

**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発生動向及び衛生対策に関する研究**

**(H27-食品-一般-008)**

**平成 29 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 渡邊 治雄**

**平成 30 年 (2018 年) 3 月**

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  
平成 29 年度 総括・研究分担報告書

目次

I. 平成 29 年度総括研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 . . . . . 1

II. 平成 29 年度分担研究報告書

1. 家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARM と JANIS の連携について

研究分担者 川西 路子 農林水産省動物医薬品検査所 . . . . . 8

2. 家畜に由来する薬剤耐性菌が食品へ伝播する経路に関する研究

研究分担者 浅井 鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 . . . . . 20

3. 全国地方衛生研究所において分離される薬剤耐性菌の情報収集体制の構築

研究分担者 四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所 . . . . . 27

4. ヒトおよび食品由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者 小西 典子 東京都健康安全研究センター . . . . . 52

5. ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学

研究分担者 倉園 貴至 埼玉県衛生研究所 . . . . . 61

6. 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネジメントに関する研究

研究分担者 五十君 静信 東京農業大学 生物応用化学科 . . . . . 71

7. JANIS 事業と JVARM の連携;食品

研究分担者 柴山 恵吾 国立感染症研究所 . . . . . 78

8. 非チフスサルモネラ症の起因菌の薬剤耐性に関する研究

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 . . . . . 83

9. 食品由来の多剤耐性菌（ESBL/AmpC 産生菌、VRE など）の疫学調査  
研究分担者 富田 治芳 群馬大学大学院医学系研究科 . . . . . 89

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 105

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業  
総括研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

代表研究者 渡邊治雄 国立感染症研究所客員研究員

**研究要旨：**

家畜(JVRAN)-人(JANIS)の耐性菌の発生動向を JANIS 解析ソフト上にて一元的に把握できる体制を確立した。ここに食品由来耐性菌のデータを取り込む試みを地方衛生研究所のネットワークを駆使し施行し、実効性が高い結果を得た。我が国の耐性菌の発生動向データを WHO GLASS に報告したが、耐性菌の収集方法上の問題点を指摘されており、JANIS 参加病院における耐性菌検査の精度管理の問題を含め、方法論の改良が必要である。2011 年以降の家畜における抗菌薬使用の抑制を反映して、例えばブロイラーの ESBL 産生大腸菌の分離頻度が激減しているが、一方、人由来 ESBL 大腸菌の分離率は増加傾向にある。この乖離現象を説明できるデータは得られていないが、食鳥処理場における解体時の交差汚染による食肉への耐性菌伝播、人保菌者を介しての一人一人による耐性菌の伝播、人における抗菌薬の過度の使用による耐性菌選択圧の増加などの影響が考えられる。食鳥処理場の交差汚染の程度は、鶏の糞便中の耐性菌率に影響を受けていた。解体時の交差汚染を最小減に抑える方法論、例えば食肉消毒法の改良などとの組み合わせが必要である。ESBL 耐性大腸菌の健康者保菌率は約 5% であり、一人一人伝播への影響評価が今後必要である。食肉検体の汚染率は国産、輸入品とも 50% 近くであり、それらのヒトへの伝播リスクは不明である。耐性菌の発生動向調査だけでは伝播のルート解明には限界があるので、今後は菌体や耐性遺伝子のゲノム情報を含めた総合的解析が必要である。

**分担研究者：**

四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
川西路子	農水省動物医薬品検査所
浅井鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学 研究科
小西典子	東京都健康安全研究センター
倉園貴至	埼玉県衛生研究所
柴山恵吾	国立感染症研究所
富田治芳	群馬大学大学院

制の確立や検査法の統一を図ってきている。また、WHO は耐性菌の世界的なコントロールをめざし、Global Action Plan を示し、我が国もそれに基づき、National Action Plan を作成した。それらは、“One Health” の観点から耐性菌のサーベイランスの構築を目指すことを掲げている。本研究においては農林省で動物を対象に行われている耐性菌モニタリングシステム JVARM と厚労省で行われているヒトにおける院内感染症耐性菌サーベイランス JANIS のデータを一元的に閲覧し、評価できる手法を開発することと、今まで体系的に集められていない食品由来細菌の耐性データを取り込める体制を構築することを目的とした。食品由来耐性細菌については全国地方衛生研究所協議会に担当してもらい、恒常的にデータの収集をすする仕組みを整える方向性を付けることを目的としている。これらの体制により、国内で分離された臨床、食品および家畜由来耐

**A. 研究目的：**

耐性菌の問題は健康危機管理としても重要な国際的課題である。WHO は、世界における耐性菌の実態を明らかにするため Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) を設立し、食中毒菌などの薬剤耐性の国際的なサーベイランス体

性菌の動向の把握と、相互の比較解析から耐性菌のグローバルな循環を明らかにし、リスク評価および行政対策に供することができるようになることが期待できる。また、耐性菌分離状況の WHO への報告ができる体制も構築する。

## B. 研究方法：

- 1) 食品、家畜および医療分野の検査手法（薬剤の種類、遺伝子検査法など）を相互比較可能にして、第3世代セファロスポリン耐性大腸菌、サルモネラ等の腸内細菌における耐性遺伝子の同定及び各種セフェム系薬剤に対する感受性試験を実施する。WHO の AMR や USA の AMR 会議に参加（渡邊）し、その情報を還元するとともに、サーベイランスの統合の調整を行う。サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて、動物由来株（担当：川西、浅井）、食品由来株（四宮、小西、倉園、五十君、富田）、人由来株（四宮、小西、倉園、大西、柴山）の菌株の収集、耐性表現型、耐性遺伝子の解析を行う。食品由来 VRE の解析を行う（富田）。JANIS 院内感染由来の菌の収集、解析を行う（柴山）。
- 2) JVARM の大腸菌のアンチバイオグラムを作成するために活用した JANIS 集計用プログラムを一部改変し移植した JVARM データサーバーに、JVARM の大腸菌のデータを加工・入力し、アンチバイオグラムを作成した。それによりお互いのデータの相互変換および比較ができるようにする。JANIS の調査薬剤（LVFX、CTX、MINO、PIPC、AMK、コリスチン）の微量液体希釈法による MIC と、それぞれと同系統の JVARM の調査薬剤（ERFX、CTF、OTC、ABPC、KM、コリスチン）の寒天平板希釈法による MIC を相関係数等によって比較した。
- 3) 家畜由来の薬剤耐性及び耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を与える可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。このため、肉養鶏から鶏肉処理過程での薬剤耐性菌の伝播状況を明らかにする必要がある。①肉養鶏生産農場におけるセファロスポリン耐性菌の浸潤状況を定量的に調査し、②食肉処理過程での耐性菌の伝播の程度を調査する。ヒト、食品、家畜から分離される腸内細菌（大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、VREなど）に関して薬剤耐性状況を調査するとともに、分離菌について分子生物学的手法等（薬剤感受性試験、耐性遺伝子型別及びPFGE法による遺伝子型別）を用いて比較解析し、耐性菌あるいは耐性遺伝子の伝播経路を解明する。
- 4) 国内で市販される国産鶏肉及び輸入鶏肉を供試検体とし、ESBL産生大腸菌、VREを分離する。なお、供試検体は、地域的なバイアスがかからないように配慮し、多系列の複数店舗から購入し、産地（都道府県）が特定されている若鶏のもも肉に限定した。ESBL産生確認のためにCTX、CAV、CAZディスク、AmpC産生確認のためにCTX、ボロン酸、CAZディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法（DDST）を行った。CTXに対してR（耐性）またはI（中間）であった株についてAmpC/ESBL鑑別ディスク（関東化学）を用いてESBL産生菌およびAmpC産生菌のスクリーニング試験を行った。各々の耐性遺伝子型（ESBL；TEM, SHV, CTX-M, およびAmpC；MOX, CIT, DHA, ACC, EBM, FOX）の確認には各種特異的プライマーを用いたPCR法を用いた。
- 5) VREの検出：培地；腸球菌分離にはEnterococcusel Broth（BBL）、Bile Esculin Azide agar（Difco）およびBrain Heart Infusion agar（Difco）を使用。用いた薬剤；バンコマイシン（VCM）、テイコプラニン（TEIC）腸球菌の分離；VRE検出のための選択的方法を用いた。VREの検出には*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*, *vanN*, 各種*ddl*の特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法を用いた。必要に応じてDNAシーケンス解析（Big Dye primer法）、PFGE解析、MLST解析を行った。
- 6) 薬剤の最少発育阻止濃度（以下 MIC）は、Clinical Laboratory Standards Institute（CLSI）法に準拠したドライ

プレート‘栄研’（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法、あるいはCLSIの方法に従い、センシディスク（BD）を用いたKB法で薬剤感受性を調べた。供試薬剤は、アンピシリン（ABPC）、CEZ、セフトキシム（CTX）、メロペネム（MEPM）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）、コリスチン（CL）、クロラムフェニコール（CP）、トリメトプリム・スルフアメトキサゾール（ST）の12剤を用いた。必要に応じ、ストレプトマイシン（SM）、ノルフロキサシン（NFLX）、オフロキサシン（OFLX）、スルフイソキサゾール（Su）、ホスホマイシン（FOM）、アミカシン（AMK）、イムペネム（IPM）を加えた。

## C. 研究結果:

### 1) JANISデータの解析:

- (1) WHOのGLASSへの報告: JANISデータベースから2014年、2015年、2016年の血液由来大腸菌、*A. baumannii*、*K. pneumoniae*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、ならびに尿由来大腸菌、*K. pneumoniae*のデータを抽出後、GLASS提出用ファイルを作成し、提出した。現在は、各施設から提供されているデータの集計であるが、GLASSは精度管理が行われているデータの提出を求めているので、JANISの体制を国際基準に合わせることに係る議論が今後必要である。
- (2) JANISデータからの食品由来耐性菌の抽出・解析: 血液由来サルモネラについて、JANIS加盟病院からの報告数は、100から300株程と少ないが、CTXやLVFXに耐性を示したものは数株程度であった（1%未満）。また、JANIS以外の調査報告から、2015年では淋菌のセフトリアキソン耐性が6.2%（38/617）、赤痢菌ではシプロフロキサシン耐性41.2%（47/114）と比較的高かった。

### 2) 地方衛生研究所ネットワークを利用した報告:

- (1) サルモネラ: 2017年、18剤中の1剤以

上に耐性を示した株は、ヒト由来118/322株（36.3%）、食品由来85/76株（89.4%）で、2015～2016年分離株と同様の傾向であった。6剤以上に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に5株、食品由来株中に8株（うち6株は外国産鶏肉由来株）に認められた。CTX, CAZ, CFX耐性は数%あり、一方、アミノグリコシド系薬GM、AMK、キノロン系薬CPFX、NFLX、ホスホマイシン系薬FOM、カルバペネム系薬IPM、MEPMに対する耐性率は低いか、0%であった。

- (2) サルモネラ血清型: 食品由来株において、Infantis, Schwarzengrund, Manhattanが全体の約8割を占め、国産鶏肉から検出される主要な血清型と考えられる。特に、Infantis及びSchwarzengrundではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性が見られ、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。
- (3) 大腸菌: 2015～2017年分離のヒト由来581株中の247株（42.5%）、及び食品由来21株中の11株（52.4%）が1剤以上に耐性を示した。EHEC以外の下痢原性大腸菌株がEHEC株よりも耐性率が高く、CTX, CAZ, CFX, キノロン系薬及びカルバペネム系薬MEPM等に耐性を示した。外国産食品由来株の耐性率が国産食品由来株よりも高く、国産、外国産間で異なる傾向が見られた。
- (4) コリスチン耐性: コリスチン阻止円径（11mm以下、12mm、13mm、14mm以上に分類）が11mm以下及び12mmの129株（ヒト由来98株、食品由来31株）を対象にコリスチン耐性遺伝子の検出を行い、食品由来株1株が*mcr-5*陽性であることを明らかにした。
- (5) ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況（東京都）  
2016年に分離された散発患者由来*C. jejuni* 113株のフルオロキノロン耐性率は52.2%であった。治療の第一選択薬であるEM耐性株は*C. jejuni*で0.9%、*C. coli*で14.3%であった。
- (6) 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況（東京都）: 2017年に健康者から

分離された大腸菌 521 株の調査；耐性率をみると最も耐性率が高かったのは ABPC で 21.3%，次いで NA 19.5%，TC 14.6%，SM 13.2% の順であった。フルオロキノロン耐性は 8.8%，CTX 耐性は 5.8% であった。CTX 耐性株の 24 株のうち、21 株が ESBL 産生株 (CTX-M-1 group および CTX-M-9 group が各 10 株、TEM 型が 1 株)、3 株が AmpC 産生株であった。

(7) 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出 (東京都)：食肉由来大腸菌 310 株中 *mcr-1* 陽性は、鶏肉由来株では 21 株、豚肉由来株では 2 株であった。国産および輸入別の比較；国産鶏肉は 12.8%，輸入鶏肉は 18.5% が陽性。国産豚肉は 1.8%，輸入豚肉は 1.4% が陽性。

**3) 国内食肉衛生検査所・検疫所由来検体調査：**2016 年度 (2017 年 2 月～3 月) に収集した国内産鶏肉 110 検体、輸入鶏肉 88 検体の合計 198 検体。

(1) ESBL 産生菌；国内産 78.2%、輸入 15.9%。 (昨年度；国内産 6.7%、輸入 26.3%)。

AmpC 産生菌；国内産 36.4%、輸入食肉 11.4% (昨年と同様)。耐性遺伝子型；国産肉では CTX-M 型 (56.2%)、CTX-M 型+TEM 型 (29.0%)、TEM 型 (15.0%)、輸入肉では CTX-M 型 (73.3%)。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入食肉共に CTX-M2 が優位で、次いで CTX-M1 が分離された。食肉から分離される耐性株の遺伝子型の傾向はこれまでの調査と同じであった。ESBL 産生株、AmpC 産生株 (合計 173 株) の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり (155 株 89.6%)、*Salmonella* 属菌が 13 株、*Klebsiella pneumoniae* が 5 株分離された。

(2) コリスチン耐性大腸菌の検出  
コリスチン含有培地 (1mg/L) に発育した大腸菌 165 株 (国内産 36 検体 75 株、輸入 54 検体 90 株)；*mcr-1* 陽性株をブラジル産検体から 1 株でた。

(3) VRE の検出  
VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株がブラジル産鶏肉検体 3 検体から検出された。国内産鶏肉 3 検体から VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された。

#### 4) JVRAM からの報告：

- (1) と畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌、サルモネラについてアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP ([http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3-1.html](http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)) に掲載した。
- (2) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について；*mcr-1* は牛由来株からは検出されなかったが、豚由来株では平成 24 年 2 株 (1.0%：割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、平成 25 年 1 株 (0.8%)、平成 26 年 1 株 (1.1%)、平成 27 年 0 株 (0%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 0 株 (0%)、平成 25 年 4 株 (2.4%)、平成 26 年 2 株 (1.2%)、平成 27 年 9 株 (4.9%) 検出された。また、*mcr-5* 遺伝子は牛由来株は平成 27 年のみ 1 株 (0.4%)、豚由来株では平成 24 年のみ 1 株 (0.5%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 3 株 (2.3%)、平成 25 年 3 株 (1.8%) 平成 26 年 1 株 (0.6%) 検出された。*mcr-2*、*mcr-4* 及び *mcr-3* 遺伝子についていずれの菌株からも分離されなかった。

#### 5) 農場、食鳥処理場等での汚染の検討

- (1) 家畜を飼育する農場における薬剤耐性菌の汚染様式の検討：昨年度の調査で、導入ヒナの敷紙から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* 及び CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae* が分離された。2016 年 12 月～2017 年 8 月に分離されたサルモネラ 784 株でセファロスポリン耐性は認められなかった。一方、遡り調査の結果、導入ヒナと飼料が Schwarzengrund で汚染していたが、導入ヒナが農場内でサルモネラが定着する要因と考えられた。サルモネラを含む薬剤耐性菌の侵入防止は、ヒナの衛生管理が重要と考えられた。
- (2) 食鳥処理工程での薬剤耐性菌対策の検討：部位別 (モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝) に汚染状況を調べたところ、レバーの汚染が高いことを明らかにした。また、セファロスポリン耐性大腸菌の汚染状況 (赤色コロニー細菌中の約 30 分の 1) は部位により異なり、水洗回数が多い部位で低度であ

った。

- (3) 食鳥処理場（盲腸内物及び鶏肉）及び採卵鶏農場（糞便）における ESBL 産生大腸菌汚染について；鶏肉における ESBL 分離率は 1 検体（3%；すべて CTX-M-2）と低かったが、その原因は、その由来となった鶏群の感染率が 13%（4/32）と低かったためであると考えられた。一方、採卵鶏農場における ESBL 産生大腸菌分離率は 30%（9/30）であり、関東周辺よりも九州周辺の農場の方が、分離率が高い傾向であった。耐性遺伝子は CTX-M-1 が最もよく分離され、7 農場（23%）から分離された。若齢鶏群から分離されることが多く、廃用に近い鶏群からの分離率は低かった。

#### D. 考察

- 1) **統合的耐性菌サーベイランスの確立と問題点**；JANIS, JVARM が施行している薬剤耐性測定法（使用薬剤、耐性値等）の調整を行い、各々のデータを同一フォーマット上で比較解析できるようにした。この中に、食品から分離される耐性菌のデータを入れ込み、家畜—食品—一人から分離される耐性菌の動向を一元的にみられるようにすることが次の課題である。そのために、食品由来の耐性菌の動向調査を継続的に行う組織が必要である。現在のところ、食中毒等の調査及びそれに関連する食品由来菌の収集解析を行っている地方衛生研究所が担当することが適していると思われる。各都道府県に少なくとも一つは存在する地方衛生研究所ならば、全国的な食品由来細菌の耐性菌のデータを得ることができるし、継続的な対応が可能であろう。しばらくは、研究費活動において動向調査の礎を築くことになるが、将来的には JANIS や JVARM のように責任部署の対応による事業として対応することが望ましい。そのために解決しなければならない点はどこにあるのかの検討が必要であろう。
- 2) **ESBL 大腸菌の人および家畜からの分離率の乖離**：研究班の成果として、特に大腸菌の ABPC、CEZ、CTX、キノロン

について人および家畜からの分離菌耐性率の年次推移の比較を容易にできるようになった。人からの分離菌では CEZ、CTX、LVFX の耐性率は年々増加が続いているが、家畜では耐性率は低く、特に肉用鶏では 2011 年以降、CEZ、CTX の耐性率が急減している。これは畜産分野での抗菌薬の使用状況を反映しているものと考えられる（特にブロイラーへのセフトイオールの投与の中止）。一般的には、ヒトから分離される ESBL 産生大腸菌の多くは、鶏の ESBL 産生大腸菌又は ESBL 産生遺伝子が、鶏肉を通じ、ヒトに伝播したものと考えられている。耐性菌あるいは耐性遺伝子が最初に人に入り込んだのは、人以外のところ（おそらく食品等を通して）から入り込んだのであろうが、その後の拡散、拡大はそれだけでは説明できないということであろう。いくつかの可能性を想定する必要がある。

(1) 食鳥処理場等における交差汚染による耐性菌の拡散、(2) 小売店、家庭等における交差汚染による食肉への耐性菌拡散、(3) ヒトへの抗菌薬の投与による耐性菌の選択、拡散、(4) 耐性菌保菌者を介しての人—人伝播による拡散、などを考える必要がある。

- 3) **食鳥処理場等における交差汚染による耐性菌の拡散**；今回の調査では食鳥処理場で処理される鶏の糞便中の汚染率の高低により、食肉の汚染率が影響される傾向にある。解体時の直腸結紮などの処理工程における糞便の汚染をどれだけ最小にとどめられるか。交差汚染を完全に防ぐことが困難な鶏製品においては、即効的で安全な消毒方法の開発などが必要であろう。

- 4) **家畜—食品—一人由来菌の耐性菌測定上のバイアスおよび問題点**；食品においては、一定量の食品含有培養液を抗菌薬含有選択培地に直接塗布することにより耐性菌を分離し、全検体中の耐性陽性検体数として耐性率を計算している。定性的測定となっている。また、食品から特定の菌種株を分離後、その菌株について耐性率を調べる場合もあるが、1 食品検体当たりの調査株数が一定してい



ない傾向にある。一方、家畜の場合（JVARM）には、各家畜糞便から対象菌2菌株を分離し、その菌の薬剤耐性を調査し、総調査細菌数の内の耐性菌率を求めている。調査が2菌株なので、1家畜の糞便中の耐性菌数が少ない場合には見逃している可能性がある。人から（JANIS）は、患者検体から分離された各対象菌種総株数のうちの耐性菌率を表している。参加病院が任意であるので耐性菌測定のパフォーマンス管理が一元化されていないこと、および患者検体から病因菌といて疑われる菌種が調査される傾向にあるので、抗菌薬の投与歴による選択圧などのバイアスがかかっている可能性もある。それぞれの耐性率の表現手法が異なるので、一概にお互いのデータを比較することには問題があるかもしれない。耐性率の比較からの伝播経路の推定には限界がある。今後は、菌体自体、耐性遺伝子、プラスミドの遺伝子配列によるゲノム解析の結果も考慮しての評価が必要であろう。

- 5) **耐性菌保菌者を介しての人一人伝播による拡散**：今回の調査では、健康人の糞便（飲食店従事者521人から分離された521株の大腸菌中）からESBL大腸菌が約5%分離されている。健康保菌者が人一人伝播にどれぐらい関与してい

るかの正確なデータは我が国においては把握されていない。耐性菌の母親から乳児への伝播、耐性菌の健康保菌者の家族内伝播の重要性は文献的には指摘されてきたところである。今後、健康保菌者の耐性菌伝播に果たすリスク解析を菌株のゲノムレベルで行う必要がある。リスクの程度が判明すれば、人一人伝播を防止する介入手法の検討に結びつけられるであろう。

- 6) **コリスチン耐性株の伝播**：コリスチン耐性株は最近報告され、世界的に注目されている。今回の調査において、我が国においても家畜、食品等から分離されることが明らかになった。コリスチンは長らく家畜等に感染予防的に使用されてきているが、人にはその毒性のため使用されてきていなかった。耐性が家畜の環境内で選択され、それが食肉に拡散していることは明らかであろう。健康人の腸内細菌叢の中に耐性遺伝子が既に入り込んでいることが報告されているので、食肉等を介しての遺伝子の伝播が起こっていると想定される。CREの治療にコリスチンの使用が認められるような状況において、コリスチン耐性菌の拡散が危惧されている。発生動向の継続とヒトへの拡散ルートの解析が重要である。

## E. 結論

家畜（JVARM）-食品一人（JANIS）の耐性菌の発生動向を一元的に把握する体制の構築に向けて進んできている。食品由来耐性菌の動向把握を継続的に進めるためには地方衛生研究所の役割りが大きなウエイトを占める。今後に向けての具体的検討が必要である。家畜由来の耐性菌が食品を介して人に入っていることは確かなことであろうが、ESBL大腸菌の例を取れば、人由来株のESBL大腸菌の耐性率は、家畜由来ESBL大腸菌の耐性率の低下とは逆に、増加傾向にある。この乖離現象を十分に説明できるデータは得られていないが、食品以外の影響、例えば人一人伝播のリスクを考慮する必要がある。今後は動向調査以外に菌体、耐性遺伝子のゲノムデータを考慮に入れた解析が必要である。

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## G. 健康危険情報

肉用鶏の生産から食鳥処理の過程で、薬剤耐性菌による最終製品の汚染を制御するため、生産段階では、サルモネラを含む薬剤耐性菌の侵入経路と消毒効果に関する監視は極め

て重要である。また、食鳥処理段階では、汚染リスクの高い部位における効果的な消毒薬の開発や消毒方法の改良が重要である。

#### H. 研究発表 別紙に記載。

平成29年度食品の安全確保推進研究事業

「食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究」

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARMとJANISの連携について

分担研究者：川西 路子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：木島 まゆみ（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：内山 万利子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：白川 崇大（農林水産省動物医薬品検査所）

## 研究要旨

薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」が項目として記載されている。また、同戦略に「食品中の薬剤耐性に関する動向調査・監視体制の確立にむけた調査研究の実施」が記載されており、本研究事業において、愛媛県立衛生環境研究所の四宮所長らにより食品由来の検体からサルモネラを対象として全国調査が進められているところである。本年度は、薬剤耐性動向調査の連携を継続発展させるため、国立感染症研究所において前年度食品由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成したソフトを改修し、JVARMのと畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌のデータを入力しアンチバイオグラムを作成した。また大腸菌と同様の方法で、JVARMの食鳥処理場由来株のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成した。また、ヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについて、平成24年～平成27年度に食鳥処理場及びと畜場で分離された大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-5* の保有状況について確認したところ、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。

### A. 研究目的

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介して人に伝播し、人の健康に危害を与える可能性について評価するため、国内では動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) が構築されている。

一方、医療の分野においては、医療機関における院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況および薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査することで、我が国の院内感染の概況を把握し、医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的に、厚生労働省院内感染対策サーベイランス

(JANIS) が構築されている。

本研究では、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略 2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」のため、JVARM データの整備作業を継続した。昨年度国立感染症研究所において、食品由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成するためのソフトが作成されたことから、当該ソフトを改修し、JVARM のと畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌及びサルモ

ネラのデータを入力しアンチバイオグラムを作成することとした。

また、ヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについては伝達性耐性遺伝子 *mcr-1* が国産の鶏肉からも検出されており、新たなプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5* が国内外で報告されていることから、家畜で使用されるコリスチンのヒト医療への影響について評価するために家畜におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を把握することを目的とする。

## B. 研究方法

(1) と畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成

国立感染症研究所において前年度食品由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成したソフトを抗菌剤の種類及び薬剤測定 range を JVARM に合うよう改修し、と畜場由来株の大腸菌の MIC 値を入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(2)食鳥処理場由来株のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成

(1) と同様のソフトを用いて抗菌剤の種類及び薬剤測定 range を JVARM に合うよう改修し、食鳥処理場由来株のサルモネラの MIC 値を入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(3) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について確認する。

平成 24 年から 27 年度の MIC2mg/L 以上の株 (表 1) について遺伝子を抽出し、各コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-5* について既報の論文の PCR 法 (表 2) に基づき、遺伝子を検出した。

## C. 研究結果

(1) と畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成

平成 27 年度と畜場由来大腸菌のアンチバイオグラムを CLSI2012 の SIR 基準により作成し (図 1～3)、

動物医薬品検査所 HP

([http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3-1.html](http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)) に掲載した。また、入力データを国立感染症研究所と共有した。

(2)食鳥処理場由来株のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成

平成 24 年度～27 年度の食鳥処理場由来株のサルモネラのアンチバイオグラムを CLSI2012 の SIR 基準により作成し (図 4～7)、動物医薬品検査所 HP

([http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3-1.html](http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)) に掲載した。また、入力データを国立感染症研究所と共有した。

(3)と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について *mcr-2*、*mcr-4* 及び *mcr-3* 遺伝子についていずれの菌株からも分離されなかった。*mcr-1* は牛由来株からは検出されなかったが、豚由来株では平成 24 年 2 株 (1.0% : 割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、平成 25 年 1 株 (0.8%)、平成 26 年 1 株 (1.1%)、平成 27 年 0 株 (0%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 0 株 (0%)、平成 25 年 4 株 (2.4%)、平成 26 年 2 株 (1.2%)、平成 27 年 9 株 (4.9%) 検出された。また、*mcr-5* 遺伝子は牛由来株は平成 27 年のみ 1 株 (0.4%)、豚由来株では平成 24 年のみ 1 株 (0.5%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 3 株 (2.3%)、平成 25 年 3 株 (1.8%) 平成 26 年 1 株 (0.6%) 検出された (図 8)。

## D. 考察

JVARM のと畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌について CLSI2012 の SIR 基準によるアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。食品由来株については、全国の地方衛生研究所において収集されたサルモネラについてモニタリングを開始されたことから、食鳥処理場由来のサルモネラについてもアンチバイオグラムを作成した。

今後「薬剤耐性ワンヘルス動向調査報告書」及び「ワンヘルス Web サイト」に活用することが可能であると考えられる。

また、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の動向を把握するため、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌における *mcr-1* ~ *mcr-5* 遺伝子の保有状況について確認したところ、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 遺伝子は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。臼井らの日本の一部の豚由来株における報告 (2017 Int J Antimicrob Agents) においても、病畜由来株からは *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* が検出されているが、農場における健康な豚由来からは今回の調査と同様に *mcr-1* 及び *mcr-5* のみが低率に分離されている。

なお、コリスチン耐性については食品安全委員会におけるリスクの程度は「中等度」との評価を受けて、農林水産省では動物用医薬品としては、これまでに食品安全委員会が「中等度」と評価した医療上重要度の高いフルオロキノロン製剤などと同様、平成30年4月以降コリスチンを第二次選択薬として位置づけ、飼料添加物としては指定を取り消す予定である。

来年度以降コリスチンにおけるリスク管理措置の効果を検証し、ヒト医療への影響について評価するためにも引き続きと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を調査していく必要がある。

## E. 結論

と畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及び食鳥処理場由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の検出の結果、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 遺伝子は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- (1)川西路子「動物由来細菌薬剤感受性調査 (JVARM) の概要と薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランへの対応」日本獣医師会雑誌 2017年、70巻1号、p 14-17
- (2)Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M, Abo H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Asai T, Hamamoto S. Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftriaxone and third-generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. J Vet Diagn Invest. 29(5):716-720 (2017).

### 2.学会等発表

- (1)「食用動物由来のコリスチン耐性の現状とコリスチンのリスク評価及びリスク管理措置について」抗菌剤研究会シンポジウム (平成29年4月 東京)
- (2)「動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM)」第27回感染研シンポジウム (平成29年5月 感染研)
- (3)「動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM) の概要と薬剤耐性」日本公衆衛生学会一地方衛生研究所フォーラム-(平成29年10月 鹿児島)
- (4)「動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM) の概要について」平成29年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部研究会 (平成29年11月 大阪)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

※ JVARM事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に深謝いたします。

表1 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌の菌株数及びMIC2 mg/L以上の菌株数

		平成 24 年	平成 25 年	平成 26 年	平成 27 年
全株数	牛	248	341	263	274
	豚	195	127	93	96
	鶏	133	166	172	184
MIC2mg/L 以上の株数	牛	3	4	5	3
	豚	7	2	2	2
	鶏	6	8	3	12

表2 コリスチン耐性遺伝子検出のPCR

コリスチン耐性遺伝子	プライマー配列	参考文献
<i>mcr-1</i>	F 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3'	Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8.
	R 5'-CTTGGTCGGTCTGTGA GGG-3'	
<i>mcr-2</i>	F 5' TGGTACAGCCCCTTTATT 3'	Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, <i>mcr-2</i> , in <i>Escherichia coli</i> , Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016;21(27):
	R 5' GCTTGAGATTGGGTTATGA 3'	
<i>mcr-3</i>	F 5'TTGGCACTGTATTTGCATT-3'	Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene <i>mcr-3</i> in <i>Escherichia coli</i> . mBio 8:e00543-17.
	R 5' TTAACGAAATTGGCTGGAACA-3'	
<i>mcr-4</i>	F 5' ATTGGGATAGTCGCCTTTTT 3'	Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF. Novel plasmid-mediated colistin resistance <i>mcr-4</i> gene in <i>Salmonella</i> and <i>Escherichia coli</i> , Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017;22(31):
	R 5' TTACAGCCAGAATCATTATCA 3'	
<i>mcr-5</i>	F 5'-ATGCGGTTGTCTGCATTTATC-3'	Maria Borowiak, Jennie Fischer, Jens A. Hammerl, Rene S. Hendriksen, Istvan Szabo and Burkhard Malorn. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, <i>mcr-5</i> , conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkx327
	R 5'-TCATGTGGTTGTCCTTTCTG-3'	

図1 2015年 と畜場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Escherichia coli* 畜種 (肉用牛 N=274)

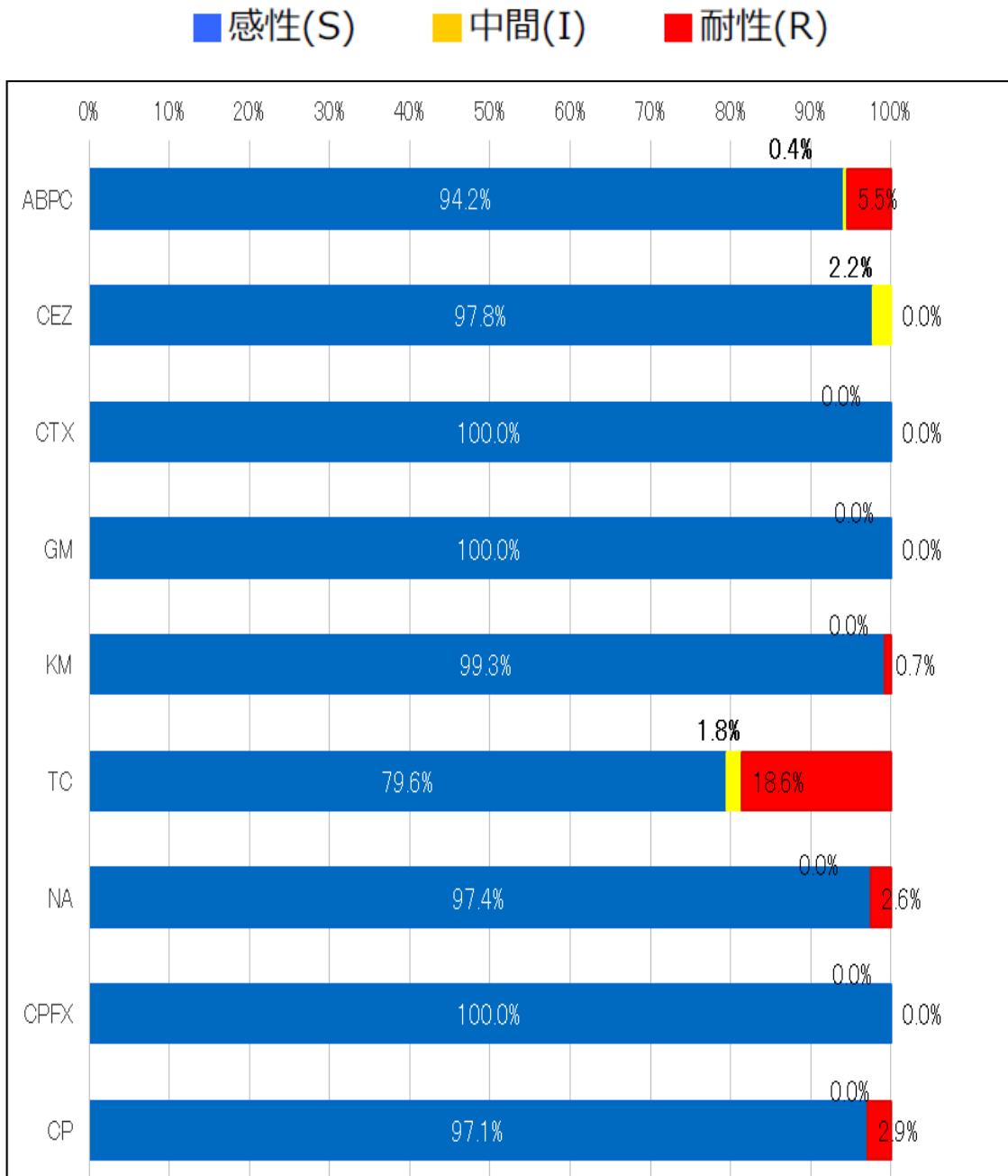


図2 2015年 と畜場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Escherichia coli* 畜種 (豚 N=96)

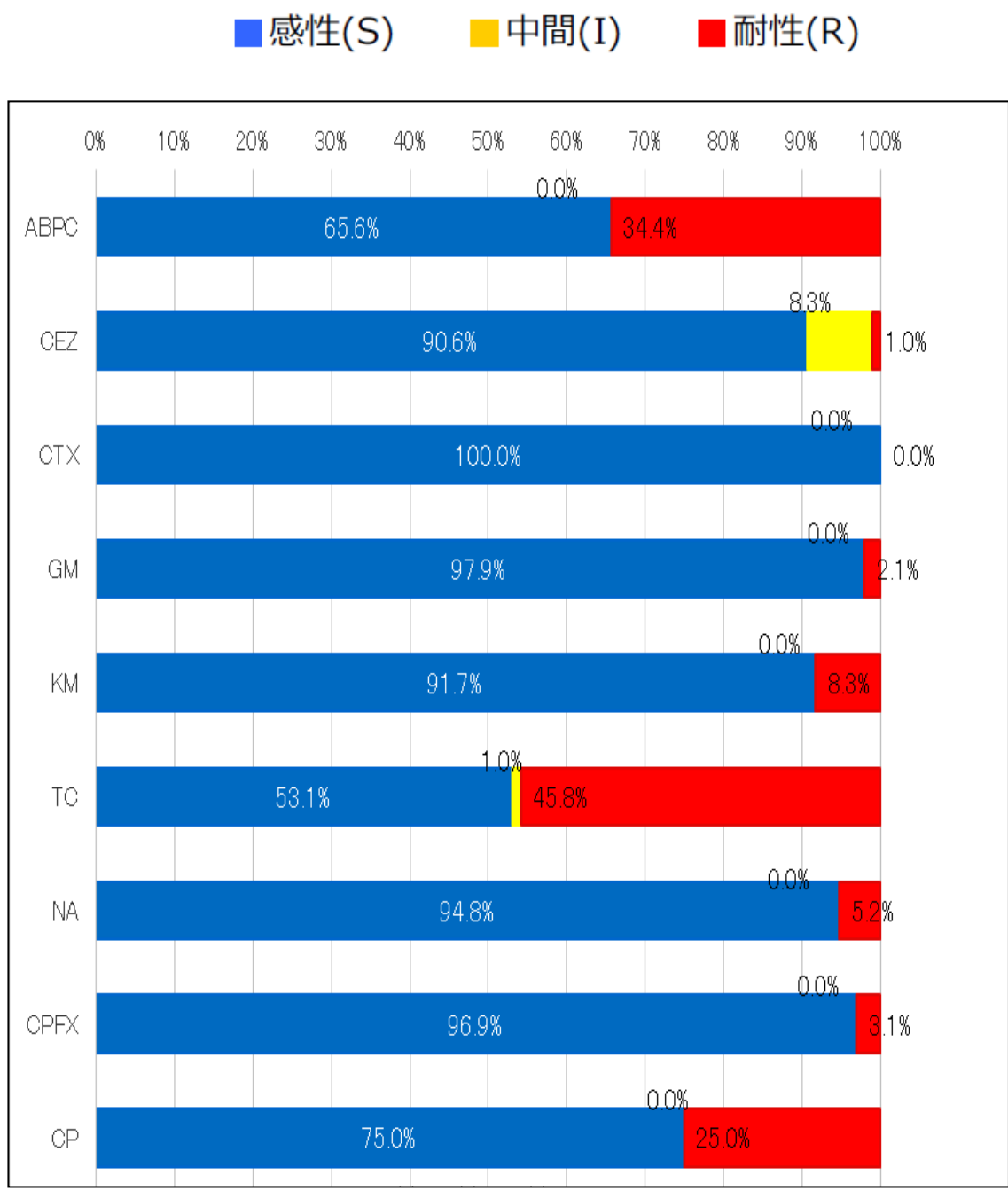




図3 2015年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Escherichia coli* 畜種（鶏 N=184）

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

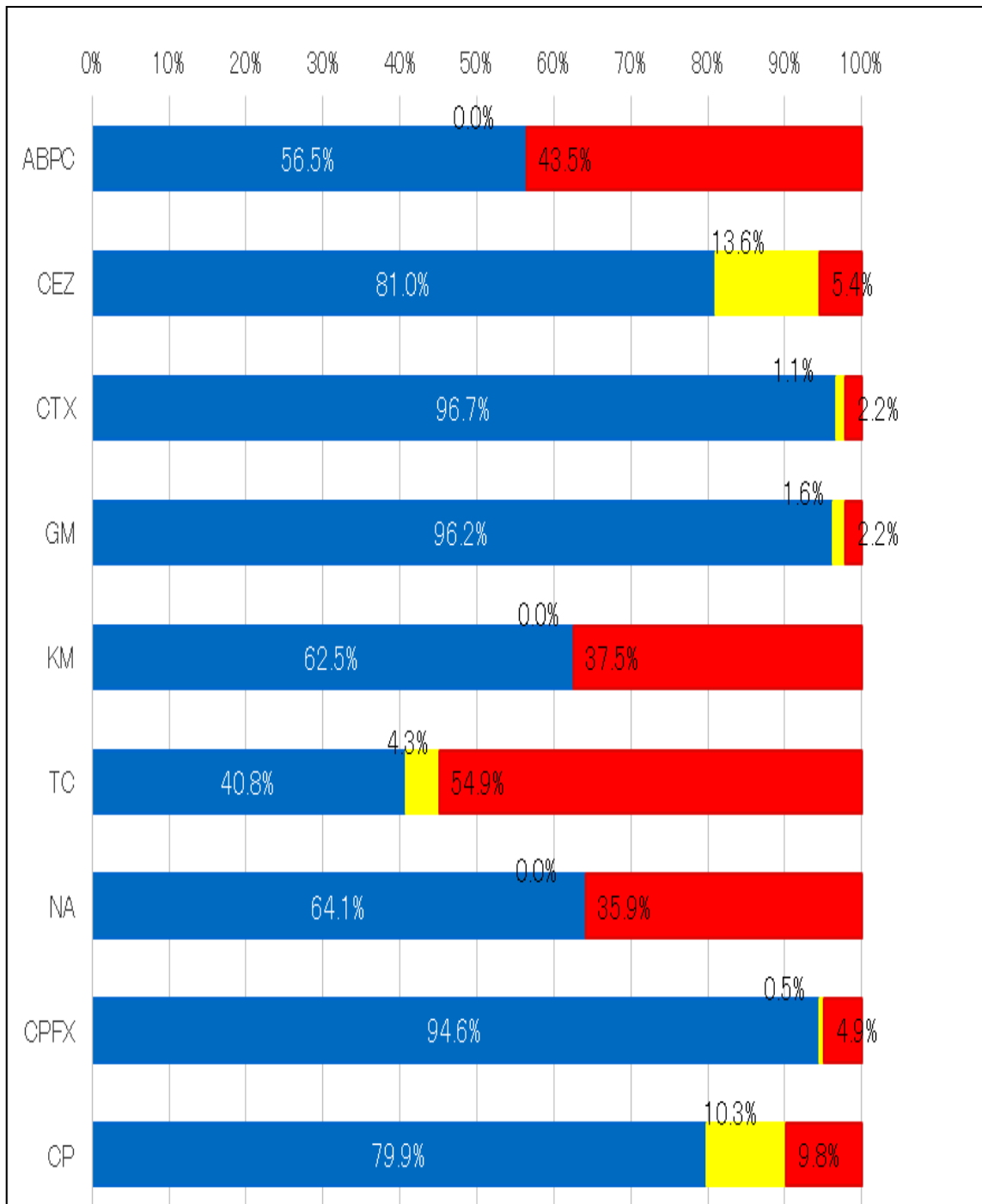


図4 2012年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種（鶏 N=94）

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

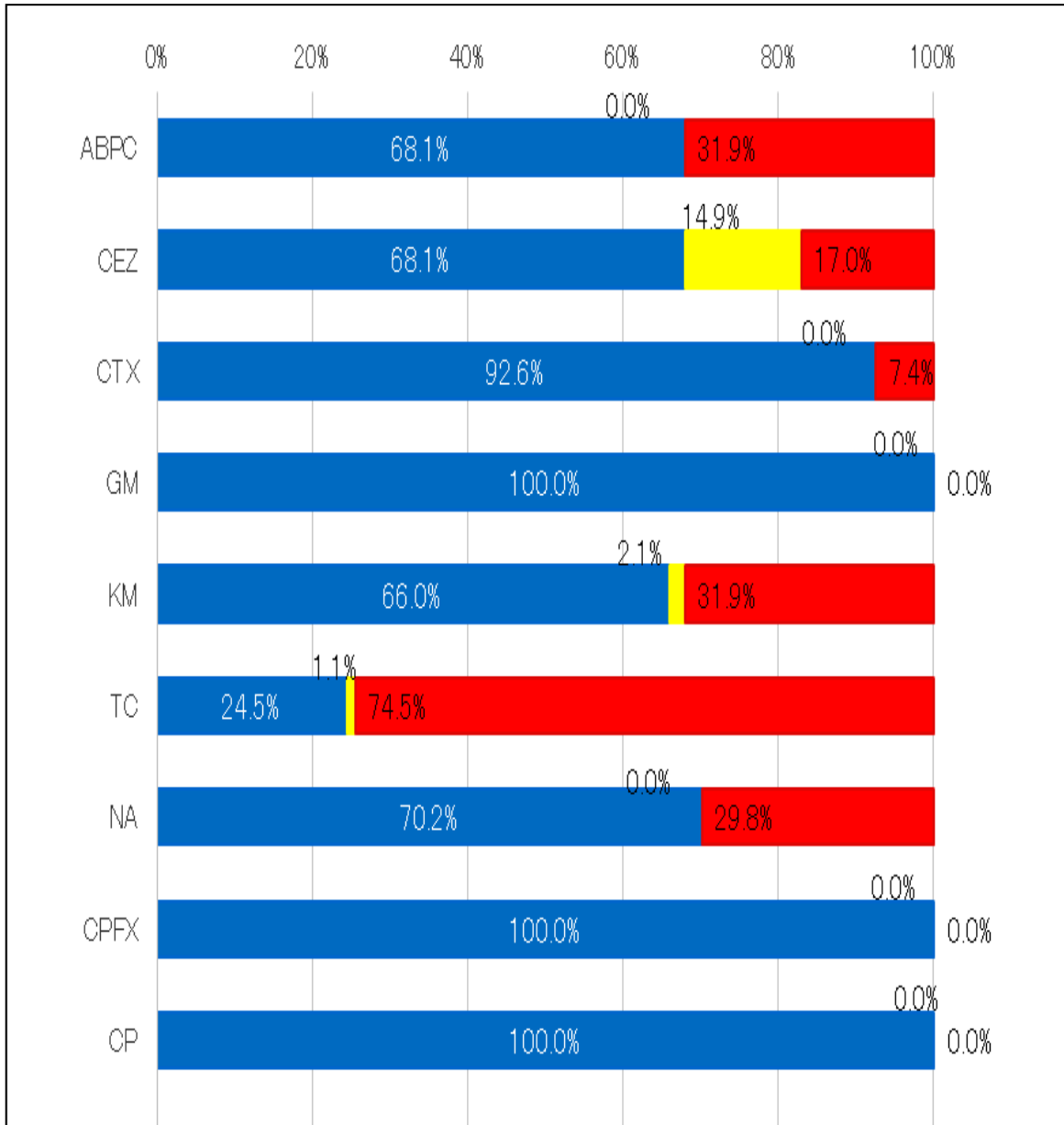


図5 2013年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種 (鶏 N=118)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

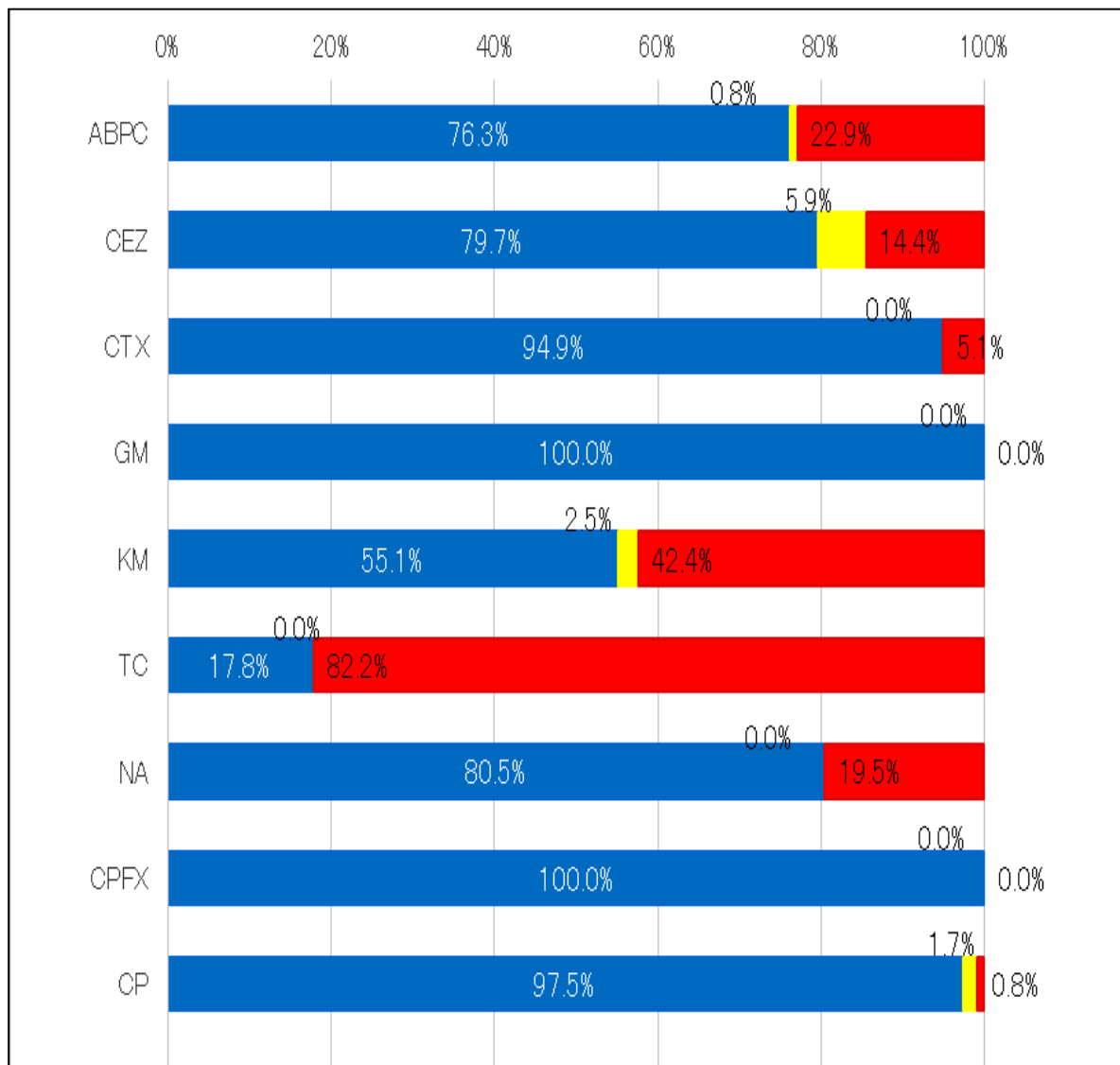


図6 2014年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種 (鶏 N=128)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

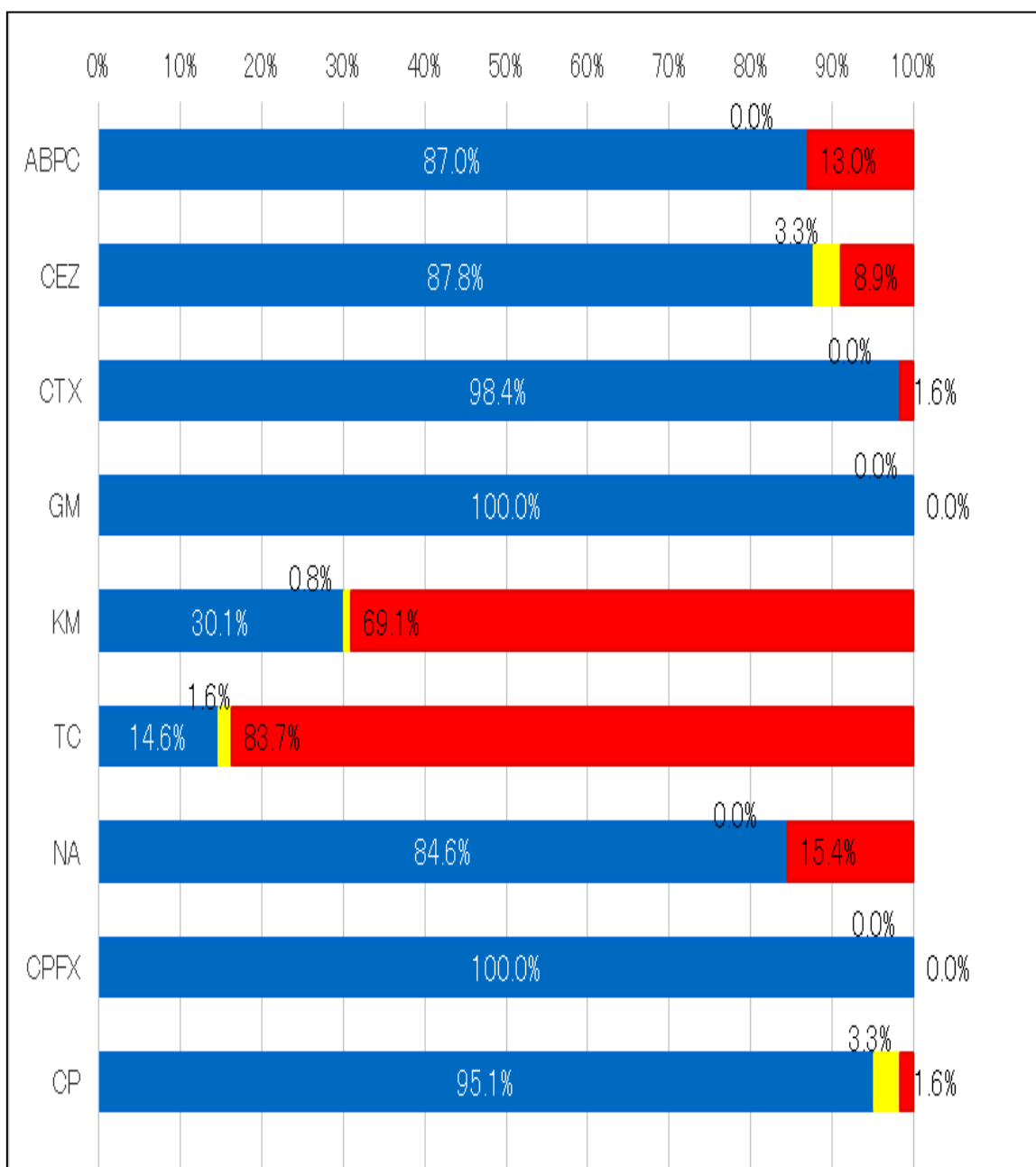


図7 2015年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種 (鶏 N=123)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

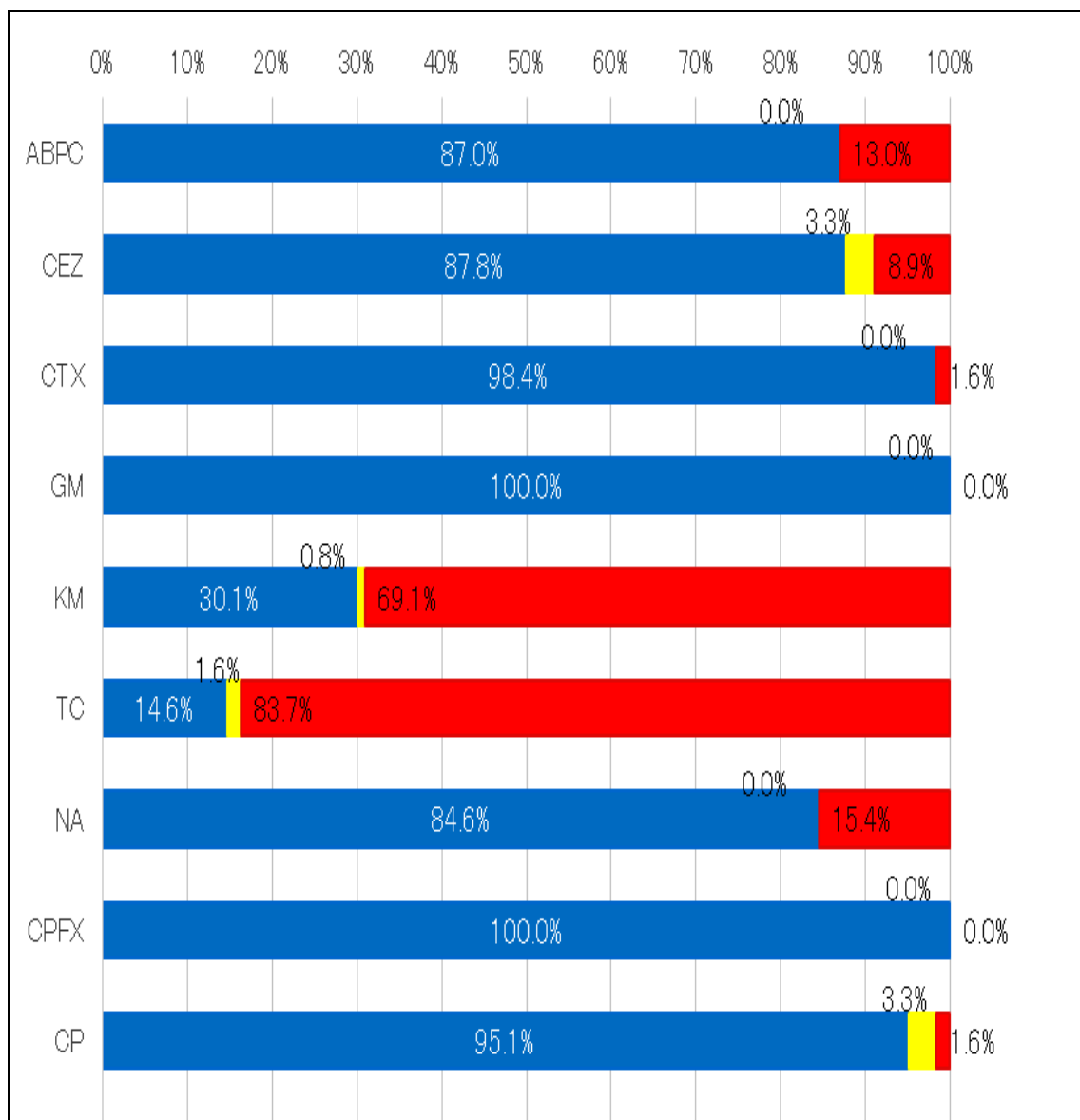
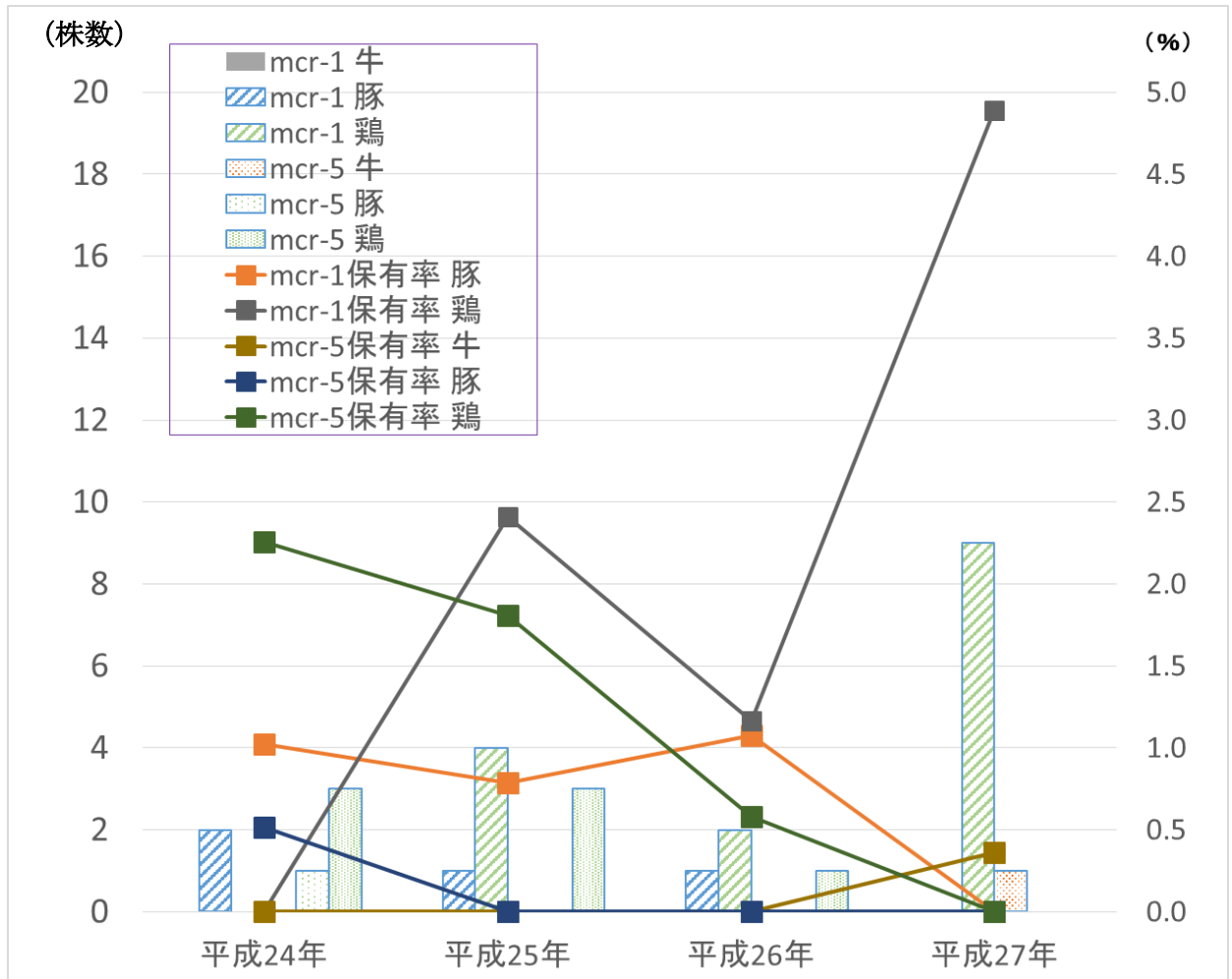


図8 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌株の *mcr1* 及び *mcr5* 遺伝子保有株数及び保有率



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）  
平成 29 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究  
分担課題 家畜に由来する薬剤耐性菌が食品へ伝播する経路に関する研究

研究分担者 浅井 鉄夫（岐阜大学大学院連合獣医学研究科・応用獣医学・教授）  
研究協力者 杉山 美千代（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）  
研究協力者 Montira Yossapol（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

### 研究要旨

食品由来薬剤耐性菌は、農場から食肉処理場（本研究では食鳥処理場）の両面で対策を実施する必要がある。農場での薬剤耐性菌の出現や分布は農場への耐性菌の侵入と家畜への定着という 2 つのステップが関与し、食肉処理場では飼育中に保菌した動物を介して処理過程で保菌動物の腸内容物による交差汚染により最終製品が薬剤耐性菌汚染すると考えられる。そこで、導入ヒナを介して農場へ侵入した薬剤耐性菌の定着と拡散及び食鳥処理場における薬剤耐性菌の交差汚染防止に焦点を置いて以下の実験を実施した。

家畜を飼育する農場における薬剤耐性菌の汚染様式の検討：昨年度の調査で、導入ヒナの敷紙から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* 及び CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae* が分離された。2016 年 12 月～2017 年 8 月に分離されたサルモネラ 784 株でセファロスポリン耐性は認められなかった。2017 年 7～8 月に採取した糞便から CTX-M-25 産生大腸菌が分離されたが、プラスミドのサイズが異なり、他菌種への伝播は明らかにできなかった。一方、本農場はサルモネラ汚染農場（Infantis）であったが、新たな血清型（Schwarzengrund）の汚染が確認された。遡り調査の結果、導入ヒナと飼料が Schwarzengrund で汚染していたが、導入ヒナが農場内でサルモネラが定着する要因と考えられた。サルモネラを含む薬剤耐性菌の侵入防止は、ヒナの衛生管理が重要と考えられた。

食鳥処理工程での薬剤耐性菌対策の検討：部位別（モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝）に汚染状況を調べたところ、レバーの汚染が高く（赤色コロニー数の平均： $5.6 \times 10^4$  CFU/g）、ササミ（ $6 \times 10$  CFU/g）・砂肝（ $4 \times 10$  CFU/g）の汚染が低いことを明らかにした。また、セファロスポリン耐性大腸菌の汚染状況（赤色コロニー細菌中の約 30 分の 1）は部位により異なり、水洗回数が多い部位で低度であった。型崩れや変色が起こりやすいレバーにおける汚染低減できる方法の開発が重要と考えられた。

### A. 研究目的

家畜由来の薬剤耐性菌及び耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を与える可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。これまでの調査から、食肉（鶏肉）の耐性菌汚染は高度で、その原因として、食鳥処理場における耐性菌の交差汚染が指摘されてきた。国内の 2012 年にセフトオフル（動物専用、第三世代セファロスポリン）の卵内接種およびヒナへの使用に対して養鶏団体による自主的注意喚起が行われた以降、農場の鶏糞から ESBL/AmpC 産生大腸菌の出現率が減少したが、市販鶏肉から第三世代セファロスポリン耐性菌は依然として分離される。このことから、食品由来薬剤耐性菌は、農場から食肉処理場（本研究では食鳥処理場）の両面で対策を実施

する必要がある。

農場での薬剤耐性菌の出現や分布は農場への耐性菌の侵入と家畜への定着という 2 つのステップが関与し、耐性菌を保菌する動物が搬入される食肉処理場では処理過程での対策が最終製品の汚染に関与すると考えられる。昨年度、導入ヒナの敷紙から分離された ESBL（CTX-M-25）産生 *Enterobacter cloacae* と *Klebsiella pneumoniae* から大腸菌へプラスミド性 ESBL 遺伝子が接合伝達することを *in vitro* で確認したが、農場内での腸内細菌間におけるプラスミド性耐性遺伝子の伝播は不明である。特に食中毒菌への耐性遺伝子伝播は公衆衛生上重要な問題である。一方、鶏糞よりも鶏肉等の耐性菌汚染率が高い理由として処理場等における交差汚染が考えられる。食肉処理場における交差汚染の状況を、最終製品を用いてセフ

ァロスポリン耐性菌を定量的に検査し、汚染状況を把握する。セファロスポリン耐性菌の汚染状況に基づいて処理工程の問題を明らかにする。そこで、導入ヒナを介して農場へ侵入した薬剤耐性菌の定着と拡散と食鳥処理場における耐性菌の交差汚染を明らかにすることで、肉養鶏生産から鶏肉処理過程での薬剤耐性菌の衛生対策を構築することを目的とする。

## B. 研究方法

### (1) 実験1：導入ヒナを介して農場へ侵入した薬剤耐性菌の定着と拡散

a. 細菌分離：2017年7月～8月に11鶏舎23鶏群（27-32日齢）から糞便4-5羽分をプールし、CTX（32 µg/ml）加DHL培地を用いて分離した。分離菌は、API20Eを用いて同定後、薬剤感受性試験及びβラクタマーゼ型別を実施した。

b. 供試菌株：2016年12月～2017年8月に定期検査で農場材料及び食肉材料から分離された784株（*Infantis*、*Schwarzengrund*）を対象にセファロスポリン耐性をセファレキシム（CEX）50mg/L添加ミュラーヒントン培地でスクリーニング検査した。

### (2) 実験2：肉用鶏農場における長期的なサルモネラの動向調査

2014年から2016年に岐阜県内の肉用鶏生産企業から提供され、研究室で冷凍（-80℃）保存されている約3,600株から、企業が経営する3農場のうち肉用鶏のみを飼育する1農場で、出荷前の鶏舎内の拭き取りで分離された（鶏舎環境由来）99株、ヒナの輸送箱の敷紙から分離された（ヒナ由来）4株及び配合飼料から分離された（飼料由来）2株の計105株を供試した。血清型は鶏舎環境由来株99株のうち85株は*S. Infantis*、14株は*S. Schwarzengrund*で、ヒナ由来株3株と飼料由来株2株は全株とも*S. Schwarzengrund*であった。

さらに、2016年に入雛前の鶏舎内の拭き取りでサルモネラが分離された3鶏舎（5、7、9）を対象に、1～6週齢の鶏から排泄された盲腸便75検体からサルモネラを分離した。分離は、ハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地を用いて42℃で24時間増菌培養後、DHL寒天培地とブリリアントグリーン寒天培地を使用した。

### (3) 実験3：食鳥処理場における薬剤耐性菌の交差汚染

2017年11月～12月の異なる日（5回）に採取した7部位（モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝）を供試した。検体1gを9mlの生理食塩水で10%乳剤を作成した。10倍段階希釈後、セファレキシム（CEX）を50mg/L添加したDHL寒天培地（CEX加DHL寒天培地）と非添加のDHL寒天培地に希釈液を50µLコンラージ

棒で塗抹し、37℃で1晩培養した。培養後、大腸菌数及びCEX耐性数を求め、その割合を算出した。コロニーが認められた最高希釈のCEX添加DHL寒天培地から、赤色の5コロニーを単離して、TSI培地及びLIM培地を用いて性状を確認した後、バイテック2コンパクトを用いて同定した。

### (4) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 法に準拠したドライプレート（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法で実施した。供試薬剤は、アンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、セフォタキシム（CTX）、メロペネム（MEPM）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）、コリスチン（CL）、クロラムフェニコール（CP）、トリメトプリム・スルファメトキサゾール（ST）の12剤を用いた。

### (5) βラクタマーゼ産生遺伝子型

CTX耐性株（MIC ≥4mg/L）は、ダブルディスク法によるスクリーニング後、DallenneらのマルチプレックスPCR法によりβラクタマーゼ遺伝子型を決定した。

### (6) パルスフィールドゲル電気泳動（pulsed-field gel electrophoresis, PFGE）

PFGEは、PulseNetのプロトコールに準拠して実施した。

### (7) 反復配列多型解析法（multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA）

MLVAは、7種類（STTR-3、STTR-5、STTR-9、SENTR-2、SENTR-3、SE-7、SE-10）のプライマーを用いて、PCR法により増幅した。その後、増幅産物のシーケンスにより塩基配列を決定し、含まれる反復配列の繰り返し数をカウントした。

（倫理面への配慮）

配慮すべき倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

### (1) 実験1

2017年7～8月に採取した糞便からCTX-M-25産生大腸菌1株が分離された。分離株は、CTX耐性の他、KM-TC-GM耐性を示す多剤耐性株であった。接合試験の結果、*bla*<sub>CTX-M-25</sub>は、*IncA/C*プラスミド（173kb）上に存在し、KM耐性と共伝達した。導入ヒナの敷紙から分離されたセファロスポリン耐性菌（CTX-M-25産生*E. cloacae*及びCTX-M-25産生*K. pneumoniae*）が保有するプラス



ミドと分離大腸菌が保有するプラスミドはサイズが異なることが示された (表 1)。一方、2016年12月～2017年8月に分離されたサルモネラ784株では、セファロスポリン耐性は認められなかった。これらのことから、導入ヒナを介して農場へ侵入した *bla*<sub>CTX-M-25</sub> プラスミドが、農場内に分布する大腸菌やサルモネラへ伝播した証拠は認められなかった。

## (2) 実験2

MLVA 解析では、*S. Infantis* 85株と *S. Schwarzengrund* 20株は、STTR-3、STTR-5、STTR-9の3領域が増幅したが、SENTR2、SENTR3、SE-7、SE-10の4領域が増幅しなかった。STTR-3領域においては、27bpと33bpの2種類の反復配列が認められ、27bpの繰り返し数は全株とも1回であったが、33bpの繰り返し数は *S. Infantis* では全株とも12回、*S. Schwarzengrund* では全株とも11回であった。STTR-5領域における繰り返し数は *S. Infantis* 83株では21回、残りの2株では20回、*S. Schwarzengrund* では全株とも14回であった。STTR-9における繰り返し数は全株とも1回であった。3領域の解析により *S. Infantis* はM1 (83株) とM2 (2株) の2パターンに分類され、*S. Schwarzengrund* は全株同一 (m1) であった。

PFGE 解析では、*S. Infantis* の泳動像はB1 (67株)、B2 (1株)、B3 (13株)、B4 (1株)、B5 (3株) の5パターンで、B1が優勢であった。一方、*S. Schwarzengrund* の泳動像はb1 (17株) とb2 (3株) の2パターンであった。

*S. Infantis* のうち60株はKMとTCの2剤に耐性 (A1) を示し、残りの25株はTCのみに耐性 (A2) を示した。一方、*S. Schwarzengrund* は全株ともKM、TC、STの3剤に耐性 (a1) を示した。

MLVA型、PFGE型及び薬剤耐性型の組み合わせに基づき分離株を分類したところ、*S. Infantis* 85株はM1-B1-A1 (54株)、M1-B1-A2 (11株)、M1-B2-A1 (1株)、M1-B3-A2 (13株)、M1-B4-A2 (1株)、M1-B5-A1 (3株)、M2-B1-A1 (2株) の7タイプに分類された。一方、*S. Schwarzengrund* はm1-b1-a1 (17株) とm1-b2-a1 (3株) の2タイプに分類された。

同一タイプのサルモネラが同一鶏舎で4ロット以上連続して鶏舎環境から分離された場合を連続汚染と定義すると、13鶏舎中9鶏舎 (1、2、3、4、6、7、8、9、13) で連続汚染が認められた。このうち、7鶏舎 (1、2、3、4、6、7、13) ではM1-B1-A1の連続汚染が認められ、鶏舎9ではM1-B3-A2の連続汚染が認められた。また、*S. Schwarzengrund* 汚染ヒナが導入された鶏舎7～10のうち鶏舎7と8では、それ以降もヒナ由来株と同じタイプ (m1-b1-a1) の *S. Schwarzengrund* が鶏舎環境から分離され、連続汚染が認められた。一

方、*S. Schwarzengrund* 汚染飼料が搬入された鶏舎2と5では、それ以降の連続汚染は認められず、鶏舎2では、汚染飼料搬入前後で同じタイプ (M1-B1-A1) の *S. Infantis* が鶏舎環境から分離された。

鶏群の追跡調査では、鶏舎Aでは3週齢でサルモネラが分離され始めたが、鶏舎B及び鶏舎Cでは1週齢でサルモネラが分離され始めた (表2)。入雛前の鶏舎内の拭き取り材料から *S. Infantis* が分離された鶏舎AとCで飼育した鶏から分離されたサルモネラの血清型は全株とも *S. Infantis* であった。また、入雛前の鶏舎内の拭き取り材料から *S. Schwarzengrund* が分離された鶏舎Bで分離されたサルモネラの血清型は全株とも *S. Schwarzengrund* であった。さらに、すべての鶏舎において、入雛前の鶏舎内の拭き取りで分離されたサルモネラは、1～6週齢の鶏の盲腸便から分離されたサルモネラと同一のPFGE型を示した (図2)。

## (3) 実験3

部位別 (モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝) に腸内細菌の汚染状況を調べたところ、レバーで汚染が高く (赤色コロニー数の平均:  $5.6 \times 10^4$  CFU/g)、ササミ ( $6 \times 10$  CFU/g)・砂肝 ( $4 \times 10$  CFU/g) の汚染が低い傾向が認められた。しかし、調査日により汚染程度は大きく異なっていた (図3)。

赤色コロニー中の第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の汚染状況は約30分の1であった (図4)。

CEX加DHL寒天培地から分離した細菌を同定したところ、主に *Enterobacter* 属菌と大腸菌であった。第3世代セファロスポリンに対する耐性菌は、大腸菌と *E. asburiae* で認められた。大腸菌はCTX-M-2グループのESBLもしくはCMY-2GのAmpC  $\beta$ ラクタマーゼ産生菌であったが、*E. asburiae* は不明であった (表4)。

## D. 考察

昨年度、2016年1～7月に導入ヒナの敷紙から分離されたESBL産生 *E. cloacae* と *K. pneumoniae* のプラスミドが農場内の他菌種へ伝播・拡散状況を明らかにするため、飼育鶏からCTX-M-25産生大腸菌を分離し、昨年度分離された耐性菌のプラスミドと比較検討した。*E. cloacae* と *K. pneumoniae* のプラスミドと類似した性状 (レプリコン型と共耐性型) が認められたが、サイズが異なっていたため、異なるプラスミドであることが示唆された。また、農場で分離されているサルモネラにおいてセファロスポリン耐性株は認められず、農場内で耐性遺伝子が伝播・拡散した証拠は得られなかった。

一方、飼育中に細菌が鶏群へ定着・分布様式を

検討するためにサルモネラを対象にした解析では、サルモネラで汚染した飼料に比べ導入ヒナによる持ち込みが鶏群に定着する要因として重要であること、また、鶏群に分布する要因として導入前鶏舎でのサルモネラ残存が要因であることが示された。以上のことから、導入するヒナの衛生管理や飼育場所の清浄性を保つことが鶏群の薬剤耐性菌を含む細菌汚染を防止や感染環の遮断する上で重要と考えられた。

食鳥処理施設における汚染は、調査日によって異なること、肝臓といった菌量が多い部位でセファロスポリン耐性が分離されることから、菌数を相対的に減少させることが重要と考えられた。昨年、食鳥処理過程での汚水中の薬剤耐性菌の分布を調査した結果、汚水中の耐性菌は内臓検査工程以外では検出できなかったが、比較的洗浄頻度の高い砂肝における汚染が程度であったことから、清潔な水で丹念に洗浄することは菌数を低減させる効果が示唆された。今後、畜産物の交差汚染の状況を継続的把握するとともに、あわせて洗浄水の定期的な検査を実施する必要がある。

現在、食鳥処理施設では次亜塩素酸ナトリウムによる洗浄水の消毒が行われているが、畜産物への塩素臭の付着や変色により十分な洗浄ができない部位も存在する。交差汚染を防ぐことが困難な鶏製品において、臭気が製品へ移行しない、即効性で安全な消毒方法の開発が必要である。

#### E. 結論

サルモネラを含む薬剤耐性菌の侵入防止は、ヒナの衛生管理、また、鶏群の継続的な汚染防止には飼育環境の衛生管理が重要と考えられた。

食鳥処理での交差汚染を防ぐために、鶏製品対して、消毒薬の臭気が移行しない、即効性で安全な消毒方法の開発が必要である。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

肉用鶏の生産から食鳥処理の過程で、薬剤耐性菌による最終製品の汚染を制御するため、生産段階では、サルモネラを含む薬剤耐性菌の侵入経路と消毒効果に関する監視は極めて重要である。また、食鳥処理段階では、汚染リスクの高い部位における効果的な消毒薬の開発や消毒方法の改良

が重要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M, Abo H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Asai T, Hamamoto S. Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29(5):716-720, 2017.
- 2) Yossapol M, Sugiyama M, Asai T. The occurrence of CTX-M-25-producing *Enterobacteriaceae* in day-old broiler chicks in Japan *Journal of Veterinary Medical Science* 79(10):1644-1647, 2017.
- 3) 浅井鉄夫 One Health の視点から見た耐性菌の問題点 最新医学 72(4):528-533, 2017.
- 4) 浅井鉄夫 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランで注目される耐性菌-動物-臨床と微生物 44(4):303-308, 2017.
- 5) 浅井鉄夫 輸入される畜産物を生産する国における家畜への抗菌薬の使用と耐性菌の現状 化学療法の領域 33(5):1001-1009, 2017.
- 6) 浅井鉄夫 獣医療分野における抗菌薬の慎重使用の推進 公衆衛生 81(10):822-826, 2017.
- 7) 浅井鉄夫 豚における薬剤耐性菌対策 ALL about SWINE 50:2-6, 2017.
- 8) 浅井鉄夫 One Health と薬剤耐性 ALL about SWINE 51:24-26, 2017.

##### 2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1 肉養鶏及び導入ヒナ敷き紙から分離されたCTX-M-25産生大腸菌及び保有プラスミドの性状

検体	Donor			Transconjugants			Estimated plasmid size (Kb)
	菌種	$\beta$ -lactamase type	耐性型	$\beta$ -lactamase type	Plasmid replicon type	耐性型	
糞便	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-25	CTX, KM, TC, GM	CTX-M-25	IncA/C	CTX, KM	173
導入ヒナ敷き紙	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-25, SHV-11	CTX, KM, TC	CTX-M-25	IncA/C	CTX, KM	155
	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-25, TEM-1	CTX, KM	CTX-M-25	IncA/C	CTX, KM	208
	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-25	CTX, KM, CL	CTX-M-25	IncA/C	CTX, KM	238

表2 導入前のふき取り検査でサルモネラが分離された鶏舎における入雛後のサルモネラ分離状況  
各週齢における陽性検体数/検査検体数(陽性率)

鶏舎	1週齢	2週齢	3週齢	4週齢	5週齢	6週齢
A	0/5(0%)	0/5(0%)	4/5(80%)		2/5(40%)	2/5(40%)
B	4/5(80%)	5/5(100%)		3/5(60%)	1/5(20%)	2/5(40%)
C	2/5(40%)	2/5(40%)		4/5(80%)	0/5(0%)	4/5(80%)

鶏舎 A と C で分離されたサルモネラの血清型は全株とも Infantis であった  
鶏舎 B で分離されたサルモネラの血清型は全株とも Schwarzengrund であった

表3 食鳥処理場で鶏肉製品から CEX 加 DHL 培地で分離した細菌の薬剤感受性

薬剤	<i>Enterobacter cloacae</i> n=27	<i>Escherichia coli</i> n=20	<i>Cedecea davisae</i> n=7	<i>Enterobacter asburiae</i> n=4	<i>Aeromonas sp.</i> n=2
ABPC	16- $\geq$ 128	$\geq$ 128	128- $\geq$ 128	128- $\geq$ 128	$\geq$ 128
CEZ	128- $\geq$ 128	$\geq$ 128	$\geq$ 128	64- $\geq$ 128	32- $\geq$ 128
CTX	$\leq$ 0.5-1	8- $\geq$ 64	$\leq$ 0.5	$\leq$ 0.5-8	$\leq$ 0.5
MEPM	$\leq$ 0.25	$\leq$ 0.25	$\leq$ 0.25	$\leq$ 0.25	$\leq$ 0.25
GM	$\leq$ 0.5	$\leq$ 0.5-8	$\leq$ 0.5	$\leq$ 0.5	$\leq$ 0.5
KM	$\leq$ 1-4	4- $\geq$ 128	2-4	2	$\leq$ 1-2
TC	1-64	2- $\geq$ 64	1-4	1	$\leq$ 0.5-64
NA	$\leq$ 1- $\geq$ 128	2-128	4-8	2- $\geq$ 128	$\leq$ 1
CPF	$\leq$ 0.03-0.25	$\leq$ 0.03-1	$\leq$ 0.03	$\leq$ 0.03-0.25	$\leq$ 0.03
CL	0.5- $\geq$ 16	0.25-1	$\geq$ 16	0.5- $\geq$ 16	$\leq$ 0.12-0.5
CP	4-16	4-8	2-4	4-8	2-4
ST	$\leq$ 2.38/0.12-4.75/0.25	$\leq$ 2.38/0.12	$\leq$ 2.38/0.12	$\leq$ 2.38/0.12	4.75/0.25

表4 鶏肉製品から分離した第3世代セファロsporin耐性菌の $\beta$ -ラクタマーゼ型

採材回	菌種	部位 (株数)	$\beta$ ラクタマーゼ型
3回目	<i>Escherichia coli</i>	手羽元 (4)、レバー (1)	TEM, CTX-M-2G
4回目	<i>Escherichia coli</i>	手羽元 (1)、レバー (1)	TEM, CTX-M-2G
	<i>Enterobacter asburiae</i>	レバー (1)	不明
5回目	<i>Escherichia coli</i>	もも (1)	TEM, CTX-M-2G
		レバー (11)	TEM, CTX-M-2G

鶏舎	血清型	組み合わせ	各飼養期間における分離状況							
			2014年 11~12月	2015年 1~3月	4~6月	7~9月	2016年 10~12月	1~3月	4~6月	7~9月
1	SI	M1-B1-A1								
	SS	m1-b1-a1								
2	SI	M1-B1-A1								
	SS	m1-b2-a1								飼料
3	SI	M1-B1-A1								
4	SI	M1-B1-A1								
	SS	m1-b1-a1								
5	SI	M1-B1-A1								
	SI	M1-B1-A2								
	SS	m1-b2-a1								飼料
6	SI	M1-B1-A1								
	SS	m1-b1-a1								
7	SI	M1-B1-A1								
	SS	m1-b1-a1								ヒナ
8	SI	M1-B3-A2								ヒナ
	SS	m1-b1-a1								ヒナ
9	SI	M1-B3-A2								ヒナ
	SS	m1-b1-a1								
10	SI	M1-B3-A2								
	SS	m1-b1-a1								ヒナ
13	SI	M1-B1-A1								
	SS	m1-b1-a1								

図1 MLVA、PFGE及び耐性型の組合せを利用した分離状況

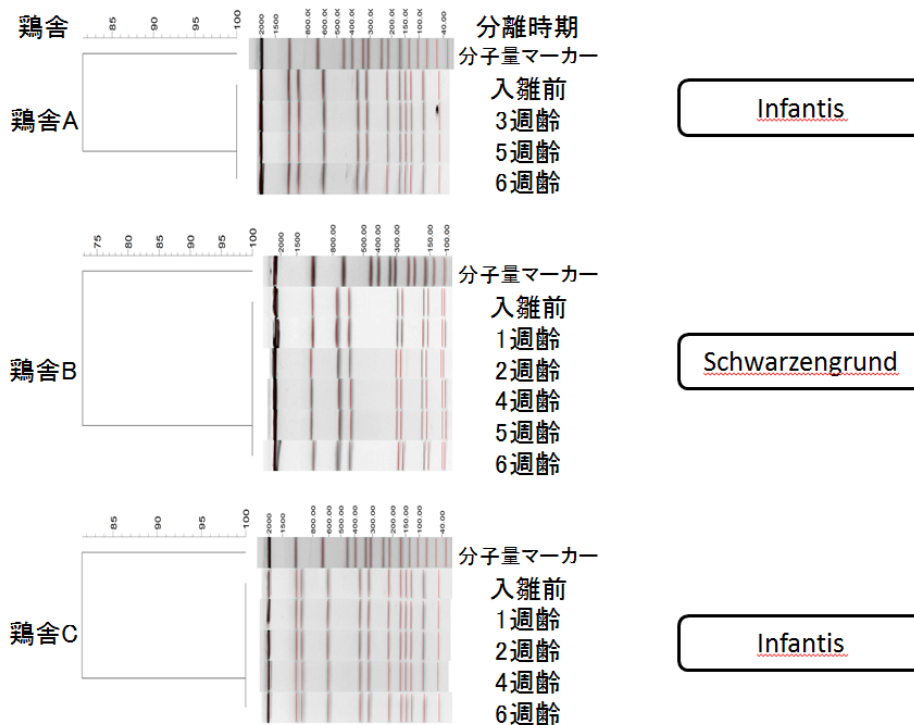
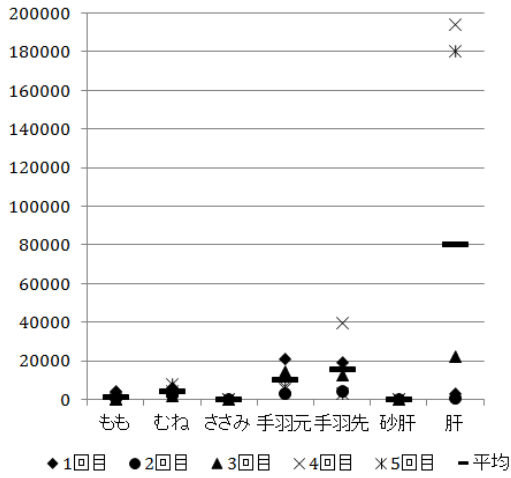


図2 導入前の鶏舎で分離されたサルモネラと飼育中に分離されたサルモネラのPFGE解析

総菌数 (CFU/ml)



赤色コロニー数 (CFU/ml)

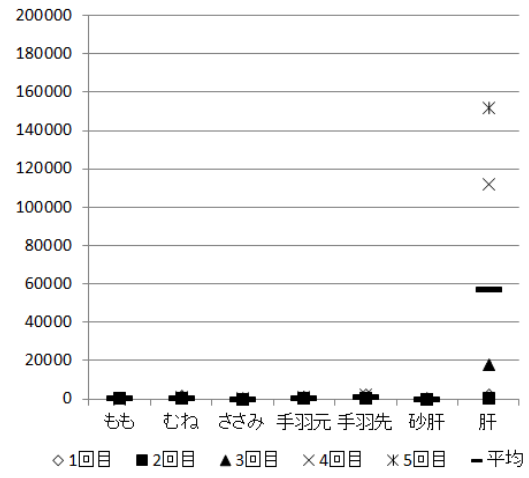
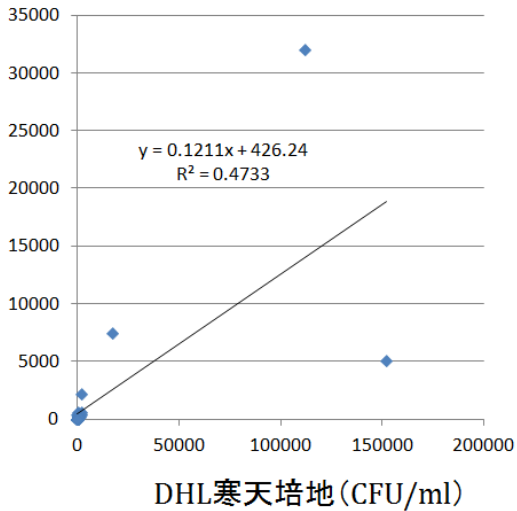


図3 部位別細菌数の採材日による変動

CEX含有DHL培地 (CFU/ml)



CTX含有DHL培地 (CFU/ml)

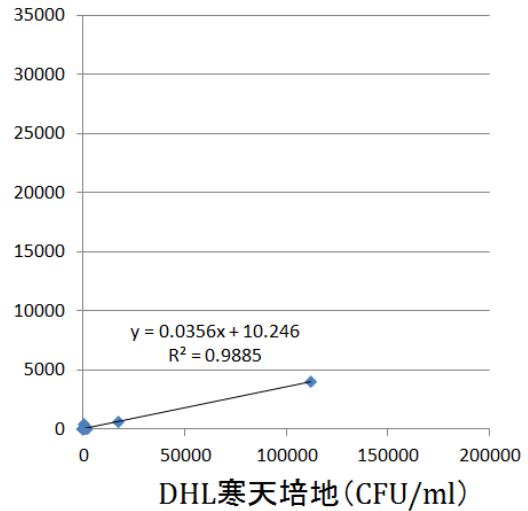


図4 抗菌剤添加培地を用いた鶏製品中の赤色コロニーの出現状況

## 食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究 分担課題 全国地方衛生研究所において分離される薬剤耐性菌の 情報収集体制の構築

### 研究分担者

四宮博人 (愛媛県立衛生環境研究所)

### 研究協力者

調 恒明 (山口県環境保健センター)  
小川恵子、渡邊涼太、森本 洋 (北海道立衛生研究所)  
山上剛志、高橋洋平、武差愛美 (青森県環境保健センター)  
小林妙子 (宮城県保健環境センター)  
小西典子 (東京都健康安全研究センター)  
古川一郎、政岡智佳 (神奈川県衛生研究所)  
太田 嘉、松本裕子、小泉充正 (横浜市衛生研究所)  
柳本恵太 (山梨県衛生環境研究所)  
綿引正則、内田 薫 (富山県衛生研究所)  
東方美保 (福井県衛生環境研究センター)  
石川和彦、一瀬佳美 (滋賀県衛生科学センター)  
若林友騎 (大阪健康安全基盤研究所)  
福田弘美、東野和直 (堺市衛生研究所)  
吉田孝子 (奈良県保健研究センター)  
萩田堅一、坂野 桂、秋山由美 (兵庫県立健康生活科学研究所)  
角森ヨシエ、福岡藍子、酒井智健 (島根県保健環境科学研究所)  
狩屋英明、仲 敦史 (岡山県環境保健センター)  
福田千恵美 (香川県環境保健研究センター)  
中山志幸 (福岡県保健環境研究所)  
藤田景清 (北九州市保健環境研究所)  
鈴木仁人、甲斐明美 (国立感染症研究所)  
宮本仁志、田内久道 (愛媛大学医学部)  
青野 学、仙波敬子、園部祥代、阿部裕樹 (愛媛県立衛生環境研究所)  
菅 美樹

### 研究要旨

前年度に引き続き 2017 年に分離されたヒト及び食品由来サルモネラ株について薬剤耐性状況を調査するとともに、2015～2016 年に分離されたサルモネラ株について血清型別の耐性傾向を詳細に解析し、さらに、2015～2017 年に分離された大腸菌（下痢原性大腸菌を含む）株についても調査した。2017 年分離のサルモネラ株のうち 18 剤中の 1 剤以上に耐性を示した株は、ヒト由来 322 株中の 118 株(36.3%)、食品由来 85 株中の 76 株(89.4%)で、2015～2016 年分離株と同様の傾向であった。多剤耐性状況については、ヒト及び食品由来株ともに 2～3 剤耐性が多く、6 剤以上に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 5 株、食品由来株中に 8 株（うち 6 株は外国産鶏肉由来株）認められた。外国産鶏肉由来株はアンチバイオグラムにおいて国産鶏肉由来株とは異なる耐性傾向を示した。2015～2016 年分離のサルモネラ株について血清型別の詳細な解析を行ったところ、食品由来株では血清型別の耐性傾向に共通する部分が多いがそれぞれに特徴的な点も認められ、ヒト由来株におい

ては血清型別に特徴的な耐性傾向が認められた。また、ヒト由来株のうち食品からも分離された血清型群では、両者の間に明瞭な類似性が認められた。特に、**Infantis** 及び **Schwarzengrund** ではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性が見られ、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。一方、大腸菌については、2015～2017年分離のヒト由来 581株中の 247株(42.5%)、及び食品由来 21株中の 11株(52.4%)が 1剤以上に耐性を示した。腸管出血性大腸菌(EHEC)以外の下痢原性大腸菌株の耐性率が EHEC 株よりも約 2倍高かったが、多剤耐性状況は両者とも同様であった。その他の大腸菌株は 6剤以上の多剤耐性株が多く、下痢原性大腸菌株よりも多種類の抗菌剤に耐性を示した。大腸菌においても、外国産食品由来株は国産食品由来株とは異なる耐性傾向を示した。これらの地研における薬剤耐性データを JANIS や JVARM など既存の薬剤耐性データベースと統合し一元化することも本研究班で可能となり、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

## A. 研究目的

薬剤耐性(AMR)の問題は医療現場に限定されるものではなく、耐性菌は生態系で循環するとの考えが近年提示されている。こうした背景から、環境—動物—食品—ヒトなどを包括するワンヘルス・アプローチが重要であるという認識が共有され、WHO は 2015 年に「AMR に関するグローバルアクションプラン」を採択し、これを受けて、2016 年 4 月に我が国においても「AMR 対策アクションプラン」が策定された。このうち、動物については農林水産省で実施している JVARM(Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)による耐性菌モニタリングシステムがあり、病院内の耐性菌については厚生労働省で行われている JANIS(Japan Nosocomial Infections Surveillance)によるサーベイランスがある。一方、食品由来耐性菌については、これらのシステムではモニターされていない。

一昨年度の本研究分担班の調査で、地方衛生研究所(以下、地研)の多くが、食中毒原因菌等の食品由来細菌の薬剤耐性状況を調べていることが明らかにされ、昨年度、全国の地研の協力を得て、ヒト(患者)由来及び食品由来細菌、特に 2015～2016 年に分離されたサルモネラ属菌の薬剤耐性状況調査を、共通のプロトコル、薬剤、器材等を用いて実施した。このような統一された全国規模の調査は、本邦では初めてと思われる。得られたデータは、WHO グローバルアクションプランの一環として展開されている、GLASS(Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)に報告する日本のデータベース構築に活用されるとともに、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2017」にも提供された。

今年度は前年度に引き続き 2017 年に分離されたサルモネラ株について薬剤耐性状況を調査するとともに、2015～2016 年に分離されたサルモネラ株の各種抗菌剤に対する耐性率を血清型別に詳細に解析した。加えて、2015～2017 年に分離された大腸菌(下痢原性大腸菌を含む)の薬剤耐性状況についても調査した。

## B. 研究方法

### 1. 調査対象菌株

2017 年にヒト(患者)及び食品から分離され、サルモネラ属菌と判定された菌株、及び 2015～2017 年にヒト(患者)及び食品から分離され、大腸菌と判定された菌株を対象とした。ヒト由来株は、感染性胃腸炎や食中毒の患者検体から分離されたものを対象とし、検体情報として、性別、年齢、症状、検体の種類、分離年を可能な範囲で求めた。食品由来株は、分離した食品の種類、分離年月日を求め、食品が食肉の場合は、国産、輸入(国名)、不明の情報を記載した。

### 2. 薬剤感受性検査

協力 21 地研でサルモネラ属菌及び大腸菌と判定された菌株を用い、昨年度報告書に示した「渡邊班地研グループ薬剤感受性検査プロトコル」にしたがって、CLSI ディスク拡散法による薬剤感受性検査を実施した。検査に用いる感受性ディスク等の試薬、ディスクディスペンサーやノギス等の器具は全ての地研で共通のものを用いた。寒天平板上の感受性ディスクの配置は、阻止円が融合しないように配置した。阻止円径を測定し、大腸菌株の結果の判定は、感受性判定表(別表)にしたがって行い、サルモネラ株の判定は昨年度報告書記載の感受性

判定表にしたがって行った。

### 3. 結果の報告・集計と解析

サルモネラ株及び大腸菌株の検体情報、血清型（O 抗原、H 抗原）、感受性ディスク阻止円径、その SIR 判定結果を感受性検査結果表に記載した。加えて、大腸菌株については病原因子やマーカー遺伝子の有無から、下痢原性大腸菌分類（腸管出血性大腸菌 EHEC、腸管毒素原性大腸菌 ETEC、腸管侵入性大腸菌 EIEC、腸管病原性大腸菌 EPEC、腸管凝集付着性大腸菌 EAggEC、他の下痢原性大腸菌）を記載した。これらの結果は研究分担者である愛媛県立衛生環境研究所に送付され、集計・解析された。なお、コリスチンについては、CLSI ディスク拡散法の SIR 判定表がないため、阻止円径のみを記載した。

### 4. サルモネラ株の血清型別薬剤耐性解析

2015～2016 年分離のサルモネラ株を対象に、血清型別に各種抗菌剤に対する耐性率を解析し、血清型間で比較した。

### 5. コリスチン耐性遺伝子の検出

上述のように、コリスチンについては感受性試験のみから SIR 判定ができないため、コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1, 2, 3, 4, 5*)のマルチプレックス PCR 法を開発し、2015～2016 年分離のサルモネラ株のうちコリスチン阻止円径が 12 mm 以下の菌株を対象にコリスチン耐性遺伝子の検出を行った。

### 倫理面への配慮

本研究課題は、分担者を研究代表者、協力地研担当者を研究協力者として、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会で審査され、研究の許可が決定された。本審査にしたがい、全ての分離株及び調査情報は個人を特定できる情報を含まない状態で収集し、本研究に用いた。

## C. 研究結果

### 1. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の血清型

2017 年に収集されたサルモネラ株は、ヒト由来 322 株及び食品由来株 85 株で、総計 407 株であった。これらの O 血清群の内訳を図 1 に示す。ヒト由来では、O4 が最も多く、次いで、O7、O9、O8 の順に多い。一方、食品由来株では、O4、次いで O7、O8 群の順で、この 3 つが主な血清群であり、そのほかの群は少数であ

った。これらの結果は 2015～2016 年分離株と同様の傾向であった。血清型別の内訳を図 2 に示す。2015～2016 年分離の食品由来株で上位ではなかった Heidelberg は、2017 年に外国産食品（鶏肉）から分離されたものである。ヒト由来株については、順位に多少の変動はあるが、2015～2016 年分離株と同様の傾向であった。

### 2. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の薬剤耐性状況

ヒト由来株 322 株のうち、調べた 18 剤のうち 1 剤以上に耐性を示した株は 117 株で、耐性率は 36.3%であった（表 1）。一方、食品由来株 85 株のうち、76 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 89.4%であった。これらについても 2015～2016 年分離株と同様の傾向であった。

ヒト由来株は有症者（患者）から分離された菌株を対象としたが、糞便由来が最も多く 70.2%(226/322)を占めた。その耐性率は 31.0%で、ヒト由来株全体の耐性率とほぼ同じであった（表 2）。検体別に見ると、血液由来株は耐性率が高い傾向であった(6/6, 100%)。次に、ヒト由来株を患者年齢別に解析した。年齢区分は GLASS の報告様式にしたがった。検体数を考慮すると、年齢別の耐性率に目立った偏りは認められなかった（表 3）。一方、食品由来株の食品別内訳は、89.4%(76/85)が国産鶏肉で、約 10%が外国産であった（表 1）。

### 3. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の多剤耐性状況

複数の薬剤に対する耐性状況について調べると（図 3）、ヒト由来株では 3 剤耐性株が多く、食品由来株では 2 剤耐性株が多かった。6 剤以上に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 5 株、食品由来株中に 8 株認められた。この 8 株のうち 6 株は外国産鶏肉由来株であった（タイ産 1 株、ブラジル産 7 株）。ヒト由来の 5 株について詳細を表 4 に示す。

### 4. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の各種抗菌剤に対する耐性率について

抗菌剤別の耐性状況を図 4 に示す。ヒト由来株、食品由来株ともに、TC, SM に対する耐性率が最も高く、ABPC, KM, NA, ST がそれらに続く耐性率であった。全体として、ヒト由来株と食品由来株の 18 剤に対する耐性率のパターンに明瞭な類似性が認められた。基質特異性拡張型 βラクタマーゼ(ESBL)産生菌及び AmpC 型 βラクタマーゼ(AmpC)産生菌との関連が示



唆される CTX, CAZ, CFX 耐性も数%認められた。一方、アミノグリコシド系薬 GM、AMK、キノロン系薬 CPMX、NFLX、ホスホマイシン系薬 FOM、カルバペネム系薬 IPM、MEPM に対する耐性率は低いか、0%であった。

CTX, CAZ, CFX に耐性の株は、ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌の可能性があり、ヒト由来株中に 7 株、食品由来株中に 8 株見いだされた。表 5 に示すように、これらの株の多くは 3 剤のうち複数の薬剤に耐性を示した。

5. 外国産鶏肉由来サルモネラ株の耐性状況  
2015～2016 年の食品由来株は無作為に収集され、外国産食品由来株は全 266 株中 2 株と少なかったことから、今年度は外国産食品（鶏肉）を対象に分離株を収集した。この作業は 3 つの地研に限定したため分離株数は 8 株と少なかったが、これらの株には 6 剤以上の多剤耐性株が多く（図 3）、また、ABPC, CTX, CAZ, CFX 耐性率が高い一方、SM 耐性率が低いなど、国産鶏肉由来株とは異なる傾向が見られた（図 4）。

6. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の血清型別の耐性率の比較

2015～2016 年分離のサルモネラ株（266 株）について血清型別の詳細な解析を行った。食品由来株において、Infantis, Schwarzengrund, Manhattan は、これらで全体の約 8 割を占め、国産鶏肉から検出される主要な血清型と考えられる。これらの株の各種抗菌剤に対する耐性率には共通する部分が多いが、それぞれの血清型に特徴的な点も認められた。すなわち、Schwarzengrund では CTX, CAZ, CFX 耐性が見られず、Manhattan では KM 耐性が見られなかった（図 5）。一方、ヒト由来株においては血清型別の耐性率に興味深い特徴が認められた。O4:i:- は国産鶏肉からの検出率は低いですがヒトでは主要な血清型の一つで、ABPC, SM, TC に対する耐性率が最も高く、国産鶏肉由来株の主な血清型である Infantis, Schwarzengrund では ABPC 耐性率は低いですが SM, TC 耐性率は高かった。鶏肉よりも鶏卵から分離される Enteritidis では SM, TC 耐性率は低く、本調査において食品からは分離されなかった Saintpaul, Thompson においても SM, TC 耐性率は低かった（図 6）。

次に、ヒト由来株の血清型のうち、食品からも分離されたもの（Infantis, Schwarzengrund, Manhattan, Enteritidis, O4:i:-, Braenderup, Agona 等）と分離されなかったもの（Thompson,

Saintpaul, Chester, Newport, Nagoya, Litchfield, Bareilly 等）に分けて、耐性率を比較した。食品から分離された血清型と同じヒト由来株の耐性率は 56.8%であったのに対し、食品から分離されなかった血清型では 19.1%であった。図 7 に示すように、各種抗菌剤に対する耐性傾向において、ヒト由来株のうち食品からも分離された血清型群では食品由来株と間に明瞭な類似性が認められたが、KM 耐性のみ類似しなかった。さらに、食品由来株の主要な血清型である Infantis 及び Schwarzengrund について、ヒト由来株と食品由来株の各種抗菌剤に対する耐性率を比較すると、両血清型ともヒト由来株と耐性傾向が強く類似しており、Schwarzengrund では耐性率そのものもヒト由来株と近似であった（図 8）。

#### 7. コリスチン耐性遺伝子の検出

コリスチンについては、ディスク法による薬剤感受性試験では SIR 判定ができないが、本研究とは別の研究で、阻止円径が小さい（11 mm 以下）サルモネラ株から *mcr* 遺伝子が検出され、微量液体希釈法により MIC（最小阻止濃度）から耐性であることが決定された。そこで、本研究において、コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1, 2, 3, 4, 5*)のマルチプレックス PCR 法を用いて、コリスチン阻止円径（11 mm 以下、12 mm、13 mm、14 mm 以上に分類）が 11 mm 以下及び 12 mm の 129 株（ヒト由来 98 株、食品由来 31 株）を対象にコリスチン耐性遺伝子の検出を行い、食品由来株 1 株が *mcr-5* 陽性であることを明らかにした。

8. ヒト及び食品から分離された大腸菌株の薬剤耐性状況

2015～2017 年分離のヒト由来大腸菌株 581 株のうち、18 剤の 1 剤以上に耐性を示した株は 247 株で、耐性率は 42.5%であった（表 6）。大腸菌株の分類別耐性率は、EHEC32.3%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 76.5%、その他 68.8%であり、EHEC 以外の下痢原性大腸菌株の耐性率が EHEC 株よりも 2 倍以上高かった。一方、食品（牛肉、鶏肉など）由来株 21 株のうち、11 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 52.4%であった。分類別耐性率は、EHEC33.3%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 66.7%であった。

9. ヒト及び食品から分離された大腸菌株の多剤耐性状況及び各種抗菌剤に対する耐性率について

ヒト由来株のうち、18 剤の 1 剤以上に耐性を示した EHEC 以外の下痢原性大腸菌株の頻度は EHEC 株より 2 倍以上高かったが、多剤耐性状況については両者間でほとんど差がなく、EHEC においても 6 剤以上に耐性を示す株が認められた (図 9 上)。各種抗菌剤に対する耐性率では、ABPC, ST, CTX, NA 及びキノロン系薬 CFFX, NFLX に対して、EHEC 以外の下痢原性大腸菌株が EHEC 株よりも耐性率が高く、その他の株は CTX, CAZ, CFX, キノロン系薬及びカルバペネム系薬 MEPM 等に耐性を示した (図 9 下)。6 剤以上に耐性を示したヒト由来大腸菌 37 株の詳細を表 7 に示す。

CTX, CAZ, CFX に耐性の株が、ヒト由来株中に 36 株見いだされた。表 8 に示すように、下痢原性 EC 株の多くは 3 剤のうち 1 剤薬剤に耐性を示し、その他の株の多くは 2~3 剤に耐性を示した。

外国産食品及び国産食品から分離された大腸菌株の各種抗菌剤に対する耐性率を比較すると (図 10)、GM, AMK, CTX, キノロン系薬 CFFX, NFLX 等に対して、外国産食品由来株の耐性率が国産食品由来株よりも高く、国産、外国産間で異なる傾向が見られた。

#### D. 考察

昨年度に引き続き、地域性を考慮した 21 地研の協力を得て、ヒト (有症者、大部分は便検体) 及び食品 (大部分は国産鶏肉) から、2017 年に分離されたサルモネラ株の薬剤耐性状況を調査した。ヒト由来株 (322 株) は 36.3%、食品由来株 (85 株) は 89.4%が、1 剤以上の抗菌剤に耐性を示した。それぞれにおいて、2017 年分離株は 2015~2016 年分離株とほぼ同じ耐性率を示し、現在の日本における状況を反映していると考えられる。

ヒト由来サルモネラ株の血清型は非常に多様で多くの型が含まれていたが、食品由来株は 5 種類の型が約 90%を占め、ある程度限定された血清型が養鶏場等で定着している可能性が示唆された。また、ヒト由来株の耐性率は、検体数を考慮すると、患者の年齢別で大きな偏りはないように思われた。血液由来の 6 株は全て耐性菌で、糞便由来よりも耐性率が高い傾向であった。一方、食品の約 90%は国産鶏肉で、分離株の耐性率は 88.2%であった。

多剤耐性状況については、ヒト由来株では 3 剤耐性、食品由来株では 2 剤耐性が多かった。6 剤~10 剤に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 5 株、食品由来株中に 8 株認められた。

ヒト由来株中に 11 剤耐性菌が 1 株認められた。これらの多剤耐性株ではプラスミドのゲノム解析やその伝達リスクについて調査する必要がある。

2015~2016 年の調査では外国産の食肉由来サルモネラ株が少なかったため、今回は外国産鶏肉からの分離株を収集した。これらは 8 株 (ブラジル産 7 株、タイ産 1 株) と株数は多くないが、6 剤以上に耐性を示す株が多い点やセフェム系薬 (CTX, CAZ, CFX) に高度耐性を示す点で、国産鶏肉由来株と異なる傾向を示した。今後、菌株数を増やして解析する必要がある。また、これらの株が ESBL 産生菌及び AmpC 産生株である可能性から、より詳細な遺伝子解析が望まれる。

2015~2016 年に分離されたサルモネラ株を対象に血清型別の耐性率パターンを解析すると、食品由来 (主として国産鶏肉) 株として主要な *Infantis*, *Schwarzengrund*, *Manhattan* では、各種抗菌剤に対する耐性率に共通する部分が多いが、血清型に特徴的な点も認められた。一方、ヒト由来株においては、血清型別の耐性率に特徴的な点も認められた。

今回、それぞれ独立に採取したヒト由来及び食品由来サルモネラ株の間で、薬剤耐性傾向に明瞭な類似性が認められたことから、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が示唆された。特に、*Infantis* 及び *Schwarzengrund* ではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来株がヒトサルモネラ症の感染源になっていることが示唆される。*Schwarzengrund* では耐性率そのものも近似であり、より直接的に感染源になっている可能性が示唆される。*Infantis* では鶏肉だけでなく、複数の感染経路があるのかもしれない。今回の結果は、いくつかの血清型について感染経路を具体的に推測させるもので、今後の研究と相まって、ワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

ヒト及び食品由来大腸菌株においても興味ある知見が得られた。EHEC, EHEC 以外の下痢原性大腸菌株、その他の大腸菌株の間で、抗菌剤に対する耐性率が相当に異なることが明らかにされた。生息環境の違いによって、抗菌剤に対する選択圧や薬剤耐性遺伝子の伝達頻度が異なることが可能性として示唆される。また、大腸菌においても、外国産食品由来株の耐性状況が国産食品由来株と異なることが示唆され、今後検体数を増やして調査する必要がある。

JANIS 及び JVARM には食品由来薬剤耐性菌の情報は含まれないことから、環境-動物-

食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチにおいて、地研における食品由来菌の耐性データは重要である。また、ヒト便検体由来サルモネラ株の耐性データについても地研での集積が大きいと言われている。JANIS 及び JVARM は、それぞれ病院及び動物由来耐性菌データベースであるが、本研究班で開発された相互変換ソフトウェアによって、地研での薬剤耐性菌のデータをこれらと合わせ一元化することが可能となった（柴山分担研究の項を参照）。今後、三者のデータをナショナルサーベイランスとして充実させ、ワンヘルス・アプローチに基づく薬剤耐性制御に繋げていくためには、地研による食品由来耐性菌のモニターを継続して実施していく体制整備が必要である。

#### E. 結論

全国の地方衛生研究所（21 地研）の協力を得て、2017 年に分離されたヒト及び食品由来サルモネラ株について薬剤耐性状況を調査するとともに、2015～2016 年に分離されたサルモネラ株について血清型別に詳細に解析し、さらに、2015～2017 年に分離された大腸菌（下痢原性大腸菌を含む）株についても調査した。地研における薬剤耐性データを JANIS や JVARM など既存の薬剤耐性データベースと統合し一元化することも本研究班で可能となり、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

#### F. 健康危険情報

（総括研究報告書にまとめて記載）

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 園部祥代、仙波敬子、阿部裕樹、青野 学、四宮博人：愛媛県で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌臨床株の POT 法による解析. 第 70 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2017.10.14-15, 広島
- 2) 四宮博人：AMR 対策アクションプランにおける地衛研の役割～特に食品由来耐性菌の実態調査. 地方衛生研究所研修フォーラム「AMR（薬剤耐性）One Health アプローチの公衆衛生学的意義」、第 76 回日本公衆衛生学会総会、2017.10.31-11.2, 鹿児島
- 3) Hiroto Shinomiya: Monitoring of antimicrobial resistance in bacteria of food origin, especially that of *Salmonella*. シンポジウム 7「環境・動物・食品に分布する耐性菌がヒトの感染症に与える影響を考える」、第 91 回日本細菌学会総会、2018.3.27-29, 福岡（予定）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別表

感受性判定表： 大腸菌（2015～2017 年分）

感受性ディスク名	耐性 (R) ≤ (mm)	中間 (I) (mm)	感性 (S) ≥ (mm)	<i>E. coli</i> ATCC25922
アンピシリン (ABPC)	13	14-16	17	16-22
セフトキシム (CTX)	22	23-25	26	29-35
ゲンタマイシン (GM)	12	13-14	15	19-26
カナマイシン (KM)	13	14-17	18	17-25
イミペネム (IPM)	19	20-22	23	26-32
ノルフロキサシン (NFLX)	12	13-16	17	28-35
シプロフロキサシン (CPFX)	15	16-20	21	30-40
ナリジクス酸 (NA)	13	14-18	19	22-28
ST 合剤 (SXT)	10	11-15	16	23-29
メロペネム (MEPM)	19	20-22	23	28-34
セフトジジム (CAZ)	17	18-20	21	25-32
ホスホマイシン (FOM)	10	11-15	16	—
クロラムフェニコール (CP)	12	13-17	18	21-27
セフォキシチン (CFX)	14	15-17	18	23-29
アミカシン (AMK)	14	15-16	17	19-26
ストレプトマイシン (SM)	11	12-14	15	12-20
テトラサイクリン (TC)	11	12-14	15	18-25
コリスチン (CL)	—	—	—	11-17

\*判定については感受性ディスク添付文書参照。

図1. ヒト及び食品由来サルモネラ株のO抗原別内訳  
(2017年分離株 n = 407)

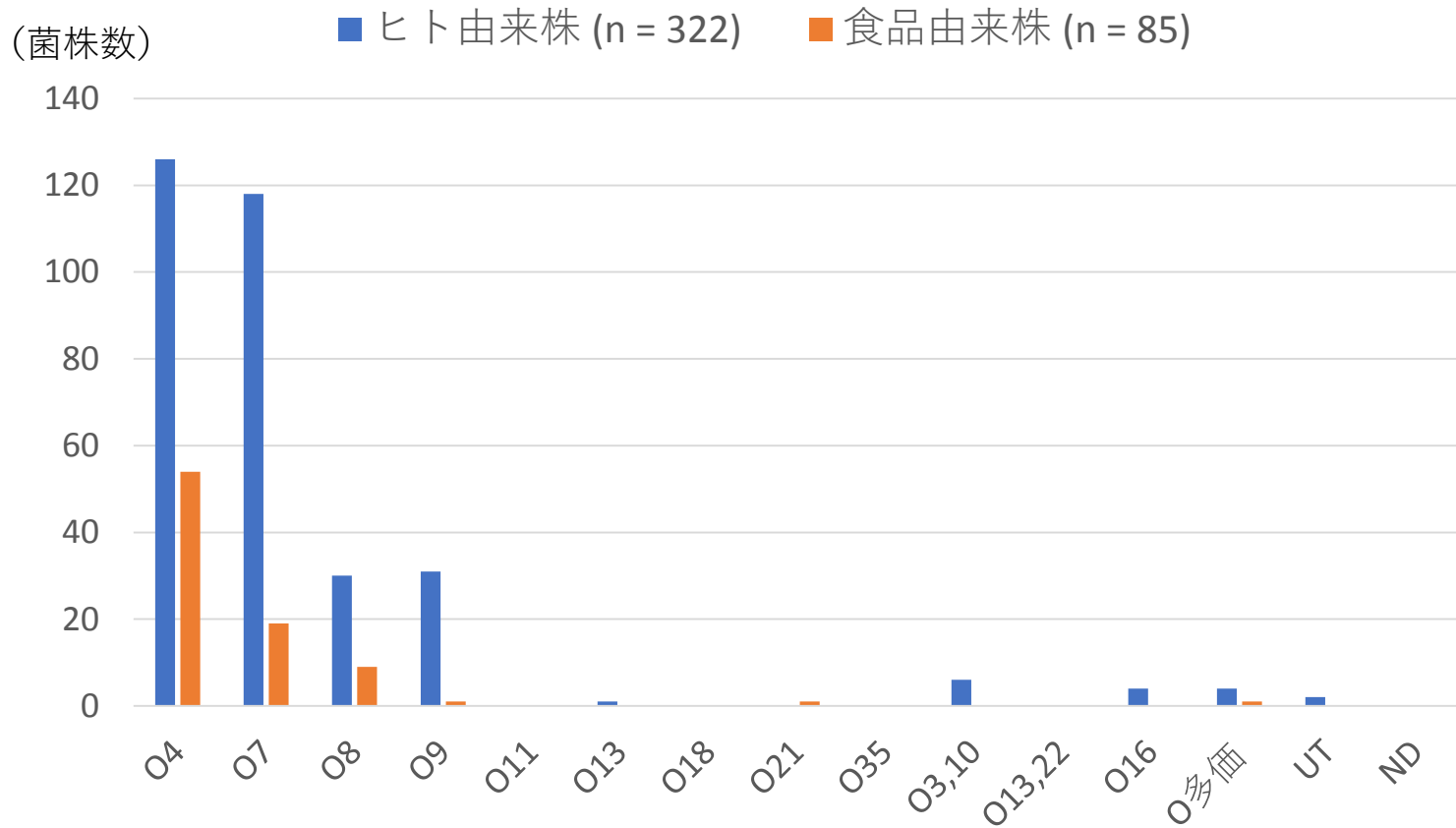
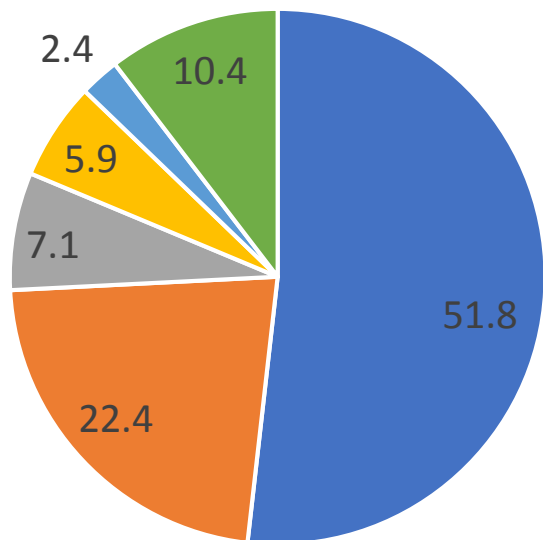
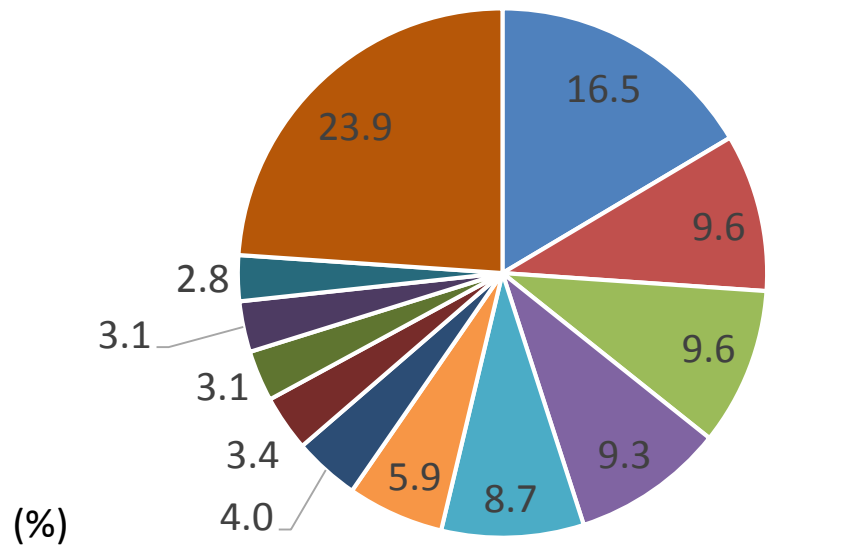


図2. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型  
(2017年分離株 n = 407)

食品由来株 (n = 85)



ヒト由来株 (n = 322)



- Schwarzengrund ■ infantis
- Heidelberg ■ Manhattan
- Typhimurium ■ その他

- infantis ■ O4:i:-
- Saintpaul ■ Enteritidis
- Thompson ■ Schwarzengrund
- Manhattan ■ Virchow
- Typhimurium ■ Stanley
- Agona ■ その他

表1. ヒト及び食品由来サルモネラ株の薬剤耐性状況  
(2017年分離株 n = 407)

由来		菌株数	耐性菌#	耐性率
ヒト由来		322	117	36.3%
食品由来	国産鶏肉	76	67	88.2%
	外国産鶏肉*	8	8	100%
	その他**	1	1	100%
	合計	85	76	89.4%

#18剤中の1剤以上の抗菌剤に耐性(R)を示した菌株

\*ブラジル産7株、タイ産1株

\*\*豪州牛肉・国産鶏肉の混合物

表2. ヒト（患者）由来サルモネラ株の検体別内訳と耐性率  
 （2017年分離株 n = 322）

検体名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
糞便	226	70	31.0%
血液	6	6	100%
尿	6	1	16.7%
腸壁・腹部ドレーン	1	0	0%
不明	83	40	48.2%
合計	322	117	36.3%



表3. ヒト由来サルモネラ株の年齢別菌株数と耐性率  
(2017年分離株 n = 322)

年齢	菌株数	耐性菌株数	耐性率
0	4	0	0%
1～4	49	13	26.5%
5～14	55	19	34.5%
15～24	41	18	43.9%
25～34	34	11	32.4%
35～44	12	5	41.7%
45～54	16	10	62.5%
55～64	11	3	27.3%
65～80	19	9	47.4%
81以上	6	1	16.7%
不明	75	28	37.3%
合計	322	117	36.3%

図3. ヒト及び食品由来サルモネラ株の多剤耐性状況（2017年分離株）

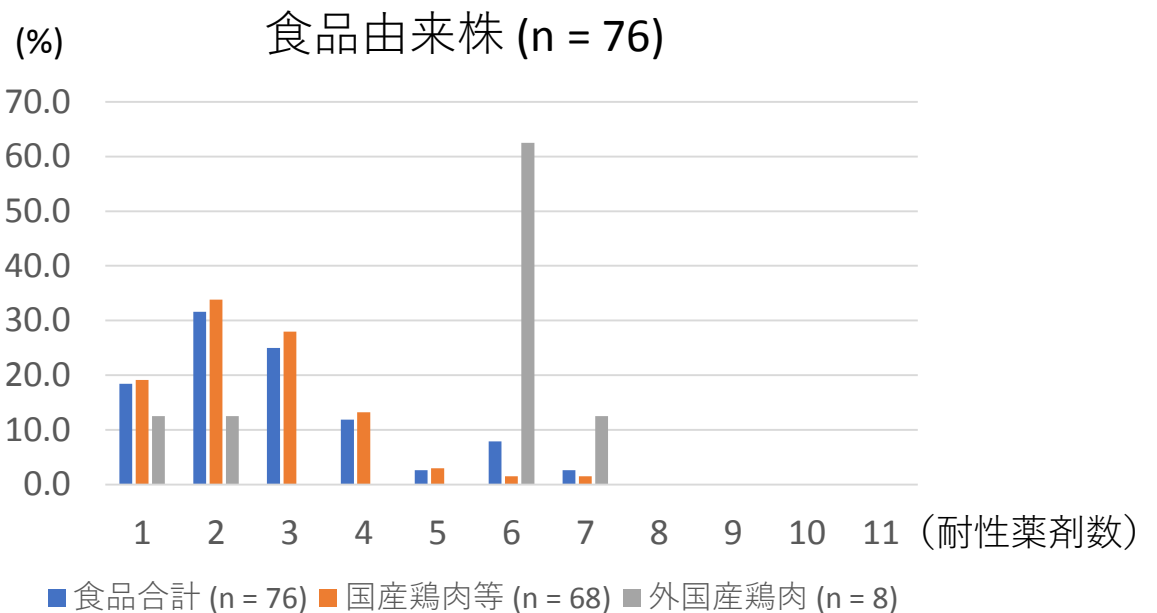
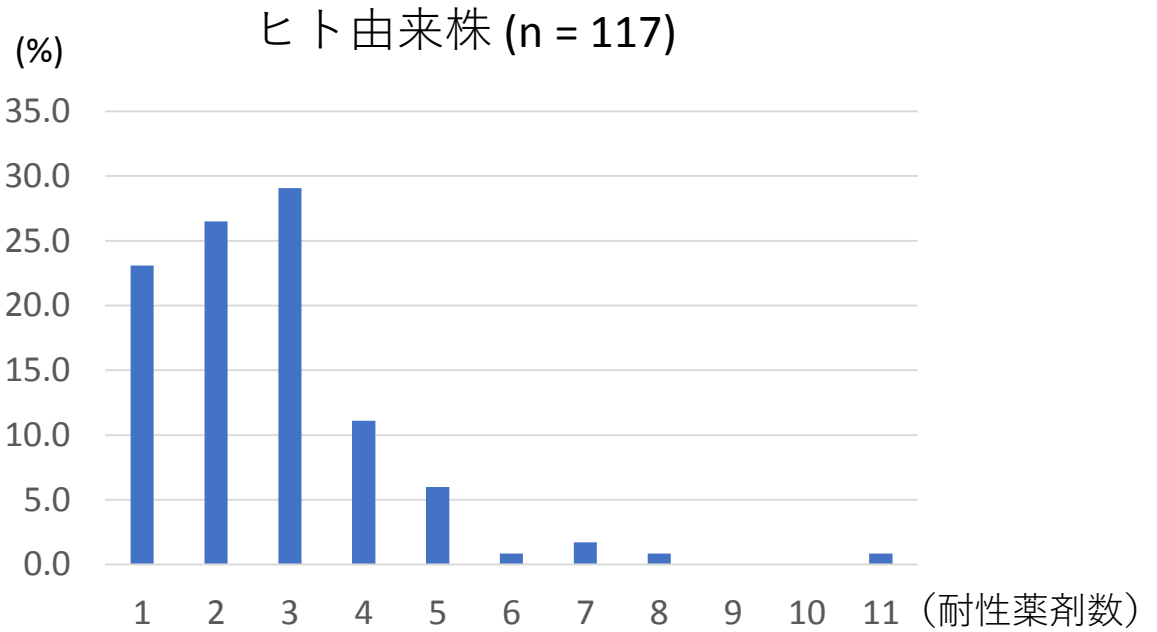


表4. 多剤耐性（6剤以上）を示したヒト由来サルモネラ株

菌株	血清型	耐性 薬剤数	耐性抗菌剤
1	Albany	6	ABPC, SM, TC, ST, CP, NA
2	Saintpaul	7	ABPC, SM, TC, ST, CP, CTX, FOM
3	Blockley	7	ABPC, KM, SM, TC, CP, CTX, CAZ
4	O4:i:-	8	ABPC, GM, KM, SM, TC, CTX, CAZ, CFX
5	Saintpaul	11	ABPC, GM, KM, SM, TC, ST, CP, CTX, CAZ, NA, CPMX

図4. ヒト及び食品由来サルモネラ株の各種薬剤耐性率（2017分離株）

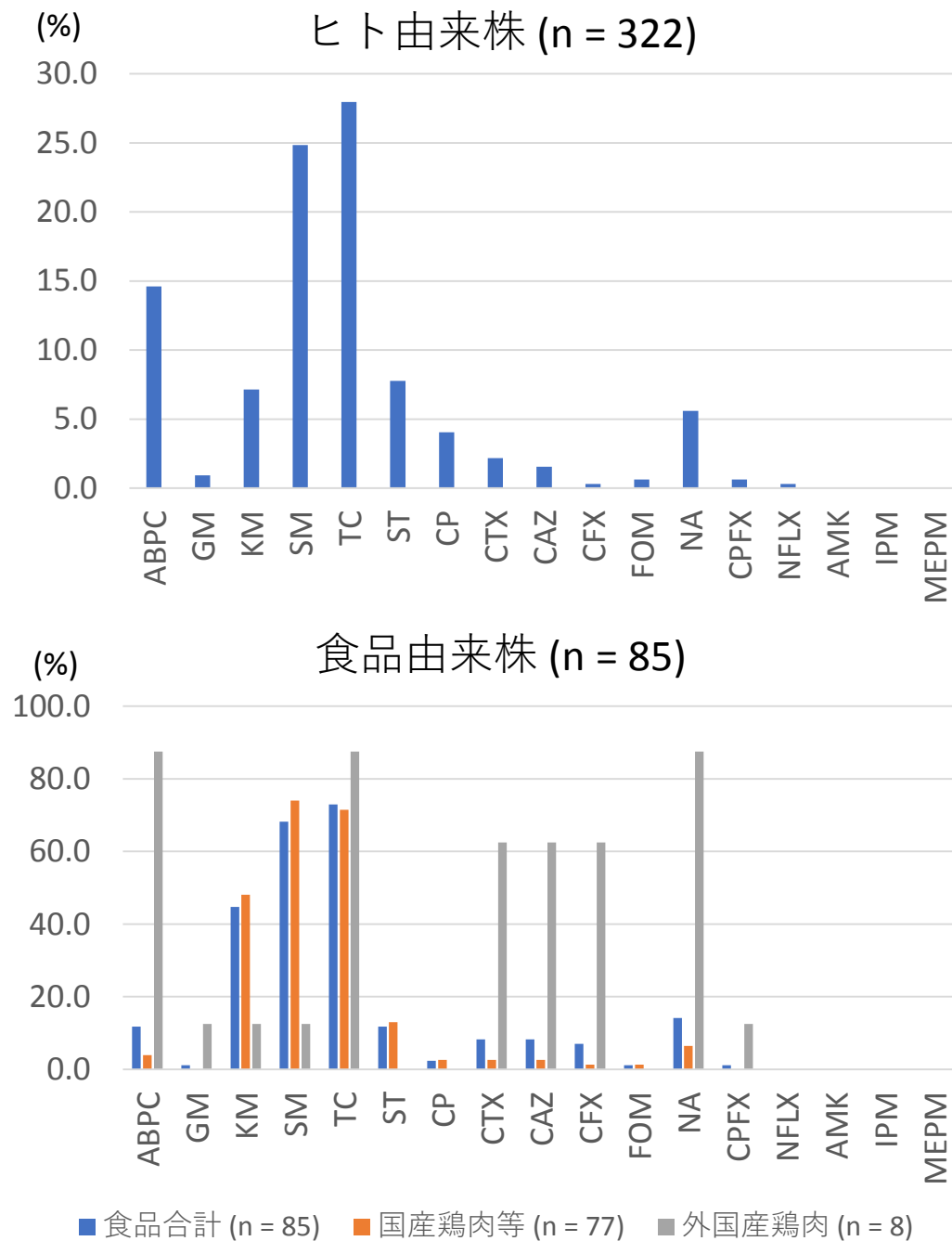


表5. セフェム系薬(CTX, CAZ, CFX)に耐性を示したヒト及び食品由来サルモネラ株 (2017年分離株)

由来	菌株	血清型	CTX	CAZ	CFX	耐性数	
ヒト	1	O4:i:-	R	R	R	8	
	2	Saintpaul	R	S	S	7	
	3	Typhimurium	R	S	S	2	
	4	Saintpaul	R	R	S	11	
	5	Blockley	R	R	S	7	
	6	Schwarzengrund	R	R	S	5	
	7	Schwarzengrund	R	R	S	5	
食品	1	Schwarzengrund	R	R	I	6	
	2	Infantis	R	R	R	7	
	3	Heidelberg	R	S	S	6	外国産
	4	Heidelberg	R	R	R	6	外国産
	5	Heidelberg	R	R	R	6	外国産
	6	Minnesota	I	R	R	6	外国産
	7	Heidelberg	R	R	R	6	外国産
	8	Heidelberg	R	R	R	7	外国産

図5. 食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率

(2015~2016年分離の合計 n = 266)

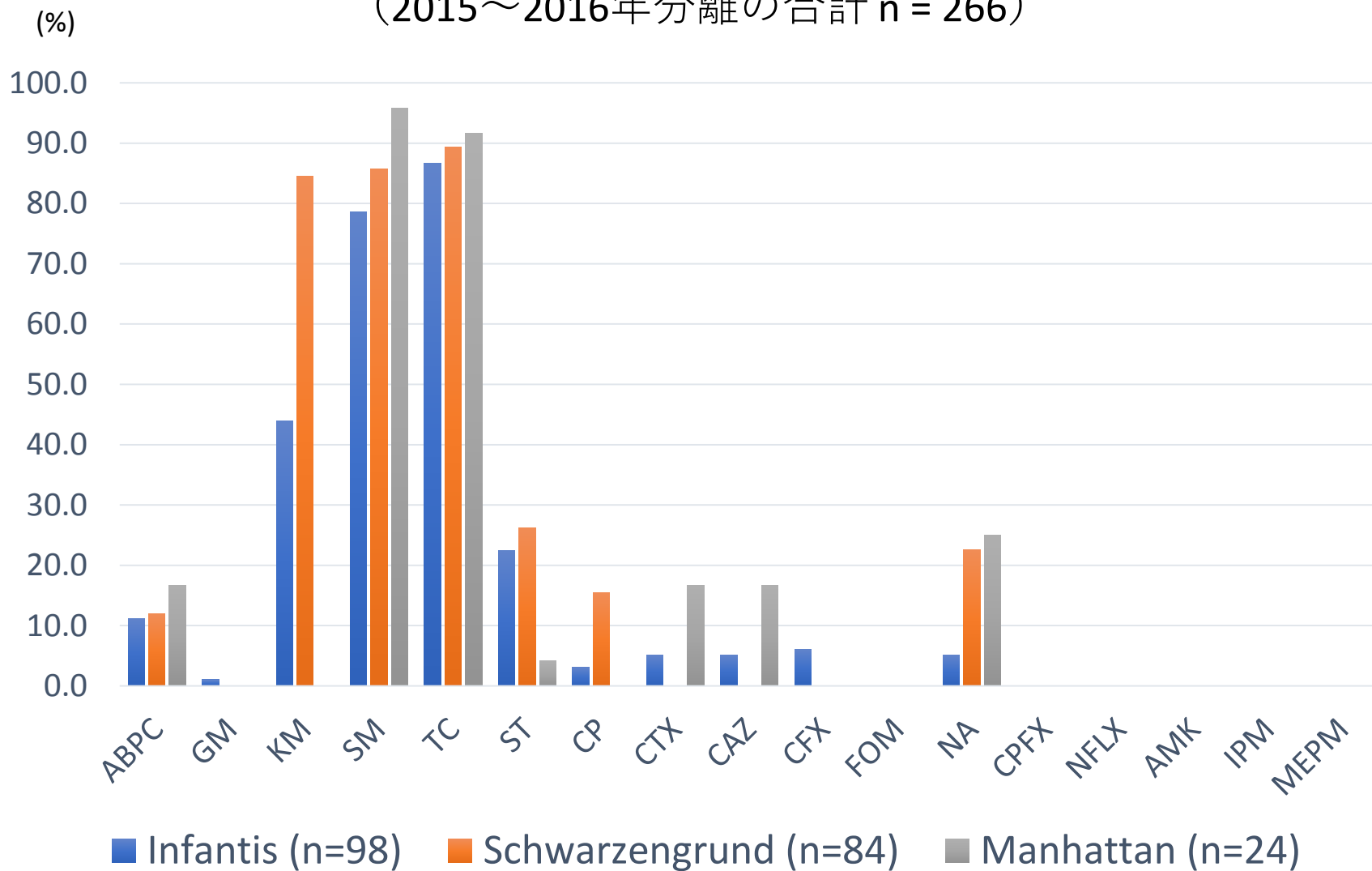


図6. ヒト由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率  
(2015～2016年分離株の合計 n = 651)

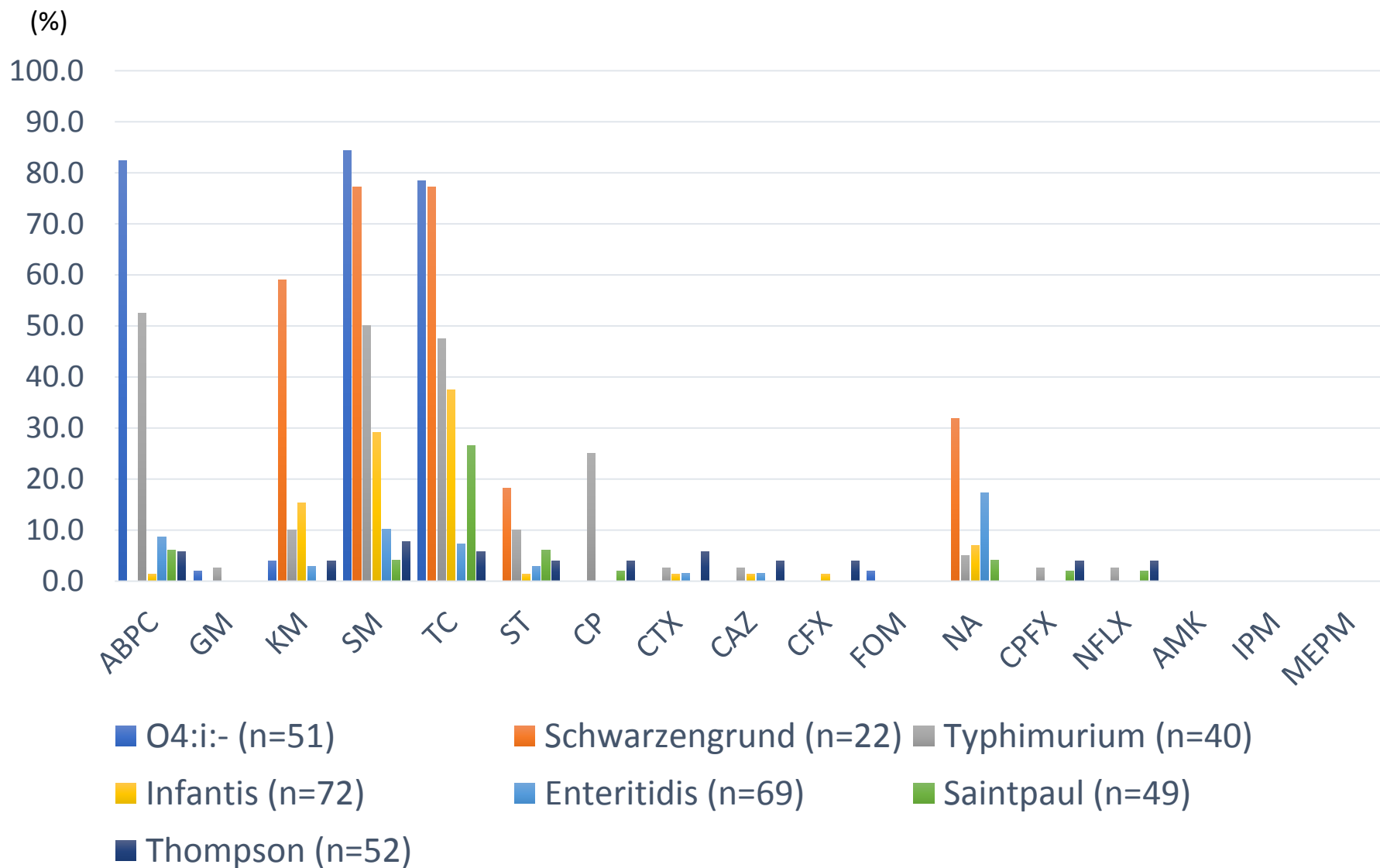
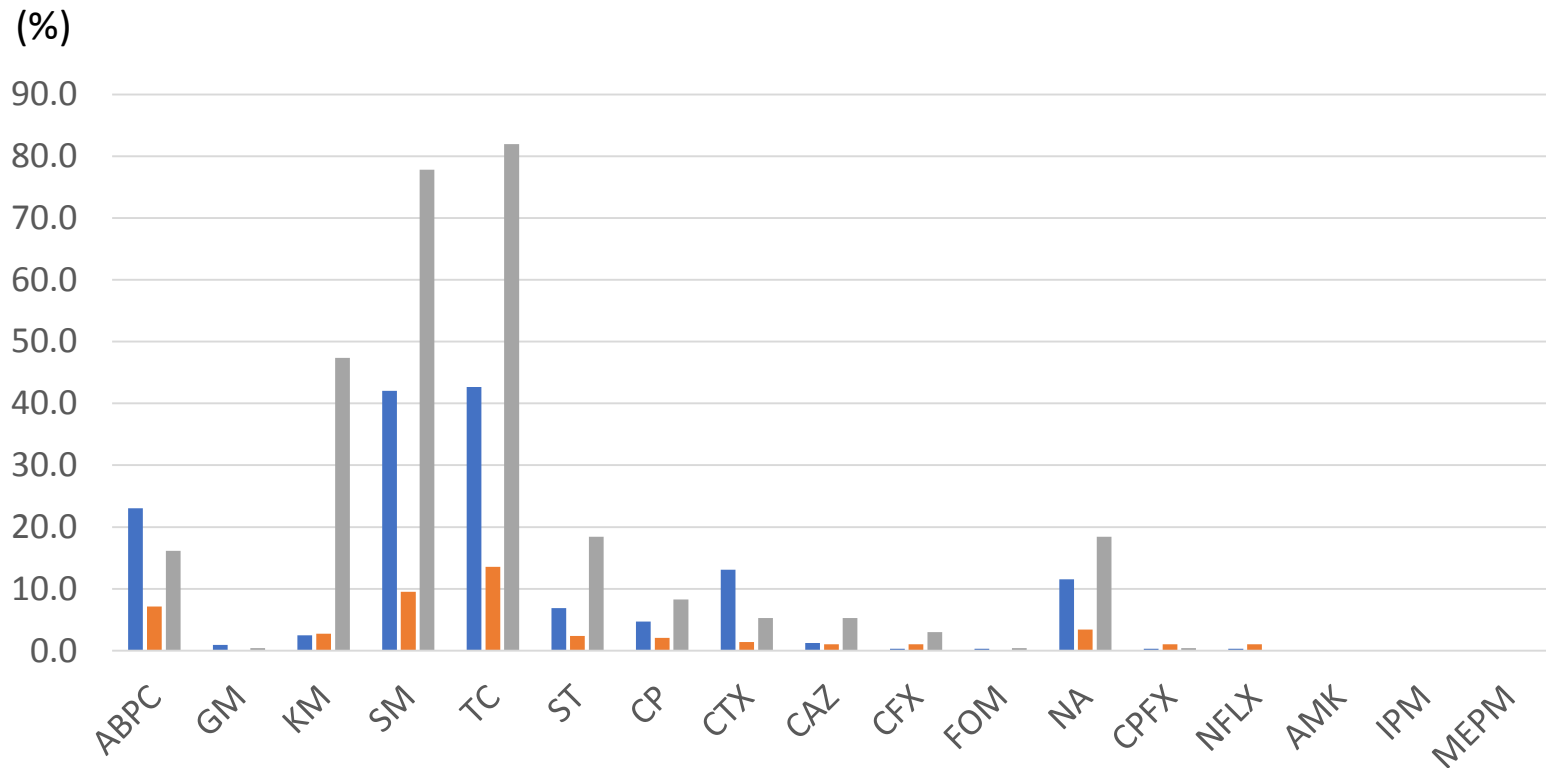


図7. ヒト由来サルモネラ株のうち、食品から分離された血清型と分離されなかった血清型の株の薬剤耐性率

(2015～2016年分離株の合計 n = 651)



- ヒト由来のうち食品から分離あり (n = 321)
- ヒト由来のうち食品から分離なし (n = 295)
- 食品由来 (n = 266)



図8. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率  
(2015～2016年分離株)

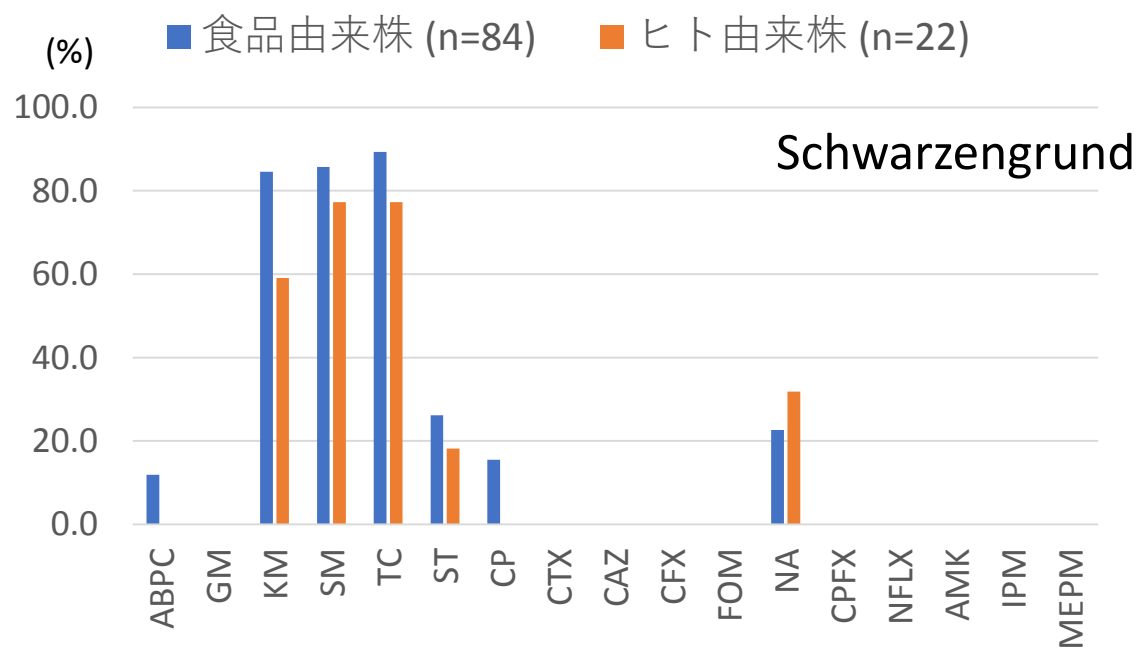
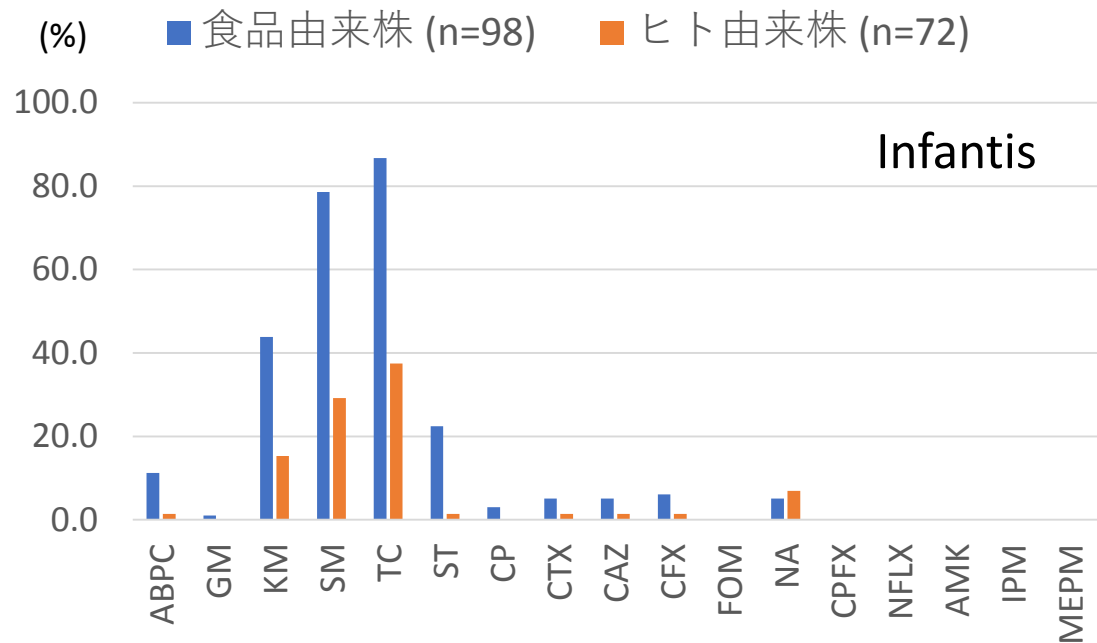


表6. ヒト及び食品由来大腸菌株の薬剤耐性状況  
(2015～2017年分離株 n = 602)

ヒト由来株 (n = 581)

	分類	株数	耐性数	耐性率
2015	EHEC	130	39	30.0
	下痢原性#	23	20	87.0
	その他*	12	6	50.0
	計	165	65	39.4
2016	EHEC	115	34	29.6
	下痢原性	32	24	75.0
	その他	24	15	62.5
	計	171	73	42.7
2017	EHEC	191	68	35.6
	下痢原性	26	18	69.2
	その他	28	23	82.1
	計	245	109	44.5
合計	EHEC	436	141	32.3
	下痢原性	81	62	76.5
	その他	64	44	68.8
	計	581	247	42.5

食品由来株 (n = 21)

	分類	株数	耐性数	耐性率
2015	EHEC	4	1	25.0
	下痢原性	2	2	100.0
	その他	0	0	-
	計	6	3	50.0
2016	EHEC	5	2	40.0
	下痢原性	2	2	100.0
	その他	0	0	-
	計	7	4	57.1
2017	EHEC	0	0	-
	下痢原性	8	4	50.0
	その他	0	0	-
	計	8	4	50.0
合計	EHEC	9	3	33.3
	下痢原性	12	8	66.7
	その他	0	0	-
	計	21	11	52.4

#EHEC以外の下痢原性EC (ETEC, EIEC, EPEC, EAaggEC, 他の下痢原性EC (上記5つに該当せず*astA*保有))

\*非病原大腸菌及び病原因子未検査株

図9. ヒト由来大腸菌株の多剤耐性状況及び各種薬剤耐性率  
(2015～2017分離株)

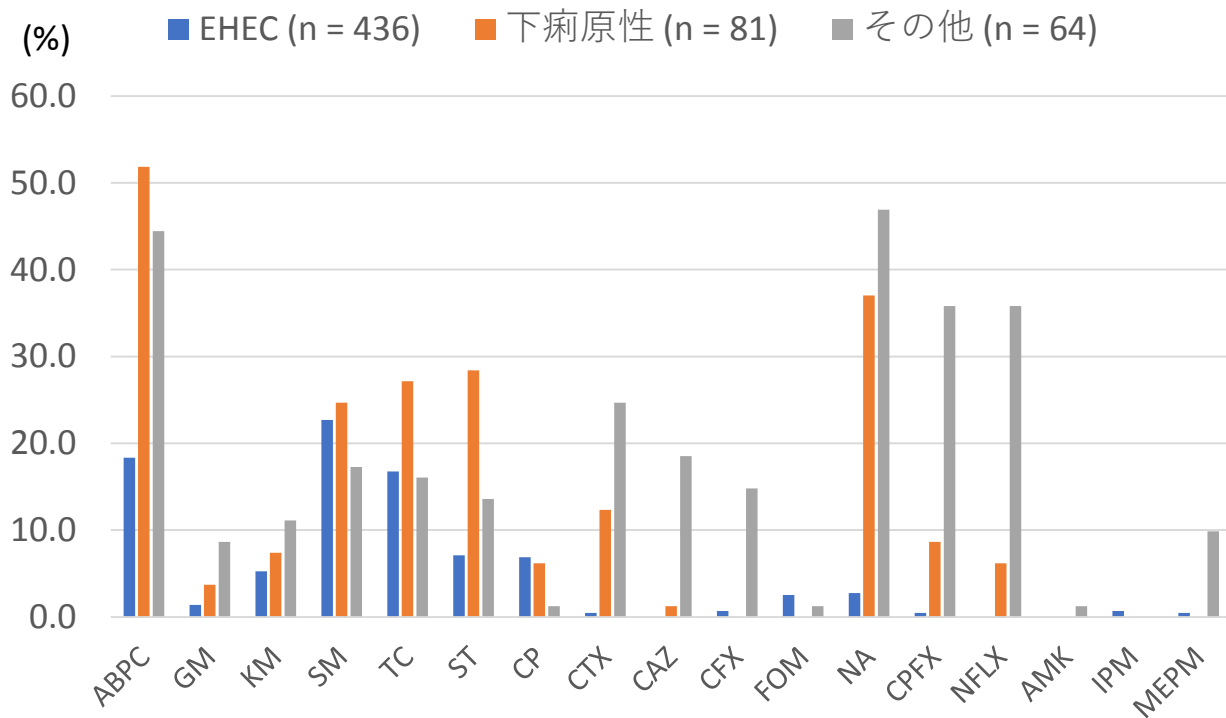
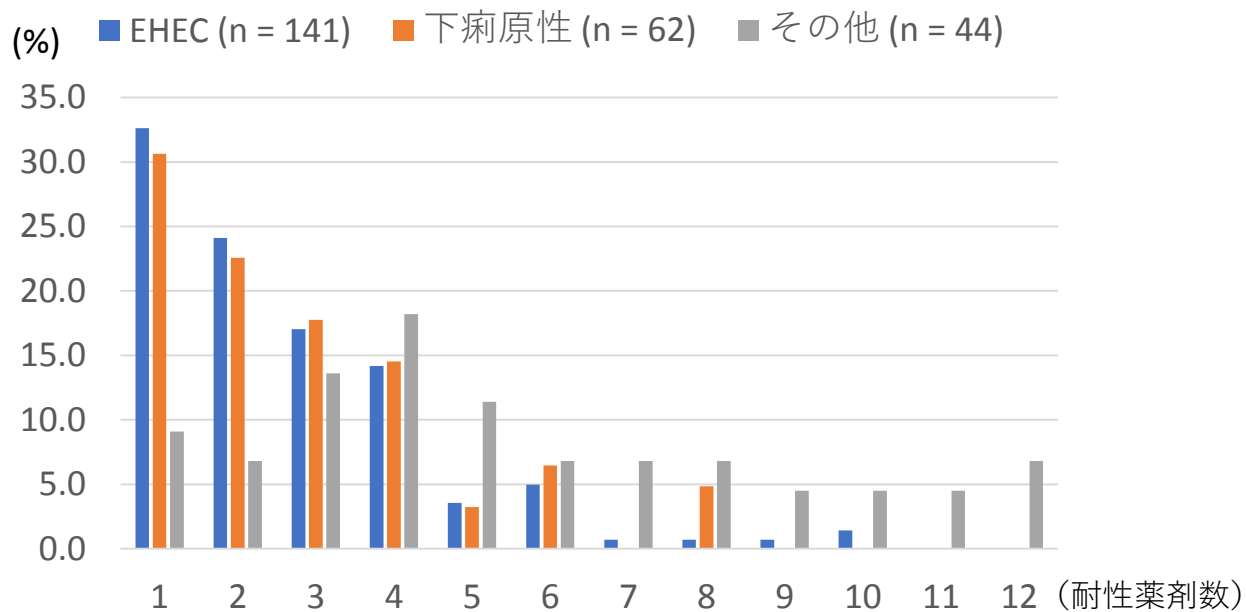


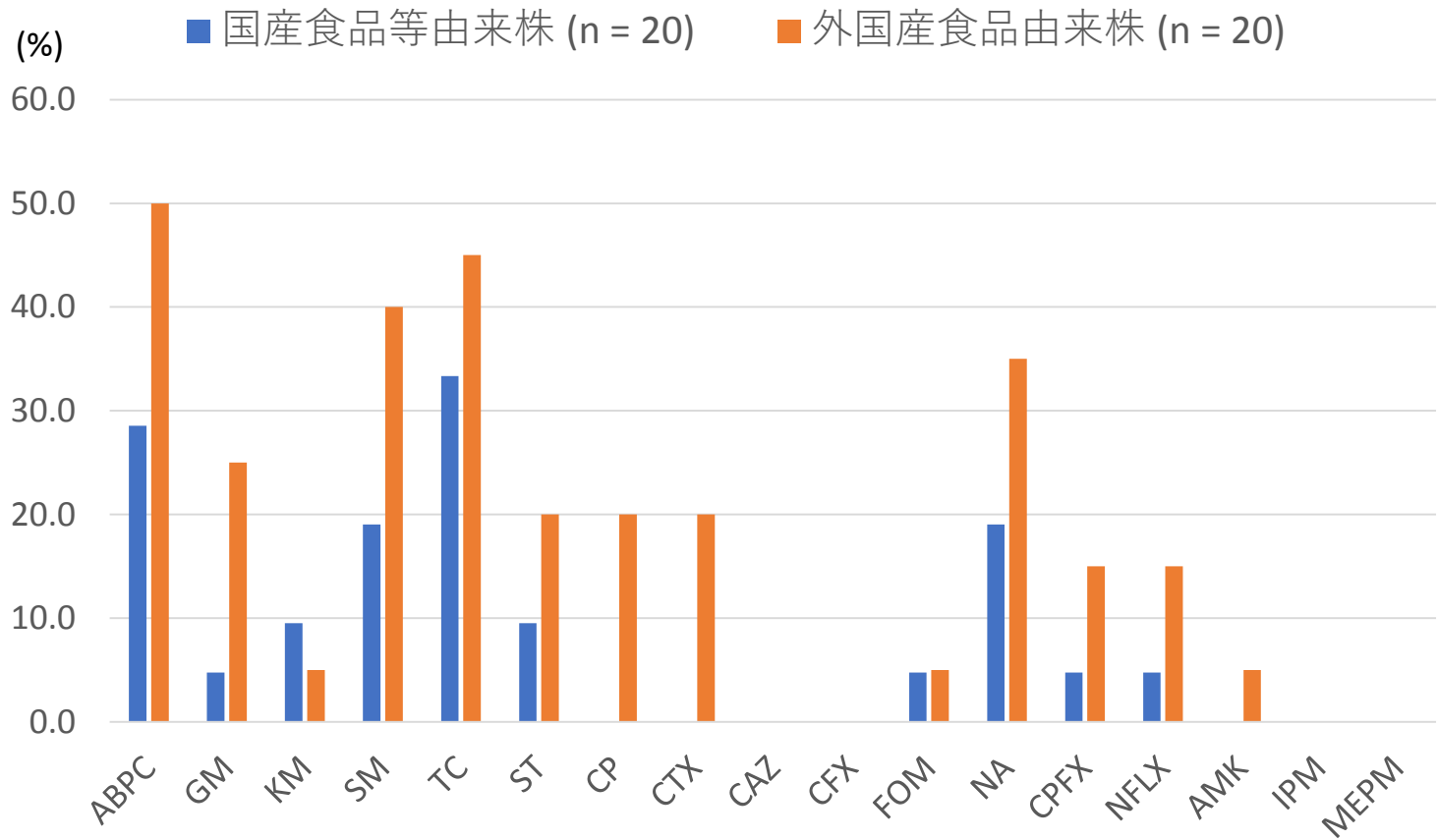
表7. 多剤耐性（6  
剤以上）を示した  
ヒト由来大腸菌株  
（2015～2017年分離  
株）

菌株	下痢原性大腸菌分類	耐性薬剤数	耐性抗菌剤
1	EHEC	6	KM,NA,ST,CP,SM,TC
2	EHEC	6	KM,NA,ST,CP,SM,TC
3	EHEC	6	KM,NA,ST,CP,SM,TC
4	EHEC	6	KM,NA,ST,CP,SM,TC
5	EHEC	6	KM,NA,ST,CP,SM,TC
6	EHEC	6	KM,NA,ST,CP,SM,TC
7	EPEC	6	ABPC,KM,NFLX,CPFX,NA,TC
8	他の下痢原性	6	ABPC,CTX,NFLX,CPFX,NA,SM
9	他の下痢原性	6	ABPC,KM,ST,CP,SM,TC
10	EHEC	6	ABPC,GM,KM,ST,SM,TC
11	EAggEC	6	ABPC,GM,NA,ST,SM,TC
24	その他	6	ABPC,CTX,NFLX,CPFX,NA,CAZ
25	その他	6	ABPC,CTX,NFLX,CPFX,NA,CAZ
35	その他	6	ABPC,CTX,NFLX,CPFX,NA,CAZ,
12	EHEC	7	ABPC,KM,NA,ST,CP,SM,TC
20	その他	7	ABPC,GM,NFLX,CPFX,NA,SM,TC
23	その他	7	ABPC,NFLX,CPFX,NA,ST,SM,TC
33	その他	7	ABPC,CTX,GM,CAZ,CFX,SM,TC
13	他の下痢原性	8	ABPC,GM,NFLX,CPFX,NA,ST,SM,TC
14	他の下痢原性	8	ABPC,GM,NFLX,CPFX,NA,ST,SM,TC
15	他の下痢原性	8	ABPC,NFLX,CPFX,NA,ST,CP,SM,TC
16	EHEC	8	ABPC,GM,KM,NA,ST,CP,SM,TC
21	その他	8	ABPC,CTX,NFLX,CPFX,NA,MEPM,CAZ,CFX
26	その他	8	ABPC,CTX,KM,NA,MEPM,CAZ,CFX,SM
34	その他	8	ABPC,CTX,NFLX,CPFX,NA,CAZ,FOM,CFX
17	EHEC	9	ABPC,GM,KM,NA,ST,CP,CFX,SM,TC
31	その他	9	ABPC,CTX,GM,KM,NFLX,CPFX,NA,CFX,SM
36	その他	9	ABPC,CTX,NFLX,CPFX,NA,ST,CAZ,SM,TC
18	EHEC	10	ABPC,GM,KM,CPFX,NA,ST,CP,CFX,SM,TC
19	EHEC	10	ABPC,GM,KM,CPFXNA,ST,CP,CFX,SM,TC
22	その他	10	ABPC,CTX,KM,NFLX,CPFX,NA,MEPM,CAZ,CFX,SM
29	その他	10	ABPC,CTX,KM,NFLX,CPFX,NA,MEPM,CAZ,CFX,TC
27	その他	11	ABPC,CTX,KM,NFLX,CPFX,NA,MEPM,CAZ,CFX,SM,TC
28	その他	11	ABPC,CTX,KM,NFLX,CPFX,NA,MEPM,CAZ,CFX,SM,TC
30	その他	12	ABPC,CTX,GM,KM,NFLX,CPFX,NA,MEPM,CAZ,CFX,SM,TC
32	その他	12	ABPC,CTX,GM,KM,NFLX,CPFX,NA,MEPM,CAZ,CFX,AMK,TC
37	その他	12	ABPC,CTX,GM,KM,NFLX,CPFX,NA,ST,CAZ,CP,SM,TC

表8. セフェム系薬(CTX, CAZ, CFX)に耐性を示したヒト由来大腸菌株（2015～2017年分離株）

菌株	下痢原性大腸菌分類	CTX	CAZ	CFX	耐性薬剤数
1	EHEC	R	I	S	3
2	EHEC	R	S	S	3
3	EHEC	S	S	R	9
4	EHEC	S	S	R	10
5	EHEC	S	S	R	10
6	ETEC	R	S	S	2
7	ETEC	R	S	S	3
8	ETEC	R	S	S	4
9	ETEC	R	S	S	4
10	EPEC	R	I	S	2
11	EAggEC	R	S	S	2
12	EAggEC	R	S	S	4
13	EAggEC	R	R	S	4
14	EAggEC	R	S	S	4
15	他の下痢原性	R	S	S	6
16	その他	R	S	S	2
17	その他	I	I	R	3
18	その他	R	S	S	5
19	その他	R	S	I	5
20	その他	R	S	S	5
21	その他	R	R	S	6
22	その他	R	R	S	6
23	その他	R	R	S	6
24	その他	R	R	R	7
25	その他	R	R	R	8
26	その他	R	R	R	8
27	その他	R	R	R	8
28	その他	R	I	R	9
29	その他	R	R	S	9
30	その他	R	R	R	10
31	その他	R	R	R	10
32	その他	R	R	R	11
33	その他	R	R	R	11
34	その他	R	R	R	12
35	その他	R	R	R	12
36	その他	R	R	I	12

図10. 国産食品及び外国産食品由来大腸菌株の各種抗菌剤に対する耐性率（2015 = 2017年分離株）



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）  
平成 29 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究  
分担課題 ヒトおよび食品由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者	小西 典子	(東京都健康安全研究センター微生物部)
研究協力者	尾畑 浩魅	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	赤瀬 悟	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	下島優香子	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	小野明日香	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	横山 敬子	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	平井 昭彦	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	甲斐 明美	(国立感染症研究所 細菌第一部)

### 研究要旨

2017 年にヒトから分離されたサルモネラは 120 株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 49.2% で、食品由来株の 89.8% と比較して耐性率は低かった。

フルオロキノロン系薬剤である CPFX および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で 2 株 (1.7%)、食品由来株では認められなかった。フルオロキノロン耐性株 2 株中 1 株は、9 薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。この様な多剤耐性株が拡大すれば、ヒトの治療に大きな影響があるものと示唆されたが、現時点ではサルモネラのフルオロキノロン耐性率はそれほど高くなく、また増加傾向も認められていないため拡大は限定的なものと考えられた。第 3 世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で 3 株 (2.5%)、食品由来株で 9 株 (7.0%) であり、2016 年分離株 (ヒト由来株 4 株、食品由来株 6 株) より増加していた。

2016 年に散発下痢症患者から分離した *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率はそれぞれ 52.2% および 35.7% であった。*C. jejuni* は例年とほぼ同様の耐性率であったが、*C. coli* は 2011 年の 87.5% と比較して年々減少傾向であった。また治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められなかった。

市販の食肉から分離された大腸菌を対象にプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) 保有状況を調べた結果、鶏肉由来株では 21 株、豚肉由来株では 2 株が陽性となった。

国産鶏肉は 86 検体中 11 検体 (12.8%)、輸入鶏肉は 27 検体中 5 検体 (18.5%)、国産豚肉は 55 検体中 1 検体 (1.8%)、輸入豚肉は 71 検体中 1 検体 (1.4%) から *mcr-1* 保有大腸菌が検出されたことから、食肉には広く *mcr-1* 保有大腸菌が存在することが明らかとなった。耐性菌で汚染された食肉を介して耐性菌が拡大していく可能性も考えられるため、今後もヒトからの検出状況等監視していく必要がある。

### A. 研究目的

ヒトの治療に影響を与える薬剤耐性菌の出現が依然として増加しており、世界的な問題となっている。このような状況下、2011 年 WHO は薬剤耐性菌に対し、ヒト、動物、環境といった垣根を越えた「One health」としての世界規模の取り組みの必要性を示した。薬剤耐性菌は医療現場のみならず、動物、家畜、水産および環境に至るすべての生態系で発生し拡散していくという考え方である。これらの考えを受け、

わが国でも耐性菌をコントロールするための「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」が 2016 年 4 月に示され、抗菌薬の適正な使用と薬剤耐性菌の動向調査・監視の強化等を行うことになった。

耐性菌の蔓延を防止するためには、その基礎資料となる薬剤耐性菌の変化や拡大を継続的に監視していくことが重要である。

そこで今回、人および食品から分離されるサルモネラ、カンピロバクターおよび大腸菌につ

いて薬剤耐性菌出現状況を調べた。

## B. 研究方法

### 1. ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

#### 1) 供試菌株

2017年にヒト(下痢症患者および無症状病原体保有者)から分離された120株および食品から分離された128株を供試した。集団事例由来株は代表株1株を計上した。

#### 2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験に用いる薬剤は、同じく研究分担者である埼玉県衛生研究所と共通の薬剤を用いた。すなわちABPC, GM, KM, SM, TC, SXT, CP, CTX, Su, FOM, NA, CPF, NFLX, AMK, IPM, MEPMの16薬剤である。更に一部の株については、セフトジジム(CAZ), セフォキシチン(CFX), コリスチン(CL)を追加した。これらの薬剤についてセンシディスク(BD)を用いたKBディスク法で調べた。

### 2. ヒト由来カンピロバクターの耐性菌出現状況

2016年に都内病院で分離された*C. jejuni* 113株および*C. coli* 14株を対象に薬剤感受性試験を行った。供試薬剤はABPC, TC, NA, CPF, NFLX, OFLX, EMの7薬剤である。

### 3. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2017年に搬入された飲食店従事者(下痢等の症状が無い者)の糞便521人から分離された大腸菌521株を供試した。これらの菌株を対象にサルモネラと同様の16薬剤にOFLXを加えた17薬剤を用いた薬剤感受性試験を行った。CTX耐性株についてはAmpC/ESBL鑑別ディスク(関東化学)を用いてAmpCまたはESBL産生菌の鑑別を行った。さらにESBL産生菌を疑う株についてはShibataらのプライマーおよび市販のプライマー(ESBL遺伝子型別キット, 関東化学)を用いて型別試験を実施した。

### 4. 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出

#### 1) 供試検体

2015年から2016年に都内で流通した鶏肉113検体(国産86検体, 輸入27検体), 豚肉126検体(国産55検体, 輸入71検体)を用いた。

#### 2) 大腸菌分離方法

食肉25gに普通ブイヨン30mlを加えストマッキング後, 乳剤をXM-G寒天培地(日水製薬)に滴下し, 分離培養を行う方法と, 食肉25gに緩衝ペプトン水(BPW)225mlを加え35°Cで18時間培養後, XM-G寒天培地に分離培養する方法で行った。塗抹したXM-G寒天培地は, 35°C, 18~24時間培養し, 出現した大腸菌定型集落を薬剤感受性試験に供試した。

#### 3) 供試菌株

鶏肉由来310株(国産240株, 輸入70株), 豚肉由来117株(国産54株, 輸入63株)の大腸菌を供試した。

#### 4) 薬剤感受性試験

コリスチンに対するMICを寒天平板希釈法(0.25μg/mL~16μg/mL)で測定した。MICが4μg/mL以上の株についてプラスミド性コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*)の保有をPCR法で確認した(Liu YY, *et al.* Lancet. Infect. Dis, 2016)。

## 4. 倫理面への配慮

全てのヒト由来株および調査情報は, 個人を特定できる情報を含まない状況で収集し, 本研究に用いた。なお, 本研究は東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を受けている。

## C. 研究結果

### 1. ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

2017年にヒトから分離されたサルモネラは120株で34血清型に, 食品由来株は128株で12血清型に分類された(表1)。分離された血清型を比較すると04群Schwarzengrund, 04群Agona, 07群Infantisはヒトおよび食品由来共に多く分離されていた。

ヒト由来株120株のうち1薬剤以上に耐性を示した株は49.2%で, 食品由来株の89.8%と比較して耐性率は低かった。血清群別では04群56株中37株(66.1%), 07群26株中10株(38.5%), 08群15株中5株(33.3%), 09群14株中5株(35.7%), 03, 10群5株中2株(40.0%)であった。013, 016および018群に耐性菌は認められなかった(表2)。

一方, 食品由来128株のほぼ全ての株は鶏肉および鶏肉内臓肉由来であった。供試した薬剤16薬剤中1薬剤以上に耐性を示した株は128株中115株(89.8%)で耐性率は非常に高かった。血清群ごとに分離菌株数と耐性率をみると04群は64株中62株(96.9%), 07群は40株中



33株 (82.5%), 08群は9株中9株 (100.0%) であった (表2)。

フルオロキノロン系薬剤である CPFX および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で2株 (1.7%), 食品由来株では認められなかった。ヒト由来フルオロキノロン系薬剤耐性株の血清型はそれぞれ 04群 Saintpaul および 08群 Colvallis であった。

第3世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で3株 (2.5%), 食品由来株で9株 (7.0%) であり, 2016年分離株 (ヒト由来株4株, 食品由来株6株) より増加していた (図1)。CTX耐性株の血清型はヒト由来株では 04群 Saintpaul, 08群 Blockley, 03, 10群 Anatum (各1株), 食品由来株は 08群 Blockley (3株), 04群 Schwarzengrund および 07群 Infantis (各2株), 04群 Agona および 08群 Manhattan (各1株) であり, ヒト由来株と食品由来株に共通に検出された血清型は 08群 Blockley であった (表3)。

## 2. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

2016年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* 113株のフルオロキノロン耐性率は52.2%であった。2015年分離株と比較すると増加していたが, 過去6年間の耐性率を比較すると, ほぼ横ばいであった (図2)。一方, *C. coli* 14株の耐性率は35.7%で, *C. jejuni* より耐性率は低かった (図3)。治療の第一選択薬である EM 耐性株は *C. jejuni* で0.9%, *C. coli* で14.3%であった (図2, 図3)。

## 3. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2017年に健康者から分離された大腸菌521株を対象に17薬剤を用いた薬剤感受性試験を行ったところ, いずれか1薬剤以上に耐性を示した株は190株 (36.5%) であった。薬剤別に耐性率をみると最も耐性率が高かったのは ABPC で21.3%, 次いで NA 19.5%, TC 14.6%, SM 13.2%の順であった。フルオロキノロン耐性は8.8%, CTX耐性は5.8%であった (図4)。CTX耐性株のうち24株についてESBLあるいはAmpC産生の確認を行った結果, 21株がESBL産生株, 3株がAmpC産生株であった。ESBL産生株の遺伝子型を調べた結果, CTX-M-1 group および CTX-M-9 group が各10株, TEM型が1株であった。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は2株で

陽性となった。これらは1月および3月に分離された株で, コリスチンに対するMIC値(Etest)は2および4  $\mu\text{g/ml}$  であった。

## 4. 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出

市販の食肉 (鶏肉, 豚肉) から分離された大腸菌を対象にコリスチンに対するMICを寒天平板希釈法で測定した。4  $\mu\text{g/ml}$  以上に耐性を示した株は, 鶏肉由来では310株中22株 (7.1%), 豚肉由来117株中2株 (1.7%) であった。これらの株を対象に *mcr-1* の保有をPCR法で調べた結果, 鶏肉由来株では21株, 豚肉由来株では2株が陽性となった (表4)。

*mcr-1* 保有大腸菌の検出状況を国産および輸入別に比較した。国産鶏肉は86検体中11検体 (12.8%), 輸入鶏肉は27検体中5検体 (18.5%), 国産豚肉は55検体中1検体 (1.8%), 輸入豚肉は71検体中1検体 (1.4%) から *mcr-1* 保有大腸菌が検出された。

## D. 考察

ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの血清型を比較すると, 04群 Schwarzengrund, 07群 Infantis, 04群 Agona が共通して高率に検出されていることから, 食品 (鶏肉および鶏肉内臓肉) がヒトのサルモネラ症に影響を与えていることが示唆された。近年はヒトから分離される血清型に変化が認められており, これまでヒトから最も多く分離されていた血清型 Enteritidis が減少し, 04群 Schwarzengrund や 07群 Infantis が多く分離されてきている。またこれまで鶏肉からの分離では 07群 Infantis が最も多かったが, 2016年度から 04群 Schwarzengrund が多く検出されるようになってきている。この様にサルモネラの検出状況を長期的にみていくと, ヒト由来および食品由来株共に, 年代によって流行する血清型に変化が認められることが明らかとなった。

分離された株の薬剤耐性率を比較すると, 耐性率はヒト由来株で49.2%, 食品由来株では89.8%と, 食品由来株の方が耐性率は高かった。この傾向は例年と同様である。

ヒト下痢症の治療薬として主に用いられているフルオロキノロンに対する耐性株は, ヒト由来株2株のみであり, 耐性率は低かった。しかし, このうち1株は ABPC, CTX, SM, TC, CPFX, NA, ST 合剤, CP, Su の9薬剤に対する多剤耐性菌であった。この患者は散発患者であるが, 感染源等は不明であった。このようなフルオロ

キノロンおよび第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す株が蔓延すれば、治療に少なからず影響がでるものと考えられた。現時点ではサルモネラのフルオロキノロン耐性率はそれほど高くなく、また増加傾向も認められていないため拡大は限定的なものと考えられた。

CTX 耐性株の分離状況をみると、2015 年以降急激に増加している。特に食品由来株が多いが、今後ヒトからの分離状況も注意していく必要がある。

カンピロバクター食中毒は依然として多く発生しており、東京都では 2017 年に発生した食中毒 126 事例中 44 事例 (34.9%) がカンピロバクターによるものである。2016 年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率は 52.2%、*C. coli* では 35.7%であった。2011 年～2016 年に分離した株についてフルオロキノロン耐性率を比較すると、*C. coli* ではやや減少傾向であった。*C. coli* の分離数は少ないことから単純な比較は難しいと考えられるが、今後の動向を注意深く見る必要があると考えられた。一方、治療の第一選択薬である EM の耐性率は、*C. jejuni* 0.9%、*C. coli* 14.3%であった。いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められていない。

健康者由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況を調査した結果、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示す株は 36.5%で、2015 年 (46.1%)、2016 年 (37.6%) と比較して減少していた。キノロン系薬剤である NA の耐性率は 19.5%であったが、フルオロキノロン系薬剤である CPFX、NFLX、OFLX の耐性率は 8.8%であった。CTX 耐性株は 30 株 (5.8%) であった。このうち 24 株について調べた結果、ESBL 産生株が 21 株、AmpC 産生株は 3 株であった。ESBL 産生株の遺伝子型をみると、CTX-M-1 group および CTX-M-9 group が各 10 株であった。CTX-M-1 group の中には世界的な流行株である CTX-M-15 が含まれていることから、今回分離された株もこれらが含まれている可能性があると考えられる。また、*mcr-1* 保有株が 2 株認められた。このことから健康者由来株の中にもプラスミド性コリスチン耐性株が広がっていることが明らかとなった。

市販食肉を対象として、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有大腸菌の分離を試みた結果、国産鶏肉の 12.8%、輸入鶏肉では 18.5% から検出された。産地はいずれもブラジル産であった。豚肉では国産の 1.8%、輸入の 1.4% から検出された。輸入豚肉の産地はスペインであった。コリスチンに対する MIC は、いずれも

8  $\mu$ g/ml 以上であった。家庭では鶏肉や豚肉は、いずれも加熱調理して喫食する食材であることから、直接コリスチン耐性菌を摂取する機会は少ないと考えられる。しかし、生の鶏肉および鶏内臓肉を提供する飲食店があることや、生肉を取り扱った調理器具や調理従事者の手指からの二次汚染した食品を介してヒトが摂取する可能性もある。今後も耐性菌検出状況についてモニタリングをすると同時に、ヒトへの感染状況についても監視していく必要がある。

## E. 結論

2017 年にヒトから分離されたサルモネラは 120 株で 34 血清型に、食品由来株は 128 株で 12 血清型に分類された。分離された血清型を比較すると 04 群 Schwarzengrund, 04 群 Agona, 07 群 Infantis はヒトおよび食品由来共に多く分離されていた。

ヒト由来株 120 株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 49.2%で、食品由来株の 89.8%と比較して耐性率は低かった。

フルオロキノロン系薬剤である CPFX および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で 2 株 (1.7%)、食品由来株では認められなかった。フルオロキノロン耐性株 2 株中 1 株は、9 薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。第3世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で 3 株 (2.5%)、食品由来株で 9 株 (7.0%) であり、2016 年分離株 (ヒト由来株 4 株、食品由来株 6 株) より増加していた。

2016 年に散発下痢症患者から分離した *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率はそれぞれ 52.2%および 35.7%であった。*C. jejuni* は例年とほぼ同様の耐性率であったが、*C. coli* は 2011 年の 87.5%と比較して年々減少傾向であった。また治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められなかった。

市販の食肉 (鶏肉、豚肉) から分離された大腸菌のうちコリスチンに対する MIC 4  $\mu$ g/ml 以上に耐性を示した株は、鶏肉由来では 310 株中 22 株 (7.1%)、豚肉由来 117 株中 2 株 (1.7%) であった。*mcr-1* の保有株は、鶏肉由来株では 21 株、豚肉由来株では 2 株であった。

*mcr-1* 保有大腸菌が国産鶏肉 86 検体中 11 検体 (12.8%)、輸入鶏肉 27 検体中 5 検体 (18.5%)、国産豚肉 55 検体中 1 検体 (1.8%)、輸入豚肉 71 検体中 1 検体 (1.4%) から検出されたことから、食肉には広く *mcr-1* 保有大腸菌が存在することが明らかとなった。耐性菌で汚染された食

肉を介して耐性菌が拡大していく可能性も考えられるため、今後もヒトからの検出状況等監視していく必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

1) 下島優香子, 西野由香里, 井田美樹, 福井理恵, 森田加奈, 黒田寿美代, 平井昭彦, 貞升健志: 東京都内に流通する食肉からの *mcr-1* 保有コリスチン耐性大腸菌検出状況, 第 160 回日本獣医学会, 2017 年 9 月, 鹿児島県.

2) 佐藤友美, 臼井優, 小西典子, 甲斐明美, 松井秀仁, 花木秀明, 田村 豊: 牛及び市販食肉由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の特徴とヒトへの影響, 第 91 回日本感染症学会, 2017 年 4 月, 東京.

3) 小西典子, 平井昭彦, 甲斐明美, 貞升健志: 健康者の糞便から分離された大腸菌の薬剤耐性菌検出状況, 第29回日本臨床微生物学会総会・学術総会, 2018年2月, 岐阜県.

##### 2. 論文発表

1) Sato T, Usui M, Konishi N, Kai A, Matsui H, Hanaki H, Tamura Y.: Closely related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat, cows with mastitis, and humans in Japan. : PLoS One. 2017 Oct 30;12(10):e0187319.doi:10.1371/journal.pone.0187319. eCollection 2017.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1. ヒトおよび食品由来サルモネラの上位血清型(2017年, 東京都)

ヒト由来株			食品由来株		
O群	血清型	分離数 (%)	O群	血清型	分離数 (%)
O4	Schwarzengrund	14 (11.7)	O4	Schwarzengrund	48 (37.5)
O7	Infantis	12 (10.0)	O7	Infantis	37 (28.9)
O4	Saintpaul	12 (10.0)	O4	Agona	14 (10.9)
O9	Enteritidis	12 (10.0)	OUT	r:1,5	8 (6.3)
O4	Typhimurium	7 (5.8)	O8	Blockley	5 (3.9)
O4	i:-	7 (5.8)	O8	Manhattan	4 (3.1)
O4	Agona	5 (4.2)	O7	Colindale	3 (2.3)
O7	Thompson	5 (4.2)	O9	Enteritidis	3 (2.3)
O4	Stanley	4 (3.3)	O3,10	Anatum	2 (1.6)
O8	Newport	4 (3.3)	OUT	d:1,7	2 (1.6)
O4	Reading	3 (2.5)	O4	Typhimurium	1 (0.8)
O7	Virchow	3 (2.5)	O4	Heidelberg	1 (0.8)
O8	Manhattan	3 (2.5)			
O3,10	Anatum	3 (2.5)			
O7	Rissen	2 (1.7)			
O8	Blockley	2 (1.7)			
O8	Litchfield	2 (1.7)			

集団事例は1株を計上

ヒト由来株:120株, 34血清型, 型別不能:4株, 食品由来株:128株, 12血清型

表2. 東京都で分離されたサルモネラの薬剤耐性率(2017年)

O群	ヒト由来株			食品由来株		
	供試数	耐性数	(%)	供試数	耐性数	(%)
O4	56	37	(66.1)	64	62	(96.9)
O7	26	10	(38.5)	40	33	(82.5)
O8	15	5	(33.3)	9	9	(100)
O9	14	5	(35.7)	3	1	(33.3)
O3,10	5	2	(40.0)	2	0	
O13	1	0				
O16	2	0				
O18	1	0				
OUT				10	10	(100)
合計	120	59	(49.2)	128	115	(89.8)

表3. 2017年に分離されたCTX耐性サルモネラの血清型(東京都)

O群	血清型	ヒト由来	食品由来	由来
O4	Schwarzengrund		2	胸肉, 鶏皮
O4	Agona		1	豚ハラミ
O4	Saintpaul	1		
O7	Infantis		2	鶏肉, 白レバー
O8	Manhattan		1	ささみ
O8	Blockley	1	3	胸肉, 鶏もも, ハツ・レバー
O3,10	Anatum	1		
	合計	3	9	

表4. 食肉由来大腸菌の*mcr-1*保有状況

検出状況											
検体	期間	原産	供試 検体数	<i>mcr-1</i> 陽性検体数 (%)	供試 菌株数	菌株数					
						CL MIC( $\mu$ g/ml)				<i>mcr-1</i>	
						$\leq 2$	4	8	16	(+)	(-)
鶏肉	2011-12	国産	69	1(1.4)	163	159	2	2		1	3
		輸入	100		190	188	2			0	2
	2015-16	国産	86	11(12.8)	240	228		10	2	11	1
		輸入	27	5(18.5)	70	60		10		10	0
豚肉	2015-16	国産	55	1(1.8)	54	53		1		1	0
		輸入	71	1(1.4)	63	62		1		1	0
プラスミド											
検体	原産国	株数	<i>mcr-1</i> 保有プラスミド								
			サイズ (kb)	レプリコン型							
鶏肉	国産	12	60	Incl2							
	ブラジル産	10	30	IncX4							
豚肉	国産	1	250	IncH11							
	スペイン産	1	30	IncX4							

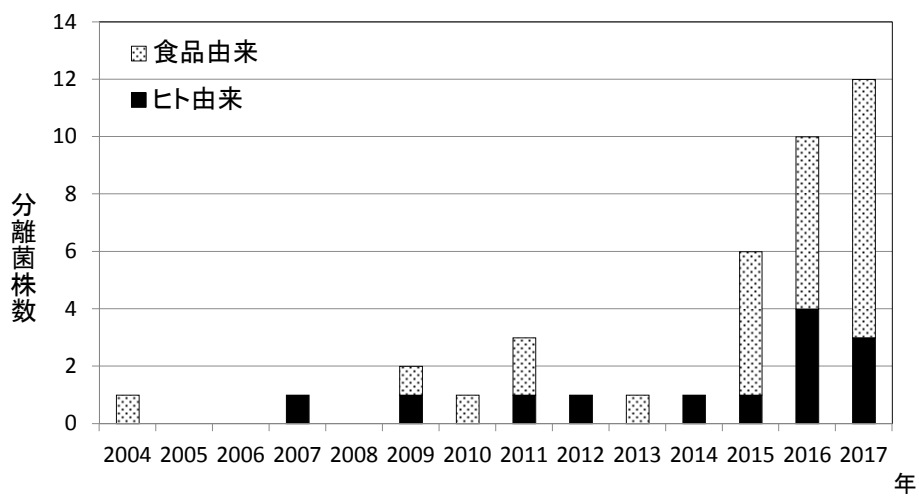


図1. CTX耐性サルモネラの分離状況(東京都)

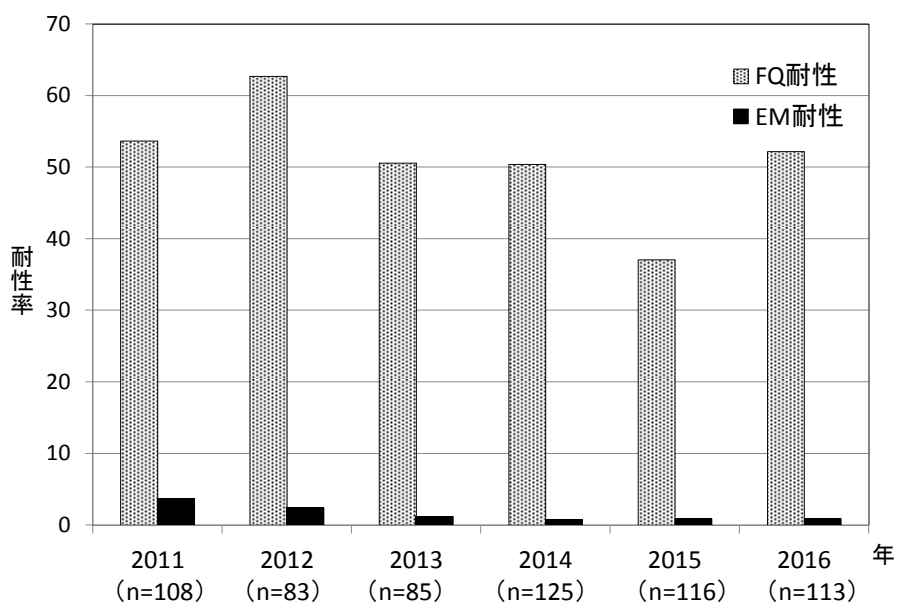


図2. 散発下痢症由来株*C. jejuni*の薬剤感受性試験成績

供試薬剤: ABPC, TC, EM, NA, CFX, NFLX, OFLX

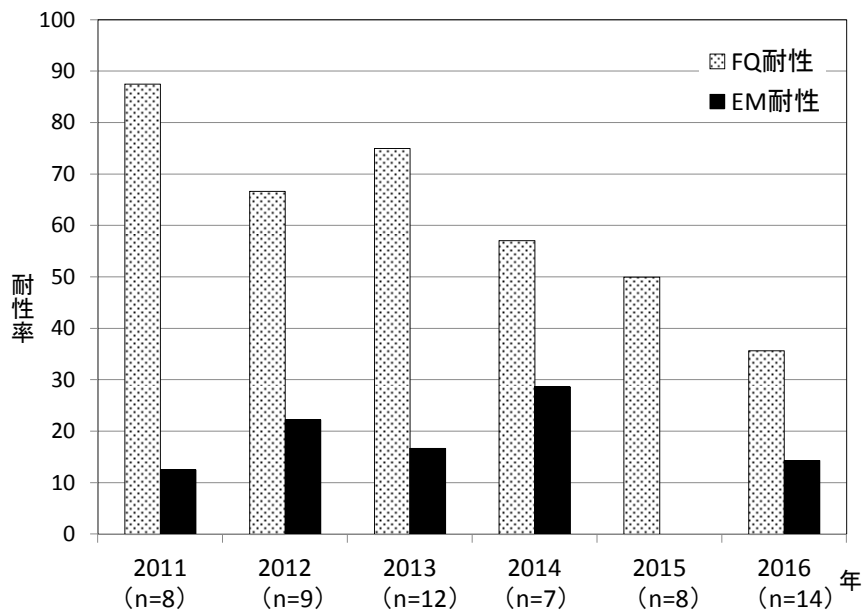


図3. 散発下痢症由来株 *C. coli* の薬剤感受性試験成績

供試薬剤: ABPC, TC, EM, NA, CPMX, NFLX, OFLX

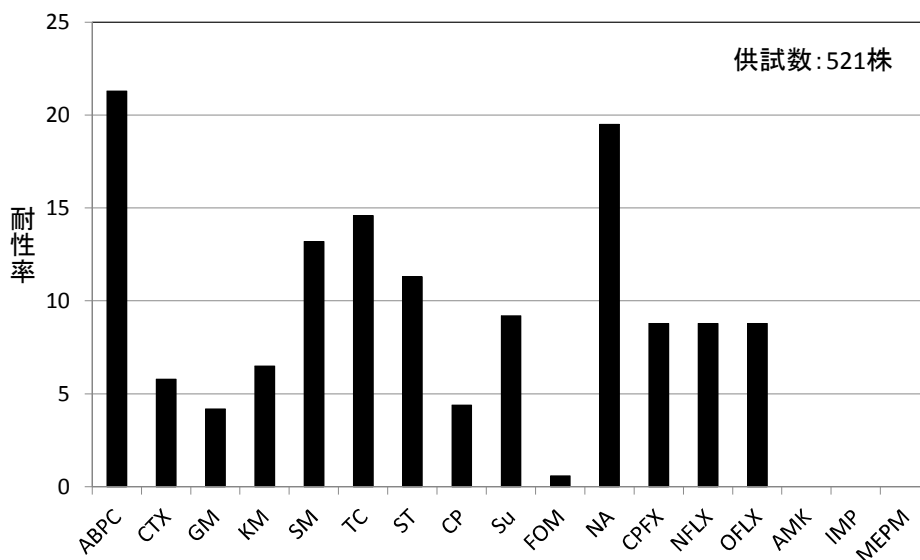


図4. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤別耐性率(2017年, 東京都)

厚生労働科学研究費補助（食品の安全確保推進研究事業）  
平成 29 年度 分担研究報告書  
食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究  
分担課題：ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学

研究分担者	倉園貴至	埼玉県衛生研究所
研究協力者	砂押克彦	埼玉県衛生研究所
研究協力者	近真理奈	埼玉県衛生研究所
研究協力者	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	門脇奈津子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	上野裕之	さいたま市健康科学研究センター
研究協力者	土井りえ	埼玉県食肉衛生検査センター

## 研究要旨

ヒトの健康に被害を与える可能性がある薬剤耐性菌の動向を把握するため、ヒトや食品等の環境から分離される食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行うとともに、食品からの ESBL 産生菌の検索を行った。

埼玉県内で 2017 年に分離され、供試したヒト（散発下痢症例及び健康保菌者）由来サルモネラは 176 株で 48 血清型に型別された。薬剤耐性では 71 株（40.3%）が供試した 18 薬剤のいずれかに対して耐性を示した。CTX 耐性は 7 株、フルオロキノロン耐性は 1 株分離された。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 209 株が分離され、薬剤感受性試験では、209 株中 31 株（14.8%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。

食品の汚染実態調査では、県内の市場で購入した食肉等 100 検体から分離されたサルモネラ 40 株中 33 株（82.5%）が供試した 18 薬剤にいずれかに耐性を示し、ヒト由来株の 40.3% よりも明らかに高い耐性率であった。また、内臓肉から分離された 04:i:- の 1 株がコリスチン（CL）の耐性遺伝子である *mcr-1* を保有していた。CTX 耐性株も 1 株分離され、血清型は *S. Manhattan*、耐性遺伝子は TEM を保有していた。カンピロバクターは 29 株が分離され、豚内臓肉および鶏レバーから EM 耐性株が分離された。

### A. 研究目的

近年、ヒトの健康に危害を与える可能性がある耐性菌をコントロールするために、国際的な耐性菌対策への行動計画

が求められるようになっている。そこで、耐性菌情報の提供を目的として、治療薬剤であるフルオロキノロン剤や第三代セファロスポリン等に対して抵抗を



示す耐性菌のヒトや環境からの分離状況を調査し、分離菌の血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行った。また、食肉等を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

## B. 研究方法

### I. 供試菌株

#### 1. ヒト由来

埼玉県内で分離された散発下痢症例及び健康保菌者由来のサルモネラ・腸管出血性大腸菌を医療機関等の協力を得て広く収集した。

#### 2. 食品由来

買い取りによる検体収集を行い、サルモネラ・カンピロバクター・腸管出血性大腸菌の汚染調査に供した。また、食肉等からの ESBL 産生菌の検索も行った。

#### 3) 食鳥処理場由来

食鳥処理場でのと体フキトリからのサルモネラ・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。

### II. 薬剤感受性試験

収集した菌株は米国臨床検査標準化協会 (CLSI) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク:BBL) を用いて行った。サルモネラ、腸管出血性大腸菌はクロラムフェニコール (CP;30  $\mu$ g)、ストレプトマイシン (SM;10  $\mu$ g)、テトラサイクリン (TC;30  $\mu$ g)、カナマイシン (KM;30  $\mu$ g)、アミノベンジルペニシリン (ABPC;10  $\mu$ g)、ナリジクス酸 (NA;30  $\mu$ g)、セフトキサキ

シム (CTX;30  $\mu$ g)、シプロフロキサシン (CPFX;5  $\mu$ g)、ゲンタマイシン (GM;10  $\mu$ g)、ホスホマイシン (FOM;50  $\mu$ g)、ノルフロキサシン (NFLX;5  $\mu$ g)、スルフアメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST;25  $\mu$ g)、イミペネム (IMP;10  $\mu$ g)、アミカシン (AMK;30  $\mu$ g)、メロペネム (MEPM;10  $\mu$ g)、セフォキシチン (CFX;30  $\mu$ g)、セフトジジム (CAZ;30  $\mu$ g)、コリスチン (CL;10  $\mu$ g) の 18 薬剤を供試した。また、コリスチンの感受性については耐性遺伝子である *mcr-1* の検出を PCR 法で検討した。カンピロバクターはテトラサイクリン (TC;30  $\mu$ g)、ナリジクス酸 (NA;30  $\mu$ g)、シプロフロキサシン (CPFX;5  $\mu$ g)、ノルフロキサシン (NFLX;5  $\mu$ g)、オフロキサシン (OFLX;5  $\mu$ g)、エリスロマイシン (EM;15  $\mu$ g) の 6 薬剤を供試した。

### C. 研究結果

#### (1) ヒト由来サルモネラ

埼玉県内で 2017 年に、散発下痢症患者および食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラの血清型別分離状況を表 1 に示した。分離された 176 株は 48 血清型に型別され、*S. Schwarzengrund* と *S. Enteritidis* がそれぞれ 17 株と最も多く分離され、次いで *S. Saintpaul* が 16 株であった。

分離株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した 176 株のうち 71 株 (40.3%) が 18 薬剤のいずれかに耐性を示した。由来別では国内有症者由来分離株が 111 株中 46 株 (41.4%) と国内無症者由来分離株 61 株中 21 株 (34.4%)

よりも耐性率が高かった。海外由来分離株を合わせた171株中71株(40.3%)が供試18薬剤のいずれかに耐性であった。血清型では最も多く分離された*S. Schwarzengrund*は17株中14株(82.4%)、*S. Enteritidis*は17株中14株(52.9%)が耐性を示した。一方、16株が分離された*S. Saintpaul*は5株(31.3%)が耐性であった。薬剤別の耐性状況を表2に示した。耐性71株中54株がSM耐性で、次いでTC耐性が48株、ABPC耐性が26株であった。CTXやCFXのセフェム系やCPFXやNFLXのフルオロキノロン系薬剤の耐性株も検出された。一方、供試18薬剤のうち、GM、FOM、IMP、AMK、MEPM、CLの6薬剤に対する耐性菌は検出されなかった。

分離株の区分別耐性パターンを表3に示す。SM・TC耐性が8株と最も多く、次いでSM耐性とSM・TC・ABPC耐性がそれぞれ7株であった。71株中52株が2剤以上の複数薬剤に耐性を示した。また、第3世代セフェム系薬剤であるCTXに対する耐性菌が7株、フルオロキノロン剤耐性株が1株分離された。CTX耐性菌及びフルオロキノロン剤耐性株について表4に示す。8例中7例が有症者からの分離であった。CTX耐性菌は耐性遺伝子CTX-M-15を保有する*S. Blockley*と、CTX-M-2を保有する*S. Heidelberg*及びDHA-1を保有する*S. Anatum*がそれぞれ1株、CTX-M-15を保有する*S. Saintpaul*が4株あった。フルオロキノロン耐性株は、血清型*S. Kentucky*であった。

## (2) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で2017年に、ヒトから分離さ

れた腸管出血性大腸菌の血清型別分離状況を表5に示した。分離された209株で最も多く分離された血清型は、O157:H7が123株、次いでO26:H11が59株であった。分離209株の薬剤感受性試験の結果を表6に示す。供試した18薬剤のいずれかに耐性であったのは31株(14.8%)であった。耐性パターンは13パターンに分かれ、最も多かったのはSM耐性で7株、次いでSM・TC耐性が5株であった。

## (3) 食品からの分離

2017年6月から12月にかけて、埼玉県内の市場等で食肉等100検体を購入し、サルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌の検査を行った。その結果、牛肉・豚肉などの食肉からはいずれの菌種も分離されなかった。豚タン・鶏レバー等の内臓肉から、サルモネラは内臓肉60検体中30検体、カンピロバクターは16検体から分離された。鶏肉からは、サルモネラが内臓肉20検体中8検体、カンピロバクターは9検体から分離された。腸管出血性大腸菌はいずれの検体からも分離されなかった(表7)。サルモネラの分離状況を表8に示す。内臓肉と鶏肉の両方から分離された血清型は*S. Schwarzengrund*、*S. Infantis*、*S. Manhattan*の3血清型であった。薬剤感受性では、分離された40株中33株(82.5%)が供試した18薬剤にいずれかに耐性を示し、ヒト由来株の40.3%よりも明らかに高い耐性率であった。また、内臓肉から分離されたO4:i:-の1株がコリスチン(CL)の耐性遺伝子である*mcr-1*を保有していた。CTX耐性株も1株分離され、血清型は*S. Manhattan*、耐

性遺伝子は TEM を保有していた。カンピロバクターは、鶏肉や内臓肉 80 検体中 25 検体 29 株が分離され、豚内臓肉および鶏レバーから EM 耐性株が分離された（表 9）。

食品の ESBL 産生大腸菌の検索では、鶏肉 20 検体中 2 検体から 2 株、内臓肉 60 検体中 15 検体から 24 株が分離された（表 10）。保有耐性遺伝子は、CTX-M-9group、CTX-M-1group および TEM のいずれか、あるいは複数で保有していた。また、ディスク法で CTX のみならずフルオロキノロン剤に耐性を示す株も分離された。

#### (4) 食鳥処理場由来

食鳥処理場での出荷前最終洗浄後のと体等の拭き取り検査で、カンピロバクターが 29 検体中 1 検体から 2 株分離されたが、サルモネラは分離されなかった。薬剤感受性では分離されたカンピロバクターは供試 6 薬剤のいずれにも感受性であった（表 11）。

#### D. 考察

近年、ヒトの健康に危害を与える可能性がある薬剤耐性菌の問題に対応するために、国際的サーベイランス体制の確立が求められており、国内のヒトおよび食品など環境から分離される耐性菌の発生状況を多角的に把握する必要がある。サルモネラでは、2016 年に引き続きヒト由来株から CTX 耐性菌やフルオロキノロン耐性菌が分離され、食品からも CTX 耐性菌が分離され、血清型からもその共通性が示唆された。また、コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) の検出を検討したところ、内臓肉から分離された 04:i:- の 1 株が

*mcr-1* を保有していた。2015 年に都内で流通した食肉から *mcr-1* 保有の大腸菌が分離されていることから、今後も監視を続け、更なる情報収集の強化を図る必要がある。

#### E. 結論

CTX やフルオロキノロン剤耐性株の分離が続いており、*mcr-1* を保有するサルモネラも分離されたことから、今後とも耐性菌の動向調査を継続していくことが重要である。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 ヒトから分離されたサルモネラの血清型 (2017)

O血清型	血清型名	国内		海外	計
		有症者	無症者		
O4	S.Paratyphi B	1			1
	S.Stanley	6	7(1)		13(1)
	S.Schwarzengrund	5(4)	12(10)		17(14)
	S.Saintpaul	11(4)	5(1)		16(5)
	S.Reading	1	1(1)		2(1)
	S.Chester	3(1)	2		5(1)
	S.Sandiego	3(1)			3(1)
	S.Agona	3(3)	1(1)		4(4)
	S.Typhimurium	1(1)			1(1)
	S.Brandenburg	1(1)			1(1)
	S.Heidelberg	1(1)			1(1)
	O4:i:-	8(8)	2(2)		10(10)
	O4:b:-	1			1
O7	S.Isangi	1			1
	S.Braenderup	1	1		2
	S.Montevideo		1		1
	S.Thompson	3	2		5
	S.Potsdam	1			1
	S.Virchow	1	2		3
	S.Infantis	9(4)	1		10(4)
	S.Bareilly	1			1
	S.Mbandaka		1		1
	S.Tennessee	3	1		4
O8	S.Nagoya	3	3		6
	S.Muenchen	1	3(1)		4(1)
	S.Manhattan	3(3)	1(1)		4(4)
	S.Newport	3	1		4
	S.Kentucky	2(1)			2(1)
	S.Blockley	1(1)			1(1)
	S.Litchfield	2(1)	2		4(1)
	S.Corvallis	2	1		3
	S.Albany		2(1)		2(1)
	S.Hadar		1(1)		1(1)
	O8:b:-		1		1
	O8:d:-	1(1)			1(1)
O8:-:-	1	1		2	
O9	S.Typhi			4(4)	4(4)
	S.Enteritidis	17(9)			17(9)
	S.Panama	2			2
	S.Javiana		1		1
O3,10	S.Anatum	2(1)	2(1)		4(2)
	S.Weltevreden	1	1		2
O13	S.Havana		1		1
	O13:m,t:-	1			1
OUT	OUT:b:en,x	2			2
	OUT:i:1,2		1		1
	OUT:r:1,7	1			1
	OUT:-:1,7	1(1)			1(1)
計		111(46)	61(21)	4(4)	176(71)

( ): 薬剤耐性株数

表 2 ヒト由来サルモネラの薬剤別耐性株数（2017）

O群	血清型	供試菌株数	耐性菌株数	各薬剤別耐性菌株数（再掲）												
				ABPC	KM	SM	TC	SXT	CP	CTX	NA	CPFX	NFLX	CFX	CAZ	
4	Stanley	13	1					1								
4	Schwarzengrund	17	14		11	11	11	5		1	2					
7	Infantis	10	4		1	4	4	1			2					
8	Muenchen	4	1			1	1									
8	Manhattan	4	4			4	3									
8	Kentucky	2	1	1			1				1	1	1			
8	Blockley	1	1	1	1	1	1		1	1						1
8	Litchfield	4	1			1										
8	Albany	2	1	1		1					1					
8	Hadar	1	1		1		1									
8	O8:d-	1	1			1	1									
9	Typhi	4	4	1		1		1	1		1					
9	Enteritidis	17	9	1		6	1				4					
3,10	Anatum	4	2	2		2	2	2	2		2				2	1
UT	OUT:-:1,7	1	1				1		1							
計		128	71	7	14	54	48	10	5	2	13	1	1	2	2	

表 3 ヒトから分離されたサルモネラの薬剤耐性パターン (2017)

	国内		海外	計
	有症者	無症者		
供試菌株数	111	61	4	176
耐性株数	46	21	4	71
(%)	41.4%	34.4%	100.0%	40.3%
薬剤耐性パターン				
CP	1			1
SM	7			7
TC	1			1
KM	1	1		2
NA	3		3	6
SXT	1	1		2
SM・TC	5	3		8
SM・ABPC	1	1		2
TC・KM		1		1
NA・SXT	1			1
SM・TC・KM	3	4		7
SM・TC・ABPC	4	2		6
SM・TC・NA	1			1
SM・ABPC・NA		1		1
SM・TC・SXT		1		1
CP・TC・ABPC・NA	1			1
SM・TC・ABPC・NA	3			3
SM・TC・KM・SXT	1	3		4
SM・TC・NA・SXT	1			1
CP・SM・ABPC・NA・SXT			1	1
SM・TC・KM・NA・SXT		1		1
SM・TC・ABPC・NA・CTX	1			1
SM・TC・ABPC・NA・SXT	3			3
TC・ABPC・NA・CPFX・NFLX	1			1
CP・SM・TC・KM・ABPC・SXT	1			1
CP・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	1			1
CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	3	1		4
CP・SM・TC・ABPC・NA・SXT・CFX		1		1
CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT・CFX・CAZ	1			1

CP: クロラムフェニコール, SM: ストレプトマイシン, TC: テトラサイクリン, KM: カナマイシン  
 ABPC: アンピシリン, NA: ナリジクス酸, CTX: セフトキシム, CPFX: シプロフロキサシン  
 GM: ゲンタマイシン, NFLX: ノルフロキサシン, SXT: ST合剤, CAZ: セフトジジム, CFX: セフォキシチン

表4 フルオロキノロン耐性およびCTX耐性 *Salmonella* 分離例 (2017)

No.	OH血清型	血清型名	区分	耐性パターン	備考
1	O8:k:1,5	Blockley	有症者	CP・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-15
2	O4:r:1,2	Heidelberg	有症者	SM・TC・ABPC・NA・CTX	<i>bla</i> CTX-M-2
3	O8:i:z <sub>6</sub>	Kentucky	有症者	TC・ABPC・NA・CPFX・NFLX	
4	O4:eh:1,2	Saintpaul	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65
5	O4:eh:1,2	Saintpaul	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65
6	O4:eh:1,2	Saintpaul	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65
7	O3,10:eh:1,6	Anatum	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT・CFX・CAZ	<i>bla</i> DHA-1
8	O4:eh:1,2	Saintpaul	無症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65

表5 腸管出血性大腸菌の血清型と毒素型 (2017)

血清型	毒素型			計
	VT1	VT2	VT1&2	
O157:H7		87	36	123
O157:H-		3	4	7
O26:H11	59			59
O26:H-	2			2
O111:H-	1		3	4
O84:H-	1			1
O91:H-	2	1		3
O93H7		1		1
O100:H-		1		1
O121:H19		5		5
O145:H-	1			1
O146H10	1			1
OUT:H-		1		1
	67	99	43	209

表6 埼玉県内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌の薬剤耐性パターン (2017)

	O157H7	O157H-	O26H11	O26H-	O111H-	O91H-	O121H19	O145H-	OUTH-	その他*	計
供試菌株数	123	7	59	2	4	3	1	1	1	4	209
耐性株数	13	3	5	1	4	2	1	1	1	0	31
(%)	10.6%	42.9%	8.5%	50.0%	100.0%	66.7%	100.0%	100.0%	100.0%	0.0%	14.8%
薬剤耐性パターン											
SM	2	3				1			1		7
TC						1					1
KM	1										1
ABPC			2								2
SM・TC	4							1			5
SM・ABPC	3			1							4
CP・SM・TC	1										1
CP・SM・TC・ABPC	1										1
SM・TC・ABPC・SXT	1										1
SM・TC・KM・ABPC								1			1
SM・TC・KM・ABPC・SXT			3								3
CP・SM・TC・KM・SXT					1						1
CP・SM・TC・KM・ABPC・SXT					3						3

\*O84H-(1),O93H7(1),O100H-(1),O146H10(1)

CP: クロラムフェニコール, SM: ストレプトマイシン, TC: テトラサイクリン, KM: カナマイシン, ABPC: アンピシリン

表 7 食品からの食中毒菌分離状況 (2017)

検体の種類	検体数	サルモネラ	カンピロバクター
食肉*	20	0	0
内臓肉**	60	30	16
鶏肉	20	8	9
計	100	38	25

表 8 食品からのサルモネラ分離状況 (2017)

検体	検査数	陽性数(株数)	血清型(耐性薬剤)
食肉	20	0	
内臓肉	60	30 (32)	S.Schwarzengrund(SM,TC,KM,SXT) (3) S.Derby(-) (2) S.Derby(SM) (1) S.Derby(SM,TC,ABPC) (1) S.Stanley(-) (1) S.Saintpaul(-) (1) S.Bredeney(-) (1) S.Brandenburg(CP,SM,TC,KM,ABPC,SXT) (1) O4:i:-(TC) (2) O4:i:-(ABPC,CL) (1) O4:i:-(SM,TC) (2) O4:i:-(SM,TC,ABPC) (3) O4:i:-(CP,SM,TC,KM,ABPC,SXT) (1) S.Bradford(SM,TC,KM) (1) S.Infantis(SM,TC) (2) S.Infantis(SM,TC,KM) (1) S.Infantis(SM,TC,KM,SXT) (1) S.Manhattan(SM) (1) S.Manhattan(SM,TC,NA) (2) S.Manhattan(SM,TC,ABPC,CTX,CAZ) (1) S.Rissen(SM,TC,ABPC) (1) S.Anatum(-) (2)
鶏肉	20	8 (8)	S.Schwarzengrund(SM,TC,KM,SXT) (2) S.Infantis(KM) (1) S.Infantis(SM,TC,KM,SXT) (1) S.Infantis(SM,TC,SXT) (2) S.Manhattan(SM,TC,ABPC,CTX) (1) S.Manhattan(SM) (1)

内臓肉：豚タン、豚カシラ、鶏レバー、砂肝

表9 食品からのカンピロバクター分離状況 (2017)

検体	検体数	陽性検体数	種(検出数)	耐性パターン(検出株数)
食肉	20	0		
豚内臓肉	40	4	<i>C. jejuni</i> (1) <i>C. coli</i> (3)	感受性(1) TC・EM(1) TC(1) 感受性(1)
鶏肉	20	9	<i>C. jejuni</i> (9) <i>C. coli</i> (1)	NA・CPFX・NFLX・OFLX(5) 感受性(4) NA・CPFX・NFLX・OFLX(1)
鶏レバー 砂肝	20	12	<i>C. jejuni</i> (15)	NA・CPFX・NFLX・OFLX・EM(1) TC・NA・CPFX・NFLX・OFLX(3) NA・CPFX・NFLX・OFLX(4) TC(1) 感受性(6)

TC：テトラサイクリン，NA：ナリジクス酸，EM：エリスロマイシン，  
CPFX：シプロフロキサシン，NFLX：ノルフロキサシン，OFLX：オフロキサシン，



表 10 食品からのESBL産生大腸菌分離状況 (2017)

検体	検査数	陽性数	保有耐性遺伝子 (株数)
食肉	20	0	
内臓肉	60	15	TEM(6) CTX-M-1group(8) CTX-M-9group(3) TEM,CTX-M-1group(5) TEM,CTX-M-9group(2)
鶏肉	20	2	TEM(2)

表 11 鶏と体フキトリ検体からのサルモネラ・カンピロバクター分離状況 (2017)

区分	検体数	陽性検体数	陽性株数	薬剤感受性パターン (株数)
サルモネラ	29	0	0	
カンピロバクター	29	1	2	感受性(2)

分離されたサルモネラは,*S. Infantis*

分離されたカンピロバクターはすべて *C. jejuni*

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）  
平成 29 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究  
分担課題 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメントに関する研究

研究分担者	五十君 静信	(東京農業大学応用生物化学科・微生物学・教授)
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・第一室長)
	中山 達也	(国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・研究員)
	百瀬 愛佳	(国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・研究員)
	山本 詩織	(国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・研究員)
	石井 良和	(東邦大学医学部 微生物・感染症学講座・教授)

### 研究要旨

ヒトから分離される ESBL 産生大腸菌の多くは、鶏の ESBL 産生大腸菌又は ESBL 産生遺伝子が、鶏肉を通じ、ヒトに伝播したものと考えられている。しかし、肉用鶏農場における ESBL 産生大腸菌又は ESBL 産生遺伝子の耐性遺伝子型の比率は、鶏肉におけるそれら比率と異なり、さらに、ヒトにおける比率とも一致しない。この不一致（ギャップ）の要因の 1 つとして、肉用鶏農場は国内に様に存在しないこと、鶏肉生産者毎に生産方法、抗菌性物質の使用方法が異なること、食鳥処理場の処理工程の違いによって鶏肉の汚染状況が異なることなどが挙げられる。さらに、国産鶏肉の多くは、肉用若鳥（ブロイラー）や地鶏であるが、廃鶏肉も流通し、これらは国産鶏肉の 1 割弱（重量換算）を占める。

そこで、これら要因がギャップに対して与えている影響について検討を行うため、食鳥処理場（盲腸内物及び鶏肉）及び採卵鶏農場（糞便）における ESBL 産生大腸菌汚染について調査を行った。鶏肉における ESBL 分離率は 1 検体（3%）と低かったが、その原因は、その由来となった鶏群の感染率が 13%（4/32）と低かったためであると考えられた。検出された耐性遺伝子は、すべて CTX-M-2 であり、当該食鳥処理場に鶏を出荷する農場間では CTX-M-2 を保有する大腸菌が分布していると考えられた。一方、採卵鶏農場における ESBL 産生大腸菌分離率は 30%（9/30）であり、関東周辺よりも九州周辺の農場の方が、分離率が高い傾向であった。耐性遺伝子は CTX-M-1 が最もよく分離され、7 農場（23%）から分離された。若齢鶏群から分離されることが多く、廃用に近い鶏群からの分離率は低かった。

今回の調査結果は、寡占が進んだ鶏肉生産では、ブロイラー飼育から鶏肉販売までを一括して行う統合経営体となっているため、ESBL 産生大腸菌もその範囲内で分布することになる。また、鶏肉も各鶏肉生産者の販売ルートによって、地域によって異なる。つまり、フードチェーンの各段階でモニタリングを実施しても、全国規模の調査を除き、サンプリングした検体の素性が明らかでなければ、その結果を他の段階の結果と定量的に比較することはできないと考えられた。

#### A. 研究目的

ヒトから分離される ESBL 産生大腸菌の多くは、鶏の ESBL 産生大腸菌又は ESBL 産生遺伝子が、鶏肉を通じ、ヒトに伝播したものと考えられている。しかし、肉用鶏農場における ESBL 産生大腸菌又は ESBL 産生遺伝子の耐性遺伝子型の比率は、鶏肉におけるそれら比率と異なり、さらに、ヒトにおける比率とも一致しない。この不一致（ギャップ）の要因の 1 つとして、肉用鶏農場は国内に様に存在しないこと（主産地は東北及び九州地方）、鶏肉生産者毎に生産方法、抗菌性物質の使

用方法が異なること（例えば、一般的な肉用若鳥以外にも無薬鶏（抗菌性飼料添加物及び抗菌剤を不使用）を飼育）、食鳥処理場の処理工程の違いによって鶏肉の汚染状況が異なること（中抜き又は外剥ぎ）などが挙げられる。例えば、主に九州地方で生産された鶏肉を検体とした調査成績と関東地方で発生した食中毒事例の調査を比較すると同様な耐性遺伝子型が分離されているが、その比率は異なる。その原因は、関東地方でも九州地方で生産された鶏肉も販売されているが、東北地方や関東地方で生産された鶏肉も販売されて

いるためと考えられる。さらに、国産鶏肉の多くは、肉用若鳥（ブロイラー）や地鶏であるが、採卵鶏や種鶏のうち、廃用となったものが国産鶏肉としても流通（親鳥やひね鶏という名称で店頭販売、料理店で提供されている。）し、これらは国産鶏肉の1割弱（重量換算）を占めるが、これら農場のESBL産生大腸菌の保有状況は不明である。そこで、これら要因が鶏肉からヒトへのESBL産生大腸菌又はESBL産生遺伝子の伝播リスクを解析する際のギャップに対して与えている影響について検討を行った。なお、ギャップ及び要因の解析に際し、他の畜産産業における耐性菌保有状況と比較することが有用であるため、他の家畜種でもモニタリングされているカンピロバクター（採卵鶏農場のみ）及びサルモネラ、同じ大腸菌であるコリスチン耐性大腸菌も調査対象とした。

## B. 研究方法

### 1. 食鳥処理場における検体及び検体採取

東北地方の1食鳥処理場の協力の下、16食鳥処理日において、各日の最初に食鳥処理された農場の鶏群（第1鶏群）及び2番目に処理された別農場の鶏群（第2鶏群）の各鶏群について、3羽の盲腸内容物及び鶏肉（むね）パック1個（2kg入り）を採取し、採取日に当所に冷蔵宅配便で送付し、翌日、当所において、検体採取後24時間以内に分離検査を開始した。また、農場飼養管理及び鶏群に関するアンケートを実施した。なお、ヒナは自社生産ではなく、複数のヒナ生産会社から購入していた。

### 2. 採卵鶏農場における検体及び検体採取

関東周辺及び九州周辺で採卵鶏の診療を行っている獣医師の協力の下、30か所の採卵鶏農場及び1か所の育雛・育成農場において、各農場2鶏群（農場内において弱齢な鶏群及び廃用間際の鶏群）から盲腸便（糞便ベルトから各5g以上）を採取した。また、カンピロバクター分離用として、各鶏舎の3ケージの3羽の総排泄腔スワブを採取した。また、農場飼養管理及び鶏群に関するアンケートを実施した。

### 3. ESBL産生大腸菌の分離及び遺伝子型の同定

食鳥処理場：盲腸内容物（ブロイラー鶏群の各群3羽で1プール検体）について、採卵鶏農場と同様に分離、同定した。鶏肉については、各パックにつき6ムネブロックを取り出し、各25gをストマック袋に入れ（計150g）、150mLの緩衝ペプトン水を加え、1分間ストマック処理を行い（ストマック検体）、鶏肉ストマック検体2mLに8mLのCTX（1mg/L）加緩衝ペプトン水とよく混合し、100 $\mu$ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。また、残りの

混合検体を37 $^{\circ}$ Cで1日間増菌培養後、100 $\mu$ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。さらに、2食鳥処理日の計4群に由来する鶏肉については、ストマック検体50mLを200mLの緩衝ペプトン水と混合し、37 $^{\circ}$ Cで1日間増菌培養後、100 $\mu$ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。その後、各検体につき、CTX耐性大腸菌と疑われる集落最大2集落を釣菌し、薬剤感受性ディスクとPCR法により、ESBL産生大腸菌と同定するとともに耐性遺伝子型を同定した。

採卵鶏農場：盲腸便1g（採卵鶏農場の各群1検体）をCTX（1mg/L）加緩衝ペプトン水とよく混合し、100 $\mu$ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。また、残りの混合検体を37 $^{\circ}$ Cで1日間増菌培養後、100 $\mu$ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。その後、食鳥処理場と同様に分離、同定した。

### 4. カンピロバクターの分離及び薬剤耐性パターンの同定

採卵鶏農場：総排泄腔スワブ（採卵鶏農場の各群3羽から3検体）をmCCDAに塗抹し、42 $^{\circ}$ Cで2日間微好気培養した（直接培養）。また、塗抹に使用したスワブの先端を9mLのプレストン増菌液体培地に入れ、42 $^{\circ}$ Cで1日間微好気培養後、1白金耳をmCCDAに塗抹し、42 $^{\circ}$ Cで2日間微好気培養した（増菌培養）。その後、各検体につき、カンピロバクターと疑われる集落最大2集落を釣菌し、PCR法により菌種を同定するとともに、微量液体希釈法（栄研プレート）により、7薬剤（ストレプトマイシン（SM）、エリスロマイシン（EM）、ゲンタマイシン（GM）、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）及びクロムフェニコール（CP））のMICを測定した。薬剤科感受性試験は、各鶏群につき、1菌種1株について実施した。

### 5. サルモネラの分離及び薬剤耐性パターンの同定

食鳥処理場：盲腸内容物（ブロイラーの各群3羽から3検体）の各1gを9mLの緩衝ペプトン水に添加し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養後、1mL及び0.1mLをそれぞれ、ハーナ・テトラチオネート培地及びRV培地に添加し、42 $^{\circ}$ Cで1日間培養後、各培地の1白金耳をXLD培地及びクロモアガー・サルモネラ培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。また、培養後のハーナ・テトラチオネート培地を室温で5~7日間放置し、1mL及び0.1mLをそれぞれ、ハーナ・テトラチオネート培地及びRV培地に添加し、42 $^{\circ}$ Cで1日間培養後、各培地の1白金耳をXLD培地及びクロモアガー・サルモネラ培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した（遅延二次培養）。鶏肉に

については、ストマック検体 50mL を緩衝ペプトンに添加し、盲腸内容物と同様に培養した。培養後、各検体につき、サルモネラと疑われる集落最大2集落を釣菌し、抗血清を用いて0群を同定するとともに、微量液体希釈法(栄研プレート)により、12 薬剤(アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、セフトキシム(CTX)、GM、カナマイシン(KM)、SM、TC、NA、CPFX、コリスチン(CL)、CP 及びトリメトプリム(TMP)のMICを測定した。なお、薬剤感受性試験は、各鶏群の盲腸内容物検体及び鶏肉につき、1菌種1株について実施した。

採卵鶏農場:盲腸便5g(採卵鶏農場の各群1検体)を45mLの緩衝ペプトン水に添加し、食長処理場と同様に分離・性状解析を実施した。

#### 6. コリスチン耐性大腸菌の分離及び耐性遺伝子の同定

食鳥処理場及び採卵鶏農場:サルモネラ検査用に緩衝ペプトン水に添加・混合された直後のもの(直接培養)、培養後のもの(増菌培養)を各100 $\mu$ L、クロモアガー・COL-APSEに塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで1日培養した。37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。各検体につき、コリスチン耐性大腸菌と疑われる集落最大2集落を釣菌し、PCR法(mcr-1、2又は3)により、耐性遺伝子を同定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。病原体の取扱いについては、国立医薬品食品衛生研究所病原体等安全管理規程に基づき適切に行った。

### C. 研究結果

#### 1. 食鳥処理場

全16食鳥処理日で処理した鶏群は、15農場(A~O)に由来する32鶏群であった。調査対象鶏群の出荷日齢は45~55日間であった。アンケート結果によると、A農場は、今回の調査の中で最も生産規模が大きく、29鶏舎で構成されており、年6回、1回あたり約35万羽を飼育している。一方、E農場は、最も生産規模が小さく、3鶏舎で年5回、1回あたり約1万6千5百羽の鶏を飼育している。なお、A農場は鶏舎数が多いため、農場単位のオールインオールアウトが行われていないが、他の14農場では行われている。今回の調査では、A農場から14鶏群が調査体調となり、その他の4農場(C、G、I及びN)は2鶏群が調査対象となった。調査対象となった32鶏群には、食鳥処理場への出荷まで抗菌剤は使用されておらず、9鶏群(28%)に対しては抗菌性飼料添加物も与えられていなかった。添加された抗菌性飼料添加物は、サリノマイシン、エンラマイシン、ア

ピラマイシン、硫酸コリスチンであり、硫酸コリスチンは10鶏群(31%)に与えられていた。

ESBL産生大腸菌:鶏肉については、1検体(3%)からCTX耐性大腸菌が分離され、CTX-M-2を保有するESBL産生大腸菌であった。しかし、この鶏肉の由来となった鶏群及びその前に食鳥処理された鶏群の盲腸内容物からは分離されなかった(表1)。盲腸内容物については、11群(34%)からCTX耐性大腸菌が分離され、4鶏群(13%)に由来する株がESBL産生大腸菌(CTX-M2)であり、2農場(A及びN)から出荷された鶏群であった。CTX-M-2が分離されたA農場の鶏群は同一ヒナ生産者から購入したものであったが、N農場は、A農場とは別の2つのヒナ生産者から購入したものであった。第15回と第16回は、鶏肉の検体量を25g(増菌培養について)に増量したが、盲腸内容物からESBL産生大腸菌が分離された2鶏群を含め、鶏肉からESBL産生大腸菌は分離されなかった。

サルモネラ:鶏肉については、21検体(66%)から分離され、20検体では、その鶏肉の由来となった鶏群の盲腸内容物から同じ血清型で同じ薬剤耐性パターンの株が分離された。残りの1検体は、由来となった鶏群の盲腸内容物からサルモネラが分離されなかったが、その鶏群の前に食鳥処理された鶏群の盲腸内容物から同じ血清型で同じ薬剤耐性パターンの株が分離された(交叉汚染)。最もよく分離された株は、5剤(ABPC、CEZ、SM、TC及びTMP)に耐性な07群で8検体から分離された。この8検体のうち7検体は、A農場の鶏群に由来する鶏肉であり、残りの1検体は、上述の交叉汚染検体であった。次によく分離されたのは、KM耐性の04群で、7検体から分離され、すべて異なる農場の鶏群由来であった。盲腸内容物については、27鶏群(84%)から分離された。8鶏群では、3羽中3羽の盲腸内容物からサルモネラが分離され、それらの鶏肉から同一株と考えられる株が分離された。

コリスチン耐性大腸菌:鶏肉については、2検体から分離され、うち1検体はその由来となった鶏群の盲腸内容物からも分離された。盲腸内容物では、鶏肉から分離された鶏群以外にも3鶏群から分離された。

#### 2. 採卵鶏農場

ESBL産生大腸菌:30採卵鶏農場の計60鶏群のうち、CTX耐性大腸菌は15農場(50%)の18鶏群から分離され、ESBL産生大腸菌と同定された株は、9農場(30%)の12鶏群から分離された(表2)。ESBL産生大腸菌陽性9農場のうち、2鶏群ともに陽性だったのは3農場で、残りの6農場のうち5農場では、陽性であった鶏群はすべて若齢鶏群であった。耐性遺伝子型は3型に分類され、

CTX-M-1 型が最も多く (7 農場の 8 鶏群)、次いで CTX-M-9 (2 農場 2 鶏群)、CTX-M-2 (2 農場 2 群) であった。地域別にみると、関東周辺の農場分離率 (21%:5/24) は九州周辺の農場分離率 (67%:4/6) と比べ有意に低かった。CTX-M-1 型の分離状況に地域的な偏向はなかった。なお、8 農場の 8 鶏群から分離された CTX 耐性大腸菌は AmpC を有していた。育雛・育成農場については、2 鶏群とも ESBL 産生大腸菌が分離され、耐性遺伝子型は CTX-M-1 と CTX-M-9 であった。

カンピロバクター：30 採卵鶏農場の全農場 (100%) の 52 鶏群から分離された。*C. jejuni* は、28 農場 (93%) の 49 鶏群から分離された。薬剤耐性について農場単位でみると、TC の 33% (10/30) が最も高く、次いで CPFY (NA を含む) の 28% (8/30) であった。ただし、農場の 2 鶏群とも CPFY 耐性株であった農場はなく、CPFY 耐性については、8 農場のうち 7 農場において耐性株が分離されたのは若齢鶏群であり、有意に若齢鶏群の CPFY 耐性株の分離率が高かった (ピアソンのカイ二乗検定  $P = 0.023$ )。さらに、地域別にみると、関東周辺の CPFY 耐性菌農場分離率 (21%:5/24) は九州周辺の農場分離率 (50%:3/6) と比べ高い傾向が見られた。その他の 4 薬剤 (SM、EM、GM 及び CP) に対する耐性はなかった。*C. coli* は、13 農場 (43%) の 18 鶏群から分離された。薬剤耐性については、TC 耐性株が 2 農場 (7%) から分離されたのみで、他の 6 薬剤に対する耐性はなかった。*C. coli* 陽性 13 農場のうち 12 農場は関東周辺に所在した。

サルモネラ：2 農場の 2 鶏群から分離され、どちらも 08 群であった。薬剤耐性については、1 農場の分離株は TMP に耐性であった。

コリスチン耐性大腸菌：1 農場の 2 鶏群から分離され、*mcr-1* を有していた。

#### D. 考察

今回、鶏肉の ESBL 産生大腸菌については、1 検体のみから CTX-M-2 型の耐性遺伝子を有する株が分離され、この分離率は過去の調査結果と比べ、かなり低いものであった。その理由としては、まず、調査を実施した食鳥処理場に搬入された調査対象 32 鶏群のうち、ESBL 産生大腸菌が分離されたのは 4 鶏群 (13%) と既報の農場陽性率よりもかなり低かったことが挙げられる。サルモネラの結果をみると、27 鶏群 (84%) から分離され、鶏肉でも 21 検体 (66%) から分離されたものの、CTX 耐性株はなかった。さらに、近年の抗菌性物質使用や耐性菌に対する消費者の関心の高まりに対応するため、無薬鶏の飼育数が増加しており、今回の調査でも 7 鶏群 (25%) に対し、抗菌性飼料

添加物は使用されていなかった。

加えて、コリスチン耐性大腸菌の結果をみると、4 鶏群の盲腸内容物から分離されているが、鶏肉は 2 検体のみ陽性であり、サルモネラの結果でも、27 鶏群の盲腸内容物から分離されているが、鶏肉は 20 検体が陽性と、ESBL 産生大腸菌、コリスチン耐性大腸菌或いはサルモネラに感染した鶏群に由来する鶏肉のすべてがそれに汚染されるわけではないことを示している。また、今回の調査では食鳥処理場で検体を採取後、冷蔵宅配便にて迅速に当所に発送し、検体採取後 24 時間以内に分離検査を開始しており、店頭販売品と比べ、温度条件、検査開始までの時間など、検体中で ESBL 産生大腸菌が増殖できる環境でありなかったとも考えられる。耐性遺伝子については、今回調査した鶏群は、CTX-M-2 を保有する ESBL 産生大腸菌しか分離されなかった。この結果は、国内の ESBL 産生大腸菌は、食鳥処理場を中心とする鶏肉生産者によって、ESBL 産生大腸菌株の耐性遺伝子型が異なる可能性を示しており、国内の状況を把握するためには、鶏肉生産量や地域を考慮したモニタリングの必要であることを示している。また、農場の生産規模も大小様々であり、これも考慮しなければならないと考えられる。

採卵鶏農場調査については、5 割の農場から ESBL 産生大腸菌が分離され、肉用鶏農場よりも抗菌剤使用機会が低いと考えられる採卵鶏農場も ESBL 産生大腸菌に高率に汚染されていることが判明した。しかし、若齢鶏群と比べ、廃用期に近い鶏群 (老齢鶏群) からは分離されない傾向がみられた。耐性菌と鶏の日齢の関係について、カンピロバクターの結果をみると、有意に老齢鶏群の方が、若齢鶏群より CPFY 耐性株分離率が低かった。さらに、育雛・育成農場では 2 鶏群とも ESBL 産生大腸菌が分離された。以上のことから、育雛・育成農場での抗菌剤使用により、耐性菌が選択され、感染育成鶏が採卵鶏農場に運ばれる。しかし、産卵鶏農場に育成鶏ともに運ばれると、選択圧の少ない採卵鶏農場環境下で徐々に汚染濃度が低下していくと考えられた。分離された ESBL 産生大腸菌の耐性遺伝子は、地域に関係なく CTX-M-1 が多く、既報及び今回の肉用鶏農場の汚染状況とは異なっていた。

今回の調査結果は、国内の養鶏産業の状況をよく反映していた。鶏肉生産は寡占が進み、大手の鶏肉生産者は、ブロイラー飼育から鶏肉販売までを一括して行う統合経営体となっているため、ESBL 産生大腸菌もその範囲内で分布することになる。また、鶏肉も各鶏肉生産者の販売ルートによって、地域によって異なる。つまり、フードチェーンの各段階でモニタリングを実施しても、全国規模の調査を除き、サンプリングした検体の素

性が明らかでなければ、その結果を他の段階の結果と定量的に比較することはできないと考えられた。

#### E. 結論

寡占が進んだ鶏肉生産では、ブロイラー飼育から鶏肉販売までを一括して行う統合経営体となっているため、ESBL 産生大腸菌もその範囲内で分布することになる。また、鶏肉も各鶏肉生産者の販売ルートによって、地域によって異なる。国内の現状を掌握するには、全国規模の調査が望まれる。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 山本詩織、朝倉 宏、五十君静信。基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌に関わる最近の動向とその拡散に関する考察 ～食品汚染実態とその危害性について～食品衛生学会誌 58 巻1号 1-11. (2017)

##### 2. 学会発表

山本 詩織, 朝倉 宏, 石井 良和, 五十君 静信。国内の市販鶏肉から分離されたバンコマイシン耐性 *Enterococcus gallinarum* のフルオロキノロン耐性について。第91回日本細菌学会総会、2018年3月 (福岡)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

表1 食鳥処理場における細菌検査結果

処理日	農場	盲腸内容物				鶏肉(むね)				
		サルモネラ		ESBL 産生 大腸菌 遺伝子型	CL耐性 大腸菌 遺伝子型	サルモネラ		ESBL 産生 大腸菌 遺伝子型	CL耐性 大腸菌 遺伝子型	
		陽性数 /3	血清型(O群) 薬剤耐性			血清型(O群) 薬剤耐性				
第1回	A	2/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	CTX-M-2	-	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	mcr-1		
	B	2/3	O4 KM	AmpC	mcr-1	O4 KM	-	-		
第2回	A	3/3	O3,10 sus	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	O4 SM,KM	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-
	C	1/3	O3,10 sus		-	-	O7 SM,KM,TC,NA,TMP		-	-
第3回	A	0/3	-	CTX-M-2	-	-	-	-	-	-
	D	2/3	O4 KM	-	-	O4 KM	-	-		
第4回	E	3/3	O4 KM	-	-	O4 KM	-	-		
	A	1/3	O7 sus	-	-	-	-	-		
第5回	A	1/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-		
	F	1/3	O7 SM,TC	-	mcr-1	-	-	-		
第6回	A	2/3	O3,10 sus		-	O3,10 sus	-	-		
	G	1/3	O7 SM,KM,TC	AmpC	-	-	-	-		
第7回	A	2/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	-	-	-		
	H	1/3	O4 KM	-	mcr-1	O4 KM	CTX-M-2 TEM	mcr-1		
第8回	A	1/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	-	-	-		
	G	2/3	O7 SM,KM,TC	-	-	-	-	-		
第9回	A	2/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-		
	I	0/3	-	-	-	-	-	-		
第10回	A	3/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	AmpC	-	O4 sus	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	
	I	3/3	O4 KM	-	-	O4 KM	-	-		
第11回	A	2/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-		
	J	0/3	-	AmpC	-	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-		
第12回	A	0/3	-	AmpC	-	-	-	-		
	K	3/3	O4 KM	AmpC	-	O4 KM	-	-		
第13回	A	2/3	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	O3,10 sus	O7 ABPC,CEZ,SM,TC,TMP	-	-	
	C	3/3	O4 KM	-	-	O4 KM	-	-		
第14回	L	3/3	O7 SM,KM,TC,NA,TMP	UT SM,KM,TC,NA,TMP	-	-	O7 SM,KM,TC,NA,TMP	-	-	
	M	0/3	-	-	-	-	-	-		
第15回	N	1/3	O7 ABPC,SM,KM,TC,NA,TMP	CTX-M-2	mcr-1	-	-	-		
	O	1/3	O4 SM,KM,TC,TMP	AmpC	-	O4 SM,KM,TC,TMP	-	-		
第16回	A	2/3	O7 sus	-	-	O7 sus	-	-		
	N	3/3	O4 SM,KM,TC,TMP	CTX-M-2 TEM	-	O4 SM,KM,TC,TMP	-	-		

sus:すべてに感受性

表2 採卵鶏農場における細菌検査結果

地域	農場記号	日齢	カンピロバクター		サルモネラ 血清型 薬剤耐性	ESBL産生大腸菌 遺伝子型	CL耐性 大腸菌 遺伝子型	
			陽性数 /3	菌種, 薬剤耐性				
関東地域	I	136	3/3	<i>C. coli</i> , sus		-	-	-
		480	2/3	<i>C. coli</i> , TC		-	-	-
	M	177	1/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	CTX-M-1,TEM	-
		715	1/3	<i>C. jejuni</i> TC		-	CTX-M-1,TEM CTX-M-1	-
	S	148	3/3	<i>C. jejuni</i> sus		-	-	-
		663	1/3	<i>C. jejuni</i> sus		-	-	-
	Y	232	3/3	<i>C. jejuni</i> NA,CPFX		-	-	-
		580	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	AmpC	-
	O	156	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	AmpC	-
		523	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
	K	280	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
		640	3/3	<i>C. jejuni</i> , TC,NA,CPFX	<i>C. coli</i>	-	-	-
	IT	150	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
		514	0/3	-		-	-	-
	KO	146	2/3	<i>C. jejuni</i> , TC,NA,CPFX		-	-	-
		566	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
	YFK	141	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	AmpC	-
		659	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
	N001	223	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	-	-
		576	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	-	-
	MD	129	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		O8:r:UT, TMP	AmpC	-
		680	0/3	-		-	-	-
	MS	184	2/3	<i>C. jejuni</i> , NA,CPFX		-	-	-
		564	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
	N	211	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
		701	2/3	<i>C. coli</i> , sus		-	-	-
	YFS	139	1/3	<i>C. jejuni</i> , NA,CPFX		-	CTX-M-1	-
		657	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
	MT	136	0/3	-		-	-	-
		644	2/3	<i>C. jejuni</i> , TC		-	-	-
	H	221	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	-	-
		662	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	CTX-M-9	-
	A	160	3/3	<i>C. jejuni</i> , TC	<i>C. coli</i> , TC	-	-	-
		416	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , TC	-	-	-
	Q	159	0/3	-		-	-	-
		552	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	AmpC	-
	PK	210	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
		504	1/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
	PS	135	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	CTX-M-1,TEM	-
		632	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
SC	153	0/3	-		-	CTX-M-9,AmpC	-	
	336	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	CTX-M-1,TEM	-	
UH	126	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	-	-	
	638	3/3	<i>C. jejuni</i> , TC	<i>C. coli</i> , sus	-	-	-	
KA	132	3/3	-		-	-	-	
	548	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	-	-	
YT	114	1/3	<i>C. coli</i> , sus		-	-	-	
	583	0/3	-		-	-	-	
九州周辺	C	123	3/3	<i>C. jejuni</i> , TC,NA,CPFX		-	AmpC	-
		469	2/3	<i>C. jejuni</i> , TC		-	-	-
	T	258	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
		587	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	-
	O	145	3/3	<i>C. jejuni</i> , TC,NA,CPFX		-	CTX-M-2	-
		505	0/3	-		-	CTX-M-1,TEM	-
	E	182	3/3	<i>C. jejuni</i> , TC,NA,CPFX		-	CTX-M-1,TEM	-
		639	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		S. Corvallis, sus	-	-
	U	213	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	CTX-M-1	-
		654	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus	<i>C. coli</i> , sus	-	-	-
	MI	166	3/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	AmpC,CTX-M-2	mcr-1
		496	2/3	<i>C. jejuni</i> , sus		-	-	mcr-1

sus:すべてに感受性、UT:判定不能



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）  
平成 29 年度 分担研究報告書食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究  
分担課題 JANIS 事業と JVARM の連携;食品

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所・細菌第二部・部長)

## 研究要旨

JANIS と JVARM を連携させ、大腸菌で人(JANIS)ならびに家畜(JVARM)で共通に測定している薬剤 (ABPC、CEZ、CTX、キノロン) について薬剤耐性率の年次推移を比較できるようにした。2011 年以降、人由来大腸菌では CEZ、CTX、キノロンの耐性率が増加し続けているが、家畜由来大腸菌ではいずれも人由来大腸菌より耐性率が低い傾向にある。JVARM 担当者ならびに臨床の専門家等と検討し、国立国際医療研究センターで開設予定のホームページで大腸菌の薬剤耐性率の年次推移を示す図を公開することになった。その他の菌種についても人ならびに家畜由来の薬剤耐性菌の動向を容易に比較できるようにするため、JVARM が作成する集計データを JANIS が通常作成するアンチバイオグラムの形で表示するツールを作成した。WHO は 2015 年に Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS) を立ち上げ、2017 年に各国に薬剤耐性に関するデータの提出を求めた。今年度は、GLASS が求める菌種、薬剤について 2014 年、2015 年、ならびに一部の 2016 年分のデータを取りまとめ、GLASS が指定するデータ形式のファイルを作成して提出した。WHO からは日本を含む各国のデータが取りまとめられた報告書が公開された。GLASS は各菌種において、各薬剤で試験を行う菌株数を同じにすることを前提としているが、JANIS はもともと病院が測定しているデータを収集しているため薬剤ごとに測定菌株数が異なるという問題がある。この点について今後も GLASS 側と技術的な協議を継続し解決を目指すこととした。その他、韓国の GLASS について情報収集を行った。韓国では NIH が窓口になっており、実際の集計は Yonsei 大学 Kangnam Severance Hospital が中心となり、6 病院のデータを取りまとめているとのことだった。

## A. 研究目的

ワンヘルスアプローチによる薬剤耐性サーベイランス体制構築を目的として、家畜、食品由来の病原細菌の薬剤耐性に関するデータを JANIS のレポートと同様の形で作成し、比較できるようなツールを作成して、情報を公開する。今年度は JVARM が作成する集計データを JANIS が通常作成するアンチバイオグラムの形で表示するツールを作成した。特に大腸菌については人と家畜由来の菌株での年次推移が比較にできるようにした。さらに地方衛生研究所が収集、解析している人検体由来のサルモネラ属菌の薬剤感受性試験のデータについても、JANIS と同様の形式のレポートを作成するツールを作成した。また、WHO は国際的な薬剤耐性サーベイランス Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) を 2015 年から開始し、2017 年から各国にデータの提出を求めている。JANIS ならびに地方衛生研究所、国立感染症研究所細菌第一部の薬剤耐性に関するデータを用いて GLASS が求め

る集計を行い、GLASS のファイル形式でデータファイルを作成し GLASS に提出した。

## B. 研究方法

JVARM が集計している家畜由来細菌の薬剤感受性試験結果のデータをもとに、JANIS 形式のアンチバイオグラムを自動作成するツールをエクセルで作成した。

大腸菌については、JANIS と JVARM で共通で測定している薬剤について耐性率の年次推移が容易に比較できるような図を作成し、国立国際医療研究センターが運営する事業に提示した。

GLASS については、GLASS が求めるデータ形式のファイルを作成した。血液由来の大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、ならびに尿由来大腸菌、*K. pneumoniae* は JANIS のデータベースからデータを抽出し、年齢、性別、入院外来別に層別化した。JANIS データ利用にあたっては、統計法に基づき厚生労働省に研

究利用申請を行い、承認を得た。便由来のサルモネラについては、地方衛生研究所が集計しているデータをもとに同様に GLASS 提出用ファイルを作成した。便由来赤痢菌、ならびに淋菌については国立感染症研究所細菌第一部が集計したデータを用いた。

(倫理面への配慮)

患者情報は取り扱わない。

### C. 研究結果

JVARM が集計している家畜由来細菌の薬剤感受性試験結果のデータをもとに、JANIS 形式のアンチバイオグラムを自動作成するツールをエクセルで作成した(図1)。このツールをもとに、JVARM 側(分担者川西)においてアンチバイオグラムが作成された。

特に大腸菌、腸球菌については、人ならびに家畜由来で共通の薬剤を測定している。JVARM 担当(分担者川西ならびに協力者)ならびに国立国際医療研究センターの臨床の専門家、厚生労働省結核感染症課担当官等と検討し、大腸菌と腸球菌の薬剤耐性の年次推移を比較する図を作成し(図2(a)から(h))、比較に意味があると考えられる大腸菌(図2(a)から(d))については国立国際医療研究センターが運営するホームページに今後掲載することとした。2011年以降、人由来大腸菌ではCEZ、CTX、キノロンの耐性率が増加し続けているが、家畜由来大腸菌ではいずれも人由来大腸菌より耐性率が低い傾向にあり、現時点では人と家畜の相関は明らかでないが、今後も継続的な監視が必要である。腸球菌については *Enterococcus faecim* と *Enterococcus faecalis* で薬剤耐性率が大きく異なり、JVARM では両菌種を *Enterococcus* 属として集計している(図2(e)から(h))ため、これらのデータを一般公開するのは適切でないと考えられた。また、他の菌種や薬剤についても、できるだけ JANIS と JVARM の集計薬剤や手法を揃えて比較可能にして行く必要がある。

WHO が進めているサーベイランス GLASS については、JANIS データベースから 2014 年、2015 年、2016 年の血液由来大腸菌、*A. baumannii*、*K. pneumoniae*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、ならびに尿由来大腸菌、*K. pneumoniae* のデータを抽出し、解析した。各菌種とも数千から数万株のデータを集計した。2014 年、2015 年のデータについては GLASS 提出用ファイルを作成し、GLASS に提出した。2016 年のデータについても現在解析を進めている。2014 年、2015 年とも、*A. baumannii*、大腸菌、*K. pneumoniae*、黄色ブドウ球菌など、院内感染で問題となる菌種では外来検体より入院検体の方が耐性率が高い傾向があっ

た(図3(a)から(d))。血液由来サルモネラでは、集計菌株数が 100 から 300 株程と少なく、うち CTX や LVFX に耐性を示したものは数株程度だったため耐性率の数値にばらつきがあるが、CTX 耐性は 2015 年で LVFX 概ね 1% または 1% 未満だった。淋菌、赤痢菌については分担者大西から国立感染症研究所細菌第一部が持つデータの提供を受け、解析を行なった。2015 年では淋菌のセフトリアキソン耐性が 6.2%(38/617)、赤痢菌ではシプロフロキサシン耐性が 41.2%(47/114) と比較的高いことがわかった。便由来サルモネラについては、分担者四宮より地方衛生研究所が集計しているデータの提供をうけ、解析を行なった。GLASS は今後も各国にデータの提出を求める予定であり、さらに将来的には GLASS の集計方式が薬剤耐性サーベイランスの世界標準となる可能性があるため、今後もデータの集計を継続する必要がある。

なお、GLASS は各菌種において、各薬剤で試験を行う菌株数を同じにすることを前提としているが、JANIS はもともと病院が測定しているデータを収集しているため薬剤ごとに測定菌株数が異なるという問題がある。この点について今後も GLASS 側と技術的な協議を継続し解決を目指すこととした。

### D. 考察

JVARM と JANIS の比較で、特に大腸菌の ABPC、CEZ、CTX、キノロンについて耐性率の年次推移の比較を容易にできるようにして一般公開することになった。人では CEZ、CTX、LVFX の耐性率は増加が続いているが、家畜では耐性率は低く、特に肉用鶏では 2011 年以降、CEZ、CTX の耐性率が急減している。畜産分野での抗菌薬の使用状況を反映するものと考えられる。人分野での薬剤耐性との相関については、ゲノムの比較などさらに詳細な解析が必要である。

GLASS の集計と JANIS の集計に齟齬がある点については、データを提出した時点で柴山と GLASS 担当者として議論を行った。JANIS では JANIS 参加病院がそれぞれ異なるパネルを使っているため、薬剤ごとに分母の菌株数が異なってしまう点を説明し、もし GLASS の format に従うなら、新しく GLASS のパネルに沿うようなデータを抽出するためにプログラムから開発しなければならぬことを説明した。結果その段階では技術的に解決が困難との結論になった。その後協力研究者の国立感染症研究所薬剤耐性研究センターの菅井センター長が GLASS の責任者 Carmen Lucia da Silva ならびに IT 担当の Sergey Eremin に会う機会があり、この問題を議論した。GLASS 側は、今回が初めての施行で 2019 年バージョンは改訂を予定している。この問題は改訂で解決でき

るとの認識を示した。また da Silva は JANIS のデータを非常に重要と考えており、JANIS の format の東南アジア諸国への波及効果を期待していること、そのためにも face to face で discussion がしたいので今後に skype 会議を持ちたいとの申し出があった。

その他、韓国の GLASS について情報収集を行った。韓国では KCDC の下に NIH が組織され、NIH の一部門として Center for Infectious Disease Research が置かれている。韓国では GLASS については NIH が窓口になっており、実際の集計は Yonsei 大学 Kangnam Severance Hospital が中心となり、6 病院のデータを取りまとめているとのことだった。NIH は以前に薬剤耐性に関する国のサーベイランスとして Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System (KARMS) を実施してきたが、KARMS はすでに廃止され、GLASS をベースにしたシステム Kor-GLASS が稼働しているとのことだった。なお、医療関連感染のサーベイランスである KONIS は今後廃止されるとのことだった。

#### E. 結論

JVARM が集計している家畜由来細菌の薬剤耐性率を JANIS 形式のアンチバイオグラムで表示するツールを分担者川西らと共同で作成した。

大腸菌について、人由来と家畜由来の菌株の ABPC、CEZ、CTX、キノロンの耐性率の年次推移を容易に比較できる図を作成し、国立国際医療研究センターが運営するホームページに掲載することとなった。

WHO が進めている薬剤耐性サーベイランス GLASS に日本のデータを提出した。GLASS と JANIS とで

集計手法が異なる問題について、今後解決を図ることとした。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

Keigo Shibayama. National Surveillance system for Antimicrobial Resistance and Adaptation of GLASS in Japan. 20th General Meeting of The Korean Society for Clinical Microbiology, 2017年7月6日、韓国扶余

Keigo Shibayama. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan. AMR ワンヘルス東京会議-AMR 国際シンポジウム-厚生労働省、2017年1月14日、東京

Keigo Shibayama. Experience of Japan in working on Surveillance of Antimicrobial Resistance. Workshop on Sharing experience in Interdisciplinary Coordination in antibiotic resistance surveillance and response in Vietnam. 10月31日-11月1日、ベトナムハノイ

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

年 2014  
畜種 肉用牛

2014  
日

	検体数	S検体数	I検体数	R検体数		S(%)	I(%)	R(%)
ABPC	284	268	0	16	ABPC	94.4%	0.0%	5.6%
CEZ	284	269	12	3	CEZ	94.7%	4.2%	1.1%
CTX	284	280	0	4	CTX	98.6%	0.0%	1.4%
GM	284	284	0	0	GM	100.0%	0.0%	0.0%
KM	284	279	0	5	KM	98.2%	0.0%	1.8%
TC	284	217	9	58	TC	76.4%	3.2%	20.4%
NA	284	273	0	11	NA	96.1%	0.0%	3.9%
CPFX	284	284	0	0	CPFX	100.0%	0.0%	0.0%
CP	284	275	2	7	CP	96.8%	0.7%	2.5%
TMP	284	275	0	9	TMP	96.8%	0.0%	3.2%

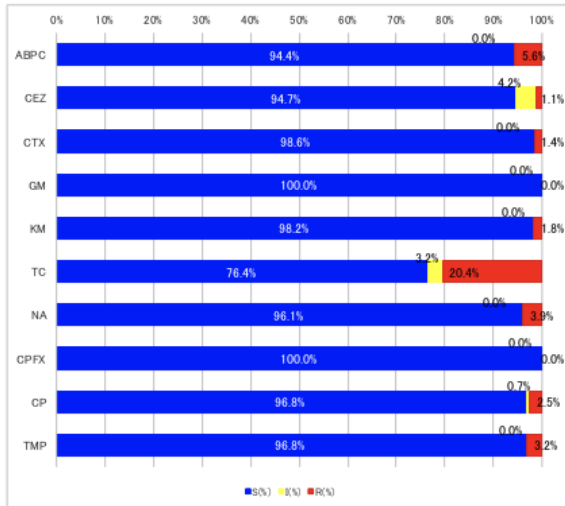
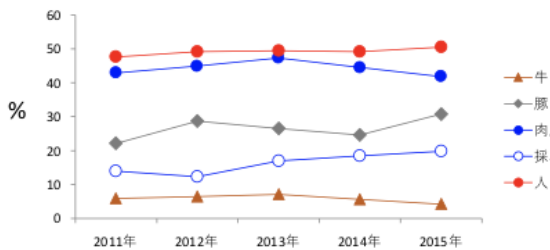


図1 JVARMの集計を JANIS 形式のアンチバイオグラムで表示するツール。左上の年、畜種をプルダウンメニューで選択すると、S、I、Rの検体数が自動集計され、アンチバイオグラムが作成される。表示されているデータはダミーデータ。

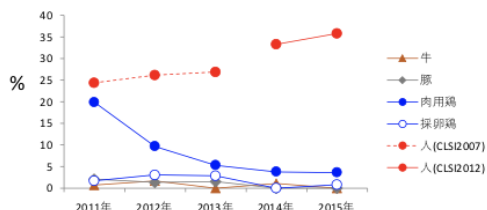
大腸菌ABPC耐性率の推移



CLSI 2012に基づきブレイクポイントは32μg/mlとした

図2(a) 大腸菌 ABPC の耐性率の年次推移

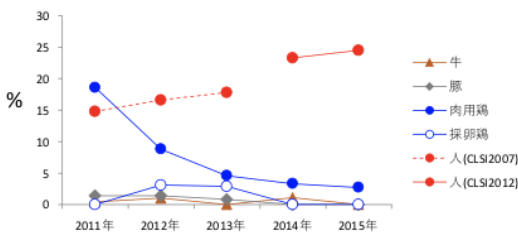
大腸菌CEZ耐性率の推移



ブレイクポイントは家畜についてはCLSI 2007に基づき32μg/ml、人については2013年まではCLSI 2007に基づき32μg/ml、2014年以降はCLSI 2012に基づき8μg/mlとした。

図2(b) 大腸菌 CEZ の耐性率の年次推移

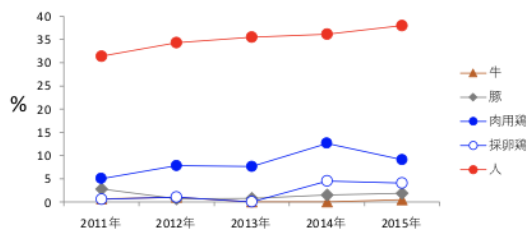
大腸菌CTX耐性率の推移



ブレイクポイントは家畜についてはCLSI 2012に基づき4μg/ml、人については2013年まではCLSI 2007に基づき64μg/ml、2014年以降はCLSI 2012に基づき4μg/mlとした。

図2(c) 大腸菌 CTX の耐性率の年次推移

大腸菌フルオロキノロン系薬剤耐性率の推移

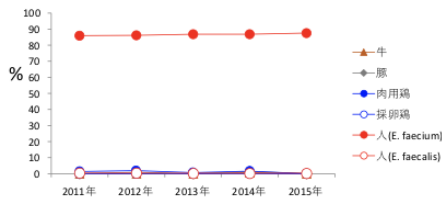


CLSI 2012に基づきLVFXのブレイクポイントは8μg/ml、CPFXのブレイクポイントは4μg/mlとした。

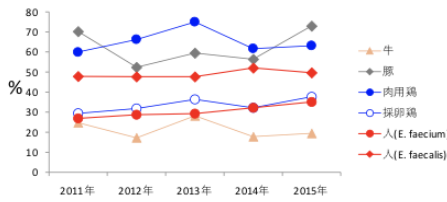
図2(d) 大腸菌フルオロキノロンの耐性率の年次推移

人についてはレボフロキサシン(LVFX)、家畜についてはシプロフロキサシン(CPFX)の耐性率の調査結果を示した。

腸球菌ABPC耐性率の推移



腸球菌テトラサイクリン系薬剤耐性率の推移



人についてはミノサイクリン (MINO)、家畜についてはオキシテトラサイクリン (OTC)の耐性率の調査結果を示した。

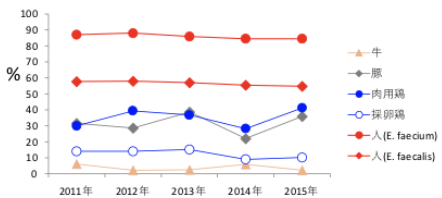
人についてはEnterococcus faeciumとEnterococcus faecalisを別に集計し、家畜についてはEnterococcus spp.として集計した。ブレイクポイントはCLSI2012に基づき16μg/mlとした。

人についてはEnterococcus faeciumとEnterococcus faecalisを別に集計し、家畜についてはEnterococcus spp.として集計した。ブレイクポイントはCLSI2012に基づき16μg/mlとした。

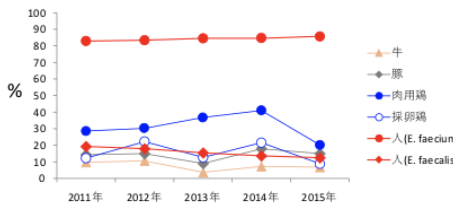
図 2 (e) 腸球菌 ABPC の耐性率の年次推移

図 2 (f) 腸球菌テトラサイクリンの耐性率の年次推移

腸球菌EM耐性率の推移



腸球菌フルオロキノロン系薬剤耐性率の推移



人についてはレボフロキサシン(LVFX)、家畜についてはエンロフロキサシン (ERFX)の耐性率の調査結果を示した。

人についてはEnterococcus faeciumとEnterococcus faecalisを別に集計し、家畜についてはEnterococcus spp.として集計した。ブレイクポイントはCLSI2012に基づき8μg/mlとした。

人についてはEnterococcus faeciumとEnterococcus faecalisを別に集計し、家畜についてはEnterococcus spp.として集計した。ブレイクポイントはCLSI2012に基づきERFXは4μg/ml、LVFXは8μg/mlとした。

図 2 (g) 腸球菌 ABPC の耐性率の年次推移

図 2 (h) 腸球菌テトラサイクリンの耐性率の年次推移

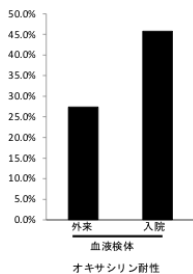


図 3 (a) 黄色ブドウ球菌に占める MRSA の割合 (2015 年)

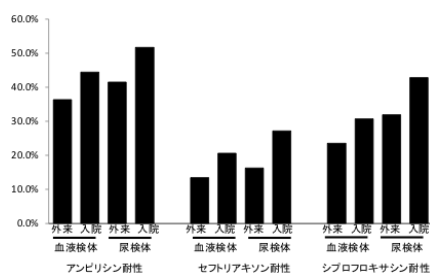


図 3 (b) 大腸菌の各検体、各薬剤の耐性率 (2015 年)

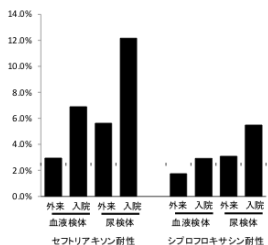


図 3 (c) K. pneumoniae の各検体、各薬剤の耐性率 (2015 年)

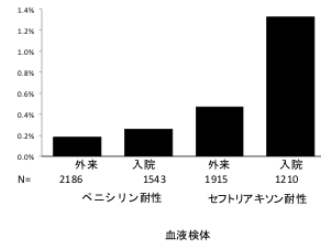


図 3 (d) 肺炎球菌の薬剤耐性 (2015 年)

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究  
分担課題 非チフスサルモネラ症の起因菌の薬剤耐性に関する研究

研究分担者 大西 真 (国立感染症研究所・細菌第一部・部長)  
研究協力者 泉谷秀昌 (国立感染症研究所・細菌第一部・室長)

研究要旨

この研究では、サルモネラヒト由来株に焦点をあてて解析する体制構築を目指した。食品からヒトへの菌の伝播を考えるうえで重要な健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った。

A. 研究目的

腸チフス、パラチフスを除くサルモネラ (non-typhoidal Salmonella, NTS) 症は食中毒の中で件数、患者数とも上位を占めることが知られている。また、食品由来感染症（食中毒として捉えることができない事例を含む）としても、カンピロバクター感染症とともに未だ多数の症例が国内で存在することが推定されている。サルモネラ属菌による食品由来推定患者数は年間 14～25 万人程度（2005～2008）とされている（平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業『食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究』：分担研究「宮城県における積極的 食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害者数推定」 分担研究者 窪田邦宏、春日文子、2010、p. 117-136.）。

大規模流通食品の汚染が、直接大規模事例につながる危険がある。そのため、散発例の把握、食品汚染の実態の把握からリスク要因を抽出し、NTS 対策の効率化、高度化が望まれる。また、薬剤感受性プロファイルを理解することで、NTS の動物-ヒト間の伝播の様子を探る上でも分離株の詳細な検討が必要である

本研究では、国立感染症研究所で収集された NTS 株の整理をするとともに、健康サ

ルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った。

B. 研究方法

収集菌株情報の整理

細菌第一部において 2010 年から 2015 年にかけて検査依頼を受けた NTS について、解析株数、血清型情報、血清型ごとの薬剤感受性試験結果について整理を行った。

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築

業務従事者の検便を実施している検査会社から、2013 年に分離された血清群 04 の株の分与を受け、これについて H 型別及び薬剤感受性試験を行った。

倫理面への配慮

いずれも菌株のみの解析であり、個人情報 は連結不可能匿名化されている。

C. 研究結果

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築

昨年度は、業務従事者の検便を実施している検査会社から供試された 2015 年に分離された 04 群を調べた。本年度は 2013 年に分離された 04 群 207 株の供試を受け、H

型別及び薬剤感受性試験を行った。

その結果、Schwarzengrund、04:i:-、Saintpaul、Typhimurium、Agona などの血清型が同定された。各血清型の分布を図 1 に示した。

上記血清型における薬剤耐性の分布を図 2 に示した。いずれの薬剤にも感受性であった株の頻度は

Bredeney	100%
Stanley	88%
Saintpaul	74%
04:i:-	8%
Schwarzengrund	9%

において高く、  
において低かった。

全体の耐性率の高い薬剤は

TC	45%
SM	41%

であり、CPFX、CTX、CAZ、FOM は 2%以下であった。

TC は 04:i:-、Schwarzengrund において耐性率が高かった（それぞれ 78%、68%）。ABPC は 04:i:-、Typhimurium において耐性率が高かった（76%、52%）。KM は Schwarzengrund において耐性率が高かった（70%）。

#### 2015 年株との比較

菌株数を比較した結果を図 3 に示す。どの血清型も 2015 年では増加傾向にあり、Schwarzengrund、Saintpaul、Stanley では 1.5 倍以上の増加が見られた。Chester は 2015 年にのみ検出された。

Saintpaul、Stanley では感受性株が多く、上記増加も感受性株の増加によるところが大きかった（それぞれ 1.6 倍、2.6 倍）。Schwarzengrund については図 4 に示すように、SM/TC、SM/TC/KM 耐性株の増加が見られた。

04:i:-については、図 3 に示すように株数にわずかな増加が見られた一方、図 5 に示すように、ABPC/SM/TC 耐性株の増加が見られた。また、数は少ないものの CP (C) もしくは KM (K) を含む ASTCSx、ASTKC、

ASTKCSx、ASTKCZm 耐性パターンも 2015 年のみに観察された。

#### D. 考察

サルモネラ属菌は様々な動物へ適応することでその多様性を獲得してきたと考えられている。各血清型のサルモネラ属菌の宿主域により、リスク食品や接触感染のリスクが規定される。ヒトへは、食品を介する感染が主であり、一部ヒトと動物の接触によるヒト感染が存在する。ヒト-ヒトの直接感染のリスクは腸チフス原因菌（チフス菌、パラチフス菌）ほど明確ではないが、調理従事者の保菌が食品の汚染の原因となることは否定できない。

サルモネラ属菌がヒト腸管内に存在している状態（健康保菌）についての知見には限りがある。本研究では、これらの分離株を詳細に解析することでサルモネラ属菌の耐性化機構の一つの側面を考察することを目的としている。

2013 年の健康保菌者由来サルモネラ 04 群菌 207 株の解析の結果、2015 年同様、多様な血清型が存在することが示された。分離頻度が高いものとして Schwarzengrund、04:i:-、Saintpaul、Typhimurium、Agona、Derby、Stanley、04:b:-、Bredeney で 92% を占めていた。04 群のみを対象とした解析ではあるが、多様なサルモネラによる健康保菌が存在していることがうかがわれた。

薬剤耐性の分布では、高い確率で感受性が保たれている血清型 (Bredeney、Stanley、Saintpaul)、と感受性株がほとんど存在しない血清型 (Schwarzengrund、04:i:-) が存在した。また、薬剤別では全体としては TC および SM が高い耐性率を示した。注目すべきは血清型によって ABPC 耐性率、あるいは KM 耐性率が高いことが示されたことである。また、2013 年から 2015 年にかけて、Schwarzengrund、Saintpaul、Stanley が大きく増加しており、Chester のように 2015 年にのみ検出された血清型も存在した。Saintpaul、Stanley は大勢を占める感受性株の増加が見られた。一方、耐性頻度の高い Schwarzengrund ならびに 04:i:-では

SM/TC/KM 3 剤耐性、ABPC/SM/TC 3 剤耐性を中心に耐性株の増加が見られた。このように、健康保菌者におけるサルモネラは多様であり、血清型も耐性率の傾向も変化することが明らかとなった。

#### E. 結論

検便検査会社の協力をえて、04 群サルモネラ属菌の性状解析を実施するための体制の構築を始め、計 507 株の性状解析が実施した。多様なサルモネラが健康保菌者から分離されていることが示された。今後の解析の参照として重要な知見であると考ええる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし。

2. 学会発表  
特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得	なし。
2. 実用新案登録	なし。
3. その他	なし。





図3 サルモネラ04群 健康保菌者由来株の血清型分布（2013年、2015年株数による比較）

## 2013, 2015年比較(株数)

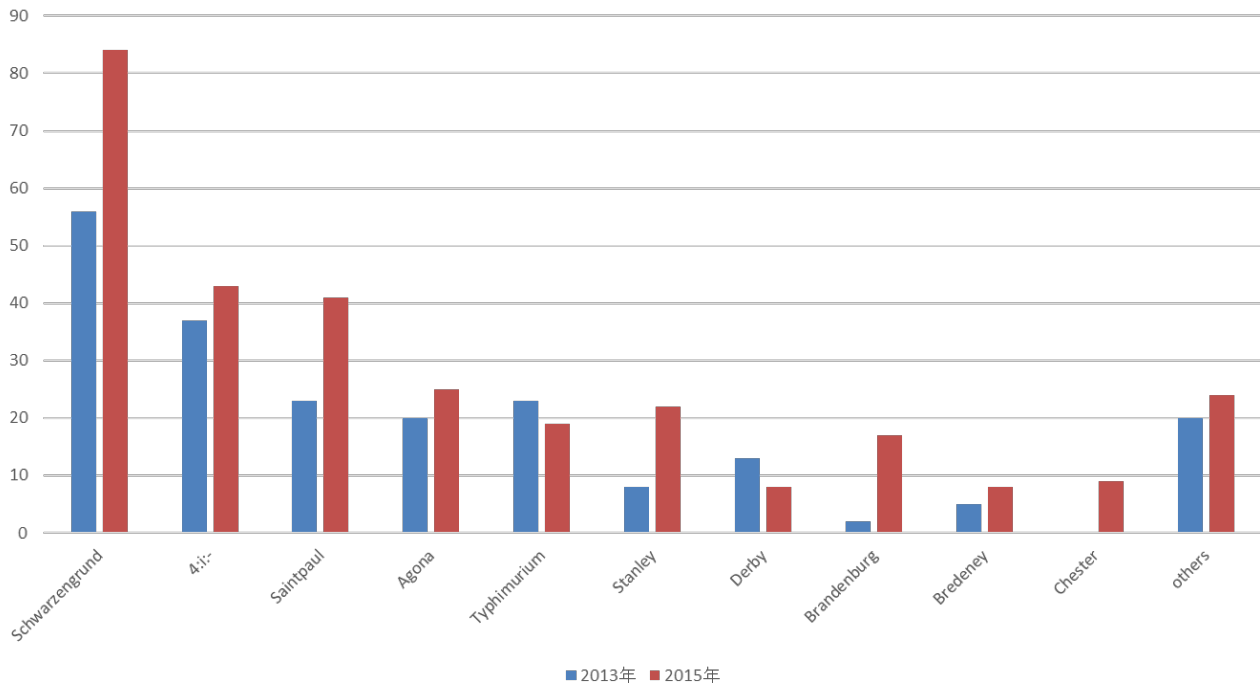


図4 *Salmonella* Schwarzengrund の薬剤耐性パターン

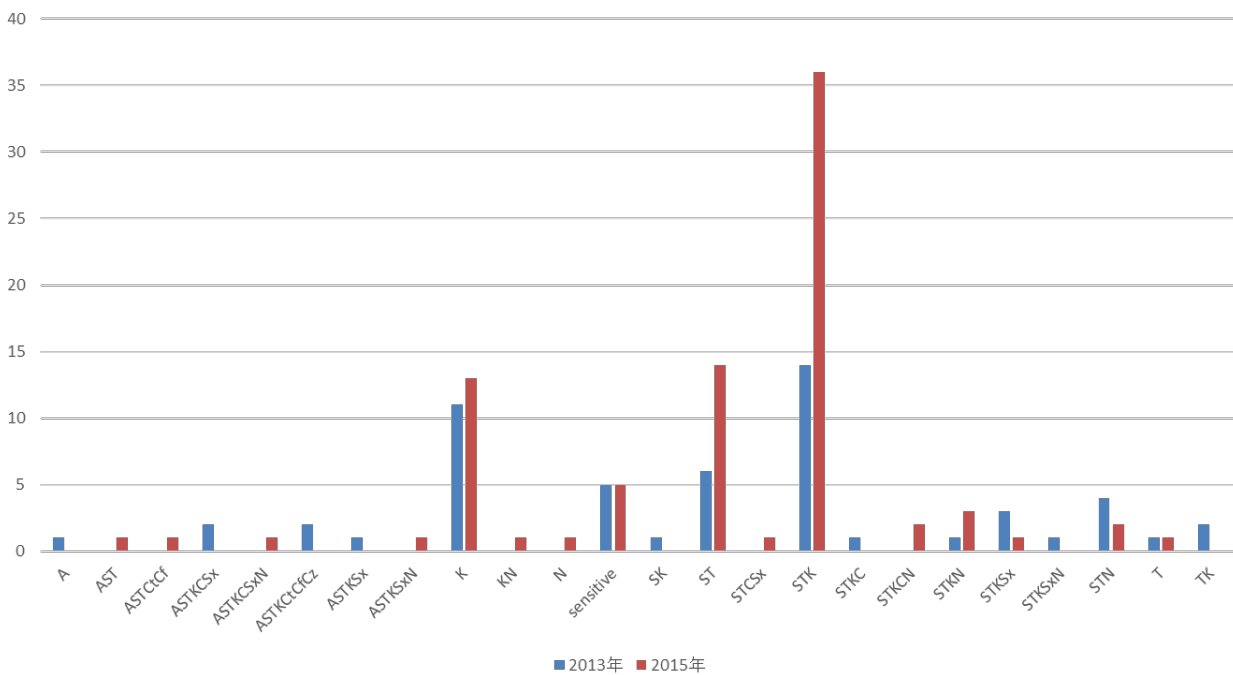
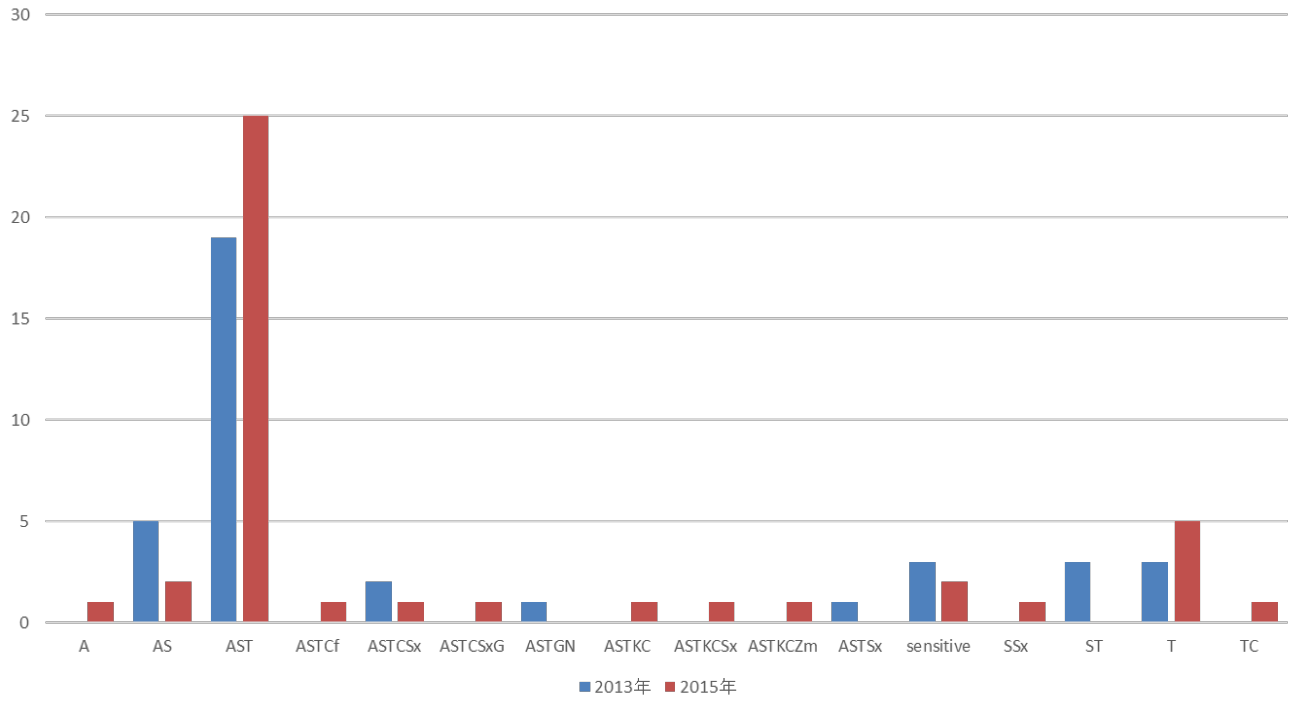


図5 *Salmonella* 04:i:- の薬剤耐性パターン



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）  
平成 29 年度 分担研究報告書食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究  
分担課題 食品由来の多剤耐性菌（ESBL/AmpC 産生菌、VRE など）の疫学調査研究分担者 富田 治芳（群馬大学大学院医学系研究科・細菌学・教授）  
研究協力者 谷本 弘一（群馬大学大学院医学系研究科・薬剤耐性菌実験施設・准教授）

## 研究要旨

本調査研究では、環境（家畜、食肉）からヒトへの伝播・拡散が危惧される多剤耐性腸内細菌科菌（ESBL 産生菌、AmpC 産生菌）およびバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）について国内で流通する食肉検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。2016 年度（2017 年 2～3 月）に収集した国内産食肉（鶏肉）110 検体、輸入食肉（鶏肉）88 検体の合計 198 検体を調査した。ESBL 産生菌は 100 検体陽性（50.5%）、AmpC 産生菌は 50 検体陽性（25.3%）であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し（昨年度は ESBL 産生菌 13.3%、AmpC 産生菌 15.9%の検出率）、いずれも高いものであった。特に ESBL 産生菌は国産鶏肉から高頻度で検出され（国内産 78.2%、輸入 15.9%）、昨年とは大きく異なっていた（国内産 6.7%、輸入 26.3%）。一方、AmpC 産生菌の検出率は国内産が 36.4%、輸入食肉が 11.4%と昨年と同様に国内産鶏肉の方が高かった。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型（56.2%）、CTX-M 型+TEM 型（29.0%）、TEM 型（15.0%）が多く、輸入肉では CTX-M 型（73.3%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入食肉共に CTX-M2 が優位で、次いで CTX-M1 が分離された。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された。これら食肉由来多剤耐性腸内細菌科細菌 173 株の約 9 割は大腸菌であったが、ESBL 産生サルモネラ属菌 13 株が国内産鶏肉から検出された。約 6 割の分離株が薬剤耐性伝達能を示し、伝達性プラスミドの多くは IncF、I1、B/0 に属した。サルモネラ属菌 13 株が保持する TEM 型耐性遺伝子も全て伝達性を示した。ブラジル産鶏肉から伝達性 *mcr-1* を保持するコリスチン耐性大腸菌が 1 株分離された。またブラジル産鶏肉 3 検体から高度バンコマイシン耐性 VanA 型 VRE 株が検出された。さらに VanN 型 VRE が国内産鶏肉 3 検体から検出された。これらの VanN 型株の PFGE 解析と MLST 解析から、VanN 型 VRE 株は過去に分離された国産鶏肉由来株と同一の起源であった。

## A. 研究目的

1) 臨床では多剤耐性の腸内細菌科菌（大腸菌、肺炎桿菌など）が急激に増加している。特に抗菌薬として最も多く使用されている  $\beta$ -ラクタム剤に対して高度耐性を示す ESBL 産生菌、および AmpC 産生菌の増加が深刻な問題となっている。これら多剤耐性腸内細菌科菌は環境（家畜）から畜産物、特に食肉を介してヒトへ伝播、拡散する危険性が指摘されている。本研究では食肉のこれら多剤耐性腸内細菌科菌の調査・解析を行い、その関連性を科学的に明確にすることを目的とした。

2) 多剤耐性グラム陰性菌に対し効果のある抗菌薬としてコリスチンがヒト臨床で注目されている。 $\beta$ -ラクタム薬とは異なり、コリスチンは細胞壁外膜を標的としており、交叉耐性を示さない。近年、国外の家畜環境から伝達性プラスミドのコリスチン耐性遺伝子（*mcr-1/mcr-2*）を保有する腸内細菌科細菌が報告され、ヒトへの伝播拡散が

報告された。本調査では、これらのコリスチン耐性腸内細菌科細菌の検出も行った。

3) 多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE は欧米で院内感染症の主な起因菌として深刻な問題となっている。ヨーロッパにおいては過去の家畜への肥育目的の抗菌薬（アボパルシン）使用による環境中での VRE の増加とそのヒトへの伝播、拡散が指摘されている。幸い日本国内では VRE の分離頻度は欧米に比較し低いが、近年、増加中であり複数件のアウトブレイクが臨床報告されている。しかし国内ではこれまで VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は十分に行われていない。本研究では環境（家畜、食肉）由来 VRE と臨床分離 VRE との関係を明らかにする目的で、国内食肉における VRE の調査と解析を行った。

## B. 研究方法

食肉検体（表1）：国内産食肉は国内3ヶ所の食肉検査所からそれぞれ鶏肉30あるいは40検体を収集した。海外食肉は各年度に検疫所で取り扱う輸入鶏肉（ブラジル産63検体、米国产13検体、タイ産11検体、フィリピン産1検体の合計88検体）を収集した。各施設から送付された検体は速やかに凍結保存とし、順次融解の後、解析を行った。

検出方法：

1) ESBL産生菌およびAmpC産生菌（腸内細菌科菌）の検出

国内の食肉衛生検査所で採集された肉の拭き取り材料を用いた。輸入肉はミンチ肉を用いた。それぞれABPC添加（80mg/L）LB液体培地3mlで一晩培養し、0.1mlを二種類の薬剤添加DHL寒天培地（CAZを1mg/LまたはCTXを1mg/L含む）に塗布した。それぞれの平板上の発育コロニーを2個ずつ釣菌し、純培養後チトクロム・オキシダーゼ試験陰性菌のみを選択した。CTX、CAZに対するMIC値2mg/L以上の株についてさらに2薬剤阻害実験を行った。ESBL産生確認のためにCTX、CAV、CAZディスク、AmpC産生確認のためにCTX、ボロン酸、CAZディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法（DDST）を行った。各々の耐性遺伝子型（ESBL；TEM、SHV、CTX-M、およびAmpC；MOX、CIT、DHA、ACC、EBM、FOX）の確認には各種特異的プライマーを用いたPCR法を用いた。

上記の方法で分離された耐性株について耐性の接合伝達実験を行なった。受容菌として大腸菌実験株C600（アザイド耐性）を用い、膜フィルターを用いた接合伝達（37°C、8時間培養）を行った。選択培地にはCTXまたはCAZをそれぞれ1μg/mLとアザイド250mg/Lを含む寒天平板を用いた。接合伝達性を認めた株については、プラスミドのレプリコン型をPCR法によって調べた。

2) コリスチン耐性大腸菌の分離

食肉検体を薬剤非添加のL培地（液体）を用いて前培養し、その0.1mlをコリスチン1mg/L含有DHL寒天培地上に塗布し、培養した。平板上で発育した赤色コロニーを釣菌し（1検体あたり2株）、純培養後に*mcr-1*および*mcr-2*検出用プライマーを用いたコロニーPCRによって各耐性遺伝子の検出を行った。

3) VREの検出

培地；腸球菌分離にはEnterococcosel Broth（BBL）、Bile Esculin Azide agar（Difco）およびBrain Heart Infusion agar（Difco）を使用。

用いた薬剤；バンコマイシン（VCM）、テイコプラニン（TEIC）

腸球菌の分離；VRE検出のための選択的方法を用いた。検体のガーゼのふき取りサンプル、ミンチ

肉片を、VCM 4mg/L加Enterococcosel Brothで48時間選択的増菌後、VCM 4mg/L加Bile Esculin Azide agar選択培地に塗布し、得られたコロニーをVCM 4mg/L加Brain Heart Infusion agar上で単集落分離を行うことにより選択した。ミンチ肉浸潤液0.1mlをVRE選択寒天培地に塗布した。選択用寒天平板の培養時間はすべて37°C、48時間培養。薬剤耐性検査は薬剤平板希釈法を用い、接種菌液は1夜液体培地培養後の菌を100倍希釈することにより用いた。VREの検出には*vanA*、*vanB*、*vanC1*、*vanC2/3*、*vanN*、各種*ddl*の特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法を用いた。必要に応じてDNAシーケンス解析（Big Dye primer法）、PFGE解析、MLST解析を行った。

（倫理面への配慮）

全ての臨床分離株は患者個人を同定できる情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

## C. 研究結果

1) ESBL産生菌およびAmpC産生菌の調査・検出のために2016年度（2017年2月～3月）に収集した国内産鶏肉110検体、輸入鶏肉88検体の合計198検体を解析した（表1）。

ESBL産生菌は100検体陽性（50.5%）、AmpC産生菌は50検体陽性（25.3%）であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し（昨年度はESBL産生菌13.3%、AmpC産生菌15.9%の検出率）、いずれも高いものであった（表2）。特にESBL産生菌は国産鶏肉から高頻度で検出され（国内産78.2%、輸入15.9%）、昨年とは大きく異なっていた（国内産6.7%、輸入26.3%）。一方、AmpC産生菌の検出率は国内産が36.4%、輸入食肉が11.4%と昨年と同様に国内産鶏肉の方が高かった。耐性遺伝子型の解析からESBL産生菌は国産肉ではCTX-M型（56.2%）、CTX-M型+TEM型（29.0%）、TEM型（15.0%）が多く（表3）、輸入肉ではCTX-M型（73.3%）が多かった（表4）。CTX-M型遺伝子として国内産と輸入食肉共にCTX-M2が優位で、次いでCTX-M1が分離された（表5）。食肉から分離される耐性株の遺伝子型の傾向はこれまでの調査と同じであった。

鶏肉由来ESBLおよびAmpC産生株（国内産鶏肉由来91株と輸入鶏肉由来株24株）の合計173株について、膜フィルター上で大腸菌実験株との接合伝達実験を行なった。その結果、いずれの耐性遺伝子型も約6割が伝達性を示し（表6）、耐性遺伝子が伝達性プラスミド上に存在していることが示唆された。そのうち102株（国内91株、国外11株）についてプラスミドのレプリコン型を解析したところ、主にIncF、I1、B/0、A/C型

であった（表7）。

ESBL 産生株、AmpC 産生株（合計 173 株）の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり（155 株 89.6%）、*Salmonella* 属菌が 13 株、*Klebsiella pneumoniae* が 5 株分離された（表8）。昨年度の本調査において、食肉検体から病原性細菌であるサルモネラ属菌 1 株が多剤耐性腸内細菌科細菌として初めて分離されたが、今年度も同様に国内産鶏肉から複数分離された。これらのサルモネラ属菌は全て伝達性の TEM 型耐性遺伝子を保持する ESBL 産生菌であった。

今回の調査で分離された 173 株について他の薬剤（TC、CPFX、GM）の薬剤感受性を調べたところ、いずれかの薬剤に耐性の株は 125 株（72.2%）で、特に TC 耐性は 114 株（65.9%）と高頻度であった（表9）。

#### 2) コリスチン耐性大腸菌の検出

コリスチン含有培地（1mg/L）に発育した大腸菌 165 株（国内産 36 検体 75 株、輸入 54 検体 90 株）について PCR を行ったところ、*mcr-1* 陽性株をブラジル産検体から 1 株得た（*mcr-2* は全株陰性）。接合伝達実験により、このコリスチン耐性（MIC 値；16 mg/L）は伝達性を示し、プラスミド性であった。尚、今回の調査では自然耐性菌の *Proteus* 属菌は対象から除いた。

#### 3) VRE の検出（図1、図2、表10）

VRE について、今年度は高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株がブラジル産鶏肉検体 3 検体から検出された（図1）。これらのうち 2 検体からの株は PFGE パターンが類似し、近縁株であった（図2）。一方、国内産鶏肉 3 検体から VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された（図1、図2）。VanN 型 VRE は我々が 2011 年に収集した国内産鶏肉から分離し、世界で 2 例目として、また環境中からは初めて報告した新型 VRE である（表10の GU121-1 株）。今回の調査で国産鶏肉検体から分離された VanN 型 VRE 株について PFGE 解析を行ったところ、これまでに本調査で報告してきた VanN 型 VRE 株 *E. faecium* 株と極めて類似の PFGE パターンを示した（図2）。また MLST 解析を行ったところ、これらは全て ST669 に分類された（表10）。これらの結果は今回検出した VanN 型株が以前に分離された株と同一の起源を持つことを示している。

#### D. 考察

ESBL/AmpC 産生株の調査においては、一昨年度より、検出方法を改善した結果（Ampicillin を添加した液体培地で前培養を行なう工程を追加）、検出率自体は上がった。しかし、昨年度の調査結果と比較し、ESBL 産生菌、AmpC 産生菌の分離頻

度が国内外の食肉でそれぞれ逆転していた。また国内産鶏肉検体からの分離頻度と比較し、外国産食肉検体からの検出率が全体的に低下していた。今年度の国内産食肉における AmpC 産生株の検出頻度に地域差を認めたが、その理由は不明である。昨年度と同様に、食肉から多剤耐性サルモネラ属菌が複数の検体から分離され、これらは全て国産食肉検体であった。病原性の腸内細菌科細菌の多剤耐性化について、今後の動向を調査して行く必要がある。

今回、伝達性（プラスミド性）*mcr-1* を保持するコリスチン耐性大腸菌 1 株がブラジル産鶏肉から分離された。近年、中国をはじめ海外の家畜環境中での、腸内細菌科細菌の伝達性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* の急速な拡散と蔓延、ヒトへの伝播が危惧されている。今回は外国産食肉からの耐性菌の分離であったが、伝達性プラスミドの伝播と拡散による国内の家畜環境中における菌の耐性獲得が心配される。

VRE に関しては、これまでの調査ではしばしばブラジル産鶏肉から頻度自体は低いものの、臨床で問題となる VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出されていたが、今年度の調査でも検出された。グリコペプチド系抗菌薬であるアボパルシンの家畜への投与は 2000 年頃に世界的に禁止されてから、すでに 10 年以上が経過し、VRE による家畜環境の汚染は軽減したものの、いまだに VRE が存在し続けていることが示唆された。また今回の調査においても国産鶏肉 1 検体から以前分離した VRE と同一の宿主遺伝子型を持つ VanN 型 VRE 株が分離された。これらの結果は、同一の起源を持つ VanN 型 VRE が低頻度ではあるものの既に国内の環境中に伝播、拡散していることを示唆している。今回国産鶏肉から分離された VRE 株はいずれも VCM の MIC 値 4 mg/L と臨床的に問題となる高度耐性株ではなかった（表15）。

#### E. 結論

国内産鶏肉及びの輸入鶏肉から ESBL 産生または AmpC 産生の多剤耐性腸内細菌科菌（主に大腸菌）が国内産から 60~80%、国外産から約 26%と比較的高頻度で検出された。コリスチン耐性大腸菌、高度耐性 VRE 株が少数ながら輸入食肉（ブラジル産）から分離された。VRE については環境の汚染状況が改善していることが推察されるが、多剤耐性腸内細菌科細菌の分離頻度は比較的高く、継続的な調査が必要である。また昨年を引き続き、多剤耐性サルモネラ属菌（ESBL 産生菌）が複数分離され、これらは伝達性 TEM 型耐性遺伝子を保持していたことから今後の動向に注意する必要がある。一方、国内産鶏肉検体から、以前の国内

分離株と同一起源である VanN 型 VRE 株が継続的に分離されていることから、VanN 型 VRE 株の国内の家畜環境中に拡散し定着していることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nomura T, Hashimoto Y, Kurushima J, Hirakawa H, Tanimoto K, Zheng B, Ruan G, Xue F, Liu J, Hisatsune J, Sugai M, Tomita H. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. J Microbiol Methods. 145:69-72 (2018).

##### 2. 学会発表

- 1) 大竹洋輔、千葉菜穂子、久留島潤、谷本弘一、

富田治芳. 鶏肉検体からの ESBL、AmpC 産生腸内細菌科細菌の分離と解析. 第 46 回薬剤耐性菌研究会. 2017 年 11 月 10 日. 水上(群馬).

- 2) 谷本弘一、野村隆浩、富田治芳. 輸入鶏肉由来大腸菌の持つプラスミド伝達性コリスチン耐性遺伝子. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月 27-28 日. 博多(予定).
- 3) 野村隆浩、谷本弘一、富田治芳. 2017 年に日本で分離された VanN 型 VRE の解析. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月 27-28 日. 博多(予定).
- 4) 大竹洋輔、千葉菜穂子、久留島潤、谷本弘一、富田治芳. 鶏肉検体からの ESBL、AmpC 産生腸内細菌科細菌の分離と解析. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月 27-28 日. 博多(予定).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録       なし
3. その他             なし

表1. 本年度の調査検体(2017年2~3月採取)

国内鶏肉(拭き取りスワブ)

	鹿児島県	宮崎県	群馬県	合計
検体数	30	40	40	110

輸入鶏肉(ミンチ肉)

	ブラジル	米国	タイ	フィリピン	合計
検体数	63	13	11	1	88



表2. 鶏肉検体からのESBLおよびAmpC産生菌の分離

生産地 (検体数)	国産			国内合計 (n=110)	国外産	国外合計 (n=88)
	鹿児島 (n=30)	宮崎 (n=40)	群馬 (n=40)		ブラジル (n=63)	
ESBL	29	6	18	53 (48.2%)	14	14 (15.9%)
AmpC	0	6	1	7 (6.4%)	10	10 (11.4%)
ESBL+AmpC	0	12	21	33 (30.0%)	0	0 (0%)
合計	29 (96.7%)	24 (60.0%)	40 (100.0%)	93 (84.5%)	24 (38.1%)	24 (27.3%)

表3. 国内産鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の耐性遺伝子型別

国内鶏肉		(株数)			
生産地	鹿児島	宮崎	群馬	合計	
ESBL	TEM	0	16	3	16
	SHV	0	0	0	0
	CTX-M	30	0	30	60
	TEM+CTX-M	0	0	31	31
AmpC	CIT	0	14	25	39
ESBL+AmpC	TEM+CIT	0	5	0	5
合計		30	35	86	151

\* 同一検体から2株検出され、それらのMIC結果が同じ場合は片方のみを解析対象とした

# 表4. 輸入鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の耐性遺伝子型別

輸入鶏肉		(株数)				
	輸出国	ブラジル	米国	タイ	フィリピン	合計
ESBL	TEM	0	0	0	0	0
	SHV	0	0	0	0	0
	CTX-M	11	0	0	0	11
	TEM+CTX-M	4	0	0	0	4
AmpC	CIT	9	0	0	0	9
ESBL+AmpC	TEM+CIT	0	0	0	0	0
	合計	24	0	0	0	24

\* 同一検体から検出されMIC結果が同じ場合は片方を解析対象とした

# 表5. 鶏肉由来ESBL産生菌のCTX-M遺伝子型別

(株数)

	国内産				輸入	
	鹿児島	宮崎	群馬	合計	ブラジル	合計
CTX-M1 group	0	0	28 (5)	28 (5)	4 (3)	4 (3)
CTX-M2 group	29	0	30 (25)	59 (25)	11 (1)	11 (1)
CTX-M9 group	0	0	2 (2)	2 (2)	0	0
CTX-M8/25 group	0	0	0	0	0	0
Non-typable	1	0	1	2	0	0
合計	30	0	61 (32)	91 (32)	15 (4)	15 (4)

\* ( )は同時にTEMを産生していた菌株数

# 表6. 鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の耐性伝達性

	遺伝子型	耐性伝達株数 (%)
国内鶏肉	ESBL (n = 105)	51 (48.5)
	AmpC (n = 39)	35 (89.7)
	ESBL+AmpC (n = 5)	5 (100)
	合計 (n = 149)	91 (61.1)
輸入鶏肉	ESBL (n = 15)	5 (33.3)
	AmpC (n = 9)	6 (66.7)
	合計 (n = 24)	11 (45.8)
合計 (n =173)		102 (59.0)

\* CTX耐性/CAZ耐性の伝達を指標として接合伝達能を調べた

# 表7. 薬剤耐性伝達性プラスミドのレプリコン型別

(株数)

Replicon type	国内鶏肉				輸入鶏肉		
	ESBL (n=51)	AmpC (n=35)	ESBL+AmpC (n=5)	合計 (n=91)	ESBL (n=5)	AmpC (n=6)	合計 (n=11)
K		1	1	2		3	3
I1	15			15	2	1	3
F	18			18	3		3
A/C		8	4	12			
B/O	1	5		6		1	1
I1, B/O		21		21			
I1, F	1			1			
I1, FIB, F	1			1			
Non-typable	15			15		1	1

表8. 食肉由来ESBL産生/AmpC産生  
腸内細菌科細菌の菌種同定

菌種*	国内	輸入	合計株数
<i>Escherichia coli</i>	131	24	155
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	0	5
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	13**	0	13
合計	149	24	173

\* 菌種同定はBD社 BBLCRYSTAL E/NF同定検査試薬を用いて行った

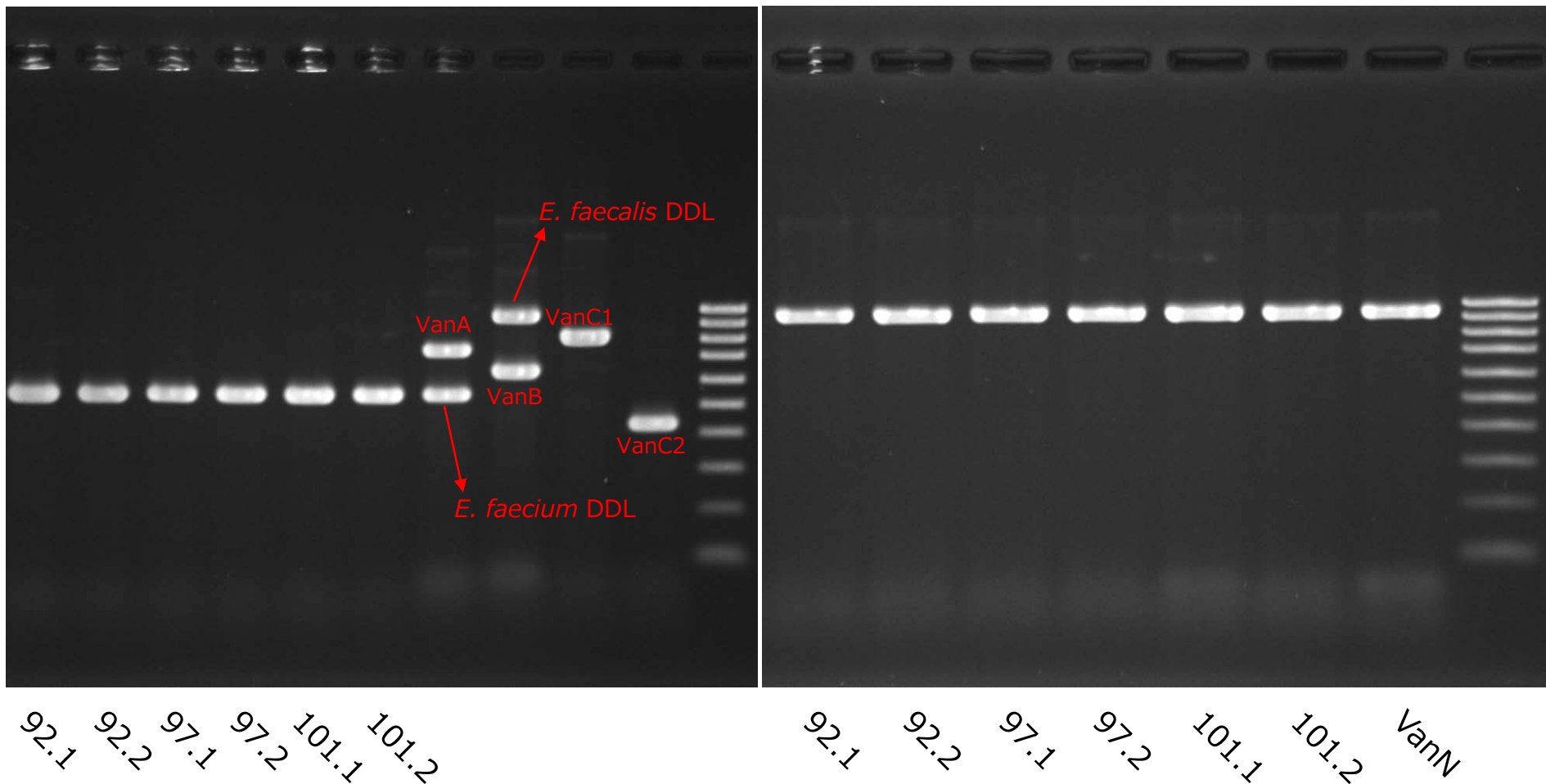
\*\* *Salmonella*属菌は全てESBL産生菌で、伝達性TEM型耐性遺伝子を保持していた  
(プラスミドのレプリコン型は不明)

表9. 食肉由来ESBL産生/AmpC産生株の薬剤耐性型

他の薬剤耐性	国内	輸入	合計株数
TC	72	1	73
CPFX	7	0	7
TC, GM	14	0	5
TC, CPFX	9	4	13
GM, CPFX	0	4	4
TC, GM, CPFX	2	6	8
None	45	3	48
合計	149	24	173



# 図1. 2017年収集食肉検体からのVREの検出



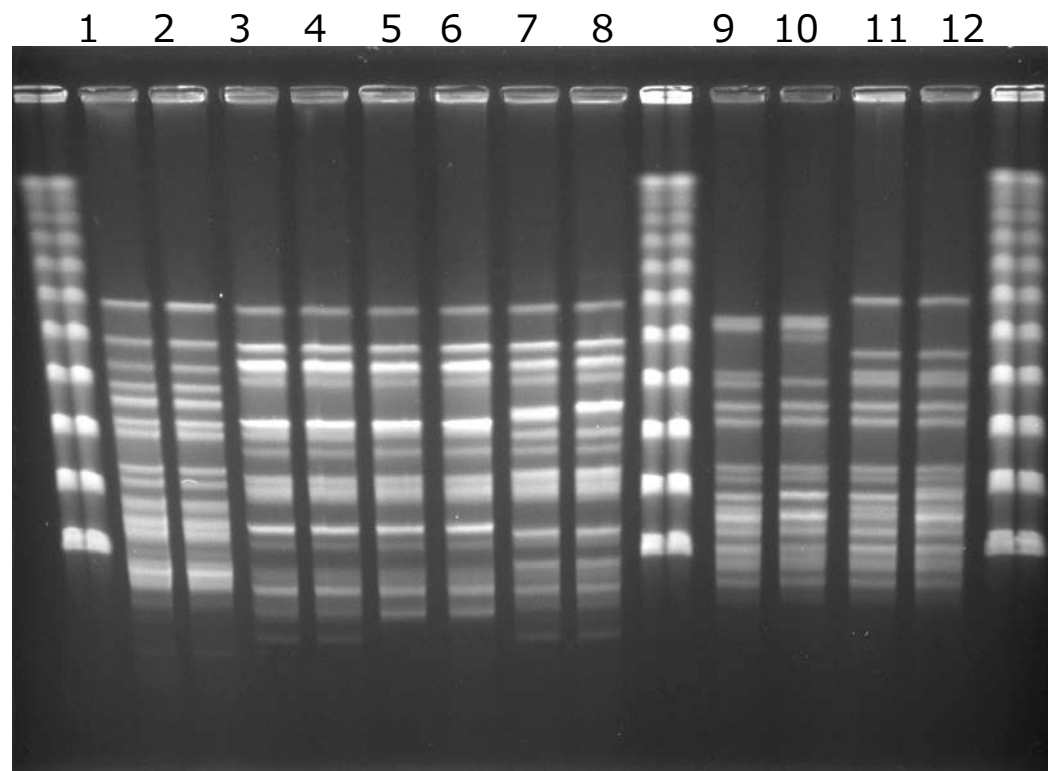
国産鶏肉ふき取りスワブ、からVanN型を分離した

宮崎県40検体(No.1~40)、鹿児島県30検体(No.41~70)、群馬40検体(No.71~110)  
計110検体のうち群馬県から3検体6株のVanN型を分離した

## 図2. 2017年収集食肉検体からのVREの検出

### PFGE解析(*Sma*I消化)

No.	菌株	菌腫	VRE型	地域
1	57.1	<i>E. faecium</i>	不明	鹿児島
2	57.2	<i>E. faecium</i>	不明	鹿児島
3	92.1	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	群馬
4	92.2	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	群馬
5	97.1	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	群馬
6	97.2	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	群馬
7	101.1	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	群馬
8	101.2	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	群馬
9	113.2	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	ブラジル
10	140.1	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	ブラジル
11	174.1	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	ブラジル
12	174.2	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	ブラジル



VanN type

VanA type

# 表10. 食肉検体由来VanN型、VanA型VRE株

## *E. faecium*株のMLST解析による比較

strain	Year	Van type	allelic profile							ST
			<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
UCN 71*	2008	VanN	25	13	9	33	10	19	6	240
AA-22	2009	VanN	72	13	9	33	10	19	6	862
GU121-1	2011	VanN	9	8	14	58	6	27	6	669
92.1	2017	VanN	9	8	14	58	6	27	6	669
97.1	2017	VanN	9	8	14	58	6	27	6	669
101.1	2017	VanN	9	8	14	58	6	27	6	669
113.2	2017	VanA	2	3	1	6	1	41**(new)	1	new
140.1	2017	VanA	2	3	1	6	1	41**(new)	1	new
174.1	2017	VanA	2	3	1	6	1	41**(new)	1	new

\*UCN71はVanN型VREとして世界で初めて報告された株でフランス国内の患者血液から分離された

\*\*1番近いallele

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M, Abo H, Kojima A, Koike R, Sufuzuki S, Asai T, Hamamoto S.	Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third-generation cephalosporins in <i>Escherichia coli</i> isolates from food-producing animals.	J Vet Diagn Invest.	29(5):	716-720	2017
川西路子	動物由来細菌薬剤感受性調査 (JVARM) の概要と薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランへの対応	日本獣医師会雑誌	70巻1号	14-17	2017年
Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M, Abo H, Kojima A, Koike R, Sufuzuki S, Asai T, Hamamoto S.	Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third generation cephalosporins in <i>Escherichia coli</i> isolates from food-producing animals.	Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	29(5)	716-720	2017
Yossapol M, Sugiyama M, Asai T.	The occurrence of CTX-M-25-producing <i>Enterobacteriaceae</i> in day-old broiler chicks in Japan	Journal of Veterinary Medical Science	79(10)	1644-1647	2017
浅井鉄夫	One Healthの視点から見た耐性菌の問題点	最新医学	72(4)	528-533	2017
浅井鉄夫	薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランで注目される耐性菌-動物	臨床と微生物	44(4)	303-308	2017
浅井鉄夫	輸入される畜産物を生産する国における家畜への抗菌薬の使用と耐性菌の現状	化学療法の領域	33(5)	1001-1009	2017
浅井鉄夫	獣医療分野における抗菌薬の慎重使用の推進	公衆衛生	81(10)	822-826	2017
浅井鉄夫	豚における薬剤耐性菌対策	ALL about SWINE	50	2-6	2017

浅井鉄夫	One Healthと薬剤耐性	ALL about S WINE50	51	24-26	2017
山本詩織、朝倉 宏、五十君静信	基質特異性拡張型βラク タマーゼ (ESBL) 産 生菌に関わる最近の動 向とその拡散に関する 考察 ～食品汚染実態 とその危害性について ～	食品衛生学会誌	58巻1号	P. 1-11	2017
柴山恵吾	厚生労働省院内感染対 策サーベイランス(JA NIS)からみたAMR対 策の課題と展望	公衆衛生	81(10)	798-803	2017