

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 24-26 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）について国内に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。2011 年度と 2012 年度に収集した国内産食肉 271 検体（鶏肉 180、豚肉 91）、輸入食肉 358 検体（鶏肉 157、豚肉 201）の合計 629 検体を調査した結果、ESBL 生産菌は 57 検体陽性（9.1%）、AmpC 生産菌は 39 検体陽性（6.2%）であった。ESBL 生産菌は鶏肉から高頻度で検出され（国内産 20.0%、ブラジル産 21.5%）、AmpC 生産菌の検出率は国内産（9.2%）、輸入食肉（3.9%）であった。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では、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%）、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。各耐性株の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。食肉由来株の各遺伝子型の分離頻度は臨床分離 ESBL 生産株とは異なっていた。また AmpC 生産菌は CIT 型が主であった。これら食肉由来の多剤耐腸内細菌科菌種としては大腸菌が最も多く検出された。一方、VRE については、2012 年度収集検体のうち、ブラジル産鶏肉 2 検体とデンマーク産鶏肉 2 検体から VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出され、分離頻度はそれぞれ 2.6%、67%であった。また 2013 年度収集検体では、ブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE (*E. faecium*) を検出した（分離頻度 1.3%）。さらに新規 VanN 型 VRE を産地が異なる国内産（宮崎、群馬）鶏肉 2 検体から検出した。PFGE 解析と MLST 解析の結果、これら VanN 型 VRE 株は宿主遺伝子型が互いに同一であった。また 2008 年度と 2010 年度の調査において国内産（宮崎）鶏肉から分離された VanN 型 VRE 株とも宿主遺伝子型が類似することから、これらは全て同一の起源を持つと考えられた。

A. 研究目的（ボンチ絵）

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：国内産食肉は群馬県、宮崎県、鹿児島県の 3ヶ所で採取、収集した。国外産輸入食肉は各年度に国内検疫所で取り扱う輸入食肉（鶏肉および豚肉）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。2011 年度、2012 年度は鶏肉及び豚肉検体を収集し解析を行ったが、2013 年度は鶏肉検体のみを収集し解析に用いた（表 1、表 2）。尚、検体収集を依頼した協力施設の都合により検体の収集（採取）が各年度の終わり（毎年 2 月）であった。そのため送付された検体の処理、解析が次年度にまたがることとなり、本調査での最終的な結果報告は前年度検体収集分となっている。今回の平成 24-26 年度の報告では、平成 23～25 年度（2011～2013 年度）調査として、実際には 2012 年～2014 年の各 2 月に採取、収集された検体の解析結果を示す。そのため本文と図表中の各年は記載のない限り、各年度を表す。

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(図1)

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。食肉検体からの耐性菌の検出率の改善を目指し、2011年度、2012年度と2013年度とでは検出方法の最初のステップ(検体の前培養と選択培地の種類)を改変(改良)した。2011年度、および2012年度では、それぞれの検体をLB液体培地3mlで一夜培養し(前培養)0.1mlをDHL寒天培地(ABPC 20 mg/L)に塗布した。一方、2013年度では検体をABPC添加(80mg/L)LB液体培地3mlで一夜培養し(前培養)二種類の異なる抗菌薬(CAZ 1mg/LまたはCTX 1mg/L)を添加したDHL寒天培地にそれぞれ培養液を0.1ml塗布した。各選択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二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。本研究での検出方法のサマリーを図1に示す。

2) VREの検出(図8)

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シーケンス解析(Big Dye primer法) PFGE解析、MLST解析を行った。本研究での検出方法のサマリーを図8に示す。

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

本研究では、2011年度と2012年度収集の検体と2013年度収集の検体では、食肉の種類および検出方

法(上記の初期ステップ)が異なっているために、調査(検出)結果を以下別々に示す(各図表)。

1) 今回のESBL生産菌およびAmpC生産菌の調査・検出のために収集し、解析に用いた検体の内訳を表1(国内産食肉)および表2(輸入食肉)に示す。2011年、2012年度の二年間に収集(それぞれ2012年2月、2013年2月に採取)した国内産食肉は271検体(鶏肉180、豚肉91) 輸入食肉は358検体(鶏肉157、豚肉201)で合計629検体であった。また2013年度に収集(2014年2月に採取)した国内産鶏肉は100検体、輸入鶏肉は89検体で合計189検体であった。輸入量の関係から、主な国外産鶏肉はブラジル産であり(8~9割) 国外産豚肉検体は米国産、デンマーク産、カナダ産が多くこれら3カ国で約8割を占めた。

2011年度、2012年度の食肉検体全体での検出頻度はESBL生産菌57検体陽性(9.1%)、AmpC生産菌39検体陽性(6.2%)であった。国内産食肉と輸入食肉との比較ではどちらの耐性菌も国内産食肉からの検出率の方が高かった(図2)。ESBL生産菌は鶏肉から高頻度で検出され(国内産20.0%、ブラジル産21.5%)、AmpC生産菌の検出率は国内産で9.2%、輸入食肉で3.9%だった。一方、2013年度収集の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。国内産食肉と輸入食肉との比較ではESBL生産菌は国内産鶏肉からの検出率の方が高かった(64.0%)、一方AmpC生産菌は海外産鶏肉の方が高かった(28.1%)(図2)。

耐性遺伝子型の解析から2011年、2012年はESBL生産菌としてCTX-M型が多く(図3)、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(図4)。2013年のESBL生産菌の由来検体種類の割合、検出方法は異なっていたが、各耐性遺伝子型の頻度の傾向は同様であった(図4)。これら食肉由来株の各耐性遺伝子型の分離割合は同時期(2012年)の国内での臨床分離ESBL生産株の遺伝子型とは異なっていた(図5)。

AmpC生産菌は国内外の食肉から2011年、2012年は5%、2013年は25%の頻度で検出され(図2) 鶏肉由来株は主にCIT型耐性遺伝子であった(図6)。一方、国外産食肉(鶏、豚)検体からは他にACC型、DHA型、EBC型など多様な型が検出された(図6)。

本調査で検出された多剤耐性腸内細菌科菌種としては2011年、2012年は*Escherichia. coli*が最多であり、次いで*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*が多く分離された(図7)。2013年は*Escherichia. coli*が最多(93%)であり、次いで*Ptoteus mirabilis*(2%), *Enterobacter cloacae*(2%)が多く分離された(図7)。

2) 2012年度及び2013年度収集した食肉検体のVREの検出結果をそれぞれ、表3、表4に示す。

2012年はブラジル産鶏肉2検体、デンマーク産鶏肉2検体からそれぞれVanA型VRE株を検出した。それぞれの検出率は3%、67%であった。またこれらVanA型VREの菌種は全て*E. faecium*であった。国

内産食肉からは高度耐性を示す VRE 株は検出されなかった。

2013 年はブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE 株が分離され(検出率 1.3%)、菌種は *E. faecium* 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 4)。これらの 2 検体はそれぞれ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 3 月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(*E. faecium* GU121-1 株)である(図 9)。我々は過去の VRE 調査において、2009 年 3 月に収集解析した食肉 8 検体から VanN 型 VRE(*E. faecium*)合計 19 株を分離した(型別不明 VRE として以前保存していた株のレトロスペクティブな解析により新たに判明した)。それら 8 検体は全て国内産鶏肉(宮崎県産)であった。19 株の VanN 型 VRE を PFGE 解析した結果、これらは 6 検体 14 株と 2 検体 5 株の全く異なる 2 つのパターンに分かれた(図 10)。6 検体 14 株の VRE は 2011 年に分離し報告した VanN 型 VRE 株(*E. faecium* GU121-1)と同一の PFGE パターンを示したことから由来が同じクローンと考えられた。他の異なるパターンを示す 2 検体 5 株のうち代表株(*E. faecium* AA-22)を 1 つ選び、宿主染色体遺伝子の MLST 解析を行った。その結果、この株は 2011 年分離の GU121-1 株の ST669 とは全く異なる新規の ST 型(ST862)であった。この新規 ST862 は ST240 と *atpA* 遺伝子配列が 1 塩基異なるのみの *E. faecium* 株でこれらは極めて近縁の遺伝子型を持つことが明らかとなった(表 5)。この ST240 は世界で初めて分離された VanN 型 VRE(*E. faecium* UCN71)株である(図 9、表 5)。ST240 と ST862 は ST669 同様、ヒトや家畜において拡がっている主なクローン株とは異なる別の遺伝子型 *E. faecium* 株であった(図 12)。

今回の調査で 2013 年度に国産鶏肉 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 11)。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 5)。

D. 考察

2011 年、2012 年の調査では食肉検体から ESBL 生産、および AmpC 生産各種腸内細菌科菌を検出した。しかし、検出頻度は他の報告とは異なり(時には 80%以上の検出率)それぞれ全体で 10%程度と高くなかった。その原因としていくつかの理由が考えられた。他の報告の多くは食肉小売店から購入し収集した検体を用いた調査であった。そのため小売店での食肉加工中に環境菌や他の汚染された食肉の耐性菌が処理器具(まな板や包丁)を介し、本来は汚染されていない食肉に付着したために、著しく高い陽性率となった可能性は否定できない。今回私達が

収集した検体は小売店に流通する以前の段階の食肉であった。それらの違いによって見かけ上、検出頻度に大きな差を認めた可能性が考えられた。一方で食肉検体からの検出方法の感度が低かった可能性も考えられた。食肉検体に目的以外の他の菌の付着が多い場合、あるいは検出菌の付着が極めて少ない場合、増菌処理後であっても目的とする菌が検出限界以下になることが考えられる。また食肉収集の過程で凍結溶解が繰り返されるため、また検体収集から検査までの時間経過中に付着菌の大部分が死滅減少してしまったことも予想される。2013 年度には検出率の改善を目指し、検出方法を改変した。最初に検体を ABPC 添加液体培地によって前培養を行い、その培養液を低濃度の CAZ あるいは CTX 添加寒天平板培地へ塗布する操作とした。この改良によって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。本調査研究では、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。検出方法を変更した 2013 年度の某国内施設からの検体では ESBL 生産菌の検出率は 100%(30 検体中 30 検体陽性)であったのに対し、別の施設からは 0%(30 検体全てが陰性)であった。その施設から送付された検体試料のほとんどが乾燥に近い状態であることなど検体の採取方法や送付方法などに手技的な問題もあることが示された。今後、より正確な調査のために各施設での検体採取方法の改善指導が必要であろう。

食肉由来株とヒト由来株(臨床分離株)とでは ESBL 生産株の CTX 型遺伝子の種類とその頻度が異なっていた。これらの結果は一見、家畜環境の耐性菌と臨床の耐性菌とは直接的な関連性が低いことを示している。一方、検出された ESBL 遺伝子型、AmpC 遺伝子型の多くがプラスミド性であるとされることから、伝達性プラスミドを介した腸内細菌科細菌間での耐性遺伝子の伝達による耐性菌の伝播、拡散が生じていることを否定はできない。特に CTX-M1 型耐性遺伝子は食肉由来株でも臨床分離株においても 20%~30%の頻度で分離されている。今後は、これらの共通する特定の耐性遺伝子に着目した、宿主遺伝子型の比較解析、さらには耐性プラスミドの詳細な解析を進める必要がある。

食肉由来の VRE の調査では、2012 年、2013 年と輸入食肉(鶏肉)から VanA 型 VRE(*E. faecium*)が検出された。特にブラジル産鶏肉から頻度は低いものの継続的に VanA 型 VRE が検出されている。また 2012 年には検体数が少ないものの、デンマーク産鶏肉から高頻度(3 検体中 2 検体)で VanA 型 VRE(*E. faecium*)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。ヨーロッパ、特にデンマークでは家畜へのグリコペプチド系抗菌薬使用による環境中での VRE の増加とその人への伝播・拡散の危険性が論議され、早くから使用禁止となり、その後も厳格に規制が行われてい

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、本調査の結果は、一度環境中(家畜腸管内)で増加した VRE は、抗菌薬の選択圧の非存在下であっても、比較的長年に環境中に存続することが推測される。一方、VRE の多くは多剤耐性菌であるためにグリコペプチド系以外の他の家畜用抗菌薬、あるいは飼料添加物としての抗菌物質が現在でも選択圧として働いている可能性が考えられる。今後これら動物用抗菌薬や抗菌飼料添加物と VRE の薬剤耐性との関係を考慮した調査、研究が必要であろう。

VanN 型 VRE(*E. faecium*)はフランスで患者血液から 2008 年に初めて分離され、2011 年に論文報告された新規の VRE である(図 9、表 5)。2013 年度の本調査において、日本の環境中(複数の食肉検体)から互いに類似の遺伝子背景を持つ VanN 型 VRE 株を複数分離した。また過去に収集した食肉検体から得られた耐性株のレトロスペクティブな解析の結果、この VanN 型 VRE は 2008 年度に収集された食肉検体に既に存在していた。さらにその一部の株において宿主菌の遺伝子型がフランスの臨床分離株と極めて類似し、遺伝的な関連性を認めた(表 5)。これらの結果は、新規 VanN 型 VRE は既に日本国内の家畜環境中(養鶏)に拡散していることを示唆しており、同時に VRE において環境からヒト、あるいはヒトから環境への伝播・拡散の可能性を強く示すものと考えられた。VanN 型耐性遺伝子は伝達性プラスミド上に存在することが我々の解析から明らかとなっている。今後、国内で分離された複数の VanN 型 VRE 株におけるバンコマイシン耐性伝達性プラスミドの比較解析によって関連性が明らかになることが期待される。また国内の養鶏用ひな鳥の一部はフランスから輸入されている。日本の鶏肉から分離された VanN 型 VRE はフランスから輸入ヒナ鳥を介し伝播してきた可能性も強く疑われる。今後、フランスで臨床分離された VanN 型 VRE と国内の VanN 型 VRE の比較解析、さらにはフランスから輸入されるヒナ鳥の VRE の保菌状況の調査、研究が望まれる。また国内での養鶏環境における VanN 型 VRE の拡散、汚染状況を正確に把握する必要がある。

一方、他の Van 型 VRE 同様、環境中で増加しつつある新規 VanN 型 VRE が国内のヒト環境中へ伝播、拡散する(既にしている)ことが十分に予想される。今後、ヒト環境、臨床(病院)での VanN 型 VRE 株の分離、感染症の発生が危惧される。

E. 結論

国内外の食肉(豚、鶏)から ESBL 生産および AmpC 生産腸内細菌科菌を検出した。食肉由来の ESBL 生産・AmpC 生産腸内細菌科菌は主に大腸菌であった。

VRE の調査ではブラジル産輸入鶏肉およびデンマーク産鶏肉から VanA 型 VRE(*E. faecium*)株が検出された。一方、異なる産地の国内産鶏肉検体から複数の VanN 型 VRE(*E. faecium*)株が検出された。その多くが同じ宿主遺伝子型であったことから、同一起源

の VanN 型 VRE 株による国内の家畜環境中(養鶏)での伝播・拡散が示唆された。一部の株はフランスの VanN 型臨床分離株と類似の遺伝型であり、臨床株と環境株との関連性が強く疑われた。今後、国内のヒト環境への新規 VanN 型 VRE の伝播・拡散、および感染に注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura T, Tanimoto K, Shibayama K, Arakawa Y, Fujimoto S, Ike Y, Tomita H. Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 56:6389-6392. (2012).
- 2) Kurushima J, Hayashi I, Sugai M, Tomita H. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan D-isoglutamyl-L-lysine endopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 288:36915-36925. (2013).
- 3) 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).
- 4) 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) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、池康嘉、富田治芳 . VanN 型バンコマイシン耐性腸球菌の解析 . 第 86 回日本細菌学会総会 . 2013 年 3 月 20 日 千葉 .
- 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 42 回薬剤耐性菌研究会 . 2013 年 10 月 17 日 静岡
- 3) 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.
- 4) 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 .
- 5) 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

