

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 27～29 年度 総合研究報告書

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 27～29 年度 総合研究報告書

目次

I. 平成 28 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 28 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 22

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 31

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 64

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 80

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 89

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 97

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 101

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 108

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 138

平成 27-29 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
総合研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生动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：

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—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。地方衛生研究所（地研）間ネットワークには、食品由来菌の耐性データ、ヒト便検体由来サルモネラ株の耐性データが集積されている。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。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きた。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。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人に最初に入り込んだのは、人以外のところ（おそらく食品等を通して）からであろうが、上記の現象からは、その後の人での耐性率の増加は家畜における汚染だけからでは説明できない。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) 耐性菌保菌者を介しての人—人伝播による拡散、3) ヒトへの抗菌薬の投与による耐性菌の選択、拡散、などが想定される。食鳥処理場での汚染状況は、処理場間で異なっており、その改善には食鳥処理過程での脱羽工程や使用水の衛生管理の強化や汚染リスクの高い部位における効果的な消毒薬の使用、そのための安全な消毒薬の開発や消毒方法の改良が必要であろう。今回の調査では、ESBL 耐性大腸菌汚染は輸入鶏肉で 42.5%、国産鶏肉で 14.9%との結果が得られているので、輸入鶏肉を介しての耐性菌の人への伝播の果たすリスクも考慮が必要である。ESBL 耐性大腸菌健康保菌者率は約 5%であり、これの人—人の間における耐性菌伝播に果たすリスクがどの程度であるのかは、今後評価をする必要がある。ヒトへの抗菌薬投与及びそれによる耐性菌の選択・拡散の果たす役割は、今後ヒトへの抗菌薬の使用量の削減を目指す施策が取られていくので、JANIS による動向調査の結果をもって判明するであろう。

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

A. 研究目的：

近年、薬剤耐性 (AMR) の問題が社会的および政治的な課題としても取り上げられてきている。耐性菌は、医療現場に限定されるものではなく、人、動物、食品、環境間を循環するとの考えに基づき、それらを包括する“ワンヘルス・アプローチ”による研究および対策が取られる必要性が強調されて

きている。WHO は 2015 年に「AMR に関するグローバルアクションプラン ; GAP」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 ; NAP」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。本研究においては JVARM と 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収集・解析できる体制の構築を目指すことを目的とした。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、我が国の耐性菌分離状況の WHO・GLASS への報告ができる体制も構築する。

B. 研究方法 :

H27-29 年の各総括研究報告書に記載されている通りである。概略は、

- 1) 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った。JVARM, JANIS の情報の一元的解析手法の検討を行う (川西、柴山)。WHO・GLASS への報告を担当した (柴山)。

- 2) JVARM のアンチバイオグラムを JANIS 集計用プログラム上に入力・加工できるように改変させた。JANIS の調査薬剤 (LVFX、CTX、MINO、PIPC、AMK、コリスチン) と、同系統の JVARM の調査薬剤 (ERFX、CTF、OTC、ABPC、KM、コリスチン) による薬剤耐性の相関係数等による判定を行い、相互比較可能性の検討を行った。
- 3) 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ため、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析を行った。
- 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・解析した。
- 5) 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。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果 :

1) JANIS、JVARM の統合的データの解析 :

- (1) WHO の GLASS への報告 : JANIS 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、GLASS の集計プログラムに合うように修正・解析し、それを GLASS に提出した。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、耐性率が高い傾向であった。血液由

来サルモネラ耐性率は、CTX 耐性、LVFX 耐性は概ね 1 %程度であった。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。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。

- (2) 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。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。

2) 地方衛生研究所ネットワークを利用した報告：

- (1) 全国の地研を対象に、食中毒・感染性胃腸炎原因菌（ヒト、食品、動物、環境由来菌を含む）に関して、薬剤耐性菌検査実施の有無、検査件数、検査の実施方法（感受性試験、耐性遺伝子の解析等）、実施形態等について調査した。食中毒・感染性胃腸炎原因菌のヒト由来株については約 10,000 件、食品由来株については約 3,000 件の耐性検査が最近 3 年間で実施されていることが明らかにされた。また、全国の地研で保有・保管されている食品由来耐性菌株は 3,500 株以上であると推定された
- (2) サルモネラ：ヒト由来株 973 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 351 株で、耐性率は 40.4%であった。食品由来株 351 株のうち、315 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 89.7%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 16 株、食品由来株中に 23 株見いだされた。

- (3) 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。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。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。
- (4) 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。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。
- (5) コリスチン耐性：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。
- (6) 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）
2011 年～2016 年に分離された散発患者由来の *C. jejuni* フルオロキノロン耐性率は毎年 50%程度でほぼ一定であった。一方 *C. coli* では 2011 年が 87.5%、2012 年 66.7%、2013 年 75%、2014 年

57.1%, 2015年50%, 2016年35.7%と耐性率は低下していた。治療の第一選択薬であるエリスロマイシン耐性株の出現率は *C. jejuni* で 0.8%~3.7%, *C. coli* では 0%~28.6%と *C. coli* の方が高い傾向であった。しかし、いずれの菌種でも増加傾向は認められなかった。

- (7) 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況（東京都）：2015年~2017年に健康者糞便から分離された大腸菌 1,169株を対象に 17 薬剤を用いた薬剤感受性試験を実施した。薬剤別耐性率をみると最も高かったのは ABPC で 25.6%, 次いで NA 22.6%, Su 19.8%, TC 14.6%, SM 14.5%の順であった。フルオロキノロン耐性は 9.4%, CTX 耐性は 6.0%であった。AMK, IMP, MEPM 耐性株は認められなかった。CTX 耐性株のうち 63 株について ESBL あるいは AmpC 産生の確認を行った結果、55 株が ESBL 産生株、8 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-9 group が最も多く 29 株、CTX-M-1group が 21 株、CTX-M-8group が 3 株、CTX-M-2 group および TEM 型がそれぞれ 1 株であった。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は 2015 年から 2017 年に分離された大腸菌 695 株中 2 株で陽性となった。
- (8) 鶏肉由来大腸菌の耐性（東京都）：鶏肉 1 検体から 1-3 株の大腸菌を分離し、それについて耐性検査を行い、全調査大腸菌株数に対する耐性率を求めた結果である。国産鶏肉の CPFX 耐性率は 16.6% (2012年) → 6.5% (2015年) に減少していた。CTX に耐性 (R) を示した株は輸入鶏肉で 97 株 (42.5%), 国産鶏肉で 45 株 (14.9%) あり、このうち ESBL 産生菌であったのは輸入鶏肉 47 株、国産鶏肉 15 株であった。遺伝子型をみると、輸入鶏肉では CTX-M-2 group が 23 株 (48.9%), CTX-M-9 group が 16 株 (30.4%), CTX-M-8 group 3 株 (6.4%), TEM 型 4 株 (8.5%), SHV 型 1 株 (2.1%) であった。国産鶏肉では CTX-M-1group が 6 株 (40%), CTX-M-2group が 4 株 (26.7%), CTX-M-9group が 3 株 (20%), SHV および TEM が各 1 株であった。

- (9) 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）：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。2015 年から 2016 年分離株で 4 μ 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

3) 国内食肉衛生検査所・検疫所由来検体調査：3 年間で合計 575 の鶏肉検体（国産 350、輸入 225）を調査した。一定量の鶏肉を ABPC 添加培地で液体培養後、CAZ, あるいは CTX 含有寒天培地に塗布する、薬剤選択法。調査鶏肉検体数に対する陽性検体数で表している。

- (1) 鶏肉検体からの ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の分離頻度は、年度や生産地によって異なるものの、耐性菌が検出される頻度は 25%から 98%と高頻度であった。特に国産鶏肉からの分離頻度が輸入鶏肉からの分離頻度と比較し、高い傾向にあった。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入共に CTX-M2 が最も多く、次いで国内産では CTX-M1 が多いのに対し、輸入肉では CTX-M8/25 が多く分離された。
- (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）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。

(3) VRE の検出：

バンコマイシン含有培地で選択後、生育してきた株について調査。高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が 2015 年のブラジル産鶏肉 1 検体、および 2017 年のブラジル産鶏肉 3 検体から検出された。

4) JVRAM からの報告：

- (1) 平成 26~27 年度農場由来大腸菌及び平成 24~27 年度と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及び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/yakuza>
[i/yakuzai_p3-1.html](http://www.maff.go.jp/nval/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； 検体から分離された大腸菌についてコリスチンの耐性を調べ、耐性のものについて遺伝子をPCR法で検査：*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%)。

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：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で汚染されていたが、導入ヒナ汚染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。

C. 考察

- 1) 統合的耐性菌サーベイランス {JANIS-JVARM-食品(地研)}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-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。地方衛生研究所(地研)ネットワークには、食品由来菌の耐性データ、ヒト便検体由来サルモネラ株の耐性データが集積されている。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JANIS-JVARMに一元化することが可能となった。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。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責任部署として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収集を行い、継続的に対応することが可能であろう。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 のように責任部署としての対応による事業化が望ましい。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ティオール投与の中止）。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一人伝播による拡散、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—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選択培地に直接塗布後、1-3 株/検体の大腸菌を釣菌し、耐性菌かどうかを調べ、全調査菌株中の耐性陽性菌株数として耐性率を計算している。また、食品から特定の抗菌薬含有培地で耐性菌を選択し、その菌株について耐性遺伝子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精度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、一概に相互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解析が重要である。

D. 結論

家畜(JVRAN)-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い。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やヒトへの抗菌薬使用量との関連性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伝播様式解明の解析が必要である。

平成27－29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：小池 良治（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）

研究協力者：比企 基高（農林水産省消費・安全局）

研究協力者：鈴木 里和（国立感染症研究所）

研究協力者：柴山 恵吾（国立感染症研究所）

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。本研究では当該データの連携を実施するため、①動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) の農場由来（平成 26 年～27 年）、と畜場及び食鳥処理場由来（平成 24～27 年度）大腸菌及びサルモネラの MIC データを国立感染症研究所で作成されたアンチバイオグラム作成ソフトに入力し、アンチバイオグラムを作成した。また、②JANIS で測定されるヒト用の薬剤と JVARM で測定される動物用の薬剤の薬剤耐性の相関を確認するため、JANIS の調査薬剤（セフトキシム；CTX、レボフロキサシン；LVFX 及びシプロフロキサシン；CPFX、ミノサイクリン；MINO、ピペラシリン；PIPC、アミカシン；AMK）の微量液体希釈法による最小発育阻止濃度（MIC）と、それぞれと同系統の JVARM の調査薬剤（セフトフル；CTF、エンロフロキサシン；ERFX、オキシテトラサイクリン；OTC、アンピシリン；ABPC、カナマイシン；KM）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、関係について検討した。CTF と CTX、ERFX と LVFX と CPFX、ABPC と PIPC については、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、MIC の比較に用いられると考えられた。OTC については特異度が低く、MINO 耐性の検出には有効であるが、比較の際は注意が必要と考えられた。KM については相関係数が低く、AMK との比較に用いるには検討が必要であることが確認された。

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、薬剤感受性試験法である E-test、微量液体希釈法、寒天平板希釈法の 3 法による MIC の相関を検討した。E-test における MIC は寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MIC がやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。さらに、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平成 24～27 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。その結果 *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、動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) のデータを、国立感染症研究所で作成されたソフトに入力し、アンチバイオグラムを作成した。

さらに、JVARM と JANIS では測定薬剤が一部異なるため、JVARM と JANIS のデータを比較可能か検討するため、セファロスポリン系、フルオロキノロン系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、アミノグリコシド系各薬剤間の薬剤感受性の相関を確認することとした。

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 (CL) について、JANIS では微量液体希釈法により感受性が確認されているが、JVARM では平成 21 年まで薬剤感受性試験を寒天平板希釈法で実施していた。薬剤感受性の推移を JVARM 内及び JANIS と比較可能か検討するため、E-test、微量液体希釈法、寒天平板希釈法での最小発育阻止濃度 (MIC) の相関を確認した。

さらに伝達性耐性遺伝子 *mcr-1* が国産の鶏肉から

も検出されおり、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した。

B. 研究方法

(1) JVARM のアンチバイオグラムの作成

平成 26～27 年度農場由来大腸菌及び平成 24 年～27 年度と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラの MIC データを、国立感染症研究所で作成されたアンチバイオグラム作成ソフトに入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認

平成 21 年に JVARM において健康家畜から分離された大腸菌について、JVARM の調査薬剤 (セフトオフル CTF、エンロフロキサシン; ERFX、オキシテトラサイクリン; OTC、アンピシリン; ABPC、カナマイシン; KM) の寒天平板希釈法による MIC と、それぞれと同系統の JANIS の調査薬剤 (セフトオタキシム; CTX、レボフロキサシン; LVFX 及びシプロフロキサシン; CPFX、ミノサイクリン; MINO、ピペラシリン; PIPC、アミカシン; AMK) の微量液体希釈法による MIC を、相関係数 (スピアマン)、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。さらに、相関性が低かった成分について、その原因を検討するため耐性遺伝子の検出を行った。

(3) 健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較

平成 22～26 年度に JVARM において健康家畜から分離された大腸菌 126 株 (牛由来: 34 株、豚由来: 37 株、肉用鶏由来: 32 株、採卵鶏由来: 23 株) を供試株とし、寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test を用いて CL の MIC を測定した。EUCAST

での CL のカットオフ値 4 μ g/mL を用い、各方法での MIC を相関係数等によって比較し、関係について検討した。

(4) 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 24～27 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) 家畜由来大腸菌のアンチバイオグラムを

CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成

平成 26～27 年度農場由来大腸菌及び平成 24～27 年度と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラのアンチバイオグラムを CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成する (例: 図 1) とともに、動物医薬品検査所 HP

(http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.htm 1) に掲載した。

(2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認

相関係数、感度及び特異度はそれぞれ以下のとおりであった。CTX に対する CTF : 0.764、0.98、1.00。LVFX に対する ERFX 及び CPFX : 0.763、1、0.899 及び 0.929、1、0.980。MINO に対する OTC : 0.739、1、0.64。PIPC に対する ABPC : 0.709、1、0.899。

AMK に対する KM : 0.241、1、0.873 (図 2～7)。

AMK と KM の相関係数が低かったが、特に KM の MIC が 128 μ g/mL 以上の株において、AMK の MIC との差が大きくなっていた。特異度が低かった OTC と MINO、相関係数が低かった AMK と KM について、それぞれに耐性を示した株で耐性遺伝子の検出を行ったところ、OTC のみ耐性の株は 31 株中 24 株 (77.4%) が *tet(A)* を、OTC と MINO 耐性の株は 18 株中 16 株 (88.9%) が *tet(B)* を保有していた。また、KM のみ耐性の株は調査した耐性遺伝子 6 種類のうち 0～3 種類を保有していたが、AMK 耐性の 1 株 (MIC 64 μ g/mL) は 4 種類を保有していた (図 8)。

(3) 健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較

E-test における MIC は寒天平板希釈法及び微量液体希釈法と比較し低い傾向が認められた。相関係数 (スピアマン)、感度および特異度は、微量液体希釈法に対する E-test : 0.684、0.806、0.958。寒天平板希釈法に対する E-test : 0.819、0.674、1.000。寒天平板希釈法に対する微量液体希釈法 : 0.801、0.721、1.000 (図 9～11) であった。

(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 12)。

D. 考察

JVARM の家畜由来細菌におけ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。JVARM では平成 24 年度から、健康家畜由来のモニタリングについては農場由来株だけでなくと畜場及び食鳥処理場由来株について実施しており、平成 28 年度については農場由来株の調査を中止し、と畜場由来株のみとする。そのため、28 年度からは JVARM のと畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成した。また、本事業において全国の地方衛生研究所において収集された食品由来のサルモネラのモニタリングが開始されたことから、平成 29 年度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。以上のように

JVRAM と JANIS の比較可能なデータを公表し、両者の連携を継続的に実施した。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。

JANIS と JVARM での測定薬剤の薬剤感受性の相関を確認した結果、CTX に対する CTF、LVFX 及び CPFX に対する ERFX、PIPC に対する ABPC について相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、耐性性の検出及び比較に有効であると考えられた。

MINO に対する OTC について、相関係数及び感度は良好な値を示したが、特異度が若干低く、耐性の検出には有効であるが、比較の際には注意が必要と考えられた。AMK に対する KM について相関係数が低く、比較に用いるには検討が必要と考えられた。耐性遺伝子検出の結果から、保有する耐性遺伝子により、KM 耐性であっても AMK の MIC が上昇せず感受性になる可能性が考えられた。

健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度を比較した結果、E-test による MIC は寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MIC がやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。

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

農場由来大腸菌、と畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及び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。セファロスポリン系、フルオロキノロン系及びペニシリン系について、JANIS と JVARM 間での測定薬剤の薬剤感受性に高い相関があることを確認し、両モニタリングで実施された薬剤の耐性率の比較が可能であることを示した。テトラサイクリン系について OTC は MINO 耐性の検出には有効であるが比較の際には注意が必要、アミノグリコシド系の両薬剤については比較に用いるには検討が必要であることが確認された。コリスチン最小発育阻止濃度を寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test で比較し、E-test は MIC 値が低いものの、寒天平板希釈法、微量液体希釈法は相関係数、感度および特異度について良好な値を示し、CL 耐性率のモニタリングに有用であることが確認された。

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（各年、動物種毎に 5% 以下）であった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli*

from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. Foodborne Pathog Dis. 2015;12:639-43.

- 2) Kawanishi, M., H. Abo, M. Ozawa, M. Uchiyama, T. Shirakawa, S. Suzuki, A. Shima, A. Yamashita, T. Sekizuka, K. Kato, M. Kuroda, R. Koike, and M. Kijima. Prevalence of colistin-resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food producing animals in Japan. Antimicrob Agents Chemother
- 3) 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. J Vet Diagn Invest. 29(5):716-720 (2017).
- 4) 川西路子 JVARM(動物由来薬剤耐性菌モニタリング)の取り組み (2016) 日本豚病研究会会報 第 68 号
- 5) 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.学会発表

- 1) 川西路子、比企 基高、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一、柴山恵吾、鈴木里和。院内感染対策サーベイランス (JANIS) と家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング (JVARM) の連携について第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 青森
- 2) 比企 基高、清水裕仁、川西路子、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一。家畜由来大腸菌におけるセフトロフルと人用の各種第 3 世代セファロスポリンとの最小発育阻止濃度 (MIC) の関係 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 青森
- 3) 小澤真名緒、川西路子、内山万利子、阿保均、小池良治、木島まゆみ。家畜由来大腸菌におけ

る人用抗菌剤と動物用抗菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の関係 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 神奈川

- 4) 内山万利子、小澤真名緒、川西路子、阿保均、小池良治、木島まゆみ。健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 神奈川
- 5) 川西路子、阿保均、内山万利子、小澤真名緒、小池良治、木島まゆみ。健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性について第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 神奈川
- 6) 川西路子。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 2017 年 4 月 東京
- 7) 川西路子。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 2017 年 5 月 感染研)
- 8) 川西路子。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-2017 年 10 月 鹿児島
- 9) 川西路子 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 2017 年 11 月 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

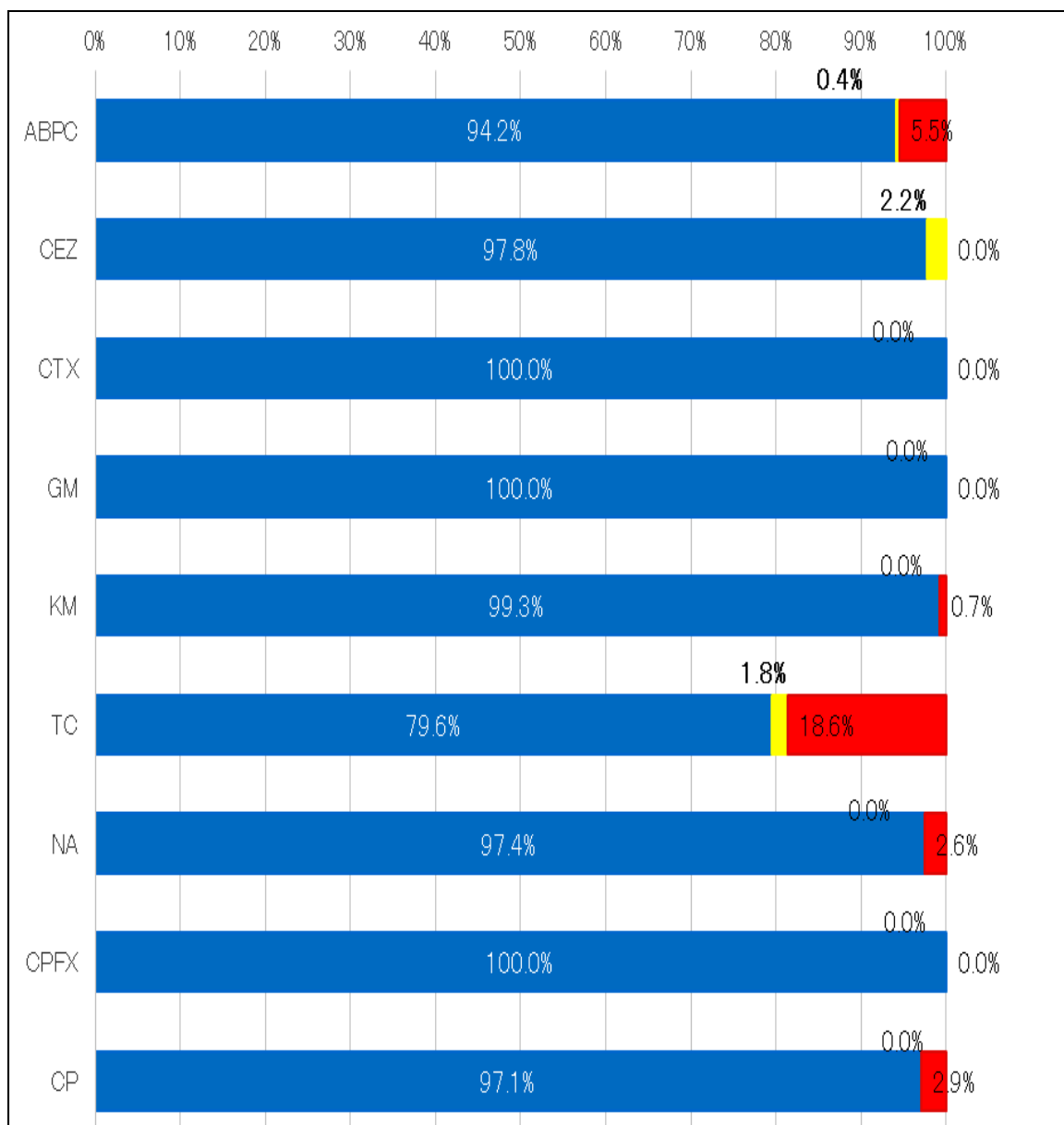
※ JVARM事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に深謝いたします。

図1 アンチバイオグラムの例（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）

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)



寒天平板希釈法で測定したCTFのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したCTXのMIC (mg/L)									Total
	≤0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
0.5	4		1							5
1	4									4
2	1	3	4							8
4		1	1	2						4
8				6	7					13
12				8	12	6	1			27
>12				5	13	13	6	12	8	57
Total	9	4	6	21	32	19	7	12	8	118

	CTX感受性	CTX耐性
CTF感受性	19	2
CTF耐性	0	97
Total	19	99

相関係数(スピアマン): 0.764
 感度: 0.980(97/99)
 特異度: 1.00(19/19)

図2. CTF と CTX の MIC の相関

寒天平板希釈法で測定したERFXのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したLVFXのMIC (mg/L)										Total
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
0.125	20	5									25
0.25	11	13	5	5	9						43
0.5	3			2	8	1					14
1					4	2					6
2		1		1	2		1				5
4					1		2				3
8											
16								2	1		3
32										1	1
64									1	2	3
Total	34	19	5	8	24	3	3	2	2	3	103

	LVFX感受性	LVFX耐性
ERFX感受性	88	0
ERFX耐性	10	5
Total	98	5

相関係数(スピアマン): 0.763
 感度: 1(5/5)
 特異度: 0.899(88/98)

図3. ERFX と LVFX の MIC の相関

微量液体希釈法で 測定したCPFVの MIC(mg/L)	微量液体希釈法で測定したLVFXのMIC(mg/L)										Total
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
0.03	34	18	2								54
0.06		1	3								4
0.125				5	1						6
0.25				3	18	1					22
0.5					5						5
1						2	1				3
2							2				2
4											
8								2	1	1	4
16									1		1
32										2	2
Total	34	19	5	8	24	3	3	2	2	3	103

	LVFX感受性	LVFX耐性
CPFV感受性	96	0
CPFV耐性	2	5
Total	98	5

相関係数(スピアマン):0.929
 感度:1(5/5)
 特異度:0.980(96/98)

図4. CPFV と LVFX の MIC の相関

結果:MINOとOTCの関係

寒天平板希釈法で測定したOTCのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したMINOのMIC (mg/L)								
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	総計
0.25	1								1
0.5		2	1		1				3
1			3	9	1				13
2				9	3	1			22
4				8	7				15
8				1		1			1
16		1					1		1
32								1	1
64				1					1
128					3	1	1		5
256				2	8	2	5	2	19
512				1	2	6	5	3	17
>512					2	1	1	1	5
総計		1	15	31	27	12	12	6	104

	MINO感受性	MINO耐性
OTC感受性	55	0
OTC耐性	31	18
総計	86	18

相関係数:0.739
 感度:1(18/18)
 特異度:0.64(55/86)

図5. MINOとOTCのMICの相関

寒天平板希釈法で測定したABPCのMIC(mg/L)	微量液体希釈法で測定したPIPCのMIC (mg/L)												
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512	総計
0.5	1												1
1		4	4	1									9
2			5	11	1								17
4			4	21	1								26
8		1	2	7	6								16
16				2	1								3
32													
64		1				1							2
128						1							1
256			1	2									3
512										1	1	1	4
>512									1	4	2	6	7
総計	1	17	47	10		2	2	4	4	3	10	8	104

	PIPC感受性	PIPC耐性
ABPC感受性	71	0
ABPC耐性	8	25
計	79	25

相関係数:0.709
 感度:1(25/25)
 特異度:0.899(71/79)

図6. PIPCとABPCのMICの相関

結果:AMKとKMの関係

寒天平板希釈法で 測定したKMの MIC(mg/L)	微量液体希釈法で測定したAMKのMIC (mg/L)						総計
	1	2	4	8	16	32	
1	1						1
2	2	11	7				20
4	6	22	14	2	1		45
8	1	7	8		2		18
16		2	1		1		4
32			1				1
64							
128		2		1			3
256							
512							
>512	1	3	5		1		11
総計	11	47	36	3	5		103

	AMK感受性	AMK耐性
KM感受性	89	0
KM耐性	13	1
計	102	1

相関係数:0.241
 感度:1(1/1)
 特異度:0.873(89/102)

図7. AMK と KM の MIC の相関

株	MIC (μg/mL)		アミノグリコシド耐性遺伝子					
	AMK	KM	strA	strB	aph(3')-Iia	aac(3)-Iia	aac(6)-Ib	ant(3)-Ia
21-Ec-C-67	1	>512	-	+	+	-	-	+
21-Ec-C-54	2	128	-	-	-	-	-	+
21-Ec-C-66	2	128	-	+	-	+	-	+
21-Ec-L-99	2	>512	-	+	+	-	+	-
21-Ec-P-43	2	>512	-	-	+	-	-	+
21-Ec-P-95	2	>512	-	-	+	-	-	-
21-Ec-C-28	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-C-70	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-C-89	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-L-44	4	>512	-	-	-	-	-	-
21-Ec-L-98	4	>512	-	+	+	-	+	-
21-Ec-C-53	8	128	-	-	-	-	-	-
21-Ec-P-91	16	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-P-110	64	>512	-	+	+	-	+	+

図8. KM 耐性株におけるアミノグリコシド耐性遺伝子

結果:微量液体希釈法とE-testの関係性

E-testによる MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)	微量液体希釈法によるMIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
	≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	total
0.047	1	1	1					3
0.064		1	2	1				4
0.094	11	9	6	10	1	1		38
0.125	3	10	7		10			30
0.19	3	3	3	1				10
0.25								0
0.5								0
1								0
2					2	2		4
3					5	3		8
4					3	14		17
6					1	8		9
8						1	1	2
12						1		1
total	18	24	19	12	22	30	1	126

	微量液体希釈法 感受性	微量液体希釈法 耐性	
E-test感受性	91	6	感度 : 0.806 (25/31)
E-test耐性	4	25	特異度 : 0.958 (91/95)
total	95	31	相関係数(Pearson): 0.824 相関係数(Spearman): 0.684

図 9. コリスチンの微量液体希釈法と E-test の MIC の相関

結果:寒天平板希釈法とE-testの関係性

E-testによる MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)	寒天平板希釈法によるMIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	total
0.047		3						3
0.064		4						4
0.094	1	36			1			38
0.125		26	3		1			30
0.19		10						10
0.25								0
0.5								0
1								0
2					3	1		4
3					6	2		8
4					5	12		17
6						9		9
8							2	2
12							1	1
total	1	79	3	0	16	24	3	126

	寒天平板希釈法 感受性	寒天平板希釈法 耐性	
E-test感受性	83	14	感度 : 0.674 (29/43)
E-test耐性	0	29	特異度 : 1.000 (83/83)
total	83	43	相関係数(Pearson): 0.942 相関係数(Spearman): 0.819

図 10. コリスチンの寒天平板希釈法と E-test の MIC の相関

結果: 寒天平板希釈法と微量液体希釈法の関係性

微量液体希釈法による MIC($\mu\text{g/mL}$)	寒天平板希釈法によるMIC($\mu\text{g/mL}$)							
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	total
≤ 0.125	1	17						18
0.25		24						24
0.5		16	2		1			19
1		12						12
2		10	1		7	4		22
4					8	20	2	30
8							1	1
total	1	79	3	0	16	24	3	126

	寒天平板希釈法 感受性	寒天平板希釈法 耐性	
微量液体希釈法 感受性	83	12	感度 : 0.721 (31/43)
微量液体希釈法 耐性	0	31	特異度 : 1.000 (83/83)
total	83	43	相関係数(Pearson): 0.843 相関係数(Spearman): 0.801

図 11. コリスチンの寒天平板希釈法と微量液体希釈法の MIC の相関

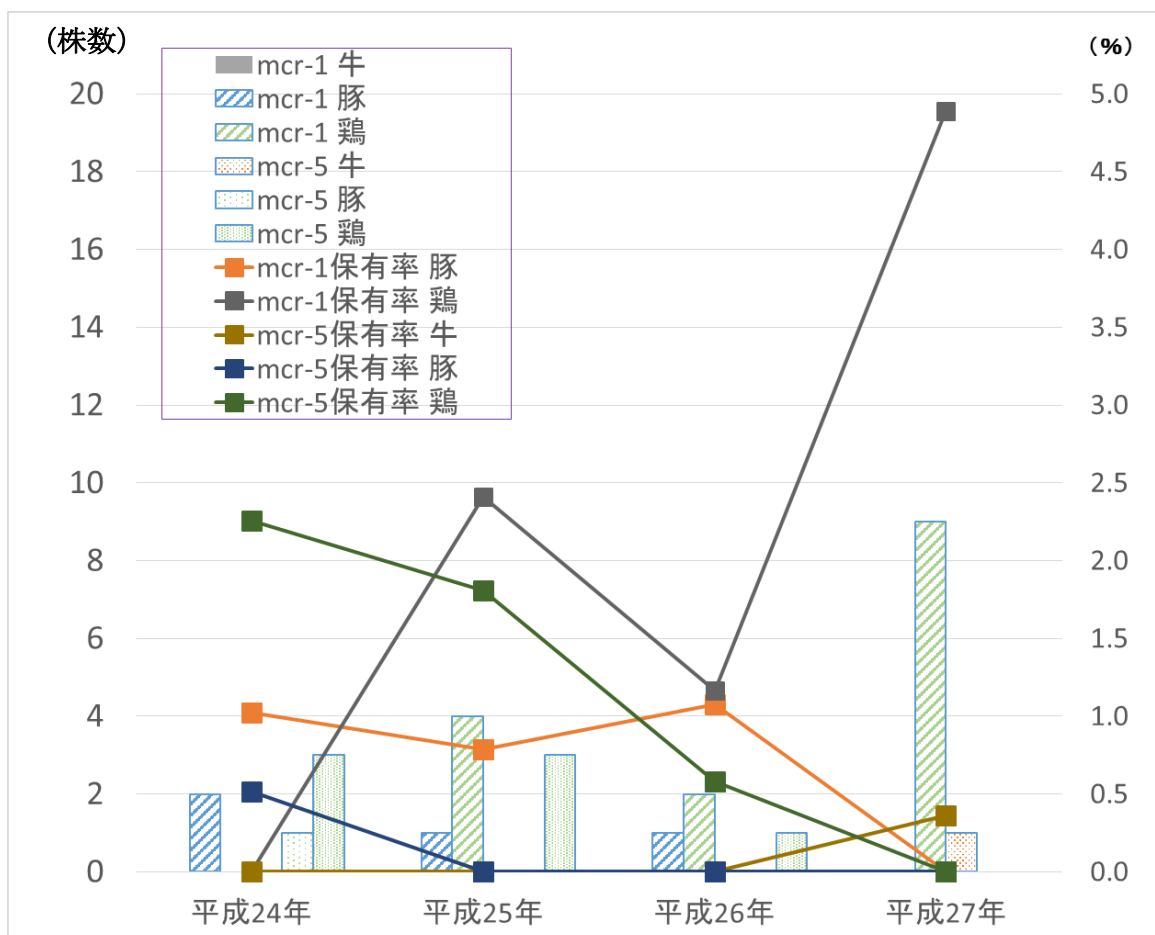
表1 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌の菌株数及びMIC2 mg/L以上の菌株数

		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'-CTTGGTCGGTCTGTA 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'TTGGCACTGTATTTTGCATTT-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, Magistrati 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 12 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 27～29 年度 分担（総合）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 鈴木 香澄（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、農場と食肉処理場の両面で衛生管理対策を構築する必要がある。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での定着という 2 つのステップが関与する。無薬鶏群と有薬鶏群におけるセファロスポリン耐性菌の分布状況を調べたところ、飼育鶏の糞便中でセファロスポリン耐性大腸菌は飼料添加物や抗菌剤といった抗菌性物質の使用と関係が認められなかった。しかし、抗菌剤の使用は、交差耐性や共耐性により薬剤耐性菌の分布に大きな影響を与えるため、抗菌剤の慎重使用は重要である。一方、導入ヒナが ESBL 産生菌を保有する場合があります、サルモネラの場合、導入ヒナの汚染や導入する飼育施設の汚染が農場内の持続汚染に影響することが明らかとなった。これらから、孵化場から出荷されるヒナの衛生対策や飼育施設の衛生管理を徹底する必要がある。一方、食肉処理場では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。食鳥処理過程の汚水調査で、ほとんどの工程で汚水の細菌汚染は制御されており、使用される洗浄水における消毒薬（塩素）の管理は適正に行われていると考えられた。しかし、そのような施設で加工された鶏製品における耐性菌を含む細菌汚染を制御することは困難で、特にレバーのように型崩れや変色による製品価値の下がる部位での細菌汚染が課題と考えられた。

A. 研究目的

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収集が重要な課題である。国内のブロイラーから分離される大腸菌やサルモネラにおいて、第 3 世代セファロスポリン耐性が 2004 年ごろから増加した (Hiki et al, 2013)。カナダで実施した研究から、ワクチンを卵内接種する時にセフチオフル（動物用第 3 世代セファロスポリン製剤）を混合することが要因として指摘された。わが国においても、2012 年にセフチオフル（動物専用、第 3 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て以降、農場の鶏糞から ESBL/AmpC 産生大腸菌の出現率が減少した。

一方、市販鶏肉から第 3 世代セファロスポリン耐性菌は依然として分離されるため、カンピロバクターやサルモネラのように食鳥処理の工程で、と殺される鶏の腸内容物がと体、器具や洗浄水を汚染し、他のと体を交差汚染する可能性が考えら

れる。しかし、食鳥処理過程での薬剤耐性菌の汚染状況や伝播状況については不明な点が多い。

このように、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）の両面に対策を実施する必要がある。そこで、生産から食鳥処理過程での問題を科学的データに基づき提案することを目的とする。

本研究は、肉養鶏生産農場における対策を構築するため、①セファロスポリン耐性菌の浸潤状況、②抗菌薬投与が薬剤耐性菌の変動に与える影響、③導入鶏における第 3 世代セファロスポリン耐性菌の分布及び拡散状況、さらに④外部から浸潤した細菌が農場に定着する要因を解析した。また、食肉処理過程での耐性菌の交差汚染の状況を明らかにするため、①処理過程で利用された排水の汚染状況、②鶏製品の部位別汚染状況及び程度を調査した。

B. 研究方法

(1) 肉養鶏生産農場における薬剤耐性菌の出現と分布に関する研究

①無薬飼育と有薬飼育鶏群におけるセファロスポリン耐性大腸菌の分布状況

岐阜県内のブロイラー生産農場で無薬飼育された異なる孵化場から導入した3群ブロイラー鶏及び別の農場で抗菌性飼料添加物含有飼料により飼育（有薬飼育）された1群を対象にした。飼料添加物の他、5～7日齢にアモキシシリン（20mg/L）と25～27日齢にST合剤（sulfamonomethoxine 75mg/L + ormetoprim 25mg/L）を投薬された。導入から出荷までの期間に、2週間隔で3～5羽の糞便を採取した。

②抗菌薬投与が薬剤耐性菌の変動に与える影響

上述の有薬飼育された肉用鶏を対象に、薬剤投与後のアンピシリン（AMP）耐性とセファロスポリン耐性菌の動向について2鶏群を対象に調べた。導入から出荷までの期間に、5、12、19、26、33及び40日齢に3～5羽の糞便を採取した。

③導入鶏における第3世代セファロスポリン耐性菌の分布状況及び拡散

2016年の1月～7月に異なる3箇所の孵化場から初生ヒナを導入する農場で、輸送箱の敷紙66サンプル（A孵化場38サンプル、B孵化場7サンプル、C孵化場21サンプル）を採取し、検査材料とした。薬剤耐性菌の農場内定着を調べるため、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。また、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リン（CEX）50mg/L添加ミューラーヒントン培地でスクリーニング検査した。

④外部から浸潤した細菌が農場に定着する要因解析

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。

(2) 食肉処理過程での耐性菌の交差汚染

①処理過程で利用された排水の汚染状況

2016年度の調査で、AmpC/CTX-M β-ラクタマ

ーゼ産生大腸菌が確認された無薬鶏飼育農場の食鳥処理場で、食鳥処理工程の排水（脱羽排水、内臓検査排水①及び②、内外洗浄水、予備チラー水、本チラー水）における薬剤耐性菌の汚染状況を調査した。

②鶏製品の部位別汚染状況及び程度

2017年11月～12月の異なる日（5回）に食肉処理場で鶏肉等（肝臓、手羽先、手羽元、砂肝、ムネ肉、モモ肉、ササミ）における薬剤耐性菌の汚染状況を調査した。

(3)細菌検査

滅菌生理食塩水を用いて、検体を10倍段階希釈し、AMP及びセファレキシリン（CEX）を50mg/L添加したDHL寒天培地（栄研化学、栃木）及び薬剤非添加のDHL寒天培地に希釈液50µLを接種し、37℃で一晩培養した。薬剤添加及び非添加のDHL寒天培地に認められた赤色コロニー数を測定し、糞便1g中の大腸菌数及びAMPまたは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、API20E（シスメックス・ビオメリュー、東京）もしくはバイテック2コンパクトを用いて同定した。

(4) 薬剤感受性試験

薬剤の最小発育阻止濃度（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により決定した。供試薬剤は、AMP、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（CPFEX）、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ラクタマーゼ型別

CTX耐性株（MIC ≥4mg/L）は、PCase試験とDDST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ラクタマーゼ産生遺伝子型を決定した。

(6) パルスフィールドゲル電気泳動（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）

サルモネラの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 VNTR 領域を増幅した後、シーケンスにより VNTR 領域の塩基配列を決定し、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無い。

C. 研究結果

(1) 肉養鶏生産農場における薬剤耐性菌の出現と分布に関する研究

①無薬飼育と有薬飼育鶏群におけるセファロスポリン耐性大腸菌の分布状況

大腸菌数は導入 2 週目以降には約 10^6 CFU/g で安定して推移した。入雛直後 (3~15 日齢) には 4 群全て CEX 添加 DHL 寒天培地上に 10^4 ~ 10^6 CFU/g のコロニーが検出された。その後の発育段階では 4 群中 2 鶏群で CEX 耐性菌は検出されなかったが、無薬飼育と有薬飼育の各 1 鶏群の計 2 鶏群で 10^3 ~ 10^5 CFU/g の CEX 耐性菌が継続的に検出された。4 鶏群中セファレキシン耐性菌のうち、セフォタキシム (CTX) 耐性大腸菌は、CMY-2 型と CTX-M 型であった。

②抗菌薬投与が薬剤耐性菌の変動に与える影響

大腸菌数は 10^6 ~ 10^8 CFU/g で推移した。糞便中の大腸菌に対するアンピシリン耐性大腸菌の割合は、アモキシシリン投薬後と ST 合剤投薬後に増加した (図 2)。一方、セファロスポリン耐性菌は 1 鶏群のみで認められ、薬剤投与の影響は認められなかった。CTX 耐性大腸菌は、CMY-2 または CTX-M-3 産生株で、CTX-M-3 型 ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* と *Enterobacter cloacae* も分離された。

③導入鶏における第三世代セファロスポリン耐性菌の分布状況及び拡散

2016 年の 1 月~7 月に A 孵化場由来敷紙 38 検体中、1 検体 (2.6%) から CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae*、もう 1 検体 (2.6%) から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が分離された。B 孵化場由来敷紙 7 検体中 2 検体 (28.6%) から、また、C 孵化場由来 21 検体中 1 検体 (4.8%) から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が分離された。分離した CTX-M-25 産生 *E. cloacae* 4 株は、農場ごとに異なる PFGE 型を示した。接合伝達試験により得られた接合伝達株は、 β -ラクタム耐性の他、カナマイシン耐性を示した (図 3)。

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*_{CTX-M-25} 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*_{CTX-M-25} 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。

④外部から浸潤した細菌が農場に定着する要因解析

同一タイプのサルモネラが 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 (図 4)。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なかった。

(2) 食肉処理過程での耐性菌の交差汚染

①処理過程で利用された排水の汚染状況

昨年度の調査で、無薬鶏群と有薬鶏群の両郡でセファロスポリン耐性大腸菌が継続的に分離されたことから、食鳥処理場における交差汚染が懸念された。そこで、食鳥処理の各工程で使用された汚水の細菌検査を実施した。大腸菌は、内臓処理工程の汚水 2 検体のみで検出され、1 検体でセファロスポリン耐性大腸菌 (CMY-2) が分離された。汚水中の大腸菌に対するセファロスポリン耐性大腸菌の割合は、約 100 分の 1 であった。同日に処理された 2 個体からは、CMY-2 及び CTX-M-2 産生大腸菌が分離された (図 5)。

②鶏製品の部位別汚染状況及び程度

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: 5.6×10^4 CFU/g)、ササミ (6×10 CFU/g)・砂肝 (4×10 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 6)。

D. 考察

わが国では、2000年ごろから ESBL/AmpC β -ラクタマーゼ産生菌が家畜から報告されるようになり、多様な ESBL 産生菌が分離されている。特に、肉用鶏では、セフトオフル（動物用第3世代セファロスポリン）をワクチンと混合して卵内接種したことによって急激な CTX 耐性菌が増加し、その時期に ESBL 型の多様化が促進した（原田と浅井, 2015）。一般に、家畜衛生分野では病原体は人を含む動物、飼料及び車両を介して生産現場へ侵入することが知られている。

2015～2016年に実施した無薬鶏群と有薬鶏群における CTX 耐性菌の分布状況を調べたところ、飼育鶏の糞便中の大腸菌（約 10^6 CFU/g）中でセファロスポリン耐性大腸菌は、検出できないものから多いものでも 10^5 CFU/g であった。また、ペニシリン系抗生物質（アモキシシリン）が投薬されることによって、AMP 耐性大腸菌は増加するが、セファロスポリン耐性菌は選択されず、アンピシリン耐性菌に対して選択圧がかかる期間は2週間程度であった。セファロスポリン投与された実習犬を用いた研究では、投薬3～10日後にはセファロスポリン耐性大腸菌が選択されていることが示されている（Kimura et al., 2017）。一方、以前国内で実施された研究では、無薬鶏と有薬鶏の糞便中に 10^6 CFU/g 程度の ESBL 産生大腸菌が1週齢～出荷時期まで継続的に腸管内に分布すると報告されている（Hiroi et al., 2012）。発育鶏卵や初生ヒナで使用されたセフトオフルによる選択圧は肉用鶏の腸管内でのセファロスポリン耐性菌の分布に関与することが示唆される。しかし、長期間（約50日間）持続している点から、セフトオフルの選択圧以外の投与時期の要因も考える必要がある。

次に、導入鶏の汚染状況とサルモネラを指標に鶏群汚染の要因を検討した。導入ヒナが ESBL 産生菌を保有する場合は、農場への侵入ルートとして導入ヒナは重要な役割を果たしていることが示唆された（Montira et al., 2017）。我々が検出した ESBL 遺伝子（*bla*_{CTX-M-25}）は調査農場にとって新たなタイプの ESBL 遺伝子型で、その後の *bla*_{CTX-M-25} の他菌種への伝播や鶏群への定着は明らかにできなかったが、新たな耐性遺伝子の侵入も含めて継続的な調査が必要である。しかし、サルモネラの場合、導入ヒナの汚染や導入する飼育施設の汚染が農場内の持続汚染に影響することを本研究で明らかにした。これらから、孵化場から出荷されるヒナの衛生対策や飼育施設の衛生管理は飼育施設での細菌汚染を制御するために適切に実施することが重要である。

食鳥処理過程でと体の交差汚染は、脱羽工程で発生することが知られている。2017年に実施した

各工程の汚水の調査で、ほとんどの工程で汚水の細菌汚染は制御されていたことから、使用される洗浄水における消毒薬（塩素）の管理は適正に行われていると考えられた。しかし、そのような施設で加工された鶏製品における耐性菌を含む細菌汚染を制御することは困難で、特にレバーのように型崩れや変色による製品価値の下がる部位での細菌汚染が課題と考えられた。

調査日によって異なる食鳥処理施設における汚染は、菌数を安定的に減少させることができる可能性を示唆している。特に、汚染程度の低い砂肝は洗浄頻度の高い部位である。このように、洗浄による物理的除去は有効な方法であるが、レバーのような困難な部位も食用として流通することから、洗浄水の衛生管理を適正に行うことに加えて即効性の高い安全な消毒薬や洗浄方法の開発が必要と考えられる。畜産物の交差汚染の状況を継続的の把握するとともに、あわせて洗浄水の定期的な検査を実施する必要がある。

E. 結論

抗菌剤の使用は耐性菌の出現や分布に大きな影響を与えるため、抗菌剤の慎重使用は重要である。一方、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、鶏製品に対して、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) 浅井鉄夫：耐性菌とは？養豚の課題は何？
Pig Journal 19(12):15-17, 2016. 平成28年12月15日 アニマルメディア社
- 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 ceftiofur and third generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. Journal of Veterinary Diagnostic

- Investigation 29(5):716-720, 2017.
- 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 浅井鉄夫 豚における薬剤耐性菌対策 *ALL about SWINE* 50:2-6, 2017.
 - 9) 浅井鉄夫 *One Health* と薬剤耐性 *ALL*

about SWINE 51:24-26, 2017.

2. 学会発表
 - 1) 浅井鉄夫 野生動物および家畜環境中の耐性菌 第30回日本微生物生態学会 (土浦、2015)
 - 2) 鈴木香澄、浅井鉄夫 肉養鶏の発育段階における第3世代セファロスポリン耐性菌の推移 第89回日本細菌学会総会 (大阪、2016)
 - 3) 浅井鉄夫 動物由来ESBL産生菌の現状と人へのリスク 動物用抗菌剤研究会・四学会合同事業セミナー「One Healthから見た耐性菌の現状と課題」 (東京、平成28年8月28日)
- 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

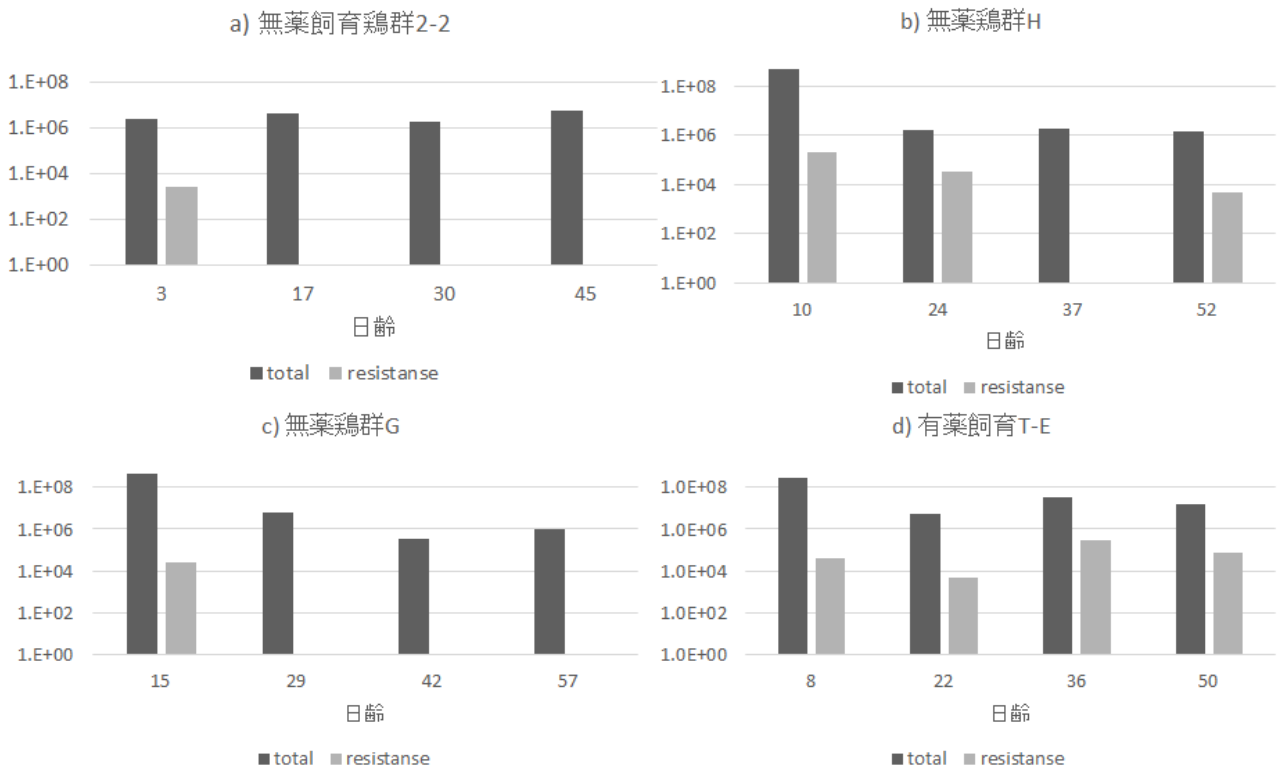
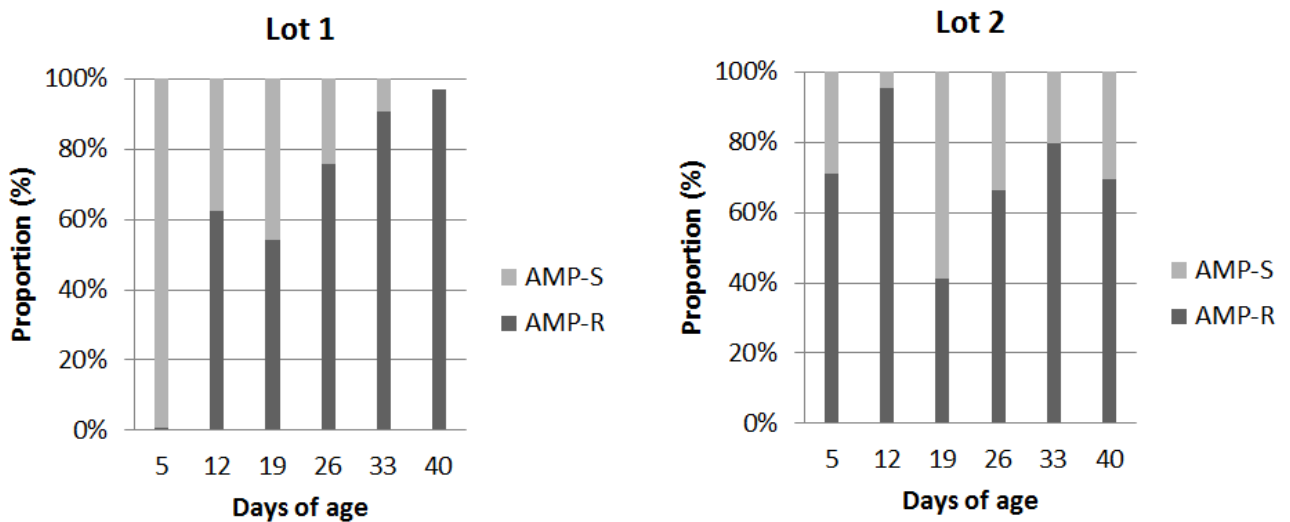


図1 無薬飼育と有薬飼育鶏群におけるセファロスポリン耐性大腸菌の推移



• 投薬

- 5～7日アモキシシリン (20mg/L)
- 24～26日 ST合剤 (sulfamonomethoxine 75mg/L and ormetoprim 25mg/L)

図2 糞便中のアンピシリン耐性大腸菌の割合(推移)

Hatcheries	検査数	K. pneumoniae	E. cloacae
A	38	1 (2.63%)	1 (2.63%)
B	7	0	2 (28.57%)
C	21	0	1 (28.57%)

Organisms	Strains	Hatcheries	β-lactamase types	MIC (μg/L) of antimicrobials									
				CTX ^a	MEPM	GM	KM	TC	NA ^d	CPFX	CL	CP	ST
				≥4 ^b	≥4 ^b	≥16 ^b	≥64 ^b	≥16 ^b	≥32 ^b	≥4 ^b	>2 ^c	≥32 ^b	≥76/4 ^b
K. pneumoniae	CC37	A	CTX-M 25, SHV-11	64	≤0.25	2	≥128	≥64	4	≤0.03	1	2	19/1
E. cloacae	CC23	A	CTX-M 25, TEM-1	≥64	≤0.25	4	≥128	4	16	≤0.03	1	8	19/1
	CC5	B	CTX-M 25	≥64	≤0.25	32	64	4	2	≤0.03	2	8	38/2
	CC6	B	CTX-M-25	≥64	≤0.25	32	64	4	2	≤0.03	1	8	38/2
	CC32	C	CTX-M 25	≥64	≤0.25	≤0.5	≥128	2	4	≤0.03	≥16	8	9.5/0.5

^a CTX: cefotaxime, MEPM: meropenem, GM: gentamicin, KM: kanamycin, TC: tetracycline, NA: nalixidic acid, CPFX: ciprofloxacin, CL: colistin, CP: chloramphenicol and ST: sulfamethoxazole and trimethoprim; ^b CLSI Resistance breakpoint (μg/mL); ^c EUCAST Resistance breakpoint (μg/mL)

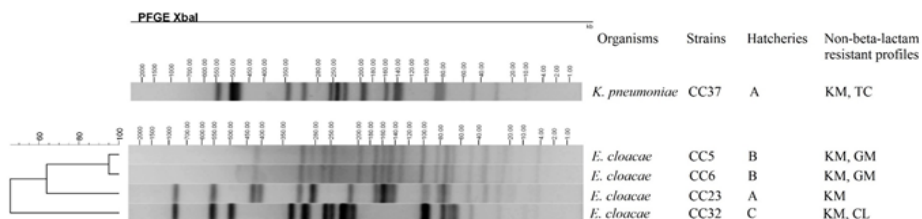


図3 初生雛敷紙由来第三世代セファロスポリン耐性菌

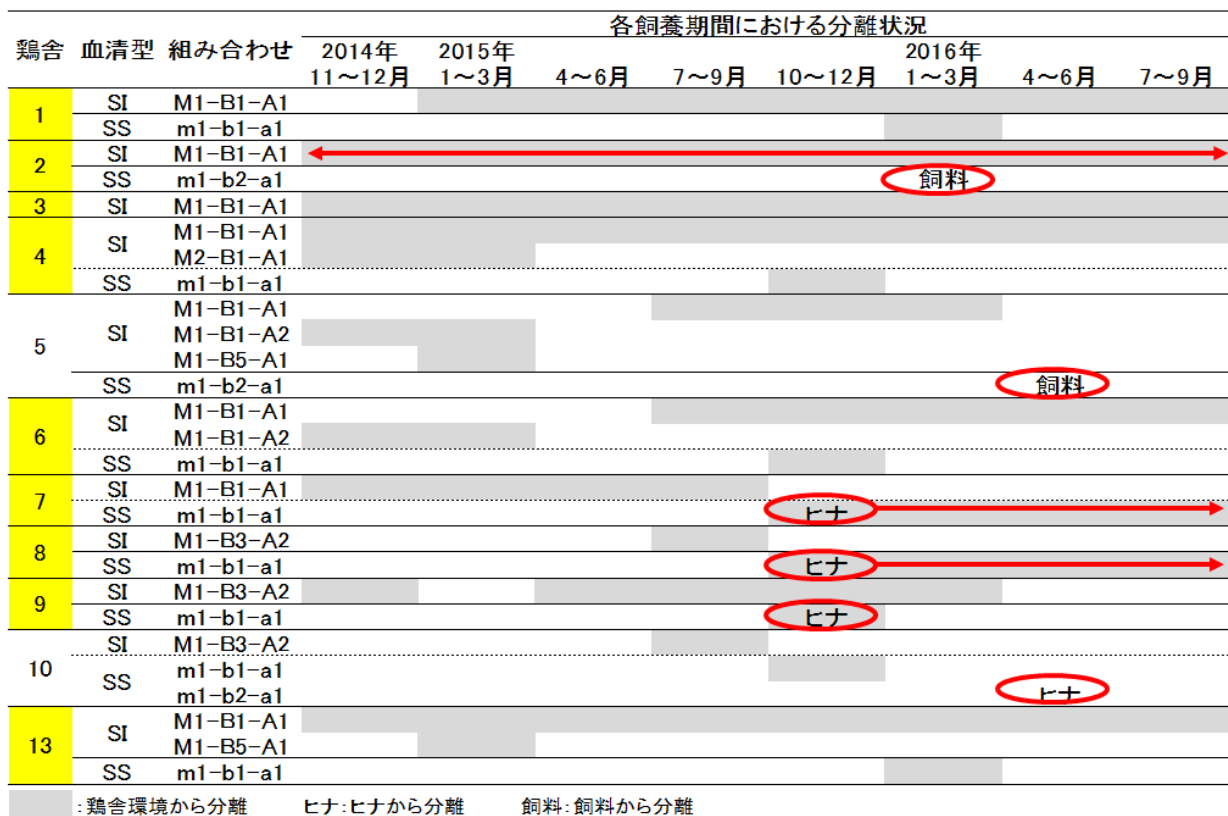
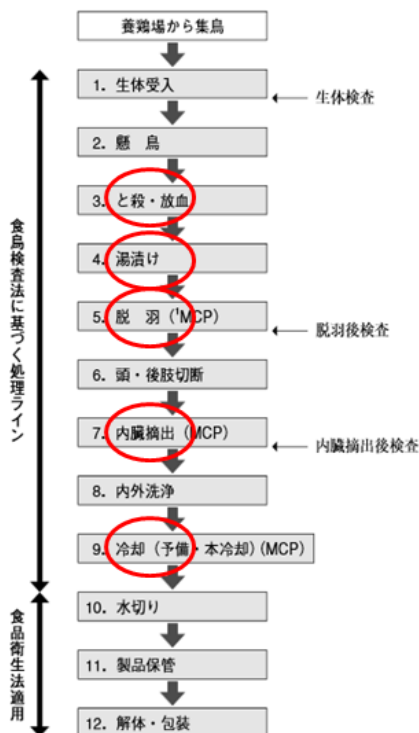


図4 MLVA、PFGE及び耐性型の組合せを利用した分離状況



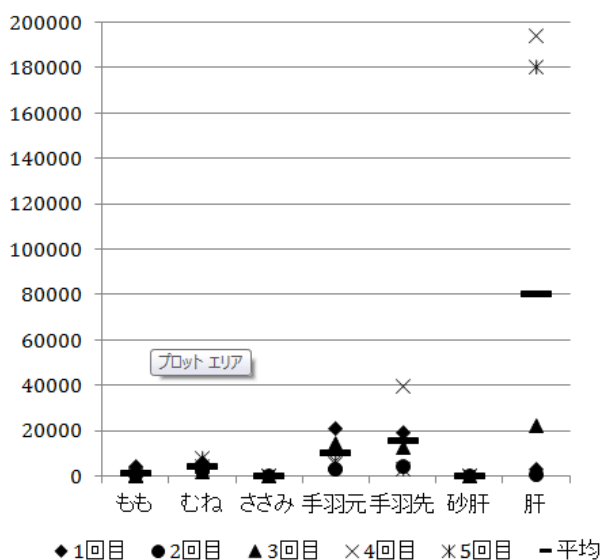
採材工程	大腸菌数	CEX耐性菌数	B-ラクタマーゼ型	耐性型 (βラクタム系以外)
5. 脱羽排水	$<2 \times 10^2$	$<2 \times 10$		
7. 内臓検査排水①	6.16×10^3	$<2 \times 10$		
7. 内臓検査排水②	2.38×10^4	1.4×10^2	CMY-2	KM-NA-CP-ST
8. 内外洗浄水	$<2 \times 10^2$	$<2 \times 10$		
9. 予備チラー水	$<2 \times 10^2$	$<2 \times 10$		
9. 本チラー水	$<2 \times 10^2$	$<2 \times 10$		
腸管内容物1			CTX-M-2G	-
腸管内容物2			CMY-2	KM-NA-CP-ST

1MCP: 微生物汚染管理ポイント
 図1 食鳥処理工程 (中抜き処理法)

図5 食鳥処理過程の汚染水での薬剤耐性大腸菌の汚染状況の調査

昨年度の調査で、AmpC/CTX-M β-ラクタマーゼ産生大腸菌が確認された無薬鶏飼育農場の食鳥処理場

総菌数 (CFU/ml)



赤色コロニー数 (CFU/ml)

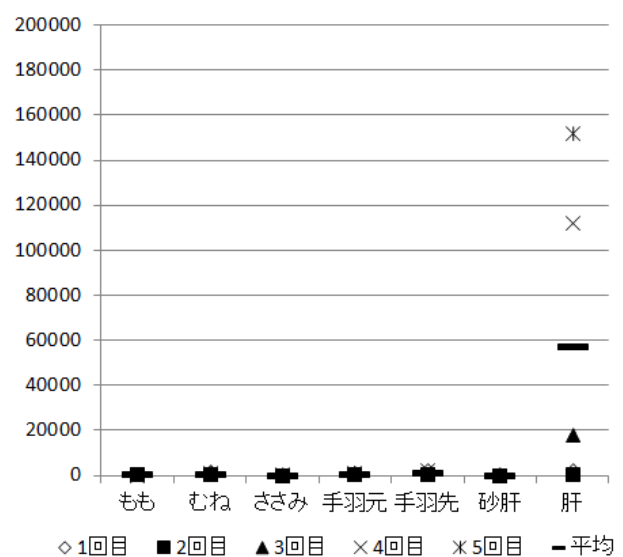


図6 食鳥処理場における部位別細菌汚染状況

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			
	菌種	β -lactamase type	耐性型	β -lactamase type	Plasmid replicon type	耐性型	Estimated plasmid size (Kb)
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

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、武沼浩子、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)
南 真紀、青木佳代、河野智美、石川和彦 (滋賀県衛生科学センター)
一瀬佳美
若林友騎、原田哲也 (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)
橋田みさを、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)
清水裕美子、千神彩香 (広島市衛生研究所)
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、有川衣美 (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)
木村俊也、青野 学、仙波敬子、園部祥代、(愛媛県立衛生環境研究所)
阿部裕樹、菅 美樹

研究要旨

薬剤耐性菌を制御するためには、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチが重要である。当分担班の調査で、相当数の地方衛生研究所（以下、地研）が、食品由来菌（サルモネラ、大腸菌など）の薬剤耐性菌検査を実施していることが明らかにされた。これに基づき、全国の地研と協力してヒト及び食品由来サルモネラ株及び大腸菌株（下痢原性大腸菌を含む）について薬剤耐性状況を調査した。サルモネラに関しては、2015～2017年に分離されたヒト由来973株中の393株(40.4%)、及び食品由来351株中の315株(89.7%)株が、18剤中の1剤以上に耐性を示した。年次毎の耐性率はほぼ同様であり、現在の日本の状況を反映していると考えられる。多剤耐性状況については、ヒト及び食品由来株ともに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11株、食品由来株中に

30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あり、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。食品由来菌の薬剤耐性調査に関して、統一された方法による組織だった全国規模の調査は、本邦では初めてと思われる。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、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。

地方衛生研究所(以下、地研)は、従来から食中毒原因菌等の食品由来細菌の検査を実施してきたが、それらの薬剤耐性検査をどの程度行っているかについてはこれまで不明であった。本研究班において当分担任は、全国の地研において収集されているヒト及び食品由来細菌(大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター等)の薬剤耐性に関する情報収集体制の構築を担当している。そのためには、全国の地研で実施されている薬剤耐性菌検査の実態を知ることが必要である。また、各地研における検査方法

は必ずしも同一ではないため、全国的調査のためには、プロトコル、薬剤、器材等を統一する必要がある。さらに、ワンヘルス・アプローチのためには、地研での食品由来耐性菌のデータをJANISやJVARMの耐性菌データと統合し一元化する方法論の開発も必要である。

当分担任は以上のような課題に取り組み、全国の地研と協力し、ヒト及び食品から分離されたサルモネラ属菌や大腸菌等の薬剤耐性状況を調査するとともに、耐性菌に関する情報収集体制を構築することを目的としている。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」に提供され、延いては、ワンヘルス・アプローチに基づく薬剤耐性制御に資することが期待される。

B. 研究方法

1. 地研における食品由来細菌薬剤耐性検査の実態調査

全国の地研を対象に、食中毒・感染性胃腸炎原因菌(ヒト、食品、動物、環境由来菌を含む)に関して、薬剤耐性菌検査実施の有無、検査件数、検査の実施方法(感受性試験、耐性遺伝子の解析等)、実施形態等について調査した。また、薬剤耐性検査を実施している地研を対象に、

食中毒・感染性胃腸炎原因菌株（薬剤耐性菌株を含む）の保有・保管数について調査した。

2. 薬剤耐性調査対象菌株

2015～2017年にヒト（患者）及び食品から分離され、サルモネラ属菌及び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。

3. 薬剤感受性検査

協力 21 地研においてサルモネラ属菌及び大腸菌と判定された菌株を用い、末尾に添付した「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、サルモネラ株及び大腸菌株の結果の判定は、感受性判定表（別表）にしたがって行った。

4. 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。

5. 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。

6. 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. 食中毒・感染性胃腸炎原因菌（サルモネラ毒菌、腸管出血性大腸菌 EHEC、EHEC 以外の病原大腸菌、非病原大腸菌、カンピロバクター、コレラ菌、赤痢菌、チフス菌、パラチフス菌）を対象に薬剤耐性検査を実施している地研数を図 1 に示す。何らかの薬剤耐性検査を実施していると回答した 59 地研の中で、サルモネラでは 31 地研と 22 地研がそれぞれヒト由来株、食品由来株の耐性検査を実施していた。同様に、EHEC 等の病原大腸菌やカンピロバクターにおいて、相当数の地研が薬剤耐性菌検査を実施していることが判明した。検査件数においても、食中毒・感染性胃腸炎原因菌のヒト由来株については約 10,000 件、食品由来株については約 3,000 件の耐性検査が最近 3 年間で実施されていることが明らかにされた（図 2）。また、全国の地研で保有・保管されている食品由来耐性菌株は 3,500 株以上であると推定された（表 1）。

2. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の血清型

2015～2017年に収集されたサルモネラ株は、ヒト由来 973 株及び食品由来株 351 株で、総計 1324 株であった。これらの O 血清群の内訳を図 3 に示す。ヒト由来では、O4 が最も多く、次いで、O7、O8、O9 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 2015～2017 年のいずれの年でも同様の傾向であった。H 抗原を含めた血清型別の内訳では、ヒト由来株は非常に多様で 60 種以上の血清型を含んでいたが、食品由来株では 20 種類以下であった。これら

のうち、ヒト由来株の上位 10 血清型及び食品由来株の上位 5 血清型を図 4 に示す。図中の「その他」についても大部分は型別されている。

3. 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 973 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 351 株で、耐性率は 40.4%であった(表 2)。一方、食品由来株 351 株のうち、315 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 89.7%であった。これらの耐性率は 2015～2017 年のいずれの年も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 78.1%(760/973)を占めた。その耐性率は 39.5%で、ヒト由来株全体の耐性率とほぼ同じであった(表 3)。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(15/18, 83.3%)。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 4)。一方、食品由来株の食品別内訳は、89.7%(315/351)が国産鶏肉であった(表 5)。

4. 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 5)、ヒト由来株では 1 剤と 3 剤耐性株が同程度認められたのに対し、食品由来株では 1 剤耐性株は比較的少なく、2～3 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 11 株、食品由来株中に 30 株認められた。ヒト由来の 11 株について詳細を表 6 に示す。

5. 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 6 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 ラクターマーゼ(ESBL)産生菌及び AmpC 型 β ラクターマーゼ(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 CPF, 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、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 16 株、食品由来株中に 23 株見いだされた。表 7 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。

6. 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、2017 年は外国産食品(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 7 上)、また、ABPC, CTX, CAZ, CFX, NA 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 7 下)。

7. 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について血清型別の詳細な解析を行った。食品由来株(266 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 8)。一方、ヒト由来株(651 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 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 9)。

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 10 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 11)。

8. 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。

9. 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 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 8)。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。

10. 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かった (図 12 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 CFX, 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 12 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 9 に示す。

CTX, CAZ, CFX に耐性の株が、ヒト由来株中に 36 株が見いだされた。表 10 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 13)、GM, AMK, CTX, キノロン系薬 CFX, 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

今回の実態調査で、地研において食品由来菌の薬剤耐性検査が相当な規模で実施されていることが明らかにされた。これを基に、全国 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、2015~2017 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 (973 株) は 40.4%、食品由来株 (351 株) は 89.7%が、1 剤以上の抗菌剤に耐性を示した。2015~2017 年の年次毎の耐性率はほぼ同様で、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 85%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認められなかった。血液由来株は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 91.1%であった。

多剤耐性状況については、ヒト由来株では 1 剤と 3 剤耐性、食品由来株では 2, 3 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 11 株、食品由来株中 30 株認められた。ヒト由来株中に 10 剤以上に耐性を示す株が 3 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、2017年に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が認められた。

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を期待される。

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

地方衛生研究所におけるヒト及び食品由来菌の薬剤耐性検査の実態調査を行い、地研において食品由来菌の薬剤耐性検査が相当な規模で実施されていることが判明した。全国21地研の協力を得て、2015～2017年に分離されたヒト及び食品由来サルモネラ株及び大腸菌株について薬剤耐性状況を調査し、集計された耐性データを解析した。統一された方法を用いて全国規模で実施された本邦初の調査と思われる。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を期待される。

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

- 1) 四宮博人, 勢戸和子, 川瀬 遵, 有川健太郎, 船渡川圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛顕, 調 恒明: 地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情. 日本細菌学雑誌 70(2):309-318, 2015.
- 2) 菅 美樹, 四宮博人, 北尾孝司: 市販鶏レバーおよび臨床材料から分離した基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* が保有する *bla_{CTX-M}* 型別に関する検討. 感染症学雑誌 90(3):305-9, 2016

2. 学会発表

- 1) 仙波敬子、園部祥代、木村俊哉、大倉敏裕、
鳥谷竜哉、四宮博人：地研における薬剤耐性
菌解析の取り組み、衛生微生物技術協議会
第 36 回研究会、2015. 7. 23-24、仙台
 - 2) 木村千鶴子、仙波敬子、園部祥代、木村俊
也、四宮博人：小児感染性胃腸炎患者から
分離された腸管凝集付着性大腸菌の性状に
ついて、第 68 回日本細菌学会中国・四国支
部総会、2105.10.3-4、岡山
 - 3) Keiko Semba, Mayumi Yamashita,
Sachiko Sonobe, Eiji Yokoyama, Tsuyoshi
Sekizuka, Komei Shirabe, Makoto
Kuroda, and Hiroto Shinomiya: Whole
genome analysis of *Salmonella* isolates
from foods and patients reveals their
detailed relationships. シンポジウム 7
「ゲノム解析手法の最前線」、第 89 回日本
細菌学会総会、2016.3.23-25、大阪
 - 4) 園部祥代、仙波敬子、木村俊也、井上 智、
四宮博人：愛媛県の患者から分離されたペ
ニシリン耐性肺炎球菌の血清型及び薬剤耐
性遺伝子について。第 69 回日本細菌学会中
国・四国支部総会、2016.10.15-16、香川
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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

渡邊班地研グループ薬剤感受性菌検査プロトコル（サルモネラ属菌及び大腸菌）

1 検査の項目

薬剤感受性試験

2 検体の種類・適用範囲

ヒト（有症者）及び食品由来サルモネラ属菌及び大腸菌（下痢原性大腸菌を含む）と判定された菌株

3 検査法

CLSI ディスク拡散法

4 実施場所・作業環境

BSL2かつ管理区域内

5 検査に使用する試薬及び器具・器材等

1) 試薬・培地等

- ① 増殖用培地：トリプチケースソイブロス（TSB と略）
- ② 直接法用平板培地：ミューラーヒントンⅡ寒天培地（MH 寒天培地と略）
- ③ 感受性試験用培地：ミューラーヒントンⅡ寒天培地（市販の生培地）
- ④ 菌液調整用：滅菌生理食塩水
- ⑤ 感受性ディスク：BD センシ・ディスク
アンピシリン（ABPC）、セフトキサシム（CTX）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、イミペネム（IPM）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸（NA）、ST合剤（SXT）、メロペネム（MEPM）、セフトジジム（CAZ）、ホスホマイシン（FOM）、クロラムフェニコール（CP）、セフォキシチン（CFX）、アミカシン（AMK）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、コリスチン（CL）
- ⑥ 薬剤感受性試験用標準菌株
Escherichia coli ATCC 25922（関東化学から購入可能）

2) 器具・器材等

- ① 白金耳、白金線
- ② センシ・ディスク・ディスペンサー
- ③ ノギス
- ④ 滅菌綿棒
- ⑤ 滅菌ピンセット
- ⑥ ふ卵器
- ⑦ マックファーランド No.0.5 標準比濁計（remel）

6 操作上の注意

1) 菌株について

前日に供試菌株を MH 寒天培地に画線分離培養し、1 種類の菌であることを確認した上で使用する。

2) 試薬について

室温に戻してから使用すること。

7 測定 (操作) 方法

1) 接種菌液の調整

接種菌液の調整は以下に示すいずれか一つの方法を用いる。

1) 増殖法

6.1) の菌株を TSB に接種し、マックファーランド No.0.5 以上の濁度になるまで 35~37°C の条件で約 2~6 時間培養する。これを滅菌生理食塩水で希釈し、マックファーランド No.0.5 に調整する。

2) 直接法

6.1) の菌株 (MH 寒天培地上に発育した菌) を使用する。菌を直接滅菌生理食塩水に懸濁し、均一に懸濁されていることを確認後、マックファーランド No.0.5 に調整する。

2) 接種・培養

1) 調整菌液に滅菌綿棒を浸し、余液を試験管壁で取り除く。調整菌液は 15 分以内に使用すること。

2) MH 寒天培地全面に塗布する。平板を約 60° ずつ回転させた位置から、3 回塗布する。この際、綿棒に菌液をつけるのは最初に行った 1 回だけでよい。静置時間は 15 分を超えないこと。

3) ディスクディスペンサーを用いてディスクを置く。15 分以内に培地を逆さにし、35±2 °C で 16~18 時間培養する。

ディスクディスペンサーのディスクの配置は図のようにする。

〔 ディスクディスペンサーがない場合は、滅菌ピンセットを使ってディスクを置く。この場合ディスクの間隔を 24mm 以上離すこと。 〕

3) 測定

培養後、ディスク周辺に形成された阻止円直径を mm 単位で測定する。

寒天培地を裏側にし、反射光で完全阻止円をノギスにより計測する。

4) 測定結果の判定法

測定された阻止円直径から別表感受性判定表により判定し、阻止円直径の計測値と感性 (S)、中間 (I)、耐性 (R) の判定結果を別紙「渡邊班 薬剤耐性菌検査結果表」に記載する。なお、コリスチンについては阻止円直径の計測値のみの記載とする。

カテゴリーの解釈

感性 : S (Susceptible) その抗菌薬の用法、用量により適切に治療できることが期待される。

中間 : I (Intermediate) 感性、耐性のどちらでもない。

耐性 : R (Resistant) 耐性菌。

別表

感受性判定表： サルモネラ属菌及び大腸菌（CPFX は上がサルモネラ、下が大腸菌）

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)	20	21-30	31	30-40
	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。

感受性ディスク配置図

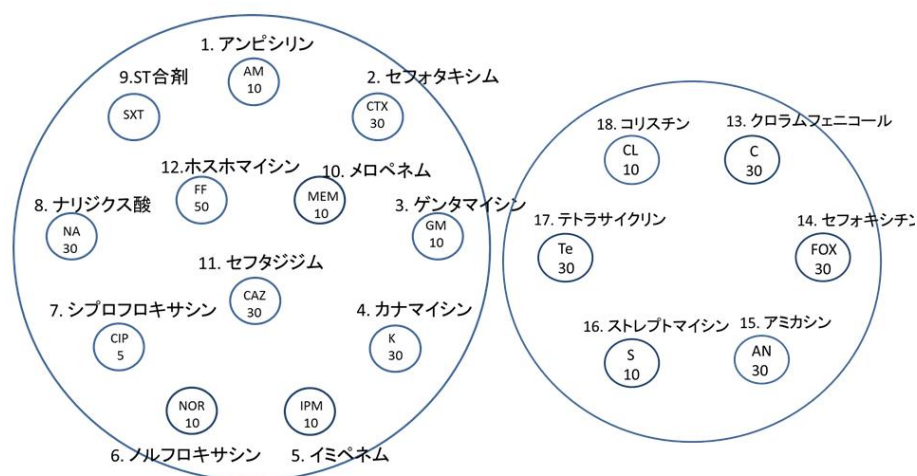
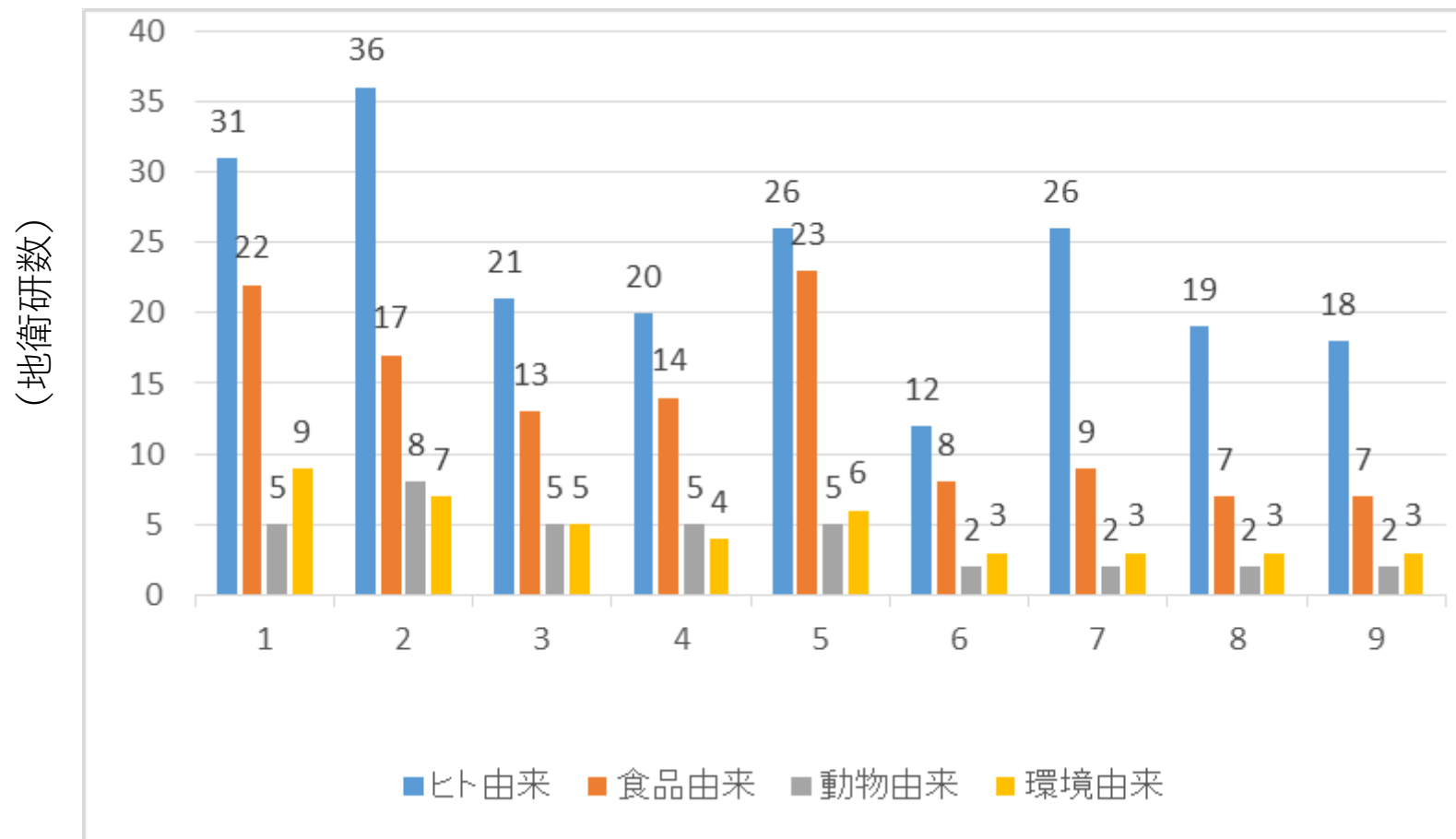


図1. 地方衛生研究所による食中毒原因菌の薬剤耐性検査



- | | | | |
|---|------------------------|---|--------|
| 1 | サルモネラ | 6 | コレラ菌 |
| 2 | EHEC | 7 | 赤痢菌 |
| 3 | EHEC以外の病原大腸菌 | 8 | チフス菌 |
| 4 | 非病原大腸菌 | 9 | パラチフス菌 |
| 5 | カンピロバクター ⁴¹ | | |

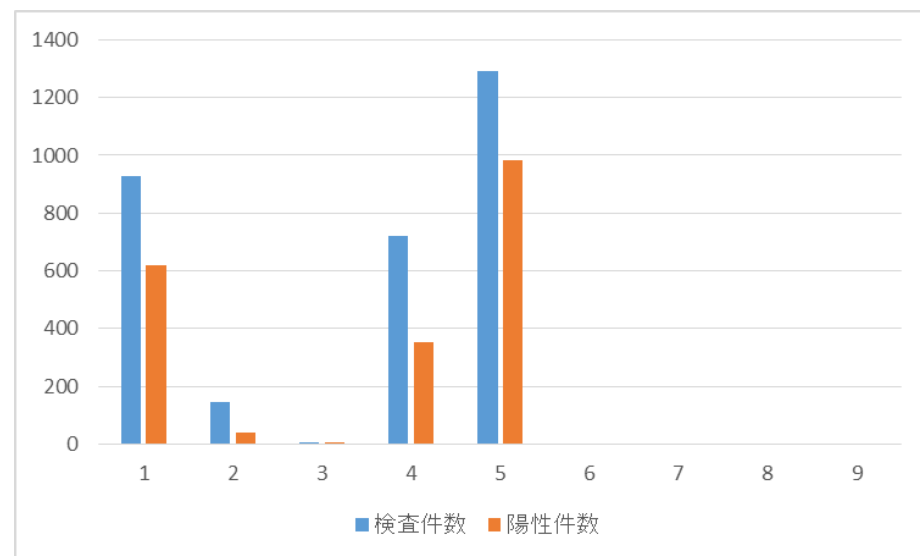
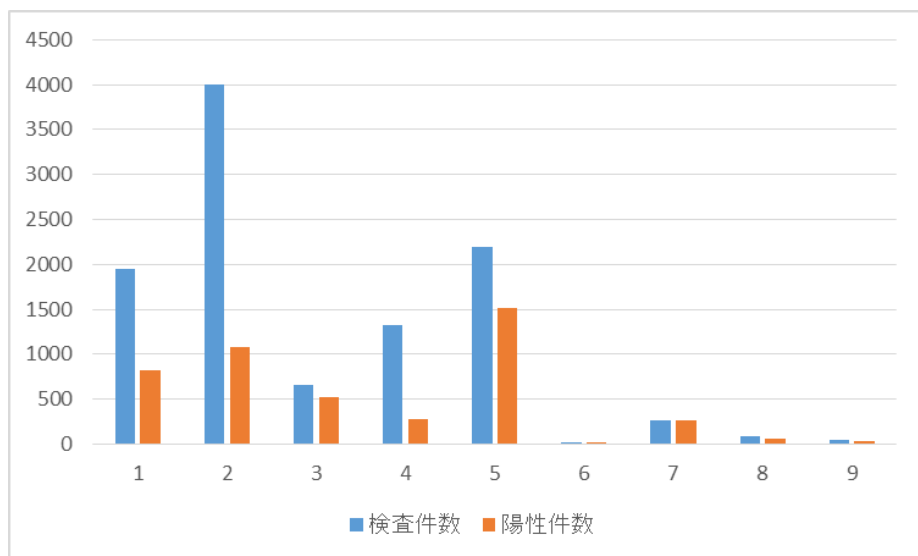
図2. 地方衛生研究所における食中毒原因菌の薬剤耐性検査数
(2012～2014年)

ヒト由来菌

食品由来菌

(検査数)

(検査数)



- | | | | |
|---|--------------|---|--------|
| 1 | サルモネラ | 6 | コレラ菌 |
| 2 | EHEC | 7 | 赤痢菌 |
| 3 | EHEC以外の病原大腸菌 | 8 | チフス菌 |
| 4 | 非病原大腸菌 | 9 | パラチフス菌 |
| 5 | カンピロバクター | | |

表1. 地方衛生研究所における食中毒原因菌株の
保有・保管数（推定）

	菌株を保有する地衛研数 (うち耐性菌株を保有する地衛研数)				推定保有菌株数（全国）	
	ヒト由来株		食品由来株		ヒト由来株 (うち耐性菌)	食品由来株 (うち耐性菌)
	10～ 100	>100	10～ 100	>100		
サルモネラ属菌	16 (12)	45 (11)	26 (9)	20 (6)	5300 (1700)	3300 (1050)
EHEC	6 (13)	56 (15)	12 (5)	3 (0)	5900 (2150)	900 (250)
EHEC以外の病原大腸菌	31 (6)	21 (6)	8 (3)	2 (1)	3650 (900)	600 (250)
非病原大腸菌	26 (11)	13 (5)	15 (7)	3 (2)	2600 (1050)	1050 (550)
カンピロバクター	23 (13)	37 (12)	30 (10)	14 (8)	4850 (1850)	2900 (1300)
コレラ菌	29 (2)	6 (1)	1 (0)	0 (0)	2050 (200)	50 (0)
赤痢菌	38 (9)	14 (6)	0 (0)	0 (0)	3300 (1050)	0 (0)
チフス菌	21 (4)	5 (1)	0 (0)	0 (0)	1550 (300)	0 (0)
パラチフス菌	16 (3)	3 (2)	0 (0)	0 (0)	1100 (350)	0 (0)

図3. ヒト及び食品由来サルモネラ株のO抗原別内訳
 (2015～2017年分離株 n = 1324)

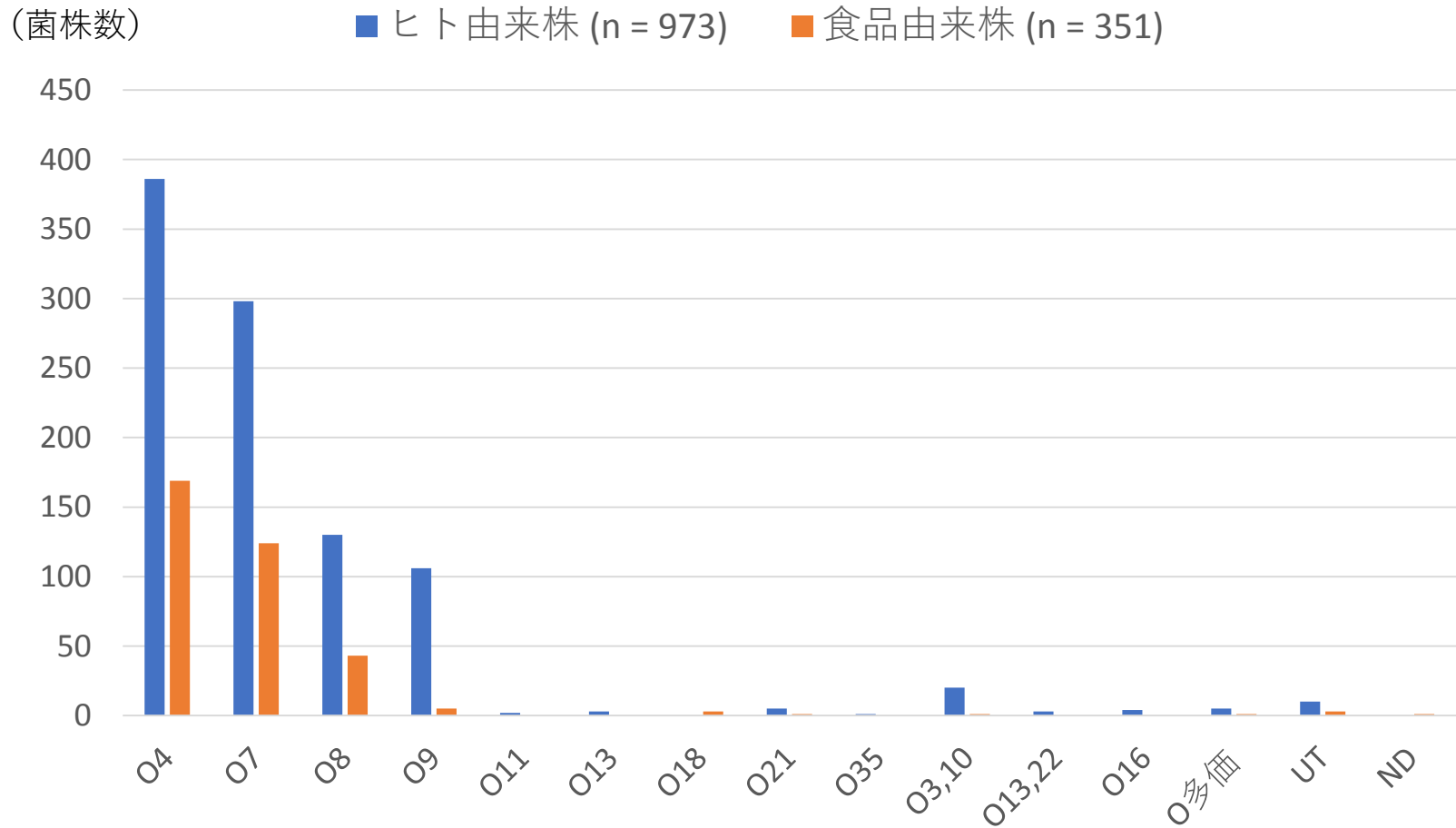
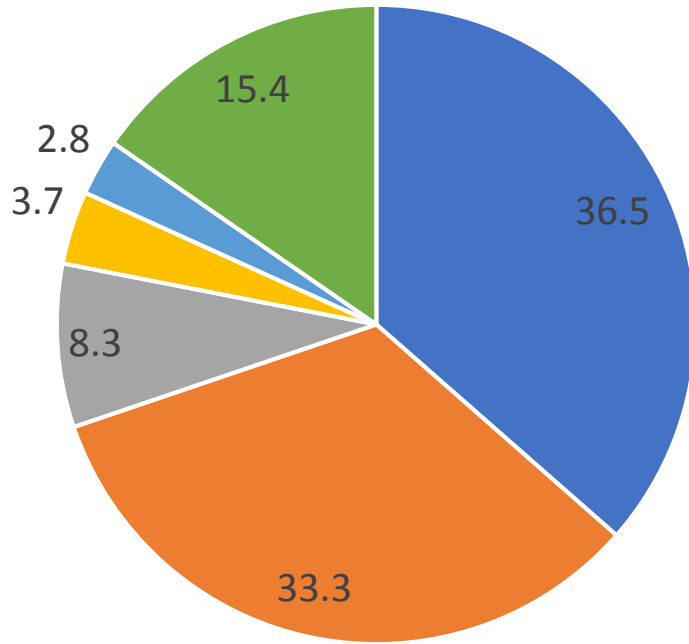


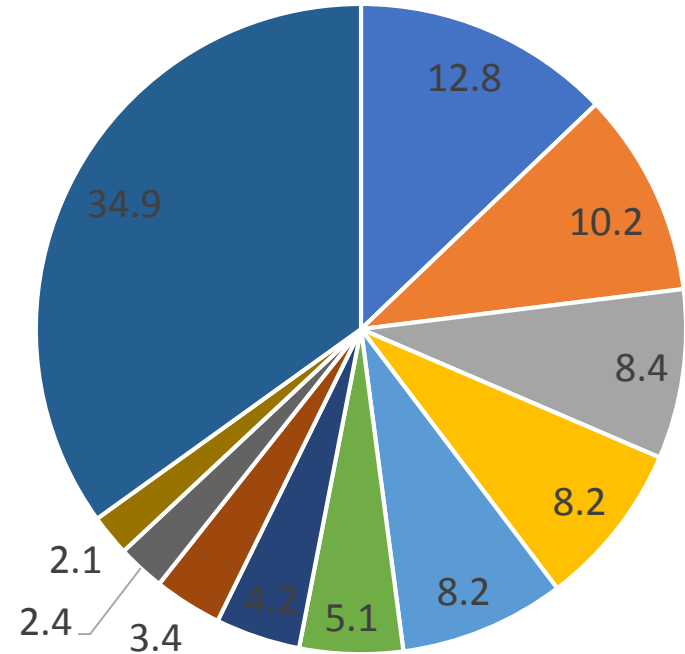
図4. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型
(2015～2017年分離株 n = 1324)

食品由来株 (n = 351)



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

ヒト由来株 (n = 973)



- infantis ■ Enteritidis
- O4:i- ■ Thompson
- Saintpaul ■ Typhimurium
- Schwarzengrund ■ Manhattan
- Newport ■ Chester
- その他

表2. ヒト及び食品由来サルモネラ株の薬剤耐性状況
(2015～2017年株 n = 1324)

由来	分離年	菌株数	耐性菌#	耐性率
ヒト由来	2015年	388	164	42.3%
	2016年	263	112	42.6%
	2017年	322	117	36.3%
	合計	973	393	40.4%
食品由来	2015年	156	143	91.7%
	2016年	110	96	87.3%
	2017年	85	76	89.4%
	合計	351	315	89.7%

#18剤中 1 剤以上の抗菌剤に耐性(R)を示した菌株

表3. ヒト由来サルモネラ株の検体別内訳と耐性率
(2015～2017年分離株 n = 973)

検体名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
糞便	760	300	39.5%
血液	18	15	83.3%
尿	25	10	40.0%
腸壁・腹部ドレーン	3	1	33.3%
不明	167	67	40.1%
合計	973	393	40.4%

表4. ヒト由来サルモネラ株の年齢別菌株数と耐性率
(2015～2017年分離株 n = 973)

年齢	菌株数	耐性菌株数	耐性率
0	16	4	25.0%
1～4	127	50	39.4%
5～14	216	83	38.4%
15～24	127	55	43.3%
25～34	104	45	43.3%
35～44	48	19	39.6%
45～54	40	21	52.5%
55～64	42	16	38.1%
65～80	67	31	46.3%
81以上	30	9	30.0%
不明	156	60	38.5%
合計	973	393	40.4%

表5. 食品由来サルモネラ株の食品別内訳と耐性率
(2015～2017年分離株 n = 351)

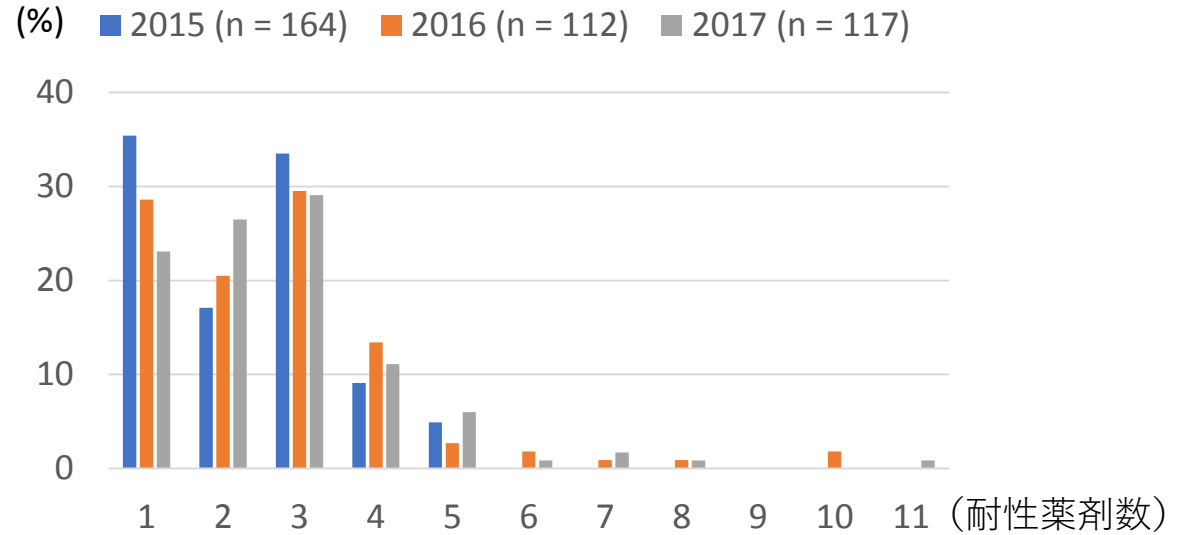
食品名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
国産・鶏肉	315	287	91.1%
外国産・鶏肉*	10	9	90.0%
不明・鶏肉	18	11	61.1%
国産・牛肉	2	2	100%
不明・牛肉	2	2	100%
国産・豚肉	3	3	100%
その他**	1	1	100%
合計	351	315	89.7%

*ブラジル産7株、タイ産2株、アメリカ産1株

**豪州牛肉・国産鶏肉の混合物

図5. ヒト及び食品由来サルモネラ株の
多剤耐性状況
(2015～2017年分離株)

ヒト由来株



食品由来株

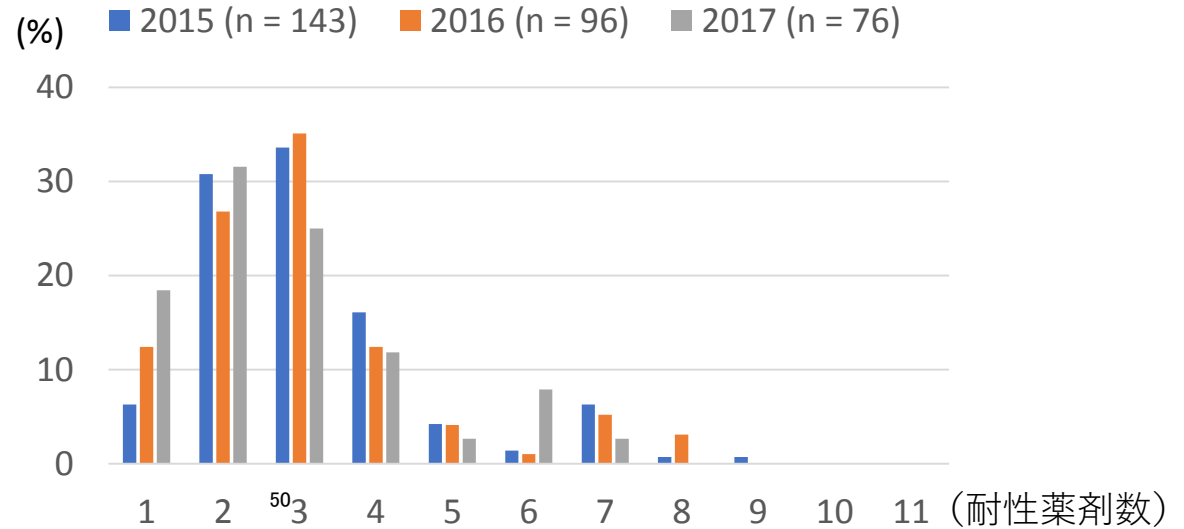


表6. 多剤耐性（6剤以上）を示したヒト由来サルモネラ株

菌株	分離年	血清型	耐性薬剤数	耐性抗菌剤
1	2016	Minnesota	6	ABPC, KM, TC, CTX, CAZ, CFX
2	2016	Brandenburg	6	ABPC, KM, SM, TC, ST, CP
3	2017	Albany	6	ABPC, SM, TC, ST, CP, NA
4	2016	Blockley	7	ABPC, KM, SM, TC, CP, CTX, CAZ
5	2017	Saintpaul	7	ABPC, SM, TC, ST, CP, CTX, FOM
6	2017	Blockley	7	ABPC, KM, SM, TC, CP, CTX, CAZ
7	2016	Typhimurium	8	ABPC, GM, SM, TC, ST, CP, CPF ₅ X, NFLX
8	2017	O4:i:-	8	ABPC, GM, KM, SM, TC, CTX, CAZ, CFX
9	2016	Thompson	10	ABPC, SM, TC, ST, CP, CTX, CAZ, CFX, CPF ₅ X, NFLX
10	2016	Thompson	10	ABPC, SM, TC, ST, CP, CTX, CAZ, CFX, CPF ₅ X, NFLX
11	2017	Saintpaul	11	ABPC, GM, KM, SM, TC, ST, CP, CTX, CAZ, NA, CPF ₅ X

図6. ヒト及び食品由来サルモネラ株の各種薬剤耐性率
(2015～2017分離株)

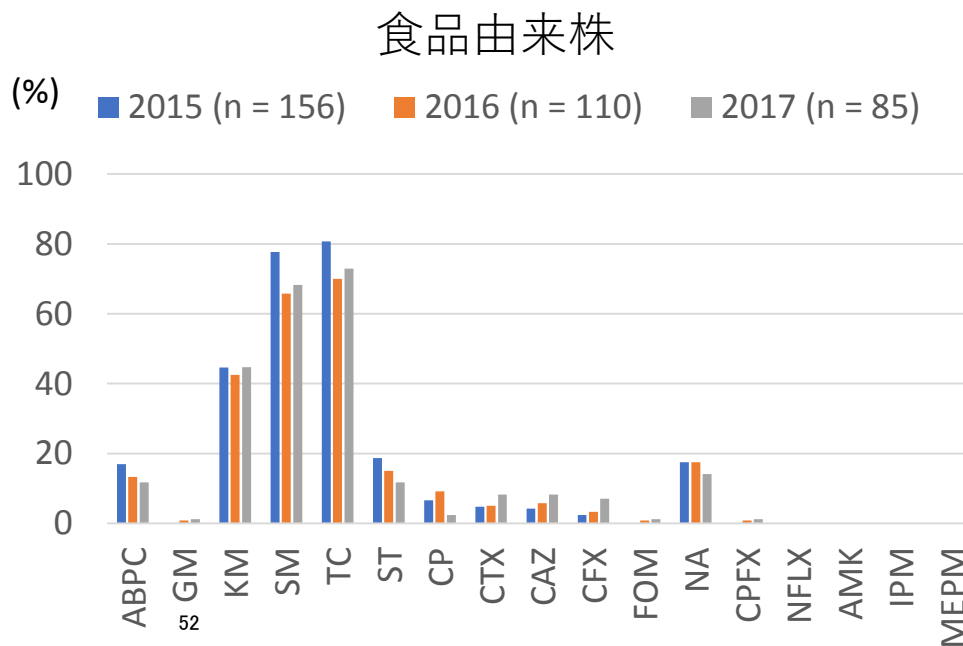
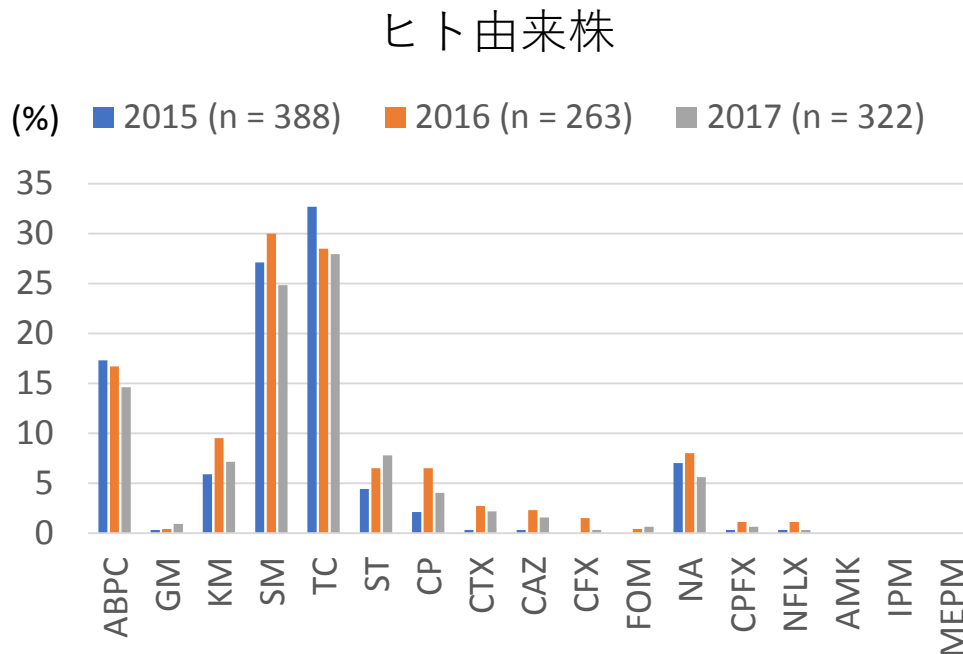


表7. セフェム系薬(CTX, CAZ, CFX)に耐性を示したヒト及び食品由来サルモネラ株 (2015~2017年分離株)

由来	菌株	分離年	血清型	CTX	CAZ	CFX	耐性薬剤数
ヒト	1	2016	Blockley	R	R	S	7
	2	2017	Blockley	R	R	S	7
	3	2016	Enteritidis	R	R	S	5
	4	2016	Infantis	R	R	S	3
	5	2016	Infantis	S	S	R	2
	6	2016	Minnesota	R	R	R	6
	7	2017	O4:i:-	R	R	R	8
	8	2017	Saintpaul	R	S	S	7
	9	2017	Saintpaul	R	R	S	11
	10	2017	Schwarzengrund	R	R	S	5
	11	2017	Schwarzengrund	R	R	S	5
	12	2016	Thompson	R	R	R	10
	13	2016	Thompson	R	R	R	10
	14	2016	Thompson	R	S	S	2
	15	2015	Typhimurium	R	R	S	5
	16	2017	Typhimurium	R	S	S	2
食品	1	2015	Blockley	R	R	S	6
	2	2016	Blockley	R	R	S	7
	3	2016	Blockley	R	R	S	7
	4	2015	Heidelberg	R	R	R	6
	5	2017	Heidelberg	R	R	R	6
	6	2017	Heidelberg	R	R	R	6
	7	2017	Heidelberg	R	R	R	6
	8	2017	Heidelberg	R	R	R	6
	9	2017	Heidelberg	R	S	S	7
	10	2015	Infantis	R	R	R	9
	11	2015	Infantis	R	R	R	8
	12	2016	Infantis	R	R	R	8
	13	2016	Infantis	R	R	R	8
	14	2015	Infantis	R	I	R	7
	15	2016	Infantis	I	R	R	7
	16	2017	Infantis	R	R	R	7
	17	2015	Manhattan	R	R	S	5
	18	2015	Manhattan	R	R	S	5
	19	2015	Manhattan	R	R	S	5
	20	2016	Manhattan	R	R	S	5
	21	2017	Minnesota	I	R	R	6
	22 ⁵³	2016	O4 UT	R	R	R	6
	23	2017	Schwarzengrund	R	R	S	6

外国産
外国産
外国産
外国産
外国産

外国産

図7. 国産及び外国産鶏肉由来サルモネラ株の多剤耐性状況と各種薬剤耐性率（2017年分離株）

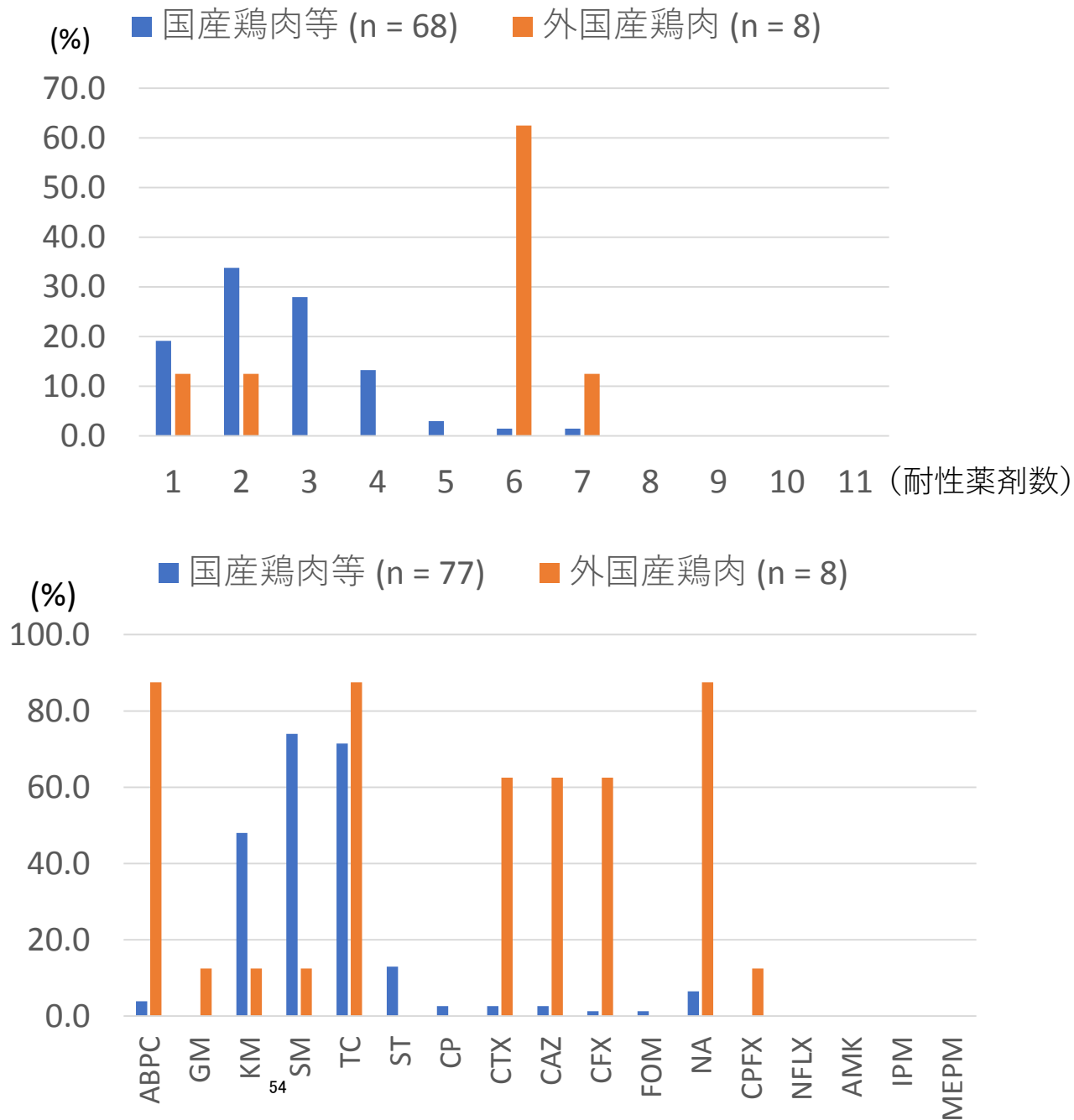


図8. 食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015~2016年分離株 n = 266)

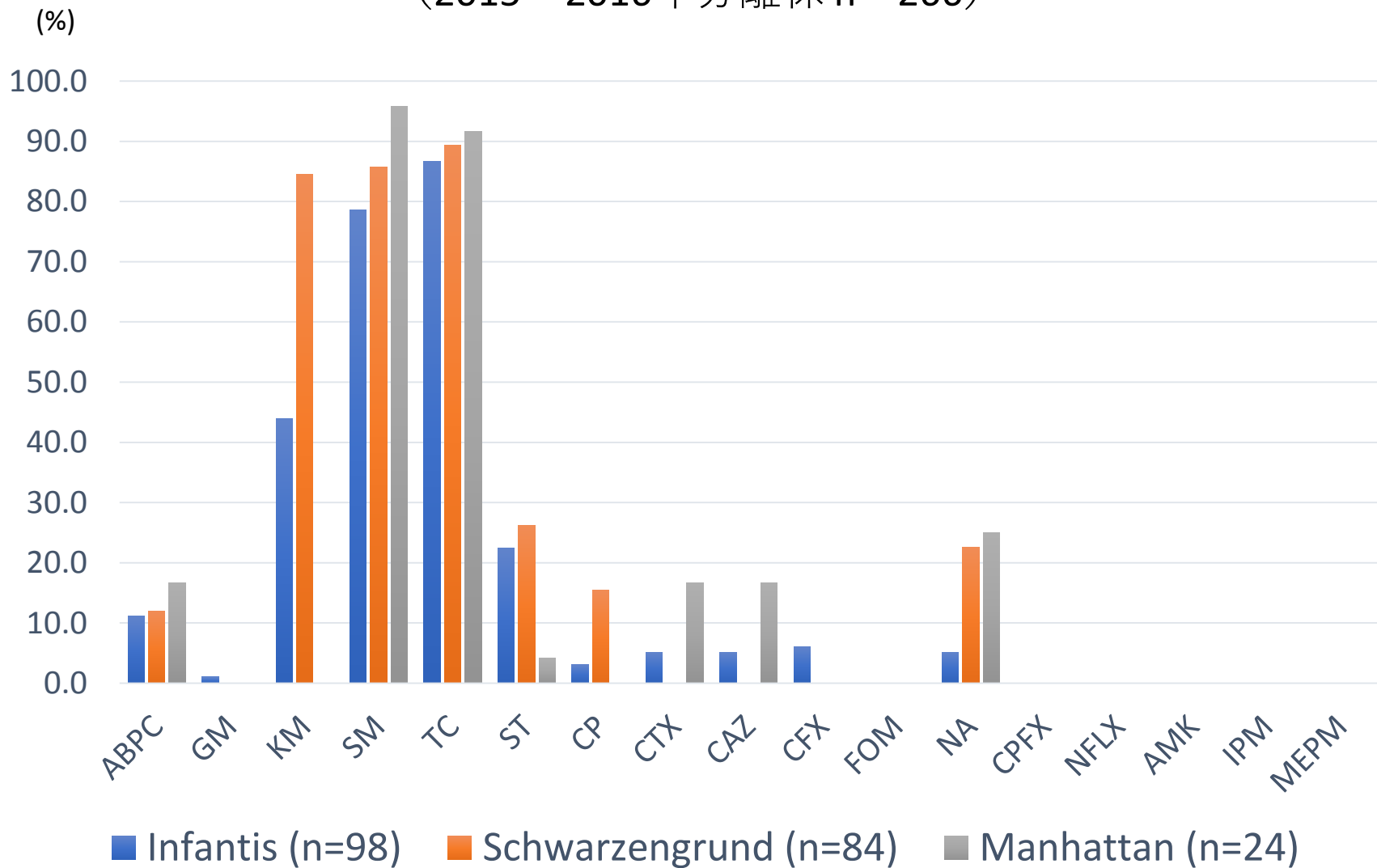


図9. ヒト由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015~2016年分離株 n = 651)

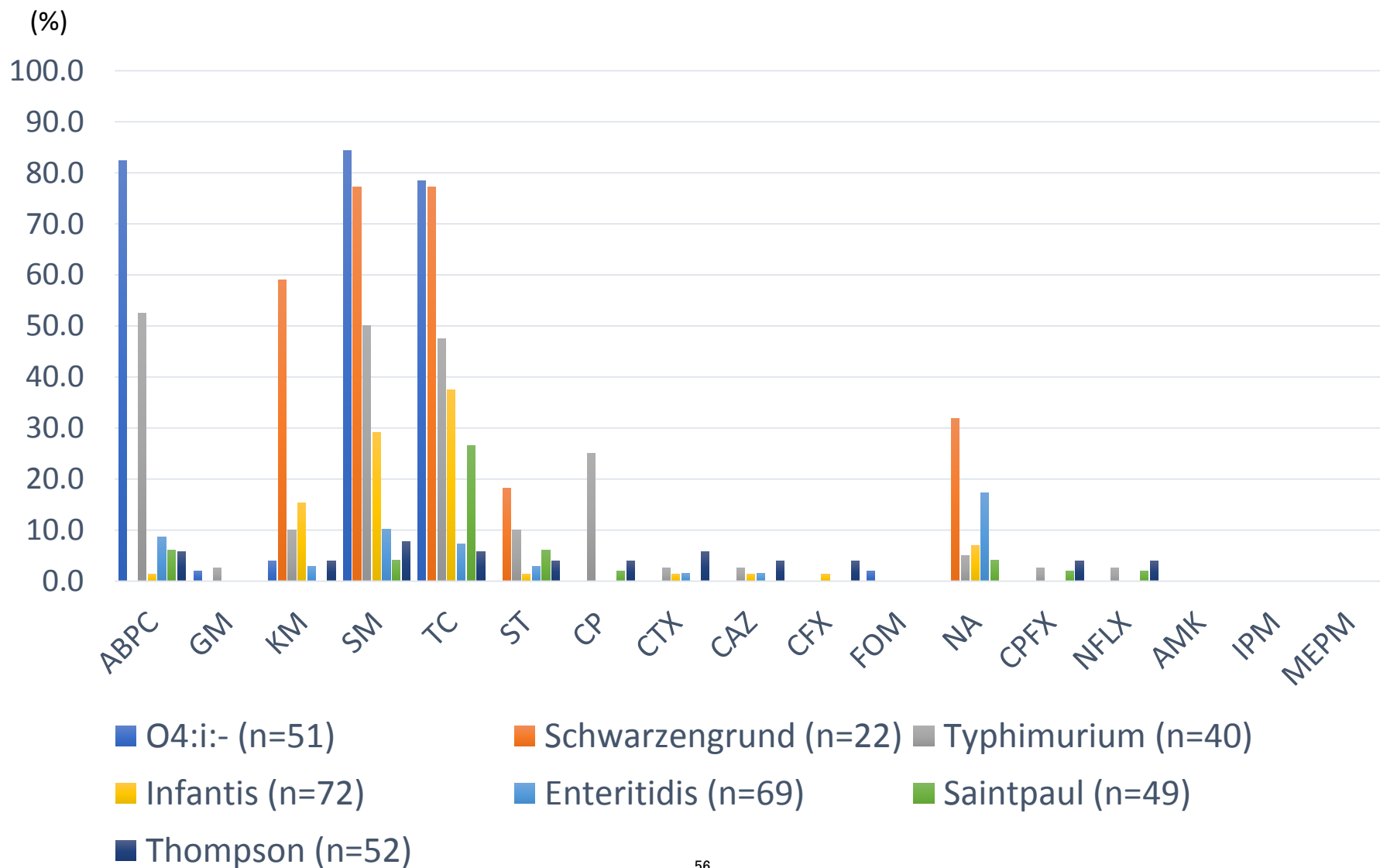
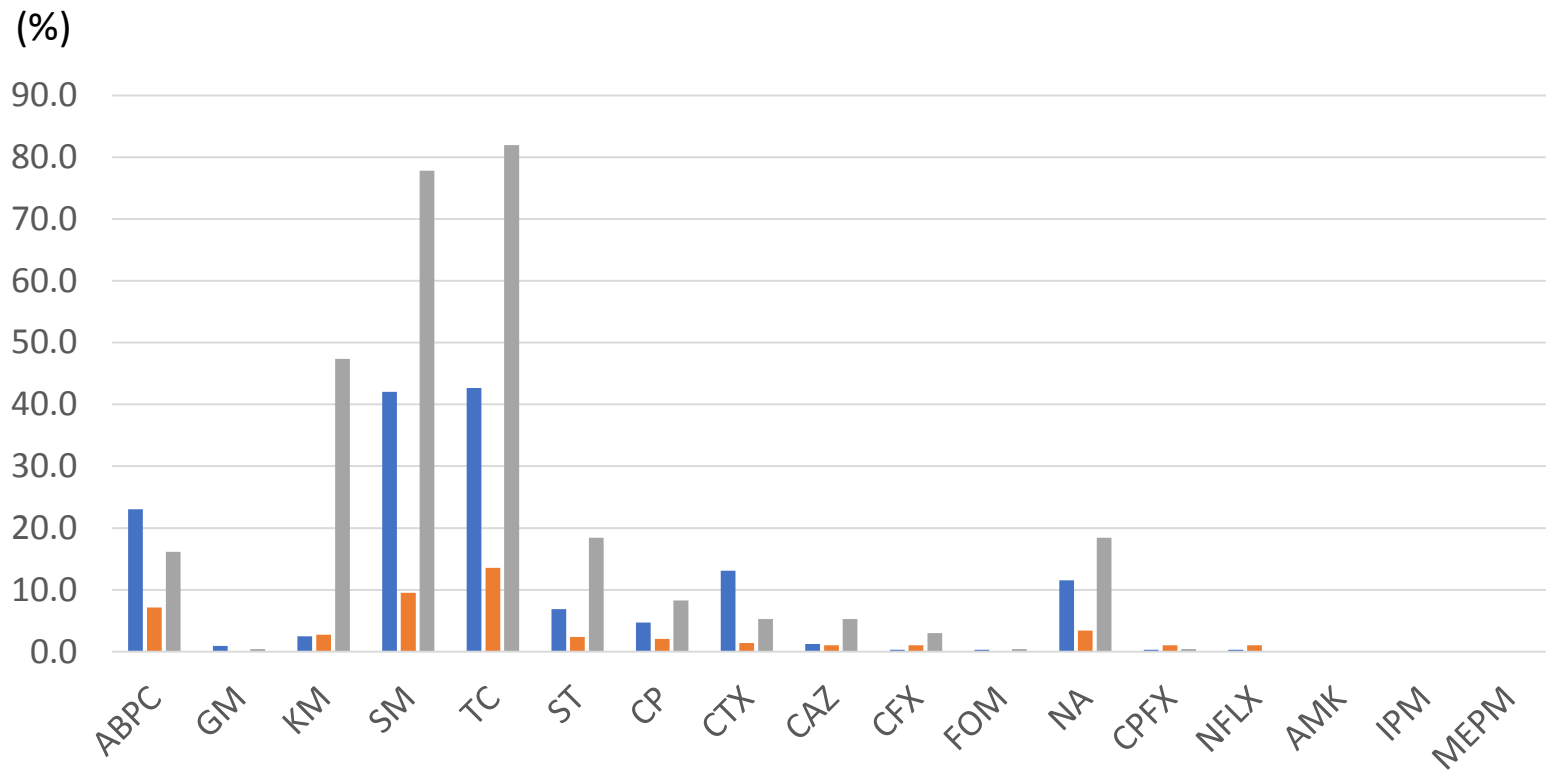


図10. ヒト由来サルモネラ株のうち、食品から分離された血清型と分離されなかった血清型の株の薬剤耐性率
(2015～2016年分離株 n = 651)



- 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11. 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)

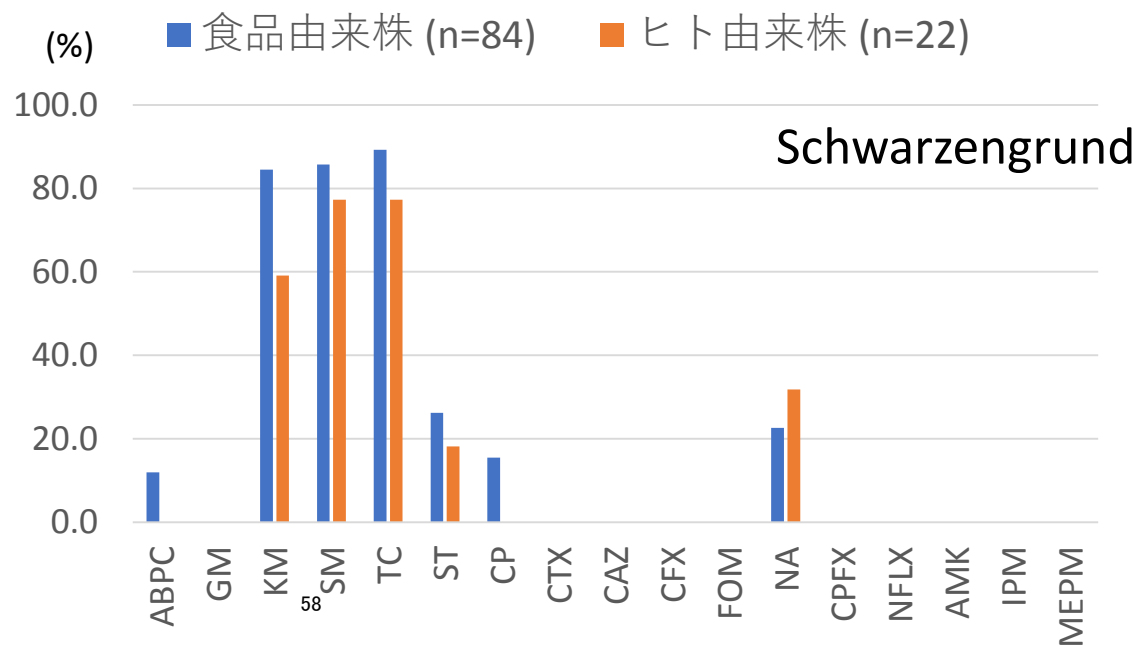
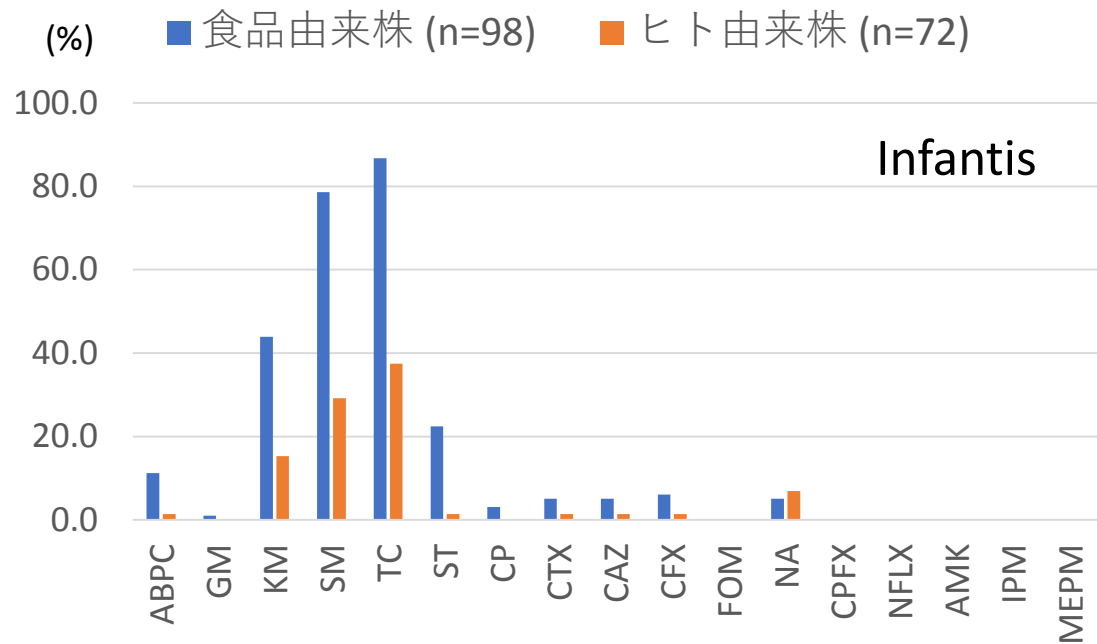


表8. ヒト及び食品由来大腸菌株の薬剤耐性状況
(2015～2017年分離株 n = 602)

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, EA_ggEC, 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12. 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)

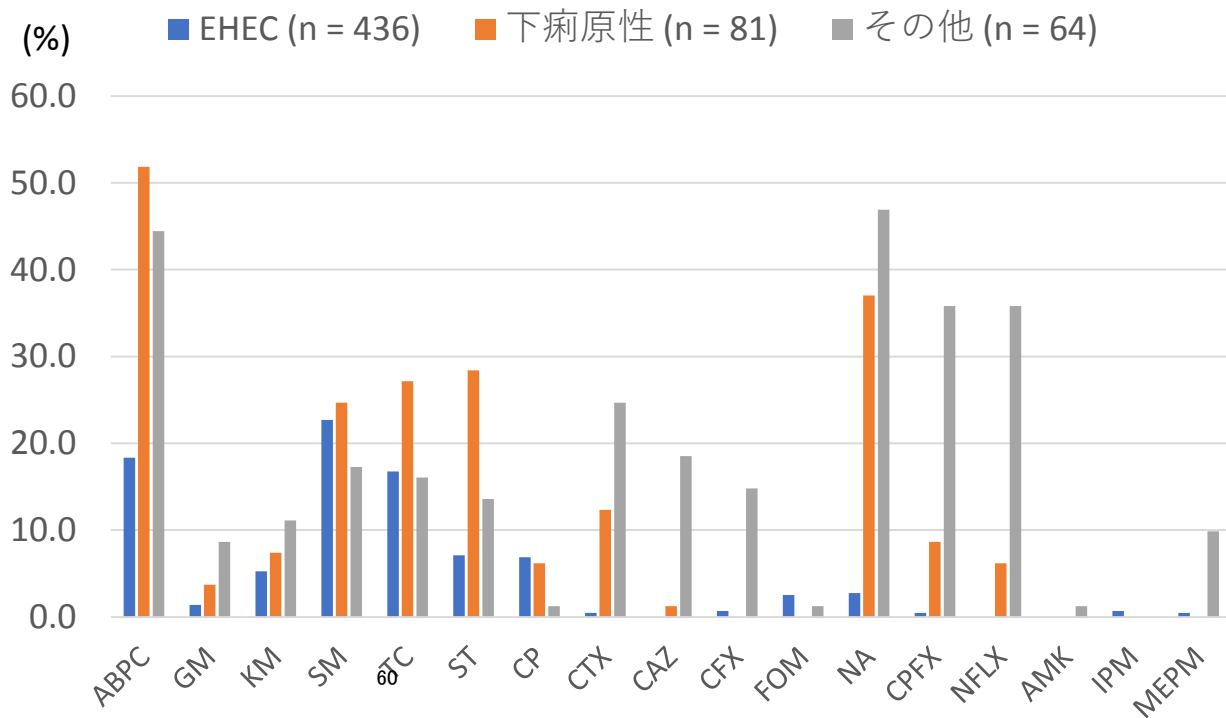
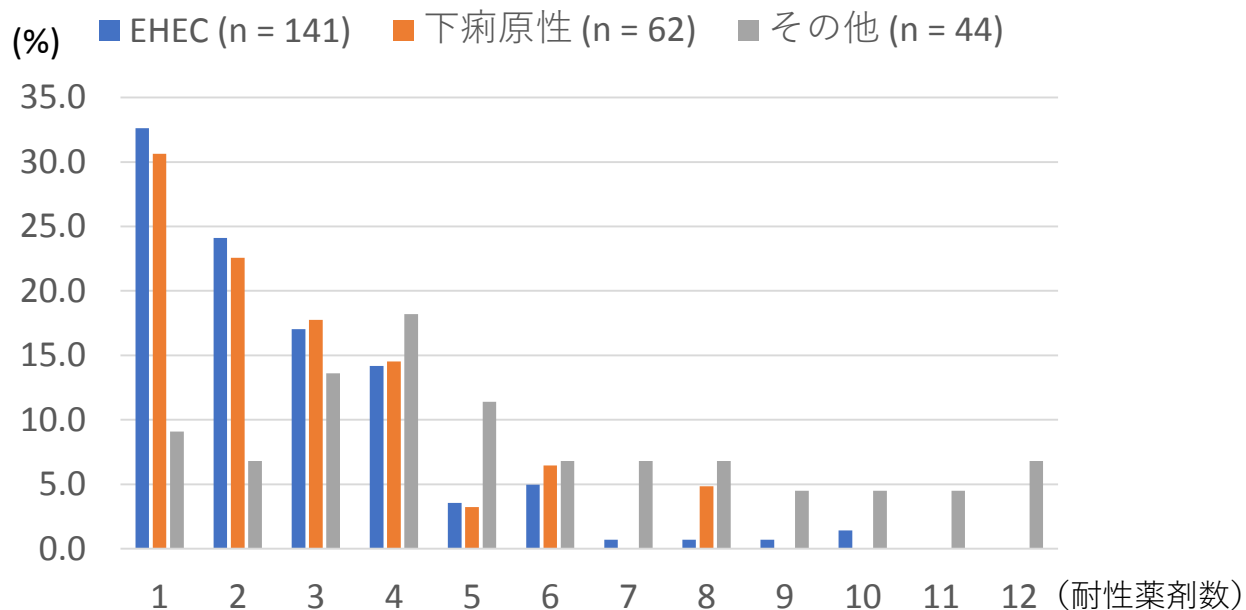


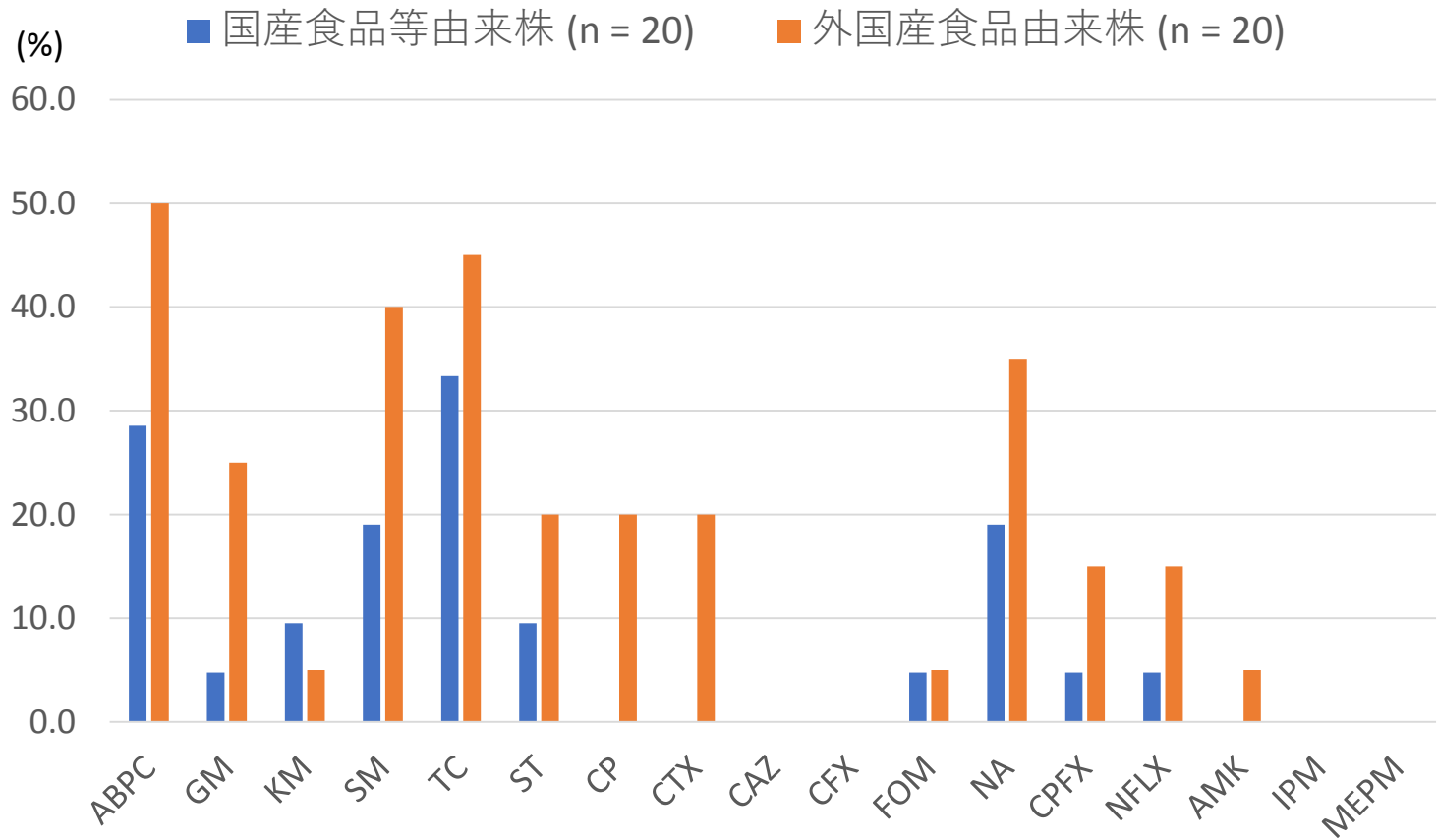
表9. 多剤耐性（6
剤以上）を示した
ヒト由来大腸菌株
（2015～2017年分離
株）

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10. 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13. 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 27～29 年度 分担（総合）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
	小野明日子	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
	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
	西野由香里	東京都健康安全研究センター	精度管理室
	甲斐 明美	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨

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, 08 群 Manhattan, 04 群 Typhimurium が共通して高率に検出されていることから、ヒトのサルモネラ症に食品が影響を与えている可能性が少なからずあることが示唆された。

第 3 世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株の分離状況をみると、食品由来株で 2015 年以降に急激に増加していることが明らかとなったが、現時点で耐性率はそれほど高くないことから、耐性株の拡大は限定的なものと考えられた。

散発下痢症由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性株出現状況をみると 50% 程度でほぼ横ばいであった。*C. coli* の耐性率は 87.5% (2011 年) から 35.7% (2016 年) と、年々低下している傾向であった。治療の第一選択薬として用いられるエリスロマイシン耐性率をみると、いずれの菌種とも耐性率は低く、耐性株の増加は認められていない。

健康者の糞便から分離された大腸菌のフルオロキノロン耐性は 9.4%、CTX 耐性は 6.0% であった。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有株が 2017 年に 2 株検出されたことから、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。

市販流通する食品から検出された大腸菌のうち ESBL 産生菌は輸入鶏肉で 42.5%、国産鶏肉では 14.9% であった。

今後も引き続き詳細なサーベイランスを行い、耐性菌出現状況を把握していく必要があると考えられた。

A. 研究目的

医療現場では依然として薬剤耐性菌の出現が増加しており、世界的な問題となっている。2011 年 WHO は薬剤耐性菌に対し、ヒト、食品、動物、環境といった垣根を超えた「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る可能性があるため、一つの分野だけでなく、一丸となって取り組んでいかななくてはならないという考え方である。この様な状況を受け、わが国でも薬剤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。

薬剤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出現状況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。そこで食中毒起因菌として重要なサルモネラおよびカンピロバクターについて薬剤耐性菌出現状況を調べた。また、健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況および市販流通する食肉から分離された大腸菌を対象とした薬剤耐性菌出現状況、更に ESBL 産生菌やプラスミド性コリスチン耐性株検出状況についてまとめた。

B. 研究方法

1. ヒト（下痢症患者および無症状病原体保有者）および食品由来サルモネラの分離状況および薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2015年～2017年に東京都内で分離されたヒト由来サルモネラ 382株および食品から分離された 394株を供試した。集団事例由来株は代表株 1株を計上した（表 1）。

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基本に、東京都独自に 1 薬剤を追加して供試した。すなわち ABPC, GM, KM, SM, TC, SXT, CP, CTX, Su, FOM, NA, CPF, NFLX, OFLX, AMK, IPM, MEPM の 17 薬剤である。Su については 2016 年 5 月に販売中止になったことから、2017 年 10 月以降の実施には使用していない。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米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) の方法に従い、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薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2014年～2016年に都内病院で散発下痢症患者から分離された *C. jejuni* 354株（2014年：125株, 2015年：116株, 2016年：113株）および *C. coli* 29株（2014年：7株, 2015年：8株, 2016年：14株）を供試した。

2) 薬剤感受性試験

供試薬剤は ABPC, TC, NA, CPF, NFLX, OFLX, EM の 7 薬剤で、KB ディスク法で調べた。

3. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2015年～2017年に飲食店従事者で下痢等の消化器症状の無い健康者糞便から分離された大腸菌 1,169株（2015年：297株, 2016年：351株, 2017年 521株）を供試した。

2) 薬剤感受性試験

供試薬剤はサルモネラに使用した薬剤と同じ 17 薬剤である。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。

3) ESBL 産生菌の検出

CTX 耐性株については ESBL 産生性の確認を行

い、遺伝子型別は Shibata ら（Antimicrob. Agents Chemother. 50, 791-795, 2006）および Yagi ら（FEMS Microbiol. Lett. 184, 53-56, 2000）あるいは市販のプライマー（ESBL 遺伝子型別キット、関東化学）を用い実施した。

4. 市販流通する食肉から検出された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

1) 鶏肉から分離された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

(1) 供試検体

2011～2012年および 2015年に都内で流通した輸入鶏肉 106検体、国産鶏肉 116検体の合計 222検体を供試した。

(2) 大腸菌検出方法

食肉 25g に普通ブイヨン 30ml を加えストマッキング処理を行った後、その 0.1ml を XM-G 寒天培地（日水製薬）に滴下し塗抹分離培養を行った（直接法）。また鶏肉 25g に緩衝ペプトン水 225ml を加え、35℃で 18時間培養した後、XM-G 寒天培地に塗抹分離を行った（増菌法）。培養後 XM-G 寒天培地に発育した大腸菌様集落 1～3 集落について生化学的性状試験を行い、大腸菌と同定した。

(3) 分離された大腸菌の薬剤感受性試験

輸入鶏肉から分離された大腸菌 228株（2011年：191株, 2015年：37株）および国産鶏肉由来の 302株（2012年：163株, 2015年：139株）を供試した。薬剤感受性試験は、サルモネラと同じ 17 薬剤を用いた。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。ESBL 産生菌あるいは AmpC 産生菌と判定された菌株については、それぞれの遺伝子型を決定した。ESBL 産生菌の遺伝子型別には 3-3) に示したプライマーを用い、AmpC 産生菌については Javier ら（J. Clin. Microbiol. 40, 2153-2162, 2002）のプライマーを用いた。

2) プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) 遺伝子保有状況

(1) 供試検体

2011年～2012年に都内で流通した鶏肉 169検体（国産 69検体, 輸入 100検体）および 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) 供試菌株

2011～2012年に分離された 353株（国産 163

株、輸入 190 株) および 2015~2016 年に分離された 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。

(3) 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 (0.25 μ g/mL~16 μ g/mL) で測定した。MIC が 4 μ g/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)。

5. 倫理面への配慮

すべての人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. ヒトおよび食品由来サルモネラの分離状況および薬剤耐性菌出現状況

1) 分離状況

2015 年~2017 年に東京都内でヒトから分離されたサルモネラは 382 株で、73 血清型に分類された (表 2)。最も多く分離された血清型は 07 群 Infantis で 47 株 (12.3%), 次いで 09 群 Enteritidis 40 株 (10.5%), 04 群 Schwarzengrund 34 株 (8.9%), 04 群 Saintpaul 26 株 (6.8%) であった。

一方、食品から検出されたサルモネラは 394 株で、23 血清型に分類された (表 3)。食品由来株のほとんどは生の鶏肉または鶏内臓肉からの分離であった。最も多く分離された血清型は 04 群 Schwarzengrund および 07 群 Infantis で、それぞれ 125 株 (31.7%) であった。次いで 04 群 Agona 45 株 (11.4%), OUT:r:1,5 26 株 (6.6%) であった。

2) サルモネラの薬剤耐性菌出現状況

分離されたサルモネラのうち、供試した薬剤のいずれか 1 薬剤以上に耐性を示した割合を図 1 に示した。いずれの年も食品由来株の方が耐性率は高かった。食品由来株は耐性率 90%前後で横ばいであったが、ヒト由来株の耐性率は 39.2% (2015 年), 44.5% (2016 年), 49.2% (2017 年) と年々上昇していた (図 2)。

ヒトおよび食品から共通に多く分離されている血清型である 04 群 Schwarzengrund, 04 群 Typhimurium, 07 群 Infantis, 04 群 Agona および、ヒトからの分離率が高い 09 群 Enteritidis

について薬剤耐性率を比較した (図 2)。

ヒトと食品で共通に分離されている 4 種類の血清型は全体的に耐性率が高く 76~100%であった。一方、ヒトから多く分離される 09 群 Enteritidis は 30%程度であった。耐性率を比較すると、04 群 Schwarzengrund および 04 群 Typhimurium はヒト由来株で耐性率が高く、07 群 Infantis, 04 群 Agona および 09 群 Enteritidis は食品由来株の方が高かった。

血清型ごとに薬剤耐性率をみるとヒト由来株と食品由来株で同じような耐性傾向が認められた (図 3-1, 図 3-2)。

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 2016 年および 2017 年に各 2 株の検出で、ともにヒト由来株であった。食品由来株では認められなかった。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, 07 群 Thompson, 08 群 Kentucky および 08 群 Corvallis であった。

第 3 世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株の検出状況を図 4 に示した。2015 年以降、分離数が増加している。特に食品由来株は、5 株 (2015 年), 6 株 (2016 年), 9 株 (2017 年) と分離数が増加していた。

2. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

2011 年~2016 年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率およびエリスロマイシン耐性率の年次推移を図 5 および図 6 に示した。*C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率は毎年 50%程度でほぼ一定であった。一方 *C. coli* では供試した菌株は少ないが、2011 年が 87.5%, 2012 年 66.7%, 2013 年 75%, 2014 年 57.1%, 2015 年 50%, 2016 年 35.7% と耐性率は低下していた。治療の第一選択薬であるエリスロマイシン耐性株の出現率は *C. jejuni* で 0.8%~3.7%, *C. coli* では 0%~28.6% と *C. coli* の方が高い傾向であった。しかし、いずれの菌種でも増加傾向は認められなかった。

3. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2015 年~2017 年に健康者糞便から分離された大腸菌 1,169 株を対象に 17 薬剤を用いた薬剤感受性試験を実施した。いずれか 1 薬剤以上に耐性を示した株の割合は 46.1% (2015 年), 37.6% (2016 年), 36.5% (2017 年) であり、耐性率は減少傾向であった。

薬剤別耐性率をみると最も高かったのは ABPC で 25.6%, 次いで NA 22.6%, Su 19.8%, TC 14.6%, SM 14.5% の順であった。フルオロキノロン耐性は 9.4%, CTX 耐性は 6.0% であった。AMK, IMP, MEPM 耐性株は認められなかった (図 7)。耐性率の高かった主な薬剤の耐性率の年次変化を図 8 に示した。ABPC, TC, NA, CFX 耐性率はいずれも 2015 年, 2016 年, 2017 年と年々耐性率が減少していた。

CTX 耐性株のうち 63 株について ESBL あるいは AmpC 産生の確認を行った結果, 55 株が ESBL 産生株, 8 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-9 group が最も多く 29 株, CTX-M-1group が 21 株, CTX-M-8group が 3 株, CTX-M-2 group および TEM 型がそれぞれ 1 株であった (表 4)。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は 2015 年から 2017 年に分離された大腸菌 695 株中 2 株で陽性となった。コリスチンに対する MIC 値 (Etest) は 2 および 4 μ g/ml であった (表 5)。

4. 市販流通する食肉から検出された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

1) 鶏肉から分離された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

輸入鶏肉および国産鶏肉由来大腸菌の薬剤感受性試験結果を図 9 に示した。輸入鶏肉で耐性率が 50% を超えている薬剤は SM, TC, Su の 3 薬剤であったが, 国産鶏肉では TC のみであった。

輸入鶏肉由来株の NA およびフルオロキノロン耐性株について分離年で比較すると, NA 耐性: 46.6% \rightarrow 51.4%, CFX 耐性: 17.8% \rightarrow 29.7%, OFLX 耐性: 17.3% \rightarrow 29.7%, NFLX 耐性: 16.2% \rightarrow 27.0% といずれも耐性率が増加していた。

一方, 国産鶏肉の CFX 耐性率は 16.6% (2012 年) \rightarrow 6.5% (2015 年) に減少していた。

CTX に耐性 (R) を示した株は輸入鶏肉で 97 株 (42.5%), 国産鶏肉で 45 株 (14.9%) あり, このうち ESBL 産生菌であったのは輸入鶏肉 47 株, 国産鶏肉 15 株であった。遺伝子型をみると, 輸入鶏肉では CTX-M-2 group が 23 株 (48.9%), CTX-M-9 group が 16 株 (30.4%), CTX-M-8 group 3 株 (6.4%), TEM 型 4 株 (8.5%), SHV 型 1 株 (2.1%) であった。国産鶏肉では CTX-M-1group が 6 株 (40%), CTX-M-2group が 4 株 (26.7%), CTX-M-9group が 3 株 (20%), SHV および TEM が各 1 株であった。

AmpC 産生菌は輸入鶏肉で 9 株, 国産鶏肉で 8 株分離された。遺伝子型を調べた結果, 輸入鶏

肉由来は全て CMY-2, 国産由来株は 7 株が CMY-2, 1 株は不明であった (表 7)。

2) 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。2015 年から 2016 年分離株で 4 μ 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 8)。

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, 08 群 Manhattan, 04 群 Typhimurium が共通して高率に検出されていることから, ヒトのサルモネラ症に食品が影響を与えている可能性が少なからずあることが示唆された。食品由来株の多くは生の鶏肉, 鶏内臓肉がほとんどである。近年は生あるいは加熱不十分の鶏肉を喫食したカンピロバクター一食中毒が多いことから, サルモネラにも感染する機会が多くなっていると考えられた。また, 1990 年代にヒトから最も多く分離された血清型は鶏卵に関連した 09 群 Enteritidis であったが, 近年は分離率が減少している。鶏卵由来の食中毒が減少しているものと考えられた。このようにヒト由来および食品由来株の血清型を長期的にみていくと, 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。

分離されたサルモネラの薬剤耐性率を比較すると, いずれの年も食品由来株の方が高い傾向であった。この理由としては, 分離される血清型の違いがあると考えられる。サルモネラは血清型によって耐性率が大きくことなっている。すなわち, ヒトと食品に共通に検出される 04 群 Schwarzengrund, 07 群 Infantis, 04 群 Agona, 08 群 Manhattan 等は耐性率が高い一方, ヒトから多く分離される 09 群 Enteritidis や 04 群 Chester 等は耐性率が低く, 感受性株が多

くを占めている。この差が全体の耐性率に影響しているものと考えられた。

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系薬剤に対する耐性菌は4株(2016年2株, 2017年2株)のみであり耐性率は低かった。

CTX耐性株の分離状況をみると2015年以降に急激に増加していることが明らかとなった。特に食品(鶏肉)からの検出が多くなっているが、ヒトからの検出状況についても注意していく必要がある。現時点ではサルモネラのフルオロキノロン耐性および第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す株はそれほど多くはないことから耐性株の拡大は限定的なものと考えられた。

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った。散発下痢症由来*C. jejuni*のフルオロキノロン耐性株出現状況を2011年~2016年までの間で比較すると、耐性率は37.1%(2015年)~62.7%(2012年)まででほぼ横ばいであった。*C. coli*は*C. jejuni*と比べて耐性率が高い傾向であったが、耐性率は87.5%(2011年)から35.7%(2016年)と、年々低下している傾向であった。しかし、*C. coli*は供試菌株数が毎年10株程度と少なく、1株の影響が強く反映されてしまうことから菌株数を増やしてデータをとる必要があると考えられた。

治療の第一選択薬として用いられるエリスロマイシン耐性は*C. jejuni*で0.8%(2014年)~3.7%(2011年)、*C. coli*では0%(2015年)~28.6%(2014年)であった。いずれの菌種とも耐性率は低く、耐性株の増加は認められていない。

市中一般に拡散している薬剤耐性菌の分離状況を把握することを目的として、健康者の糞便から分離された大腸菌を対象に薬剤耐性菌出現状況を調査した。2015年~2017年に分離された1,169株を供試した結果、耐性率は46.1%(2015年)、37.6%(2016年)、37.6%(2017年)と減少していた。薬剤別耐性率をみると、最も高かったのはABPCで25.6%、次いでNA 22.6%、Su 19.8%、TC 14.6%、SM 14.5%の順であった。フルオロキノロン耐性は9.4%、CTX耐性は6.0%であった。分離株の一部についてプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を調べた結果、2017年分離の2株が陽性となった。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。

市販流通する食品から検出された大腸菌の薬剤耐性率を調べた結果、輸入鶏肉の42.5%、国産鶏肉の14.9%がESBL産生菌であった。遺伝子型は、輸入鶏肉ではCTX-M-2 groupが最も多く、次いでCTX-M-9 groupが多かった。国産鶏肉ではCTX-M-1 groupが最も多く、次いでCTX-M-2 groupが多かったことから、輸入と国産では遺伝子型に違いが認められた。一方、健康者由来株の遺伝子型はCTX-M-9 groupが最も多く、次いでCTX-M-1 groupであった。ヒト由来株と鶏肉由来株では同じ遺伝子型菌も検出されており、鶏肉由来大腸菌がどの程度ヒトへ影響を及ぼしているかについては、更に検討が必要である。

今後、AMR対策アクションプランに基づいた様々な取り組みが本格的に行われていくものと考えられる。これら取り組みの効果を実証するためにも、今後も引き続き詳細なサーベイランスを行い、耐性菌出現状況を把握していく必要があると考えられた。

E. 結論

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, 08群Manhattan, 04群Typhimuriumが共通して高率に検出されていることから、ヒトのサルモネラ症に食品が影響を与えている可能性が少なからずあることが示唆された。分離されたサルモネラの薬剤耐性率を比較すると、いずれの年も食品由来株の方が高い傾向であった。血清型別に薬剤耐性率を比較すると、ヒトと食品に共通に検出される04群Schwarzengrund, 07群Infantis, 04群Agona, 08群Manhattan等は耐性率が高い一方で、ヒトから多く分離される09群Enteritidisや04群Chester等は耐性率が低く、感受性株が多くを占めている。この差が耐性率に影響しているものと考えられた。

第3世代セファロスポリン系薬剤であるCTX耐性株の分離状況をみると、食品由来株で2015年以降に急激に増加していることが明らかとなったが、現時点で耐性率はそれほど高くないことから、耐性株の拡大は限定的なものと考えられた。

散発下痢症由来*C. jejuni*のフルオロキノロン耐性株出現状況を2011年~2016年までの間で比較すると、耐性率は37.1%(2015年)~62.7%(2012年)まででほぼ横ばいであった。

C. coli の耐性率は 87.5% (2011 年) から 35.7% (2016 年) と、年々低下している傾向であった。治療の第一選択薬として用いられるエリスロマイシン耐性率をみると、いずれの菌種とも耐性率は低く、耐性株の増加は認められていない。

健康者の糞便から分離された大腸菌のフルオロキノロン耐性は 9.4%, CTX 耐性は 6.0% であった。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有株が 2017 年に 2 株検出されたことから、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。

市販流通する食品から検出された大腸菌のうち ESBL 産生菌は、輸入鶏肉 42.5%, 国産鶏肉 14.9% であった。

今後も引き続き詳細なサーベイランスを行い、耐性菌出現状況を把握していく必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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.

2. 学会発表

1) 西野由香里, 下島優香子, 井田美樹, 石塚理恵, 黒田寿美代, 吉原祥子, 甲斐明美, 平井昭彦, 貞升健志: 鶏肉由来大腸菌の薬剤感受性, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 2015 年 11 月, 川崎市

2) 佐藤友美, 臼井 優, 小西典子, 甲斐明美, 田村 豊: 牛及び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 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 6 月, 神奈川県.

3) 西野由香里, 下島優香子, 井田美樹, 福井理恵, 黒田寿美代, 上原さとみ, 平井昭彦, 貞升健志: 東京都で流通する食品からのコリスチン耐性大腸菌の検出, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 2016 年 9 月, 東京都.

4) 小西典子, 赤瀬 悟, 尾畑浩魅, 原田幸子, 森功次, 門間千枝, 平井昭彦, 甲斐明美, 貞升健志: ヒトおよび食品由来サルモネラの血清型の特徴と耐性菌出現状況, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 2016 年 9 月, 東京都

5) 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.

6) 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.

7) 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.

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. 薬剤感受性試験に用いたサルモネラ菌株数

年	供試菌株数	
	ヒト由来	食品由来
2015	125	148
2016	137	118
2017	120	128
合計	382	394

表2. ヒト由来サルモネラの血清型および分離数(2015~2017年)

血清群	血清型	分離数	血清群	血清型	分離数
07	Infantis	47	04	Coelem	1
09	Enteritidis	40	04	eh:-	1
04	Schwarzengrund	34	07	Tennessee	1
04	Saintpaul	26	07	Montevideo	1
04	Chester	23	07	Mbandaka	1
04	i:-	22	07	Oranienberg	1
04	Typhimurium	20	07	Colindale	1
04	Agona	17	07	Tennessee	1
07	Thompson	17	07	Montevideo	1
04	Stanley	15	08	Altona	1
08	Newport	11	08	eh:-	1
08	Manhattan	9	08	Corvallis	1
03,10	Anatum	8	08	型別不能	1
08	Litchfield	7	08	Muenhen	1
07	Bareilly	5	08	Narashino	1
04	Stanley	4	09	Panama	1
08	Blockley	4	09	Miyazaki	1
04	Brandenburg	3	09	型別不能	1
04	Reading	3	03,10	Give	1
07	Virchow	3	03,10	Weltevreden	1
04	Derby	2	03,10	London	1
07	Rissen	2	03,10	Meleagridis	1
07	Braenderup	2	03,10	Weltevreden	1
07	Ohio	2	03,10	Give	1
08	Albany	2	01,3,19	Senftenberg	1
08	Kentucky	2	01,3,19	Liverpool	1
08	Pakistan	2	013	運動性(-)	1
08	Nagoya	2	013	Havana	1
08	Muenhen	2	013	Poona	1
09	Javiana	2	013	Cubana	1
017	Matadi	2	013	Agbei	1
04	Haifa	1	016	Vancouver	1
04	Stanleyville	1	016	型別不能	1
04	Heidelberg	1	018	Cerro	1
04	Sandiego	1	018	運動性(-)	1
04	b:-	1	035	Adelaide	1
04	d:-	1	合計		382

表3. 食品由来サルモネラ(2015年～2017年)

血清群	血清型	分離数	血清群	血清型	分離数
O4	Schwarzengrund	125	OUT	d:1, 7	3
O7	Infantis	125	O4	i:—	2
O4	Agona	45	O3,10	Anatum	2
OUT	r:1, 5	26	O4	運動性(-)	1
O8	Manhattan	17	O4	Bredeney	1
O8	Blockley	16	O7	Virchow	1
O4	Typhimurium	9	O7	-:1, 5	1
O4	Heidelberg	4	O7	Tennessee	1
O4	Derby	3	O8	Yovokome	1
O4	Stanley	3	O1,3,19	Senftenberg	1
O7	Colindale	3	O21	Minnesota	1
O9	Enteritidis	3	合計		394

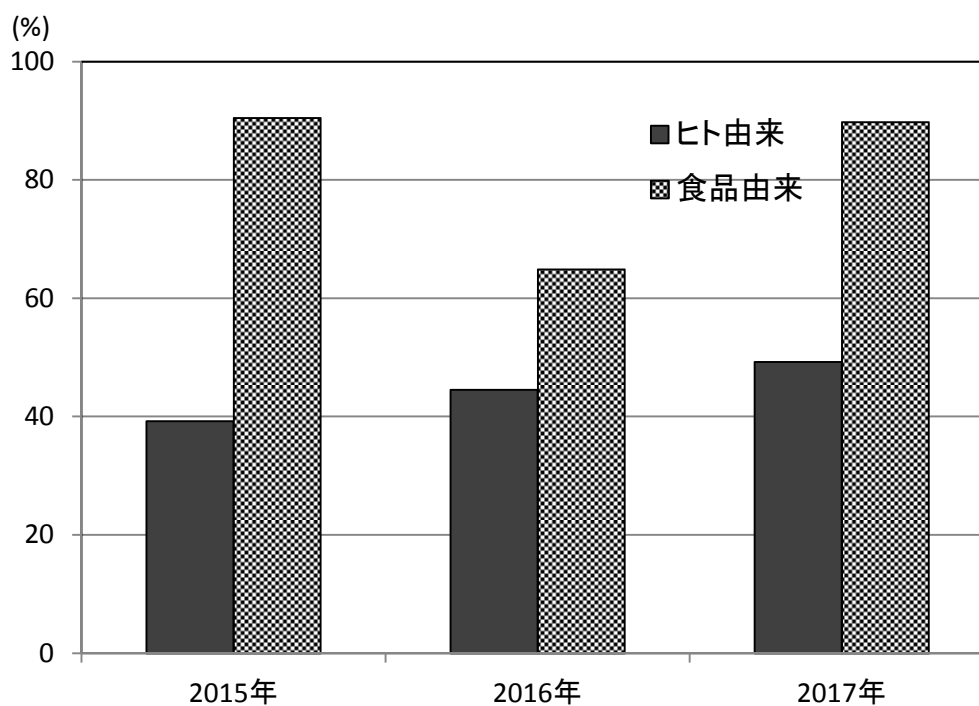


図1. ヒトおよび食品由来サルモネラのうちいずれか1薬剤以上に耐性を示す株の検出状況

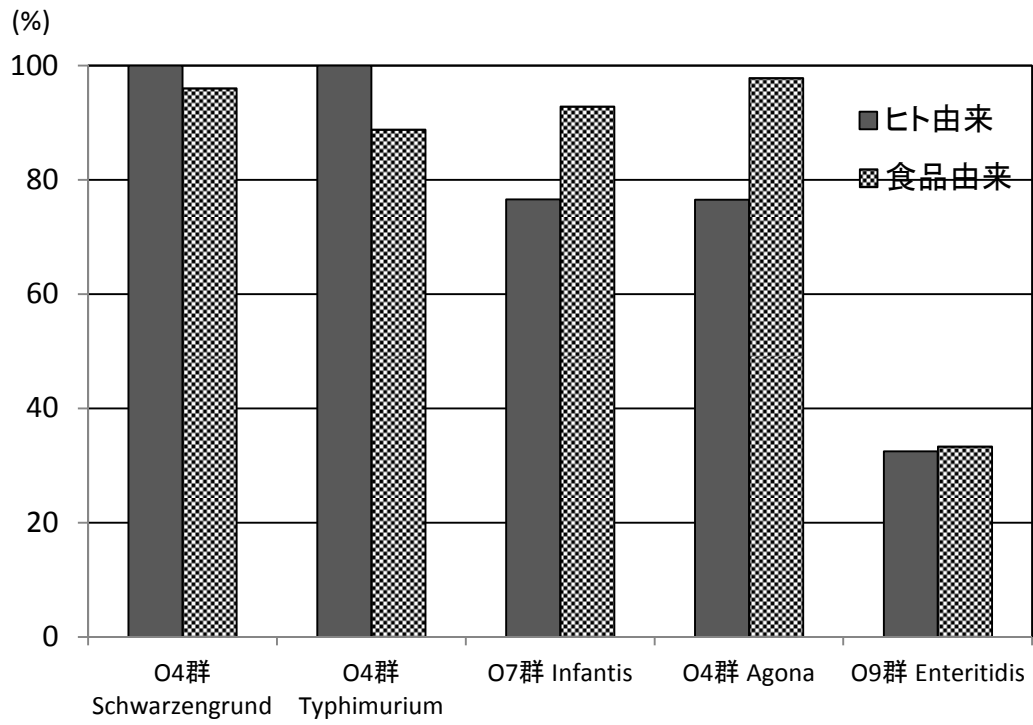
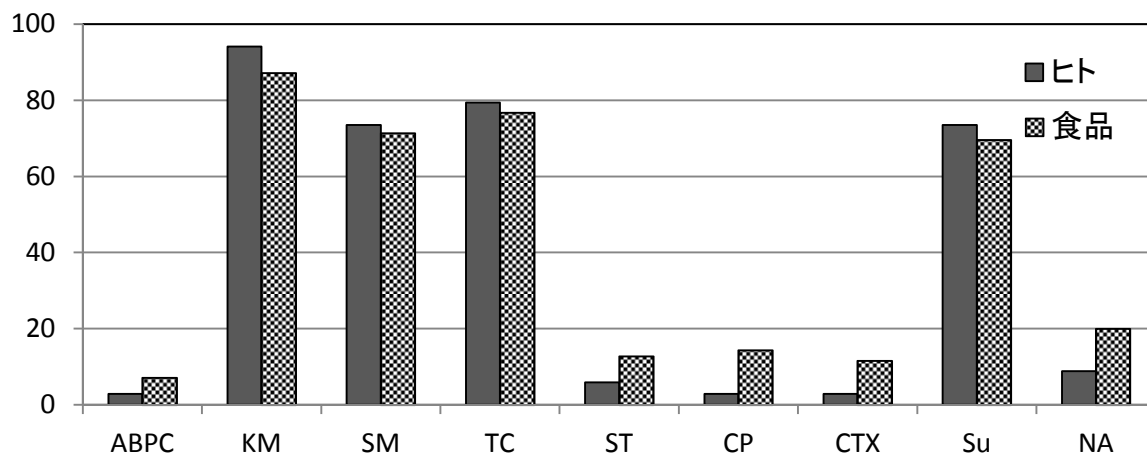


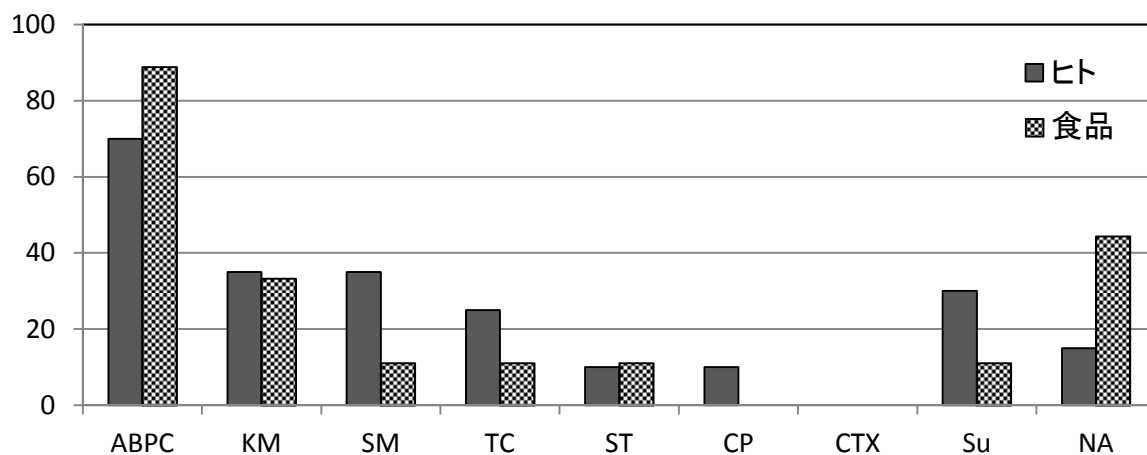
図2. サルモネラ主要5血清型菌の耐性率

図3-1. 各薬剤に対するサルモネラ血清型別薬剤別耐性率の比較

(%) O4群 Schwarzengrund



(%) O4群 Typhimurium



(%) O7群 Infantis

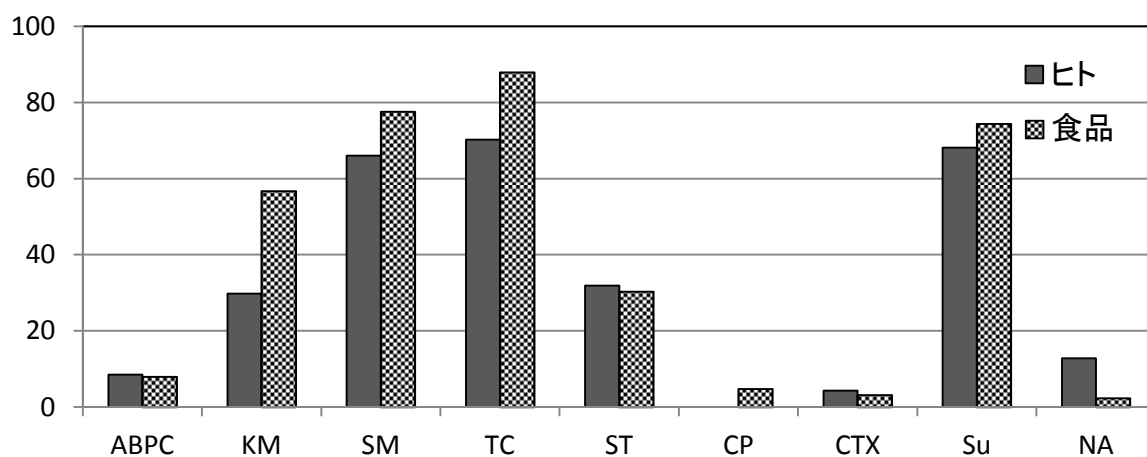
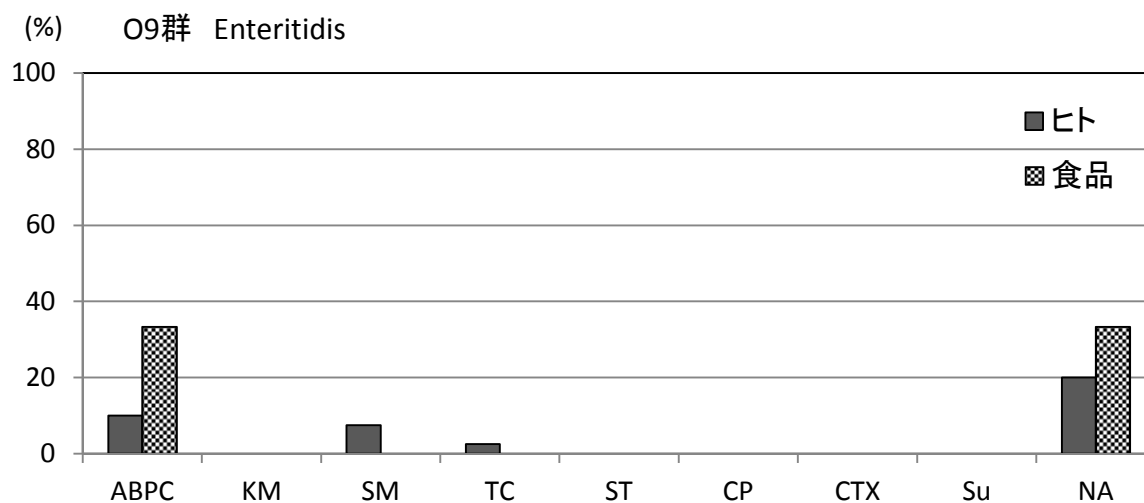
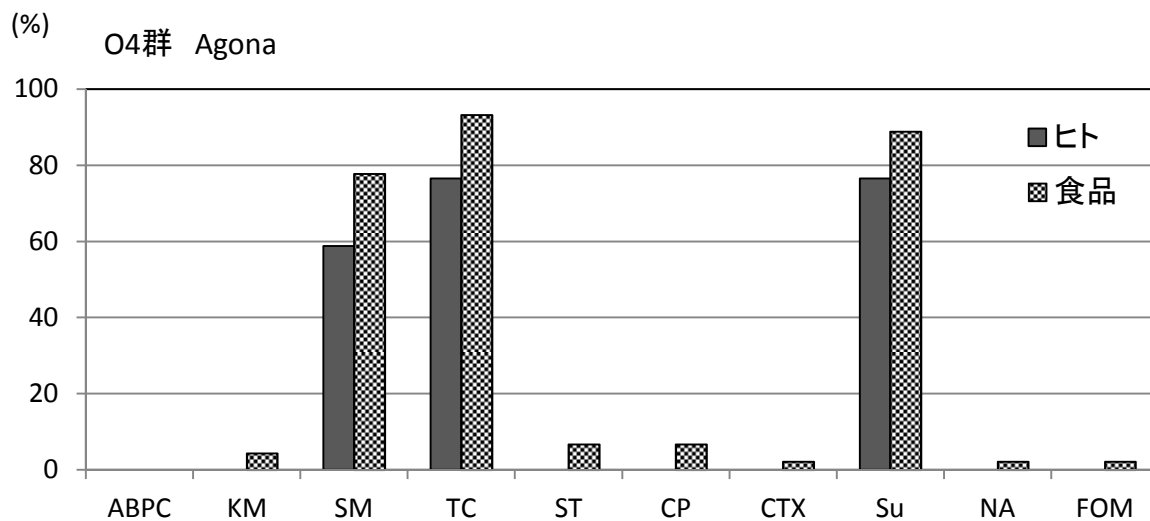


図3-2. 各薬剤に対するサルモネラ血清型別薬剤別耐性率の比較



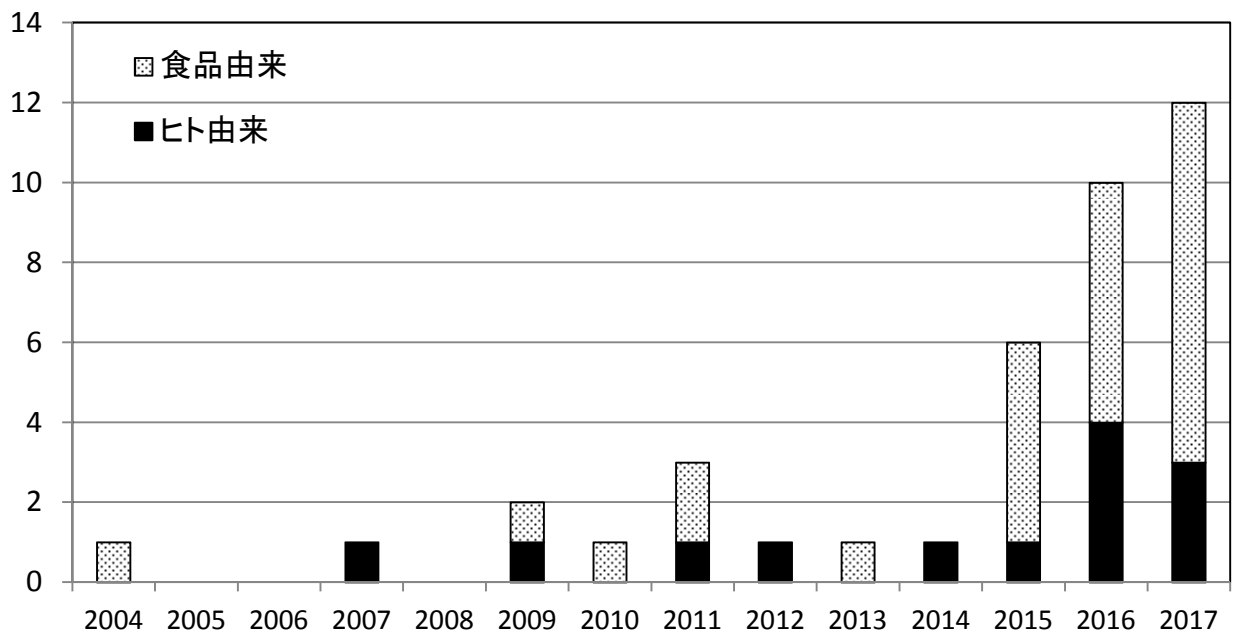


図4. CTX耐性サルモネラの分離状況(東京都)

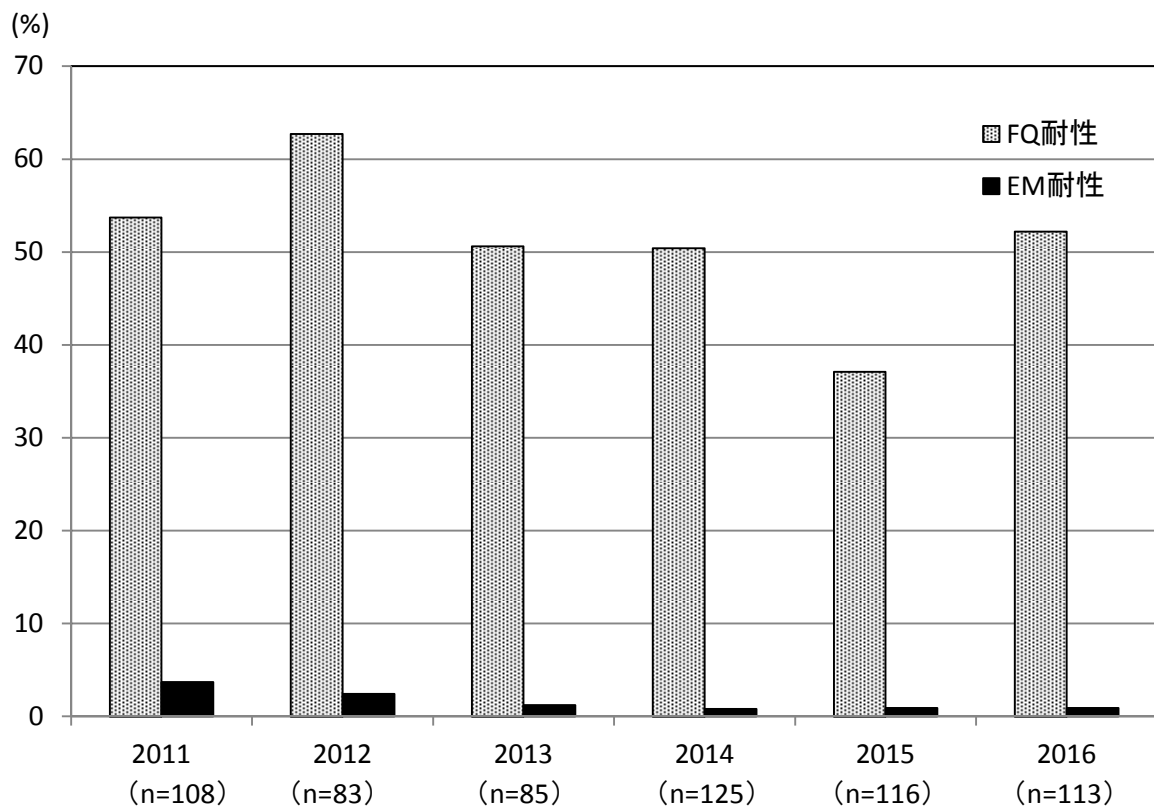


図5. 散発下痢症由来株*C. jejuni*の薬剤感受性試験成績

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

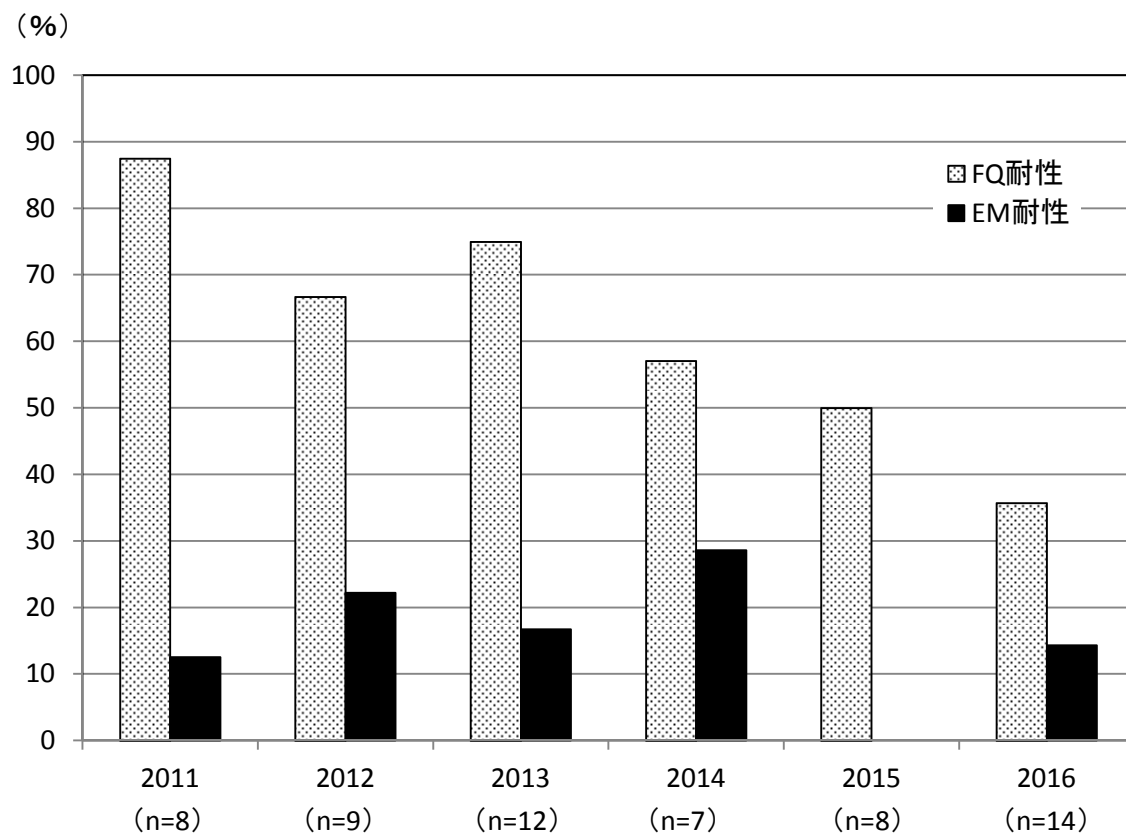


図6. 散発下痢症由来株 *C. coli* の薬剤感受性試験成績
 供試薬剤: ABPC, TC, EM, NA, CPFX, NFLX, OFLX

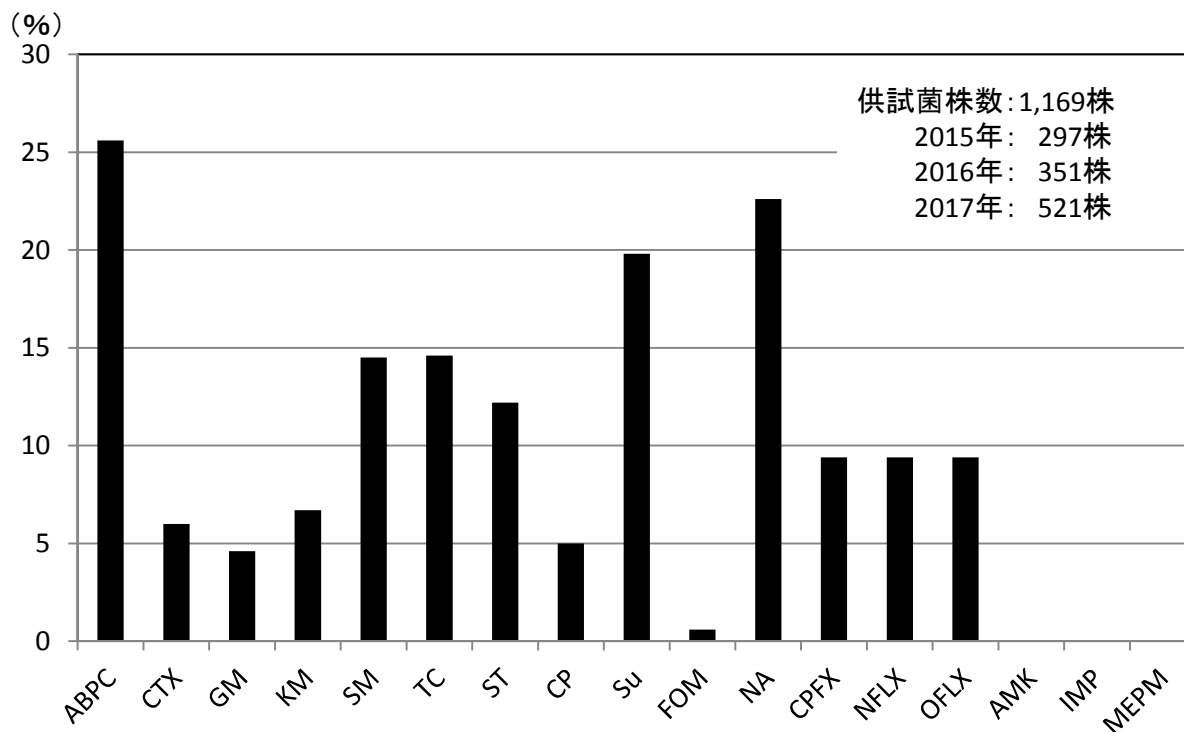


図7. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤別耐性率: 2015~2017年

1薬剤以上に耐性を示した株の割合:
 2015年: 46.1%, 2016年: 37.6%, 2017年: 36.5%

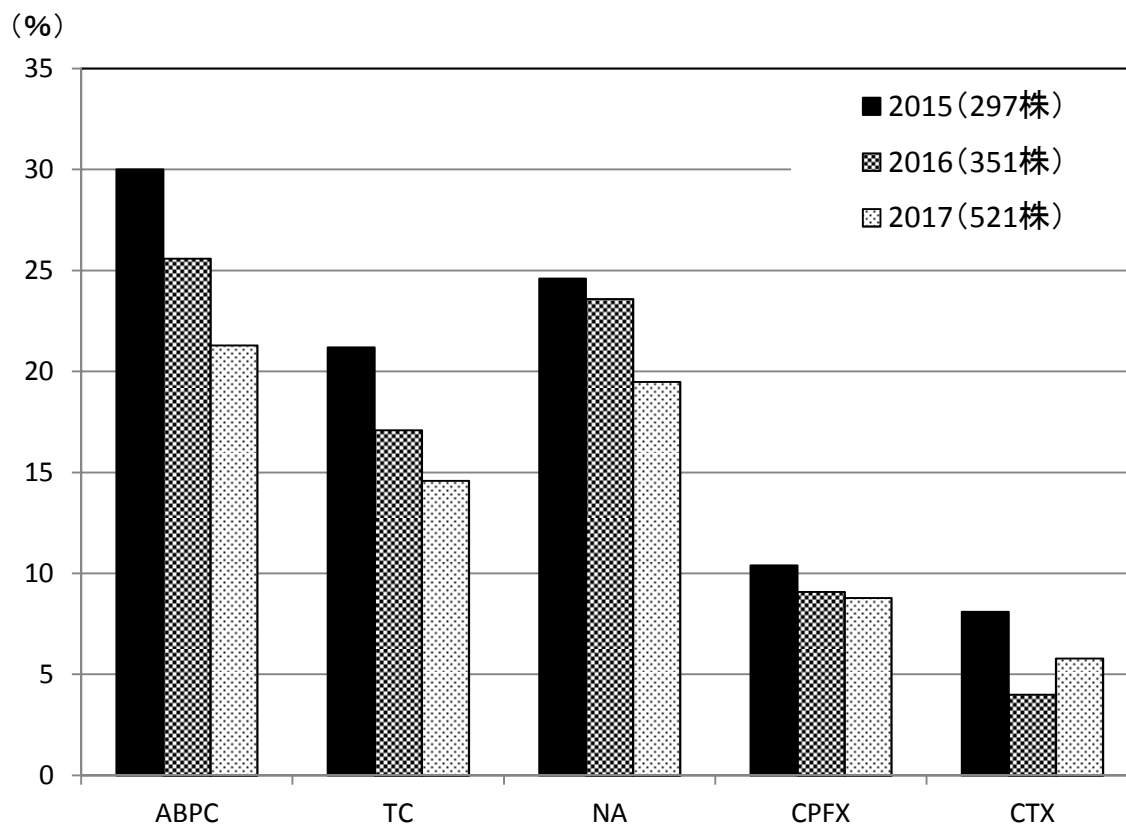


図8. 健康者由来大腸菌の主な薬剤に対する薬剤耐性率の年次変化

表4. 健康者由来ESBL産生大腸菌の遺伝子型

年	供試数	ESBL : CTX M-group				TEM
		M-1	M-2	M-8	M-9	
2015年	22	7	1	1	13	
2016年	12	4		2	6	
2017年	21	10			10	1
合計	55	21	1	3	29	1

表5. 健康者由来大腸菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有状況

年	供試数	陽性数	
		<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>
2015年	85	0	0
2016年	89	0	0
2017年	521	2* (0.4%)	0

* コリスチンに対するMIC(Etest)
 1月分離株 2 µg/ml
 3月分離株 4µg/ml

図9. 鶏肉から分離された大腸菌の薬剤感受性試験結果

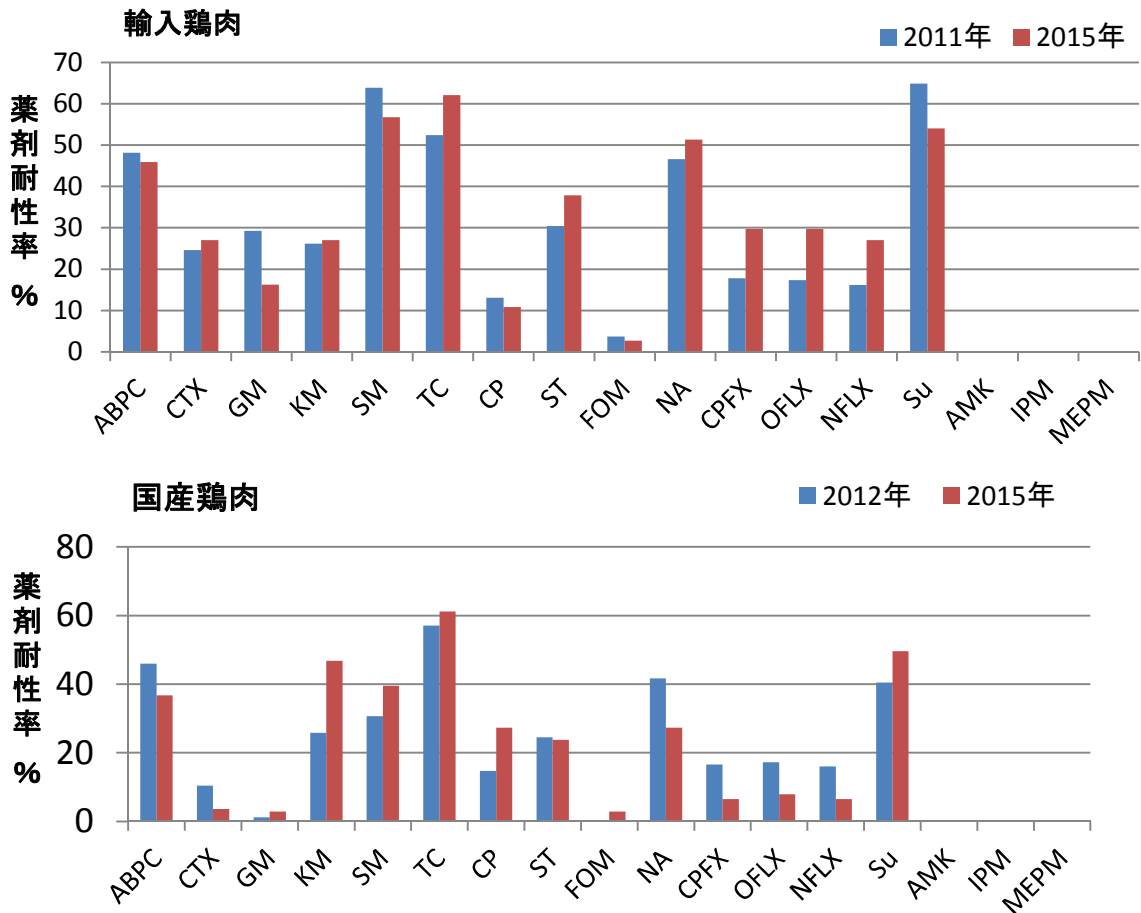


表7. 鶏肉からのβラクタマーゼ産生大腸菌の分離状況と遺伝子型

由来	年度	菌株数	ESBL (%)	AmpC (%)
輸入	2011	191	37 (19.4)	9 (4.7)
	2015	37	10 (27.0)	1 (2.7)
国産	2012	163	9 (5.5)	8 (4.9)
	2015	139	6 (4.3)	1 (0.7)

由来	年度	菌株数	ESBL						AmpC			
			菌株数	CTX-M(グループ)				SHV	TEM	菌株数	CIT CMY-2	不明
				-1	-2	-8	-9					
輸入	2011	191	37		20		16	1		8	8	
	2015	37	10	1	3	3			4	1	1	
国産	2012	163	9	4	2		2	1		7	7	
	2015	139	6	2	2		1		1	1		1

表8. 食肉由来大腸菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*) 保有状況

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(μg/ml)				<i>mcr-1</i>		
						≤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

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 27～29 年度 分担（総合）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	青木敦子	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	松下明子	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 2015-2017 年に分離され、供試したヒト由来サルモネラは 502 株で 78 血清型に型別された。薬剤耐性では 189 株（37.6%）が供試薬剤のいずれかに対して耐性を示した。CTX 耐性は 12 株、フルオロキノロン耐性は 2 株分離された。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 477 株が分離され、薬剤感受性試験では、477 株中 75 株（15.7%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。CTX 耐性株が 4 株分離された。

食品の汚染実態調査では、県内の市場で購入した食肉等 242 検体を供試し、サルモネラは分離された 65 株中 57 株（87.6%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示し、ヒト由来株の 37.6% よりも明らかに高い耐性率であった。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分離された 41 株中 25 株（60.9%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示し、豚内臓肉および鶏レバーから分離された 2 株が EM 耐性であった。また、内臓肉から分離されたサルモネラ 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。

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世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。

4) 動物由来

2015 年から 2016 年にかけて伴侶動物のイヌやネコおよび、「埼玉県アライグマ防除実施計画」に基づき捕獲された野性化アライグマのサルモネラ分離を検討し、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、腸管出血性大腸菌について、2015 年はクロラ

ムフェニコール (CP; 30 μ g)、ストレプトマイシン (SM; 10 μ g)、テトラサイクリン (TC; 30 μ g)、カナマイシン (KM; 30 μ g)、アミノベンジルペニシリン (ABPC; 10 μ g)、ナリジクス酸 (NA; 30 μ g)、セフトキシム (CTX; 30 μ g)、シプロフロキサシン (CPF; 5 μ g)、ゲンタマイシン (GM; 10 μ g)、ホスホマイシン (FOM; 50 μ g)、ノルフロキサシン (NFLX; 5 μ g)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST; 25 μ g)、イミペネム (IMP; 10 μ g)、アミカシン (AMK; 30 μ g)、メロペネム (MEPM; 10 μ g)、スルフィソキサゾール (Su; 250 μ g) の 16 薬剤を供試した。2016-2017 年はスルフィソキサゾール感受性ディスクの供給停止とコリスチン耐性株の検索等により、スルフィソキサゾールを除いた 15 薬剤にセフォキシチン (CFX; 30 μ g)、セフトジジム (CAZ; 30 μ g)、コリスチン (CL; 10 μ g) の 3 薬剤を加えた 18 薬剤を供試した。また、コリスチン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 μ g)、ナリジクス酸 (NA; 30 μ g)、シプロフロキサシン (CPF; 5 μ g)、ノルフロキサシン (NFLX; 5 μ g)、オフロキサシン (OFLX; 5 μ g)、エリスロマイシン (EM; 15 μ 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 2015-2017 年に、散発下痢症患者及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502株は78血清型に型別され、*S. Infantis*が48株と最も多く分離された。次いで*S. Enteritidis*が39株、*S. Chester*が35株であった。

この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502株のうち189株(37.6%)が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された*S. Infantis*は48株中21株(43.8%)、*S. Enteritidis*は39株中20株(51.3%)、*S. Chester*は35株中4株(11.4%)が耐性を示した。

分離株の区分別耐性パターンを2015年は表2に、2016年-2017年は表3に示す。2015年はSM・TC・Su耐性が9株と最も多く、次いでTC耐性が8株であった。しかし、第3世代セフェム系薬剤であるCTXやフルオロキノロン剤に対する耐性菌は分離されなかった。2016年～2017年はSM・TC耐性とSM・TC・ABPC耐性が20株と最も多く分離された。また、CTX耐性株が12株、フルオロキノロン耐性株が2株分離された(表4)。いずれも3剤以上の薬剤に耐性を示した。血清型別に見てみると、*S. Saintpaul*が4株、*S. Blockley*が3株分離され、残りはすべて1株ずつの分離であった。保有耐性遺伝子は*S. Saintpaul*がCTX-M-65、*S. Blockley*はCTX-M-15であった。フルオロキノロン耐性株は2016年と2017年に1株ずつ分離され、血清型はいずれも*S. Kentucky*であったが、その薬剤耐性パターンは異なっていた。

(2) 動物由来サルモネラ

イヌ、ネコおよび野生化アライグマの

サルモネラ保菌状況調査の結果を表5に示す。イヌ224頭およびネコ104頭のいずれからも分離されなかったが、野生化アライグマは349頭中2頭(1.1%)の便からサルモネラが分離された。その血清型は*S. Nagoya*であったが、薬剤感受性は、供試薬剤に対して感受性を示した。

(3) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で2015-2017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6に示した。分離された477株で、O157:H7が279株と最も多く分離され、次いで、O26:H11が130株の順であった。血清型別の各薬剤に対する耐性株数を表7に示す。この表では供試薬剤のいずれにも感受性であったO76:H19等7血清型8株を除く血清型469株の薬剤別の結果を示したが、耐性75株中56株がSM耐性で、次いでABPC耐性が37株、TC耐性が33株であった。CTXとCAZ耐性株が4株検出され、その血清型はO26:H11であった。一方、供試薬剤のうち、CPF、NFLX、IMP、AMK、MEPM、CL、CFXの7薬剤に対する耐性菌は検出されなかった。

(4) 食品からの分離

2015年-2017年にかけて、埼玉県内の市場等で食肉等242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、サルモネラは豚タン・鶏レバー等の内臓肉93検体中40検体、鶏肉47検体中19検体から分離された。カンピロバクターは食肉102検体中2検体、内臓肉93検体中19検体、鶏肉47検体中16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8)。

サルモネラの分離状況を表9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65株中57株(87.6%)が供試薬剤のいずれかに耐性を示し、ヒト由来株の37.6%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、分離された41株中25株(60.9%)が供試薬剤のいずれかに耐性を示し、豚内臓肉および鶏レバーから分離された2株がEM耐性であった(表10)。

食品のESBL産生大腸菌の検索では、鶏肉47検体中11検体から17株、内臓肉93検体中25検体から40株が分離された(表11)。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。

(5) 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89検体中14検体から、サルモネラは6検体から分離された。薬剤感受性はカンピロバクターでは分離された *C. jejuni*28株すべてが感受性であった。サルモネラでは6検体から分離された11株の *S. Infantis* すべてが供試薬剤のいずれかに耐性を示した(表

12)。

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。埼玉県では2003年にCTX耐性腸管出血性大腸菌026:H11が分離され、フルオロキノロン耐性も *S. Typhimurium*(DT193)や *S. Schwarzengrund* が分離された、それ以降、毎年CTX耐性菌やフルオロキノロン耐性菌が分離されている。CTX耐性菌では、保有する耐性遺伝子も多岐にわたり、CTX-M型のみならずAmpC型やCMY-型も分離されている。また、サルモネラではヒト由来株からと食品由来株から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*)の検討では、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 (2015-2017)

O血清型	血清型名	国内		海外	計
		有症者	無症者		
O4	S.Paratyphi B	2			2
	S.Stanley	14(1)	8(1)		22(2)
	S.Schwarzengrund	11(9)	18(13)		29(22)
	S.Saintpaul	16(7)	16(4)		32(11)
	S.Reading	1	1(1)		2(1)
	S.Chester	15(3)	20(1)		35(4)
	S.Sandiego	3(1)			3(1)
	S.Derby		1(1)		1(1)
	S.Agona	6(5)	4(4)		10(9)
	S.Typhimurium	7(6)	3		10(6)
	S.Bredenev		1		1
	S.Brandenburg	1(1)	1		2(1)
	S.Heidelberg	1(1)	1(1)		2(2)
	O4:i:-	20(19)	13(12)		33(31)
	O4:b:-	6	2		8
	O4:d:-		1(1)		1(1)
	O4:eh:-		2		2
O4:-:-	2	1(1)		3(1)	
O7	S.Ohio		1(1)		1(1)
	S.Livingstone		3		3
	S.Isangi	1			1
	S.Braenderup	2	2		4
	S.Rissen		1(1)		1(1)
	S.Montevideo	1	2		3
	S.Oranienburg	1			1
	S.Thompson	9	14		23
	S.Potsdam	1			1
	S.Virchow	1	7(1)		8(1)
	S.Infantis	20(10)	28(11)		48(21)
	S.Bareilly	1	4		5
	S.Mikawasima		1		1
	S.Mbandaka	2	2		4
	S.Tennessee	5	11		16
	O7:eh:-	1(1)			1(1)
	O7:lv:-	1			1
O7:lw:-	1			1	
O7:-:-		4(1)		4(1)	
O8	S.Narashino	1			1
	S.Nagoya	6(1)	11(1)		17(2)
	S.Muenchen	1	6(2)		7(2)
	S.Manhattan	8(7)	13(10)		21(17)
	S.Newport	6	7		13
	S.Kentucky	2(1)	1(1)		3(2)
	S.Blockley	4(4)			4(4)
	S.Litchfield	2(1)	7		9(1)
	S.Corvallis	5(2)	3		8(2)
	S.Albany		3(1)		3(1)
	S.Hadar		2(2)		2(2)
	O8:b:-		1		1
	O8:d:-	1(1)			1(1)
	O8:-:1,5		1		1
O8:-:-	1	1		2	
O9	S.Typhi			7(6)	7(6)
	S.Berta	1			1
	S.Enteritidis	35(18)	4(2)		39(20)
	S.Panama	2			2
O3,10	S.Javiana		1		1
	S.Anatum	3(1)	4(2)		7(3)
	S.Uganda		1		1
	S.Weltevreden	2	2		4
O1,3,19	O3,10:lw:-	2(2)			2(2)
O11	S.Senfenberg		3		3
	S.Aberdeen	1			1
O13	S.Putten	1			1
	S.Havana		1(1)		1(1)
	S.Worthington		1(1)		1(1)
	O13:m,t:-	1			1
O16	S.Hvitvingfoss		1		1
	O16:lw:-	1			1
O18	S.Cerro	1			1
O21	S.Minnesota		1(1)		1(1)
O28	S.Pomona		1		1
OUT	O41:z4,z23,z32:-	1			1
	OUT:r:-		1(1)		1(1)
	OUT:b,en,x	2			2
	OUT:i:1,2		1		1
計	OUT:r:1,7	1			1
	OUT:-:1,7	1(1)			1(1)
計		244(103)	251(80)	7(6)	502(189)

() : 薬剤耐性株数

表 2 ヒトから分離されたサルモネラの薬剤耐性パターン (2015)

	国内		海外	計
	有症者	無症者		
供試菌株数	37	101	1	139
耐性株数	10	33	1	44
(%)	27.0%	32.7%	100.0%	31.7%
薬剤耐性パターン				
SM	3			3
TC	2	6		8
KM		1		1
ABPC		1		1
NA		4	1	5
KM・ABPC	1			1
SM・TC・Su	2	7		9
TC・ST・Su		1		1
SM・TC・KM・Su	1	4		5
SM・TC・ABPC・Su	1	4		5
SM・TC・NA・Su		2		2
SM・ABPC・NA・Su		1		1
TC・ABPC・NA・Su		1		1
SM・TC・KM・NA・Su		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，Su：スルフィソキサゾール

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 (2016-2017)

	国内		海外	計
	有症者	無症者		
供試菌株数	207	150	6	363
耐性株数	93	46	5	144
(%)	44.9%	30.7%	83.3%	39.7%
薬剤耐性パターン				
CP	1			1
SM	10			10
TC	3	2		5
KM	3	2		5
ABPC	2			2
NA	7		4	11
SXT	2	1		3
SM・TC	10	10		20
SM・ABPC	1	1		2
TC・KM		1		1
TC・SXT	2			2
KM・ABPC	4			4
KM・NA		1		1
ABPC・NA	1			1
NA・SXT	1			1
SM・TC・KM	7	6		13
SM・TC・ABPC	12	8		20
SM・TC・NA	1	1		2
SM・TC・GM	1			1
SM・ABPC・NA		1		1
SM・TC・SXT		1		1
NA・CPFX・NFLX		1		1
CP・SM・TC・KM	1			1
CP・SM・TC・ABPC		1		1
CP・SM・ABPC・SXT	1			1
CP・TC・ABPC・NA	1			1
SM・TC・ABPC・NA	4			4
SM・TC・KM・SXT	2	3		5
SM・TC・ABPC・GM		1		1
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	2			2
SM・TC・ABPC・CTX・CFX・CAZ		1		1
CP・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	3			3
CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	3	1		4
CP・SM・TC・ABPC・NA・SXT・CFX		1		1
SM・TC・KM・ABPC・CTX・GM・CAZ		1		1
CP・SM・TC・KM・ABPC・CTX・SXT・CAZ	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：セフォタキシム，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：セフトアジジム，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

No.	OH血清型	血清型名	区分	耐性パターン	備考
1	O8:i:z ₆	Kentucky	無症者	NA・CPFX・NFLX	GyrA S83F+D87N, ParC S80I
2	O8:d:1,2	Muenchen	無症者	SM・TC・KM・ABPC・CTX・GM・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-2
3	O8:k:1,5	Blockley	有症者	CS・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-15
4	O4:i:-		有症者	CS・SM・TC・KM・ABPC・CTX・SXT・CAZ	<i>bla</i> SHV-12, TEM-1D
5	O21:b:en,x	Minnesota	無症者	SM・TC・ABPC・CTX・CFX・CAZ	<i>bla</i> CMY-2 like
6	O8:k:1,5	Blockley	有症者	CS・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-15
7	O8:k:1,5	Blockley	有症者	CP・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-15
8	O4:r:1,2	Heidelberg	有症者	SM・TC・ABPC・NA・CTX	<i>bla</i> CTX-M-2
9	O8:i:z ₆	Kentucky	有症者	TC・ABPC・NA・CPFX・NFLX	
10	O4:eh:1,2	Saintpaul	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65
11	O4:eh:1,2	Saintpaul	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65
12	O4:eh:1,2	Saintpaul	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65
13	O3,10:eh:1,6	Anatum	有症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT・CFX・CAZ	<i>bla</i> DHA-1
14	O4:eh:1,2	Saintpaul	無症者	CP・SM・TC・ABPC・NA・CTX・SXT	<i>bla</i> CTX-M-65

表 5 イヌ、ネコおよびアライグマからのサルモネラ分離状況 (2015-2016)

由来動物	検査数	検出数 (陽性率)	血清型名	薬剤耐性
イヌ	224	0 (0%)	/	/
ネコ	104	0 (0%)	/	/
アライグマ	349	2 (1.1%)	S:Nagoya	感受性

表 6 腸管出血性大腸菌の血清型と毒素型 (2015-2017)

血清型	毒素型			計
	VT1	VT2	VT1&2	
O157:H7		154	125	279
O157:H-	1	15	14	30
O26:H11	104		26	130
O26:H-	2			2
O111:H-	3		5	8
O8:H9		1*		1
O76:H19	1			1
O84:H-	1			1
O91:H14	1			1
O91:H-	3	1		4
O93:H7		1		1
O100:H-		1		1
O121:H19		6	1	7
O128:H2			1	1
O145:H-	1	1		2
O146:H10	1			1
O165:H-			1	1
O186:H2	2			2
OUT:H45		1		1
OUT:H-	2	1		3
	122	182	173	477

*:VT2e

表 7 腸管出血性大腸菌の薬剤別耐性株数 (2015-2017)

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	CAZ	FOM	GM	Su
O157:H7	279	32	18	1	27	16	2	4		1				10
O157:H-	30	8	1		8									
O26:H11	130	16	11	3	6	4	3	2	4	1	4	2		2
O26:H-	2	1	1		1									
O111:H-	8	5	2	2	3	3	2	2						
O8:H9	1	1	1	1	1	1	1	1						
O91:H14	1	1			1	1								1
O91:H-	4	3			2	2								1
O121:H19	7	1	1	1	1	1								
O145:H-	2	2	1		2	2	1	1		1			1	1
O165:H-	1	1				1		1						
OUT:H45	1	1		1	1	1	1	1						
OUT:H-	3	3	1		3	1	2			1				
合計	469	75	37	9	56	33	12	12	4	4	4	2	1	15

表 8 食品からの食中毒菌分離状況 (2015-2017)

検体の種類	検体数	サルモネラ	カンピロバクター
食肉*	102	0	2
内臓肉**	93	40	19
鶏肉	47	19	16
計	242	59	37

*:牛肉・牛挽肉・馬刺し・豚肉

** :豚内臓・豚タン・豚カシラ・鶏レバー

表9 食品からのサルモネラ分離状況 (2015-2017)

検体	検査数	陽性数(株数)	血清型 (耐性株数/検査株数)
食肉	102	0	
内臓肉	93	40 (43)	S.Stanley(0/1) S.Schwarzengrund(5/5) O4:d-(1/1) S.Derby(2/4) S.Agona(1/1) S.Saintpaul(0/1) S.Bredeney(0/1) S.Brandenburg(1/1) O4:i-(15/16) S.Bradford(1/1) S.Infantis(5/5) S.Manhattan(4/4) S.Rissen(1/1) S.Anatum(0/1)
鶏肉	47	19 (22)	S.Schwarzengrund(6/6) S.Infantis(SM,TC)(14/15) S.Manhattan(1/1)

表10 食品からのカンピロバクター分離状況 (2015-2017)

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	102	2	<i>C. jejuni</i> (2)	TC(1) 感受性(1)
豚内臓肉	69	5	<i>C. coli</i> (4)	TC・EM(1) TC(2) 感受性(1)
鶏肉	47	16	<i>C. jejuni</i> (16)	TC・NA・CPFX・NFLX・OFLX(1) NA・CPFX・NFLX・OFLX(8) 感受性(7)
鶏レバー 砂肝	24	14	<i>C. coli</i> (1)	NA・CPFX・NFLX・OFLX(1)
			<i>C. jejuni</i> (17)	NA・CPFX・NFLX・OFLX・EM(1) TC・NA・CPFX・NFLX・OFLX(4) NA・CPFX・NFLX・OFLX(4) TC(2) 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11 食品からのESBL産生大腸菌分離状況 (2015-2017)

検体	検査数	陽性数	保有耐性遺伝子 (株数)
食肉	102	0	
内臓肉	93	25	TEM(9) SHV(1) CTX-M-1group(11) CTX-M-9group(8) TEM,CTX-M-1group(6) TEM,CTX-M-9group(5)
鶏肉	47	11	TEM(2) SHV(4) CTX-M-1group(6) CTX-M-9group(1) TEM,CTX-M-1group(2) TEM,CTX-M-9group(2)

表12 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 (2015-2017)

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	89	6	11	KM・GM(5) TC・KM(1) SM・TC・KM(3) SM・TC・KM・NA(2)
カンピロバクター	89	14	28	感受性(28)

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 27～29 年度 分担（総合）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	石井 良和	（東邦大学医学部 微生物・感染症学講座・教授）
	朝倉 宏	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・部長）
	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）
	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）
	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）

研究要旨

基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌は鶏肉からの分離が高いことが報告されており、鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌が有するプラスミドがヒト腸管内に元來定着している大腸菌に伝播することで ESBL 産生菌の拡散に寄与している可能性が示唆されている。さらに、鶏肉からのバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の検出事例もあり、鶏肉が ESBL 産生菌並びに VRE のヒトへの伝播に最も重要な食品であるとされている。本研究では、ESBL 産生大腸菌については、国産・輸入市販鶏肉、食鳥処理場、採卵鶏農場を対象としての汚染実態を調査すると共に、東邦大学医学部の協力によりヒトからの分離菌株との比較を行い、国内の鶏肉生産環境における ESBL 産生大腸菌の分布状況とその諸性状に関する検討を行った。また、バンコマイシン耐性腸球菌 VRE については、国産・輸入市販鶏肉の汚染実態調査を行い考察した。

平成 27 年度の研究では、国内の市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌および VRE のいずれにも汚染されている実態を明らかにし、ESBL 産生大腸菌はヒトへの当該菌の伝播には鶏肉が最も重要である可能性が示唆された。一方、VRE は鶏肉から高頻度で検出されたものの、臨床上で重要視される VRE による汚染は少ないと考えられた。

平成 28 年度には、ESBL 産生大腸菌株が保有する IncI1 プラスミドの分子疫学的傾向について検討を行った。その結果、鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌の多くがヒト由来 ESBL 産生大腸菌で多く認められる遺伝子を保有していた。また、IncI1 プラスミドの多くが CC-3 に分類され、これらが接合伝達性を示したことから、ヒトへの伝播に CC-3 型 IncI1 が関与している可能性が示唆された。一方、VRE では、分離株のほとんどがヒト臨床分離株の遺伝特性との差異が認められたことから、ヒト健康危害の影響は少ないと想定されたが、ヒトへの危害となり得る VRE が鶏肉から検出された事例が少なからずとも存在するため、今後も市販鶏肉における VRE の危害分析を継続する必要があると考えられる。

平成 29 年度には、食鳥処理場、採卵鶏農場を対象として ESBL を中心に汚染実態を調査し、分離された菌株の性状を明らかにした。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ことが示された。

2010 年および 2012 年にヒト由来（健常ボランティア糞便および患者）およびブラジル産鶏肉より分離された $bla_{CTX-M-8}$ 陽性大腸菌の遺伝学的関連性を明らかにするため、全ゲノム解析と $bla_{CTX-M-8}$ プラスミドの全長塩基配列の決定を行った。ヒトおよびブラジル産鶏肉由来の $bla_{CTX-M-8}$ 陽性大腸菌は multilocus sequence typing (MLST) により、それぞれ異なる sequence type (ST) に属していた。一方、それらの大腸菌が保有した $bla_{CTX-M-8}$ 搭載プラスミドは全て IncI1 型であった。それらのプラスミドは全長が酷似していた。また、これらのプラスミドはブラジルの下水由来大腸菌から検出された $bla_{CTX-M-8}$ プラスミドとも酷似していた。以上のことから、本邦のヒトから分離される

*bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が保有する *bla*_{CTX-M-8} はブラジルに由来すると考えられた。

A. 研究目的

食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメントに必要な基礎となるデータの収集を行うことを目的とした。食品としては鶏肉を対象とした。鶏肉に汚染の認められる基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は、第三世代セフェム系抗菌薬を分解する代表的な院内感染症起因菌の一つである。環境、食品及びヒトからの ESBL 産生菌の分離に関する文献情報を調べ、食品を介した人への伝播に関する危害分析を行った。その結果から、鶏の ESBL 産生大腸菌が、鶏肉を通じヒトへの伝播に重要であることが判明した。また、ESBL 産生菌は、菌株自体の直接伝播ではなく、ESBL 産生遺伝子を含むプラスミドがヒト腸内細菌へ伝播することで ESBL 産生菌の拡散に大きく寄与する可能性が示唆されている。

また、鶏肉は ESBL 産生菌だけではなく、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の保菌リスクも報告されている。国内の輸入鶏肉より VRE が検出された事例が報告されており、鶏肉を介して直接的にヒトへ伝播・拡散すると示唆されている。さらに、VRE はヒトへ伝播した後、ヒト腸管内に定着する可能性も危惧されている。

国産・輸入市販鶏肉を対象として ESBL 産生大腸菌および VRE の汚染実態を調査すると共に、ESBL 産生大腸菌株が保有する IncI1 プラスミドの分子疫学的傾向について検討を行った。

2010 年、ブラジルを中心に南米から報告されている、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ: ESBL のひとつである CTX-M-8 をコードする *bla*_{CTX-M-8} が陽性の大腸菌が健常ボランティアから分離された。2012 年に市販ブラジル産鶏肉から ESBL 産生大腸菌の分離を試みたところ、分離された ESBL 産生大腸菌は *bla*_{CTX-M-2} と *bla*_{CTX-M-8} 陽性株が約半数ずつを占めていた。本研究では、健常ボランティアと市販ブラジル産鶏肉由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌の遺伝学的関連性を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

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 (供試検体数 50 検体) 又は VRE (17 検体) を分離した。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もも肉に限定した。ESBL 産生大腸菌の分離には 1µg/mL セフトキシム含有マッコンキー寒天培地及びクロモアガー ESBL を用い、VRE では 1µg/mL バンコマイシン含

有 Enterococcosel 寒天培地 (BD) 及びクロモアガー・VRE スクリーン (関東化学) を用いた。分離された ESBL 産生大腸菌及び VRE 菌株は、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に供した。

ESBL 産生大腸菌株については、プラスミドレプリコン型の同定及び IncI1 の pMLST 型別を行った。これらの方別結果は、Plasmid MLST databases (<https://pubmlst.org/plasmid/>) におけるヒトおよび鶏由来株との比較を行った。

食鳥処理場における検体及び検体採取では、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。

採卵鶏農場における検体及び検体採取では、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な鶏群) 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。

ESBL 産生大腸菌の分離及び遺伝子型の同定では、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 をスタマック袋に入れ (計 150g)、150mL の緩衝ペプトン水を加え、1 分間スタマック処理を行い (スタマック検体)、鶏肉スタマック検体 2 mL に 8mL の CTX (1mg/L) 加緩衝ペプトン水とよく混合し、100 µL を CTX (1mg/L) 加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°C で 1 日間培養した。また、残りの混合検体を 37°C で 1 日間増菌培養後、100 µL を CTX (1mg/L) 加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°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、スタマック検体 50mL を 200mL の緩衝ペプトン水と混合し、37°C で 1 日間増菌培養後、100 µL を CTX (1mg/L)

加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°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 μ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°Cで1日培養した。また、残りの混合検体を37°Cで1日間増菌培養後、100 μ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°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。

カンピロバクターの分離及び薬剤耐性パターンの同定では、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°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°Cで1日間微好気培養後、1白金耳をmCCDAに塗抹し、42°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（CPF）及びクロムフェニコール（CP））のMICを測定した。薬剤耐性感受性試験は、各鶏群につき、1菌種1株について実施した。

サルモネラの分離及び薬剤耐性パターンの同定では、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°Cで1日培養後、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°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°Cで1日培養した。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°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°Cで1日間培養した（遅延二次培養）。鶏肉については、スタック検体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）、セフォタキシム（CTX）、GM、カナマイシン（KM）、SM、TC、NA、CPF、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。

コリスチン耐性大腸菌の分離及び耐性遺伝子の同定では、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 μ L、クロモアガー・COL-APSEに塗抹し、37°Cで1日培養した。37°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。

2010年から2013年にかけて分離されたヒト由来*bla*_{CTX-M-8}陽性大腸菌6株（健康ボランティア：5株、患者1株）、ブラジル産鶏肉由来*bla*_{CTX-M-8}陽性大腸菌4株の合計10株を供試した。DNAはドラフト全ゲノム解析には次世代シーケンサーのMiSeq（Illumina）を用いた。MiSeqで解読するDNAライブラリの調整にはNextera XT DNA Sample Preparation Kit v2（Illumina）を用いた。MiSeq reagent kit v3, 600 cycles（Illumina）を用いて300bp \times 2のペアエンドリードでDNAライブラリの解読を行った。*de novo* assemblyにはCLC genomics workbench（QIAGEN）を用いた。

MiSeqの短解読塩基長では*bla*_{CTX-M-8}搭載プラスミドの全長を明らかにすることができなかったため、それらの解読には長解読塩基長のPacBio RS（Pacific Biosciences）を用いた。PacBio RSで解読するDNAライブラリの調整には、DNA Template Prep kit, version 1.0を用いた（Pacific Biosciences）。DNA/Polymerase Binding Kit P5、MagBeads、および1つのSMRT（single-molecule, real-time）cellを用いて180分間の動画を撮影した。PacBio RSデータの*de novo* assemblyにはa hierarchical genome assembly process（HGAP, version 3.0）を用いた。薬剤感受性遺伝子の網羅的検索にはResFinder 3.0を用いた。（<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>）MLST解析はMLST 1.8（<https://cge.cbs.dtu.dk//services/MLST/>）を用いて行った。プラスミドの不和合性（Inc/rep type）型別にはPlasmidFinder 1.3（<https://cge.cbs.dtu.dk//services/PlasmidFinder/>）を用いた。プラスミド塩基配列のアノテーションにはDDBJ Fast Annotation and Submission Toolを用いた。（DFAST, <https://dfast.nig.ac.jp/>）

プラスミド塩基配列の比較と図示にはEasyFig

(<http://mjsull.github.io/Easyfig/>) を用いた。比較対象とした塩基配列は公共データベース GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) よりダウンロードした。

(倫理面への配慮)

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従い、適切な管理を行った。

C. 研究結果

市販鶏肉の ESBL 産生大腸菌の陽性率は全体で 76.0%であり、国産・輸入鶏肉の別ではほぼ同等の陽性率を示した (有意差なし [P>0.05])。ESBL 産生大腸菌は計 45 株分離され、国産鶏肉由来株では blaCTX-M-1 及び blaCTX-M-15 の両遺伝子を保有する割合が 42.4%であり、輸入鶏肉由来株に比べ、高い傾向であった。一方、輸入鶏肉由来株では、blaCTX-M-2 遺伝子を保有する割合が 50.5%と高い傾向であった。保有する耐性遺伝子の傾向を、国内鶏肉と輸入鶏肉で比較したところ、有意な差は認められなかった (P>0.05)。耐性遺伝子を保有する菌株を対象としてβラクタム系以外の薬剤に対する感受性を調べたところ、テトラサイクリン耐性が 81.6%と最も多く、続いてカナマイシン耐性 (63.2%)、ストレプトマイシン耐性 (55.3%) であった。フルオロキノロン系薬剤であるシプロフロキサシンでは、28.9%と比較的高い割合で耐性が認められた。これらの菌株の諸性状を比較したところ、購入店別または産地別による偏りは認められなかった。さらに、分離菌株を PFGE 型別した結果、全体的に類似性は乏しく、各分離菌株は異なるものであることが示された。プラスミドレプリコン型は、IncF が 64.4%、IncFIB が 55.5%、IncI1 が 31.1%認められた。blaCTX-M-1 及び blaCTX-M-15 を併せ持つ分離菌株では、IncI1 が 73.3%の割合で認められた。分離菌株が保有する IncI1 のプラスミドサイズはほぼ同等であり、100kb 前後であった。

調査した市販鶏肉の VRE はの陽性率は全体で 63.6%であり、国産・輸入鶏肉の別ではほぼ同等の陽性率を示した (有意差なし [P>0.05])。しかし、分離された 22 株のほとんどが *E. gallinarum* であり、vanC1 遺伝子を保有していた。*E. faecium* 及び *E. faecalis* は同定されず、vanA 及び vanB の両遺伝子も検出されなかった。分離菌株のバンコマイシンに対する MIC は、2~8µg/mL と低い傾向であった。また、バンコマイシン以外の薬剤に対する感受性を調べたところ、テトラサイクリン

耐性が 95.5%と最も多く、続いてカナマイシン耐性 (81.8%)、ストレプトマイシン耐性 (54.5%) であった。フルオロキノロン系薬剤であるシプロフロキサシンでは、4.5%に耐性が認められたが、ほとんどが感受性であった。これらの菌株の諸性状と PFGE 型より、各分離株は異なるものであることが示された。

食鳥処理場では、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 鶏群が調査対象となり、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。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。

採卵鶏農場では、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。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 CPFX (NA を含む) の 28% (8/30) であった。ただし、農場の 2 鶏群とも CPFX 耐性株であった農場はなく、CPFX 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 CPFX 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 CPFX 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。なお、図表等の詳細なデータについては、各年度の総括研究報告書に示した。

市販ブラジル産鶏肉由来およびヒト由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌の Multilocus sequence typing (MLST) の結果において、共通する sequence type (ST) あるいは clonal complex (CC) に属する大腸菌はなかった。一方、由来が異なる大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドの完全長塩基配列を決定したところ、全て IncI1 型であった。それらのプラスミドの比較解析の結果、全長が酷似していた (図 1)。また、これらのプラスミドはブラジルの下水由来大腸菌から検出された *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドとも酷似していた (図 1)。

由来	管理番号	年	ST	CC
ブラジル産鶏肉	TUM12355	2012	7285	-
	TUM 12357	2012	10	10
	TUM 12358	2012	10	10
	TUM 12368	2012	648	648
健常人	TUM 10828	2010	69	69
	TUM 11352	2011	131	131
	TUM 11353	2011	2278	131
	TUM 13936	2013	4387	-
	TUM 13937	2013	4387	-
臨床分離株	TUM 13754	2012	127	127

表 1. 大腸菌の由来、分離年度、sequence type (ST)、および clonal complex (CC)

D. 考察

国内の市販鶏肉から ESBL 産生大腸菌が 76.0% と高率で分離され、他の報告と比べても高い陽性率であった。また、分離菌株の多くが、ヒト由来 ESBL 産生大腸菌で比較的多く認められる CTX-M-1 型と CTX-M-2 型であり、さらに、近年の流行型として危惧されている CTX-M-15 型の存在も認められた。これは、市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌に汚染されている実態を示す成績であると共に、ヒトへの ESBL 産生大腸菌の伝播には鶏肉が重要である可能性が考えられ、鶏肉からヒトへの伝播リスクが示唆された。

CTX-M-1 及び CTX-M-15 産生大腸菌は、プラスミドレプリコン型として Inc I1 を保有する傾向が認められた。IncI1 は ESBL 産生遺伝子との関連が強く示唆されており、本邦においてもこれらの関連性と共に接合伝達性プラスミドである可能性が示唆された。IncI1 プラスミドの MLST 型を決定

し、ヒト由来及び鶏由来 IncI1 プラスミドと比較解析を行うことで、ESBL 産生菌の拡散機構を明らかにした。

市販鶏肉中の VRE として 63.6%の陽性率が認められたが、いずれも *E. gallinarum* であると共に vanC1 遺伝子を保有していた。臨床上で重要視されている VRE は、vanA 又は vanB 遺伝子を保有する *E. faecium* 及び *E. faecalis* であり、本邦では検出されなかった。しかし、今回用いた供試検体数が少ないことから、今後さらに多くの検体を対象として市販鶏肉における VRE の危害分析を行う必要があると考えられる。

食鳥処理場の調査では、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つたとも考えられる。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 CPFX 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。

今回の食鳥処理場及び肉用鶏農場の調査結果は、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。

ブラジル産鶏肉およびヒト由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌は異なる ST に属していたことから、ブラジル産鶏肉を汚染する *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が直接ヒト腸管へ定着したとは考えられなかった。一方、いずれの由来の大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドは酷似していたことから、ブラジル産鶏肉由来大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドがヒト腸管内に定着する大腸菌へ伝達された可能性が示唆された。また、それらのプラスミドはブラジルの下水から分離された大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドとも全長構造が酷似していたことから、本邦のヒトより分離された *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} はブラジルに由来することが強く示唆された。

E. 結論

国内の市販鶏肉の調査からは、国内・国外産市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌に汚染されていると共に、ヒトへの ESBL 産生大腸菌の伝播には鶏肉が最も重要である可能性が示唆された。また、接合伝達性プラスミドによる鶏肉からヒトへの伝播

リスクも推測された。一方で、臨床上で重要視されるVREによる汚染は少ないと考えられたが、今後さらなる危害分析を行う必要があると考えられた。

食鳥処理場及び肉用鶏農場の調査結果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。

ヒト分離株の検討では、本邦のヒトから分離される *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が保有する *bla*_{CTX-M-8} はブラジルに由来すると考えられた。

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) 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

1) 山本詩織、朝倉 宏、岡田由美子、吉田麻利江、五十君静信：国内の市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌の分布状況と保有プラスミドの諸性状について、第89回日本細菌学会総会、2016年3月、大阪
2) 山本詩織、吉田麻利江、岡田由美子、朝倉 宏、

五十君静信：市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌及びVREの汚染実態と分離株の遺伝特性について、日本防菌防黴学会第43回年次大会、2016年9月、東京
3) 山本詩織、朝倉 宏、岡田由美子、吉田麻利江、

五十君静信：国内の市販鶏肉由来ESBL産生大腸菌が保有するIncI1プラスミドの分子疫学的傾向とその特性について、第90回日本細菌学会総会、2017年3月、宮城

4) 朝倉宏、山崎栄樹、小西良子、五十君静信、山本茂貴：細菌学領域における基礎と臨床のクロストークセッション-カンピロバクター・ジェジュニが顕す生存・生息のための環境応答。第90回日本細菌学会学術総会。2017年3月。宮城

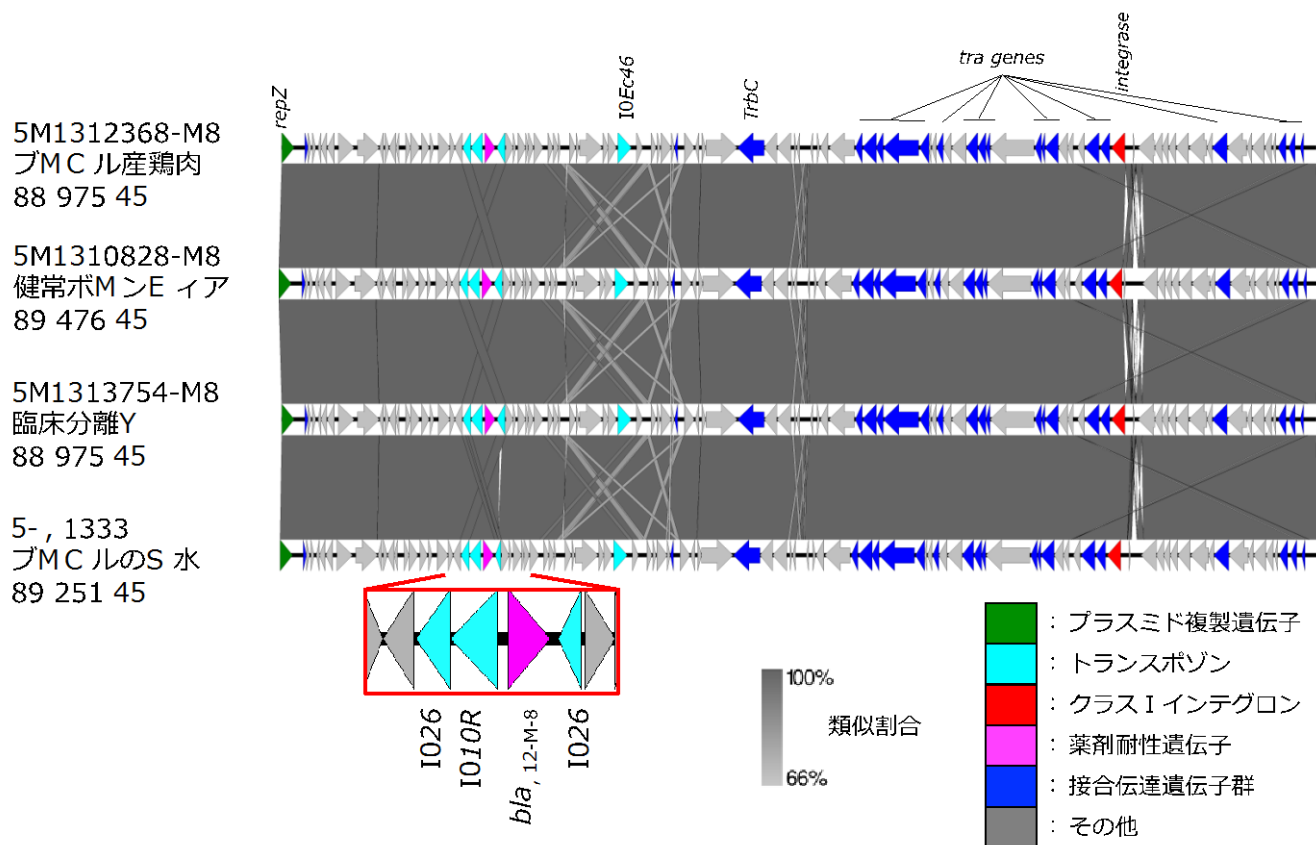
5) Yoshikazu Ishii, Kotaro Aoki Ayaka Kusano, Yukihiro Akeda, Shoua Nakamura, Daisuke Motooka, Kazuhori Tomono, Tsuyoshi Sekizuka, Tetsuya Iida, Makoto Kuroda, Kazuhiro Tateda. 2017. June 16. Spreading of the *bla*_{CTX-M-8} carrying plasmid in human was mediated by its possessed *Escherichia coli* contaminated chicken meat; a public health concern. 13th beta-lactamase meeting, Santo Stefano di Sessanio, L' Aquila, Italy.

6) 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

図1. 由来が異なる大腸菌が保有した blaCTX-M-8 搭載プラスミドの完全長塩基配列比較



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 27～29 年度 分担（総合）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

厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)と農林水産省家畜由来耐性菌モニタリングシステム(JVARM)とを連携させ、人由来細菌と家畜由来細菌の薬剤耐性の動向を容易に比較できるようにした。大腸菌の情報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で耐性率の年次推移のデータを公開することとなった。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、人と家畜の相関は明らかでない。今後、ゲノム等の詳細な解析が求められる。また、WHO は 2015 年に Global Antimicrobial Surveillance System(GLASS)を立ち上げ、2017 年から各国に薬剤耐性に関するデータの提出を求めた。この研究班において、GLASS が求めるデータをまとめ提出した。GLASS は検体別、性別、年齢別に層別化したデータを求めており、そのデータを GLASS が指定するデータ形式で提出する必要があるため、集計ならびに GLASS 提出ファイル作成のツールを作成した。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* のデータについては、JANIS のデータベースから必要なデータを抽出し解析した。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、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。作成したツールを用いて各菌種について集計を行い、データを GLASS に提出した。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 では JANIS 参加病院がそれぞれで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。

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 のデータと比較できるようにする。さらにその情報を公開する。

また、WHO は国際的な薬剤耐性サーベイランス Global Antimicrobial 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 に提出する。

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。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結果のデータについても同様に 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するツールを作成し解析を行った。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)

該当なし。

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。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。また大腸菌については、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、薬剤耐性の年次推移を比較する図を作成し(図 1 (a)から(d))、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。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* のデータを抽出した。GLASS の集計は通常 JANIS の集計とは全く異なるため、別途にプログラムを作成して解析した(図 2)。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。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。その他、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た。地方衛生研究所が作成している集計ファイルから、GLASS が求めるデータフォーマットのファイルを作成するツールを作成し、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が容易にできるようになった。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、データを提出した当初、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いる点を説明し、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ないことを説明した。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。

食品では地方衛生研究所がサルモネラ、EHEC、キャンピロバクターなどを分離培養し、薬剤感受性試験を実施しているが、現在は各所がそれぞれに集計して公表している。各地方衛生研究所で標準化された収集方法や集計法を作成し、データを集積していく必要があると考えられる。

E. 結論

JVARM ならびに地方衛生研究所が集計している薬剤感受性試験結果のデータをもとに、JANISが通常作成しているレポートと同じ形のアンチバイオグラムが作成できるようにした。また、大腸菌についてはJANISとJVARMのデータの年次推移を比較した図を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した。

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。

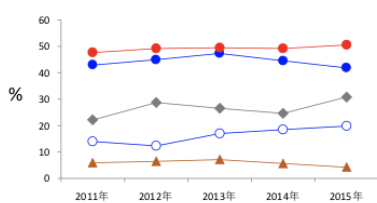
2. 学会発表
Keigo Shibayama. National Surveillance system for Antimicrobial Resistance and Adaptation of GLASS in Japan. 20th General Meeting of The Korean Society for Clinical Microbiology, 2017年7月6日、韓国扶余

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

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1(a) 大腸菌 ABPC の耐性率の年次推移

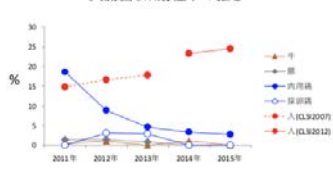
大腸菌CEZ耐性率の推移



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1(b) 大腸菌 CEZ の耐性率の年次推移

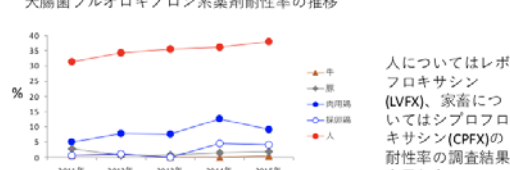
大腸菌CTX耐性率の推移



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1(c) 大腸菌 ABPC 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。

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。

図1(d) 大腸菌 CEZ の耐性率の年次推移

Extraction of data from JANIS database for GLASS

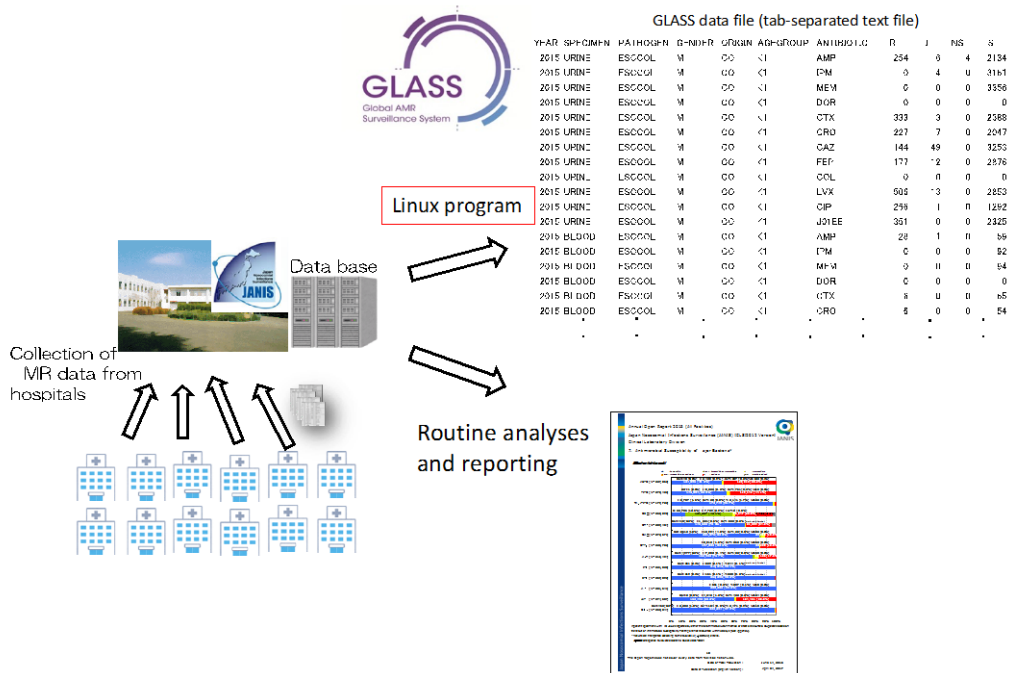


図2 JANIS データベースから GLASS 提出データの作成の流れ。JANIS データベースから、GLASS が要求する集計項目を抽出し、集計して GLASS が指定するデータフォーマットのファイルを作成し、提出した。

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、散发例の把握、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 および 2015 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

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 株数は年間 2010-2011 年は 600 株程度、2012-2015 年は 100-200 株程度であった。

血清型としては、 Enteritidis,

Infantis, Typhimurium, 04:i:-, Schwarzengrund, Manhattan, Thompson, Braenderup, Saitpaul, Oranienburg, Montevideo, Paratyphi B Java, Newport, Nagoya, Weltevreden, Chester, Agona (頻度上位から列記) 等が見られた。Enteritidis が約 40%を占め、Braenderup までの頻度上位 8 血清型で 75%程度を占めていた。

薬剤感受性試験の結果、なんらかの薬剤に耐性を示す割合は各血清型株で大きく異なった。

Enteritidis (09)	29%
Infantis (07)	83%
Typhimurium (04)	56%
04:i:- (04)	49%
Schwarzengrund (04)	94%

04 群に属す 04:i:-、Schwarzengrund、Typhimurium の薬剤耐性の分布を図 1 に示す。

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と面談し、検便検体全体における NTS 陽性率についての情報を得た。2011 年から 2014 年において、約 0.06%から 0.09%程度であった。また、NTS 全体における薬剤耐性株の頻度は、ST 合剤に対する耐性が約 11%、ABPC 耐性 6%、ミノサイクリン耐性 4-5%、セファロsporin耐性 3-4%、フルオロキノロン耐性が 1%未満であった。この検査会社において保存されている菌株数は 2013 年 1199 株、2014 年 1191 株、2015 年 1224 株と多数に上ることが判明した。

血清型別は実施されていないが、0 型の分類からは 07 群が 44%、04 群が 28%、09 群は 3%(2014 年)であることが示された。2011 年から 2014 年の間に 07 群は減少傾向が認められる一方で、04 群の増加傾向が認められた。

そこで、2013 年および 2015 年に分離された 04 群の供試を受け、H 型別及び薬剤感受性試験を行った。2013 年分離株は 207 株、2015 年分離株は 300 株であった。

2013 年株、2015 年株とも、Schwarzengrund、04:i:-、Saintpaul が上位で、56%を占めた。それ以外の主要な血清型は、2013 年は Typhimurium、Agona、Derby、Stanley であり、2015 年株では Brandenburg、Chester なども同定された (図 2)。

上記血清型における薬剤耐性の分布として、いずれの薬剤にも感受性であった株の頻度は

Bredeney	100% (2013 年、2015 年)
Chester	100% (2015 年のみ)
Stanley	88% (2013 年)、82% (2015 年)
Saintpaul	74% (2013 年)、82% (2015 年)
04:i:-	8% (2013 年)、5% (2015 年)
Schwarzengrund	9% (2013 年)、6% (2015 年)

において低かった (図 3、図 4)。

全体の耐性率の高い薬剤は

TC	45% (2013 年)、51% (2015 年)
SM	41% (2013 年)、46% (2015 年)

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 (2013-2015 年にかけてそれぞれ 78-86%、68-76%)。ABPC は 04:i:-、Typhimurium において耐性率が高かった (76-79%、52-63%)。KM は Schwarzengrund において耐性率が高かった (70-69%)。

2015 年株と 2013 年株を株数で比較すると、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 (図 5)。

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 SM/TC、SM/TC/KM 耐性株の増加が見られた (図 6)。

04:i:-については、株数にわずかな増加が見られた一方、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、

ASTKCS_x、ASTKZ_m 耐性パターンも 2015 年のみに観察された (図 7)。

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。

健康保菌者由来サルモネラ 04 群菌 507 株の解析の結果、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 が上位を占め、他に Typhimurium、Agona、Derby、Stanley などが同定された。Chester など、一方の年にのみ同定された血清型も存在した。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。

2013 年から 2015 年にかけて、Schwarzengrund、Saintpaul、Stanley が大きく増加していた。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られる。

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1 感染研保存株（2011-2015）O4群薬剤耐性率

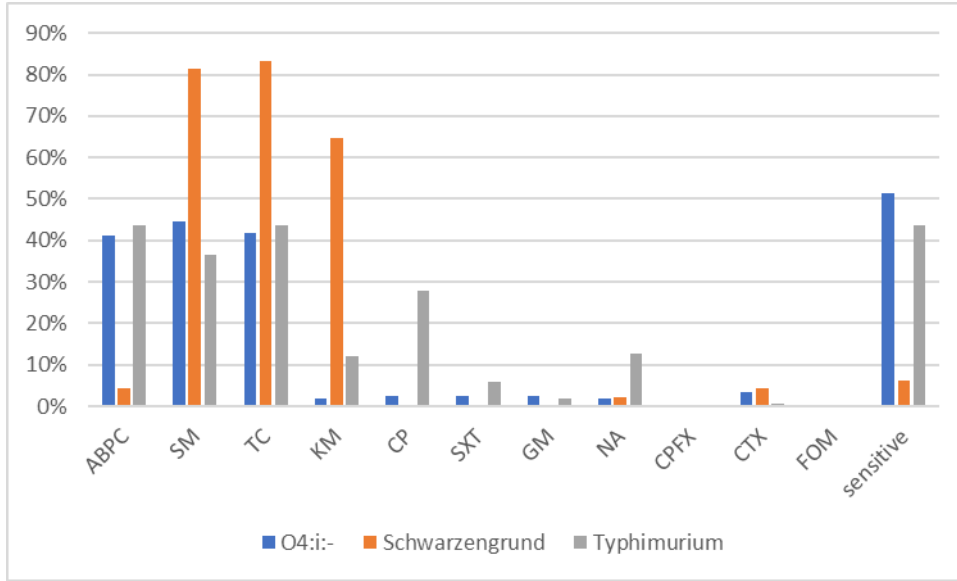


図2 サルモネラO4群 健康保菌者由来株の血清型分布（左 2013年、右 2015年）

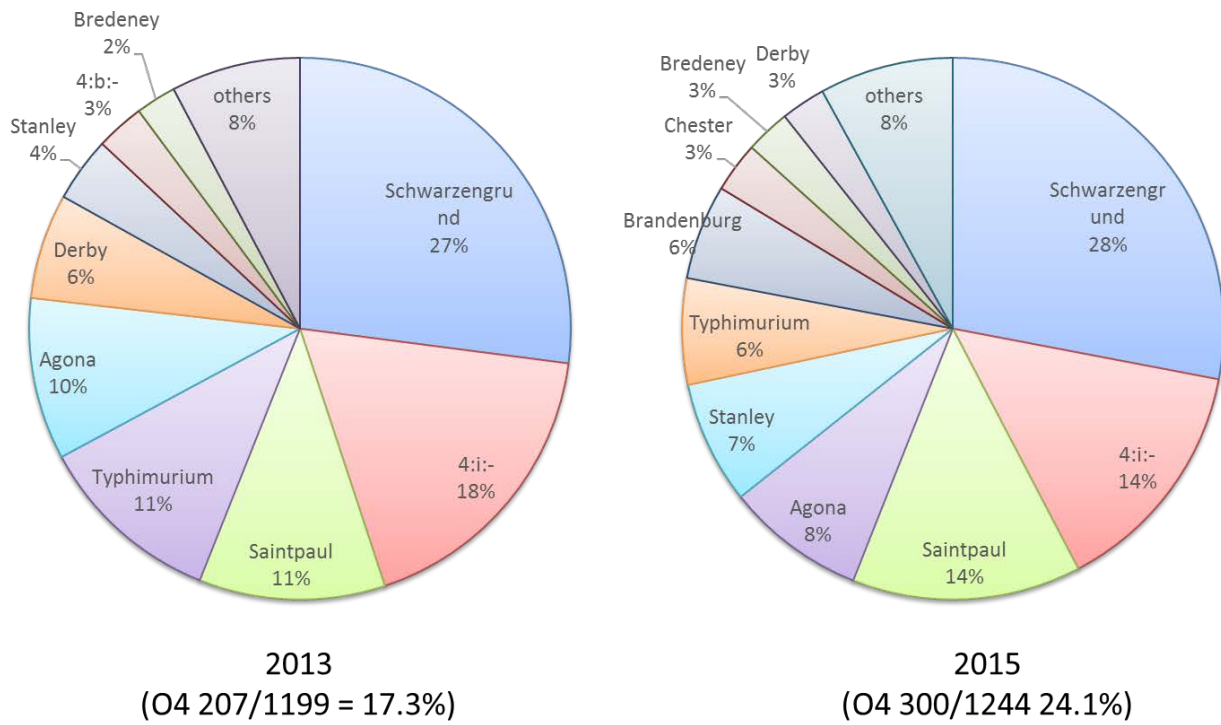


図3 サルモネラ04群 健康保菌者由来株(2013年)の耐性率

2013年株耐性率

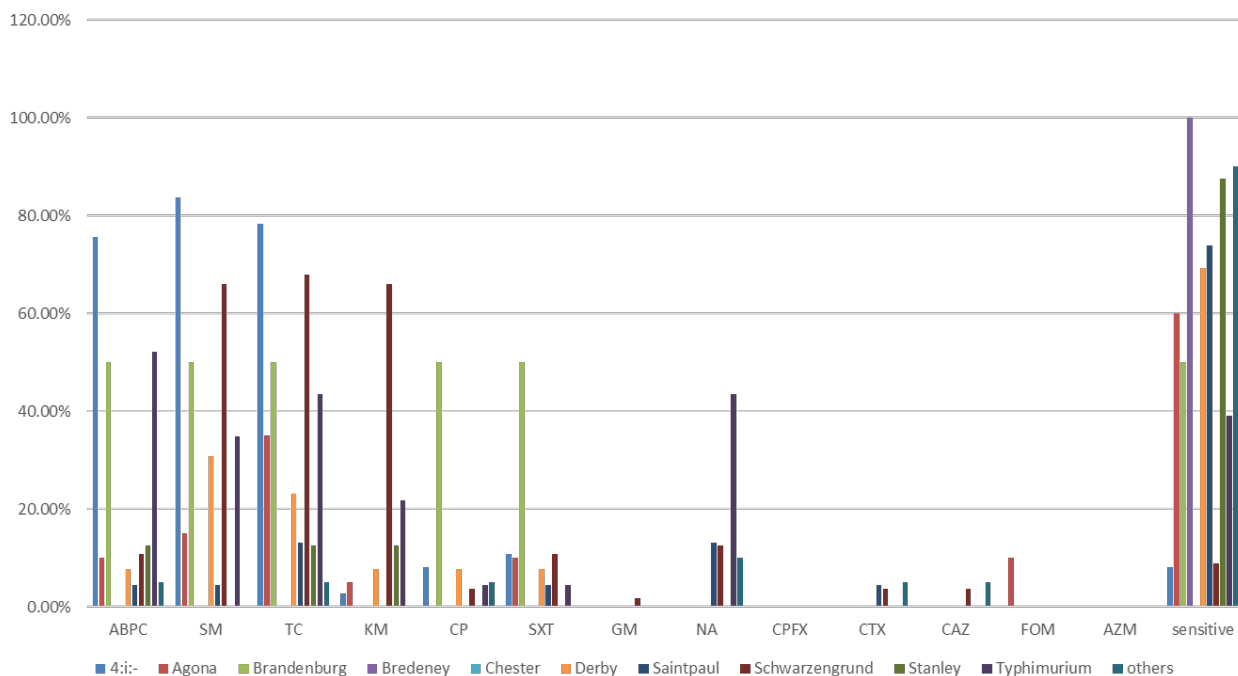


図4 サルモネラ04群 健康保菌者由来株(2015年)の耐性率

2015年耐性率

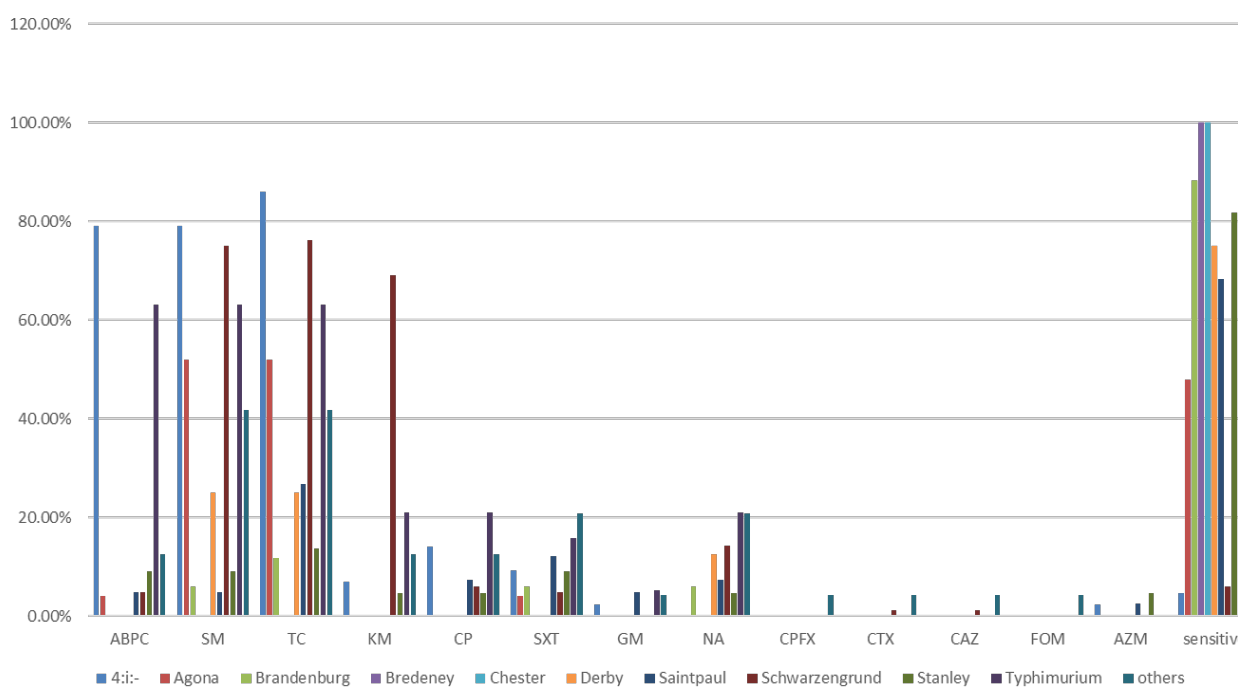


図5 サルモネラ04群 健康保菌者由来株の血清型分布（2013年、2015年株数による比較）

2013, 2015年比較(株数)

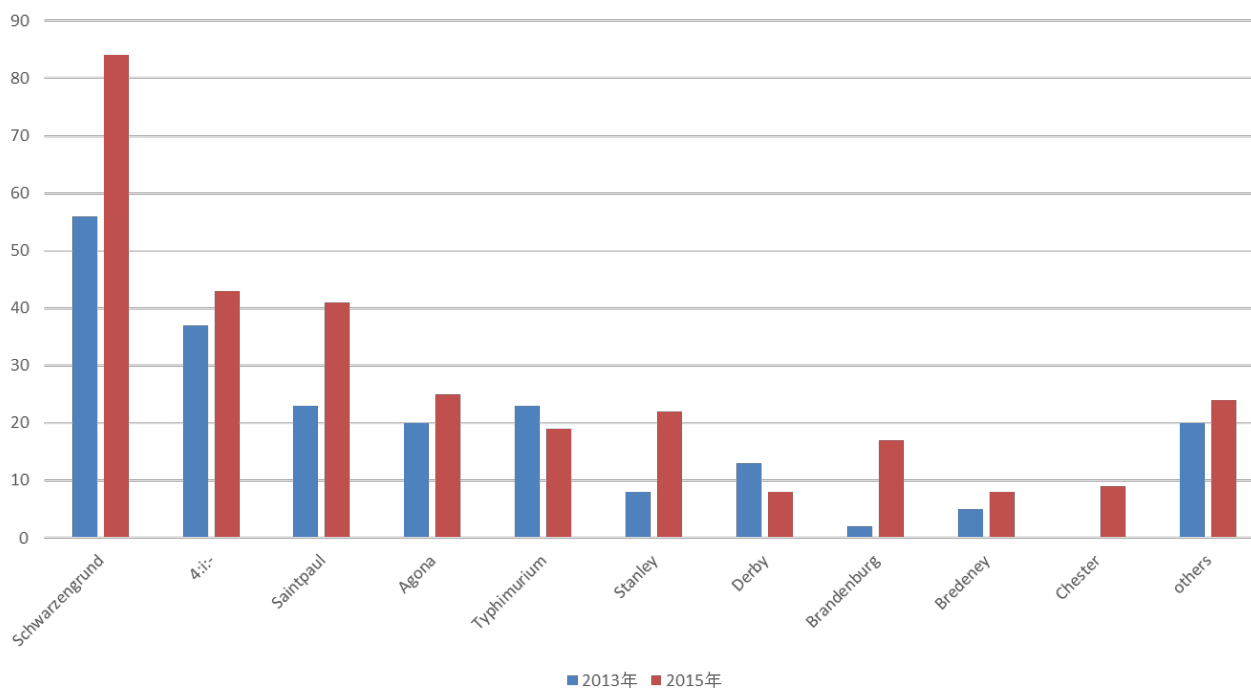


図6 *Salmonella* Schwarzengrund の薬剤耐性パターン

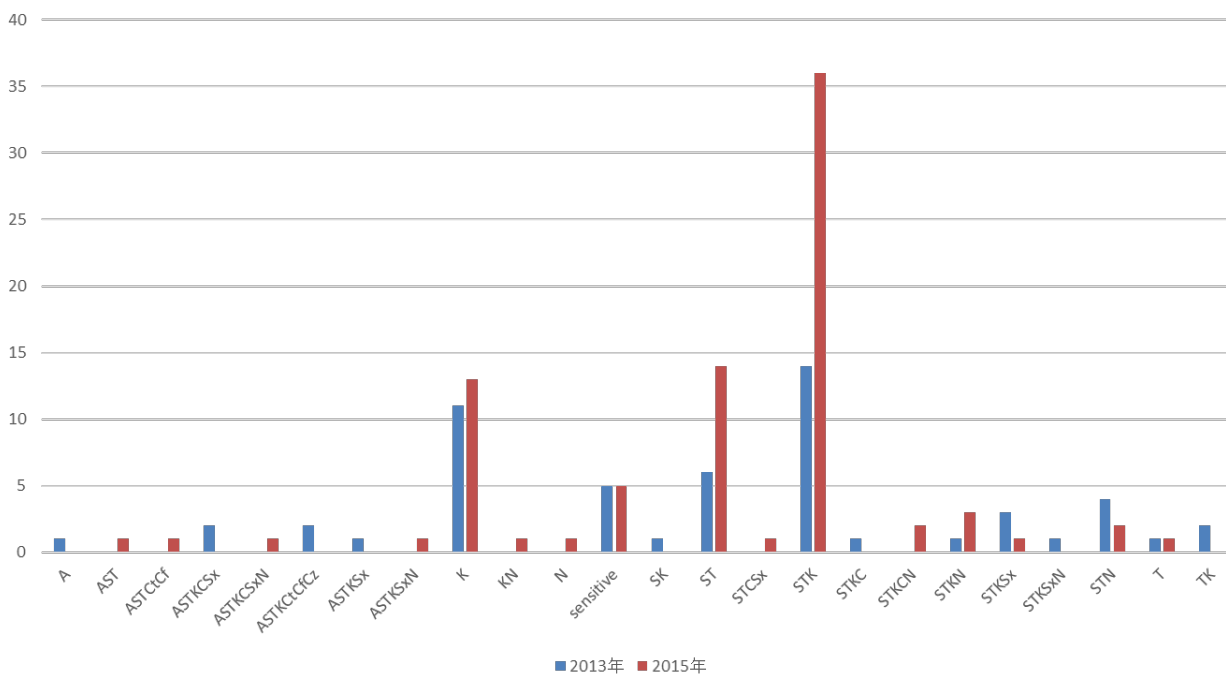
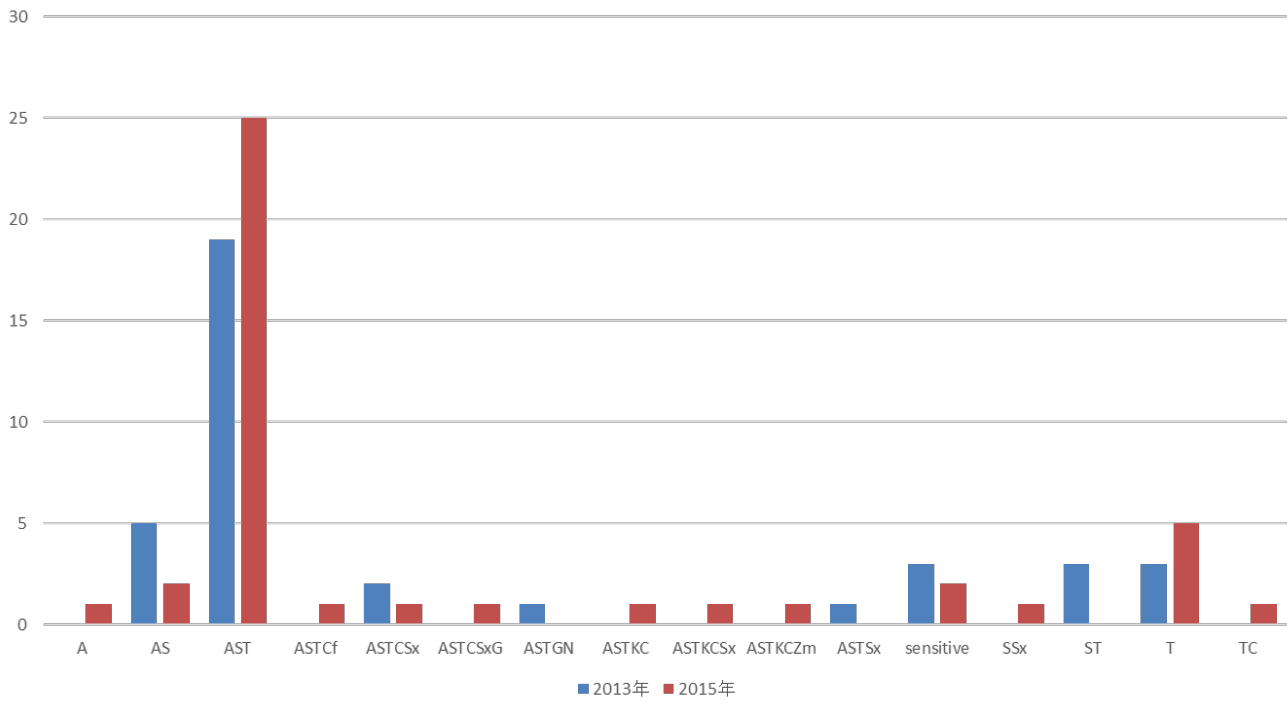


図7 *Salmonella* 04:i:- の薬剤耐性パターン



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 27～29 年度 分担（総合）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（鶏肉）検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。平成 27 年度は 151 検体（国産 90、輸入 61）、28 年度は 226 検体（国産 150、輸入 76）、29 年度は 198 検体（国産 110、輸入 88）検体をそれぞれ収集し、3 年間で合計 575 検体（国産 350、輸入 225）を調査した。鶏肉検体からの ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の分離頻度は年度や生産地によって異なるものの、いずれかの菌が検出される頻度は 25%から 98%と高頻度であった。特に国産鶏肉からの分離頻度が輸入鶏肉からの分離頻度と比較し、高い傾向にあった。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型、CTX-M 型+TEM 型、TEM 型が多く、輸入肉では CTX-M 型が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入共に CTX-M2 が最も多く、次いで国内産では CTX-M1 が多いのに対し、輸入肉では CTX-M8/25 が多く分離された。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の多くは大腸菌、一部は *Klebsiella pneumoniae*（肺炎桿菌）であった。少数だが ESBL 産生サルモネラ属菌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たことから、耐性遺伝子の多くは伝達性プラスミド上に存在することが示された。プラスミドレプリコン型は多様であった。2017 年収集のブラジル産鶏肉 1 検体から伝達性 *mcr-1* を保持するコリスチン耐性大腸菌が検出された。また 2015 年と 2017 年に収集したブラジル産鶏肉検体から VanA 型高度耐性 VRE (*E. faecium*) 株が検出された（検出率はそれぞれ 2.6%、4.8%）。さらに VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が国内産鶏肉検体から 3 年間継続して検出された（検出率はそれぞれ 2.2%、0.7%、2.7%）。これら食肉由来 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 β -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。 β -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。平成 29 年度の本調査では、食肉検体からのコリスチン耐性腸内細菌科細菌の検出も行なった。

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、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（2016 年に宮崎から送付された検体が乾燥していたため、40 検体を追加収集した）。海外食肉は各年度に検疫所で取り扱う輸入鶏肉、輸入量にあわせを収集した。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 3 ml で一夜培養し、0.1 ml を二種類の薬剤添加 DHL 寒天培地（CAZ を 1 mg/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 1 μg/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 0.1 ml 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 0.1 ml 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 シークエンス解析（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・検出のために平成 27 年度は 151 検体（国産 90、輸入 61）、28 年度は 226 検体（国産 150、輸入 76）、29 年度は 198 検体（国産 110、輸入 88）検体をそれぞれ収集し、3 年間で合計 575 検体（国産 350、輸入 225）を調査した（表 1）。尚、国内産鶏肉の拭き取りスワブとして収集した検体のうち、2015 年鹿児島からの検体が乾燥していたため、菌の増殖が認められず、解析データ数からは除いた。また 2016 年宮崎からの検体もやや乾燥しており、菌の増殖が少なかったため、再度の収集を行い、解析した（40 検体追加）。

鶏肉検体からの ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の分離頻度は図 1-1、図 1-2、図 1-3 に示されるように、年度や生産地によって異なるものの、耐性菌が検出される頻度は 25% から 98% と高頻度であった。特に国産鶏肉からの分離頻度が輸入鶏肉からの分離頻度と比較し、高い傾向にあった。

耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型、CTX-M 型+TEM 型、TEM 型が多く、輸入肉では CTX-M 型が多かった（図 2-1、図 2-2、図 2-3）。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入共に CTX-M2 が最も多く、次いで国内産では

CTX-M1 が多いのに対し、輸入肉では CTX-M8/25 が多く分離された (図 3-1、図 3-2、図 3-3)。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された (図 4-1、図 4-2、図 4-3)。これら食肉由来多剤耐性腸内細菌科細菌の多くは大腸菌、一部は *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌) であった (図 5-1、図 5-2、図 5-3)。少数だが ESBL 産生サルモネラ属菌が国内産鶏肉から検出された。

鶏肉由来 ESBL 産生株と AmpC 産生株 (2016 年分離の 70 株および 2017 年分離の 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。それぞれの年度で 52.9%、59.0% の分離株が薬剤耐性伝達能を示したことから、耐性遺伝子の多くは伝達性プラスミド上に存在することが示された (表 2-1、表 2-2)。耐性型では ESBL 型耐性よりも AmpC 型耐性の方が伝達性を示すものが多かった。得られた接合伝達株 (2016 年分離の 37 株、2017 年分離の 102 株) の保持するプラスミドレプリコン型は多様であった (表 3-1、3-2)。

2) コリスチン耐性大腸菌の検出

2017 年に収集した食肉 198 検体を用いた。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。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。

3) VRE の検出 (図 6、図 7、表 4、表 5)

食肉からの VRE 検出結果を、年度毎に表 4 に示す。高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が 2015 年のブラジル産鶏肉 1 検体、および 2017 年のブラジル産鶏肉 3 検体から検出された (表 4-1、表 4-3)。それぞれ検出率は、ブラジル産鶏肉の 2.6% と 4.8% であった。これらの VRE 株と過去にブラジル産鶏肉から分離された VanA 型 VRE 株の PFGE パターンを図 6 に示す。一方、国内産鶏肉検体から 3 年間継続的に VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された。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 (図 7 および表 5 の GU121-1 株)。本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、過去に我々が分離した VanN 型 VRE 株 *E. faecium* 株と極めて類似の PFGE パターンを示した (図 7)。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 5)。これらの結果は今回継続的に検出されている VanN 型株が以前に国産食肉から分離された株と同一の起源を

持つことを示している。また 2015 年と 2017 年の収集のそれぞれ 1 検体から型別不明の低度バンコマイシン耐性株が分離された。

D. 考察

ESBL/AmpC 産生株の調査において毎年、国内外産いずれの食肉検体からも比較的高頻度に多剤耐性菌が検出された。特に国内産鶏肉検体からの分離頻度は輸入食肉検体からの検出率よりも高い傾向にあった。検体処理の状況及び輸送形態の違いによることが考えられるものの、ESBL/AmpC 産生多剤耐性菌 (主に大腸菌) の鶏肉検体への付着汚染が確認された。少数ではあるものの 2016 年と 2017 年収集食肉 (国内産) から多剤耐性サルモネラ属菌が検出されたことから、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ことから国内流通食肉の汚染動向の調査は重要である。

VRE に関しては、過去の調査ではしばしばブラジル産鶏肉から臨床で問題となる VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出されていた。今回も分離頻度は低いものの (2015 年 2.6%、2017 年 4.8%)、以前と同様に VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された。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激減したものの、いまだに限局した地域での汚染が持続していることが示唆される。一方で日本の鶏肉検体から、同一の宿主遺伝子型を持つ VanN 型 VRE 株が継続的に分離されている。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 VanN 型 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が、フランスでは患者の血流感染症の起因菌となった中等度耐性株の報告もあり、VRE の感染対策上は環境調査の対象とすべきである。

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) が比較的高頻度で検出された。調査期間後半

2年続けてESBL産生サルモネラ属菌が国内産食肉から、また採集年度にコリスチン耐性大腸菌が輸入食肉（ブラジル産）から検出されており、今後の動向に注意する必要がある。高度耐性VREについては一部の地域（ブラジル産）で少数の分離のみであり、環境中の汚染状況が改善していることが示された。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) Kurushima J, Ike Y, Tomita H. Partial Diversity Generates Effector Immunity Specificity of the Bac41-Like Bacteriocins of *Enterococcus faecalis* Clinical Strains. *Journal of Bacteriology*. 198:2379-2390. (2016).
- 2) 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) 野村隆浩、谷本弘一、久留島潤、柴山恵吾、渡邊治雄、富田治芳. 日本で新たに分離されたVanN型VREの解析. 第88回日本細菌学会総会. 2015年3月27日 岐阜.
- 2) 野村隆浩、谷本弘一、富田治芳. 新たに日本で分離されたVanN型VREについて. 第26回日本臨床微生物学会. 2015年2月1日 東京.
- 3) 千葉菜穂子、谷本弘一、野村隆浩、富田治芳. ESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌の鶏肉からの

分離. 第44回薬剤耐性菌研究会. 2015年10月30日 仙台.

- 4) 大竹洋輔、千葉菜穂子、谷本弘一、富田治芳. 鶏肉からのESBL、AmpC産生腸内細菌科細菌の分離と解析. 第10回若手コロッセウム. 2016年8月1日 草津.
- 5) 杉岡佳祐、富田治芳. 食肉由来腸球菌のバシトラシンなどの抗菌性飼料添加物に対する耐性と多剤耐性伝達性プラスミドとの関係について. 第10回若手コロッセウム. 2016年8月1日 草津.
- 6) 橋本佑輔、久留島潤、野村隆浩、谷本弘一、富田治芳. 腸球菌のVanB型バンコマイシン耐性に関する研究. 第10回若手コロッセウム. 2016年8月1日 草津.
- 7) 久留島潤、富田治芳. *Enterococcus faecalis* プラスミドにコードされるバクテリオシンBac41の多様性と免疫特異性. 第10回若手コロッセウム. 2016年8月1日 草津.
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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. 調査検体数(毎年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
2015年	0 (30*)	30	30	60 (90*)
2016年	30	80**	40	150
2017年	30	40	40	110

* 輸送中スワブが乾燥し、菌が検出されなかったことから本解析データから除いた

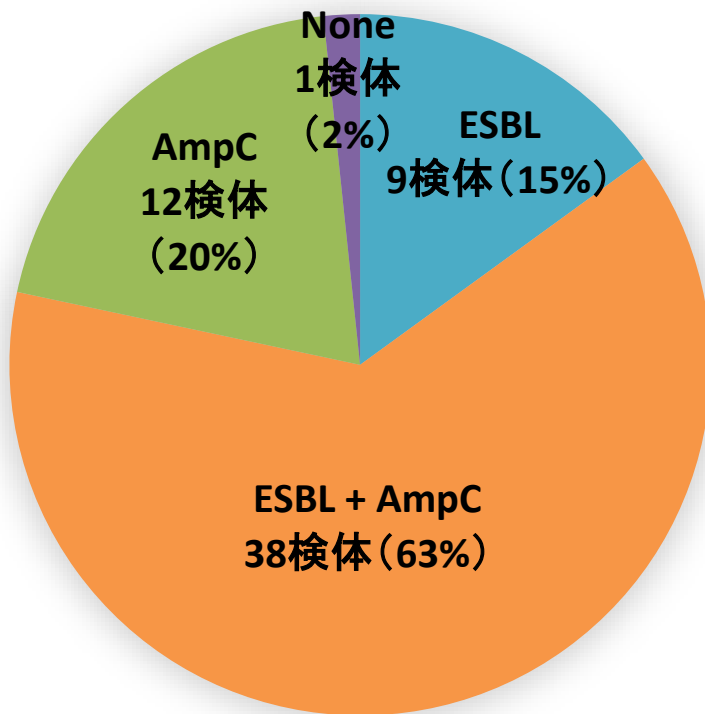
** スワブがやや乾燥していたため、40検体を追加収集した

輸入鶏肉(ミンチ肉)

	ブラジル	米国	タイ	フィリピン	デンマーク	合計
2015年	39	8	8	6	0	61
2016年	38	20	8	8	2	76
2017年	63	13	11	1	0	88

図1-1. 2015年に収集した鶏肉検体における
ESBL / AmpC産生株の分離頻度

国内（60検体）



輸入（61検体）

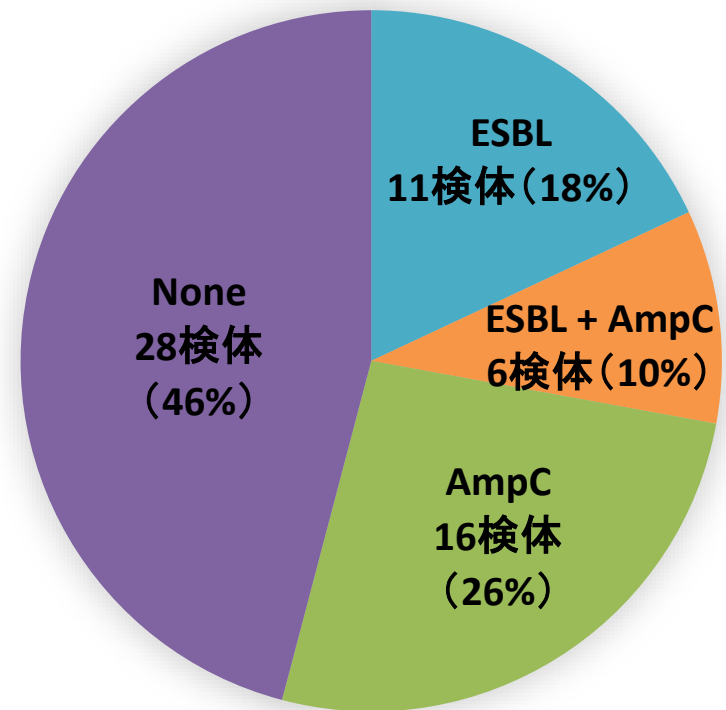


図1-2. 2016年に収集した鶏肉検体における
ESBL / AmpC産生株の分離頻度

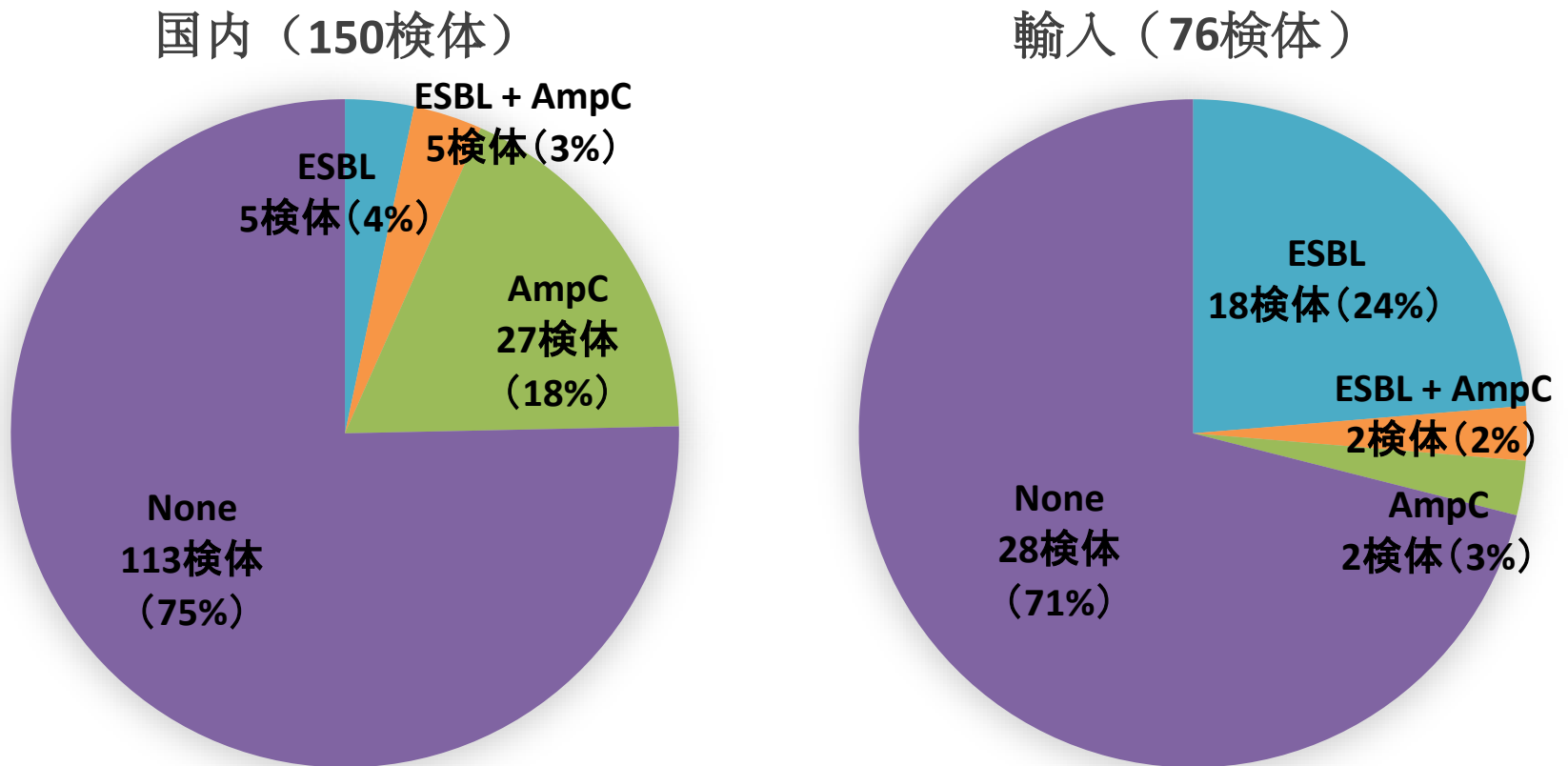
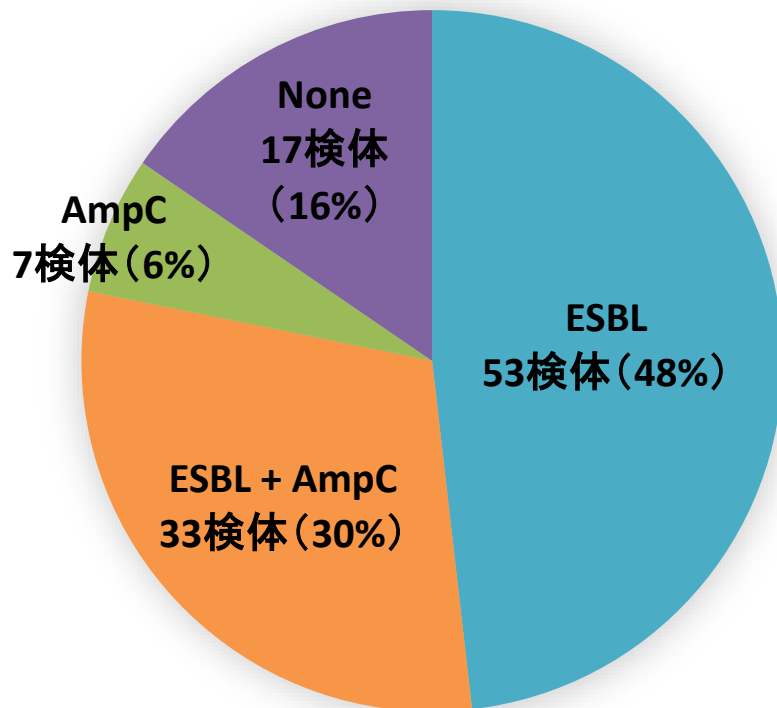


図1-3. 2017年に収集した鶏肉検体における
ESBL / AmpC産生株の分離頻度

国内（110検体）



輸入（88検体）

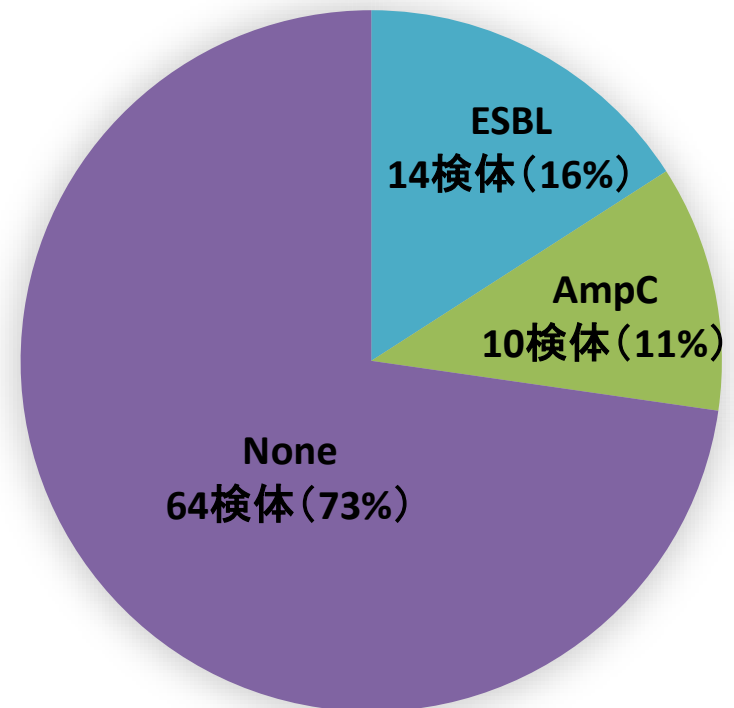


図2-1. 2015年分離のESBL産生株の耐性遺伝子型別

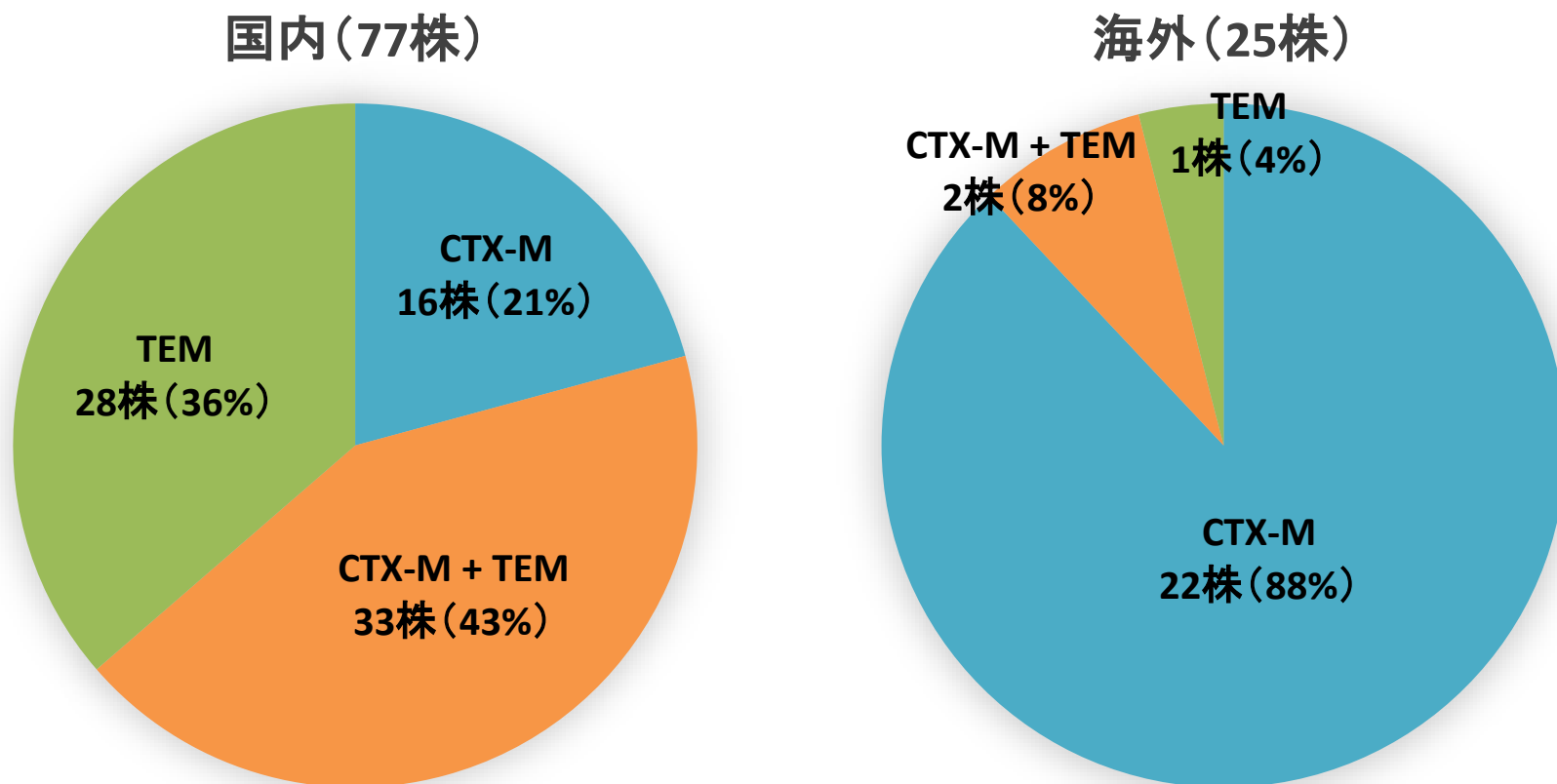


図2-2. 2016年分離のESBL産生株の耐性遺伝子型別

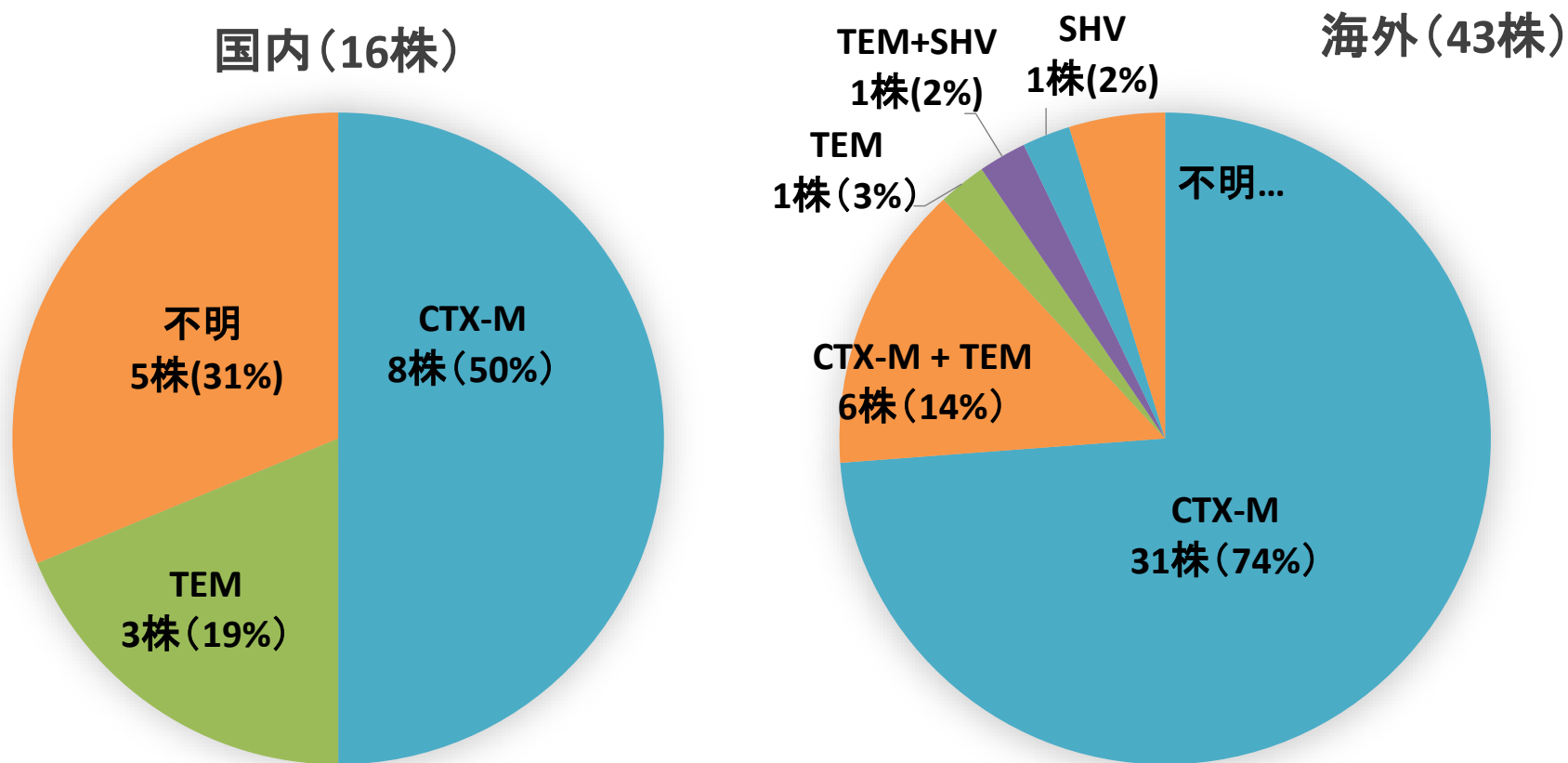


図2-3. 2017年分離のESBL産生株の耐性遺伝子型別

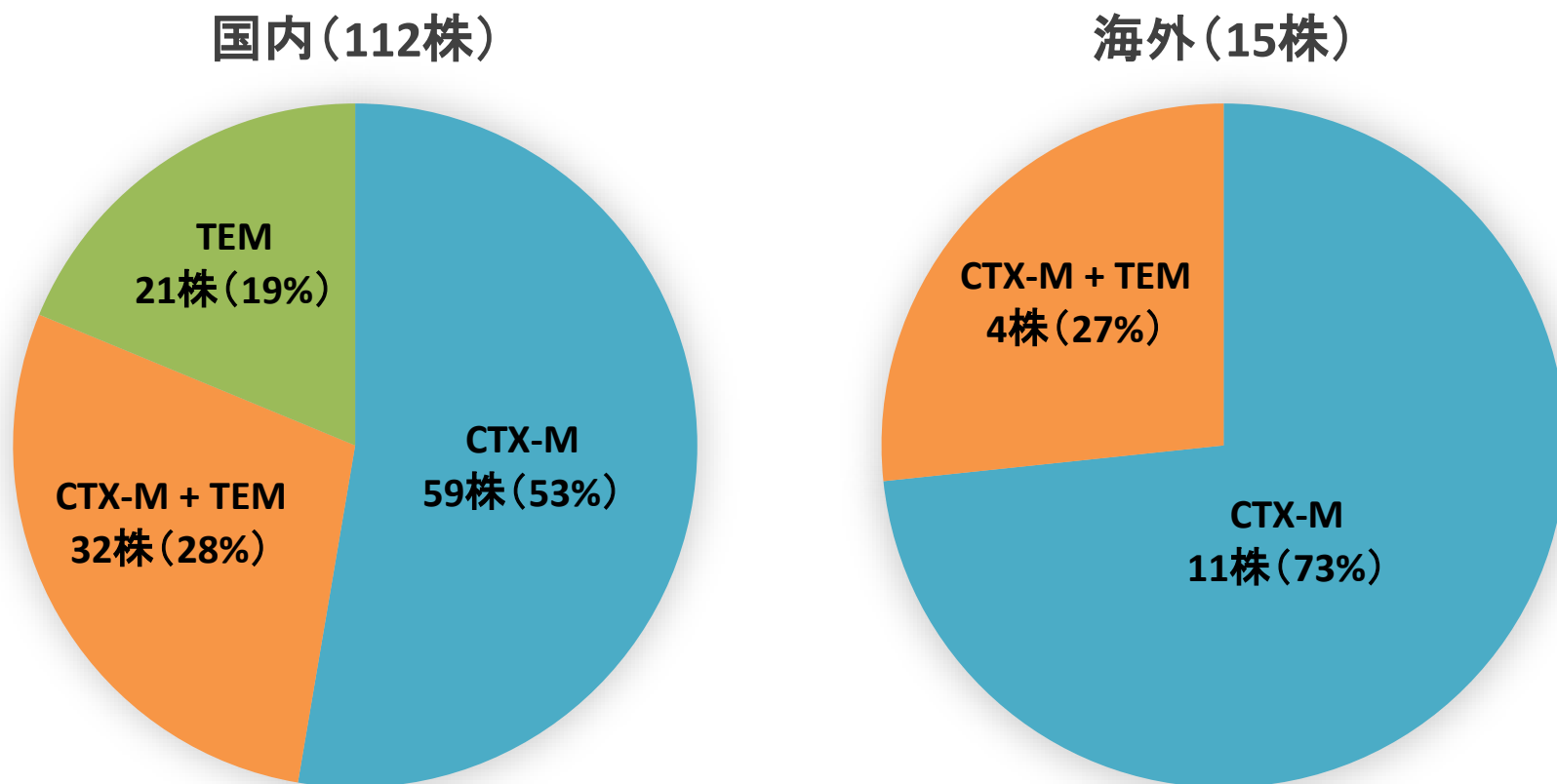


図3-1. 2015年分離のESBL産生株のCTX-M遺伝子型別

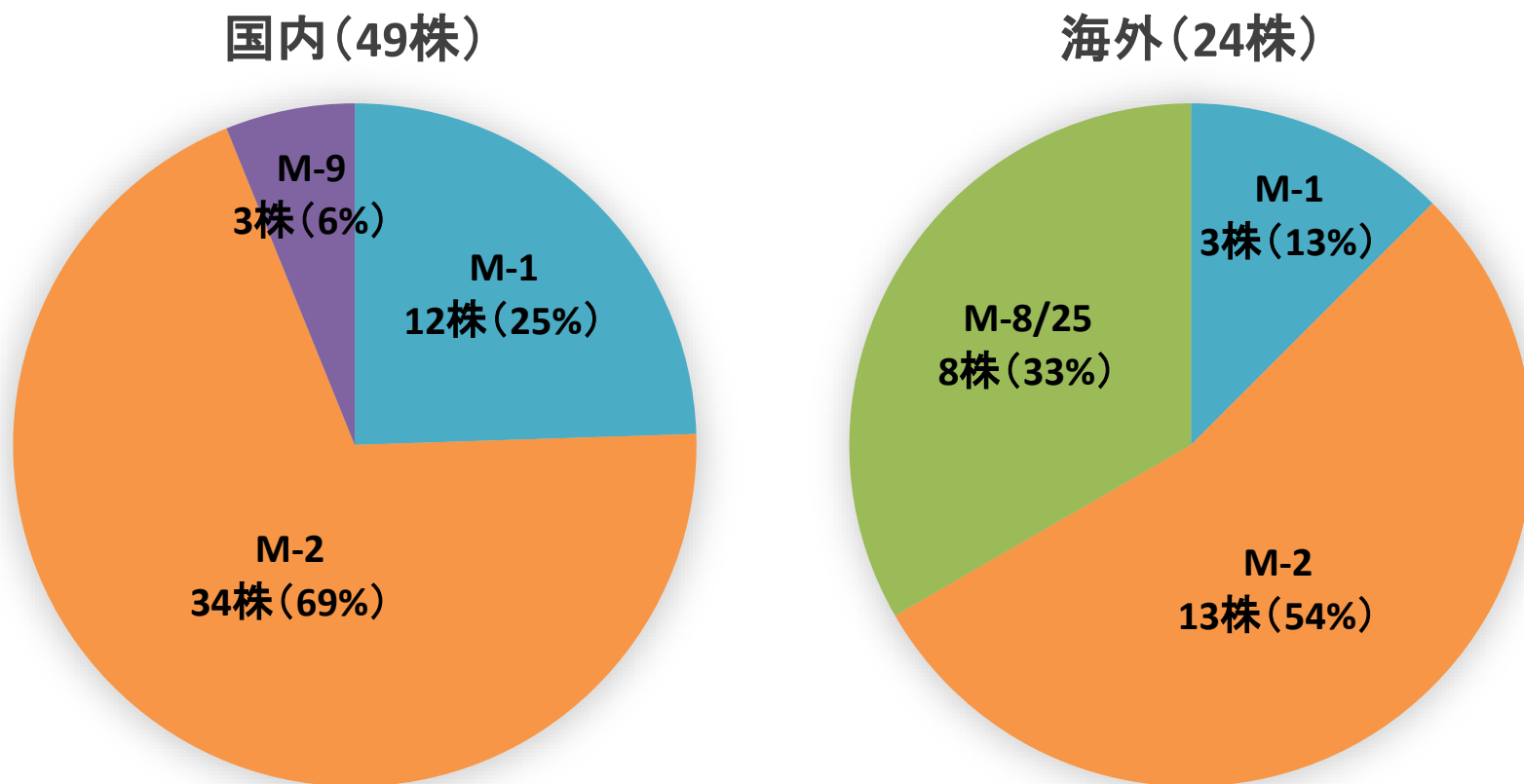


図3-2. 2016年分離のESBL産生株のCTX-M遺伝子型別

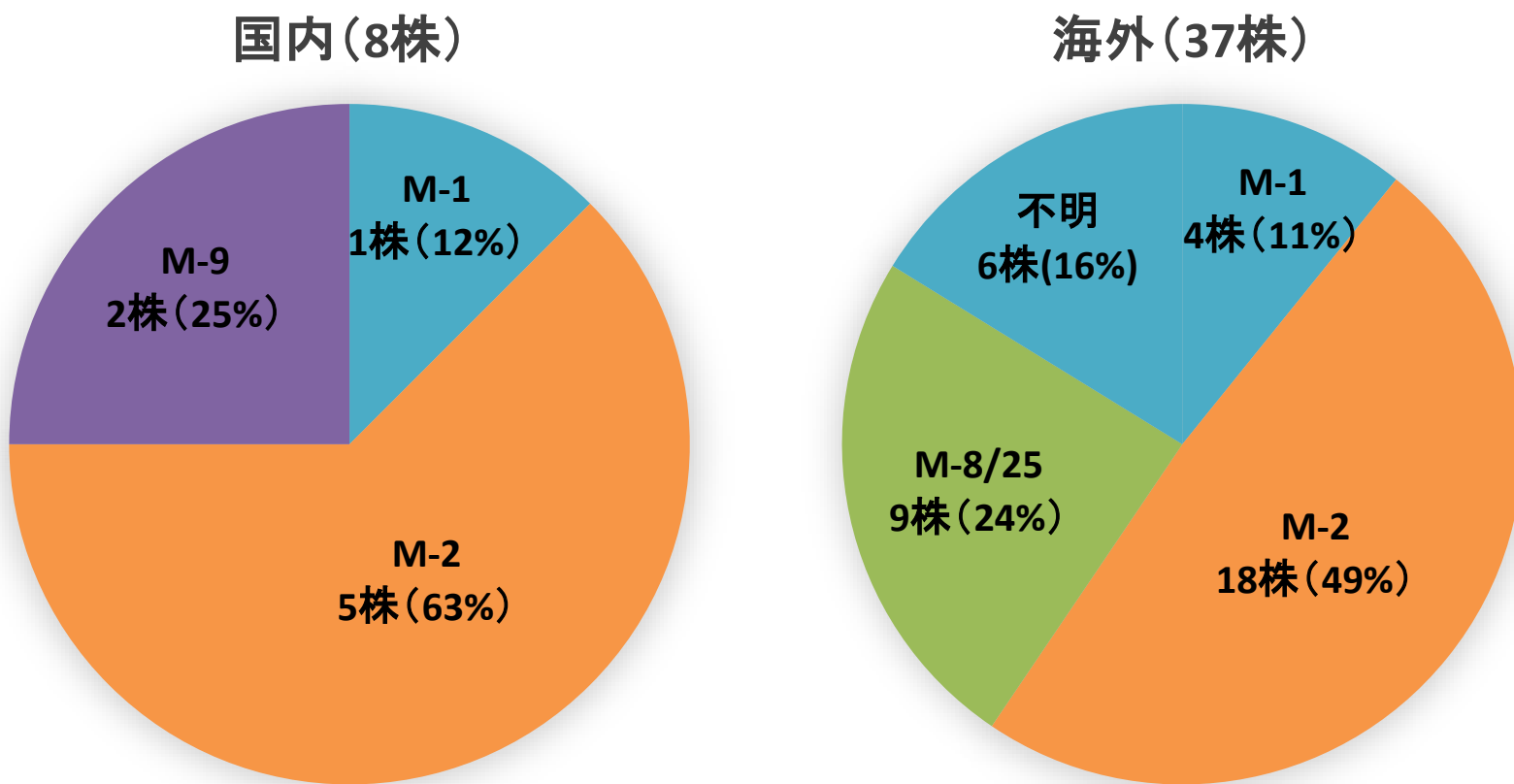


図3-3. 2017年分離のESBL産生株のCTX-M遺伝子型別

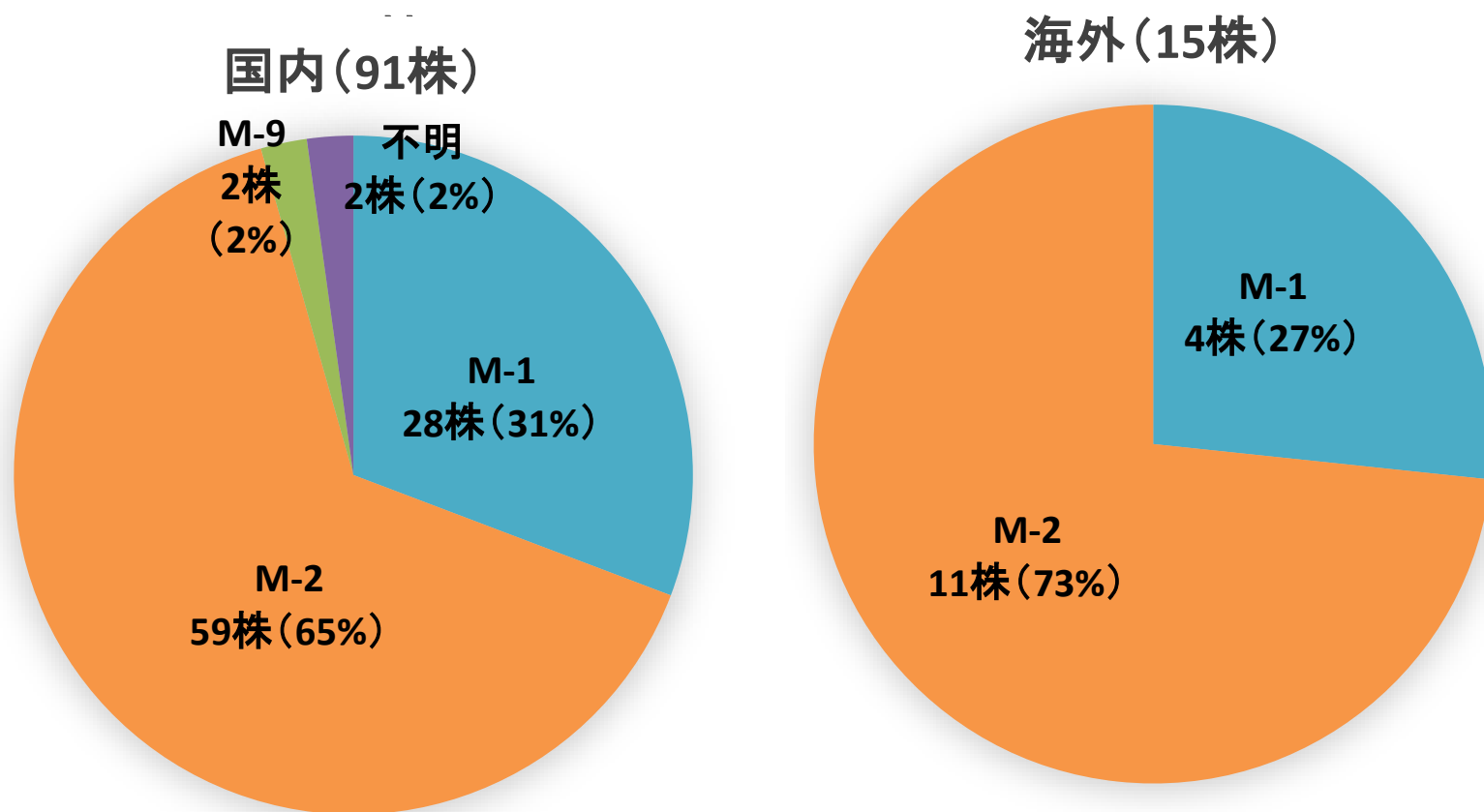


図4-1. 2015年分離のAmpC産生株の耐性遺伝子型別

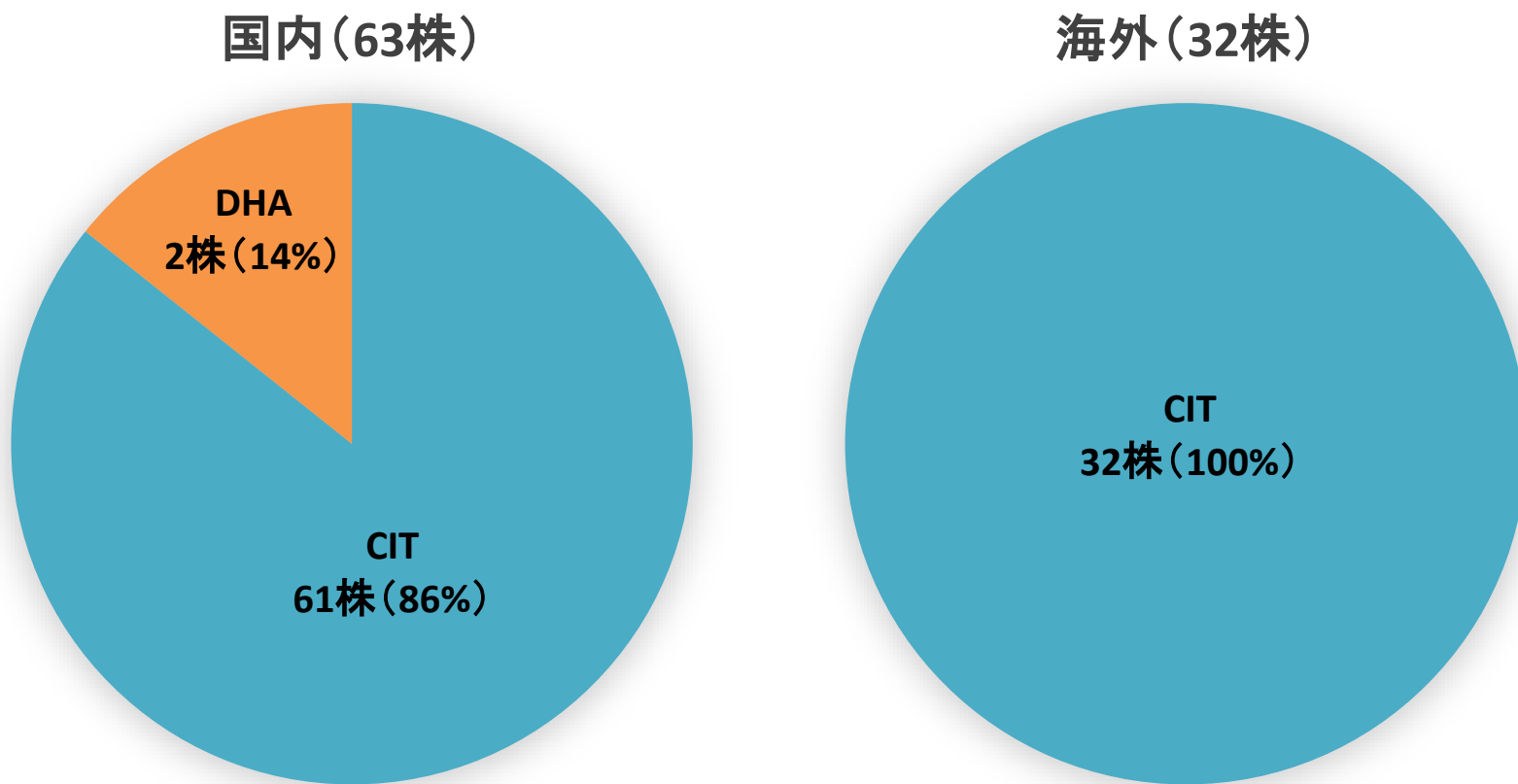
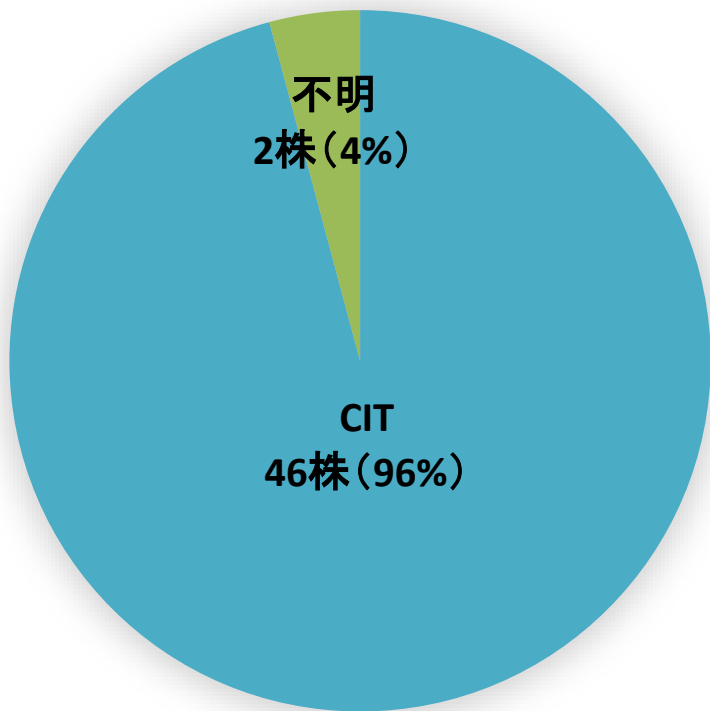


図4-2. 2016年分離のAmpC産生株の耐性遺伝子型別

国内(48株)



海外(4株)

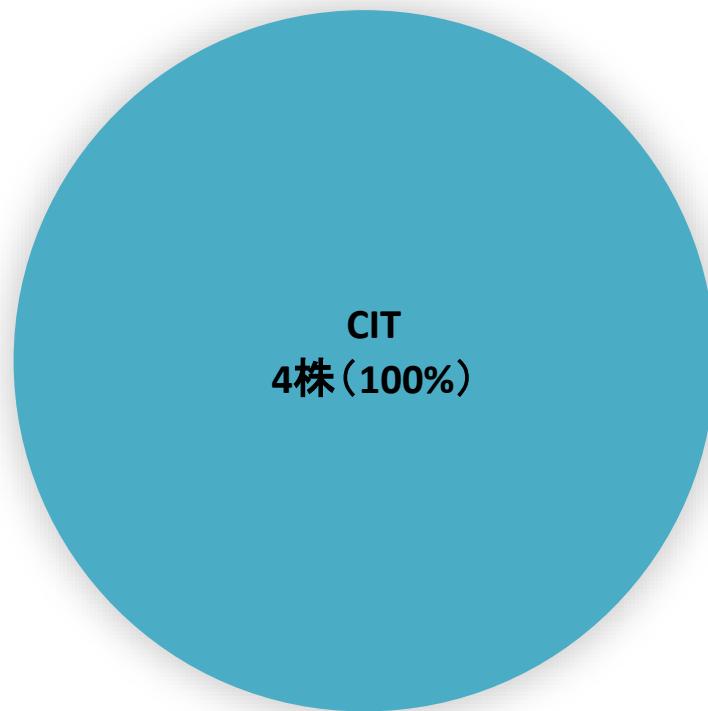
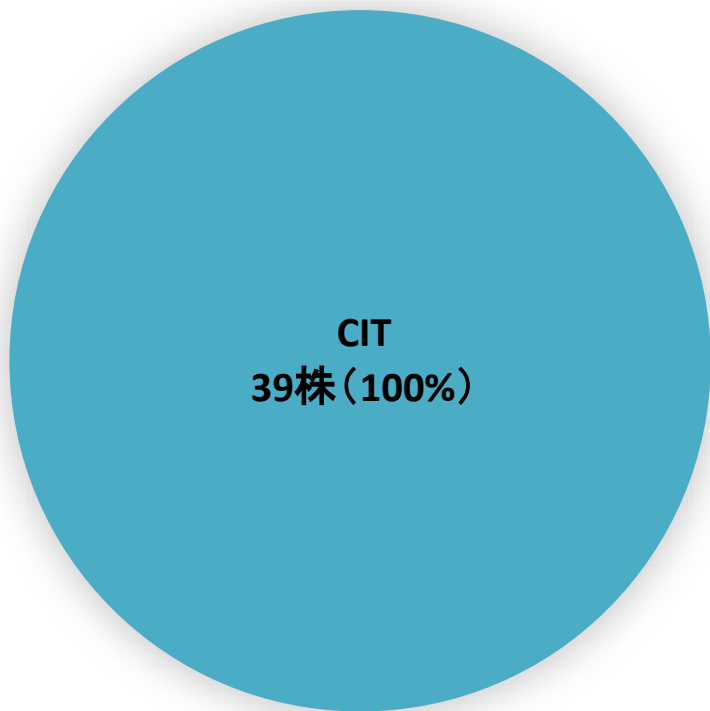


図4-3. 2017年分離のAmpC産生株の耐性遺伝子型別

国内(39株)



海外(9株)

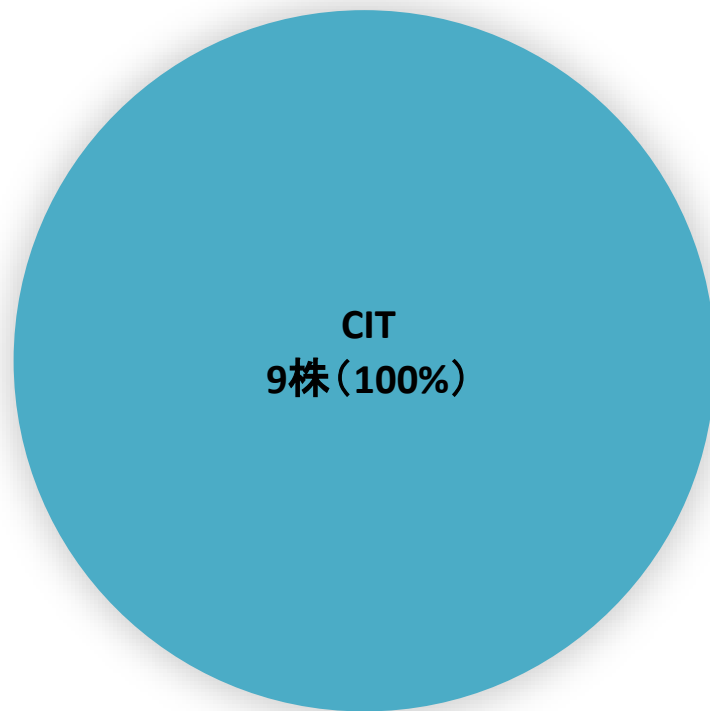


図5-1. 2015年分離鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の菌種

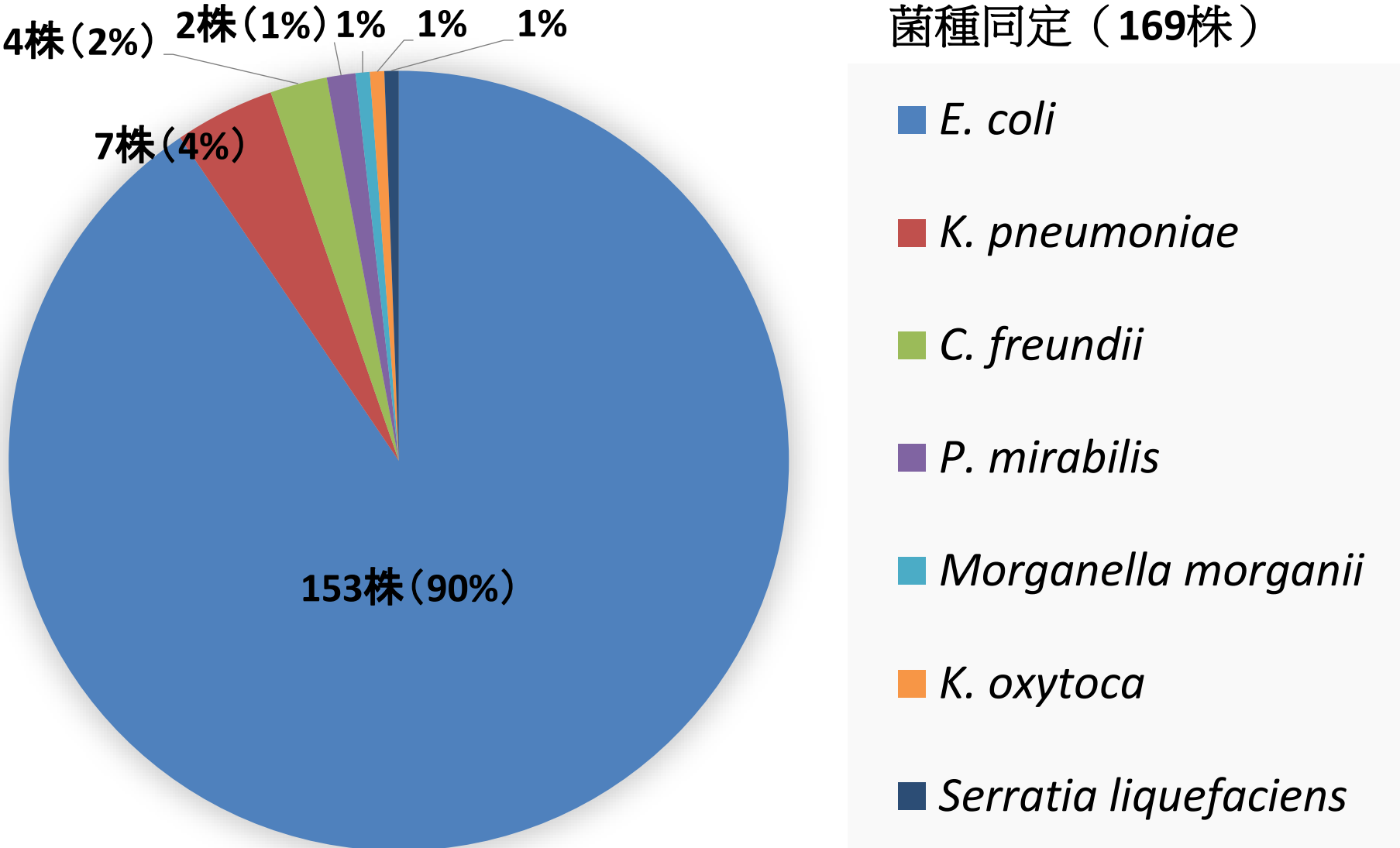


図5-2. 2016年分離鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の菌種

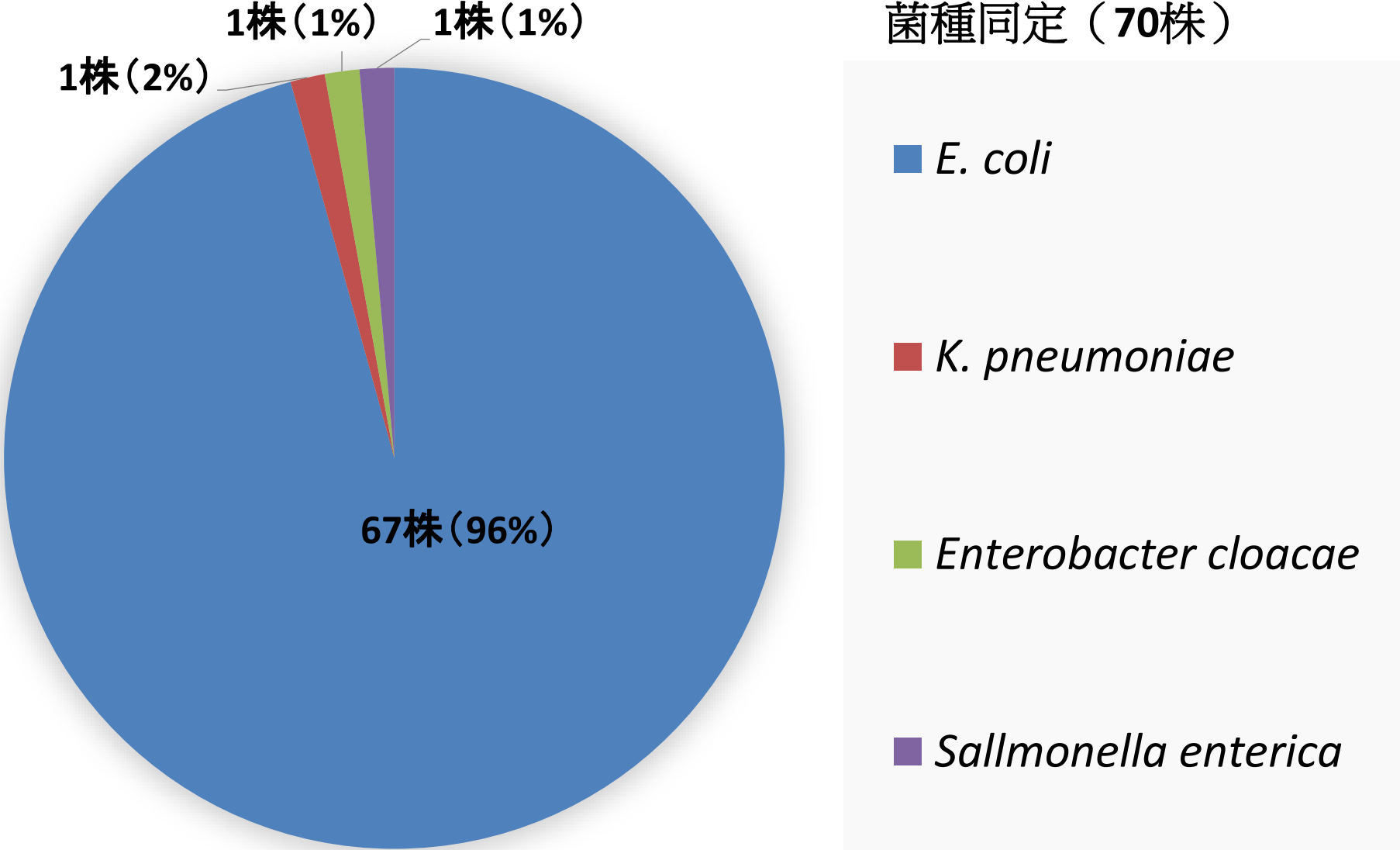


図5-3. 2017年分離鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の菌種

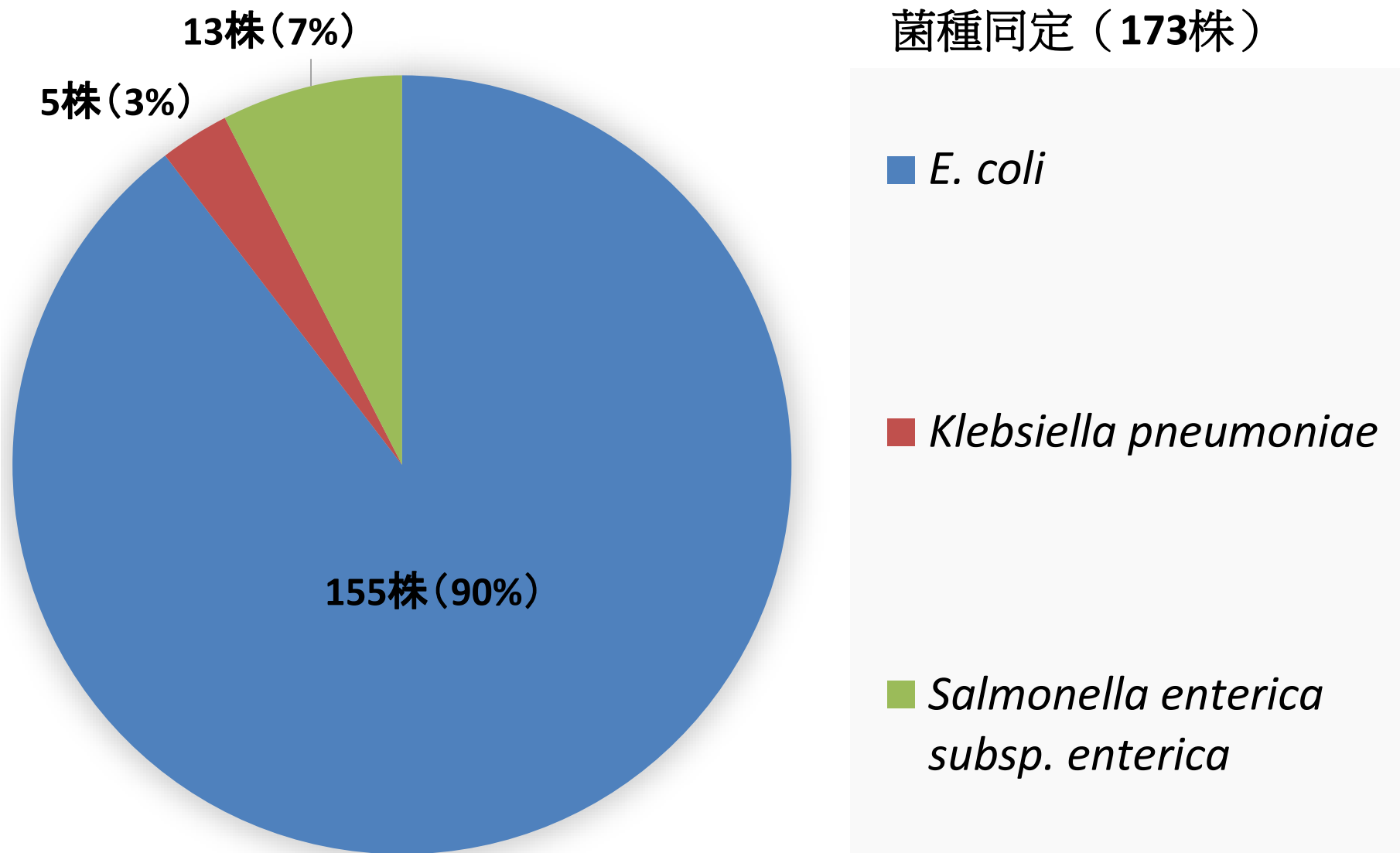


表2-1. 2016年の鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の耐性伝達性

	Sample	耐性伝達株数 (%)
国内鶏肉 (n=42)	ESBL (n = 9)	4 (44%)
	AmpC (n = 31)	18 (58%)
	ESBL+AmpC (n = 2)	2 *(100%)
輸入鶏肉 (n=28)	ESBL (n = 24)	11 (46%)
	AmpC (n = 3)	1 (33%)
	ESBL+AmpC (n = 1)	1 *(100%)
合計 (n = 70)		37 (52.9%)

*AmpCはすべてで伝達されているが、ESBLはその限りではない
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2-2. 2017年の鶏肉由来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3-1. 2016年分離株の耐性伝達性プラスミドのレプリコン型別

(株数)

Replicon type (amplicon obtained)	国内鶏肉			輸入鶏肉			合計 (n=37)
	ESBL (n=4)	AmpC (n=18)	ESBL+AmpC (n=2)	ESBL (n=11)	AmpC (n=1)	ESBL+AmpC (n=1)	
K	1	14	2	1		1	19
I1	1			3			4
FIB, F	1			1			2
F	1				1		2
FIB, F, K		1					1
FIB, A/C, F, K		1					1
K, B/O		1					1
I1, K		1					1
I1, P, F				1			1
L/M				1			1
I1, P				2			2
N, F				1			1
I1, FIA, FIB, F				1			1

表3-2. 2017年分離株の耐性伝達性プラスミドのレプリコン型別

(株数)

Replicon type	合計 (n=102)	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	5		1	1	2		3	3
I1	18	15			15	2	1	3
F	21	18			18	3		3
A/C	12		8	4	12			
B/O	7	1	5		6		1	1
I1, B/O	21		21		21			
I1, F	1	1			1			
I1, FIB, F	1	1			1			
Non-typable	16	15			15		1	1

表4-1. 2015年収集鶏肉検体からのVREの分離

VRE型 菌種	国産			国内合計 (n=90)	国外産		国外合計 (n=61)
	鹿児島 (n=30)	宮崎 (n=30)	群馬 (n=30)		ブラジル (n=39)	その他 (n=22)	
VanA <i>E. faecium</i>	0	0	0	0 (0%)	1	0	1 (1.6%)
VanN <i>E. faecium</i>	0	0	2	2 (2.2%)	0	0	0 (0%)
不明型 <i>E. faecalis</i>	1	0	0	1 (1.1%)	0	0	0 (0%)
合計	1 (3.3%)	0 (0%)	2 (6.7%)	3 (3.3%)	1 (2.6%)	0 (0%)	1 (1.6%)

表4-2. 2016年収集鶏肉検体からのVREの分離

VRE型 菌種	国産			国内合計 (n=150)	国外産		国外合計 (n=76)
	鹿児島 (n=30)	宮崎 (n=80)	群馬 (n=40)		ブラジル (n=38)	その他 (n=38)	
VanA <i>E. faecium</i>	0	0	0	0 (0%)	0	0	0 (0%)
VanN <i>E. faecium</i>	0	0	1	1 (0.7%)	0	0	0 (0%)
不明型	0	0	0	0 (0.9%)	0	0	0 (0%)
合計	0 (0%)	0 (0%)	0 (2.5%)	1 (0.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

表4-3. 2017年収集鶏肉検体からのVREの分離

VRE型 菌種	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)	その他 (n=25)	
VanA <i>E. faecium</i>	0	0	0	0 (0%)	3	0	3 (3.4%)
VanN <i>E. faecium</i>	0	0	3	3 (2.7%)	0	0	0 (0%)
不明型 <i>E. faecium</i>	1	0	0	1 (0.9%)	0	0	0 (0%)
合計	1 (3.3%)	0 (0%)	3 (7.5%)	4 (3.6%)	3 (4.8%)	0 (0%)	3 (3.4%)

図6. ブラジル産鶏肉由来VanA型VREの染色体DNA比較

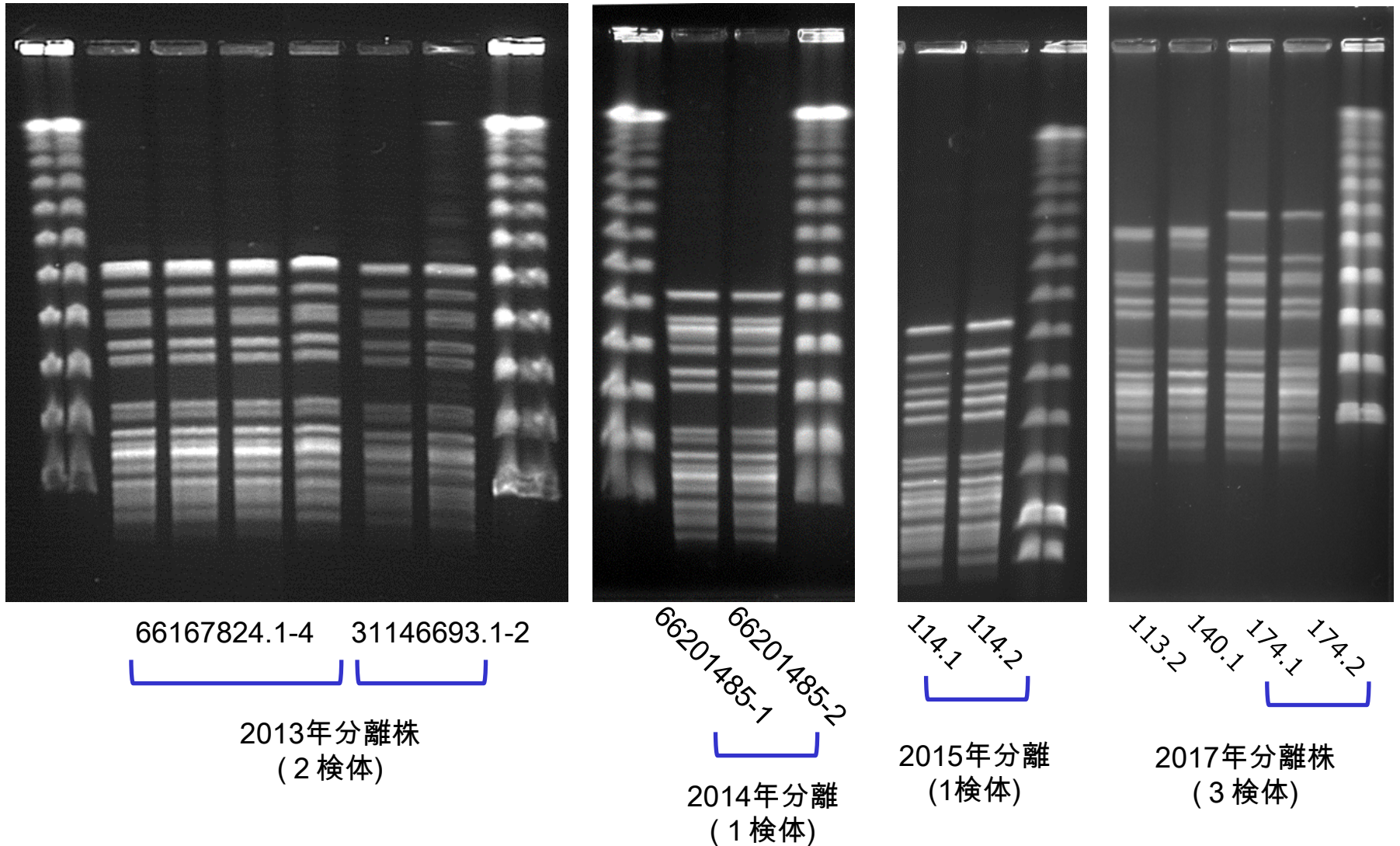
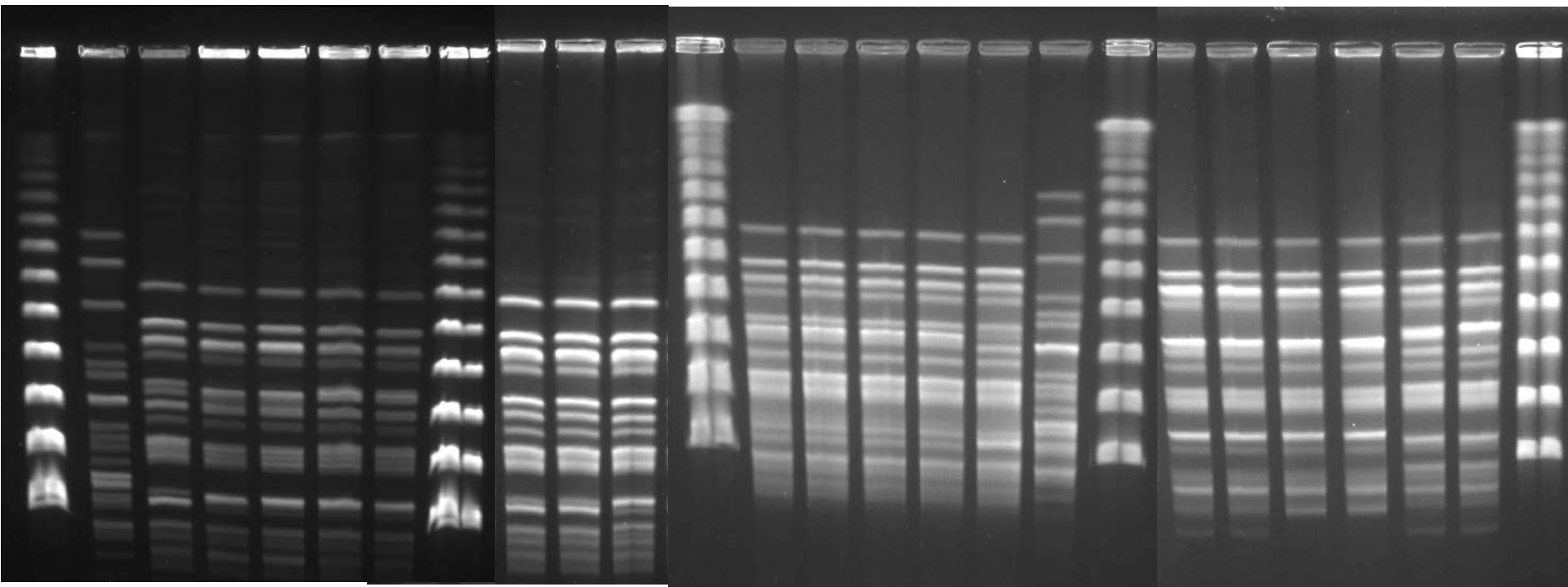


図7. 国産鶏肉由来VanN型VRE (*E. faecium*) 株の染色体DNAの比較



AA-22 2009年 宮崎
 GU121-1 2011年 宮崎
 AA-411
 AA-412
 AA-413
 AA-417* 2014年 宮崎 群馬 (2検体)
 62.1 62.2 87.2 2015年 群馬 (2検体)
 105.1 105.2 105.3 105.4 2016年群馬 (1検体)
 GU121-1 2011年 宮崎
 AA-22 2009年 宮崎
 92.1 92.2 97.2 97.2 101.1 101.2 2016年群馬 (3検体)

表5. 国内(宮崎、群馬)鶏肉検体から分離された
VanN型VRE (*E. faecium*)株のMLST解析

Year	Location	Strain	Allelic profile							ST
			<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
2008	France	UCN-71	25	13	9	33	10	19	6	240
2009	宮崎	AA-22	72	13	9	33	10	19	6	852
2011	宮崎	GU121-1	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	宮崎	AA-412	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	群馬	AA-413	9	8	14	58	6	27	6	669
2015	群馬	AA-425	9	8	14	58	6	27	6	669
2015	群馬	AA-423	9	8	14	58	6	27	6	669
2016	群馬	105.1	9	8	14	58	6	27	6	669
2017	群馬	92.1	9	8	14	58	6	27	6	669
2017	群馬	97.1	9	8	14	58	6	27	6	669
2017	群馬	101.1	9	8	14	58	6	27	6	669

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, <u>Kawanishi M</u> , Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T.	Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in <i>Escherichia coli</i> from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur.	Foodborne Pathog Dis	12	639-43.	2015
<u>Kawanishi M</u> , H. Abo, M. Ozawa, M. Uchiyama, T. Shirakawa, S. Suzuki, A. Shima, A. Yamashita, T. Sekizuka, K. Kato, M. Kuroda, R. Koike, and M. Kijima.	Prevalence of colistin-resistance gene <i>mcr-1</i> and absence of <i>mcr-2</i> in <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy food producing animals in Japan.	Antimicrob Agents Chemother	doi.org/10.1128/AAC.02057-16.		2016
Hiki M, Shimizu Y, <u>Kawanishi M</u> , 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 <i>Escherichia coli</i> isolates from food-producing animals.	J Vet Diagn Invest.	29(5):	716-720	2017
川西路子	JVARM(動物由来薬剤耐性菌モニタリング)の取り組み	日本豚病研究会会報	第68号	12-18	2016年
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
浅井鉄夫	耐性菌とは？養豚の課題は何？	Pig Journal	19 (12)	15-17	2016
Hiki M, Shimizu Y, <u>Kawanishi M</u> , 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 <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 S WINE	50	2-6	2017
浅井鉄夫	One Healthと薬剤耐性	ALL about S WINE	51	24-26	2017
四宮博人, 勢戸和 子, 川瀬 遵, 有 川健太郎, 船渡川 圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛顕, 調 恒明	地方衛生研究所におけ る細菌学的検査・研究 の最新事情	日本細菌学雑 誌	70(2)	309-318	2015年
菅 美樹, 四宮博 人, 北尾孝司	市販鶏レバーおよび臨 床材料から分離した基 質特異性拡張型βラ クタマーゼ産生 <i>Escher ichia coli</i> および <i>Klebsi ella pneumoniae</i> が保 有する bla_{CTX-M} 型別に 関する検討	感染症学雑誌	90(3)	305-9	2016年
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
Kurushima J, I ike Y, Tomita H	Partial Diversity Ge nerates Effector Im munity Specificity of the Bac41-Like Bac teriocins of Enteroco ccus faecalis Clinical Strains.	Journal of B acteriology	198	2379-2390	2016
Nomura T, Has himoto Y, Kuru shima J, Hirak awa H, Tanimo to K, Zheng B, Ruan G, Xue F, Liu J, Hisat sune J, Sugai M, Tomita H.	New colony multiple x PCR assays for th e detection and discr mination of vancom ycin-resistant enteroc coccal species.	J Microbiol Methods.	145	69-72	2018