

令和元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	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	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	清水秀樹	山梨県食肉衛生検査所

**研究要旨：** 鶏肉 100 検体及び中抜き食鳥と体 100 検体における ESBL/AmpC  $\beta$  ラクタマーゼ産生大腸菌及び同腸内細菌科菌群の定量的汚染実態を調査した。鶏肉計 100 検体のうち、ESBL 産生大腸菌は 29 検体、ESBL 産生腸内細菌科菌群は 21 検体より検出された。両対象菌の平均菌数は、それぞれ 2.34 logCFU/g 及び 3.06 logCFU/g であり、最大値は 2.36 logCFU/g 及び 3.23 logCFU/g であった。ムネ・モモの部位間で ESBL 産生菌の検出菌数には有意差を認めなかった。また、食鳥と体計 100 検体のうち、大腸菌は 12 検体、腸内細菌科菌群は 27 検体より検出された。ESBL 産生大腸菌および同腸内細菌科菌群の平均菌数はそれぞれ 2.61 logCFU/g 及び 2.45 logCFU/g であり、最大値は 3.26 logCFU/g 及び 3.11 logCFU/g であった。また、採卵鶏由来サルモネラ属菌及びカンピロバクター分離株を解析したところ、サルモネラでは近年肉用若鳥で高頻度に検出される *S. Schwarzengrund* は認められなかったほか、カンピロバクターでは CPF<sub>X</sub> 耐性率は低い結果となったことから、採卵鶏は肉用若鳥とは保有する薬剤耐性菌の保有状況が異なる可能性が示唆された。

次年度には鶏肉・食鳥と体由来 ESBL 産生大腸菌等の分子疫学解析を進めるほか、生体内での水平伝播に関する知見の集積を図りたい。また、生産段階ではサルモネラ属菌、カンピロバクター等の汚染実態を抗菌性薬剤の使用状況と紐づけることで、耐性菌の動向及び対策を講じる上での要因の抽出を図る予定である。

## A. 研究目的

ESBL/AmpC  $\beta$  ラクタマーゼ産生大腸菌は鶏肉から高率に検出される状況にあるとされ、当該食品を介したヒト健康被害との

関連性も推察されている。しかしながら、当該耐性菌の汚染実態として報告される成績の多くは、定性的な汚染実態あるいは分

離株の特性に留まることが多い。一方、食品のリスク評価を行う上では定量的データに基づいた分析が国際標準となっている。

本分担研究では、こうした状況を踏まえ、国内で製造加工・流通販売される鶏肉製品のほか、その上流にあたる食鳥処理場で解体処理過程にある食鳥と体を対象として、ESBL 産生菌の定性・定量的汚染実態を調査すると共に、分離株の薬剤感受性を検討した。あわせて、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汚染実態及び分離株の薬剤感受性についても検討を行ったので、報告する。

## B. 研究方法

### 1. 鶏肉製品及び食鳥と体からの ESBL 産生菌の定量検出試験

国内で製造加工・流通販売される加熱用鶏肉製品計 100 検体（モモ及びムネ）並びに食鳥処理場にて本冷却後の中抜き食鳥と体より採材した首皮計 100 検体について、ESBL 産生菌定量試験に供した。検体 25g に緩衝ペプトン水（BPW）100mL を加えてホモジナイズ後、同懸濁液 200 $\mu$ L をクロモアガー-ESBL 寒天培地（CHROMagar）に塗抹し、37°Cにて 24 時間培養を行い、同培地上に発育した定型集落を計数することで定量菌数を求めた。

### 2. 鶏肉製品及び食鳥と体からの ESBL 産生大腸菌の定性検出試験と分離株の薬剤感受性試験

上項 1 の鶏肉製品及び食鳥と体検体計 200 検体について、ESBL 産生大腸菌の定性検出試験を実施した。各検体 25g にセフ

ォタキシム（CTX）1 $\mu$ g/mL 含有 BPW225mL を加えて 10 倍乳剤を調整した後、37°Cで 24 時間増菌培養を行った。培養後、増菌培養液一白金耳量をクロモアガー-ESBL 寒天培地に画線塗抹し、37°C24 時間培養を行い、ESBL 産生大腸菌の発育を確認した。その後、陽性と判定された集落については、分離を行い、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験に供した。

### 3. 採卵鶏農場におけるサルモネラ及びカンピロバクター定性検出試験及び分離株の薬剤感受性試験

8 協力農場にて、若齢鶏群と高齢鶏群の計 16 鶏群を対象として各群 3 羽の総排泄腔スワブを採材し、サルモネラ及びカンピロバクター定性検出試験を実施した。得られた分離株については、上項 3.と同様に薬剤感受性試験を行った。

## C. 研究結果

### 1. 国内鶏肉製品における ESBL 産生菌の部位別検出成績

まず、鶏肉製品 5 検体を対象として、皮及び筋肉部位それぞれを採材し、ESBL 産生菌の検出状況について比較を行った。結果として、両部位共に ESBL 産生大腸菌は認められなかったが、1 検体の皮部位からは ESBL 産生腸内細菌科菌群（*Klebsiella* spp.、*Enterobacter* spp.、*Citrobacter* spp. 等）が認められた（表 1）。また、いずれの検体においても、その他の ESBL 産生菌が皮部位から多く検出される傾向が認められ

た。以上の成績を基に、以降の試験では皮部位を対象として検討を進めることとした。

## 2. 食鳥と体検体における ESBL 産生菌の定量検出状況.

食鳥と体計 100 検体のうち、大腸菌は 12 検体、腸内細菌科菌群は 27 検体より検出され、同対象菌の何れかが検出された検体数は 30 検体にのぼった (図 1)。ESBL 産生大腸菌および同腸内細菌科菌群の平均値は、それぞれ 2.61 logCFU/g 及び 2.45 logCFU/g であり、最大値は 3.26 logCFU/g 及び 3.11 logCFU/g であった。検出下限 (1.40~1.70 logCFU/g) 未満となった検体数は 70 検体であった。

## 3. 鶏肉検体における ESBL 産生菌の定量検出状況.

鶏肉製品計 100 検体のうち、大腸菌は 29 検体、腸内細菌科菌群は 21 検体検出され、これらのいずれかが検出された検体数は 41 検体にのぼった (図 1)。ESBL 産生大腸菌及び同腸内細菌科菌群の平均値は、それぞれ 2.34 logCFU/g 及び 3.06 logCFU/g であり、最大値は 2.36 logCFU/g 及び 3.23 logCFU/g であった。検出下限 (1.40~1.70 logCFU/g) 未満となった検体数は 59 検体であった。ムネ・モモの部位別に ESBL 産生菌の検出菌数を比較したが、両部位間の成績に有意差は認められなかった (図 2)。

## 4. 鶏肉製品及び食鳥と体検体における ESBL 産生大腸菌の定性検出状況.

ESBL 産生大腸菌の陽性率は、鶏肉製品

検体では 69.0% (69/100) (うち、モモ 74.5% (41/55)、ムネ 62.2% (28/45))、食鳥と体検体では 47.0% (47/100) となり、全体の陽性率は 58.0% (116/200) であった (図 3)。

## 5. 鶏肉及び食鳥と体検体由来 ESBL 産生大腸菌株の薬剤耐性状況

ESBL 産生大腸菌分離株の薬剤耐性率は、ABPC の他、TC 耐性が 8.7%、SM 耐性が 65.3%、ST (SMX/TMP) 耐性が 58.9% の順に高値を示した (表 2、3)。CPFX 耐性株も 36.7% で認められた。鶏肉製品検体及び食鳥と体検体の間では、GM 及び CP の耐性率に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

## 6. 採卵鶏におけるサルモネラ及びカンピロバクター定性検出状況及び分離株の薬剤耐性状況.

8 農場 16 鶏群の採卵鶏より計 9 株 (*C. jejuni* 8 株及び *C. coli* 1 株) のカンピロバクターを分離した。これらのうち、CPFX 耐性は *C. jejuni* 2 株のみで認められた。サルモネラについては、10 株が分離され、これらの血清型別内訳は、*S. Thompson* が 3 株のほか、*S. Infantis*、*S. Altona*、*S. Corvallis*、*S. Albany*、*S. Haifa*、*S. Cerro* 等が各 1 株であった (表 4)。

## D. 考察

国内で製造加工される過程にある食鳥と体検体からは、ESBL 産生大腸菌が高率で分離された。本研究では定性データのみな

らず定量データの創出をはかった。

概して食品の微生物リスク評価にあたっては、定量的なデータに基づく解析が国際標準となっている。その意味において、本年度得られた ESBL 産生菌に関する定量データは、こうしたリスク評価等にあたっての基礎資料としての活用が期待される。

一方、鶏肉喫食に伴うヒト生体内での耐性因子の水平伝播効率については依然として把握されておらず、当該耐性菌のリスク分析を行う上では、関連する知見の集積が必要と思われる。

食中毒菌を対象とした薬剤耐性状況を図る上では、対象菌の汚染実態をあわせて捉えることも必要不可欠である。既報として、肉用若鳥の鶏肉及び内臓肉等からは、サルモネラ属菌及びカンピロバクターが高率に検出されているが、本研究で実施した採卵鶏を対象とした両食中毒菌分離株の薬剤感受性試験結果は、肉用若鳥で認められる高い薬剤耐性率に比べ、相対的に低い傾向にあると考えられる。採卵鶏は肉用若鳥に比べ、長期的な飼育がおこなわれていることから、こうした飼育期間の差異が当該菌の薬剤耐性率と関連する可能性も示唆された。

カンピロバクターのうち、肉用若鳥由来株については、高い CPFX 耐性率を示す傾向が近年続いているとされるが、*C. jejuni* による CPFX 耐性獲得は *gyrAB* 遺伝子の点変異による割合が極めて高い。同剤耐性獲得が既に一定程度侵淫している現状からの大きな耐性率低減は、生産段階での同薬剤使用中止のみによっては期待し難いと思われる。一方、近年穏やかな上昇傾向を示す

同菌のテトラサイクリン耐性については、ESBL 産生菌と同様に、プラスミド性の水平伝播により獲得される割合が高いとされ、生産農場等での使用制限等による効果は相対的に期待度が大きいとも目される。生産段階等における薬剤の使用制限設定や家畜・家禽のモニタリングを実施する際には、対象菌のこれまでの耐性率等の疫学実態のみに執着することなく、薬剤耐性獲得機序を十分に考慮することがより合理的と考えられる。

以上を踏まえ、次年度は、複数の肉用若鳥生産農場における抗菌剤使用実態に関する情報を紐づけた形で各農場での侵淫状況を調査する予定である。これにより、生産段階での耐性菌汚染実態を見極め、更なる対策を講じるための知見を得ることが期待される。また、市販鶏肉・食鳥と体由来サルモネラ及びカンピロバクター菌株の薬剤耐性状況についても次年度に取り纏め、報告を行う予定である。

## E. 結論

国内の市販鶏肉製品及び食鳥と検体からは高率かつ一定菌数の ESBL 産生菌が検出される状況を把握することができた。フードチェーンを通じた汚染低減及び増殖抑制に係る対策の重要性を改めて示すことができたともいえる。採卵鶏は、肉用若鳥に比べ、相対的に低いサルモネラ・カンピロバクター汚染率を示した。採卵鶏由来サルモネラの血清型別は肉用若鳥とは異なる傾向も示唆された。今後、ESBL 産生菌につ

いては分離株の遺伝的解析を進めると共に、生体内伝達性に関する知見の集積を図ることにより広範なフードチェーンを通じた耐性菌の食品媒介性に関する科学的知見の集積につとめたい。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto S, Nakayama T, Asakura H. Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* CRB139-1 isolated from poultry meat in Japan. Microbiol. Res. Announc, In Press.
- 2) 佐々木貴正、米満研三、上間匡、五十君静信、朝倉宏. (2019) 採卵養鶏場のサルモネラ汚染実態と有効なサルモネラ汚染低減対策の推定. 鶏病研究会報. 55: 159-163.

### 2. 学会発表

- 1) 山本詩織、朝倉宏：鶏肉におけるカルバペネム耐性菌汚染実態及び *Stenotrophomonas maltophilia* 分離株のゲノム特性、日本微生物生態学会第33回大会、2019年9月、山梨.
- 2) 山本詩織、川村研二、朝倉宏：外来患者由来 ESBL 産生大腸菌の分子遺伝学的特性について、第92回日本細菌学会総会、2019年4月、北海道.

表 1. 皮・筋肉部位別の ESBL 産生菌定量成績

番号	採取部位	ESBL産生菌 (log CFU/g)		
		大腸菌	腸内細菌科菌群	その他
1	皮	<1.4	2.65	>4.10
	筋肉	<1.4	<1.4	>4.10
2	皮	<1.4	<1.4	>4.10
	筋肉	<1.4	<1.4	>4.10
3	皮	<1.4	<1.4	>4.10
	筋肉	<1.4	<1.4	4.01
4	皮	<1.4	<1.4	3.95
	筋肉	<1.4	<1.4	3.79
5	皮	<1.4	1.4	3.77
	筋肉	<1.4	<1.4	3.15

(A) ESBL 産生腸内細菌科菌群

(B) ESBL 産生大腸菌

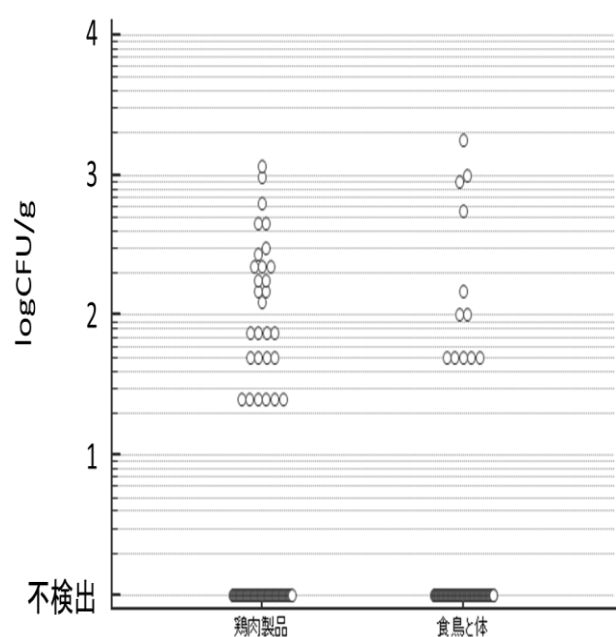
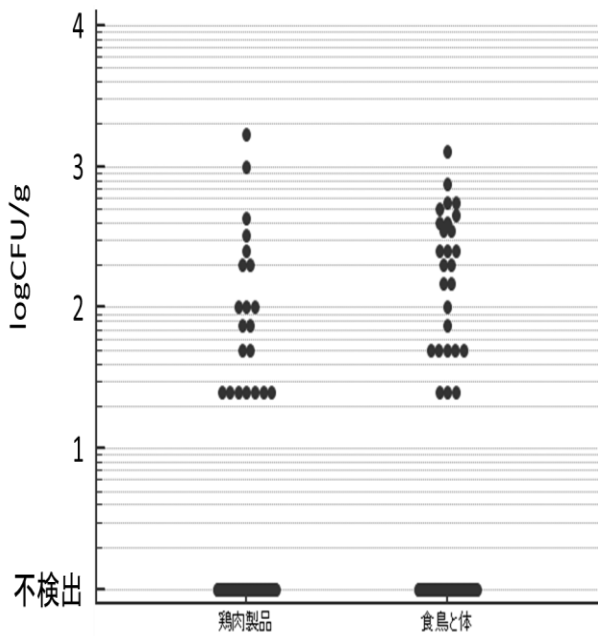


図 1. 鶏肉製品及び食鳥と体検体における ESBL 産生菌の定量検出成績.

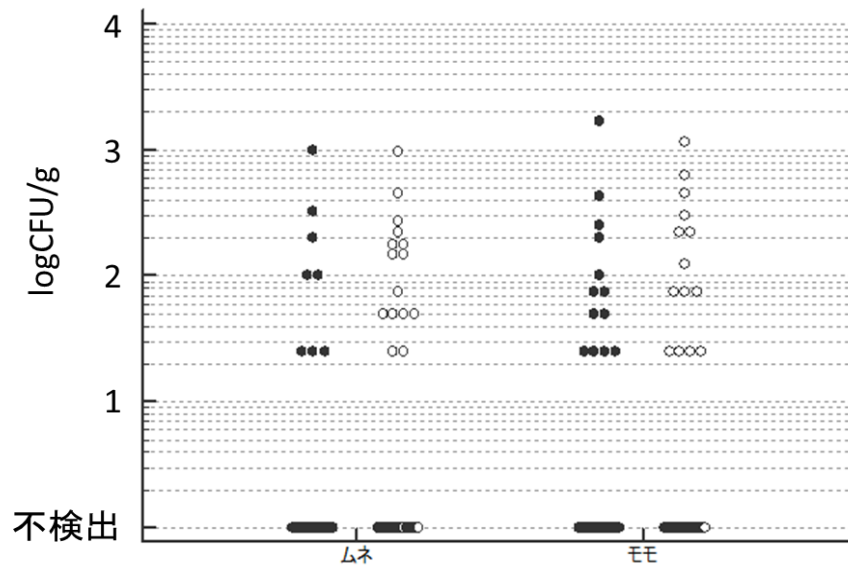


図 2. 鶏肉製品における ESBL 産生菌の部位別検出状況.

ESBL 産生腸内細菌科菌群を●、ESBL 産生大腸菌を○でそれぞれ示す。

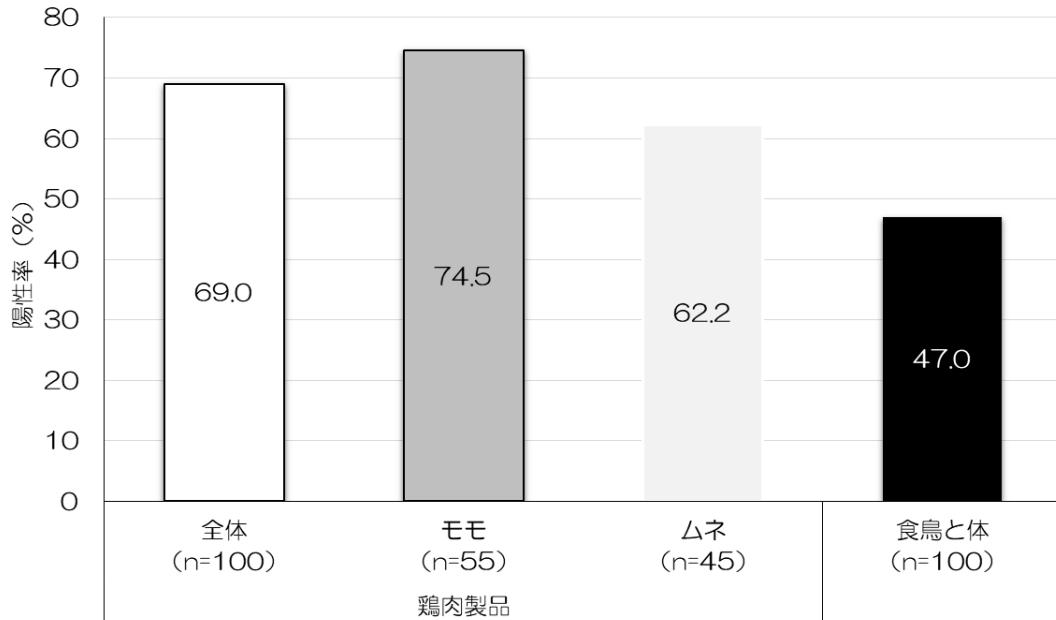


図 3. ESBL 産生大腸菌の陽性率

表 2. ESBL 産生大腸菌分離株の薬剤耐性状況.

検体	株数	ABPC		CEZ		CTX		SM		GM		KM		ST		CL		CP		TC		NA		CPFX	
		陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)	陽性数	(%)
鶏肉製品	64	64	100.0	64	100.0	64	100.0	39	60.9	25	39.1	22	34.4	39	60.9	0	0.0	13	20.3	53	82.8	30	46.9	20	31.3
食鳥と体	57	57	100.0	57	100.0	57	100.0	40	70.2	1	1.8	15	26.3	32	56.1	2	3.5	29	50.9	55	96.5	29	50.9	28	49.1
計	121	121	100.0	121	100.0	121	100.0	79	65.3	26	21.5	37	30.6	71	58.7	2	1.7	42	34.7	108	89.3	59	48.8	48	39.7

表 3. 多剤耐性を示す ESBL 産生大腸菌分離株の薬剤耐性プロファイル

耐性薬剤数	株数	薬剤耐性パターン	株数	鶏肉製品	食鳥と体
11	2	ABPC-CEZ-CTX-SM-GM-KM-ST/TMP-CP-TC-NA-CPFX	2	1	1
10	1	ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-ST/TMP-CP-TC-NA-CPFX	1	0	1
9	42	ABPC-CEZ-CTX-SM-GM-ST/TMP-TC-NA-CPFX	18	18	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-ST/TMP-CP-TC-NA-CPFX	13	0	13
		ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-CP-TC-NA-CPFX	6	0	6
		ABPC-CEZ-CTX-SM-GM-KM-ST/TMP-TC-NA	3	3	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-ST/TMP-CP-TC-NA	1	1	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-GM-KM-ST/TMP-CP-TC	1	1	0
8	22	ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-ST/TMP-CP-TC	13	6	7
		ABPC-CEZ-CTX-SM-ST/TMP-TC-NA-CPFX	7	0	7
		ABPC-CEZ-CTX-SM-GM-ST/TMP-NA-CPFX	1	1	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-ST/TMP-TC-NA	1	1	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-GM-ST/TMP-TC-NA	1	0	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-ST/TMP-CP-TC-NA	1	0	1
7	5	ABPC-CEZ-CTX-SM-ST/TMP-CL-TC	1	0	1
		ABPC-CEZ-CTX-KM-ST/TMP-CP-TC	1	0	1
		ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-ST/TMP-TC	3	3	0
6	7	ABPC-CEZ-CTX-SM-ST/TMP-TC	2	0	2
		ABPC-CEZ-CTX-KM-CP-NA	1	1	0
		ABPC-CEZ-CTX-ST/TMP-CP-TC	1	1	0
		ABPC-CEZ-CTX-KM-ST/TMP-TC	1	0	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-CP-TC	1	0	1
		ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-TC	1	0	1
5	7	ABPC-CEZ-CTX-KM-NA	3	3	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-TC	2	1	1
		ABPC-CEZ-CTX-GM-TC	1	0	1
		ABPC-CEZ-CTX-CL-TC	1	0	1
		ABPC-CEZ-CTX-CP-TC	1	0	0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-ST/TMP	1	1	0
4	27	ABPC-CEZ-CTX-TC	27	12	15
		ABPC-CEZ-CTX-SM	1	0	0
		ABPC-CEZ-CTX-NA	1	1	0
3	6	ABPC-CEZ-CTX	6	4	2



表 4. 採卵鶏由来サルモネラ分離株の血清型及び薬剤耐性プロファイル.

血清型	株数	薬剤耐性
O7 群		
<i>S. Thompson</i>	3	-
<i>S. Infantis</i>	1	-
O8 群		
<i>S. Altona</i>	1	TP
<i>S. Corvallis</i>	1	-
<i>S. Albany</i>	1	SM
O4 群		
<i>S. Haifa</i>	1	SM
O13 群		
<i>S. 13;23:y;-</i>	1	SM
O18 群		
<i>S. Cerro</i>	1	-