

内閣府食品安全委員会
平成26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27年3月

一般財団法人 東京顕微鏡院

目次

I. 調査の概要	1
II. 調査背景および目的	2
III. サルモネラ属菌、大腸菌および腸球菌の検出試験と成績	2
1. 試料のサンプリング	2
1) 施設の要件	2
2) 対象食品の種類	2
3) 試料のサンプリング、輸送および保管方法	2
4) 試料数	3
2. 試料からのサルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌の分離および同定の概略	6
1) 対象菌	6
2) 分離および同定	6
3. 試験方法	6
1) 試料液の調製	6
① サルモネラ属菌	6
② 大腸菌および腸球菌	6
2) 検出方法および同定方法	6
① サルモネラ属菌	6
② 大腸菌	7
③ 腸球菌	8
3) 試験に使用した培地・試薬	8
4. 結果	13
1) 対象菌の検出成績	13
① 牛ひき肉からの検出状況	13
② 豚ひき肉からの検出状況	15
③ 食肉加工場でのふき取り検体からの検出状況	16
IV. 分離菌株の薬剤感受性試験(MICの測定)	17
1. 分離菌株の選定	17
1) 牛ひき肉からの分離株	17
① サルモネラ属菌	17
② 大腸菌	17
③ 腸球菌	17
2) 豚ひき肉からの分離株	17
① サルモネラ属菌	17
② 大腸菌	17

③腸球菌.....	17
3)クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地からの大腸菌分離株.....	18
2.測定方法.....	18
1)対象薬剤.....	18
2)MIC 測定試験方法.....	19
①接種用菌液の調製.....	19
②菌液の接種および培養.....	19
③判定方法とブレイクポイント.....	20
④精度管理.....	22
3)試験に使用した機器・培地.....	23
3.結果.....	23
1)牛ひき肉由来株の MIC と耐性出現頻度.....	23
①サルモネラ属菌.....	23
②大腸菌.....	26
③腸球菌.....	27
2)豚ひき肉由来株の MIC と耐性出現頻度.....	31
①サルモネラ属菌.....	31
②大腸菌.....	33
③腸球菌.....	34
3)クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地由来大腸菌の MIC と耐性出現頻度..	37
①牛ひき肉分離株.....	37
②豚ひき肉分離株.....	37
③牛・豚ひき肉分離株.....	37
V. 薬剤耐性菌の性状解析.....	41
1.対象菌株の選定.....	41
2.試験方法.....	41
1)ESBL の確認.....	41
2)ESBL の遺伝子型別.....	41
3)PFGE 解析.....	41
4)試験に使用した機器・培地.....	41
3.結果および考察.....	43
1)ESBL 産生大腸菌の検出状況.....	43
2)ESBL 遺伝子型別.....	43
3)PFGE 解析.....	44
4.分離菌株の保存.....	50

I. 調査の概要

本調査では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ため、牛ひき肉および豚ひき肉における薬剤耐性菌の調査を実施した。

平成 26 年 7 月から 11 月にかけて、国内の代表的な都市において国内産の牛ひき肉 995 検体、豚ひき肉 1,149 検体を入手し、サルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌 (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*) を分離した。

牛ひき肉からの対象菌の分離状況は、サルモネラ属菌が 10 検体(陽性率 1.0%)、大腸菌が 196 検体(19.7%)、腸球菌が 642 検体(64.5%)で陽性であった。豚ひき肉からの分離状況は、サルモネラ属菌が 13 検体(1.1%)、大腸菌が 432 検体(37.6%)、腸球菌が 880 検体(76.6%)で陽性であった。

次に、分離された菌株について、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を行った。対象とした薬剤は、サルモネラ属菌および大腸菌については ABPC、CEZ、CTX、SM、GM、KM、TC、CP、CL、NA、CPFEX および ST 合剤の 12 薬剤、腸球菌については ABPC、DSM、GM、KM、OTC、CP、BC、EM、LCM、ERFX、TS、SNM および VGM の 13 薬剤とした。牛ひき肉由来のサルモネラ属菌について見ると、薬剤耐性株が供試した 12 薬剤のうち 8 薬剤に認められ、耐性率は 4.0%(CTX)~70.0%(TC)であった。大腸菌は、薬剤耐性株が供試した 12 薬剤中 10 薬剤に認められ、耐性率は 3.8%(CPFEX)~28.8%(SM)であった。腸球菌は、薬剤耐性株が供試した 13 薬剤のうち 10 薬剤に認められ、耐性率は 0.9%(ABPC)~39.6%(KM)であった。豚ひき肉由来のサルモネラ属菌について見ると、薬剤耐性株が供試した 12 薬剤のうち 6 薬剤に認められ、耐性率は 15.4%(ST)~40.0%(SM)であった。大腸菌は、薬剤耐性菌が供試した 12 薬剤中 9 薬剤に認められ、耐性率は 1.4%(GM、CPFEX)~45.2%(TC)であった。腸球菌は、薬剤耐性株が供試した 13 薬剤のうち 9 薬剤に認められ、耐性率は 5.7%(GM)~38.1%(OTC)であった。

さらに得られた薬剤耐性菌について PFGE 等による解析を実施した。ESBL 産生大腸菌について型別を調べたところ、TEM+SHV 型が 9 株で最も多く、CTX-M-1 group+TEM 型および CTX-M-9 group 型が各 8 株、SHV 型が 7 株、CTX-M-1 group 型が 5 株、CTX-M-2 group 型が 2 株であった。サルモネラ属菌は、*S. infantis* および *S. Schwarzengrund*、ESBL 産生大腸菌について PFGE 解析に基づく系統樹を作成した。

Ⅱ. 調査背景および目的

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当たり、畜水産食品等の薬剤耐性菌の出現に関する科学文献および調査報告数が極めて少ないことから、畜水産食品等の薬剤耐性菌の出現状況を定量的に把握しておく必要がある。平成 17 年度には、畜水産食品における薬剤耐性菌について情報収集するとともに、薬剤耐性菌の出現状況を定量的に把握するためのプロトコルを作成した(平成 17 年度「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)。このプロトコルに従い、平成 18、19、20 および 25 年度に畜産食品(牛肉、豚肉、鶏肉、牛肝臓、豚肝臓)における薬剤耐性菌の出現状況を調査したが、牛ひき肉および豚ひき肉を対象とした調査は行われておらず、薬剤耐性菌の状況については知見が少ない。

本調査では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ため、牛ひき肉および豚ひき肉における薬剤耐性菌の調査を実施し、薬剤耐性菌の食品健康影響評価を実施するための基礎資料とすることを目的とした。

Ⅲ. サルモネラ属菌、大腸菌および腸球菌の検出試験と成績

1. 試料のサンプリング

1) 施設の要件

牛ひき肉および豚ひき肉を国内産に限って採取する必要があることから、全国の大手量販店、中小量販店、小売店の施設を対象とした。なおサンプリングにおいては、産地が偏らないよう北海道、東北、関東、中部、近畿、中国・四国および九州の、それぞれ代表的な都市の量販店等から採取した。また食肉加工場でのふき取り調査も実施した。

2) 対象食品の種類

国内産の牛ひき肉および豚ひき肉の 2 種類を対象食品とした。また、対象食品は加熱調理等がなされていないもので、国内産(パッケージや店頭表示で「国産」「国内産」「○○県産」などが明らかであるもの)であることが明らかであるものを対象とした。

3) 試料のサンプリング、輸送および保管方法

包装容器およ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保冷して運搬し、速やかに試験に供試した。

4) 試料数

牛ひき肉および豚ひき肉の試料数はそれぞれ 900 サンプル以上とした。対象食品の採取目標数を表 1 に示した。なお採取目標数は、人口比等を考慮して設定した。牛ひき肉および豚ひき肉の地域別採取数を表 2、3 に示した。実際の採取数は、牛ひき肉が 995 検体、豚ひき肉が 1,149 検体の、合計 2,144 検体であった。

また食肉加工場でのふき取り調査(図 1)では、まな板 11 検体、コンベアー5 検体、包丁 2 検体、スキッパー2 検体の合計 20 検体であった。ふき取り以外の試料として作業者の軍手 2 検体を採取した。

表1 牛ひき肉および豚ひき肉の採取目標数

地域	採取割合 (%)	900検体中の割合	採取目標数
北海道	4.3	39	40
東北	7.2	65	65
関東	33.4	301	300
中部	16.9	152	150
近畿	17.8	160	160
中国・四国	9.0	81	80
九州	11.4	103	105
合計	100.0	900	900

(検体)

表2 牛ひき肉の地域別採取数

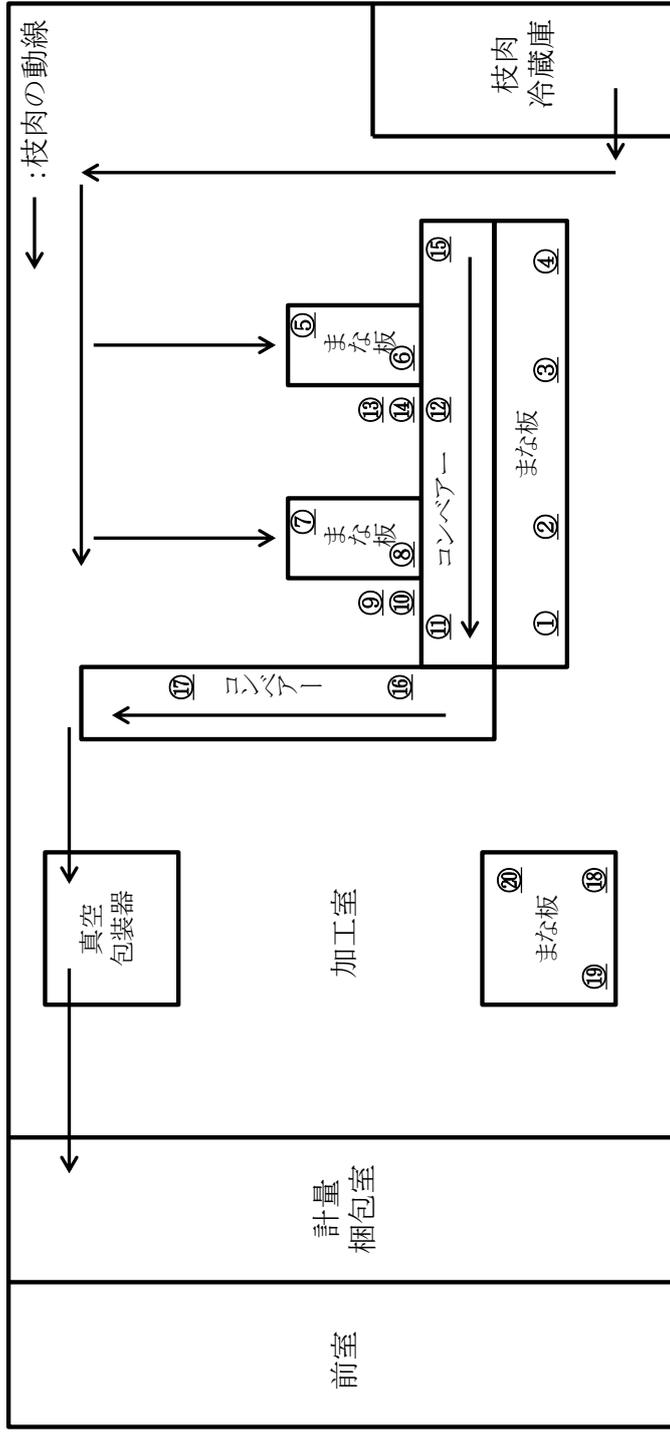
地域	牛ひき肉			
	大手量販店	中小量販店	小売店	合計
北海道	31	15	9	55
東北	14	43	20	77
関東	48	198	92	338
中部	40	90	32	162
近畿	25	119	20	164
中国・四国	19	63	25	107
九州	20	57	15	92
合計	197	585	213	995

(検体)

表3 豚ひき肉の地域別採取数

地域	豚ひき肉			
	大手量販店	中小量販店	小売店	合計
北海道	9	57	9	75
東北	14	59	18	91
関東	30	208	94	332
中部	43	133	30	206
近畿	24	141	21	186
中国・四国	24	62	30	116
九州	23	107	13	143
合計	167	767	215	1,149

(検体)



①~⑧, ⑬: 手袋



⑨, ⑩: スキッパー



⑪, ⑫: 包丁



⑬, ⑭, ⑮~⑰: コンベアー



⑱, ⑲~⑳: まな板

図1 食肉加工場でのふき取り調査

2. 試料からのサルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌の分離および同定の概略

1) 対象菌

サルモネラ属菌

大腸菌

腸球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*)

2) 分離および同定

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、分離および同定を行った。また最新の試験方法として「食品からの微生物標準試験法」等を参考に、使用する分離平板培地などを選択した(図2-4)。なお今回の調査では、薬剤耐性菌をスクリーニングする目的でESBL産生大腸菌およびバンコマイシン耐性の腸球菌を検出可能な酵素基質培地も併用した。

3. 試験方法

1) 試料液の調製

① サルモネラ属菌

試料 25-30g を秤量し、滅菌緩衝ペプトン水(BPW)225-270ml を加えた後、1 分間ストマッカー処理したものを試料液(1 次増菌培養)として用いた(図 2)。

② 大腸菌および腸球菌

試料 25-30g を秤量し、滅菌緩衝ペプトン水(BPW)100-120ml を加えた後、1 分間ストマッカー処理したものを試料液として用いた(図 3、4)。

2) 検出方法および同定方法

① サルモネラ属菌

a) 増菌培養法

試料液を 36℃で 22±2 時間 1 次増菌培養した。次に、1 次増菌培養液 0.1ml をラポート・バシリアディス培地 10ml、1 次増菌培養液 1.0ml をテトラチオネート培地 10ml にそれぞれ接種し、42℃で 22±2 時間 2 次増菌培養した。2 次増菌培養液の 1 白金耳量を DHL 寒天培地およびクロモアガーサルモネラ寒天培地に画線塗抹し、36℃で 22±2 時間培養した。

b) 生化学的性状試験

培養終了後、各寒天培地にサルモネラ属菌が疑われる集落が出現した場合は、下記

表 4 に示す生化学的性状試験を行い、サルモネラ属菌の同定を行った。なお得られたサルモネラ属菌については O 抗原および H 抗原を調べ、血清型を決定した。

表4 サルモネラ属菌の生化学的性状試験

使用培地	試験項目	サルモネラ属菌の性状
TSI寒天培地	糖分解	斜面(乳糖・白糖)：非分解/ 高層(ブドウ糖)：分解
	硫化水素産生	+
	ガス産生	+ or -
LIM寒天培地	リジン脱炭酸	+
	インドール産生	-
	運動性	+
VP半流動培地	VP反応	+
シモンズのクエン酸塩培地	クエン酸塩利用能	+

②大腸菌

a)直接分離培養法

試料液 0.1ml をクロモカルトコリフォーム寒天培地に塗抹し、36℃で 22±2 時間培養した。

b)増菌培養法

試料液 10ml を 3 倍濃度の EC 培地 5ml に接種し、36℃で 24±2 時間培養した。その後、培養液の 1 白金耳量をクロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地に画線塗抹し、36℃で 22±2 時間培養した。

c)生化学的性状試験

直接分離培養法および増菌培養法の各寒天培地に大腸菌が疑われる集落が出現した場合は、下記表 5 に示す生化学的性状試験を行い、大腸菌の同定を行った。

表5 大腸菌の生化学的性状試験

使用培地	試験項目	大腸菌の性状
TSI寒天培地	糖分解	斜面(乳糖・白糖): 分解/ 高層(ブドウ糖): 分解
	硫化水素産生	-
	ガス産生	+ or -
LIM寒天培地	リジン脱炭酸	+
	インドール産生	+
	運動性	+

③腸球菌

a)直接分離培養法

試料液 0.1ml を EF 寒天培地に塗抹し、36°Cで 48±3 時間培養した。

b)増菌培養法

試料液 10ml を 3 倍濃度の Enterococcosel 培地 5ml に接種し、36°Cで 24 時間培養した。その後、培養液の 1 白金耳量を EF 寒天培地(48±3 時間)およびクロモアガー VRE スクリーン培地(22±2 時間)に画線塗抹し、36°Cで培養した。

c)生化学的性状試験

直接分離培養法および増菌培養法の各寒天培地に腸球菌が疑われる集落が出現した場合は、下記表 6 に示す生化学的性状試験を行い腸球菌であることを確認後、API Strep を用いて *E. faecalis* および *E. faecium* の菌種同定を行った。

表6 腸球菌の生化学的性状試験

使用培地	試験項目	腸球菌の性状
Enterococcosel培地	45°C発育	+
6.5%食塩加ブドウ糖ブイヨン	6.5%食塩発育	+

3)試験に使用した培地・試薬

サルモネラ属菌、大腸菌および腸球菌の検出および同定に使用した培地、試薬を表 7 に示した。

表7 使用培地、試薬一覧

対象菌	名称	メーカー名
サルモネラ属菌	緩衝ペプトン水	極東製薬
	ラポポート・バシリアデイス(RV)培地	Oxoid
	テトラチオネート(TT)培地	Oxoid
	DHL寒天培地	極東製薬
	クロモアガーサルモネラ寒天培地	関東化学
	TSI寒天培地	極東製薬
	LIM寒天培地	極東製薬
	VP半流動培地	極東製薬
	シモンズのクエン酸塩培地	極東製薬
	サルモネラ免疫血清(O群, H血清)	デンカ生研
大腸菌	緩衝ペプトン水	極東製薬
	クロモカルトコリフォーム寒天培地	関東化学
	EC培地	極東製薬
	クロモアガーオリエンタシオン/ESBL分画培地	関東化学
	TSI寒天培地	極東製薬
	LIM寒天培地	極東製薬
	病原大腸菌免疫血清(O群)	デンカ生研
腸球菌	緩衝ペプトン水	極東製薬
	EF寒天培地	日水製薬
	Enterococcosel培地	BD
	クロモアガーVREスクリーン寒天培地	関東化学
	6.5%食塩加ブドウ糖ブイヨン	自家調製
	API Strep	SYSMEX bioMérieux

牛ひき肉・豚ひき肉

1次増菌培養

検体25-30g + BPW225-270ml ストマッカー処理1分間
36°C, 22±2時間

2次増菌培養

ラポポート・バシリアデイス培地10ml + 1次増菌培養液0.1ml
テトラチオネート培地10ml + 1次増菌培養液1.0ml
42°C, 22±2時間

分離培養

DHL寒天培地
クロモアガーサルモネラ寒天培地
36°C, 22±2時間

疑わしい集落5-6集落

生化学的性状試験

TSI寒天培地
LIM寒天培地
血清型別

菌株の凍結保存(薬剤感受性試験には5株を供試する)

図2 サルモネラ属菌の分離方法

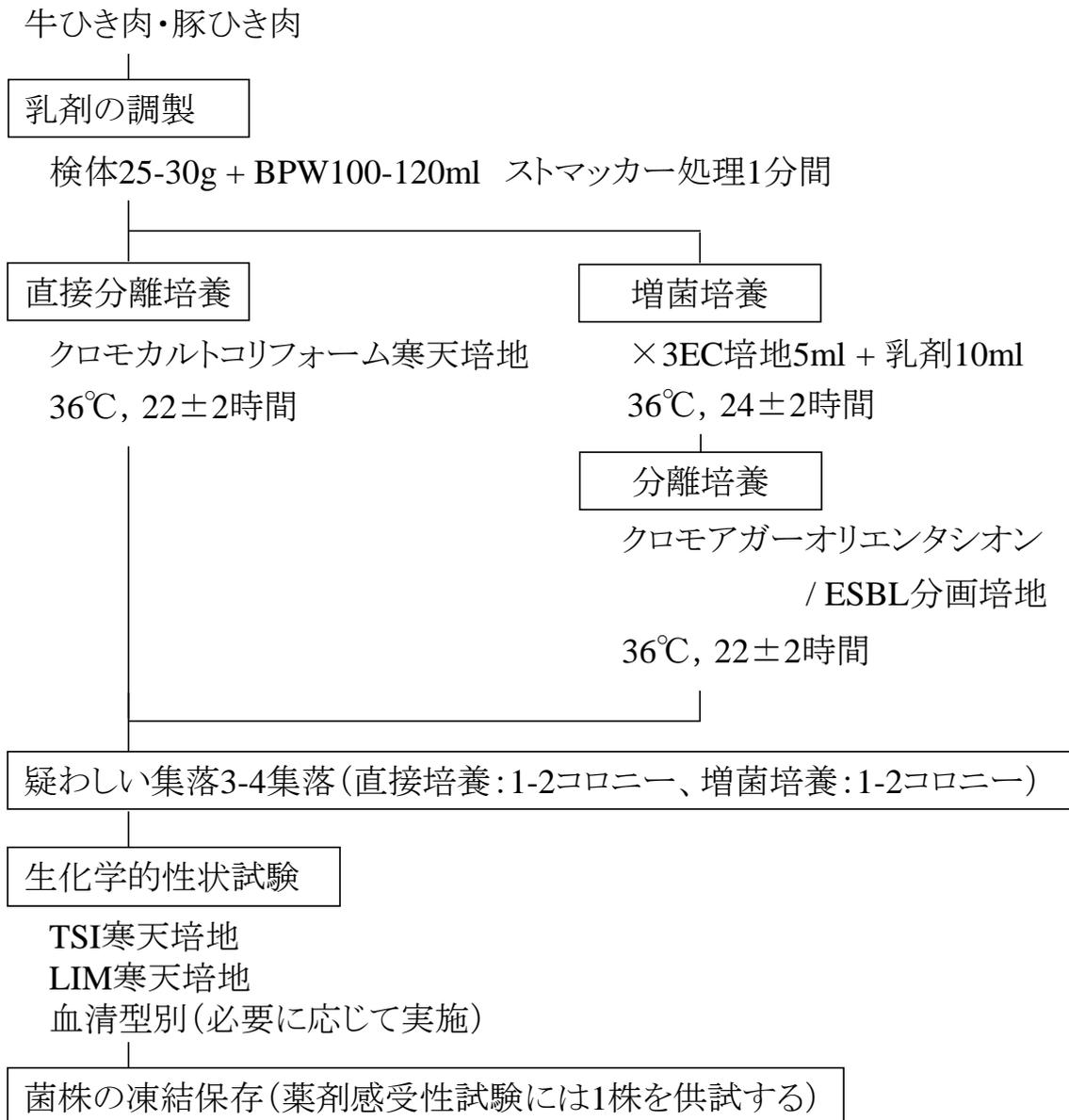


図3 大腸菌の分離方法

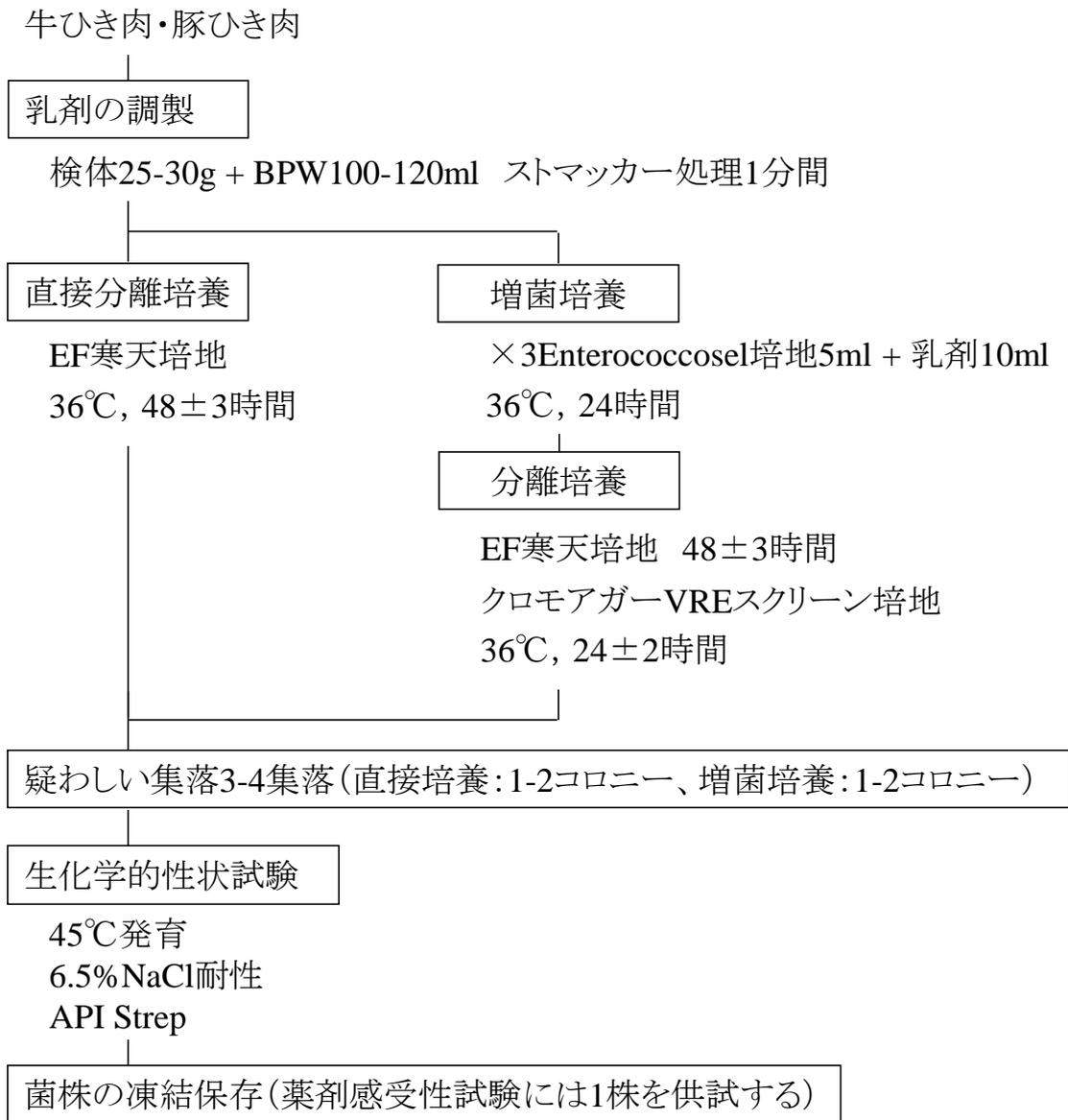


図4 腸球菌の分離方法

4.結果

1)対象菌の検出成績

①牛ひき肉からの検出状況

牛ひき肉からの対象菌の検出状況を表 8-1、表 8-2 に、分離菌株一覧を表 9 に示した。牛ひき肉 995 検体中、サルモネラ属菌は 10 検体、大腸菌は 196 検体、腸球菌は 642 検体が陽性であり、陽性率はそれぞれ 1.0%、19.7%、64.5%であった。検体を採取した規模別に見ると、サルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌いずれも小売店の陽性率が高い傾向であった。

分離されたサルモネラ属菌の内訳は、*S. Infantis* が 5 検体(25 株)、*S. Schwarzengrund* が 2 検体(10 株)、*S. Manhattan*、*S. Newport* および *S. Typhimurium* が各 1 検体(各 5 株)であった。

腸球菌の内訳は、*E. faecalis* が 600 株、*E. faecium* が 59 株であった。

また、薬剤耐性菌をスクリーニングする目的で使用したクロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地から 5 株が分離された。

表8-1 牛ひき肉からの検出状況(地域別)

地域	検体数	サルモネラ属菌		大腸菌		腸球菌	
		陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)
北海道	55	0	0	17	30.9	30	54.5
東北	77	1	1.3	9	11.7	43	55.8
関東	338	5	1.5	66	19.5	212	62.7
中部	162	0	0	37	22.8	111	68.5
近畿	164	1	0.6	32	19.5	98	59.8
中国・四国	107	2	1.9	22	20.6	87	81.3
九州	92	1	1.1	13	14.1	61	66.3
合計	995	10	1.0	196	19.7	642	64.5

表8-2 牛ひき肉からの検出状況 (規模別)

	検体数	サルモネラ属菌		大腸菌		腸球菌	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
大手量販店	197	0	0	29	14.7	113	57.4
中小量販店	585	6	1.0	119	20.3	384	65.6
小売店	213	4	1.9	48	22.5	145	68.1

表9 牛ひき肉からの分離菌株一覧

対象菌	菌種またはサルモネラ血清型	分離方法	分離菌株数	薬剤感受性試験に供試する菌株数
サルモネラ属菌	<i>S. Infantis</i>	増菌培養	25	25
	<i>S. Schwarzengrund</i>		10	10
	<i>S. Manhattan</i>		5	5
	<i>S. Newport</i>		5	5
	<i>S. Typhimurium</i>		5	5
	合計		50	50
大腸菌		直接培養	18	18
		増菌培養*	190	34
		合計	208	52
腸球菌	<i>E. faecalis</i>	直接培養	152	31
		増菌培養	448	16
		計	600	47
	<i>E. faecium</i>	直接培養	7	7
		増菌培養	52	52
		計	59	59
	合計		659	106

*クロモアガーESBLからの分離あり:5株

②豚ひき肉からの検出状況

豚ひき肉からの対象菌の検出状況を表 10-1、表 10-2 に、分離菌株一覧を表 11 に示した。豚ひき肉 1,149 検体中、サルモネラ属菌は 13 検体、大腸菌は 432 検体、腸球菌は 880 検体が陽性であり、陽性率はそれぞれ 1.1%、37.6%、76.6%であった。検体を採取した規模別に見ると、サルモネラ属菌、大腸菌、腸球菌いずれも小売店の陽性率が高い傾向であった。

分離されたサルモネラ属菌の内訳は、*S. Infantis* が 5 検体(25 株)、*S. Schwarzengrund* および *S. Typhimurium* が各 2 検体(各 5 株)、*S. Blockey*、*S. Derby*、*S. Rissen* が各 1 検体(各 5 株)、型別不能が 1 検体(5 株)であった。

腸球菌の内訳は、*E. faecalis* が 828 株、*E. faecium* が 126 株であった。

また、薬剤耐性菌をスクリーニングする目的で使用したクロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地から 15 株、クロモアガーVRE から 3 株が分離された。

表10-1 豚ひき肉からの検出状況(地域別)

地域	検体数	サルモネラ属菌		大腸菌		腸球菌	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
北海道	75	1	1.3	15	20.0	48	64.0
東北	91	0	0	40	44.0	63	69.2
関東	332	7	2.1	158	47.6	263	79.2
中部	206	2	1.0	81	39.3	161	78.2
近畿	186	0	0	52	28.0	133	71.5
中国・四国	116	1	0.9	33	28.4	92	79.3
九州	143	2	1.4	53	37.1	120	83.9
合計	1,149	13	1.1	432	37.6	880	76.6

表10-2 豚ひき肉からの検出状況(規模別)

	検体数	サルモネラ属菌		大腸菌		腸球菌	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
大手量販店	167	0	0	50	29.9	124	74.3
中小量販店	767	6	0.8	294	38.3	588	76.7
小売店	215	7	3.3	88	40.9	168	78.1

表11 豚ひき肉からの分離菌株一覧

対象菌	菌種またはサルモネラ血清型	分離方法	分離菌株数	薬剤感受性試験に供試する菌株数
サルモネラ属菌	<i>S. Infantis</i>	増菌培養	25	25
	<i>S. Schwarzengrund</i>		10	10
	<i>S. Typhimurium</i>		10	10
	<i>S. Blockey</i>		5	5
	<i>S. Derby</i>		5	5
	<i>S. Rissen</i>		5	5
	<i>Salmonella</i> spp.		5	5
	合計		65	65
大腸菌		直接培養	58	39
		増菌培養*	418	34
		合計	476	73
腸球菌	<i>E. faecalis</i>	直接培養	249	44
		増菌培養	579	28
		計	828	72
	<i>E. faecium</i>	直接培養	17	17
		増菌培養	109	16
		計	126	33
	合計		954	105

*クロモアガー-ESBLからの分離あり:15株

**クロモアガー-VREからの分離あり:3株

③食肉加工場でのふき取り検体からの検出状況

食肉加工場でのふき取り検体からは、サルモネラ属菌、大腸菌は検出されなかった。腸球菌はまな板 5 検体、スキッパー1 検体から *E. faecalis* が検出された。また作業者の軍手 1 検体から大腸菌、2 検体から腸球菌(*E. faecalis*)が検出された。

今回のふき取り調査に協力頂いた工場では Safe Quality Food(SQF)認証を取得しており、食肉の「安全性」と「品質」の確保に取り組んでいることも、対象菌がほとんど検出されなかった要因と考えられる。

IV. 分離菌株の薬剤感受性試験(MIC の測定)

1. 分離菌株の選定

分離された菌株について、サルモネラ属菌、大腸菌は対象食品ごとにそれぞれ各 50 株、腸球菌は各 100 株となるように選定した。直接分離培養で分離された菌株を優先的に採用し、直接分離培養陰性の検体については、増菌培養で分離された菌株を用いた。また基本的に 1 試料について 1 株を採用した。なお腸球菌については、*E. faecalis* と *E. faecium* が半々となるように選定した。

1) 牛ひき肉からの分離株

牛ひき肉から分離された菌株のうち、薬剤感受性試験に供試した菌株数を表 9 に示した。

①サルモネラ属菌

牛ひき肉から分離された 50 株すべてを試験用菌株とした。

②大腸菌

直接培養で分離された 18 株、増菌培養で分離された 34 株の合計 52 株を試験用菌株とした。

③腸球菌

E. faecalis は直接培養で分離された 31 株、増菌培養で分離された 16 株の計 47 株、*E. faecium* は直接培養で分離された 7 株すべて、増菌培養で分離された 52 株の計 59 株、合計 106 株を試験用菌株とした。

2) 豚ひき肉からの分離株

豚ひき肉から分離された菌株のうち、薬剤感受性試験に供試した菌株数を表 11 に示した。

①サルモネラ属菌

豚ひき肉から分離されたサルモネラ属菌 65 株すべてを試験用菌株とした。

②大腸菌

直接培養で分離された 39 株、増菌培養で分離された 34 株の合計 73 株を試験用菌株とした。

③腸球菌

E. faecalis は直接培養で分離された 44 株、増菌培養で分離された 28 株の計 72 株、*E. faecium* は直接培養で分離された 17 株すべて、増菌培養で分離された 16 株の計 33 株、合計 105 株を試験用菌株とした。

3)クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地からの大腸菌分離株
牛ひき肉および豚ひき肉から分離された菌株すべてを試験用菌株とした。

2.測定方法

米国臨床検査標準委員会 (CLSI)の試験法に準拠し、微量液体希釈培養法により最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)を測定した。なお対象薬剤は国内の家畜衛生分野におけるモニタリング調査で採用されている薬剤を参考に決定した。

1)対象薬剤

対象とした薬剤および濃度範囲を表 12、13 に示した。

表12 調査対象薬剤 (サルモネラ属菌、大腸菌)

薬剤名	略号	濃度範囲 (μg/ml)
アンピシリン	ABPC	1-128
セファゾリン	CEZ	1-128
セフトキシム	CTX	0.5-64
ストレプトマイシン	SM	0.5-64
ゲンタマイシン	GM	0.5-64
カナマイシン	KM	1-128
テトラサイクリン	TC	0.5-64
クロラムフェニコール	CP	1-128
コリスチン	CL	0.12-16
ナリジクス酸	NA	1-128
シプロフロキサシン	CPF	0.03-4
スルファメトキサゾール・トリメプリーム合剤	ST	2.38/0.12-152/8

表13 調査対象薬剤(腸球菌)

薬剤名	略号	濃度範囲 (µg/ml)
アンピシリン	ABPC	0.12-128
ジヒドロストレプトマイシン	DSM	0.25-512
ゲンタマイシン	GM	0.12-256
カナマイシン	KM	0.25-512
オキシテトラサイクリン	OTC	0.12-64
クロラムフェニコール	CP	0.25-512
バシトラシン	BC	0.25-512
エリスロマイシン	EM	0.12-128
リンコマイシン	LCM	0.12-256
エンロフロキサシン	ERFX	0.12-64
タイロシン	TS	0.12-256
サリノマイシン	SNM	0.12-32
バージニアマイシン	VGM	0.12-128

2)MIC 測定試験方法

微量液体希釈培養法には、栄研化学株式会社製のフローズンプレートまたはドライプレートを用いた。

①接種用菌液の調製

サルモネラ属菌と大腸菌については、凍結保存菌株を普通寒天培地で 35℃、18-24 時間培養した。生育した集落を滅菌生理食塩水に McFarland 標準濁度 No.1 と同じ濁度となるように調製した。調製した菌液 0.025ml をミューラーヒントンブイヨン(BD 社製)12ml に加えたものを接種用菌液とした。

腸球菌については、凍結保存菌株を普通寒天培地で 35℃、18-24 時間培養した。生育した集落を滅菌生理食塩水に McFarland 標準濁度 No.1 と同じ濁度となるように調製した。調製した菌液 1ml を、滅菌生理食塩水 9ml で 10 倍に希釈し、接種用菌液とした。

②菌液の接種および培養

サルモネラ属菌と大腸菌については、接種用菌液を 0.05ml ずつドライプレートの各ウェルに接種した。接種後、35℃で 16-20 時間培養した。

腸球菌については、接種用菌液を 0.0025ml ずつフローズンプレートの各ウェルに接種した。接種後、35℃で 16-20 時間培養した。

③判定方法とブレイクポイント

マイクロプレートリーディングミラーの上に培養後のプレートを置き、判定を行った。肉眼的に混濁または沈殿が認められない場合、沈殿物があっても直径 1 mm未満で 1 個の場合には発育陰性と判定した。これ以外の場合には、発育陽性と判定した。

なおブレイクポイント(耐性限界値)は、農林水産省および(独)農林水産消費安全技術センターの平成 25 年度家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査を参考にした(表 14、15)。

表14 調査対象薬剤に対するブレイクポイント(サルモネラ属菌、大腸菌)

薬剤名	ブレイクポイント (µg/ml)
ABPC	32
CEZ	32
CTX	4
SM	32
GM	16
KM	64
TC	16
CP	32
CL	16
NA	32
CPFX	4
ST	76/4

表15 調査対象薬剤に対するブレイクポイント(腸球菌)

薬剤名	ブレイクポイント(μg/ml)
ABPC	16
DSM	128
GM	32
KM	128
OTC	16
CP	32
BC	-
EM	8
LCM	128
ERFX	4
TS	64
SNM	-
VGM	-

④精度管理

CLSI の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 ATCC29213

Enterococcus faecalis ATCC29212

Escherichia coli ATCC25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

なお、MIC の精度管理限界値(MIC 範囲)については CLSI の規定に従った(表 16)。

表16 CLSIが規定する調査対象薬剤におけるMIC (μg/ml) の精度管理限界値

薬剤名	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
ABPC	0.5-2	0.5-2	2-8	-
BC	-	-	-	-
CEZ	0.25-1	-	1-4	-
CL	-	-	-	-
CP	2-8	4-16	2-8	-
CPFX	-	-	-	-
CTX	-	-	-	-
DSM	-	-	-	-
EM	0.25-1	1-4	-	-
ERFX	0.03-0.12	0.12-1	0.008-0.03	1-4
GM	0.12-1	4-16	0.25-1	0.5-2
KM	1-4	16-64	1-4	-
LCM	-	-	-	-
NA	-	-	-	-
OTC	-	-	-	-
SM	-	-	-	-
SNM	-	-	-	-
ST	-	-	-	-
TC	0.12-1	8-32	0.5-2	8-32
TS	≦9.5/0.5	≦9.5/0.5	≦9.5/0.5	152/8-608/32
VGM	-	-	-	-

-: 規定なし

3)試験に使用した機器・培地

MIC 測定に使用した培地類を表 17 に示した。

表17 MIC測定に使用した試薬等一覧

名称	メーカー名	ロットNo.
ドライプレート‘栄研’ QJOE	栄研化学株式会社	51002
フローズンプレート‘栄研’ XB0A	栄研化学株式会社	51001
フローズンプレート‘栄研’ XB1B	栄研化学株式会社	51001
ミューラーヒントンブイヨン	Oxoid	1460487

3.結果

1)牛ひき肉由来株の MIC と耐性出現頻度

①サルモネラ属菌

牛ひき肉から分離されたサルモネラ属菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 18、MIC 分布を表 19、薬剤耐性パターンを表 20-1、表 20-2 に示した。

薬剤耐性株は供試した 12 薬剤のうち 8 薬剤に認められ、耐性率は 4.0%(CTX)～TC(70.0%)であった。ABPC では $\leq 1\mu\text{g/ml}$ および $>128\mu\text{g/ml}$ 、CEZ では $\leq 1\mu\text{g/ml}$ および $>128\mu\text{g/ml}$ 、KM では $\leq 1\mu\text{g/ml}$ および $>128\mu\text{g/ml}$ 、TC では $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$ および $32\mu\text{g/ml}$ 、CP では $2\mu\text{g/ml}$ および $64\mu\text{g/ml}$ 、ST 合剤では $\leq 2.38/0.12\mu\text{g/ml}$ および $>152/8\mu\text{g/ml}$ を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1～5 薬剤耐性の 8 パターンに分類され、5 薬剤耐性が 2 株、4 薬剤耐性が 12 株、3 薬剤耐性が 6 株、2 薬剤耐性が 15 株、1 薬剤耐性が 5 株、感受性株が 10 株であった。耐性株の内訳については、SM-TC の 2 薬剤耐性が 15 株(30.0%)で最も多く、次いで KM の 1 薬剤耐性、SM-KM-TC の 3 薬剤耐性および ABPC-SM-TC-CP の 4 薬剤耐性が各 5 株(10.0%)であった。薬剤耐性パターンを血清型毎に見ると、いずれかの薬剤に耐性を示したのは、*S. Infantis* が 80%、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* および *S. Typhimurium* は 100%で、*S. Newport* はすべて感受性であった。

表18 サルモネラ属菌の薬剤感受性試験 (牛ひき肉)

薬剤名	菌株数	Range (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (µg/ml)
ABPC	50	≦1->128	≦1	64	10	20.0	32
CEZ	50	≦1->128	≦1	4	5	10.0	32
CTX	50	≦0.5-4	≦0.5	1	2	4.0	4
SM	50	2->64	32	64	34	68.0	32
GM	50	≦0.5	≦0.5	≦0.5	0	0	16
KM	50	≦1->128	≦1	>128	15	30.0	64
TC	50	≦0.5-64	32	32	35	70.0	16
CP	50	≦1-128	2	4	5	10.0	32
CL	50	≦0.12-2	0.5	1	0	0	16
NA	50	2-4	2	2	0	0	32
CPFEX	50	≦0.03-0.06	≦0.03	≦0.03	0	0	4
ST	50	≦2.38/0.12->152/8	≦2.38/0.12	19/1	5	10.0	76/4

表19 サルモネラ属菌のMIC分布 (牛ひき肉)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (µg/ml)													
		≦0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
ABPC	50	-	-	-	-	-	40(≦1)					4	1		5
CEZ	50	-	-	-	-	-	39(≦1)	1	5						5
CTX	50	-	-	-	-	44(≦0.5)	1	3	2						
SM	50	-	-	-	-	-	1	8	5	2	24	7			3(>64)
GM	50	-	-	-	-	50(≦0.5)									
KM	50	-	-	-	-	-	28(≦1)	7							15
TC	50	-	-	-	-	14(≦0.5)	1			2	28	5			
CP	50	-	-	-	-	-	12(≦1)	27	6			3	2		
CL	50	-	-	2(≦0.12)	14	22	10	2							
NA	50	-	-	-	-	-		45	5						
CPFEX	50	48	2												

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (µg/ml)							
		≦2.38/0.12	4.75/0.25	9.5/0.5	19/1	38/2	76/4	152/8	>152/8
ST	50	36	3	3	3				5

表20-1 サルモネラ属菌の薬剤耐性パターン (牛ひき肉)

菌株数	感受性 菌株数	耐性 菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳				
				1薬剤耐性	2薬剤耐性	3薬剤耐性	4薬剤耐性	5薬剤耐性
50	10	40	80.0	KM	SM-TC	SM-KM-TC KM-TC-ST	ABPC-SM-TC-CP SM-KM-TC-ST ABPC-CEZ-SM-TC	ABPC-CEZ-CTX-SM-TC

表20-2 サルモネラ属菌の薬剤耐性パターン (牛ひき肉, 血清型別)

血清型	菌株数	薬剤耐性パターン	菌株数	割合 (%)
<i>S. Infantis</i>	25	Susceptible	5	20.0
		SM-TC	10	40.0
		SM-KM-TC	5	20.0
		ABPC-CEZ-SM-TC	3	12.0
		ABPC-CEZ-CTX-SM-TC	2	8.0
<i>S. Schwarzengrund</i>	10	KM	5	50.0
		KM-TC-ST	1	10.0
		SM-KM-TC-ST	4	40.0
<i>S. Manhattan</i>	5	SM-TC	5	100
<i>S. Newport</i>	5	Susceptible	5	100
<i>S. Typhimurium</i>	5	ABPC-SM-TC-CP	5	100

②大腸菌

牛ひき肉から分離された大腸菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 21、MIC 分布を表 22、薬剤耐性パターンを表 23 に示した。

薬剤耐性株は供試した 12 薬剤中 10 薬剤に認められ、耐性率は 3.8%(CPFX)～28.8%(SM)であった。ABPC では 2μg/ml および >128μg/ml、CEZ では ≤1μg/ml および >128μg/ml、CTX では ≤0.5μg/ml および >64μg/ml、SM では 4μg/ml および >64μg/ml、KM では 2μg/ml および >128μg/ml、TC では ≤0.5μg/ml および 32μg/ml、CP では 2μg/ml および 64μg/ml、ST 合剤では ≤2.38/0.12μg/ml および >152/8μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1～4、7 および 9 薬剤耐性の 16 パターンに分類され、9 薬剤耐性が 2 株、7 薬剤耐性が 1 株、4 薬剤耐性が 5 株、3 薬剤耐性が 4 株、2 薬剤耐性が 3 株、1 薬剤耐性が 7 株、感受性株が 30 株であった。耐性株の内訳については、SM の 1 薬剤耐性、ABPC-SM-ST の 3 薬剤耐性が各 3 株(5.8%)で最も多かった。

表21 大腸菌の薬剤感受性試験(牛ひき肉)

薬剤名	菌株数	Range (μg/ml)	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (μg/ml)
ABPC	52	≤1->128	2	>128	12	23.1	32
CEZ	52	≤1->128	≤1	2	4	7.7	32
CTX	52	≤0.5->64	≤0.5	≤0.5	3	5.8	4
SM	52	1->64	4	>64	15	28.8	32
GM	52	≤0.5-1	≤0.5	≤0.5	0	0	16
KM	52	≤1->128	2	128	6	11.5	64
TC	52	≤0.5-64	≤0.5	32	11	21.2	16
CP	52	2-128	2	4	4	7.7	32
CL	52	≤0.12-2	0.5	1	0	0	16
NA	52	≤1->128	2	4	4	7.7	32
CPFX	52	≤0.03-4	≤0.03	≤0.03	2	3.8	4
ST	52	≤2.38/0.12->152/8	≤2.38/0.12	>152/8	9	17.3	76/4

表22 大腸菌のMIC分布(牛ひき肉)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (μg/ml)												
		≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
ABPC	52	-	-	-	-	-	18(≤1)	20	2	-	-	-	2	10
CEZ	52	-	-	-	-	-	43(≤1)	4	-	1	1	-	3	
CTX	52	-	-	-	-	49(≤0.5)	-	-	1	-	-	-	2(>64)	
SM	52	-	-	-	-	1	9	20	7	-	5	4	6(>64)	
GM	52	-	-	-	-	48(≤0.5)	4	-	-	-	-	-	-	
KM	52	-	-	-	-	8(≤1)	31	6	1	-	-	1	5	
TC	52	-	-	-	-	35(≤0.5)	4	1	1	3	5	3	-	
CP	52	-	-	-	-	-	41	7	-	1	2	1	-	
CL	52	-	-	16(≤0.12)	6	19	10	1	-	-	-	-	-	
NA	52	-	-	-	-	23(≤1)	23	1	1	-	-	2	2	
CPFX	52	47	-	1	1	1	-	2	-	-	-	-	-	

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (μg/ml)						
		≤2.38/0.12	4.75/0.25	9.5/0.5	19/1	38/2	76/4	152/8
ST	52	41	1	-	-	1	-	9

表23 大腸菌の薬剤耐性パターン (牛ひき肉)

菌株数	感受性 菌株数	耐性 菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳															
				1薬剤耐性					2薬剤耐性		3薬剤耐性		4薬剤耐性				7薬剤耐性	9薬剤耐性	
				SM	ABPC	KM	TC	ST	SM-TC	TC-CP	ABPC-SM-ST	SM-KM-TC	ABPC-CEZ-TC-ST	ABPC-SM-KM-CP	ABPC-SM-KM-ST	ABPC-SM-TC-ST	ABPC-KM-TC-NA	ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-TC-NA	ABPC-CEZ-CTX-SM-TC-CP-NA-CPEFX-ST
52	30	22	42.3	3	1	1	1	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	2

③腸球菌

牛ひき肉から分離された腸球菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 24、MIC 分布を表 25~27、薬剤耐性パターンを表 28 に示した。

E. faecalis

薬剤耐性株は供試した 13 薬剤のうち 7 薬剤に認められ、耐性率は 2.1%(CP)~27.7%(OTC)であった。DSM では 64μg/ml および >512μg/ml、KM では 32μg/ml および >512μg/ml、OTC では、1μg/ml および 64μg/ml、EM では 2μg/ml および >128μg/ml、LCM では 1μg/ml および 32μg/ml、TS では 2μg/ml および >256μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1、2、4 および 6 薬剤耐性の 8 パターンに分類され、6 薬剤耐性が 3 株、4 薬剤耐性が 2 株、2 薬剤耐性が 6 株、1 薬剤耐性が 7 株、感受性株が 29 株であった。耐性株の内訳については、OTC の 1 薬剤耐性および DSM-OTC の 2 薬剤耐性が 4 株(8.5%)で最も多く、次いで DSM の 1 薬剤耐性および DSM-KM-OTC-EM-LCM-TS の 6 薬剤耐性が各 3 株(6.4%)であった。

E. faecium

薬剤耐性株は供試した 13 薬剤のうち 10 薬剤に認められ、耐性率は 1.7%(ABPC、CP)~64.4%(KM)であった。DSM では 32μg/ml および >512μg/ml、OTC では 0.5μg/ml および 64μg/ml、LCM では 1μg/ml および 16μg/ml、TS では 2μg/ml および >256μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1~3 および 7 薬剤耐性の 12 パターンに分類され、7 薬剤耐性が 3 株、3 薬剤耐性が 5 株、2 薬剤耐性が 22 株、1 薬剤耐性が 16 株、感受性株が 13 株であった。耐性株の内訳に

については、KM-EM の 2 薬剤耐性が 19 株(32.2%)で最も多く、次いで KM の 1 薬剤耐性が 10 株(16.9%)、KM-OTC-EM の 3 薬剤耐性が 5 株(8.5%)であった。

E. faecalis/faecium

薬剤耐性株は供試した 13 薬剤のうち 10 薬剤に認められ、耐性率は 0.9%(ABPC) ~39.6%(KM)であった。DSM では 64 μ g/ml および >512 μ g/ml、OTC では 0.5 μ g/ml および 64 μ g/ml、EM では 2 μ g/ml および >128 μ g/ml、LCM では 1 μ g/ml および 32 μ g/ml、TS では 2 μ g/ml および >256 μ g/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1~4、6 および 7 薬剤耐性の 18 パターンに分類され、7 薬剤耐性が 3 株、6 薬剤耐性が 3 株、4 薬剤耐性が 2 株、3 薬剤耐性が 5 株、2 薬剤耐性が 28 株、1 薬剤耐性が 23 株、感受性株が 42 株であった。耐性株の内訳については、KM-EM の 2 薬剤耐性が 19 株(17.9%)で最も多く、次いで KM の 1 薬剤耐性が 10 株(9.4%)、OTC の 1 薬剤耐性が 6 株(5.7%)であった。

表24 腸球菌の薬剤感受性試験 (牛ひき肉)

薬剤名	種	菌株数	Range (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (µg/ml)
ABPC	<i>E. faecalis</i>	47	0.5-1	1	1	0	0	16
	<i>E. faecium</i>	59	≦0.12-32	1	2	1	1.7	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	≦0.12-32	1	2	1	0.9	
DSM	<i>E. faecalis</i>	47	16->512	64	256	12	25.5	128
	<i>E. faecium</i>	59	16->512	32	64	4	6.8	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	16->512	64	128	16	15.1	
GM	<i>E. faecalis</i>	47	4-16	8	16	0	0	32
	<i>E. faecium</i>	59	2-32	8	16	2	3.4	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	2-32	8	16	2	1.9	
KM	<i>E. faecalis</i>	47	16->512	32	128	5	10.6	128
	<i>E. faecium</i>	59	16->512	128	512	38	64.4	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	16->512	64	512	42	39.6	
OTC	<i>E. faecalis</i>	47	≦0.12->64	1	64	13	27.7	16
	<i>E. faecium</i>	59	0.25->64	0.5	64	11	18.6	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	≦0.12->64	1	64	24	22.6	
CP	<i>E. faecalis</i>	47	2-64	8	8	1	2.1	32
	<i>E. faecium</i>	59	4-32	8	8	1	1.7	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	2-64	8	8	2	1.9	
BC	<i>E. faecalis</i>	47	32->512	128	512	-	-	-
	<i>E. faecium</i>	59	16->512	256	512	-	-	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	16->512	256	512	-	-	
EM	<i>E. faecalis</i>	47	≦0.12->128	2	4	4	8.5	8
	<i>E. faecium</i>	59	≦0.12->128	4	16	28	47.5	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	≦0.12->128	2	8	32	30.2	
LCM	<i>E. faecalis</i>	47	≦0.12->256	32	256	5	10.6	128
	<i>E. faecium</i>	59	0.5->256	16	64	4	6.8	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	≦0.12->256	32	64	9	8.5	
ERFX	<i>E. faecalis</i>	47	0.5-1	1	1	0	0	4
	<i>E. faecium</i>	59	0.25-8	1	4	6	10.2	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	0.25-8	1	2	6	5.7	
TS	<i>E. faecalis</i>	47	1->256	2	4	4	8.5	64
	<i>E. faecium</i>	59	1->256	4	16	3	5.1	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	1->256	4	8	7	6.6	
SNM	<i>E. faecalis</i>	47	0.5-2	1	2	-	-	-
	<i>E. faecium</i>	59	0.5-8	2	2	-	-	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	0.5-8	2	2	-	-	
VGM	<i>E. faecalis</i>	47	0.25-16	8	8	-	-	-
	<i>E. faecium</i>	59	0.5-8	2	2	-	-	
	<i>E. faecalis/faecium</i>	106	0.25-16	2	8	-	-	

表25 腸球菌のMIC分布 (牛ひき肉)

種	菌株数	薬剤名	No. of strains with MIC (µg/ml)															
			≦0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512		
<i>E. faecalis</i>	47	ABPC			16	31												
		DSM								1	10	24	7				5	
		GM							9	25	13							
		KM									7	20	14	2	1		3	
		OTC	2	2	12	18						4	7					2(>64)
		CP					1	5	39	1		1						
		BC										2	4	18	16	3	4	
		EM	1	3	2	10	23	4										4(>128)
		LCM	1		1	5	1					21	13		1			4(>256)
		ERFX				16	31											
		TS				2	23	18										4(>256)
		SNM			6	23	18											
		VGM		3	5	1	1	1	35	1								

表26 腸球菌のMIC分布 (牛ひき肉)

種	菌株数	薬剤名	No. of strains with MIC (μg/ml)														
			≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512	
<i>E. faecium</i>	59	ABPC	2	10	8	18	20				1						
		DSM	-							5	31	19	1				3
		GM	-				2	22	26	7	2						
		KM	-							1	9	11	16	12	6	4	
		OTC	-	3	33	7	5				3	6					2(>128)
		CP	-					9	48	1	1						
		BC	-							1		8	4	27	15	4	
		EM	1	5	1	1	11	12		22	3						3(>128)
		LCM	-		2	4				3	26	18	2				4(>256)
		ERFX	-	1	4	34	14		4	2							
		TS	-		1	18	16	18	3								3(>256)
		SNM	-	1	14	43			1								
VGM	-		6	5	43	1	4										

表27 腸球菌のMIC分布 (牛ひき肉)

種	菌株数	薬剤名	No. of strains with MIC (μg/ml)													
			≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512
<i>E. faecalis faecium</i>	106	ABPC	2	10	24	49	20				1					
		DSM	-							6	41	43	8			8
		GM	-				2	31	51	20	2					
		KM	-							8	29	25	18	13	6	7
		OTC	2	5	45	25	5				7	13				4(>128)
		CP	-				1	14	87	2	1	1				
		BC	-							1	2	12	22	43	18	8
		EM	2	8	3	11	34	16		22	3					7(>128)
		LCM	1		3	9	1		3	26	39	15		1		8(>256)
		ERFX	-	1	20	65	14		4	2						
		TS	-		3	41	34	18	3							7(>256)
		SNM	-		7	37	61		1							
VGM	-	3	11	6	44	2	39	1								

表28 腸球菌の薬剤耐性パターン (牛ひき肉)

種	菌株数	感受性菌株数	耐性菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳																	
					1薬剤耐性				2薬剤耐性				3薬剤耐性	4薬剤耐性	6薬剤耐性	7薬剤耐性						
					OTC	DSM	KM	ERFX	DSM-OTC	DSM-KM	KM-LCM	KM-EM	KM-ERFX	OTC-EM	OTC-LCM	KM-OTC-EM	DSM-KM-OTC-CP	OTC-EM-LCM-TS	DSM-KM-OTC-EM-LCM-TS	ABPC-DSM-KM-EM-LCM-ERFX-TS	DSM-KM-OTC-CP-EM-LCM-TS	DSM-KM-OTC-EM-LCM-ERFX-TS
<i>E. faecalis</i>	47	29	18	38.3	4	3	-	-	4	1	1	-	-	-	-	-	1	1	3	-	-	-
<i>E. faecium</i>	59	13	46	78.0	2	1	10	3	-	-	-	19	1	1	1	5	-	-	-	1	1	1
<i>E. faecalis faecalis</i>	106	42	64	60.4	6	4	10	3	4	1	1	19	1	1	1	5	1	1	3	1	1	1

2)豚ひき肉由来株の MIC と耐性出現頻度

①サルモネラ属菌

豚ひき肉から分離されたサルモネラ属菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 29、MIC 分布を表 30、薬剤耐性パターンを表 31-1、表 31-2 に示した。

薬剤耐性株は供試した 12 薬剤のうち 6 薬剤に認められ、耐性率は 15.4%(ST)～40.0%(SM)であった。ABPC では ≤1μg/ml および >128μg/ml、KM では 2μg/ml および >128μg/ml、TC では ≤0.5μg/ml および 32μg/ml、CP では 2μg/ml および 32μg/ml、ST 合剤では ≤2.38/0.12μg/ml および >152/8μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1～4 薬剤耐性の 11 パターンに分類され、4 薬剤耐性が 13 株、3 薬剤耐性が 15 株、2 薬剤耐性が 2 株、1 薬剤耐性が 6 株、感受性株が 29 株であった。耐性株の内訳については、KM の 1 薬剤耐性、ABPC-SM-TC および SM-KM-TC の 3 薬剤耐性、SM-KM-TC-CP の 4 薬剤耐性が各 5 株(7.7%)で最も多かった。薬剤耐性パターンを血清型毎に見ると、いずれかの薬剤に耐性を示したのは、*S. Infantis* および *Salmonella* spp. が 20%、*S. Schwarzengrund*、*S. Typhimurium*、*S. Blockly* および *S. Rissen* が 100%で、*S. Derby* はすべて感受性であった。

表29 サルモネラ属菌の薬剤感受性試験 (豚ひき肉)

薬剤名	菌株数	Range (μg/ml)	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (μg/ml)
ABPC	65	≤1->128	≤1	>128	13	20.0	32
CEZ	65	≤1-4	≤1	2	0	0	32
CTX	65	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0	0	4
SM	65	4->64	16	64	26	40.0	32
GM	65	≤0.5-1	≤0.5	≤0.5	0	0	16
KM	65	≤1->128	2	>128	20	30.8	64
TC	65	≤0.5-64	≤0.5	32	22	33.8	16
CP	65	≤1-128	2	64	13	20.0	32
CL	65	≤0.12-1	0.5	1	0	0	16
NA	65	≤1-2	2	2	0	0	32
CPFEX	65	≤0.03	≤0.03	≤0.03	0	0	4
ST	65	≤2.38/0.12->152/8	≤2.38/0.12	>152/8	10	15.4	76/4

表30 サルモネラ属菌のMIC分布 (豚ひき肉)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (μg/ml)													
		≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
ABPC	65	-	-	-	-	-	52(≤1)	-	-	-	-	-	-	-	13
CEZ	65	-	-	-	-	-	57(≤1)	5	3	-	-	-	-	-	-
CTX	65	-	-	-	-	60(≤0.5)	-	-	-	5	24	10	11	12	3(>64)
SM	65	-	-	-	-	63(≤0.5)	2	-	-	-	-	-	-	-	-
GM	65	-	-	-	-	63(≤0.5)	2	-	-	-	-	-	-	-	-
KM	65	-	-	-	-	-	17(≤1)	26	2	-	-	-	-	-	20
TC	65	-	-	-	-	38(≤0.5)	2	-	-	1	22	2	-	-	-
CP	65	-	-	-	-	-	5(≤1)	34	13	-	5	3	5	-	-
CL	65	-	-	7(≤0.12)	6	42	10	-	-	-	-	-	-	-	-
NA	65	-	-	-	-	-	9(≤1)	56	-	-	-	-	-	-	-
CPFEX	65	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (μg/ml)						
		≤2.38/0.12	4.75/0.25	9.5/0.5	19/1	38/2	76/4	152/8
ST	65	45	6	2	1	1	-	10

表31-1 サルモネラ属菌の薬剤耐性パターン (豚ひき肉)

菌株数	感受性 菌株数	耐性 菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳										
				1薬剤耐性		2薬剤耐性	3薬剤耐性			4薬剤耐性				
				KM	SM	SM-TC	ABPC-SM-TC	SM-KM-TC	KM-TC-ST	ABPC-CP-ST	SM-KM-TC-CP	ABPC-SM-CP-ST	ABPC-SM-TC-CP	SM-KM-TC-ST
65	29	36	55.4	5	1	2	5	5	3	2	5	3	3	2

表31-2 サルモネラ属菌の薬剤耐性パターン (豚ひき肉, 血清型別)

血清型	菌株数	薬剤耐性パターン	菌株数	割合 (%)
<i>S. Infantis</i>	25	Susceptible	20	80.0
		SM-KM-TC	5	20.0
<i>S. Schwarzengrund</i>	10	KM	5	50.0
		KM-TC-ST	3	30.0
		SM-KM-TC-ST	2	20.0
		SM-TC	2	20.0
<i>S. Typhimurium</i>	10	ABPC-CP-ST	2	20.0
		ABPC-SM-CP-ST	3	30.0
		ABPC-SM-TC-CP	3	30.0
		SM-KM-TC-CP	5	100
<i>S. Derby</i>	5	Susceptible	5	100
<i>S. Rissen</i>	5	ABPC-SM-TC	5	100
<i>Salmonella</i> spp.	5	Susceptible	4	80.0
		SM	1	20.0

②大腸菌

豚ひき肉から分離された大腸菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 32、MIC 分布を表 33、薬剤耐性パターンを表 34 に示した。

薬剤耐性菌は供試した 12 薬剤中 9 薬剤に認められ、耐性率は 1.4%(GM、CPFX) ~45.2%(TC)であった。ABPC では 2μg/ml および>128μg/ml、SM では 4μg/ml および>64μg/ml、KM では 2μg/ml および>128μg/ml、TC では ≤0.5μg/ml および 32μg/ml、CP では 2μg/ml および 64μg/ml、ST 合剤では ≤2.38/0.12μg/ml および>152/8μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1~5 および 7 薬剤耐性の 23 パターンに分類され、7 薬剤耐性が 1 株、5 薬剤耐性が 3 株、4 薬剤耐性が 7 株、3 薬剤耐性が 8 株、2 薬剤耐性が 11 株、1 薬剤耐性が 12 株、感受性株が 31 株であった。耐性株の内訳については、TC の 1 薬剤耐性が 8 株(11.0%)で最も多く、次いで ABPC-SM-TC の 3 薬剤耐性が 5 株(6.8%)、SM-TC の 2 薬剤耐性が 4 株(5.5%)であった。

表32 大腸菌の薬剤感受性試験(豚ひき肉)

薬剤名	菌株数	Range (μg/ml)	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (μg/ml)
ABPC	73	≤1->128	2	>128	18	24.7	32
CEZ	73	≤1-4	≤1	2	0	0	32
CTX	73	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0	0	4
SM	73	2->64	4	>64	22	30.1	32
GM	73	≤0.5-32	≤0.5	≤0.5	1	1.4	16
KM	73	≤1->128	2	4	6	8.2	64
TC	73	≤0.5->64	1	64	33	45.2	16
CP	73	≤1-128	2	64	12	16.4	32
CL	73	≤0.12-1	0.5	1	0	0	16
NA	73	≤1->128	2	4	3	4.1	32
CPFX	73	≤0.03->4	≤0.03	≤0.03	1	1.4	4
ST	73	≤2.38/0.12->152/8	≤2.38/0.12	>152/8	14	19.2	76/4

表33 大腸菌のMIC分布(豚ひき肉)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (μg/ml)													
		≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
ABPC	73	-	-	-	-	-	25(≤1)	30	-	-	-	1	2	3	12
CEZ	73	-	-	-	-	-	63(≤1)	8	2	-	-	-	-	-	-
CTX	73	-	-	-	-	73(≤0.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM	73	-	-	-	-	-	6	34	7	4	6	7	-	9(>64)	
GM	73	-	-	-	-	66(≤0.5)	6	-	-	1	-	-	-	-	
KM	73	-	-	-	-	13(≤1)	45	9	-	-	-	-	1	5	
TC	73	-	-	-	-	34(≤0.5)	4	1	1	4	16	12	-	1(>64)	
CP	73	-	-	-	-	3(≤1)	51	4	-	3	-	6	6	-	
CL	73	-	-	20(≤0.12)	8	32	13	-	-	-	-	-	-	-	
NA	73	-	-	-	-	31(≤1)	34	1	2	2	-	1	-	2	
CPFX	73	66	-	2	3	1	-	-	-	-	-	-	-	1(>4)	

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (μg/ml)							
		≤2.38/0.12	4.75/0.25	9.5/0.5	19/1	38/2	76/4	152/8	>152/8
ST	73	56	1	-	2	-	-	-	14

表34 大腸菌の薬剤耐性パターン(豚ひき肉)

菌株数	感受性 菌株数	耐性 菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳																							
				1薬剤耐性			2薬剤耐性						3薬剤耐性			4薬剤耐性				5薬剤耐性		7薬剤耐性					
				TC	SM	ST	SM-TC	KM-TC	ABPC-SM	ABPC-ST	KM-CP	TC-CP	TC-ST	ABPC-SM-TC	ABPC-TC-ST	SM-KM-TC	ABPC-SM-TC-CP-ST	ABPC-SM-KM-TC	ABPC-SM-TC-CP	ABPC-TC-CP-ST	SM-KM-TC-CP	SM-TC-CP-ST	ABPC-SM-GM-CP-ST	ABPC-SM-CP-NA-ST	ABPC-TC-CP-NA-ST	ABPC-SM-TC-CP-NA-ERFX-ST	
73	31	42	57.5	8	2	2	4	2	1	1	1	1	1	5	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

③腸球菌

豚ひき肉から分離された腸球菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 35、MIC 分布を表 36～38、薬剤耐性パターンを表 39 に示した。

E. faecalis

薬剤耐性株は供試した 13 薬剤のうち 9 薬剤に認められ、耐性率は 6.9%(GM)～34.7%(OTC)であった。DSM では 64μg/ml および>512μg/ml、GM では 8μg/ml および>256μg/ml、OTC では 0.5μg/ml および>64μg/ml、EM では 2μg/ml および>128μg/ml、LCM では 32μg/ml および>256μg/ml、TS では 2μg/ml および>256μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1～8 薬剤耐性の 23 パターンに分類され、8 薬剤耐性が 3 株、7 薬剤耐性が 3 株、6 薬剤耐性が 4 株、5 薬剤耐性が 1 株、4 薬剤耐性が 2 株、3 薬剤耐性が 1 株、2 薬剤耐性が 10 株、1 薬剤耐性が 20 株、感受性株が 28 株であった。耐性株の内訳については、KM の 1 薬剤耐性が 7 株(9.7%)で最も多く、次いで OTC の 1 薬剤耐性および DSM-OTC の 2 薬剤耐性が 4 株(5.6%)であった。

E. faecium

薬剤耐性株は供試した 13 薬剤のうち 9 薬剤に認められ、耐性率は 3.0%(GM)～45.5%(OTC)であった。DSM では 32μg/ml および>512μg/ml、KM では 32μg/ml および>512μg/ml、OTC では 0.5μg/ml および>64μg/ml、EM では 2μg/ml および>128μg/ml、LCM では 32μg/ml および>256μg/ml、TS では 4μg/ml および>256μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1～3 および 6～8 薬剤耐性の 14 パターンに分類され、8 薬剤耐性が 1 株、7 薬剤耐性が 2 株、6 薬剤耐性が 2 株、3 薬剤耐性が 4 株、2 薬剤耐性が 4 株、1 薬剤耐性が 9 株、感受性株が 11 株であった。耐性株の内訳については、OTC および DSM の 1 薬剤耐性が 3 株(9.1%)で最も多かった。

E. faecalis/faecium

薬剤耐性株は供試した 13 薬剤のうち 9 薬剤に認められ、耐性率は 5.7%(GM)～

38.1%(OTC)であった。DSM では 32 μ g/ml および>512 μ g/ml、GM では 8 μ g/ml および>256 μ g/ml、KM では 64 μ g/ml および>512 μ g/ml、OTC では 0.5 μ g/ml および>64 μ g/ml、EM では 2 μ g/ml および>128 μ g/ml、LCM では 32 μ g/ml および>256 μ g/ml、TS では 2 μ g/ml および>256 μ g/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンについては、1~8 薬剤耐性の 27 パターンに分類され、8 薬剤耐性が 4 株、7 薬剤耐性が 5 株、6 薬剤耐性が 6 株、5 薬剤耐性が 1 株、4 薬剤耐性が 2 株、3 薬剤耐性が 5 株、2 薬剤耐性が 14 株、1 薬剤耐性が 29 株、感受性株が 39 株であった。耐性株の内訳については、KM および OTC の 1 薬剤耐性が 7 株(6.7%)で最も多く、次いで DSM の 1 薬剤耐性および DSM-OTC の 2 薬剤耐性が各 6 株(5.7%)であった。

表35 腸球菌の薬剤感受性試験 (豚ひき肉)

薬剤名	種	菌株数	Range (μ g/ml)	MIC ₅₀ (μ g/ml)	MIC ₉₀ (μ g/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (μ g/ml)
ABPC	<i>E. faecalis</i>	72	\leq 0.12-8	1	2	0	0	
	<i>E. faecium</i>	33	0.5-4	1	2	0	0	16
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	\leq 0.12-8	1	2	0	0	
DSM	<i>E. faecalis</i>	72	16->512	64	>512	18	25.0	
	<i>E. faecium</i>	33	16->512	64	>512	12	36.4	128
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	16->512	64	>512	30	28.6	
GM	<i>E. faecalis</i>	72	2->256	8	16	5	6.9	
	<i>E. faecium</i>	33	2->256	8	16	1	3.0	32
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	2->256	8	16	6	5.7	
KM	<i>E. faecalis</i>	72	16->512	64	>512	21	29.2	
	<i>E. faecium</i>	33	8->512	64	>512	8	24.2	128
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	8->512	64	>512	29	27.6	
OTC	<i>E. faecalis</i>	72	0.25->64	1	>64	25	34.7	
	<i>E. faecium</i>	33	0.25->64	1	>64	15	45.5	16
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	0.25->64	1	>64	40	38.1	
CP	<i>E. faecalis</i>	72	4-128	8	16	6	8.3	
	<i>E. faecium</i>	33	4-128	8	32	4	12.1	32
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	4-128	8	16	10	9.5	
BC	<i>E. faecalis</i>	72	8->512	256	512	-	-	-
	<i>E. faecium</i>	33	8-512	256	512	-	-	-
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	8->512	256	512	-	-	-
EM	<i>E. faecalis</i>	72	0.25->128	2	>128	17	23.6	
	<i>E. faecium</i>	33	0.25->128	2	>128	7	21.2	8
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	0.25->128	2	>128	24	22.9	
LCM	<i>E. faecalis</i>	72	0.5->256	32	>256	16	22.2	
	<i>E. faecium</i>	33	0.5->256	32	>256	8	24.2	128
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	0.5->256	32	>256	24	22.9	
ERFX	<i>E. faecalis</i>	72	0.25-16	1	2	7	9.7	
	<i>E. faecium</i>	33	0.25-8	1	2	3	9.1	4
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	0.25-16	1	2	10	9.5	
TS	<i>E. faecalis</i>	72	1->256	4	>256	10	13.9	
	<i>E. faecium</i>	33	2->256	4	>256	5	15.2	64
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	1->256	4	>256	15	14.3	
SNM	<i>E. faecalis</i>	72	0.5-4	1	2	-	-	-
	<i>E. faecium</i>	33	1-8	1	2	-	-	-
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	0.5-8	1	2	-	-	-
VGM	<i>E. faecalis</i>	72	0.25-16	8	8	-	-	-
	<i>E. faecium</i>	33	0.25-16	8	8	-	-	-
	<i>E. faecalis/faecium</i>	105	0.25-16	8	8	-	-	-

表36 腸球菌のMIC分布 (豚ひき肉)

種	菌株数	薬剤名	No. of strains with MIC (μg/ml)														
			≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512	
<i>E. faecalis</i>	72	ABPC	1	2	16	42	8	2	1								
		DSM	-							2	25	27	4				14
		GM					2	20	27	18			1				4(>256)
		KM	-							10	16	25	10	2	1		8
		OTC		5	26	14				2	1	6	6				12(>64)
		CP	-					10	54	2		2	1	3			
		BC	-						1		3	9	19	32	5		3
		EM		9	1	15	23	7	6	1		1					9(>128)
		LCM			3	4	1		3	6	29	10	1	2			13(>256)
		ERFX		2	22	32	9	3	3	1							
		TS				2	28	24	6	2							10(>256)
		SNM			10	31	30	1									
		VGM		2	5	1	20	7	36	1							

表37 腸球菌のMIC分布 (豚ひき肉)

種	菌株数	薬剤名	No. of strains with MIC (μg/ml)														
			≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512	
<i>E. faecium</i>	33	ABPC			10	17	5	1									
		DSM	-							3	11	7	6				6
		GM					3	7	10	12							1(>256)
		KM	-						1	2	12	10	3				5
		OTC		2	11	4	1			1	4	4					6(>64)
		CP	-					5	24			1	1	2			
		BC	-						1		4	1	7	15	5		
		EM		5	2	5	12	2	2								5(>128)
		LCM			2	1			1	3	12	6		1			7(>256)
		ERFX		1	9	18	2	2	1								
		TS					11	12	5								5(>256)
		SNM				17	15		1								
		VGM		2	1		10	1	16	3							

表38 腸球菌のMIC分布 (豚ひき肉)

種	菌株数	薬剤名	No. of strains with MIC (μg/ml)														
			≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512	
<i>E. faecalis faecium</i>	105	ABPC	1	2	26	59	13	3	1								
		DSM	-							5	36	34	10				20
		GM					5	27	37	30			1				5(>256)
		KM	-						1	12	28	35	13	2	1		13
		OTC		7	37	18	1		2	2	10	10					18(>64)
		CP	-					15	78	2		3	2	5			
		BC	-						2		7	10	26	47	10		3
		EM		14	3	20	35	9	8	1		1					14(>128)
		LCM			5	5	1		4	9	41	16	1	3			20(>256)
		ERFX		3	31	50	11	5	4	1							
		TS				2	39	36	11	2							15(>256)
		SNM			10	48	45	1	1								
		VGM		4	6	1	30	8	52	4							

表39 腸球菌の薬剤耐性パターン(豚ひき肉)

種	菌株数	感受性 菌株数	耐性 菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳																										
					1薬剤耐性				2薬剤耐性				3薬剤耐性			4薬剤耐性	5薬剤耐性	6薬剤耐性		7薬剤耐性	8薬剤耐性										
					KM	OTC	DSM	EM	ERFX	LCM	DSM-OTC	KM-EM	KM-ERFX	KM-OTC	OTC-EM	OTC-LCM	OTC-ERFX	KM-OTC-LCM	DSM-KM-OTC	KM-OTC-EM	OTC-LCM-ERFX	OTC-EM-LCM-TS	DSM-OTC-LCM-ERFX	DSM-KM-OTC-EM-LCM	DSM-OTC-CP-EM-LCM-ERFX	DSM-OTC-CP-EM-LCM-TS	KM-OTC-EM-LCM-ERFX-TS	DSM-KM-OTC-EM-LCM-TS	DSM-GM-KM-OTC-EM-LCM-TS	DSM-KM-OTC-CP-EM-LCM-TS	DSM-GM-KM-OTC-CP-EM-LCM-TS
<i>E. faecalis</i>	72	28	44	61.1	7	4	3	2	2	2	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3			
<i>E. faecium</i>	33	11	22	66.7	-	3	3	-	2	1	2	1	-	-	1	-	-	2	1	1	-	-	-	-	1	-	1	-	2	1	
<i>E. faecalis</i> <i>/faecalis</i>	105	39	66	62.9	7	7	6	2	4	3	6	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	3	4

3)クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地由来大腸菌の MIC と耐性出現頻度

①牛ひき肉分離株

牛ひき肉から分離された大腸菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 40、MIC 分布を表 41、薬剤耐性パターンを表 42 に示した。薬剤耐性株は供試した 12 薬剤中 11 薬剤に認められ、耐性率は 40.0%(KM、CPFX)～100%(ABPC、TC)であった。薬剤耐性パターンについては、4、7 および 9 薬剤耐性の 4 パターンに分類され、9 薬剤耐性が 2 株、7 薬剤耐性が 1 株、4 薬剤耐性が 2 株であった。

②豚ひき肉分離株

豚ひき肉から分離された大腸菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 43、MIC 分布を表 44、薬剤耐性パターンを表 45 に示した。薬剤耐性株は供試した 12 薬剤中 11 薬剤に認められ、耐性率は 20.0%(GM)～93.3%(ABPC)であった。薬剤耐性パターンについては、3、4、6～10 薬剤耐性の 14 パターンに分類され、10 薬剤耐性が 2 株、9 薬剤耐性が 1 株、8 薬剤耐性が 2 株、7 薬剤耐性が 1 株、6 薬剤耐性が 2 株、4 薬剤耐性が 3 株、3 薬剤耐性が 4 株であった。

③牛・豚ひき肉分離株

牛ひき肉および豚ひき肉から分離された大腸菌の Range、MIC₅₀、MIC₉₀、耐性菌株数および耐性率を表 46、MIC 分布を表 47、薬剤耐性パターンを表 48 に示した。薬剤耐性株は供試した 12 薬剤中 11 薬剤に認められ、耐性率は 15.0%(GM)～95.0%(ABPC)であった。薬剤耐性パターンについては、3、4、6～10 薬剤耐性の 18 パターンに分類され、10 薬剤耐性が 2 株、9 薬剤耐性が 3 株、8 薬剤耐性が 2 株、7 薬剤耐性が 2 株、6 薬剤耐性が 2 株、4 薬剤耐性が 5 株、3 薬剤耐性が 4 株であった。

表40 ESBL産生大腸菌の薬剤感受性試験 (牛ひき肉)

薬剤名	菌株数	Range (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (µg/ml)
ABPC	5	>128	>128	>128	5	100.0	32
CEZ	5	16->128	>128	>128	4	80.0	32
CTX	5	≤0.5->64	32	>64	3	60.0	4
SM	5	4->64	32	>64	3	60.0	32
GM	5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0	0	16
KM	5	2->128	2	128	2	40.0	64
TC	5	32-64	32	64	5	100.0	16
CP	5	2-64	2	64	2	40.0	32
CL	5	≤0.12-1	0.25	1	0	0	16
NA	5	≤1->128	128	>128	4	80.0	32
CPFX	5	≤0.03-4	0.5	4	2	40.0	4
ST	5	≤2.38/0.12->152/8	>152/8	>152/8	3	60.0	76/4

表41 ESBL産生大腸菌のMIC分布 (牛ひき肉)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (µg/ml)													
		≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
ABPC	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
CEZ	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	3
CTX	5	-	-	-	-	2(≤0.5)	-	-	-	-	1	1	-	-	2(>64)
SM	5	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	2(>64)
GM	5	-	-	-	-	5(≤0.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KM	5	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	1	-
TC	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-
CP	5	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	2	-	-	-
CL	5	-	-	2(≤0.12)	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
NA	5	-	-	-	-	-	1(≤1)	-	-	-	-	-	-	2	2
CPFX	5	1	-	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (µg/ml)						
		≤2.38/0.12	4.75/0.25	9.5/0.5	19/1	38/2	76/4	152/8
ST	5	1	-	-	-	1	-	3

表42 ESBL産生大腸菌の薬剤耐性パターン (牛ひき肉)

菌株数	感受性 菌株数	耐性 菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳			
				4薬剤耐性		7薬剤耐性	9薬剤耐性
5	0	5	100.0	ABPC-CEZ-TC-ST 1	ABPC-KM-TC-NA 1	ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-TC-NA 1	ABPC-CEZ-CTX-SM-TC-CP-NA-CPFX-ST 2

表43 ESBL産生大腸菌の薬剤感受性試験 (豚ひき肉)

薬剤名	菌株数	Range (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)	ブレイクポイント (µg/ml)
ABPC	15	4->128	>128	>128	14	93.3	32
CEZ	15	≦1->128	128	>128	11	73.3	32
CTX	15	≦0.5->64	16	>64	8	53.3	4
SM	15	2->64	64	>64	9	60.0	32
GM	15	≦0.5-32	≦0.5	32	3	20.0	16
KM	15	≦1->128	>128	>128	8	53.3	64
TC	15	≦0.5-64	64	64	12	80.0	16
CP	15	≦1-128	2	128	6	40.0	32
CL	15	≦0.12-2	0.25	2	0	0	16
NA	15	≦1->128	4	>128	7	46.7	32
CPFEX	15	≦0.03->4	0.12	4	4	26.7	4
ST	15	≦2.38/0.12->152/8	≦2.38/0.12	>152/8	6	40.0	76/4

表44 ESBL産生大腸菌のMIC分布 (豚ひき肉)

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (µg/ml)													
		≦0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
ABPC	15	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	13
CEZ	15	-	-	-	-	-	1(≦1)	-	-	3	2	-	3	6	-
CTX	15	-	-	-	-	1(≦0.5)	2	4	-	1	4	-	-	3(>64)	-
SM	15	-	-	-	-	-	-	2	2	2	1	1	-	7(>64)	-
GM	15	-	-	-	-	11(≦0.5)	1	-	-	1	2	-	-	-	-
KM	15	-	-	-	-	-	1(≦1)	6	-	-	-	-	-	8	-
TC	15	-	-	-	-	3(≦0.5)	-	-	-	1	3	8	-	-	-
CP	15	-	-	-	-	-	1(≦1)	8	-	-	3	1	2	-	-
CL	15	-	-	5(≦0.12)	4	4	-	2	-	-	-	-	-	-	-
NA	15	-	-	-	-	-	3(≦1)	3	2	-	-	1	-	6	-
CPFEX	15	6	1	1	1	1	1	-	-	3	-	-	-	1(>4)	-

薬剤名	菌株数	No. of strains with MIC (µg/ml)							
		≦2.38/0.12	4.75/0.25	9.5/0.5	19/1	38/2	76/4	152/8	>152/8
ST	15	8	-	-	1	-	-	6	-

表45 ESBL産生大腸菌の薬剤耐性パターン (豚ひき肉)

菌株数	感受性 菌株数	耐性 菌株数	耐性率 (%)	耐性株の内訳							
				3薬剤耐性	4薬剤耐性	6薬剤耐性	7薬剤耐性	8薬剤耐性	9薬剤耐性	10薬剤耐性	
15	0	15	100.0	ABPC-CEZ-CTX SM-KM-TC ABPC-TC-ST	ABPC-CEZ-CTX-TC ABPC-CEZ-NA-CPFEX ABPC-SM-KM-TC	ABPC-SM-KM-TC-NA-ST ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-TC	ABPC-CEZ-SM-TC-CP-NA-ST	ABPC-CEZ-CTX-SM-TC-CP-NA-CPFEX ABPC-CEZ-SM-GM-KM-TC-CP-NA	ABPC-CEZ-CTX-CP-SM-GM-KM-TC-ST	ABPC-CEZ-CTX-GM-KM-TC-CP-NA-CPFEX-ST ABPC-CEZ-CTX-SM-KM-TC-CP-NA-CPFEX-ST	
				2	1	1	1	1	1	1	1

V. 薬剤耐性菌の性状解析

1. 対象菌株の選定

今回の調査において薬剤耐性菌をスクリーニングする目的で使用した酵素基質培地(クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地、クロモアガーVRE スクリーン培地)から分離された菌株および薬剤感受性試験の結果から ESBL 産生が疑われる菌株を対象とした。

2. 試験方法

1)ESBL の確認

クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 分画培地から分離された大腸菌および薬剤感受性試験において CTX 耐性($\geq 4\mu\text{g/ml}$)株については ESBL 産生が疑われるため、MASTDISCSTMID AmpC and Extended Spectrum Beta-Lactamase(ESBL) Detection Discs(Mast 社製)を用いて ESBL の確認試験を行った。

2)ESBL の遺伝子型別

分離された ESBL 産生大腸菌については PCR 法^{1,2}により CTX-M-1、2、9 group、TEM、SHV の ESBL 遺伝子の検出を行った。

3)PFGE 解析

MIC 測定したすべてのサルモネラ属菌、ESBL 産生大腸菌について、以下に示した条件でパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による核型解析を行った。供試菌株のプラグを作成し、制限酵素 *Xba* I で 30℃、5 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% Seakem Gold Agarose、泳動バッファーは $\times 0.5\text{TBE}$ 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 2.2-54.2 秒を 18-19 時間で行った。泳動終了後、Ethidium bromide により染色を行い、GelDox 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 BioNumerics 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

ESBL の確認に使用した試薬を表 49、ESBL の遺伝子型別に使用した機器および試薬を表 50、ESBL 遺伝子検出用プライマーを表 51、PFGE 解析に使用した機器および試薬を表 52 に示した。

¹ Yagi, T., *et al.*: *FEMS Microb. Lett.*, **184**, 53-56, 2000.

² Shibata, N., *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 791-795, 2006.

表49 ESBLの確認に使用した試薬

名称	メーカー名	ロットNo.
MASTDISCSTMID AmpC and Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Detection Discs	MAST	327887
ミューラーヒントン寒天培地	Oxoid	1172314

表50 ESBLの遺伝子型別に使用した機器および試薬一覧

名称	メーカー名	機種番号
サーマルサイクラー	Bio-Rad	T100 Thermal cycler
Nucleo Spin Tissue	TaKaRa	-
10× Ex Taq Buffer	TaKaRa	-
HotStar Taq DNA polymerase	QIAGEN	-
Primer	SIGMA	-

表51 ESBL遺伝子検出用プライマー一覧

プライマー	5'-3'	PCR産物サイズ
TEM-F TEM-R	CCGTGTCGCCCTTATTCC AGGCACCTATCTCAGCGA	824 bp
SHV-F SHV-R	ATTGTCGCTTCTTTACTCGC TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1,051 bp
CTX-M-1 group-F CTX-M-1 group-R	GCTGTTGTTAGGAAGTGTGC CCATTGCCCGAGGTGAAG	516 bp
CTX-M-2 group-F CTX-M-2 group-R	ACGCTACCCCTGCTATTT CCTTTCCGCCTTCTGCTC	779 or 780 bp
CTX-M-9 group-F CTX-M-9 group-R	GCAGATAATACGCAGGTG CGGCGTGGTGGTGTCTCT	393 bp

表52 PFGE解析に使用した機器および試薬一覧

名称	メーカー名	機種番号
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
<i>Xba</i> I	TaKaRa	-
Seakem Gold Agarose	LONZA	-

3.結果および考察

1)ESBL 産生大腸菌の検出状況

クロモアガーオリエンタシオン/ESBL分画培地から分離された大腸菌40株(2株/検体×20検体)(牛ひき肉由来10株、豚ひき肉由来30株)のうち、31株がESBL産生株と推定された。

2)ESBL 遺伝子型別

前項1)において、31株がESBL産生株と推定されたが、確認試験としてクロモアガーオリエンタシオン/ESBL分画培地から分離された大腸菌40株すべてについて遺伝子型を調べた。ESBL産生大腸菌の遺伝子型別を表53に示した。ESBL産生大腸菌39株の遺伝子型は多いものから、TEM+SHV型が9株、CTX-M-1group+TEM型とCTX-M-9groupが各8株、SHV型が7株、CTX-M-1groupが5株、CTX-M-2groupが2株であった。

表53 ESBL産生大腸菌の遺伝子型株数

遺伝子型	株数
CTX-M-1	5
CTX-M-1 + TEM	8
CTX-M-2	2
CTX-M-9	8
SHV	7
TEM + SHV	9

3)PFGE 解析

牛ひき肉および豚ひき肉から分離されたサルモネラ属菌のうち、*S. Infantis* の PFGE による電気泳動図および平均距離法 (UPGMA 法) により作成した系統樹を、図 5 に示した。*S. Infantis* 50 株について系統樹を作成したところ、10 パターン (SI-X-1~10) に区別された。また PFGE パターンが同一であると判断された菌株は、8 パターン存在した。さらに、類似度 96% 以上を同一株として分類すると、5 パターン (SI-1~5) に区別された。同一の検体由来の菌株で同一パターンを示す場合が多かったが、SI-1 (検体番号 B30 および B646 由来株) や SI-5 (B322、P514、P515、P516 および P517) のように、異なる検体由来の菌株で同一のパターンを示す例も存在した。この中で SI-1 については、B30 (7/21 採取) と B646 (10/14 採取) は採取日が異なることから、と畜時や加工時に同じ *S. Infantis* に汚染された可能性は低いと考えられ、PFGE で同一のパターンを示す菌株が散在していると考えられた。一方で、SI-5 については、5 検体 (B322、P514、P515、P516 および P517) すべてが同一店舗かつ採取日も同じであることから、店舗内での交差汚染の可能性が考えられた。

S. Schwarzengrund の PFGE による電気泳動図および系統樹を図 6 に示した。*S. Schwarzengrund* 20 株について系統樹を作成したところ、4 パターン (SS-X-1~4) に区別され、類似度 96% 以上を同一株として分類すると 3 パターン (SS-1、SS-X-3、SS-X-4) に区別された。同一の検体由来の菌株で同一のパターンを示したが、SS-1 (検体番号 P402 および B248 由来株) では、異なる検体由来の菌株で同一のパターンを示した。P402 (8/19 採取) と B248 (8/18 採取) は採取日は近いものの、採取場所が関東および九州と大きく離れており、加工時や店舗で同じ *S. Schwarzengrund* に汚染された可能性は考えにくく、*S. Infantis* の場合と同様に PFGE で同一のパターンを示す菌株が散在していると考えられた。

牛ひき肉および豚ひき肉から分離された ESBL 産生大腸菌の PFGE による電気泳動図および系統樹を、図 7 に示した。本調査の条件で適切な消化断片の得られた 34 株について系統樹を作成したところ、22 パターン(EC-X-1~22)に区別された。また PFGE パターンが同一であると判断された菌株は、11 パターン存在した。さらに、類似度 96% 以上を同一株をして分類すると、EC-X-1 と EC-X-2、EC-X-3 と EC-X-4 がそれぞれ同一である(EC-1 および EC-2)と判断されることから、20 パターンに区別された。サルモネラ属菌の場合と同様に、同一の検体由来の菌株で同一パターンを示す場合が多かったが、EC-1(検体番号 B597 および B598 由来株)では異なる検体由来の菌株であるが、同一のパターンを示した。B597(10/5 採取)と B598(10/5 採取)は採取日が同一であるものの異なる店舗で採取したものであり、と畜時あるいは加工時に同じ ESBL 産生大腸菌に汚染された可能性が考えられた。

次に、PFGE パターンが同一であった *S. Infantis* から作成した系統樹を MIC 値と合わせて図 8 に示した。PFGE パターンと MIC 値の関連性を見ると、同一の PFGE パターンを示した菌株は、MIC 値のパターンも同様である場合が多かった。しかし同一の PFGE パターンである SI-X-2 では、□で囲んだ薬剤(ABPC、CEZ および CTX)で相違が認められたため、さらに詳細な解析が必要と考えられた。

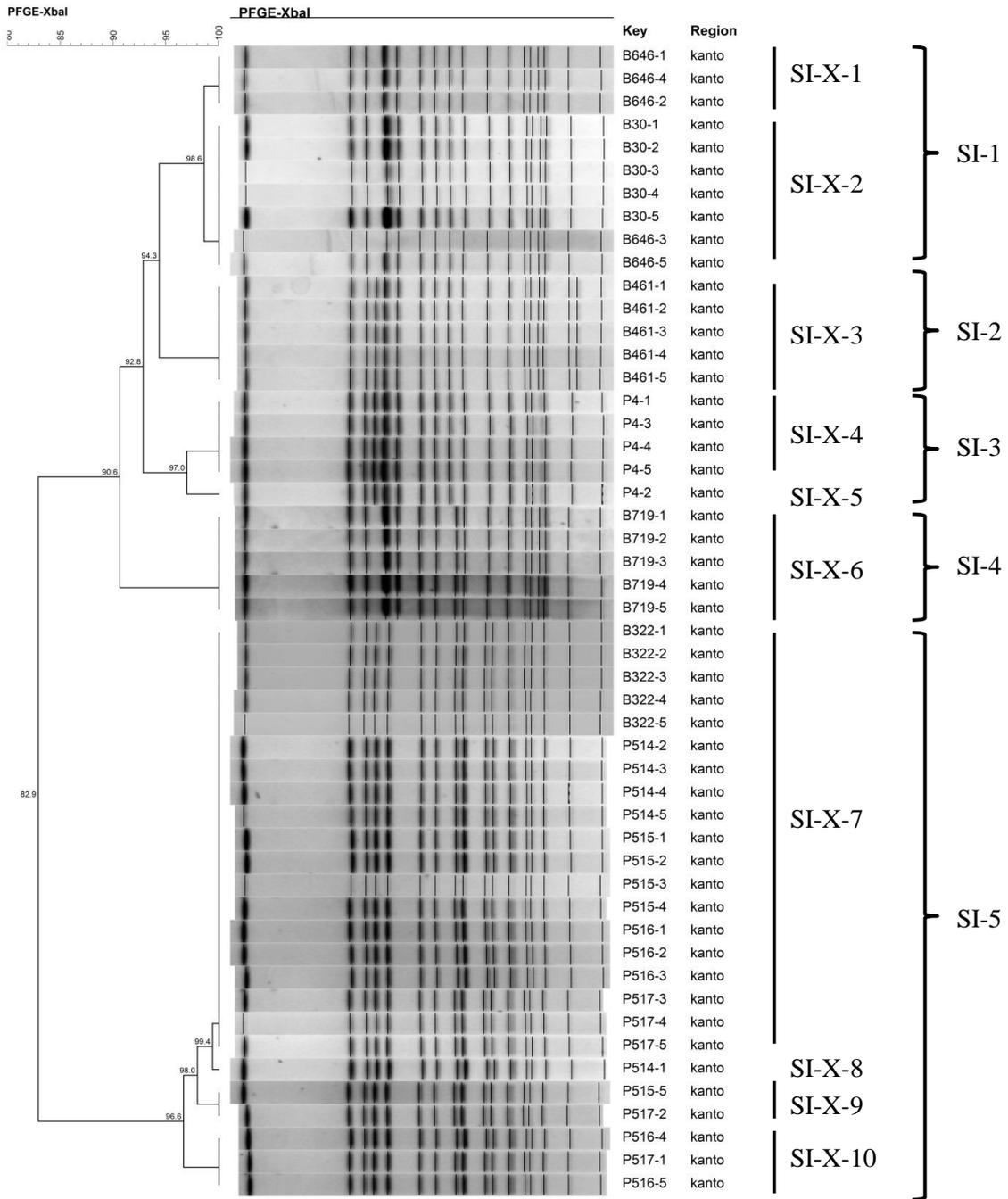


図5 *S. Infantis*のPFGEによる電気泳動図および系統樹

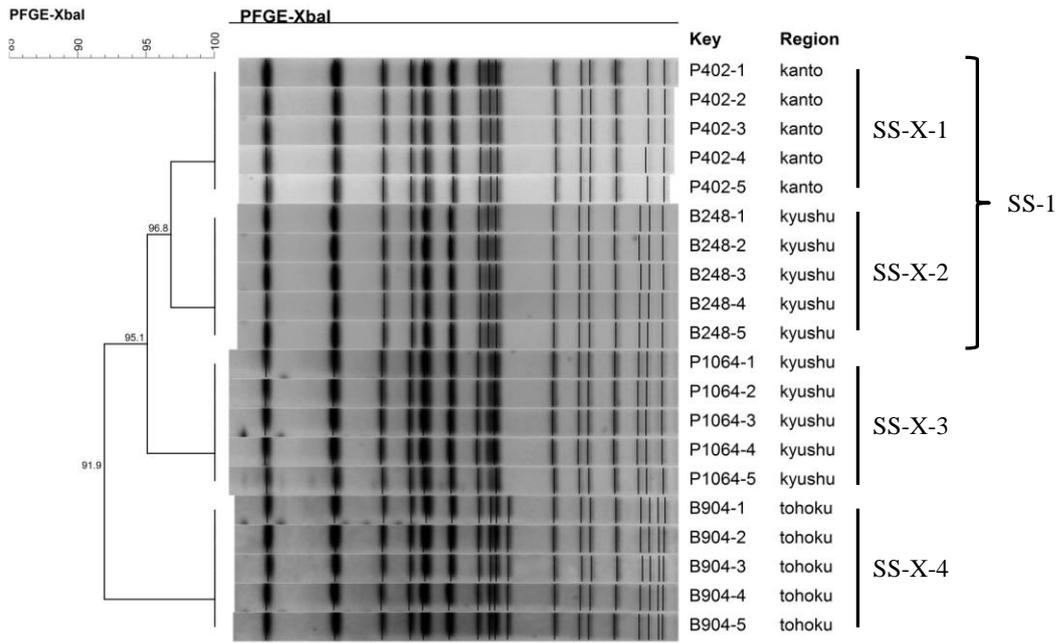


図6 S. SchwarzengrundのPFGEによる電気泳動図および系統樹

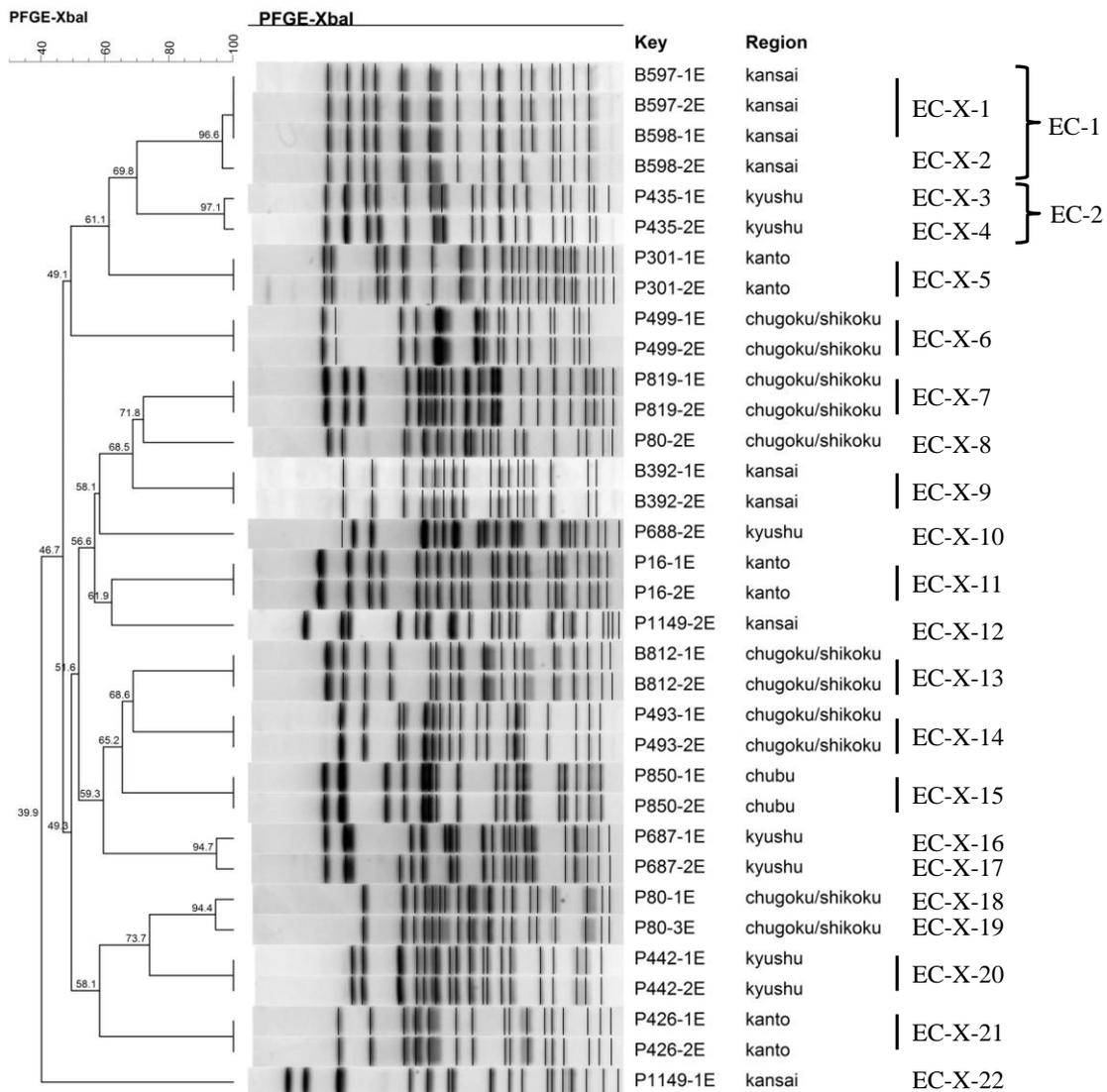


図7 ESBL産生大腸菌のPFGEによる電気泳動図および系統樹

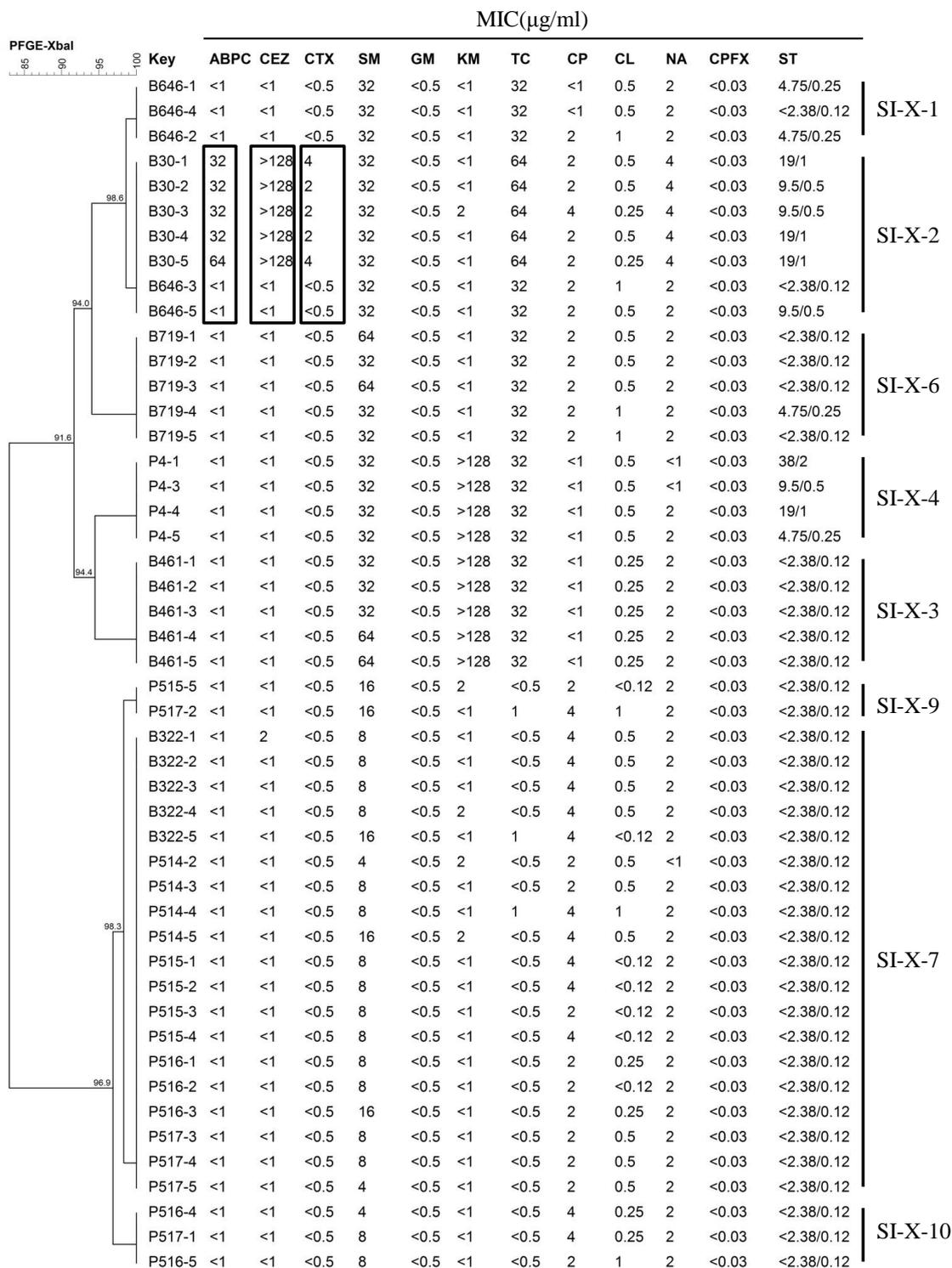


図8 PFGEパターンが同一であった*S. infantis*におけるPFGEによる系統樹およびMIC値

4.分離菌株の保存

本調査で分離され、薬剤感受性試験に供した菌株を-80℃で凍結保存した。
凍結保存した菌株数を表 54 に示した。

表54 凍結保存に供した分離菌株数

菌種	菌株数
サルモネラ属菌	115
大腸菌	127
腸球菌	211
合計	453

以 上