

令和4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）  
「ワンヘルスに基づく食品由来薬剤耐性菌のサーベイランス体制の強化のための研究」

分担研究報告書

食品由来カンピロバクター、サルモネラ等の薬剤耐性獲得動向に関するサーベイランス  
及び食品内での制御効果の評価に関する研究

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	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	有田佳子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	増岡和代	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

**研究要旨：**国内で製造加工された鶏モモ肉製品 212 検体を対象に、ESBL 産生大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクターの汚染状況並びに分離株の遺伝性状を解析した。定性試験を通じ、ESBL 産生大腸菌は 155 検体（73.1%）より検出されたが、あわせて行った定量試験成績より、191 検体（90.1%）は 100 CFU/g 未満の汚染菌数であること、100 CFU/g 以上の汚染菌数を認めた 21 検体中 11 検体は同一事業者由来であったこと等が確認され、特定施設での衛生管理の確認と必要に応じた衛生指導が今後検討すべき課題と想定された。また、ESBL 産生大腸菌株の約 22%はβラクタム系を除く 5 剤以上に耐性を示したほか、βラクタマーゼ産生遺伝子型は事業者間で差異を認めた。サルモネラ属菌は 94 検体（44.3%）より検出され、うち 14 株（14.9%）は 5 剤以上の多剤耐性を示した。薬剤別の耐性率は TC 耐性が 92 株（97.9%）と最も高く、KM 耐性が 81 株（86.2%）、ST/TMP 耐性が 47 株（50.0%）と続いた。カンピロバクターは最終的に 98 株（*C. jejuni* 74 株、*C. coli* 24 株）が分離された。*C. jejuni/coli* をあわせた 98 株全体での薬剤別の耐性株数及び耐性率は、CPFX が 61 株（62.2%）と最も高く、次いで TC が 30 株（30.6%）、AMP が 26 株（26.5%）、EM が 12 株（12.2%）であった。菌種別では、*C. jejuni* は CPFX 耐性が 39 株（52.7%）と最も多く、次いで AMP 耐性が 21 株（28.4%）、TC 耐性が 13 株（74%）であったのに対し、*C. coli* では CPFX 耐性が 22 株（91.7%）と最も多く、次いで TC 耐性が 17 株（70.8%）、EM 耐性が 12 株（50.0%）、AMP 耐性株が 5 株（20.8%）であった。CPFX 耐性率は本年度も全体で 6 割を超え、前年度に比べて著変は認められず、今後もその動向をサーベイランスしていく必要があると考えられた。また、*C. coli* 株の 50.0%は特定事業者から出荷された鶏肉検体由来であり、10 株中 9 株が TC 耐性を示していたことから、当該事業者が取り扱う鶏肉について、生産段階での飼養管理体制を含めた衛生管理状況を調査していく必要性が示唆されたほか、引き続き、特定事業者由来検体に限定することなく、幅広く検体収集を行うべきと考えられる。

## A. 研究目的

基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生菌は鶏肉から高率に検出されるとする報告がこれまでに集積されつつあり、当該食品を

介したヒト健康被害の可能性も指摘されている。一方、当該耐性菌の汚染実態として報告される成績の多くは定性的な汚染実態あるいは

分離菌株の特性解析に限定されており、定量的成績に関する知見は乏しい状況であった。一方、近年では食品のリスク評価を行う上では定量的成績に基づいた分析が国際標準となっていることを踏まえ、本分担研究では鶏肉におけるESBL産生菌の定性・定量的汚染実態を継続的に調査するとともに、分離菌株の遺伝的性状の検討を進めてきた。

本年度は、計7の大手事業者により製造加工され、流通段階にある鶏モモ肉製品におけるESBL産生菌の定量的汚染実態に関する調査を経時的に行うと共に、得られたESBL産生大腸菌株の薬剤感受性及びβ-ラクタマーゼ産生遺伝子型別を検討した。加えて、同一検体からのサルモネラ属菌並びにカンピロバクター属菌の菌分離を試み、得られた分離菌株の薬剤感受性に関する検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 供試検体および試験検液の調整

国内に流通する鶏肉製品212検体を対象として、鶏モモ肉製品の皮中心部位25gを供試検体とした。各検体は採取後、滅菌鉗及びピンセットを用いて、細切した後、緩衝ペプトン水(BPW、Oxoid) 100mLを加えて1分間ホモジナイズした後、試験検液とした。

### 2. ESBL産生大腸菌の定量・定性試験

ESBL産生大腸菌の定量評価にあたっては、上項1の試験検液200μLをクロモアガーESBL培地(関東化学)に直接塗抹した後、37°Cで24時間好気培養し、培養後に生育した典型集落数を計測した。平行して、試験検液の残液にセフトキシム(CTX)を終濃度1μg/mLになるよう添加した後、37°Cで24時間で増菌培養し、一白金耳量をクロモアガーESBL培地に画線塗抹し、生育したESBL産生大腸菌(赤色集落)

を1検体につき原則2集落を単離した(定性試験)。

### 3. ESBL産生性が疑われる大腸菌以外の集落の菌種同定

上項2の定量試験において、クロモアガーESBL培地上で生育が認められた青色または白色を呈する代表集落について、純培養した後、AXIMA微生物同定システム(島津製作所)に供することで、菌種同定を行った。

### 3. サルモネラ属菌の定性評価

上項1の試験検液を調製し、37°Cで24時間増菌培養した後、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)に画線塗抹することで、サルモネラ属菌を単離した。菌種同定にはPCR法を用いた。

### 4. カンピロバクター属菌の定性評価

上項と同一検体10gをプレストン培地に接種し、42°Cにて48時間好気培養を行った。培養後、一白金耳量をクロモアガーカンピロバクター培地(関東化学)に画線塗抹して、カンピロバクター属菌を単離した。菌種同定にはPCR法を用いた。

### 5. 薬剤感受性試験等

分離されたESBL産生大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター属菌の各分離株について、CLSI法に準じた薬剤感受性試験に供した。供試薬剤は、ESBL産生大腸菌ではSM、GM、KM、ST/TMP、CL、CP、TC、NA、CPFの計9剤を、サルモネラ属菌では、AMP、CEZ、CTX、SM、GM、KM、ST/TMP、CL、CP、TC、NA、CPFの計12剤を、カンピロバクターではAMP、EM、TC、CPFの計4剤を用いた。な

お、カンピロバクターに対する AMP の breakpoint については、CLSI、EU-CAST 共に示されていなかったため、Ammar らの方法 (Ammar AM, Animals, 11, 1-18, 2020) に従って判定を行った。

また、サルモネラ属菌株では、サルモネラ免疫血清「生研」を用いた血清型別を行った。

## 6. $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子型別試験

ESBL 産生大腸菌株については、PCR 法により主要な  $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子 (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8) を対象とした型別試験に供した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. ESBL 産生大腸菌の検出試験成績概要

定性試験を通じ、ESBL 産生大腸菌は 212 検体中 155 検体 (73.1%) で認められた。一方、定量検出試験を通じ、ESBL 産生大腸菌は 50 CFU/g 以上の菌数を認めた検体数は 31 検体に留まり、残り 181 検体 (85.4%) は検出限界未満 (<50 CFU/g) であった (図 1)。最大菌数は 2,925 CFU/g であったが、100 CFU/g 以上を呈した検体数は 21 検体、1,000 CFU/g 以上を呈した検体数は 3 検体に留まった (図 1)。

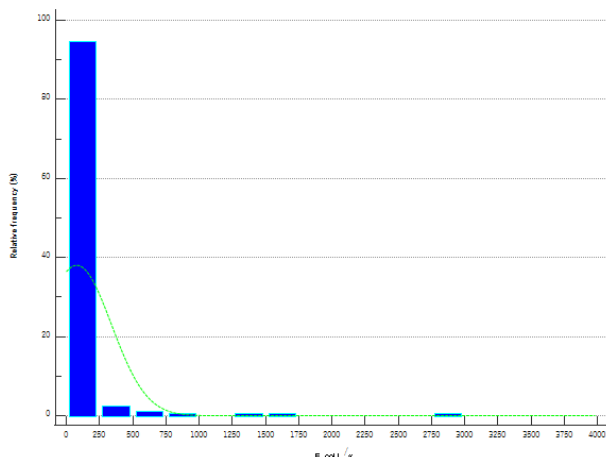


図 1. 鶏モモ肉検体における ESBL 産生大腸菌の菌数分布。

本分担研究では計 7 (A~G) の大規模事業

者由来の鶏モモ肉検体を対象として経時的に調査を進めた。全体では、わが国において製造加工、流通される当該食品における ESBL 産生大腸菌の汚染菌数は低い状況にあることが確認された。一方、100 CFU/g 以上を呈した 21 検体のうち、11 検体は複数月に跨った形で、同一施設由来であったことから、当該施設における一般衛生管理の向上が当該耐性菌の汚染低減に資するものと考えられた。これらの状況を鑑みると、今後もこうした調査研究を行う際には、地域や事業者に偏りを持たない形で検討を進める必要があると思料される。

### 2. クロモアガー-ESBL 培地上での発育集落数及び優勢菌種の同定

クロモアガー-ESBL 培地上に発育した赤色以外の集落数を計数したところ、菌数分布は ESBL 産生大腸菌に近似し、212 検体中 40 検体 (18.9%) で青色集落を認めたが、残り 172 検体 (81.1%) ではこれらを認めなかった (図 2)。最大菌数は 2,925 CFU/g であったが、100 CFU/g 以上を呈した検体数は 25 検体、1,000 CFU/g 以上を呈した検体数は 4 検体に留まっていた (図 2)。

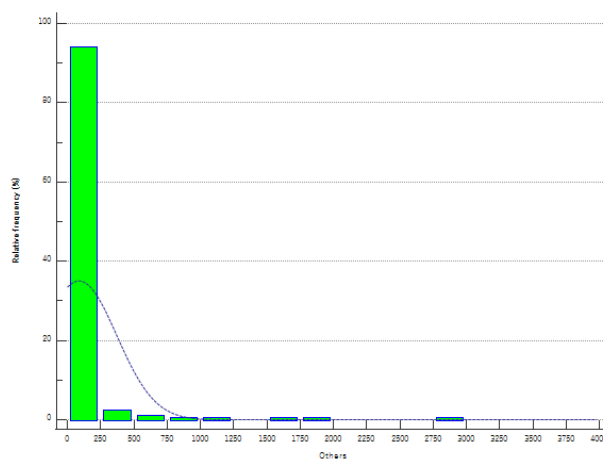


図 2. 鶏モモ肉検体をクロモアガー-ESBL 培地に塗抹・培養後に発育を呈した青色集落数の分布。

鶏モモ肉製品検体からの定量試験において、クロモアガー-ESBL 培地上で発育が認められた *E. coli* 及びその他の集落数に関する関連性を確認したところ、両試験項目間の相関係数  $r$  は 0.9533 と高い正の相関を示した (図 3)。

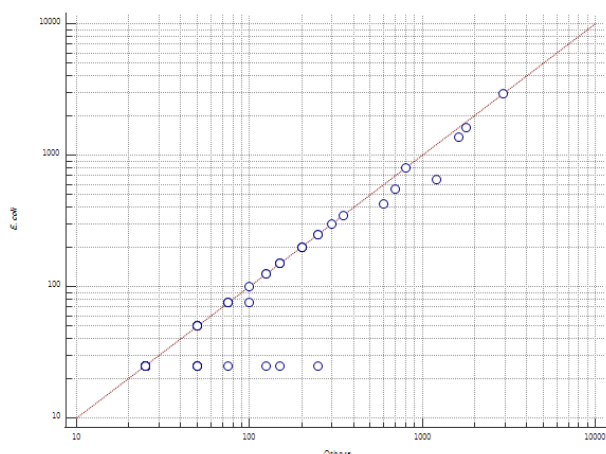


図 3. 鶏モモ肉製品検体からの定量試験において、クロモアガー-ESBL 培地上で発育が認められた *E. coli* 及びその他の集落数に関する関連性。

42 検体で発育を認めた青色代表集落を菌種同定試験に供した結果、*Klebsiella pneumoniae* が 19 株と最も多く、*Serratia fonticola* が 10 株と続いていた (表 1)。

表 1. 鶏モモ肉検体をクロモアガー-ESBL 培地に塗抹・培養後に発育を認めた青色を呈する代表集落の菌属種同定結果。

菌属種	菌株数
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
<i>Serratia fonticola</i>	10
<i>Enterococcus faecium</i>	5
<i>Cedecea davisae</i>	2
<i>Acinetobacter spp.</i>	2
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1

<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1
<i>Serratia spp.</i>	1
計	42

*K. pneumoniae* や *C. davisae*, *B. agrestis* 等は腸内細菌科菌群に属する菌種であり、大腸菌との間での遺伝子水平伝播も相対的に生じ易い菌種と目される。引き続き、大腸菌と近縁の ESBL 産生菌の汚染動向に関する情報収集を行うことは、鶏肉食品における薬剤耐性菌の動向を俯瞰的に把握する上で有用な知見になるものと期待される。

### 3. ESBL 産生大腸菌株の薬剤耐性状況

定性試験を通じて鶏モモ肉検体より分離された ESBL 産生大腸菌 296 株を、 $\beta$ ラクタム系抗菌薬を除く計 9 剤 (SM, GM, KM, ST/TMP, CL, CP, TC, NA, CIP) を対象とした薬剤感受性試験に供したところ、13 株を除く計 283 株 (95.6%) が 1 剤以上に耐性を示し、うち 64 株は 5 剤以上に耐性を示した (表 2)。

表 2. ESBL 産生大腸菌株のうち、5 剤以上に耐性を示した分離株の薬剤耐性プロファイル。

耐性薬剤数	耐性プロファイル	菌株数
9	SM-GM-KM-ST/TMP-CL-CP-TC-NA-CIP	0
8	SM-GM-KM-ST/TMP-CP-TC-NA-CIP	2
7	SM-KM-ST/TMP-CP-TC-NA-CIP	3
	GM-KM-ST/TMP-CP-TC-NA-CIP	2
6	SM-KM-ST/TMP-TC-NA-CIP	17
	SM-KM-ST/TMP-CP-TC-NA	6
	SM-KM-ST/TMP-CP-NA-CIP	6
	SM-GM-ST/TMP-CP-TC-CIP	1
	SM-GM-KM-ST/TMP-CP-TC	1
	GM-KM-ST/TMP-CP-NA-CIP	1
5	GM-ST/TMP-CP-NA-CIP	10
	SM-GM-ST/TMP-CP-TC	6
	SM-KM-CL-TC-NA	3
	SM-KM-ST/TMP-CP-NA	2
	SM-KM-ST/TMP-TC-NA	2
	SM-KM-TC-NA-CIP	1

薬剤別の耐性率は、SM 耐性が 69.9% (207 株/296 株) と最も高く、次いで KM 耐性が 68.2% (202 株/296 株)、NA 耐性が 63.9% (189 株/296 株)、TC 耐性が 62.2% (184 株/296 株)、ST/TMP 耐性が 48.0% (142 株/296 株)、CP 耐性及び CIP 耐性はそれぞれ 16.9% (50 株/296 株) であった (図 4)。CL 耐性は 1 株のみ認められた (図 4)。

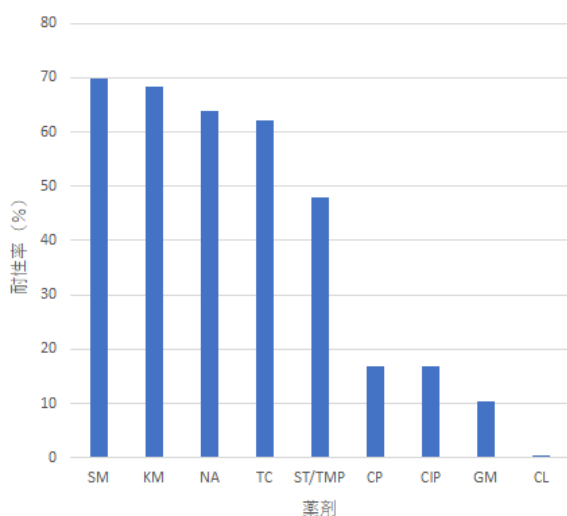


図 4. ESBL 産生大腸菌株の各種薬剤に対する耐性率

### 3. ESBL 産生大腸菌株における $\beta$ ラクタマーゼ 遺伝子型

上記の ESBL 産生大腸菌株について、3 種の代表的な  $\beta$  ラクタマーゼ 遺伝子型について型別試験を実施したところ、CTX-M-1 型が 107 株 (36.1%) と最も多く、次いで CTX-M-2 型が 86 株 (29.1%)、CTX-M-9 型が 85 株 (28.7%)、その他が 18 株 (6.1%) であった (表 3)。

表 3. 事業者 (A-G) 別の ESBL 遺伝子型別結果概要

事業者	菌株数	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-9	他
A	2	0	0	2	0
B	12	12	0	1*	0
C	49	34	11	3	1
D	72	15	40	14	3
E	71	12	5	51	3
F	52	12	24	14	2
G	38	22	6	1	9
計	296	107	86	85	18

\*CTX-M-1 及び CTX-M-9 共保有株

韓国の食鳥由来 ESBL 産生大腸菌 43 株の遺伝子型については、CTX-M-1 のほか、CTX-M-14 や CTX-M-55 が高い割合を占めたとする報告もある (Kim *et al.*, 2021. *Antibiotics* 2021, 10, 1050.)。わが国で分離された ESBL 産生大腸菌株における  $\beta$  ラクタマーゼ 遺伝子型の構成については昨年度と比較しても著変は認められなかったことから考えると、近隣国間で食鳥肉における薬剤耐性遺伝子の伝播が生じているとは考え難いと思われる。更に、事業者別で同遺伝子型の分布割合が大きく異なる場合も見られたことから、各食品関連施設環境、或いはその上流にあたる農場で特定の遺伝子を有する大腸菌が常在化している可能性も示唆される。

### 4. サルモネラ属菌の検出状況と分離株の血清型及び薬剤耐性状況

サルモネラ属菌は、鶏モモ肉 212 検体中 94 検体 (44.3%) から 100 株が分離された。分離菌株の血清型としては、Schwarzengrund が 96 株 (96.0%) と最も多く、Infantis が 4 株 (4.0%) であった。

サルモネラ属菌 100 株の薬剤感受性試験の結果

果、すべての菌株が単剤以上に耐性を示し、うち14株(14.9%)は5剤以上の多剤耐性を示した。また、Infantis株はいずれもTC、KM、ST/TMPに耐性を示した。

薬剤別の耐性率は、TC耐性が92株(97.9%)と最も高く、次いでKM耐性が81株(86.2%)、ST/TMP耐性が47株(50.0%)、SM耐性が36株(38.3%)、NA耐性が35株(37.2%)等であった(図5)。

薬剤耐性率について月別比較を行ったところ、月毎の分離菌株数は異なるものの、4剤以上に耐性を示した菌株の割合は7月に一過性の上昇を認め、12月には減少傾向を呈したほか、5剤以上に耐性を示した菌株の割合は、7月及び9月に高い傾向を示した(図6)。

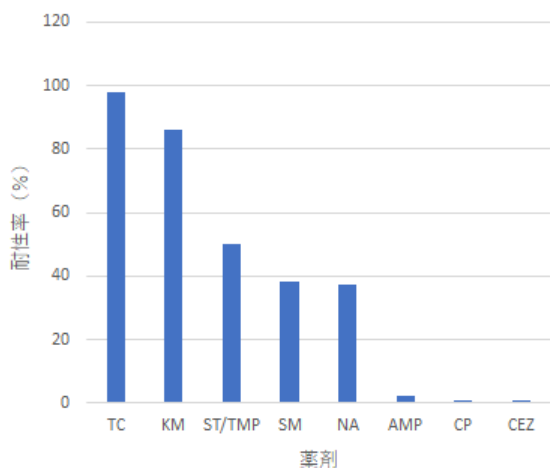


図5. サルモネラ分離株の各種薬剤に対する耐性率

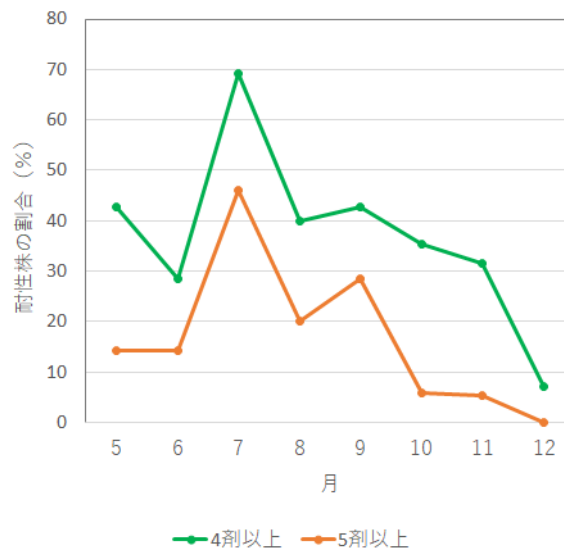


図6. サルモネラ分離株のうち、4剤以上又は5剤以上に耐性を示した菌株の月別割合。

耐性薬剤数については表4の通りとなった。

表4. サルモネラ属菌株のうち、3剤以上に耐性を示した分離株の薬剤耐性プロファイル。

耐性薬剤数	菌株数	耐性プロファイル	菌株数
6	2	AMP-SM-KM-ST/TMP-CP-TC	1
		CEZ-SM-KM-ST/TMP-TC-NA	1
5	12	SM-KM-ST/TMP-TC-NA	11
		SM-GM-KM-ST/TMP-TC	1
4	20	SM-KM-ST/TMP-TC	10
		KM-ST/TMP-TC-NA	6
		SM-KM-TC-NA	4
3	30	KM-ST/TMP-TC	16
		SM-KM-TC	7
		KM-TC-NA	4
		SM-KM-NA	1
		ST/TMP-TC-NA	1
		AMP-KM-TC	1

### 5. カンピロバクター属菌の検出状況及び分離菌株の薬剤耐性状況

カンピロバクター属菌は鶏モモ肉212検体より最終的に98株が分離された。分離菌株の内訳は、*C. jejuni*が74株、*C. coli*が24株であった。

分離菌株を薬剤感受性試験に供したところ、69株(70.4%)が単剤以上に耐性を示し、うち45株が*C. jejuni*、24株が*C. coli*であった(表

5)。

表 5. カンピロバクター・ジェジュニ/コリ分離株の薬剤耐性プロファイル。

菌種	耐性薬剤数	耐性パターン	菌株数
<i>C. jejuni</i>	3	AMP-TC-CPFX	4
	2	AMP-CPFX	13
		TC-CPFX	7
	1	CPFX	15
		AMP	4
		TC	2
	0	-	29
<i>C. coli</i>	4	AMP-EM-TC-CPFX	1
	3	EM-TC-CPFX	10
		AMP-TC-CPFX	2
		AMP-EM-CPFX	1
	2	TC-CPFX	2
		AMP-TC	1
	1	CPFX	6
		TC	1
0	-	0	

*C. jejuni/coli*をあわせた計 98 株全体での薬剤別の耐性株数及び耐性率は、CPFX が 61 株 (62.2%) と最も高く、次いで TC が 30 株 (30.6%)、AMP が 26 株 (26.5%)、EM が 12 株 (12.2%) であった (図 7)。

菌種別の薬剤耐性株数及び耐性率は、*C. jejuni*では CPFX 耐性株が 39 株 (52.7%) と最も多く、次いで AMP 耐性株が 21 株 (28.4%)、TC 耐性株が 13 株 (74%) であり、EM 耐性株は認められなかった (表 5)。

一方、*C. coli*では CPFX 耐性株が 22 株 (91.7%) と最も多く、次いで TC 耐性株が 17 株 (70.8%)、EM 耐性株が 12 株 (50.0%)、AMP 耐性株が 5 株 (20.8%) であった (図 7)。

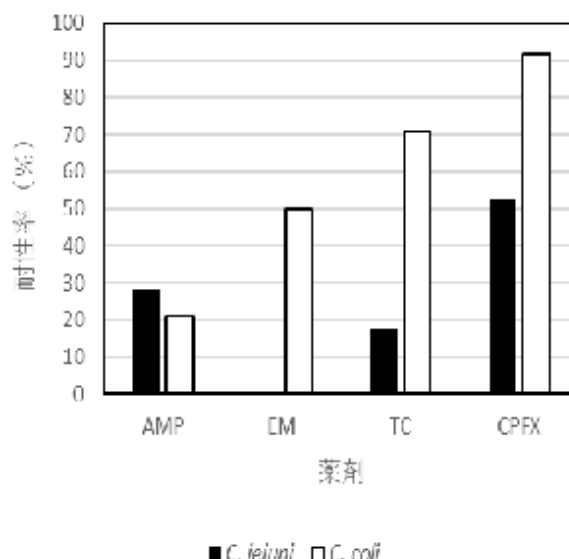


図 7. カンピロバクター分離株の各種薬剤に対する耐性率

上述の結果より、CPFX 耐性率については本年度も全体では 6 割を超えていたほか、*C. coli* 分離株については特に CPFX に加え、TC、EM に対する高い耐性率が認められた。CPFX 耐性獲得については、*gyrA/B* の一塩基置換により齎されることが既知であることから、長期的なモニタリングによりその動向を把握していく必要があると解される。また、*C. coli* 株の 50.0% (12 株/24 株) は特定事業者から出荷された鶏肉検体由来であり、うち 9 株は TC 耐性を示していたため、当該事業者が取り扱う鶏肉については、生産段階での飼養管理体制を含めた衛生管理状況を調査していく必要があると思料される。TC 耐性遺伝子は、主としてプラスミド性に伝達されることが知られていることから、今後、分離株に対するプラスミドシーケンスによる耐性遺伝子の保有状況調査は、迅速な当該薬剤耐性状況の把握に資するものと思われる。

## D. 結論

計7事業者由来の鶏モモ肉212検体を対象として、ESBL産生大腸菌の定性・定量試験、並びにサルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ分離株の薬剤感受性動向を調査した。ESBL産生大腸菌の定性検出率の高いものの、汚染菌数は総じて低く、また高い汚染菌数の検体の約半数は特定事業者由来であったことから、検討対象検体の事業者は幅広く選定すべきことがわが国における鶏肉等の食品における耐性菌サーベイランスを俯瞰的に進める上で重要と考えられた。また、サルモネラ、カンピロバクターについては前年度に比べて顕著な変動は認められなかったが、*C. coli*株で認められたTC/EM/CPFX耐性率の高さにも検体の由来となる事業者が影響している可能性が示唆された。

## E. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし