

内 閣 府 食 品 安 全 委 員 会
平成 1 8 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 1 9 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	5
4	結果及び要約	7
1)	試料のサンプリング	7
2)	対象菌の検出試験	8
3)	対象菌の分離菌株の採取	9
III	分離菌の薬剤感受性試験(MICの測定)	12
1	分離菌株の選定	12
1)	牛肉及び豚肉の場合	12
2)	鶏肉の場合	12
3)	分離菌株の保存方法	12
2	測定方法	13
1)	対象薬剤	14
2)	MIC測定試験方法	15
3)	PFGE解析(カンピロバクター)	20
4)	試験に使用した機器・培地	20
3	結果及び考察	21
1)	薬剤感受性試験について	21
2)	PFGE解析(カンピロバクター)について	29
4	薬剤耐性菌株の保存	36

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。

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、豚肉及び鶏肉の3種を対象食品とした。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

牛肉及び豚肉の試料数はそれぞれ200以上、鶏肉の試料数は300以上とした。

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

- ① 大腸菌
- ② 腸球菌及び“バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”
- ③ サルモネラ
- ④ カンピロバクター(*C. jejuni*, *C. coli*)

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 大腸菌

a) 直接分離培養法

試料液0.1ml及び1白金耳量の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。

b) 増菌培養法

試料液1mlをEC培地(10ml)に接種し、44.5℃で22～24時間培養した後、ガス産生の有無を判定した。ガス産生の認められたEC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。

c) 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	－

② 腸球菌及び“バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”

本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、プロトコルに従いバンコマイシン3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

なお、国内の家畜衛生分野におけるモニタリング調査で示されているバンコマイシンのブレイクポイントは32 μ g/mlである。

a) 直接分離培養法

試料液0.1ml及び1白金耳量をEnterococcosel寒天培地(腸球菌用培地：ECA培地)及びバンコマイシンを3 μ g/ml添加したECA培地(VRE用培地：V-ECA培地)にそれぞれ塗抹又は画線塗抹し、35℃で48時間培養した。

b) 増菌培養法

試料液1mlをEnterococcoselブイヨン(10ml)に接種し、35℃で18～24時間培養した。培養液の1白金耳量をECA培地及びV-ECA培地に画線塗抹し、35℃で48時間培養した。

c) 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腸球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-2に示す生化学的性状試験を実施し、腸球菌の同定を行った。表-2 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
ブドウ糖寒天培地	グラム染色	＋
	形態	球菌
	カタラーゼ	－
ACブイヨン	45℃発育試験	＋
6.5%食塩加ブドウ糖ブイヨン	6.5%食塩発育試験	＋
ID580 OBIS PYR試験用キット	Pyrrolidonyl arylamidase (PYR) 試験	＋

d) 菌種の同定試験

腸球菌と同定された分離菌について、Kleinが報告したマンニトール、ソルビトール及びアラビノースの分解試験並びに50℃の発育試験を実施し、*E. faecalis* 及び *E. faecium* の菌種同定を行った(表-3)。

表-3 腸球菌の菌種の同定試験

使用培地	試験項目	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
糖分解試験用培地	マンニトール	+	+
	ソルビトール	+	+又は-
	アラビノース	-	+
Heart Infusion Broth	50℃発育試験	-	+

③ サルモネラ

a) 検出試験

試料液80mlに2倍濃度の緩衝ペプトン水80mlを加え、さらに緩衝ペプトン水を40ml加えて全量を200mlとした後、35℃で18～22時間前培養を行った。次に、前培養液0.5mlをテトラチオン酸塩培地(10ml)及びラパポート・バシリアディス培地(10ml)にそれぞれ接種し、43℃で18～22時間選択増菌培養を行った。選択増菌培養液の1白金耳量をMLCB寒天培地及びクロモアガーサルモネラ寒天培地に画線塗抹し、35℃で18～24時間培養した。

b) 生化学的性状試験

培養後、各寒天培地上にサルモネラ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-4に示す生化学的性状試験を実施し、サルモネラの同定を行った。

なお、サルモネラと同定された菌株についてはO抗原及びH抗原を決定し、血清型別を実施した。

表-4 サルモネラの生化学的性状試験

使用培地	試験項目	サルモネラの性状
TSI培地	糖の分解	斜面: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	-
	運動性	+
SIM培地	IPA反応	-
シモンズのクエン酸塩培地	クエン酸塩利用	+
VP半流動培地	VP反応	+

④ カンピロバクター (*C. jejuni*, *C. coli*)

a) 直接分離培養法

試料液0.1ml及び1白金耳量をmCCDA寒天培地及びSkirrow寒天培地にそれぞれ塗抹又は画線塗抹し、42℃で48時間微好気培養した。

b) 増菌培養法

試料液1mlをPreston培地(10ml)に接種し、42℃で18～22時間微好気培養を行った。培養液の1白金耳量をmCCDA寒天培地及びSkirrow寒天培地に画線塗抹し、42℃で48時間微好気培養した。

c) 生化学的性状及び菌種の同定試験

直接分離培養法及び増菌培養法の各寒天培地上にカンピロバクター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-5に示す生化学的性状試験を実施し、カンピロバクターの同定及び*C. jejuni* 及び*C. coli* の菌種の同定を行った。

表-5 カンピロバクターの生化学的性状及び菌種の同定試験

使用培地	試験項目	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
各寒天分離培地	グラム染色	—	—
	形態	S字状の螺旋	S字状の螺旋
	運動性	コルクスクリュウ様	コルクスクリュウ様
	オキシダーゼ試験	+	+
Mueller Hinton 寒天培地	カタラーゼ試験	+	+
血液寒天培地	25℃発育(微好気)	—	—
	42℃発育(微好気)	+	+
	37℃発育(好気)	—	—
0.5%食塩加 Mueller Hinton 寒天培地	馬尿酸塩加水分解	+	—
	酢酸インドキシル 加水分解	+	+

3) 試験に使用した培地・試薬

対象菌の検出及び同定に使用した培地・試薬を表-6に示した。

表-6-1 使用培地・試薬一覧

対象菌	名 称	メーカー名
大腸菌	EC培地	栄研器材
	ESコリマーク寒天培地	栄研器材
	クロモアガーE. coli寒天培地	関東化学
	TSI培地	栄研器材
	LIM培地	日水製薬
	シモンズ・クエン酸ナトリウム培地	栄研器材
	SIM培地	栄研器材
	VP半流動培地	栄研器材
	チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙	日水製薬
腸球菌 及び バンコマイシン3 μg/mlで選択さ れた腸球菌	Enterococcusel Broth	BBL
	Enterococcusel Agar	BBL
	バンコマイシン	Sigma
	ブドウ糖寒天平板培地	自製
	AC培地	日水製薬
	6.5%塩化ナトリウム加ブドウ糖ブイヨン	自製
	ID580 OBIS PYR	Oxoid
	日本薬局方 オキシドール	小堺製薬
	Heart Infusion Broth	Difco
	1%マンニトール加糖分解試験用培地	自製
	1%ソルビトール加糖分解試験用培地	自製
	1%アラビノース加糖分解試験用培地	自製
サルモネラ	緩衝ペプトン水	Oxoid
	テトラチオン酸塩(TT)培地	Oxoid
	ラパポート・バシリアディス(RV)培地	Merck
	MLCB寒天培地	日水製薬
	クロモアガーサルモネラ寒天培地	関東化学
	TSI培地	栄研器材
	LIM培地	日水製薬
	シモンズ・クエン酸ナトリウム培地	栄研器材
	SIM培地	栄研器材
	VP半流動培地	栄研器材
	サルモネラ免疫血清(O群及びH血清)	デンカ生研

表-6-2 使用培地・試薬一覧

対象菌	名 称	メーカー名
カンピロ バクター	Preston培地	Oxoid
	馬脱繊維素血液	日本バイオテスト 研究所
	mCCDA寒天培地	Merck
	Skirrow寒天培地	Oxoid
	アネロパック・微好気	Oxoid
	チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙	日水製薬
	日本薬局方 オキシドール	小堺製薬
	血液寒天培地 (5%馬血加Blood Agar Base No.2)	Oxoid
	0.5%食塩加Mueller Hinton 寒天培地	自製
	1%馬尿酸ナトリウム溶液	自製
	ニンヒドリン試薬	自製
	10%酢酸インドキシルアセトン溶液	自製

4 結果及び要約

1) 試料のサンプリング

対象食品の都道府県別内訳(サンプリング数)を表-7に示した。

表-7 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	鶏肉
A	57	0	18
B	0	0	23
C	18	18	0
D	10	18	60
E	0	18	0
F	21	48	0
G	0	12	0
H	0	19	0
I	11	0	0
J	15	0	0
K	0	10	0
L	10	0	9
M	0	0	6
N	0	0	14
O	0	0	11
P	32	0	9
Q	16	15	74
R	14	0	0
S	0	37	80
T	0	8	0
合計	204	203	304

2) 対象菌の検出試験

対象食品別の対象菌の検出状況を表-8～10に示した。

表-8 牛肉からの対象菌の検出状況 [陽性試料数(検出率)]

都道府県	大腸菌	腸球菌	バンコマイシン3 μ g/ml で選択された腸球菌※
A	2 (3.5%)	3 (5.3%)	0 (0%)
C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
D	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
F	0 (0%)	2 (9.5%)	0 (0%)
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
J	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
L	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
P	0 (0%)	5 (15.6%)	0 (0%)
Q	0 (0%)	1 (6.3%)	0 (0%)
R	0 (0%)	1 (7.1%)	0 (0%)
合計	2 (1.0%)	12 (5.9%)	0 (0%)

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

表-9 豚肉からの対象菌の検出状況〔陽性試料数(検出率)〕

都道府県	大腸菌	腸球菌	バンコマイシン $3\mu\text{g/ml}$ で選択された腸球菌※
C	1 (5.6%)	1 (5.6%)	1 (5.6%)
D	0 (0%)	1 (5.6%)	0 (0%)
E	2 (11.1%)	1 (5.6%)	1 (5.6%)
F	0 (0%)	3 (6.3%)	1 (2.1%)
G	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)
H	2 (10.5%)	1 (5.3%)	0 (0%)
K	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Q	0 (0%)	3 (20.0%)	0 (0%)
S	0 (0%)	6 (16.2%)	0 (0%)
T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
合計	5 (2.5%)	17 (8.4%)	3 (1.5%)

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン $3\mu\text{g/ml}$ を添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

表-10 鶏肉からの対象菌の検出状況〔陽性試料数(検出率)〕

都道府県	大腸菌	腸球菌	バンコマイシン $3\mu\text{g/ml}$ で選択された腸球菌※	サルモネラ	カンピロバクター
A	15 (83.3%)	9 (50.0%)	0 (0%)	13 (72.2%)	1 (5.6%)
B	14 (60.9%)	12 (52.2%)	2 (8.7%)	11 (47.8%)	4 (17.4%)
D	56 (93.3%)	17 (28.3%)	5 (8.3%)	39 (65.0%)	25 (41.7%)
L	9 (100%)	6 (66.7%)	1 (11.1%)	3 (33.3%)	5 (55.6%)
M	6 (100%)	6 (100%)	2 (33.3%)	6 (100%)	5 (83.3%)
N	12 (85.7%)	11 (78.6%)	2 (14.3%)	9 (64.3%)	8 (57.1%)
O	8 (72.7%)	10 (90.9%)	0 (0%)	6 (54.5%)	7 (63.6%)
P	7 (77.8%)	6 (66.7%)	0 (0%)	2 (22.2%)	3 (33.3%)
Q	49 (66.2%)	48 (64.9%)	5 (6.8%)	47 (63.5%)	43 (58.1%)
S	70 (87.5%)	58 (72.5%)	8 (10.0%)	46 (57.5%)	44 (55.0%)
合計	246 (80.9%)	183 (60.2%)	25 (8.2%)	182 (59.9%)	145 (47.7%)

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン $3\mu\text{g/ml}$ を添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

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。ただし、対象菌の種類により分離菌株の採取数を以下のとおりとした。

なお、対象食品別の対象菌の分離状況を表-11～13に示した。

① 大腸菌

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。

② 腸球菌及び“バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”

直接分離培養法により検出された3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または2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菌株と合わせて3菌株とした。

③ サルモネラ

増菌培養法により検出された菌株のうち、O群血清型が異なる3菌株とした。ただし、O群血清型が同一である場合は2菌株とした。

④ カンピロバクター

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2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1菌株と合わせて2菌株とした。

表-11 牛肉からの対象菌の分離状況

対象菌	分離方法	菌種	分離菌株数	合計
大腸菌	直接分離培養	—	2	6
	増菌培養	—	4	
腸球菌	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	2	3
		<i>E. faecium</i>	1	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	9	24
		<i>E. faecium</i>	15	
バンコマイシン 3 μ g/mlで選択 された腸球菌※	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	0	0
		<i>E. faecium</i>	0	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	0	0
		<i>E. faecium</i>	0	

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

表-12 豚肉からの対象菌の分離状況

対象菌	分離方法	菌種	分離菌株数	合計
大腸菌	直接分離培養	—	4	13
	増菌培養	—	9	
腸球菌	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	1	2
		<i>E. faecium</i>	1	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	36	44
		<i>E. faecium</i>	8	
バンコマイシン 3 μ g/mlで選択 された腸球菌※	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	0	0
		<i>E. faecium</i>	0	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	6	9
		<i>E. faecium</i>	3	

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン 3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

表-13 鶏肉からの対象菌の分離状況

対象菌	分離方法	菌種または サルモネラ血清型(抗原構造)	分離菌株数	合計
大腸菌	直接分離培養	—	290	695
	増菌培養	—	405	
腸球菌	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	57	110
		<i>E. faecium</i>	53	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	201	375
		<i>E. faecium</i>	174	
バンコマイシン3 μ g/mlで選択さ れた腸球菌※	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	0	1
		<i>E. faecium</i>	1	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	31	60
		<i>E. faecium</i>	29	
サルモネラ	増菌培養	Infantis(7:r:1,5)	285	373
		Schwarzengrund(4:d:1,7)	32	
		Typhimurium(4:i:1,2)	6	
		Agona(4:f, g, s:-)	2	
		YovokomeまたはManhattan (8:d:1,5)	32	
		IstanbulまたはHadar (8:z10:e, n, x)	12	
		Corvallis(8:z4, z23:-)	2	
		Enteritidis(9:g, m:-)	2	
カンピロ バクター	直接分離培養	<i>C. jejuni</i>	89	101
		<i>C. coli</i>	12	
	増菌培養	<i>C. jejuni</i>	226	237
		<i>C. coli</i>	11	

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン 3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

Ⅲ 分離菌の薬剤感受性試験(MICの測定)

1 分離菌株の選定

対象食肉ごとに分離された各細菌の菌株において、菌株数が100株未満の場合はすべての菌株を用い、100株以上の場合は100株を選定し、薬剤感受性試験を実施した(表-14)。

ただし、菌株の選定方法及び保存方法は以下のとおりとした。

1) 牛肉及び豚肉の場合

対象とした細菌の分離菌株数がいずれもそれぞれ100株以下であったため、すべての分離菌株を試験用菌株とした。

2) 鶏肉の場合

分離菌株数が100株を超えた菌種については、1試料につき2株以上分離された場合であっても各試料1株を原則とするとともに、各試料の直接分離株を優先的に採用した。

なお、選定した試験用菌株の産地ごとの内訳を表-15に示した。

① 大腸菌

各試料から1株ずつを選定した後、産地ごとの菌株比率に応じて、試験用菌株100株を選定した。

② 腸球菌及びサルモネラ

各試料1株を原則とし、1つの試料から複数の菌種またはO群血清型が分離された場合は、1試料2株として菌株を選定した後、産地ごとの菌株比率に応じて、試験用菌株100株を選定した。

③ バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌

分離された61株すべてを試験用菌株とした。

④ カンピロバクター

カンピロバクターは食中毒菌として重要であることから、各菌種における産地ごとの菌株比率に応じて、試験用菌株100株を選定した。

3) 分離菌株の保存方法

大腸菌、腸球菌及びサルモネラの各分離菌株についてはカジトン半流動培地にて培養後、冷暗所で保存した。カンピロバクターについては5%馬脱繊維血加BLOOD AGAR BASE No.2平板培地に分離菌株を接種し35℃微好気条件下で2～3日間培養後、生育した菌体を15%グリセリン添加ブレインハートインフュージョンブイヨン培地に懸濁させ、-80℃で保存した。

表-14 薬剤感受性試験に用いる分離菌株の選定

対象食品	対象菌	試料数	対象菌の検出状況		分離菌株数	試験用菌株数
			陽性試料数	検出率		
牛肉	大腸菌	204	2	1.0%	6	6
	腸球菌		12	5.9%	27	27
	バンコマイシン 3 μ g/ml で選択された腸球菌※		0	0.0%	0	0
豚肉	大腸菌	203	5	2.5%	13	13
	腸球菌		17	8.4%	46	46
	バンコマイシン 3 μ g/ml で選択された腸球菌※		3	1.5%	9	9
鶏肉	大腸菌	304	246	80.9%	695	100
	腸球菌		183	60.2%	485	100
	バンコマイシン 3 μ g/ml で選択された腸球菌※		25	8.2%	61	61
	サルモネラ		182	59.9%	373	100
	カンピロバクター		145	47.7%	338	100

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン 3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

表-15 鶏肉における試験用菌株の産地内訳

都道府県	大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター	
				<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
A	6 (6.1%)	5 (4.8%)	7 (6.8%)	1 (0.7%)	0 (0%)
B	6 (5.7%)	6 (6.4%)	6 (6.3%)	3 (2.6%)	0 (0%)
D	23 (22.8%)	9 (9.0%)	20 (20.3%)	16 (16.6%)	0 (0%)
L	4 (3.7%)	3 (3.2%)	2 (1.6%)	3 (3.3%)	0 (0%)
M	2 (2.4%)	3 (3.2%)	3 (3.1%)	3 (3.3%)	0 (0%)
N	5 (4.9%)	6 (5.9%)	5 (5.2%)	5 (4.6%)	1 (0.7%)
O	3 (3.3%)	5 (5.3%)	3 (3.1%)	5 (4.6%)	0 (0%)
P	3 (2.8%)	3 (3.2%)	1 (1.0%)	1 (1.3%)	1 (0.7%)
Q	20 (19.9%)	27 (26.6%)	27 (27.1%)	26 (26.5%)	4 (4.0%)
S	28 (28.4%)	33 (32.4%)	26 (25.5%)	28 (28.5%)	3 (2.6%)
合計	100 (100%)	100 (100%)	100 (100%)	91 (91.0%)	9 (9.0%)

※ ()内の産地ごとの菌株比率に応じて、試験用菌株100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最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)を測定した。また、大腸菌、腸球菌及びサルモネラについては17薬剤、カンピロバクターについては11薬剤についてMICを測定した。

なお、セデカマイシンについては、平成17・18年度に日本での使用実績がなく、製造も中止されていることから測定必要量を入手することができず、試験を実施することができな

かった。

1) 対象薬剤

各試験菌株に対する対象薬剤を表-16に示した。

表-16 調査対象薬剤及び菌種

薬剤	略号	対象菌種			
		大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
アンピシリン	ABPC	○	○	○	○
セファゾリン	CEZ	○	×	○	×
セフトオフル	CTF	○	×	○	×
アピラマイシン	APM	○	×	○	×
シヒト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	○	○	○	×
エリスロマイシン	EM	×	○	×	○
リンコマイシン	LCM	×	○	×	×
コリスチン	CL	○	×	○	×
ノシハプタイト	NHT	×	○	×	×
バンコマイシン	VCM	×	○	×	×
バーシニアマイシン	VGM	×	○	×	×
サリノマイシン	SLM	×	○	×	×
オキシテトラサイクリン	OTC	○	○	○	○
アピラマイシン	AVM	×	○	×	×
バシトラシン	BC	×	○	×	×
ビコサマイシン	BCM	○	×	○	×
クロラムフェニコール	CP	○	○	○	○
ナリシクス酸	NA	○	×	○	○
エンフロキサシン	ERFX	○	○	○	○
スルファジメトキシ	SDMX	○	×	○	○
トリメトロム	TMP	○	×	○	×
ホスホマイシン	FOM	○	○	○	○
チルミコシン	TMS	○	○	○	○

○：調査対象，×：調査対象外

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-17に示した。なお，各薬剤については5120～1.25 μ g/mlまでの2段階希釈液を調製した。ただし，ノシヘプタイド，バージニアマイシン，アビラマイシン，ピコザマイシンについては2000～0.49 μ g/mlまでの2段階希釈液を調製した。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-17 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	蒸留水
セフトオフル	メタノール	蒸留水
アブラマイシン	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
エリスロマイシン	95%エタノール	蒸留水
リンコマイシン	蒸留水	蒸留水
コリスチン	蒸留水	蒸留水
ノシヘプタイト	ジメチルホルムアミド	蒸留水
バンコマイシン	蒸留水	蒸留水
バージニアマイシン	少量のメタノール＋蒸留水	蒸留水
サリノマイシン	メタノール	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
アビラマイシン	アセトン	蒸留水
バシトラシン	蒸留水	蒸留水
ビュサマイシン	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	下記 ⁴⁾ 参照	蒸留水
トリメプリーム	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 (KH_2PO_4) 7.0g, リン酸一水素ナトリウム (Na_2HPO_4) 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1000ml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1000ml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℃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。また、カンピロバクターについては5%の割合に綿羊脱繊維素血液を添加したミュラーヒントンス寒天培地を用いた。

③ 接種用菌液の調製

a) 大腸菌，腸球菌及びサルモネラ

普通寒天培地で35℃，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℃，18～24時間培養後，培養液を約 $1\sim 2\times 10^8$ /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。

b) カンピロバクター

5%馬脱繊維血加BLOOD AGAR BASE No. 2平板で35℃，2～3日間微好気培養し，生育した菌体5～10集落を釣菌し，TRYPTONE SOYA BROTHに接種後，混合ガス(炭酸ガス10%，酸素ガス5%，窒素ガス85%)を噴入，スクリュウ栓で密封した。これを35℃，18～24時間振とう培養後，培養液を約 $1\sim 2\times 10^8$ /ml (McFarland標準液 No. 0.5)となるように調製して接種用菌液とした。

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。

なお，カンピロバクターの場合は菌液接種後，35℃で45～48時間微好気培養した。

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)は国内の家畜衛生分野におけるモニタリング調査で示されている値を基本とした(表-18)。ただし，CLSI/NCCLSや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-18に示した。また，腸球菌及び“バンコマイシン 3μ g/mlで選択された腸球菌”のMIC分布が二峰性を示したバージニアマイシンについては，感受性菌と耐性菌のピークの間値をブレイクポイントとした。なお，ブレイクポイントの設定方法は農林水産省動物医薬品検査所の平成13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-18 各薬剤に対するブレイクポイント

薬剤	略号	ブレイクポイント (μ g/ml)			
		大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
アンピシリン	ABPC	32	16	32	32
セファゾリン	CEZ	32	—	32 ¹⁾	—
セフトオフル	CTF	8	—	8 ²⁾	—
アピラマイシン	APM	16 ²⁾	—	***	—
シヒトロストレプトマイシン	DSM	32	128	32	32
ゲンタマイシン	GM	16	32	16 ¹⁾	16 ²⁾
カナマイシン	KM	64	128	64	—
エリスロマイシン	EM	—	8	—	32
リンコマイシン	LCM	—	128	—	—
コリスチン	CL	16	—	16 ²⁾	—
ノシヘプトライド	NHT	—	***	—	—
バンコマイシン	VCM	—	32	—	—
バネシニアマイシン	VGM	—	1.56 ³⁾	—	—
サリノマイシン	SLM	—	16 ²⁾	—	—
オキサテトラサイクリン	OTC	16	16	16	16
アピラマイシン	AVM	—	16	—	—
バシトラシン	BC	—	128 ²⁾	—	—
ビコサマイシン	BCM	128	—	64	—
クロラムフェニコール	CP	32	32	32	16
ナリジクス酸	NA	32	—	32	32
エンロフロキサシン	ERFX	2	4	***	2
スルファジメトキシ	SDMX	***	—	***	***
トリメトプリム	TMP	16	—	16	—
ホスホマイシン	FOM	***	***	***	***
チルミコシン	TMS	***	***	***	***

1) CLSI/NCCLS2006に準拠

2) DANMAP2003に準拠

3) 二峰性を示したため、感受性菌と耐性菌のピークの間値をブレイクポイントとした。

—：測定対象外

***：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。

カンピロバクター以外

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)

カンピロバクター

Campylobacter jejuni subsp. *jejuni* ATCC 33560

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-19)、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-20)。

表-19 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	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560
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	0.5-2
KM	1-4	16-64	1-4	—	—
EM	0.25-1	1-4	—	—	1-8
VCM	0.5-2	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-20 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
LCM	0.25-2	8-32	≥ 256	≥ 256
CL	64-128	≥ 256	0.5-2	0.5-2
BC	32-128	32-128	≥ 256	≥ 256
NHT	≤ 0.008	≤ 0.015	—	—
VGM	0.25-1	1-4	—	—
OTC	≤ 1	4-16	0.25-2	2-16
AVM	0.5-2	0.25-2	—	—
BCM	≥ 512	≥ 512	16-64	≥ 512
SDMX	—	≥ 256	≥ 256	≥ 512

3) PFGE解析(カンピロバクター)

MICの測定を実施したカンピロバクター100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(PFGE)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 *Sma*I で30℃、2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×0.5TBE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1.0～14.3秒を4.6時間、14.3～20.4秒を7.2時間、20.4～23.0を6.7時間で行った^{文献1)}。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。

文献1) 満田年宏：“感染対策のための分子疫学入門”(2002)メディカ出版。

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-21に、PFGE解析に使用した機器及び試薬を表-22に示した。

表-21 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	ミクロプランター	佐久間製作所	*****
培地等	ミューラーヒントンス寒天培地	栄研化学	6Z005
	普通寒天培地	栄研化学	*****
	TRYPTONE SOYA BROTH	OXOID	711129-5
	Blood Agar Base No. 2	OXOID	*****
	緬羊脱繊維素血液	日本バイオテスト研究所	*****
	馬脱繊維素血液	日本バイオテスト研究所	*****

表-22 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>Sma</i> I	タカラバイオ	*****
	PFCアガロース	Bio-Rad	*****
	Lamda Ladder	Bio-Rad	*****

3 結果及び考察

1) 薬剤感受性試験について

各菌種におけるRange, MIC50, MIC90, 耐性菌株数及び耐性率を表-23～27に示した。

① 大腸菌について

耐性菌は供試した17薬剤のうち12薬剤に認められ、耐性率は0.0～66.7%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-23)。特に、DSM及びOTCについては、調査した3種類すべての食肉に耐性菌が見られた。また、供試した119株の中には多くの薬剤に耐性を示すものもあり、5薬剤及び6薬剤耐性菌がそれぞれ12株、7薬剤耐性菌が5株、8薬剤耐性菌が3株、9薬剤耐性菌が2株認められた。

② 腸球菌について

耐性菌は供試した17薬剤のうち10薬剤に認められ、耐性率は0.0～86.0%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-24)。特に、OTC, BC及びCPについては、調査した3種類全ての食肉に耐性菌が見られた。また、供試した173株の中には多くの薬剤に耐性を示すものもあり、5薬剤及び6薬剤耐性菌がそれぞれ9株、7薬剤耐性菌が2株、8薬剤耐性菌が1株、9薬剤耐性菌が3株認められた。

③ “バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”について

本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離し、薬剤感受性試験を実施した。

耐性菌は供試した17薬剤のうち12薬剤に認められ、耐性率は0.0～66.7%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-25)。特に、DSM, KM, EM, LCM, OTC, BC及びERFXについては、豚肉及び鶏肉に耐性菌が見られた。また、供試した70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11株、6薬剤耐性菌が5株、7薬剤耐性菌が4株、9薬剤耐性菌が2株認められた。

なお、今回、“バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”について、バンコマイシンのブレイクポイントを32 μ g/mlとして評価すると、分離された70株におけるバンコマイシン耐性率は2.9%(豚肉由来0%, 鶏肉由来3.3%)であった。

④ サルモネラについて

耐性菌は供試した17薬剤のうち11薬剤に認められ、耐性率は0.0～83.0%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-26)。特に、DSM及びOTCの耐性率は80 %以上であった。また、供試した100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12株、6薬剤耐性菌が3株認められた。

⑤ カンピロバクターについて

耐性菌は供試した11薬剤のうち8薬剤に認められ、耐性率は1.0～42.0%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-27)。また、供試した100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1株、6薬剤耐性菌が2株、7薬剤耐性菌が1株認められた。

表-23-1 大腸菌の薬剤感受性試験

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	6	4-8	4	4	0	0.0
	豚肉	13	4-512<	512	512<	7	53.8
	鶏肉	100	3-512<	128	512<	53	53.0
	全体	119	3-512<	64	512<	60	50.4
CEZ	牛肉	6	2-32	2	32	0	0.0
	豚肉	13	2-4	2	4	0	0.0
	鶏肉	100	2-512<	4	512<	26	26.0
	全体	119	2-512<	4	512<	26	21.8
CTF	牛肉	6	0.5-1	1	1	0	0.0
	豚肉	13	0.5-1	0.5	0.5	0	0.0
	鶏肉	100	0.25-512<	1	32	25	25.0
	全体	119	0.25-512<	1	32	25	21.0
APM	牛肉	6	4-64	8	64	2	33.3
	豚肉	13	4-16	8	8	0	0.0
	鶏肉	100	4-512<	8	16	3	3.0
	全体	119	4-512<	8	16	5	4.2
DSM	牛肉	6	8-512	8	512	3	50.0
	豚肉	13	4-512<	8	512<	5	38.5
	鶏肉	100	4-512<	8	512<	45	45.0
	全体	119	4-512<	8	512<	53	44.5
GM	牛肉	6	2-4	2	4	0	0.0
	豚肉	13	1-2	2	2	0	0.0
	鶏肉	100	1-128	2	4	4	4.0
	全体	119	1-128	2	4	4	3.4
KM	牛肉	6	4-32	4	32	0	0.0
	豚肉	13	2-512<	4	8	1	7.7
	鶏肉	100	2-512<	8	512<	19	19.0
	全体	119	2-512<	8	512<	20	16.8
CL	牛肉	6	0.25-512<	0.5	512<	2	33.3
	豚肉	13	0.5	0.5	0.5	0	0.0
	鶏肉	100	<0.125-512	0.5	0.5	2	2.0
	全体	119	<0.125-512<	0.5	0.5	4	3.4
OTC	牛肉	6	2-512	32	512	4	66.7
	豚肉	13	1-256	2	256	5	38.5
	鶏肉	100	1-512	256	512	62	62.0
	全体	119	1-512	256	512	71	59.7
BCM	牛肉	6	25-50	25	50	0	0.0
	豚肉	13	25	25	25	0	0.0
	鶏肉	100	12.5-100	25	50	0	0.0
	全体	119	12.5-100	25	50	0	0.0
CP	牛肉	6	16	16	16	0	0.0
	豚肉	13	8-512<	16	128	3	23.1
	鶏肉	100	4-512	16	128	12	12.0
	全体	119	4-512<	16	128	15	12.6

表-23-2 大腸菌の薬剤感受性試験

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(%)
NA	牛肉	6	4	4	4	0	0.0
	豚肉	13	2-64	4	4	1	7.7
	鶏肉	100	2-512<	4	512<	36	36.0
	全体	119	2-512<	4	512<	37	31.1
ERFX	牛肉	6	<0.125	<0.125	<0.125	0	0.0
	豚肉	13	<0.125-0.5	<0.125	<0.125	0	0.0
	鶏肉	100	<0.125-32	<0.125	16	11	11.0
	全体	119	<0.125-32	<0.125	2	11	9.2
SDMX	牛肉	6	512<	512<	512<		
	豚肉	13	256-512<	512<	512<		
	鶏肉	100	512<	512<	512<		
	全体	119	256-512<	512<	512<		
TMP	牛肉	6	0.5-1	0.5	1	0	0.0
	豚肉	13	0.25-512<	2	512<	6	46.2
	鶏肉	100	0.25-512<	1	512<	20	20.0
	全体	119	0.25-512<	1	512<	26	21.8
FOM	牛肉	6	64-256	64	256		
	豚肉	13	32-128	64	128		
	鶏肉	100	16-512	64	128		
	全体	119	16-512	64	128		
TMS	牛肉	6	256-512	512	512		
	豚肉	13	256-512	256	512		
	鶏肉	100	256-512<	512	512		
	全体	119	256-512<	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-24-1 腸球菌の薬剤感受性試験

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	27	0.25-2	0.5	2	0	0.0
	豚肉	46	<0.125-1	0.5	1	0	0.0
	鶏肉	100	0.25-8	0.5	1	0	0.0
	全体	173	<0.125-8	0.5	1	0	0.0
DSM	牛肉	27	8-64	32	64	0	0.0
	豚肉	46	8-512<	64	512<	19	41.3
	鶏肉	100	16-512<	64	512<	17	17.0
	全体	173	8-512<	64	512<	36	20.8
GM	牛肉	27	1-16	8	16	0	0.0
	豚肉	46	0.25-32	8	16	0	0.0
	鶏肉	100	2-512<	16	16	3	3.0
	全体	173	0.25-512<	16	16	3	1.7
KM	牛肉	27	8-64	32	64	0	0.0
	豚肉	46	1-512<	32	64	3	6.5
	鶏肉	100	16-512<	64	512<	17	17.0
	全体	173	1-512<	32	512	20	11.6
EM	牛肉	27	0.25-8	4	4	0	0.0
	豚肉	46	<0.125-512<	2	4	2	4.3
	鶏肉	100	<0.125-512<	4	512<	35	35.0
	全体	173	<0.125-512<	4	512<	37	21.4
LCM	牛肉	27	1-64	32	64	0	0.0
	豚肉	46	0.5-512<	64	64	2	4.3
	鶏肉	100	1-512<	64	512<	36	36.0
	全体	173	0.5-512<	64	512<	38	22.0
NHT	牛肉	27	<0.049	<0.049	<0.049		
	豚肉	46	<0.049	<0.049	<0.049		
	鶏肉	100	<0.049	<0.049	<0.049		
	全体	173	<0.049	<0.049	<0.049		
VCM	牛肉	27	0.5-4	1	4	0	0.0
	豚肉	46	0.25-8	1	2	0	0.0
	鶏肉	100	0.5-4	1	2	0	0.0
	全体	173	0.25-8	1	2	0	0.0
VGM	牛肉	27	0.39-6.25	6.25	6.25	16	59.3
	豚肉	46	0.2-6.25	6.25	6.25	27	58.7
	鶏肉	100	0.39-25	6.25	6.25	86	86.0
	全体	173	0.20-25	6.25	6.25	129	74.6
SLM	牛肉	27	0.5-1	1	1	0	0.0
	豚肉	46	0.5-1	1	1	0	0.0
	鶏肉	100	0.25-4	1	4	0	0.0
	全体	173	0.25-4	1	4	0	0.0
OTC	牛肉	27	0.25-64	1	32	6	22.2
	豚肉	46	<0.125-256	4	256	19	41.3
	鶏肉	100	0.5-512<	32	256	56	56.0
	全体	173	<0.125-512<	16	256	81	46.8

※ 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-24-2 腸球菌の薬剤感受性試験

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(%)
AVM	牛肉	27	0.78-3.13	3.13	3.13	0	0.0
	豚肉	46	0.78-3.13	3.13	3.13	0	0.0
	鶏肉	100	0.78-512<	3.13	3.13	5	5.0
	全体	173	0.78-512<	3.13	3.13	5	2.9
BC	牛肉	27	16-256	64	256	5	18.5
	豚肉	46	1-512<	64	512	5	10.9
	鶏肉	100	32-512<	128	512<	22	22.0
	全体	173	1-512<	128	128	32	18.5
CP	牛肉	27	4-64	8	64	3	11.1
	豚肉	46	8-64	8	16	2	4.3
	鶏肉	100	8-64	16	64	8	17.4
	全体	173	4-64	8	16	13	7.5
ERFX	牛肉	27	1-4	2	4	0	0.0
	豚肉	46	0.5-32	1	2	2	4.3
	鶏肉	100	0.5-64	1	2	4	4.0
	全体	173	0.5-64	2	4	6	3.5
FOM	牛肉	27	32-256	64	128		
	豚肉	46	16-128	64	128		
	鶏肉	100	32-128	64	128		
	全体	173	16-256	64	128		
TMS	牛肉	27	32-64	32	64		
	豚肉	46	32-512<	32	64		
	鶏肉	100	32-512<	64	512<		
	全体	173	32-512<	64	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-25-1 バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌¹⁾の薬剤感受性試験

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	豚肉	9	0.5-1	0.5	1	0	0.0
	鶏肉	61	0.25-8	0.5	2	0	0.0
	全体	70	0.25-8	0.5	1	0	0.0
DSM	豚肉	9	32-512<	512<	512<	5	55.6
	鶏肉	61	16-512<	64	512<	18	29.5
	全体	70	16-512<	64	512<	23	32.9
GM	豚肉	9	8-16	8	16	0	0.0
	鶏肉	61	1-512<	8	16	3	4.9
	全体	70	1-512<	8	16	3	4.3
KM	豚肉	9	16-512<	64	512<	2	22.2
	鶏肉	61	8-512<	64	512<	14	23.0
	全体	70	8-512<	64	512<	16	22.9
EM	豚肉	9	4-512<	4	512<	2	22.2
	鶏肉	61	<0.125-512<	4	512<	26	42.6
	全体	70	<0.125-512<	4	512<	28	40.0
LCM	豚肉	9	16-512<	64	512<	2	22.2
	鶏肉	61	1-512<	64	512<	25	35.7
	全体	70	1-512<	64	512<	27	38.6
NHT	豚肉	9	<0.049	<0.049	<0.049		
	鶏肉	61	<0.049	<0.049	<0.049		
	全体	70	<0.049	<0.049	<0.049		
VCM	豚肉	9	1-4	2	4	0	0.0
	鶏肉	61	1-512	4	8	2	3.3
	全体	70	1-512	4	4	2	2.9
VGM	豚肉	9	0.78-12.5	6.25	12.5	6	66.7
	鶏肉	61	0.39-12.5	6.25	6.25	37	60.7
	全体	70	0.39-12.5	6.25	6.25	43	61.4
SLM	豚肉	9	0.5-1	1	1	0	0.0
	鶏肉	61	0.5-512<	1	4	1	1.6
	全体	70	0.5-512<	1	4	1	1.4
OTC	豚肉	9	0.5-256	128	256	5	55.6
	鶏肉	61	0.25-512	32	256	33	54.1
	全体	70	0.25-512	32	256	38	54.3
AVM	豚肉	9	1.56-3.13	3.13	3.13	0	0.0
	鶏肉	61	0.78-200<	3.13	3.13	4	6.6
	全体	70	0.78-200<	3.13	3.13	4	5.7
BC	豚肉	9	32-512<	256	512<	5	55.6
	鶏肉	61	16-512<	128	512<	26	42.6
	全体	70	16-512<	128	512<	31	44.3

1) 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン
3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

2) 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-25-2 バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌¹⁾の薬剤感受性試験

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(%)
CP	豚肉	9	8-64	16	64	2	22.2
	鶏肉	61	8-32	16	16	0	0.0
	全体	70	8-64	16	16	2	2.9
ERFX	豚肉	9	1-32	4	32	2	22.2
	鶏肉	61	1-16	2	8	13	21.3
	全体	70	1-32	2	16	15	21.4
FOM	豚肉	9	64-512<	64	512<		
	鶏肉	61	16-512<	64	128		
	全体	70	16-512<	64	128		
TMS	豚肉	9	32-512<	64	512<		
	鶏肉	61	8-512<	64	512<		
	全体	70	8-512<	64	512<		

- 1) 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン 3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。
- 2) 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-26 サルモネラの薬剤感受性試験

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	鶏肉	100	1-512<	1	2	8	8.0
CEZ			2-512<	2	4	7	7.0
CTF			0.25-32	1	2	4	4.0
APM			1-16	4	8		
DSM			8-512<	256	256	81	81.0
GM			0.25-32	1	2	1	1.0
KM			1-512<	4	512<	39	39.0
CL			0.5-512<	1	1	1	1.0
OTC			1-512	256	512	83	83.0
BCM			12.5-200<	12.5	100	11	11.0
CP			4-32	8	16	0	0.0
NA			2-512	4	256	12	12.0
ERFX			<0.125-2	<0.125	0.5		
SDMX			512 $\leq$	512<	512<		
TMP			0.25-512<	512	512<	59	59.0
FOM			2-256	2	8		
TMS			128-512<	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-27 カンピロバクターの薬剤感受性試験

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	鶏肉	100	0.5-128	2	16	3	3.0
DSM			0.5-512<	1	2	6	6.0
GM			0.25-32	0.5	1	1	1.0
EM			0.25-512	2	4	4	4.0
OTC			<0.125-256	1	64	34	34.0
CP			1-64	4	4	3	3.0
NA			2-256	8	128	42	42.0
ERFX			<0.125-16	0.25	8	41	41.0
SDMX			64-512<	512<	512<		
FOM			4-256	64	128		
TMS			0.5-512<	4	8		

※ 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。

2) PFGE解析(カンピロバクター)について

MIC測定試験に用いた全てのカンピロバクターの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に示した。

試験菌株番号56及び57は消化断片が認められず、試験菌株番号74は泳動ゲルの下部にのみバンドが認められた。このことから試験菌株番号56、57及び74は本調査で行った条件では適切な消化断片を得ることが出来ない菌株であると考えられた。

図-1の系統樹を見ると、各原産地及び地域によるクラスターの形成は認められず、様々な菌株が各地に散在していると考えられた。また、同一の原産地若しくは近隣の原産地由来の株間で同一パターンを示す場合が多かったが、SとNを原産地とする試料からの菌株で一致する例もあった(試験菌株番号13と46及び17と87)。なお、この2組の由来は、それぞれ店舗所在地及び採取日時も大きく異なっていたことから、店舗内の加工・包装時に同じ菌株によって汚染された可能性は低いと考えられた。

検出されたカンピロバクターの50%以上を占めているX地区(原産地O, P, Q, R及びS)に注目したところ、国内全域での比較と同様に、地域に特異的な菌株が存在するのではなく、様々な菌株が広範囲にわたって散在している可能性が考えられた(図-2)。また、系統樹において、15組の菌株が同一パターンを示し(図-2のa～o)、その多くは共通した原産地となったものの、a, j及びkの3組については原産地がそれぞれ異なった。jについては、サンプリングした店舗及び日時が同一であったとともに、aについては、店舗所在地こそ異なるものの、同一市内の同系列店舗であり、サンプリングした日時も近かった。このことから、a及びjについては、同一店舗内(または同一加工処理施設内)で異なる産地の食肉を処理した際に、同じカンピロバクターに汚染された可能性も考えられた。

また、X地区のみで比較をした図-2では、試験菌株番号13及び52は同一パターンと判定されたが、国内全域で比較した図-1では、異なるパターンとして判定された。これはFingerprinting II software[Bio-Rad]による泳動パターンの解析結果において試験菌株番号13が試験菌株番号46と、より同一性が強いと判断されたため生じた事例と考えられた。

一方、PFGEパターンと薬剤耐性の関連性をみると、同一なPFGEパターンを示した菌株は薬剤耐性の傾向も同様である場合が多かった(図-3)。しかし、図-3の□で囲んだ同一なPFGEパターンの菌株間において、DSM, OTC, NA及びERFXのいずれかに対する薬剤耐性に顕著な違いが見られたため、さらに詳細な解析が必要であると考えられた。

また、*C. jejuni* 及び*C. coli*の菌種の同定で*C. coli*と判定された試験菌株番号3, 10, 14, 22, 27, 28, 65, 71及び72のうち、試験菌株番号10, 14, 22, 28, 71及び72は1つのクラスターを形成した。しかし、試験菌株番号3, 27及び65に関しては*C. coli*と判定されたにもかかわらず*C. jejuni* の大きなクラスター内に点在しており、*C. jejuni* である可能性も考えられた(図-1)。そこで、試験菌株番号3, 27及び65に対して「内閣府食品安全委員会 平成16年度食品安全確保総合調査 家畜等のカンピロバクターに関する汚染実態調査報告書」で用いた各菌種の特異的プライマーを用いてPCRによる確認試験を実施した。その結果、試験菌株番号3及び65は*C. jejuni*, 27は*C. coli*と判定された。プロトコルに従った本試験では*C. jejuni* 及び*C. coli*の菌種の鑑別を馬尿酸塩加水分解試験で実施したが、本鑑別試験だけでは分けられない菌株も存在することが示唆された。

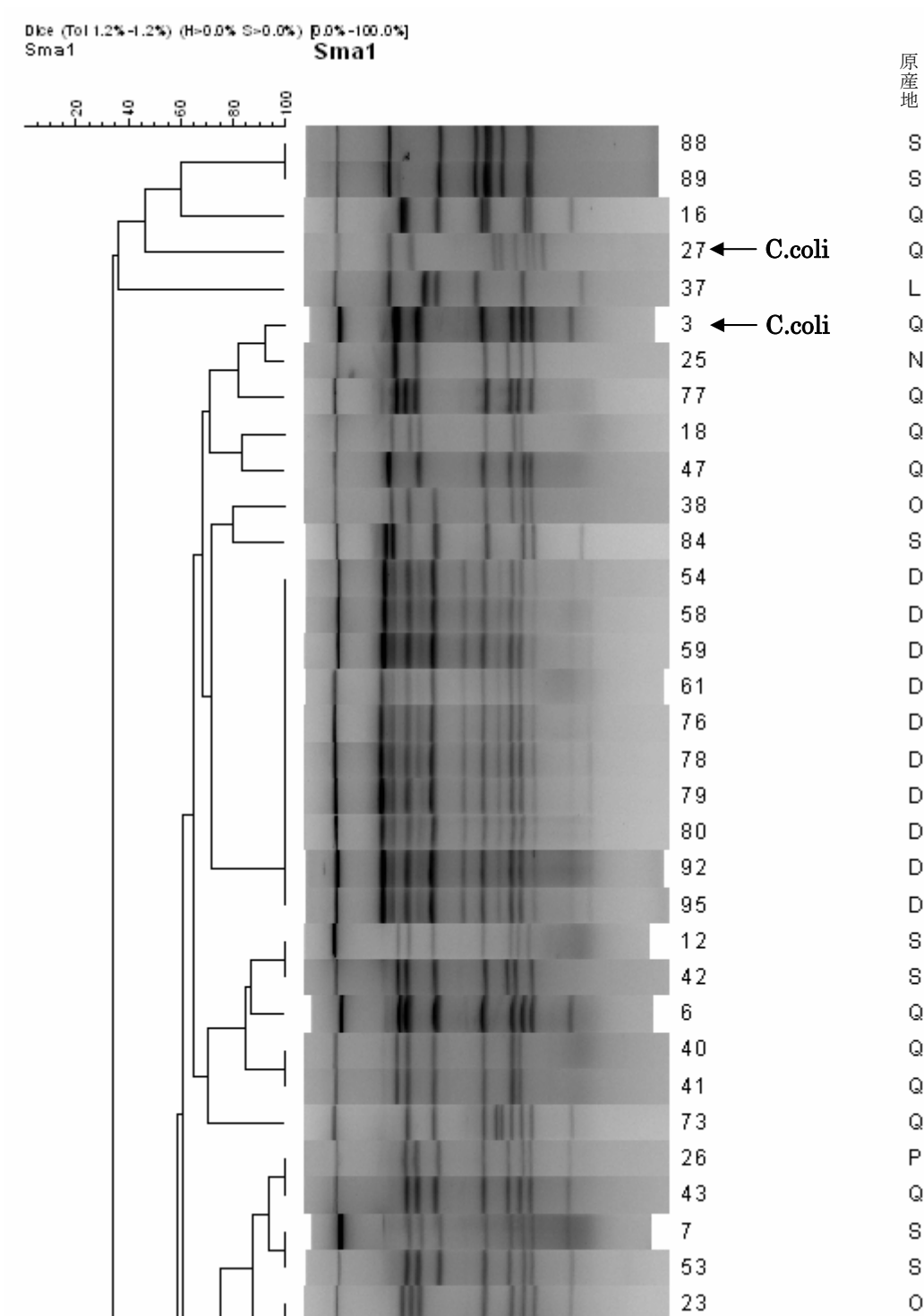


図-1-1 MIC測定試験に用いた全てのカンピロバクターのPFGEによる電気泳動図及び系統樹

- ※ 馬尿酸塩加水分解試験により，*C. coli*の記載の無い菌株は全て*C. jejuni*と判定された。
- ※ 試験菌株番号3の菌株は，馬尿酸塩加水分解試験では*C. coli*と判定されたが，PCRによる確認試験では*C. jejuni*と判定された。

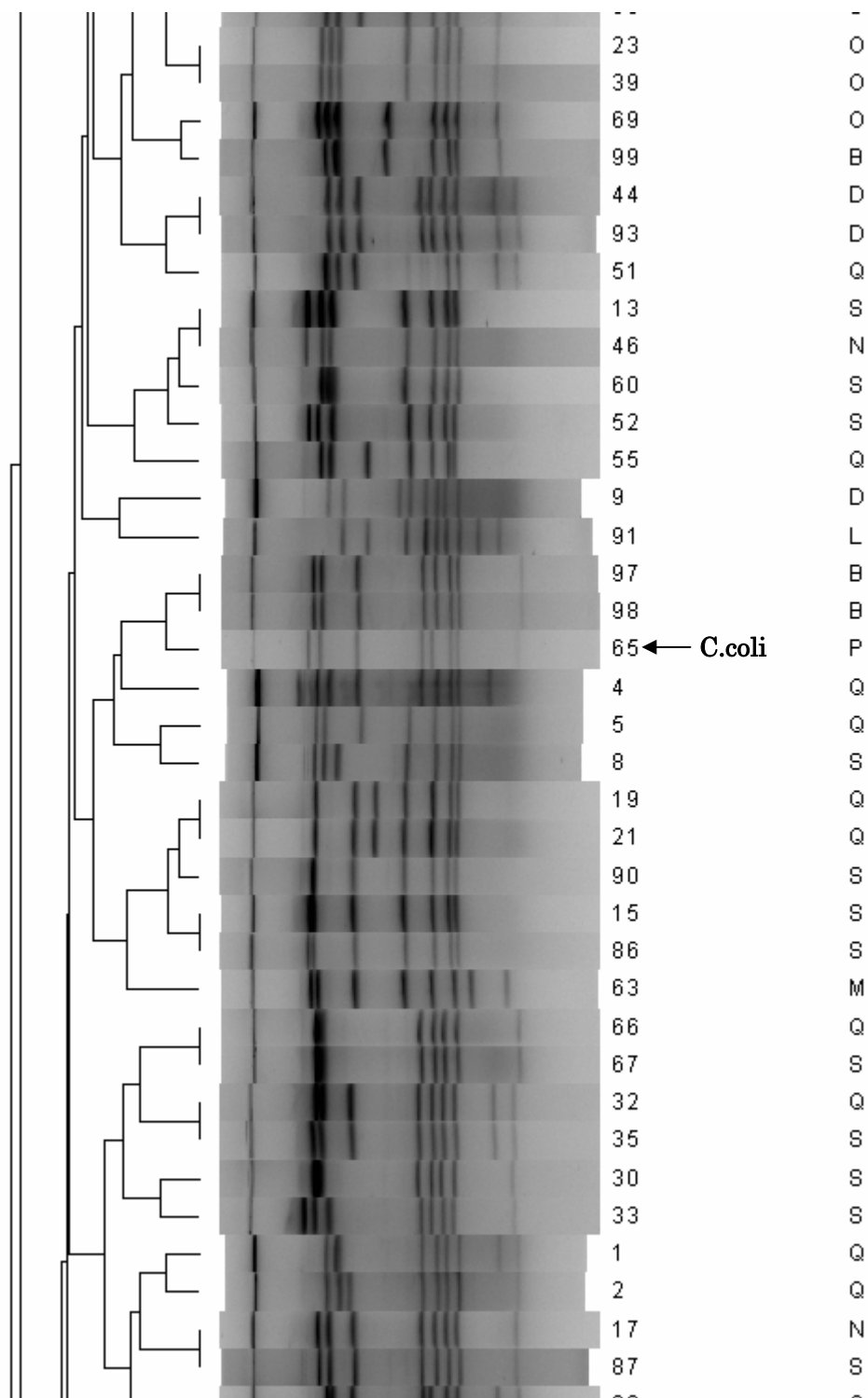


図-1-2 MIC測定試験に用いた全てのカンピロバクターのPFGEによる電気泳動図及び系統樹

※ 馬尿酸塩加水分解試験により，*C. coli*の記載の無い菌株は全て*C. jejuni*と判定された。

※ 試験菌株番号65の菌株は，馬尿酸塩加水分解試験では*C. coli*と判定されたが，PCRによる確認試験では*C. jejuni*と判定された。

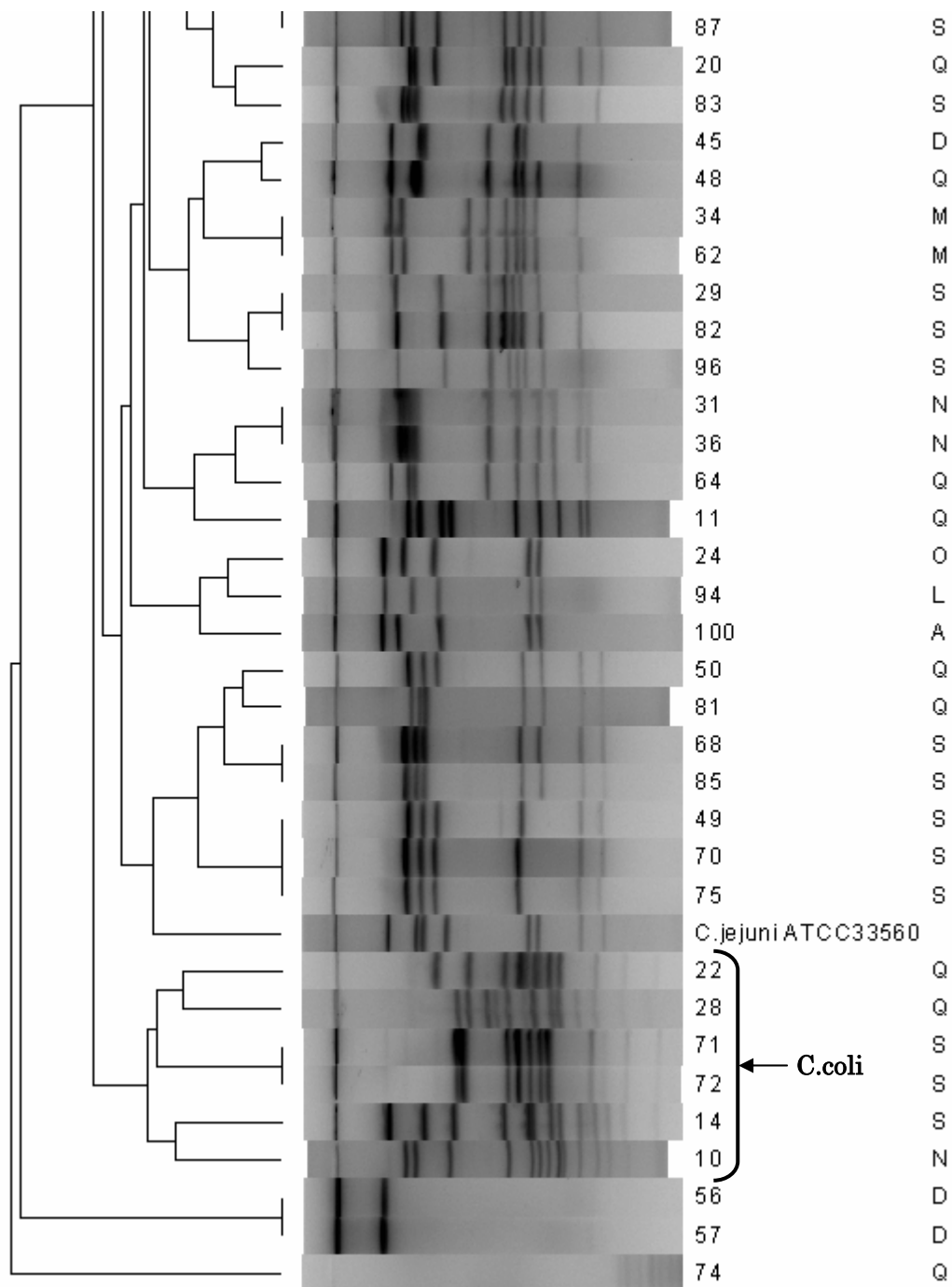


図-1-3 MIC測定試験に用いた全てのカンピロバクターのPFGEによる電気泳動図及び系統樹
 ※ 馬尿酸塩加水分解試験により，*C. coli*の記載の無い菌株は全て*C. jejuni*と判定された。

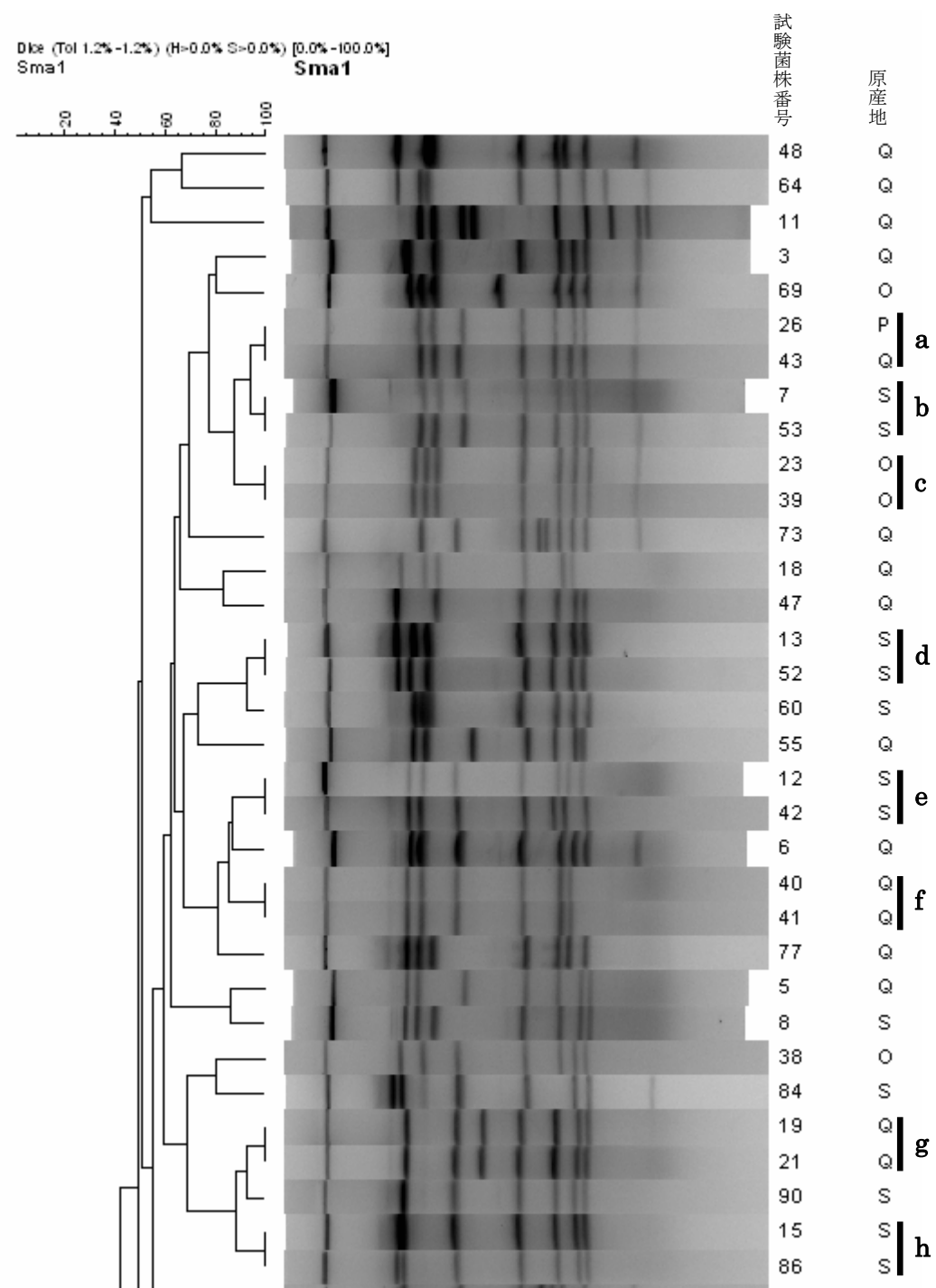


図-2-1 X地区(原産地O, P, Q, R及びS)で検出されたカンピロバクターのPFGEによる電気泳動図及び系統樹

※ a~hはPFGEパターンが同一であると判断された菌株

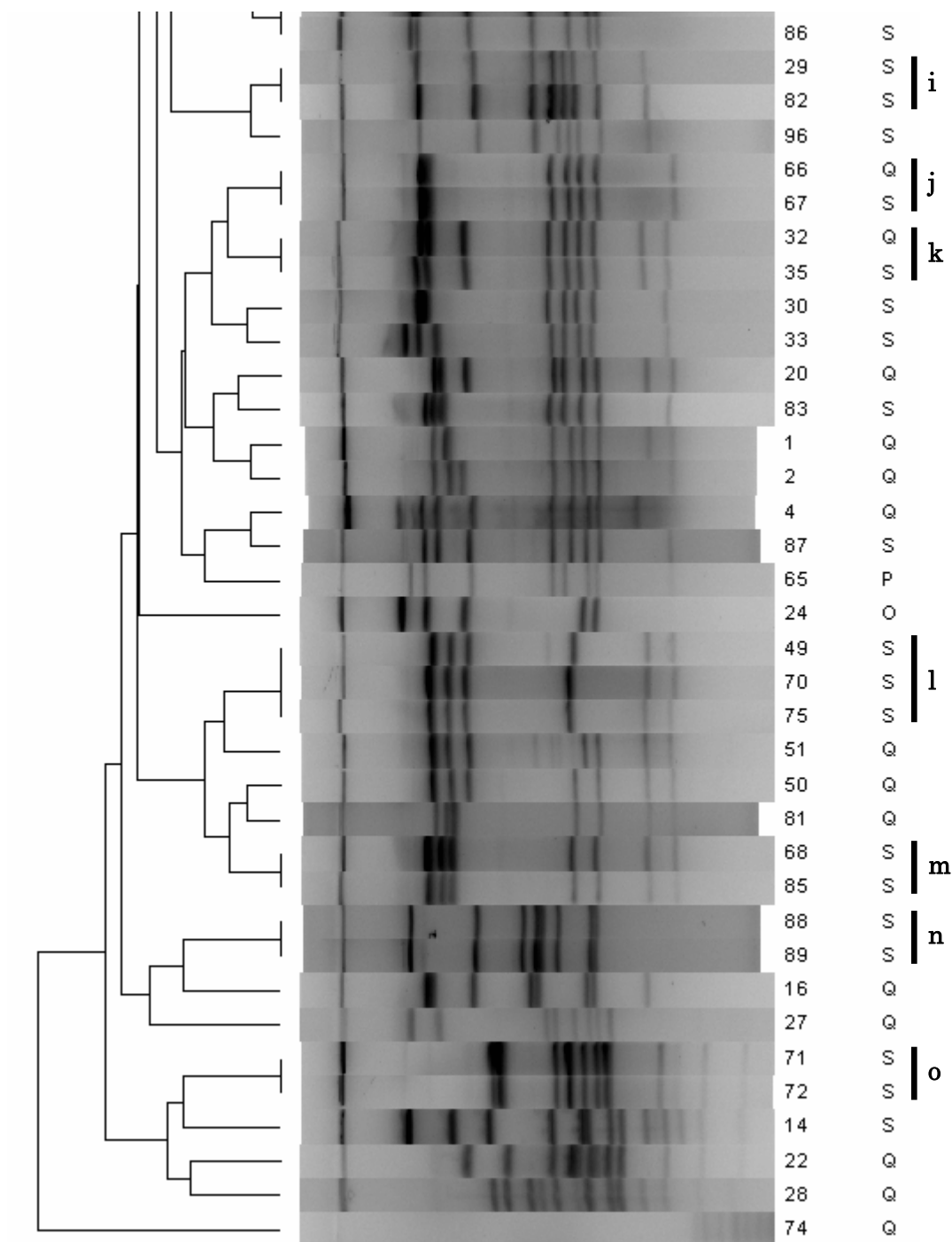


図-2-2 X地区(原産地O, P, Q, R及びS)で検出されたカンピロバクターのPFGEによる電気泳動図及び系統樹

※ i～oはPFGEパターンが同一であると判断された菌株

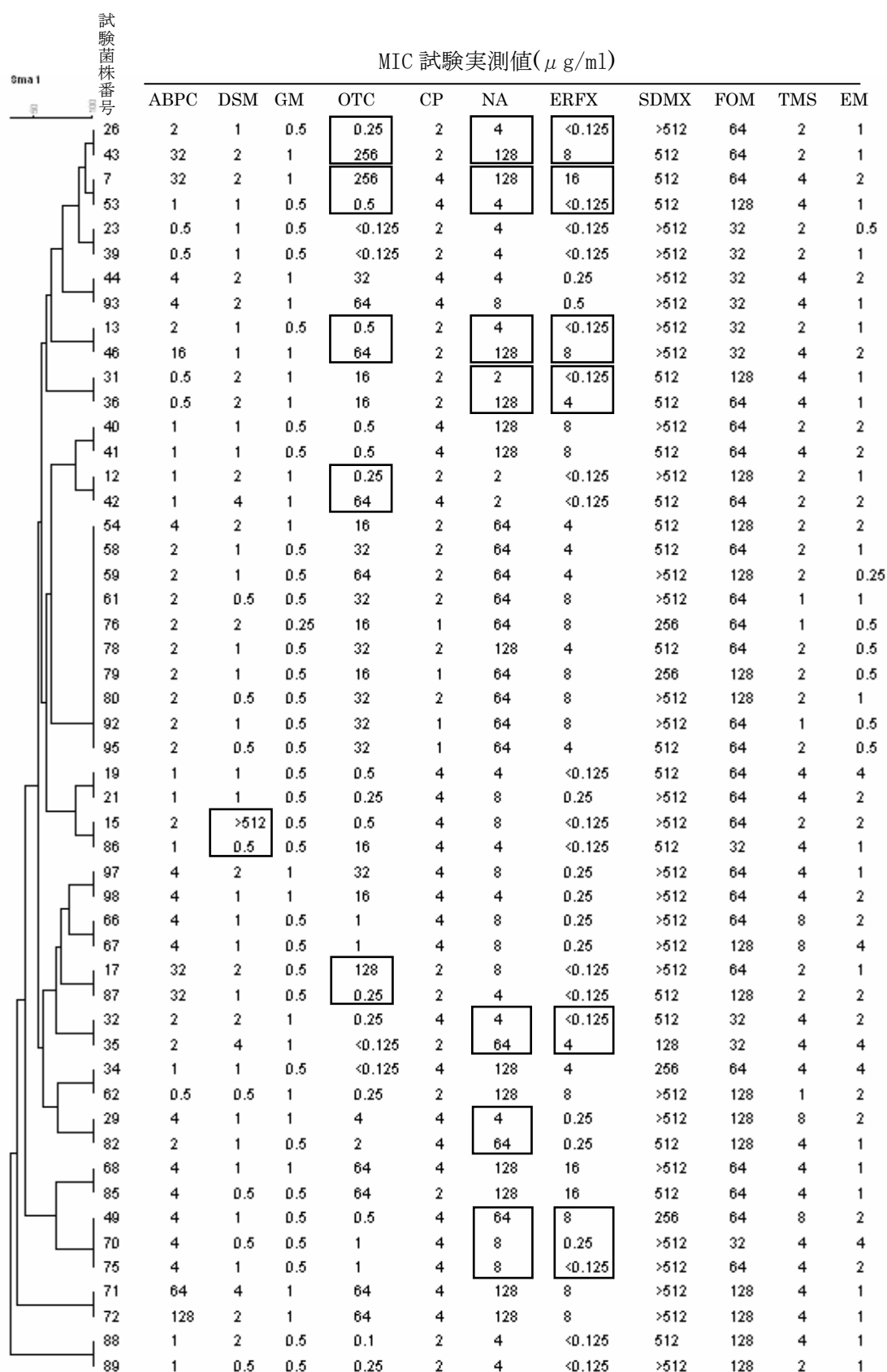


図-3 PFGEパターンが同一であったカンピロバクター菌株におけるPFGEによる系統樹及びMIC試験実測値

※ 図中の□で囲った部分は、同一なPFGEパターンを示した菌株であるが、薬剤耐性能が著しく異なったもの

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、各菌株のトリプトソイブイヨン培養液にグリセロールを等量加えたものを-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を菌種ごとにまとめ、表-28に示した。

表-28 凍結保存に供した分離菌株数

菌 種	耐性菌株	耐性が不明な菌株	合 計
大腸菌	95	24	119
腸球菌	108	65	173
バンコマイシン3 μ g/mlで 選択された腸球菌※	59	11	70
サルモネラ	97	3	100
カンピロバクター	52	48	100
合 計	411	151	562

※ 本調査においては、バンコマイシン耐性を詳細に調査するため、バンコマイシン3 μ g/mlを添加した培地で選択された腸球菌を分離した。

以 上