

食品に由来する腸内細菌科細菌の薬剤耐性化に関する研究

Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae isolated from Foods distributed in Miyagi

佐藤 千鶴子 神尾 彩楓 小林 妙子 渡邊 節 山谷 聡子 畠山 敬
Chizuko SATO, Sayaka KAMIO, Taeko KOBAYASHI, Setsu WATANABE,
Satoko YAMAYA, Takashi HATAKEYAMA

宮城県内に流通する食品 2,293 件を対象として検査を行い、319 株の腸内細菌科細菌を分離した。食品全体の汚染率は 13.0% で、食品分類別では Ready to Eat 食品であるカットサラダが 68.8%、おむすびが 50.0% と高く、生肉からも 63.3% と高率に検出された。分離した腸内細菌科細菌について、薬剤感受性スクリーニング試験及び PCR による遺伝子型別を行った結果、鶏肉由来の *Escherichia coli* 1 株 及び加熱そうざい由来の *Enterobacter cloacae* 1 株からそれぞれ AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子を検出した。また、鶏肉由来の *Escherichia coli* 8 株から、育雛で汎用されるテトラサイクリンの耐性遺伝子である *tet* が検出されており、流通食品の薬剤耐性菌汚染が明らかとなった。

キーワード：（腸内細菌科細菌；食品；ディスク拡散法；AmpC β -ラクタマーゼ；*tet*）

Key words：（*Enterobacteriaceae*；Food；Disk diffusion method；AmpC β -lactamase；*tet*）

1 はじめに

薬剤耐性菌の世界的な拡大が危惧される中、2015 年世界保健機関（WHO）総会でグローバルアクションプランが採択され、それに基づき我が国においても、2016 年にワンヘルスアプローチ（ヒト、動物、食品および環境等の垣根をこえた取組）という視点に立った薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン¹⁾を策定し推進している。

当センターでは、山口らによる「市中における薬剤耐性腸内細菌科細菌の保菌状況調査」²⁾において、セファロスポリン系薬剤に耐性を示す腸内細菌科細菌が、県内在住のヒト糞便より 13.6% の確率で検出されたことを報告している。また、本県の食品衛生監視指導の一環である食品収去検査においても、指標菌である大腸菌群等を度々検出しており、薬剤耐性菌に汚染された食品による食中毒等の増加や汚染菌のヒト腸内の定着も懸念される。

これらのことから、食品に由来する腸内細菌科細菌の検出状況と当該菌の薬剤耐性化に関する調査を行ったので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

2017 年度、2018 年度の食品収去検体 2,178 件及び県内流通食品 115 件、計 2,293 件を検査対象とした。県内流通品は、収去検体の検出傾向を基に 2018 年度と 2019 年度に調理済み（Ready to Eat：以下 RTE）食品と加熱不足による食中毒の原因食材として注意される生肉（豚肉、鶏肉）を買上げた。

2.2 方法

2.2.1 分離培養

分離対象は、行政検査において指標菌となる大腸菌群の中から選別した。すなわち、10 倍希釈した検体をダーラム管入り 2 倍濃度 BGLB 培地 10mL に等量接種して 35.0 \pm 1.0 $^{\circ}$ C で 48 \pm 3 時間培養し、ガス産生が認められた場合にその 1 白金耳を EMB 平板培地に画線塗抹した。35.0 \pm 1.0 $^{\circ}$ C、24 \pm 2 時間培養後に、培地に発育した定型または非定型集落を 1 \sim 2 個釣菌し LB 培地に移植した。さらに、35.0 \pm 1.0 $^{\circ}$ C で 48 \pm 3 時間培養後、培地が黄変しガス発生を認めたグラム陰性無芽胞桿菌を保存した。市販の同定キットおよび生化学性状により保存株の属及び菌名を決定し、腸内細菌科細菌（旧分類を含む）に属する菌株を検査に供した。

2.2.2 薬剤感受性スクリーニング試験

属及び菌名が確定した 319 株について、平成 30 年度厚生労働科学研究「食品由来薬剤耐性菌のサーベランスのための研究」のプロトコルに従い、薬剤感受性スクリーニング試験を行った。試験には、アンピシリン（ABPC）、セフォキシチン（CFX）、セフォタキシム（CTX）、セフトジジム（CAZ）、イミペネム（IPM）、メロペネム（MEPM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、アミカシン（AMK）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、クロラムフェニコール（CP）、ST 合剤（ST）、ホスホマイシン（FOM）の 17 種類の感受性ディスク（市販）を使用し、培養後の発育阻止円直径を計測するディスク拡散法により感受性の有無を確認した。

また、第 3 世代セファロスポリン系である CTX、CAZ および、カルバペネム系である IPM、MEPM に耐性を示

した菌株については、国立感染症研究所が公開している病原体検出マニュアル「CRE 検査法」に準じて、各阻害剤（メルカプト酢酸ナトリウム、ボロン酸、クロキサシリン、クラブラン酸）を用いたスクリーニング検査を実施した。

2.2.3 耐性遺伝子の検出

薬剤感受性スクリーニング試験において、β-ラクタム系薬剤に耐性を示した菌株については、カルバペネマーゼ遺伝子（IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、VIM 型、GES 型）、基質特異性β-ラクタマーゼ（ESBL）遺伝子（CTX-M-1group、CTX-M-2group、CTX-M-9group）及びAmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子（MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型、FOX 型）についてのPCRを実施し、薬剤耐性遺伝子の関与を調べた。

また、動物用として最も多く使用されている抗菌剤であるTCの耐性菌に対して、耐性遺伝子であるtetの検出³⁾を試みた。

3 結果

3.1 腸内細菌科細菌の検出状況

収去検体2,178件及び県内流通品（以下買上検体）115件を対象に菌の分離を行なったところ、それぞれ260件、39件から腸内細菌科細菌を分離した。検出率は、収去検体で11.9%、買上検体が33.9%で全体の検出率は13.0%であった。買上検体には生肉等を含むため、検出率が上がったものと考えられた。菌株数は重複分離を含め収去検体276株、買上検体43株で合計319株であった（表1）。

表1 腸内細菌科細菌の検出結果

	収去検体	買上検体	合計
検査件数	2,178	115	2,293
検出検体数	260	39	299
検出株数	276	43	319
検出率(%)	11.9	33.9	13.0

食品分類別で高い検出率を示したのは、収去検体では漬物40.4%（36件/89件）、生食用鮮魚介類33.6%（51件/152件）、未加熱弁当・そうざい30.2%（19件/63件）、ゆでだこ・ゆでがに23.1%（3件/13件）、生食用かき17.6%（36件/204件）で、買上検体では、カットサラダ68.8%（11件/16件）、おむすび50.0%（3件/6件）、お寿司41.7%（5件/12件）、芽もの野菜33.3%（2件/6件）、カットフルーツ20.0%（3件/15件）であった。これらの食品は、購入した後加熱などの工程を経ずに食されるRTE食品に類するものである。また、生肉については、収去検体で54.5%（6件/11件）、買上検体で68.4%（13件/19件）と高い検出率を示した。

検出菌319株の内訳と検出数は、Klebsiella属116株（36.4%）、Enterobacter属88株（27.6%）の2菌種のみで全体の60%を超えており、食品から優位に分離されるという田中らの報告⁴⁾と同様の傾向を示した。また、これら2菌種に加え、Citobacter属44株（13.8%）、Escherichia coli（以下、E.coli）29株（9.1%）の4種で分離菌の86.8%を占めた（表2）。

表2 検出菌の内訳と検出率

検出菌	検出数	検出率(%)
E.coli	29	9.1
Klebsiella属	116	36.4
Enterobacter属	88	27.6
Citrobacter属	44	13.8
Escherichia属	4	1.3
Kluyvera属	12	3.8
Leclercia属	12	3.8
Serratia属	5	1.6
Pantoea属	3	0.9
Rahnella属	3	0.9
Hafnia属	3	0.9
合計	319	-

表3 感受性ディスク法での17薬剤※に対する耐性菌数と耐性率

検出菌種(属)	菌数	ABPC	CFX	CTX	CAZ	IPM	NA	NFLX	CPFX	GM	KM	SM	TC	CP	ST	FOM	1剤以上耐性菌数
E.coli	29	9	1	1	1		7	4	4	2	4	6	8	1	6		15
Klebsiella属	116	102	6	2			7		3	1		5	1		2	55	110
Enterobacter属	88	63	58			1	3		2		1	4	2	1	1	53	79
Citrobacter属	44	29	33				4		2		2	2	2		1	4	39
Escherichia属	4	2	1								1	1	1			1	4
Kluyvera属	12	7	1								1					8	12
Leclercia属	12		1													9	10
Serratia属	5	4	1													1	5
Pantoea属	3	2														3	3
Rahnella属	3	2														2	3
Hafnia属	3	3															3
合計	319	223	102	3	1	1	21	4	11	3	9	18	14	2	10	136	283
耐性率(%)		69.9	32.0	0.9	0.3	0.3	6.6	1.3	3.4	0.9	2.8	5.6	4.4	0.6	3.1	42.6	88.7

※MEPM及びAMK耐性菌は検出されないため表示せず。

3.2 薬剤感受性スクリーニング試験

感受性試験の結果を表3に示した。1剤以上に耐性を示した菌株は、319株中283株で耐性率は88.7%であり、薬剤別で高い耐性率を示したのは、ABPC 69.9%、CFX 32.0%、FOM 42.6%であった（表3）。

3.3 薬剤耐性菌の遺伝子型

鶏生肉由来の *E.coli* 1株、漬物由来の *Klebsiella pneumoniae*（以下、*K.pneumoniae*）1株及び調理パン由来の *K.pneumoniae* 1株が第3世代セファロスポリン系のCTXまたはCAZに耐性を示し、加熱そうざい由来の *Enterobacter cloacae*（以下 *E.cloacae*）1株がカルバペネム系であるIPMに耐性を示したため、PCRによりβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出と分類を行った。

K.pneumoniae 2株から遺伝子は確認できなかったが、*E.coli* と *E.cloacae* からAmpC β-ラクタマーゼ産生遺伝子が検出され、それぞれの遺伝子型はCIT型とはEBC型であった（表4）。

表4 β-ラクタマーゼ産生株の種類及び遺伝子型

対象株	由来食品	産生性	遺伝子型
<i>E.coli</i>	鶏生肉	AmpC	CIT
<i>E.cloacae</i>	加熱そうざい	AmpC	EBC

3.4 TC耐性 *E.coli* の保有遺伝子型

食品から検出した *E.coli* 29株の由来は、15株が鶏生肉由来で生食用かき由来が7株、その他7株は豆腐や生めん等収去等食品からの検出であり、1剤以上の薬剤に耐性を示す株は15株であった。中でも、TCに耐性を示した株は8株とABPCに次いで多く、全て鶏生肉由来であった。TCは雛鳥の発育促進に使用されていることから、耐性遺伝子である *tet* をPCRで確認³⁾したところ、5株が *tet(A)*、3株が *tet(B/D)* であり全株が遺伝子を保有していた（表5）。

表5 各食品由来 *E.coli* の保有するTC耐性遺伝子

食品分類	検出数	1剤以上耐性	TC耐性	耐性遺伝子型及び株数
鶏生肉	15	12	8	<i>tet(A)</i> : 5株 <i>tet(B/D)</i> : 3株
生食用かき	7	1	0	-
収去等食品	7	2	0	-
合計	29	15	8	8

4 考察

本研究から、県内流通食品（規格基準等がないものも含む）の13.0%（299/2,293食品）が腸内細菌科細菌に汚染されていることが明らかになった。分離した菌の中には多様な薬剤に対する耐性菌が存在しており、スクリーニング法で1薬剤以上の耐性を示したものは88.7%であった。中でもABPC耐性菌が69.9%と高率であった

が、その理由としては *Klebsiella* 属や *Enterobacter* 属など腸内細菌科細菌の一部が、既にペニシリン系薬剤に対する自然耐性能を持っているためと考えられた⁵⁾。ペニシリン系やセファロスポリン系のようなβ-ラクタム環を構造に持つ薬剤に限れば、ヒト由来耐性菌の多くはゲノムやプラスミド上の各種β-ラクタマーゼ産生遺伝子等が関与し、広域かつ高度な薬剤耐性化が進んでいる。一方、食品由来菌では、第3世代セファロスポリン系及びカルバペネム系抗生剤にまで耐性を示した菌は僅か3菌種4株のみであった。しかし、これらのうち2株はAmpC β-ラクタマーゼ遺伝子を保有しており、臨床上問題視されるこれらの薬剤耐性菌に汚染された食品の流通実態が明らかとなった。特に、AmpC β-ラクタマーゼが検出された *E.cloacae* は加熱後のそうざい由来のものであり、一般県民の13.6%がβ-ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌を保有するとの過去の研究結果²⁾と併せると、当該菌は人為的汚染の可能性が高いと推察された。また、鶏生肉由来の *E.coli* 15株からは、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子保有菌1株の他にも、*tet* を保有するTC耐性菌が8株分離された。一方で、生食用かき及びその他の収去等食品由来の *E.coli* 計14株からはTC耐性菌及び耐性遺伝子は検出されず、由来による偏りが明らかであった。育雛等でTC等抗生剤を使用する鶏の環境中では、薬剤耐性遺伝子保有株が優位に保たれるという事実を実証したものであると考えられた。

本研究によって、県内流通食品における薬剤耐性菌の実態が明らかとなり、食を介した当該菌蔓延の可能性が示された。一方で、食の取扱いに関しては既に食中毒予防の三原則（汚染防止、温度管理、適切な調理）が一般に周知されており、鶏肉など汚染可能性の高い食品に対しては、本原則の確実な履行が薬剤耐性菌の拡散防止に有効であると思われた。また、加熱後食品等の取扱いに関しても、食品衛生法改正に伴い各業種の「HACCPに沿った衛生管理」が強化されたことで総合的な改善が見込まれている。これらの施策が、食による直接的な被害ばかりでなく、薬剤耐性菌による間接的被害の防止にも同様に役立つことを期待する。

参考文献

- 1) 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020 : 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議 (2016)
- 2) 山口友美, 木村葉子, 渡邊節, 有田富和, 後藤郁男, 畠山敬: 宮城県保健環境センター年報, 37, 38-42 (2019)
- 3) Furushita M, Shiba T, Maeda T, Yahata M, Kaneoka A, Takahashi Y, Torii K, Hasegawa T, Ohta M : Applied Environ Microbiol.69, 5336-5342 (2003)
- 4) 田中初芽, 小林妙子, 渡邊節, 山谷聡子, 佐藤千鶴子, 畠山敬: 宮城県保健環境センター年報, 37, 43-46 (2019)
- 5) 臨床微生物検査ハンドブック第5版 262-265 (2018)

