

令和 5 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

研究分担者 氏名 (所属) 鈴木康規 (北里大学獣医学部)
研究協力者 氏名 (所属) 高井伸二 (北里大学獣医学部)
氏名 (所属) 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 β ラクタム系抗菌薬に耐性を示す腸内細菌目細菌の野生鳥獣における保有状況を調査するため、シカおよびイノシシの糞便並びに市場流通後のシカ肉からの上記菌株の分離並びに特性解析を実施し、野生鳥獣を由来とする分離菌株が健康リスクとなり得るのか評価した。本年度は、シカ糞便 162 検体、イノシシ糞便 68 検体及びシカ肉 42 検体を調査した。黄色ブドウ球菌は、シカ糞便 6 検体 (3.7%)、イノシシ糞便 1 検体 (1.6%)、食肉 14 検体 (33.3%) から分離された。これは、昨年度までの分離傾向と一致しており、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。また、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、サンプリングの時期が異なっても分離率の高い施設が存在した。本施設で処理された食肉からは大腸菌等の衛生指標細菌も検出されており、黄色ブドウ球菌の高い分離率が糞便汚染に起因することを強く支持していると考えられる。一方、一昨年及び昨年と同様、CRE は分離されなかったことから、野生鳥獣が生息する環境には CRE が拡散していないことが示唆された。セフトキシム (CTX) に耐性を示す株が、シカ糞便 2 検体 (1.2%)、イノシシ糞便 8 検体 (13.1%) から分離された。本年度は一昨年の傾向に類似しイノシシ糞便からの方が高率に分離された。本年はある程度地域に偏りが無いサンプリングが実施できたためであると考えられる。これまでの分離菌株のゲノム解析を進め、CTX 耐性菌が保有する β ラクタマーゼ遺伝子のうち、最も分離率の高い $bla_{CTX-M-15}$ が 3 種類の遺伝子カセット内に存在し、染色体・プラスミドどちらにも挿入され得ることが明らかとなった。また、 $bla_{CTX-M-15}$ 保有プラスミドはいずれも大腸菌 J53 株に対して接合伝達を起こさなかった。すなわち本プラスミドを介した $bla_{CTX-M-15}$ 遺伝子の伝播は起こりづらいと考えられるが、 $bla_{CTX-M-15}$ 遺伝子はすでに国内外の環境中に広く分布しており、可動性の遺伝子カセット内に存在することからも、本プラスミドを介さない伝播様式により広域に拡散している耐性遺伝子であると推測された。さらに、*Citrobacter braakii* CB21D158 株が新規 β ラクタマーゼ遺伝子を保有することを明らかにした。本遺伝子の機能解析の結果、 bla_{new} を大腸菌に形質転換した株のイミペネム、メロペネム、アモキシシリン、セフトジジムの MIC はすべて上昇していた。しかし、これらの MIC は既報の β ラクタマーゼ bla_{CMY-70} 形質転換体の MIC より低値であった。CB21D158 株が持つ新規 β ラクタマーゼと既報の bla_{CMY-70} では基質となる β ラクタム抗菌薬に違いがある可能性、または、本遺伝子の上流配列のプロモーター活性の違いにより差が生じた可能性が考えられた。

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

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「最後の切り札」的抗菌薬であるイミペネムやメロペネムなどの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目細菌 (CRE) が国際的に警戒されている。我が国においても、2014年9月より本菌を原因とする CRE 感染症が感染症法に基づく 5 類全数把握対象疾患となり、その発生状況を注視している。本耐性遺伝子の特徴として①水平伝達され易いため広く伝播する恐れがあること、②多くの variant が存在し基質となる薬剤が異なる表現型を有するものが存在することなどがあげられる。ヒトの臨床現場における CRE 感染症患者からの分離菌株の疫学的及び遺伝学的解析は数多く報告され、その地域で流行する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 β 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、一昨年・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 壁谷英則教授にご協力頂いた。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、4°C 保存の状態で当研究室まで搬入した。

2) 野生鳥獣由来食肉試料

本工程は、昨年度に引き続き株式会社一成 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施設で解体されたシカの生肉を使用した。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) 薬剤感受性試験 (Etest)

薬剤感受性試験用 Etest (Sysmex-biomerieux) を用い、添付マニュアルに従って実施した。

7) 分離菌株の全ゲノム解析

分離菌株を BHI 液体培地で一晩培養し、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) を用いてシークエンス用ライブラリを作製した。MiSeq もしくは iSeq (Illumina) シークエンスシステムを用いて、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、新規 β ラクターマーゼと既報の β ラクターマーゼのアミノ酸配列アライメント解析は Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) を使用した。

8) 接合伝達試験

上項 7) で同定した β ラクターマーゼ遺伝子のうち最も分離率の高かった *bla*_{CTX-M-15} の保有株について、大腸菌 J53 株に対する接合伝達試験を行った。なお、*bla*_{CTX-M-15} 保有株は、上項 7) のゲノム解析で本遺伝子がプラスミド上に存在すると考えられた 6 株 (EC21B12②、EC21B29、EC22D79、EC21B28、EC21B32 及び EC21D103②) を使用した。方法は我々が以前報告した共培養法に準拠した (Suzuki et al., mSphere. 4:e00391-19, 2019.)。

9) 新規 β ラクターマーゼの機能解析

上項 7) で同定した新規 β ラクターマーゼ遺伝子並びに既報の *bla*_{CMY70} の上流 475bp から終始コドンまでを定法に従って PCR で増幅し、それぞれ pHSG398 ベクター (タカラバイオ) にサブクローニングした。これらのサブクローニングしたプラスミド (pHSG398::*bla*_{new} 及び pHSG398::*bla*_{CMY70}) を定法に従い大腸菌 DH5 α 株並びに ER2566 株に形質転換した。各形質転換体をクロラムフェニコール添加 LB 寒天培地で選択し、イミペネム、メロペネム、アモキシシリン、セフトジジムの最小発育阻止濃度 (MIC) を上項 5) の Etest を用いて測定した。なお、PCR には Tks Gflex™ DNA Polymerase (タカラバイオ) を用い、プライマー配列は以下の通りである (下線部分は制限酵素サイトを示す) ;

P475_CMYnew_F
(TATAGAATTCTCGCTCAACAGAGGGAAAAGAC)

P475_CMYnew_R
(TATAAAGCTTTTACTGCAGTTTTTCAAGAATGC),
P475_CMY70_F
(TATAGAATTCTGGACTCTTCAGAATACAGACAG)
P475_CMY70_R
(TATAAAGCTTTTTATTGCAGTTTTTCAAGAATGC)。

また、pHSG ベクター及び PCR 産物は、EcoRI 及び HindIII (タカラバイオ) で切断後、Ligation High ver.2 (Toyobo) を用いて 16°C で一晩、ライゲーション反応を行った。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

1) 野生獣糞便からの黄色ブドウ球菌の分離率 (表 1)

日本全国 15 都道府県で採取したシカ糞便 162 検体中 6 検体から黄色ブドウ球菌が分離され、陽性率は 3.7%であった (2023 年 1 月 31 日から 2024 年 2 月 15 日までの搬入分)。また、日本全国 8 都道府県で採取したイノシシ糞便 61 検体中 1 検体のみから黄色ブドウ球菌が分離され、陽性率は 1.6%であった。本年度も昨年・一昨年同様、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た。

2) 野生獣糞便及からの β ラクター系抗生物質耐性腸内細菌目細菌の分離率 (表 2)

上記と同一の糞便検体を用いて β ラクター系抗生物質耐性腸内細菌科細菌の分離を行った。昨年・一昨年の結果と同様、2023 年 1 月 31 日から 2024 年 2 月 15 日までの搬入分の全 260 検体において CRE は検出されなかった。セフトキシムに耐性を示し基質特異性拡張型 β -ラクターマーゼ (Extended spectrum beta-lactamase: ESBL) 産生菌だと疑われる株が、シカ糞便 162 検体中 2 検体 (陽性率: 1.2%) から分離された一方で、イノシシ糞便 61 検体中 8 検体 (陽性率: 13.1%) から分離された。分離した 10 株はいずれもセフトジジムをはじめとするセフェム系 β ラクター系薬剤に対して耐性を示したが、イミペネム、メロペネム、ドリペネム等のカルバペネム系の薬剤に対しては感受性を示した。本年度の傾向としては、昨年度より一昨年の報告と類似しており、シカ糞

便よりもイノシシ糞便から高率に耐性菌が分離された。

3) 解体・加工後市場流通シカ肉からの黄色ブドウ球菌並びにβラクタム系抗生物質耐性腸内細菌目細菌の分離と一般衛生細菌検査（表1、2）

北海道、京都府及び兵庫県で捕獲・解体後されたシカ肉 42 検体中 14 検体から黄色ブドウ球菌が分離され、陽性率は 33.3%であった。また、βラクタム系抗生物質耐性腸内細菌科細菌は 42 検体中 1 検体のみから分離され、陽性率は 2.4%であった。本年度も昨年同様、黄色ブドウ球菌は市場流通シカ肉から高率に分離された。また、黄色ブドウ球菌の分離される処理施設は偏っており、北海道の処理施設 F は検査時期を異なっているにもかかわらず高率に分離される傾向があった。

4) 分離した黄色ブドウ球菌の遺伝学的特性（表3）

分離した黄色ブドウ球菌 73 株（昨年及び一昨年の分離菌株も含む）の全ゲノム解析を進めており、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。各菌株の特徴については表 3 を参照されたい（数値、遺伝子名が空欄のものは 2024 年 4 月現在解析中の菌株である）。

5) 分離した薬剤耐性腸内細菌目細菌の特性（図3、図4、図5、表4、表5）

分離したβラクタム系抗生物質耐性腸内細菌目細菌 36 株（昨年及び一昨年の分離菌株も含む）の全ゲノム解析を進めた。

昨年度までに分離された 28 株すべてがセフトラジジム及びカルバペネム系薬剤以外のβラクタム剤に耐性を示し、その内 2 株（CB21D158 及び EH22D99）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（表4）。本 28 株中 26 株の菌種が *Escherichia coli* であり、上記の CB21D158 は *Citrobacter braakii*、EH22D99 は *Enterobacter hormaechei* であった。なお、本年度詳細なゲノム解析を実施したことで、一部菌種同定結果の修正点があり、昨年度報告書から菌株名を CL22D99 から EH22D99 に修正

し、菌種も *Enterobacter cloacae* から *Enterobacter hormaechei* に訂正する。

CTX 耐性 *E. coli* 株は分子系統樹解析並びに MLST から大きく 3 つのクラスターに分類された。また、これらは少なくとも 1 種類のβラクタマーゼ遺伝子を保有し、その多くが $bla_{CTX-M-15}$ (46.2%) もしくは $bla_{CTX-M-55}$ (34.6%) を保有した（図3）。最も分離率の高かった $bla_{CTX-M-15}$ は 3 種類の遺伝子カセット内に存在し、染色体（4 株分離）・プラスミド（6 株分離）どちらにも挿入され得ることが明らかとなった（図4）。また、 $bla_{CTX-M-15}$ 保有プラスミドはいずれも *E. coli* J53 株に対して接合伝達を起こさなかった（表5）。

C. braakii CB21D158 株は新規のβラクタマーゼ遺伝子を保有していた。この新規βラクタマーゼは、EC21B42 株が保有する既報の bla_{CMY-70} と比較して 18 カ所のアミノ酸置換を生じていた（図5）。

6) 新規βラクタマーゼの機能解析（表6）

前項5)で同定した新規βラクタマーゼ遺伝子について上流 475bp（予測プロモーター配列）を含むように pHSG398 ベクターに導入し、大腸菌（DH5α 及び ER2566）に形質転換した。pHSG398 空ベクターの形質転換体と比較して、 $pHSG398::bla_{new}$ 形質転換体のイミペネム、メロペネム、アモキシシリン、セフトラジジムの MIC はすべて上昇していた。しかし、 $pHSG398::bla_{new}$ 形質転換体はいずれの薬剤に対する MIC も既報のβラクタマーゼ $pHSG398::bla_{CMY70}$ 形質転換体より低値であった。

D. 考察

1) 野生鳥獣が保有する病原菌のリスクについて

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及び一昨年と同様の傾向であった。この 3 年間の継続した結果は、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。昨年度までの分離菌株のゲノム解析により、①野生獣には、CC121 から分岐した独自の黄色ブドウ球菌クローンが定着していること、②流通ジビエ肉への黄色ブドウ球菌汚

染は処理工程における糞便汚染であることが示唆されている。本年度の分離結果より、同一処理施設から異なる時期にサンプリングしたシカ肉において高率に分離される傾向にあったこと、また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、昨年度の結果に引き続いて、黄色ブドウ球菌の高い分離率との相関性があったことから糞便汚染を強く支持する結果であると考えられ、本施設での処理工程を見直す必要があると考えられる。

一昨年から継続して CRE の分離を試みたが、本年度も CRE は分離されなかった。3 年間の継続した検査において 1 株も分離されなかったことは、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拡散していないことを強く示唆している。

本年は、11 株の CTX 耐性の腸内細菌目細菌が分離された。昨年度はイノシシ糞便よりシカ糞便から高率に分離されたが、本年度は一昨年の傾向に類似しイノシシ糞便からの方が高率に分離された。この理由として、昨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と考察したが、本年度は 8 都道府県と、ある程度地域に偏りが無いサンプリングが実施できたためであると考えられる。しかし、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は明確な関連性は見出されなかった。

CTX 耐性 *E. coli* 株は分子系統樹解析並びに MLST から大きく 3 つのクラスターに分類された。また、これらは少なくとも 1 種類の β ラクタマーゼ遺伝子を保有し、その多くが $bla_{CTX-M-15}$ (46.2%) もしくは $bla_{CTX-M-55}$ (34.6%) を保有した。最も分離率の高かった $bla_{CTX-M-15}$ は 3 種類の遺伝子カセット内に存在し、染色体・プラスミドどちらにも挿入され得ることが明らかとなった。いずれのカセットも動物・環境からの分離例が報告されており、世界中に広く分布していると考えられる。また、今回解析した $bla_{CTX-M-15}$ 保有プラスミドはいずれも *E. coli* J53 株に対して接合伝達を起こさなかった。このことは国内野生動物由来の $bla_{CTX-M-15}$ 保有プラスミドを介した本遺伝子の伝播は起こりづらいことを示唆している。し

かし、 $bla_{CTX-M-15}$ はすでに環境中に広く分布している耐性遺伝子であり、可動性の遺伝子カセット内に存在することからも、本プラスミドを介さない伝播様式(例えば、別のプラスミドあるいは別の可動性遺伝子)により広域に拡散している耐性遺伝子であると推測された。

2) 新規 β ラクタマーゼの機能について

今年度同定した新規 β ラクタマーゼ遺伝子について形質転換体を用いた機能解析を行った。pHSG398 空ベクターの形質転換体と比較して、 $pHSG398::bla_{new}$ 形質転換体のイミペネム、メロペネム、アモキシシリン、セフトジジムの MIC はすべて上昇していた。しかし、 $pHSG398::bla_{new}$ 形質転換体はいずれの薬剤に対する MIC も既報の β ラクタマーゼ $pHSG398::bla_{CMY70}$ 形質転換体より低値であった。このことから、CB21D158 株が持つ新規 β ラクタマーゼと既報の bla_{CMY-70} では基質となる β ラクタム薬に違いがある可能性が考えられた。また、今回はそれぞれの株が保有する上流配列(すなわち予測プロモーター配列)を活かした形で、本実験を行った。すなわち、今回の活性の違いが、上流配列のプロモーター活性の違いにより生じた可能性も考えられる。

E. 結論

1) 一昨年及び昨年と同様、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菌率が高いことを強く示唆している。

2) 一昨年及び昨年と同様、CRE は分離されなかったことから、野生鳥獣が生息する環境には CRE が拡散していないことが示唆された。また、本年は 11 株(シカ糞便: 3 株、イノシシ糞便: 8 株)の CTX 耐性の腸内細菌目細菌が分離され、イノシシ糞便からの方が高率に分離された。これは一昨年の傾向に類似しており、本年度は 8 都道府県と、ある程度地域に偏りが無いサンプリングが実施できたためであると考えられる(なお、昨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と考察した)。

3) 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、処理施設 F では特に高い分離率であった。本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、昨年度に引き続いて、黄色ブドウ球菌の高い分離率が糞便汚染に起因することを強く支持していると考えられる。

4) CTX 耐性菌が保有する β ラクタマーゼ遺伝子のうち、最も分離率の高かった $bla_{CTX-M-15}$ は 3 種類の遺伝子カセット内に存在し、染色体・プラスミドどちらにも挿入され得ることが明らかとなった。いずれのカセットも動物・環境からの分離例が報告されており、世界中に広く分布していると考えられる。また、今回解析した $bla_{CTX-M-15}$ 保有プラスミドはいずれも *E. coli* J53 株に対して接合伝達を起こさなかった。すなわち本プラスミドを介した $bla_{CTX-M-15}$ 遺伝子の伝播は起こりづらいと考えられるが、 $bla_{CTX-M-15}$ 遺伝子はすでに国内外の環境中に広く分布しており、可動性の遺伝子カセット内に存在することからも、本プラスミドを介さない伝播様式により広域に拡散している耐性遺伝子であると推測された。

5) 本年実施した詳細なゲノム解析により、新規 β ラクタマーゼ遺伝子を同定した。pHSG398:: bla_{new} 形質転換体のイミペネム、メロペネム、アモキシシリン、セフトジジムに対する MIC はすべて上昇していた。しかし、これらの MIC は、既報の β ラクタマーゼ pHSG398:: bla_{CMY-70} 形質転換体より低値であった。このことから、新規 β ラクタマーゼと既報の bla_{CMY-70} では基質となる β ラクタム薬に違いがある可能性が考えられた。また、今回はそれぞれの株が保有する上流配列（すなわち予測プロモーター配列）を活かした実験系であったことから、上流配列のプロモーター活性の違いにより生じた可能性も考えられたため、今後さらなる検証が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, Y., Ishitsuka, T., Takagi, M., Sasaki, Y., Kakuda, T., Kobayashi, K., Kubota, H., Ono, H.K., Kabeya, H., Irie, T., Andoh, M., Asakura, H., and Takai, S. (2024). Isolation and genetic characterization of *Staphylococcus aureus* from wild animal feces and game meats. *Folia Microbiol.* 69:347-360.

2. 学会発表

1. 鈴木康規、石塚桃子、高木美羽、久保田寛顕、小林甲斐、壁谷英則、佐々木由香子、角田勤、高井伸二. 野生獣糞便並びに市場流通シカ肉からの β ラクタム系抗菌薬耐性腸内細菌目細菌の分離とその特性. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会 (大阪) 2023 年 9 月 21 日-22 日. 講演要旨集 p 26.

2. 石塚桃子、鈴木康規、高木美羽、久保田寛顕、小林甲斐、壁谷英則、小野久弥、佐々木由香子、角田勤、高井伸二. 野生獣糞便並びに市場流通シカ肉からの黄色ブドウ球菌の分離と分離菌株の特性. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会 (大阪) 2023 年 9 月 21 日-22 日. 講演要旨集 p 26.

3. 講演会

1. 高井伸二. 野生鳥獣処理活用技術者研修会 令和 5 年 8 月 30 日、兵庫県神戸市、70 名、「ジビエ基礎セミナー」 農林水産省補助事業 鳥獣被害対策基盤支援事業 (株式会社一成) 本セミナーは、ジビエ処理加工施設の経営を考えている関係者を対象として、被害対策で捕獲した個体の衛生的な解体 処理技術、食肉ビジネスに取り組む上での運営等に関する必要な考え方、捕獲から販売流通までの計画立案に必要な応用力を身につけ、自ら実践、立案できる人材の育成を目指している。

2. 高井伸二. 野生鳥獣処理活用技術者研修会 令和 5 年 9 月 12-13 日、京都府京丹波町、50 名、「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリ

スク管理:何が重要か」 農林水産省補助事業
鳥獣被害対策基盤支援事業 (株式会社一成)
概要は同上

3. 高井伸二. 野生鳥獣処理活用技術者研修会 令和5年11月8-9日、鹿児島県阿久根市、50名、「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理:何が重要か」 農林水産省補助事業 鳥獣被害対策基盤支援事業 (株式会社一成) 概要は同上

4. 高井伸二. ジビエハンター研修会 令和5年10月20日 (オンライン) 50名「衛生管理・疾病」農林水産省補助事業 鳥獣被害対策基盤支援事業 利活用技術者育成研修事業 (株式会社一成)。概要 野生動物の捕獲従事者等を対象とした食肉利用に適した捕獲および異常の確認、および衛生管理等に関する研修会を実施する。研修終了後、受講者に対して、研修カリキュラムの理解度を確認し、研修修了証を受講者に授与する。

5. 高井伸二. ジビエハンター研修会 令和5年12月5日 (オンライン) 40名「衛生管理・疾病」農林水産省補助事業 鳥獣被害対策

基盤支援事業 利活用技術者育成研修事業 (株式会社一成)。概要は同上

6. 高井伸二. ジビエハンター研修会 令和6年1月18日 (オンライン) 40名「衛生管理・疾病」農林水産省補助事業 鳥獣被害対策基盤支援事業 利活用技術者育成研修事業 (株式会社一成)。概要は同上

7. 高井伸二. ジビエハンター研修会 令和6年2月1日 (オンライン) 40名「衛生管理・疾病」農林水産省補助事業 鳥獣被害対策基盤支援事業 利活用技術者育成研修事業 (株式会社一成)。概要は同上

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

図表

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（一昨年・昨年検体も含む）

検体	分離年	陽性率 (%)	内訳 都道府県 (検体数: 由来)	菌株名
シカ糞便	2021	8/182 (4.4%)	青森 (3検体: 交通事故死個体)	SA21S1, SA21S2, SA21S5
			奈良 (3検体: 畜産協会)	SA21D57, SA21D63, SA21D82
			群馬 (1検体: 猟友会)	SA21D62
			宮崎 (1検体: 畜産協会)	SA21D112
	2022	21/191(11.0%)	岩手 (1検体: 猟友会)	SA22D4
			静岡 (1検体: 畜産協会)	SA22D23
			宮崎 (3検体: 猟友会・畜産協会)	SA22D43, SA22D144, SA22D146
			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: 民間企業)	SA22D97
			京都 (1検体: 民間企業)	SA22D98
			大阪 (5検体: 畜産会)	SA22D101, SA22D116, SA22D127, SA22D163, SA22D164
			神奈川 (1検体: 民間企業)	SA22D109
			青森 (2検体: 畜産協会)	SA22D149, SA22D195
2023	6/162(3.7%)	静岡 (2検体: 畜産協会)	SA23D5, SA23D25	
		奈良 (1検体: 民間企業)	SA23D53	
		大分 (1検体: 畜産協会)	SA23D63	
		鹿児島 (1検体: 畜産物衛生指導協会)	SA23D117	
		宮崎 (1検体: 畜産協会)	SA23D137	
イノシシ糞便	2021	0/70(0%)		
	2022	2/47(4.3%)	岡山 (1検体: 猟友会)	SA22B2
			宮崎 (1検体: 畜産協会)	SA22B25
2023	1/61(1.6%)	青森 (1検体: 畜産協会)	SA23B46	
食肉 (シカ肉)	2022	21/75 (28.0%)	静岡 (1検体/12検体: 施設A)	SA22DM15
			静岡 (2検体/6検体: 施設B)	SA22DM20, SA22DM21
			宮崎 (3検体/9検体: 施設C)	SA22DM30, SA22DM31, SA22DM33
			徳島 (2検体/5検体: 施設D)	SA22DM37, SA22DM39
			鹿児島 (11検体/13検体: 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
	2023	14/42 (33.3%)	北海道 (10検体/18検体: 施設F)	SA23DM1, SA23DM2, SA23DM3, SA23DM4, SA23DM23, SA23DM24, SA23DM25, SA23DM26, SA23DM29, SA23DM32
			京都 (1検体/14検体: 施設G)	SA23DM34
			兵庫 (2検体/7検体: 施設H)	SA23DM15, SA23DM16
			兵庫 (1検体/3検体: 施設I)	SA23DM21

* 昨年度までの報告書は、継続検査の途中経過を報告したため年度毎の結果を記載したものを報告したが、本年度は最終年度であるため年ごとに集計し直し、記載した。

表 2. 野生獣糞便及び食品検体からの薬剤耐性腸内細菌目細菌の分離結果（一昨年・昨年検体も含む）

検体	分離年	陽性率 (%)	内訳 都道府県 (検体数:由来)	菌株名	
カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)					
シカ糞便	2021	0/182(0%)			
	2022	0/191(0%)			
	2023	0/152(0%)			
イノシシ糞便	2021	0/70(0%)			
	2022	0/47(0%)			
	2023	0/61(0%)			
食肉 (シカ肉)	2022	0/75(0%)			
	2023	0/42(0%)			
セフトキシム耐性腸内細菌目細菌 (ESBL疑い)					
シカ糞便	2021	7/182 (3.8%)	大分 (2検体: 畜産協会)	EC21D54, EC21D79	
			大阪 (4検体: 畜産会) うち1検体から2種類の株を分離	EC21D90, EC21D93, EC21D96, EC21D103① (EC21D103②)	
			青森 (1検体: 畜産協会)	CB21D158	
	2022	5/191(2.6%)	奈良 (2検体: 畜産協会)	EC22D69, EC22D94	
			北海道 (1検体: 民間企業)	EC22D92	
			大阪 (1検体: 畜産会)	EC22D116	
			京都 (1検体: 民間企業)	EH22D99	
	2023	2/162(1.2%)	由来不明 (2検体)	et23D157, et23D164	
	イノシシ糞便	2021	14/70(20.0%)	大分 (10検体: 畜産協会) うち1検体から2種類の株を分離	EC21B12① (EC21B12②), EC21B18, EC21B19, EC21B22, EC21B28 EC21B29, EC21B32, EC21B39, EC21B42, EC21B44
				奈良 (2検体: 畜産協会)	EC21B23, EC21B46
山形 (1検体: 畜産協会)				EC21B27	
熊本 (1検体)				EC21B33	
岡山 (1検体: 猟友会)				EC22B2	
2022		1/47(4.3%)	青森 (2検体: 畜産協会)	et23B17, et23B22	
			大分 (4検体: 畜産協会)	et23B19, et23B23, et23B36, et23B51	
2023		8/61(13.1%)	山形 (2検体: 畜産協会)	et23B40, et23B43	
食肉 (シカ肉)	2022	0/75 (0%)			
	2023	1/42 (2.4%)	北海道 (1検体/18検体: 施設G)	et23DM26	

* 昨年度までの報告書は、継続検査の途中経過を報告したため年度毎の結果を記載したものを報告したが、本年度は最終年度であるため年ごとに集計し直し、記載した。

** et23D157 株、et23D164 株、et23B17 株、et23B19 株、et23B22 株、et23B23 株、et23B36 株、et23B40 株、et23B43 株、et23B51 株及び et23DM26 株は ANI analysis が未実施のため菌種決定されていない。仮の菌株名を記載している。

表 3. 分離した黄色ブドウ球菌の遺伝学的特性 (一昨年・昨年の分離菌株も含む)

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
SA22D108	Oita	98.49	2449	<i>sec, seh, sei, sel, sem, sen, seo, selu</i>	<i>blaZ</i> (β-lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
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>blaTEM-116</i> (β-lactam) <i>erm(T)</i> (Erythromycin)	No
SA23D5	Shizuoka	97.78	6238	<i>sei, sem, sen, seo, selu</i>	<i>blaTEM-116</i> (β-lactam)	No
SA23D25	Shizuoka					
SA23D53	Nara					
SA23D63	Oita					

SA23D117	Kagoshima						
SA23D137	Miyazaki						
SA22B2	Okayama	97.91	133	No		No	No
SA22B25	Miyazaki	97.86	8077	No		No	No
SA23B46							
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>blaZ</i> (β -lactam)	No
SA22DM43	Kagoshima	99.01	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam)	No
SA22DM46	Kagoshima	99.02	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam)	No
SA22DM47	Kagoshima	98.99	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM48	Kagoshima	99.00	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam)	No
SA22DM49	Kagoshima	99.03	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM50	Kagoshima	99.00	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM51	Kagoshima	99.02	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam)	No
SA22DM52	Kagoshima	99.00	4278	No		<i>blaZ</i> (β -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM69	—	97.84	6238	<i>sei, sem, sen, seo, selu</i>	<i>bla</i> _{TEM-116}		No

					(β-lactam)	
SA22DM71	—	99.03	20	<i>seg, sem, sen, seo, selu</i>	<i>blaZ, bla_{TEM-116}</i> (β-lactam)	No
SA23DM1	Hokkaido					
SA23DM2	Hokkaido					
SA23DM3	Hokkaido					
SA23DM4	Hokkaido					
SA23DM15	Hyogo					
SA23DM16	Hyogo					
SA23DM21	Hyogo					
SA23DM23	Hokkaido					
SA23DM24	Hokkaido					
SA23DM25	Hokkaido					
SA23DM26	Hokkaido					
SA23DM29	Hokkaido					
SA23DM32	Hokkaido					
SA23DM34	Kyoto					

* 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

** 表中の空欄は解析中の菌株である。

表 4 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	由来	ペニシリン系		セフェム系					カルバペネム系			モノバクタム系
		AM10	AMX25	CZ30	CTX30	CAZ30	CRO30	CPD10	IPM10	MEM10	DRI10	ATM30
EC21D54	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21D79	シカ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
EC21D90	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21D93	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21D96	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21D103①	シカ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	I
EC21D103②	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
CB21D158	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	I
EC22D69	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC22D92	シカ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
EC22D94	シカ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S
EC22D116	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
EH22D99	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R
et23D157	シカ糞便	R	R	R	R	S	R	R	S	—	S	R
et23D164	シカ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	—	S	R
EC21B12①	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21B12②	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21B18	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	I
EC21B19	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
EC21B22	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
EC21B23	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21B27	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21B28	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
EC21B29	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
EC21B32	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
EC21B33	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
EC21B39	イノシシ糞便	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R
EC21B42	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S
EC21B44	イノシシ糞便	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	I
EC21B46	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
et23B17	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
et23B19	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I
et23B22	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
et23B23	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
et23B36	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
et23B40	イノシシ糞便	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
et23B43	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
et23B51	イノシシ糞便	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R
et23DM26	シカ肉	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R

* R : 耐性、I : 中間、S : 感受性、— : 実施せず

表 5 *bla*_{CTX-M-15} 遺伝子の存在様式と本遺伝子が存在するプラスミドの接合伝達効率

	存在場所	菌株名	接合伝達効率	動物・環境からの分離報告
Cassette 1	染色体	EC21B22	—	
		EC21D69	—	
	プラスミド	EC21B12②	< 1.0×10 ⁻⁹	カオジロガン (フィンランド) ・ 子牛 (ドイツ) ・豚 (イギリス)
		EC21B29	< 1.0×10 ⁻⁹	
	EC22D79	< 1.0×10 ⁻⁹		
Cassette 2	染色体	EC21B18	—	七面鳥 (中国)
		EC21B19	—	
Cassette 3	プラスミド	EC21B28	< 1.0×10 ⁻⁹	生乳チーズ (エジプト) ・野生鳥 (ノル ウェー) ・環境排水 (スウェーデン)
		EC21B32	< 1.0×10 ⁻⁹	
		EC21D103②	< 1.0×10 ⁻⁹	

* *bla*_{CTX-M-15} は 3 種類の遺伝子カセット内に存在し染色体・プラスミドどちらにも挿入され得る

** 今回の分離菌株が保有するプラスミドはいずれも *E. coli* J53 株に対して接合伝達を起こさなかつた

*** いずれのカセットも動物・環境からの分離例が報告されており、世界中に広く分布していると考えられる

表 6 pHSG 形質転換体、pHSG398::*bla*_{new} 形質転換体及び pHSG398::*bla*_{CMY70} 形質転換における最小発育阻止濃度の変化

	<i>E. coli</i> DH5a			<i>E. coli</i> ER2566		
	Empty	<i>bla</i> _{new}	<i>bla</i> _{CMY70}	Empty	<i>bla</i> _{new}	<i>bla</i> _{CMY70}
イミペネム	0.064	0.19	0.38	0.125	0.19	0.25
メロペネム	0.008	0.016	0.064	0.023	0.023	0.064
アモキシリン	1.5	>256	>256	4	>256	>256
セフトジジム	0.016	2	>256	0.38	24	>256

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

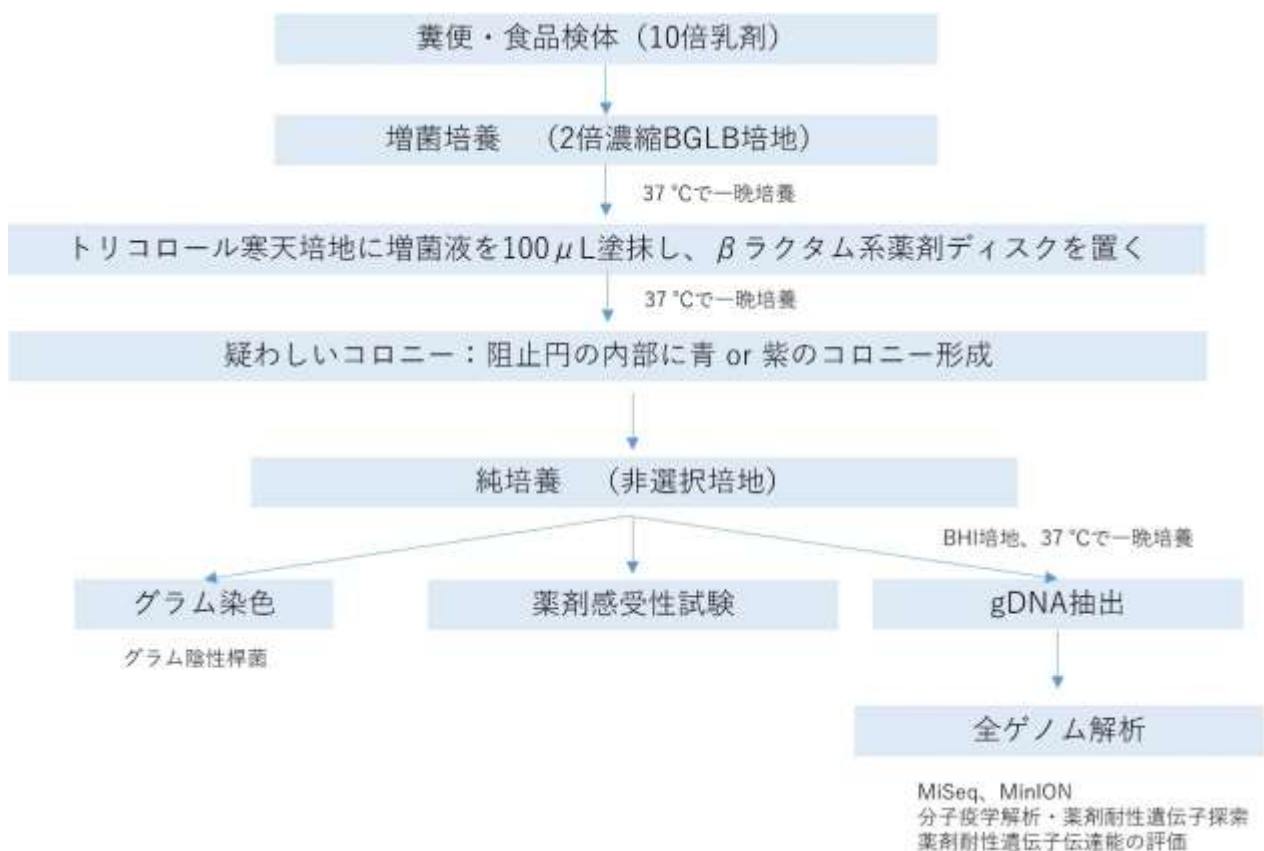


図 4 *bla*_{CTX-M-15} 遺伝子の存在様式

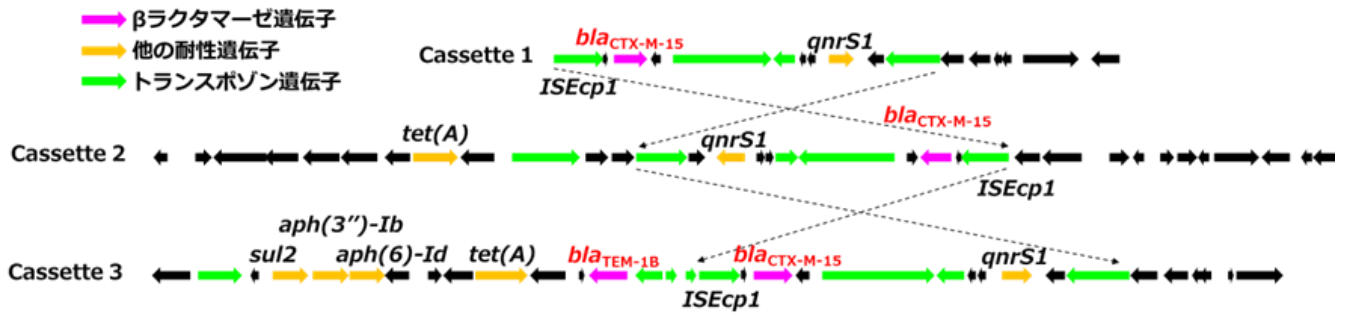


図 5 CB21D158 株が持つ新規 β ラクタマーゼ配列と既報の *bla*_{CMY-70} 配列との比較

```

MMKKSICCALLLTASFSTFAAAKTEQQIADIVNRTITPLMQEQAIPGMAVAIIYQGKPY 60
MMKKSLLCCALLLTASFSTFAAAKTEQQIADIVNRTITPLMQEQAIPGMAVAIIYQGKPY 60
*****:*****:*****

FTWKGADIANNRPVTQQLFELGVSVKTFNGVLGGDAIARGEIKLSDPVTQYWPELTGKQ 120
FTWKGADIANNRPVTQQLFELGVSVKTFNGVLGGDAIARGEIKLSDPVTQYWPELTGKQ 120
*****:*****:*****

WQGISLLHLATYTAGGLPLQVDDVTDKAALLRFYQNWQPQWAPGAKRLYANSSIGLFGA 180
WQGI RLLHLATYTAGGLPLQIPDDVRDKAALLHFYQNWQPQWTPGAKRLYANSSIGLFGA 180
**** *****:**** *****:*****:*****

LAVNPSGMSYEEAMTKRVLHPLKLAHTWITVPQSEQDYAWGYREGKPVHVSPGQLDAEA 240
LAVKPSGMSYEEAMTRRVLQPLKLAHTWITVPQNEQDYAWGYREGKPVHVSPGQLDAEA 240
***:*****:***:*****:*****

YGVKSSVIDMTRWVQANMDASVQEKTLQQGIELAQSRYWVRVGDYQGLGWEMLNWPVKA 300
YGVKSSVIDMARWVQANMDASHVQEKTLQQGIALAQSRYWRIGDYMVQGLGWEMLNWPLKA 300
*****:*****:***** *****:*****:***

DSIISGSDSKVALAALPAVEVNPAPAVKASwVHKTGSTGGFGSYVAFVPEKNLGIVMLA 360
DSIINGSDSKVALAALPAVEVNPAPAVKASwVHKTGSTGGFGSYVAFVPEKNLGIVMLA 360
****.*****:*****:*****

NKSYPNPVRVEAAWRILEKLQ* 381
NKSYPNPVRVEAAWRILEKLQ* 381
*****

```

(上段：新型, 下段：CMY-70型)

* CB21D158 株が持つ新規 β ラクタマーゼは、既報の *bla*_{CMY-70} (EC21B42 株が保有) と比較して 18 カ所のアミノ酸置換を生じていた