

令和3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
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	佐々木貴正	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	平井和也	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：国内で製造加工された鶏肉製品を対象として、ESBL 産生大腸菌・腸内細菌科菌群、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的性状解析を行った。計 134 検体の鶏もも肉及び鶏内臓肉を対象とした調査の結果、ESBL 産生大腸菌及び同腸内細菌科菌群は 49.3%または 100%の検出率を示したが、あわせて行った定量試験成績より、ESBL 産生大腸菌の汚染菌数は総じて低い状況にあることが確認された。同菌株の約 86%はβラクタム系以外の薬剤にも耐性を示し、5 株は 8 剤に耐性を示した。サルモネラ属菌は 73 検体（54.5%）より検出され、うち 52 株は SM・KM・TC に耐性を示す血清型 Schwarzengrund であった。カンピロバクターは 77 検体より検出され、うち 54 検体からは *C. jejuni*が、23 検体からは *C. coli*が分離された。AMP 耐性は *C. jejuni* 43 株、*C. coli* 18 株で認められたほか、*C. jejuni* 株の CPFX 及び TC に対する耐性率はそれぞれ 48.1%、31.5%であった。食肉加工 2 施設由来鶏肉検体におけるサルモネラ検出率を季節別に確認したところ、夏季に相対的な減少を認めたものの、総じて検出率は高く、その多くは血清型多剤耐性を示す Schwarzengrund であったことから、多剤耐性を示す同血清型株による鶏肉の広域性汚染実態が推察された。以上、本研究では鶏肉における複数の薬剤耐性菌の汚染実態を定性或いは定量的に求めた。引き続き、食品における関連データを集積することは、国内に侵淫する薬剤耐性菌の伝播経路として食品が介在する可能性とその大きさを評価する上で必要不可欠な課題と考えられる。

A. 研究目的

ESBL 産生大腸菌は鶏肉から高率に検出され、ヒト健康被害との関連性も推察されているが、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又は分離株の特性に留まっており、定量成績は乏しい。

また、鶏肉等の生物学的危害要因と認知される

カンピロバクター、サルモネラについても薬剤耐性の頻度をサーベイランスを通じて評価することが求められている。

以上の背景を踏まえ、本分担研究では、鶏肉及び鶏内臓肉を対象として、ESBL 産生大腸菌の定性・定量試験を行うと共に、サルモネラ

属菌及びカンピロバクター・ジェジュニ/コリ分離株の薬剤感受性を調査することを目的として検討を進めた。また、鶏肉由来サルモネラ属菌株については、薬剤耐性と種鶏場・孵化場における抗菌剤使用状況との関連性をあわせて調査したので報告する。

B. 研究方法

1. 食品検体

国内で製造加工され、冷蔵温度帯で流通する鶏もも肉及び鶏内臓肉計 134 検体を入手し、ESBL 産生大腸菌・腸内細菌科菌群の定量・定性検出試験、及びサルモネラ属菌とカンピロバクター・ジェジュニ/コリの定性検出試験に供した。また、2 施設で加工された鶏むね肉、及び流通鶏むね肉 234 検体を令和 3 年 4 月から 12 月にかけて入手し、サルモネラ属菌分離試験に供した。

2. 鶏もも肉及び鶏内臓肉検体からの各種薬剤耐性菌の検出試験

1) 検体の前処理

鶏もも肉及び鶏内臓肉検体各 25 g を、225 mL の緩衝ペプトン水(BPW)を加えたストマッカー袋に入れ、1 分間ストマッキング処理を行った。

2) ESBL 産生大腸菌/腸内細菌科菌群の定量/定性検出試験

上述の検体懸濁液 200 μ L をクロモアガー ESBL 培地に塗抹し、培養後に発育した定型集落を計数した（本検体における検出下限値は 50 CFU/g）。

また、定性試験については、検体懸濁液残液に対し、セフォタキシムを終濃度 1 μ g/uL となるよう添加した後、増菌培養を行い、同培養液をクロモアガーESBL 培地に塗抹・培養した。培養後は定型集落の発育の有無を確認した上で、1 検体につき 1~2 集落を釣菌し、薬剤

感受性試験及び CTX-M 型別試験に供した。

3) サルモネラ属菌検出試験

サルモネラ属菌の検出にあたっては上項 1) の手順で検体懸濁液を調整した後、BPW 中で増菌培養を行った上で、病原菌自動検出システム (MDS) を用いたスクリーニング試験を行った。スクリーニング試験陽性となった検体についてはその後、RV 培地で二次増菌培養を行い、クロモアガーサルモネラ培地に画線塗抹し、提携集落を分離した。得られた分離株については、血清型別試験及び薬剤感受性試験に供した。

4) カンピロバクター検出試験

検体 25 g を 225mL の Preston 培地を用いて検体懸濁液を調整し、42°C で 24 時間微好気環境下で増菌培養を行った。同培養液を病原菌自動検出システム (MDS) を用いたスクリーニング試験に供し、陽性となった検体由来培養液については、その後、クロモアガーカンピロバクター培地に画線塗抹し、定型集落を分離した。得られた分離株については、薬剤感受性試験に供した。

3. 鶏むね肉検体のサルモネラ属菌検出試験

2 加工施設由来の鶏むね肉検体について、令和 3 年 4 月から 12 月にかけて、月単位で入手し、1 検体につき 25 g を NIHSJ-01 法に準じた定性検出試験に供した。分離株の確保にあたっては、1 検体につき最大 2 集落を対象とした。最終的に得られた分離株は、血清型別試験及び薬剤感受性試験に供した。

4. 各種型別試験

1) 薬剤感受性試験

鶏もも肉及び鶏内臓肉由来の ESBL 産生大腸菌株については、計 8 剤 (SM, GM, ,KM, ST/TMP, CL, CP, TC, NA, CIP)、サルモネラ属菌株については、計 9 剤 (AMP, CEZ, CTX, SM, GM, KM, TC, NA, CIP)、カンピロバクタ

一属菌株については計 4 剤 (AMP, EM, TC, CPM) を対象としたディスク法による薬剤感受性試験に供した。

鶏もも肉由来のサルモネラ属菌株については、計 12 剤 (AMP, CEZ, CTX, SM, GM, KM, TC, CP, CL, TMP, NA, CPM) を対象とした薬剤感受性試験に供した。

2) CTX-M 型別試験

ESBL 産生大腸菌株については、常法に基づく、PCR を用いた CTX-M 型別試験に供した。

C. 結果

1. 鶏もも肉及び鶏内臓肉検体からの ESBL 産生大腸菌・腸内細菌科菌群の検出状況及び分離株の薬剤感受性並びに遺伝特性

令和 3 年度に入手した計 134 検体における ESBL 産生大腸菌の陽性率は 49.3% (66 検体/134 検体) であったほか、ESBL 産生腸内細菌科菌群は全ての検体で陽性を示した。定量検出試験を通じ、当該検体における ESBL 産生大腸菌及び腸内細菌科菌群それぞれの菌数分布を求めたところ、ESBL 産生大腸菌は 69 検体、ESBL 産生腸内細菌科菌群は全検体より検出され、それぞれの平均±SD 値は、 $1.1 \pm 0.8 \log \text{CFU/g}$ 、 $3.5 \pm 1.0 \log \text{CFU/g}$ であった。ESBL 産生腸内細菌科菌群の約 52.2% は $3.0 \log \text{CFU/g}$ 以上の菌数分布を認めたほか、15 検体では $2.0 \log \text{CFU/g}$ 以上の ESBL 産生大腸菌が検出され、それらの多くは鶏内臓肉検体であった (図 1、表 1)。

ESBL 産生大腸菌分離株計 130 株を薬剤感受性試験に供した結果、112 株 (86.2%) が β ラクタム系以外の薬剤にも耐性を示したほか、5 株は計 8 剤に耐性を示した (図 2、表 2)。また、これらの 5 株はメロペネムにも耐性を示した (データ未載)。薬剤の別では TC 耐性が全

体の 64.6% と最も高く、次いで SM 耐性率が 53.1%、NA 耐性率が 52.3% であった (図 2)。

CTX-M 遺伝子型別試験を通じ、当該遺伝子は全体の 60% より検出され、CTX-M-1 は 41 株 (31.5%)、CTX-M-9 は 20 株 (15.4%) より検出された (図 3)。鶏もも肉と鶏内臓肉の別では、鶏もも肉由来株が CTX-M-1 及び CTX-M-2 陽性である割合が高く、鶏内臓肉由来株では CTX-M-1、CTX-M-8、CTX-M-9 陽性率が高い傾向を認めた (図 3)。

2. 鶏もも肉及び鶏内臓肉検体におけるサルモネラ属菌の定性検出状況、及び分離株の血清型別並びに薬剤感受性

上述の検体についてサルモネラ属菌の定性検出試験を実施したところ、73 検体 (54.5%) より本菌が検出された。検体別の陽性検体数は鶏肉が 28 検体 (陽性率 51.9%)、鶏内臓肉 (肝臓) が 45 検体 (56.3%) であった。

計 73 株の血清型別を調査したところ、全体の 71.2% (鶏肉由来 14 株及び鶏内臓肉由来 38 株の計 52 株) が血清型 Schwarzengrund であり、その他としては血清型 Manhattan が 9 株、Infantis が 1 株、型別不能が 11 株であった (表 2)。

これらの分離株を薬剤感受性試験に供した結果、59 株 (80.8%) は 1 剤以上に耐性を示し、うち 43 株 (58.9%) は 3 剤以上に耐性を示した (図 4)。血清型 Schwarzengrund の全 52 株は SM, KM, TC に耐性を示した (図 4)。

3. 鶏もも肉及び鶏内臓肉検体におけるカンピロバクターの定性検出状況、及び分離株の薬剤感受性

上述の検体についてカンピロバクターの定性検出試験を実施したところ、77 検体 (57.5%) より本菌が検出され、うち 54 検体からは *C. jejuni* が、23 検体からは *C. coli* が

分離された。

分離株を薬剤感受性試験に供したところ、*C. jejuni*は*C. coli*に比べて多剤耐性率が高い傾向がみられ、3剤に耐性を示す株は*C. jejuni*が9株、*C. coli*が5株であった(表3)。薬剤の別では、EM耐性株が認められなかった一方、AMP耐性は*C. jejuni*43株(79.6%)、*C. coli*18株(78.3%)で認められた(図5)。また、*C. jejuni*株のCPFX及びTCに対する耐性率はそれぞれ48.1%、31.5%であった(図5)。

4.2 施設(食肉加工施設)由来鶏むね肉検体におけるサルモネラ属菌の季節別検出率の動向と分離株の血清型別並びに薬剤耐性状況

食肉加工施設 2 施設の協力を得て、令和3年4月から12月にかけて、鶏むね肉計234検体を対象としたサルモネラ属菌定性検出試験を行ったところ、両施設由来検体からのサルモネラ属菌検出率は夏季に低下傾向を示した(図6)。

分離株を血清型別試験に供したところ、計393株のうち、306株(77.9%)は血清型Schwarzengrundであり、70株(17.8%)は血清型Infantis、12株(3.1%)は血清型Manhattan等であった(表4)。これらの薬剤耐性状況を確認したところ、血清型Schwarzengrund株の44.4%(136/306株)はSM, KM, TCの3剤に耐性を示した一方、血清型Infantis株における同3剤耐性率は15.7%(11/70株)であった(表5)。

D. 考察

本分担研究では、市場流通する鶏モモ肉・鶏内臓肉検体を対象として、ESBL産生大腸菌・腸内細菌科菌群の汚染分布を定性・定量の両面から検討すると共に、同一検体からのサルモネラ属菌及びカンピロバクターの定性検出状況を調査した。

調査結果から、対象検体におけるESBL産生大腸菌の汚染率は高かったものの、その汚染菌数は総じて低い状況にあることが確認された。また、分離株のCTX-M遺伝子型としてはCTX-M-1が高い割合にある状況、並びに多くの菌株はβラクタム系以外の薬剤に対しても耐性を示すことが確認された。先行研究でのサーベイランスでは、ほぼ同等の耐性率が確認されているおり、令和3年度の状況に大きな変動はないものと考えられるが、今後の動向についても引き続き注視する必要があると思われる。

また、サルモネラ属菌については近年鶏肉に関連する血清型としてSchwarzengrundが高い占有率を示す状況が継続していることが確認された。同血清型株は他の血清型株に比べて、高い薬剤耐性率を示していたことは、ヒト臨床分離株の血清型や薬剤耐性状況と紐付けた形でサーベイランス体制を維持・強化していくことが、ワンヘルスに基づく食品由来薬剤耐性菌の動向を把握し、食品の安全確保の観点からのリスク管理策を講じていく上で極めて重要な課題と言える。

本年度に鶏肉検体より分離されたカンピロバクター株については、高いAMP耐性率を示した一方、EM耐性は確認されなかった。後者は主として*C. coli*で認められることが多いことから、本年度分離された菌株に占める*C. coli*の占有率の低さが上述の結果に反映された可能性も考えられる。また、TC耐性は主にプラスミド性に水平伝播を呈することが知られており、同剤の耐性率はCPFXとあわせて持続的なモニタリングが求められる対象となるであろう。

食肉加工 2 施設由来の鶏肉検体におけるサルモネラ検出率が夏季に減少傾向を示した理由は現時点では明らかではないが、施設の別によらず、そうした傾向が認められたは、国内の鶏肉全般で同様の季節変動を示す可能性が示

唆される。但し、夏季にあっても 60%以上の検体より当該菌が検出されたこと、そして多剤耐性の割合が高い血清型 Schwarzengrund が多くを占めた結果は、鶏肉等における本菌のサーベイランスの意義を改めて示す結果とも解釈される。

E. 結論

国内で製造加工される鶏肉及び鶏内臓肉では ESBL 産生大腸菌の汚染率は高いが、汚染菌数は総じて低い状況にあることが確認された。また、当該食品では、サルモネラ属菌による高い汚染率が継続している状況が確認された。当該菌の多くは血清型 Schwarzengrund であり、高頻度に多剤耐性を示したことから、その動向を引き続き注視する必要性が提起された。カンピロバクターについては、AMP 耐性率が高い状況が確認されると共に、TC や CPFY 耐性率は大きな変動が生じていないものと推察される知見をえた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki Y, Kakizawa H, Baba Y, Ito T, Haremaki Y, Yonemichi M, Ikeda T, Kuroda M, Ohya K, Hara-Kudo Y, Asai T, Asakura H. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from food workers and chicken products in Japan. *Antibiotics* (Basel). 2021. 10(12):1541.

2. 学会発表

- 1) 山本詩織、石井良和、朝倉宏. 国内流通鶏肉における ESBL 産生大腸菌並びにサルモネラ属菌の検出状況と分離菌株の遺伝的性状解析. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会.
- 2) 百瀬愛佳、佐々木貴正、米満研三、朝倉宏. 国産鶏肉における第三世代セファロスポ

リン耐性サルモネラ汚染の低下と血清型 Schwarzengrund の占有率増加. 日本食品衛生学会第 117 回学術講演会.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 鶏もも肉・内臓肉検体における ESBL 産生大腸菌・腸内細菌科菌群の菌数分布

菌数 (log CFU/g)	ND	<2.0	2.0-3.0	3.0-4.0	>4.0	平均±SD
大腸菌	65	29	10	4	1	1.1±0.8
腸内細菌科菌群	0	4	35	38	32	3.5±1.0

表 2. 鶏もも肉・鶏内臓肉（肝臓）検体由来サルモネラ属菌株の血清型別分布.

血清型	全体		鶏肉由来		鶏肝臓由来	
	株数	(%)	株数	(%)	株数	(%)
Schwarzengrund	52	(71.2)	14	(50.0)	38	(84.4)
Manhattan	9	(12.3)	4	(14.3)	5	(11.1)
Infantis	1	(1.4)	1	(3.6)	0	(0.0)
UT	11	(15.1)	9	(32.1)	2	(4.4)
計	73		28		45	

表 3. 鶏もも肉・鶏内臓肉（肝臓）検体由来カンピロバクター株の薬剤耐性状況.

耐性 薬剤数	菌株数 (%)	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
3	14 (18.2)	9 (16.7)	5 (21.7)
2	22 (28.6)	20 (37.0)	2 (8.7)
1	31 (40.3)	19 (35.2)	12 (52.2)
0	10 (13.0)	6 (11.1)	4 (17.4)

単位：菌株数 (%)

表 4. 鶏むね肉検体由来サルモネラ属菌株の血清型別内訳.

血清型別	菌株数 (%)
Schwarzengrund	306 (77.9%)
Infantis	70 (17.8%)
Manhattan	12 (3.1%)
Enteritidis	2 (0.5%)
Untypeable	3 (0.8%)

表 5. 食肉加工 2 施設の鶏むね肉検体由来サルモネラ属菌株の血清型別及び薬剤耐性状況.

血清型	薬剤耐性パターン	A	B	計	血清型	薬剤耐性パターン	A	B	計
Schwarzengrund		177	129	306	Infantis		70	0	70
	SM+KM+TC+NA+TMP	2	20	22		SM+KM+TC+NA	1	0	1
	SM+KM+TC+TMP	22	43	65		SM+KM+TC+TMP	6	0	6
	SM+KM+TC+NA	2	6	8		SM+KM+TC	4	0	4
	SM+KM+NA+TMP	0	1	1		SM+TC+NA	2	0	2
	SM+TC+NA+TMP	1	2	3		SM+TC+TMP	18	0	18
	SM+TC+NA	2	3	5		KM+NA+TMP	1	0	1
	SM+KM+TC	6	35	41		SM+TC	20	0	20
	SM+TC+TMP	8	2	10		KM+TMP	2	0	2
	KM+TC+TMP	0	2	2		SM	3	0	3
	KM+NA+TMP	0	6	6		KM	1	0	1
	SM+KM	2	0	2		TC	6	0	6
	SM+TC	13	8	21		TMP	3	0	3
	KM+TC	1	1	2		感受性	3	0	3
	KM+TMP	2	0	2	Manhattan		10	2	12
	KM+CP	1	0	1		SM+TC	9	2	11
	SM	7	0	7		感受性	1	0	1
	KM	36	0	36	Enteritidis		2		2
	TMP	1	0	1		感受性	2		2
	感受性	71	0	71	UT		2		3
						SM+KM+TC+TMP	1		1
						SM+KM+TC	1		1
						感受性	0		1

SM: streptomycin, TC: tetracycline, KM: kanamycin, NA: nalidixic acid, TMP: trimethoprim.

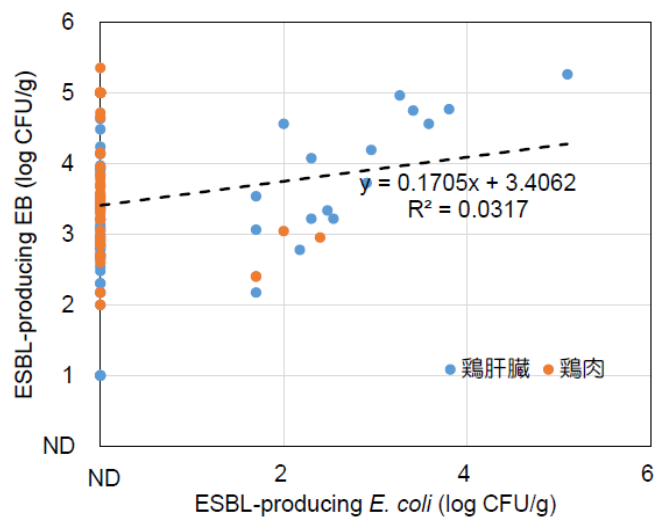


図 1. 鶏肉・鶏内臓肉（肝臓）検体での ESBL 産生大腸菌・腸内細菌科菌群の菌数分布相関図.

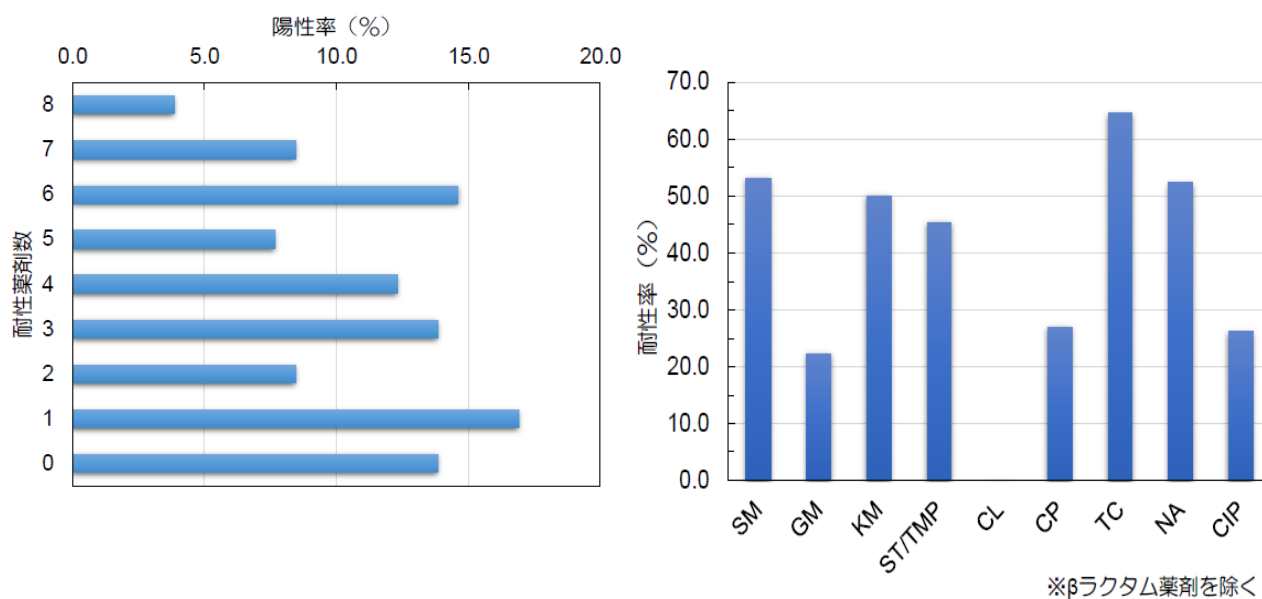


図 2. 鶏肉・鶏内臓肉（肝臓）検体由来 ESBL 産生大腸菌株の薬剤耐性状況.

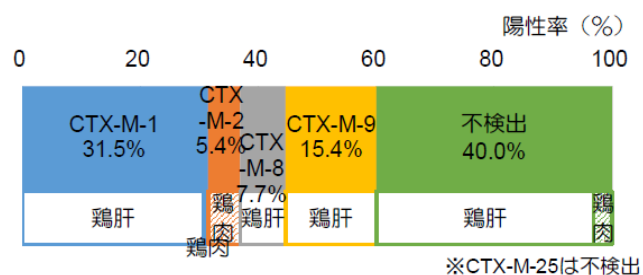


図 3. 鶏肉・鶏内臓肉（肝臓）検体由来 ESBL 産生大腸菌株の CTX-M 型別成績.

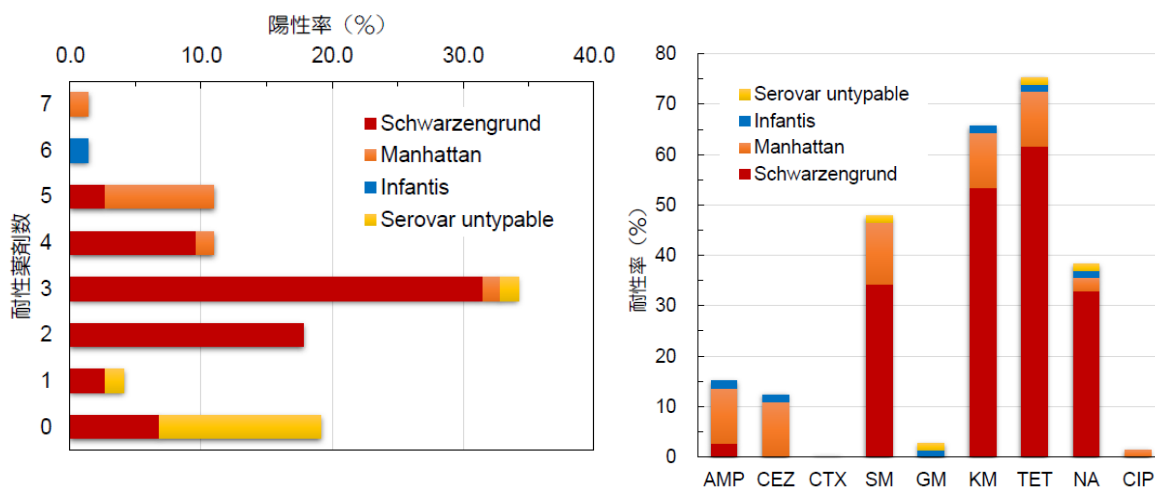


図 4. 鶏肉・鶏内臓肉（肝臓）検体由来サルモネラ属菌株の薬剤耐性状況.

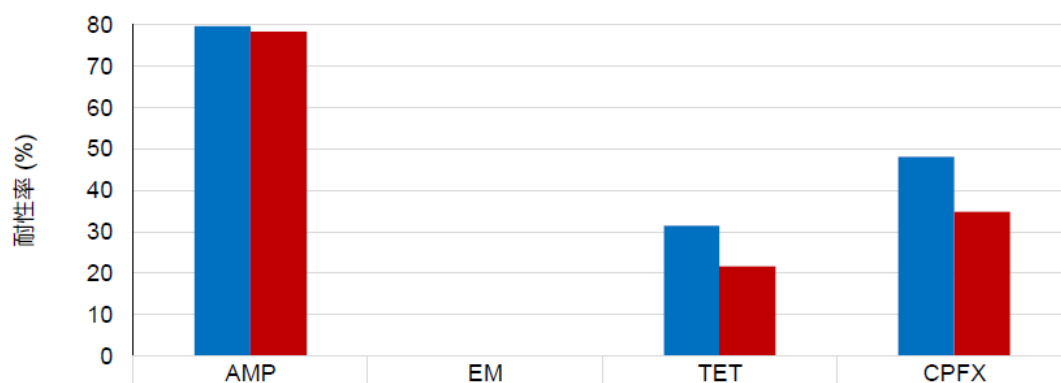


図 5. 鶏肉・鶏内臓肉（肝臓）検体由来カンピロバクター株の薬剤耐性状況.

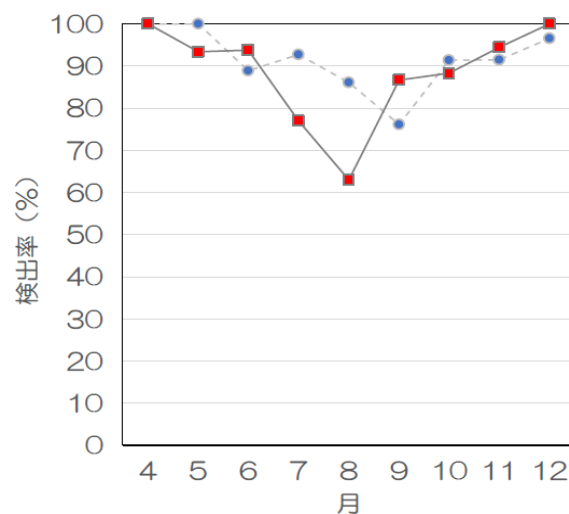


図 6. 食肉加工 2 施設由来鶏むね肉検体における季節別サルモネラ属菌検出状況.