

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：32647

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590756

研究課題名(和文) 輸入魚介類における多剤耐性菌等の汚染状況

研究課題名(英文) Prevalence of multi drug-resistant bacteria and Salmonella in imported prawn and shrimp in Japan

研究代表者

森田 幸雄 (MORITA, YUKIO)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号：50415056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：我が国は多くのエビをアジア諸国からの輸入している。そこで、市販冷凍エビ235検体の拡散型β-ラクタマーゼ(ESBL)菌とサルモネラ汚染状況を調査した。28.5%(67検体)の冷凍エビからESBL菌が、6.4%(15検体)からサルモネラが分離された。ESBL菌分離67検体中58検体は*Stenotrophomonas maltophilia*、9検体は*Chryseobacterium indologenes*であり、カルバペネム系抗生物質について耐性を示した。分離サルモネラは今回供試した抗菌性物質全てに感受性を示した。冷凍エビを生食することは無いが、解凍する際には二次汚染に配慮すべきであると思われた。

研究成果の概要(英文)：Plenty of prawn and shrimp were imported from Asian countries. Prevalence of extended-spectrum beta lactamase (ESBL) bacteria and Salmonella was assessed in 235 samples of imported prawn and shrimp obtained from retail markets. The prevalence of ESBL and Salmonella was 28.5%(67/235) and 6.4%(15/235), respectively. Of isolated 67 ESBL positive samples, 58 were *Stenotrophomonas maltophilia* and 9 samples were *Chryseobacterium indologenes*. All ESBL isolates were resistant to carbapenems. Of 15 Salmonella positive samples, all isolates were sensitively to antibiotics examined in this study. These findings indicate that to increase food safety, information regarding contamination by foodborne pathogens including Salmonella should be provided as feedback to the food's country of origin. Additionally, more detailed studies regarding the epidemiological significance of ESBL bacteria contamination of imported food are needed for both food-exporting and-importing countries.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

 キーワード：β-ラクタマーゼ産生菌 冷凍輸入エビ サルモネラ ステノトロホナス クリセオバクテリウム
薬剤感受性 東南アジア

1 . 研究開始当初の背景

2010(平成 22)年 9 月初旬,独協医科大学は 2009(平成 21)年 5 月のインド渡航者からニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ 1 (NDM-1)産生多剤耐性大腸菌の検出をマスメディアに発表し,その後,厚生労働省は,NDM-1 産生多剤耐性菌についての実態調査(我が国における新たな多剤耐性菌の実態調査等について:平成 22 年 9 月 10 日通知)を実施している.独協医科大学の事例はインド渡航者であったが,厚生労働省は 10 月 4 日,さいたま市民医療センターに入院している 90 歳代の女性患者から,NDM-1 産生肺炎桿菌が検出されたことを発表し,NDM-1 産生菌の検出は独協医科大学について国内で 2 例目であるが,海外渡航歴のない人の感染例は初めてであった.NDM-1 産生多剤耐性菌は 2009(平成 21)年,インドから帰国したスウェーデン人からがはじめて分離され(Yong D et al,2009),その後,インド,パキスタン,バングラデッシュに NDM-1 産生多剤耐性菌が蔓延している可能性が指摘されている(Kumarasamy KK et al,2010).欧米においてはインドに旅行した人が NDM-1 産生多剤耐性菌を持ち込んだと思われる事例が報告され世界的な問題として認識されつつある.

現在,アジア諸国から,高病原性鳥インフルエンザの発生・流行から鶏生肉の輸入は 2004(平成 16)年から禁止されている.また,アジア諸国は口蹄疫の流行地であるので以前より偶蹄類生肉の輸入は禁止されている.よって,食品衛生学的に考えると,アジア諸国から大腸菌等の大腸菌群を含む食品が輸入される事例としては,魚介類,特にエビが考えられる.

研究代表者:森田幸雄は過去に実施した研究報告(Asai et al,2008)において,市販冷凍エビは多くの一般生菌を保有(ブラックタイガーエビでは約 Log 5cfu/g)し,さらにエビの 2.4%(5/212)からサルモネラ遺伝子が検出され,0.9%(2/212)からサルモネラ菌が分離できることを経験している.そこで,主に東南アジアから輸入されている冷凍輸入エビからの Extended Spectrum beta() Lactamase (ESBL:基質特異性拡張型ラクタマーゼ)産生菌およびサルモネラの分離を試みた.

2 . 研究の目的

我が国でも,ESBL のひとつである,ニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ 1 (NDM-1)産生多剤耐性菌は院内感染として問題となっており,獨協医科大学の事例(2009 年 5 月のインド渡航者からの NDM-1 産生多剤耐性大腸菌の検出)のように海外渡航者からの輸入例が確認されている.研究代表者は東南アジアからの輸入冷凍エビからサルモネラを分離した経験より,輸入冷凍エビ体内から大量の大腸菌群が分離されるこ

とを経験している.また,輸入冷凍エビからサルモネラが汚染されていることを経験している.そこで,ESBL 産生菌を含む耐性菌の日本への食品を介する侵入経路解明調査のひとつとして,アジア諸国の国毎に輸入される魚介類,特に冷凍エビから大腸菌群等を分離し,薬剤耐性試験を実施し,NDM-1 産生多剤耐性菌や多剤耐性菌の分布状況について調査を実施した.また,食品衛生上重要なサルモネラの保菌状況について検討した.

3 . 研究の方法

1) 検体

2011 年(平成 23 年)~2013 年(平成 25 年)の 3 年間に,東京都・埼玉県・群馬県・栃木県内のスーパーマーケットから計 255 検体の輸入冷凍エビを購入した.255 検体の内訳はインドネシア 107 検体,インド 100 検体,タイ 13 検体,ベトナム 11 検体,オーストラリア 6 検体,ミャンマー 5 検体,マレーシア 3 検体,サウジアラビア 2 検体,バングラデッシュ 2 検体,パキスタン,中国,エクアドル,アルゼンチン 1 検体ずつ,そして産地表示無は 2 検体であった.

2) 一般生菌数,ESBL 菌の分離および ESBL 菌の同定

検体(10g)を滅菌リン酸緩衝液(90ml)でストマッカー処理後,適宜希釈検体を標準寒天培地(日水),希釈原液を ESBL 培地(BioMerieux)と KPC 培地(Oxoid)にスパイラル プレーティング システム(Eddy Jet Spiral Plater, Iul Instruments)で塗抹し 37℃,24 時間培養した.一般生菌数は標準寒天培地上の発育集落数をコロニーカウントシステム(aCOLyte,Synbiosis)で測定した.ESBL 菌は ESBL 培地または KPC 培地上に発育した集落について,10 μg 含有 ampicillin (AMP),30 μg 含有 moxalactam (MOX),25 μg 含有 amoxicillin,25 μg 含有 cefpodoxime (CPD),30 μg 含有 cefotaxime (CTX),30 μg 含有 ceftazidime (CAZ),30 μg 含有 aztreonam (AZM),30 μg 含有 ceftriaxone (CTRX),30 μg 含有 ceftiofime (CPR),10 μg 含有 imipenem (IPM),10 μg 含有 doripenem (DRPM),10 μg 含有 meropenem (MEPM),30 μg の cefotaxime と 10 μg の clavulanic acid を含有 (CTX/CLA),30 μg の ceftazidime と 10 μg の clavulanic acid を含有 (CAZ/CLA),10 μg の ampicillin と 10 μg の sulbactam を含有 (ABPC/SBT)したセンシディスク(BD)を用いたディスク法によって薬剤感受性を測定した.CPD,CAZ,AZM,CTX,CTRX ディスクに各々 22 mm, 22mm, 27mm, 27, 25mm の阻止円を示した株について,CAZ/CLA ディスクで CAZ ディスクより 5 mm 以上阻止円が拡大した株を ESBL 菌とした.分離した ESBL 菌は生化学的性状検査により菌種を同定した.

3) サルモネラの分離および薬剤感受性試

験

検体(25g)を225mlの緩衝ペプトン水(Oxoid)で37℃,18時間,前増菌培養を実施した。前増菌培養液の1mlをTetrathionate(TT)培地(Oxoid)に,0.1mlをRappaport Vassiliadis(RV)培地(Oxoid)に接種後,42℃,24時間,選択増菌培養を実施した。選択増菌培養後のTT培地とRV培地は各々DHL寒天培地(日水)とBrilliance™Salmonella(BS)寒天培地(Oxoid)に接種し37℃,18時間培養した。DHL寒天培地上で黒色集落を,BS寒天培地で紫色を呈した集落を釣菌し,生化学的性状を調べた。サルモネラと同定された株はOとHの免疫診断血清(デンカ生研)を用いて血清型を確定した。

分離したサルモネラは,10µg含有ampicillin(AMP),100µg含有piperacillin(PIP),30µg含有cefmetazole(CMZ),10µg含有streptomycin(S),30µg含有tetracycline(TE),30µg含有chloramphenicol(C),30µg含有fosfomycin(FOM),30µg含有nalidixic acid(NA),5µg含有ofloxacin(OFX)および23.75µgのsulfamethoxazoleと1.25µgのtrimethoprimを含有(SXT)したセンチディスクを用いたディスク法によって薬剤感受性を測定した。

4) 現地調査

2012(平成24)年8月にはミャンマー水産省およびタイのカセサート大学,2013(平成25)年8月にはインドネシアの民間エビ養殖場とタイの水産省を訪問し,エビ養殖や水産加工,輸出体制の実態を調査した。

4. 研究成果

1) 輸入冷凍エビからの一般生菌数,ESBL菌の分離およびESBL菌の同定

(1)2011(平成23)年度~2012(平成24)年度
平成23-24年度に国内で市販されている輸入冷凍エビ124検体(インド40検体,インドネシア59検体,タイ12検体,ベトナム6検体,ミャンマー3検体,オーストラリア2検体,サウジアラビア,アルゼンチン1検体ずつ)を検査した。冷凍エビ1gあたりの平均一般生菌数(平均±標準偏差 log cfu/g)は4.8±0.9 log cfu/gであった。

染色体上にメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する *Stenotrophomonas maltophilia* が13検体, *Chryseobacterium indologenes* は1検体から分離された。

(2)2013(平成25)年度

平成25年度に国内で市販されている輸入冷凍エビ131検体(インド60検体,インドネシア48検体,ベトナム5検体,オーストラリア4検体,マレーシア3検体,ミャンマー,バングラディシュ,産地表示なしは2検体ずつ,タイ,パキスタン,中国,サウジアラビア,エクアドルは1検体

ずつ)を検査した。冷凍エビ1gあたりの平均一般生菌数(平均±標準偏差 log cfu/g)は4.0±2.1 log cfu/gであった。

Stenotrophomonas maltophilia が45検体, *Chryseobacterium indologenes* は8検体から分離された。ベトナム,タイ,マレーシアでは稚エビに致死性の病原性を示す Early Mortality Syndrome(EMS)が流行しているために,インド産やインドネシア産のエビが多量に輸入されていた。

近年,ベトナム,タイ,マレーシアでは稚エビに致死性の病原性を示す Early Mortality Syndrome(EMS)が流行しているため,2013(平成25)年にはインド産やインドネシア産の冷凍エビが多量に我が国で見受けられた。

临床上問題となっている ESBL 産生 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Acinetobacter baumannii* は今回の調査では分離されてなかった。しかし,湿潤環境に広く存在する菌で,しかも染色体上に -ラクタマーゼ産生遺伝子が存在するメタロ -ラクタマーゼ産生菌ある, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium indologenes* が分離されていた。これらの菌種の強い病原性は報告されていないが院内感染事例はいくつか報告されている。

2) サルモネラの分離および薬剤感受性試験

(1)2011(平成23)年度~2012(平成24)年度
サルモネラは3.2%(4/124検体:S. salmoe, S. Weltevreden はインドネシア産, S. Abony, S. Stanley はインド産)から分離された。分離サルモネラは供試した抗菌性物質のすべてに感受性を示した。

(2)2013(平成25)年度

サルモネラは8.4%(11/131検体:5検体はインドネシア産,4検体はインド産,1検体はベトナム産,1検体はオーストラリア産)から分離された(現在,血清型検査中)。サルモネラ汚染率は上昇傾向を示していた。分離サルモネラは供試した抗菌性物質のすべてに感受性を示した。

冷凍エビを生食することは無いと考えられるが,解凍する際には二次汚染に配慮すべきである。

3) 現地調査

ミャンマーはエビ養殖の技術や施設の普及が遅れており,採取したエビは養殖することなく集めた後,その多くをタイ等に輸出していた。タイではエビ養殖技術が進んでおり養殖した後,HACCPシステム導入加工場で加工し,多くの冷凍エビを諸外国に輸出していた。エビの養殖に際してサルファ剤-トリメトプリムが養殖場で使用されていた。

インドネシアではエビ養殖の技術や施

設の普及が進んでおり、主要な産業となっていた。養殖場では稚エビに致死性の病原性を示す Early Mortality Syndrome(EMS) が流行しておりエビ養殖は壊滅的な打撃をうけていた。腸炎ビブリオが EMS の原因病原体であることから、抗菌性物質を養殖池に投与することもみうけられ、今後の薬剤耐性菌の出現に気をつけなければならないと思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

森田幸雄,古茂田恵美子,重村泰毅,Sumalee Boonmar ,Su Myo Thwe, 山本茂貴,佐藤 弘,野田雅博,石岡大成,小澤邦寿,黒田 誠,木村博一,冷凍輸入エビのサルモネラおよび -ラクタマーゼ産生菌汚染状況,日本獣医学会,第 156 回日本獣医学会,岐阜市(岐阜大学), H25.09.20-22

森田幸雄,古茂田恵美子,重村泰毅,Sumalee Boonmar ,Su Myo Thwe, 山本茂貴,佐藤 弘,野田雅博,石岡大成,小澤邦寿,黒田 誠,木村博一,冷凍輸入エビのサルモネラおよび -ラクタマーゼ産生菌汚染状況,平成 25 年度 日本獣医師会 獣医学術学会年次大会(千葉),千葉市(幕張メッセ,パル&リゾート<東京>), H26.02-23

森田幸雄,世界の家畜,環境,人をめぐるサルモネラの最新動向,第 34 回日本食品微生物学会学術総会,シンポジウム,東京都江戸川区(タワーホール船堀), H25.10.3-4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 森田幸雄,東京家政大学,家政学部,准教授(H23, H24):教授(H25)
研究者番号:50415056

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 丸山総一,日本大学,生物資源科学部,教授,
研究者番号:30181829