

内閣府食品安全委員会
平成27年度食品安全確保総合調査

畜水産食品における薬剤耐性菌の
出現実態調査報告書

平成28年3月

一般財団法人 東京顕微鏡院

目次

I. 調査の概要	1
II. 調査背景および目的	2
III. サルモネラ属菌、大腸菌および腸球菌の検出試験と成績	2
1. 試料のサンプリング	2
1) 施設の要件	2
2) 対象食品の種類	2
3) 試料のサンプリング、輸送および保管方法	2
4) 試料数	3
2. 試料からのサルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌の分離および同定の概略	6
1) 対象菌	6
2) 分離および同定	6
3. 試験方法	6
1) 試料液の調製	6
① サルモネラ属菌	6
② 大腸菌および腸球菌	6
2) 検出方法および同定方法	6
① サルモネラ属菌	6
② 大腸菌	7
③ 腸球菌	8
3) 試験に使用した培地・試薬	9
4. 結果	13
1) 対象菌の検出成績	13
① 市販鶏肉からの検出状況	13
② 食鳥処理場鶏肉からの検出状況	16
IV. 分離菌株の薬剤感受性試験(MICの測定)	18
1. 分離菌株の選定	18
1) 市販鶏肉からの分離株	18
① サルモネラ属菌	18
② 大腸菌	18
③ 腸球菌	18
2) 食鳥処理場鶏肉からの分離株	18
① サルモネラ属菌	18
② 大腸菌	18
③ 腸球菌	18

2.測定方法	19
1)対象薬剤	19
2)MIC 測定試験方法	20
①接種用菌液の調製	20
②菌液の接種および培養	20
③判定方法とブレイクポイント	21
④精度管理	23
3)試験に使用した機器・培地	24
3.結果	24
1)市販鶏肉由来株の MIC と耐性出現頻度	24
①サルモネラ属菌	24
②大腸菌	28
③腸球菌	30
2)食鳥処理場鶏肉由来株の MIC と耐性出現頻度	36
①サルモネラ属菌	36
②大腸菌	39
③腸球菌	41
3)ヒト由来株の MIC と耐性出現頻度	45
①サルモネラ属菌	45
4)平成 26 年度調査事業由来株との比較	46
V. 薬剤耐性菌の性状解析	47
1.対象菌株の選定	47
2.試験方法	47
1)ESBL の確認	47
2)ESBL の遺伝子型別	47
3)PFGE 解析	47
4)試験に使用した機器・培地	47
3.結果および考察	49
1)ESBL 産生大腸菌の検出状況	49
2)ESBL 遺伝子型別	49
3)PFGE 解析	50
4.分離菌株の保存	54

I. 調査の概要

本調査では家畜等への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するため、鶏肉における薬剤耐性菌の調査を実施した。

平成 27 年 6 月から平成 28 年 1 月にかけて、国内の代表的な都市において国内産の鶏肉 357 検体、国内 11 か所の食鳥処理場から出荷用にパック詰めされた鶏肉 155 検体入手し、サルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌(*Enterococcus faecalis*、*E. faecium*)を分離した。

市販鶏肉からの対象菌の分離状況は、サルモネラ属菌が 196 検体(陽性率 54.9%)、大腸菌が 315 検体(88.2%)、腸球菌が 327 検体(91.6%)で陽性であった。食鳥処理場鶏肉からの分離状況は、サルモネラ属菌が 90 検体(58.1%)、大腸菌が 147 検体(94.8%)、腸球菌が 139 検体(89.7%)で陽性であった。

次に、分離された菌株について、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を行った。対象とした薬剤は、サルモネラ属菌および大腸菌については ABPC、CEZ、CTX、SM、GM、KM、TC、CP、CL、NA、CPFX および ST 合剤の 12 薬剤、腸球菌については ABPC、DSM、GM、KM、OTC、CP、BC、EM、LCM、ERFX、TS、SNM および VGM の 13 薬剤とした。市販鶏肉由来のサルモネラ属菌(*Salmonella Infantis*)について見ると、薬剤耐性株が供試した 12 薬剤のうち 8 薬剤に認められ、耐性率は 1.8%(ST)~83.2%(TC)であった。大腸菌は、薬剤耐性株が供試した 12 薬剤中 11 薬剤に認められ、耐性率は 1.9%(CTX)~42.5%(TC)であった。腸球菌(*E. faecalis* + *E. faecium*)は、薬剤耐性株が供試した 13 薬剤のうち 10 薬剤に認められ、耐性率は 2.4%(ABPC、GM)~49.4%(OTC)であった。食鳥処理場鶏肉由来のサルモネラ属菌(*S. Infantis*)について見ると、薬剤耐性株が供試した 12 薬剤のうち 8 薬剤に認められ、耐性率は 5.6%(CTX、NA、ST)~66.7%(TC)であった。大腸菌は、薬剤耐性菌が供試した 12 薬剤中 10 薬剤に認められ、耐性率は 3.3%(CEZ)~73.3%(TC)であった。腸球菌(*E. faecalis* + *E. faecium*)は、薬剤耐性株が供試した 13 薬剤のうち 10 薬剤に認められ、耐性率は 3.4%(ABPC)~70.7%(OTC)であった。

さらに得られた薬剤耐性菌について PFGE 等による解析を実施した。ESBL 産生大腸菌について遺伝子型別を調べたところ、*bla*_{SHV} 保有株が 43 株で最も多く、*bla*_{CTX-M-2} が 25 株、*bla*_{CTX-M-1} が 21 株であった。またサルモネラ属菌は、*S. Infantis* および *S. Schwarzengrund*、ESBL 産生大腸菌について PFGE 解析に基づく系統樹を作成した。

Ⅱ．調査背景および目的

家畜等への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するに当たり、畜水産食品等の薬剤耐性菌の出現に関する科学文献および調査報告数が極めて少ないことから、畜水産食品等の薬剤耐性菌の出現状況を定量的に把握しておく必要がある。平成 17 年度には、畜水産食品における薬剤耐性菌について情報収集するとともに、薬剤耐性菌の出現状況を定量的に把握するためのプロトコルを作成した(平成 17 年度「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査(プロトコル作成)」報告書)。このプロトコルに従い、平成 18、19、20 および 25、26 年度に畜産食品(牛肉、豚肉、鶏肉、牛肝臓、豚肝臓、牛ひき肉、豚ひき肉)における薬剤耐性菌の出現状況を調査した。

本調査では家畜等への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するため、鶏肉由来のサルモネラ属菌、大腸菌および腸球菌における薬剤耐性菌の調査を実施し、薬剤耐性菌の食品健康影響評価を実施するための基礎資料とすることを目的とした。

Ⅲ．サルモネラ属菌、大腸菌および腸球菌の検出試験と成績

1. 試料のサンプリング

1) 施設の要件

鶏肉を国内産に限って採取する必要があることから、全国の手量販店、中小量販店、小売店の施設を対象とした。なおサンプリングにおいては、産地が偏らないよう北海道、東北、関東、中部、近畿、中国・四国および九州の、それぞれ代表的な都市の量販店等から採取した。また出荷地域が明らかになる食鳥処理場 11 か所(北海道 1 か所、東北 3 か所、中国・四国 1 か所、九州 6 か所)から出荷用にパック詰めされた鶏肉を採取した。

2) 対象食品の種類

国内産の鶏肉を対象食品とした。また、対象食品は加熱調理等がなされていないもので、国内産(パッケージや店頭表示で「国産」「国内産」「○○県産」などが明らかであるもの)を対象とした。

3) 試料のサンプリング、輸送および保管方法

包装容器および原産地等が記載されたラベルが破損又は損傷していないことを確認してサンプリング(購入)した。また、サンプリングした試料は凍結しないように保冷して運搬し、速やかに試験に供試した。

4) 試料数

調査仕様書に従い市販鶏肉の試料数は 300 サンプル以上、食鳥処理場由来鶏肉の試料数は 150 サンプル以上とした。市販鶏肉の採取目標数を表 1 に示した。なお採取目標数は、人口比等を考慮して設定した。

市販鶏肉の地域別採取数を表 2 に示した。また、食鳥処理場鶏肉の処理場別採取数を表 3 に示した。

実際の採取数は市販鶏肉が 357 検体、食鳥処理場鶏肉が 155 検体であった。またヒト由来 *S. Infantis* と鶏肉由来 *S. Infantis* の分布を比較・解析する目的で、健康者の腸管系病原菌保菌者検索で分離された *S. Infantis* 22 株についても供試した。

表1 市販鶏肉の採取目標数

地域	採取割合 (%)	採取目標数
北海道	4.3	13
東北	7.2	22
関東	33.4	100
中部	16.9	50
近畿	17.8	54
中国・四国	9.0	27
九州	11.4	34
合計	100.0	300

(検体)

表2 市販鶏肉の地域別採取数

地域	市販鶏肉			
	大手量販店	中小量販店	小売店	合計
北海道	5	5	5	15
東北	4	20	9	33
関東	25	70	19	114
中部	5	45	11	61
近畿	4	55	8	67
中国・四国	3	18	8	29
九州	5	30	3	38
合計	51	243	63	357

(検体)

表3 食鳥処理場鶏肉の処理場別採取数

処理場	採取数
A	13
B	16
C	11
D	11
E	26
F	16
G	16
H	16
I	10
J	10
K	10
合計	155

(検体)

2. 試料からのサルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌の分離および同定の概略

1) 対象菌

サルモネラ属菌

大腸菌

腸球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*)

2) 分離および同定

試験方法は原則として、平成 17 年度食品安全確保総合調査「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査(プロトコル作成)報告書(平成 18 年 3 月)」に準拠して、分離および同定を行った。また最新の試験方法として「食品からの微生物標準試験法」等を参考に、使用する分離平板培地などを選択した(図 1 から図 3)。なお今回の調査では、薬剤耐性菌をスクリーニングする目的で ESBL 産生大腸菌およびバンコマイシン耐性の腸球菌を検出可能な酵素基質培地も併用した。

3. 試験方法

1) 試料液の調製

① サルモネラ属菌

試料 25 g を秤量し、滅菌緩衝ペプトン水(BPW)225 ml を加えた後、1 分間ストマッカ一処理したものを試料液(1 次増菌培養)として用いた(図 1)。

② 大腸菌および腸球菌

試料 25 g を秤量し、滅菌緩衝ペプトン水(BPW)100 ml を加えた後、1 分間ストマッカ一処理したものを試料液(乳剤)として用いた(図 2、図 3)。

2) 検出方法および同定方法

① サルモネラ属菌

a) 増菌培養法

試料液を 36℃で 22±2 時間 1 次増菌培養した。次に、1 次増菌培養液 0.1 ml をラパポート・バシリアディス培地 10 ml、1 次増菌培養液 1.0 ml をテトラチオネート培地 10 ml にそれぞれ接種し、42℃で 22±2 時間 2 次増菌培養した。2 次増菌培養液の 1 白金耳量を DHL 寒天培地およびクロモアガーサルモネラ寒天培地に画線塗抹し、36℃で 22±2 時間培養した。

b) 生化学的性状試験

培養終了後、各寒天培地にサルモネラ属菌が疑われる集落が出現した場合は、下記

表 4 に示す生化学的性状試験を行い、サルモネラ属菌の同定を行った。なお得られたサルモネラ属菌については O 抗原および H 抗原を調べ、血清型を決定した。

表4 サルモネラ属菌の生化学的性状試験

使用培地	試験項目	サルモネラ属菌の性状
TSI寒天培地	糖分解	斜面(乳糖・白糖)：非分解/ 高層(ブドウ糖)：分解
	硫化水素産生	+
	ガス産生	+ or -
LIM寒天培地	リジン脱炭酸	+
	インドール産生	-
	運動性	+
VP半流動培地	VP反応	-
シモンズのクエン酸塩培地	クエン酸塩利用能	+

②大腸菌

a)直接分離培養法

試料液 0.1 ml をクロモアガーECC 寒天培地に塗抹し、36℃で 24±2 時間培養した。

b)増菌培養法

試料液 10 ml を 3 倍濃度の EC 培地 5 ml に接種し、36℃で 24±2 時間培養した。その後、培養液の 1 白金耳量をクロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地に画線塗抹し、36℃で 24±2 時間培養した。

c)生化学的性状試験

直接分離培養法および増菌培養法の各寒天培地に大腸菌が疑われる集落が出現した場合は、下記表 5 に示す生化学的性状試験を行い、大腸菌の同定を行った。

表5 大腸菌の生化学的性状試験

使用培地	試験項目	大腸菌の性状
TSI寒天培地	糖分解	斜面(乳糖・白糖)：分解/ 高層(ブドウ糖)：分解
	硫化水素産生	-
	ガス産生	+ or -
LIM寒天培地	リジン脱炭酸	+ or -
	インドール産生	+
	運動性	+
VP半流動培地	VP反応	-
シモンズのクエン酸塩培地	クエン酸塩利用能	-

③腸球菌

a)直接分離培養法

試料液 0.1 ml を EF 寒天培地に塗抹し、36°Cで 48±3 時間培養した。

b)増菌培養法

試料液 10 ml を 3 倍濃度の Enterococcusel 培地 5 ml に接種し、36°Cで 24 時間培養した。その後、培養液の 1 白金耳量を EF 寒天培地(48±3 時間)およびクロモアガー VRE スクリーン培地(24±2 時間)に画線塗抹し、36°Cで培養した。

c)生化学的性状試験

直接分離培養法および増菌培養法の各寒天培地に腸球菌が疑われる集落が出現した場合は、下記表 6 に示す生化学的性状試験を行い腸球菌であることを確認後、PCR¹を用いて *E. faecalis* および *E. faecium* の菌種同定を行った。

表6 腸球菌の生化学的性状試験

使用培地	試験項目	腸球菌の性状
血液寒天培地	45°C発育	+
6.5%食塩加ブドウ糖ブイヨン	6.5%食塩発育	+

¹ B.A. Layton, et al.:*J. Appl. Microbiol.*, **109**, 539-547, 2010.

3)試験に使用した培地・試薬

サルモネラ属菌、大腸菌および腸球菌の検出および同定に使用した培地、試薬を表7に示した。

表7 使用培地、試薬一覧

対象菌	名称	メーカー名
サルモネラ属菌	緩衝ペプトン水	Oxoid
	ラパポート・バシリアディス(RV)培地	Oxoid
	テトラチオネート(TT)培地	Oxoid
	DHL寒天培地	極東製薬
	クロモアガーサルモネラ寒天培地	関東化学
	TSI寒天培地	日水製薬
	LIM寒天培地	日水製薬
	VP半流動培地	栄研化学
	シモンズのクエン酸塩培地	日水製薬
	サルモネラ免疫血清(O群, H血清)	デンカ生研
大腸菌	緩衝ペプトン水	極東製薬
	クロモアガーECC寒天培地	関東化学
	EC培地	極東製薬
	クロモアガーオリエンタシオン/ESBL分画培地	関東化学
	TSI寒天培地	日水製薬
	LIM寒天培地	日水製薬
	VP半流動培地	栄研化学
	シモンズのクエン酸塩培地	日水製薬
	病原大腸菌免疫血清(O群)	デンカ生研
腸球菌	緩衝ペプトン水	極東製薬
	EF寒天培地	日水製薬
	Enterococcosel培地	BD
	クロモアガーVREスクリーン寒天培地	関東化学
	6.5%食塩加ブドウ糖ブイヨン	自家調製

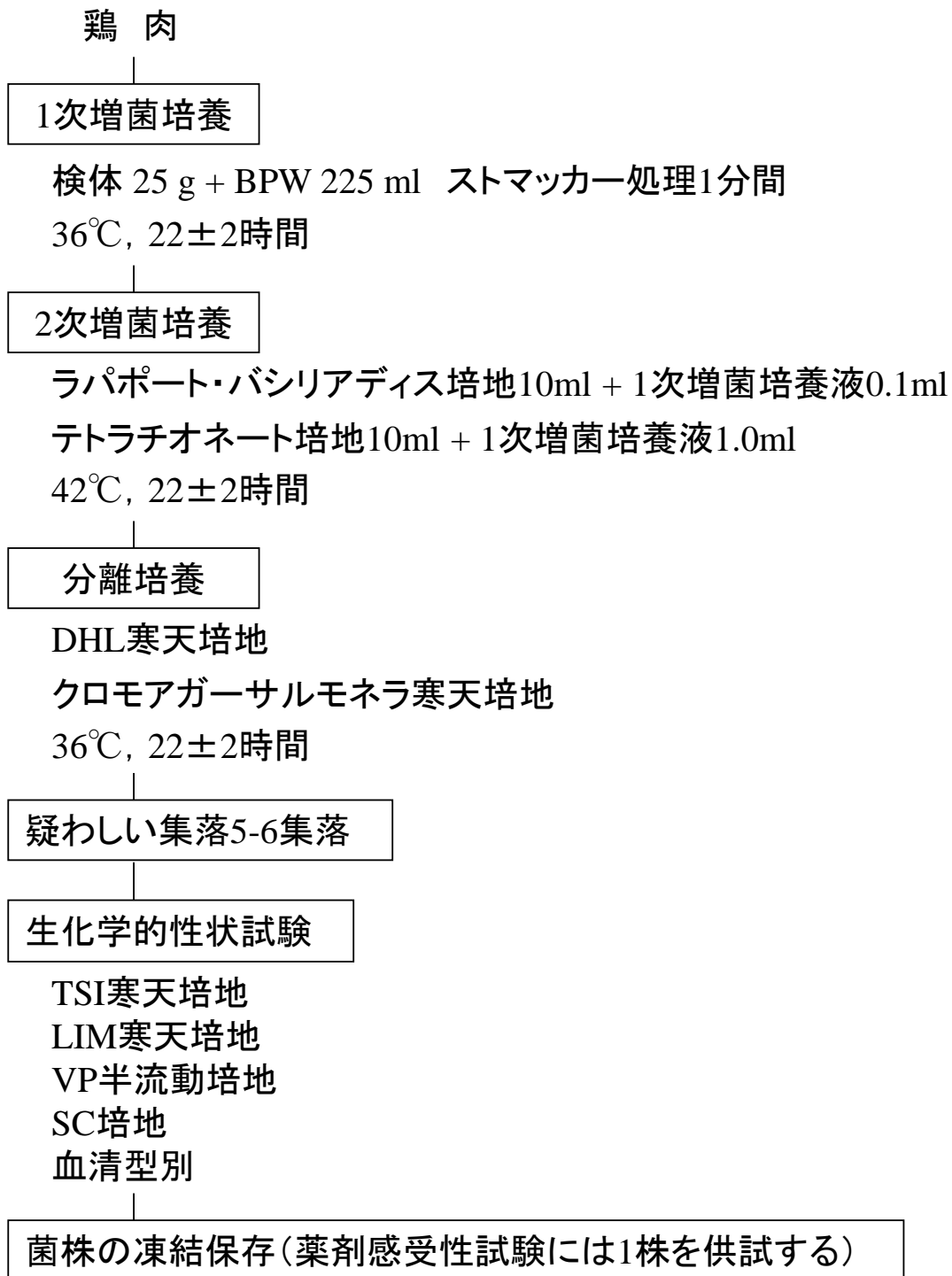


図1 サルモネラ属菌の分離方法

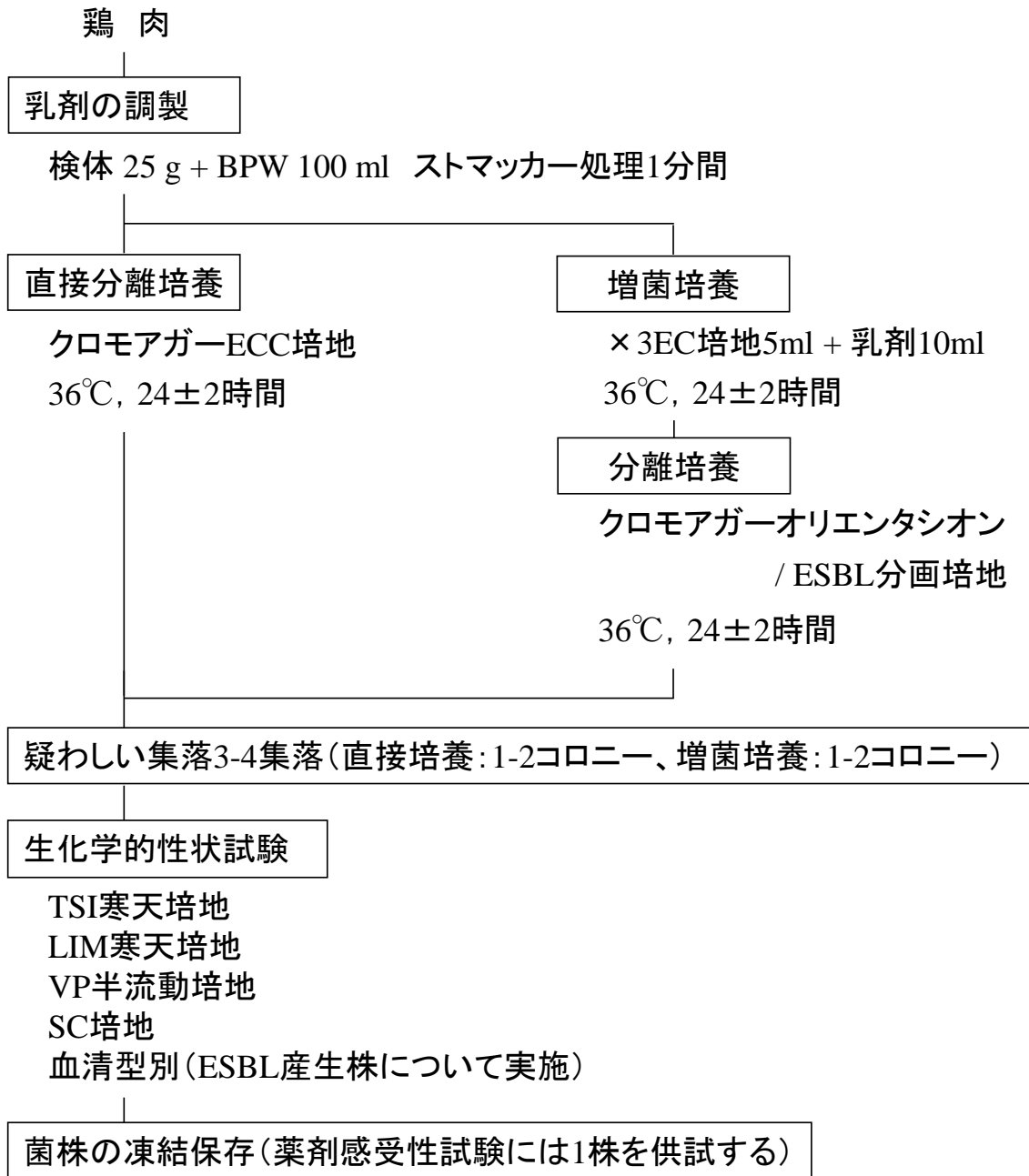


図2 大腸菌の分離方法

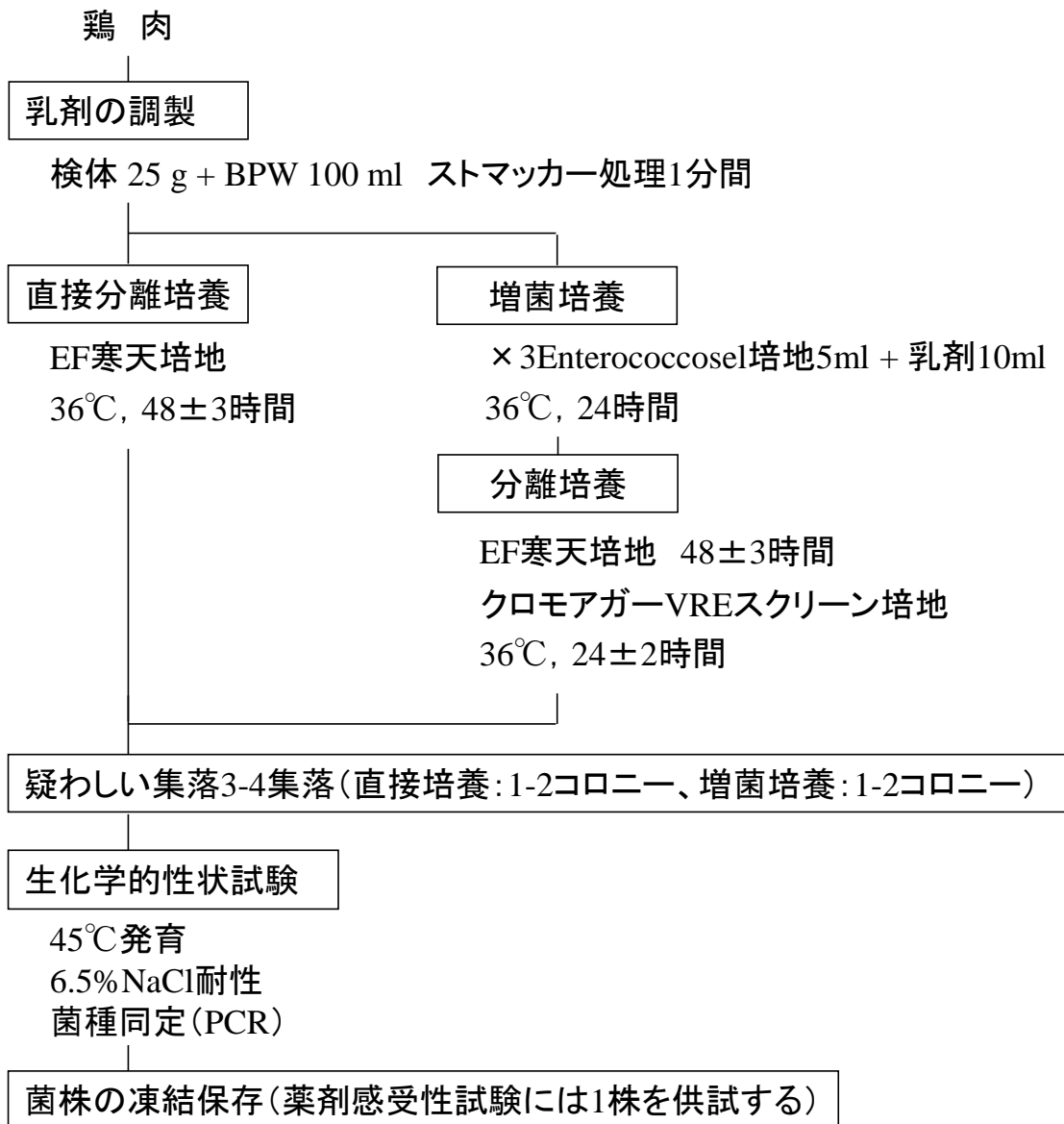


図3 腸球菌の分離方法

4.結果

1)対象菌の検出成績

①市販鶏肉からの検出状況

市販鶏肉からの対象菌の検出状況を地域別、規模別に整理して表 8-1、表 8-2 に、分離菌株一覧を表 9 に示した。

市販鶏肉 357 検体中、サルモネラ属菌は 196 検体、大腸菌は 315 検体、腸球菌は 327 検体が陽性であり、陽性率はそれぞれ 54.9%、88.2%、91.6%であった。地域別の検出状況を見ると、特定の地域で陽性率が高くなるといった傾向は認められず、サルモネラ属菌の陽性率は 40 から 60%、大腸菌、腸球菌の陽性率は 80 から 100%であった。規模別の状況を見ると、サルモネラ属菌は大手量販店、大腸菌、腸球菌は中小量販店や小売店の陽性率が高い傾向であった。

分離菌株数は、サルモネラ属菌が 214 株、大腸菌が 396 株、腸球菌が 485 株であった。サルモネラ属菌の血清型別の内訳は、*S. Infantis* が 113 株、*S. Schwarzengrund* が 63 株、*S. Manhattan* が 25 株、その他が 12 株、型別不能が 1 株であった。

腸球菌の内訳は、*E. faecalis* が 407 株(直接培養 87 株、増菌培養 320 株)、*E. faecium* が 78 株(直接培養 1 株、増菌培養 77 株)であった。

また、薬剤耐性菌をスクリーニングする目的で使用したクロモアガーVRE スクリーン培地からの検出は認められず、クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地からは 118 株が分離された。

表8-1 市販鶏肉からの検出状況 (地域別)

地域	検体数	サルモネラ属菌		大腸菌		腸球菌	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
北海道	15	6	40.0	13	86.7	13	86.7
東北	33	19	57.6	29	87.9	29	87.9
関東	114	66	57.9	92	80.7	101	88.6
中部	61	27	44.3	55	90.2	58	95.1
近畿	67	42	62.7	62	92.5	62	92.5
中国・四国	29	16	55.2	29	100.0	28	96.6
九州	38	20	52.6	35	92.1	36	94.7
合計	357	196	54.9	315	88.2	327	91.6

表8-2 市販鶏肉からの検出状況 (規模別)

	検体数	サルモネラ属菌		大腸菌		腸球菌	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
大手量販店	51	33	64.7	39	76.5	43	84.3
中小量販店	243	130	53.5	220	90.5	225	92.6
小売店	63	33	52.4	56	88.9	59	93.7
合計	357	196	54.9	315	88.2	327	91.6

表9 市販鶏肉からの分離菌株一覧

対象菌	菌種またはサルモネラ血清型	分離方法	分離菌株数	薬剤感受性試験に供試する菌株数
サルモネラ属菌	<i>S. Infantis</i>	増菌培養	113	113
	<i>S. Schwarzengrund</i>		63	63
	<i>S. Manhattan</i>		25	0
	<i>S. Typhimurium</i>		4	0
	<i>S. Agona</i>		3	0
	<i>S. Blockley</i>		2	0
	<i>S. Anatum</i>		1	0
	<i>S. Cubana</i>		1	0
	<i>S. Montevideo</i>		1	0
	UT		1	0
	合計	214	176	
大腸菌		直接培養	81	81
		増菌培養*	315	25
		合計	396	106
腸球菌	<i>E. faecalis</i>	直接培養	87	87
		増菌培養	320	0
		計	407	87
	<i>E. faecium</i>	直接培養	1	0
		増菌培養	77	77
		計	78	77
	合計	485	164	

*クロモアガーESBLからの分離あり:118株

②食鳥処理場鶏肉からの検出状況

食鳥処理場鶏肉からの対象菌の検出状況を表 10 に、分離菌株一覧を表 11 に示した。食鳥処理場鶏肉 155 検体中、サルモネラ属菌は 90 検体、大腸菌は 147 検体、腸球菌は 139 検体が陽性であり、陽性率はそれぞれ 58.1%、94.8%、89.7%であった。なお、食鳥処理場 J からサルモネラ属菌の検出が認められなかったが、これは 10 検体全てが同一ロットであり、サルモネラ属菌陰性の鶏群であったためと考えられた。

分離菌株数は、サルモネラ属菌が 97 株、大腸菌が 208 株、腸球菌が 187 株であった。サルモネラ属菌の血清型別の内訳は、*S. Schwarzengrund* が 49 株、*S. Manhattan* が 29 株、*S. Infantis* が 18 株、その他(型別不明)が 1 株であった。

腸球菌の内訳は、*E. faecalis* が 162 株(直接培養 24 株、増菌培養 138 株)、*E. faecium* が 25 株(直接培養 1 株、増菌培養 24 株)であった。

また、薬剤耐性菌をスクリーニングする目的で使用したクロモアガーVRE スクリーン培地からの検出は認められず、クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地からは 49 株が分離された。

表10 食鳥処理場鶏肉からの検出状況 (処理場別)

食鳥処理場	検体数	サルモネラ属菌		大腸菌		腸球菌	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
A	13	4	30.8	12	92.3	12	92.3
B	16	7	43.8	16	100.0	14	87.5
C	11	7	63.6	11	100.0	10	90.9
D	11	7	63.6	9	81.8	9	81.8
E	26	18	69.2	25	96.2	24	92.3
F	16	12	75.0	14	87.5	16	100.0
G	16	13	81.3	16	100.0	14	87.5
H	16	8	50.0	16	100.0	10	62.5
I	10	9	90.0	10	100.0	10	100.0
J	10	0	0.0	8	80.0	10	100.0
K	10	5	50.0	10	100.0	10	100.0
合計	155	90	58.1	147	94.8	139	89.7

表11 食鳥処理場鶏肉からの分離菌株一覧

対象菌	菌種またはサルモネラ血清型	分離方法	分離菌株数	薬剤感受性試験に 供試する菌株数
サルモネラ属菌	<i>S. Schwarzengrund</i>	増菌培養	49	49
	<i>S. Manhattan</i>		29	0
	<i>S. Infantis</i>		18	18
	<i>Salmonella</i> sp.		1	0
	合計		97	67
大腸菌	/	直接培養	63	60
		増菌培養*	145	0
		合計	208	60
腸球菌	<i>E. faecalis</i>	直接培養	24	24
		増菌培養	138	9
		計	162	33
	<i>E. faecium</i>	直接培養	1	1
		増菌培養	24	24
		計	25	25
	合計		187	58

*クロモアガー-ESBLからの分離あり:49株