

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」

分担総合研究報告書

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

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

研究要旨：輸入・国産鶏肉計 205 検体及び国産食鳥と体 100 検体における ESBL/AmpC β ラクタマーゼ産生大腸菌等の定量的汚染実態を解析した。鶏肉検体では ESBL 産生大腸菌は 35 検体で定量検出され、平均汚染菌数は 1.50logCFU/g であったほか、食鳥と体検体では 12 検体で定量検出され、平均汚染菌数は 1.66 logCFU/g であった。計 177 分離株の薬剤耐性状況として、 β ラクタム系抗菌剤に加え、TC に耐性を示した菌株は 78.0%となったほか、SM 耐性は 65.0%の分離株で認められる等、5 剤以上の抗菌剤に耐性を示す株は全体の 74%を占めた。分離株の β ラクタマーゼ遺伝子型は CTX-M-1 型が 41.2%、CTX-M-2 型は 26.0%、CTX-M-9 型は 22.6%となり、同 3 型で全体の 89.8%を占めた。また、Inc 型は IncF が全株で陽性となったほか、IncI1 も 43.5%で陽性を示した。鶏肉由来大腸菌とマウス糞便懸濁液の共培養を通じ、IncI1 プラスミドの水平伝達を確認され、生体内での薬剤耐性プラスミドの水平伝達が生じ得る事象を確認した。また、国内のヒト及び動物由来 *C. coli* の薬剤感受性を解析した結果、ヒト臨床分離株は鶏由来株と共に、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。豚由来代表株の ST-1562 株はゲノム上に TC、ABPC 耐性遺伝子等を遺伝子クラスターとして保有していたほか、EM 耐性は一塩基置換により獲得されたこと等から豚はヒトの直接的な *C. coli* 感染源として機能している状況にはないと目された。肉用鶏由来サルモネラ分離株では *S. Schwarzengrund* が高頻度に検出され、国産鶏肉分離株でも同様の傾向を示したが、輸入鶏肉分離株では同血清型は認められず、国内の肉用鶏に広く分布している血清型であることが示唆された。国産食鳥と体由来サルモネラ分離株は KM 及び TC 耐性率が高く、輸入鶏肉由来サルモネラ分離株では β ラクタム系抗菌剤への耐性率が高い傾向にあった。

A. 研究目的

ESBL/AmpC β ラクタマーゼ産生大腸菌は鶏肉から高率に検出される状況にあるとされ、当

該食品を介したヒト健康被害との関連性も推察されている。現在、当該耐性菌の汚染実態に関する報告の多くは、定性的な汚染実態あるい

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

本分担研究では、こうした状況を踏まえ、国産・輸入鶏肉並びに、国内の食鳥処理場で解体処理過程にある食鳥と体を対象として、ESBL 産生菌の定性・定量的汚染実態を調査し、分離株の薬剤感受性を検討した。あわせて、鶏及び鶏肉等におけるサルモネラ属菌及びカンピロバクターの汚染実態、並びに分離株の薬剤感受性等について検討を行った。

B. 研究方法

1. 鶏肉及び食鳥と体からの ESBL 産生菌の定量・定性検出試験と薬剤感受性試験

国産鶏肉 100 検体、輸入鶏肉 105 検体、並びに国産食鳥と体 100 検体を対象に、ESBL 産生菌定量試験に供するため、検体 25g に緩衝ペプトン水 (BPW) 100mL を加えてホモジナイズ後、同懸濁液 200 μ L をクロモアガー-ESBL 寒天培地 (CHROMagar) に塗抹し、37°Cにて 24 時間培養を行い、同培地上に発育した定型集落を計数することで定量菌数を求めた。また、上述の検体 25g にセフォタキシム (CTX) 1 μ g/mL 含有 BPW225mL を加えて 10 倍乳剤を調整した後、37°Cで 24 時間増菌培養を行い、増菌培養液一白金耳量をクロモアガー-ESBL 寒天培地に画線塗抹して 37°C24 時間培養を行うことで、ESBL 産生大腸菌の発育を確認した。陽性と判定された集落は、分離を行い、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験に供した。

2. β ラクタマーゼ遺伝子型別及び Incompatibility plasmid 型別試験

ESBL 産生大腸菌分離株の β ラクタマーゼ遺伝子型別は PCR 法によった。CTX-M 型 β ラクタマーゼを産生する ESBL 産生大腸菌株、並びに何れかの薬剤に耐性を示したサルモネラ属菌株については、PCR 法を用いた

Incompatibility (Inc) plasmid 型別試験に供した。

3. IncI1 プラスミドの接合伝達試験

鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌株が保有する IncI1 プラスミドの blaCTX-M-1 下流域に mClover3 ORF を相同組み換えにより導入し、これを再び同大腸菌株に組み入れた。同株を Donor としてマウス糞便乳剤と共培養を行い、mClover3 の蛍光を呈する集落数の動態を観察した。

4. サルモネラの定性検出試験及び性状試験

鶏肉・食鳥と体検体からのサルモネラ属菌の定性検出試験については、項 1 の試験検液を 37°C24 時間で増菌培養後、ラパポート・バシリアディス (RV) 培地で二次増菌培養し、一白金耳量をクロモアガーサルモネラ培地 (関東化学) に画線塗抹してサルモネラ属菌を単離した。サルモネラ分離株は、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験並びにサルモネラ免疫血清「生研」を用いた血清型別を行った。

5. *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。

6. 採卵鶏からのサルモネラ及びカンピロバクター定性検出試験

採卵鶏農場にて、各群 3 羽の総排泄腔スワブを採材し、サルモネラ及びカンピロバクター定性検出試験を実施した。得られた分離株については、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験を行った。

C. 研究結果

1. 食鳥と体検体における ESBL 産生菌の検出状況.

食鳥と体計 100 検体のうち、大腸菌は 12 検体、腸内細菌科菌群は 27 検体より検出され、同対象菌の何れかが検出された検体数は 30 検体にのぼった。ESBL 産生大腸菌および同腸内細菌科菌群の平均値は、それぞれ 2.61 logCFU/g 及び 2.45 logCFU/g であり、最大値は 3.26 logCFU/g 及び 3.11 logCFU/g であった。検出下限未満となった検体数は 70 検体であった。なお、ESBL 産生大腸菌の陽性率は 47.0% であった。

2. 鶏肉検体における ESBL 産生菌の検出状況.
(国産鶏肉検体)

国産鶏肉製品計 100 検体のうち、大腸菌は 29 検体、腸内細菌科菌群は 21 検体検出され、これらのいずれかが検出された検体数は 41 検体にのぼった。ESBL 産生大腸菌及び同腸内細菌科菌群の平均値は、それぞれ 2.34 logCFU/g 及び 3.06 logCFU/g であり、最大値は 2.36 logCFU/g 及び 3.23 logCFU/g であった。検出下限未満となった検体数は 59 検体であった。ムネ・モモの部位別に ESBL 産生菌の検出菌数を比較したが、両部位間の成績に有意差は認められなかった。ESBL 産生大腸菌の陽性率は 69.0% であった。

(輸入鶏肉検体)

定量検出試験を通じ、ESBL 産生大腸菌は 6 検体で共に検出限界値である 1.40 logCFU/g、腸内細菌科菌群は 6 検体より検出され、検出菌数は 6 検体が 1.40 logCFU/g、2 検体が 1.88 logCFU/g であった。また、クロモアガー上に発育した他の色調を呈する集落は計 49 検体で認められ、うち 26 検体は 1.40 logCFU/g 未満、23 検体は 1.40-1.99 logCFU/g、1 検体は 2.00

logCFU/g 以上 (3.03 logCFU/g) であった。なお、定性試験を通じ、ESBL 産生大腸菌は 105 検体中 51 検体 (48.6%) より検出された。

3. 鶏肉及び食鳥と体検体由来 ESBL 産生大腸菌株の薬剤耐性状況

ESBL 産生大腸菌分離株の薬剤耐性率は、AMP, CEZ, CTX が 100% の耐性率を示したほか、TC 耐性が 78.0%、SM 耐性が 65.0%、ST (SMX/TMP) 耐性が 58.2% の順に高値を示した。

4. 鶏肉及び食鳥と体検体由来 ESBL 産生大腸菌の遺伝特性

ESBL 産生大腸菌分離株の遺伝特性として、 β ラクタマーゼ型は CTX-M-1 型が 41.2%、CTX-M-2 型は 26.0%、CTX-M-9 型は 22.6% となり、同 3 型で全体の 89.8% を占めた。また、Inc 型は IncF が全株で陽性となったほか、IncI1 も 43.5% で陽性を示した。

5. IncI1 プラスミドの接合伝達試験

鶏肉由来大腸菌株と C57/BL6 マウス大腸内容 10 倍乳剤を混合し、2 時間培養し、得られた蛍光発現集落 100 個を釣菌して、遺伝子同定したところ、全て Donor とは異なる大腸菌であったことから、共培養を通じて Donor からの IncI1 プラスミドの接合伝達が行われたと解釈した。

6. 輸入冷凍鶏肉及び食鳥と体におけるサルモネラ属菌の検出状況と分離株の血清型.

輸入冷凍鶏肉 105 検体中、サルモネラ属菌は 21 検体 (20.0%) から検出された。分離株の血清型は Enteritidis が 7 株と最も多く、Heidelberg (3 株)、Minnesota (3 株) が次いで多い状況であった。

また、食鳥と体 130 検体からは 67 検体 (53.6%) より当該菌が分離された。最終的に分離された計 85 株の血清型別内訳としては、Schwarzengrund が 52 株 (61.2%) と高い占有率を示し、Yovokome が 4 株 (4.7%)、Typhimurium が 3 株 (3.5%) とこれに続いた。

薬剤感受性試験の結果、輸入冷凍鶏肉由来の 21 株のうち 17 株 (80.9%)、食鳥と体由来の 85 株のうち 53 株 (62.4%) は何れかの薬剤に耐性を示した。また、5 剤以上の多剤耐性はそれぞれ 7 株 (33.3%) 及び 13 株 (15.3%) で認められた。薬剤別の耐性率は、輸入冷凍鶏肉分離株では AMP 及び CEZ が共に 76.2% と最も高く、次いで NA が 61.9% であったのに対し、食鳥と体分離株では KM が 52.9% と最も高く、TC が 36.5% とこれに続く状況であった。

輸入鶏肉由来株を対象とした Inc 型別試験を通じ、全分離菌株は IncF 型陽性を示した。このうち、5 剤に耐性を示した 7 株は、何れも IncA/C 陽性を示した。また、CTX 耐性を示した 2 株からは、IncI1 が検出されたが、CTX-M 遺伝子は検出されなかった。

7. *C. coli* の薬剤感受性及びゲノム解析.

ヒト由来 *C. coli* 42 株の薬剤耐性プロファイルは、NA 耐性が 29 株 (69%)、TC 耐性が 26 株 (62%)、CPFEX 耐性が 25 株 (60%) の順に高く、EM 耐性は 2 株 (5%) のみであった。ニワトリ由来 25 株では、ヒト由来株と同様に CPFEX 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%)、CPFEX 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。

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。

8. 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。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血清型 O 群のみが検出されていた。

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。分離株の薬剤耐性状況として、若齢群の CPFEX 耐性は高齢群よりも有意に高かったほか、AMP 耐性は約 3 割で認められた。

D. 考察

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

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

一方、鶏肉喫食に伴うヒト生体内での耐性因子の水平伝播効率については依然として把握されていないが、本研究結果からその可能性が十分に想定されることから、今後は接合伝達性プラスミドの遺伝特性や宿主域の把握等に着

目した検討を行うことが必要と考えられる。

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

カンピロバクターのうち、肉用若鳥由来株については、高い CPFIX 耐性率を示す傾向が近年続いているとされるが、*C. jejuni*による CPFIX 耐性獲得は *gyrAB* 遺伝子の点変異による割合が極めて高い。同剤耐性獲得が既に一定程度浸淫している現状からの大きな耐性率低減は、生産段階での同薬剤使用中止のみによっては期待し難いと思われる。一方、近年穏やかな上昇傾向を示す同菌のテトラサイクリン耐性については、ESBL 産生菌と同様に、プラスミド性の水平伝播により獲得される割合が高いとされ、生産農場等での使用制限等による効果は相対的に期待度が大きいとも目される。生産段階等における薬剤の使用制限設定や家畜・家禽のモニタリングを実施する際には、対象菌のこれまでの耐性率等の疫学実態のみに執着することなく、薬剤耐性獲得機序を十分に考慮することがより合理的と考えられる。また、プラスミド性の耐性伝播機構についても更なる研究が必要であろう。

E. 結論

国内外を問わず、鶏肉等では高率に ESBL 産生大腸菌汚染が生じていたが汚染菌数は総じて低く、温度管理や交叉汚染排除等、食品とし

ての衛生管理の徹底により増殖を防止することが食品を介した耐性菌の伝播防止に重要となる可能性が示された。また、採卵鶏は肉用若鳥に比べ、相対的に低いサルモネラ・カンピロバクター汚染率を示し、また薬剤耐性状況も異なる可能性を示唆する知見を得た。サルモネラについては国内の肉用鶏に特定の血清型が広く分布している状況が確認できた。カンピロバクター・コリについては豚では EM 耐性率が高く、ゲノム特性等からも人の食中毒の原因として機能している可能性は低いと考えられた。引き続き、継続的な食品モニタリングを行うと共に、薬剤耐性菌の食品への拡散防止措置の効果の検証、更には食品の喫食を介した耐性菌伝播リスクを定量的に予測或いは解析していくこと等が必要と思われる。

G. 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*. 2019. 34(2): 146-154.
- 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*. 2019. 47(2):47-51
- 3) Yamamoto S, Nakayama T, Asakura H. Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* CRB139-1 isolated from poultry meat in Japan. *Microbiol. Res. Announc.* 2020. 9(12): e00075-20.
- 4) 佐々木貴正、米満研三、上間匡、五十君静信、朝倉宏. 採卵養鶏場のサルモネラ汚染実態と有効なサルモネラ汚染低減対策の推定. *鶏病研究会報*. 2019. 55: 159-163.

- 5) 佐々木貴正、上間匡、百瀬愛佳、米満研三、浅井鉄夫、朝倉宏。2食鳥処理場におけるブロイラー群および胸肉のカンピロバクター・サルモネラ汚染状況と薬剤耐性。鶏病研報。2020。50: 153-158.

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、2018年11月、東京都。
- 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、大阪府。
- 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、広島。
- 4) 山本詩織、朝倉宏：鶏肉におけるカルバペネム耐性菌汚染実態及び *Stenotrophomonas maltophilia* 分離株のゲノム特性、日本微生物生態学会第33回大会、2019年9月、山梨。
- 5) 山本詩織、川村研二、朝倉宏：外来患者由来ESBL産生大腸菌の分子遺伝学的特性について、第92回日本細菌学会総会、2019年4月、北海道。
- 6) 山本詩織、中山達哉、町田李香、朝倉宏：国内の市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌の定性的・定量的評価。第94回日本細菌学会総会、2021年3月、オンライン開催。
- 7) Yamamoto S, Okada Y, Ishii Y, Igimi S,

Asakura H: Prevalence and genetic characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail poultry meat in Japan. International Union of Microbiological Societies Congresses (IUMS 2020), October 2020, South Korea.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし