

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 27～29 年度 分担（総合）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

本調査研究では、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（鶏肉）検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。平成 27 年度は 151 検体（国産 90、輸入 61）、28 年度は 226 検体（国産 150、輸入 76）、29 年度は 198 検体（国産 110、輸入 88）検体をそれぞれ収集し、3 年間で合計 575 検体（国産 350、輸入 225）を調査した。鶏肉検体からの ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の分離頻度は年度や生産地によって異なるものの、いずれかの菌が検出される頻度は 25%から 98%と高頻度であった。特に国産鶏肉からの分離頻度が輸入鶏肉からの分離頻度と比較し、高い傾向にあった。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型、CTX-M 型+TEM 型、TEM 型が多く、輸入肉では CTX-M 型が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入共に CTX-M2 が最も多く、次いで国内産では CTX-M1 が多いのに対し、輸入肉では CTX-M8/25 が多く分離された。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された。これら食肉由来多剤耐性腸内細菌科細菌の多くは大腸菌、一部は *Klebsiella pneumoniae*（肺炎桿菌）であった。少数だが ESBL 産生サルモネラ属菌が国内産鶏肉から検出された。約 6 割の分離株が薬剤耐性伝達能を示したことから、耐性遺伝子の多くは伝達性プラスミド上に存在することが示された。プラスミドレプリコン型は多様であった。2017 年収集のブラジル産鶏肉 1 検体から伝達性 *mcr-1* を保持するコリスチン耐性大腸菌が検出された。また 2015 年と 2017 年に収集したブラジル産鶏肉検体から VanA 型高度耐性 VRE (*E. faecium*) 株が検出された（検出率はそれぞれ 2.6%、4.8%）。さらに VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が国内産鶏肉検体から 3 年間継続して検出された（検出率はそれぞれ 2.2%、0.7%、2.7%）。これら食肉由来 VanN 型株の PFGE 解析と MLST 解析から、VanN 型 VRE 株は過去に分離された国産鶏肉由来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) 多剤耐性グラム陰性菌に対し効果のある抗菌薬としてコリスチンがヒト臨床で注目されている。 β -ラクタム薬とは異なり、コリスチンは細胞壁外膜を標的としており、交叉耐性を示さない。

近年、国外の家畜環境から伝達性プラスミドのコリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1/mcr-2*) を保有する腸内細菌科細菌が報告され、ヒトへの伝播拡散が報告された。平成 29 年度の本調査では、食肉検体からのコリスチン耐性腸内細菌科細菌の検出も行なった。

3) 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、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（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 あるいは 40 検体を収集した（2016 年に宮崎から送付された検体が乾燥していたため、40 検体を追加収集した）。海外食肉は各年度に検疫所で取り扱う輸入鶏肉、輸入量にあわせを収集した。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。

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°C、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) コリスチン耐性大腸菌の分離

食肉検体を薬剤非添加の L 培地（液体）を用いて前培養し、その 0.1 ml を コリスチン 1mg/L 含有 DHL 寒天培地上に塗布し、培養した。平板上で発育した赤色コロニーを釣菌し（1 検体あたり 2 株）、純培養後に *mcr-1* および *mcr-2* 検出用プライマーを用いたコロニー PCR によって各耐性遺伝子の検出を行った。

3) 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 0.1 ml 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°C、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・検出のために平成 27 年度は 151 検体（国産 90、輸入 61）、28 年度は 226 検体（国産 150、輸入 76）、29 年度は 198 検体（国産 110、輸入 88）検体をそれぞれ収集し、3 年間で合計 575 検体（国産 350、輸入 225）を調査した（表 1）。尚、国内産鶏肉の拭き取りスワブとして収集した検体のうち、2015 年鹿児島からの検体が乾燥していたため、菌の増殖が認められず、解析データ数からは除いた。また 2016 年宮崎からの検体もやや乾燥しており、菌の増殖が少なかったため、再度の収集を行い、解析した（40 検体追加）。

鶏肉検体からの ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の分離頻度は図 1-1、図 1-2、図 1-3 に示されるように、年度や生産地によって異なるものの、耐性菌が検出される頻度は 25% から 98% と高頻度であった。特に国産鶏肉からの分離頻度が輸入鶏肉からの分離頻度と比較し、高い傾向にあった。

耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型、CTX-M 型+TEM 型、TEM 型が多く、輸入肉では CTX-M 型が多かった（図 2-1、図 2-2、図 2-3）。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入共に CTX-M2 が最も多く、次いで国内産では

CTX-M1 が多いのに対し、輸入肉では CTX-M8/25 が多く分離された (図 3-1、図 3-2、図 3-3)。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された (図 4-1、図 4-2、図 4-3)。これら食肉由来多剤耐性腸内細菌科細菌の多くは大腸菌、一部は *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌) であった (図 5-1、図 5-2、図 5-3)。少数だが ESBL 産生サルモネラ属菌が国内産鶏肉から検出された。

鶏肉由来 ESBL 産生株と AmpC 産生株 (2016 年分離の 70 株および 2017 年分離の 173 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。それぞれの年度で 52.9%、59.0% の分離株が薬剤耐性伝達能を示したことから、耐性遺伝子の多くは伝達性プラスミド上に存在することが示された (表 2-1、表 2-2)。耐性型では ESBL 型耐性よりも AmpC 型耐性の方が伝達性を示すものが多かった。得られた接合伝達株 (2016 年分離の 37 株、2017 年分離の 102 株) の保持するプラスミドレプリコン型は多様であった (表 3-1、3-2)。

2) コリスチン耐性大腸菌の検出

2017 年に収集した食肉 198 検体を用いた。尚、今回の調査では自然耐性菌の *Proteus* 属菌は対象から除いた。コリスチン含有培地 (1mg/L) に発育した大腸菌 165 株 (国内産 36 検体 75 株、輸入 54 検体 90 株) について PCR を行ったところ、*mcr-1* 陽性株をブラジル産検体から 1 株得た (*mcr-2* は全株陰性)。接合伝達実験により、このコリスチン耐性 (MIC 値; 16 mg/L) は伝達性を示し、プラスミド性であった。

3) VRE の検出 (図 6、図 7、表 4、表 5)

食肉からの VRE 検出結果を、年度毎に表 4 に示す。高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が 2015 年のブラジル産鶏肉 1 検体、および 2017 年のブラジル産鶏肉 3 検体から検出された (表 4-1、表 4-3)。それぞれ検出率は、ブラジル産鶏肉の 2.6% と 4.8% であった。これらの VRE 株と過去にブラジル産鶏肉から分離された VanA 型 VRE 株の PFGE パターンを図 6 に示す。一方、国内産鶏肉検体から 3 年間継続的に VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された。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、また環境中からは初めて報告した新型 VRE である (図 7 および表 5 の GU121-1 株)。本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、過去に我々が分離した 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 5)。これらの結果は今回継続的に検出されている VanN 型株が以前に国産食肉から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 2015 年と 2017 年の収集のそれぞれ 1 検体から型別不明の低度バンコマイシン耐性株が分離された。

D. 考察

ESBL/AmpC 産生株の調査において毎年、国内外産いずれの食肉検体からも比較的高頻度に多剤耐性菌が検出された。特に国内産鶏肉検体からの分離頻度は輸入食肉検体からの検出率よりも高い傾向にあった。検体処理の状況及び輸送形態の違いによることが考えられるものの、ESBL/AmpC 産生多剤耐性菌 (主に大腸菌) の鶏肉検体への付着汚染が確認された。少数ではあるものの 2016 年と 2017 年収集食肉 (国内産) から多剤耐性サルモネラ属菌が検出されたことから、病原性の腸内細菌科細菌の多剤耐性化について、今後の動向を調査して行く必要がある。

今回、伝達性 (プラスミド性) *mcr-1* を保持するコリスチン耐性大腸菌 1 株がブラジル産鶏肉から分離された。近年、中国をはじめ海外の家畜環境中での、腸内細菌科細菌の伝達性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* の急速な拡散と蔓延、ヒトへの伝播が危惧されていることから国内流通食肉の汚染動向の調査は重要である。

VRE に関しては、過去の調査ではしばしばブラジル産鶏肉から臨床で問題となる VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出されていた。今回も分離頻度は低いものの (2015 年 2.6%、2017 年 4.8%)、以前と同様に VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された。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、VRE による家畜環境の汚染は激減したものの、いまだに限局した地域での汚染が持続していることが示唆される。一方で日本の鶏肉検体から、同一の宿主遺伝子型を持つ VanN 型 VRE 株が継続的に分離されている。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 VanN 型 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が、フランスでは患者の血流感染症の起因菌となった中等度耐性株の報告もあり、VRE の感染対策上は環境調査の対象とすべきである。

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) が比較的高頻度で検出された。調査期間後半

2年続けてESBL産生サルモネラ属菌が国内産食肉から、また採集年度にコリスチン耐性大腸菌が輸入食肉（ブラジル産）から検出されており、今後の動向に注意する必要がある。高度耐性VREについては一部の地域（ブラジル産）で少数の分離のみであり、環境中の汚染状況が改善していることが示された。一方、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株が継続的に分離されていることから、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) Nomura T, Hashimoto Y, Kurushima J, Hirakawa H, Tanimoto K, Zheng B, Ruan G, Xue F, Liu J, Hisatsune J, Sugai M, Tomita H. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *J Microbiol Methods*. 145:69-72 (2018).

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.

- 4) 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.
- 5) 杉岡佳祐、富田治芳. 食肉由来腸球菌のバン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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 大竹洋輔、千葉菜穂子、久留島潤、谷本弘一、富田治芳. 鶏肉検体からのESBL、AmpC産生腸内細菌科細菌の分離と解析. 第46回薬剤耐性菌研究会. 2017年11月10日. 水上(群馬).
- 9) 谷本弘一、野村隆浩、富田治芳. 輸入鶏肉由来大腸菌の持つプラスミド伝達性コリスチン耐性遺伝子. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-28日. 博多(予定).
- 10) 野村隆浩、谷本弘一、富田治芳. 2017年に日本で分離されたVanN型VREの解析. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-28日. 博多(予定).
- 11) 大竹洋輔、千葉菜穂子、久留島潤、谷本弘一、富田治芳. 鶏肉検体からのESBL、AmpC産生腸内細菌科細菌の分離と解析. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-28日. 博多(予定).

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