

厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

(H30-食品-一般-006)

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 治雄

平成 31 年 (2019 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 30 年度 総括・研究分担報告書

目次

- . 平成 30 年度総括研究報告書
食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 1

- . 平成 30 年度分担研究報告書
 - 1 . 地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離される
サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査
研究分担者 四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所 10

 - 2 . 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
研究分担者 菅井 基行 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター . . . 32

 - 3 . 無症状保菌者由来サルモネラの薬剤感受性プロファイル解析に関する研究
研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 38

 - 4 . 食品由来サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の耐性分布と
遺伝特性に関する研究
研究分担者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 . . . 44

 - 5 . 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 52

 - 6 . 食品及びヒト由来カンピロバクター、大腸菌の薬剤耐性菌出現状況の把握
研究分担者 小西 典子 東京都健康安全研究センター 61

 - 7 . 食品中の耐性菌汚染、と畜場等における交差汚染の役割解析
研究分担者 浅井 鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 72

 - 8 . 食品等から分離される腸内細菌の薬剤耐性調査と遺伝学的伝播様式の解析
研究分担者 富田 治芳 群馬大学大学院医学系研究科 80

 - 9 . ヒト・家畜・食品等由来耐性菌が保有する薬剤耐性伝達因子の解析及び
伝達過程の関連性の解明
研究分担者 石井 良和 東邦大学医学部微生物・感染症学講座 99

- . 研究成果の刊行に関する一覧表 104

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業
総括研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

代表研究者 渡邊治雄 国立感染症研究所

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。ヒト由来株の耐性菌データ (JANIS) と家畜由来の耐性菌データ (JVARM) の一元的解析ができるようなシステムの構築が確立してきた。今回の研究班では汚染食品由来菌株の耐性菌のモニタリング体制の構築を行った:日本全国 23 の地方衛生研究所の協力のもと、食品 (主に鶏肉) を汚染しているサルモネラ、大腸菌、カンピロバクターの分離および薬剤耐性の測定を標準化された方法を用いて実施した。サルモネラに関しては、2015~2018 年に分離された患者由来の 40.3%、及び食品由来の 89.6%が、18 剤中の 1 剤以上に耐性を示した。ヒト患者由来株のうち食品からも分離された血清型、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* 株ではヒト患者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患者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、2015~2018 年分離のヒト患者由来の 36.3%、及び食品由来の 56.3%が 1 剤以上に耐性を示した。カンピロバクター株については、共通のプロトコール及び判定表を新規に作成し、統一した方法で感受性検査と判定を行った。*C. jejuni* 株ではヒト患者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患者由来耐性菌との関連が強く示唆された。さらに、健康者由来の大腸菌 360 株を対象に 17 薬剤に対する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は 37.5%であった。その中には CTX 耐性は 5.3%、フルオロキノロン耐性は 9.4%が存在した。健康者由来の大腸菌もかなりの高い耐性率を示した。これらのデータは、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」に提供されている。食品由来の耐性菌データも 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が可能となり、ワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることを期待される。

分担研究者：

四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
菅井基行	国立感染症研究所薬剤耐性 研究センター
大西 真	国立感染症研究所細菌第一部
朝倉宏	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
川西路子	農水省動物医薬品検査所
小西典子	東京都健康安全研究センター 微生物部
浅井鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学 研究科
富田治芳	群馬大学大学院医学系研究科
石井良和	東邦大学医学部微生物・ 感染症学

A. 研究目的：

耐性菌の問題は健康危機管理としても重要な国際的課題である。WHO は、世界における耐性菌の実態を明らかにするため Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) を設立し、食中毒菌などの薬剤耐性の国際的なサーベイランス体制の確立や検査法の統一を図ってきている。また、WHO は耐性菌の世界的なコントロールをめざし、Global Action Plan を示し、サーベイランスの強化を進めており、Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) で各国の耐性菌データの収集を図っている。我が国も 2016 年に National Action Plan を作成した。それらは、“One Health” の観点から耐性菌

のサーベイランスの構築を目指すことを掲げている。本研究においては農林省で動物を対象に行われている耐性菌モニタリングシステム JVARM と厚労省で行われているヒトにおける院内感染症耐性菌サーベイランス JANIS のデータを一元的に閲覧し、評価できる手法を開発することと、今まで体系的に集められていない食品由来細菌の耐性データの収集体制の整備とそのデータを取り込める体制を構築することを目的とした。食品由来耐性細菌については全国地方衛生研究所協議会に主な役割を担当してもらい、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、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：

1) データの解析・公開：

大腸菌等の薬剤耐性について、JANIS で集計されている入院患者全検体由来のデータと JVARM で集計されている牛、豚、鶏由来のデータを比較し、情報をホームページ等で公開および食品由来細菌の薬剤耐性のデータを JANIS 集計プログラムに入れ込み、一元的に解析できるようにする。WHO のグローバルサーベイランス (GLASS) については、JANIS データベース等から必要なデータを抽出し、GLASS が求める集計様フォーマットに変換し、提出できるようにする。

2) 食品由来耐性菌サーベイランス：

a. 地方衛生研究所ネットワーク（協力地衛研としては、地理的分布も考慮し、全国から 20-30 か所を選定する）を使い、ヒト及び食品由来のサルモネラおよび病原大腸菌について、既に確立しているプロトコルにしたがって継続的に薬剤感受性検査（17 薬剤：ABPC, CTX, CAZ, GM, KM, SM, TC, ST 合剤, CP, FOM, NA,

CPFEX, NFLX, OFLX, AMK, IPM, MEPM), を実施する（平成 30~32）。大腸菌については、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1* および *mcr-2*) 保有状況を把握する。

- b. ヒト及び食品由来のカンピロバクター等については、上記プロトコルがそのまま適応できないため、国立衛研、都安研と協力して新たに共通のプロトコルを作成する（平成 30 年）。その方法に基づき、協力地衛研において、カンピロバクター等の薬剤感受性検査（5 薬剤：ABPC, TC, EM, NA, CPFEX）を実施する（平成 30~32）。
- c. 上記によって得られた食品由来菌株の耐性データを、既に作成している相互変換ソフトを用いて、JANIS（臨床由来株）および JVARM（家畜由来株）とのデータベースと相互比較し、生態系における耐性菌・耐性遺伝子の流れについて考察する。
- d. 地衛研において分離・収集されるヒトおよび食品由来耐性菌の適切な保管、ならびにそれらの有効利用について、倫理審査を含めてコンセンサスを確立する。
- e. これらの耐性菌データを、我が国のワンヘルス動向調査の年次報告書に提供し、WHO の GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System) への報告にも提供する（平成 30~32 年）。

3) 国内産食肉、および国外産輸入食肉の比較

国内産食肉は国内 3ヶ所の食肉衛生検査所（群馬、宮崎、鹿児島）から鶏肉検体をそれぞれ 30~40 検体（合計約 100 検体）収集し、国外産食肉は該当年度の各国からの輸入鶏肉量比に合わせた検体数になるように 2ヶ所の輸入検疫所（横浜、神戸）から食肉検体を収集し、耐性状況を比較検討する。

4) と畜場・食鳥処理場由来株の解析：

農場由来株のサルモネラ、大腸菌についてアンチバイオグラムを作成し、ヒト・食品由来株と比較検討する。畜場及び食鳥処理場由来大腸菌並びに食鳥処理場

由来サルモネラ属菌についてコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* ~ *mcr-5* を multiplex PCR で検出する。

5) 市販肉の交差汚染経路の解析

牛及び豚の食肉処理施設において、「と畜場における枝肉の微生物汚染実態調査」により枝肉等のふき取り材料から分離された細菌の菌種同定と薬剤感受性を実施し、同一菌種について分子疫学的解析を行って、交差汚染の状況とその要因を明らかにする。

6) 耐性菌の遺伝学的解析

ヒト、家畜、食品から分離された第3世代セファロスポリン系薬 (3GC) に耐性を示した大腸菌について、短鎖型シーケンサーである MiniSeq/ MiSeq/ HiSeq/ NovaSeq システム (Illumina 社) による細菌ゲノムの解析、MLST (multilocus sequence typing) による菌株遺伝型の型別、ResFinder による薬剤耐性遺伝子の検出、および Plasmid Finder による保有プラスミドの型別解析を行い、菌株のメタデータと組み合わせた分子疫学解析を行う。各耐性株の代表株を選別し、長鎖型シーケンサーである MinION (Oxford Nanopore Technologies 社) を併用して完全ゲノム配列を構築し、BLAST と ACT (Artemis Comparison Tool) によるプラスミドの配列比較を行う。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr* についても、国内で収集された家畜由来または食肉由来 *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性腸内細菌科細菌株に置いて *mcr* 遺伝子保有プラスミドを含むゲノム解析を行い、国際的な分子疫学関係を明らかにし、耐性菌/耐性遺伝子の伝播経路を推察する。

C. 研究結果:

1) 担当者間の協議。大腸菌のアンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、フルオロキノロンについて、JANIS のデータと JVARМ のデータを用いて耐性率の比較データを公開することとした。腸球菌については、JVARМ 側で菌種同定がされていないため単純比較すると misleading とな

る恐れがあるため公開しないこととした。比較データについては、国立国際医療研究センターが運営する AMR ワンヘルス動向調査のホームページで公開された (<https://amr-onehealth.ncgm.go.jp>)。大腸菌においてはいずれの薬剤も、ヒト由来株の方が家畜由来株より耐性率が高い傾向があった。年次推移では明らかな相関は認められなかったが、引き続き注視していく必要がある。

2) WHO のグローバルサーベイランス

(GLASS) : 2016 年、2017 年の大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラのデータ、ならびに 2017 年の淋菌、赤痢菌のデータを集計し、GLASS 指定のデータ形式のファイルを作成して提出した。なお、GLASS は薬剤感受性試験を実施した全ての菌株について、同一の薬剤のセットで試験を実施することを求めている。しかし、JANIS では医療機関はそれぞれで様々な薬剤感受性試験パネルを採用しているため、薬剤ごとに感受性試験を実施した株数が異なる。この集計手法が異なる点について GLASS 責任者と複数回の協議を行い、最終的に JANIS データベースから作成するデータを GLASS に合わせることにした。日本ならびに各国の集計結果は WHO のホームページで公開された。

(<https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2017-2018/en/>)

3) 地方衛生研究所の成果：平成 30 年度から開始された本分担研究において、協力地衛研で分離・収集されるヒトおよび食品由来耐性菌株の適切な利用について、倫理審査を実施し許可を得た。サルモネラおよび病原大腸菌について、既に確立しているプロトコールにしたがって平成 30 年分離株について薬剤感受性検査を実施した。

a. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の内訳と血清型
2018 年に収集されたサルモネラ株は、ヒト由来 240 株、食品由来株 82 株、

総計 322 株で、1 剤以上に耐性を示した菌株の割合（耐性率）は、ヒト由来株 35.8%、食品由来株 89.0%で、

b. 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

2015 年～2018 年に収集されたヒト由来株 1425 株及び食品由来株 433 株の 18 剤に対する耐性率は、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。CTX、CAZ、CFX 耐性も数%認められ、食品由来株でやや高い傾向であった。

c. 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

食品由来株（433 株）において、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. 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。これらの菌株には共通する点が多いが、それぞれの血清型に特徴的な点も認められた。すなわち、*S. Schwarzengrund* では CTX、CAZ、CFX 耐性が低く、*S. Manhattan* では KM 耐性が認められず、ST 耐性も低かった。一方、ヒト由来株（1425 株）の上位 5 位を占める、*S. Infantis*、*S. Enteritidis*、*S. Thompson*、*S. 4:i:-*、*S. Saintpaul* の計 627 株の各種抗菌剤に対する耐性率は、*S. 4:i:-* は国産鶏肉からの検出率は低いですがヒトでは主要な血清型の一つで、ABPC、SM、TC に対する耐性率が最も高く、国産鶏肉由来株の主な血清型である *S. Infantis* と *S. Schwarzengrund* では ABPC 耐性率は低いですが SM、TC 耐性率は高かった。一方、鶏肉よりも鶏卵から分離される *S. Enteritidis* では SM、TC 耐性率は低かった。

次に、ヒト由来株と食品由来株の両方で認められ、かつ食品由来株の主要な血清型である *S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* 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非

常に類似しており、*S. Schwarzengrund* と *S. Manhattan* では耐性率そのものもヒト由来株と近似であった。

d. ヒト及び食品から分離された大腸菌株の薬剤耐性状況

2015～2018 年分離のヒト由来大腸菌 1034 株のうち、18 剤の 1 剤以上に耐性を示した株は 375 株で、耐性率は 36.3%であった。大腸菌株の分類別耐性率は、EHEC27.6%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 73.5%、その他 69.0%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、非病原性大腸菌を含むその他の大腸菌株では下痢原性大腸菌株と比べて 7 剤～12 剤の多剤耐性株の頻度が高かった。その他の大腸菌株は 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、高度の耐性傾向であった。ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌との関連が示唆される CTX、CAZ、CFX に耐性の株が、ヒト由来株中に 49 株が見いだされた。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、GM、AMK、CTX、キノロン系薬 CPMX、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。

4) カンピロバクターの耐性菌出現状況の把握

2017 年に散発患者から分離された *C. jejuni* 115 株および *C. coli* 8 株について薬剤耐性菌出現状況を調べた。フルオロキノロン系薬剤に耐性を示した割合は *C. jejuni* が 43.8%、*C. coli* が 62.5%であり 2016 年 (*C. jejuni* 52.2%、*C. coli* 35.7%) と比較して *C. jejuni* の耐性率は減少、*C. coli* では増加していた。カンピロバクター腸炎治療の第一選択薬であるエリスロマイシンに対する耐性率は *C. jejuni* が 1.7%、*C. coli* が 25%であった。ヒト及び食品由来のカンピロバクター等については、耐性測定のプロトコールがそのまま適応できないため、国立衛研、都安研と協力して新

たに共通のプロトコールを作成した（各分担者の報告書を参照）

- 5) 健康者由来大腸菌の耐性菌出現状況：
2018年に健康者360名から分離された360株の大腸菌を対象に17薬剤に対する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は135株(37.5%)であった。この割合は2016年(37.6%)、2017年(36.5%)と比較してほぼ横ばいである。薬剤ごとに耐性率をみると、最も高いのはABPCおよびTCで23.6%、次いでNAが21.9%、SMが17.2%であった。CTX耐性は19株(5.3%)、フルオロキノロン耐性は34株(9.4%)であった。
- 6) 国内・外国産鶏肉から分離された大腸菌の耐性菌出現状況：
- a. 外国産鶏肉25検体のうち大腸菌が検出されたのは22検体(88%)であった。大腸菌が検出された22検体由来の35株について薬剤感受性試験を実施した結果、22株(65.7%)が1薬剤以上に耐性を示した。CTX耐性株およびフルオロキノロン耐性株は各1株(2.9%)であった。コリスチン耐性遺伝子である*mcr-1*および*mcr-2*に耐性を示す株は認められなかった。
- b. 国内産鶏肉を100検体(鹿児島30検体、宮崎30検体、群馬40検体)、外国産鶏肉86検体(ブラジル産55検体、タイ14検体、米国9検体、デンマーク4検体、アルゼンチン3検体、フィリピン1検体)の合計186検体を収集し、解析を行った。ESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌は、国内産100検体中62検体(62%)、輸入鶏肉からは86検体中25検体(29.1%)から検出された。国内産からの耐性株の70%、輸入からの耐性株の84.4%が大腸菌であった。収集した鶏肉検体からは伝達性高度コリスチン耐性遺伝子*mcr*を保持する耐性菌は検出されなかった。ブラジル産鶏肉1検体からVanA型VRE(*E. faecium*)株が検出された。国内産鶏肉からのVREの検出は認めなかった。
- 7) と畜場・食鳥処理場由来株の解析：

- a. 生産段階における汚染分布及び遺伝特性に関する検討
採卵鶏41農場で飼養された若齢鶏(114-280日齢)及び老齢鶏(336-701日齢)41羽の鶏糞からのESBL/AmpCラクタマーゼ産生大腸菌の検出状況を検討した。全体では約43%(35/82)が陽性を示し、若齢鶏の陽性率は約56%(23/41)と、老齢鶏(約29%, 12/41)に比べ高い傾向を示した。分離株の薬剤耐性遺伝子保有状況として、CTX-M-1が約40%(27/68)と最も多く、次いでCMY-2が約31%(21/68)であった。
- b. 食鳥処理段階における交差汚染に関する検討
同一鶏群由来の鶏肉及び盲腸内容におけるESBL産生大腸菌汚染実態を比較検討した。鶏肉の約58%(7/12)、盲腸内容の約92%(11/12)で同菌は陽性を示し、分離株の薬剤耐性遺伝子保有状況は、CTX-M-2(鶏肉:42.9%(6/14)、盲腸内容物:81%(17/21))が最も多く、CMY-2(鶏肉:約29%(4/14)、盲腸内容物:19%(4/21))がこれに続いた。分離株の遺伝特性から、盲腸内容と鶏肉に分布する当該菌は同一のものであることが示された。上記検出状況から当該菌の鶏肉汚染は食鳥処理加工を通じた腸管内容の交差汚染によるものであることが改めて示された。
- c. 鶏肉等における薬剤耐性サルモネラ及びカンピロバクターの汚染実態に関する検討
本年度は小規模ながら、6食鳥処理場で処理包装された市販鶏むね肉18検体における薬剤耐性カンピロバクター及びサルモネラの汚染実態を調査した。サルモネラ属菌は、16検体(89%)で陽性となり、17株が分離された。分離株の血清型構成は*S. Schwarzengrund*(n=6)、*S. Infantis*(n=5)、*S. Manhattan*(n=5)、*S. Anatum*(n=1)であり、その成績は食鳥処理場に依存していた。全分離株はSM耐性であったほか、16株はTC耐性を示した。CTX耐性は5株の*S. Infantis*で認

められたが、これらは同一農場由来の鶏肉であった。KM 耐性 *S. Schwarzengrund* 3 株は 3 つの異なる処理場の検体より分離された。カンピロバクターは、15 検体 (83%) で陽性となり、15 株が分離された。分離株の菌種構成は、14 株が *C. jejuni*、1 株が *C. coli* であった。7 株の *C. jejuni* は CPF_X 耐性であり、耐性率と食鳥処理場との間に明確な相関性は認められなかった。

d. 平成 28 年度に分離されたコリスチン MIC₂ μ g/mL 以上のと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌 31 株及び食鳥処理場由来サルモネラ属菌 57 株についてコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1*~*mcr-5* を multiplex PCR で検出した。大腸菌より *mcr-1*: 9 株、*mcr-5*: 3 株が分離され、サルモネラ属菌より *mcr-1*: 1 株が検出されたが、その他の遺伝子は検出されなかった。

8) 市販肉の交差汚染経路の解析

a. 愛知県下の施設 (A 施設) の環境 (まな板、処理ライン) のふき取り材料の検査において汚染 13 検体のうち、優勢に分離された菌種は、*Enterobacter cloacae* complex (5 検体)、*Serratia liquefaciens* group (4 検体)、*Raoultella planticola* (3 検体)、*Enterobacter gergoviae* (2 検体)、*Buttiauxella agrestis* (1 検体)、*Enterobacter amnigenus* (1 検体)、*Klebsiella pneumoniae* (1 検体)、*Escherichia coli* (1 検体) であった。同一日の複数のふき取り材料から同じ菌種が分離された。

b. B 施設の枝肉ふき取り材料からは、*Acinetobacter baumannii* complex (10 検体)、*Acinetobacter junii* (4 検体)、*Escherichia coli* (3 検体)、*Aeromonas salmonicida* (1 検体)、*Enterobacter amnigenus* (1 検体)、*Enterobacter cloacae* complex (1 検体)、*Pseudomonas aeruginosa* (1 検体)、*Stenotrophomonas maitophilia* (1 検体)、*Yersinia intermedia* (1 検体) であった。

c. 薬剤感受性試験では、ほとんどの薬剤

に対して感受性を示す株が多く認められた。

9) 耐性菌の遺伝学的解析

a. 臨床分離 ESBL 陽性菌株については新たな収集を行うために必要な倫理審査を進めた。また、今までに収集済みの臨床分離 ESBL 陽性腸内細菌科細菌株の分子疫学的解析を目的にドラフトゲノム解析を行い、菌株 (大腸菌、肺炎桿菌など) および ESBL 遺伝子の型別を進め、プラスミドを含む完全ゲノム解析を行う菌株の選定を行った。

獲得性ポリミキシン耐性遺伝子 *mcr* の保有菌株の食肉における伝播状況を探るため、今年度は検査系の確立を行なった。コリスチン耐性大腸菌株 300 株超を用いて、*mcr-1* から 8 まで全ての亜型を同時に検出可能な multiplex PCR を開発した。

b. MiSeq による WGS 解析を実施した大腸菌 (臨床由来 11 株および鶏あるいは犬由来 19 株) は *bla*_{CTX-M-14} が臨床由来の 11 株から、*bla*_{CMY-2} および *bla*_{CTX-M-2} が鶏および犬由来からそれぞれ 10 株および 6 株から検出された。臨床由来株から検出されたプラスミド不和合性 (Inc type) は 5 種類で、IncFII が 11 株、Col が 9 株、IncFIA が 8 株、IncFIB が 2 株、IncQ1 が 2 株から検出された。同様に、鶏あるいは犬由来株からは 15 種類の Inc type が検出され、主要な Inc type では、IncFIB が 15 株、IncFII が 10 株、IncI1 が 8 株、IncFIC が 7 株、IncA/C が 6 株、IncFIA が 6 株、IncN が 5 株から検出された。MiSeq のデータに MinION のデータを追加して詳細に解析することにより、薬剤耐性遺伝子が搭載されるプラスミドの完全長塩基配列が明らかになる見込みである

D. 考察

1) GLASSへの報告

GLASSが求めるデータフォーマットでは、菌株のデータを入院外来別、年齢群別、性別、検体別に層別化している。一方、JANISでは通常入院患者のみを対象とし

て、年齢、性別、検体を分けていない。GLASSの集計で、検体や入院外来別で薬剤耐性率に違いがあることが明らかになった。今後JANISにおいてもGLASSに準じた集計を進めていく必要があると考えられる。

2) 食品由来耐性菌サーベイランスの構築

全国 23 地方衛生研究所の協力のもと、日本全国から分離されたヒト（有症者、大部分は便検体）及び食品（大部分は国産鶏肉）由来のサルモネラ、大腸菌の薬剤耐性の調査が精度管理された手法に基づき行える体制が構築された。その結果、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（*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* 等）が 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。食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌の両方で認められる *S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* 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。その中で *S. Infantis* ではヒト由来株の耐性率は食品由来株の 4 割程度で、鶏肉だけでなく、複数の食材の感染経路がある可能性がある。サルモネラ感染は、ヒトおよび食材由来の血清型間で薬剤耐性パターンの差異がみられ、それらは感染経路の違いによることが推察され、ワンヘルス・アプローチに基づく調査が感染制御に繋がることを期待される。

3) ワンヘルス・アプローチの継続性の重要性

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。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。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ネットワーク整備が必要である。将来的には JANIS や JVARM のように事業として対応することが望ましい。その人的・資金的サポート面を含め、どのように進めるべきかの議論を深めていくことが重要である。

4) 家畜 食品 ヒト由来菌の耐性菌測定上のバイアスおよび問題点；

家畜 食品 ヒト由来耐性菌の耐性率の比較を可能にするため、耐性検査の使用薬剤や検査方法のプロトコールの標準化を進めてきたが、すべてを同一にするのは現在のところ難しい問題がある。JANIS においては、各病院で行われている耐性検査に依存しており、一元的精度管理の下で行われているわけではない。JVARM においては、一元化された精度管理の下で行われている。食品においては、今回の地方衛生研究所における調査においては同一プロトコールで行う体制を確立した。統一的精度管理に関しては、薬剤耐性においては多くの機関（公的、民間の機関など）が関与しているので、大変な課題も多いが、少なくとも National surveillance においてはきちんとすべきで、本研究班においてできる範囲の対応を進める予定である。

5) 耐性菌保菌者を介しての人 人伝播による拡散；

今回の調査でも、健康人の糞便（飲食店従事者）から ESBL 大腸菌が約 5 % 分離されている。健康保菌者が人 人伝播にどれく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っていく予定である。リスクの程度が判明すれば、人 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も、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。我が国においては平成30年にコリスチンの家畜への飼料添加物としての指定を取り消し、使用を禁止したが、海外からの食品を

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文献的には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しての流入があるので、発生動向の継続とヒトへの拡散ルートの解析を引き続き行っていくことが重要である。

厚生労働省科学研究費(平成30年度～平成32年度)

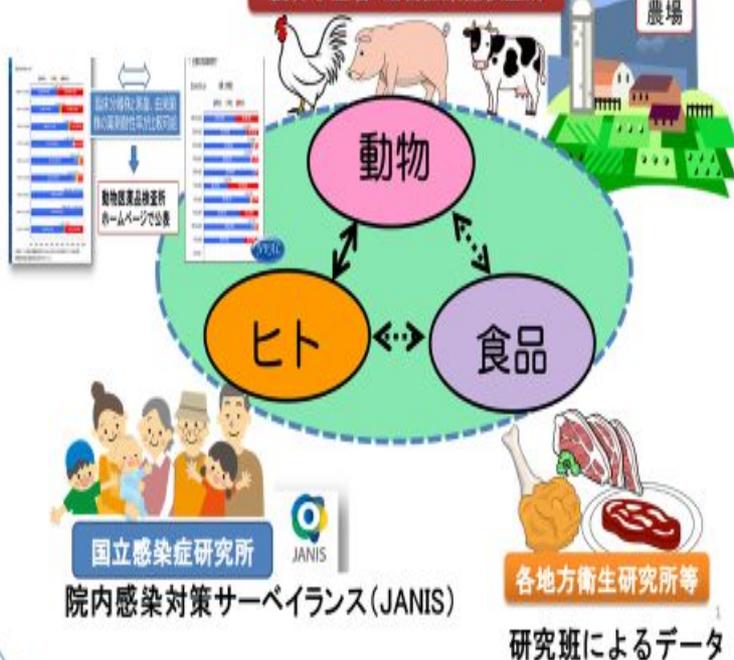
食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

大腸菌・サルモネラ
コリスチン耐性遺伝子

薬剤耐性サーベイランス体制

動物由来薬剤耐性菌モニタリング(JVARM)

農林水産省 動物医薬品検査所



貢献:ワンヘルス

動向調査報告書作成、
WHO・GLASSへの報告、薬剤
耐性菌施策等への利用



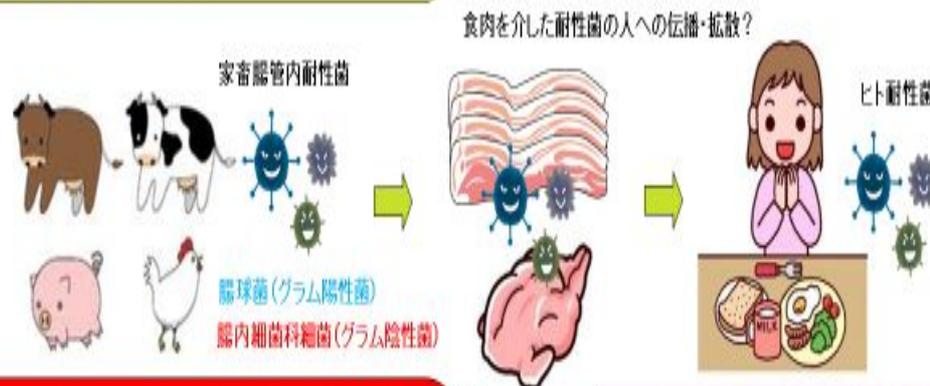
研究課題: 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

研究目的:

- ①大腸菌、腸球菌、サルモネラ、カンピロバクターを中心に、ヒト由来・家畜由来細菌に加え、食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを集計、統合及び解析して、ワンヘルスアプローチによる相互のデータの比較を行える体制の構築、また、WHOの薬剤耐性のグローバルサーベイランス(GLASS)に提出するデータの作成
- ②家畜、食品、ヒト由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子の分子的解析を行い、それらの伝播様式を解明。

期待される成果

- 1) 食肉由来の薬剤耐性菌分離状況の把握
- 2) 食肉由来菌と家畜・臨床分離菌との因果関係の解明
- 3) 食肉を介した耐性菌のヒトへの伝播、拡散の制御
- 4) 家畜・ヒト等への抗菌薬適正使用のための科学的根拠



研究概要・方法

- 1) 食肉検体(国内産食肉、輸入食肉)の収集
- 2) 食肉からの各種耐性菌(ESBL, AmpC, Mcr等)の検出
- 3) 食品由来耐性菌データの収集・統合・分析
- 3) と畜場・食鳥処理場汚染および由来耐性株の解析
- 4) 市販肉の交差汚染経路の解析
- 5) 各種耐性遺伝子と伝播経路の分子遺伝学的解析

今年度のこれまでの成果

- 1) 地方衛生研究所のネットワークで鶏肉等の食品由来耐性菌の分離・解析を行っている
- 2) 採卵鶏の鶏糞の43%からESBL/AmpC産生大腸菌が検出された
- 3) 食鳥処理段階での調査では、... 盲腸内容の約92%、鶏肉の約58%からESBL/AmpC産生大腸菌が分離された
- 4) 国内産鶏肉の62%、輸入鶏肉の29.1%からESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌(主に大腸菌)が検出された
- 5) 健康者由来大腸菌の5.3%がCTX耐性、9.4%がOPFX耐性であった
- 6) 鶏、鶏肉、臨床由来ESBL産生菌のWGS解析を行っている

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
分担課題 地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離される
サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査

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、大野祐太、三津橋和也、 (北海道立衛生研究所)
池田徹也、森本 洋
山上剛志、高橋洋平、武差愛美 (青森県環境保健センター)
小林妙子 (宮城県保健環境センター)
倉園貴至 (埼玉県衛生研究所)
小西典子 (東京都健康安全研究センター)
横山栄二 (千葉県衛生研究所)
古川一郎、政岡智佳 (神奈川県衛生研究所)
吉野友章、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、加藤智子 (富山県衛生研究所)
東方美保、永田暁洋、岩崎理美、児玉 佳 (福井県衛生環境研究センター)
柴田伸一郎 (名古屋市衛生研究所)
坂田淳子、梅川奈央、高橋佑介、若林友騎 (大阪健康安全基盤研究所)
福田弘美、東野和直 (堺市衛生研究所)
吉田孝子 (奈良県保健研究センター)
荻田堅一、坂野 桂、秋山由美 (兵庫県立健康科学研究所)
川瀬 遵、小谷麻祐子 (島根県保健環境科学研究所)
狩屋英明、森本晃司、仲 敦史 (岡山県環境保健センター)
清水裕美子、竹原佑美 (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)
大羽広宣、村瀬浩太郎、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)
青野 学、仙波敬子、木村千鶴子、 (愛媛県立衛生環境研究所)
阿部祐樹

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。前回の本研究班の調査で、多くの地方衛生研究所（以下、地研）が、食品由来菌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。地研ネットワークの協力により、ヒト及び食品由来サルモネラ株、大腸菌株、カンピロバクター株について薬剤耐性状況を調査した。今期（2018年）分離株と合わせ、サルモネラに関しては、2015～2018年に分離されたヒト由来 1425株中の 574株（40.3%）、及び食品由来 433株中の 388株（89.6%）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から 10剤に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 25株、食品由来株中に 36

株認められた。2015～2018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、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* 株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、2015～2018年分離のヒト由来1034株中の375株(36.3%)、及び食品由来32株中の18株(56.3%)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2倍以上高かったが、多剤耐性状況は両者で類似していた。その他の大腸菌株(非病原性大腸菌を含む)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高度の多剤耐性傾向を示した。カンピロバクター株については、全国の地研で共通のプロトコル及び判定表を新規に作成し、統一した方法で感受性検査と判定を行った。*C. jejuni*株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。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、本研究班で実施されている。これらのデータは、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」及びWHOのGLASSに提供されている。また、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、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「AMRに関するグローバルアクションプラン」を採択し、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リングされていない。

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、これに基づき、前回の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の薬剤耐性に関する情報収集体制の構築を担当した。全国的調査のために、プロトコル(サルモネラ、大腸菌)、薬剤、器材等を統一して感受性検査を実施し、さらに、ワンヘルス・アプローチのために、地研のデータをJANISやJVARMのデータと統合し一元化する方法論を開発した。

今回の本研究班において、当分担任は全国の地研ネットワークと協力し、ヒト及び食品から分離されたサルモネラや大腸菌の薬剤耐性状況を引き続き調査するとともに、カンピロバクターについても統一されたプロトコルや判定表を作成して感受性検査を実施し、食品由来耐性菌に関する情報収集体制をさらに強固にすることを旨とする。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提供されるとともに、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繋げていく。

B. 研究方法

1. 薬剤耐性調査対象菌株

2018年にヒト(患者)及び食品から分離され、サルモネラ属菌、大腸菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリと判定された菌株を対象とした。ヒト由来株は、感染性胃腸炎や食中毒の患者検体から分離されたものを対象とし、検体情報として、性別、年齢、症状、検体の種類、分離年を可能な範囲で求めた。食品由来株は、分離した食品の種類、分離年月日を求め、食品が食肉の場合は、国産、輸入(国名)、不明の

情報を記載した。

2. 薬剤感受性検査

協力 23 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、昨年度研究報告書に記載した方法により感受性試験と判定を実施した。カンピロバクターについては、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及び判定表」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。以上の菌株について、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・血液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、結果表に記入した。

3. 結果の報告・集計と解析

サルモネラ株及び大腸菌株については、検体情報と菌株情報（血清型）を記載した。大腸菌株はさらに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 EAaggEC、他の下痢原性大腸菌）に分類した。カンピロバクター株については検体情報と菌株情報（*C. jejuni*、*C. coli*）を記載した。以上の菌株について、感受性ディスク阻止円径と SIR 判定結果を感受性検査結果表に記載し、研究分担者である愛媛県立衛生環境研究所に送付し、集計・解析を行った。なお、コリスチンについては、CLSI ディスク拡散法の SIR 判定表がないため、阻止円径のみを記載した。

4. サルモネラ株の血清型別薬剤耐性解析

2015～2018 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。

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も審査され、承認された。本審査にしたがい、全ての分離株及び調査情報は個人を特定できる情報を含まない状態で収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

1. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ

株の内訳と血清型

2018 年に収集されたサルモネラ株は、ヒト由来 240 株、食品由来株 82 株、総計 322 株で、それぞれの内訳と耐性率を表 1 及び表 2 に示す（株数は 2019 年 3 月 2 日までの集計で、暫定的なものである）。1 剤以上に耐性を示した菌株の割合（耐性率）は、ヒト由来株 35.8%、食品由来株 89.0%で、前回の本研究班で 2015 年～2017 年に収集された菌株の結果と同様であった。2015 年～2017 年に収集されたサルモネラ株と合わせた、ヒト由来 1425 株、食品由来株 433 株について、H 抗原を含めた血清型別の割合を図 1 に示す。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 1 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。

2. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の薬剤耐性状況

2015 年～2018 年に収集されたヒト由来株 1425 株及び食品由来株 433 株の 18 剤に対する耐性率を年次別に示す（表 3、4）。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が、KM は食品由来株で耐性率が高い傾向が見られた。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、食品由来株でやや高い傾向であった。一方、アミノグリコシド系薬 GM、AMK、キノロン系薬 CFX、NFLX、ホスホマイシン系薬 FOM、カルバペネム系薬 IPM、MEPM に対する耐性率は低いか、0%であった。全体として、年次別に顕著な違いは認められなかった。

3. 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 年～2018 年に収集された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（433 株）において、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. 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。*S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* 株の各種抗菌剤に対する耐性率を年次別に示す（表 5、6）。また、2015 年～2018 年に収集された *S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* の計 344 株

の耐性率を図 2 に示す。これらの菌株には共通する点が多いが、それぞれの血清型に特徴的な点も認められた。すなわち、*S. Schwarzengrund* では CTX、CAZ、CFX 耐性が低く、*S. Manhattan* では KM 耐性が認められず、ST 耐性も低かった。

一方、ヒト由来株 (1425 株) の上位 5 位を占める、*S. Infantis*、*S. Enteritidis*、*S. Thompson*、*S. 4:i:-*、*S. Saintpaul* の計 627 株の各種抗菌剤に対する耐性率を年次別に示す (表 7、8、9、10、11)。それぞれの血清型で多少の年次間の増減は認められるが、全体的傾向として血清型別の耐性率に興味深い特徴が認められたので、上記 5 種の血清型に *S. Schwarzengrund* を加えた 6 種の血清型株について相互に比較した (図 3)。*S. 4:i:-* は国産鶏肉からの検出率は低いがヒトでは主要な血清型の一つで、ABPC、SM、TC に対する耐性率が最も高く、国産鶏肉由来株の主な血清型である *S. Infantis* と *S. Schwarzengrund* では ABPC 耐性率は低いが SM、TC 耐性率は高かった。一方、鶏肉よりも鶏卵から分離される *S. 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 *S. Saintpaul* 及び *S. Thompson* においても SM、TC 耐性率は低かった (図 3)。

次に、ヒト由来株と食品由来株の両方で認められ、かつ食品由来株の主要な血清型である *S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* 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 (表 12、図 4)、両血清型ともヒト由来株と耐性傾向が非常に類似しており、*S. Schwarzengrund* と *S. Manhattan* では耐性率そのものもヒト由来株と近似であった (図 4)。

4. ヒト及び食品から分離された大腸菌株の薬剤耐性状況

2015~2018 年分離のヒト由来大腸菌 1034 株のうち、18 剤の 1 剤以上に耐性を示した株は 375 株で、耐性率は 36.3%であった (表 13)。大腸菌株の分類別耐性率は、EHEC27.6%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 73.5%、その他 69.0%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 32 株のうち、18 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 56.3%であった。分類別耐性率は、EHEC33.3%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 69.2%であった。

5. 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 (表 13)、多剤耐性傾向については両者間で大きな差がなく、一方、非病原性大腸菌を含むその他の大腸菌株では下痢原性大腸菌と比べて 7 剤~12 剤の多剤耐性株の頻度が高かった (図 5)。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 CPFY、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、その他の大腸菌株は 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、高度の耐性傾向であった (図 6)。

ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌との関連が示唆される CTX、CAZ、CFX に耐性の株が、ヒト由来株中に 49 株が見いだされた。図 7 に示すように、下痢原性大腸菌株の大部分はこれら 3 剤のうち 1 剤に耐性を示し、その他の大腸菌株の多くは 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 8)、GM、AMK、CTX、キノロン系薬 CPFY、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。

6. ヒト及び食品から分離されたカンピロバクター株の薬剤耐性状況

カンピロバクター株については、全国の地研で共通のプロトコル及び判定表を、朝倉、小西研究分担者と共同で作成し、統一した方法で感受性検査と判定を行った (本稿末尾資料)。分離株数が多い *C. jejuni* 株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 (図 9)。*C. coli* は菌株数が多くないが、ヒト由来株、食品由来株とも、EM 及び CPFY に対する耐性率が *C. jejuni* 株よりも明らかに高かった (データは示していない)。

D. 考察

前回の本研究班での調査に引き続き、全国 23 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、2018 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 (240 株) は 35.8%、

食品由来株（82株）は89.0%が、1剤以上の抗菌剤に耐性を示した。2015～2018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。

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剤、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25株、食品由来株中36株認められた。高度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。

2015～2018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 *S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. 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。例えば、*S. Manhattan* ではKM耐性が全く認められなかった。このような違いは養鶏場等での使用抗菌剤の種類を反映しているのかもしれない。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。それぞれの血清型において、ヒトの感染に至るまでの生息環境における抗菌剤への暴露の違いを反映しているのかもしれない。鶏肉から分離される *S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* は耐性率が高い傾向であった。今回の調査で鶏肉から分離されないか、分離が少ない血清型である、*S. Enteritidis*、*S. Thompson*、*S. 4:i:-*、*S. Saintpaul* では、*S. 4:i:-*を除いて各種抗菌剤に対する耐性率があまり高くない傾向であったが、*S. 4:i:-*はABPC、SM、TCに対して耐性率が高く、抗菌剤を投与される食用鶏以外の保菌動物の存在が示唆される。

食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌の両方で認められる *S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* 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。*S. Schwarzengrund* と *S. Manhattan* 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高い。*S. Infantis* ではヒト由来株の耐性率は食品由来株の4割程度で、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、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。

カンピロバクターについても、今回新たに感受性検査プロトコルと判定基準を決定し、全ての協力地衛研が統一された方法で検査を実施した。*C. jejuni* 株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。また、*C. coli* は菌株数が多くないが、ヒト由来株、食品由来株とも、EM及びCPFXに対する耐性率が *C. jejuni* 株よりも明らかに高かった。

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。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ネットワーク整備が必要である。

E. 結論

全国23地研の協力を得て、2015～2018年に分離されたヒト及び食品由来のサルモネラ株と大腸菌株、及び2018年分離のカンピロバクター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。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、本研究班で実施され

ている。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が期待される。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 四宮博人：食品由来細菌の薬剤耐性モニタリング—特にサルモネラ属菌について、シンポジウム「薬剤耐性ワンヘルスアプローチ」第 71 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2018.10.6-7、松山
- 2) Semba Keiko, Yuki Abe, Sachiyo Sonobe, Manabu Aono, Komei Shirabe, Akei Kai, Keigo Shibayama, Makoto Onishi, Haruo Watanabe and Hiroto Shinomiya: Monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. of food origin from 2015–2017 in Japan. 第 92 回日本細菌学会総会、2019.4.23-25、札幌 (予定)
- 3) Yuki Abe, Tsuyoshi Sekizuka, Sachiyo Sonobe, Keiko Semba, Manabu Aono, Makoto Kuroda and Hiroto Shinomiya: A megaplasmid carrying multidrug-resistance genes in *Salmonella* *Infantis* isolated from patients and broiler meat. 第 92 回日本細菌学会総会、2019.4.23-25、札幌 (予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

渡邊班地衛研グループ薬剤耐性菌検査プロトコル (*Campylobacter jejuni/coli*)

1. 検査項目

薬剤感受性試験

2. 検体の種類・適用範囲

ヒトおよび食品由来 *Campylobacter jejuni/coli* と判定された菌株

3. 検査法

CLSI 法に準拠したディスク拡散法

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 薬剤感受性用寒天平板培地：5%羊（馬）脱線維血液加 Mueller-Hinton agar
- ② 菌液調整用：滅菌生理食塩水
- ③ 薬剤ディスク：BD センシディスク
エリスロマイシン（EM）、テトラサイクリン（TC）、セファロチン（CET）
シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸（NA）、アンピシリン（ABPC）
- ④ 薬剤感受性試験用標準菌株
Staphylococcus aureus ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922

2) 器具・器材等

- ① 白金線，白金耳
- 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：通常のふ卵器の場合は、市販の微好気用ガスキットを利用する。または、微好気培養のできるふ卵器を用いる。
- ⑦ McFarland No.0.5 標準比濁系

6. 操作上の注意について

1) 菌株について

前日に供試菌株を非選択分離培地に分離培養し、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

非選択培地に分離した菌株（36～37℃・48時間，または42℃・24時間培養菌）を滅菌生理食塩水に懸濁し，McFarland 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。ただし，*Campylobacter*属菌は乾燥に弱いので，固く絞り過ぎないこと。
- ② 5%羊（馬）脱線維血液加 Mueller-Hinton agar に塗抹する。平板を約60°ずつ回転させた位置から，3回塗抹する。綿棒に菌液をつけるのは最初に行った1回でよい。
- ③ ディスクディスペンサーを用いてディスクを置く（ディスク配置図参照）。42℃・24時間，微好気培養する。

注意：①から③の操作は，出来るだけ迅速に行う。菌を塗抹した寒天平板培地を長時間大気中に置かないようにする。

3) 測定

培養後，シャーレの蓋を取って，表から観察し，ディスク周囲に形成された阻止円直径を測定する。

カンピロバクター薬剤耐性判定表 (H30 渡邊班地衛研グループ)

感受性ディスク名	CLSI* または参考値**			標準株***	
	耐性(R) (\leq mm)	中間(I) (mm)	感受性 (S) (\geq mm)	<i>S. aureus</i> ATCC259 23	<i>E.coli</i> ATCC259 22
エリスロマイシン(EM)*	12	13-15	16	22-30	-
テトラサイクリン(TC)*	22	23-25	26	24-30	-
セファロチン(CET)**	阻止円なし (6 mm)	-	-	29-37	-
シプロフロキサシン(CPFX)*	20	21-23	24	22-30	-
ナリジクス酸(NA)**	13	14-18	19	-	22-28
アンピシリン(ABPC)**	13	14-16	17	27-35	-

・判定については感受性ディスク添付文書を参照のこと

* CLSI M45 3rd. ed, 2016

**CET 以外:T. Luangtongkum *et al.* J.Clin.Microbiol. 45(2): 590-4, 2007; CET: 本研究班

****S. aureus* ATCC25923: CLSI M45 3rd. ed, 2016; *E. coli* ATCC25922: CLSI M100-S23.

 ミューラーヒントン寒天培地(血液添加なし)を用い、36~37°C、16~18 時間、好気培養

表 1. ヒト及び食品由来サルモネラ株の薬剤耐性状況
(2018 年分離株 n=322)

(2019/3/2 時点)

由来	菌株数	耐性菌株数#	耐性率	
ヒト由来	240	86	35.8%	
食品由来	国産鶏肉	76	67	88.2%
	外国産鶏肉	3	3	100.0%
	その他・不明	3	3	100.0%
	合計	82	73	89.0%

#18 抗菌剤中 1 剤以上に耐性(R)を示した菌株

表 2. ヒト(患者)由来サルモネラ株の検体別内訳と耐性率
(2018 年分離株 n=240)

(2019/3/2 時点)

検体名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
糞便・直採便・直腸拭い液	175	66	37.7%
血液	1	0	0.0%
尿・カテーテル尿	3	1	33.3%
菌株	5	1	20.0%
開放膿	1	1	100.0%
右下腿骨組織	1	1	100.0%
不明	54	16	29.6%
合計	240	86	35.8%

図1. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型 (2015-2018)

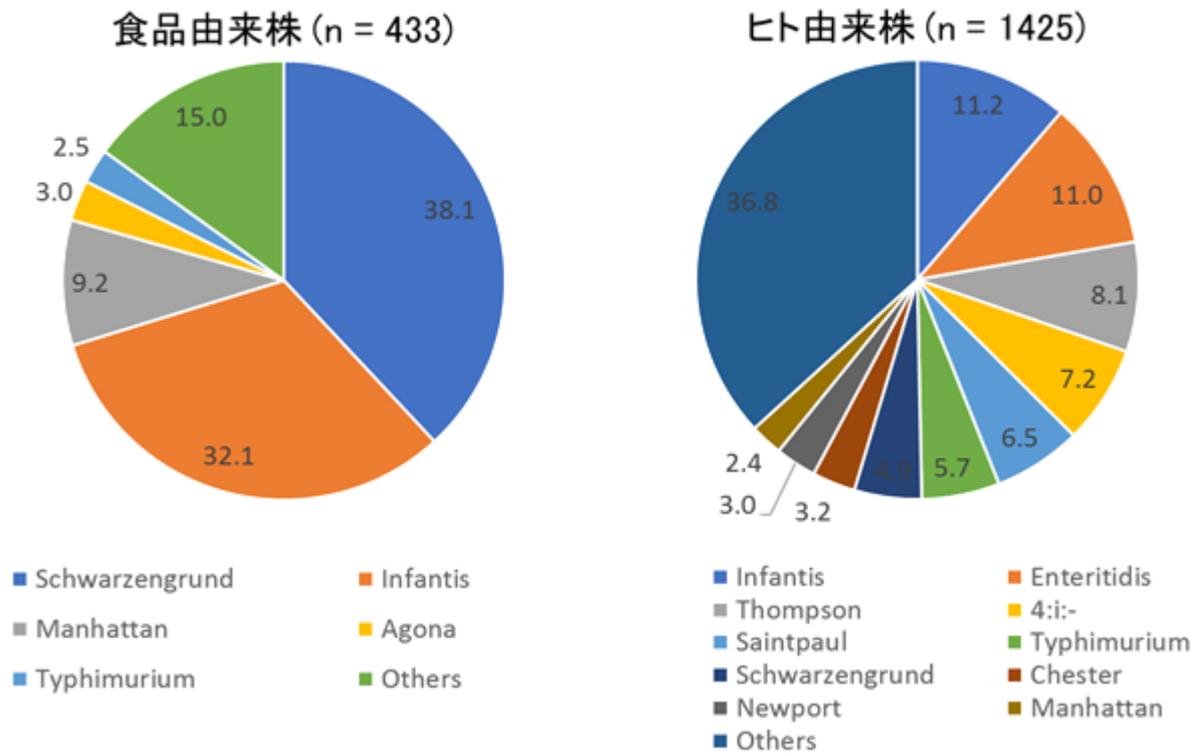


表 3. ヒト由来 non-typhoidal *Salmonella* spp の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=388)	2016 (n=361)	2017 (n=436)	2018 (n=240)	2015-2018 (n=1425)
ABPC	17.3	17.7	15.4	15.0	16.4
GM	0.3	0.6	0.7	0.8	0.6
KM	5.9	11.6	7.6	8.8	8.4
SM	27.3	29.9	27.3	23.8	27.4
TC	32.5	29.1	28.0	21.3	28.4
ST	4.4	6.6	8.9	7.1	6.8
CP	2.3	6.4	5.0	5.4	4.7
CTX	0.3	2.8	3.0	2.9	2.2
CAZ	0.3	2.5	1.6	1.7	1.5
CFX	0.0	1.4	0.5	0.4	0.6
FOM	0.0	0.3	0.5	0.4	0.3
NA	7.0	8.0	9.4	6.7	7.9
CPFX	0.3	0.8	1.6	0.4	0.8
NFLX	0.3	0.8	0.5	0.0	0.4
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1 剤以上耐性数	165	151	172	86	574
1 剤以上耐性率	42.5	41.8	39.4	35.4	40.3

表 4. 食品由来 non-typhoidal *Salmonella* spp の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=156)	2016 (n=110)	2017 (n=85)	2018 (n=82)	2015-2018 (n=433)
ABPC	17.9	13.6	11.8	7.3	13.6
GM	0.0	0.9	1.2	0.0	0.5
KM	47.4	47.3	44.7	46.3	46.7
SM	82.7	70.9	68.2	78.0	76.0
TC	85.9	76.4	72.9	76.8	79.2
ST	19.9	16.4	11.8	34.1	20.1
CP	7.1	10.0	2.4	7.3	6.9
CTX	5.1	5.5	8.2	3.7	5.5
CAZ	4.5	6.4	8.2	3.7	5.5
CFX	2.6	3.6	7.1	2.4	3.7
FOM	0.0	0.9	1.2	0.0	0.5
NA	18.6	18.2	14.1	14.6	16.9
CPFX	0.0	0.9	1.2	0.0	0.5
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1 剤以上耐性数	143	96	76	73	388
1 剤以上耐性率	91.7	87.3	89.4	89.0	89.6

表 5. 食品由来 *S. Infantis* の耐性率 (2015-2018 年)

	2015 (n=65)	2016 (n=33)	2017 (n=19)	2018 (n=22)	2015-2018 (n=139)
ABPC	10.8	12.1	5.3	9.1	10.1
GM	0.0	3.0	0.0	0.0	0.7
KM	46.2	42.4	15.8	27.3	38.1
SM	81.5	72.7	68.4	86.4	78.4
TC	89.2	81.8	68.4	81.8	83.5
ST	18.5	30.3	0.0	40.9	22.3
CP	3.1	3.0	0.0	0.0	2.2
CTX	4.6	6.1	5.3	4.5	5.0
CAZ	3.1	9.1	5.3	4.5	5.0
CFX	4.6	9.1	5.3	9.1	6.5
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NA	3.1	9.1	0.0	4.5	4.3
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 6. 食品由来 *S. Schwarzengrund* の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=47)	2016 (n=37)	2017 (n=44)	2018 (n=37)	2015-2018 (n=165)
ABPC	17.0	5.4	0.0	5.4	7.3
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	85.1	86.5	77.3	78.4	81.8
SM	93.6	78.4	81.8	78.4	83.6
TC	95.7	83.8	79.5	86.5	86.7
ST	36.2	16.2	22.7	51.4	31.5
CP	19.1	10.8	4.5	8.1	10.9
CTX	0.0	0.0	2.3	0.0	0.6
CAZ	0.0	0.0	2.3	0.0	0.6
CFX	0.0	0.0	2.3	0.0	0.6
FOM	0.0	0.0	2.3	0.0	0.6
NA	25.5	18.9	6.8	18.9	17.6
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図2. 主要な食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015～2018年分離の合計 n = 344)

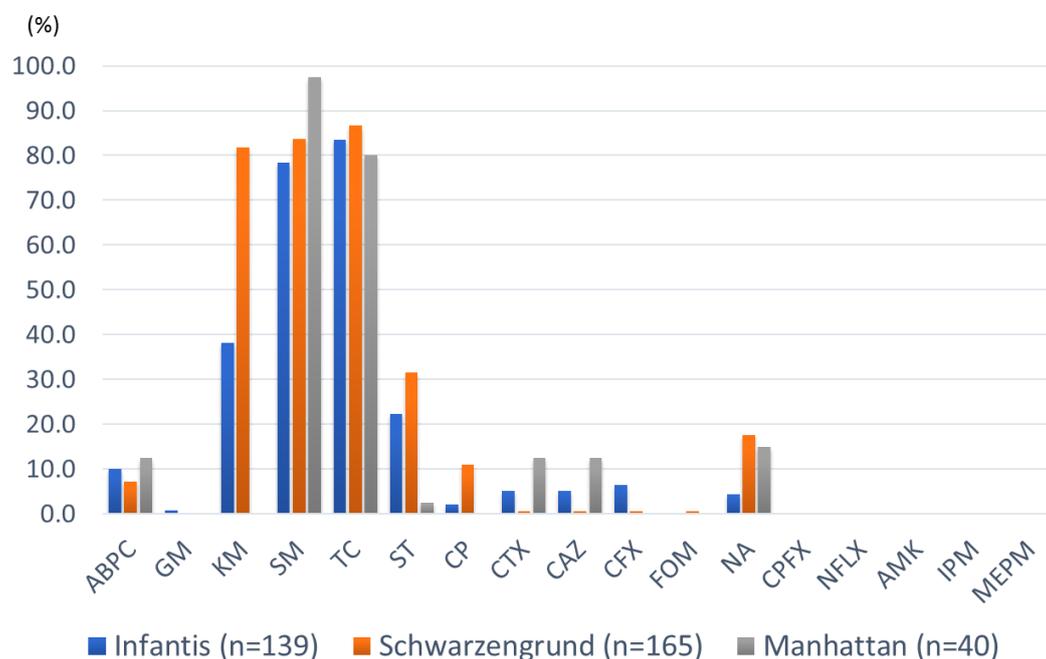


表 7. ヒト由来 *S. Infantis* の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=34)	2016 (n=48)	2017 (n=62)	2018 (n=16)	2015-2018 (n=160)
ABPC	0.0	2.1	0.0	12.5	1.9
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	20.6	14.6	9.7	25.0	15.0
SM	29.4	33.3	22.6	50.0	30.0
TC	47.1	33.3	25.8	56.3	35.6
ST	14.7	14.6	6.5	18.8	11.9
CP	0.0	0.0	0.0	12.5	1.3
CTX	0.0	2.1	0.0	6.3	1.3
CAZ	0.0	2.1	0.0	0.0	0.6
CFX	0.0	2.1	0.0	0.0	0.6
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NA	8.8	4.2	6.5	0.0	5.6
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 8. ヒト由来 *S. Enteritidis* の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=39)	2016 (n=40)	2017 (n=47)	2018 (n=31)	2015-2018 (n=157)
ABPC	5.1	17.5	4.3	9.7	8.9
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	2.6	2.5	0.0	0.0	1.3
SM	12.8	12.5	12.8	19.4	14.0
TC	10.3	2.5	4.3	12.9	7.0
ST	5.1	0.0	0.0	0.0	1.3
CP	2.6	0.0	0.0	0.0	0.6
CTX	0.0	2.5	0.0	0.0	0.6
CAZ	0.0	2.5	0.0	0.0	0.6
CFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FOM	0.0	0.0	0.0	3.2	0.6
NA	10.3	25.0	12.8	32.3	19.1
CPF	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 9. ヒト由来 *S. Thompson* の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=28)	2016 (n=28)	2017 (n=42)	2018 (n=20)	2015-2018 (n=107)
ABPC	0.0	10.7	14.3	0.0	2.8
GM	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0
KM	7.1	0.0	4.8	0.0	1.9
SM	7.1	7.1	11.9	0.0	4.7
TC	3.6	7.1	21.4	0.0	4.7
ST	0.0	7.1	16.7	0.0	1.9
CP	0.0	7.1	14.3	0.0	1.9
CTX	0.0	10.7	11.9	0.0	2.8
CAZ	0.0	7.1	2.4	0.0	1.9
CFX	0.0	7.1	0.0	0.0	1.9
FOM	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0
NA	0.0	0.0	19.0	5.0	0.9
CPF	0.0	7.1	9.5	0.0	1.9
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 10. ヒト由来 S. 4:i:-の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=42)	2016 (n=9)	2017 (n=39)	2018 (n=13)	2015-2018 (n=103)
ABPC	83.3	77.8	79.5	76.9	80.6
GM	2.4	0.0	2.6	0.0	1.9
KM	4.8	0.0	2.6	0.0	2.9
SM	83.3	88.9	82.1	84.6	83.5
TC	81.0	66.7	76.9	84.6	78.6
ST	0.0	0.0	7.7	7.7	3.9
CP	0.0	0.0	7.7	15.4	4.9
CTX	0.0	0.0	2.6	0.0	1.0
CAZ	0.0	0.0	2.6	0.0	1.0
CFX	0.0	0.0	2.6	0.0	1.0
FOM	0.0	11.1	0.0	0.0	1.0
NA	0.0	0.0	5.1	0.0	1.9
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 11. ヒト由来 S. Saintpaul の耐性率(2015-2018 年)

	2015 (n=27)	2016 (n=26)	2017 (n=42)	2018 (n=5)	2015-2018 (n=100)
ABPC	7.4	7.7	14.3	20.0	11.0
GM	0.0	0.0	2.4	0.0	1.0
KM	0.0	3.8	4.8	0.0	3.0
SM	3.7	3.8	11.9	0.0	7.0
TC	40.7	15.4	21.4	20.0	25.0
ST	0.0	11.5	16.7	20.0	11.0
CP	3.7	0.0	14.3	0.0	7.0
CTX	0.0	0.0	11.9	0.0	5.0
CAZ	0.0	0.0	2.4	0.0	1.0
CFX	0.0	3.8	0.0	0.0	1.0
FOM	0.0	0.0	2.4	0.0	1.0
NA	7.4	3.8	19.0	0.0	11.0
CPFX	3.7	0.0	9.5	0.0	5.0
NFLX	3.7	0.0	0.0	0.0	1.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図3. 主要なヒト由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015～2018年分離株 n = 699)

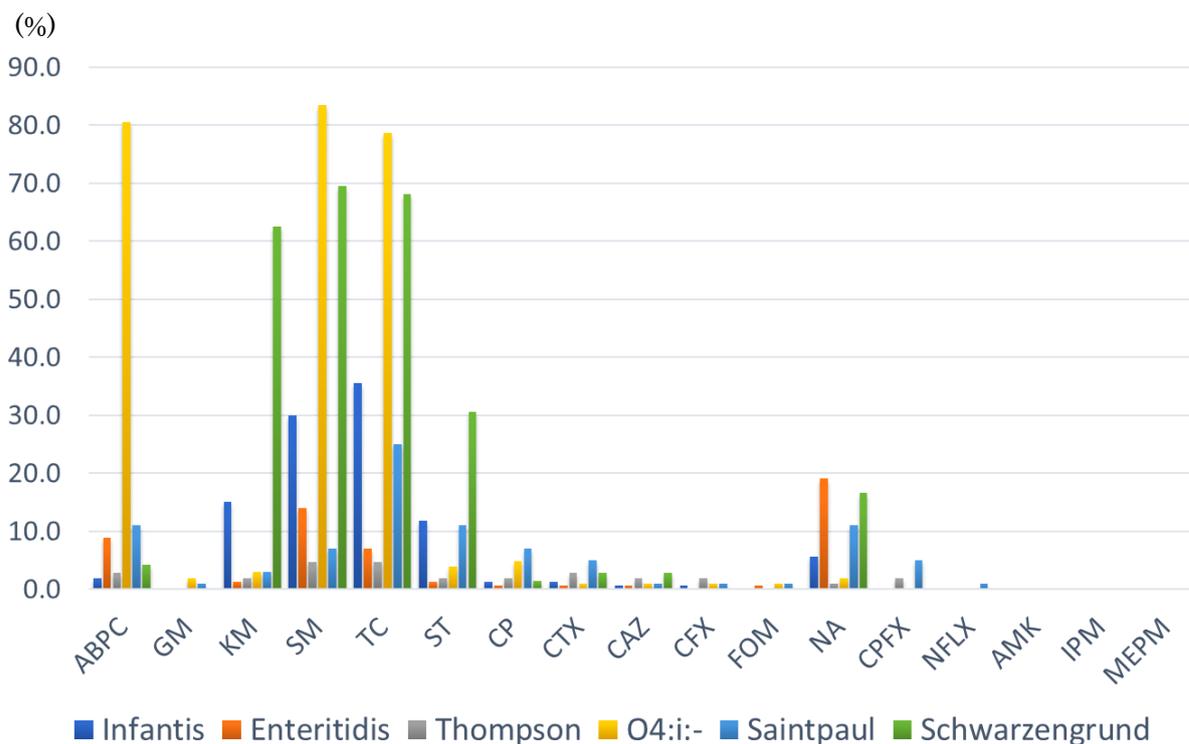


表12. ヒト及び食品から検出される*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan*の耐性率(2015-2018年)

	Infantis		Schwarzengrund		Manhattan	
	ヒト(n=160)	食品(n=139)	ヒト(n=72)	食品(n=165)	ヒト(n=44)	食品(n=40)
ABPC	1.9	10.1	4.2	7.3	2.3	12.5
GM	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	15.0	38.1	62.5	81.8	0.0	0.0
SM	30.0	78.4	69.4	83.6	90.9	97.5
TC	35.6	83.5	68.1	86.7	86.4	80.0
ST	11.9	22.3	30.6	31.5	2.3	2.5
CP	1.3	2.2	1.4	10.9	0.0	0.0
CTX	1.3	5.0	2.8	0.6	0.0	12.5
CAZ	0.6	5.0	2.8	0.6	0.0	12.5
CFX	0.6	6.5	0.0	0.6	0.0	0.0
FOM	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0
NA	5.6	4.3	16.7	17.6	9.1	15.0
CPFEX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図4. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015～2018年) (表12のグラフ)

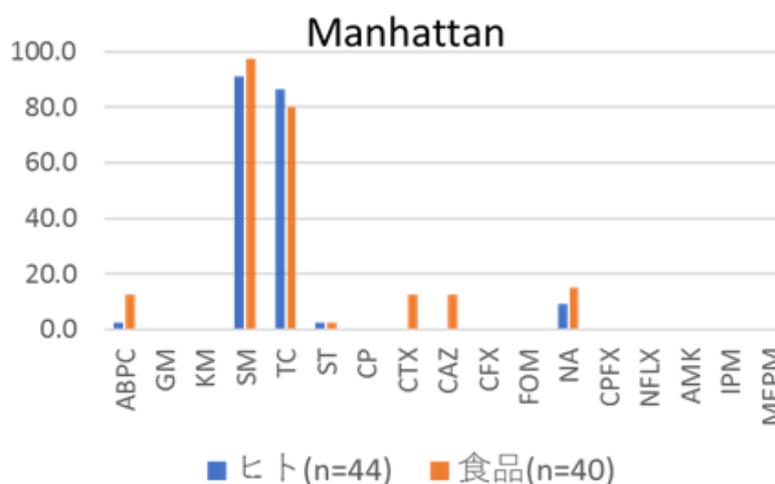
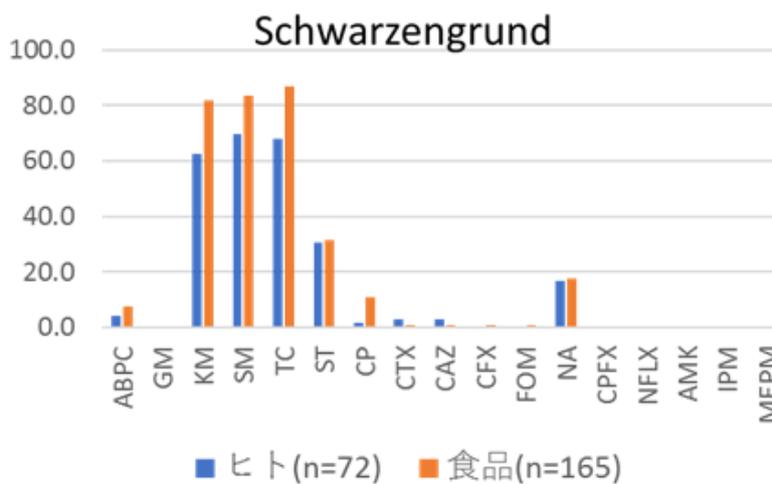
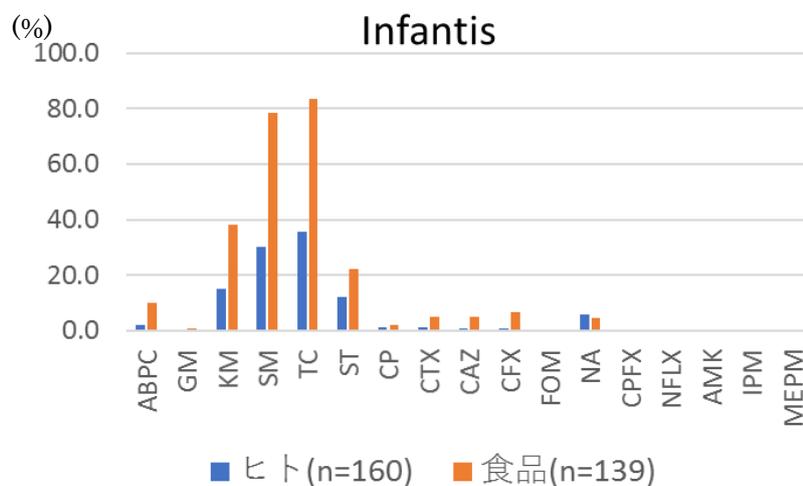


表13. ヒト及び食品由来大腸菌株の薬剤耐性状況
(2015～2018年分離株 n = 1086)

ヒト由来株 (n = 1034)

	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
2018	EHEC	394	88	22.3
	下痢原性	36	24	66.7
	その他	23	16	69.6
	計	453	128	28.3
合計	EHEC	830	229	27.6
	下痢原性	117	86	73.5
	その他	87	60	69.0
	計	1034	375	36.3

食品由来株 (n = 52)

	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	20	13	65.0
	計	28	17	60.7
2018	EHEC	0	0	-
	下痢原性	1	1	100.0
	その他	10	6	60.0
	計	11	7	63.6
合計	EHEC	9	3	33.3
	下痢原性	13	9	69.2
	その他	30	19	63.3
	計	52	31	59.6

#下痢原性EC：EPEC, EIEC, EPEC, EAggEC, 他の下痢原性EC（上記5つに該当せず*astA*保有）

*その他：非病原大腸菌及び病原因子未検査株

図5. ヒト由来大腸菌株の多剤耐性状況
(2015～2018年分離株)

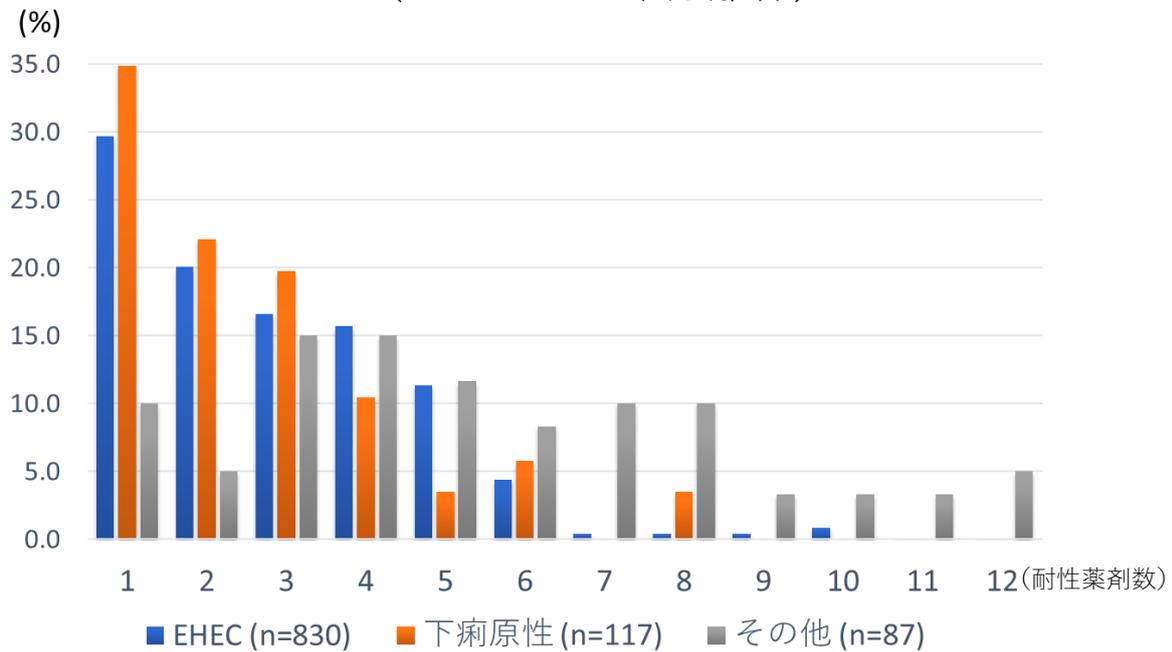


図6. ヒト由来大腸菌株の各種薬剤耐性率
(2015～2018年分離株)

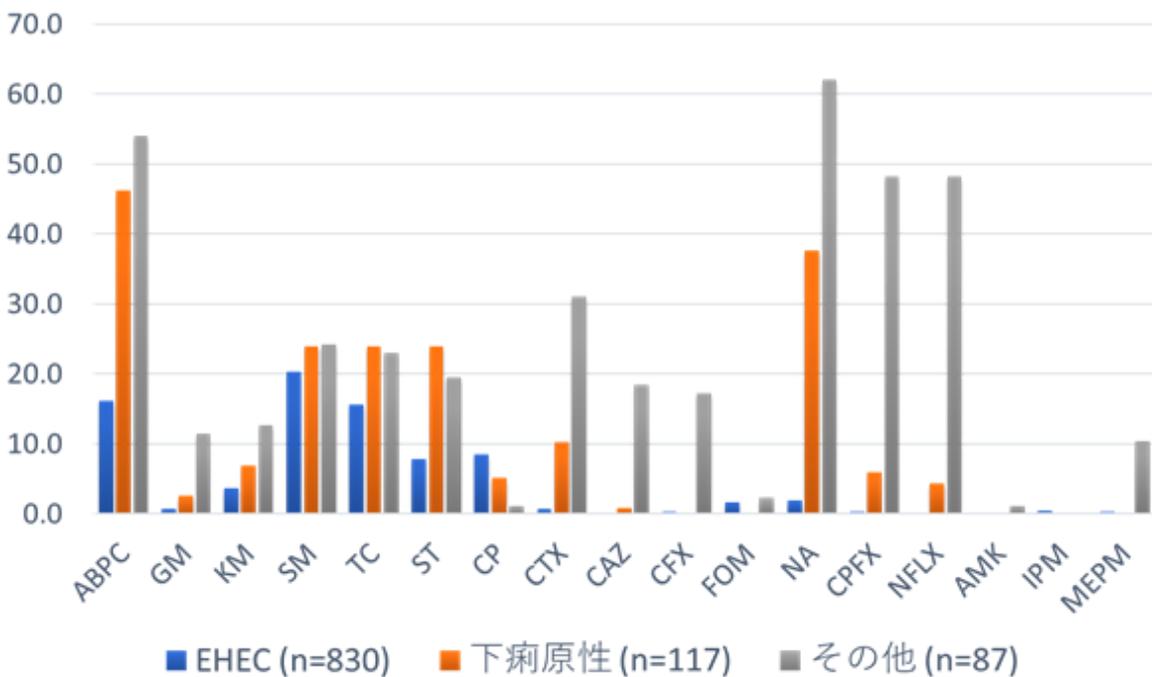


図7. セフェム系薬(CTX, CAZ, CFX)に耐性を示したヒト由来大腸菌株 (2015~2018年分離株)

セフェム薬耐性株の割合
 EHEC = 9/830 (1.1%)
 下痢原性 = 12/117 (10.3%)
 その他 = 28/87 (32.2%)
 全体 = 49/1034 (4.7%)

分離年	分類	耐性薬剤数	CTX	CAZ	CFX
2016	EHEC	3	R	I	S
2017	EHEC	3	R	S	S
2017	EHEC	10	S	S	R
2017	EHEC	9	S	S	R
2017	EHEC	10	S	S	R
2018	EHEC	2	R	I	S
2018	EHEC	2	R	I	I
2018	EHEC	2	R	I	S
2018	EHEC	2	R	S	S
2015	下痢原性	4	R	S	S
2015	下痢原性	2	R	S	S
2015	下痢原性	4	R	S	S
2016	下痢原性	4	R	S	S
2016	下痢原性	2	R	S	S
2016	下痢原性	6	R	S	S
2016	下痢原性	2	R	I	S
2016	下痢原性	4	R	R	S
2016	下痢原性	3	R	S	S
2017	下痢原性	4	R	S	S
2018	下痢原性	3	R	I	S
2018	下痢原性	5	R	S	S
2015	その他	8	R	R	R
2015	その他	10	R	R	R
2016	その他	2	R	S	S
2016	その他	6	R	R	S
2016	その他	6	R	R	S
2017	その他	5	R	S	S
2017	その他	8	R	R	R
2017	その他	11	R	R	R
2017	その他	11	R	R	R
2017	その他	10	R	R	R
2017	その他	12	R	R	R
2017	その他	9	R	I	R
2017	その他	12	R	R	R
2017	その他	7	R	R	R
2017	その他	8	R	R	R
2017	その他	5	R	S	I
2017	その他	6	R	R	S
2017	その他	5	R	S	S
2017	その他	9	R	R	S
2017	その他	3	I	I	R
2017	その他	12	R	R	I
2018	その他	12	R	S	R
2018	その他	8	R	R	R
2018	その他	5	R	S	S
2018	その他	7	R	S	S
2018	その他	5	R	S	S
2018	その他	6	R	S	R
2018	その他	8	R	I	S

図8. 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（2015～2018年分離株）

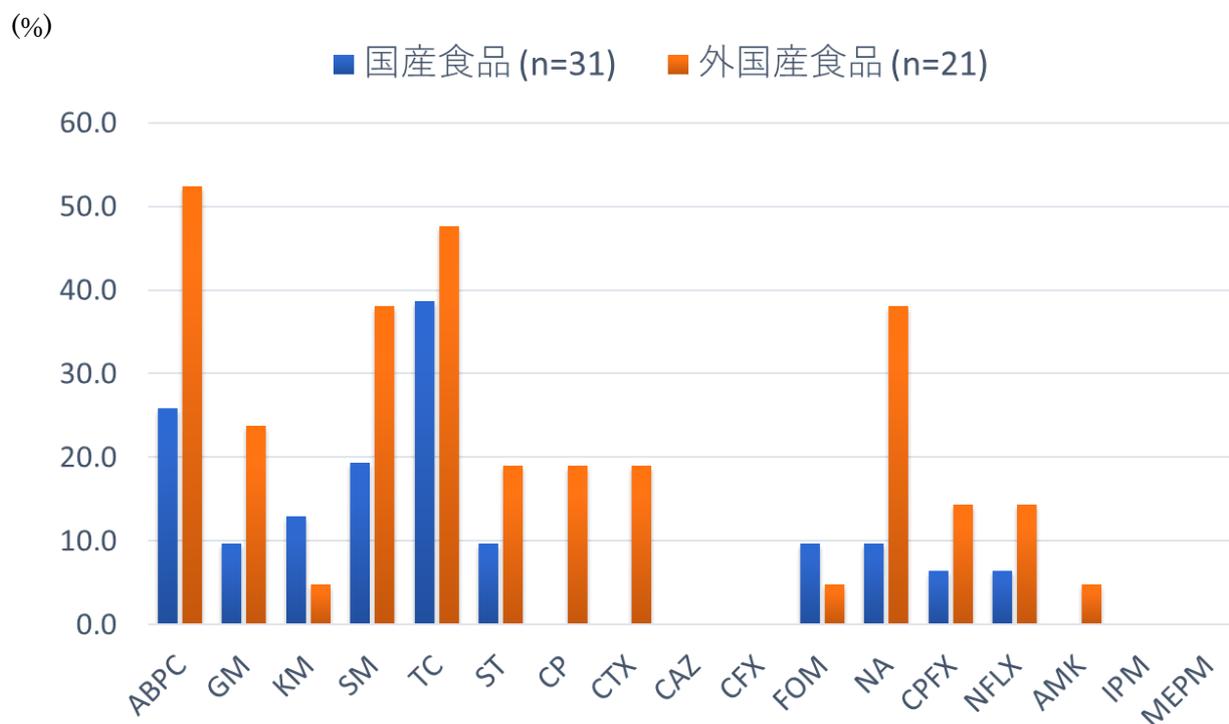
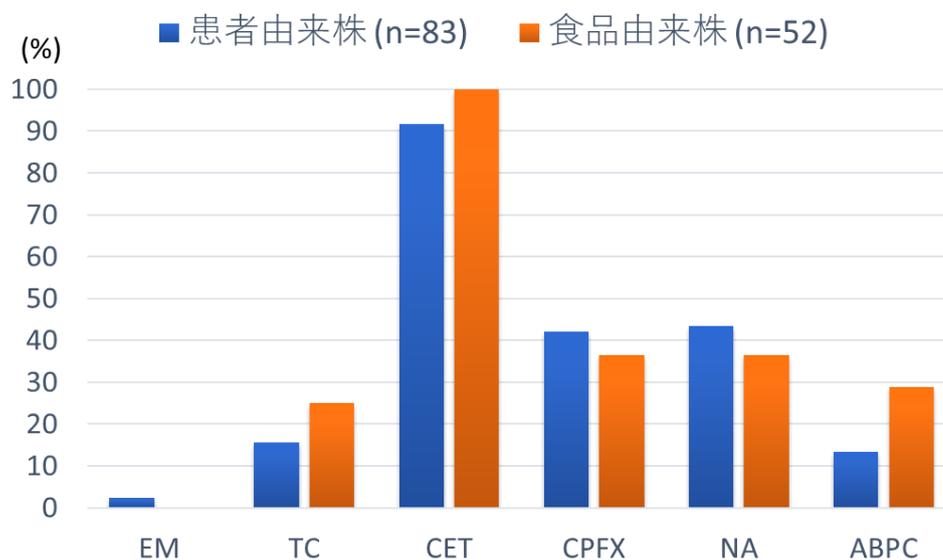


図9. ヒト及び食品由来 *C.jejuni* 株の薬剤耐性率（2018年分離株）



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）
分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

研究分担者 菅井 基行 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター長

研究要旨

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、結果は各国のデータとともにWHOのホームページで公開された。国内のESBL産生菌のゲノム解析候補菌の選定と一部の解析を実施した。また下水からの大腸菌及びESBL産生大腸菌の選択的分離方について検討した。コリスチン耐性に関わる*mcr*遺伝子の全てのバリエントを同時に検出することが可能なmultiplex PCR法を新たに開発した。

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、動物医薬品検査所ならびに地方衛生研究所と協力し、人由来細菌のサーベイランス JANIS、家畜由来細菌のサーベイランス JVARM、ならびに食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを抽出、集計、統合し解析して、継続的に相互のデータ比較を行う。大腸菌、腸球菌、サルモネラについて、JANIS、JVARMのデータ比較を行う。H30年度は2017年のデータ、H31年度は2018年のデータ、H32年度は2019年のデータを解析する。サルモネラについては食品由来細菌のデータについても比較する。薬剤耐性に関する国のサーベイランスデータを用いて、ワンヘルスアプローチをナショナルレベルのデータで進めるのがこの研究の特色である。結果を研究班に提供し、家畜、食品、人の中での薬剤耐性菌／遺伝子の伝播状況の総合的な理解に資する。

また、WHOは2015年から薬剤耐性のグローバルサーベイランス(GLASS)を開始し、各国にナショナルデータの提出を求めている。GLASSはまず人由来検体から始め、将来的に食品由来検体も加えることが検討されている。この研究では分担者四宮（地方衛生研究所）ならびに分担者大西（国立感染症研究所細菌第一部）の協力も得てGLASSに提出するための各菌種のデータをJANISそ

他の調査から収集、集計する。GLASSはJANISが通常実施している集計とは異なる集計手法を指定しているため、通常のJANISの集計とは別途に集計を行い、GLASSが指定するファイル形式ファイルを作成し、GLASSに提出する。H30年度は2017年のデータを集計し、GLASSに提出する。

前年度までの成果からESBL産生腸内細菌科細菌株の分離率において家畜（鶏肉）由来では減少が見られるのに対し、ヒト由来ではむしろ増加傾向にあることが明らかとなった。この違いは何に起因するのかを明らかにするための基盤情報を整えるためにヒト由来代表株においてESBL遺伝子保有プラスミドを含むゲノム解析を行い（H30-31年）、経年的な分子疫学解析を行う（H31-32年）とともに家畜由来株の保有するプラスミドとの比較解析を行う（H31-32年）。またプラスミド性コリスチン耐性遺伝子*mcr*は現在*mcr-1*から*mcr-5*までのバリエントが存在するが、国内では*mcr-1*、*-3*、*-5*が検出されている。国内で収集された家畜由来または食肉由来*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性腸内細菌科細菌株において*mcr*遺伝子保有プラスミドを含むゲノム解析を行い（H30-31年）、プラスミドの比較解析を通して国内での*mcr*保有株の分子疫学を明らかにする（H32年）

B. 研究方法

大腸菌、腸球菌の薬剤耐性について、JANIS で集計されている入院患者全検体由来のデータと、JVARMで集計されている牛、豚、鶏由来のデータを比較し、情報をホームページ等で公開する。大腸菌、腸球菌、サルモネラについて、JANIS、JVARMのデータ比較を行う。JVARMのデータは分担者の川西、サルモネラは分担者の四宮より提供を受ける。JANISでは、各菌種とも数万株の規模のデータを集計する。JVARMならびにサルモネラでは数百株の規模のデータを集計する。H30年度は2017年のデータ、H31年度は2018年のデータ、H32年度は2019年のデータを解析する。サルモネラについては食品由来細菌のデータについても比較する。サーベイランス間で共通している薬剤や同系統の薬剤の耐性率を比較したデータを研究班に提示して、研究班内で人、家畜、食品の間で薬剤耐性菌／耐性遺伝子がどのように伝播しているのかを総合的に解析するための情報に資する。なお、一般公開する比較データについては農水省、厚労省と十分に協議し、一般国民や畜産など関係業界に情報が適切に伝わるように十分留意する。ホームページは国立国際医療研究センターが設置するワンヘルス Web ホームページを用い、掲載データは研究班で作成する。

WHOのグローバルサーベイランス(GLASS)については、これまでに作成した解析プログラムを用いて引き続きデータの集計を進める。H30年度は2017年のデータを集計し、GLASSが指定するデータ形式のファイルを作成して提出する。GLASSが求めるデータのうち、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌についてはJANISのデータベースから必要なデータを抽出する。サルモネラについては、分担者の四宮が全国の地方衛生研究所と協力して収集するデータを提供してもらう。淋菌、赤痢菌については分担者の大西が収集するデータを提供してもらう。それぞれの菌種で、数百から数万株のデータを集計する予定である。これらのデータをもとに、GLASSが指定するデータ形式のファイルを作成する。H31年度、H32年度も同様に2018年、2019年のデータを集

計し、GLASSに提出する。

腸内細菌科細菌におけるESBL産生株や*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性株は、地方衛生研究所、酪農学園大学、広島大学などの研究班の分担または関係機関と連携して収集する。連携研究機関では、主にディスク法による薬剤感受性試験の結果を指標に耐性菌株を収集し、ESBL遺伝子および*mcr*遺伝子の検出をmultiplex PCRにて検討する。ESBL産生性の確認は、ESBLの阻害薬であるクラブラン酸を用いたダブルディスク法、MCR産生性の確認は、MCRの阻害剤であるジピコリン酸を用いたダブルディスク法を用いてそれぞれ行う。感染研では、菌種同定の確認をMALDI Biotyper (Bruker社)、より詳細な薬剤感受性パターンの測定をMicroScan Walkaway (Beckman Coulter社)を用いてそれぞれ行う。細菌ゲノムの解析は短鎖型シーケンサーであるMiniSeq/MiSeq/HiSeq/NovaSeqシステム(Illumina社)にて行い、MLST (multilocus sequence typing)による菌株遺伝型の型別、ResFinderによる薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finderによる保有プラスミドの型別を行い、菌株のメタデータと組み合わせた分子疫学解析を行う。各耐性株の代表株を選別し、長鎖型シーケンサーであるMinION (Oxford Nanopore Technologies社)を併用して完全ゲノム配列を構築し、BLASTとACT (Artemis Comparison Tool)によるプラスミドの配列比較を行う。

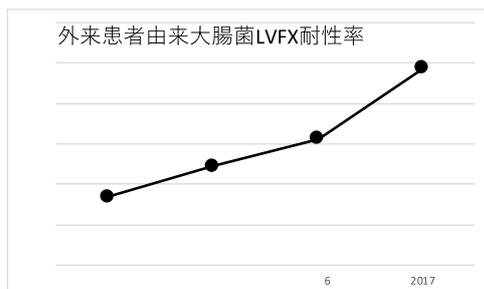
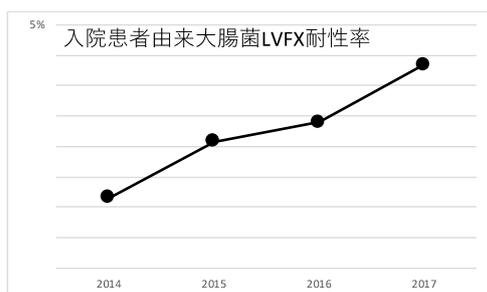
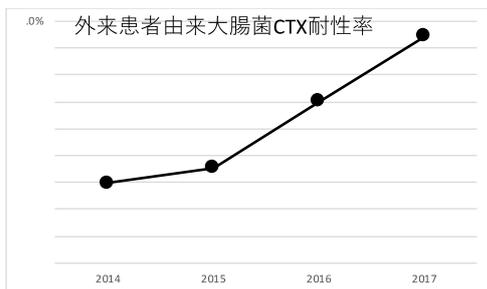
(倫理面への配慮)

C. 研究結果

1. GLASSへの報告

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2016年、2017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、集計した。各菌種とも数千から数万株のデータを集計しGLASS指定フォーマットのファイルを作成し、GLASSに提出した。淋

菌、赤痢菌については分担者大西から国立

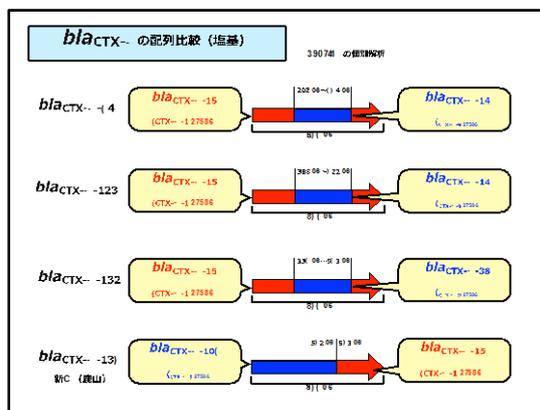


感染症研究所細菌第一部が持つ2017年のデータの提供を受けた。便由来サルモネラについては、分担者四宮より地方衛生研究所が集計した2016年、2017年分のデータの提供を受け、集計を行なった。地方衛生研究所では、独自のエクセルファイルでデータを管理しているため、データをGLASS指定フォーマットのファイルに変換するため、WHOが無償で配布している変換ツールBac Linkと集計ソフトWHONETを活用し作業で提出用ファイルを作成した。今回集計を行なったものの中では、特に大腸菌で近年耐性率の上昇が顕著だった(下図)。

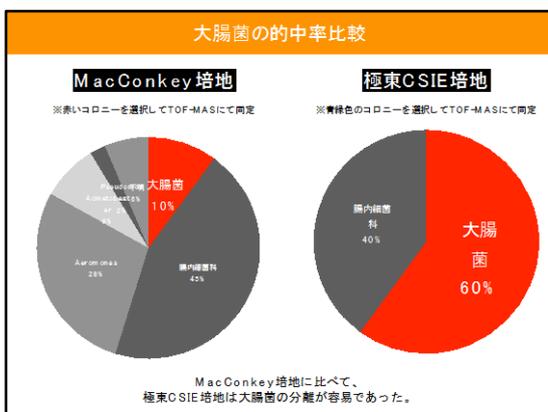
他の菌種では耐性率はほぼ横ばいまたはやや減少傾向にあった。GLASSは今後も各国にデータの提出を求める予定であり、さらに将来的にはGLASSの集計方式が薬剤耐性サーベイランスの世界標準となる可能性があるため、今後もデータの集計を継続する必要がある。なお、GLASSは各菌種において、各薬剤で試験を行う菌株数を同じにすることを前提としているが、JANISはもともと病院が測定しているデータを収集しているため薬剤ごとに測定菌株数が異なるという問題がある。この点についてGLASS責任者とオンライン会議を行い、技術協議を行った。JANIS側で、薬剤感受性試験を実施した株数が最大の薬剤の数を便宜的に分離株数と定義することにして、集計プログラムを作成した。2019年2月に公開されたGLASS reportに日本のデータも掲載された。(https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2017-2018/en/)

2. ESBL産生菌、mcr遺伝子保有コリチン耐性菌の解析

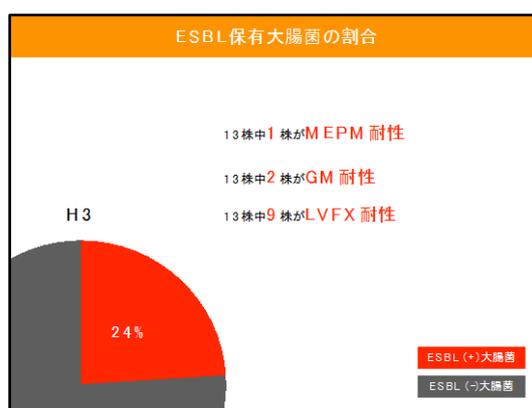
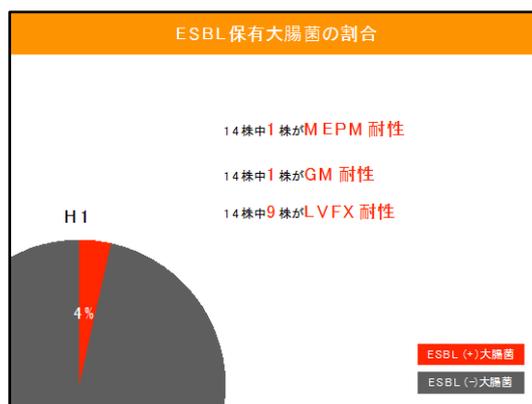
今までに収集済みの臨床分離ESBL陽性腸内細菌科細菌株の分子疫学的解析を目的にドラフトゲノム取得を行い、菌株(大腸菌、肺炎桿菌など)およびESBL遺伝子の型別を進め、プラスミドを含む完全ゲノム解析を行う菌株の選定を行った。この過程で、広島にて検出された新規CTX-M遺伝子をCTX-M-137と名付けた。これは、CDSの5'側配列がCTX-M-9グループで、3'側配列がCTX-M-1グループという、非常に特徴的な塩基配列を有していた。



次年度から施行される WHO Tricycle Surveillance Project のための呼び検討を行った。下水中の薬剤耐性菌に着目し、環境由来の ESBL 産生大腸菌の調査をするための条件検討を実施した。広島市内の下水処理施設に許可を頂き、下水中の ESBL 産生大腸菌が大腸菌全体の中で占める割合を調査した。BTB 培地、MacConkey 培地、1 μ g/mL CTX 添加 MacConkey 培地、CHROMager ESBL 培地、CHROMager mSuperCARBA 培地、極東 CSIE 培地を使用し、どの組み合わせが最も効率的に割合を算出できるか条件検討を行った。その結果、環境から効率的に大腸菌のみを分離する培地として、MacConkey 培地よりも極東 CSIE 培地のほうが適していることが明らかになった（下図）。



このような条件検討をもとに算出された“ESBL 産生大腸菌が全大腸菌に占める割合”は、下水を採取した場所により 4~24% とかなりの差が認められることが判明した（下図）。これらの大腸菌は、ESBL を保有しつつアミノグリコシド系、キノロン系の薬剤にも耐性を示したため、今後さらに解析する必要が認められた。

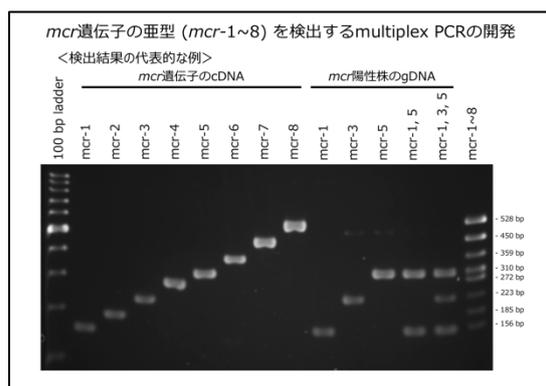


また、CTX-M-9 group の検出が多い場所が存在し、PCR での型別分類が不可能な ESBL の存在も認められた（下図）。



プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は、2018 年 4 月以降、*mcr-6* から *mcr-8* まで 3 種類の新たなバリエーションが報告された。また、既知の *mcr-1* から *mcr-5* に関しても、数多くの遺伝子多型が報告された。そのため、今年度は *mcr-1* から *mcr-8* まで全てのバリエーションを同時に検出することが可能な multiplex PCR 法を新たに開発した。ドラ

フトゲノム配列を解析済みの国内家畜分離コリスチン耐性大腸菌 86 株を同検出系を用いて解析した結果、*mcr-1*、*mcr-3*または*mcr-5*の単独陽性株、*mcr-1*および*mcr-5*の共陽性株、*mcr-1*、*mcr-3*および*mcr-5*の共陽性株を問題なく検出することが可能であり、今後有用な検査法と考えられた（下図）。



国内の分離株に加え、中国・華南農業大学との共同研究にて、中国の家畜分離腸内細菌科細菌300株超を同検出系を用いて解析した結果、大腸菌または肺炎桿菌にて、*mcr-1*または*mcr-3*の単独陽性株、*mcr-1*および*mcr-8*の共陽性株を検出した。

日本および中国の分離菌株において、複数の*mcr*遺伝子が同時に検出された菌株の代表的な6株に関して完全ゲノム配列を決定したところ、各々の*mcr*遺伝子は異なる種類のプラスミド上にコードされていた。またイムノクロマト法による MCR-1 検出キットの MCR ヴァリアントの検出能について評価した。現在、中国における薬剤耐性菌株の収集を継続している。

D. 考察

1. GLASSへの報告

GLASSが求めるデータフォーマットでは、菌株のデータを入院外来別、年齢群別、性別、検体別に層別化している。一方、JANISでは通常入院患者のみを対象として、年齢、性別、検体を分けていない。GLASSの集計で、検体や入院外来別で薬剤耐性率に違いがあることが明らかになった。今後

JANISにおいてもGLASSに準じた集計を進めていく必要があると考えられる。他の研究班とも連携し、公開するデータの形式を検討していきたい。

2. ESBL産生菌、*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性菌の解析

国内ではこのような耐性大腸菌について、今後はESBLの型別分類を進めると共にプラスミドの全長配列解析を進め、さらに他の薬剤に対する耐性遺伝子の保有状況も調査する必要がある。また次年度はWHOが主導するTricycle Surveillanceに参加するため、ヒト、食品、動物由来のESBL陽性腸内細菌科細菌株が保有する薬剤耐性プラスミドの比較解析を行う。予備実験からは下水由来大腸菌の分離にはBTX培地などを使用し、効率の良い方法についてさらに検討する必要がある。2019年2月に新たな*mcr*バリエント (*mcr-9*) の存在が示唆された。そのため、今後、現在の*mcr-1*から*mcr-8*を標的としたmultiplex PCR法に*mcr-9*も標的に加え、改めて評価を行いたい。また、*mcr*遺伝子の全てのバリエントを同時に検出することが可能なmultiplex PCR法と完全ゲノム解析を駆使して、国内において環境および食品由来の*mcr*陽性コリスチン耐性菌株のゲノム疫学解析も併せて進めていきたい。

E. 結論

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が求めるデータを全て提出し、結果は各国のデータとともにWHOのホームページで公開された。

国内のESBL産生菌のゲノム解析候補菌の選定と一部の解析を実施した。また下水からの大腸菌及びESBL産生大腸菌の選択的分離方について検討した。*mcr*遺伝子の全てのバリエントを同時に検出することが可能なmultiplex PCR法を新たに開発した。複数の*mcr*遺伝子が同時に検出された菌株において、各々の*mcr*遺伝子は異なる種類のプラスミド上にコードされていた。

F. 健康危険情報

人由来の大腸菌の薬剤耐性率の上昇が顕著である。対策強化が急務である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Detection of *mcr-1* mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. Chiba N., Tanimoto, K., Hisatsune J., Sugai M., Shibayama K., Watanabe H. Tomita H. J. Glob. Antimicrob. Resist. 16:249-250, 2019.

2. 学会発表

1. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan、口頭(英語)、柴山恵吾、第15回全国抗感染薬物臨床薬理学会議、第3回全国細菌薬剤耐性監視大会、第2回北京大学医学感染症フォーラム(中国北京)、2018/6/3、国外
2. 新たな薬剤耐性菌の時代—忍び寄る脅威にどう立ち向かうか—、口頭、菅井基行、第64回中国地区公衆衛生学会 特別講演(広島)、2018/8/21、国内
3. JANIS から見たわが国の薬剤耐性菌の現状、口頭、柴山恵吾、第47回薬剤耐性菌研究会(松本)、2018/11/16、国内
4. 多剤耐性グラム陰性菌に有効な抗菌ポリマーの開発、口頭、成瀬 秀則、一久 和弘、井本 裕顕、平林 亜希、柴山 恵吾、鈴木 仁人、第47回薬剤耐性菌研究会(松本)、2018/11/16、国内
5. JANIS サーベイランスの概要、口頭、柴山恵吾、第31回日本外科感染症学会総会(大阪)、2018/11/29、国内
6. Current situation and challenges of

AMR in Japan, 口頭(英語), Motoyuki Sugai, Japan-China-Korea Forum, 2018/12/05

7. わが国の医療分野における AMR 対策の動向、口頭、菅井基行、第8回家畜感染症学会学術集会、2018/12/7、国内
8. わが国の薬剤耐性菌の動向 シンポジウム 感染症と臨床検査、口頭、菅井基行、第29回生物試料分析科学会年次学術集会 2019/2/10
9. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan、口頭(英語)、柴山恵吾、Tokyo AMR One-Health Conference(東京)、2019/2/20、国内
10. Recent trends in antimicrobial resistance in nosocomial pathogens in Japan, 口頭(英語), Motoyuki Sugai, Tokyo Amr One-Health Conference(東京)、2019/02/20、国内
11. Quiet threat, 口頭(英語), Motoyuki Sugai, U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program Acute Respiratory Infections Panel Meeting(ハノイ)、2019/3/1
12. わが国における AMR 対策と薬剤耐性菌サーベイランス、口頭、菅井基行、第139年会 日本薬学会、国内、2019/3/23
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
分担課題 無症状保菌者由来サルモネラの薬剤感受性プロファイル解析に
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

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、2016 年及び 2017 年に分離された血清群 09 の株、並びに 2017 年に分離された血清群 08 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。

薬剤感受性試験はディスク法を用いて行った。供試薬剤はアンピシリン (ABPC もしくは A と略記)、ストレプトマイシン (SM もしくは S)、テトラサイクリン (TC もしくは T)、カナマイシン (KM もしくは K)、クロラムフェニコール (CP もしくは C)、ST 合剤 (Sx)、ゲンタマイシン (GM もしくは G)、ナリジクス酸 (NA もしくは N)、セフトキシム (CTX もしくは Ct)、セフトジジム (CAZ もしくは Cz)、セフォキシチン (FOX)、シプロフロキサシン (CPFX もしくは Cp)、ホスホマイシン (FOM もしくは F)、アミカシン (AMK)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM)、アジスロマイシン (AZM もしくは

Zm) の 17 薬剤であった。

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

前期本研究において、2013 年、2015 年に分離されたサルモネラ 04 群について、血清型及び薬剤耐性パターンの傾向等を解析した。本年度は健康サルモネラ保菌者由来株の情報をさらに充実させるため、主要サルモネラ 0 群のうち、08 及び 09 群について、業務従事者の検便を実施している検査会社から 2017 年分離株 (09 は 2016 年分離株も併せて) の提供を受け、それらを試験した。

1. 09 群の結果：

2016 年分離 32 株、2017 年分離 50 株を試験した。四半期ごとの分離状況を図 1 に示す。2016 年は第 3 四半期にピークが観察されたが、2017 年は第 2 四半期以後増加が続いた。

血清型の内訳は Enteritidis が最も多く、全体の 68% を占めた。次いで Panama (12%)、Javiana (5%) であった (図 2)。なお、2016 年に比べ、2017 年第 2 第 3 四半期に血清型 Panama が、第 4 四半期に Enteritidis が多く検出された (図 1)。

血清型によらず、薬剤耐性率は全般に低かった。比較的耐性率が高かったのは NA、ABPC、SM、TC であり、これらはいずれも血清型 Enteritidis に多く見られた (図 3)。

2. 08 群の結果：

2017 年分離 229 株を試験した。四半期ごとの分離状況を図 4 に示す。2016 年 09 群と同様に第 3 四半期にピークが観察された。

血清型の内訳は、Newport 及び Manhattan が各々 23% を占め、次いで Corvallis 及び Litchfield が各々 21% を占めた。09 群に比べ多様であった (図 5)。

09 群に比べ、耐性率は高く、特に SM、TC は全体でそれぞれ 32%、34% であった (図 6)。SM は血清型 Manhattan のほか、Blockley、

Kentucky において耐性率が高かった。TC はこれらの血清型に加え、Hadar で耐性率が高かった。それ以外の薬剤は全体として 5-10% の耐性率を示すものが多かったが、血清型によって偏りが観察されるものもあった。NA 及び CPFX は血清型 Kentucky で、ABPC、AZM、CTX、CP は血清型 Blockley で耐性率が高かった。KM は血清型 Blockley、Hadar で耐性率が高かった。

D. 考察

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

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

2016-2017 年の健康保菌者由来サルモネラ 09 群菌 82 株の解析の結果、これまで調べてきた 04 群と異なり、1 つの血清型 Enteritidis が約 7 割を占めるという多様性の低さが示された。Enteritidis は食中毒の原因となるサルモネラ属菌の上位を占める血清型であるが、保菌者においても 09 群内で上位を占めることが明らかとなった。薬剤耐性率は比較的 low、試験したいずれかの薬剤に耐性を示した株は 23% であった。NA、ABPC、SM、TC 及び ST 合剤に耐性を示すものがあり、多くは Enteritidis であった。中には ASN、ASTN、ATSxN など 3 剤以上の耐性パターンを示す株も見られた。

2017 年の健康保菌者由来サルモネラ 08 群菌 229 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 Newport、Manhattan、Corvallis、Litchfield があり、4 血清型で 64% を占めた。これら以外に、血清型 Nagoya、Narashino、Hadar、Blockley、Kentucky、Muenchen、Altona などが検出され、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、全体の 38% が何らかの薬剤に耐性を示した。血清型 Manhattan では 90% が SM、TC 耐性を示した。Hadar では TC、KM に対する耐性率がそれぞれ 89%、78% と高かった。Blockley は多剤耐性の傾向が高く、ほとんどが ABPC、SM、TC、KM、CTX、CP、AZM に耐性を示し、CAZ への耐性率も 44% であった。Kentucky では ABPC、TC、KM、NA、CPFX などに対する多剤耐性が観察された。一方、血清型 Newport、Corvallis、Litchfield においては耐性率が低かった (5-10%)。

E. 結論

検便検査会社の協力をえて、08 群及び 09 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、本年度は計 311 株の性状解析を実施した。血清型ならびに薬剤耐性の観点から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する。

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 サルモネラ 09 群 健康保菌者由来株の分離状況 (2016-2017 年)

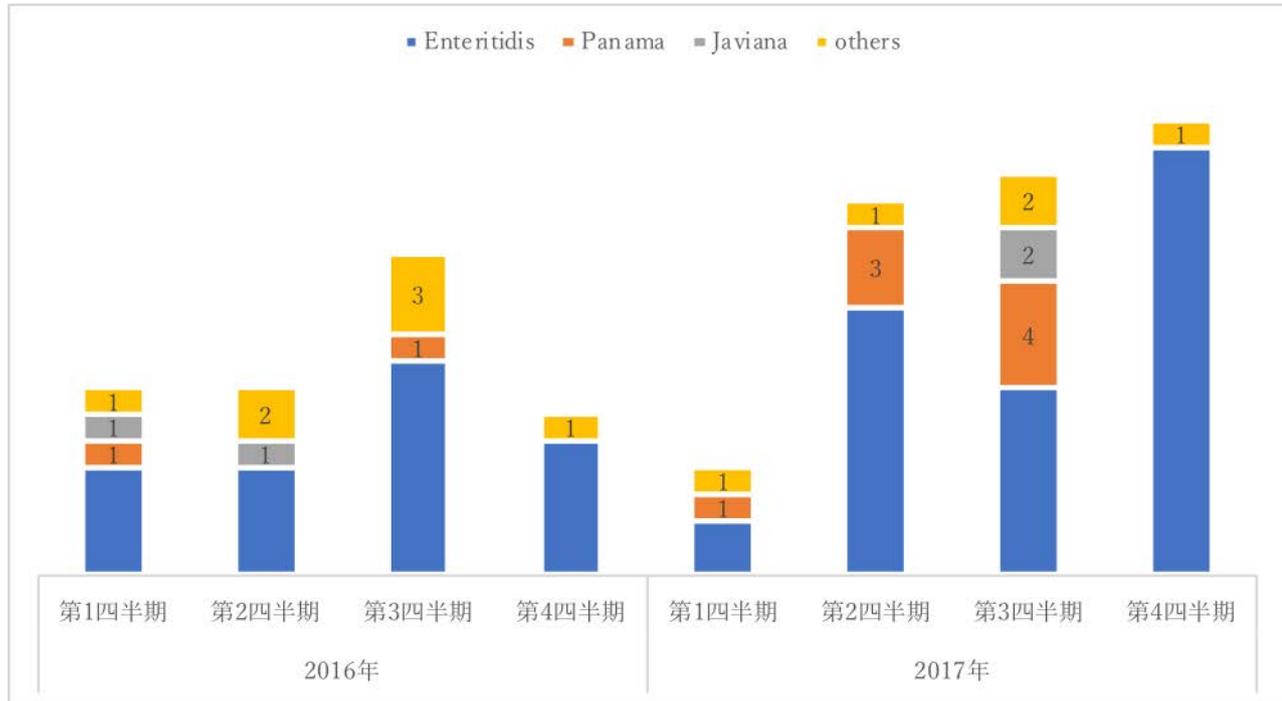


図2 サルモネラ 09 群 健康保菌者由来株の血清型分布 (2016-2017 年)

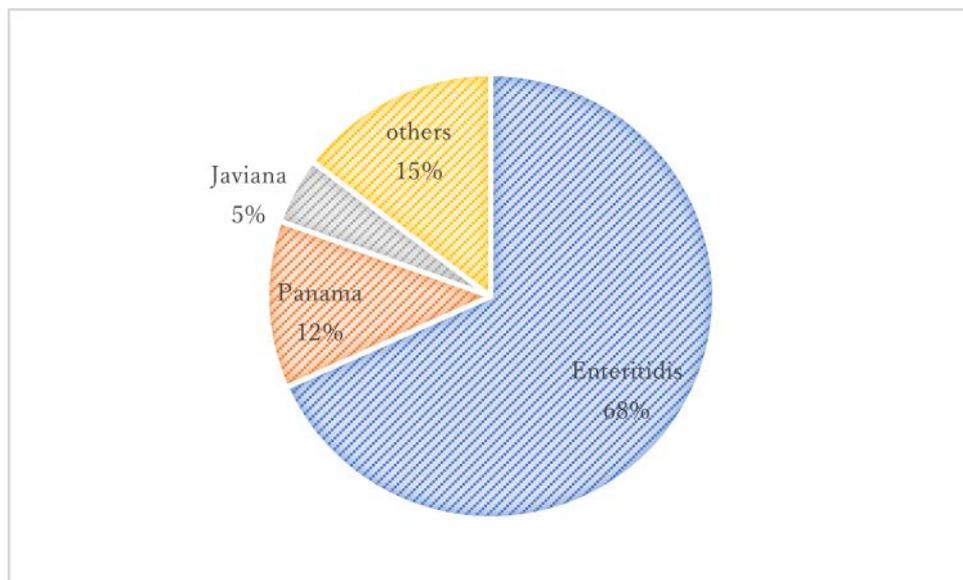


図3 サルモネラ 09 群 健康保菌者由来株の薬剤耐性率 (2016-2017 年)

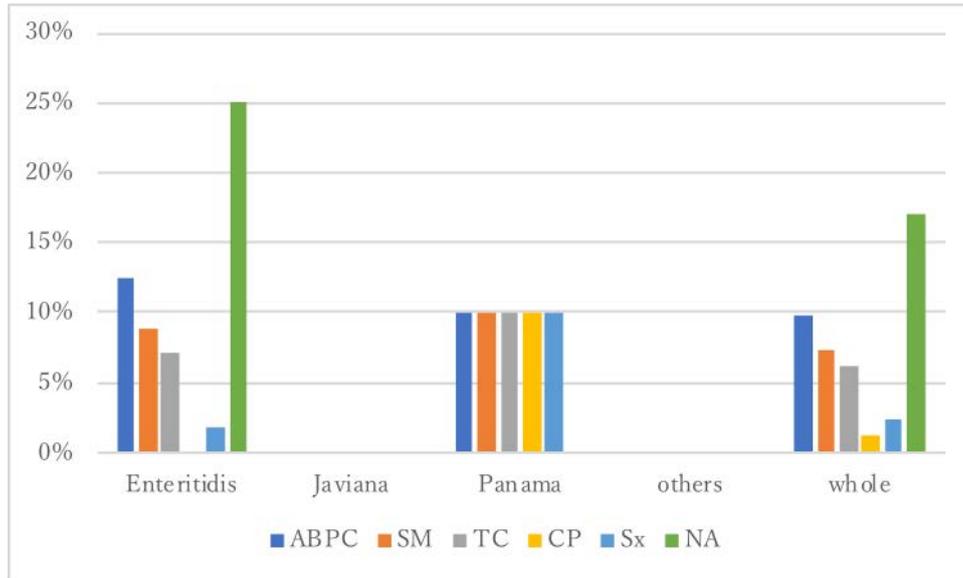


図4 サルモネラ 08 群 健康保菌者由来株の分離状況 (2017 年)

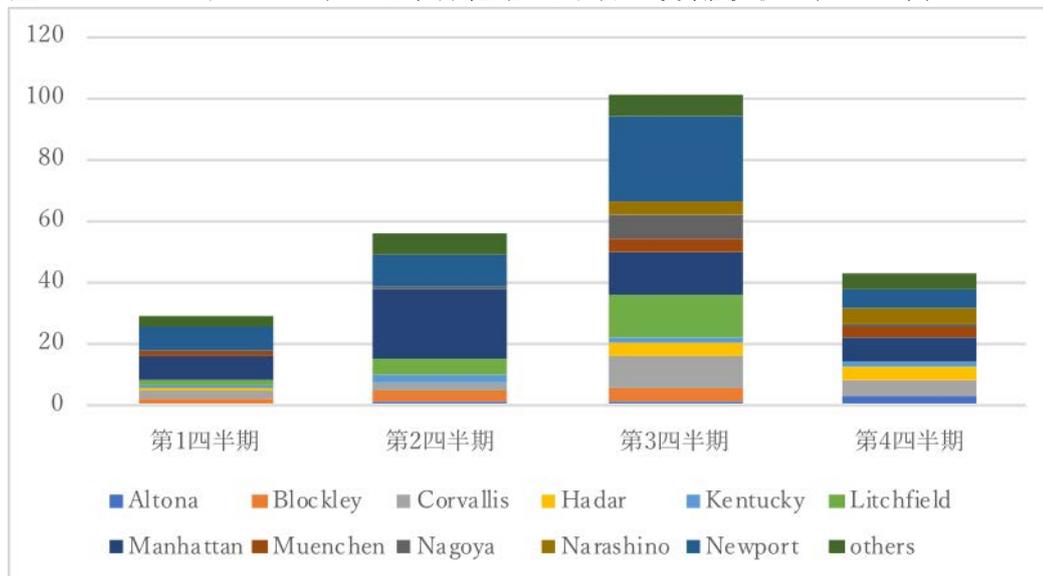


図5 サルモネラ 08 群 健康保菌者由来株の血清型分布 (2017 年)

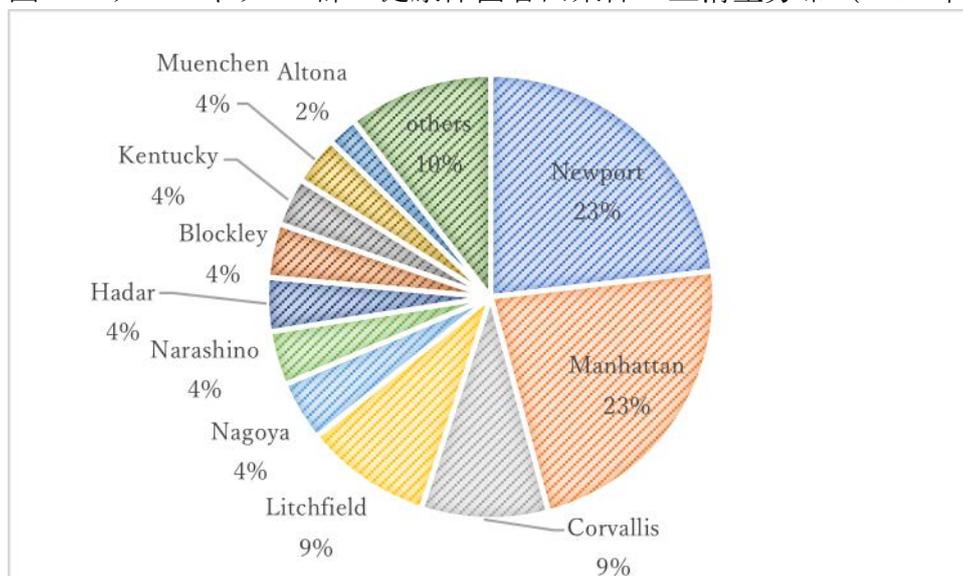
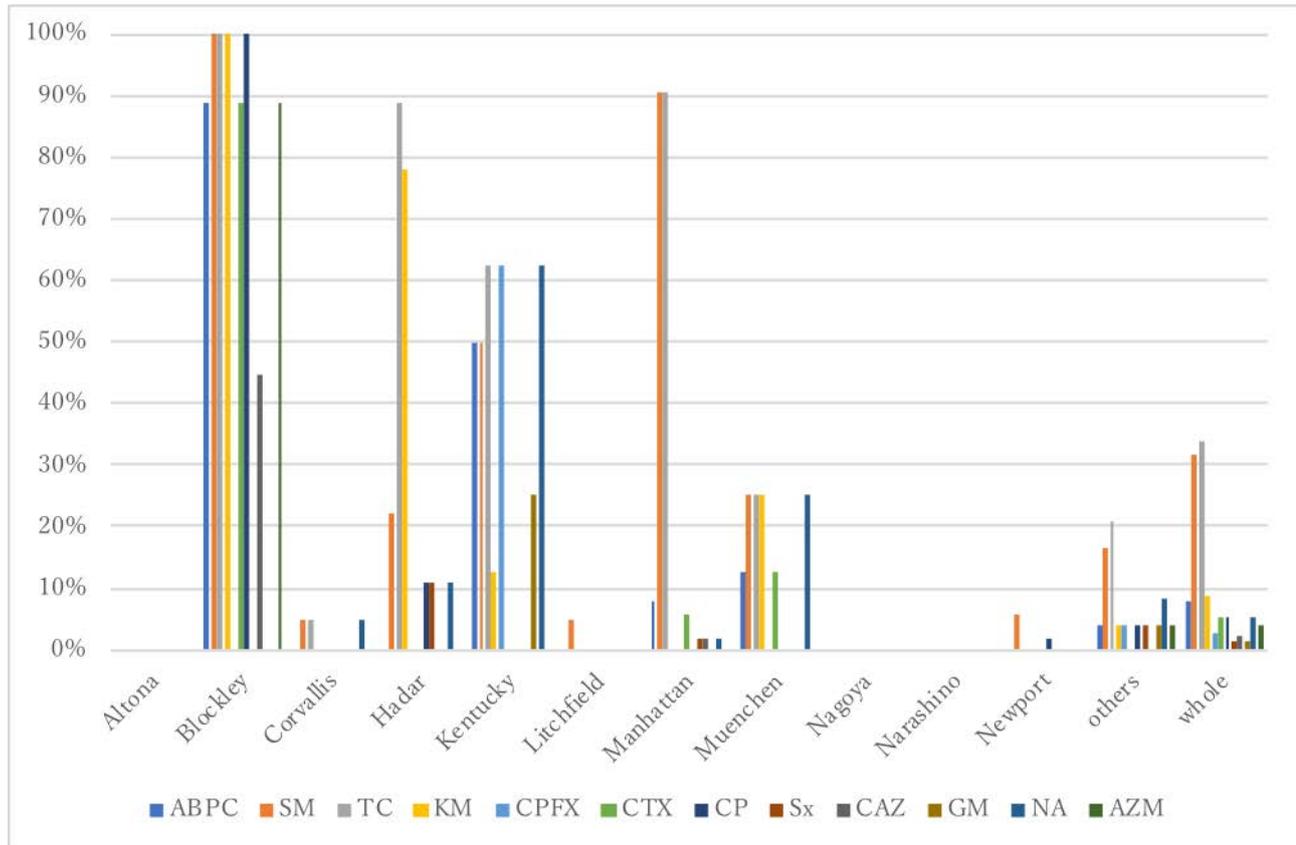


図6 サルモネラ 08群 健康保菌者由来株の耐性率 (2017年)



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

分担研究報告書

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

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

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

A. 研究目的

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

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

等においても薬剤耐性が浸淫している状況となっている。

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

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

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

B. 研究方法

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

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

①ESBL 産生大腸菌の検出試験

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

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

②サルモネラ属菌及びカンピロバクターの検出試験

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

2. 生体外環境でのマウス糞便常在菌への耐性遺伝子移行に関する検討

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

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

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

4. *C. coli* 分離株の薬剤感受性試験及びゲノム解析

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

C. 結果

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

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

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

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

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

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

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

4. 食鳥処理場におけるサルモネラ属菌の汚染動態

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

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

5. *C. coli* の薬剤耐性及びゲノム解析

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

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

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

D. 考察

1. 採卵鶏における ESBL/AmpCβラクタマーゼ産生大腸菌の汚染実態

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

2. マウス糞便常在菌への外来 CTX-M-1 遺伝子移行について

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

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

3. 採卵鶏におけるサルモネラ属菌の汚染実態及び薬剤耐性

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

4. 採卵鶏におけるカンピロバクターの汚染実態及び薬剤耐性

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

5. 食鳥処理場における肉用鶏のサルモネラ属菌の汚染動態

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

6. ヒト及び動物由来 *C. coli* の薬剤耐性状況

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

E. 結論

1) 複数の採卵鶏を対象とした汚染実態調査を通じ、以下の知見を得た。

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

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

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

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

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

4) *C. coli* の薬剤耐性実態として、ヒト臨床分

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

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

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

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 採卵鶏におけるESBL/AmpC陽性大腸菌の検出成績概要

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

P<0.05
(Fisher's exact test)

表2 ESBL/AmpC陽性大腸菌分離株における遺伝特性解析結果

(A) ESBL/AmpC

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

(B) Phylogenetic group

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

表3 採卵鶏からのサルモネラ属菌検出状況

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

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

表4 採卵鶏からのカンピロバクター検出状況

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

表5 採卵鶏由来カンピロバクター分離株の薬剤耐性状況

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

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

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

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

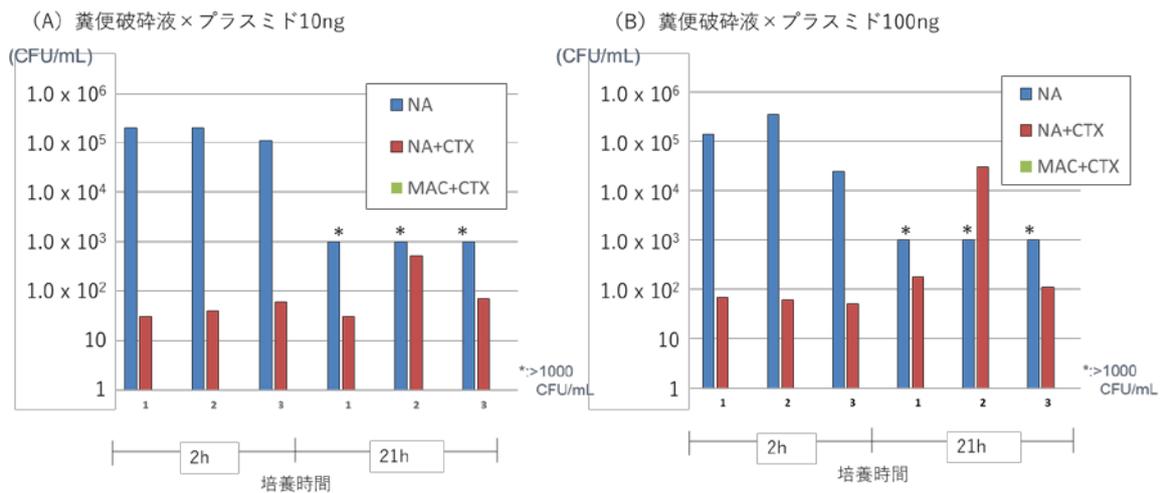
(食鳥処理場 B)

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

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

表7 ヒト及び動物由来 *C. coli* 株の薬剤耐性状況

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



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

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

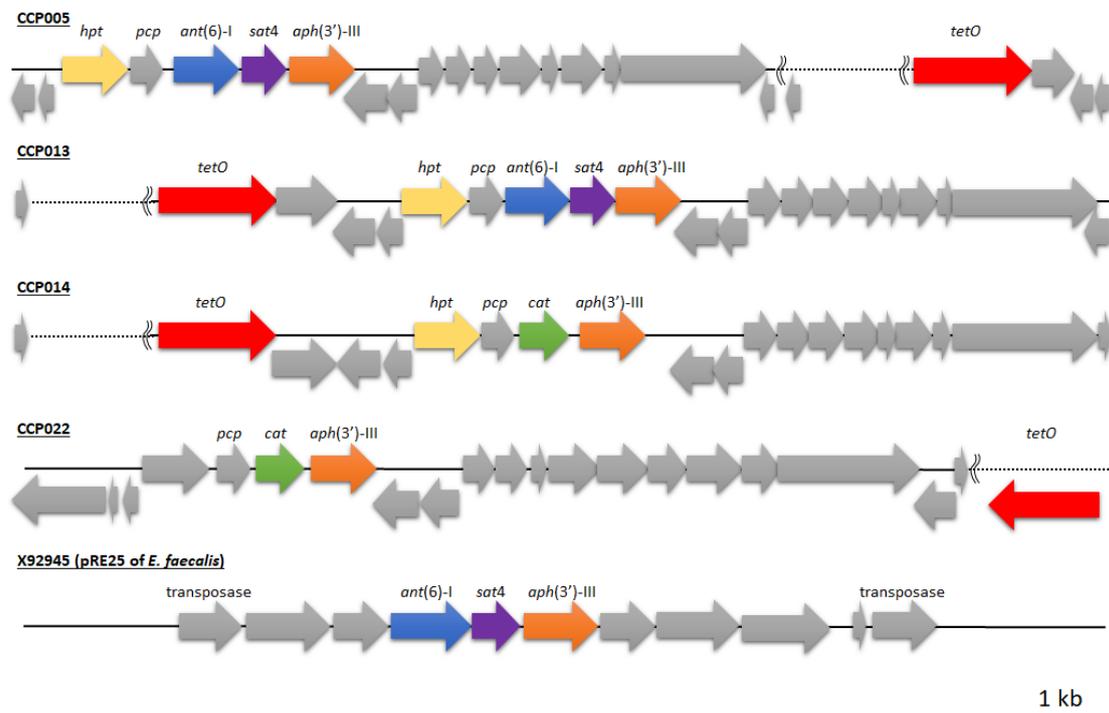


図2 ブタ由来 *C. coli* ST-1562 代表株のゲノム上耐性遺伝子クラスター

平成30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：松田 真理（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：白川 崇大（農林水産省動物医薬品検査所）

研究要旨

薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」が項目として記載されている。また、同戦略に「食品中の薬剤耐性に関する動向調査・監視体制の確立にむけた調査研究の実施」が記載されており、本研究事業において、愛媛県立衛生環境研究所の四宮所長らによりヒト及び食品由来の検体からサルモネラを対象として全国調査が進められているところである。

平成30年度は、平成25年度～28年度の病畜由来サルモネラのアンチバイオグラムを作成し、国立感染症研究所と情報を共有するとともに動薬検HPで公表し、ヒト、食品及び家畜由来サルモネラ属菌の血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較した。その結果、由来によって検出される血清型とその割合が異なること、食品と健康鶏から多く分離されるInfantis及びSchwarzengrundにおいては食品、病気鶏、健康鶏で耐性率も類似してい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、平成29年度に食鳥処理場及びと畜場で分離された大腸菌のうち、コリスチンのMICが $2\mu\text{g/mL}$ 以上の株についてコリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*～*mcr-5*)の保有状況を確認したところ、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*は検出されず、*mcr-1*及び*mcr-5*遺伝子は検出されたが低率（各年、動物種毎に、いずれも5%以下）であった。

A. 研究目的

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

一方、医療の分野においては、医療機関における院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況および薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査すること

で、我が国の院内感染の概況を把握し、医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的に、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)が構築されている。

本研究では、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向

調査・監視に関するデータ連携の実施」のため、JVARMデータの整備作業を継続した。昨年度国立感染症研究所において、食品由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成するためのソフトが作成されたことから、当該ソフトにJVARMの農場由来サルモネラのデータを入力しアンチバイオグラムを作成することとした。

また、JVARMで収集されたサルモネラについて各血清型の割合及び血清型毎の各薬剤の耐性率を本研究事業において愛媛県立衛生環境研究所の四宮所長らが報告しているヒト、食品と比較することとした。

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

B. 研究方法

(1) と畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成

国立感染症研究所において開発されたアンチバイオグラム作成ソフトに抗菌剤の種類及び薬剤測定 range をJVARMに合うよう改修し、農場由来株のサルモネラのMIC値を入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(2) ヒト、食品及び家畜由来サルモネラ属菌の血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率の比較

本研究事業において愛媛県立衛生環境研究所の四宮所長より報告された平成27年～29年に全国の地方衛生研究所より分離されたヒト及び食品由来のサルモネラ属菌と平成26年～27年に農場の病気動物及び食鳥処理場の鶏由来のサルモネラ属菌の各血清型の割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較した。

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

について確認した。

平成28年度のMIC $2\mu\text{g/mL}$ 以上の株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、鈴木らが本研究事業において報告しているマルチプレックスPCR法に基づき、遺伝子を検出した。

C. 研究結果

(1)農場由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成

平成24～28年度農場由来サルモネラのアンチバイオグラムをCLSI2012のSIR基準により作成し(例; 図1～3:その他の年はHP参照)、動物医薬品検査所HP

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

(2) ヒト、食品及び家畜由来サルモネラ属菌の血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率の比較

血清型 *Infantis*、*Schwarzengrund* はヒト、食品、農場由来の病菌の鶏、食鳥処理場由来の健康な鶏から分離され、食品と健康な鶏から分離されたサルモネラに占める両血清型の割合はいずれも25%以上であった。(図4)。*Enteritidis* はヒト及び病気の鶏由来から10%程度、*Manhattan* はヒト、食品及び健康な鶏から分離された。一方、*Saintpoul* はヒト由来、*Agona* は食品由来 *Cholerasuis*、*Derby*、*Braenderup*、*Newport*、*Mbandaka*、*Dublin* については家畜からのみ分離された。なお *Agona* は2014年から2015年には分離されなかったが、家畜から分離されることもある血清型である。

また *Infantis* の耐性率を比較したところ、食品と健康鶏は各薬剤ともに同等の耐性率を示した一方、ヒト由来はKM、SM、TCは食品及び家畜に比べ、低い耐性率を示した。

Schwarzengrund は、食品と健康鶏は各薬剤ともに同等の耐性率を示した一方、ヒト由来はABC、CPに対しては食品由来及び家畜由来に比べ、低い耐性率を示した。(図5)

Manhattan は、ヒト、食品、家畜由来間で同等の耐性率を示し、*Enteritidis* は、家畜からの分離は少なく、

耐性も異なった。(図6)

(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-3* 及び *mcr-4* 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2株(0.6%：割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、豚由来株から4株(3.3%)、鶏由来株から、3株(1.5%)検出された。また、*mcr-5* 遺伝子は牛由来株は2株(0.6%)、豚由来株は1株(0.8%)分離され、鶏由来株からは検出されなかった。平成24年から28年までの経年変化を図7に示す。

D. 考察

食品由来株については、全国の地方衛生研究所において収集されたサルモネラについてモニタリングが開始されたことから、JVARMの農場由来のサルモネラについてCLSI2012のSIR基準によるアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所HPに掲載するとともに、入力データを国立感染症研究所と共有した。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。

農場の病気動物及び食鳥処理場の鶏由来のサルモネラ属菌と愛媛県立衛生環境研究所の四宮所長より報告された全国の地方衛生研究所より分離されたヒト及び食品由来のサルモネラ属菌の各血清型の割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較したところ、食品と健康鶏から分離されたサルモネラにおいて、*Infantis*、*Schwarzengrund*の占める割合が高く、両血清型の各薬剤の薬剤耐性率が同等であった。一方、ヒト由来株においては同血清型におけるヒト由来株の薬剤耐性率は少し異なる傾向を示した。そのため、ヒトの両血清型のサルモネラについては他の感染源がある可能性も考えられた。

Manhattanはヒト、食品、健康な鶏から10%前後分離され同等の耐性率を示したことから、鶏、食品、ヒトは同じ感染源である可能性が示唆された。

一方、ヒトで分離されるEnteritidisは、食品、家畜からの分離は少なく、耐性も異なることから、異なる感染源である可能性が示唆された。

なお、Saintpoulはヒト由来、Agonaは食品由来

Cholerasuis、Derby、Braenderup、Newport、Mbandaka、Dublinについては家畜由来からのみから検出されており、血清型によっては、宿主の特異性が認められた。

今回、各由来株の血清型の割合と血清型毎の耐性率を示したが、感染ルート、由来などについての科学的な根拠を得るためには、性状や遺伝子解析による比較などを実施する必要があると考えられる。

また、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の動向を把握するため、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌における*mcr-1*～*mcr-5*遺伝子の保有状況について確認したところ、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*遺伝子は検出されず、*mcr-1*及び*mcr-5*遺伝子は検出されたが低率であった。白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同年7月に指定を取り消すリスク管理措置を講じた。

そのため来年度以降も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と考える。

E. 結論

農場由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所HPに掲載した。また、ヒト、食品、動物由来サルモネラ属菌の血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較し、由来によって検出される血清型とその割合が異なること、食品と健康鶏から多く分離される*Infantis*及び*Schwarzengrund*においては食品、病気鶏、健康鶏で耐性率が類似してい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ロスチン耐性遺伝子の検出試験の結果、昨年度と同様に *mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 遺伝子は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

(1) 木島 まゆみ、川西路子、白川崇大、松田真理：動物由来薬剤耐性モニタリング (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring; JVARM) における最近の取組み, 獣医学雑誌

2.学会等発表

- (1) 白川崇大、成嶋理恵、小澤真名緒、阿保均、永尾暢子、松田真理、川西路子、木島まゆみ「家畜由来細菌における抗菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) とディスク阻止円径の関係」第 161 回日本獣医学会学術集会 (2018 年 9 月、つくば)
- (2) 川西路子「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランに基づく JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) の強化について—愛玩 (伴侶) 動物のモニタリングの取組—」第 8 回日本医師会・日本獣医師会による連携シンポジウム「家庭内ワンヘルスの取組み—人と動物における薬剤耐性 (AMR) の実態と課題」(平成 30 年 11 月; 日本医師会館大講堂)
- (3) 木島まゆみ「NVAL と FAMIC -AMR に関する活動と OIE コラボレーティングセンターとしての地域への貢献-」薬剤耐性対策の今を知る

会～世界の動き、日本の動き～(2018 年 12 月、東京大学)

- (4) 川西路子「動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) の概要と薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランへの対応」平成 30 年度日本獣医師会 獣医学術年次大会(シンポジウム) (2019 年 2 月、新横浜プリンスホテル)

3.業界関係者向け説明会

- (1) 松田真理「豚における薬剤耐性菌の動向」平成 30 年度家畜衛生講習会 (豚疾病特殊講習会) (2017 年 7 月、つくば)
- (2) 白川崇大「鶏における薬剤耐性菌の動向」平成 30 年度家畜衛生講習会 (鶏疾病特殊講習会) (2018 年 6 月、つくば)
- (3) 川西路子「薬剤耐性対策アクションプランへの対応及び JVARM の成績」第 39 回 飼料の安全性に関する検討会 (2018 年 7 月、つくば)
- (4) 木島まゆみ「薬剤耐性菌問題について-薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン (2016-2020) における取組みを中心に-」動物医薬品協同組合夏期研修会 (2018 年 8 月、東京)
- (5) 白川崇大、川西路子、成嶋理恵、永尾暢子、阿保均、松田真理、小澤真名緒、木島まゆみ「最近の動物医薬品検査所における薬剤耐性に係る研究業績」第 59 回全国家畜保健衛生業績発表会 (2018 年 9 月、ヤクルトホール; 東京)

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 2012年 農場由来株

Salmonella spp. 畜種 (牛 N=82)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

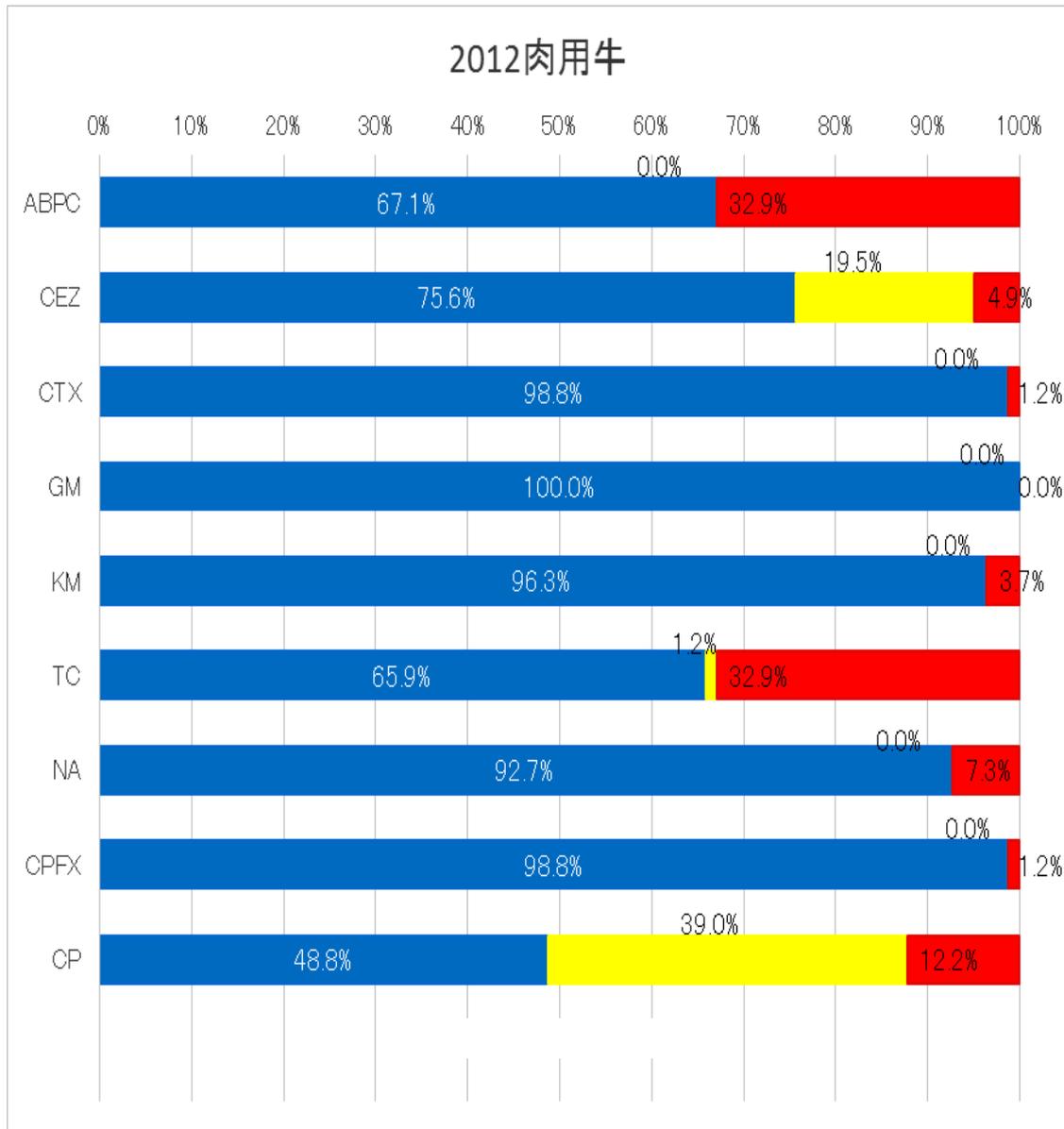


図2 2012年 農場由来株

Salmonella spp.
畜種 (豚 N=83)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

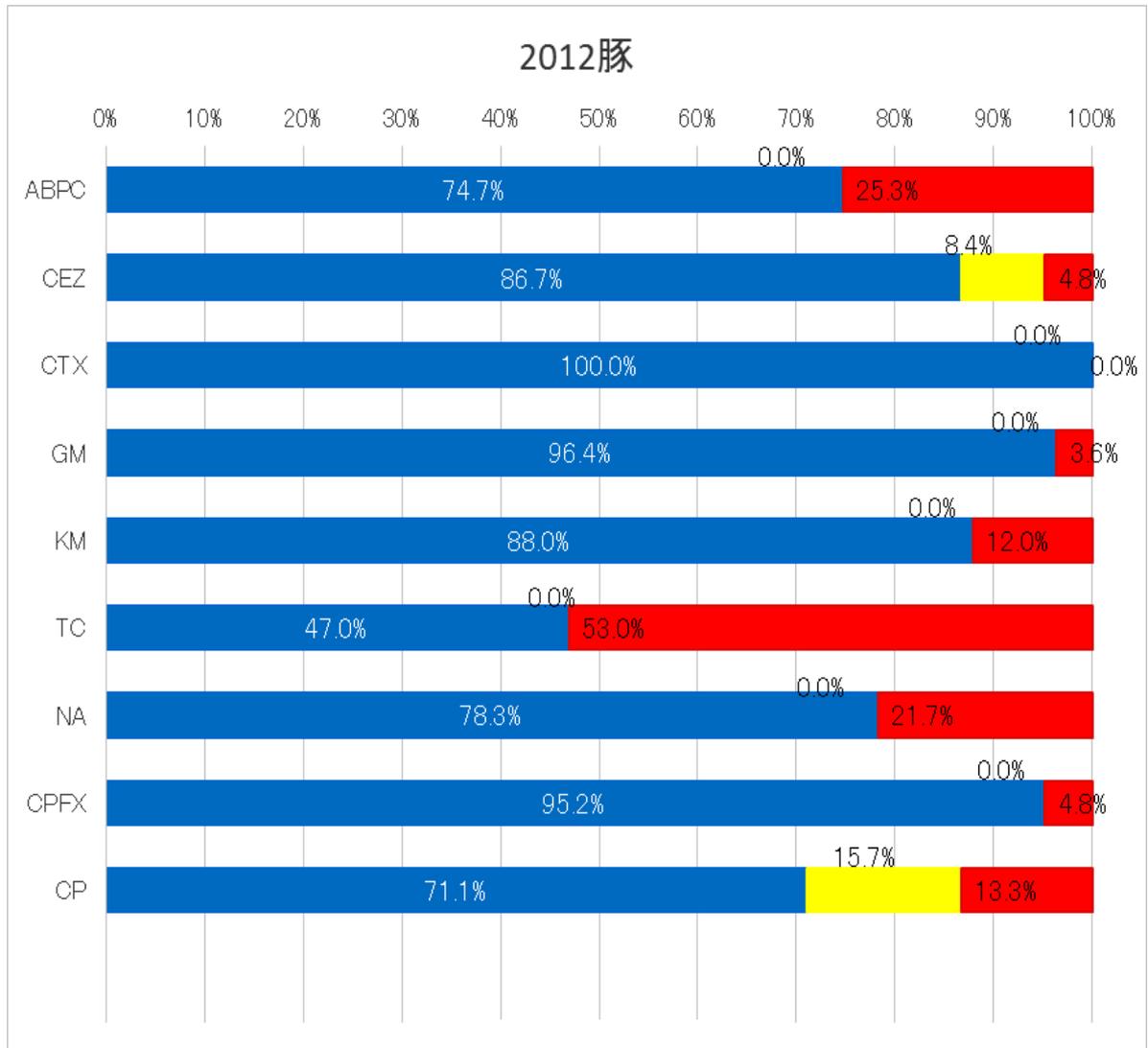
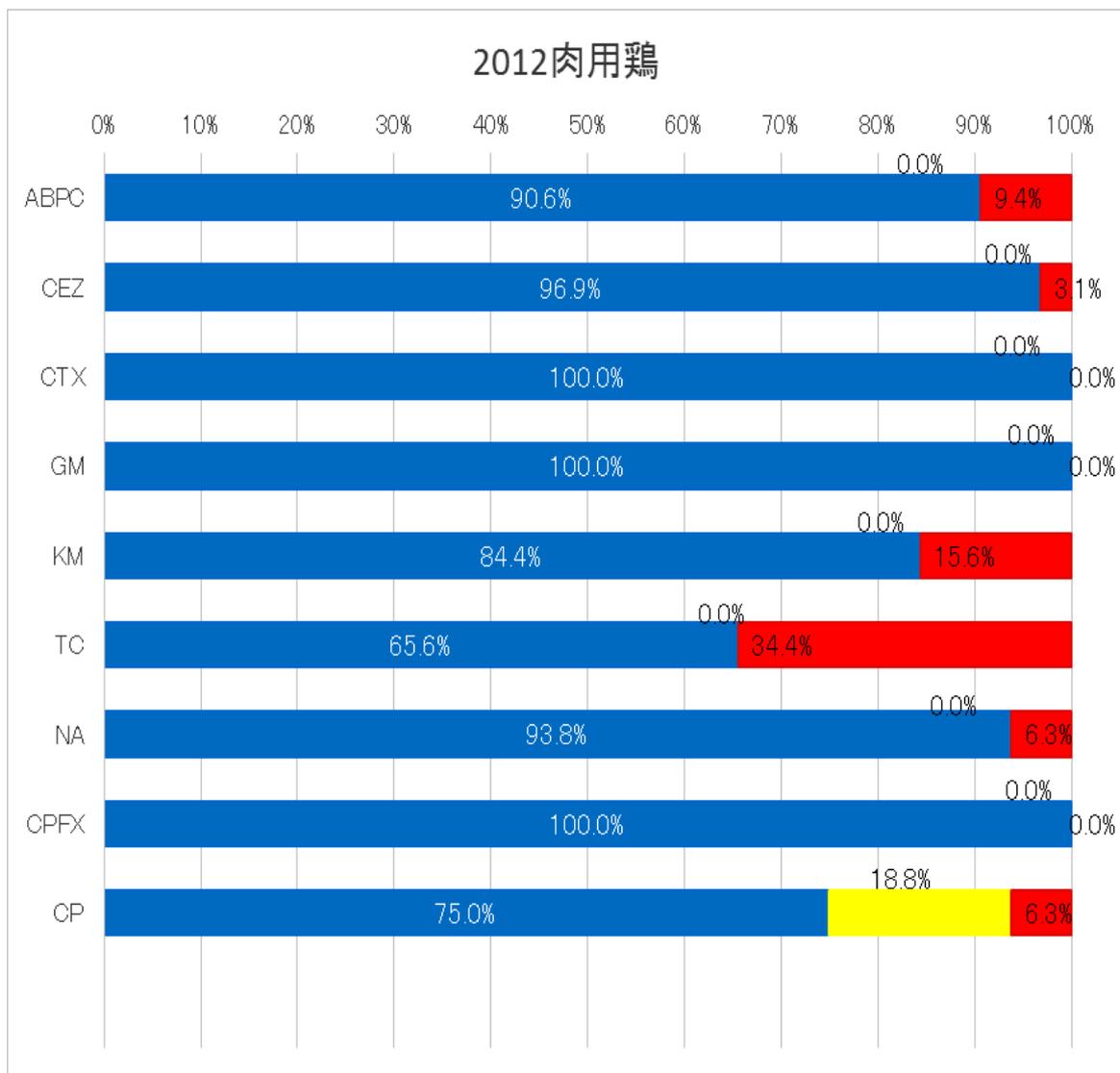


図3 2012年 農場由来株

Salmonella spp.

畜種 (肉用鶏 N=32)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)



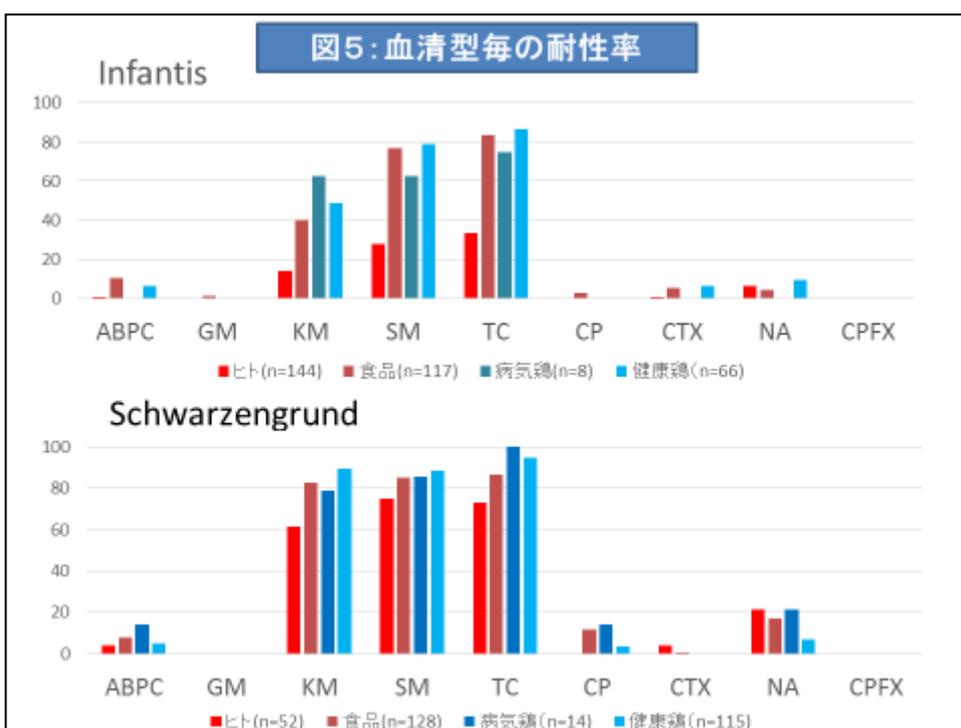
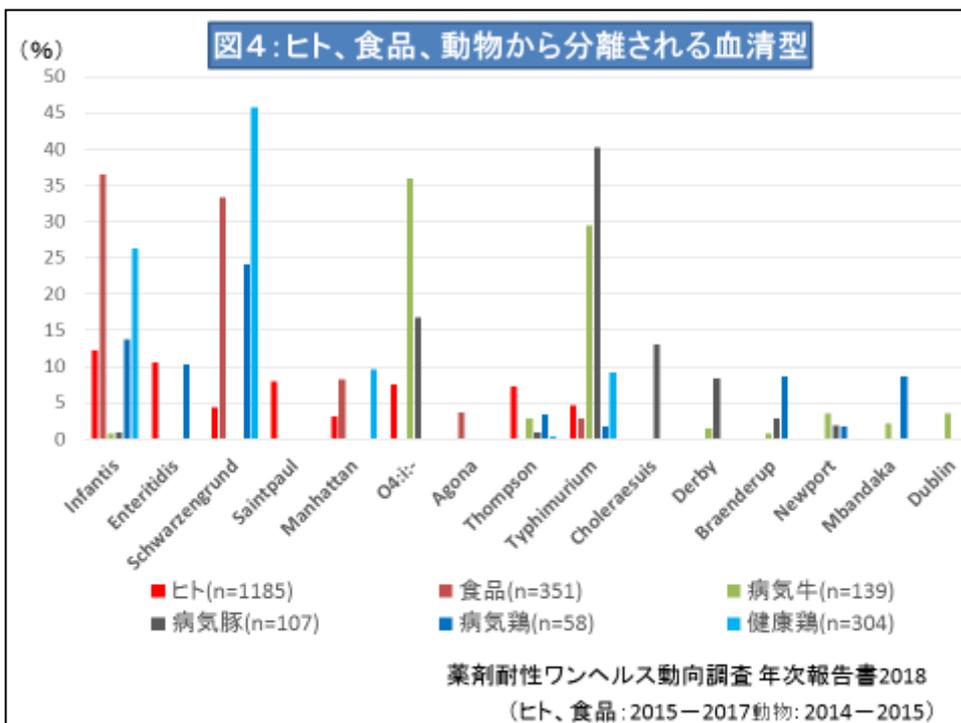


図6：血清型毎の耐性率

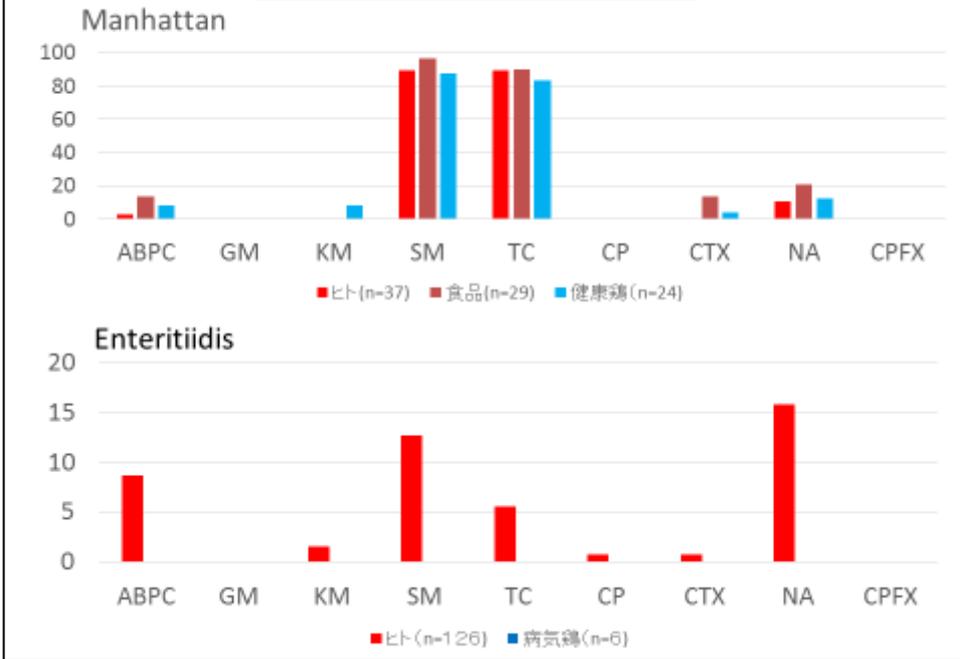
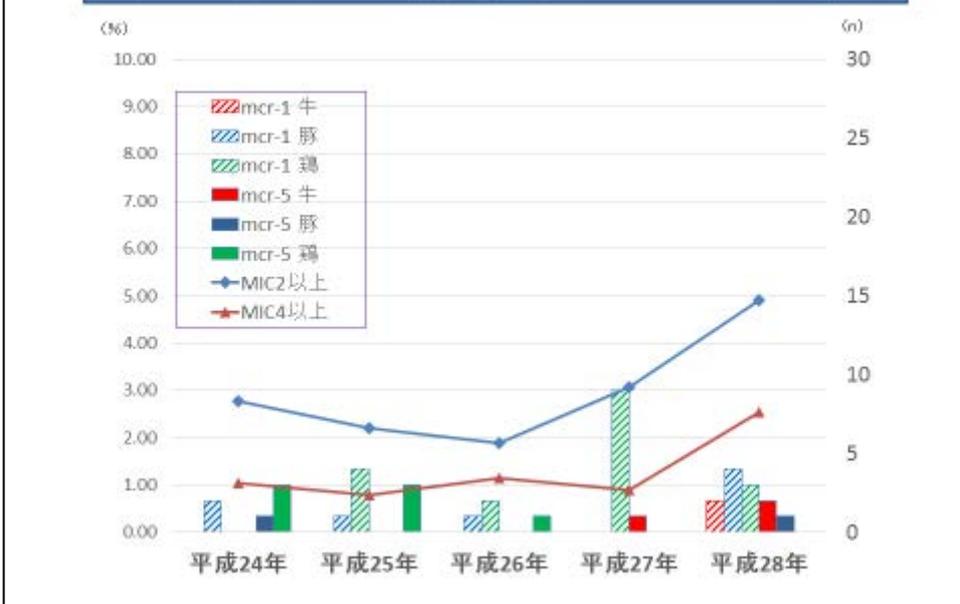


図7：と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌
プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1* ~ *mcr-5*) の検出



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 30 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題 食品及びヒト由来カンピロバクター、大腸菌の
薬剤耐性菌出現状況の把握

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	畠山 薫	東京都健康安全研究センター	微生物部
	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
	小野明日香	東京都健康安全研究センター	微生物部
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター	微生物部
	甲斐 明美	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨

2017 年に散発患者から分離された *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率はそれぞれ 43.8% および 62.5% であった。*C. jejuni* は例年とほぼ同様の耐性率であったが、*C. coli* は 2016 年と比較して増加していた。また、治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く、EM 耐性菌の増加は認められなかった。

2018 年に健康者の糞便から分離された大腸菌 360 株のうち、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示した株は 41.3% であった。フルオロキノロン耐性は 9.4%、CTX 耐性は 5.3%、CFX 耐性は 1.4% であった。IPM および MEPM に耐性を示した株は認められなかった。ESBL 産生株 9 株、AmpC 産生株 1 株、ESBL/AmpC 産生株 1 株、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 保有株 3 株が確認された。

一方、市販流通する鶏肉から分離された大腸菌（国産：163 検体由来 241 株，輸入；26 検体由来 36 株）を調べた結果、国産肉由来株の方が高い耐性率を示した薬剤は、KM、TC、ABPC、CP、ST 合剤、SM であった。輸入鶏肉で耐性率が高かったのは NA、GM であった。国産鶏肉由来株の CTX 耐性は 2012 年には 10.1% であったが、2015 年以降減少傾向にある。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 保有大腸菌が国産鶏肉 4 検体（2.5%）から検出された。

2018 年にヒトから分離されたサルモネラは 139 株（42 血清型）、食品由来株は 139 株（17 血清型）であった。ヒト由来株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 36.0%、食品由来株では 94.2% であり、食品由来株の耐性率が高かった。ヒトおよび食品由来株で共通に分離されている 04 群 Schwarzengrund ではヒト由来株と食品由来株でほぼ同じ耐性パターンを示していたが、NA は食品由来株で耐性率が高かった。07 群 Infantis では食品由来株の方が耐性率は高かった。CTX 耐性株はヒト由来株で 4 株、食品由来株で 10 株検出され、2015 年以降、増加傾向である。

A. 研究目的

臨床の現場ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）、基質拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生腸内細菌科細菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）等の薬剤耐性菌による感染症が大きな問題となっている。しかし、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全ての生態系で発生し拡散しているという状況がある。これ以上、新しい薬剤耐性菌

が発生するのを防ぎ、薬剤耐性菌の拡散を防止していくためには、1 つの分野だけではなく、我々を取り巻く全ての環境、生態系に係る分野が一丸となって取り組んでいかなくてはならない。このような状況から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の変化，出現状況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カンピロバクターおよびサルモネラについて薬剤耐性菌出現状況を調べた。また食肉およびヒト由来大腸菌を対象として薬剤耐性菌出現状況のモニタリングを実施した。

B. 研究方法

1. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

2017年に都内の病院で分離された *C. jejuni* 115株および *C. coli* 8株を対象に薬剤感受性試験を行った。供試薬剤はエリスロマイシン (EM)，アンピシリン (ABPC)，テトラサイクリン (TC)，ナリジクス酸 (NA)，シプロフロキサシン (CPFX) で，CLSI 法に準拠したディスク拡散法を行った。

2. 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

2018年に食中毒調査のために搬入された飲食店従事者(下痢等の症状が無い者)の糞便360人から分離された大腸菌360株を供試した。これらの菌株を対象に17薬剤を用いた薬剤感受性試験を実施した。CTX耐性株については AmpC/ESBL 鑑別ディスク(関東化学)を用いて AmpC または ESBL 産生菌の鑑別を行った。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験に用いる薬剤はアンピシリン (ABPC)，ゲンタマイシン (GM)，カナマイシン (KM)，ストレプトマイシン (SM)，テトラサイクリン (TC)，ST 合剤，クロラムフェニコール (CP)，セフトキシム (CTX)，セフォキシチン (CFX)，ホスホマイシン (FOM)，ナリジクス酸 (NA)，シプロフロキサシン (CPFX)，ノルフロキサシン (NFLX)，アミカシン (AMK)，イミペネム (IPM)，メロペネム (MEPN)，コリスチン (CL) の17薬剤で，センシディスク (BD) を用いた KB ディスク法で調べた。

3) コリスチン耐性大腸菌の検出

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1* および *mcr-2*) の検出は PCR 法で実施した。

3. 市販流通する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

2018年4月～12月に搬入された国産鶏肉163検体と2018年6月～12月に都内スーパーマー

ケットで購入した26検体を用いた。

2) 大腸菌分離方法

食肉に緩衝ペプトン水 (BPW) を加え 37°C，18～22 時間培養後，XM-G 寒天培地 (日水製薬) に塗抹分離した。分離平板に発育した大腸菌様集落 (1 検体当たり 2 集落) について TSI 寒天，LIM 培地で生化学的性状を確認し，典型的な生化学的性状を示すものを大腸菌と判定した。

3) 薬剤感受性試験

国産鶏肉163検体から分離した241株および輸入鶏肉26検体から分離した36株を対象に薬剤感受性試験を実施した。薬剤は健康者由来大腸菌を対象とした薬剤感受性試験と同様の17薬剤を供試した。

4. 2018年にヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2018年にヒト(下痢症患者および無症状病原体保有者)から分離された139株および食品から分離された139株を供試した。集団事例由来株は代表株1株を計上した。

2) 薬剤感受性試験

供試薬剤は大腸菌と同様の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。さらに ESBL 産生菌を疑う株については Shibata らのプライマー (Antimicrob. Agents Chemother., 50:791, 2006) および市販プライマー (ESBL 遺伝子型別キット, 関東化学) を用いて型別試験を実施した。

5. カンピロバクターを対象とした薬剤感受性試験方法の検討

これまでカンピロバクターを対象とした薬剤感受性試験は，全国衛生微生物技術協議会「カンピロバクターレファレンスセンター」で決めた方法で実施してきた。今後，全国的なモニタリングを行うために，統一的な方法の確立を目指して，本研究班の研究分担者四宮らと検討を行った。

6. 倫理面への配慮

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

C. 研究結果

1. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

2017年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* 115株のうちフルオロキノロンに耐性を示したのは50株(43.8%)であった。2016年分離株と比較すると耐性率は少し減少していたが、過去7年間と比較するとほぼ横ばいであった(図1)。一方、*C. coli* 8株のフルオロキノロン耐性は5株(62.5%)で、2013年以降耐性率は減少していたが、昨年は2016年よりも高い耐性率であった(図2)。一方、EM耐性は2株(25.0%)で、耐性化の傾向は認められていない。

2. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2018年に健康者の糞便から分離された360株を対象に17薬剤を用いた薬剤感受性試験を行ったところ、いずれか1薬剤以上に耐性を示した株は149株(41.3%)であった。薬剤別に耐性率をみると、最も耐性率が高かったのはABPCおよびTCで各23.6%、次いでNA 21.9%、SM 17.2%、ST合剤 15.3%であった。フルオロキノロン耐性は9.4%、CTX耐性は5.3%、CFX耐性は1.4%であった。FOMおよびAMK耐性はそれぞれ0.3%に認められた。IPMおよびMEPMに耐性を示した株は認められなかった(図3)。CTXに耐性を示した19株のうち16株についてESBL産生あるいはAmpC産生の確認を行った結果、ESBL産生株は9株、AmpC産生株は1株、ESBL/AmpC産生株が1株、判定保留が5株であった。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有株は3株(0.8%)であり、いずれも *mcr-1* 陽性であった。

3. 市販流通する鶏肉から分離された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

国産鶏肉163検体中132検体(81.0%)および輸入鶏肉26検体中22検体(84.6%)から大腸菌を分離し、それぞれ241株、36株を供試した(表1)。市販流通する鶏肉から分離された大腸菌を対象に薬剤感受性試験を行った結果、国産鶏肉由来株の方が高い耐性率を示したのはKM(国産35.7%、輸入8.3%)、TC(国産46.9%、輸入19.4%)、ABPC(国産42.3%、輸入27.8%)、CP(国産22.8%、輸入5.6%)、ST合剤(国産29%、輸入19.4%)、SM(国産37.3%、輸入30.1%)であった。一方、輸入鶏肉で耐性率が高かったのはNA(国産19.9%、輸入36.1%)、GM(国産

5%、輸入19.4%)であった(図4)。

国産鶏肉由来株のCTX耐性率およびKM耐性率の変化を表2に示した。CTX耐性は2012年には10.1%であったが、2015年は3.6%、2018年は5.8%と減少したまま推移していた。一方、KMは2012年の耐性率は25.8%であったが、2015年には46.8%、2018年には35.7%であった。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有大腸菌は国産鶏肉で4検体(2.5%)から検出されたが、輸入鶏肉では検出されなかった。耐性遺伝子はいずれも *mcr-1* であった。 *mcr-1* が検出された鶏肉は、レバー3検体およびササミ1検体であった(表3)。

4. 2018年にヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

2018年にヒトから分離されたサルモネラは139株で42の血清型に、食品由来株は139株で17の血清型に分類された(表4)。ヒト由来株で多く分離された血清型は09群 Enteritidis 14株(10.1%)、04群 Schwarzengrund 13株(9.4%)、04群 i:-は11株(7.9%)、07群 Infantis 10株(7.2%)、04群 Typhimurium 8株(5.8%)であった。一方、食品分離株は04群 Schwarzengrund が67株(48.2%)と最も多く分離され、次いで07群 Infantis 33株(23.7%)、08群 Blockley 7株(5.0%)であった。ヒトから多く分離された09群 Enteritidis は、食品では1株のみの分離であった。

ヒト由来株のうち1薬剤以上に耐性を示した株は20株(36.0%)、食品由来株では131株(94.2%)と食品由来株の方が耐性率は高かった。

ヒトおよび食品由来株で共通に分離されている04群 Schwarzengrund と07群 Infantis の薬剤別耐性率を図5、図6に示した。04群 Schwarzengrund ではヒト由来株と食品由来株でほぼ同じ耐性パターンを示しており、耐性率はKM、SM、TCで高かった。NAは食品由来株で耐性率が高く34.3%に対し、ヒト由来株では7.7%であった。07群 Infantis では食品由来株の方が耐性率は高かった。

CTX耐性株はヒト由来株で4株、食品由来株で10株検出された。2015年以降、分離数は増加傾向である。これら14株の血清型をみると08群 Blockley が8株、07群 Infantis が2株、04群 Typhimurium、07群 Rissen、08群 Manhattan、03、10群 Anatum が各1株であった。

5. カンピロバクターを対象とした薬剤感受性試験方法の検討

カンピロバクターを対象に、全国で統一した方法で薬剤感受性試験を実施するためにプロトコルの作成を行った。国際的な方法としては CLSI と EUCAST の方法が示されているが、それぞれ使用する平板や方法、薬剤、判定基準等に違いが認められた (表 5)。今後、多くの地方衛生研究所で継続的に実施するためには、より簡便な方法での実施が望ましいことから、CLSI 法に準拠することとした。

対象薬剤は EM, TC, セファロチン (CET), CPF, NA, ABPC の 6 薬剤で、判定基準は CLSI の基準と T. Luangtongkum らの方法 (JCM, 45: 590, 2007) を参考に新しい基準値を設定した (表 6)。

D. 考察

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 2018 年に発生した食中毒 185 事例中 41 事例 (22.2%) がカンピロバクターによるものであった (2019 年 2 月現在)。2017 年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* 115 株のうちフルオロキノロン耐性率は 43.8%, *C. coli* では 8 株中 62.5% が耐性であった。2011 年～2017 年の 7 年間についてフルオロキノロン耐性率を比較すると、*C. jejuni* では 50% 前後の耐性率で、ほぼ横ばいであった。*C. coli* は *C. jejuni* と比較して耐性率は高い傾向であったが、供試菌株数が少ないことから単純な比較は難しいと考えられた。一方、EM 耐性率は *C. jejuni*, *C. coli* とともに低く、EM 耐性菌の増加は認められていない。

健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況を調査した結果、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示す株は 41.3% で、2015 年 (46.1%), 2016 年 (37.6%), 2017 年 (36.5%) と比較すると、過去 2 年よりも耐性率は高くなった。耐性率が高い薬剤は ABPC (23.6%), TC (23.6%), NA (21.9%) で、過去 3 年間と比較しても同様の傾向であった。フルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株は 9.4% で、過去と比較しても毎年 10% 程度の耐性率で推移していることが明らかとなった。いずれの薬剤についても、耐性率の大きな増加あるいは減少は認められなかった。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子陽性株は 3 株 (0.8%) 認められ、いずれも *mcr-1* 陽性であった。2017 年分離株にも *mcr-1* 陽性株が 2 株認められたことから、健康者の中にもコリスチン耐性株が存在することが明らかとなっ

た。この大腸菌が、どのようにプラスミドを保有するようになったかについては、今後の検討が必要である。

市販鶏肉から分離された大腸菌の薬剤別耐性率を比較すると、国産肉由来株と輸入肉由来株で明らかに傾向が異なるパターンを示した。中でも KM 耐性率は国産肉由来株では 35.7% であるのに対し輸入肉由来株では 8.3% と低い耐性率であった。また、国産肉由来株の KM 耐性率の年次推移とみると 2012 年は 25.8%, 2015 年は 46.8%, 2018 年は 35.7% であった。養鶏場で行われるワクチンの卵内接種では消毒薬にセファロsporin 系薬剤であるセフチオフルが用いられてきたが、2012 年 3 月に自主規制を行い、使用されなくなった。代わりに KM が用いられるようになったことが、KM 耐性株が多い理由の 1 つとして考えられた。また TC, ABPC も国産肉由来株で耐性率が高かった。一方、輸入肉由来株では NA および GM に対する耐性率が高かった。これら耐性率の傾向に今後も注意していく必要がある。

国産肉由来株の CTX 耐性率は 2012 年が 10.4% であったが、2018 年は 5.8% であった。セフチオフルの自主規制がされたことで耐性率が減少し、耐性率が下げ止まっている状況であることが明らかとなった。

ヒトおよび食品から分離されたサルモネラで、ヒトと食品に共通して高率に検出されている血清型は、04 群 Schwarzengrund と 07 群 Infantis であった。ヒトのみから分離される血清型も多いが、少なくともこの 2 血清型は共通して検出されていることから、食品 (主に鶏肉および鶏肉内臓肉) がヒトへの感染に影響を与えている可能性が大きいことが示唆された。近年、鶏肉から分離されるサルモネラの血清型に変化が認められている。すなわち、2015 年までは 07 群 Infantis が最も多く分離されていたが、2016 年以降 04 群 Schwarzengrund が多くを占め、分離率も上昇している。ヒト由来および食品由来株共に、年代によって分離される血清型に変化が認められることが明らかとなった。

分離された株について、供試した 17 薬剤中 1 薬剤以上に耐性を示した割合を比較すると、ヒト由来株では 36.0%, 食品由来株では 94.2% と、食品由来株の方が耐性率は高かった。この傾向は例年と同様である。

04 群 Schwarzengrund の薬剤耐性パターンはヒト由来と食品由来でほぼ同じ傾向が認められた。しかし NA 耐性率はヒト由来で 7.7%, 食品由来株で 34.3% と耐性率に差が認められ

た。いずれもフルオロキノロン耐性株は認められなかった。

CTX 耐性株の分離数は年々増加しており、2018年は14株(ヒト由来4株, 食品由来10株)であった。2015年以降、食品からの検出が増加している。今後、ヒト由来株で第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す株が蔓延すれば、治療に影響がでるものと考えられた。今後の分離状況に注意する必要がある。

AMR 臨床リファレンスセンターの報告によると全国の抗菌薬販売量は2013年から約10.7%減少している。特に経口セファロスポリン系薬剤と経口フルオロキノロン系薬剤の減少が大きいというデータである。抗菌薬販売量の減少が、どの程度ヒト分離株へ影響するのか、今後も継続的にモニタリングを行い、動向に注視していく必要がある。

E. 結論

2017年に散発患者から分離された *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率はそれぞれ43.8%および62.5%であった。*C. jejuni* は例年とほぼ同様の耐性率であったが、*C. coli* は2016年と比較して増加していた。また、治療の第一選択薬であるEMに対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く、EM耐性菌の増加は認められなかった。

2018年に健康者の糞便から分離された360株を対象に17薬剤を用いた薬剤感受性試験を行ったところ、いずれか1薬剤以上に耐性を示した株は41.3%であった。2015年以降のフルオロキノロン系薬剤に対する耐性率は10%程度、CTX耐性率は5%程度で推移していることが明らかとなった。IPM, MEPMに耐性を示す株は認められなかった。ESBL産生株9株, AmpC産生株1株, ESBL/AmpC産生株1株, プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有株3株(いずれも *mcr-1* 陽性)が確認された。

国産鶏肉および輸入鶏肉から分離された大

腸菌を比較すると、明らかに異なる耐性パターンを示した。中でもKM耐性率は国産由来株では35.7%であるのに対し輸入由来株では8.3%と低い耐性率であった。一方、NAおよびGM耐性率は輸入由来株の方が高かった。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 保有大腸菌が国産鶏肉4検体(2.5%; レバー3検体およびササミ1検体)から検出されたが、輸入鶏肉では検出されなかった。

2018年にヒトから分離されたサルモネラは139株で42血清型に、食品由来株は139株で17血清型に分類された。分離された血清型を比較すると04群Schwarzengrundおよび07群Infantisがヒトおよび食品由来共に多く分離されていた。ヒト由来株のうち1薬剤以上に耐性を示した株は36.0%、食品由来株は94.2%で、食品由来株の方が耐性率は高かった。CTX耐性株はヒト由来株で4株、食品由来株で10株検出された。2015年以降、分離数は増加傾向である。

今後も継続的にモニタリングを行い、動向に注視していく必要がある。

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)

G. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

図1. 散発患者由来*Campylobacter jejuni* の耐性菌出現状況

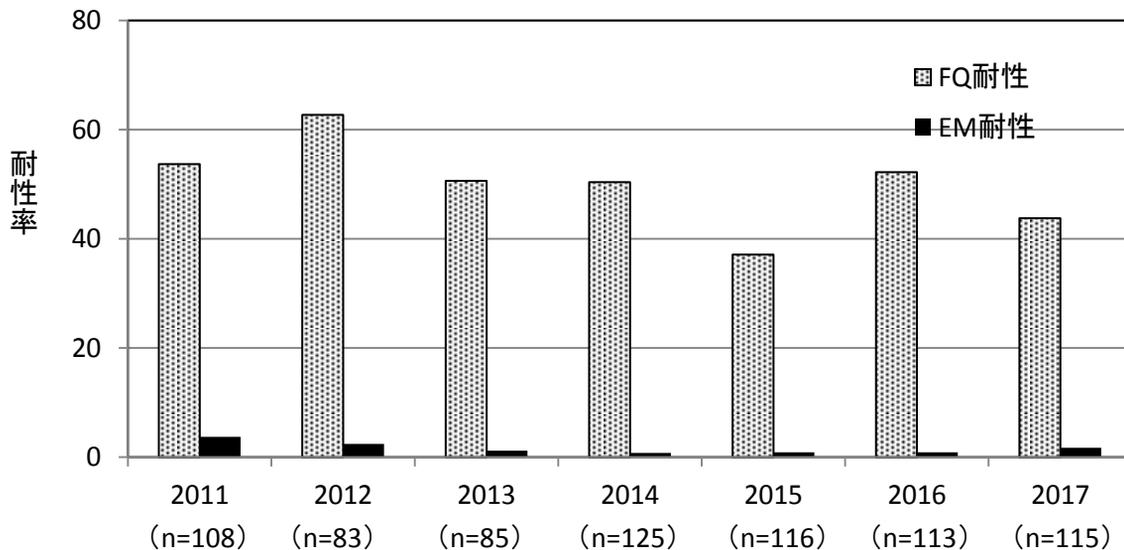


図2. 散発患者由来*Campylobacter coli* の耐性菌出現状況

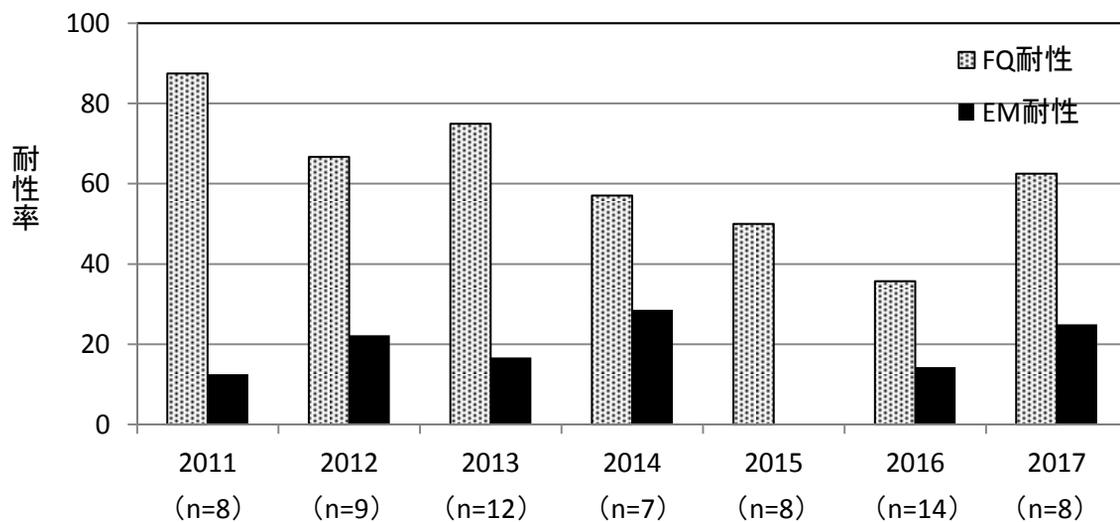


図3. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況(2018年)

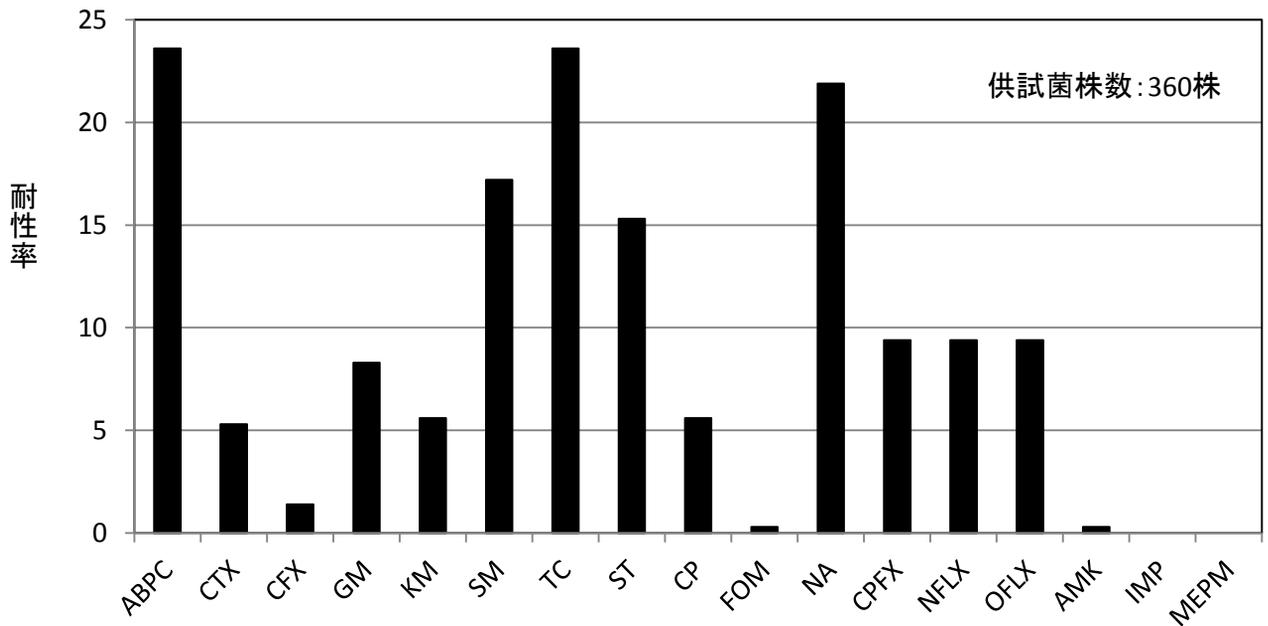


図4. 鶏肉由来大腸菌の薬剤別感受性試験成績(2018年)

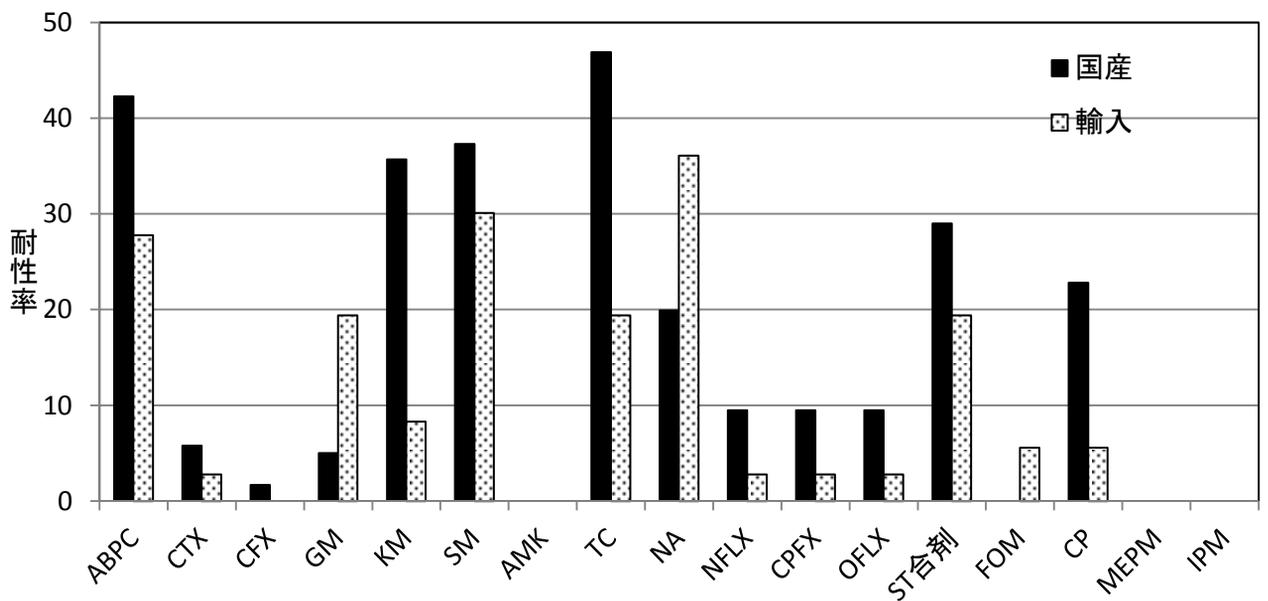


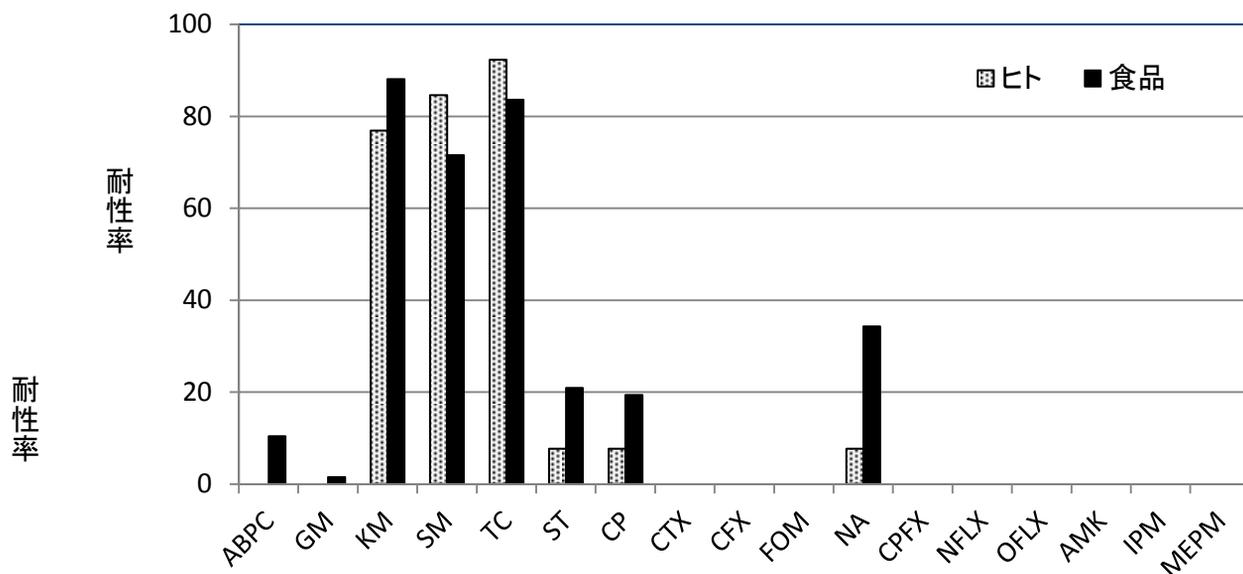
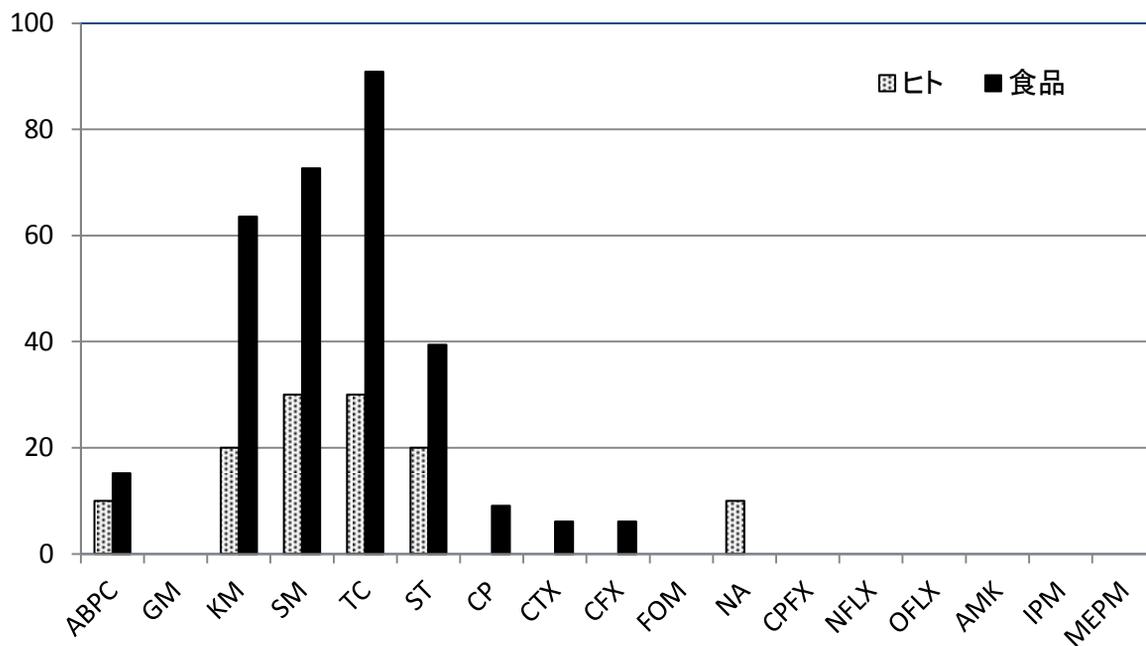
図5. ヒトおよび食品由来 *S. Schwarzengrund* の薬剤別耐性率(2018年, 東京都)図6. ヒトおよび食品由来 *S. Infantis* の薬剤別耐性率(2018年, 東京都)

表1. 鶏肉からの大腸菌検出数と薬剤感受性試験供試数

検体	検体数	大腸菌陽性	(%)	供試菌株数
国産鶏肉	163	132	81.0	241
輸入鶏肉	26	22	84.6	36

表2. 鶏肉由来大腸菌のCTXおよびKM耐性率の年次変化

由来	調査年	耐性率(%)	
		CTX	KM
国産	2012年	10.4	25.8
	2015年	3.6	46.8
	2018年	5.8	35.7

表3. 鶏肉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(2018年)

由来	供試数	耐性遺伝子陽性数	
		<i>mcr-1</i> (%)	<i>mcr-2</i>
国産	163	4 (2.5)	0
輸入	26	0	0

*mcr-1*遺伝子保有大腸菌が検出された鶏肉

レバー:3検体

ささみ:1検体

表4. ヒトおよび食品由来サルモネラの上位血清型(2018年, 東京都)

ヒト由来株			
O群	血清型	菌株数	%
O9	Enteritidis	14	10.1
O4	Schwarzengrund	13	9.4
O4	i:-	11	7.9
O7	Infantis	10	7.2
O4	Typhimurium	8	5.8
O7	Thompson	8	5.8
O4	Agona	7	5.0
O8	Newport	6	4.3
O4	Chester	5	3.6
O13	Cubana	4	2.9
O7	Colindale	3	2.2
O8	Bovismorbificans	3	2.2
O8	Blockley	3	2.2
O8	Corvallis	3	2.2
O3,10	Anatum	3	2.2
O3,10	Amager	3	2.2
O4	d:-	2	2.2
O7	Oranienburg	2	2.2
O7	Bareilly	2	2.2
O7	Braenderup	2	2.2
O7	Mbandaka	2	2.2

食品由来株			
O群	血清型	菌株数	%
O4	Schwarzengrund	67	48.2
O7	Infantis	33	23.7
O8	Blockley	7	5.0
O4	Agona	6	4.3
O8	Manhattan	5	3.6
O4	Typhimurium	4	2.9
O4	i:-	3	2.2
O3,10	Anatum	2	1.4
O4	Stanley	1	0.7
O7	Bareilly	1	0.7
O7	Rissen	1	0.7
O8	Muenchen	1	0.7
O8	Kentucky	1	0.7
O9	Enteritidis	1	0.7
O21	Minnesota	1	0.7
OUT	r:1,5	3	2.2
OUT	d:1,7	2	1.4

集団事例は1株を計上

ヒト由来株 : 139株, 42血清型

食品由来株 : 139株, 17血清型

表5. *Campylobacter jejuni/coli* を対象とした薬剤感受性試験(ディスク法)方法の比較

	EUCAST	CLSI
平板	Mueller-Hinton agar, 5%馬脱線維血液, 20mg/ l β -NAD, MH-F medium	Mueller-Hinton agar, 5%羊脱線維血液
菌液	McFarland 0.5	McFarland 0.5
培養温度	41 \pm 1 $^{\circ}$ C	36-37 $^{\circ}$ Cまたは42 $^{\circ}$ C
培養時間	24時間(40~48時間)	48時間(36-37 $^{\circ}$ C), 24時間(42 $^{\circ}$ C)
条件	微好気条件	微好気条件 85% N ₂ , 10% CO ₂ , 5% O ₂
供試薬剤	CPFX, EM, TC	EM 15 μ g, CPFX 5 μ g
その他	Quality Control <i>C. jejuni</i> ATCC33560 シャーレの蓋を取って表から観察, 目から約30cm離して判定	Quality Control <i>C. jejuni</i> ATCC33560 (MIC) <i>S. aureus</i> ATCC25923 (Disk Diffusion, 好気)

表6. カンピロバクターを対象とした薬剤感受性試験判定表
(H30渡邊班地研グループ)

感受性ディスク名	CLSI ¹⁾ または参考値 ²⁾		
	耐性(R) (\leq mm)	中間(I) (mm)	感受性(S) (\geq mm)
エリスロマイシン(EM)	12	13-15	16
テトラサイクリン(TC)	22	23-25	26
セファロチン(CET)	阻止円なし (6 mm)	-	-
シプロフロキサシン(CPFX)	20	21-23	24
ナリジクス酸(NA)	13	14-18	19
アンピシリン(ABPC)	13	14-16	17

1) CLSI M45 3rd, ed, 20162) CET以外: T. Luangtongkum *et al.* J.Clin.Microbiol. 45: 590, 2007; CET: 本研究班

厚生労働科学研究費補助金補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題名：食品中の耐性菌汚染、と畜場等における交差汚染の役割解析

研究分担者：浅井鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科・教授

研究協力者：市川 隆 （名古屋市食肉衛生検査所）

梶本 真希 （岐阜県中央食肉衛生検査所）

佐々木貴正 （国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

フードチェーンにおける薬剤耐性菌の制御は重要な課題である。本研究では、肉用鶏の生産段階の汚染を孵化場と生産農場におけるサルモネラ、食肉処理場の汚染を搬入動物として豚における家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（LA-MRSA）、食肉処理工程における汚染を腸内細菌科細菌等を指標に解析した。本研究によって、各段階を汚染する薬剤耐性菌は、素畜（ヒナ）、飼育期間に感染した動物の食肉処理場への搬入、食肉処理工程での環境等複数の要因が示唆された。

A. 研究目的

食品を介して人へ伝播する薬剤耐性菌を対策する上で、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。畜産現場において、抗菌薬は細菌感染症を治療し、安全な畜産物を安定供給するために必要な資材として長い間利用されてきた。しかし、畜産現場で抗菌薬を使用すると薬剤耐性菌が増加するため、食肉における薬剤耐性菌汚染が増大する危険性がある。一方、2012年に鶏へのセフトオフルの適応外使用に関して自主規制が行われた結果、肉用鶏からの第三世代セファロスポリン耐性大腸菌の出現率が減少したが（Hiki et al., 2016）、市販鶏肉から第三世代セファロスポリン耐性菌は高率に分離される。このように、家畜における薬剤耐性菌の実態を反映しない場合もあり、家畜が食肉処理される過程での家畜由来の薬剤耐性菌による交差汚染が影響すると考えられる。そのため、食肉処理施設における耐性菌の交差汚染を制御することは、食肉の薬剤耐性菌汚染を制御する需

要な課題と考えられる。

食肉処理施設では HACCP の導入により衛生管理は改善されているが、依然として食肉から薬剤耐性菌が分離される。食肉処理施設において汚染が拡大する薬剤耐性菌は、家畜により持ち込まれたものと推察されるが、どのような処理工程で汚染が拡大しているかについては不明な点が多い。食肉における細菌汚染は、牛肉や豚肉に比べて鶏肉で高率である。平成 27～29 年に食鳥処理施設で実施した調査では、肉用鶏製品における耐性菌汚染は、レバーで高率で、部位により異なることを明らかにした。薬剤耐性菌は腸内の細菌中に一定の割合で存在するため、細菌汚染が高度であると薬剤耐性菌が含まれていると予想される。また、抗菌薬の使用時期や方法が異なる家畜の種類により腸内の細菌中に占める薬剤耐性菌の割合は異なる。農林水産省により 1999 年から継続的に実施されている畜産分野における耐性菌のモニタリングでは、豚や肉用鶏は肉牛に比べて耐性割合が高い。この

薬剤耐性菌の分布の違いが市販食肉における耐性菌汚染を反映しているかは明らかではない。さらに、鶏肉生産における抗菌薬使用については、肉用鶏農場の上流に当たる種鶏場及び孵卵場でも使用され、肉用鶏農場由来株の薬剤耐性はこれらを含むフードチェーン全体での抗菌薬使用の影響を受ける。本研究では、肉処理施設へ搬入（出荷）された家畜が保有する薬剤耐性菌が食肉処理される各過程で汚染する状況を解明することを目的とする。

B. 研究方法

（1）市販肉の交差汚染経路の解析

愛知及び岐阜県下の牛及び豚の食肉処理場（愛知：A 処理場、岐阜：B 処理場）において、「と畜場における枝肉の微生物汚染実態調査」により枝肉等のふき取り材料と環境材料から分離された細菌の同定と薬剤感受性を実施した。細菌の同定は生化学的性状に基づく同定システム（バイテック）を用い、薬剤感受性は市販の微量液体希釈法で実施した。同一菌種について、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法で分子疫学解析を実施した。

（2）国内豚由来 MRSA の性状解析

84 農場から出荷された 420 頭（各農場 5 頭）の鼻粘膜スワブを収集し、MRSA 検査を実施した（第 1 回調査）。その後、さらに 6 農場（1 農場は第 1 回調査で MRSA 陽性、5 農場は第 1 回調査で MRSA 陰性）から出荷された 30 頭（各 5 頭）から鼻粘膜スワブ及び耳スワブを採取した。分離培養は、6.5%NaCl 加トリプトニック（TSB）で前増菌培養し、セフチキシム・アストレオナム添加 6.5%NaCl 加 TSB を用いて増菌培養した。その後、増菌培養液をカモエガ-MRSA/オキサリシ添加スクリーニング培地へ塗抹し、MRSA を分離した。分離菌の SCCmec 型、MLST 型、spa 型及び薬剤感受性を常法で調べた。Panton-Valentine-Leukocidin (PVL) 遺伝子及び *czrC* 遺伝子は PCR 法により

検出した。亜鉛の MIC は寒天平板希釈法で決定した。

（3）養鶏場等における抗菌剤使用とサルモネラの薬剤耐性

孵卵場におけるワクチンの卵内接種時にストレプトマイシンを混合している鶏肉生産社 2 社（A 及び B）の協力の下、ブロイラー鶏群の盲腸及び素ビナ導入元の孵卵場の使用抗菌剤に関する情報を入手し、分離サルモネラの薬剤耐性状況を鶏肉生産者単位で解析した。さらに、A 社の孵卵場において、卵内ワクチン接種後に発育中止した鶏卵を採取し、サルモネラ検査を実施した。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

（1）市販肉の交差汚染経路の解析

A 処理場の枝肉ふき取り材料からの分離菌は、*Escherichia coli* (豚 37 検体、牛 4 検体)、*Klebsiella pneumoniae* spp *pneumonia* (豚 19 検体、牛 1 検体)、*Enterobacter gergoviae* (豚 4 検体、牛 4 検体)、*Enterobacter cloacae* complex (豚 5 検体、牛 2 検体)、*Klebsiella oxytoca* (豚 1 検体、牛 4 検体)の順で 14 菌種分離された（表 1）。豚の枝肉由来 *Escherichia coli* (n=130) では、ABPC、TC、CP に対する耐性が 30~40%で認められ、NA と ST に対する耐性が約 15%で認められた。一方、*Klebsiella pneumoniae* (n=36)では、TC に対する耐性が 15%で認められた。両菌種ともその他の薬剤に対する耐性は、10%未満であった（図 1）。

B 処理場の枝肉ふき取り材料からは、*Acinetobacter baumannii* complex (10 検体)、*Acinetobacter junii* (4 検体)、*Escherichia coli* (3 検体)、*Aeromonas salmonicida* (1 検体)、*Enterobacter amnigenus* (1 検体)、*Enterobacter cloacae* complex (1 検体)、*Pseudomonas aeruginosa* (1 検体)、*Stenotrophomonas maitophilia*

(1 検体)、*Yersinia intermedia* (1 検体) であった。薬剤感受性試験では、ほとんどの薬剤に対して感受性を示す株が多く認められた。

食肉処理業施設 5 施設の環境 (まな板、処理ライン等) のふき取り材料の検査において汚染 13 検体のうち、優勢に分離された菌種は、*Enterobacter cloacae* complex (5 検体)、*Serratia liquefaciens* group (4 検体)、*Raoultella planticola* (3 検体)、*Enterobacter gergoviae* (2 検体)、*Buttiauxella agrestis* (1 検体)、*Enterobacter amnigenus* (1 検体)、*Klebsiella pneumoniae* (1 検体)、*Escherichia coli* (1 検体) であった。同一日の複数のふき取り材料から同じ菌種が分離されたため、PFGE 解析を実施したところ、食肉処理業施設②では菌種と PFGE 型は部位ごとに異なっていたが、食肉処理業施設⑤では、同一の PFGE 型の細菌が、複数から分離された (表 2、図 2、図 3)。

(2) 国内豚由来 MRSA の性状解析

第 1 回調査では 9 農場 (11%) 13 頭 (3.1%) から、さらに第 2 回調査では第 1 回調査で MRSA 陽性であった農場の 2 頭の耳スワブから MRSA が分離された。MRSA15 株は MLST 解析により ST398 で、spa 型では t034 (8 農場) 及び t011 (1 農場) の 2 型に分類された (表 1)。薬剤耐性については、すべての株が β -ラクタム系以外にもテトラサイクリンに耐性な多剤耐性株であり、エリスロマイシンやクロラムフェニコールに耐性な株も存在した。さらに、SCCmec 型では IVa 型 (いずれも spa 型は t034 : 5 株) 及び V 型 (spa 型は t011 と t034) の 2 型に分類され、V 型株は亜鉛抵抗性遺伝子 (*czrC*) を有し、寒天平板希釈法により亜鉛抵抗性 (MIC=4mM) であった (表 3)。

(3) 養鶏場等における抗菌剤使用とサルモネラの薬剤耐性

A 社の 16 肉用鶏農場から分離された 13 株

(Manhattan 10 株及び Schwarzengrund 6 株) は、全株ストレプトマイシン耐性、81% (13/16) がテトラサイクリン耐性を示したが、セフトキシムとカナマイシン耐性は認められなかった (表 4)。また、A 社の孵卵場で採取した発育中止卵の 54 検体 (各ロット 2 個) のうち、12 検体 (22%) からサルモネラが分離され、5 検体は A 社の肉用鶏農場から最も多く分離されたストレプトマイシンとテトラサイクリンに対して耐性を示す Manhattan であった。

一方、B 社の 11 農場から分離された 11 株 (Schwarzengrund 8 株及び Infantis 3 株) は、全株がストレプトマイシン耐性、91% (10/11) がテトラサイクリン耐性を示した。さらに、セフトキシム耐性株が 2 株 (いずれも Infantis) 及びカナマイシン耐性株が 3 株 (Schwarzengrund 2 株及び Infantis 1 株) 認められた。

D. 考察

食肉処理場の枝肉から様々な細菌が分離された。豚枝肉のふき取り材料から大腸菌や *Klebsiella* が主要な分離菌であったが、牛枝肉材料から大腸菌以外に *Enterobacter gergoviae* や *Klebsiella oxytoca* が分離され、汚染菌種が異なる可能性が考えられる。また、分離菌には *Aeromonas* なども含まれていたことから、家畜の腸内容物以外に、処理施設等の環境に由来する可能性があることから、食肉処理場の環境調査が必要である。

食肉処理業施設の環境材料から分離菌に関して、ある施設では 2 か所 (クレーンスイッチとまな板) から *Raoultella planticola* が分離されたが、PFGE 型が異なっていた。他方の施設では *Enterobacter cloacae* が 4 か所 (コンベア、まな板、スクレイパー柄、手袋) から、*Enterobacter gergoviae* が 2 か所 (クレーンスイッチ、手袋) から分離され、異なる場所から同一の PFGE 型の細菌が分離された。このように施設間の交差汚染の状況に差異が認められたことから、衛生

管理方法について詳細に比較する計画である。

今回の結果から、東北地方の11%の養豚場からMRSA ST398が分離され、東北地方に家畜関連MRSA (LA-MRSA)が浸潤していることが示された。これまで、関東地方の養豚場においてもLA-MRSAが浸潤していることを明らかにしているが(Sasakiら投稿中)、国内の広い地域に分布していると推察される。今回のと畜場分離株は海外及び輸入検疫中の豚から分離されたMRSA株の性状と酷似していることが示唆され、国内の豚におけるLA-MRSAサーベイランスが必要である。

肉用鶏の生産システムにおける抗菌剤使用とサルモネラの薬剤耐性に関して、素ビナのほとんどを自社生産するA社(種鶏場でテトラサイクリン使用、孵化場でストレプトマイシンをin ovo使用)では、肉用鶏農場と孵卵場で同じ薬剤耐性型を示すサルモネラ(Manhattan)が分離され、孵化場に浸潤するサルモネラによって肉用鶏農場が汚染することが示唆された。また、素ビナを自社孵化場(ストレプトマイシンin ovo使用)及び複数他社(抗菌薬の種類は不明)から導入するB社では、分離株の一部がカナマイシン耐性を示し、自社以外の孵化場からの導入が影響する可能性が示唆された。このように、肉用鶏由来サルモネラの薬剤耐性は、肉用鶏農場で使用される抗菌薬に加え、その上流における抗菌薬使用によって影響を受ける可能性が示唆された。今後は、鶏肉生産の各段階における抗菌剤使用による肉用鶏由来サルモネラの耐性状況への影響について、サーベイランスの可能性について検討する。

E. 結論

本研究によって、各段階を汚染する薬剤耐性菌は、素畜(ヒナ)、飼育期間に感染した動物の食肉処理場への搬入、食肉処理工程での環境等複数の要因が示唆された。飼育期間中の耐性菌対策を講じるために、飼育農場における薬剤耐

性菌の拡散様式を明らかにするとともに、食肉処理場における薬剤耐性菌制御システムを構築することが必要である。

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)

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki K, Yossapol M, Sugiyama M, Asai T. Effects of antimicrobial administration on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in broiler flocks. Jpn J Infect Dis. 2019. (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

浅井鉄夫 「畜産分野における薬剤耐性菌の実態について」、平成30年度岐阜県家畜衛生推進者研修会、平成30年6月12日、岐阜県中央家畜保健衛生所、岐阜県

浅井鉄夫 「畜産における抗菌性物質の使用と耐性菌問題」、One Health シンポジウム、2018年7月5日、東京コンファレンスセンター・品川、エランコジャパン株式会社

浅井鉄夫 「畜産物の微生物汚染～薬剤耐性菌を中心に～」、平成30年度岐阜県食品セミナー、2018年10月10日、岐阜県産業技術センター、岐阜県

表1 A処理場の食肉処理工程で分離された細菌

菌種	豚由来		牛由来	
	検体数	株数	検体数	株数
<i>Escherichia coli</i>	37	130	4	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	19	36	1	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4	6	4	10
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	5	6	2	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	4	11
<i>Pantoea</i> spp			2	6
<i>Aeromonas sobria</i>	2	4		
<i>Citrobacter youngae/freundii</i>	2	2		
<i>Morganella morganii</i> spp <i>morganii</i>	1	3		
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	1	1		
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1		
<i>Cronobacter sakazakii</i> group	1	1		
<i>Kluyvera intermedia</i>			1	1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>			1	1
合計	80	191	12	39

図1 豚由来*Escherichia coli*と*Klebsiella pneumoniae*の薬剤感受性 (A処理場)

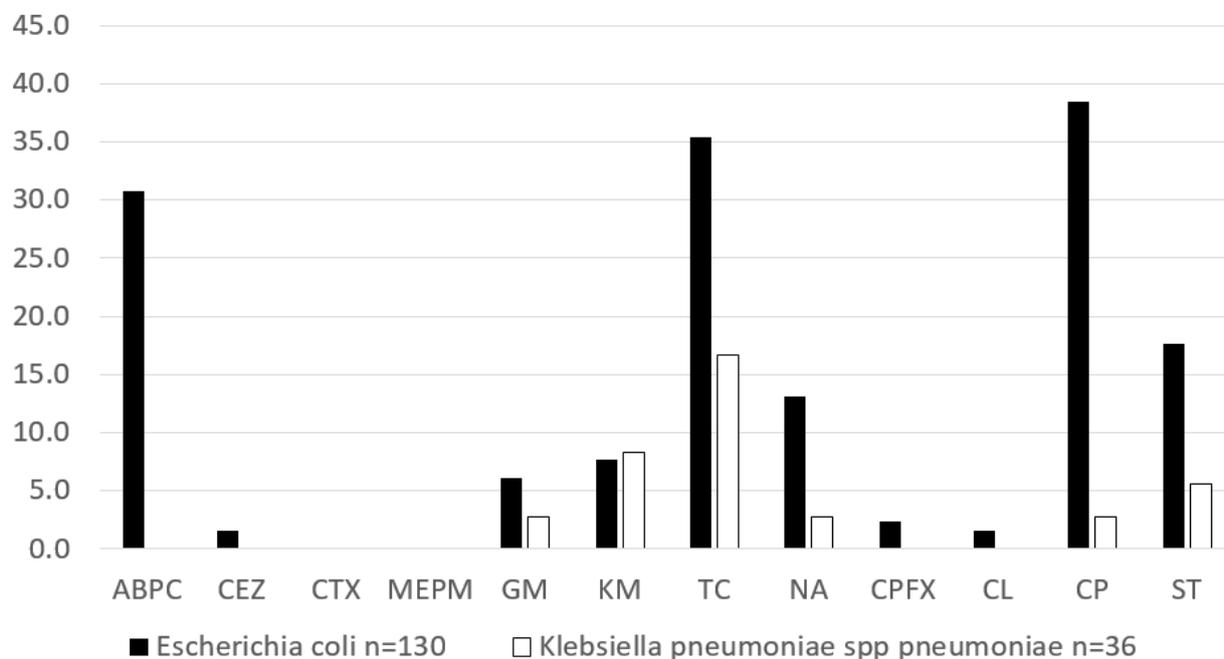


表2 同一日の食肉処理業施設検査で分離された細菌

食肉処理業施設②

場所	菌種	株数
洗浄シンク レバー	<i>Buttiauxella agrestis</i>	5
クレーンス イッチ	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1
	<i>Raoultella planticola</i>	3
まな板	<i>Raoultella planticola</i>	1
包装台	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1

食肉処理業施設⑤

場所	菌種	株数
コンベア	<i>Enterobacter cloacae</i>	3
まな板	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
スクレイパー柄	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
クレーンスイッ チ	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1
手袋	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1

図2 食肉処理業施設②で分離された細菌のPFGE像

Nagoya-Xba1

Nagoya-Xba1

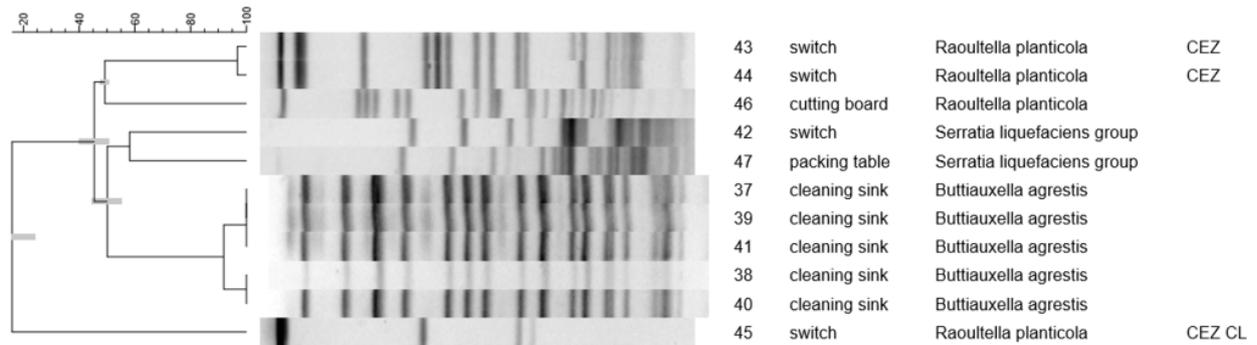


図3 食肉処理業施設⑤で分離された細菌のPFGE像

Nagoya-Xba1

Nagoya-Xba1

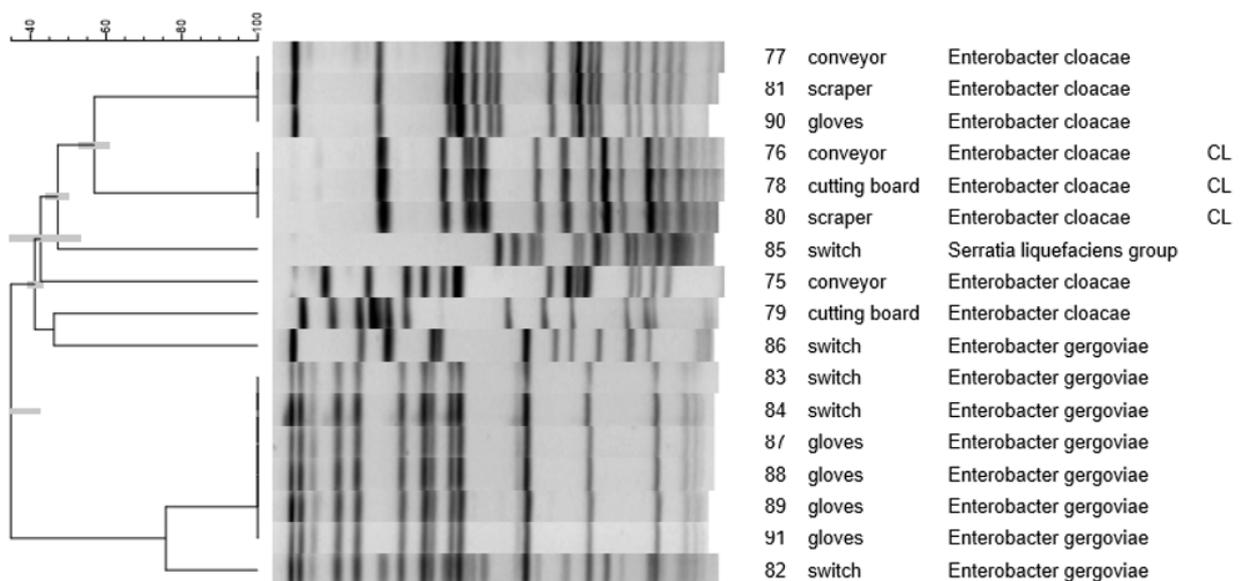


表3 と畜豚から分離されたMRSAの性状

分離株	と畜場	農場	採材日	検体 ¹⁾	ST	spa type	SCC _{mec} type	pvl	czrC	薬剤耐性パターン	亜鉛抵抗性 (MIC:mM)
a-1	a	fa	5月8日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
b-1	a	fb	5月22日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
b-2	a	fb	5月22日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
c-1	a	fc	5月22日	NS	398	t011	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
c-2	a	fc	5月22日	NS	398	t011	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
d-1	a	fd	9月13日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
e-1	a	fe	9月27日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
f-1	b	ff	5月22日	NS	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, CP, TMP	1
f-2	b	ff	5月22日	NS	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC	1
g-1	b	fg	9月14日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
g-2	b	fg	9月14日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
h-1	b	fh	9月29日	NS	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, CP, TMP	1
i-1	b	fi	10月13日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
f-3	b	ff	10月12日	ES	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, EM, CP, TMP	1
f-4	b	ff	10月12日	ES	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, EM, CP, TMP	1

¹⁾NS:鼻粘膜スワブ, ES: 耳スワブ

表4 A社におけるサルモネラ陽性率と株性状

肉用鶏農場(食鳥処理場で採取)		孵卵場	
盲腸内容物 (各群5羽)	血清型 (薬剤耐性パターン)	ワクチン接種後 発育中止鶏卵 (各ロット2個)	血清型 (薬剤耐性パターン)
100% (16/16)	<u>Manhattan (SM, TC)</u> 7株 Manhattan (SM)3株 Schwarzengrund (SM, TC)4株 Schwarzengrund (SM, TC, TMP)2株	22% (12/54)	<u>Manhattan (SM, TC)</u> 5株 Infantis (SM, TMP)7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 30 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究（H30-食品-一般-006）
分担課題 食品等から分離される腸内細菌の薬剤耐性調査と遺伝学的伝播様式の解析

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

この研究では、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、伝達性コリスチン耐性菌）およびバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）について国内で流通する食肉検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。2017 年度（2018 年 2～3 月）に収集した国内産食肉（鶏肉）100 検体、輸入食肉（鶏肉）86 検体の合計 186 検体を調査した。ESBL 産生菌は 74 検体陽性（39.8%）、AmpC 産生菌は 26 検体陽性（14.0%）であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し、やや低いものであった（昨年度は ESBL 産生菌 49.0%、AmpC 産生菌 22.7%の検出率）。ESBL 産生菌は国産鶏肉から高頻度で検出され（国内産 52.0%、輸入 25.6%）、昨年と同様の傾向であった（昨年度は国内産 75.5%、輸入 3.5%）。AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.0%、輸入食肉が 3.5%と昨年と同様に国内産鶏肉の方が高かった（昨年度は国内産が 32.7%、輸入食肉が 10.2%）。それら耐性菌の遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型（42.6%）と SHV 型（42.6%）が多く、輸入肉では CTX-M 型（70.3%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産では全て M2 型グループであり、CTX-M97 が最も多く分離された（26 株中 23 株；87.0%）。輸入食肉では CTX-M8（27.0%）と CTX-M55（21.6%）が優位に分離された。AmpC 型遺伝子としては国内外共に CIT 型（CMY-2）のみが検出された。これら食肉から分離された多剤耐性腸内細菌科細菌 117 株の約 8 割は大腸菌であり、昨年度分離されたサルモネラ属菌は検出されなかった。ESBL 産生菌として、染色体性に *fonA* 遺伝子を保持する *Serratia fonticola* が輸入鶏肉から初めて検出された。今年度に調査した食肉検体からは伝達性耐性遺伝子 *mcr* を保持するコリスチン耐性菌は検出されなかった。一方、ブラジル産鶏肉 1 検体から高度バンコマイシン耐性 VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された。PFGE 解析と MLST 解析の結果から、今回分離された株は数年前より継続的に分離されているブラジル産鶏肉由来 VRE 株と同一の起源を持つ株であることが示唆された。

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) 多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE は欧米で院内感染症の主な起因菌として深刻な問題となっている。ヨーロッパにおいては過去の家畜への肥育目的の抗菌薬（アボパルシン）使用による環境中での VRE の増加とそのヒトへの伝播、

拡散が指摘されている。幸い日本国内では VRE の分離頻度は欧米に比較し低いが、近年、増加中であり複数件のアウトブレイクが臨床報告されている。しかし国内ではこれまで VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は十分に行われていない。本研究では環境（家畜、食肉）由来 VRE と臨床分離 VRE との関係を明らかにする目的で、国内食肉における VRE の調査と解析を行った。

B. 研究方法

食肉検体（表 1）：国内産食肉は国内 3 ヶ所の食肉検査所から（鹿児島、宮崎、群馬）それぞれ鶏肉 30 あるいは 40 検体を収集した。海外食肉は各年度に検疫所で取り扱う輸入鶏肉（ブラジル産

55 検体、タイ産 14 検体、米国产 9 検体、デンマーク産 4 検体、アルゼンチン産 3 検体、フィリピン産 1 検体の合計 86 検体) を収集した。各施設から送付された検体は速やかに凍結保存とし、順次融解の後、解析を行った。

検出方法：

1) ESBL 産生菌および AmpC 産生菌(腸内細菌科菌)の検出

国内の食肉衛生検査所で採集された肉の拭き取り材料を用いた。輸入肉はミンチ肉を用いた。それぞれ ABPC 添加 (80mg/L) LB 液体培地 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。尚、今回の調査においては一つの食肉検体から釣菌した 2 株が同じ耐性パターンおよび耐性遺伝子型を示した際には、それらは同一株と考え、1 株 (1 検体 1 株) として結果に示した (またその際は 1 株のみについて以下の実験を行った)。

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 CSH55rif (リファンピシン耐性) 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 mg/L とリファンピシン 40 mg/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*~*mcr-5* の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 2017 年度 (2018 年 2 月~3 月) に収集した国内産鶏肉 100 検体、輸入鶏肉 86 検体の合計 186 検体を解析した (表 1~表 1 1、図 1~図 3)。

ESBL 産生菌は 74 検体陽性 (39.8%)、AmpC 産生菌は 26 検体陽性 (14.0%) であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し、やや低いものであった (昨年度は ESBL 産生菌 49.0%、AmpC 産生菌 22.7% の検出率)。ESBL 産生菌は国産鶏肉から高頻度で検出され (国内産 52.0%、輸入 25.6%)、昨年と同様の傾向であった (昨年度は国内産 75.5%、輸入 3.5%)。一方、AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.0%、輸入食肉が 3.5% と昨年と同様に国内産鶏肉の方が高かった (昨年度は国内産が 32.7%、輸入食肉が 10.2%)。これら耐性菌の産地別の分離頻度は異なっており、特に国内産鶏肉ではその差は著しく、分離頻度が高いところでは 50%~90%、低いところでは 0%~6.7% であった (表 8、表 9)。耐性菌の遺伝子型の解析から、ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型 (42.6%) と SHV 型 (42.6%) が多く、輸入肉では CTX-M 型 (70.3%) が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産では全て M2 型グループであり、CTX-M97 が最も多く分離された (26 株中 23 株; 87.0%)。輸入食肉では CTX-M8 (27.0%) と CTX-M55 (21.6%) が優位に分離された。AmpC 型遺伝子としては国内外共に CIT 型 (CMY-2) のみが検出された。食肉から分離される耐性株の遺

伝子型の傾向はこれまでの調査と同じであったが、ブラジル産鶏肉の調査検体数の割合が多いためか、ブラジル産食肉由来耐性株に特異的とされる CTX-M8 型の ESBL 産生株の検出が比較的多かった。

鶏肉由来 ESBL および AmpC 産生株（国内産鶏肉由来 77 株と輸入鶏肉由来株 40 株）の合計 117 株について、寒天平板上で大腸菌実験株との接合伝達実験を行なった。その結果、国内産鶏肉由来 77 株にはいずれの耐性遺伝子も伝達する株は見出されなかった。輸入鶏肉由来株 40 株については ESBL 遺伝子を伝達する株が 4 株（10%）見出され、これらの株においては耐性遺伝子が伝達性プラスミド上に存在していることが示唆された。プラスミドのレプリコン型を解析したところ、3 株が *incN* 型で、1 株が *incF* 型であった。

ESBL 産生株、AmpC 産生株（国内 77 株、国外 40 株、合計 117 株）の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり（94 株 80.3%）、次いで *Escherichia fergusonii* が 12 株分離された（表 7、表 1 1）。今年度は ESBL 産生菌として、染色体性に *fonA* 遺伝子を保持する *Serratia fonticola* が輸入鶏肉から初めて検出された。また昨年度と一昨年度の本調査において、食肉検体から病原性細菌であるサルモネラ属の多剤耐性菌が複数分離されたが、今年度は分離されなかった。

2) コリスチン耐性大腸菌の検出

コリスチン含有 DHL 培地（1mg/L）に発育した（赤色コロニー形成）大腸菌 67 株（国内産 33 検体 51 株、輸入 10 検体 16 株）について PCR を行ったところ、*mcr-1*~*mcr-5* の遺伝子陽性株は検出されなかった。またそれら耐性株（薬剤添加選択培地上に発育した MIC 値 2mg/L 以上の大腸菌）を用いた接合伝達実験を行ったが、いずれもコリスチン耐性の伝達性を認めなかった。尚、今回の調査では自然耐性菌の *Proteus* 属菌は対象から除いた。

3) VRE の検出（図 4）

VRE について、今年度は高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株がブラジル産鶏肉検体 1 検体から検出された（図 4；レーン 8、No. 8）。この株をこれまでの 2012 年度（2013 年収集）から 2016 年度（2017 年収集）の本調査において、ブラジル産鶏肉から継続的に分離されてきた VanA 型 VRE (*E. faecium*) 7 株（図 4；No. 1-7）との比較解析を行った。PFGE 解析の結果、全ての株は類似のパターンを示し、また MLST 解析により、これらは全て同一の新規 ST 型に分類され、互いに同一の起源を有する近縁株であることを示している。

D. 考察

ESBL/AmpC 産生株の調査においては、3 年前より検出方法を改善（Ampicillin を添加した液体培地で前培養・増菌処理を行なう工程を追加）した以後、耐性菌の検出率は良好であると考えられる。一方で増菌処理により、少量の耐性菌の検出も可能となり、いわゆる定性的な検出方法による調査であるから、他の定量的な調査による結果とは、分離頻度の単純な比較はできず、解釈が異なることに留意する必要がある。

昨年度の調査結果と比較し、ESBL 産生菌、AmpC 産生菌の分離頻度の傾向は類似するものであり、国外産鶏肉からは主に ESBL 産生菌が多く分離され（約 30%）、国産鶏肉からは ESBL 産生菌および AmpC 産生菌のいずれも比較的多く分離された（20~50%）。しかし、産地別の耐性菌の分離頻度、特に国内での分離頻度は著しく異なっており、今年度の国内産食肉における ESBL/AmpC 産生株の検出頻度に著しい地域差を認めたが、その理由は不明である。しかし国内の同一検査所からの検体に同一菌種、同一耐性型のクローナルな耐性株であったことから、食肉処理過程から検体収集過程までにおける耐性菌によるコンタミネーションが強く疑われる（図 1~図 3）。

昨年度と一昨年度の本調査において、国産食肉検体から多剤耐性サルモネラ属菌が複数の検体から分離され、病原性の腸内細菌科細菌の多剤耐性化について危惧されたが、今回の調査では検出されなかった。

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* の急速な拡散と蔓延、ヒトへの伝播が危惧されているが、今回収集した鶏肉検体においては伝達性（プラスミド性）高度コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*~*mcr-5*）を保持する大腸菌株は分離されなかった。コリスチン耐性大腸菌株を選択するために、腸内細菌科細菌の選択性に優れた DHL 寒天培地にコリスチン（1mg/L）を添加した寒天平板を用いたが、多くの場合 *Pseudomonas* をはじめとする環境菌が多数生育してしまい、大腸菌のコロニーを見出すことがしばしば困難となった。今後、選択平板に菌液を塗布する際にコロニーの分離が良くなる工夫をしたり、増菌過程でコリスチンによる選択圧を加えたりするなどの工夫が必要だと考えている。

VRE に関しては、これまでの調査ではしばしばブラジル産鶏肉から頻度自体は低いものの、臨床で問題となる VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出されていたが、今年度の調査でも検出され、過去数年間に分離された株は全て同一の起源を持つ近縁株であることが明らかとなった。理由は不明ではあるが、ブラジルの養鶏環境において、遺伝背

景が同じクローン株が存在し、拡散していることを強く示唆している。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既に 10 年以上が経過し、VRE による家畜環境の汚染は軽減したものの、一部の環境においては、いまだに存在していることを示している。一方、これまで日本の鶏肉検体からしばしば分離されていた VanN 型 VRE 株は検出されなかった。

E. 結論

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）が一部の国内産鶏肉から高頻度（80～90%）で、また輸入鶏肉全体の約 30 %の頻度でそれぞれ検出された。一方、鶏肉検体からは伝達性高度コリスチン耐性大腸菌は検出されなかった。高度耐性 VanA 型 VRE 株が輸入（ブラジル産）鶏肉 1 検体から検出されたが、これまで国内の食肉から継続的に分離されていた VanN 型 VRE 株は検出されなかった。

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) Chiba N, Tanimoto K, Hisatsune J, Sugai M, Shibayama K, Watanabe H, Tomita H. Detection of *mcr-I*-mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. (2019) in press.
- 2) Hashimoto Y, Kurushima J, Nomura T, Tanimoto K, Tamai K, Yanagisawa H, Shirabe K, Ike Y, Tomita H. Dissemination and genetic analysis of the stealthy *vanB* gene clusters of *Enterococcus faecium* clinical isolates in Japan. *BMC Microbiology*. (2018) 18:213.

2. 学会発表

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

表1. 2018年収集検体

国内産鶏肉(拭き取りスワブ)

	鹿児島県	宮崎県	群馬県	合計
検体数	30	30	40	100

海外産鶏肉(ミンチ肉)

	ブラジル	タイ	米国	デンマーク	アルゼンチン	フィリピン	合計
検体数	55	14	9	4	3	1	86

表2. 輸入鶏肉:ESBL/AmpC陽性検体数

耐性遺伝子	耐性菌陽性検体数
ESBL*	22 (25.6 %)
AmpC	3 (3.5 %)
ESBL or AmpC	25 (29.1 %)

* FONA (*fonA1*遺伝子陽性)をESBLとして集計

表3. 輸入鶏肉：国別ESBL/AmpC陽性検体数

生産国	ブラジル	タイ	米国	デンマーク	アルゼンチン	フィリピン	合計
検体数	55	13	9	4	3	1	86
ESBL産生菌 陽性検体数	18 (32.7 %)	1 (7.7 %)	2 (23.1 %)	0	1 (33.2 %)	0	22 (25.6 %)
AmpC産生菌 陽性検体数	3 (5.5 %)	0	0	0	0	0	3 (3.5 %)

表4. 輸入鶏肉:ESBL型別検体数

遺伝子型	陽性検体数
CTX-M	14 (63.6 %)
SHV	3 (13.6 %)
TEM	4 (18.2 %)
FONA	4 (18.2 %)
陽性検体数	22* 検体(100%)

* 3検体からは異なる2種類の耐性遺伝子型株を分離
(CTX-M + SHV, CTX-M + TEM, CTX-M + FONA)

表5. 輸入鶏肉：AmpC型別検体数

遺伝子型	陽性検体数
CIT	3 (100 %)
計	3検体

表6. 輸入鶏肉：ESBL/AmpC型別株数

	ESBL	AmpC	
TEM	4 (10.8 %)	CIT (CMY-2)	3
SHV	3 (8.1 %)		
CTX-M-1	5 (13.5 %)		
CTX-M-55	8 (21.6 %)		
CTX-M-2	3 (8.1 %)		
CTX-M-8	10 (27.0 %)		
FONA	4 (10.8 %)		
計	37株	計	3株

表7. 輸入雞肉: ESBL/AmpC產生菌菌種

菌種	株数
<i>E. coli</i>	29 (72.5 %)
<i>Serratia fonticola</i>	4
<i>C. freundii</i>	4
<i>Rahnella aquatilis</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	1
計	40株

表8. 国産鶏肉：ESBL/AmpC陽性検体数

地域(調査検体)	耐性菌陽性検体数
宮崎 (30)	2 (6.7 %)
鹿児島 (30)	27 (90.0 %)
群馬 (40)	32 (80.0 %)
合計 (100検体)	61検体 (61%)

表9. 国産鶏肉：ESBL/AmpC陽性検体数

宮崎 (2)	耐性菌陽性検体数
ESBL	2 (6.7%)
AmpC	0

鹿児島(27)	耐性菌陽性検体数*
ESBL	25 (83.3%)
AmpC	3 (10.0%)

群馬 (32)	耐性菌陽性検体数*
ESBL	25 (62.5%)
AmpC	20 (50.0%)

*ESBL産生菌とAmpC産生菌の両方が分離された検体を含む

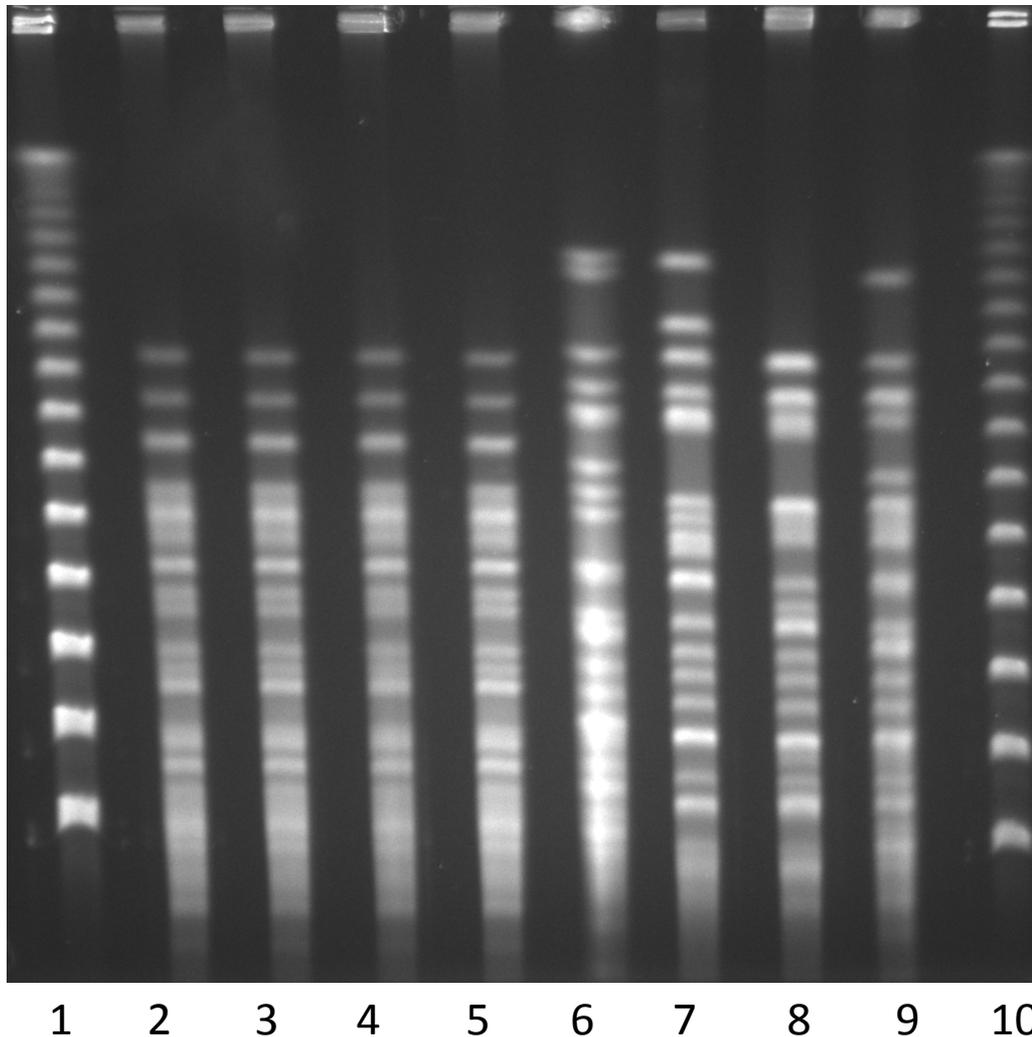
表10. 国内鶏肉：ESBL/AmpC型別株数

遺伝子型	株数	宮崎	鹿児島	群馬
SHV	23	0	23	0
TEM	5	0	0	5
TEM-1 + CTX-M97	3	0	0	3
CTX-M	23	2	4	17
CIT	19	0	3	16
CIT + TEM	4	0	0	4
合計株数	77	2	30	45

表 1 1. 国内鶏肉：ESBL/AmpC産生菌菌種

菌種	株数
<i>E. coli</i>	65 (84.4 %)
<i>E. fergusonii</i>	12
計	77株

図1. 国内検体由来株の多くはクローナル

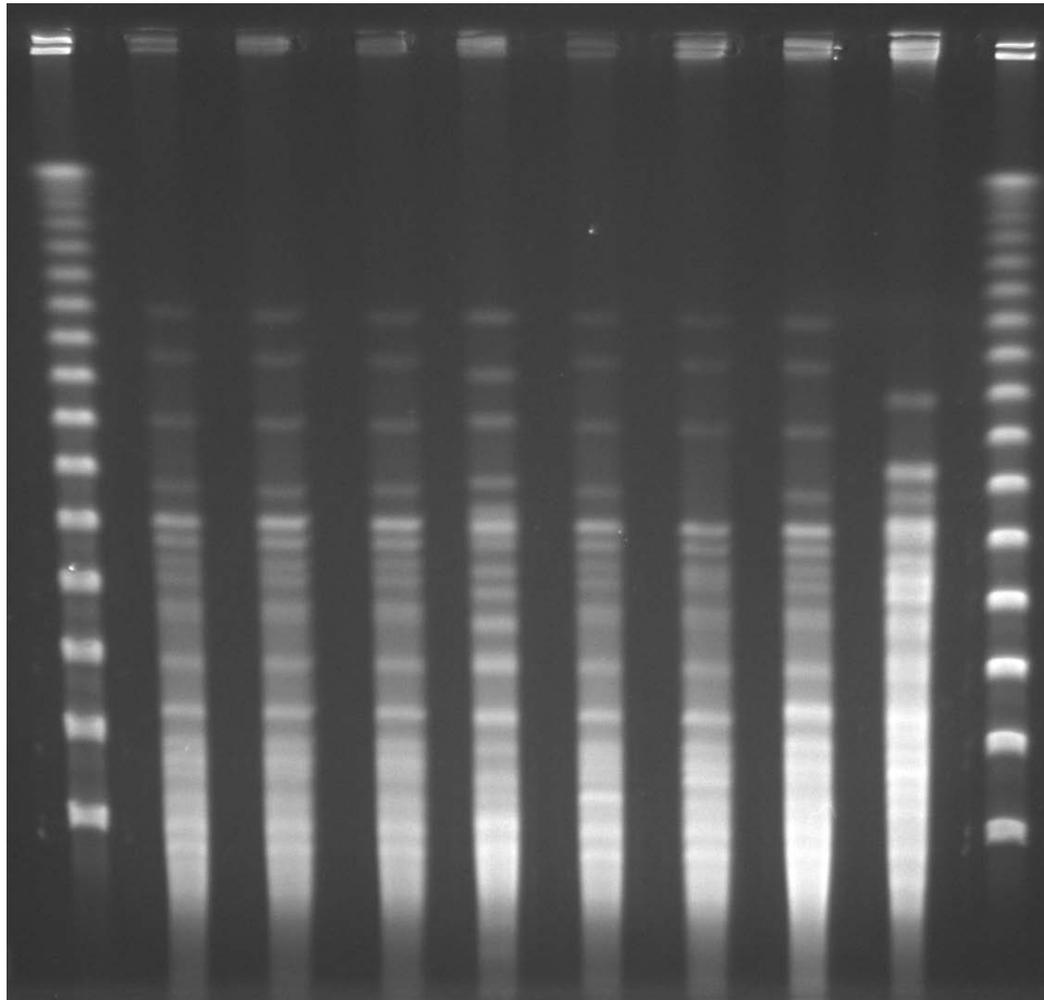


1. λ ladder
2. #13 SHV (SHV-11)
3. #21 SHV
4. #29 SHV
5. #36 SHV
6. #38 CTX-M2
7. #106 CTX-M2
8. #115 CTX-M97
9. #154 CTX-M97
10. λ ladder

全て鹿児島産検体由来株

PFGE / *Xba*I消化

図2. 国内検体由来株の多くはクローナル



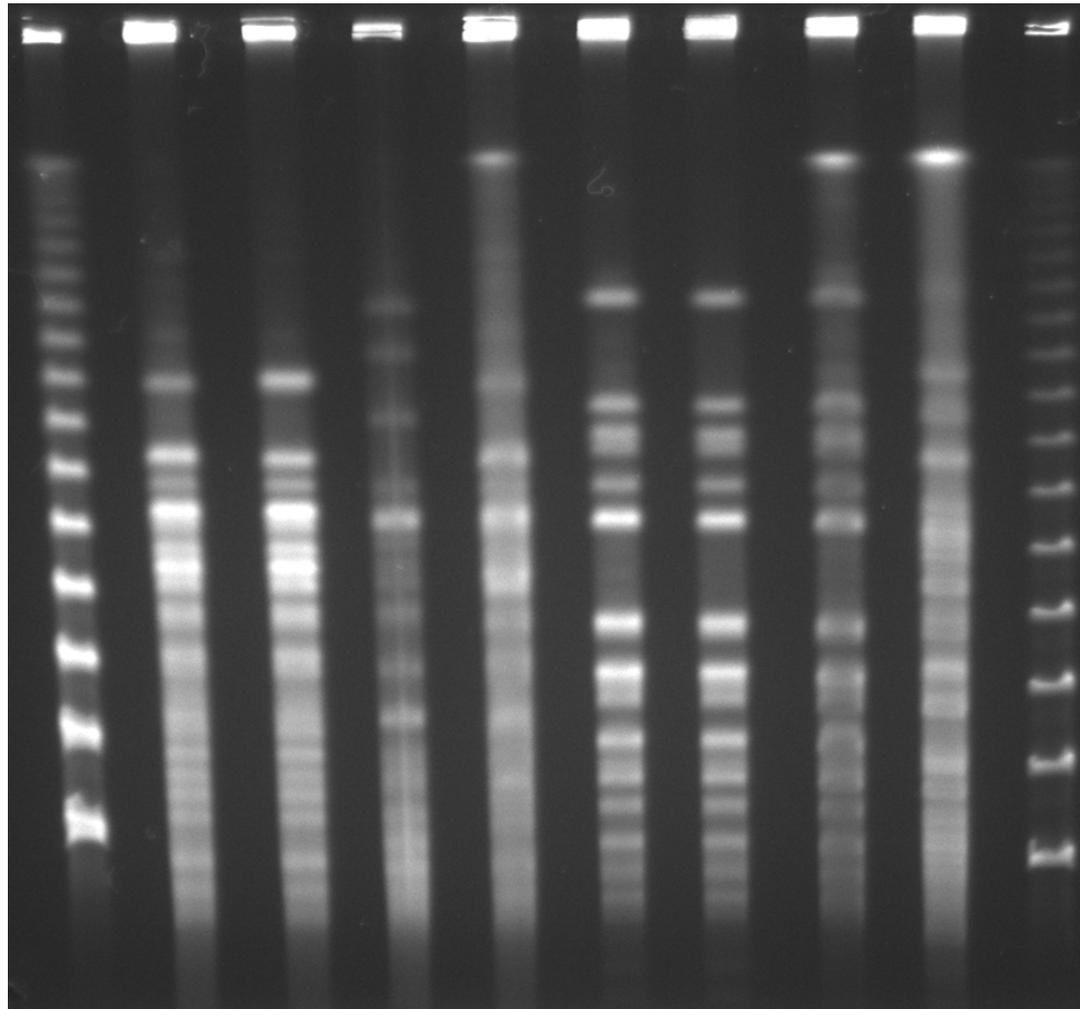
1. λ ladder
2. #158 CTX-M97
3. #166 CTX-M97
4. #175 CTX-M97
5. #193 CTX-M97
6. #170 CTX-M97 + TEM-1
7. #179 CTX-M97 + TEM-1
8. #181 CTX-M97 + TEM-1
9. #169 CMY-2 + TEM-1
10. λ ladder

全て群馬県産検体由来株

PFGE / *Xba*I消化

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

図3. 国内検体由来株の多くはクローナル

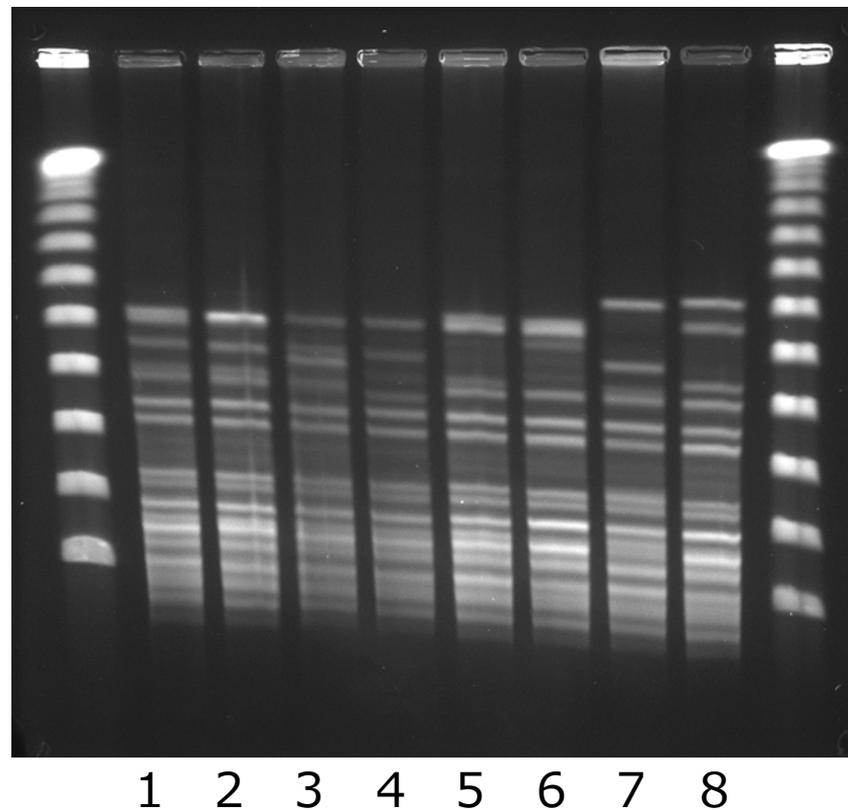


- 1. λ ladder
- 2. #39 CIT 群馬
- 3. #45 CIT 群馬
- 4. #176 CIT 群馬
- 5. #186 CIT 群馬
- 6. #26 CIT 鹿児島
- 7. #28 CIT 鹿児島
- 8. #33 CIT 鹿児島
- 9. #127 SHV 鹿児島
- 10. λ ladder

PFGE / *Xba*I消化

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

図4. ブラジル産鶏肉から分離されたVanA型VRE (*E. faecium*)



No.	分離年度 (収集年は+1年)	VRE			Glycopeptide耐性値	
		が分離された 検体番号	遺伝子型	菌種	(MIC, µg/ml) (E-TEST)	
					Vancomycin	Teicoplanin
1	2012	66167824	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	1
2	2012	31146693	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	1
3	2013	66201485	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256以上	12
4	2014	66229706	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256以上	3
5	2016	66281173	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	4
6	2016	66272347	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	4
7	2016	31247244	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	4
8	2017	66300418	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256以上	3

研究課題名：食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題名：ヒト・家畜・食品等由来耐性菌が保有する薬剤耐性伝達因子の解析及び伝達過程の関連性の解明

研究分担者：石井 良和 東邦大学医学部微生物・感染症学講座・教授

研究協力者：青木 弘太郎（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

研究要旨

患者・家畜・食品および伴侶動物由来の薬剤耐性菌から検出される薬剤耐性伝達因子の伝達過程を明らかにすることは、それらの拡散制御方法を策定する上で重要な情報である。我々のグループでは、本邦において第三セファロスポリン系薬剤耐性大腸菌が広く拡散する以前の菌株を対象として、薬剤耐性伝達因子を塩基配列レベルで明らかにした。また、ペットおよび飼主の糞便から同一遺伝子型の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼが陽性の大腸菌を分離した。

A. 研究目的

近年、国内外において、患者、家畜、食肉、および伴侶動物からプラスミドに媒介される基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) およびコリスチン耐性遺伝子陽性腸内細菌科細菌が分離され、問題となっている。本研究では、ヒト・家畜・伴侶動物間での薬剤耐性遺伝子の伝達過程を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

大きく以下の 2 つの方法により本研究を実施した。

[1] 本邦で ESBL が拡散する以前の ESBL 産生大腸菌保存菌株を対象とした全ゲノム解析 (表 1)

[2] 伴侶動物およびその飼い主の糞便を対象に分離・収集した ESBL/AmpC 産生大腸菌の全ゲノム解析 (表 2)

全ゲノム解析は次世代シーケンサーの MiSeq (イルミナ) および MinION (オックスフ

ード ナノポアテクノロジー) により行った。2 機種から出力された塩基配列を *in silico* で組み合わせた *de novo assembly* により、完全長ゲノム (各複製単位で環状化) 塩基配列の取得を試みた。得られたゲノムを分子疫学および分子生物学的見地から解析し、得られた結果について解釈した。

糞便からの大腸菌および ESBL/AmpC 産生大腸菌の分離培養には、クロモアガー-ECC およびクロモアガー-ESBL (関東化学) を用いた。

(倫理面への配慮)

人を対象とする医学系研究に関する倫理指針および病原体等安全管理規程を遵守して本研究を行った。

C. 研究結果

1996 年~2001 年に臨床材料および健常ブローラーより分離された ESBL あるいは AmpC 型 β -ラクタマーゼ陽性大腸菌それぞれ 12 株および

16 株を対象に全ゲノム解析を行った(表 1)。その結果、臨床材料から分離された大腸菌は全株が *bla*_{CTX-M-14} 陽性だった。一方、健常ブロイラー由来 ESBL 陽性大腸菌は 11 株が *bla*_{CMY-2} 陽性、5 株が *bla*_{CTX-M-2} 陽性だった。*bla*_{CTX-M-14} 陽性株のうち、9 株が sequence type (ST) 405, 1 株ずつに ST10, ST62, および ST68 だった(図 1)。*bla*_{CMY-2} 陽性株はすべてが異なる ST に属する大腸菌だった。うち 3 株は *bla*_{CMY-2} が plasmid sequence type (pST) 3 に属する不和合性グループ IncA/C プラスミドに搭載されていた(図 2)。それらのプラスミドは過去に米国でヒトおよびウシから検出されたプラスミドと骨格構造が酷似していた(図 3)。5 株のうち 3 株から検出された *bla*_{CTX-M-2} 搭載 pST5 に属する IncN プラスミドは、2009 年に検出された *bla*_{CTX-M-2} および *bla*_{IMP-6} 搭載プラスミドに骨格が酷似していた(図 4)。ペットおよびその飼主の糞便サンプルは、40 組のボランティアに採便キットを送付し、17 組分回収された(表 2)。そのうち 1 組でペットおよび飼主から *bla*_{CTX-M-9} グループが共通して陽性の大腸菌が検出された。今後、採便キットの回収および、分離菌の全ゲノム解析を実施する。

D. 考察

第三世代セファロスポリン系薬耐性大腸菌から検出された ESBL/AmpC 遺伝子型は、由来別に明らかに偏っていた。近年、特定の薬剤耐性遺伝子を媒介する流行プラスミド骨格が報告されつつあるが、*bla*_{CMY-2} は IncA/C-pST3 プラスミドにより広く拡散したことが強く示唆された。また、*bla*_{CTX-M-2} が大阪地域における *bla*_{IMP-6} 陽性

腸内細菌科細菌の大規模アウトブレイクの原因となった菌株から検出された IncN-pST5 プラスミドから検出されたことは、流行プラスミドの観点から極めて興味深い。

E. 結論

薬剤耐性遺伝子ごとに媒介するプラスミドの特徴が異なっていた。本研究の結果から、薬剤耐性遺伝子のみならず、それらを媒介するプラスミドの拡散にも注意を向ける必要性が示唆された。

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

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 供試大腸菌の保有薬剤耐性遺伝子、由来および分離年次

ESBL/AmpC	年次	ヒト由来 (株)	動物由来 (株)
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	1996	9	0
	1999	1	0
	2001	2	0
<i>bla</i> _{CMY-2}	1999	0	2
	2000	0	6
	2001	0	1
	2009	0	2
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	2001	0	3
	2004	0	1
	計	12	15

表 2. ペットおよびその宿主糞便から分離された ESBL 産生大腸菌

ペット種	ペア数	ESBL 産生大腸菌	
		宿主	ペット
犬	11	2 (<i>bla</i> _{CTX-M-9G})*	1 (<i>bla</i> _{CTX-M-9G})*
猫	6	0	1 (<i>bla</i> _{CTX-M-1G})
未返送	23	-	-
計	40	2	2

*1 株が同一ペア由来

図 1. *bla*_{CTX-M-14} 陽性大腸菌の遺伝的背景と薬剤耐性遺伝子の周辺構造

CTX-M-14 (MiSeqのみ)

大腸菌遺伝的背景と*bla*_{CTX-M-14}の周辺構造

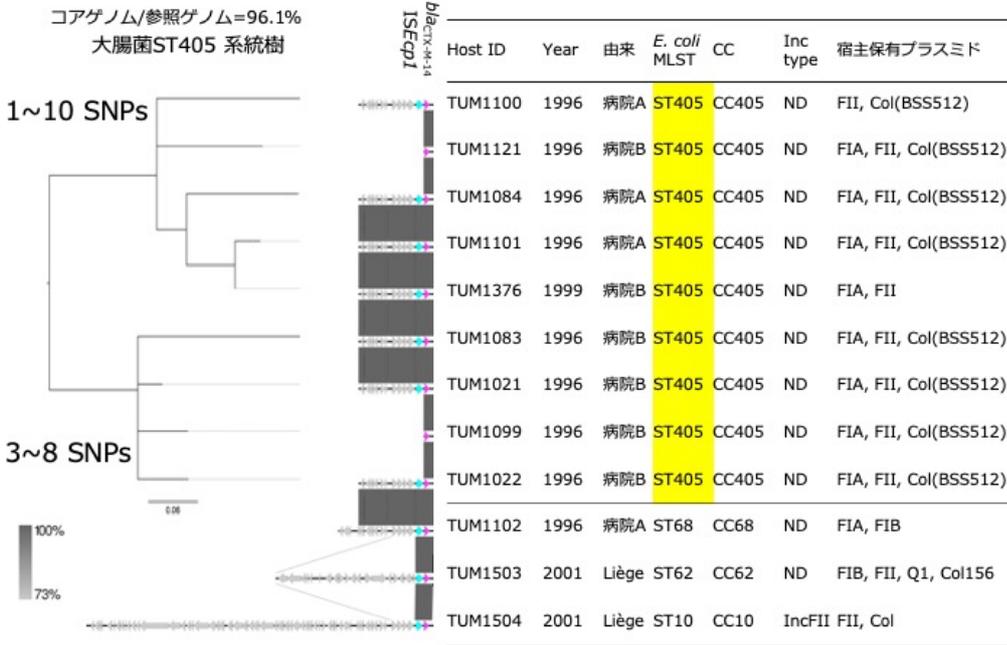
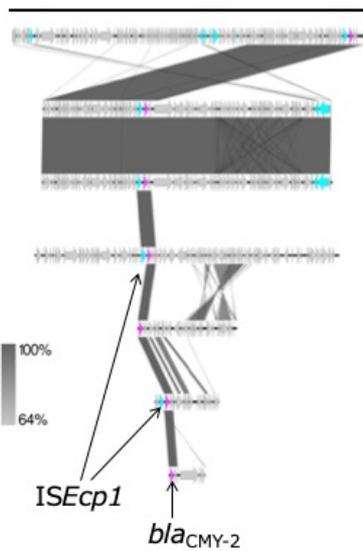


図 2. *bla*_{CMY-2} 周辺構造と宿主大腸菌の関係

CMY-2 (MiSeq+MinION)

*bla*_{CMY-2} 周辺領域と宿主大腸菌の関係

約98.5Kb 部分配列



Host ID	Year	由来	MLST	CC	Inc type	宿主保有プラスミド Inc type (ST)
11-C-217	1999	HB	Novel	CC107	A/C2 (ST3)	FIB, FIC
12-C-140	2000	HB	ST1642	CC10	ND	A/C2(ST3), FIA, FIB, FII
12-C-016	2000	HB	ST3941	CC10	ND	A/C2(ST3), FIB, FIC, I1(ST26)
12-C-129	2000	HB	ST93	CC10	I1 (ST55)	FII, N(ST5), p0111
TUM5327	2009	D	ST372	CC372	ND	FII
TUM5317	2009	CM	ST10	CC10	ND	FIB, FIC, I1(ST12), X1
13-C-034	2001	HB	ST48	CC10	ND	A/C2, FIB, FII, I1(ST26), I2, B/O/K/Z, ColpVC, p0111

HB: 健康プロイラー, CM: 鶏肉, D: 犬

図 3. *bla*_{CMY-2} 搭載 IncA/C-pST3 プラスミドの構造比較

CMY-2 (MiSeq+MinION)

*bla*_{CMY-2} 搭載 IncA/C-ST3 プラスミド

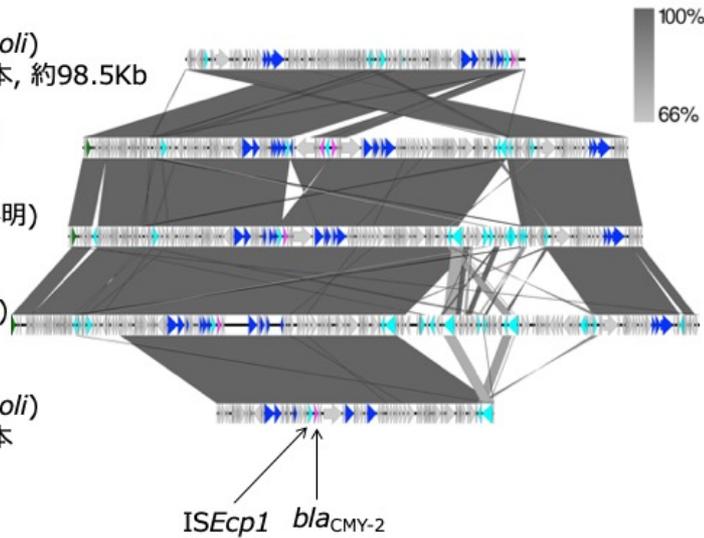
pC11-C-217¹ Partial (*E. coli*)
健康プロイラー, 1999, 日本, 約98.5Kb

pAM04528² (*S. Newport*)
ヒト, 1998, 米国

pAR060302² (*E. coli* ST不明)
ウシ, 2002, 米国

pYDC367³ (*E. coli* ST不明)
ヒト, 2013, 米国

pC12-C-140¹ Partial (*E. coli*)
健康プロイラー, 2000, 日本



¹本研究

²AAC. 2010 Feb;54(2):590-6.

³AAC. 2015 Jul;59(7):4360-1.

水色：トランスポゼース遺伝子
青：接合伝達関連遺伝子

図 4. *bla*_{CTX-M-2} 搭載 IncN-pST5 プラスミドの構造比較

CTX-M-2 (MiSeq+MinION)

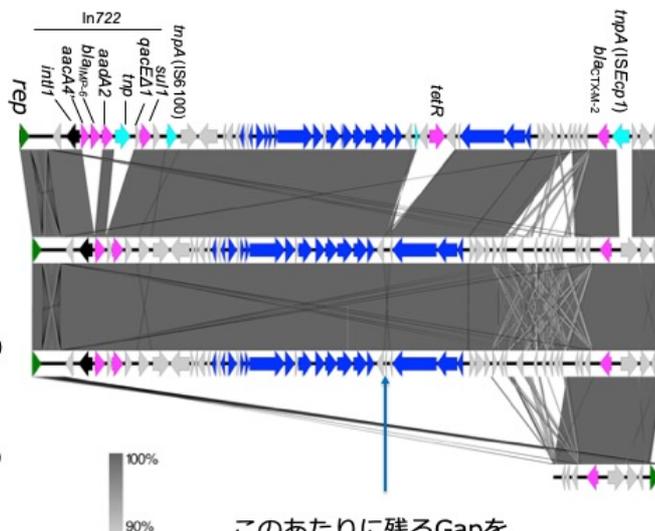
*bla*_{CTX-M-2} 搭載 IncN-ST5 プラスミド

pKPI-6¹ (*K. pneumoniae*)
ヒト, 2009, 日本 (約47kb)

p13-C-033 (*E. coli* ST345[CC10])
健康プロイラー, 2001, 日本
環状(仮)

p13-C-006 (*E. coli* ST1072[CC10])
健康プロイラー, 2001, 日本
環状(仮)

pMTY2255 (*E. coli* ST1060[CC10])
健康プロイラー?, 2004, 日本
水色：トランスポゼース遺伝子
青：接合伝達関連遺伝子



¹ Antimicrob Agents Chemother. 2015 Feb;59(2):1356-9.

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chiba N., Tanimoto, K., Hisatsune J., Sugai M., Shibayama K., Watanabe H. Tomita H.	Detection of mcr-1 mediated colistin resistance in E. coli isolate from imported chicken meat from Brazil.	J. Glob. Antimicrob. Resist.	16	249-250	2019
Hashimoto Y, Kurushima J, Nomura T, Tanimoto K, Tamai K, Yanagisawa H, Shirabe K, Ike Y, Tomita H.	Dissemination and genetic analysis of the stealthy vanB gene clusters of Enterococcus faecium clinical isolates in Japan	BMC Microbiology	18	213	2018

平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 細菌第一部 客員研究員
(氏名・フリガナ) 渡邊 治雄・ワタナベ ハルオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月20日

厚生労働大臣 殿

機関名 愛媛県立衛生環境研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 四宮 博人



次の職員の平成 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 愛媛県立衛生環境研究所 所長
(氏名・フリガナ) 四宮 博人 (シノミヤ ヒロト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口をチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

(様式第7号)

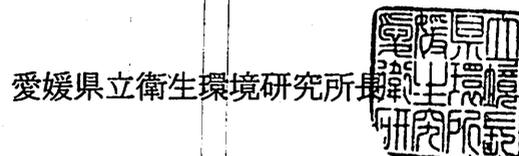
研究計画決定通知書

30衛環第506-2号

平成30年11月19日

愛媛県立衛生環境研究所

所長 四宮 博人 様



平成30年11月6日付けで申請のあった下記の研究計画について、次のとおり決定したので通知します。

研究課題名	食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
研究責任者 (所属・職・氏名)	愛媛県立衛生環境研究所 所長 四宮博人
判定	<input checked="" type="radio"/> ① 承認 <input type="radio"/> ② 条件付承認 <input type="radio"/> ③ 計画の変更 <input type="radio"/> ④ 不承認 <input type="radio"/> ⑤ 研究の停止又は中止 <input type="radio"/> ⑥ その他 ()
判定理由	(承認の場合は不要)
条件、変更の内容、意見等	(承認の場合は不要)
その他	

注 決定内容欄は、いずれかに○印をつけること。6 その他の場合は、具体的に記載すること。

平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆宇



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬剤耐性研究センター・センター長
(氏名・フリガナ) 菅井 基行・スガイ モトユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 細菌第一部 部長

(氏名・フリガナ) 大西 真・オオニシ マコト

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田 晴宏

印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究 (H30 - 食品 - 一般 - 006)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・部長

(氏名・フリガナ) 朝倉 宏 ・ アサクラ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) 組み換え DNA 実験指針

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 3月25日

厚生労働大臣 殿

機関名 農林水産省動物医薬品検査所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 小原 健児



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 検査第二部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 川西路子・カワニシミチコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 審査を研究代表機関に委託)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: 国立感染症研究所)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



平成 31 年 3 月 13 日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 東京都健康安全研究センター

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 大井 洋 印



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 微生物部 食品微生物研究科 主任研究員

(氏名・フリガナ) 小西 典子・コニシ ノリコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京都健康安全研究センター 倫理審査委員会	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

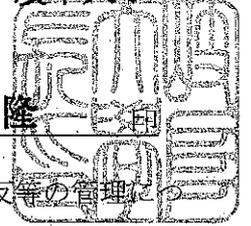
平成31年3月7日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立大学法人 岐阜大学

所属研究機関長 職名 学 長

氏名 森脇久隆



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 連合獣医学研究科 教授
(氏名・フリガナ) 浅井鉄夫 アサイテツオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

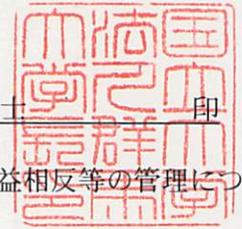
平成31年4月4日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立大学法人群馬大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 平塚 浩 士



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学系研究科 教授
(氏名・フリガナ) 富田 治芳 トミタ ハルヨシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

