

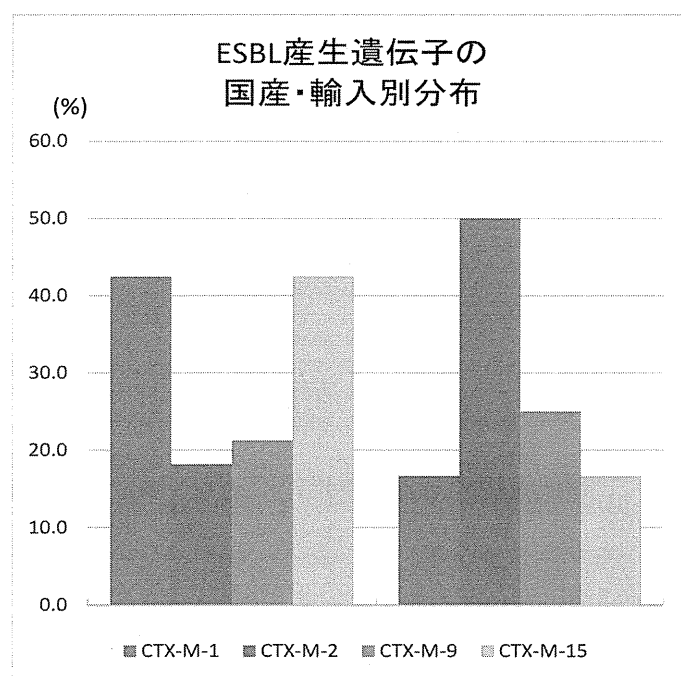


図 1. 国産鶏肉と輸入鶏肉別の ESBL 産生遺伝子型別

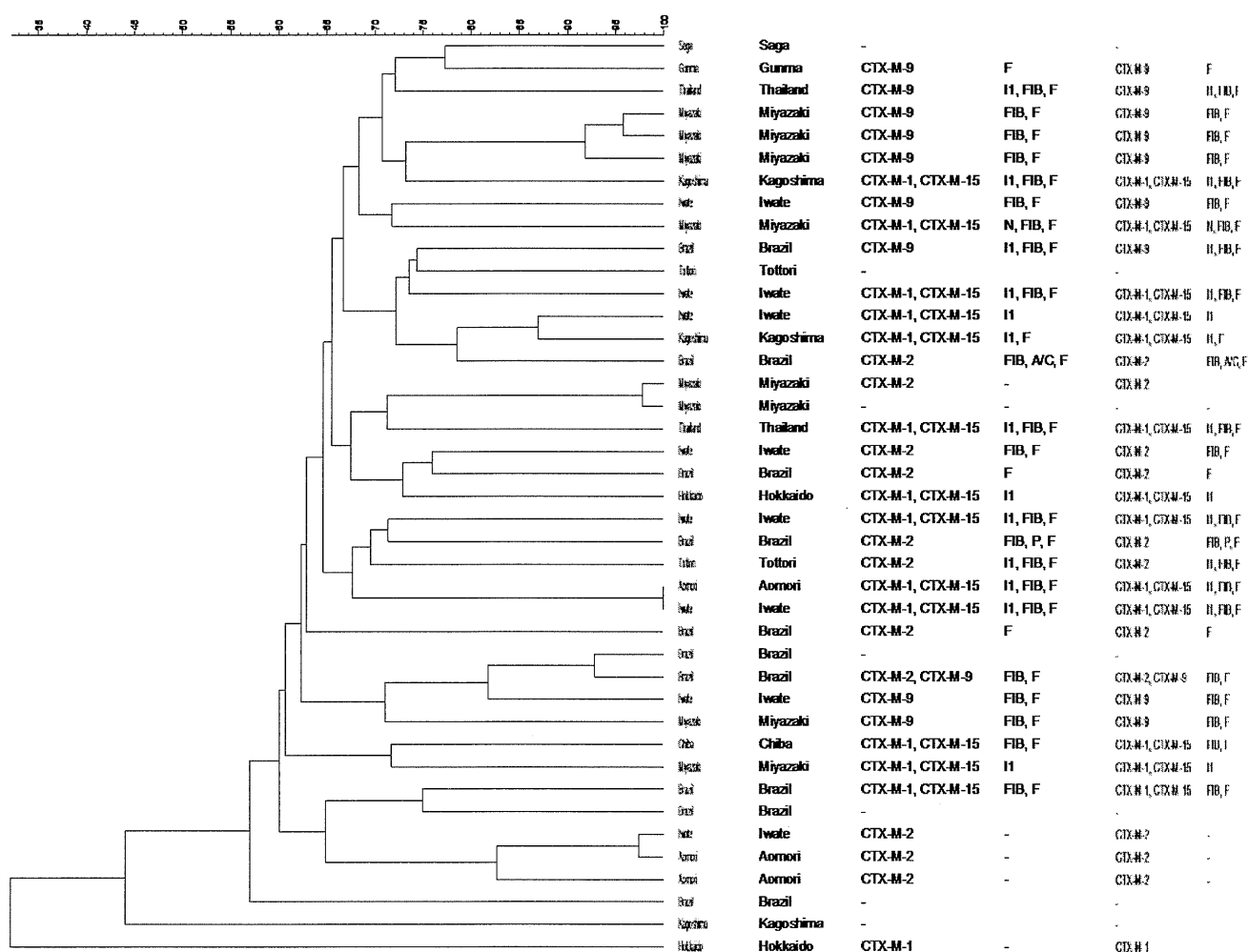


図 2. ESBL 産生大腸菌の *XbaI*-PFGE 型別

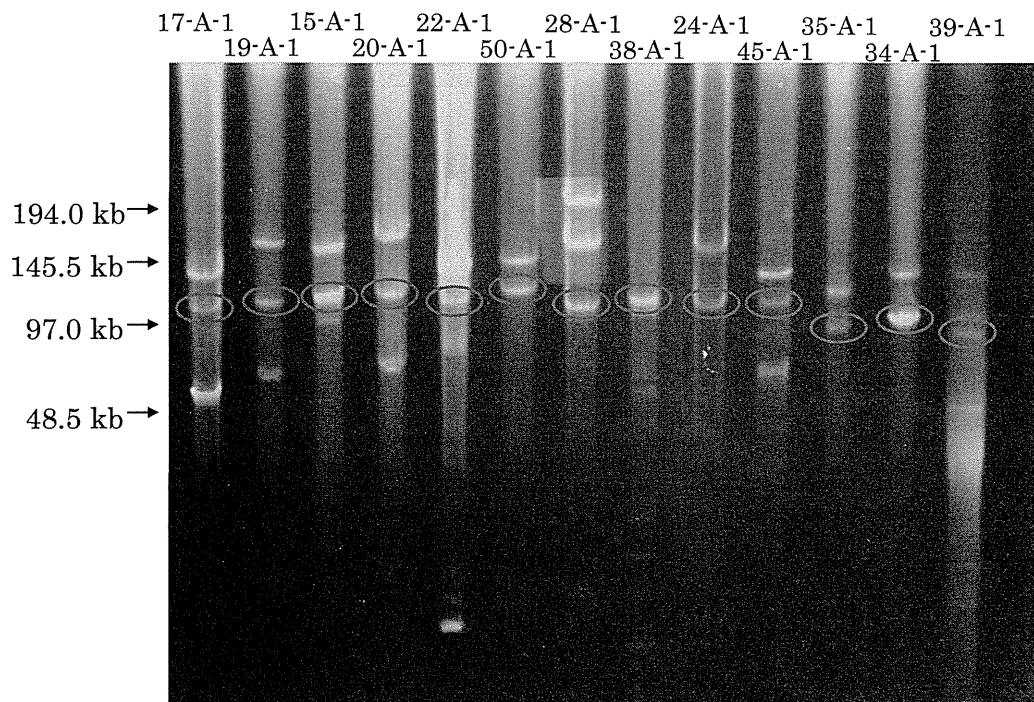


図 3. IncI1 プラスミド保有株が持つプラスミドの解析

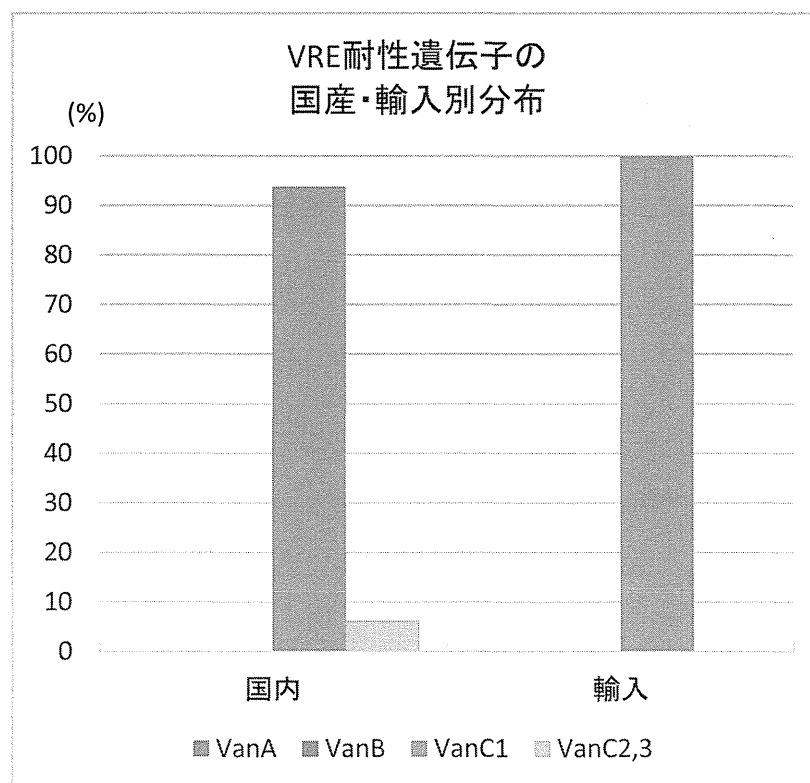


図 4. 国産鶏肉と輸入鶏肉別の VRE 産生遺伝子型別

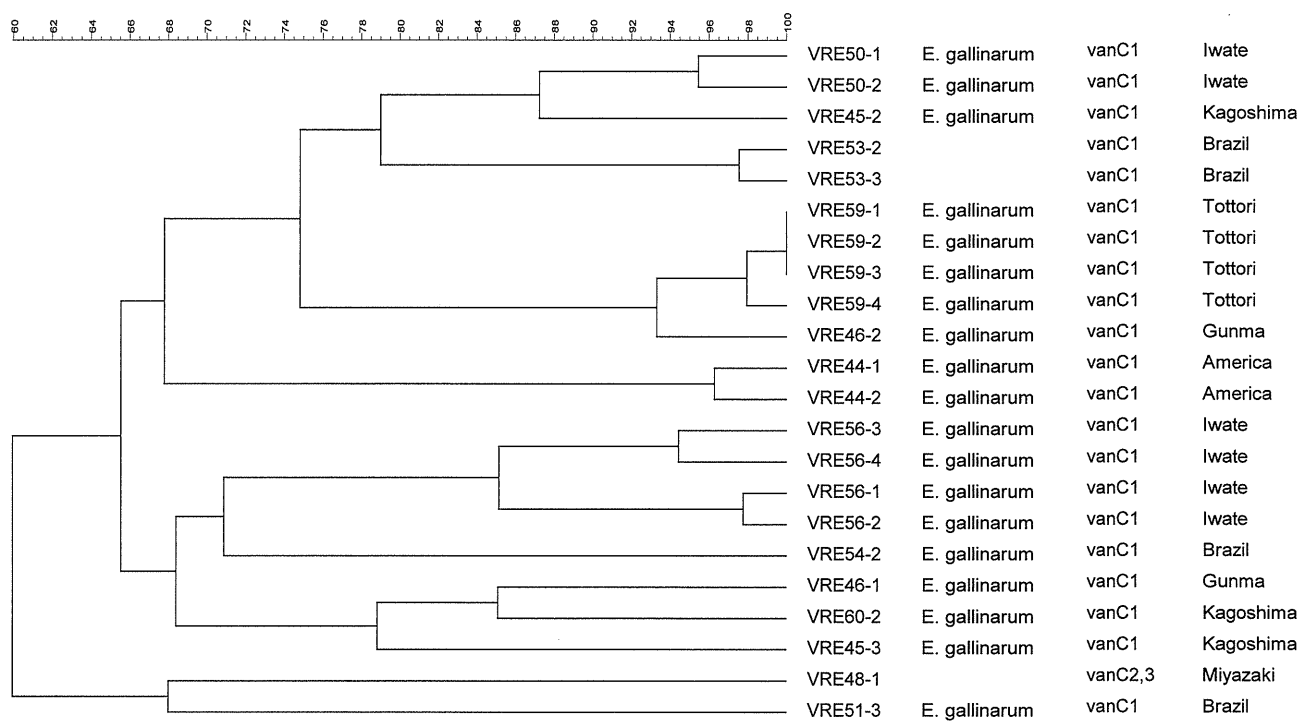


図 5 . VRE の *SmaI*-PFGE 型別

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 JANIS データとの連携に関する研究

研究分担者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

研究要旨

この研究では、食品由来細菌の耐性状況のデータを収集し、家畜—ヒトのデータに繋ぐ体制を構築することを目的とする。これまで厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) の人由来大耐性菌データと農林水産省家畜由来耐性菌モニタリングシステム (JVARM) との連携体制を構築してきたが、さらに食品由来耐性菌のデータを連携させることを目標とする。菌種としてはまずサルモネラを対象とする。人由来サルモネラでは、2011 年 JANIS データの解析の結果、セフトキシム耐性は 0.8% (11/1429 株)、セフトジジム耐性は 0.8% (14/1681 株)、イミペネム耐性は 0% (0/1649 株)、レボフロキサシン耐性は 2% (40/1966 株) だった。血液由来株に限っても同様の結果であり、セフトキシム耐性は 0% (0/96 株)、セフトジジム耐性は 0% (0/120 株)、イミペネム耐性は 0% (0/109 株)、レボフロキサシン耐性は 2% (3/124 株) だった。食品由来のサルモネラの薬剤耐性については、地方衛生研究所が通常解析を行っているので、今後共同研究を進めて同様の形式で集計を行う予定である。なお、人由来のサルモネラの薬剤耐性については WHO が主導するサーベイランス Global Antimicrobial Resistance Surveillance System にデータを提供する予定である。

A. 研究目的

WHO は 2015 年の総会で薬剤耐性菌対策に関する Global Action Plan を採択し、各国に対策を求めた。Global Action Plan が目標としてあげる課題には、サーベイランスと研究の強化 (To strengthen the knowledge and evidence base through surveillance and research) が含まれている。この研究では、人、家畜、食品における薬剤耐性菌の実態を統合的に把握する体制の構築を目指している。今年度は、厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) のデータから人由来のサルモネラならびにその他 WHO が主導するサーベイランス Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) が報告を求める菌種の薬剤耐性を集計し、今後食品由来の情報と連携するにあたっての課題を整理した。

なお、GLASS は人の検体を対象とし、血液由来の大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、尿由来の大腸菌、*K. pneumoniae*、便由来のサルモネラ、赤痢菌、尿路、膣由来の淋菌を対象として各国にデータの報告を求めている。GLASS は食品由来株の調査については触れていないが、昨今食品由来の菌株の薬剤耐性率が非常に高いことが報告されていることから、今後国としてのデータを整備し、さらに人由来菌や家畜由来菌と比較できるようにすることは重要である。

B. 研究方法

GLASS が報告を求めるサルモネラ、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌について、JANIS のデータ整理、解析した。

倫理面への配慮

JANIS のデータ利用にあたっては、統計法に基づく利用申請を行った。

C. 研究結果

JANIS 検査部門データの解析から、サルモネラでは 2010 年でセフトキシム耐性は 0.8% (11/1429 株)、セフトジジム耐性は 0.8% (14/1681 株)、イミペネム耐性は 0% (0/1649 株)、レボフロキサシン耐性は 2% (40/1966 株) だった (図)。血液由来株に限っても同様の結果であり、セフトキシム耐性は 0% (0/96 株)、セフトジジム耐性は 0% (0/120 株)、イミペネム耐性は 0% (0/109 株)、レボフロキサシン耐性は 2% (3/124 株) だった (表)。

なお、GLASS が報告を求める他の菌種については、2013 年の JANIS 検査部門公開情報によると大腸菌のイミペネム、メロペネム耐性は 1% 未満、レボフロキサシン耐性は 35.5%、セフトキシム耐性は 17.8% だった。*K. pneumoniae* では、イミペネム、メロペネム耐性は 1% 未満、レボフロキサシン耐性は 2.5%、セフトキシム耐性は 5.1%、だった。*A. baumannii*

ではイミペネム、メロペネム耐性は 2.3%、アミカシン耐性は 3.5%だった。黄色ブドウ球菌では、51%が MRSA だった。肺炎球菌では 47.5%がペニシリン耐性だった。なお、GLASS は各菌種について検体別のデータを求めているが、JANIS 検査部門は通常、検体別の集計は行っておらず、また入院患者のみの解析である。しかしながら、参加病院から提出されるデータには、検体の情報や入院、外来別の情報も含まれているため、今後その解析を行う予定である。

JANIS は比較的大規模な医療機関が多く参加しているため、赤痢菌についてはデータが少ない。便由来の赤痢菌については地方衛生研究所と国立感染症研究所の連携により多くの菌株が収集されているため、これらを解析することで National data として十分代表性がある集計が得られると考えられた。

便由来のサルモネラについても同様に、JANIS は比較的大規模な医療機関のデータが多いのでバイアスがある。そのため、中小の医療機関を対象とした病原体サーベイランスが必要である。今後、地方衛生研究所、国立感染症研究所での体制の整備が必要である。

GLASS では、淋菌の調査も求められている。淋菌については、臨床現場ではほとんどが核酸検査により検出が行われており、培養は治療困難例など限られていることが分かった。大手検査会社では、CLSI の標準法ではなく独自に標準化した検査法により薬剤感受性試験を実施しているが、培養は 1 日に数件程度とのことだった。このように大手検査会社が持っているデータは、収集されている検体にバイアスがあるため、正確な集計ができない可能性があると思われた。淋菌については、協力病院を決めて病原体を収集し、標準化した方法で薬剤感受性試験を実施する体制を構築する必要があると考えられた。

D. 考察

食品では地方衛生研究所がサルモネラ、EHEC、キャンピロバクターなどを分離培養し、薬剤感受性試験を実施しているが、現在は各所がそれぞれに集計して公表している。各地方衛生研究所で標準化された収集方法や集計法を作成し、データを集積していく必要があると考えられる。来年度は食品分離菌について、JANIS で人由来菌株で作成しているアンチバイオグラムと同様のものを作成するツールを整備する。また、GLASS が求めている調査対象の菌種のうち、便由来、血液由来サルモネラの薬剤感受性を 2011 年から 2014 年までの JANIS 検査部門のデータから集計し、GLASS に報告する。

E. 結論

便由来サルモネラ、食品由来サルモネラについては、地方衛生研究所のデータを標準化し活用することで薬剤耐性に関する情報の集約が可能と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

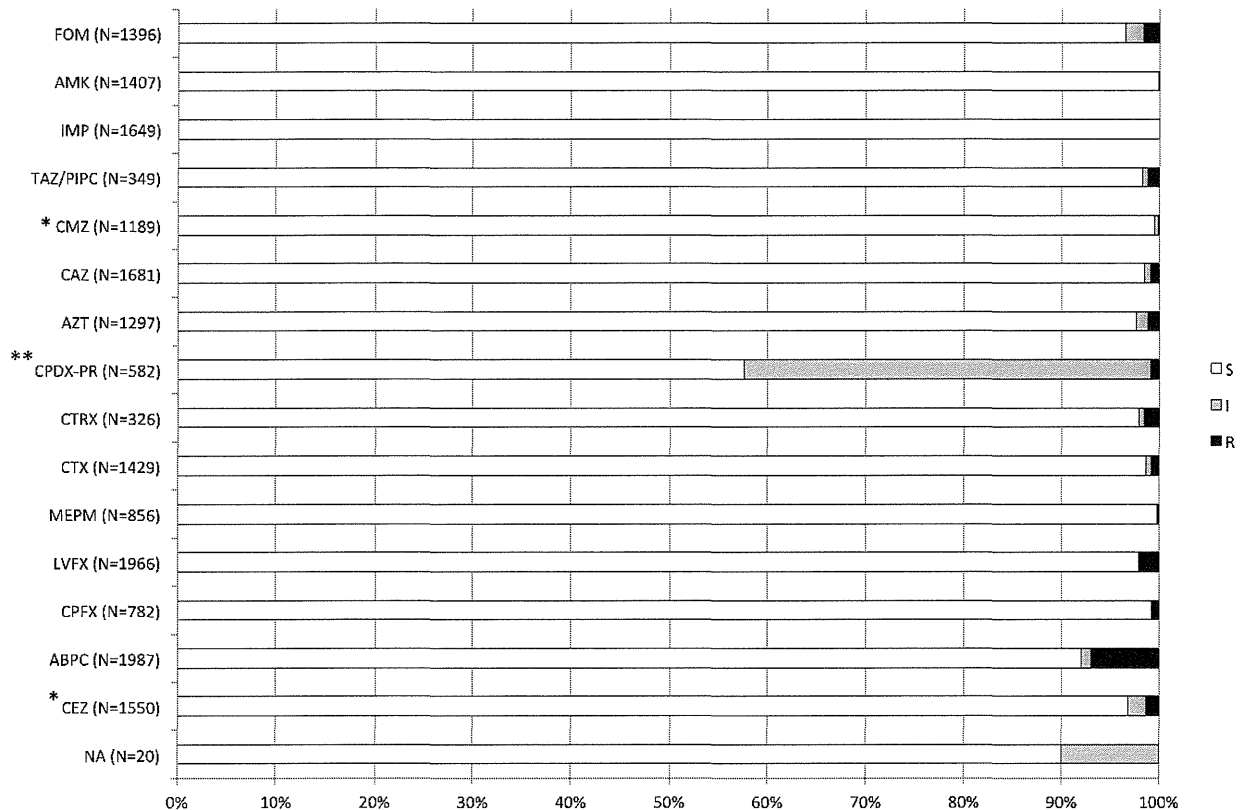
2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

全検体由来Salmonella spp.の薬剤感受性 2011年



*第一世代、第二世代セファロスポリン、セファマイシンは通常臨床へはRと報告されるが、ここでは検査上の結果を表示した。 **CPDXのIIは、R以外の判定を含む。



2011年にJANIS参加機関で血液から分離されたSalmonella spp. の薬剤感受性

CPFX	LVFX	CTX	CTR	CAZ	IPM	MEPM
S 53	S 121	S 96	S 19	S 120	S 109	S 58
I 0	I 0	I 0	I 0	I 0	I 0	I 0
R 1	R 3	R 0	R 0	R 0	R 0	R 0
Total 54	Total 124	Total 96	Total 19	Total 120	Total 109	Total 58

うち、S. typhi、S. paratyphi Aの薬剤感受性

CPFX	LVFX	CTX	CTR	CAZ	IPM	MEPM
S 6	S 14	S 11	S 3	S 14	S 12	S 7
I 0	I 0	I 0	I 0	I 0	I 0	I 0
R 1	R 1	R 0	R 0	R 0	R 0	R 0
Total 7	Total 15	Total 11	Total 3	Total 14	Total 12	Total 7

表

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 非チフスサルモネラ症の起因菌の薬剤耐性に関する研究研究分担者 大西 真 (国立感染症研究所・細菌第一部・部長)
研究協力者 泉谷秀昌 (国立感染症研究所・細菌第一部・室長)

研究要旨

この研究では、サルモネラヒト由来株に焦点をあてて解析する体制構築を目指した。食品からヒトへの菌の伝播を考えるうえで重要な健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った。

A. 研究目的

腸チフス、パラチフスを除くサルモネラ (non-typhoidal Salmonella, NTS) 症は食中毒の中で件数、患者数とも上位を占めることが知られている。また、食品由来感染症（食中毒として捉えることができない事例を含む）としても、カンピロバクター感染症とともに未だ多数の症例が国内で存在することが推定されている。サルモネラ属菌による食品由来推定患者数は年間 14～25 万人程度（2005～2008）とされている（平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業『食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究』：分担研究「宮城県における積極的 食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害者数推定」 分担研究者 窪田邦宏、春日文子、2010、p. 117-136.）。

大規模流通食品の汚染が、直接大規模事例につながる危険がある。そのため、散发例の把握、食品汚染の実態の把握からリスク要因を抽出し、NTS 対策の効率化、高度化が望まれる。また、薬剤感受性プロファイルを理解することで、NTS の動物-ヒト間の伝播の様子を探る上でも分離株の詳細な検討が必要である

本研究では、国立感染症研究所で収集された NTS 株の整理をするとともに、健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った

B. 研究方法

収集菌株情報の整理

細菌第一部において 2010 年から 2015 年にかけて検査依頼を受けた NTS について、解析株数、血清型情報、血清型ごとの薬剤感受性試験結果について整理を行った。

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築
業務従事者の検便を実施している検査会社と面談

し、現状について情報提供を受けた。

倫理面への配慮

いずれも菌株のみの解析であり、個人情報とは連結不可能匿名化されている。

C. 研究結果

収集菌株情報の整理

細菌第一部において 2010 年から 2014 年にかけて検査依頼を受けた NTS 株数は 200～600 株程度であった。2015 年分離株は年度途中であり、100 株程度であった。

血清型としては、Enteritidis, Infantis, Typhimurium, 04:i:-, Schwarzengrund, Manhattan, Thompson, Braenderup, Saitpaul, Oranienburg, Montevideo, Paratyphi B Java, Newport, Nagoya, Weltevreden, Chester, Agona（頻度上位から列記した）等が見出された（図 1）。Enteritidis が約 40% を占め、Braenderup までの頻度上位 8 血清型で 75% 程度を占めていた。

各血清型の薬剤感受性パターンとその頻度を図 2～6 に示した。なんらかの薬剤に耐性を示す割合は各血清型株で大きく異なる（図 2～6 には感受性株の率を丸で囲んだ）。

Enteritidis	(09)	29%
Infantis	(07)	83%
Typhimurium	(04)	56%
04:i:-	(04)	49%
Schwarzengrund	(04)	94%

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築

業務従事者の検便を実施している検査会社と面談し、検便検体全体における NTS 陽性率についての情報を得た。2011 年から 2014 年において、約 0.06% から 0.09% 程度であった（図 7）。また、NTS 全体にお

ける薬剤耐性株の頻度は、ST 合剤に対する耐性が約 11%、AMPC 耐性 6%、ミノサイクリン耐性 4-5%、セファロスポリン耐性 3-4%、フルオロキノロン耐性が 1%未満であった（図 7）。この検査会社において保存されている菌株数は 2013 年 1199 株、2014 年 1191 株、2015 年 1224 株と多数に上ることが判明した。

血清型別は実施されていないが、O 型の分類からは O7 群が 44%、O4 群が 28%、O9 群は 3%(2014 年)であることが示された。2011 年から 2014 年の間に O7 群は減少傾向が認められる一方で、O4 群の増加傾向が認められた。

D. 考察

サルモネラ属菌は様々な動物へ適応することでその多様性を獲得してきたと考えられている。各血清型のサルモネラ属菌の宿主域により、リスク食品や接触感染のリスクが規定される。ヒトへは、食品を介する感染が主であり、一部ヒトと動物の接触によるヒト感染が存在する。ヒト-ヒトの直接感染のリスクは腸チフス原因菌（チフス菌、パラチフス菌）ほど明確ではないが、調理従事者の保菌が食品の汚染の原因となることは否定できない。

腸管に常在する他の細菌が保有する耐性遺伝子保有プラスミドの伝達によって、耐性遺伝子が拡散する現象が古くから知られている。院内感染事例における薬剤耐性プラスミドの伝播を示唆する知見は集積されつつあるが、下痢症関連細菌においても同様の知見が知られている。比較的近年の国内の知見のなかでも、腸管出血性大腸菌が集団の中で伝播する過程で、薬剤耐性プラスミドを獲得して耐性化したことを示唆する報告がある（菊地ら。Cefotaxime 感性および耐性株が混在した保育園における腸管出血性大腸菌 O121 集団感染。感染症学雑誌 88; 430-437, 2014）。また、チフス菌が治療過程で耐性プラスミドを獲得した可能性を示唆する症例の報告もなされている（Morita M et al. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins in *Salmonella enterica* serovar Typhi. Antimicrob Agents Chemother 54: 3991-3992, 2010）。

サルモネラ属菌がヒト腸管内に存在している状態（健康保菌）についての知見には限りがある。本研究で協力を依頼した検査会社で集積された情報からは、比較的高率（0.09% 1100 検便に 1 検体からサルモネラ属菌が分離される）にサルモネラ属菌が分離されていることが示唆された。個人情報付加さ

れていないことから、詳細な検討はできない。しかしながら、これらの分離株を詳細に解析することでサルモネラ属菌の耐性化機構の一つの側面を考察することが可能となると考える。

国立感染症研究所において過去に収集されたサルモネラ属菌の血清型頻度の最も多い Enteritidis は比較的薬剤感受性が保たれている可能性がある一方で、第2位の Infantis は耐性化傾向が強い。また、第3位-5位の Typhimurium, O4:i:-, Schwarzengrund も比較的耐性化傾向が高い。Typhimurium, O4:i:-, Schwarzengrund は同じ O4 群に属する血清型であるが、検便検体から分離されるサルモネラ属菌の O 群の分布からは、O4 群は近年増加傾向にあるも血清群として捉えられている。

現在、協力検査会社でストックされている菌株のうち、O4 群に属する菌株の血清型別と薬剤感受性試験を実施するための体制構築を開始した。約 400 株のデータを集積して患者由来株との比較解析を実施する予定である。

E. 結論

検便検査会社の協力をえて、O4 群サルモネラ属菌の性状解析を実施するための体制の構築を始め、来年度第 1 四半期から菌株の提供と、性状解析が実施する計画が立てられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

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 なし。

感染研 細菌第一部に検査依頼あるいは収集
Non-typhoidal Salmonella

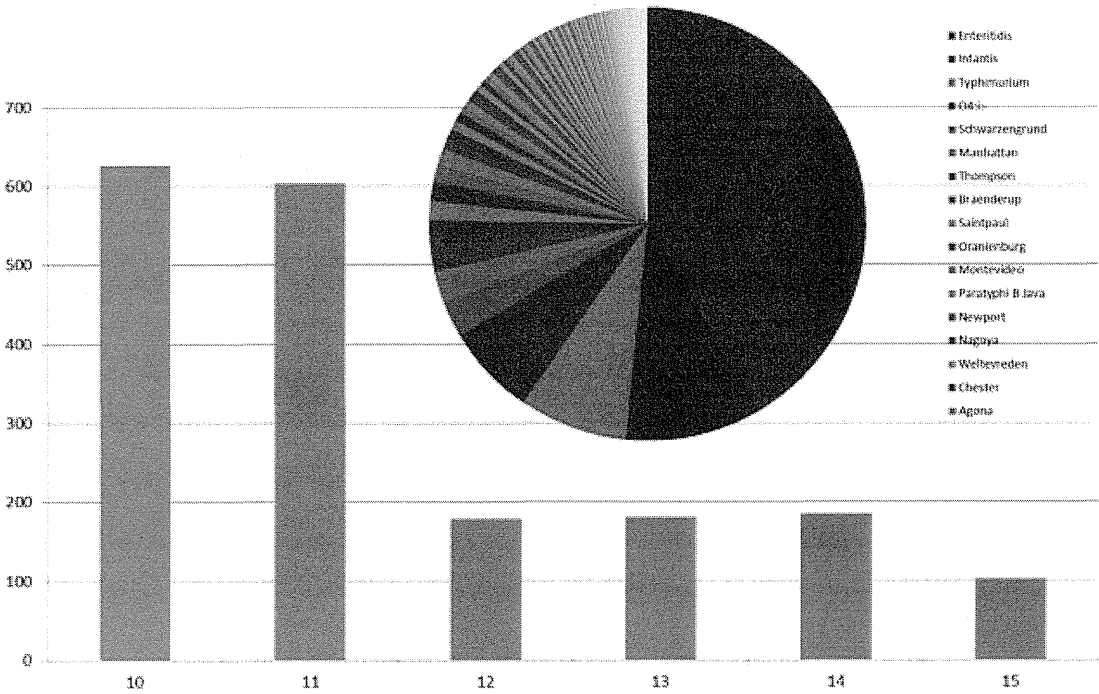
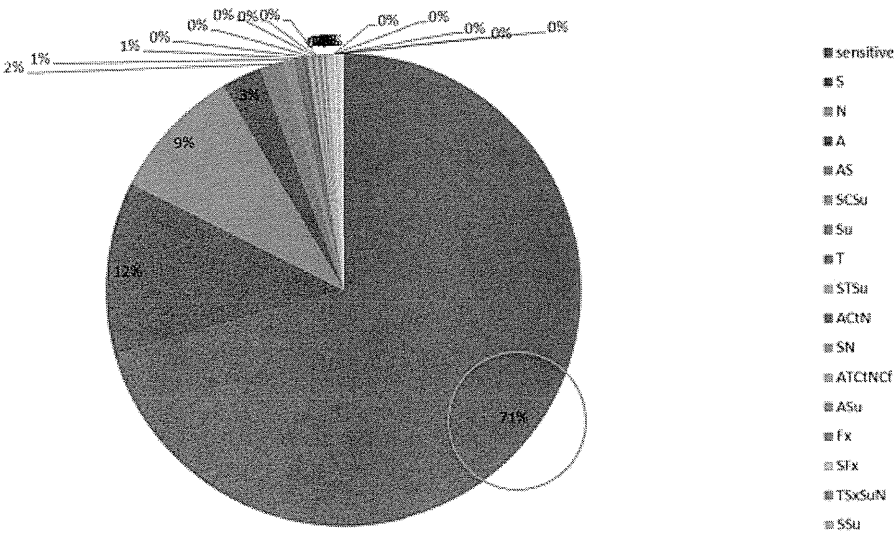


図 1

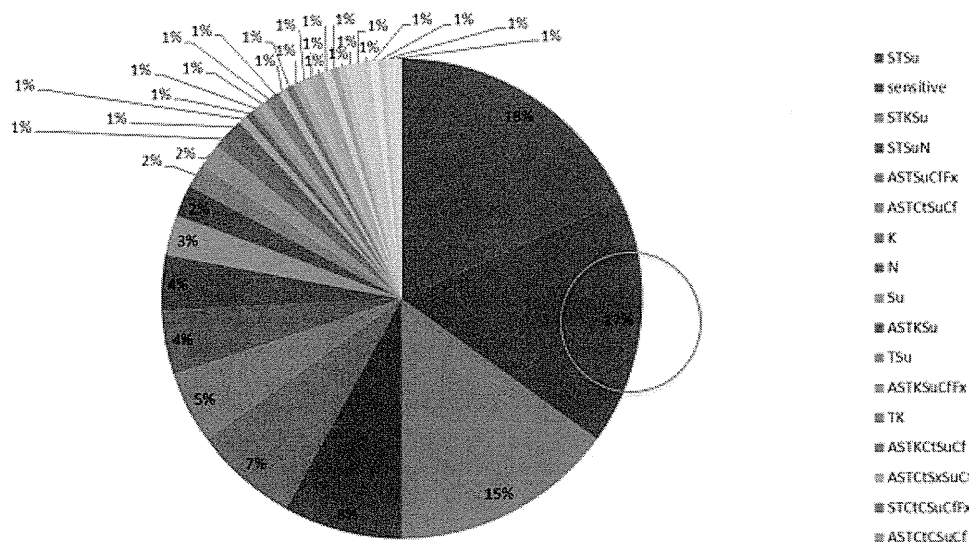
薬剤耐性パターン
Enteritidis (O9)



N=735

図 2

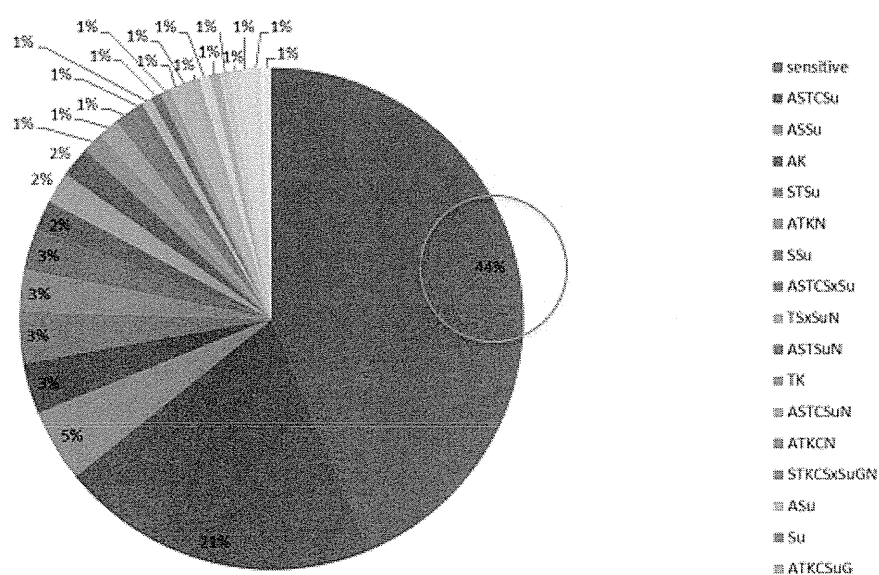
薬剤耐性パターン Infantis (O7)



N=186

図3

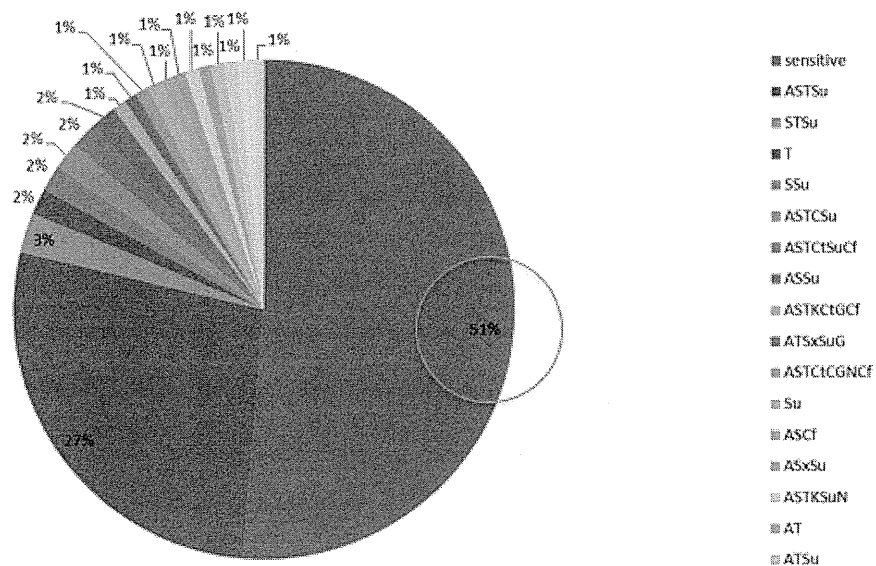
薬剤耐性パターン Typhimurium (O4)



N=151

図4

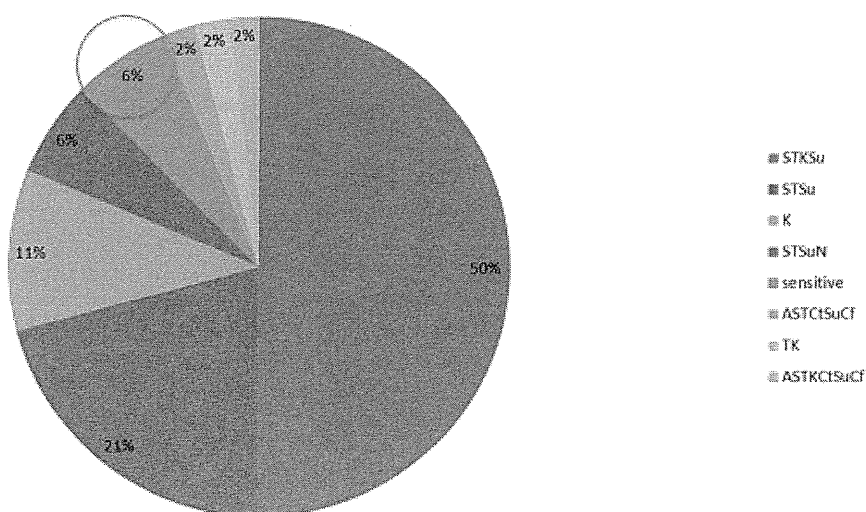
薬剤耐性パターン 4:i:- (O4)



N=117

図5

薬剤耐性パターン Schwarzengrund (O4)



N=48

図6

保菌者一検便由来

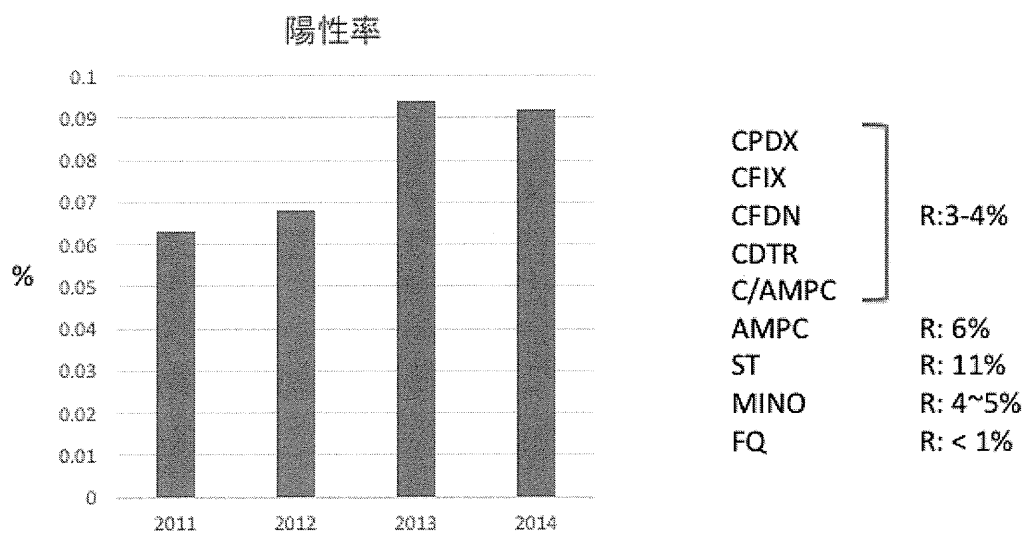


図7

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 27 年度 分担研究報告書食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 「食肉中の多剤耐性菌（VRE, ESBL 産生菌など）に関する調査、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・教授）
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・准教授）

研究要旨

この研究では、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 産生菌、AmpC 産生菌）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。2014 年度（2015 年 2～3 月）に収集した国内産食肉（鶏肉）60 検体、輸入食肉（鶏肉）61 検体の合計 121 検体を調査した。ESBL 産生菌は 64 検体陽性（52.9%）、AmpC 産生菌は 72 検体陽性（59.5%）であった。ESBL 産生菌は国内産鶏肉から高頻度で検出され（国内産 78.3%、輸入 27.9%）、一方 AmpC 産生菌の検出率も国内産が 83.3%、輸入食肉が 36.1%と国産肉の方が高かった。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では TEM 型（79.2%）、CTX-M 型（63.6%）が多く、輸入肉では CTX-M 型（96.0%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産は CTX-M-2、輸入食肉は CTX-M-2、CTX-M-8/25 が主に分離された。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された。これら食肉から分離される多剤耐性腸内細菌科細菌の約 9 割は大腸菌であった。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（国別頻度 2.6%）。また新規の VanN 型 VRE が国内産鶏肉 2 検体から検出された。VanN 型株の 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、さらには過去に分離した国産鶏肉由来 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 産生菌、および AmpC 産生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 39 検体、米国産 8 検体、タイ産 8 検体、フィリピン産 6 検体の合計 61 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 産生菌および AmpC 産生菌（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 産生確認のために CTX、CAV、CAZ ディスク、AmpC 産生確認のために 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（DDST）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、VCM 4mg/L 加 Enterococcosel Broth で 48 時間選択的増菌後、VCM 4mg/L 加 Bile Esculin Azide agar 選択培地に塗布し、得られたコロニーを VCM 4mg/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 産生菌および AmpC 産生菌の調査・検出のために 2014 年度 (2015 年 2 月～3 月) に収集した国内産鶏肉 90 検体、輸入鶏肉 61 検体の合計 151 検体を解析した。このうち鹿児島から送付された検体が乾燥しており、いずれの検体からも細菌コロニーの生育を認めなかった。そのため、今回の結果では鹿児島の 30 検体分は除外し、実質的な調査検体数を合計 121 検体 (国内 60 検体、輸入 61 検体) とした。食肉検体全体での検出頻度は ESBL 産生菌が 64 検体陽性 (52.9%)、AmpC 産生菌は 72 検体陽性 (59.5%) であった。(図 1)。国内産食肉と輸入食肉との比較では ESBL 産生菌は国内鶏肉からの検出率の方が高く (78.3%)、一方 AmpC 産生菌も国内産鶏肉の方が高かった (83.3%)。輸入検体からの検出頻度はそれぞれ 27.9% と 36.1% であった。国内産食肉由来 ESBL 産生菌および輸入食肉由来 ESBL 産生菌の検出結果、及び耐性遺伝子型の解析の詳細を図 2、図 3 に示す。また同様に AmpC 産生菌の遺伝子解析結果は図 4 に示す。耐性遺伝子型の解析では ESBL 産生菌は CTX-M 型と TEM 型が多く、国内産は CTX-M-2 (69%) と CTX-M-1 (25%)、輸入食肉は CTX-M-2 (54%) と CTX-M-8/25 (33%) がそれぞれ主に分離された。一方、AmpC 産生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 産生株、AmpC 産生株 (合計 169 株) の菌種としては *Escherichia. coli* が最多であり (153 株 91%)、次いで *Klebsiella*

pneumoniae (7 株 4%)、*Citrobacter freundii* (4 株 2%) が多く分離された (図 5)。

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 (1.6%) (表 1)。ブラジル産鶏肉における検出率としては 2.6% (1/39 検体) であった。ブラジル産鶏肉検体からの VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株の検出は本調査において 3 年間連続であったが、は PFGE 法による染色体パターンと比較解析からは過去の株との同一性、明らかな類似性は認められなかった (図 6)。一方、国内産鶏肉 2 検体から VanN 型 VRE 株が検出され (2/60 検体: 検出率 3.3%)、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。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、これまでに本調査で報告した VanN 型 VRE 株 *E. faecium* 株と極めて類似の PFGE パターンを示した (図 7)。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 型株が以前に分離された株と同一の起源を持つことを示している。また国内産鶏肉 1 検体から VCM 低感受性腸球菌 *E. faecalis* 株が分離された (表 2)。耐性度が低く (MIC 値 4 mg/L)、既知の Van 型遺伝子も検出されなかったことから菌の細胞壁合成・代謝系の変異による薬剤低感受性株と推測される。

D. 考察

食肉検体から ESBL 産生、および AmpC 産生各種腸内細菌科菌を検出した。二年前までの本調査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。昨年度からの調査では、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。改良した検出方法により、一昨年度までと比べ、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、昨年と同様に一部の検査所 (鹿児島) から送付された検体が乾燥気味であり、菌コロニーの生育が全く認められず、その機関での検体の採取・送付方法の手技的な問題が考えられた。今回の調査結果として、それらの 30 検体を除いた実質的な検出率を報告している。そのため昨年度と比べ特に国内産鶏肉からの多剤耐性腸内細菌科菌 (ESBL 産生菌、AmpC 産生菌) の検出率はさらに高い値 (98%) となっている。

VRE に関しては、これまでの調査と同様、今回もブラジル産鶏肉から頻度自体は低いものの (分離率 2.6%)、臨床で問題となる 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ボ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し、VRE による食肉の汚染が持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、これらの同一の起源を持つ 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。今回国産鶏肉から分離された VRE 株はいずれも VCM の MIC 値 4 mg/L と臨床的に問題となる高度耐性株ではなかった。そのため、これらの耐性株がヒトへ伝播・拡散しても、医療上、直ちに大きな問題となる可能性は低いことが予想される。しかし、ヨーロッパでは VanN 型 VRE 株によるヒト感染（菌血症）も報告されていることから、今後の動向を注意深く監視してゆく必要はあるだろう。

E. 結論

国内産鶏肉及びの輸入鶏肉から ESBL 産生または AmpC 産生の多剤耐性腸内細菌科菌（主に大腸菌）がそれぞれ 98%、54%の高頻度で検出された。

ブラジル産輸入鶏肉から VanA 型 VRE が 2.6%の頻度で検出された。国内産鶏肉検体から同一起源と考えられる VanN 型 VRE 株を複数分離したことから、VanN 型 VRE 株の国内の家畜環境中での伝播・拡散が

強く疑われた。

F. 健康危険情報

家畜環境中の多剤耐性菌が食肉を介してヒトに伝播する危険性が示され、食肉（生肉）の取り扱いには注意が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし（投稿準備中）
2. 学会発表
 - 1) 野村隆浩、谷本弘一、久留島潤、柴山恵吾、渡邊治雄、富田治芳。日本で新たに分離された VanN 型 VRE の解析。第 88 回日本細菌学会総会。2015 年 3 月 27 日 岐阜。
 - 2) 野村隆浩、谷本弘一、富田治芳。新たに日本で分離された VanN 型 VRE について。第 26 回日本臨床微生物学会。2015 年 2 月 1 日 東京。
 - 3) 千葉菜穂子、谷本弘一、野村隆浩、富田治芳。ESBL/AmpC 産生腸内細菌科細菌の鶏肉からの分離。第 44 回薬剤耐性菌研究会。2015 年 10 月 30 日 仙台。

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 なし

図1. 2015年に収集した鶏肉検体における
ESBL / AmpC産生株の分離頻度

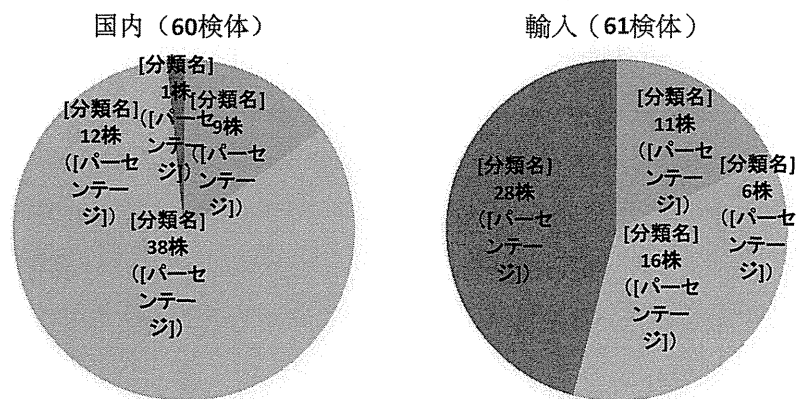


図2. 2015年分離のESBL産生株の耐性遺伝子の型別

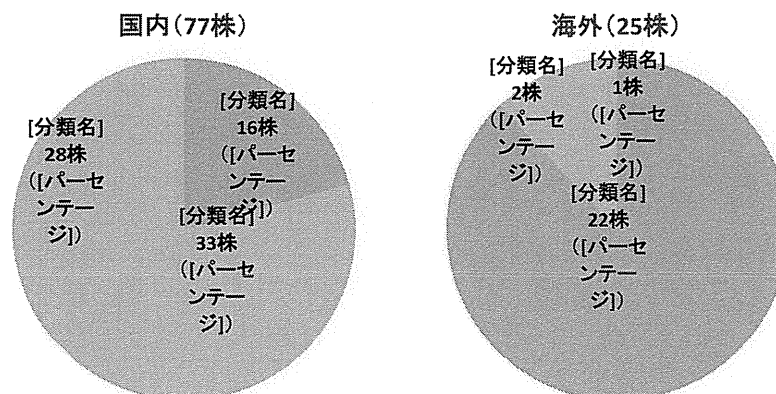


図3. 2015年分離のESBL産生株のCTX-M遺伝子の型別

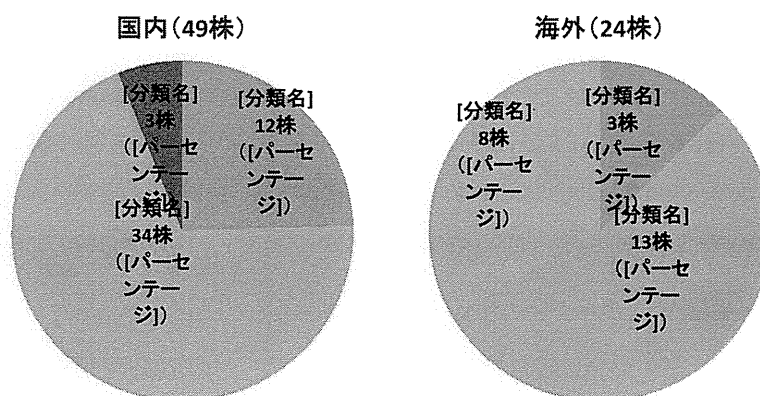


図4. 2015年分離のAmpC産生株の耐性遺伝子の型別

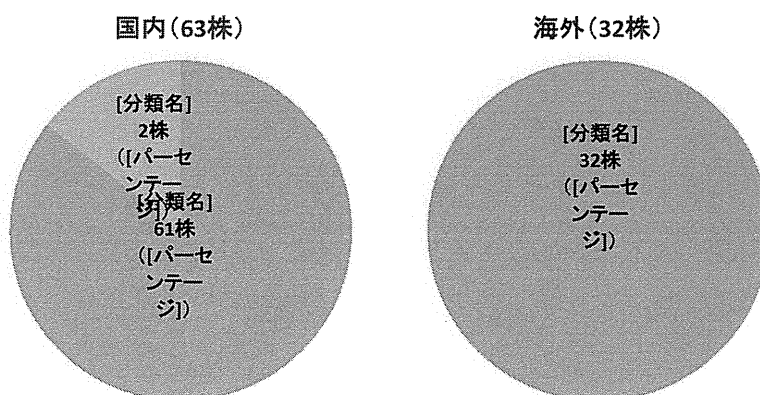


図5. 2015年分離の鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の菌種

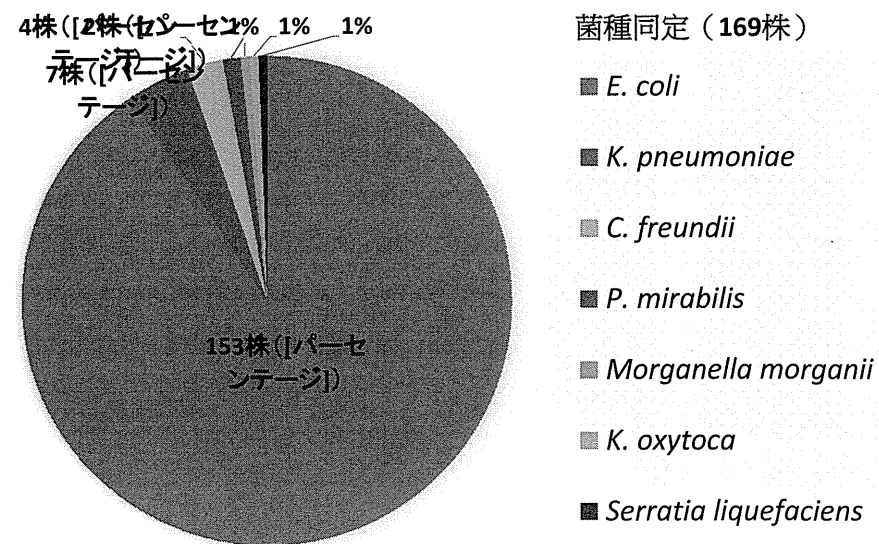


表1. 輸入鶏肉検体からのVREの分離

表 1 . 輸入鶏肉からのVRE の分離

国名	検体数	VRE		遺伝子型	菌種	Glycopeptide耐性値		分離数 (%)
		が分離された 検体番号	分離した株			(MIC,µg/ml)		
						Vancomycin	Teicoplanin	
ブラジル	39	66229706	114-1	vanA	E. faecium	256以上	3	2.56%
			114-2			256以上	4	
アメリカ合衆国	8							0%
タイランド	8							0%
フィリピン	6							0%

図6. ブラジル産鶏肉由来VanA型VRE(*E. faecium*)株の染色体DNAの比較

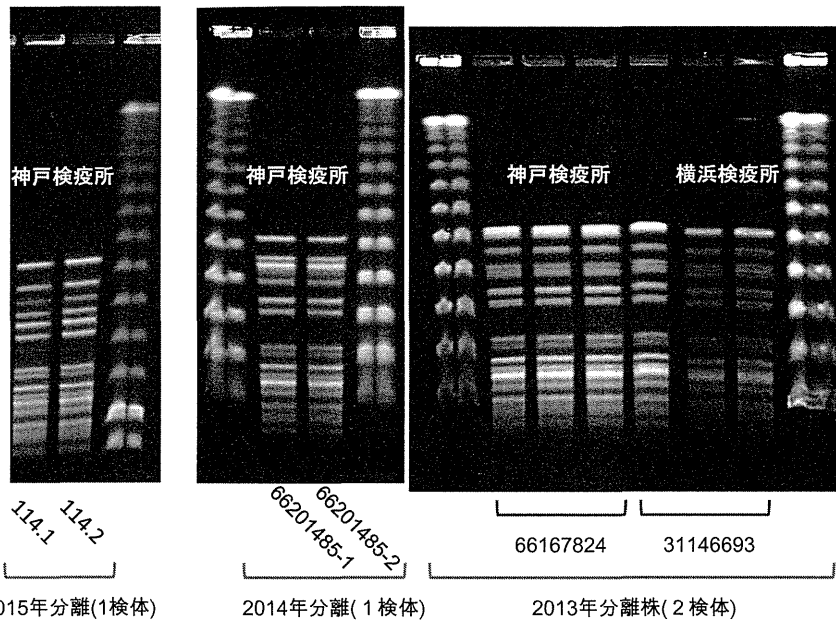


表2. 国産鶏肉検体からのVREの分離

表2. 国内産鶏肉からのVREの分離

県名	検体数	VRE		遺伝子型	菌種	Glycopeptide耐性値		分離数 (%)
		が分離された 検体番号	分離した株			(MIC, µg/ml)(E-Test)		
						Vancomycin	Teicoplanin	
鹿児島県	30	鹿-27	27-1	不明	<i>E. faecalis</i>	4	0.125	3.3%
			27-2			4	0.125	
宮崎県	30							0%
群馬県	30	No.2	62-1	<i>vanN</i>	<i>E. faecium</i>	4	1.5	6.7%
			62-2			4	1	
			42℃ 62-1			4	1.5	
			87-2			4	1.5	
			No.27			42℃ 87-1	4	

図7. 国産鶏肉由来VanN型VRE (*E. faecium*) 株の染色体DNAの比較

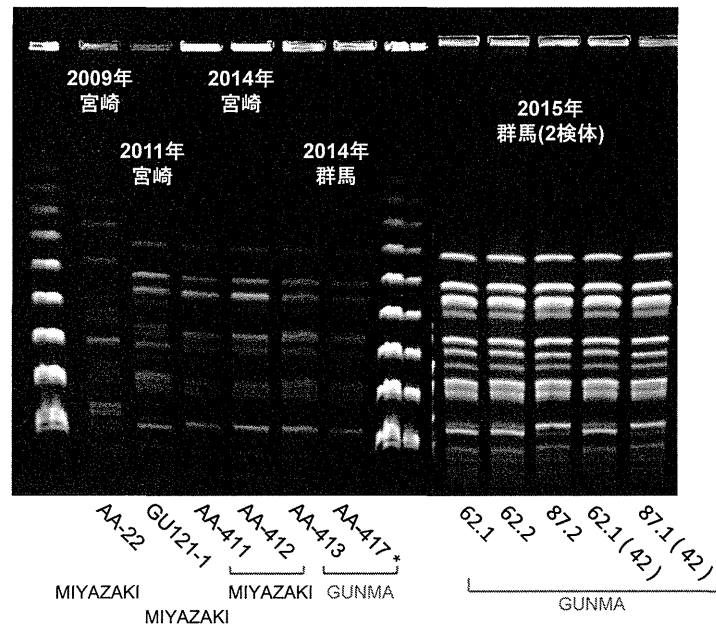


表3. 国内(宮崎、群馬)鶏肉検体から分離された
VanN型VRE (*E. faecium*) 株のMLST解析

Year	Location	Strain	Allelic profile							ST
			<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
2008	France	UCN-71	25	13	9	33	10	19	6	240
2009	Japan/ 宮崎	AA-22	72	13	9	33	10	19	6	852
2011	Japan/ 宮崎	GU121-1	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	Japan/ 宮崎	AA-412	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	Japan/ 群馬	AA-413	9	8	14	58	6	27	6	669
2015	Japan/ 群馬	AA-425	9	8	14	58	6	27	6	669