

令和4年度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）  
「野生鳥獣由来食肉の食中毒発生防止と衛生管理ガイドラインの改良に資する研究」  
分担研究報告書

野生鳥獣が保有する食中毒細菌の汚染状況と薬剤耐性に関する研究

分担研究者 鈴木康規（北里大学獣医学部）  
研究協力者 高井伸二（北里大学獣医学部）  
安藤匡子（鹿児島大学共同獣医学部）

**研究要旨** 過年度から引き続き、代表的な食中毒起因菌の一つである黄色ブドウ球菌並びにカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）を含めた  $\beta$  ラクタム系抗生物質耐性腸内細菌目細菌の野生鳥獣における保有状況の調査を行う目的で、シカおよびイノシシの糞便からの分離を実施した。また、市場流通後の野生鳥獣由来食肉における汚染調査へと対象を広げ、野生分離株が処理過程を経て市場流通後も存在しリスクとなり得るのか評価した。本年度はシカ糞便 139 検体、イノシシ糞便 43 検体及び食肉検体（シカ肉）75 検体を調査した。シカ糞便 18 検体（12.9%）、イノシシ糞便 1 検体（2.3%）、食肉 21 検体（28.0%）から黄色ブドウ球菌が分離された。また、これらの分離菌株の 73.4%は、CC121 から分岐した新たなクローン集団に属し、野生鳥獣において優占クローンが存在することが明らかとなった。さらに、糞便及び食肉検体の両者からこの優占クローンに属する同一の ST が複数株分離されたことから、処理工程における流通食肉への糞便汚染が疑われた。一部の黄色ブドウ球菌分離菌株に SE 遺伝子陽性株が存在し、その多くは *egc* 関連の新型エンテロトキシンのみを保有していた。このような菌株を原因とする食中毒発生のリスクは低いと推測されるが、それとは別に過去の食中毒事例由来株と同程度の SEC を産生する株が 1 株分離されたため、食中毒リスク管理の観点から注視する必要がある。一方、本年度も全 257 検体において CRE は分離されなかったことから、野生鳥獣の環境には CRE がまだ拡散していないことが示唆された。セフトキシムに耐性を示す株が、シカ糞便 5 検体（3.6%）から分離された。これらの菌株が保有する  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子は、昨年度同様、主に環境中に広く分布している *bla* であった。現時点では、野生鳥獣が保有する株を原因とする薬剤耐性菌感染症の発生リスクは低いと予測されるが、カルバペネムの効きづらい AmpC 過剰産生菌が 1 株分離されるなど、野生鳥獣環境でも徐々に耐性化の進行や広域スペクトルの耐性遺伝子の広がりが懸念される結果と考えられるため、今後も継続的なモニタリングが必要である。

## A. 研究目的

野生鳥獣由来食肉による食中毒発生を防止するためには、食中毒細菌の野生鳥獣における汚染、及び処理・加工段階での汚染、それぞれの過程における状況の汚染状況の把握が重要である。ブドウ球菌食中毒の主な原因菌である黄色ブドウ球菌は温血動物の常在菌として知られており、野生鳥獣由来食肉においても例外ではない。しかし、野生鳥獣をはじめとした環境中における本菌の分布や疫学的情報は非常に限られている。

また近年、グラム陰性菌による感染症の治療において重要なカルバペネム系抗菌薬を分解するカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）が国

際的に警戒されている。本耐性遺伝子は水平伝達され易く、多くの variant が存在し薬剤感受性が異なる表現型を有するものが存在する。CRE 感染症患者からの臨床分離株の疫学的及び遺伝学的解析は数多く報告され、その特徴が把握されつつある。しかし、本耐性遺伝子の由来や野生鳥獣を含む環境中に存在する腸内細菌科細菌の汚染状況に関する報告は少ない。

本年度は、過年度から引き続き、シカおよびイノシシの糞便試料からの黄色ブドウ球菌並びに  $\beta$  ラクタム系抗生物質耐性腸内細菌科細菌（CRE を含む）の分離並びに各種遺伝子型の調

査を実施し、これら野生獣における汚染状況に関する分子疫学データを蓄積することを目的とした。また、市場流通後の野生鳥獣由来食肉においても同様の調査を行い、処理過程を経た食肉における当該菌種によるリスクを評価した。

## B. 研究方法

### 1) 糞便試料

本工程は、昨年度に引き続き同事業の分担研究者である日本大学生物資源科学部 壁谷英則教授のご協力を頂いた。日本各地より狩猟および有害鳥獣として捕獲された野生獣（シカ及びイノシシ）から糞便を回収した。

### 2) 野生鳥獣由来食肉試料

本工程は株式会社一成 迫田華絵様のご協力を頂いた。国産ジビエ認証制度取得施設を含む6施設（北海道・静岡県・徳島県・宮崎県・鹿児島県）で解体されたシカの生肉並びにインターネットで販売されているシカ肉（ジャーキーなどの加工品を含む）を使用した。なお、本食肉試料に関しては、後述の黄色ブドウ球菌及び薬剤耐性菌の分離に加えて、衛生学的な評価を行う目的で一般的な食品における一般細菌数・大腸菌群・大腸菌・サルモネラの検査も併せて実施した。

### 3) 糞便・食肉試料からの黄色ブドウ球菌の分離

図1に示すフローチャートに従って行った。なお、本法は一般的な食中毒検査におけるヒト糞便・原因食品からの黄色ブドウ球菌の分離法に準拠した方法である（鈴木, 臨床検査. 66: 64-72, 2022.）。

### 4) 糞便・食肉試料からの薬剤耐性菌の分離

図2に示すフローチャートに従って行った。なお、本法は我々が報告した下水からの薬剤耐性菌の分離法に準拠した方法である（Suzuki et al., mSphere. 4:e00391-19, 2019.）。

### 5) 薬剤感受性試験（ディスク拡散法）

BD センシ・ディスク（Becton Dickinson）を用い、添付マニュアルに従って実施した。

### 6) 分離菌株の全ゲノム解析

分離菌株を BHI 液体培地で一晚培養し、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用いてゲノム DNA (gDNA) を抽出した。それぞれの

gDNA について、Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いてシーケンシング用ライブラリを作製した。MiSeq もしくは iSeq (Illumina) シーケンシングシステムを用いて、ショートリードの全ゲノムデータを取得した。

### 7) *in silico* 解析

得られたペアエンドのリードデータを ANI Calculator

(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) CLC Genomics Workbench (QIAGEN)、PubMLST (<https://pubmlst.org/>) 並びに Center for Genomic Epidemiology

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services>) にインポートし、各菌株の ANI value、Mutilocus sequence typing (MLST) 法に沿った ST 型の決定、k-mer 系統樹解析、毒素遺伝子、薬剤耐性遺伝子の探索を行った。また、昨年度分離された黄色ブドウ球菌株を含めて ST 型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析を PhyloViz 2.0 を用いて行った。

### 8) Sandwich ELISA

SEC、SHE 遺伝子保有株である SA22D108 株の培養上清中の SEC 及び SEH 産生量について既報の Sandwich ELISA を用いて定量した（Suzuki et al., J appl Microbiol. 118:1507-1520, 2015.）。すなわち、分離した黄色ブドウ球菌株を 1% yeast extract 添加 BHI 液体培地で 48 時間培養し、上清を回収した。50%の正常ウサギ血清と一晚反応させ Protein A を除去した後、PBS で 10-1000 倍に希釈してサンプルとした。Capture 抗体として 8  $\mu$ g/ml anti-SEC 抗体もしくは 2  $\mu$ g/ml anti-SEH 抗体を固相化し、HRP 標識 anti-SEC 抗体もしくは HRP 標識 anti-SEH 抗体を Labelled 抗体として使用した（いずれも自作抗体）。OPD substrate (Sigma-Aldrich) を発色基質として使用し、Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific) を用いて吸光度を測定した。それぞれの組換えタンパク質 (rSEC 及び rSEH; いずれも自作) を希釈後、検量線を作成して SE の濃度を算出した。

## C. 研究結果

### 1) 野生獣糞便及び食肉検体からの黄色ブドウ球菌の分離率（表1）

日本全国 18 道府県のシカ糞便 139 検体中 18 検体から黄色ブドウ球菌が分離され陽性率は

12.9%であった。イノシシ糞便においては、43検体中1検体のみ(2.3%)から黄色ブドウ球菌が分離された。また、解体後・加工後市場流通シカ肉75検体中21検体から分離され、陽性率は28.0%であった。本年度の興味深い結果として、①黄色ブドウ球菌はイノシシ糞便よりシカ糞便から高率に分離されこの傾向は昨年度と同様であること、②シカ肉からの黄色ブドウ球菌の分離率は各処理施設ごとに依存し、一般細菌数・大腸菌群・大腸菌等の細菌検査の結果と関連したことがあげられた。

## 2) 野生獣糞便及び食肉検体からのβラクタム系抗生物質耐性腸内細菌目細菌の分離率(表

上記と同一の糞便検体を用いてβラクタム系抗生物質耐性腸内細菌科細菌の分離を行った。昨年度同様全257検体においてCREは検出されなかった。一方で、セフトキシムに耐性を示し基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(Extended spectrum beta-lactamase: ESBL)産生菌だと疑われる株が、シカ糞便139検体中5検体(3.6%)から分離されたが、イノシシ糞便においては、全43検体で分離されなかった(0%)。また、解体後・加工後市場流通シカ肉においても全75検体で分離されなかった(0%)。本年度の興味深い結果として、①シカ糞便からは昨年度と同程度の分離率であったが、イノシシ糞便からは昨年度とは異なり耐性菌が分離されなかったことがあげられた。

## 3) 分離した黄色ブドウ球菌の遺伝学的特性(表3、表4、図3)

分離菌株53株(昨年度分離菌株も含む)の全ゲノム解析を行い、各菌株のANI value、ST型の決定、毒素遺伝子、薬剤耐性遺伝子の探索を行った結果を表3に示す。黄色ブドウ球菌の標準株(*S. aureus* NCTC8325: NC\_007795)に対するANI valueは全ての分離菌株で95%以上であり、ゲノム構造においても全ての分離菌株が黄色ブドウ球菌であることが確認された。53株中30株が既報のST型に分類され、ST6238が12株、ST4278が9株、ST1250が4株、ST20、ST133、ST188、ST398及びST2449が各1株であった。一方で残りの23株は既報のST型に分類されない未報告のST型であった。すなわち、本研究において7つの新規allele(gmk-630、pta-963、tpi-888、tpi-889、tpi-890、yqil-1059、yqil-1060)と12の新規ST型(ST8073-8084)を同定

し、これらについてPubMLSTデータベースに登録した(表4)。ST型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析の結果、53株中39株がClonal complex(CC)121から分岐した新たな集団に含まれることが明らかとなった(図3)。すなわちこの優占クローンにはST1250、ST6238及び新規12種類のSTが含まれていた。一方で、ST4278(n=9)はこの優占クローンには含まれず、既報のCC15に属した。なお、ST4278に属する9株は全て同一の施設(施設E)で処理された食肉検体由来であった。

食中毒の原因毒素であるエンテロトキシン遺伝子は、上記の優占クローンに属するST6238(n=12)とST8076(n=3)の全ての株において、必ずegc関連SE遺伝子(*sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu*)を保有したが、古典的SE遺伝子(*sea-see*)を保有する株は存在しなかった。一方で、上記の集団には属さないST2449(SA22D108株)1株のみ、egc関連SE遺伝子に加えて古典的SEであるSEC及びSEH遺伝子を保有していた(SE genotype; *sec*, *seh*, *sei*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu*)。また本菌株の培養液中のSEC産生量は $4.97 \pm 0.68 \mu\text{g/ml}$ 、SEH産生量は $180.27 \pm 14.98 \text{ ng/ml}$ であった。

上述のSA22D108株はβラクタム系薬剤耐性遺伝子である*blaZ*並びにアミノグリコシド耐性遺伝子である*aph(3')-Ia*を保有していた。ST4278に属する全ての株(n=9)は、*blaZ*単独もしくは*blaZ*と*aph(3')-Ia*の両者を保有していた。その他の株では既報の薬剤耐性遺伝子を保有しなかった。また、全53株でメチシリン耐性に関与する遺伝子*mecA*を持つSCC*mec*は存在せず、MRSAは分離されなかった。

## 4) 分離した薬剤耐性腸内細菌目細菌の薬剤感受性試験と遺伝学的特性(表5、表6)

2)で分離された5菌株の全ゲノム解析を行い、各菌株のST型、薬剤耐性遺伝子の探索を行った。分離菌株の内4株(EC22D69、EC22D92、EC22D94、EC22D116株)は*Escherichia coli*であり、それぞれST38、ST540、ST746、ST4450であった。いずれの菌株も少なくとも1種類のβラクタマーゼ遺伝子を保有し、昨年度の分離菌株でも多く検出された*bla<sub>CTX-M-15</sub>*保有株が2株(EC22D69、EC22D92)あり、EC22D92株は*bla<sub>TEM-1B</sub>*も併せて保有していた。EC22D116株は*bla<sub>CTX-M-55</sub>*と*bla<sub>TEM-1B</sub>*を保有しており、EC22D94株は昨年度分離されなかった*bla<sub>CTX-M-32</sub>*を保有していた。残りの1株

(CL22D99 株)は *Enterobacter cloacae* であり、*bla*<sub>ACT-16</sub> を保有していた (表 5)。しかし、昨年度同様 genotype と薬剤耐性遺伝子の保有に明確な関連性は見出されなかった。続けて、5 菌株について 14 種類の  $\beta$  ラクタム系抗生物質の薬剤感受性試験を行った。全ての株においてペニシリン系薬剤 (ペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン、オキサシリン) において阻止円は観察されなかった。また、CL22D99 株を除く 4 株は、カルバペネム系薬剤 (イミペネム、メロメネム、ドリペネム) に対して感受性を示した一方で、CL22D99 株はイミペネムの阻止円径が耐性と感受性の中間を示した。また、セフェム系のセフトジジム及びモノバクタム系のアズトレオナムについては一部の株で中間を示す株が存在したが、多くはこれらの薬剤を含むセフェム系、モノバクタム系薬剤に対して耐性を示した (表 6)。

## D. 考察

### 1) 黄色ブドウ球菌によるリスクについて

黄色ブドウ球菌の分離率がイノシシ糞便よりシカ糞便から高率であることは昨年度と同様の傾向であった。この結果は、イノシシよりシカの方が、黄色ブドウ球菌の保菌率が高いことを強く示唆している。昨年度の分離菌株の遺伝子型の傾向から、他の家畜同様、野生獣には独自の黄色ブドウ球菌クローンが存在する可能性が考えられた。本年度の分離菌株を加えた 53 株の ST 型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析の結果、53 株中 39 株 (73.6%) が CC121 から分岐した新たな集団に含まれることが明らかとなった。すなわち、本研究により、この集団に属する黄色ブドウ球菌がシカやイノシシなどの野生鳥獣における優占クローンであることが明らかとなった。また、この優占クローン属する ST1250、ST6238、ST8074、ST8077、ST8078、ST8080 の黄色ブドウ球菌株はシカ糞便及び食肉検体の両者から分離された (図 3)。このことから、処理工程における流通食肉への糞便汚染が疑われた。表 1 に示す通り、処理施設ごとに黄色ブドウ球菌の分離率が異なり、特に施設 E では特に高い分離率であった。これらの施設で処理された食肉における一般細菌数及び大腸菌群数は高値であり、また大腸菌も検出されており、高い分離率との相関性も糞便汚染を強く支持していると考えられる。

食中毒の原因毒素であるエンテロトキシン遺

伝子を保有する株は 17 株分離された。その内の 16 株は *egc* 関連の新型エンテロトキシンに分類される SE 遺伝子のみ (*sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu*) を保有していた。これら *egc* 関連の SE は一般的に菌からの産生量が少なく、また嘔吐活性も弱いとされており、食中毒事例の原因毒素となるのが古典的エンテロトキシンと比較して少ないことが知られている。すなわち、これらの分離菌株を原因とするに食中毒発生のリスクは低いと推測される。しかし、1 株のみ (SA22D108 株) *egc* 関連 SE 遺伝子に加えて古典的 SE である SEC 及び SEH 遺伝子を保有していた (*sec*, *seh*, *sei*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu*)。本菌株の培養上清中における SEC 及び SEH 産生量は、過去に報告された食中毒事例由来株の産生量と同程度であり (Suzuki et al., J appl Microbiol. 118:1507-1520, 2015.; Sato' o et al. Appl Environ Microbiol. 81:7782-7790, 2015.)、この菌株による食中毒リスクは存在すると考えられる。

薬剤耐性遺伝子は、SA22D108 株並びに ST4278 に属する全 9 株において、*bla*<sub>Z</sub> 単独もしくは *bla*<sub>Z</sub> と *aph* (3')-1a を検出した。ST4278 に属する 9 株は、同一の施設 (施設 E) で処理された食肉検体由来であったことから、施設内汚染の可能性が考えられるため、薬剤耐性黄色ブドウ球菌が野生鳥獣の環境に拡散しているとは言い難い。また、昨年度から継続して MRSA は一株も分離されなかったことから、ヒトの臨床現場で大きな問題になっている等の薬剤耐性黄色ブドウ球菌が野生鳥獣の環境にはまだ拡散していないことを示唆している。

### 3) 薬剤耐性菌によるリスクについて

昨年度から継続して CRE の分離を試みたが、本年度も CRE は分離されなかった。ヒトの臨床現場で大きな問題になっている CRE が野生鳥獣の環境にはまだ拡散していないことを示唆している。

5 株の CTX 耐性の腸内細菌目細菌がシカ糞便から分離された。昨年度はシカ糞便よりイノシシ糞便から高率に分離されたが、本年度はイノシシ糞便全 43 検体から分離されなかった。本年度分離を試みたイノシシ糞便は大分・宮崎の 2 県のみから採取したものであり、地域性に偏りが生じたため分離されなかった可能性があると考えられる。

分離菌株の内 4 株は *Escherichia coli*、1 株

は *Enterobacter cloacae* であった。いずれの菌株も少なくとも 1 種類の  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子を保有し、*Escherichia coli* では昨年度の分離菌株でも多く検出された  $bla_{CTX-M-15}$ 、 $bla_{CTX-M-55}$  は本年度の分離菌株も保有していた。これら 2 つの遺伝子は、世界各地の様々な野生鳥獣からの分離例が報告されており、世界中に広く拡散しているタイプの耐性遺伝子であることが考えられる。一方、*Enterobacter cloacae* であった CL22D99 株は AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼである  $bla_{ACT-16}$  を保有していた。AmpC 過剰産生菌はカルバペネムの MIC を上昇することが知られており、薬剤感受性試験においてイミペネムに中間を示した結果と一致すると考えられる。また、本年度も genotype と薬剤耐性遺伝子の保有、あるいは分離地域の間に関連性は見出されなかった。

## E. 結論

- 1) 昨年度同様、黄色ブドウ球菌の分離率がイノシシ糞便よりシカ糞便から高率であることから、イノシシよりシカの方が、黄色ブドウ球菌の保有率が高いことを強く示唆している。
- 2) 本研究により、CC121 から分岐した新たなクローン集団に属する黄色ブドウ球菌がシカやイノシシなどの野生鳥獣における優占クローンであることが明らかとなった。
- 3) 上記の野生動物優占クローンに属する黄色ブドウ球菌株は糞便及び食肉検体の両者から分離されたことから、処理工程における流通食肉への糞便汚染が疑われた。
- 4) 食肉検体由来の分離菌株について、処理施設ごとに分離率が異なり、特に施設 E では特に高い分離率であった。これらの施設で処理された食肉における一般細菌数及び大腸菌群数は高値であり、また大腸菌も検出されており、高い分離率との相関性も糞便汚染を強く支持していると考えられる。
- 5) 分離菌株のエンテロトキシン遺伝子保有状況に着目すると現時点での分離菌株の多くは、*egc* 関連の新型エンテロトキシンのみ保有しており、このような菌株による食中毒発生のリスクは低いと推測される。しかし本年度は、過去に報告された食中毒事例由来株と同程度の SEC

を産生する株も分離されたため、継続的なモニタリングが必要である。

5) 本年度も CRE は分離されなかったことから、野生鳥獣の環境にはまだ拡散していないことが示唆された。また、セフェム系薬剤耐性腸内細菌目細菌の  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子の保有状況に着目すると、昨年度同様、主に環境中に広く分布している *bla* が検出された。現時点では、野生獣が保有する株を原因とする薬剤耐性菌感染症の発生リスクは低いと予測されるが、カルバペネムの効きづらい AmpC 過剰産生菌が 1 株分離されるなど、野生鳥獣環境でも徐々に耐性化の進行や広域スペクトルの耐性遺伝子の広がりが懸念される結果と考えられるため、今後も継続的なモニタリングが必要である。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) **Takai S.** Guidelines on the hygienic management of wild meat in Japan. Meat Sci. 2022. 191:108864.

### 2. 学会発表

1) **Shinji Takai** "Guidelines on the Hygienic Management of Wild Meat in Japan" 68th International Congress of Meat Science and Technology, August 25, 2022, Kobe, Japan

2) **鈴木 康規、高井 伸二、久保田 寛頭、長谷川 乃映瑠、小林 甲斐、壁谷 英則、入江 隆夫、佐々木 由香子、角田 勤** 「野生鳥獣糞便からの黄色ブドウ球菌及び  $\beta$  ラクタム系抗菌薬耐性腸内細菌目細菌の分離とゲノム解析」第 43 回日本食品微生物学会学術総会、2022 年 9 月 29-30 日、タワーホール船堀（東京）

### 講演会

**高井 伸二** 「野生鳥獣肉の衛生管理：食中毒を予防するには」野生鳥獣処理活用技術者研修会（広島県会場）2022 年 9 月 13 日、向原生涯学習センターみらい（広島）

**高井 伸二** 「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保

とリスク管理」野生鳥獣処理活用技術者研修会  
(北海道会場) 2022年10月17日、新冠町レ・  
コード館シアタールーム (北海道)

**高井 伸二**「野生鳥獣の感染症：狩猟者・処理  
者・消費者の感染防止」野生鳥獣処理活用技術  
者研修会 (宮崎県会場) 2022年11月7日、上米  
良公民館 (宮崎)

**高井 伸二**「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保  
とリスク管理」野生鳥獣処理活用技術者研修  
会 (長野県会場) 2022年12月8日、長野市生涯  
学習センター (長野)

**高井 伸二**「衛生管理及び疾病」令和4年度ジ  
ビエハンター研修会 (試行) 2022年10月3日、  
10月8日、11月19日、2023年2月18日 (計4  
回) オンライン開催

**高井 伸二**「安全安心にお肉を堪能するために  
一畜産物とジビエの違い」特別セミナー伯方  
島 2023 2023年2月19日、オンライン開催

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

表1 野生獣糞便及び食品検体からの黄色ブドウ球菌の分離結果（昨年度検体も含む）

| 検体       | 分離年度 | 陽性数 (%)       | 内訳<br>都道府県 (検体数:由来)   | 菌株名  |
|----------|------|---------------|-----------------------|--|
| シカ糞便     | 2021 | 11/237(4.6%)  | 青森 (3検体:交通事故死)        | SA21S1, SA21S2, SA21S5   |
|          |      |               | 岩手 (1検体:猟友会)          | SA22D4   |
|          |      |               | 群馬 (1検体:猟友会)          | SA21D62  |
|          |      |               | 静岡 (1検体:畜産協会)         | SA22D23  |
|          |      |               | 奈良 (3検体:畜産協会)         | SA21D57, SA21D63, SA21D82  |
|          | 2022 | 18/139(12.9%) | 宮崎 (2検体:畜産協会、猟友会)     | SA21D112, SA22D43  |
|          |      |               | 大分 (3検体:畜産協会)         | SA22D82, SA22D108, SA22D140  |
|          |      |               | 奈良 (3検体:畜産協会)         | SA22D93, SA22D114, SA22D162  |
|          |      |               | 北海道 (1検体:民間)          | SA22D97  |
|          |      |               | 京都 (1検体:民間)           | SA22D98  |
|          |      |               | 大阪 (5検体:畜産会)          | SA22D101, SA22D116, SA22D127, SA22D163, SA22D164   |
|          |      |               | 神奈川 (1検体:民間)          | SA22D109   |
|          |      |               | 宮崎 (2検体:畜産協会)         | SA22D144, SA22D146   |
|          |      |               | 青森 (2検体:畜産協会)         | SA22D149, SA22D195   |
|          |      |               | 静岡 (1検体:畜産協会)         | SA23D5   |
| イノシシ糞便   | 2021 | 1/72(1.4%)    | 岡山 (1検体:猟友会)          | SA22B2   |
|          | 2022 | 1/43(2.3%)    | 宮崎 (1検体:畜産協会)         | SA22B25  |
| 食肉 (シカ肉) | 2022 | 21/75(28.0%)  | 静岡 (1検体/12検体:処理施設A)   | SA22DM15   |
|          |      |               | 静岡 (2検体/6検体:処理施設B)    | SA22DM20, SA22DM21   |
|          |      |               | 宮崎 (3検体/9検体:処理施設C)    | SA22DM30, SA22DM31, SA22DM33   |
|          |      |               | 徳島 (2検体/5検体:処理施設D)    | SA22DM37, SA22DM39   |
|          |      |               | 鹿児島 (11検体/13検体:処理施設E) | SA22DM40, SA22DM41, SA22DM42, SA22DM43, SA22DM46, SA22DM47, SA22DM48, SA22DM49, SA22DM50, SA22DM51, SA22DM52 |
|          |      |               | インターネット購入             | SA22DM69, SA22DM71   |

表2 野生獣糞便及び食肉検体からの薬剤耐性腸内細菌目細菌の分離結果(昨年度検体も含む)

| 動物種                          | 分離年度   | 陽性数 (%)     | 内訳<br>都道府県 (検体数:由来)                  | 菌株名   |                 |
|------------------------------|--------|-------------|--------------------------------------|---|-----------------|
| <b>カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)</b> |        |             |                                      |   |                 |
| シカ糞便                         | 2021   | 0/237(0%)   |                                      |   |                 |
|                              | 2022   | 0/139(0%)   |                                      |   |                 |
| イノシシ糞便                       | 2021   | 0/72(0%)    |                                      |   |                 |
|                              | 2022   | 0/43(0%)    |                                      |   |                 |
| 食肉 (シカ肉)                     | 2022   | 0/75(0%)    |                                      |   |                 |
| <b>セフトキシム耐性腸内細菌目細菌</b>       |        |             |                                      |   |                 |
| シカ糞便                         | 2021   | 7/237(3.0%) | 青森 (1検体:畜産協会)                        | EC21D158  |                 |
|                              |        |             | 大阪 (4検体:畜産会,<br>うち1検体から2種類の耐性菌を分離)   | EC21D90, EC21D93, EC21D96, EC21D103①②   |                 |
|                              |        |             | 大分 (2検体:畜産協会)                        | EC21D54, EC21D79  |                 |
|                              | 2022   | 5/139(3.6%) | 奈良 (2検体:畜産会)                         | EC22D69, EC22D94  |                 |
|                              |        |             | 北海道 (1検体:民間)                         | EC22D92   |                 |
|                              |        |             | 大阪 (1検体:畜産会)                         | EC22D116  |                 |
|                              |        |             | 京都 (1検体:民間)                          | CL22D99   |                 |
|                              | イノシシ糞便 | 2021        | 15/72(21.0%)                         | 山形 (1検体:畜産協会)   | EC21B27         |
|                              |        |             |                                      | 奈良 (2検体:畜産協会)   | EC21B23,EC21B46 |
|                              |        |             |                                      | 岡山 (1検体:猟友会)  | EC22B2          |
|                              | 2022   | 0/43(0%)    | 大分 (10検体:畜産協会,<br>うち1検体から2種類の耐性菌を分離) | EC21B12①②,EC21B18,EC21B19,EC21B22,EC21B28,<br>EC21B29,EC21B32,EC21B39,EC21B42,EC21B44 |                 |
|                              |        |             | 熊本 (1検体)                             | EC21B33   |                 |
| 食肉 (シカ肉)                     | 2022   | 0/75(0%)    |                                      |   |                 |

表3 分離した黄色ブドウ球菌の遺伝学的特性 (昨年度分離菌株も含む)

| Strain name | Prefecture | ANI value | Sequence type | Enterotoxin gene *                             | Resistance gene              | Scmec |
|-------------|------------|-----------|---------------|--|------------------------------|-------|
| SA21S1      | Aomori     | 97.95     | 8073          | No   | No                           | No    |
| SA21S2      | Aomori     | 97.84     | 1250          | No   | No                           | No    |
| SA21S5      | Aomori     | 97.83     | 1250          | No   | No                           | No    |
| SA21D57     | Nara       | 98.66     | 188           | No   | No                           | No    |
| SA21D62     | Gunma      | 97.94     | 8074          | No   | No                           | No    |
| SA21D63     | Nara       | 97.83     | 8075          | No   | No                           | No    |
| SA21D82     | Nara       | 97.89     | 8076          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA21D112    | Miyazaki   | 97.78     | 8084          | No   | No                           | No    |
| SA22D4      | Iwate      | 97.90     | 8083          | No   | No                           | No    |
| SA22D23     | Shizuoka   | 97.92     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D43     | Miyazaki   | 97.81     | 8077          | No   | No                           | No    |
| SA22D82     | Oita       | 97.83     | 8077          | No   | No                           | No    |
| SA22D93     | Nara       | 97.93     | 8076          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D97     | Hokkaido   | 97.83     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D98     | Kyoto      | 97.84     | 8078          | No   | No                           | No    |
| SA22D101    | Osaka      | 97.95     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
|             |            |           |               |  | <i>blaZ</i>                  |       |
|             |            |           |               |  | ( $\beta$ -lactam)           |       |
| SA22D108    | Oita       | 98.49     | 2449          | <i>sec, seh, sei, sel, sem, sen, seo, selu</i> | <i>aph(2'')-Ia</i>           | No    |
|             |            |           |               |  | (aminoglycoside)             |       |
| SA22D109    | Kanagawa   | 97.91     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D114    | Nara       | 97.85     | 8083          | No   | No                           | No    |
| SA22D116    | Osaka      | 97.86     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D127    | Osaka      | 97.80     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D140    | Oita       | 97.92     | 8079          | No   | No                           | No    |
| SA22D144    | Miyazaki   | 97.81     | 8079          | No   | No                           | No    |
| SA22D146    | Miyazaki   | 97.76     | 8080          | No   | No                           | No    |
| SA22D149    | Aomori     | 97.93     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D162    | Nara       | 97.82     | 8076          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D163    | Osaka      | 97.82     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D164    | Osaka      | 97.88     | 6238          | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i>                | No                           | No    |
| SA22D195    | Aomori     | 97.67     | 398           | No   | <i>bla<sub>TEM-116</sub></i> | No    |

|          |           |       |      |                                 |                               |                    |    |
|----------|-----------|-------|------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|----|
|          |           |       |      |                                 |                               | ( $\beta$ -lactam) |    |
|          |           |       |      |                                 |                               | <i>erm</i> (T)     |    |
|          |           |       |      |                                 |                               | (Erythromycin)     |    |
| SA23D5   | Shizuoka  | 97.78 | 6238 | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i> | <i>bla</i> <sub>TEM-116</sub> | ( $\beta$ -lactam) | No |
| SA22B2   | Okayama   | 97.91 | 133  | No                              | No                            |                    | No |
| SA22B25  | Miyazaki  | 97.86 | 8077 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM15 | Shizuoka  | 97.80 | 8078 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM20 | Shizuoka  | 97.88 | 6238 | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i> | No                            |                    | No |
| SA22DM21 | Shizuoka  | 97.78 | 8074 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM30 | Miyazaki  | 97.82 | 8077 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM31 | Miyazaki  | 98.01 | 8081 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM33 | Miyazaki  | 97.79 | 8080 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM37 | Tokushima | 98.04 | 8082 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM39 | Tokushima | 97.90 | 8082 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM40 | Kagoshima | 97.80 | 1250 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM41 | Kagoshima | 97.82 | 1250 | No                              | No                            |                    | No |
| SA22DM42 | Kagoshima | 99.03 | 4278 | No                              | <i>bla</i> <sub>Z</sub>       | ( $\beta$ -lactam) | No |
| SA22DM43 | Kagoshima | 99.01 | 4278 | No                              | <i>bla</i> <sub>Z</sub>       | ( $\beta$ -lactam) | No |
| SA22DM46 | Kagoshima | 99.02 | 4278 | No                              | <i>bla</i> <sub>Z</sub>       | ( $\beta$ -lactam) | No |
| SA22DM47 | Kagoshima | 98.99 | 4278 | No                              | <i>bla</i> <sub>Z</sub>       | ( $\beta$ -lactam) | No |
|          |           |       |      |                                 | <i>aph</i> (2'')-Ia           | (aminoglycoside)   | No |
| SA22DM48 | Kagoshima | 99.00 | 4278 | No                              | <i>bla</i> <sub>Z</sub>       | ( $\beta$ -lactam) | No |

|          |           |       |      |                                 |  |    |
|----------|-----------|-------|------|---------------------------------|--|----|
| SA22DM49 | Kagoshima | 99.03 | 4278 | No                              | <i>blaZ</i><br>( $\beta$ -lactam)<br><i>aph(2'')</i> -Ia<br>(aminoglycoside<br>) | No |
| SA22DM50 | Kagoshima | 99.00 | 4278 | No                              | <i>blaZ</i><br>( $\beta$ -lactam)<br><i>aph(2'')</i> -Ia<br>(aminoglycoside<br>) | No |
| SA22DM51 | Kagoshima | 99.02 | 4278 | No                              | <i>blaZ</i><br>( $\beta$ -lactam)  | No |
| SA22DM52 | Kagoshima | 99.00 | 4278 | No                              | <i>blaZ</i><br>( $\beta$ -lactam)<br><i>aph(2'')</i> -Ia<br>(aminoglycoside<br>) | No |
| SA22DM69 | —         | 97.84 | 6238 | <i>sei, sem, sen, seo, selu</i> | <i>bla<sub>TEM-116</sub></i><br>( $\beta$ -lactam)                               | No |
| SA22DM71 | —         | 99.03 | 20   | <i>seg, sem, sen, seo, selu</i> | <i>blaZ, bla<sub>TEM-116</sub></i><br>( $\beta$ -lactam)                         | No |

\* Enterotoxin genes はCenter for Genomic Epidemiology (<https://genomicepidemiology.org/>)のデータベース上に登録されている遺伝子配列と相同性のあったものを抽出しており、変異が存在するもの(完全に配列が一致しないもの)も含む

表 4 本研究で新たに報告した Sequence type と allele

| Strain                      | Assigned<br>sequence type | Allele      |             |             |            |            |            |             |
|-----------------------------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|
|                             |                           | <i>arcC</i> | <i>aroE</i> | <i>glpF</i> | <i>gmk</i> | <i>pta</i> | <i>tpi</i> | <i>yqiL</i> |
| 21S1                        | 8073                      | 6           | 79          | 113         | 2          | 13         | 50         | 152         |
| 22D98, 22DM15               | 8078                      | 6           | 79          | 113         | 47         | <b>963</b> | <b>889</b> | 172         |
| 22D146, 22DM33              | 8080                      | 6           | 79          | 113         | 47         | 10         | 70         | 102         |
| 21D82, 22D93, 22D162        | 8076                      | 6           | 79          | 496         | 47         | 7          | 70         | 61          |
| 21D62, 22DM21               | 8074                      | 14          | 380         | 12          | 2          | 13         | 70         | 172         |
| 22B25, 22D43, 22D82, 22DM30 | 8077                      | 57          | 79          | 6           | 2          | 62         | 110        | <b>1059</b> |
| 22D140, 22D144              | 8079                      | 57          | 79          | 6           | 2          | 62         | <b>890</b> | <b>1059</b> |
| 22DM37, 22DM39              | 8082                      | 57          | 79          | 6           | 18         | 149        | 70         | 139         |
| 22DM31                      | 8081                      | 57          | 79          | 6           | 47         | <b>963</b> | 50         | <b>1060</b> |
| 21D63                       | 8075                      | 57          | 79          | 12          | 2          | 13         | 76         | 171         |
| 22D4, 22D114                | 8083                      | 57          | 79          | 12          | 2          | 13         | <b>888</b> | 152         |
| 21D112                      | 8084                      | 154         | 79          | 12          | <b>630</b> | 149        | 114        | 102         |

太字は新たに報告した Allele 番号を示す

表5 分離した薬剤耐性腸内細菌目細菌のSequence typeと保有する薬剤耐性遺伝子

| 菌株名      | 都道府県 | 菌種                          | ST   | 薬剤耐性遺伝子   |
|----------|------|-----------------------------|------|---|
| EC22D69  | 奈良   | <i>Escherichia coli</i>     | 4450 | <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub><br><i>qnrS1</i><br><i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub><br><i>qnrS1</i><br>(Bata-lactum)<br>(Quinolones)<br>(Bata-lactum)<br>(Quinolones) |
| EC22D92  | 北海道  | <i>Escherichia coli</i>     | 38   | <i>tet(B)</i><br><i>sul2</i><br><i>aph(6)-Id</i><br>(Tetracycline)<br>(Folate pathway antagonist)<br>(Aminoglycoside)   |
| EC22D94  | 奈良   | <i>Escherichia coli</i>     | 540  | <i>bla</i> <sub>CTX-M-32</sub><br>(Bata-lactum)   |
| EC22D116 | 大阪   | <i>Escherichia coli</i>     | 746  | <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub><br>(Bata-lactum)  |
| CL22D99  | 京都   | <i>Enterobacter cloacae</i> | 182  | <i>bla</i> <sub>ACT-16</sub><br><i>fosA</i><br>(Bata-lactum)<br>(Fosfomycin)  |

表6 分離した薬剤耐性腸内細菌目細菌の薬剤感受性試験

| 菌株名      | 菌種                          | βラクタム系<br>耐性遺伝子  | 阻止円直径(mm) |      |           |     |      |       |      |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|-----------------------------|--|-----------|------|-----------|-----|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|          |                             |  | P10       | AM10 | AMX2<br>5 | OX1 | CZ30 | CTX30 | CF30 | CAZ30 | CRO30 | CPD10 | IPM10 | MEM10 | DOR10 | ATM30 |
| EC22D69  | <i>Escherichia coli</i>     | <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>                                 | 0         | 0    | 0         | 0   | 0    | 0     | 0    | 16    | 0     | 0     | 27    | 25    | 24    | 17    |
| EC22D92  | <i>Escherichia coli</i>     | <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub><br><i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> | 0         | 0    | 0         | 0   | 0    | 11    | 0    | 19    | 10    | 0     | 28    | 29    | 28    | 17    |
| EC22D94  | <i>Escherichia coli</i>     | <i>bla</i> <sub>CTX-M-32</sub>                                 | 0         | 0    | 0         | 0   | 0    | 13    | 0    | 20    | 13    | 0     | 26    | 29    | 30    | 21    |
| EC22D116 | <i>Escherichia coli</i>     | <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub><br><i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> | 0         | 0    | 0         | 0   | 0    | 0     | 0    | 14    | 0     | 0     | 28    | 25    | 21    | 25    |
| CL22D99  | <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>bla</i> <sub>ACT-16</sub>                                   | 0         | 0    | 0         | 0   | 0    | 0     | 0    | 0     | 0     | 0     | 21    | 23    | 29    | 10    |

赤字：耐性、緑字：中間、黒字：感受性、青字：腸内細菌目で判定の定義なし

図1 黄色ブドウ球菌の分離方法

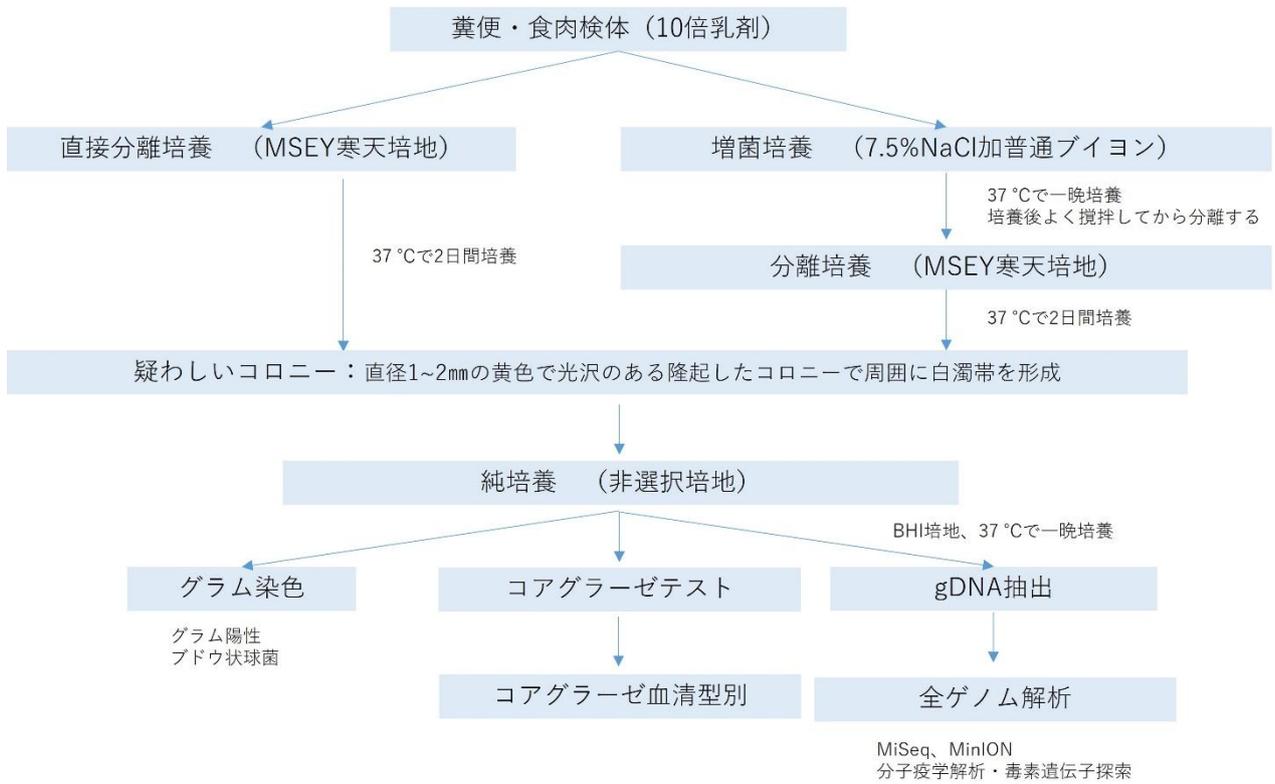


図2 薬剤耐性菌の分離方法

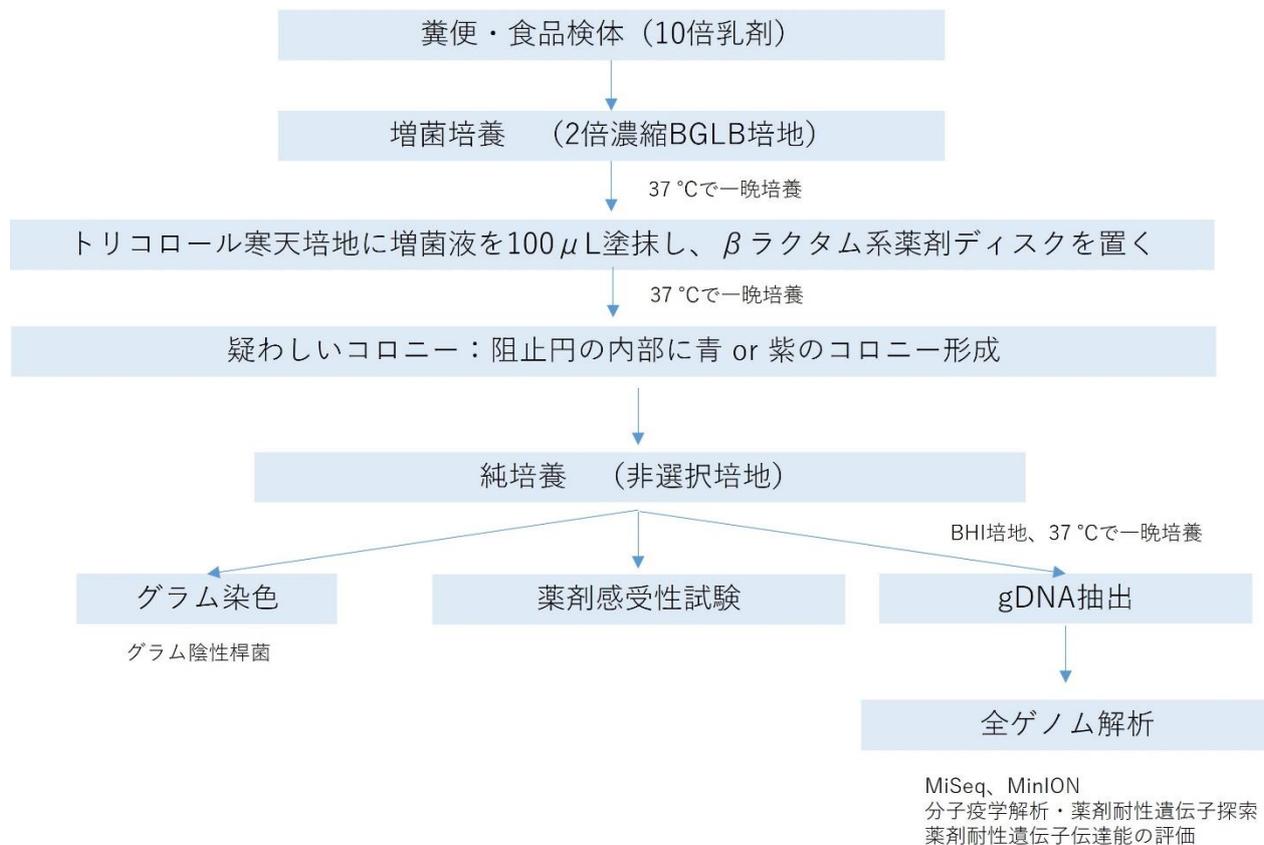


図3 黄色ブドウ球菌のST型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析

(A) 全 ST を対象にした系統樹 青色; シカ糞便由来株の ST、赤色; イノシシ糞便由来株の ST、緑色; 食品検体 (シカ肉) 由来株の ST をそれぞれ示す。色がついた円の大きさは本研究で分離された株数と対応し、灰色の円は今回分離されなかった ST のため 1 株の円の大きさとしている。

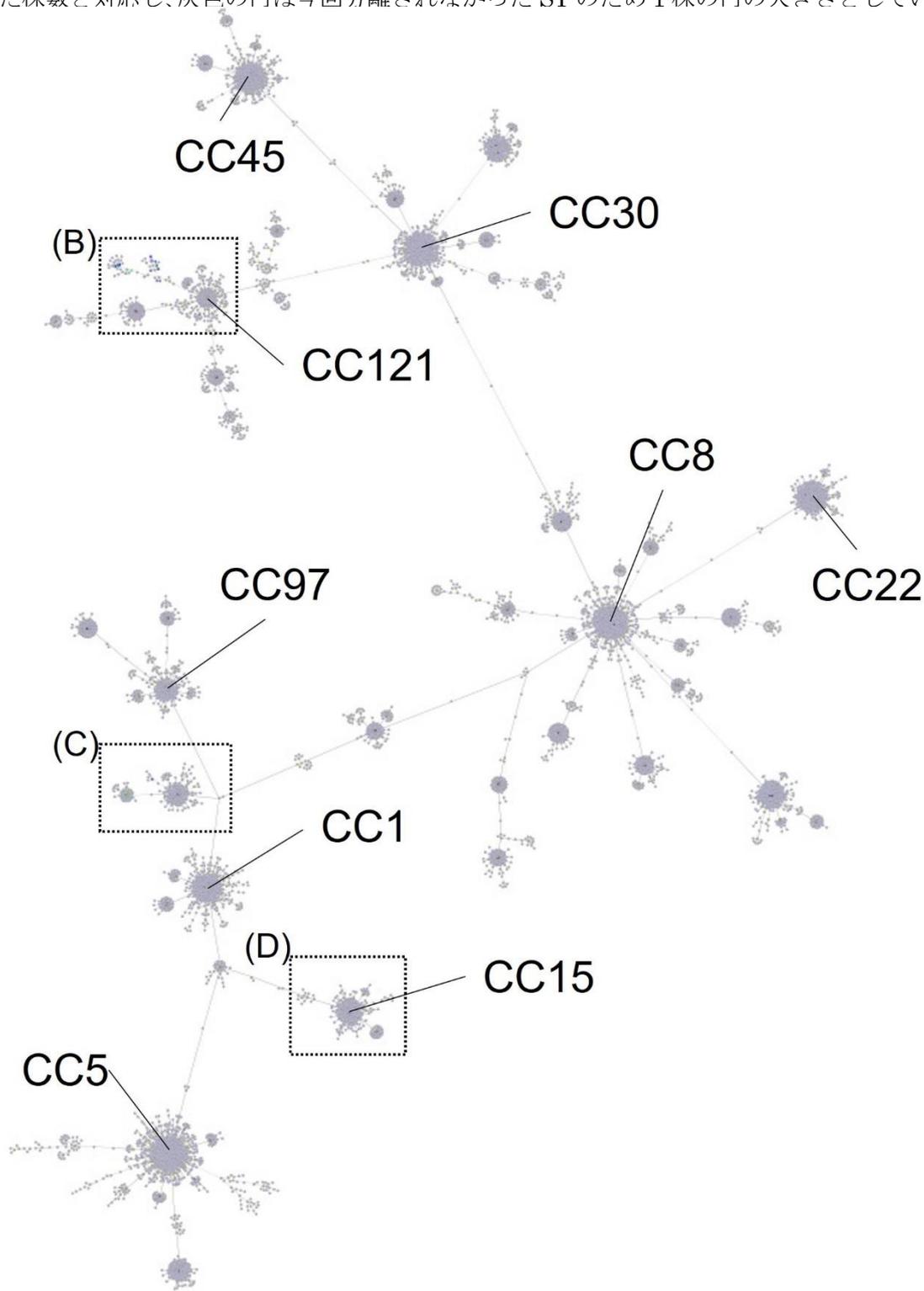
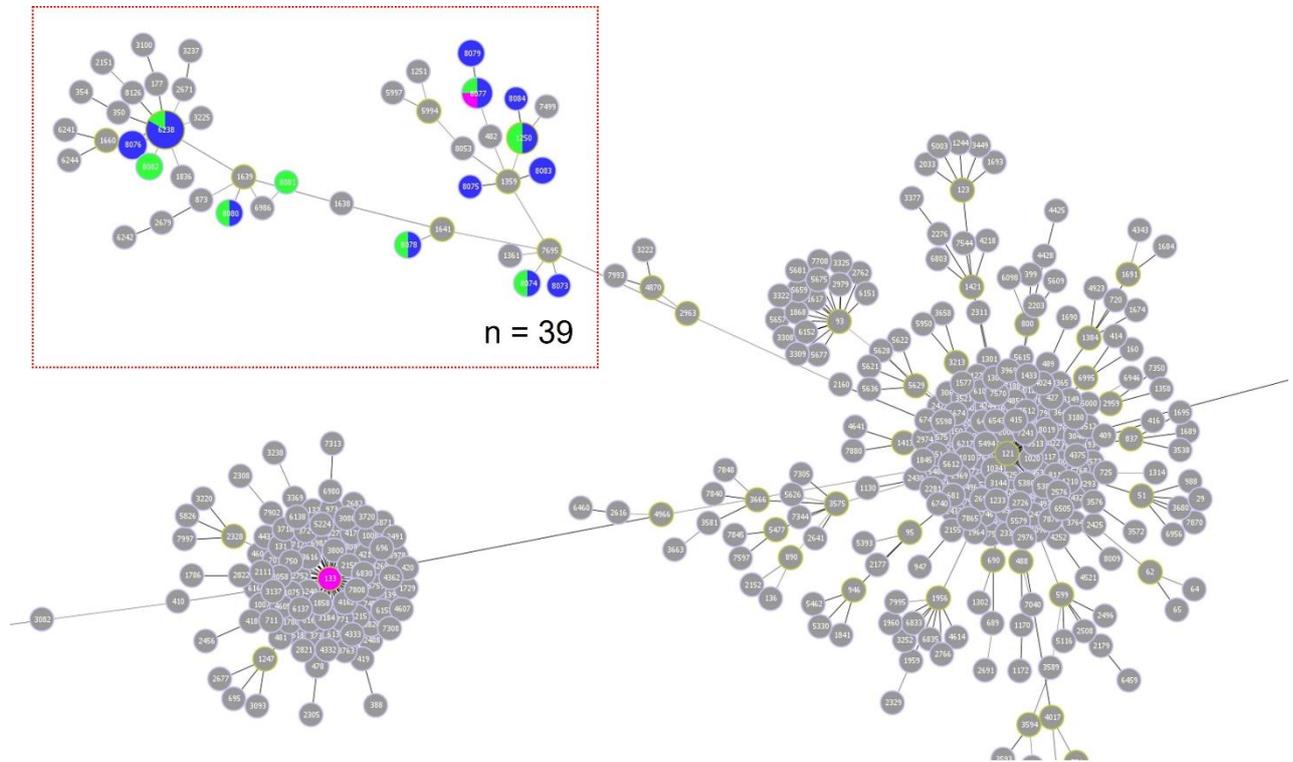




図3 黄色ブドウ球菌のST型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析

(B) 図 3A 中の (B) の拡大図



(C) 図 3A 中の (C) の拡大図

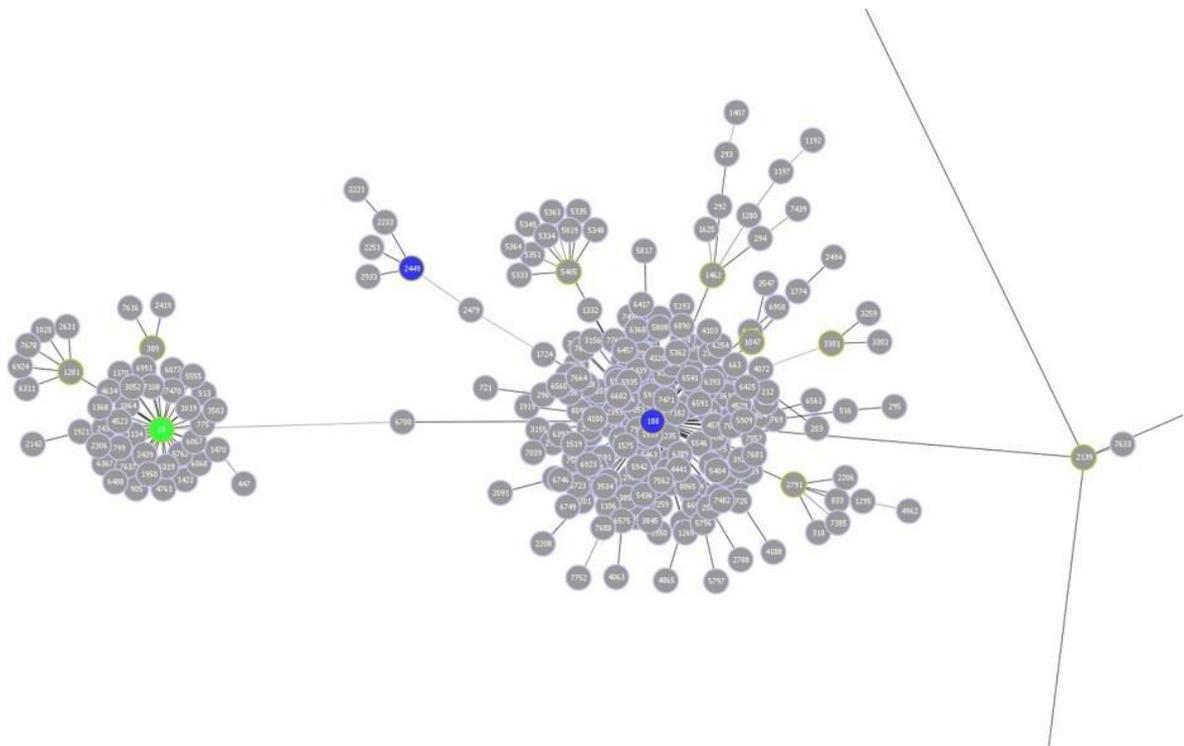


図3 黄色ブドウ球菌のST型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析

(D) 図 3A 中の (D) の拡大図

