

流通食品中における薬剤耐性菌汚染実態調査

中岡加陽子*, 矢内英之, 庄真理子*, 寺杣文男

Survey of antimicrobial resistant bacteria contamination in marketed food

Kayoko Nakaoka*, Hideyuki Yanai, Mariko Sho* and Fumio Terasoma

キーワード：基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ, ESBL, AmpC β -ラクタマーゼ, 流通食品

Keyword: Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBL, AmpC β -Lactamase, Marketed food

はじめに

現在, 国際的な問題となっている薬剤耐性菌は医療現場や畜産分野における抗菌剤の不適切な使用により出現し, 食品や環境を介してヒトに伝播し, 生態系を循環していると考えられている. これまで薬剤耐性菌汚染調査は食肉における大腸菌, カンピロバクター, サルモネラ属菌等について実施されているが¹⁻³⁾, 食肉以外の食品に関する国内報告事例は少ない. 今回, 食品の微生物汚染の程度を示す指標となる大腸菌群について, 近年医療分野で問題となっている基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌, カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) および AmpC β -ラクタマーゼ (AmpC) 産生菌による県内流通食品の汚染実態を把握するため調査を行った.

調査方法

1. 材料

2020年5月から2022年1月までに行政検査として収去した県内流通食品のうち, 435検体を用いた. 内訳は, 牛肉70検体, 豚肉10検体, 鶏肉93検体, 鮮魚介類60検体, アイスクリーム類・氷菓79検体, 生めん類20検体, 浅漬18検体, 生洋菓子20検体, そうざい16検体, そうざい半製品8検体, カット野菜・サラダ21検体, はち

微生物グループ * 現 衛生グループ

みつ20検体であった.

2. 方法

1) 薬剤耐性大腸菌群のスクリーニング

加藤らの方法⁴⁾を参考に耐性菌のスクリーニングを行った. 食品の10倍希釈乳剤を2倍濃度のBGLB培地(日水製薬)に接種し, 培養後ガス産生が認められたものを大腸菌群陽性とした. 培養液をXM-G培地(日水製薬)に塗布し, セフトキシム, セフトジジム, イミペネムおよびメロペネムディスク(KBディスク; 栄研化学)を置き, 培養後ディスク周囲の阻止円内に発育したコロニーを釣菌および単離した. 単離した菌株について, 前述の薬剤ディスク4剤を用いKirby-Bauer法(K-B法)により1剤以上耐性となったものを耐性菌とした.

2) 薬剤感受性試験

耐性菌について, アンピシリン(ABPC), セフトジジム(CAZ), セフトキシム(CTX), セフトメタゾール(CMZ), イミペネム(IPM), メロペネム(MPM), テトラサイクリン(TC), ナリジクス酸(NA), ノルフロキサシン(NFLX), カナマイシン(KM), クロラムフェニコール(CP), ストレプトマイシン(SM), ST合剤(ST)およびホスホマイシン(FOM)のディスク(KBディスク; 栄研化学)を用い, K-B法により薬剤感受性試験を行った.

3) 菌種同定

検出された耐性菌について、生化学性状試験、ID テスト・EB-20 (日水製薬) および API 20 E (シスメックス・ビオメリュー) により同定した。

4) β -ラクタマーゼ産生性試験

国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌」に準じて、メタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) については市販の検出用ディスク (メタロ- β -ラクタマーゼ SMA; 栄研化学), ESBL についてはクラブラン酸・アモキシシリンディスク およびスルバクタム・アンピシリンディスク (KB ディスク; 栄研化学), AmpC については3-アミノフェニルボロン酸一水和物 (富士フィルム和光純薬) およびクロキサシリンナトリウム一水和物 (シグマアルドリッチ) を用い試験を行った。

5) 薬剤耐性遺伝子の検出

マルチプレックス PCR 法により、カルバペネマーゼ遺伝子⁵⁾, ESBL 遺伝子および AmpC 遺伝子¹⁾ の検出を実施した。

結 果

1. 耐性菌の検出状況

県内流通食品計 435 検体のうち大腸菌群陽性となったのは 252 検体で、そのうち第三世代セファ

ロスポリン系薬剤耐性菌は 35 検体から 49 株, カルバペネム系薬剤耐性菌は 3 検体から 3 株が検出された (表 1)。

2. 検出された耐性菌の菌種

検出された耐性菌計 52 株は 8 菌種に分類された。 *E. cloacae* が 15 株 (28.8%) と最も多く、次いで *C. freundii* が 9 株 (17.3%), *H. alvei* が 8 株 (15.4%), *E. coli* が 7 株 (13.5%), *E. asburiae* が 5 株 (9.6%), *K. pneumoniae* が 5 株 (9.6%), *E. amnigenus* が 2 株 (3.8%), *E. cancerrogenus* が 1 株 (1.9%) 検出された。 *Enterobacter* 属は全体の 44.2% を占め、どの食品の種類からも検出された。また、*E. coli* と *K. pneumoniae* は鶏肉のみから検出された。

3. 耐性株の薬剤耐性パターン

耐性菌 52 株について薬剤感受性試験を行ったところ、15 種類の薬剤耐性パターンが認められた (表 2)。うち *E. coli* 1 株と *E. cloacae* 1 株については、9 薬剤と最も多くの薬剤に耐性を示し、いずれも鶏肉由来であった。また、CMZ と IPM の両方に耐性を示した CRE は 3 株あり、それぞれ牛肉由来の *E. cloacae*, 鶏肉由来の *C. freundii*, 生めん類由来の *E. asburiae* であった。

表 1. 第三世代セフェム系およびカルバペネム系薬剤耐性大腸菌群の検出状況

種類	検体数	大腸菌群 陽性検体数 (%)	第三世代セフェム ^ホ リン系 薬剤耐性菌		カルバペネム系 薬剤耐性菌	
			検出検体数 (%)	株数	検出検体数 (%)	株数
牛肉	70	66 (94.3)	6 (9.1)	8	1 (1.5)	1
豚肉	10	10 (100)	1 (10.0)	2	0	
鶏肉	93	91 (97.8)	15 (16.5)	24	1 (1.1)	1
鮮魚介類	60	37 (61.7)	6 (16.2)	6	0	
アイス・氷菓	79	2 (2.5)	0		0	
生めん類	20	1 (5.0)	0		1 (100)	1
浅漬	18	15 (83.3)	2 (13.3)	3	0	
生洋菓子	20	6 (30.0)	1 (16.7)	1	0	
そうざい	16	3 (18.8)	0		0	
そうざい半製品	8	6 (75.0)	1 (16.7)	2	0	
カット野菜・サラダ	21	15 (71.4)	3 (20.0)	3	0	
はちみつ	20	0	-		-	
計	435	252 (57.9)	35 (13.9)	49	3 (1.2)	3

表 2. 菌種別薬剤耐性パターン

菌種	薬剤耐性パターン	株数
<i>C. freundii</i>	ABPC/CAZ/CTX	1
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ	6
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ/SM	1
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ/IPM/SM	1
<i>E. cloacae</i>	ABPC/CAZ/CTX	1
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ	7
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ/IPM	1
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ/FOM	5
	ABPC/CAZ/CTX/TC/NA/KM/CP/SM/ST	1
<i>E. amnigenus</i>	ABPC/CAZ/CTX/CMZ	1
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ/FOM	1
<i>E. asburiae</i>	ABPC/CAZ/CTX/CMZ	1
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ/IPM	1
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ/FOM	3
<i>E. cancerrogenus</i>	ABPC/CAZ/CTX/CMZ	1
<i>E. coli</i>	ABPC/CTX/TC	1
	ABPC/CAZ/CTX/TC	1
	ABPC/CAZ/CTX/KM	2
	ABPC/CTX/TC/KM/SM	1
	ABPC/CAZ/CTX/TC/KM/CP/SM/ST	1
	ABPC/CAZ/CTX/TC/NA/NFX/KM/SM/ST	1
<i>K. pneumoniae</i>	ABPC/CAZ/CTX/TC/KM/SM	3
	ABPC/CAZ/CTX/TC/SM/FOM	1
	ABPC/CAZ/CTX/TC/KM/CP/SM/ST	1
<i>H. alvei</i>	ABPC/CAZ/CTX	5
	ABPC/CAZ/CTX/CMZ	3

4. β -ラクタマーゼ産生性

β -ラクタマーゼ産生性を示したのは耐性菌 52 株のうち 47 株であり, ESBL 産生菌は 14 株, AmpC 産生菌は 33 株であった (表 3). MBL 産生菌はみられなかった. CRE 3 株はいずれも AmpC 産生であった. また, ESBL 産生株はすべて鶏肉由来であった.

5. 薬剤耐性遺伝子の検出

ESBL 産生菌からは CTX-M-1 group, CTX-M-2

表 3. 菌種別 β -ラクタマーゼ産生性

菌種	ESBL	AmpC
<i>C. freundii</i>		9
<i>E. amnigenus</i>		2
<i>E. asburiae</i>		5
<i>E. cancerrogenus</i>		1
<i>E. cloacae</i>	2	13
<i>E. coli</i>	7	
<i>H. alvei</i>		3
<i>K. pneumoniae</i>	5	

(株数)

表4. 薬剤耐性遺伝子検出状況

菌種	β -ラクタマーゼ	薬剤耐性遺伝子	由来 (株数)
<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	CTX-M-1+TEM	鶏肉 (2)
		CTX-M-1+TEM+SHV	鶏肉 (2)
		CTX-M-2+SHV	鶏肉 (1)
<i>E. coli</i>	ESBL	CTX-M-1+TEM	鶏肉 (3)
		CTX-M-2+TEM	鶏肉 (1)
<i>E. cloacae</i>	ESBL	CTX-M-2	鶏肉 (2)
	AmpC	EBC	牛肉 (1), 浅漬 (2), カット野菜 (2)
<i>C. freundii</i>	AmpC	CIT	牛肉 (1), 鮮魚介類 (2), そうざい半製品 (1)
<i>E. asburiae</i>	AmpC	EBC	めん (2) [※] , そうざい半製品 (1)
<i>H. alvei</i>	AmpC	ACC	牛肉 (2), 鶏肉 (1)

※ うち1株はCRE

group, SHV 型, TEM 型が, AmpC 産生菌では ACC 型, CIT 型, EBC 型が検出された (表4). MBL を含むカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった.

考 察

今回の調査では, 食肉だけでなく鮮魚介類や加工食品から第三世代セファロスポリン系薬剤またはカルバペネム系薬剤耐性菌が計 52 株検出され, *Enterobacter* 属菌が 44.2% を占めた. *Enterobacter* 属菌は水や土壌などの環境中にも分布しており, 材料自体の汚染または製造過程における汚染が原因として考えられる. 今回調査した加工食品の一部は非加熱で摂取されることから, 製造過程における汚染を防ぐことが重要と考えられる.

β -ラクタマーゼ産生性試験により ESBL 産生菌と判定された 14 株はすべて鶏肉由来であった. このうち 11 株からプラスミド性薬剤耐性遺伝子が検出された. 検出された菌種が動物の腸管内に常在している *E. coli* と *K. pneumoniae* が中心であること, また, 2 種類以上の薬剤耐性遺伝子が検出されている菌があることから, 鶏の腸管内や飼育環境内でプラスミドを介して薬剤耐性遺伝子が伝播されている可能性が考えられる.

AmpC 産生菌 33 株のうち 15 株から EBC 型, CIT 型, ACC 型の薬剤耐性遺伝子が検出された. これらの遺伝子はそれぞれ *Enterobacter* 属菌, *Citrobacter* 属菌, *H. alvei* の染色体上に存在し

ており⁶⁾, 薬剤の曝露により AmpC を過剰産生することが知られている. CRE 3 株のうち生めん類由来の *E. asburiae* についても EBC 型が検出されており, カルバペネム系薬剤に耐性を示した要因の1つとして AmpC の過剰産生が考えられる.

ま と め

今回の調査結果より, 流通食品中にも薬剤耐性菌が存在することが明らかになった. 食品を介した薬剤耐性菌感染は, 抗菌薬による治療の難航や感染拡大のリスクがあり, 食中毒菌と同様の感染予防対策が重要であると思われる.

文 献

- 1) 四宮博人, 他: 厚生労働科学研究費補助金「食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究 (代表研究者: 渡邊治雄)」平成 31 ~ 令和元年度 分担研究報告書, 厚労化研, 2020
- 2) 佐藤拓弥, 藤岡美幸: 青森県内における市販食肉の *Campylobacter* 汚染状況および分離菌株の薬剤感受性, 日本食品微生物学会誌, 35, 36-40, 2018
- 3) 岡田さくら, 他: 県内におけるサルモネラ属菌の薬剤耐性調査, 和環衛研年報, 66, 41-44, 2020
- 4) 加藤玲, 他: 市販食品からの第三世代セフェ

- ム系およびカルバペネム系薬剤耐性大腸菌群の検出 (2014 年～2015 年), 東京都健康安全研究センター研究年報, 67, 113-119, 2016
- 5) Watahiki M. et al. : Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase, *Jpn J Infect Dis.* , 73(2) : 166-172, 2020
- 6) Pérez-Pérez, F. J. and Hanson, N.D. : Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2153-2162, 2002