

内閣府食品安全委員会
平成20年度食品安全確保総合調査

畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査
報告書

平成21年3月

財団法人 日本食品分析センター

目次

I	調査背景及び目的	1
II	食肉からの各種細菌の検出試験	1
1	試料のサンプリング	1
1)	施設の要件及び施設数	1
2)	対象食品の種類	1
3)	試料のサンプリング，輸送及び保管方法	1
4)	試料数	1
2	試料からの細菌の分離及び同定	2
1)	対象菌	2
2)	対象菌の分離及び同定	2
3	試験方法	2
1)	試料液の調製	2
2)	対象菌の検出方法及び同定方法	2
3)	試験に使用した培地・試薬	3
4	結果	3
1)	試料のサンプリング	3
2)	対象菌の検出試験	4
3)	対象菌の分離菌株の採取	5
III	分離菌の薬剤感受性試験(MICの測定)	6
1	分離菌株の選定・保存	6
1)	分離菌株の選定	6
2)	分離菌株の保存方法	6
2	測定方法	6
1)	対象薬剤	7
2)	MIC測定試験方法	7
3)	PFGE解析(大腸菌)	11
4)	試験に使用した機器・培地	11
3	結果及び考察	11
1)	薬剤感受性試験について(平成20年度調査分)	11
2)	薬剤感受性試験について(平成18～20年度調査総括)	12
3)	PFGE解析(大腸菌)について	16
4	薬剤耐性菌株の保存	27

I 調査背景及び目的

家畜等への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するにあたり、畜水産食品等における薬剤耐性菌の出現に関する科学文献及び調査報告数が極めて少ないのが現状である。そこで、畜水産食品等の薬剤耐性菌の出現状況を定量的に把握する必要がある。

本調査は、畜水産食品における薬剤耐性菌の出現状況等を把握し、より一層、科学的な薬剤耐性菌の食品健康影響の評価を行うための基礎的データの収集を目的とする。

なお、本調査は、内閣府食品安全委員会における「平成19年度食品安全確保総合調査 畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査」に引き続き実施するものである。

II 食肉からの各種細菌の検出試験

1 試料のサンプリング

1) 施設の要件及び施設数

消費直前の食品を取り扱っており、容易に入手が可能で、かつトレースバックが可能な複数の店舗を有する大手量販店をサンプリングの対象施設とした。また、個々の大手量販店においては、プライベートブランドを含め数種の銘柄しか販売されていないことから、複数の大手量販店の施設を対象とした。

2) 対象食品の種類

国産の畜水産食品の中で、消費直前の牛肉及び豚肉を対象食品とした。また、対象食品は加熱調理等がなされていないパック詰めされた商品(原則250g以上)で、原産地(「〇〇県産」など)の記載があり、産地が特定できるものを対象とし、単に「国産」と表示されているものは対象外とした。

3) 試料のサンプリング、輸送及び保管方法

対象食品(試料)の包装容器及び原産地等が記載されたラベルが破損又は損傷していないことを確認してサンプリング(購入)した。また、サンプリングした試料は凍結しないように8℃以下に保冷して運搬し、サンプリング後速やかに試験に供した。

なお、試料に添付されているラベルは保管するとともに、名称、原産地、「個体識別番号(牛肉の場合)」, サンプリング日、試料購入施設の住所及び店舗名等を試料の情報として記録した。

4) 試料数

牛肉の試料数は500、豚肉の試料数は1104とした。

なお、平成17年度食品安全確保総合調査「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査(プロトコル作成)報告書(平成18年3月)」に記載されている都道府県別生産量のデータを参考にして、生産量が多い都道府県の対象食品を優先的にサンプリングした。

2 試料からの細菌の分離及び同定

1) 対象菌

大腸菌

2) 対象菌の分離及び同定

試験方法は原則として、平成17年度食品安全確保総合調査「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査(プロトコル作成)報告書(平成18年3月)」に準拠して、対象菌の分離・同定を行った。

3 試験方法

1) 試料液の調製

試料200gを秤量し、滅菌リン酸緩衝液200mlを加えた後、ストマッカーを用いて1分間リンスした液を試料液とした。

2) 対象菌の検出方法及び同定方法

① 直接分離培養法

試料液0.1ml及び1白金耳量を大腸菌検出用酵素基質培地であるESコリマーク寒天培地及びクロモアガー-E. coli寒天培地にそれぞれ塗抹又は画線塗抹し、35℃で18～24時間培養した。

② 増菌培養法

試料液1mlをMUG加EC培地(10ml)に接種し、44.5℃で22～24時間培養した後、紫外線(約360nm)照射下での蛍光の有無及びガス産生の有無を判定した。蛍光又はガス産生が認められた培養液の1白金耳量をESコリマーク寒天培地及びクロモアガー-E. coli寒天培地に画線塗抹し、35℃で18～24時間培養した。

③ 生化学的性状試験

直接分離培養法及び増菌培養法の各寒天培地上に大腸菌と疑われる集落が出現した場合は、食品衛生検査指針 微生物編(2004)を参考に表-1に示す生化学的性状試験を実施し、大腸菌の同定を行った。

表-1 大腸菌の生化学的性状試験

使用培地・試薬	試験項目	大腸菌の性状
TSI培地	糖の分解	斜面:分解又は非分解 高層:分解
	硫化水素	－
	ガス産生	＋又は－
LIM培地	リジン脱炭酸試験	＋
	インドール試験	＋又は－
	運動性	＋
シモンズのクエン酸塩培地	クエン酸塩利用	－
SIM培地	IPA反応	－
VP半流動培地	VP反応	－
チトクロームオキシダーゼ用ろ紙	オキシダーゼ試験	－

3) 試験に使用した培地・試薬

大腸菌の検出及び同定に使用した培地・試薬を表-2に示した。

表-2 使用培地・試薬一覧

名 称	メーカー名
MUG加EC培地	Oxoid
ESコリマーク寒天培地	栄研化学
クロモアガーE. coli寒天培地	関東化学
TSI培地	栄研化学
LIM培地	日水製薬
シモンズ・クエン酸ナトリウム培地	栄研化学
SIM培地	栄研化学
VP半流動培地	栄研化学
チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙	日水製薬

4 結果

1) 試料のサンプリング

対象食品の都道府県別内訳(試料数)を表-3に示した。

表-3 対象食品の原産地別内訳(試料数)

原産地 (都道府県)	牛肉	豚肉	原産地 (都道府県)	牛肉	豚肉
A	140	0	K	0	53
C	45	99	L	24	0
D	24	99	P	79	0
E	0	91	Q	40	76
F	53	269	R	34	0
G	0	68	S	0	197
H	0	106	T	0	46
I	24	0	合計	500	1104
J	37	0			

※ 原産地(都道府県)のローマ字表記は、「平成19年度食品安全確保総合調査畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査」において用いたものと一致している(以下同様)

2) 対象菌の検出試験

対象食品別の大腸菌の検出状況を表-4に示した。

表-4 大腸菌の検出状況 [陽性試料数(検出率)]

都道府県	牛肉	豚肉
A	5 (3.6%)	—
C	2 (4.4%)	9 (9.1%)
D	2 (8.3%)	1 (1.0%)
E	—	14 (15.4%)
F	3 (5.7%)	12 (4.5%)
G	—	3 (4.4%)
H	—	8 (7.5%)
I	3 (12.5%)	—
J	3 (8.1%)	—
K	—	1 (1.9%)
L	1 (4.2%)	—
P	1 (1.3%)	—
Q	1 (2.5%)	7 (9.2%)
R	0 (0%)	—
S	—	18 (9.1%)
T	—	2 (4.3%)
合計	21 (4.2%)	75 (6.8%)

— : 測定無し

3) 対象菌の分離菌株の採取

分離菌株の採取は原則として、同一試料から検出された3菌株とした。

直接分離培養法により検出された2菌株及び増菌培養法により検出された1菌株を分離菌株とした。ただし、直接分離培養法では検出されず、増菌培養法でのみ検出された場合は、増菌培養法により検出された3菌株とした。また、直接分離培養法で1菌株しか採取できなかった場合は、増菌培養法により検出された2菌株と合わせて3菌株とした。

なお、対象食品別の大腸菌の分離状況を表-5に示した。

表-5 大腸菌の分離状況

対象食品	分離方法	分離菌株数	合計
牛肉	直接分離培養	12	59
	増菌培養	47	
豚肉	直接分離培養	33	202
	増菌培養	169	

Ⅲ 分離菌の薬剤感受性試験(MICの測定)

1 分離菌株の選定・保存

1) 分離菌株の選定

対象食品からの大腸菌の分離株数が、薬剤感受性試験に供試する予定の牛肉由来の35株及び豚肉由来の70株をそれぞれ超えたため、産地ごとの菌株比率に応じて、牛肉分離株36株、豚肉分離株71株を選定した。なお、選定に当たっては、各試料の直接分離株を優先的に採用した。

選定した試験用菌株の産地ごとの内訳を表-6に示した。

2) 分離菌株の保存方法

分離菌株を市販の菌株保存キット(マイクロバンク)を用いて-80℃で保存した。

表-6 試験用菌株の産地内訳

都道府県	牛肉			豚肉		
	分離株数	菌株比率	選定株数	分離株数	菌株比率	選定株数
A	13	22.0%	8	—	—	—
C	6	10.2%	4	23	11.4%	8
D	6	10.2%	4	1	0.5%	1
E	—	—	—	41	20.3%	14
F	9	15.3%	5	30	14.9%	10
G	—	—	—	9	4.5%	3
H	—	—	—	22	10.9%	8
I	7	11.9%	4	—	—	—
J	9	15.3%	5	—	—	—
K	—	—	—	3	1.5%	1
L	3	5.1%	2	—	—	—
P	3	5.1%	2	—	—	—
Q	3	5.1%	2	19	9.4%	7
R	0	0%	0	—	—	—
S	—	—	—	48	23.8%	17
T	—	—	—	6	3.0%	2
合計	59	100%	36	202	100%	71

—：測定無し

※ 産地ごとの菌株比率に応じて、試験用菌株を各産地に配分した。

2 測定方法

米国臨床検査標準委員会(CLSI/NCCLS)の試験法に準拠し、寒天平板培養法により対象菌について各17薬剤の最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)を測定した。

なお、セデカマイシンについては、測定に必要な量の標準品が入手できなかったことから、試験を実施しなかった。

1) 対象薬剤

試験用菌株に対する対象薬剤を表-7に示した。

表-7 調査対象薬剤

薬剤	略号
アンピシリン	ABPC
セファゾリン	CEZ
セフトオフル	CTF
アプラマイシン	APM
ジヒドロストレプトマイシン	DSM
ゲンタマイシン	GM
カナマイシン	KM
コリスチン	CL
オキシテトラサイクリン	OTC
ビコザマイシン	BCM
クロラムフェニコール	CP
ナリジクス酸	NA
エンロフロキサシン	ERFX
スルファジメトキシシン	SDMX
トリメトプリム	TMP
ホスホマイシン	FOM
チルミコシン	TMS

2) MIC測定試験方法

① 抗生物質の調製方法

a) 標準品の保存方法

薬剤はデシケーターに入れ、それぞれの保存方法に従って保存した。

b) 薬剤の溶解と濃度の調製

各薬剤の溶解に使用した溶媒と希釈液を表-8に示した。各薬剤については、5,120～1.25 μ g/mlまでの2倍段階希釈液を調製したが、ビコザマイシンについては2,560～1.25 μ g/mlまでの2倍段階希釈液を調製した。ビコザマイシンにおいては、発育が完全に阻止されなかった被検菌についてのみ、5,120～1.25 μ g/mlまでの2倍段階希釈液を再度調製して試験した。また、トリメトプリム及びチルミコシンについては、蒸留水では溶解しなかったため、溶解する溶媒及び容量の検討を行い、溶媒を1/2量メタノール+蒸留水とした。なお、薬剤の調製は試験当日に実施した。

表-8 試験薬剤の溶解に使用する溶媒と希釈液

薬剤	溶媒	希釈液
アンピシリン	緩衝液-2 ²⁾	緩衝液-1 ¹⁾
セファゾリン	緩衝液-1 ¹⁾	蒸留水
セフトオフル	メタノール	蒸留水
アプラマイシン	蒸留水	蒸留水
ジヒドロストレプトマイシン	蒸留水	蒸留水
ゲンタマイシン	蒸留水	蒸留水
カナマイシン	蒸留水	蒸留水
コリスチン	蒸留水	蒸留水
オキシテトラサイクリン	少量の0.1N HCl+蒸留水	蒸留水
ビコザマイシン	蒸留水	蒸留水
クロラムフェニコール	95%エタノール	蒸留水
ナリジクス酸	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
エンロフロキサシン	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
スルファジメトキシシン	下記 ⁴⁾ 参照	蒸留水
トリメトプリム	1/2量メタノール+蒸留水	温かい蒸留水
ホスホマイシン	蒸留水	蒸留水
チルミコシン	1/2量メタノール+蒸留水	蒸留水

1) 0.1Mリン酸塩緩衝液(pH6.0)の調製法

リン酸二水素カリウム(KH₂PO₄)7.0g, リン酸一水素ナトリウム(Na₂HPO₄)6.0gに蒸留水約750 mlを加え, 1分以上煮沸して溶かした。必要があれば, 1N NaOHまたはリン酸を用いてpHを5.9~6.1に調整した後, 更に蒸留水を加えて1,000mlとした。

2) 0.1Mリン酸塩緩衝液(pH8.0)の調製法

リン酸一水素カリウム(無水)(13.2g)/リン酸二水素カリウム(0.91g)を蒸留水約750mlを加えて溶かし, 必要があれば, リン酸を用いてpHを7.9~8.1に調整した後, 更に蒸留水を加えて1,000mlとした。

3) 蒸留水1/2容量を加えた後, 溶解するまで1N NaOHを滴下し, 蒸留水でメスアップした。

4) 熱い蒸留水1/2容量を加えた後, 溶解するまで2.5N NaOHを滴下し, 蒸留水でメスアップした。

② 薬剤含有寒天培地の調製

シャーレ(直径90mm)に各薬剤希釈液をそれぞれ2ml分注し, 48~50°Cに保ったミュラーヒントンス寒天培地18mlを添加して混和・固化させた後, クリーンベンチ内で30分間, 寒天表面を乾燥させた。薬剤無添加の寒天培地についても同様に作製し, 対照とした。

③ 接種用菌液の調製

普通寒天培地で35°C, 18~24時間培養し, 生育した菌体3~5集落を釣菌し, TRYPTONE SOYA BROTHで35°C, 18~24時間培養後, 培養液を約1~2×10⁸/ml(McFarland標準液 No. 0.5)となるように調製し接種用菌液とした。

④ 菌液の接種及び培養

マイクロプランターを用いて、薬剤を含まない対照培地、次いで低濃度の薬剤含有寒天培地の順に菌液を接種し、培地上の菌液が乾燥した後、35℃で16～20時間培養した。

⑤ 薬剤感受性判定方法とブレイクポイント

薬剤含有寒天培地で被検菌の発育が完全に阻止された薬剤の最小濃度をエンドポイントとして判定し、その値をMICとした。なお、単一集落のみの発育あるいは微小な発育はCLSI/NCCLSのガイドラインに従い発育阻止と見なした。また、薬剤を含まない対照培地では被検菌の発育を確認した。

ブレイクポイント(耐性限界値)は、農林水産省動物医薬品検査所の平成19年度家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査で示されている値を基本とした(表-9)。ただし、諸外国でのモニタリング調査で提唱されている値も参考として表-9に示した。

表-9 各薬剤に対する対象菌のブレイクポイント

薬剤	略号	ブレイクポイント(μg/ml)
アンピシリン	ABPC	32
セファゾリン	CEZ	32
セフチオフル	CTF	8
アプラマイシン	APM	16 ¹⁾
ジヒドロストレプトマイシン	DSM	32
ゲンタマイシン	GM	16
カナマイシン	KM	64
コリスチン	CL	16
オキシテトラサイクリン	OTC	16
ビコザマイシン	BCM	128
クロラムフェニコール	CP	32
ナリジクス酸	NA	32
エンロフロキサシン	ERFX	2
スルファジメトキシシン	SDMX	***
トリメトプリム	TMP	16
ホスホマイシン	FOM	***
チルミコシン	TMS	***

1) DANMAP2003に準拠

*** : ブレイクポイント不明

⑥ 精度管理

CLSI/NCCLSガイドラインで示された下記の菌株を用いて精度管理を行った。

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* JCM 2874(ATCC 29213相当)

Enterococcus faecalis JCM 7783(ATCC 29212相当)

Escherichia coli JCM 5491(ATCC 25922相当)

Pseudomonas aeruginosa JCM 6119(ATCC 27853相当)

なお、MICの精度管理限界値(MIC範囲)はCLSI/NCCLSの規定に準拠し(表-10)、CLSI/NCCLSが規定していない薬剤については農林水産省動物医薬品検査所で実施された成績に基づき暫定的に制定された精度管理限界値を参考とした(表-11)。

表-10 CLSIが規定する薬剤におけるMIC(μ g/ml)の精度管理限界値

薬剤	精度管理用菌株			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
ABPC	0.5-2	0.5-2	2-8	—
CEZ	0.25-1	—	1-4	—
GM	0.12-1	4-16	0.25-1	0.5-2
KM	1-4	16-64	1-4	—
CP	2-16	4-16	2-8	—
NA	—	—	1-4	—
TMP	1-4	≤ 1	0.5-2	>64

—：規定なし

表-11 CLSIが規定していない薬剤の寒天平板希釈法によるMIC(μ g/ml)の精度管理限界値

薬剤	精度管理用菌株			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
DSM	1-8	16-64	1-4	4-32
CL	64-128	≥ 256	0.5-2	0.5-2
OTC	≤ 1	4-16	0.25-2	2-16
BCM	≥ 512	≥ 512	16-64	≥ 512
SDMX	—	≥ 256	≥ 256	≥ 512

—：未決定

3) PFGE解析(大腸菌)

MIC測定試験に用いた全ての大腸菌107株(牛肉由来菌株36株, 豚肉由来菌株71株)について, 以下に示した手順でパルスフィールドゲル電気泳動による核型解析を行った。

分離菌のプラグを, CHEFバクテリア用DNAプラグキットを用いて作成した。制限酵素 *Xba* I で37℃, 2~4時間の処理を行った後, CHEF DRIIIを用いて電気泳動を行った。なお, ゲルは1%PFCアガロース[Bio-Rad], 泳動バッファーは0.5×TBEを用いた。また, 泳動条件は温度14℃, 電圧6V/cm, 角度120°, パルスタイム4.0~8.0秒を9時間, 8~50秒を13時間で行った。泳動終了後, Ethidium bromideにより染色を行い, GelDoc XRを用いて画像データとした。さらに, 得られた画像データをもとにFingerprinting IIを用いて平均距離法(UPGMA法)により系統樹を作成した。

4) 試験に使用した機器・培地

MIC測定に使用した機器及び培地を表-12に, PFGE解析に使用した機器及び試薬を表-13に示した。

表-12 MIC測定に使用した機器及び培地等一覧

対象	名 称	メーカー名	ロットNo
機器	マイクロプランター	佐久間製作所	****
培地等	ミュラーヒントンス寒天培地	栄研化学	84001
	普通寒天培地	栄研化学	89002
	TRYPTONE SOYA BROTH	Oxoid	610695

表-13 PFGE解析に使用した機器及び試薬一覧

対象	名 称	メーカー名	機種番号
機器	パルスフィールドゲル電気泳動装置	Bio-Rad	CHEF DRIII
	画像解析装置	Bio-Rad	GelDoc XR
試薬等	CHEFバクテリア用DNAプラグキット	Bio-Rad	****
	<i>Xba</i> I	タカラバイオ	****
	PFCアガロース	Bio-Rad	****
	Lambda Ladder	Bio-Rad	****

3 結果及び考察

1) 薬剤感受性試験について(平成20年度調査分)

供試した大腸菌107株におけるRange, MIC50, MIC90, 耐性菌株数及び耐性率を表-14-1~2に示した。

供試した17薬剤のうち12薬剤に耐性菌が認められた。耐性率は0.0~52.1%で, 薬剤及び

対象食品の種類により大きな差があった(表-14-1~2)。ABPC, CEZ, APM, DSM, KM, OTC, BCM, CP及びTMPについては、牛肉及び豚肉由来菌株のいずれにも耐性菌が認められた。また、供試した大腸菌107株の中には多くの薬剤に耐性を示すものもあり、5薬剤耐性菌が10株、6薬剤耐性菌が4株、7薬剤耐性菌が2株、9薬剤耐性菌が1株認められた。

2) 薬剤感受性試験について(平成18~20年度調査総括)

平成18~20年度調査において供試した大腸菌204株(牛肉由来：平成18年度6株、平成19年度59株、平成20年度36株、豚肉由来：平成18年度13株、平成19年度19株、平成20年度71株)について、Range, MIC50, MIC90, 耐性菌株数及び耐性率を表-15-1~2に示した。

供試した17薬剤のうち12薬剤に耐性菌が認められた。耐性率は0.0~51.5%で、調査年度に関係なく、薬剤及び対象食品の種類により大きな差があった。ABPC, CEZ, APM, DSM, KM, CL, OTC, BCM, CP, NA及びTMPについては、牛肉及び豚肉由来菌株のいずれにも耐性菌が認められた。また、供試した204株については、5薬剤耐性菌が12株、6薬剤耐性菌が9株、7薬剤耐性菌が3株、9薬剤耐性菌が1株認められた。

表-14-1 大腸菌の薬剤感受性試験(平成20年度調査)

薬剤	対象	試験 菌株数	Range (μ g/ml)	MIC50 (μ g/ml)	MIC90 (μ g/ml)	耐性 菌株数	耐性率(%)
ABPC	牛肉	36	1-512<	4	256	5	13.9
	豚肉	71	2-512<	4	512<	15	21.1
	全体	107	1-512<	4	512<	20	18.7
CEZ	牛肉	36	1-64	2	4	2	5.6
	豚肉	71	1-512<	2	4	1	1.4
	全体	107	1-512<	2	4	3	2.8
CTF	牛肉	36	0.25-2	0.5	1	0	0.0
	豚肉	71	<0.125-2	0.5	1	0	0.0
	全体	107	<0.125-2	0.5	1	0	0.0
APM	牛肉	36	4-16	8	16	5	13.9
	豚肉	71	4-32	8	16	33	46.5
	全体	107	4-32	8	16	38	35.5
DSM	牛肉	36	4-256	4	64	5	13.9
	豚肉	71	4-512<	8	512<	32	45.1
	全体	107	4-512<	8	512	37	34.6
GM	牛肉	36	1-2	1	2	0	0.0
	豚肉	71	0.5-4	1	2	0	0.0
	全体	107	0.5-4	1	2	0	0.0
KM	牛肉	36	4-512<	8	8	2	5.6
	豚肉	71	2-512<	8	512<	8	11.3
	全体	107	2-512<	8	16	10	9.3
CL	牛肉	36	0.5-1	0.5	0.5	0	0.0
	豚肉	71	0.25-16	0.5	0.5	1	1.4
	全体	107	0.25-16	0.5	0.5	1	0.9
OTC	牛肉	36	2-512	2	256	7	19.4
	豚肉	71	1-512	256	512	37	52.1
	全体	107	1-512	2	256	44	41.1
BCM	牛肉	36	16-512<	32	32	2	5.6
	豚肉	71	8-512<	32	32	3	4.2
	全体	107	8-512<	32	32	5	4.7
CP	牛肉	36	4-256	8	16	3	8.3
	豚肉	71	2-512	8	128	13	18.3
	全体	107	2-512	8	64	16	15.0
NA	牛肉	36	2-4	4	4	0	0.0
	豚肉	71	2-512<	4	4	3	4.2
	全体	107	2-512<	4	4	3	2.8
ERFX	牛肉	36	<0.125	<0.125	<0.125	0	0.0
	豚肉	71	<0.125-2	<0.125	<0.125	2	2.8
	全体	107	<0.125-2	<0.125	<0.125	2	1.9
SDMX	牛肉	36	128-512<	256	512<		
	豚肉	71	64-512<	512	512<		
	全体	107	64-512<	512	512<		

※ 空欄については、その薬剤のブレイクポイントが未決定のため算出不可。

表-14-2 大腸菌の薬剤感受性試験(平成20年度調査)

薬剤	対象	試験 菌株数	Range (μ g/ml)	MIC50 (μ g/ml)	MIC90 (μ g/ml)	耐性 菌株数	耐性率(%)
TMP	牛肉	36	<0.125-512<	0.5	512<	6	16.7
	豚肉	71	<0.125-512<	0.5	512<	19	26.8
	全体	107	<0.125-512<	0.5	512<	25	23.4
FOM	牛肉	36	8-256	32	64		
	豚肉	71	4-512	32	64		
	全体	107	4-512	32	64		
TMS	牛肉	36	64-256	256	256		
	豚肉	71	32-256	128	256		
	全体	107	32-256	256	256		

※ 空欄については、その薬剤のブレイクポイントが未決定のため算出不可。

表-15-1 大腸菌の薬剤感受性試験(平成18~20年度調査総括)

薬剤	対象	試験 菌株数	Range (μ g/ml)	MIC50 (μ g/ml)	MIC90 (μ g/ml)	耐性 菌株数	耐性率(%)
ABPC	牛肉	101	1-512<	4	64	11	10.9
	豚肉	103	2-512<	4	512<	26	25.2
	全体	204	1-512<	4	512<	37	18.1
CEZ	牛肉	101	1-256	2	4	7	6.9
	豚肉	103	1-512<	2	4	1	1.0
	全体	204	1-512<	2	4	8	3.9
CTF	牛肉	101	0.25-2	0.5	1	0	0.0
	豚肉	103	<0.125-2	0.5	1	0	0.0
	全体	204	<0.125-2	0.5	1	0	0.0
APM	牛肉	101	2-64	8	16	22	21.8
	豚肉	103	4-32	8	16	41	39.8
	全体	204	2-64	8	16	63	30.9
DSM	牛肉	101	2-512<	8	256	20	19.8
	豚肉	103	4-512<	8	512<	46	44.7
	全体	204	2-512<	8	512<	66	32.4
GM	牛肉	101	1-8	2	4	0	0.0
	豚肉	103	0.5-8	2	4	0	0.0
	全体	204	0.5-8	2	4	0	0.0
KM	牛肉	101	2-512<	8	32	7	6.9
	豚肉	103	2-512<	8	16	9	8.7
	全体	204	2-512<	8	16	16	7.8
CL	牛肉	101	0.25-512<	0.5	0.5	2	2.0
	豚肉	103	0.25-16	0.5	0.5	1	1.0
	全体	204	0.25-512<	0.5	0.5	3	1.5
OTC	牛肉	101	1-512	2	256	24	23.8
	豚肉	103	1-512	128	512	53	51.5
	全体	204	1-512	2	512	77	37.7

表-15-2 大腸菌の薬剤感受性試験(平成18~20年度調査総括)

薬剤	対象	試験 菌株数	Range (μ g/ml)	MIC50 (μ g/ml)	MIC90 (μ g/ml)	耐性 菌株数	耐性率(%)
BCM	牛肉	101	16-512<	32	32	4	4.0
	豚肉	103	8-512<	32	32	3	2.9
	全体	204	8-512<	32	32	7	3.4
CP	牛肉	101	0.5-256	8	16	9	8.9
	豚肉	103	2-512<	8	256	19	18.4
	全体	204	0.5-512<	8	128	28	13.7
NA	牛肉	101	<0.125-512	4	4	3	3.0
	豚肉	103	2-512<	4	4	4	3.9
	全体	204	<0.125-512<	4	4	7	3.4
ERFX	牛肉	101	<0.125-1	<0.125	<0.125	0	0.0
	豚肉	103	<0.125-2	<0.125	<0.125	2	1.9
	全体	204	<0.125-2	<0.125	<0.125	2	1.0
SDMX	牛肉	101	128-512<	512<	512<		
	豚肉	103	64-512<	512<	512<		
	全体	204	64-512<	512<	512<		
TMP	牛肉	101	<0.125-512<	0.5	1	6	5.9
	豚肉	103	<0.125-512<	0.5	512<	28	27.2
	全体	204	<0.125-512<	0.5	512<	34	16.7
FOM	牛肉	101	1-256	16	64		
	豚肉	103	4-512	32	128		
	全体	204	1-512	32	64		
TMS	牛肉	101	64-512<	512	512		
	豚肉	103	32-512	256	512		
	全体	204	32-512<	256	512		

※ 空欄については、その薬剤のブレイクポイントが未決定のため算出不可。

3) PFGE解析(大腸菌)について

本調査においてMIC測定試験に用いた全ての大腸菌107株(牛肉由来36株, 豚肉由来71株)及び「内閣府食品安全委員会 平成19年度食品安全確保総合調査畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査報告書」でPFGEを実施した全ての大腸菌97株(牛肉由来65株, 豚肉由来32株)のPFGEによる電気泳動図及び平均距離法(UPGMA法)により作成した系統樹を図-1-1~5に示した。

その結果, 原産地及び対象食品の種類によるクラスターの形成は認められなかったことから, 様々な菌株が原産地及び対象食品の種類に関係なく各地に存在していると考えられた。また, 平成18年度から平成20年度の異なる年度にわたっての共通性も認められなかった。

平成20年度の分離菌株においても, PFGEパターンが一致した菌株の大多数は同一試料から分離されたものであったが, 異なる試料から分離された菌株の一部において, PFGEパターンが一致した菌株が認められた(表-16)。ただし, これらの試料は同一店舗, もしくは処理施設が同一である可能性が考えられる店舗で入手されたもので, 加工日も同一であった。

PFGEパターンとMIC測定試験結果の関連性をみると, 同一のPFGEパターンを示した菌株はMICの傾向も同様である場合が多かった(図-2-1~5)。しかし, 同一なPFGEパターンの菌株であるにもかかわらず, MICに顕著な違いが見られるものがあり, さらに詳細な解析が必要であると考えられた(図-2の□で囲んだ箇所)。

以上の結果から, 特定の大腸菌による食肉の汚染は複数年にわたるものではなく, 少なくとも1年以下の短い期間で菌株が替わっていることが推測された。また, 処理施設が同一である場合には, 大腸菌の交差汚染が起こりうる可能性が示唆された。

なお, 本調査ではMIC測定試験結果とPFGEのクラスター解析との間に相関性は認められなかった。

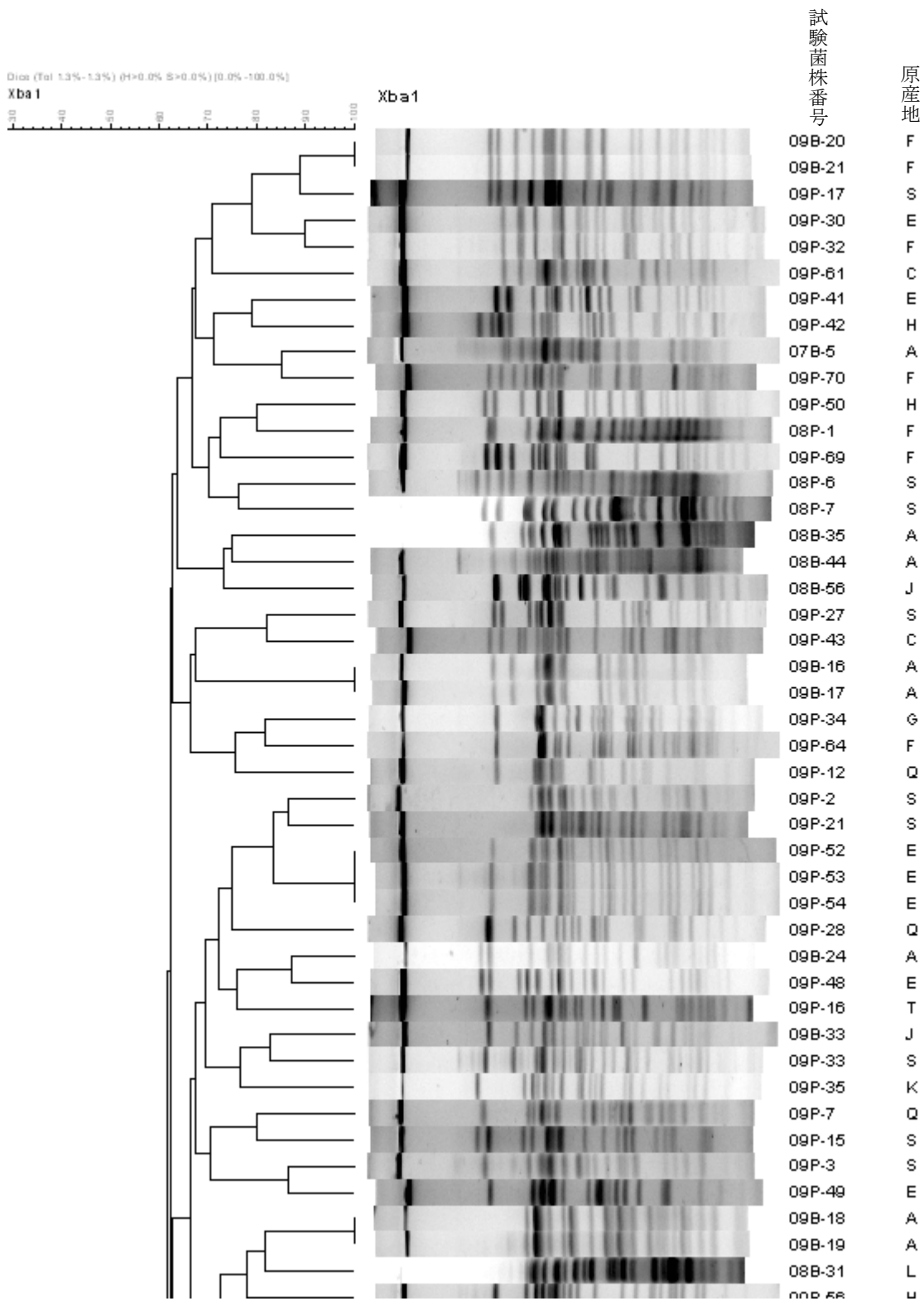


図-1-1 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

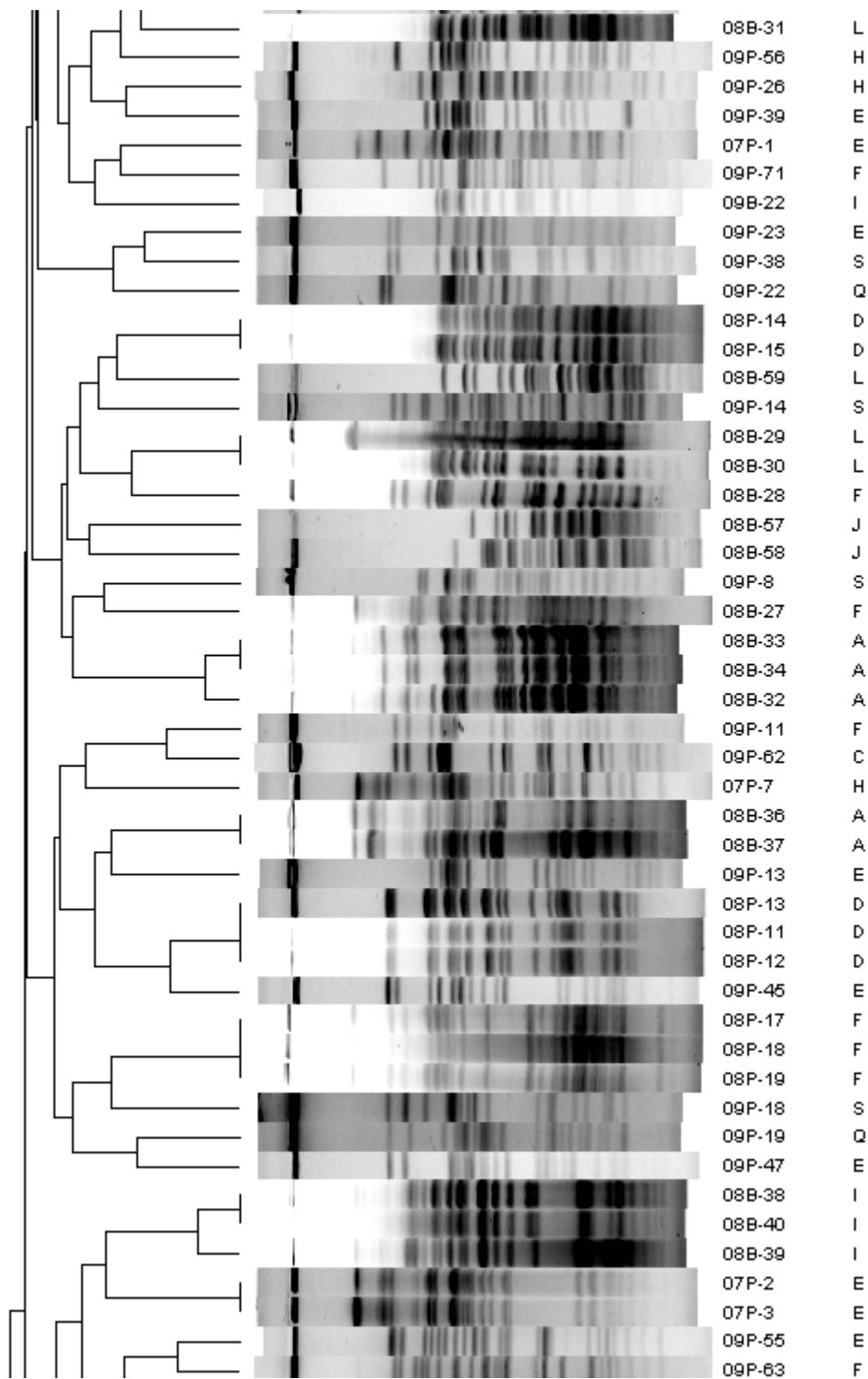


図-1-2 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

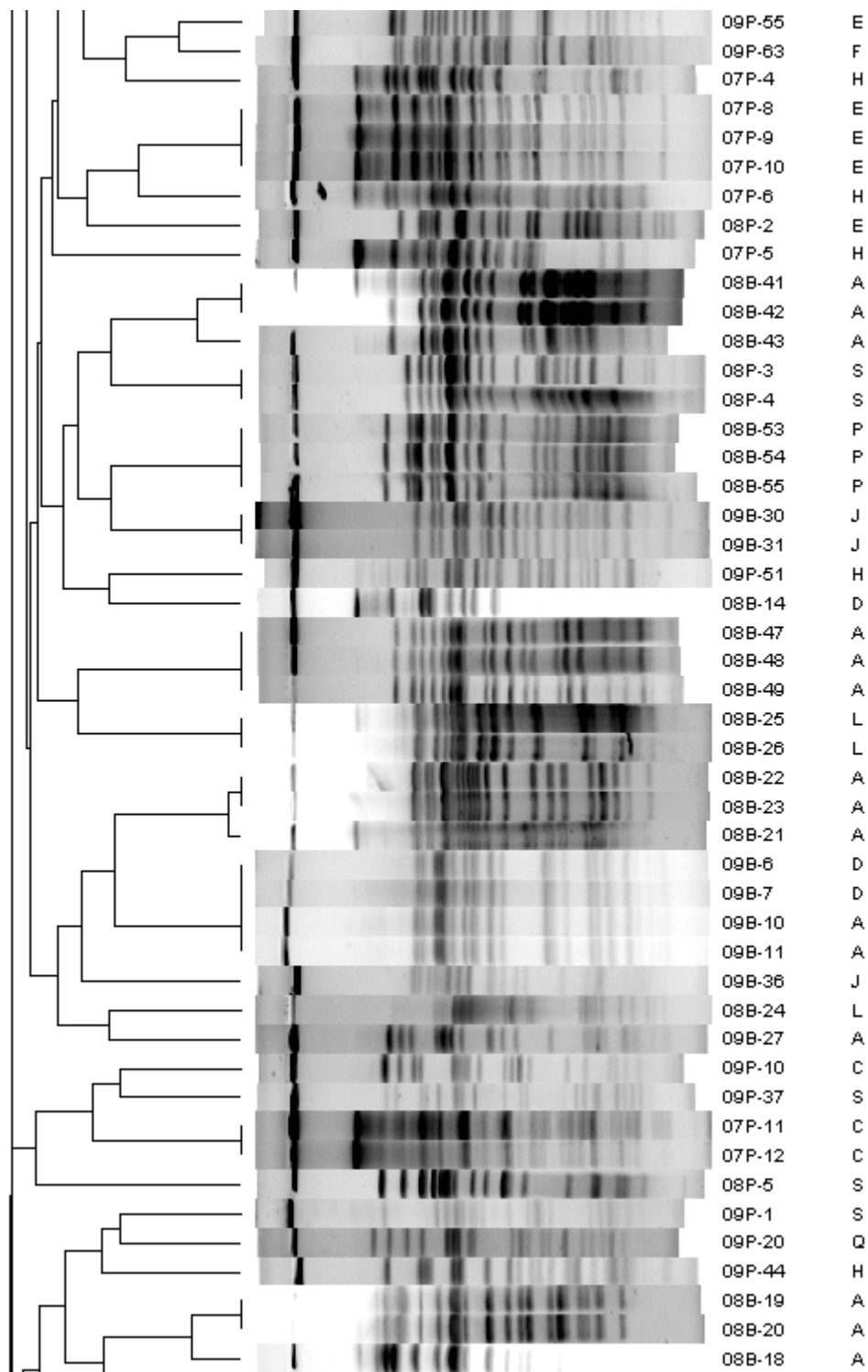


図-1-3 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

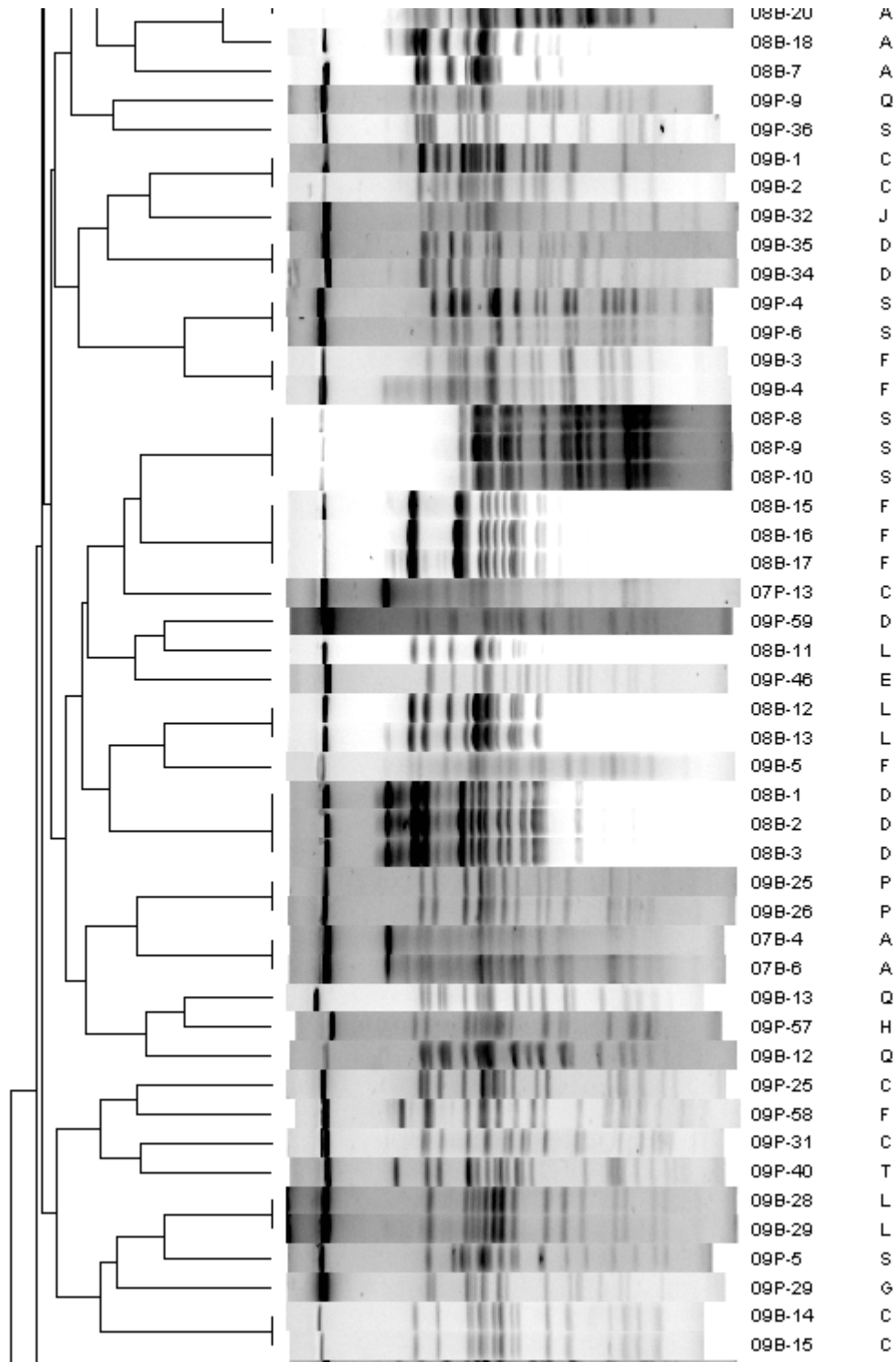


図-1-4 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

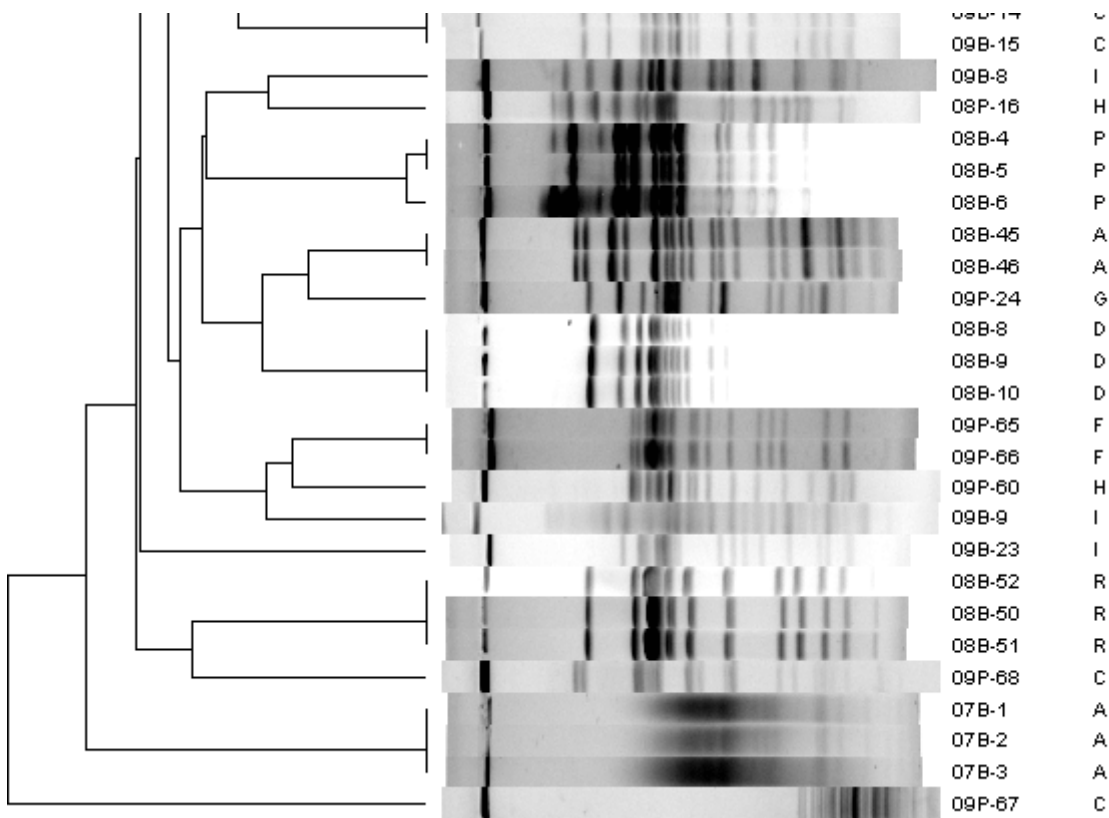


図-1-5 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

09B-1～36：本調査において牛肉から分離された大腸菌

09P-1～71：本調査において豚肉から分離された大腸菌

08B-1～59：平成19年度当該調査において牛肉から分離された大腸菌

08P-1～19：平成19年度当該調査において豚肉から分離された大腸菌

07B-1～6：平成18年度当該調査において牛肉から分離された大腸菌

07P-1～13：平成18年度当該調査において豚肉から分離された大腸菌

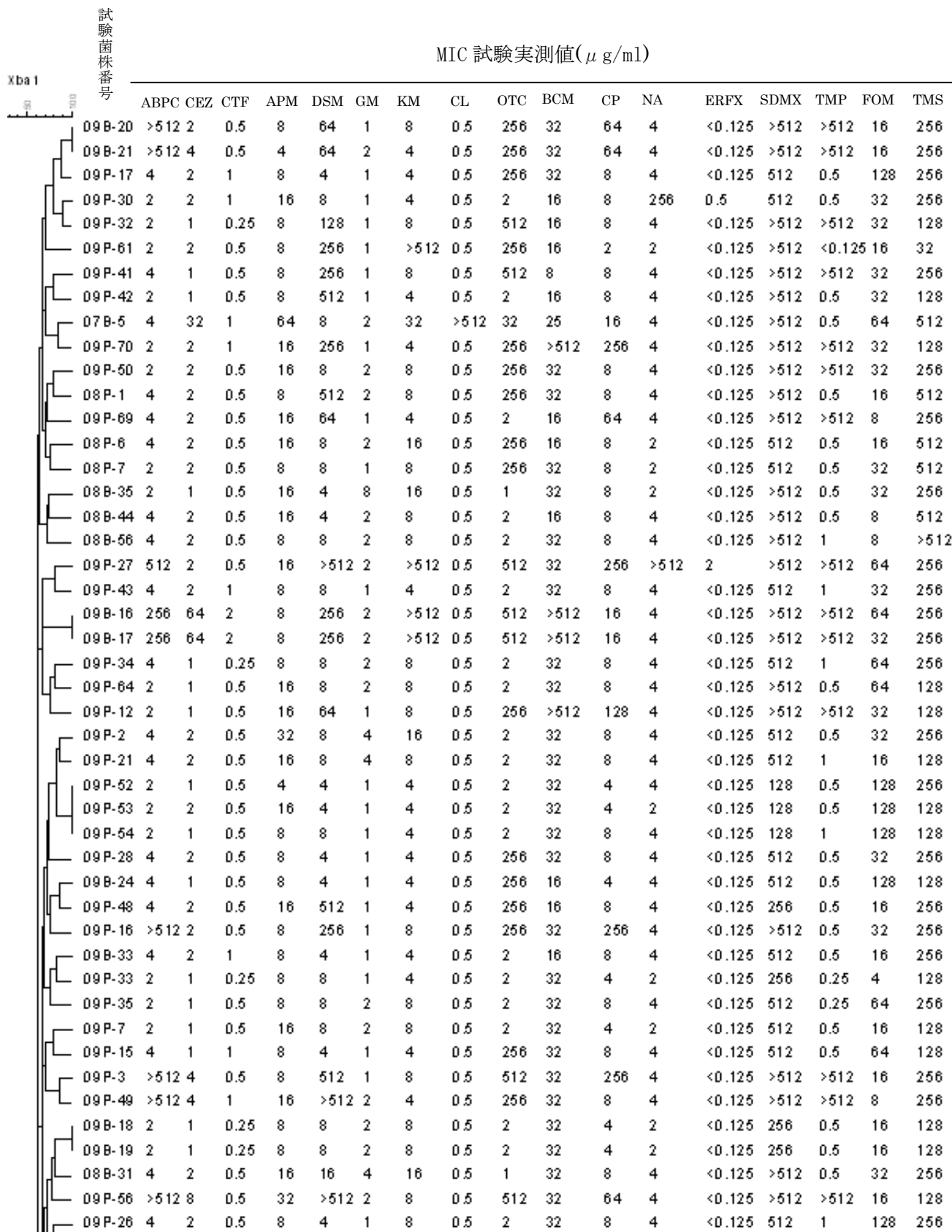


図-2-1 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる系統樹及びMIC試験実測値

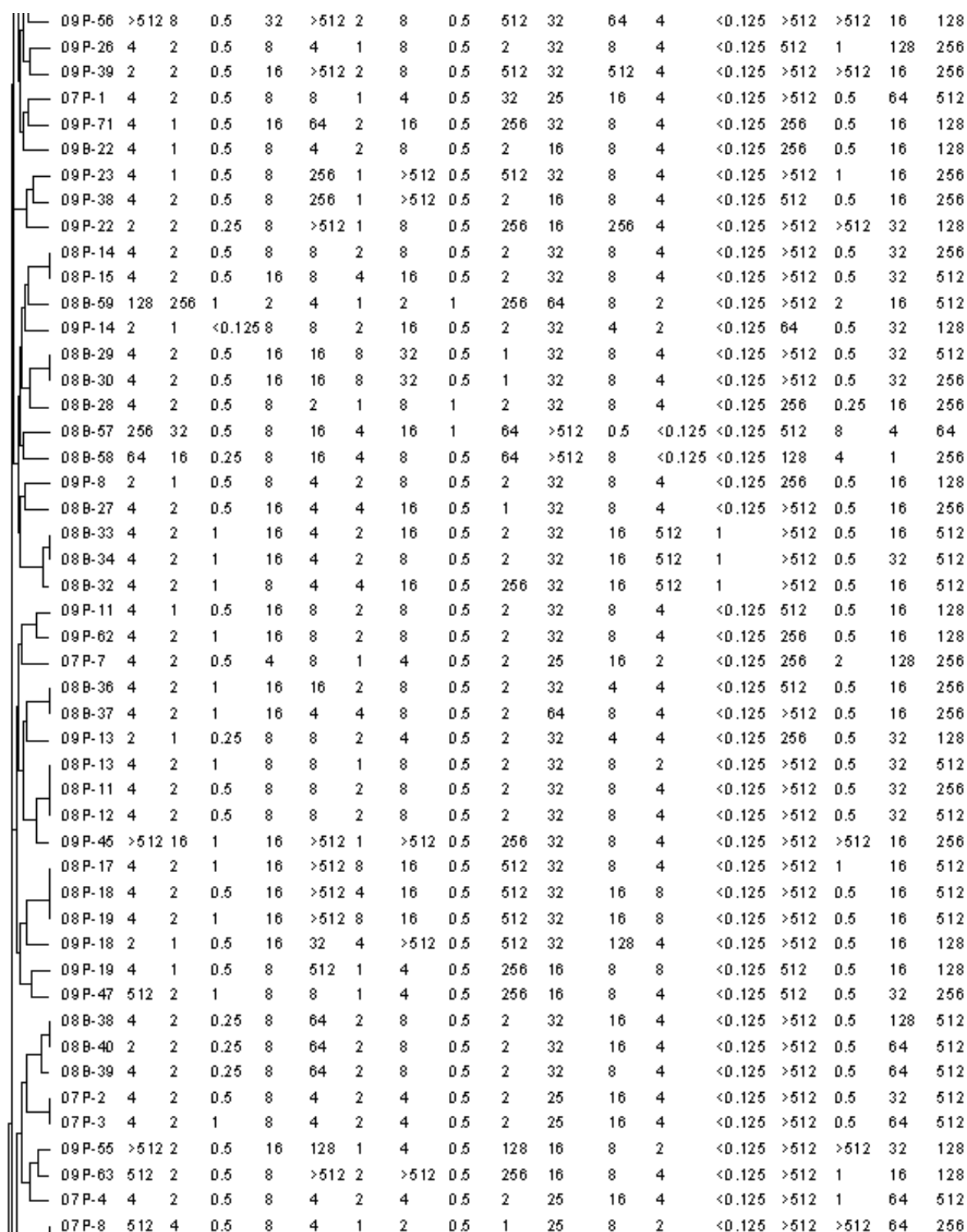


図-2-2 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる系統樹及びMIC試験実測値

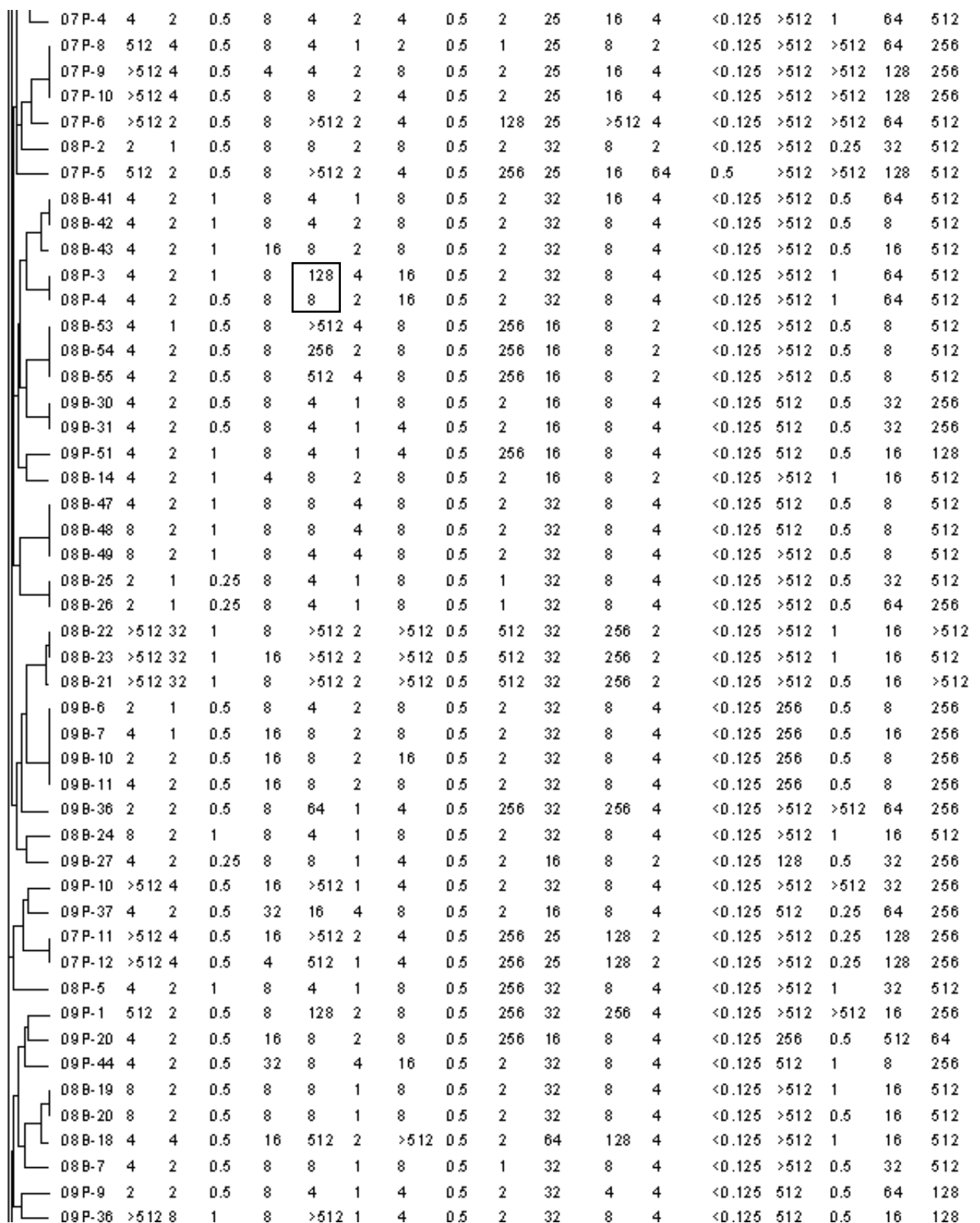


図-2-3 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる系統樹及びMIC試験実測値

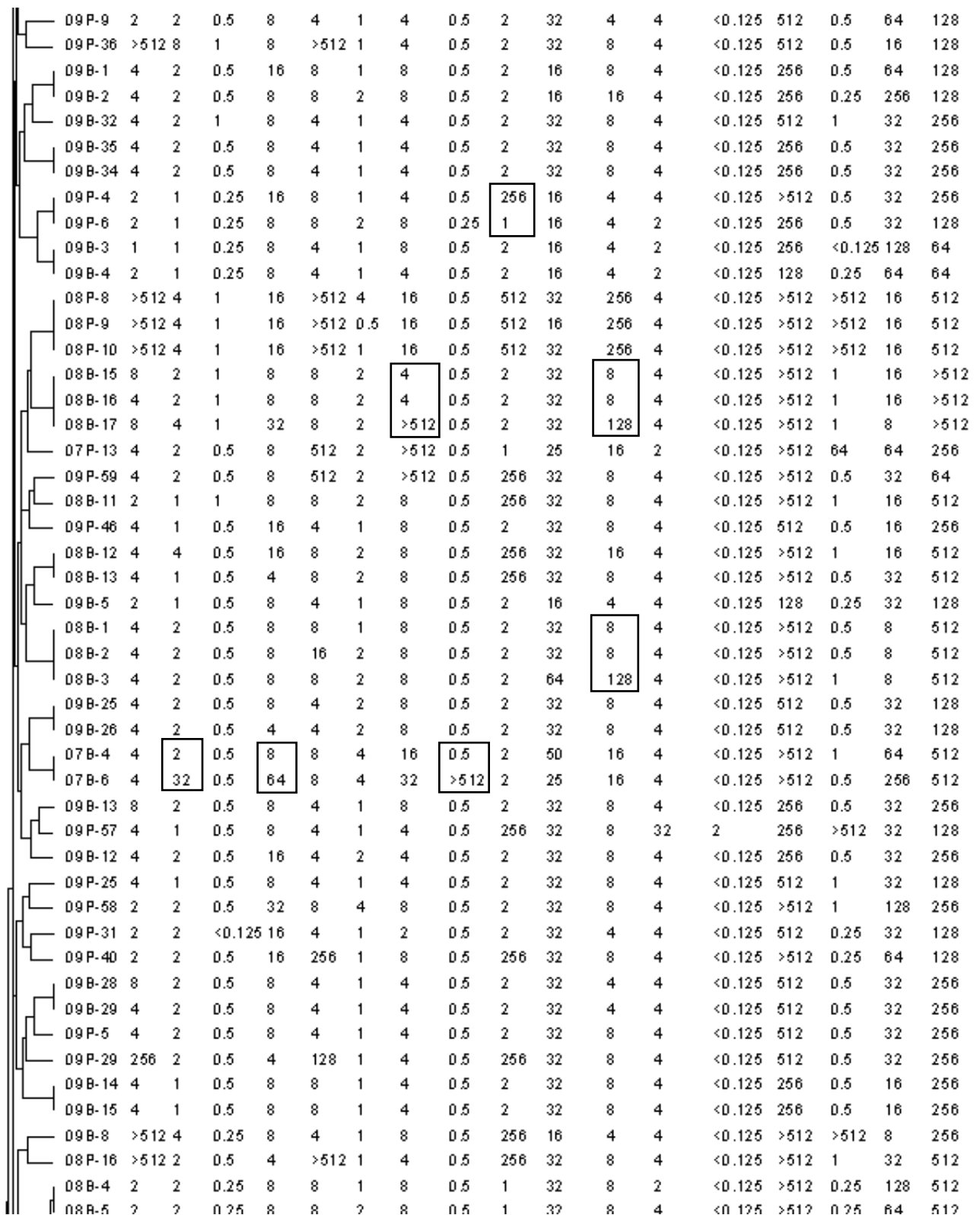


図-2-4 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる系統樹及びMIC試験実測値

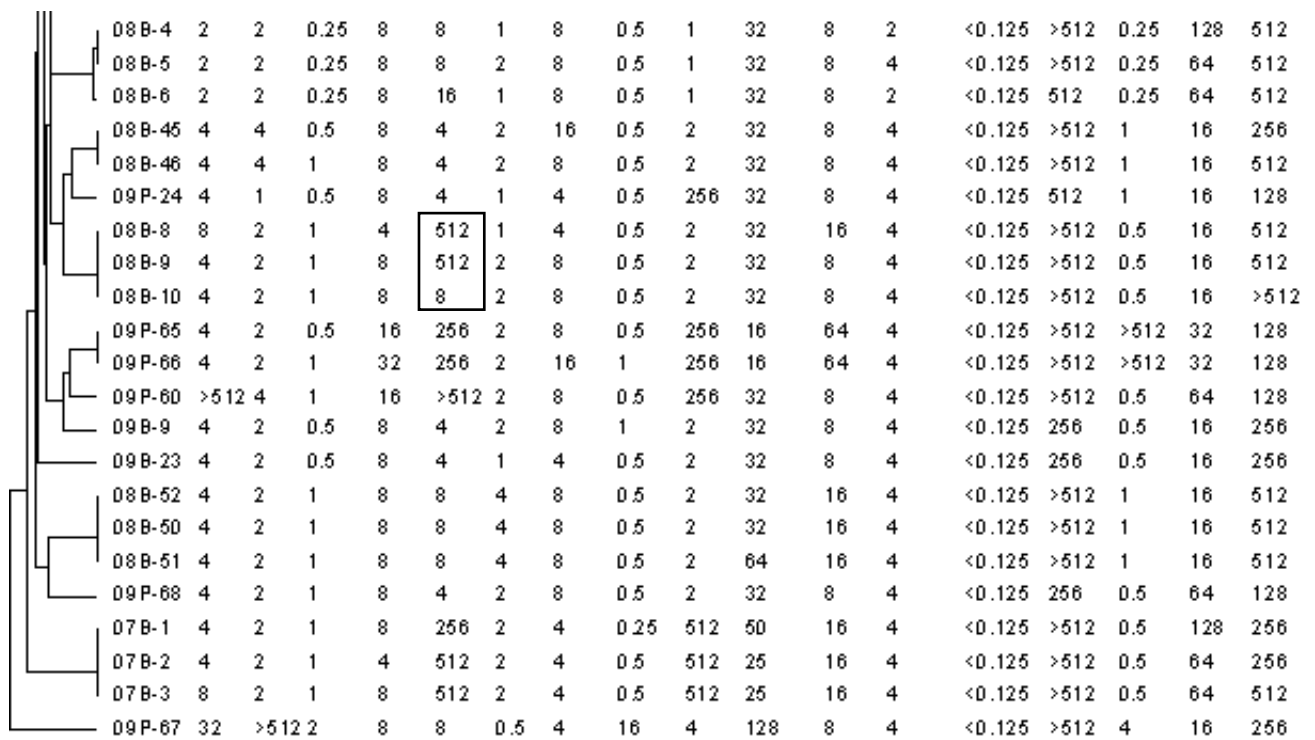


図-2-5 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる系統樹及びMIC試験実測値

※ 図中の□で囲った部分は、同一なPFGEパターンを示した菌株にもかかわらず、ブレイクポイント

を挟んで薬剤耐性能が著しく異なったもの

09B-1～36：本調査において牛肉から分離された大腸菌

09P-1～71：本調査において豚肉から分離された大腸菌

08B-1～59：平成19年度当該調査において牛肉から分離された大腸菌

08P-1～19：平成19年度当該調査において豚肉から分離された大腸菌

07B-1～6：平成18年度当該調査において牛肉から分離された大腸菌

07P-1～13：平成18年度当該調査において豚肉から分離された大腸菌

表-16 平成 20 年度分離菌株で同一の PFGE パターンを示した菌株

肉種	菌株番号	試料番号	試料加工日 (平成 20 年)	原産地	備考
牛肉	09B-6 09B-7	B118	10 月 1 日	D	原産地の異なる試料から分離されたものの、同一店舗で入手した試料からの分離菌株であった。 加工日も同一であった。
	09B-10 09B-11	B125	10 月 1 日	A	
豚肉	09P-4 09P-6	P42 P75	9 月 29 日 9 月 29 日	S	異なる店舗で入手した試料（同一原産地）からの分離菌株であるが、販売店舗が同地域の同系列店であり、処理施設が同一である可能性が示唆された。 加工日も同一であった。
	09P-52 09P-53 09P-54	P623 P625 P626	11 月 3 日 11 月 3 日 11 月 3 日	E	異なる試料（同一原産地）から分離されたが、同一店舗から入手した試料であった。 加工日も同一であった。
	09P-65 09P-66	P931 P937	11 月 19 日 11 月 19 日	F	異なる試料（同一原産地）から分離されたが、同一店舗から入手した試料であった。 加工日も同一であった。

4 薬剤耐性菌株の保存

薬剤耐性が認められた分離菌株については、市販保存キット(マイクロバンク)で引き続き -80 ℃で凍結保存した。

また、ブレイクポイントが未定で耐性の有無が判定できなかった菌株についても同様に保存した。

凍結保存した菌株数は表-17のとおりである。

表-17 凍結保存に供した分離菌株数

対象	耐性菌株	耐性が不明な菌株	合計
牛肉	12	24	36
豚肉	56	15	71
全体	68	39	107

以 上