

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 31 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（H31-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。2018 年度（2019 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）90 検体の合計 190 検体を調査した。ESBL 産生菌は 46 検体陽性（24.2%）、AmpC 産生菌は 11 検体陽性（5.8%）であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し、低いものであった（昨年度は ESBL 産生菌 39.8%、AmpC 産生菌 14.0%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 36.0%、輸入 11.1%）、昨年と同様の傾向であった（昨年度は国内産 52.0%、輸入 25.6%）。AmpC 産生菌の検出率は国内産が 11.0%、輸入食肉が 0%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 23.0%、輸入食肉が 3.5%）。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（28%）と SHV 型（9%）が多く、輸入肉では CTX-M 型（7%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産では主に M2 型グループであり（約 2/3）、CTX-M2 が最も多く分離された（20 株中 19 株；95%）。輸入食肉では CTX-M 型グループ間の明確な差はなかった。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 70 株中の 68 株は大腸菌であった。昨年同様、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 1 株検出された。今年度に調査で、タイ産鶏肉 1 検体から伝達性耐性遺伝子 *mcr-1* を保持するコリスチン耐性菌を検出した。一方、国内産（宮崎）食肉 4 検体から VanN 型 VRE 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以前より継続的に分離されて国内産鶏肉由来 VRE 株と同一の起源を持つ株であることが示唆された。リネゾリド耐性腸球菌の調査では、国内産鶏肉 45 検体（45%）と国外産鶏肉 1 検体から低度耐性株が検出され、その多くは *optrA* と *fexA* 遺伝子を保持する *E. faecalis* であった。*poxtA* を保持する腸球菌が国内産鶏肉から初めて分離された。

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。また近年では、新たにカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）やコリスチン耐性大腸菌なども問題となっている。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、国内で流通する食肉における VRE の調査と解析を行った。また VRE などに対す

る新規抗菌薬であるリネゾリドに耐性を示す腸球菌株についても調査を行った。

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57検体、タイ産21検体、米国産10検体、スペイン産1検体、ポーランド産1検体の合計90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（40 mg/L）LB液体培地3 mlで一晩培養し、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1 mg/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。ESBLおよびAmpCの産生を確認するためにCTX、CAZに対するMIC値2 mg/L以上の株について阻害剤実験を行った。ESBL産生確認のためにクラブラン酸を、AmpC産生確認のためにボロン酸を用い、阻害剤存在下で寒天平板希釈法によりMIC値が1/8以下に低下する事（3管以上の差）が確認された株をそれぞれの産生株として以下の実験に用いた。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0.1 mlをコリスチン1 mg/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)、Enterococcosel agar (BBL) 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 4 mg/L 加 Enterococcosel Broth で48時間選択的増菌後、VCM 4 mg/L 加 Bile Esculin Azide agar 選択培地に塗布し、得られたコロニーをVCM 4 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0.1 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℃、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。

（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2018年度（2019年2月～3月）に収集した国内産鶏肉100検体、輸入鶏肉90検体の合計190検体を解析した（表1～表15、図1）。

ESBL産生菌は46検体陽性（24.2%）、AmpC産生菌は11検体陽性（5.8%）であり、それらの分離頻度は昨年度と比較し、低いものであった（昨年度はESBL産生菌39.8%、AmpC産生菌14.0%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36.0%、輸入11.1%）、昨年と同様の傾向であった（昨年度は国内産52.0%、輸入25.6%）。一方、AmpC産生菌の検出率は国内産が11.0%、輸入食肉が0%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23.0%、輸入食肉が3.5%）。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%～80%、低いところでは0%であった（表2、表3、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 (28%) と SHV 型 (9%) が多く、輸入肉では CTX-M 型 (7%) が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産では主に M2 型グループであり (約 2/3)、CTX-M2 が最も多く分離された (20 株中 19 株; 95%)。輸入食肉では CTX-M 型グループ間の明確な差はなかった。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として、全体の陽性率が低いためもあり、これまで比較的多かった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 産生株の検出が少なかった (表 4、表 5、表 10~13)。

鶏肉由来 ESBL および AmpC 産生株 (国内産鶏肉由来 52 株と輸入鶏肉由来株 13 株) の合計 69 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 17 株 (32.7%) および輸入鶏肉由来株 7 株 (53.8%) については ESBL 遺伝子を伝達する株が見出され、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、10 株が incI1 型で、4 株が incFIB 型であった (表 14)。

ESBL 産生株、AmpC 産生株 (国内 57 株、国外 13 株、合計 70 株) の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり (68 株 97%)、国内産から *Pantonea agglomerans* と国外産から *Serratia fonticola* がそれぞれ 1 株ずつ分離された (表 6、表 15)。昨年度は ESBL 産生菌として、染色体性に *fonA* 遺伝子を保持する *Serratia fonticola* がブラジル産と米国産鶏肉から検出されたが、今年度も同種菌がタイ産鶏肉から検出された (表 7、図 1)。今年度は食肉検体から病原性細菌であるサルモネラ属は分離されなかった。

2) コリスチン耐性大腸菌の検出 (表 16)

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) 大腸菌株について PCR を行ったところ、*mcr-1* 遺伝子陽性株 (コリスチン MIC: 16mg/L) がタイ産鶏肉 1 検体から検出された。MLST 解析では ST1246 に分類され、既知のクローナル・コンプレックス (クラスター形成) には属さない株であった。接合伝達実験を行ったところ、液体培地中でも高頻度でのコリスチン耐性の伝達性を認めた (供与菌当たり 3×10^{-4})。この耐性プラスミドの *Inc* は non-typeable であり (以前のブラジル産由来 *mcr-1* プラスミドは incX4)、他の薬剤耐性は示さなかった (表 16)。

3) VRE の検出 (図 2、図 3)

VRE について、今年度は VanN 型 VRE 型 VRE (*E. faecium*) 株が国産 (宮崎) 鶏肉 4 検体から検出された (図 2、図 3)。今回分離された 6 株の VanN 型 VRE について過去の本調査において国内鶏肉

から分離された VanN 型 VRE 株と比較解析を行った。PFGE 解析の結果、4 検体のうち 2 検体から分離された株はこれまでの本調査において、国産鶏肉から継続的に分離されてきた VanN 型 VRE (*E. faecium*) の 2 種類の株とそれぞれ類似のパターンを示した。また MLST 解析により、これらは PFGE 結果で示された類似株と同一の 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が確認された。

4) リネゾリド (LZD) 耐性腸球菌の検出 (表 17、表 18、図 4、図 5)

今年度は、食肉検体から LZD 耐性腸球菌の検出とその耐性遺伝子の解析を行った。その結果、国内産鶏肉 45 検体と国外産鶏肉 1 検体から LZD 低度耐性株 (MIC: 4-8 mg/L) が検出された。国内産の陽性検体は主に国産鶏肉からであり、特に群馬の全 40 検体から LZD 低度耐性 *E. faecalis* (*optrA+*, *fexA+*) 株が検出された。宮崎県産 4 検体から *E. faecium* (*poxtA+*, *fexB+*) 株、鹿児島県産 1 検体から *E. faecalis* (*poxtA+*) 株がそれぞれ検出された。またタイ産鶏肉 1 検体から *E. faecalis* (*optrA+*, *fexA+*) 株が検出された。これまでに国内産食肉からの *poxtA* 陽性腸球菌の検出の報告はなく、今回が初めてであった。また宮崎県産検体から分離された *E. faecium* (*poxtA+*, *fexB+*) の LZD 耐性の一部は伝達性を示した (図 5、表 18)。

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ある。

これまで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しており、国外産鶏肉からは主に ESBL 産生菌が多く分離され (約 11%)、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 (11~80%)。しかし、その分離頻度は全体的に徐々に低下してきている。一方で、これまで同様に、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、今年も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。特に群馬県産食肉からは ESBL 産生あるいは AmpC 産生の腸内細菌科細菌が全く検出されずにオキシダーゼ陽性菌の発育のみであった。

一方で、全ての群馬県産検体から同一菌種、同一耐性型の LZD 耐性腸球菌株が検出されたことから、食肉処理過程での何らかの共通する事象、汚染等が疑われた（表 17、図 4）。しかし、群馬県の検体採取担当者に確認したところでは、例年通りにチラー水処理の前に拭き取り検査を行ったとの回答から、それについては不明であった。

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*）を保持する大腸菌株がタイ産鶏肉から検出された。他の調査、研究では、タイでの環境中へのコリスチン耐性菌の拡散と蔓延、流通食材への付着、汚染が報告されており、今回の結果は、それを反映したものと考えられる。

VRE に関しては、これまでの調査ではしばしば VanN 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。一方、これまでブラジル産鶏肉からしばしば分離されていた VanA 型 VRE 株はいずれの検体からも検出されなかった。

今年度の調査では新たにリネゾリド耐性腸球菌の検出とその解析を行った。リネゾリド (LZD) は VRE およびバンコマイシン耐性 MRSA (VRSA) など多剤耐性グラム陽性菌に有効なオキサゾリジノン系の新規治療薬である。LZD の臨床での使用量増加に伴い、今後の耐性菌の動向が注目されている。特に黄色ブドウ球菌や腸球菌で報告されたプラスミド性高度耐性遺伝子 *cfr* (23S rRNA メチル化酵素遺伝子) や耐性関連遺伝子 (*poxA*, *optrA*, *fexA*, *fexB*) の伝播と拡散が危惧されている。今回の調査では *cfr* 遺伝子陽性の高度耐性株は検出されなかったが、低度耐性株が国内外の食肉から分離された。特に LZD 耐性遺伝子 *optrA* と家畜用抗菌薬フロルフェニコール耐性遺伝子 *fexA* を共に保持する *E. faecalis* が国産鶏肉検体から多く分離された。また *poxA* を保持する腸球菌が国内産鶏肉から初めて分離され、一部は伝達性を示した。*poxA* の多くはプラスミド性 *cfr* と隣接して存在し、その関連性が報告されていることから今後の動向に注意する必要がある。

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の約 4 割

から、また輸入鶏肉全体の約 1 割から、それぞれ検出された。一方、タイ産の鶏肉検体からは伝達性高度コリスチン耐性大腸菌を検出した。VanN 型 VRE 株が国産鶏肉 4 検体から検出された。リネゾリド低度耐性腸球菌が、主に国内産鶏肉から検出された。

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) Hashimoto Y, Taniguchi M, Uesaka K, Nomura T, Hirakawa H, Tanimoto K, Tamai K, Ruan G, Zheng B, Tomita H. Novel multidrug-resistant enterococcal mobile linear plasmid pELF1 encoding *vanA* and *vanM* gene clusters from a Japanese vancomycin-resistant enterococci isolate. *Front Microbiol.* (2019) 10: 2568.
- 2) Hirakawa H, Takita A, Kato M, Mizumoto H, Tomita H. Roles of CytR, an anti-activator of cyclic-AMP receptor protein (CRP) on flagellar expression and virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* (2020) 521: 555-561.
- 3) Hirakawa H, Suzue K, Kurabayashi K, Tomita H. The Tol-Pal system of uropathogenic *Escherichia coli* is responsible for optimal internalization into and aggregation within bladder epithelial cells, colonization of the urinary tract of mice, and bacterial motility. *Front Microbiol.* (2019) 10: 1827.

2. 学会発表

- 1) 谷本弘一, 野村隆浩, 橋本佑輔, 平川秀忠, 富田治芳. 「輸入トリ肉から分離された FONA 産生 *Serratia fonticola*」第 93 回日本細菌学会総会（名古屋 2020 年 2 月 20 日）
- 2) 野村隆浩, 谷本弘一, 渡邊治雄, 富田治芳. 「鶏肉より分離したリネゾリドに対して低度耐性を示す腸球菌の解析」第 93 回日本細菌学会総会（名古屋 2020 年 2 月 19 日）

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

表1. 2019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	スペイン	ポーランド	合計
検体数	57	21	10	1	1	90

表2. ESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌

輸入鶏肉90検体：陽性**検体数**

耐性遺伝子	耐性菌陽性 検体数
ESBL*	10 (11.1 %)
AmpC	0 <small>AmpC産生株は分離されず</small>
ESBL or AmpC	10 (11.1 %)

* FONAをESBLとして集計

CAZ、CTXの選択平板にはコロニーが得られるが殆どのコロニーがOxidase-positiveのため除外された

表3. 輸入鶏肉：陽性検体数

ブラジル (57検体)	耐性菌陽性検体数
ESBL	7 (12.3 %)
AmpC	0
タイ (21検体)	耐性菌陽性検体数
ESBL	2 (9.5 %)
AmpC	0
アメリカ (10検体)	耐性菌陽性検体数
ESBL	1 (10.0 %)
AmpC	0

表4. 輸入鶏肉: ESBL型別**検体数**

遺伝子型	陽性 検体数
CTX-M	6 (60 %)
SHV	3 (30 %)
FONA	1 (10 %)
計	10

表5. 輸入鶏肉: ESBL/AmpC型別株数

TEM-1 + SHV2a	1 (7.7 %)
SHV	4 (30.8 %)
CTX-M-1Gp (M55)	2 (15.4 %)
CTX-M-1Gp (M55) + TEM-1	1 (7.7 %)
CTX-M-2Gp (M2)	2 (15.4 %)
CTX-M-8/25Gp (M8)	2 (15.4 %)
FONA	1 (7.7 %)
計	13 (Tra ⁺ : 7)

8/25Gpの1株がアメリカ産検体由来、1Gpの1株とFONAの1株がタイ産検体由来で、
他はブラジル産検体由来

Tra^{+/-}は寒天平板上での接合伝達

表6. 輸入鶏肉:ESBL/AmpC産生株菌種

菌種	株数
<i>E. coli</i>	12 (92.3 %)
<i>Serratia fonticola</i>	1 (7.7 %)
計	13

表7. 輸入鶏肉から分離された *fonA*保有*S. fonticola*の薬剤感受性

β-lactam耐性以外に目立った耐性は持っていない

Strain	KT	分離年	原産国	受入 税関	ABPC	CAZ	CAZ/C VA	CTX	CTX/C VA	IPM	MEPM	GM	KM	SM	AMK	TC	CPFX
113	2480	2018	ブラジル	東京	128<	≤1	0.5	>128	0.5	0.5	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	4	≤0.25
126	2481	2018	ブラジル	那覇	128<	≤1	0.25	16	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	≤0.25	2	≤0.25
149	2482	2018	ブラジル	小樽	128<	≤1	0.25	4	≤0.25	0.5	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	≤0.25	4	≤0.25
157	2483	2018	US	神戸	128<	≤1	0.5	64	1	1	≤0.25	≤0.25	0.5	2	0.5	4	≤0.25
140	2520	2019	タイ	大阪	128<	≤1	0.5	8	≤0.25	0.5	≤0.25	≤0.25	0.5	1	0.5	4	≤0.25

図1. bla_{FONA} と bla_{CTX-M} 遺伝子の系統樹解析



表8. ESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌

国産鶏肉100検体：陽性**検体数**

地域	耐性菌陽性 検体数
宮崎 (30)	24 (80.0 %)
群馬 (40)	0 <small>(殆どのコロニーがOxidase-positive)</small>
鹿児島(30)	15 (50.0 %)
合計 (100)	39 (39.0 % <small>(群馬を除くと65.0 %)</small>)

表9. 国産鶏肉：陽性検体数

宮崎 (30検体)	検体数 (陽性24検体中)
-----------	---------------

ESBL	24 (80.0 %)
------	-------------

AmpC	3 (10.0 %)
------	------------

群馬 (40検体)	陽性検体なし
-----------	--------

殆どのコロニーがOxidase-positive

鹿児島(30検体)	検体数 (陽性15検体中)
-----------	---------------

ESBL	12 (40.0 %)
------	-------------

AmpC	8 (26.7 %)
------	------------

表10. 国産鶏肉：耐性遺伝子（検体数）

	宮崎	鹿児島	合計
TEM*	1	3	4 (4 %)**
SHV	6	3	9 (9 %)
CTX-M	22	6	28 (28 %)
AmpC (CIT)	3	8	11 (11 %)

*TEMはESBL

**群馬を含め総検体数を100としたときの割合

表11. 国産鶏肉：耐性遺伝子(株数)

	宮崎	鹿児島	合計
TEM*	1	3	4
SHV	6	3	9
CTX-M	24	6	30
AmpC (CIT: CMY-2)	3	9	12

*4株のTEMはESBL

表12. 国産鶏肉:CTX-M型別(株数)

	宮崎	鹿児島	合計
CTX-M-1Gp	5	0	5 (16.7 %)
CTX-M-2Gp	15	5	20 (66.7 %)
CTX-M-8/25Gp	1	0	1 (3.4 %)
CTX-M-9Gp	3	1	4 (13.3 %)

表13. 国産鶏肉：CTX-M型別（株数）

Group	宮崎	鹿児島	合計
Gp 1	5 (M15: 3, M55: 2)	0	5 (16.7 %)
Gp 2	15 (M2: 14, M97: 1)	5 (M2)	20 (66.7 %)
Gp 8/25	1 (M25)	0	1 (3.4 %)
Gp 9	3 (M14)	1 (M14)	4 (13.3 %)

表14. Tra⁺株と*inc* group

<i>inc</i> group	輸入	国内産
A/C		1
FIB	2	2
I1	5	5
L/M		1
X		1
non-typeable		7
Tra ⁺ 株 (総株数)	7 (13)	17 (52)

ABPC^r(40mg/L)伝達性を示した株のtransconjugantを用いてPCRにて判定

表15. 国産鶏肉:ESBL/AmpC産生菌菌種

菌種	株数
<i>E. coli</i>	56 (98.2 %)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (1.8 %)
計	57

表16. *mcr-1*⁺ *E. coli*の感受性試験

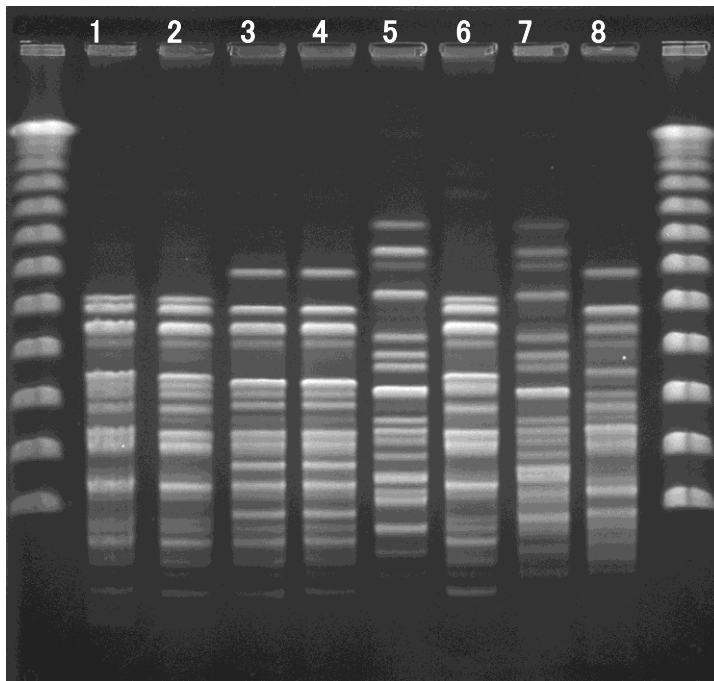
KT#	分離年	原産国	受入税関	ABPC	IPM	MEPM
#84	2518	タイ	福岡	4	≤0.25	≤0.25
#213	2519	タイ	福岡	4	≤0.25	≤0.25

GM	KM	SM	AMK	TC	CPFX	COL
≤0.25	2	2	1	4	≤0.25	16
≤0.25	2	2	1	4	≤0.25	16

(mg/L)

図2. VanN型VRE (*E. faecium*) 株のPFGE解析

- 12.1は2009年度に宮崎県の検体から分離された株(AA-22)と類似
- 7.1と7.2は2011年度に宮崎県の検体から分離された株(AA-80)と類似



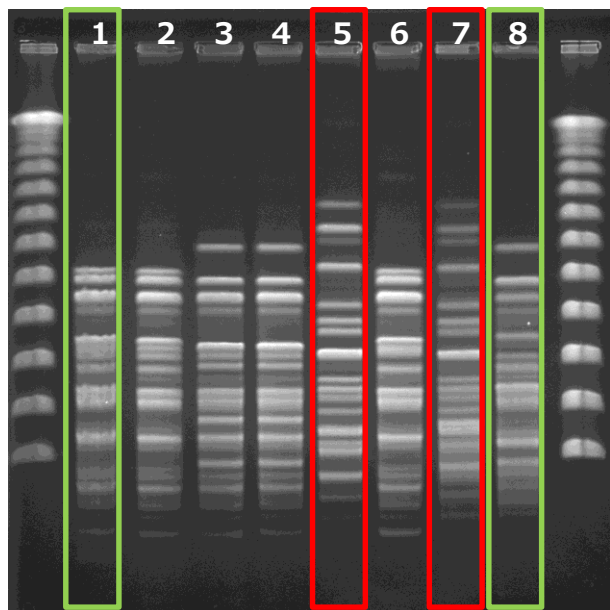
AA-22: 2009年度宮崎県より分離
AA-80: 2011年度宮崎県より分離

*Sma*I digest

Lane No.	衛生検査所No.	採取農場及び鶏舎	検査所	県	送付年月日	処理年月日	菌種	遺伝子型	Glycopeptide耐性値 (MIC, µg/ml) (E-TEST)	
									Vancomycin	Teicoplanin
1	2.1	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
2	2.2	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	6	0.75
3	7.1	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
4	7.2	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
5	12.1	C	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	2
6	21.1	D-3	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	2
7	AA-22		宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	2009年度分離		<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
8	AA-80		宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	2011年度分離		<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	12	1

図3. VanN型VRE (*E. faecium*) 株の MLST解析

- ・2.1は2009年度に宮崎県の検体から分離した株(AA-22)と同一のST669
- ・12.1は2011年度に宮崎県の検体から分離した株(AA-80)と同一のST862



AA-22: 2009年度宮崎県より分離

AA-80: 2011年度宮崎県より分離

UCN71: 2008年にフランスで分離され2011年に報告された株

Lane No.	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>	
1	2.1	9	8	14	58	6	27	6	669
5	12.1	72	13	9	33	10	19	6	862
7	AA-22	72	13	9	33	10	19	6	862
8	AA-80	9	8	14	58	6	27	6	669
	UCN 71	25	13	9	33	10	19	6	240

表17-1. リネゾリド耐性腸球菌の検出①

- LZD低度耐性株(4 mg/L)を46検体から合計88株分離
- 宮崎県4検体5株、鹿児島県1検体1株、群馬県40検体80株、タイ1検体2株

群大No.	検体番号	検体採取鶏舎 (検体採取農場)	送付機関名	検体採取機関名 (検疫所又は検査所)	原産国名	送付年月日	処理年月日	菌種 (DDL)	poxtA	optrA	fexA	fexB
6	6	1 2	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
17	17	2	D-1	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
19	19	2	D-2	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
22	22	2	D-3	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
97	鹿児島-27	2	F18-4	鹿児島県鹿屋食肉衛生検査所	鹿児島県	平成31年2月26日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-
169	66348559	1	神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター	大阪	タイ	平成31年2月19日	平成31年4月18日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
169	66348559	2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
31	1	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
32	2	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
33	3	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
34	4	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
35	5	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
36	6	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
37	7	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
38	8	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
39	9	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
40	10	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
41	11	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
42	12	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
43	13	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
44	14	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
45	15	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-

表17-2. リネゾリド耐性腸球菌の検出②

群大No.	検体番号	検体採取鶏舎 (検体採取農場)	検体採取機関名 (検疫所又は検査所)	送付機関名	原産国名	送付年月日	処理年月日	菌種 (DDL)	poxtA	optrA	fexA	fexB
46	16	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
47	17	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
48	18	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
49	19	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
50	20	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
51	21	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
52	22	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
53	23	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
54	24	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
55	25	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
56	26	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
57	27	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
58	28	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
59	29	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
60	30	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
61	31	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
62	32	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
63	33	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
64	34	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
65	35	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
66	36	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
67	37	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
68	38	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
69	39	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
70	40	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-

図4. LZD耐性腸球菌株のPFGE解析

- 宮崎県で検出されたLZD低度耐性株は6.1株、6.2株が違う消化パターンを示したが他の株はほぼ同一のパターンを示した
- 群馬県で検出された80株はほぼ同一のパターンを示した(写真は一部のみ)
- 国または県を跨いでの同一パターンの株は存在しなかった

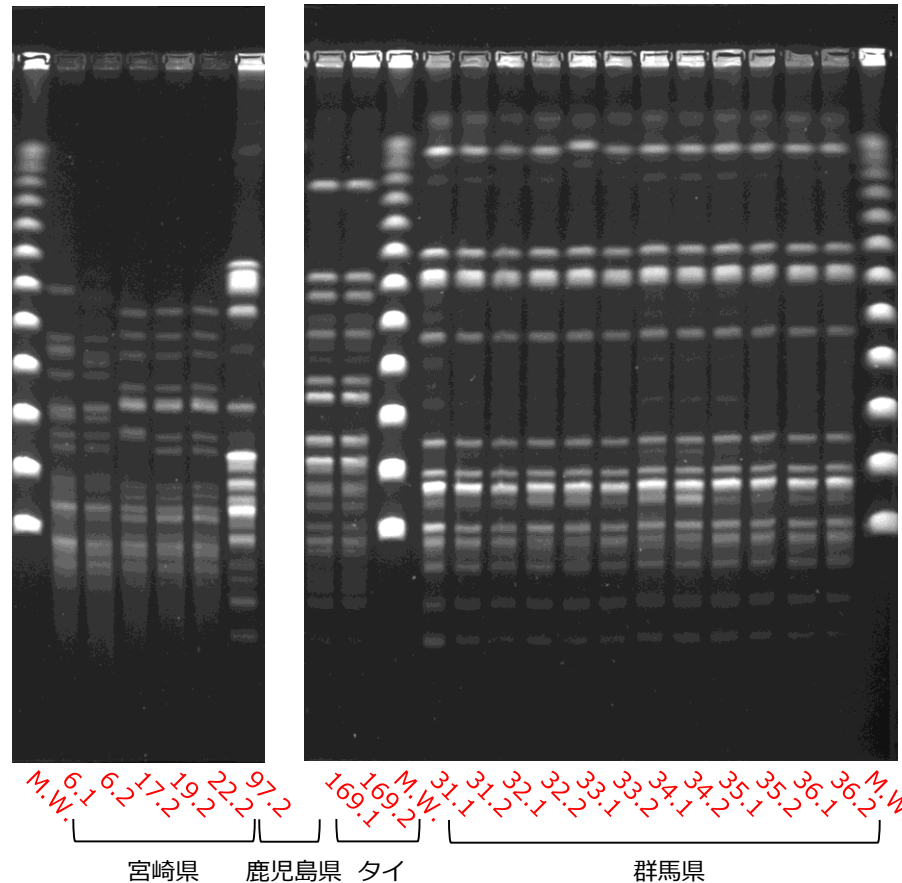
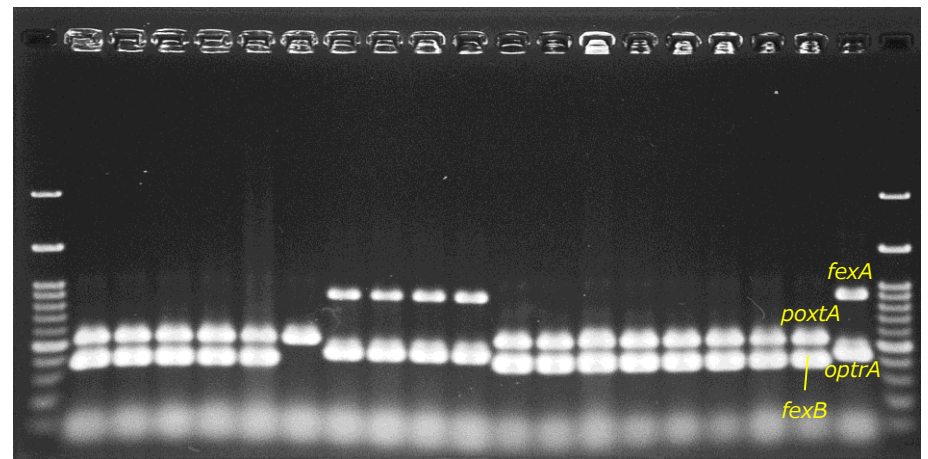
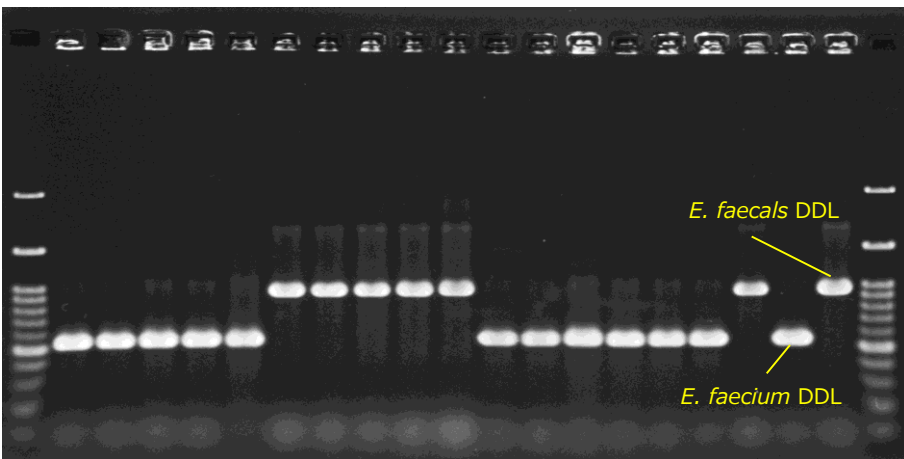


図5. LZD耐性腸球菌の菌種と耐性遺伝子の同定

- 既知のプラスミド性LZD耐性遺伝子(*optrA*、*poxtA*、*cfr*)、および薬剤排出型フロルフェニコール耐性遺伝子(*fexA*、*fexB*)に対するMultiplex PCRを行った
- 腸球菌種に特異的なDDL遺伝子プライマーを用いたMultiplex PCRを行った
- 宮崎県産鶏肉から分離された株はすべて*poxtA*と*fexB*を持つ*E. faecium*
- 鹿児島県産鶏肉から分離された株は*poxtA*のみを持つ*E. faecalis*
- 群馬県産鶏肉から分離された株はすべて*optrA*と*fexA*を持つ*E. faecalis*



6.1 6.2 17.2 19.2 22.2 97.2 169.1 169.2 31.1 32.1 B6.1.5 B6.1.6 B6.1.7 B6.2.1 B6.2.5 B6.2.8 F6.2.1 P.C.1 P.C.2
 宮崎県 鹿児島県 タイ 群馬県 6.1伝達株 6.2伝達株 コントロール株

6.1 6.2 17.2 19.2 22.2 97.2 169.1 169.2 31.1 32.1 B6.1.5 B6.1.6 B6.1.7 B6.2.1 B6.2.5 B6.2.8 F6.2.1 P.C.1 P.C.2
 宮崎県 鹿児島県 タイ 群馬県 6.1伝達株 6.2伝達株 コントロール株

表18. LZD耐性腸球菌株のMIC値

- LZD低度耐性10株(宮崎県5株、鹿児島県1株、群馬県2株)と6.1株と6.2株の耐性伝達株(B6.1.5, 7, 8、B6.2.1, 5, 8, F6.2.1)のMIC値を測定
- 6.1株と6.2株のLZD耐性は他のアンピシリン、ビアペネム、テトラサイクリンの各耐性とは独立して伝達

No.	MIC (mg / L)																			
	LZD	FFC	CP	EM	LCM	TC	TGC	CPFX	FOS	ABPC	BIPM	VCM	TEIC	SM	KM	SPC	GM	RFP	FA	
6.1	2	32	8	≥256	≥256	128	≤1	8	32	64	≥256	≤1	0.5	16	≥256	≥256	≤8	≤1	2	
6.2	4	32	8	≤1	16	128	≤1	8	32	64	≥256	≤1	0.5	16	64	≥256	≤8	≤1	2	
17.2	4	32	8	≤1	16	128	≤1	32	32	64	≥256	2	0.5	≥256	64	32	≤8	≤1	2	
19.2	8	32	8	≤1	16	128	≤1	32	32	64	≥256	2	0.5	≥256	64	64	≤8	≤1	2	
22.2	4	32	8	≤1	16	128	≤1	32	32	64	≥256	2	0.5	≥256	64	64	≤8	≤1	2	
97.2	4	16	4	≤1	64	128	≤1	2	32	≤1	4	2	0.25	64	≥256	64	≥256	≤1	2	
169.1	4	64	16	≥256	≥256	128	≤1	2	32	≤1	2	4	0.5	64	≥256	≥256	16	≤1	2	
169.2	4	64	16	≥256	≥256	128	≤1	2	32	≤1	2	4	0.5	64	≥256	≥256	16	≤1	2	
31.1	4	128	16	8	≥256	128	≤1	2	32	≤1	4	2	0.5	64	64	≥256	16	≤1	4	
32.1	4	128	64	≥256	≥256	≥256	≤1	2	32	≤1	4	2	0.25	64	≥256	≥256	≥256	≤1	4	
B6.1.5	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128	
B6.1.6	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128	
B6.1.7	4	64	8	≤1	16	≤1	≤1	2	64	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	64	≤8	≥256	128	
B6.2.1	4	64	8	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128	
B6.2.5	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128	
B6.2.8	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128	
F6.2.1	4	32	4	≤1	32	≤1	≤1	2	128	≤1	8	2	0.5	64	64	64	16	≥256	≥256	
BM4105RF	2	2	≤1	2	32	≤1	≤1	2	32	≤1	16	2	0.25	16	≥256	128	≤8	≥256	≥256	
FA2-2	2	2	2	2	64	≤1	2	2	128	≤1	8	2	0.5	64	64	64	16	≥256	≥256	
ATCC29212	2	2	2	2	64	32	2	2	32	≤1	2	4	0.5	64	32	64	≤8	≤1	2	