

令和3年度～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）  
（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：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目細菌（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。2021年から2023年の間に、シカ糞便535検体、イノシシ糞便178検体及びシカ肉117検体を調査した。黄色ブドウ球菌は、シカ糞便35検体（6.5%）、イノシシ糞便3検体（1.7%）、シカ肉35検体（29.9%）から分離された。このことは、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示唆している。また、これらの分離菌株の多くは、Clonal Complex 121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Sequence Typeが複数分離されたことから、処理工程における流通シカ肉への糞便汚染が疑われた。一部の黄色ブドウ球菌株においてエンテロトキシン（SE）遺伝子保有株が存在し、その多くはegc関連の新型SE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ているが、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。また、上記3年間において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。一方、セフォタキシム（CTX）に耐性を示す株が、シカ糞便14検体（2.6%）、イノシシ糞便23検体（12.9%）、シカ肉1検体（0.9%）から分離された。分離年において多少の増減はあるが、イノシシ糞便から高率に分離された。これは、イノシシとシカの食性の違いが影響したものと考えられる。ゲノム解析の結果、CTX耐性菌の多くは大腸菌であり、SNPs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、これら全ての菌株は少なくとも1種類のβラクタマーゼ遺伝子を保有し、その多くがbla<sub>CTX-M-15</sub>もしくはbla<sub>CTX-M-55</sub>を保有した。最も分離率の高いbla<sub>CTX-M-15</sub>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。また、bla<sub>CTX-M-15</sub>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<sub>CTX-M-15</sub>遺伝子の伝播は起こりづらいと考えられる。しかし一方で、bla<sub>CTX-M-15</sub>遺伝子はすでに国内外の環境中に広く分布し、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。このように本研究期間においては、主に環境中に広く分布しているblaが高率に検出されており、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。しかし、カルバペネムの効きづらいAmpC過剰産生株（bla<sub>ACT-16</sub>保有株）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懸念されるため、今後も継続的なモニタリングが必要である。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<sub>new</sub>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、セフトラジジムのMICはすべて上昇した。しかし、これらのMICは既報のβラクタマーゼbla<sub>CMY-70</sub>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<sub>CMY-70</sub>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「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。

本研究では、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B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、2022年より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。また、全ゲノム解析から新たな病原性候補遺伝子が同定されたため、本遺伝子の機能解析を実施することも目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 糞便試料

本工程は2021年4月より実施した。本事業の分担研究者である日本大学生物資源科学部 壁谷英則教授並びに研究協力者である宮崎大学農学部 入江隆夫准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℃保存の状態でご研究室まで搬入した。また、青森県八戸市の市街地で交通事故死し、動物火葬場に運び込まれたシカから採取した糞便も調査の対象とした。

### 2) 野生鳥獣由来食肉試料

本工程は2022年4月より実施し、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の一部を試料とした。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）

分離した菌株について、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）

分離した一部の菌株について、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。分離した黄色ブドウ球菌株を含めて ST 型に基づく最小スパン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。また、新規  $\beta$  ラクタマーゼと既報の  $\beta$  ラクタマーゼのアミノ酸配列アライメント解析には Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) を使用した。

## 8) Sandwich ELISA

SEC、SHE 遺伝子保有株の培養上清中の 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。

## 9) 接合伝達試験

上項 7) で同定した  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子のうち最も分離率の高かった *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 遺伝子保有株について、大腸菌 J53 株に対する接合伝達試験を行った。なお、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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 (EC21B12 ②、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て実施した (Suzuki et al., mSphere. 4:e00391-19, 2019.)。

## 10) 新規 $\beta$ ラクタマーゼの機能解析

上項 7) で同定した新規  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子並びに既報の *bla*<sub>CMY70</sub> 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*<sub>new</sub> 及び pHSG398::*bla*<sub>CMY70</sub>) を定法に従い大腸菌 DH5 $\alpha$  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  
(TATAGAAATTCTCGCTCAACAGAGGGAA AAGAC)  
P475\_CMYnew\_R  
(TATAAAGCTTTTACTGCAGTTTTTCAAG AATGC),  
P475\_CMY70\_F  
(TATAGAAATTCTGGACTCTTCAGAATACA GACAG)

P475\_CMY70\_R  
(TATAAAGCTTTTATTGCAGCTTTTCAAG  
AATGC)。

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)

2021 年 4 月から 2023 年 12 月までに日本各地で採取したシカ糞便 535 検体 (2021 年: 182 検体、2022 年: 191 検体、2023 年: 162 検体) 及びイノシシ糞便 178 検体 (2021 年: 70 検体、2022 年: 47 検体、2023 年: 61 検体) を分離に供した。3 年間の合計で、シカ糞便 535 検体中 35 検体から黄色ブドウ球菌が分離され、陽性率は 6.5% であった (なお、各年の陽性率は順に 4.4%、11.0%、3.7% であった)。また、同期間に日本各地で採取したイノシシ糞便 178 検体中 3 検体から黄色ブドウ球菌が分離され、陽性率は 1.7% であった (なお、各年の陽性率は順に 0%、4.3%、1.6% であった)。3 年間を通して、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。また、青森県の市街地で交通事故死したシカから高率に (3 検体/5 検体: 60%) 分離された。

### 2) 野生獣糞便及からの β ラクタム系抗生物質耐性腸内細菌目細菌の分離率 (表 2、表 3)

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。3 年間を通じた全 713 糞便検体から、CRE は検出されなかった。セフトキシム (CTX) 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、3 年間の合計で、シカ糞便 535 検体中 14 検体から分離され、陽性率は 2.6% であった (なお、各年の陽性率は順に 3.8%、2.6%、1.2% であった)。また、同期間に日本各地で採取したイノシシ糞便 178 検体中 23 検体から CTX 耐性腸内細菌目細菌が分離され、陽性率は 12.9% であっ

た (なお、各年の陽性率は順に 20.0%、4.3%、13.1% であった)。なお、2021 年に大阪府から搬入されたシカ糞便並び大分県から搬入されたイノシシ糞便からは異なる特性を示す 2 種類の CTX 耐性菌株が分離された。3 年間の傾向として、シカ糞便よりもイノシシ糞便から高率に CTX 耐性菌株が分離された (表 2)。

分離された菌株について 4 系統の β ラクタム系抗生物質の薬剤感受性試験を行った。全ての株がペニシリン系薬剤において阻止円は観察されなかった。また、CB21D158 株、CL22D99 株及び et23DM26 以外の分離菌株は、カルバペネム系薬剤に対して感受性を示した一方で、上記 3 株はこれらの薬剤に対して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 3)。

### 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、表 2)

2022 年及び 2023 年に北海道、静岡県、京都府、兵庫県、徳島県及び鹿児島県で捕獲・解体後されたシカ肉から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を行った。2 年間の合計で、117 検体中 35 検体から黄色ブドウ球菌が分離され、陽性率は 29.9% であった (なお、各年の陽性率は順に 28.0%、33.3% であった) (表 1)。また、β ラクタム系抗生物質耐性腸内細菌科細菌は 117 検体中 1 検体のみから分離され、陽性率は 0.9% であった (なお、各年の陽性率は順に 0%、2.4% であった) (表 2)。2 年間を通して、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、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。

### 4) 分離した黄色ブドウ球菌の遺伝学的特性 (表 4、表 5)

分離した黄色ブドウ球菌株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 (表 4)。黄色ブドウ球菌の標準株 (*S. aureus* NCTC8325: NC\_007795) に対する ANI value は解析した全ての分離菌株で 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。また、解析した 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 5)。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 3A)。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 遺伝子から SEE 遺伝子) を保有する株は存在しなかった。一方で、上記の優占クローンには属さない 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 遺伝子及び 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 (図 3B)。

上述の SA22D108 株は  $\beta$  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 SCCmec は存在せず、MRSA は分離されなかった (表 4)。

## 5) 分離した薬剤耐性腸内細菌目細菌の特性 (図 4、図 5、図 6、表 6)

分離した  $\beta$  ラクタム系抗生物質耐性腸内細菌目細菌株の全ゲノム解析を進めた。2022 年までに分離された 28 株すべてがセフトラジム及びカルバペネム系薬剤以外の  $\beta$  ラクタム剤に耐性を示し、本 28 株中 26 株の菌種が *Escherichia coli* であった。残りの 2 株である 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、2022 年度の報告書から以下の菌種同定結果の修正点がある。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 (図 4)。

CTX 耐性 *E. coli* 株は Core gene における SNPs を抽出した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、これら全ての菌株は少なくとも 1 種類の  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子を保有し、その多くが *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (46.2%) もしくは *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (34.6%) を保有した (図 4)。なお、CTX-M-15 型と CTX-M-55 型は 1 アミノ酸置換【A80V】のみの違いであることが知られている。最も分離率の高かった *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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 5)。*bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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 6)。

*E. hormaechei* EH22D99 株は AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼである *bla*<sub>ACT-16</sub> を保有していた (図 4)。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、これはイミペネムに対して中間を示した薬剤感受性試験の結果と一致していた。

*C. braakii* CB21D158 株は新規の  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子を保有していた (図 4)。この新規  $\beta$  ラクタマーゼは、EC21B42 株が保有する既報の *bla*<sub>CMY-70</sub> と比較して 18 ヲ所のアミノ酸置換を生じていた (図 6)。

#### 6) 新規 $\beta$ ラクタマーゼの機能解析 (表 7)

前項 5) で同定した新規  $\beta$  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 (DH5 $\alpha$  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*<sub>new</sub> 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*<sub>new</sub> 形質転換体はいずれの薬剤に対する MIC も既報の  $\beta$  ラクタマーゼ pHSG398::*bla*<sub>CMY70</sub> 形質転換体より低値であった。

#### D. 考察

##### 1) 黄色ブドウ球菌によるリスクについて

分離を実施した 3 年間を通して、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った (表 1)。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。また、市街地のシカ糞便からは高率に分離されることが示唆された。狩猟等で捕獲されたシカ糞便由来株の多くは、後述の通りこれまでに報告のない ST 型であった。すなわち、市街地に生息するシカは他の温血動物に由来する株を保菌する可能性がある。

2022 年までの分離菌株 53 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。すなわち、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 (図 3)。このことは、本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を示している。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シカ肉検

体の両者から分離された (図 3)。これは、処理工程における流通食肉への糞便汚染を示唆する結果である。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 並びに施設 F において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かつ大腸菌も検出された。このような衛生指標細菌の汚染率が黄色ブドウ球菌の分離率と高い相関性があったこと、また、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などから、本施設では、処理工程における継続的な糞便汚染が生じていることを強く支持している。このような施設では、解体・加工処理工程を見直す必要があると考えられる。

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 53 株中 17 株分離された (表 4)。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 SEs 遺伝子 (*sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *selu*) のみを保有していた。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、古典的 SEs (SEA~SEE) と比較して食中毒の原因毒素として報告されることが少ない。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 (遺伝子型 : *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、それぞれ  $4.97 \pm 0.68$   $\mu\text{g/ml}$  及び  $180.27 \pm 14.98$   $\text{ng/ml}$  であり (図 3B)、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った (Suzuki et al., J appl Microbiol. 118:1507-1520, 2015.; Sato'o et al. Appl Environ Microbiol. 81:7782-7790, 2015.)。以上のことから、この菌株による食中毒リスクは存在すると考えられる。

黄色ブドウ球菌が保有す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)-Ia* を同定した (表 4)。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、本研究期間を通して 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メチシリン(バンコマイシン)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

3年間を通して CRE の分離を試みたが、1株も分離されなかった。このことは、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。

一方で、表 2 に示す通り、セフトキシム (CTX) に耐性を示し基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌だと疑われる株が、3年間の合計で、シカ糞便 535 検体中 14 検体から分離され、陽性率は 2.6%であった(なお、各年の陽性率は順に 3.8%、2.6%、1.2%であった)。また、同期間に日本各地で採取したイノシシ糞便 178 検体中 23 検体から CTX 耐性腸内細菌目細菌が分離され、陽性率は 12.9%であった(なお、各年の陽性率は順に 20.0%、4.3%、13.1%であった)。さらに、シカ肉検体 42 検体中 1 検体から分離され、陽性率は 2.4%であった。検査した年度により、イノシシ糞便をサンプリングした地域に偏りが生じたため、分離率に多少の増減があったが、3年間を通してシカ糞便よりイノシシ糞便から高率に分離された。これは、雑食性のイノシシの方が薬剤耐性腸内細菌科細菌を食餌性に接種する機会が多いためであると考えられる。また、全ての分離菌株がセフトキシム及びカルバペネム系薬剤以外の  $\beta$  ラクタム剤に耐性を示し、その内 3 株 (CB21D158、EH22D99 及び et23DM26) 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 3)。

ゲノム解析の結果、2022 年までに分離された CTX 耐性腸内細菌目細菌 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。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  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子を保有し、その多くが *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (46.2%) もしくは *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (34.6%) を保有した(図 4)。しかし、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。一方で *Enterobacter hormaechei* であった EH22D99 株は AmpC 型  $\beta$  ラクタマーゼである *bla*<sub>ACT-16</sub> 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(図 4)。

最も分離率の高かった *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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(図 5、表 6)。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*<sub>CTX-M-15</sub> 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 6)。このことは国内野生動物由来の *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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*<sub>CTX-M-15</sub> 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。

### 3) 新規 $\beta$ ラクタマーゼの機能について

*C. braakii* CB21D158 株は新規の  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子を保有していた(図 4)。この新規  $\beta$  ラクタマーゼは、EC21B42 株が保有する既報の *bla*<sub>CMY-70</sub> と比較して 18 ヲ所のアミノ酸置換を生じていた(図 6)。本新規  $\beta$  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::*blanew* 形質転換体のイミペネム、メロペネム、アモキシシリン、セフトキシムの MIC はすべて上昇していた。しかし、pHSG398::*blanew* 形質転換体はいずれの薬剤に対する MIC も既報の  $\beta$  ラクタマーゼ pHSG398::*bla*<sub>CMY70</sub> 形質転換体より

低値であった（表 7）。このことから、CB21D158 株が持つ新規  $\beta$  ラクタマーゼと既報の *bla*<sub>CMY-70</sub> では活性が異なり、基質となる  $\beta$  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) 黄色ブドウ球菌の分離は、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が示唆された。

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シカ肉への糞便汚染が疑われた。また、シカ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っており、顕著に分離率の高い施設が複数存在した。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いることから、糞便汚染を強く支持していると考えられる。

4) 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、現時点での分離黄色ブドウ球菌株の多くは、*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。しかし分離菌株の中には、過去に報告された食中毒事例由来株と同程度の SEC を産生する株も存在したため、継続的なモニタリングが必要である。

5) 3 年間の研究機関を通して 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、CTX 耐性腸内細菌目細菌は分離

率に多少の増減があったが、3 年間を通してシカ糞便よりイノシシ糞便から高率に分離された。これは、雑食性のイノシシの方が薬剤耐性腸内細菌科細菌を食餌性に接種する機会が多いためであると考えられる。

6) CTX 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、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。

7) CTX 耐性菌が保有する  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子のうち、最も分離率の高かった *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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*<sub>CTX-M-15</sub> 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*<sub>CTX-M-15</sub> 遺伝子の伝播は起こりづらいと考えられるが、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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。

8) ゲノム解析により、新規  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子を同定した。pHSG398::*bla*<sub>new</sub> 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  $\beta$  ラクタマーゼ pHSG398::*bla*<sub>CMY70</sub> 形質転換体より低値であった。このことから、新規  $\beta$  ラクタマーゼと既報の *bla*<sub>CMY-70</sub> では基質となる  $\beta$  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. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Morita S, Sato S, Maruyama S, Nagasaka M, Murakami K, Inada K, Uchiumi M, Yokoyama E, Asakura H, Sugiyama H, **Takai S**, Maeda K, Kabeya H. (2021). Whole-genome sequence analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from wild deer and boar in Japan. *J Vet Med Sci.* 83:1860-1868.

2) Morita S, Sato S, Maruyama S, Miyagawa A, Nakamura K, Nakamura M, Asakura H, Sugiyama H, **Takai S**, Maeda K, Kabeya H. (2022). Prevalence and whole-genome sequence analysis of *Campylobacter* spp. strains isolated from wild deer and boar in Japan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 82:101766.

3) **高井伸二**, 斑目広郎, 佐々木由香子, **鈴木康規**, 角田 勤. (2021). 家畜・伴侶動物・野生動物のロドコッカス・エクイ感染症. *日獣会誌.* 74:695-706.

4) **高井伸二**. (2021). わが国における野生動物と家畜伝染病, *家畜衛生学雑誌.* 47:53-62.

5) **鈴木康規**. (2022). ブドウ球菌食中毒に関する最近の動向とその検査法. *臨床検査.* 66:64-72.

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

7) **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

### 学術集会

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**, 久保田寛顕, 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β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(東京), 2022年9月29-30日、講演要旨集 p 72.

3) **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.

4) 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.

### 講演会

1) **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 農林水産省令和3年度利活用技術育成研修事業 岩手県盛岡市 2021年9月13日.

2) **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 農林水産省令和3年度利活用技術育

成研修事業 島根県浜田市 2021年10月27日.

3) 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 農林水産省令和3年度利活用技術育成研修事業 Web開催 2022年1月22日.

4) 高井伸二「ジビエと家畜伝染病 ～野生鳥獣を取り巻く30年～」令和3年度食品安全に係る科学セミナー(第5回)農林水産省消費・安全局 2022年2月17日.

5) 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、広島県安芸高田市、2022年9月13日.

6) 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、北海道新冠町、2022年10月17日.

7) 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、宮崎県西米良村、2022年11月7日.

8) 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、長野県長野市、2022年12月8日.

9) 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)、オンライン、2022年10月3日、10月8日、11月19日、2023年2月18日(計4回)

10) 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、オンライン、2023年2月19日.

11) 高井伸二「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)野生鳥獣処理活用技術者研修会、兵庫県神戸市、2023年8月30日.

12) 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: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)野生鳥獣処理活用技術者研修会、京都府京丹波町、2023年9月12-13日.

13) 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: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)野生鳥獣処理活用技術者研修会、鹿児島県阿久根市、2023年11月8-9日.

14) 高井伸二「ジビエハンター研修会「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)、オンライン、2023年10月20日.

15) 高井伸二「ジビエハンター研修会「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)、オンライン、2023年12月5日.

16) 高井伸二「ジビエハンター研修会「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)、オンライン、2024年1月18日.

17) 高井伸二「ジビエハンター研修会「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)、オンライン、2024年2月1日.

#### G. 知的財産権の取得状況

##### 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 2021年4月から2023年12月に採取した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

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
			岩手 (1検体: 猟友会)	SA22D4
	2022	21/191(11.0%)	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: 畜産協会)	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
			静岡 (2検体: 畜産協会)	SA23D5, SA23D25
2023	6/162(3.7%)	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

\* 2022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、本報告書は3か年の総合報告書であるため年ごとに集計し直して記載した。

表2 2021年4月から2023年12月に採取した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

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：畜産協会) 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)	<b>CB21D158</b>
	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：畜産協会)	EC22D116
			京都 (1検体：民間企業)	<b>EH22D99</b>
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
	2022	1/47(4.3%)	岡山 (1検体：猟友会)	EC22B2
	2023	8/61(13.1%)	青森 (2検体：畜産協会)	et23B17, et23B22
			大分 (4検体：畜産協会)	et23B19, et23B23, et23B36, et23B51
			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

\* 2022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、本報告書は3か年の総合報告書であるため年ごとに集計し直して記載した。

\*\* 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	DR110	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4 分離した黄色ブドウ球菌の遺伝学的特性

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> ( $\beta$ -lactam)	No
SA22DM43	Kagoshima	99.01	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam)	No
SA22DM46	Kagoshima	99.02	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam)	No
SA22DM47	Kagoshima	98.99	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM48	Kagoshima	99.00	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam)	No
SA22DM49	Kagoshima	99.03	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM50	Kagoshima	99.00	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM51	Kagoshima	99.02	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam)	No
SA22DM52	Kagoshima	99.00	4278	No		<i>blaZ</i> ( $\beta$ -lactam) <i>aph(2'')-Ia</i> (aminoglycoside)	No
SA22DM69	—	97.84	6238	<i>sei, sem, sen, seo, selu</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-116</sub>		No

					(β-lactam)	
SA22DM71	—	99.03	20	<i>seg, sem, sen, seo, selu</i>	<i>blaZ, bla<sub>TEM-116</sub></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 5 本研究で新たに報告した Sequence type と allele

Strain	Assigned 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 6 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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	—	カオジロガン (フィンランド) ・ 子牛 (ドイツ) ・豚 (イギリス)
		EC21D69	—	
	プラスミド	EC21B12②	< 1.0×10 <sup>-9</sup>	
		EC21B29	< 1.0×10 <sup>-9</sup>	
Cassette 2	染色体	EC22D79	< 1.0×10 <sup>-9</sup>	
		EC21B18	—	七面鳥 (中国)
		EC21B19	—	
Cassette 3	プラスミド	EC21B28	< 1.0×10 <sup>-9</sup>	
		EC21B32	< 1.0×10 <sup>-9</sup>	
		EC21D103②	< 1.0×10 <sup>-9</sup>	

\* *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 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

表7 pHSG形質転換体、pHSG398::*bla*<sub>new</sub>形質転換体及びpHSG398::*bla*<sub>CMY70</sub>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> <sub>new</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY70</sub>	Empty	<i>bla</i> <sub>new</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY70</sub>
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

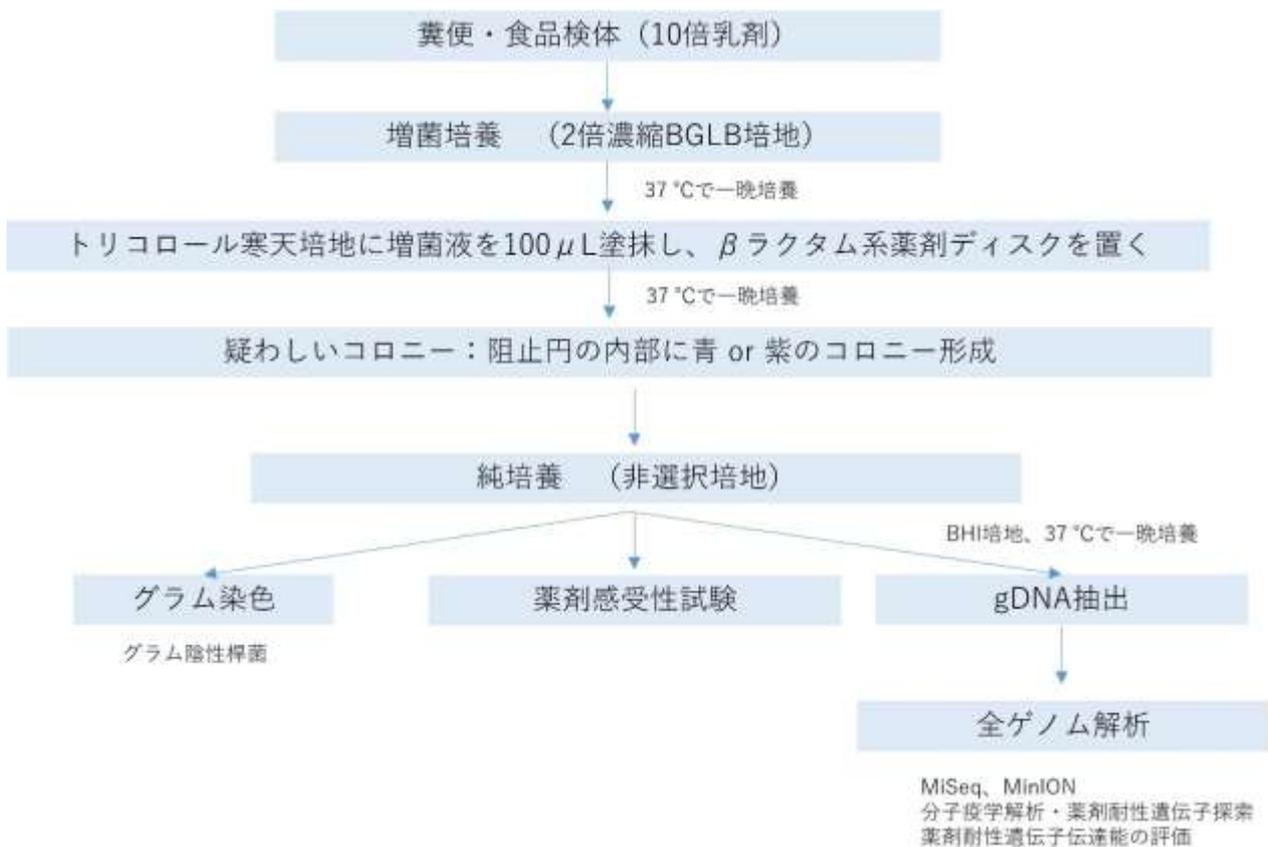


図3 黄色ブドウ球菌のST型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析

全 ST を対象にした系統樹 青色；シカ糞便由来株の ST、マゼンダ；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。

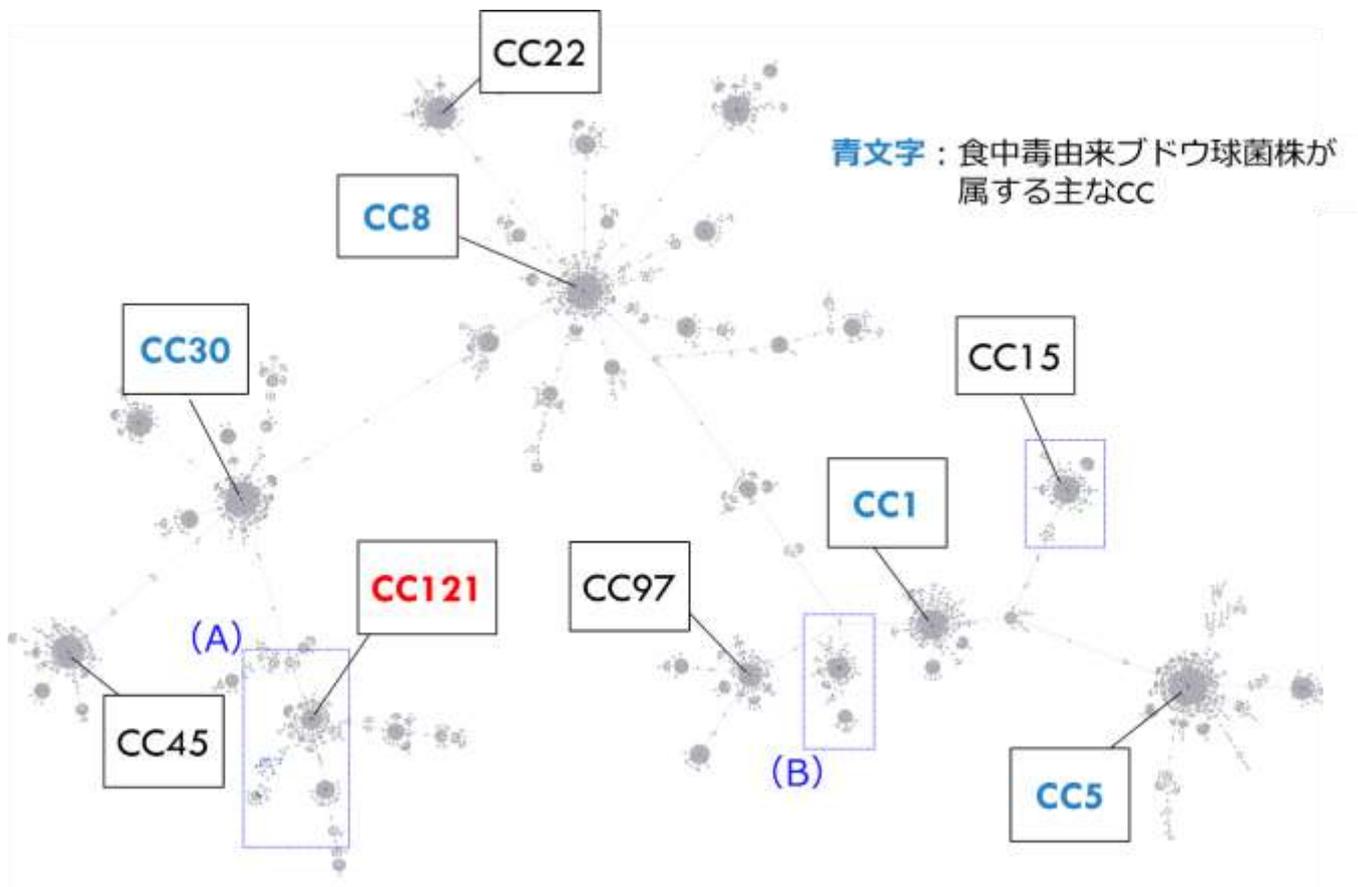
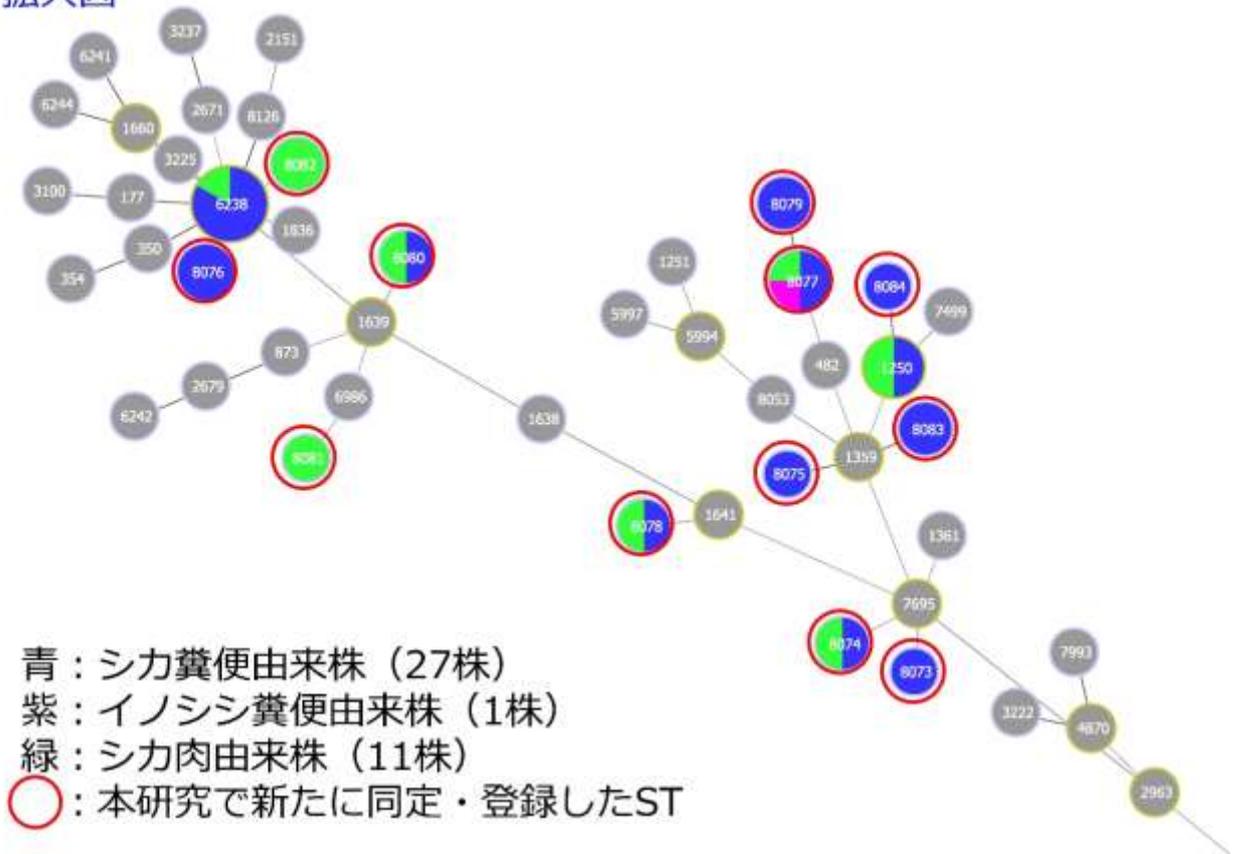


図3 黄色ブドウ球菌のST型に基づく最小スパニングツリー法による系統解析

(A) 上記 (A) の拡大図

(A) 拡大図



(B) 上記 (B) の拡大図とエンテロトキシン産生量

(B) 拡大図

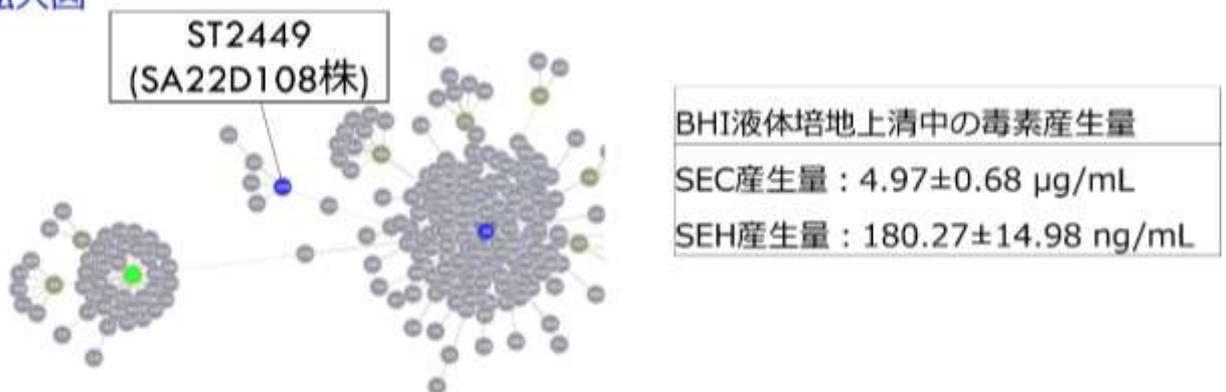
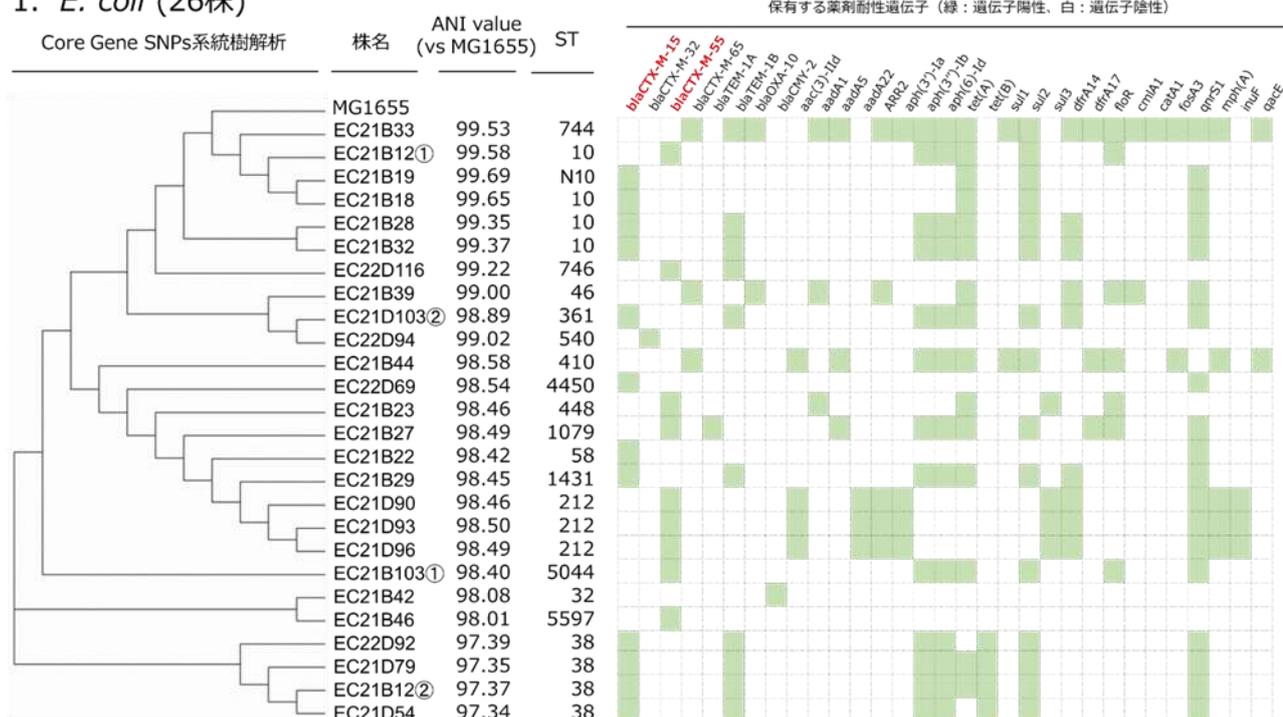


図 4 分離した薬剤耐性腸内細菌目細菌の遺伝学的特性（一昨年・昨年の分離菌株も含む）

### 1. *E. coli* (26株)



\* 分離した CTX 耐性菌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

\*\* 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、その多くが blaCTX-M-15 (46.2%) もしくは blaCTX-M-55 (34.6%) を保有した (CTX-M-15 型と CTX-M-55 型は 1 アミノ酸置換【A80V】のみの違い)

### 2. その他の菌種 (2株)

株名	菌種	ANI Value	耐性遺伝子
CB21D158	<i>Citrobacter braakii</i>	99.17	<b>New bla</b> ( <i>bla</i> <sub>CMY-83</sub> と98.5%の相同性) <i>qnrB40</i>
EH22D99	<i>Enterobacter hormaechei</i>	95.88	<i>bla</i> <sub>ACT-16</sub> <i>fosA</i>

\* CB21D158 株は新規の βラクタマーゼ遺伝子を保有していた

\*\* EH22D99 株は AmpC 型 βラクタマーゼである *bla*<sub>ACT-16</sub> 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、これは薬剤感受性試験の結果と一致する

図 5 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 遺伝子の存在様式

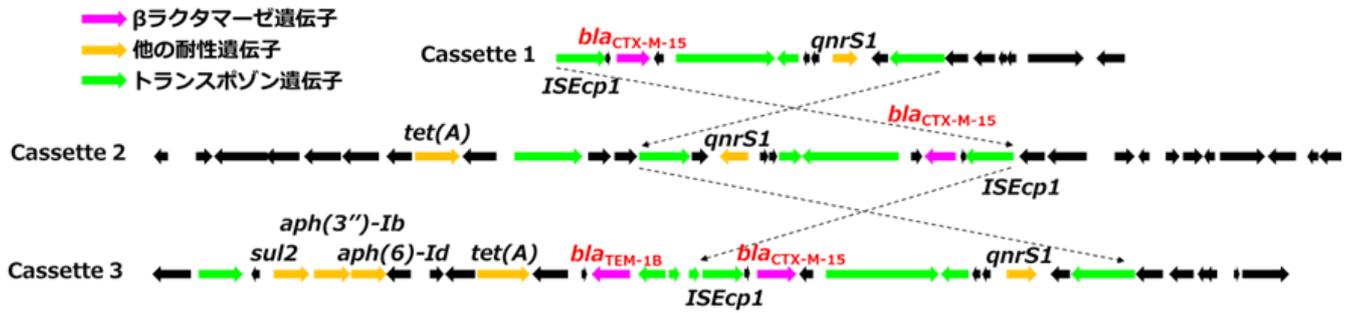


図 6 CB21D158 株が持つ新規  $\beta$  ラクタマーゼ配列と既報の *bla*<sub>CMY-70</sub> 配列との比較

```

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

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

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

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

YGVKSSVIDMTRWVQANMDASQVQEKTLQQGIELAQSRYWVRVGDYQGLGWEMLNWPVKA 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  $\beta$  ラクタマーゼは、既報の *bla*<sub>CMY-70</sub> (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