

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 28 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 食品由来の多剤耐性菌（ESBL/AmpC 産生菌、VRE など）の疫学調査

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。2015 年度（2016 年 2～3 月）に収集した国内産食肉（鶏肉）150 検体、輸入食肉（鶏肉）76 検体の合計 226 検体を調査した。ESBL 産生菌は 37 検体陽性（16.4%）、AmpC 産生菌は 39 検体陽性（17.3%）であり、それらの分離頻度は昨年度までと比較し、いずれも低いものであった（昨年度は ESBL 産生菌 52.9%、AmpC 産生菌 59.5%の検出率）。ESBL 産生菌は輸入鶏肉から高頻度で検出され（国内産 8.7%、輸入 31.6%）、一方 AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.3%、輸入食肉が 5.3%と国内産鶏肉の方が高かった。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型（50.0%）、TEM 型（18.8%）が多く、輸入肉では CTX-M 型（86.0%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産は CTX-M2、輸入食肉は CTX-M2 と CTX-M8/25 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 9 割以上は大腸菌であったが、病原性細菌であるサルモネラ属菌が 1 株検出された。VRE については、今年度は高度バンコマイシン耐性の VanA 型や VanB 型 VRE 株は国内外の鶏肉検体からは検出されなかった。しかし、新規の VanN 型 VRE が国内産鶏肉 1 検体から検出された。VanN 型株の PFGE 解析と MLST 解析から、この株は過去に分離された国産鶏肉由来 VRE 株と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 との関係性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（表 1）：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, ポロン酸, 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。

上記の方法で分離された耐性株について耐性の接合伝達実験を行なった。受容菌として大腸菌実験株 C600 (アザイド耐性)を用い、膜フィルターを用いた接合伝達(37、8 時間培養)を行った。選択培地には CTX または CAZ をそれぞれ 1 μg/mL とアザイド 250mg/L を含む寒天平板を用いた。接合伝達性を認めた株については、プラスミドのレプリコン型を PCR 法によって調べた。

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 ddi 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 2015 年度(2016 年 2 月~3 月)に収集した国内産鶏肉 150 検体、輸入鶏肉 76 検体の合計 226 検体を解析した(表 1)。このうち宮崎から送付された検体数が 80 検体と予定数よりも多く含まれている。これは当初送られてきた 40 検体からの菌の検出率が極めて低いために、再度、

40 検体からの拭き取りを追加依頼したためである。二度目の送付検体からの菌の検出率は幾分改善したものの、昨年度までの検出率と比較し、低いものであった。そのため、今回の結果には宮崎県から最初に送られてきた 40 検体分は結果に含んでいることが昨年度の場合とことなる。昨年度は、送付された検体が感想気味で菌の検出が認められなかった鹿児島からの検体を除外した結果となっていた。

ESBL 産生菌は 37 検体陽性(16.4%)、AmpC 産生菌は 39 検体陽性(17.3%)であり、それらの分離頻度は昨年度までと比較し、いずれも低いものであった(昨年度は ESBL 産生菌 52.9%、AmpC 産生菌 59.5%の検出率)。ESBL 産生菌は輸入鶏肉から高頻度で検出され(国内産 8.7%、輸入 31.6%)、一方 AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.3%、輸入食肉が 5.3%と国内産鶏肉の方が高かった(表 2、表 6)。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型(50.0%)、TEM 型(18.8%)が多く、輸入肉では CTX-M 型(86.0%)が多かった(表 3、表 7)。CTX-M 型遺伝子として国内産は CTX-M2、輸入食肉は CTX-M2、CTX-M8/25 が主に分離された(表 4、表 8)。AmpC 型遺伝子としては国内国外ともに CIT が主に検出された(表 5、表 9)。食肉から分離される耐性株の遺伝子型の傾向はこれまでの調査と同じであった(表 10)。

鶏肉由来 ESBL および AmpC 産生株(国内産鶏肉由来 42 株と輸入鶏肉由来株 28 株)の合計 70 株について、膜フィルター上で大腸菌実験株との接合伝達実験を行なった。その結果、いずれの耐性遺伝子型も約半数が伝達性を示し、耐性遺伝子が伝達性プラスミド上に存在していることが示唆された(表 11)。そのうち 37 株についてプラスミドのレプリコン型を解析したところ、約半数の 19 株が K 型であった(表 12)。

ESBL 産生株、AmpC 産生株(合計 70 株)の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり(67 株 96%)、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* がそれぞれ 1 株分離された(表 13)。これまでの本調査において、食肉検体から病原性細菌であるサルモネラ属菌が多剤耐性腸内細菌科細菌として分離されたのは初めてであった。尚、この株の血清型は 16S rRNA の塩基配列の解析結果から、Newport 株であることが判明した。

一方、VRE について、今年度は高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型や VanB 型 VRE 株は国内外の鶏肉検体からは検出されなかった。しかし、国内産鶏肉 1 検体から VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された(表 14)。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てきた VanN 型 VRE 株 *E. faecium* 株と極めて類似の PFGE パターンを示した(図 1)。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(図 1、表 15)。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。

D. 考察

今回の調査結果として、昨年度までの本調査と比較し、ESBL 産生菌、AmpC 産生菌の分離頻度が全体的に低下していた。昨年度は、検出方法を改善し(Ampicillin を添加した液体培地で前培養を行なう工程を追加) その結果、検出率が上がった。今年度も同様の検出方法を行なったが、検出率は低いものであった。国内産鶏肉検体でも群馬の検体(採取後直ちに当施設へ検体を持参)からは腸内細菌科細菌および腸球菌の分離頻度が極めて高いこと、また過去においては他県の検体からも高頻度で耐性菌が検出された年度もあったことから、単に地域による環境汚染状況の差のみとは考え難い。おそらくはサンプリングの方法に依るもの、あるいは検体送付の過程において、菌が死滅することも考えられた。また鶏肉処理場の環境の汚染、あるいはサンプル採取の時期(チラー処理の前後等)に依る違いも考えられる。今後は可能な限り、同一の手法、時期に統一することが望ましい。

VRE に関しては、これまでの調査ではしばしばブラジル産鶏肉から頻度自体は低いものの、臨床で問題となる VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出されていたが、今年度の調査では検出されなかった。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。VRE による家畜環境の汚染が軽減され、環境中の VRE が減少・消失していることが推測される。一方で今回も日本の鶏肉 1 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 株が分離された。これらの結果は、同一の起源を持つ VanN 型 VRE が低頻度ではあるものの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く、また宿主菌の遺伝子型もヒトに定着し易いとされる型(CC17 等)ではなかった(表 15)。そのため、これらの耐性株がヒトへ伝播しても、ヒト腸管内には定着し難く、また医療上も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(MIC

値 16mg/L)によるヒト感染(菌血症)も報告されていること、また VanV 型耐性遺伝子は伝達性プラスミド上に存在することから、耐性遺伝子がヒトに定着し易い腸球菌株に獲得された場合には、ヒト環境中に速やかに拡散し、将来的に臨床現場において問題となる可能性は十分に考えられる。VRE についてはそれらを念頭に今後も動向を注意深く監視してゆく必要があるだろう。

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 16~17%の頻度で検出され、昨年度までと比較し明らかに低下していた。耐性菌による環境の汚染が改善していることが推察される一方で、対象やサンプリング方法の違いによる影響も否定できず、継続的な調査が必要である。

国内産鶏肉検体から、以前の国内分離株と同一起源である VanN 型 VRE 株が分離されたことから、VanN 型 VRE 株の国内の家畜環境中に拡散し定着していることが示唆された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurushima J, Ike Y, Tomita H. Partial Diversity Generates Effector Immunity Specificity of the Bac41-Like Bacteriocins of *Enterococcus faecalis* Clinical Strains. *Journal of Bacteriology*. 198:2379-2390. (2016).

2. 学会発表

- 1) 大竹洋輔、千葉菜穂子、谷本弘一、富田治芳. 鶏肉からの ESBL、AmpC 産生腸内細菌科細菌の分離と解析. 第 10 回若手コロッセウム. 2016 年 8 月 1 日 草津.
- 2) 杉岡佳祐、富田治芳. 食肉由来腸球菌のバシトラシンなどの抗菌性飼料添加物に対する耐性と多剤耐性伝達性プラスミドとの関係について. 第 10 回若手コロッセウム. 2016 年 8 月 1 日 草津.
- 3) 橋本佑輔、久留島潤、野村隆浩、谷本弘一、富田治芳. 腸球菌の VanB 型バンコマイシン耐性に関する研究. 第 10 回若手コロッセウム. 2016 年 8 月 1 日 草津.
- 4) 久留島潤、富田治芳. *Enterococcus faecalis* プラスミドにコードされるバクテリオシン Bac41 の多様性と免疫特異性. 第 10 回若手コ

ロッセウム . 2016 年 8 月 1 日 草津 .

2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

表1. 本年度の調査検体(2016年2~3月採取)

国内鶏肉

	鹿児島県	宮崎県	群馬県	合計
検体数	30	80	40	150

輸入鶏肉

	アメリカ	ブラジル	タイ	フィリピン	デンマーク	合計
検体数	20	38	8	8	2	76

表2. 国内鶏肉からのESBLおよびAmpC産生菌の分離

国内鶏肉

生産県 (検体数)	鹿児島 (n=30)	宮崎 (n=80)	群馬 (n=40)	合計 (n=150)
ESBL	3	3	5	11
AmpC	1	0	32	33
ESBL+AmpC	0	0	2	2
合計	3 (10%)	3 (3.8%)	34 (85%)	40 (26.7%)

表3. 国内鶏肉由来ESBL産生株の耐性遺伝子型別

国内鶏肉

生産県 (株数)	鹿児島 (n=4)	宮崎 (n=6)	群馬 (n=6)	合計 (n=16)
TEM	0	0	3	3
CTX-M	3	2	3	8
不明	1	4	0	5

* 同一検体から検出されMIC結果が同じ場合は片方を解析対象とした

表4. 国内鶏肉由来ESBL産生菌のCTX-M型別

国内鶏肉

生産県 (株数)	鹿児島 (n=3)	宮崎 (n=2)	群馬 (n=3)	合計 (n=8)
CTX-M1 group	0	0	1	1
CTX-M2 group	3	0	2	5
CTX-M9 group	0	2	0	2
CTX-M8/25 group	0	0	0	0
不明	0	0	0	0

表5. 国内鶏肉由来AmpC産生株の耐性遺伝子型別

国内鶏肉			
生産県 (株数)	鹿児島 (n=1)	群馬 (n=47)	合計 (n=48)
CIT	0	46 [*]	46
不明	1	1	2

* 群馬株のうち2株は同時にTEMを産生していた

表6. 輸入鶏肉からのESBLおよびAmpC産生菌の分離

輸入鶏肉

輸出国 (検体数)	アメリカ (n=20)	ブラジル (n=38)	タイ (n=8)	フィリピン (n=8)	デンマーク (n=2)	合計 (n=76)
ESBL	1	18	2	3	0	23
AmpC	0	3	0	0	0	3
ESBL+AmpC	0	0	0	1	0	1
合計	1 (5%)	21 (55.3%)	2 (25%)	3 [*] (37.5%)	0	27 (35.5%)

*フィリピンの株では同一検体からESBLのみとESBL+AmpCの両方を検出した株が1株あったため合計の検体数は3となる

表7. 輸入鶏肉由来ESBL産生株の耐性遺伝子型別

輸入鶏肉

輸出国 (株数)	アメリカ (n=2)	ブラジル (n=33)	タイ (n=2)	フィリピン (n=6)	合計 (n=43)
TEM	0	0	1	0	1
SHV	0	2	0	0	2
TEM+SHV	0	1	0	0	1
CTX-M	2	27	0	2	31
TEM+CTX-M	0	2	0	4	6
不明	0	1	1	0	2

* 同一検体から検出されMIC結果が同じ場合は片方を解析対象とした

表8. 輸入鶏肉由来ESBL産生株のCTX-M 型別

輸入鶏肉

輸出国 (株数)	アメリカ (n=2)	ブラジル (n=29)	フィリピン (n=6)	合計 (n=37)
CTX-M1 group	0	0	4	4*
CTX-M2 group	0	17	1	18
CTX-M9 group	0	0	0	0
CTX-M8/25 group	0	9	0	9**
不明	2	3	1	6

* TEMも同時に持っていた

** このうち2株はTEMも同時に持っていた

表9. 輸入鶏肉由来AmpC産生株の耐性遺伝子型別

輸入鶏肉			
輸出国 (検体数)	ブラジル (n=3)	フィリピン (n=1)	合計 (n=4)
CIT	3	1 [*]	4
不明	0	0	0

* フィリピンの1株は同時にTEMを産生していた

表10. 鶏肉由来ESBLおよびAmpC産生株の耐性遺伝子型別

遺伝子型		国内鶏肉	輸入鶏肉	合計
ESBL (n = 46)	TEM	3	1	4
	SHV	0	2	2
	TEM+SHV	0	1	1
	CTX-M1	1	0	1
	CTX-M2	5	18	23
	CTX-M9	2	0	2
	CTX-M8/25	0	7	7
	CTX-M1+TEM	0	4	4
	CTX-M8/25 +TEM	0	2	2
AmpC (n = 47)	CIT	44	3	47
ESBL+AmpC (n = 3)	TEM+CIT	2	1	3
合計		57	39	96

表11. 鶏肉由来ESBLおよびAmpC産生株の耐性伝達性

	Sample	耐性伝達株数 (%)
国内鶏肉 (n=42)	ESBL (n = 9)	4 (44)
	AmpC (n = 31)	18 (58)
	ESBL+AmpC (n = 2)	2 (100) *
輸入鶏肉 (n=28)	ESBL (n = 24)	11 (46)
	AmpC (n = 3)	1 (33)
	ESBL+AmpC (n = 1)	1 (100) *
合計 (n = 70)		37 (52.9)

* AmpCはすべてで伝達されているが、ESBLはその限りではない

表12. 耐性伝達性プラスミドのレプリコン型別

Replicon type (amplicon obtained)	国内鶏肉			輸入鶏肉			合計 (n=37)
	ESBL (n=4)	AmpC (n=18)	ESBL+AmpC (n=2)	ESBL (n=11)	AmpC (n=1)	ESBL+AmpC (n=1)	
K	1	14	2	1		1	19
I1	1			3			4
FIB, F	1			1			2
F	1				1		2
FIB, F, K		1					1
FIB, A/C, F, K		1					1
K, B/O		1					1
I1, K		1					1
I1, P, F				1			1
L/M				1			1
I1, P				2			2
N, F				1			1
I1, FIA, FIB, F				1			1

表13. 食肉由来ESBLおよびAmpC産生腸内細菌科細菌の菌種同定

菌種	株数(n=70)
<i>Escherichia coli</i>	67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1

菌種同定はBD社 BBLCRYSTAL E/NF同定検査試薬を用いて行った

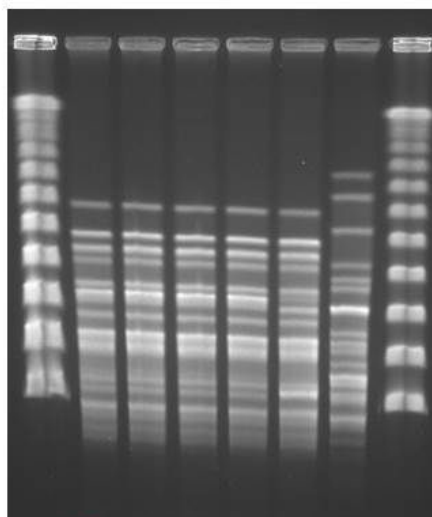
*Salmonella*は16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定しserovar Newportであることを確認した

表14. 輸入鶏肉および国内産鶏肉からのVRE の検出

国名	検体取り扱い 検査所	検体数	VRE		遺伝子型	菌種	Glycopeptide耐性値 (MIC, µg/ml)		分離数 (%)
			が分離された 検体番号	分離した株			Vancomycin	Teicoplanin	
ブラジル	神戸	38							0%
アメリカ合衆国	神戸	20							0%
タイランド	神戸	8							0%
フィリピン	神戸	8							0%
デンマーク	神戸	2							0%

県名	取り扱い 検査所	検体数	VRE		遺伝子型	菌種	Glycopeptide耐性値 (MIC, µg/ml)(E-Test)		分離数 (%)	
			が分離された 検体番号	分離した株			Vancomycin	Teicoplanin		
鹿児島県	鹿児島県大口食肉衛生検査所	30							0%	
宮崎県	宮崎県高崎食肉衛生検査所	80							0%	
群馬県	群馬県食肉衛生検査所	40	群馬-3 5	105-1			4	0.38	2.50%	
				105-2		<i>vanN</i>	<i>E. faecium</i>	4		0.38
				105-3			4	0.5		
				105-4			4	0.5		

図1. 今年度群馬県産鶏肉から分離されたVanN型VRE株のPFGEとMLST解析結果



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>	
UCN 71	25	13	9	33	10	19	6	240
AA-22	72	13	9	33	10	19	6	862
GU121-1	9	8	14	58	6	27	6	669
105.1	9	8	14	58	6	27	6	669

表15. これまでに国内産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