

平成30年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究」

分担研究報告書

食品由来サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の耐性分布と
遺伝特性に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	佐々木貴正	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	中山達哉	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	中村寛海	大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
研究協力者	坂田淳子	大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課
研究協力者	森 篤志	日本食品検査首都圏事業所
研究協力者	五十君静信	東京農業大学応用生物科学部
研究協力者	村上覚史	東京農業大学農学部

研究要旨：ESBL/AmpCβラクタマーゼ産生大腸菌はブロイラー等の肉用鶏から高率に分離され、鶏肉への汚染源として位置づけられつつあるが、同じく食用に供される採卵鶏の汚染実態については極めて限定的な知見に留まる。そこで本分担研究では採卵鶏を対象にESBL/AmpCβラクタマーゼ産生大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクターの保菌率を調査した。結果として、ESBL/AmpCβラクタマーゼ産生大腸菌は35盲腸便検体（42.9%）より検出され、若齢鶏は高齢鶏に比べ相対的に高率であった。分離株計68株のESBL/AmpC遺伝子型はCTX-M-1が最も多く、系統型としてはB1型及びD型が多くを占めた。試験管内でのCTX-M-1遺伝子とマウス糞便常在菌の共培養を通じ、外来DNAからの薬剤耐性移行は見られず、その移行効率は極めて低いものと推察された。採卵鶏におけるサルモネラ検出率は肉用鶏に比べて低く、耐性頻度も相対的に低い値を示した。カンピロバクターは高い検出率ながら、分離株のCPFX、NAに対する耐性率は肉用鶏で見られる成績に比べて低い傾向を示した。肉用鶏を処理する食鳥処理場2施設でのサルモネラ属菌汚染動態を盲腸便及びムネ肉を対象に調査した結果、両検体で共通性の高い血清型、薬剤耐性状況が認められ、処理工程を通じた交叉汚染を制御する重要性が改めて示された。国内のヒト及び動物由来*C. coli*の薬剤感受性を調査したところ、ヒト臨床分離株では鶏由来株と共に、CPFX、NA、TC等に対する高い耐性率を認めた一方、豚由来株ではEM、TC等への耐性傾向を示した、豚由来代表株であるST-1562株はゲノム上にTC、ABPC、SM耐性遺伝子等を遺伝子クラスターとして保有しており、EM耐性は一塩基置換により獲得されたことが示されたこと等から、豚はヒトの直接的な*C. coli*感染源として機能する可能性は低いと目された。次年度以降には鶏肉におけるESBL産生大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター等の食鳥処理を通じた汚染・薬剤耐性動態を衛生管理実態を踏まえて調査すると共に、生体内における細菌間での耐性遺伝子移行に関する検討を進めることで、食品を介した薬剤耐性菌感染症の位置づけについて考察を行いたい。

A. 研究目的

これまでの研究の発展の成果として、食品においても様々な薬剤耐性菌が分布することが

徐々に明らかになりつつある。特に、鶏肉については、ESBL産生菌のほか、ヒト食中毒起因菌であるサルモネラ属菌やカンピロバクター

等においても薬剤耐性が浸淫している状況となっている。

本分担研究では、まず、現状では未解明であった領域として、肉用鶏と同様、採卵鶏も採卵終了後は、食鳥処理場に出荷され鶏肉として流通するが、それらの耐性菌保有状況が不明であることを踏まえ、採卵鶏における ESBL 産生大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクターの汚染実態を調査すると共に、分離株の薬剤感受性を検討することとした。また、ESBL 産生に関わる CTX-M-1 遺伝子保有プラスミド DNA をマウス腸管常在菌叢と共培養することで耐性移行の発生を検討することとした。

肉用鶏を取り扱う食鳥処理施設 2 箇所で見腸便と鶏肉（最終製品）におけるサルモネラ属菌の汚染動態並びに薬剤耐性プロファイルを明らかにすることで、衛生的な食鳥処理工程が果たす役割について考察することとした。

更に、ヒト及び動物由来 *C. coli* の薬剤感受性プロファイル及びゲノム解析を通じた、ヒト *C. coli* 感染の感染源動物について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 採卵鶏における ESBL/AmpC β ラクタマーゼ産生大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター汚染実態調査

採卵鶏 41 農場から若齢鶏（114-280 日齢）及び老齢鶏（336-701 日齢）から盲腸便（ESBL 産生大腸菌、サルモネラ属菌）または総排泄口スワブ（カンピロバクター）を採材し、当所へ 48 時間以内に冷蔵輸送した。

①ESBL 産生大腸菌の検出試験

検体 1g に対し、CTX 1 μ g/mL 含有緩衝ペプトン水 9 mL を加え攪拌した。同懸濁液 100 μ L を CTX 1 μ g/mL 含有 MacConkey 寒天培地

に塗抹し、37 度で 24 時間培養を行った。平行して、上記懸濁液残液を 37°C で 24 時間培養後、培養液 100 μ L を CTX 1 μ g/mL 含有 MacConkey 寒天培地に塗抹し、37°C で 24 時間培養後の定型発育集落を培地一枚あたり 2 個無作為に抽出し、生化学性状試験（TSI と LIM）に供した。生化学性状試験により大腸菌と同定された集落は、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験に供すると共に、DNA を抽出し、マルチプレックス PCR により、ESBL/AmpC、Phylogenetic group の遺伝子型別を行った。

②サルモネラ属菌及びカンピロバクターの検出試験

サルモネラ属菌については、検体 1g を対象として、カンピロバクターについては総排泄口スワブ全量を対象として、ISO 6579:2016 及び ISO 10272-1: 2017 に準じて定性検出試験を行った。分離株の薬剤感受性試験は CLSI 法により実施した。

2. 生体外環境でのマウス糞便常在菌への耐性遺伝子移行に関する検討

SPF-DDY マウス 8 週齢メス 3 匹からそれぞれ糞便 0.05g を採材し、LB 培地 450 μ L 中に破碎した（糞便破碎液）。鶏由来 CTX-M-1 保有 ESBL 産生大腸菌 LHC2-2-2 株より CTX-M-1 プラスミド DNA を抽出し、同 DNA 10ng または 100ng（/100 μ L）を上述のマウス糞便破碎液 100 μ L と混合し、LB 培地 800 μ L を加えた後、37°C で 2 時間または 21 時間共培養を行った。培養後には、それぞれの共培養液 100 μ L を Nutrient 寒天培地、CTX 1 μ g/mL 含有 Nutrient 寒天培地、CTX 1 μ g/mL 含有 Mac-Conkey 寒天培地に塗抹し、37°C、24 時間後に各培地上に発育する集落数を求めた。CTX 1 μ g/mL 含有 Nutrient 寒天培地上の発育集落については、Colony sweep した後、DNA を抽出し、CTX-M-1 特異的検出用プライマー

(5'-GAATTAGAGCGGCAGTCGGG-3', 5'-CA CAACCCAGGAAGCAGGC-3') を用いた PCR 法により当該遺伝子獲得の有無を確認した。

3. 食鳥処理場におけるサルモネラ属菌の動態
食鳥処理場 A・B の協力を得て、盲腸内容 (N=5) 及び同一鶏群由来のムネ肉 (N=1) を計 6 回継続的に採材した。盲腸内容 1g、またはムネ肉 30g を対象に ISO 6579:2016 に準じて分離培養を行った。得られた分離株の薬剤感受性試験は CLSI 法に拠った。

4. *C. coli* 分離株の薬剤感受性試験及びゲノム解析

ヒト臨床分離株計 42 株、鶏・牛・豚由来株各 25 株、及びカモ由来株 2 株を対象として、CLSI 法に準じて薬剤耐性試験を行った。また、豚由来代表株である ST-1563 株 4 株より DNA を抽出し、Ion CHEF/S5 を用いてゲノム情報を収集・解析した。

C. 結果

1. 採卵鶏における ESBL/AmpC β ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌状況

採卵鶏からの ESBL/AmpC 大腸菌の検出陽性率は 42.9% (35/82) であり、若齢群 56.1% (23/41) 及び老齢群 29.3% (12/41) と前者は後者に比べて、高い傾向であった (表 1)。分離株全 68 株の ESBL/AmpC の遺伝子型を求めたところ、CTX-M-1 が最も多く (39.7%, 27/68)、CMY-2 が 30.9% (21/68) とこれに続いた (表 2)。Phylogenetic group は B1 型が 39.7% (27/68) と最も多く、次いで D 型の 27.9% (19/68) であった (表 2)。

2. マウス糞便常在菌への耐性遺伝子移行
マウス糞便常在菌約 10^5 CFU を CTX-M-1 遺伝子を保有するプラスミド DNA と共培養したところ、培養条件によらず、CTX 含有 Nutrient

寒天培地上では概ね 10^2 から 10^4 CFU/mL の細菌の発育を認めた (図 1)。一方、CTX 含有 MacConkey 寒天培地上には集落の発育を認めなかった (図 1)。CTX 含有 Nutrient 培地上の発育集落を *ctx-M-1* 特異的 PCR に供したが、いずれも陰性であった。

3. 採卵鶏におけるサルモネラ属菌及びカンピロバクターの保菌並びに薬剤感受性

サルモネラ属菌は 49 農場中 6 農場 (13%) から分離され、A 農場由来 *S. Altona* は TP 耐性、D 農場由来 *S. Albany* は SM 耐性であった (表 3)。サルモネラワクチン接種との関係では、ワクチン接種を実施している A・B 農場でもサルモネラが分離されたが、ワクチン成分とは異なる O 群血清型のみが検出されていた (表 3)。

カンピロバクターは、全農場から分離され、71%は若齢・高齢両鶏群共に陽性であった (表 4)。分離株の薬剤耐性状況として、若齢群の CPFX 耐性は高齢群よりも有意 ($P < 0.01$) に高かったほか、ABPC 耐性は約 3 割で認められた (表 5)。

4. 食鳥処理場におけるサルモネラ属菌の汚染動態

食鳥処理場 A : 6 鶏群中 5 鶏群から第 3 世代セファロスポリン及び TP、ABPC、SM 耐性の *S. Infantis* が盲腸内容及び同一鶏群のムネ肉から分離された (表 6)。

食鳥処理場 B : 2 鶏群の盲腸内容及び 4 鶏群のムネ肉から SM 耐性の *S. Manhattan* が、4 鶏群の盲腸内容及び 3 鶏群のムネ肉から SM、TP 耐性の *S. Schwarzengrund* が分離された (表 6)。

5. *C. coli* の薬剤耐性及びゲノム解析

ヒト臨床分離 *C. coli* 42 株の薬剤耐性プロファイルとしては、NA 耐性が 29 株 (69%)、TC 耐性が 26 株 (62%)、CPF_X 耐性が 25 株 (60%) の順に高く、EM 耐性は 2 株 (5%)

のみで認められた(表 7)。ニワトリ由来 25 株では、ヒト由来株と同様に CPF_X と NA 耐性が 18 株 (72%)、TC 耐性が 15 株 (60%) と高く、ウシ由来株は TC 耐性が 2 株 (8%)、CPF_X が 3 株 (12%) であった。ブタ由来 25 株は、ABPC と TC 耐性が 22 株 (88%) と高率であったほか、EM 耐性も 14 株 (56%) と他宿主由来株に比べ高い傾向を示した (表 7)。

ブタ由来代表株で TC, EM 共耐性を示した ST-1562 株について、ドラフトゲノム配列データを取得し、薬剤耐性遺伝子を探索したところ、当該株はプラスミドの有無にかかわらず、何れもゲノム上に耐性遺伝子を保有していることが明らかとなった (図 2)。

D. 考察

1. 採卵鶏における ESBL/AmpCβラクタマーゼ産生大腸菌の汚染実態

：採卵鶏での ESBL/AmpCβラクタマーゼ産生大腸菌汚染状況調査を通じ、若齢鶏での高率保菌が確認された。同内容は、採卵鶏が育成段階で既に当該耐性菌暴露を受けた可能性を示唆するものと思われる。分離株の遺伝子型として CTX-M-1 が最も多い状況であったが、過去には肉用鶏では CMY-2 が多く検出されたとの報告もあることから、国内の採卵鶏と肉用鶏に蔓延する ESBL/AmpC βラクタマーゼ産生大腸菌の遺伝子型には異なる傾向があるかもしれない。

2. マウス糞便常在菌への外来 CTX-M-1 遺伝子移行について

：CTX 含有 MacConkey 寒天培地で菌の検出が認められなかったことから、腸内細菌科菌群における CTX 耐性は獲得されていないと考えられた。CTX 含有 Nutrient 寒天培地では外来 DNA の量及び共培養時間によらず細菌の出現を認めたこと、並びに CTX 含有 Nutrient 寒天培地上の代表集落から CTX-M-1 遺伝子は認め

られなかったことから、供試したマウス糞便中に CTX に対する自然耐性菌が存在した可能性が示唆された。本条件におけるマウス糞便常在菌約 10⁵CFU での外来 CTX-M-1 遺伝子移行効率は少なくとも 100 Transformants/1μg(同プラスミド DNA として)未満と推定された。

3. 採卵鶏におけるサルモネラ属菌の汚染実態及び薬剤耐性

：採卵鶏からは、肉用養鶏で流行が懸念される *S. Schwarzengrund* は検出されなかった。肉用鶏で高頻度に認められる多剤耐性サルモネラ属菌株は検出されず、またワクチン投与の有無との間で明確な関連性も認められなかった。今後、採卵鶏及び肉用鶏間での飼養管理やワクチン投与等に関する更なる学術知見の蓄積が農林水産省及び関係部局により整理されることで、本菌の汚染状況をより科学的に把握することが可能となるものと期待される。

4. 採卵鶏におけるカンピロバクターの汚染実態及び薬剤耐性

：採卵鶏は、既報の肉養鶏と同等のカンピロバクター保菌状況を顕した。分離株の薬剤耐性として CPF_X 耐性は TC、ABPC、NA と共に一定の出現頻度を認めたものの、一般的な肉用鶏に比べると低い傾向を示した。

5. 食鳥処理場における肉用鶏のサルモネラ属菌の汚染動態

：処理場 A では多剤耐性 *S. Infantis* が、処理場 B では 2 剤耐性 *S. Schwarzengrund* 及び *S. Manhattan* がそれぞれ盲腸内容とムネ肉の間で共通して認められ、食鳥処理工程を通じた交叉汚染が鶏肉汚染の主たる汚染要因であることが示された。現在、食鳥処理場の HACCP の手引書も作成・公表される状況となっており、こうした衛生対策の効果が耐性菌の処理工程を通じた動態へどのように影響するかについても評価検討する意義があるものと思われる。

6. ヒト及び動物由来 *C. coli* の薬剤耐性状況

：ヒト由来 *C. coli* の薬剤耐性は TC、CPFX、NA で高く、特にニワトリ由来株は類似した傾向を示した。一方、豚由来株は EM、TC、ABPC 耐性率が高い状況であった。豚由来株で高い占有率を認めた ST-1562 代表株はゲノム解析を通じ、ゲノム上に遺伝子クラスターとして TC、ABPC、SM 耐性遺伝子等を保有していること、EM については一塩基置換による耐性獲得であることも明らかとなった。プラスミド性の耐性遺伝子水平伝播が薬剤耐性の拡大に大きく寄与しているとされる現状を鑑みて、豚はヒトへの直接的な感染源として機能している可能性は低いと推察された。

E. 結論

1) 複数の採卵鶏を対象とした汚染実態調査を通じ、以下の知見を得た。

・ESBL/AmpC β ラクタマーゼ産生大腸菌は約 43%より検出され、そのうち、CTX-M-1 が最も高率に関与を示した。

・サルモネラ属菌は 49 農場中 6 農場で検出されたが、肉用鶏で流行する *S. Schwarzengrund* は検出されず、また多くは薬剤感受性であった。

・カンピロバクターは高率に検出されたが、肉用鶏に比べ、総じて低い CPFX 耐性率であった。

2) 外来 DNA 曝露によるマウス腸管内常在菌の ESBL 耐性獲得は低い発生確率にあることを試験管内での検討を通じて示した。

3) 食鳥処理場での検討を通じ、肉用鶏の鶏肉におけるサルモネラ汚染は盲腸便の汚染と相関する動態を示し、工程中での交差汚染が本菌の鶏肉汚染の主たる経路であることが改めて示された。今後、各処理施設での衛生管理実態を踏まえた上で、ESBL 産生大腸菌やカンピロバクターを含めた耐性菌動態を把握する必要があると思われる。

4) *C. coli* の薬剤耐性実態として、ヒト臨床分

離株は TC、CPFX、NA 耐性率が高く、鶏及び牛由来株は類似する傾向であったが、豚由来株は EM、TC、ABPC 耐性率が高いことから、後者は直接的なヒトへの感染源としての可能性は低いと目された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Asakura H, Sakata J, Nakamura H, Yamamoto S, Murakami S. Phylogenetic diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* from humans and animals in Japan. *Microbes and Environments*. In press.

2) 山本詩織、森 篤志、朝倉 宏：国内市販鶏挽肉におけるカルバペネム耐性菌の汚染実態調査. 日本防菌防黴学会誌、47(2)、47-51、2019

2. 学会発表

1) 山本詩織、森 篤志、朝倉 宏：国内市販鶏挽肉におけるカルバペネム耐性腸内細菌科菌群の汚染実態に関する検討. 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会、東京都、2018 年 11 月 14 日。

2) 中山達哉、佐々木貴正、山口貴弘、河原隆二、岡田由美子、朝倉 宏、五十君静信. 採卵鶏農場における薬剤耐性大腸菌汚染実態調査. 第 39 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 30 年 9 月 27 日、大阪

3) 中山達哉、佐々木貴正、朝倉 宏、五十君静信. 食鳥処理場における薬剤耐性大腸菌の汚染実態. 日本食品衛生学会第 114 回学術講演会. 平成 30 年 11 月 15 日、広島。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 採卵鶏におけるESBL/AmpC陽性大腸菌の検出成績概要

	若齢群	老齢群	計
ESBL/AmpC 陽性株	56.1% (23/41)	29.3% (12/41)	42.9% (35/82)

P<0.05
(Fisher's exact test)

表2 ESBL/AmpC陽性大腸菌分離株における遺伝特性解析結果

(A) ESBL/AmpC

遺伝型	占有率 (陽性数/供試数)
CTX-M-1	39.7% (27/68)
CTX-M-2	4.4% (3/68)
CTX-M-14	10.3% (7/68)
CTX-M-15	5.9% (4/68)
CTX-M-27	5.9% (4/68)
CMY-2	30.9% (21/68)
その他	2.9% (2/68)
計	68

(B) Phylogenetic group

Phylogenetic group	占有率 (陽性数/供試数)
A	11.8% (8/68)
B1	39.7% (27/68)
B2	5.9% (4/68)
D	27.9% (19/68)
不特定	14.7% (10/68)
計	68

表3 採卵鶏からのサルモネラ属菌検出状況

	A農場	B農場	C農場	D農場	E農場	D農場		
鶏群 (日齢)	若齢群 (129)	高齢群 (639)	若齢群 (158)	高齢群 (523)	若齢群 (193)	若齢群 (237)	若齢群 (168)	
血清型 (O型)	Altona (08)	Corvallis (08)	Thompson (07)	Thompson (07)	Thompson (07)	Infantis (07)	Cerro (018)	Albany (08)
薬剤耐性	P	sus	sus	sus	sus	sus	sus	S
サルモネラ ワクチン	SE, ST, SI	SE, ST, SI	無	無	無	無	無	無

S: streptomycin, P: trimetoprim, sus: susceptible, SE: *S. Enteritidis*(O9群), ST: *S. Typhimurium*(O4群), SI: *S. Infantis*(O7群).

表4 採卵鶏からのカンピロバクター検出状況

陽性 農場数	両鶏群 陽性数	若齢群 (114~280日齢)			高齢群 (336~770日齢)		
		陽性鶏群: 41 (84%)			陽性鶏群: 43 (88%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	両方	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	両方
49 (100%)	35 (71%)	30	3	8	27	4	12

表5 採卵鶏由来カンピロバクター分離株の薬剤耐性状況

		株数	ABPC	TC	NA	CPFX
<i>C. jejuni</i>	全体	77	23(30%)	17(22%)	14(18%)	14(18%)
	若齢群	38	13(34%)	10(26%)	13(34%)	13(34%)
	高齢群	39	10(26%)	7(18%)	1(3%)	1(3%)
<i>C. coli</i>	全体	27	5(19%)	5(19%)	4(15%)	4(15%)
	若齢群	11	1(9%)	2(18%)	1(9%)	1(9%)
	高齢群	16	4(25%)	3(19%)	3(19%)	3(19%)

表6 食鳥処理場における肉用鶏盲腸内容及びムネ肉からのサルモネラ属菌検出状況
(食鳥処理場 A)

調査回	陽性検体数/5	盲腸内容物		ムネ肉
		血清型と薬剤耐性		血清型と薬剤耐性
第1回	3/5	Infantis (A + F + C + R + P)		Infantis (A + F + C + R + P)
第2回	1/5	Infantis (A + F + C + R + P)		Infantis (A + F + C + R + P)
第3回	4/5	Infantis (A + F + C + R + T + P)		Infantis (A + F + C + R + T + P)
第4回	4/5	Infantis (A + F + C + R + P)	OUT _r ,1,5 (A + F + C + R + P)	Infantis (A + F + C + R + P)
第5回	4/5	Infantis (A + F + C + R + T + P)		Infantis (A + F + C + R + T + P)
第6回	1/5	Anatum (R)		Anatum (R)

A: ampicillin, F: cefazolin, C: cefotaxime, R: streptomycin, T: tetracycline, P: trimethoprim

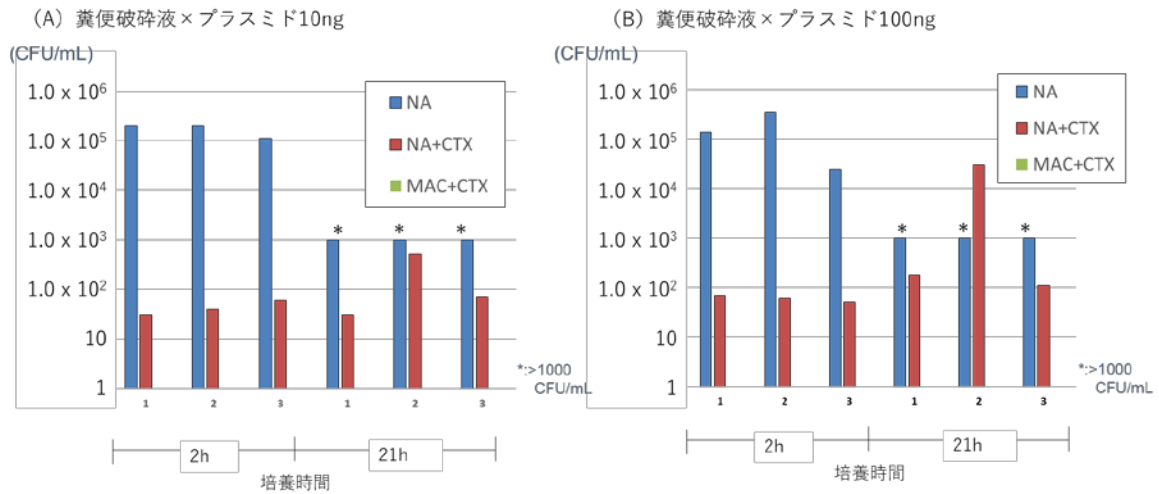
(食鳥処理場 B)

調査回	陽性検体数/5	盲腸内容物		ムネ肉
		血清型と薬剤耐性		血清型と薬剤耐性
第1回	4/5	Manhattan (R + T)		Manhattan (R + T)
第2回	5/5	Schwarzengrund (R + T)		Manhattan (R + T)
第3回	4/5	Schwarzengrund (R + T)		Manhattan (R)
第4回	2/5	Manhattan (R)		Schwarzengrund (R + T)
第5回	1/5	Schwarzengrund (R + T + P)		Schwarzengrund (R + T + P)
第6回	1/5	Schwarzengrund (R + T + P)	Schwarzengrund (R + T + P)	Manhattan (R + T)

R: streptomycin, T: tetracycline, P: trimethoprim.

表7 ヒト及び動物由来 *C. coli* 株の薬剤耐性状況

由来	菌株数	薬剤耐性株数 (耐性率)					
		TC	EM	CPFX	NA	ABPC	GM
ヒト	42	26 (62%)	2 (5%)	25 (60%)	29 (69%)	11 (26%)	1 (2%)
ニワトリ	25	15 (60%)	0 (0%)	18 (72%)	18 (72%)	0 (0%)	0 (0%)
ブタ	25	22 (88%)	14 (56%)	2 (8%)	1 (4%)	22 (88%)	0 (0%)
ウシ	25	2 (8%)	0 (0%)	3 (12%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
カモ	2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)



NA: Nutrient agar, NA+CTX: Nutrient agar containing cefotaxime 1μg/mL, MAC+CTX: MacConkey agar containing cefotaxime 1μg/mL

図1 CTX-M-1保有プラスミドとの共培養を通じた、マウス糞便常在菌の各条件下での発育状況

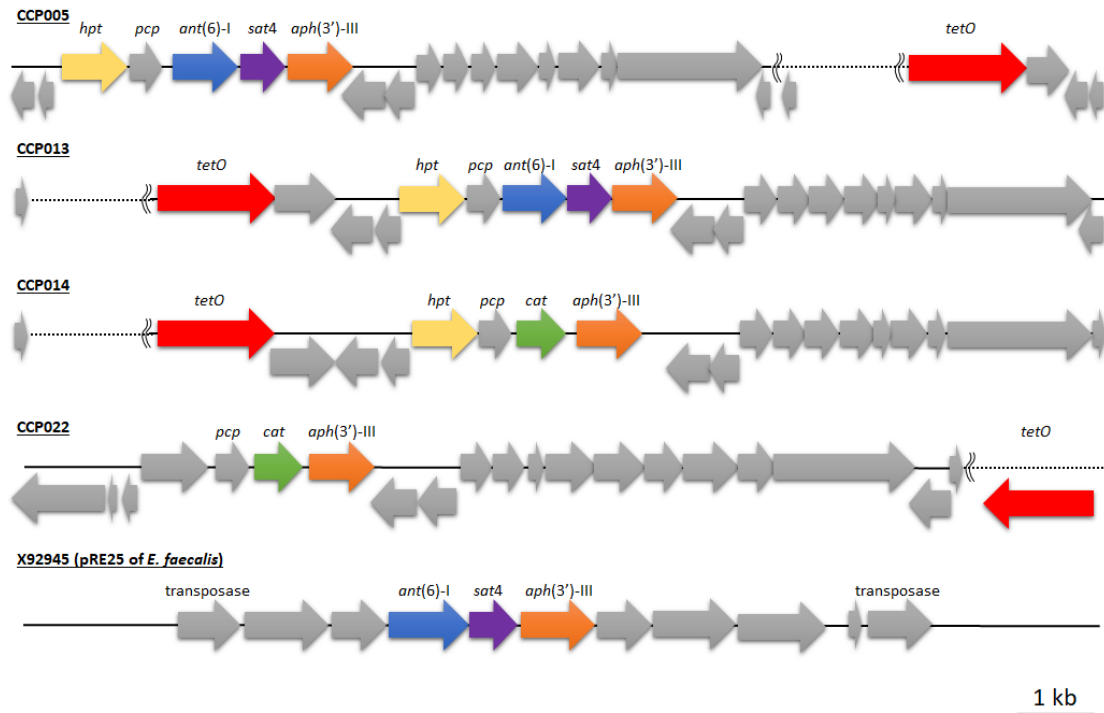


図2 ブタ由来 *C. coli* ST-1562 代表株のゲノム上耐性遺伝子クラスター