別紙3

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30年度　分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究（H30-食品-一般-006）
分担課題　食品等から分離される腸内細菌の薬剤耐性調査と遺伝学的伝播様式の解析

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、伝達性コリスチン耐性菌）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。2017年度（2018年2～3月）に収集した国内産食肉（鶏肉）100検体、輸入食肉（鶏肉）86検体の合計186検体を調査した。ESBL 産生菌は74検体陽性(39.8%)、AmpC 産生菌は26検体陽性(14.0%)であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し、やや低いものであった(昨年度はESBL 産生菌 49.0%、AmpC 産生菌 22.7%の検出率)。ESBL 産生菌は国産鶏肉から高頻度で検出され（国内産 52.0%、輸入 25.6%)、昨年と同様の傾向であった（昨年度は国内産 75.5%、輸入 3.5%)。AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.0%、輸入食肉が 3.5%と昨年と同様に国内産鶏肉の方が高かった（昨年度は国内産が 32.7%、輸入食肉が 10.2%)。それら耐性菌の遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉ではCTX-M 型（42.6%）と SHV 型（42.6%）が多く、輸入肉ではCTX-M 型（70.3%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産では全て M2 型グループであり、CTX-M97 が最も多く分離された（26株中23株；87.0%)。輸入食肉ではCTX-M8（27.0%）と CTX-M55（21.6%）が優位に分離された。AmpC 型遺伝子としては国内外共にCIT 型（CMY-2）のみが検出された。これら食肉から分離された多剤耐性腸内細菌科細菌117株の約8割は大腸菌であり、昨年度分離されたサルモネラ属菌は検出されなかった。ESBL 産生菌として、染色体性に *fonA* 遺伝子を保持する *Serratia fonticola* が輸入鶏肉から初めて検出された。今年度に調査した食肉検体からは伝達性耐性遺伝子 *mcr* を保持するコリスチン耐性菌は検出されなかった。一方、ブラジル産鶏肉1検体から高度バンコマイシン耐性 VanA 型 VRE（*E. faecium*）株が検出された。PFGE 解析と MLST 解析の結果から、今回分離された株は数年前より継続的に分離されているブラジル産鶏肉由来 VRE 株と同一の起源を持つ株であることが示唆された。

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ー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（鹿児島、宮崎、群馬）それぞれ鶏肉 30 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

55 検体、タイ産 14 検体、米国産 9 検体、デンマーク産 4 検体、アルゼンチン産 3 検体、フィリピン産 1 検体の合計 86 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。尚、今回の調査においては一つの食肉検体から釣菌した 2 株が同じ耐性パターンおよび耐性遺伝子型を示した際には、それらは同一株と考え、1 株（1 検体 1 株）として結果に示した（またその際は 1 株のみについて以下の実験を行った）。

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 CSH55rif（リファンピシン耐性）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 mg/L とリファンピシン 40 mg/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 0.1ml 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*～*mcr-5* の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 0.1ml 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 2017 年度（2018 年 2 月～3 月）に収集した国内産鶏肉 100 検体、輸入鶏肉 86 検体の合計 186 検体を解析した（表１～表１１、図１～図３）。

ESBL 産生菌は 74 検体陽性（39.8%）、AmpC 産生菌は 26 検体陽性（14.0%）であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し、やや低いものであった（昨年度は ESBL 産生菌 49.0%、AmpC 産生菌 22.7%の検出率）。ESBL 産生菌は国産鶏肉から高頻度で検出され（国内産 52.0%、輸入 25.6%）、昨年と同様の傾向であった（昨年度は国内産 75.5%、輸入 3.5%）。一方、AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.0%、輸入食肉が 3.5%と昨年と同様に国内産鶏肉の方が高かった（昨年度は国内産が 32.7%、輸入食肉が 10.2%）。これら耐性菌の産地別の分離頻度は異なっており、特に国内産鶏肉ではその差は著しく、分離頻度が高いところでは 50%～90%、低いところでは 0%～6.7%であった（表８、表９）。耐性菌の遺伝子型の解析から、ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型（42.6%）と SHV 型（42.6%）が多く、輸入肉では CTX-M 型（70.3%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産では全て M2 型グループであり、CTX-M97 が最も多く分離された（26 株中 23 株；87.0%）。輸入食肉では CTX-M8（27.0%）と CTX-M55（21.6%）が優位に分離された。AmpC 型遺伝子としては国内外共に CIT 型（CMY-2）のみが検出された。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が、ブラジル産鶏肉の調査検体数の割合が多いためか、ブラジル産食肉由来耐性株に特異的とされる CTX-M8 型の ESBL 産生株の検出が比較的多かった。

鶏肉由来 ESBL および AmpC 産生株（国内産鶏肉由来 77 株と輸入鶏肉由来株 40 株）の合計 117 株について、寒天平板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、国内産鶏肉由来 77 株にはいずれの耐性遺伝子も伝達する株は見出されなかった。輸入鶏肉由来株 40 株については ESBL 遺伝子を伝達する株が４株(10％)見出され、これらの株においては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。プラスミドのレプリコン型を解析したところ、3 株が incN 型で、1 株が incF 型であった。

ESBL 産生株、AmpC 産生株（国内 77 株、国外 40 株､合計 117 株)の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり(94 株 80.3%)、次いで *Escherichia fergusonii* が 12 株分離された（表７、表１１）。今年度は ESBL 産生菌として、染色体性に *fonA* 遺伝子を保持する *Serratia fonticola* が輸入鶏肉から初めて検出された。また昨年度と一昨年度の本調査において、食肉検体から病原性細菌であるサルモネラ属の多剤耐性菌が複数分離されたが、今年度は分離されなかった。

２）コリスチン耐性大腸菌の検出

コリスチン含有 DHL 培地（1mg/L）に発育した（赤色コロニー形成）大腸菌 67 株（国内産 33 検体 51 株、輸入 10 検体 16 株）について PCR を行ったところ､*mcr-1*～*mcr-5* の遺伝子陽性株は検出されなかった。またそれら耐性株（薬剤添加選択培地上に発育した MIC 値 2mg/L 以上の大腸菌）を用いた接合伝達実験を行ったが、いずれもコリスチン耐性の伝達性を認めなかった。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。

３）VRE の検出（図４）

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 VRE（*E. faecium*）株がブラジル産鶏肉検体１検体から検出された（図４；レーン 8、No.8)。この株をこれまでの 2012 年度（2013 年収集）から 2016 年度（2017 年収集）の本調査において、ブラジル産鶏肉から継続的に分離されてきた VanA 型 VRE（*E. faecium*）７株（図４；No.1-7)との比較解析を行った。PFGE 解析の結果、全ての株は類似のパターンを示し、また MLST 解析により、これらは全て同一の新規 ST 型に分類され、互いに同一の起源を有する近縁株であることを示している。

D. 考察

ESBL/AmpC 産生株の調査においては、3 年前より検出方法を改善（Ampicillin を添加した液体培地で前培養・増菌処理を行なう工程を追加）した以後、耐性菌の検出率は良好であると考えられる。一方で増菌処理により、少量の耐性菌の検出も可能となり、いわゆる定性的な検出方法による調査であるから、他の定量的な調査による結果とは、分離頻度の単純な比較はできず、解釈が異なることに留意する必要が在る。

昨年度の調査結果と比較し、ESBL 産生菌、AmpC 産生菌の分離頻度の傾向は類似するものであり、国外産鶏肉からは主に ESBL 産生菌が多く分離され（約 30％)、国産鶏肉からは ESBL 産生菌および AmpC 産生菌のいずれも比較的多く分離された（20～50％)。しかし、産地別の耐性菌の分離頻度、特に国内での分離頻度は著しく異なっており、今年の国内産食肉における ESBL/AmpC 産生株の検出頻度に著しい地域差を認めたが、その理由は不明である。しかし国内の同一検査所からの検体に同一菌種、同一耐性型のクローナルな耐性株であったことから、食肉処理過程から検体収集過程までにおける耐性菌によるコンタミネーションが強く疑われる（図１～図３)。

昨年度と一昨年度の本調査において、国産食肉検体から多剤耐性サルモネラ属菌が複数の検体から分離され、病原性の腸内細菌科細菌の多剤耐性化について危惧されたが、今回の調査では検出されなかった。

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* の急速な拡散と蔓延、ヒトへの伝播が危惧されているが、今回収集した鶏肉検体においては伝達性（プラスミド性）高度コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*～*mcr-5*）を保持する大腸菌株は分離されなかった。コリスチン耐性大腸菌株を選択するために、腸内細菌科細菌の選択性に優れた DHL 寒天培地にコリスチン（1mg/L）を添加した寒天平板を用いたが、多くの場合 *Pseudomonas* をはじめとする環境菌が多数生育してしまい、大腸菌のコロニーを見出すことがしばしば困難となった。今後、選択平板に菌液を塗布する際にコロニーの分離が良くなる工夫をしたり、増菌過程でコリスチンによる選択圧を加えたりするなどの工夫が必要だと考えている。

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、今年度の調査でも検出され、過去数年間に分離された株は全て同一の起源を持つ近縁株であることが明らかとなった。理由は不明ではあるが、ブラジルの養鶏環境において、遺伝背

景が同じクローン株が存在し、拡散していることを強く示唆している。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既に 10 年以上が経過し、VRE による家畜環境の汚染は軽減したものの、一部の環境においては、いまだに存在していることを示している。一方、これまで日本の鶏肉検体からしばしば分離されていた VanN 型 VRE 株は検出されなかった。

E. 結論

　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）が一部の国内産鶏肉から高頻度（80～90%）で、また輸入鶏肉全体の約 30 %の頻度でそれぞれ検出された。一方、鶏肉検体からは伝達性高度コリスチン耐性大腸菌は検出されなかった。高度耐性 VanA 型 VRE 株が輸入（ブラジル産）鶏肉 1 検体から検出されたが、これまで国内の食肉から継続的に分離されていた VanN 型 VRE 株は検出されなかった。

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) Chiba N, Tanimoto K, Hisatsune J, Sugai M, Shibayama K, Watanabe H, Tomita H. Detection of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. Journal of Global Antimicrobial Resistance. (2019) in press.

2) Hashimoto Y, Kurushima J, Nomura T, Tanimoto K, Tamai K, Yanagisawa H, Shirabe K, Ike Y, Tomita H. Dissemination and genetic analysis of the stealthy *vanB* gene clusters of *Enterococcus faecium* clinical isolates in Japan. BMC Microbiology. (2018) 18:213.

2. 学会発表

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

表1. 2018年収集検体

国内産鶏肉（拭き取りスワブ）

	鹿児島県	宮崎県	群馬県	合計
検体数	30	30	40	100

海外産鶏肉（ミンチ肉）

	ブラジル	タイ	米国	デンマーク	アルゼンチン	フィリピン	合計
検体数	55	14	9	4	3	1	86

表２. 輸入鶏肉：ESBL/AmpC陽性検体数

耐性遺伝子	耐性菌陽性検体数
ESBL*	22 (25.6 %)
AmpC	3 (3.5 %)
ESBL or AmpC	25 (29.1 %)

* FONA（*fonA*1遺伝子陽性）をESBLとして集計

表３．輸入鶏肉：国別ESBL/AmpC陽性検体数

生産国	ブラジル	タイ	米国	デンマーク	アルゼンチン	フィリピン	合計
検体数	55	13	9	4	3	1	86
ESBL産生菌陽性検体数	18 (32.7 %)	1 (7.7 %)	2 (23.1 %)	0	1 (33.2 %)	0	22 (25.6 %)
AmpC産生菌陽性検体数	3 (5.5 %)	0	0	0	0	0	3 (3.5 %)

表４. 輸入鶏肉：ESBL型別検体数

遺伝子型	陽性検体数
CTX−M	14（63.6 ％）
SHV	3（13.6 ％）
TEM	4（18.2 ％）
FONA	4（18.2 ％）
陽性検体数	22* 検体(100%)

*３検体からは異なる2種類の耐性遺伝子型株を分離
（CTX-M + SHV, CTX-M + TEM, CTX-M + FONA）

表5. 輸入鶏肉：AmpC型別検体数

遺伝子型	陽性検体数
CIT	3 (100 %)
計	3検体

表６. 輸入鶏肉：ESBL/AmpC型別株数

ESBL		AmpC	
TEM	4 (10.8 %)	CIT (CMY-2)	3
SHV	3 (8.1 %)		
CTX-M-1	5 (13.5 %)		
CTX-M-55	8 (21.6 %)		
CTX-M-2	3 (8.1 %)		
CTX-M-8	10 (27.0 %)		
FONA	4 (10.8 %)		
計	37株	計	3株

表7. 輸入鶏肉：ESBL/AmpC産生菌菌種

菌種	株数
E. coli	29 (72.5 %)
Serratia fonticola	4
C. freundii	4
Rahnella aquatilis	2
Serratia marcescens	1
計	40株

表８. 国産鶏肉：ESBL/AmpC陽性検体数

地域（調査検体）	耐性菌陽性検体数
宮崎 (30)	2 (6.7 %)
鹿児島 (30)	27 (90.0 %)
群馬 (40)	32 (80.0 %)
合計 (100検体)	61検体 (61%)

表9. 国産鶏肉：ESBL/AmpC陽性検体数

宮崎 (2)	耐性菌陽性検体数
ESBL	2 (6.7%)
AmpC	0

鹿児島(27)	耐性菌陽性検体数*
ESBL	25 (83.3%)
AmpC	3 (10.0%)

群馬 (32)	耐性菌陽性検体数*
ESBL	25 (62.5%)
AmpC	20 (50.0%)

*ESBL産生菌とAmpC産生菌の両方が分離された検体を含む

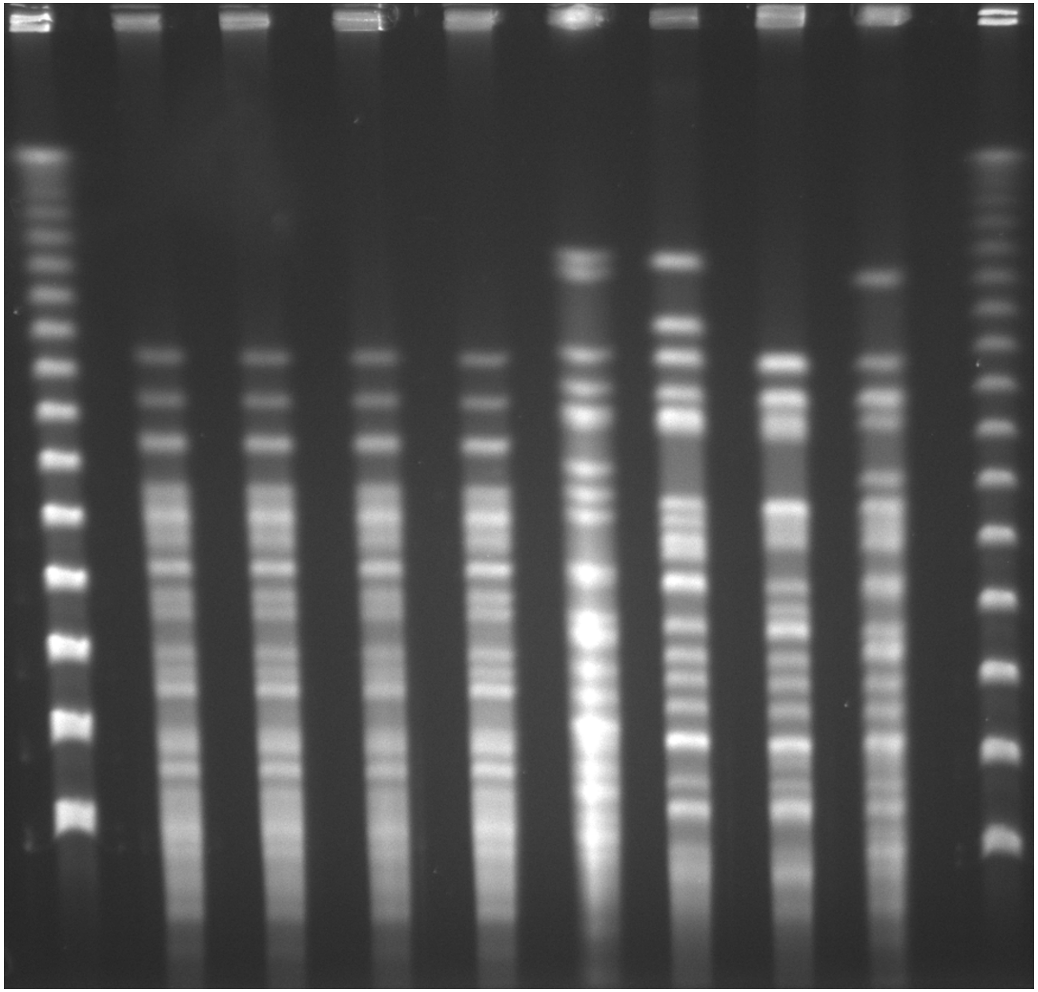
表10. 国内鶏肉：ESBL/AmpC型別株数

遺伝子型	株数	宮崎	鹿児島	群馬
SHV	23	0	23	0
TEM	5	0	0	5
TEM-1 + CTX-M97	3	0	0	3
CTX-M	23	2	4	17
CIT	19	0	3	16
CIT + TEM	4	0	0	4
合計株数	77	2	30	45

表11. 国内鶏肉：ESBL/AmpC産生菌菌種

菌種	株数
E. coli	65 (84.4 %)
E. fergusonii	12
計	77株

図1. 国内検体由来株の多くはクローナル



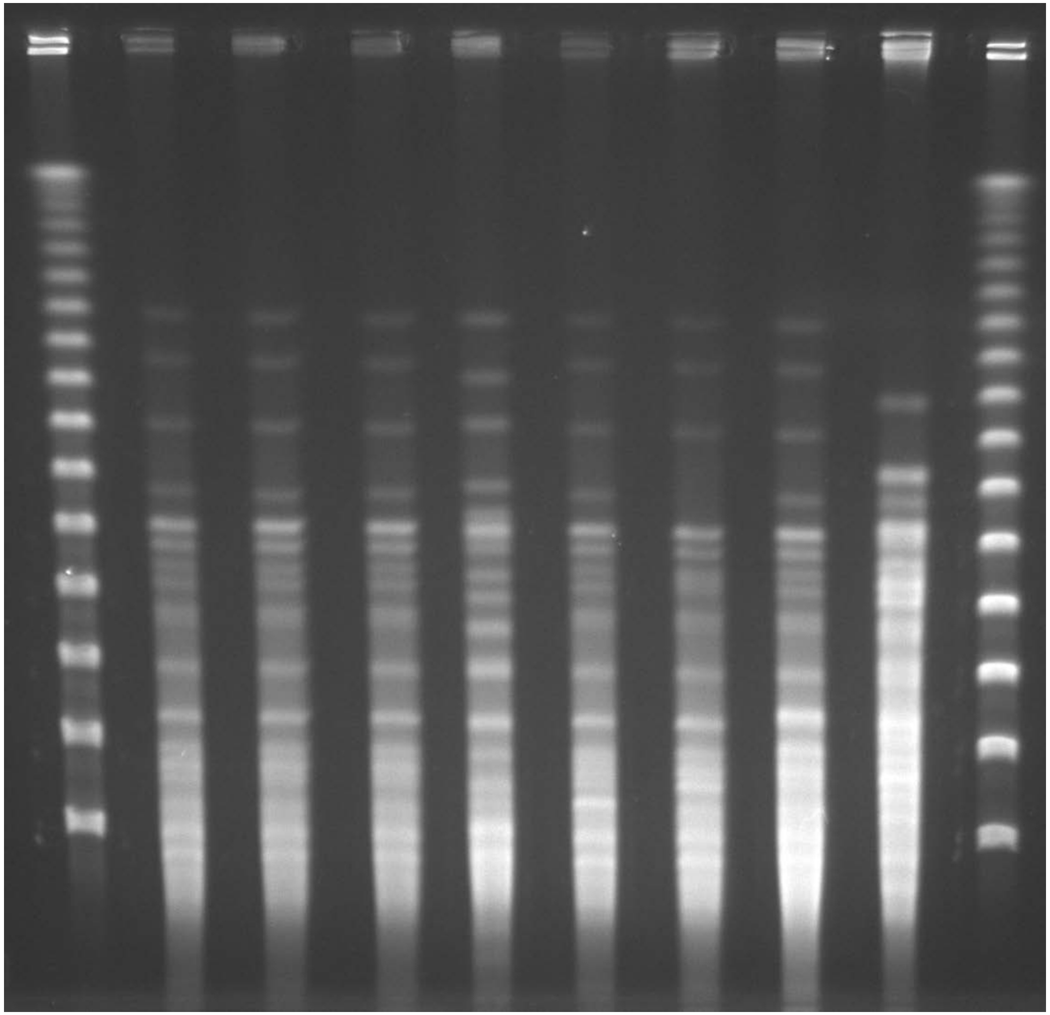
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1. λ ladder
2. #13 SHV (SHV-11)
3. #21 SHV
4. #29 SHV
5. #36 SHV
6. #38 CTX-M2
7. #106 CTX-M2
8. #115 CTX-M97
9. #154 CTX-M97
10. λ ladder

全て鹿児島産検体由来株

PFGE / *Xba*I消化

図2. 国内検体由来株の多くはクローナル



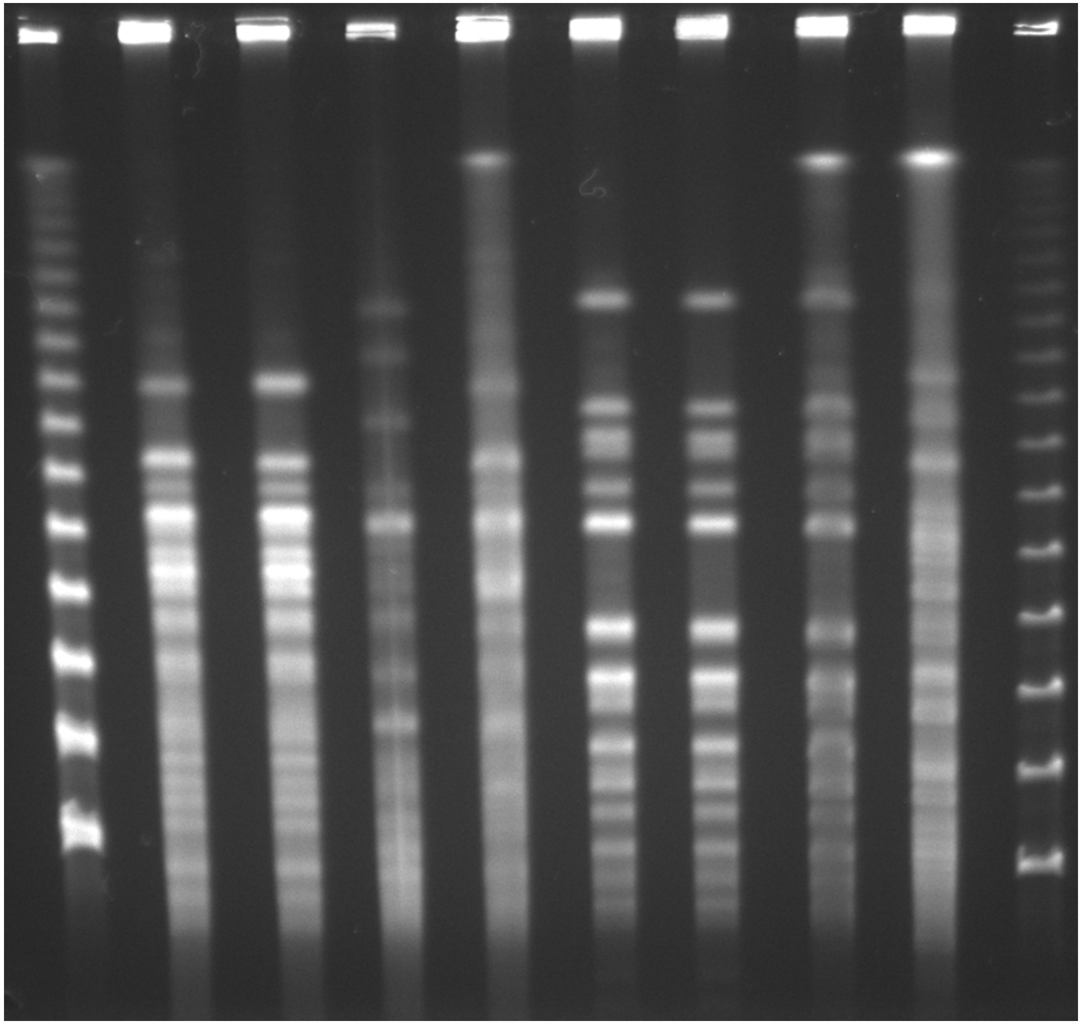
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1. λ ladder
2. #158 CTX-M97
3. #166 CTX-M97
4. #175 CTX-M97
5. #193 CTX-M97
6. #170 CTX-M97 + TEM-1
7. #179 CTX-M97 + TEM-1
8. #181 CTX-M97 + TEM-1
9. #169 CMY-2 + TEM-1
10. λ ladder

全て群馬県産検体由来株

PFGE / *Xba*I消化

図3. 国内検体由来株の多くはクローナル

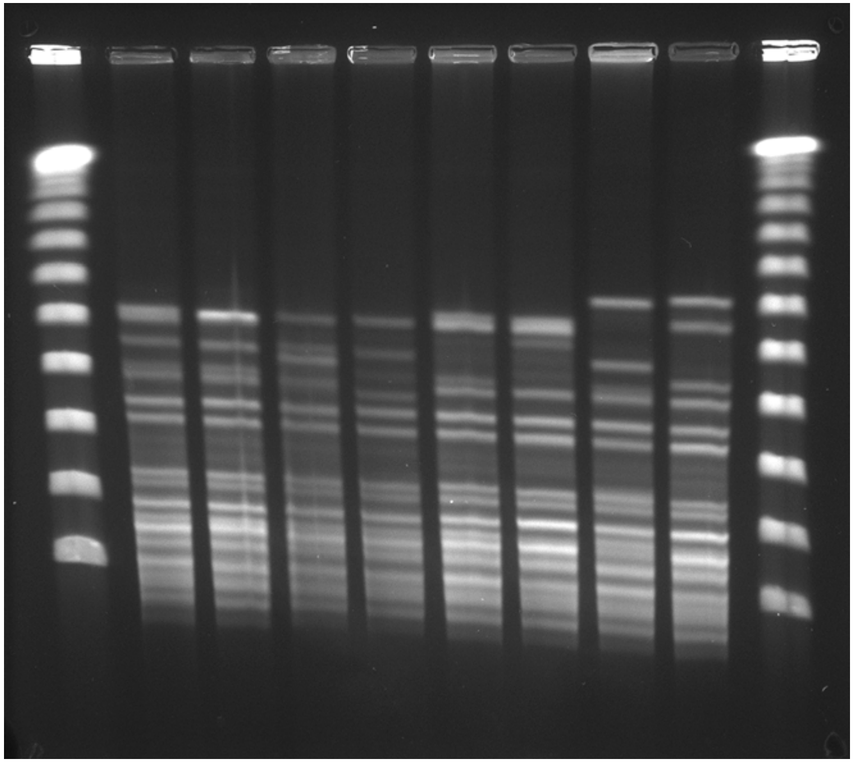


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1. λ ladder
2. #39 CIT 群馬
3. #45 CIT 群馬
4. #176 CIT 群馬
5. #186 CIT 群馬
6. #26 CIT 鹿児島
7. #28 CIT 鹿児島
8. #33 CIT 鹿児島
9. #127 SHV 鹿児島
10. λ ladder

PFGE / *Xba*I消化

図４．ブラジル産鶏肉から分離されたVanA型VRE（*E. faecium*）



No.	分離年度 (収集年は+1年)	VRE が分離された 検体番号	遺伝子型	菌種	Glycopeptide耐性値 (MIC,μg/ml)（E-TEST） Vancomycin	 Teicoplanin
1	2012	66167824	*vanA*	*E. faecium*	256	1
2	2012	31146693	*vanA*	*E. faecium*	256	1
3	2013	66201485	*vanA*	*E. faecium*	256以上	12
4	2014	66229706	*vanA*	*E. faecium*	256以上	3
5	2016	66281173	*vanA*	*E. faecium*	256	4
6	2016	66272347	*vanA*	*E. faecium*	256	4
7	2016	31247244	*vanA*	*E. faecium*	256	4
8	2017	66300418	*vanA*	*E. faecium*	256以上	3