

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）
平成 26 年度 分担研究報告書

- ・ 食肉の多剤耐性菌（VRE, ESBL 生産菌など）の調査・研究

研究分担者 富田 治芳 （群馬大学大学院医学系研究科細菌学分野）
研究協力者 谷本 弘一 （群馬大学大学院医学系研究科薬剤耐性菌実験施設）

研究要旨

環境（家畜、食肉）からヒトへの伝播・拡散が危惧される多剤耐性腸内細菌科菌（ESBL 生産菌、AmpC 生産菌）およびバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）について国内で流通する食肉検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。2013 年度に収集した国内産食肉（鶏肉）100 検体、輸入食肉（鶏肉）89 検体の合計 189 検体を調査した結果、ESBL 生産菌は 102 検体陽性（54.0%）、AmpC 生産菌は 39 検体陽性（20.6%）であった。ESBL 生産菌は国内産鶏肉から高頻度で検出され（国内産 64.0%、輸入肉 42.7%）、一方 AmpC 生産菌の検出率は国内産で 14.0%、輸入食肉で 28.1%と輸入肉の方が高かった。遺伝子型の解析から ESBL 生産菌は CTX-M 型が多く、国内産は CTX-M-1、輸入食肉は CTX-M-2、CTX-M-8/25 が主に分離された。VRE については、ブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE（*E. faecium*）を検出した（頻度 1.3%）。また我々が 2011 年に環境中（国内産鶏肉）から初めて分離し報告した新規の VanN 型 VRE が、今回収集した産地の異なる国内産鶏肉 2 検体から検出された。PFGE 解析と MLST 解析から、これらの株は互いに同一由来であり、さらには 2011 年に報告した VRE 株とも同一の起源であった。

A. 研究目的

1) 臨床では多剤耐性の腸内細菌科菌（大腸菌、肺炎桿菌など）が急激に増加している。特に抗菌薬として最も多く使用されている β-ラクタム剤に対して高度耐性を示す ESBL 生産菌、および AmpC 生産菌の増加が深刻な問題となっている。これら多剤耐性腸内細菌科菌は環境（家畜）から畜産物、特に食肉を介してヒトへ伝播、拡散する危険性が指摘されている。本研究では食肉のこれら多剤耐性腸内細菌科菌の調査・解析を行い、その関連性を科学的に明確にすることを目的とした。

2) 多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE は欧米で院内感染症の主な起因菌として深刻な問題となっている。ヨーロッパにおいては過去の家畜への肥育目的の抗菌薬（アボパルシン）使用による環境中での VRE の増加とそのヒトへの伝播、拡散が指摘されている。幸い日本国内では VRE の分離頻度は欧米に比較し低いが、近年、増加中であり複数件のアウトブレイクが臨床報告されている。しかし国内ではこれまで VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は十分に行われていない。本研究では環境（家畜、食肉）由来 VRE と臨床分離 VRE との関係を明らかにする目的で、国内食肉における VRE の調査と解析を行った。

B. 研究方法

食肉検体：国内産食肉は国内 3ヶ所の食肉検査所からそれぞれ鶏肉 30 検体、あるいは 40 検体を収集した。海外食肉は各年度に検疫所で取り扱う輸入鶏肉（ブラジル産 78 検体、フランス産 6 検体、米国产 4 検体、タイ産 1 検体の合計 89 検体）を収集した。

各施設から送付された検体は速やかに凍結保存とし、順次融解の後、解析を行った。

検出方法：

1) ESBL 生産菌および AmpC 生産菌（腸内細菌科菌）の検出

国内の食肉衛生検査所で採集された肉の拭き取り材料を用いた。輸入肉はミンチ肉を用いた。それぞれ ABPC 添加（80mg/L）LB 液体培地 3 ml で一夜培養し、0.1 ml を二種類の薬剤添加 DHL 寒天培地（CAZ を 1 mg/L または CTX を 1mg/L 含む）に塗布した。それぞれの平板上の発育コロニーを 2 個ずつ釣菌し、純培養後チトクロム・オキシダーゼ試験陰性菌のみを選択した。CTX、CAZ に対する MIC 値 2mg/L 以上の株についてさらに 2 薬剤阻害実験を行った。ESBL 生産確認のために CTX、CAV、CAZ ディスク、AmpC 生産確認のために CTX、ボロン酸、CAZ ディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法を行った。各々の耐性遺伝子型（ESBL; TEM, SHV, CTX-M, および AmpC; MOX, CIT, DHA, ACC, EBM, FOX）の確認には各種特異的プライマーを用いた PCR 法を用いた。

2) VRE の検出

培地；腸球菌分離には Enterococcosel Broth (BBL) Bile esculin azide agar (Difco) および Brain Heart Infusion agar (Difco) を使用。用いた薬剤；バンコマイシン（VCM）、テイコプラニン（TEIC）

腸球菌の分離；VRE 検出のための選択的方法を用いた。検体のガーゼのふき取りサンプル、ミンチ肉片を、VCM6.0 mg/L 加 Enterococcosel Broth で 48 時間選択的増菌後、VCM12.5 mg/L 加 Bile esculin azide agar 選択培地に塗布し、得られたコロニーを

VCM6.0 mg/L 加 Brain Heart Infusion agar 上で単集落分離を行うことにより選択した。ミンチ肉浸潤液 0.1ml を VRE 選択寒天培地に塗布した。選択用寒天平板の培養時間はすべて 37、48 時間培養。薬剤耐性検査は薬剤平板希釈法を用い、接種菌液は 1 夜液体培地培養後の菌を 100 倍希釈することにより用いた。VRE の検出には *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*, *vanN*, 各種 *ddl* の特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法を用いた。必要に応じて DNA シークエンス解析 (Big Dye primer 法) PFGE 解析、MLST 解析を行った。

倫理面への配慮 全ての臨床分離株は患者個人を同定できる情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

1) ESBL 生産菌および AmpC 生産菌の調査・検出のために 2013 年度 (2014 年 2 月) に収集した国内産鶏肉 100 検体、輸入鶏肉 89 検体の合計 189 検体を解析した。食肉検体全体での検出頻度は ESBL 生産菌 102 検体陽性 (54.0%)、AmpC 生産菌 39 検体陽性 (20.6%) であった (図 1、図 2)。国内産食肉と輸入食肉との比較では ESBL 生産菌は国内鶏肉からの検出率の方が高く (64.0%)、一方 AmpC 生産菌は海外産鶏肉の方が高かった (28.1%)。国内産食肉由来 ESBL 生産菌および輸入食肉由来 ESBL 生産菌の検出結果、及び耐性遺伝子型の解析の詳細を図 3、図 4 に示す。また同様に AmpC 生産菌の遺伝子解析結果は図 5 に示す。耐性遺伝子型の解析では ESBL 生産菌は CTX-M 型が多く、国内産は CTX-M-1 (71%)、輸入食肉は CTX-M-2 (58%)、CTX-M-8/25 (22%) が主に分離された。一方、AmpC 生産菌では国内外共にほとんどの食肉由来株において耐性遺伝子は CIT 型であった。また今回、食肉から分離された ESBL 生産株、AmpC 生産株 (合計 155 株) の菌種としては *Escherichia coli* が最多 (93%) であり、次いで *Prototus mirabilis* (2%)、*Enterobacter cloacae* (2%) が多く分離された (図 6)。

2) 2014 年 2 月に収集した食肉 (鶏肉) 189 検体のうち、輸入鶏肉 1 検体 (ブラジル産) から VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された (表 1)。ブラジル産鶏肉における検出率としては 1.3% (1/78 検体) であった。一方、国内産鶏肉 2 検体から VanN 型 VRE 株が検出され (検出率 2.0%)、それらは全て *E. faecium* 株であった (表 2)。これらの 2 検体は国内の異なる検査所 (産地) から得られた鶏肉検体であった。VanN 型 VRE は我々が 2011 年に収集した国内産鶏肉から分離し、世界で 2 例目として (環境中からは初めて) 報告した新型 VRE である (図 7)。今回の調査で、国産鶏肉 2 検体から分離された VanN 型 VRE 株について PFGE 解析を行ったところ、先に報告した VanN 型 VRE 株 *E. faecium* GU121-1 と極めて類似の PFGE パターンを示した (図 8)。また MLST 解析を行ったところ、これらは全て ST669 に分類された

(表 3)。これらの結果は今回検出した VanN 型株が同一由来であり、かつ 2011 年の分離株とも同一の起源を持つことを示している。

D. 考察

食肉検体から ESBL 生産、および AmpC 生産各種腸内細菌科菌を検出した。昨年度、一昨年度の本調査、研究での各耐性腸内細菌科菌の検出頻度は他の報告とは異なり (時には 80% 上の検出率)、それぞれ全体で 10% 程度と比較的低かった。その原因として、検体を LB 液体培地で前培養する際に、薬剤を入れずに単純な増菌操作のみをしたことが考えられた。本年度の調査では、検出率の改善を目的として、前培養液に抗菌薬を加え (ABPC:80mg/L)、増菌処理を行った。今回の検出方法により、昨年度と比べ、大幅に検出限界値が高められ、耐性菌の検出率が高くなったものと考えられる。一方で一部の検査所から得られた検体からの耐性菌の検出率が他地域と比べ、著しく低いことが認められたことから、その機関での検体の採取方法や送付方法などに手技的な問題が考えられた。

これまでの調査と同様、今回もブラジル産鶏肉から頻度は低いものの (分離率 1.3%)、VanA 型 VRE が検出された。グリコペプチド系抗菌薬であるアバパルシンの家畜への投与は 2000 年頃に世界的に禁止されてから、すでに 10 年以上が経過している。ブラジルでの家畜への抗菌薬投与の規制管理状況は不明であるが、一度、環境中 (家畜腸管内) で増加した VRE は、抗菌薬による選択圧の非存在下であっても比較的長期に存続することが推測される。

一方、今回、日本の環境中 (複数の食肉検体) から以前分離した VRE と同一の宿主遺伝子型を持つ VanN 型 VRE 株を複数分離した。これらの結果は、これらの VRE 株は同一の起源を持ち、この VanN 型 VRE が既に国内の環境中に伝播、拡散していることを示唆している。

E. 結論

国内産鶏肉及びの輸入鶏肉から ESBL 生産および AmpC 生産腸内細菌科菌 (主に大腸菌) をそれぞれ 54%、20% の頻度で検出した。

ブラジル産輸入鶏肉から VanA 型 VRE が 1.3% の頻度で検出された。異なる産地の国内産鶏肉検体から同一由来と考えられる VanN 型 VRE 株を複数分離されたことから、VanN 型 VRE 株の国内の環境での伝播・拡散が強く疑われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kudo M, Nomura T, Yomoda S, Tanimoto K, Tomita H. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* over a long period in a university hospital in Japan. *Microbiology Immunology*.

58:607-614, 2014.

- 2) Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, Tomita H. Bacteriocin protein BacL₁ of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala²-crossbridged peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. 197:286-295, 2015.

2. 学会発表

- 1) Nomura H, Tomita H. Analysis of VanN-type vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolates in Japan. 4th ASM Conference on Enterococci. March 5-7, 2014 Cartagena, Colombia.
- 2) 菅貴則、谷本弘一、富田治芳. 食肉から分離された ESBL 産生腸内細菌科菌について .第 87 回日本細菌学会 . 2014 年 3 月 26 日 東京 .
- 3) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、谷本弘一、富田治芳 .日本の VanN 型 VRE について .第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 28 日 東京 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

