

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

平成20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	4
4	結果	5
1)	試料のサンプリング	5
2)	対象菌の検出試験	5
3)	対象菌の分離菌株の採取	6
III	分離菌の薬剤感受性試験(MICの測定)	8
1	分離菌株の選定・保存	8
1)	大腸菌及び“バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”の選定	8
2)	腸球菌の選定	8
3)	分離菌株の保存方法	8
2	測定方法	9
1)	対象薬剤	9
2)	MIC測定試験方法	10
3)	PFGE解析(大腸菌)	15
4)	試験に使用した機器・培地	15
3	結果及び考察	16
1)	薬剤感受性試験について	16
2)	PFGE解析(大腸菌)について	22
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18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600、豚肉の試料数は300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”

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白金耳量が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を判定した。蛍光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。

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、プロトコルに従い腸球菌用培地及びバンコマイシン3 μ g/mlを添加した培地を用いて腸球菌を分離した。

なお、農林水産省動物医薬品検査所の平成18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(“バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”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) 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-4に示した。

表-4-1 使用培地・試薬一覧

対象菌	名称	メーカー名
大腸菌	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

表-4-2 使用培地・試薬一覧

対象菌	名 称	メーカー名
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”	Enterococcosel Broth	BBL
	Enterococcosel 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	小塚製薬
	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

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-5に示した。

表-5 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	168	0	K	0	14
C	54	27	L	29	0
D	29	27	P	95	0
E	0	25	Q	48	21
F	63	72	R	41	0
G	0	19	S	0	54
H	0	29	T	0	12
I	29	0	合計	600	300
J	44	0			

※ 原産地(都道府県)のローマ字表記は、「平成18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

対象食品別の対象菌の検出状況を表-6, 7に示した。

表-6 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	8 (4.8%)	20 (11.9%)	0 (0%)
C	0 (0%)	2 (3.7%)	0 (0%)
D	3 (10.3%)	1 (3.4%)	0 (0%)
F	2 (3.2%)	6 (9.5%)	0 (0%)
I	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)
J	2 (4.5%)	5 (11.4%)	1 (2.3%)
L	4 (13.8%)	5 (17.2%)	0 (0%)
P	2 (2.1%)	8 (8.4%)	1 (1.1%)
Q	0 (0%)	2 (4.2%)	0 (0%)
R	1 (2.4%)	6 (14.6%)	0 (0%)
合計	23 (3.8%)	55 (9.2%)	2 (0.3%)

表-7 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 μ g/mlで選択 された腸球菌
C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
D	2 (7.4%)	10 (37.0%)	1 (3.7%)
E	1 (4.0%)	0 (0%)	0 (0%)
F	2 (2.8%)	8 (11.1%)	1 (1.4%)
G	0 (0%)	2 (10.5%)	0 (0%)
H	1 (3.4%)	11 (37.9%)	1 (3.4%)
K	0 (0%)	2 (14.3%)	0 (0%)
Q	0 (0%)	5 (23.8%)	1 (4.8%)
S	3 (5.6%)	7 (13.0%)	0 (0%)
T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
合計	9 (3.0%)	45 (15.0%)	4 (1.3%)

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-8, 9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。

表-8 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	—	23	59
	増菌培養	—	36	
腸球菌	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	9	14
		<i>E. faecium</i>	5	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	106	141
		<i>E. faecium</i>	35	
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	6
		<i>E. faecium</i>	0	

表-9 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	—	10	19
	増菌培養	—	9	
腸球菌	直接分離培養	<i>E. faecalis</i>	13	13
		<i>E. faecium</i>	0	
	増菌培養	<i>E. faecalis</i>	110	113
		<i>E. faecium</i>	3	
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>	10	10
		<i>E. faecium</i>	0	

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

対象食品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-10)。

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) 大腸菌及び“バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”の選定

対象とした細菌の分離菌株数が牛肉、豚肉ともに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) 腸球菌の選定

牛肉、豚肉ともに分離菌株数が100株を超えたため、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。なお、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-11に示した。

3) 分離菌株の保存方法

大腸菌及び腸球菌の各分離菌株を市販菌株保存キット(マイクロバンク)を用いて-80℃で保存した。

表-10 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	600	23	3.8%	59	59
	腸球菌		55	9.2%	155	100
	バンコマイシン3 μ g/ml で選択された腸球菌		2	0.3%	6	6
豚肉	大腸菌	300	9	3.0%	19	19
	腸球菌		45	15.0%	126	100
	バンコマイシン3 μ g/ml で選択された腸球菌		4	1.3%	10	10

表-11 腸球菌の産地内訳

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	57	36.8%	36	—	—	—
C	6	3.9%	4	0	0%	0
D	3	1.9%	2	27	21.4%	21
F	18	11.6%	12	23	18.3%	18
G	—	—	—	5	4.0%	4
H	—	—	—	31	24.6%	25
J	15	9.7%	10	—	—	—
K	—	—	—	6	4.8%	5
L	12	7.7%	8	—	—	—
P	23	14.8%	15	—	—	—
Q	5	3.2%	3	15	11.9%	12
R	16	10.3%	10	—	—	—
S	—	—	—	19	15.1%	15
合計	155	100%	100	126	100%	100

—：測定無し

※ 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大腸菌及び腸球菌について各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

各試験菌株に対する対象薬剤を表-12に示した。

表-12 調査対象薬剤及び対象菌種

薬剤	略号	対象菌種	
		大腸菌	腸球菌
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	○	○
エリスロマイシン	EM	×	○
リンコマイシン	LCM	×	○
コリスチン	CL	○	×
ノシヘプタイド	NHT	×	○
バンコマイシン	VCM	×	○
バージニアマイシン	VGM	×	○
サリノマイシン	SLM	×	○
オキシテトラサイクリン	OTC	○	○
アビラマイシン	AVM	×	○
バシトラシン	BC	×	○
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	○	○

○：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-13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、ノシヘプタイド、バージニアマイシン、アビラマイシンについては、2,000～0.49 μ g/mlまでの2倍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-13-1 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
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
ノシヘプタイド	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

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。

表-13-2 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
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

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。

③ 接種用菌液の調製

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。

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18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-14)。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-14に示した。また、腸球菌及び“バンコマイシン $3\mu\text{g/ml}$ 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中値をブレイクポイントとした。

表-14 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 ($\mu\text{g/ml}$)	
		大腸菌	腸球菌
アンピシリン	ABPC	32	16
セファゾリン	CEZ	32	—
セフトオフル	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	128
ゲンタマイシン	GM	16	32
カナマイシン	KM	64	128
エリスロマイシン	EM	—	8
リンコマイシン	LCM	—	128
コリスチン	CL	16	—
ノシヘプタイド	NHT	—	***
バンコマイシン	VCM	—	32
バージニアマイシン	VGM	—	1.56 ²⁾
サリノマイシン	SLM	—	16 ¹⁾
オキシテトラサイクリン	OTC	16	16
アピラマイシン	AVM	—	16
バシトラシン	BC	—	128 ¹⁾
ビコザマイシン	BCM	128	—
クロラムフェニコール	CP	32	32
ナリジクス酸	NA	32	—
エンロフロキサシン	ERFX	2	4
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

2) 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。

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-15)、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-16)。

表-15 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	—
EM	0.25-1	1-4	—	—
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-16 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

—：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[78株(牛肉由来59株, 豚肉由来19株)]及び「内閣府食品安全委員会 平成18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MIC測定試験に用いた全ての大腸菌[19株(牛肉由来6株, 豚肉由来13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 *Xba* I で37℃, 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, 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による染色を行い, 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-17に, PFGE解析に使用した機器及び試薬を表-18に示した。

表-17 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	6Z005
	普通寒天培地	栄研化学	****
	TRYPTONE SOYA BROTH	OXOID	453832

表-18 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

各菌種におけるRange, MIC50, MIC90, 耐性菌株数及び耐性率を表-19～21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10薬剤に認められ、耐性率は0.0～57.9%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-19)。特に、ABPC, APM, DSM, OTC及びCPについては、調査した牛肉及び豚肉ともに耐性菌が見られた。また、供試した78株の中には多くの薬剤に耐性を示すものもあり、6薬剤耐性菌が5株、7薬剤耐性菌が1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8薬剤に認められ、耐性率は0.0～70.0%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-20)。特に、DSM, KM, EM, LCM, VGM, OTC及びBCについては、調査した牛肉及び豚肉ともに耐性菌が見られた。また、供試した200株の中には多くの薬剤に耐性を示すものもあり、6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(VCM)3 μ g/mlを添加した培地で選択した腸球菌を分離し、様々な薬剤に対する感受性試験を実施した。

耐性菌は供試した17薬剤のうち7薬剤に認められ、耐性率は0.0～100%と、薬剤及び対象食品により大きな差があった(表-21)。また、供試した16株の中には多くの薬剤に耐性を示すものもあり、6薬剤耐性菌が1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16株におけるバンコマイシン耐性率は0%であった。

表-19-1 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	59	2-512<	4	64	6	10.2
	豚肉	19	2-512<	4	512<	4	21.1
	全体	78	2-512<	4	256	10	12.8
CEZ	牛肉	59	1-256	2	16	5	8.5
	豚肉	19	1-4	2	4	0	0.0
	全体	78	1-256	2	4	5	6.4
CTF	牛肉	59	0.25-1	0.5	1	0	0.0
	豚肉	19	0.5-1	0.5	1	0	0.0
	全体	78	0.25-1	0.5	1	0	0.0
APM	牛肉	59	2-32	8	16	15	25.4
	豚肉	19	4-16	8	16	8	42.1
	全体	78	2-32	8	16	23	29.5
DSM	牛肉	59	2-512<	8	512	12	20.3
	豚肉	19	4-512<	8	512<	9	47.4
	全体	78	2-512<	8	512<	21	26.9
GM	牛肉	59	0.5-8	2	4	0	0.0
	豚肉	19	0.5-8	2	8	0	0.0
	全体	78	0.5-8	2	4	0	0.0
KM	牛肉	59	2-512<	8	32	5	8.5
	豚肉	19	4-16	16	16	0	0.0
	全体	78	2-512<	8	16	5	6.4
CL	牛肉	59	0.5-1	0.5	0.5	0	0.0
	豚肉	19	0.5	0.5	0.5	0	0.0
	全体	78	0.5-1	0.5	0.5	0	0.0
OTC	牛肉	59	1-512	2	256	13	22.0
	豚肉	19	2-512	256	512	11	57.9
	全体	78	1-512	2	512	24	30.8
BCM	牛肉	59	16-512<	32	64	2	3.4
	豚肉	19	16-32	32	32	0	0.0
	全体	78	16-512<	32	32	2	2.6
CP	牛肉	59	0.5-256	8	128	6	10.2
	豚肉	19	8-256	8	256	3	15.8
	全体	78	0.5-256	8	128	9	11.5
NA	牛肉	59	<0.125-512	4	4	3	5.1
	豚肉	19	2-8	4	8	0	0.0
	全体	78	<0.125-512	4	4	3	3.8
ERFX	牛肉	59	<0.125-1	<0.125	<0.125	0	0.0
	豚肉	19	<0.125	<0.125	<0.125	0	0.0
	全体	78	<0.125-1	<0.125	<0.125	0	0.0
SDMX	牛肉	59	128-512<	512<	512<		
	豚肉	19	512-512<	512<	512<		
	全体	78	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-19-2 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(%)
TMP	牛肉	59	0.25-8	0.5	1	0	0.0
	豚肉	19	0.25-512<	0.5	512<	3	15.8
	全体	78	0.25-512<	0.5	1	3	3.8
FOM	牛肉	59	1-128	16	64		
	豚肉	19	16-64	32	64		
	全体	78	1-128	16	64		
TMS	牛肉	59	64-512<	512	512<		
	豚肉	19	256-512	512	512		
	全体	78	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-20-1 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	100	<0.125-2	0.5	1	0	0.0
	豚肉	100	<0.125-1	0.5	1	0	0.0
	全体	200	<0.125-2	0.5	1	0	0.0
DSM	牛肉	100	16-512<	32	64	9	9.0
	豚肉	100	8-512<	32	64	6	6.0
	全体	200	8-512<	32	64	15	7.5
GM	牛肉	100	2-16	4	8	0	0.0
	豚肉	100	0.5-16	4	8	0	0.0
	全体	200	0.5-16	4	8	0	0.0
KM	牛肉	100	8-128	32	64	2	2.0
	豚肉	100	2-512<	32	64	3	3.0
	全体	200	2-512<	32	64	5	2.5
EM	牛肉	100	<0.125-512	2	4	10	10.0
	豚肉	100	<0.125-512	2	4	3	3.0
	全体	200	<0.125-512	2	4	13	6.5
LCM	牛肉	100	<0.125-512<	32	64	6	6.0
	豚肉	100	0.5-512<	8	64	4	4.0
	全体	200	<0.125-512<	32	64	10	5.0
NHT	牛肉	100	<0.049	<0.049	<0.049		
	豚肉	100	<0.049	<0.049	<0.049		
	全体	200	<0.049	<0.049	<0.049		
VCM	牛肉	100	0.5-8	1	2	0	0.0
	豚肉	100	0.5-2	1	2	0	0.0
	全体	200	0.5-8	1	2	0	0.0
VGM	牛肉	100	0.20-12.5	6.25	6.25	70	70.0
	豚肉	100	0.20-12.5	1.56	6.25	53	53.0
	全体	200	0.20-12.5	3.13	6.25	123	61.5

※ 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-20-2 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(%)
SLM	牛肉	100	0.5-2	1	1	0	0.0
	豚肉	100	0.5-1	0.5	1	0	0.0
	全体	200	0.5-2	1	1	0	0.0
OTC	牛肉	100	<0.125-256	0.5	32	27	27.0
	豚肉	100	0.25-256	0.5	32	31	31.0
	全体	200	<0.125-256	0.5	32	58	29.0
AVM	牛肉	100	0.39-3.13	1.56	1.56	0	0.0
	豚肉	100	0.39-1.56	1.56	1.56	0	0.0
	全体	200	0.39-3.13	1.56	1.56	0	0.0
BC	牛肉	100	0.5-512	64	128	15	15.0
	豚肉	100	1-128	32	64	6	6.0
	全体	200	0.5-512	32	128	21	10.5
CP	牛肉	100	2-8	8	8	0	0.0
	豚肉	100	4-8	8	8	0	0.0
	全体	200	2-8	8	8	0	0.0
ERFX	牛肉	100	0.5-8	1	2	5	5.0
	豚肉	100	0.5-2	1	2	0	0.0
	全体	200	0.5-8	1	2	5	2.5
FOM	牛肉	100	16-128	32	32		
	豚肉	100	16-64	32	32		
	全体	200	16-128	32	32		
TMS	牛肉	100	4-512	16	64		
	豚肉	100	16-512<	16	32		
	全体	200	4-512<	16	32		

※ 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-21-1 “バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”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	6	0.5	0.5	0.5	0	0.0
	豚肉	10	0.5-1	0.5	0.5	0	0.0
	全体	16	0.5-1	0.5	0.5	0	0.0
DSM	牛肉	6	32	32	32	0	0.0
	豚肉	10	8-512<	32	32	1	10.0
	全体	16	8-512<	32	32	1	6.3
GM	牛肉	6	4-32	8	32	3	50.0
	豚肉	10	1-4	4	4	0	0.0
	全体	16	1-32	4	32	3	18.8
KM	牛肉	6	32-64	32	64	0	0.0
	豚肉	10	16-512<	32	32	1	10.0
	全体	16	16-512<	32	64	1	6.3
EM	牛肉	6	<0.125-2	0.25	2	0	0.0
	豚肉	10	2-512	2	2	1	10.0
	全体	16	<0.125-512	2	2	1	6.3
LCM	牛肉	6	64	64	64	0	0.0
	豚肉	10	1-512<	1	1	1	10.0
	全体	16	1-512<	1	64	1	6.3
NHT	牛肉	6	<0.049	<0.049	<0.049		
	豚肉	10	<0.049	<0.049	<0.049		
	全体	16	<0.049	<0.049	<0.049		
VCM	牛肉	6	1-2	1	2	0	0.0
	豚肉	10	1	1	1	0	0.0
	全体	16	1-2	1	2	0	0.0

※ 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-21-2 “バンコマイシン3 μ g/mlで選択された腸球菌”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(%)
VGM	牛肉	6	6.25	6.25	6.25	6	100
	豚肉	10	0.39-1.56	0.39	0.39	1	10.0
	全体	16	0.39-6.25	0.39	6.25	7	43.8
SLM	牛肉	6	1	1	1	0	0.0
	豚肉	10	0.5	0.5	0.5	0	0.0
	全体	16	0.5-1	0.5	1	0	0.0
OTC	牛肉	6	0.5-32	0.5	32	3	50.0
	豚肉	10	0.5-128	0.5	0.5	1	10.0
	全体	16	0.5-128	0.5	32	4	25.0
AVM	牛肉	6	1.56	1.56	1.56	0	0.0
	豚肉	10	1.56	1.56	1.56	0	0.0
	全体	16	1.56	1.56	1.56	0	0.0
BC	牛肉	6	64	64	64	0	0.0
	豚肉	10	32	32	32	0	0.0
	全体	16	32-64	32	64	0	0.0
CP	牛肉	6	8	8	8	0	0.0
	豚肉	10	2-8	8	8	0	0.0
	全体	16	2-8	8	8	0	0.0
ERFX	牛肉	6	0.5-2	0.5	2	0	0.0
	豚肉	10	0.5-1	1	1	0	0.0
	全体	16	0.5-2	1	1	0	0.0
FOM	牛肉	6	16-32	16	32		
	豚肉	10	16-32	16	16		
	全体	16	16-32	16	32		
TMS	牛肉	6	64	64	64		
	豚肉	10	32-64	64	64		
	全体	16	32-64	64	64		

※ 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(大腸菌)について

MIC測定試験に用いた全ての大腸菌[78株(牛肉由来59株, 豚肉由来19株)]及び「内閣府食品安全委員会 平成18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MIC測定試験に用いた全ての大腸菌[19株(牛肉由来6株, 豚肉由来13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に示した。

試験菌株番号07B-1~3については, いくつかのバンドは検出されたものの, スメアになる部分が認められたことから, 本調査の条件では適切な消化断片を得ることができない菌株であると考えられた。なお, 07B-1~3は同じ牛肉サンプル由来であり, わずかに検出されたバンドとスメアのパターンが一致していたことから, 同一菌株の可能性が示唆された。

図-1の系統樹において, 各原産地若しくは近隣の原産地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, 試料間(牛肉と豚肉)及び採取店舗内での共通性は認めらず, 同一パターンを示す菌株はすべて同一試料から分離されたもののみであった。さらに, 平成18年度と平成19年度に分離された菌株の共通性も認められなかったことから, 大腸菌による汚染は年単位の長期にわたるものではなく, 比較的短期間で菌株が入れ替わっていることが推測された。このことから大腸菌は加工・包装等により同一店舗内で汚染が広がるというよりは, むしろ試料固有の様々な菌株が最終的な商品までもたらされている可能性が考えられた。

一方, PFGEパターンと薬剤耐性の関連性をみると, 同一の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-2)。しかし, 図-2の□で囲んだ同一なPFGEパターンの菌株間において, CEZ, APM, DSM, KM, CL, 及びCP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, 薬剤耐性能の共通性によるクラスターの形成も認められず, 本調査では様々な薬剤耐性を示す菌株が期間, 原産地, 採取店舗地域及び試料(牛肉と豚肉)に関係なく散在していることが示された。

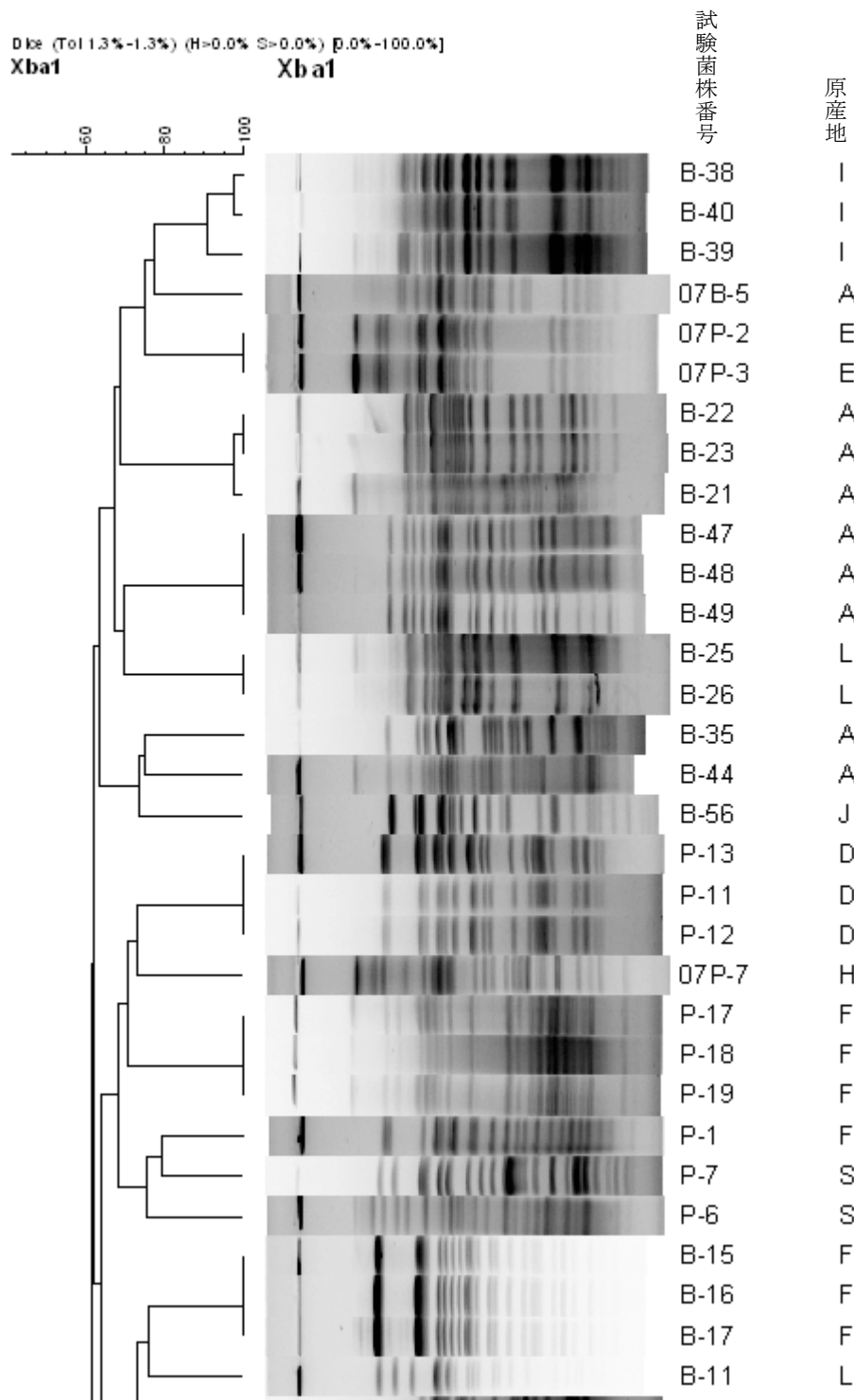


図-1-1 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

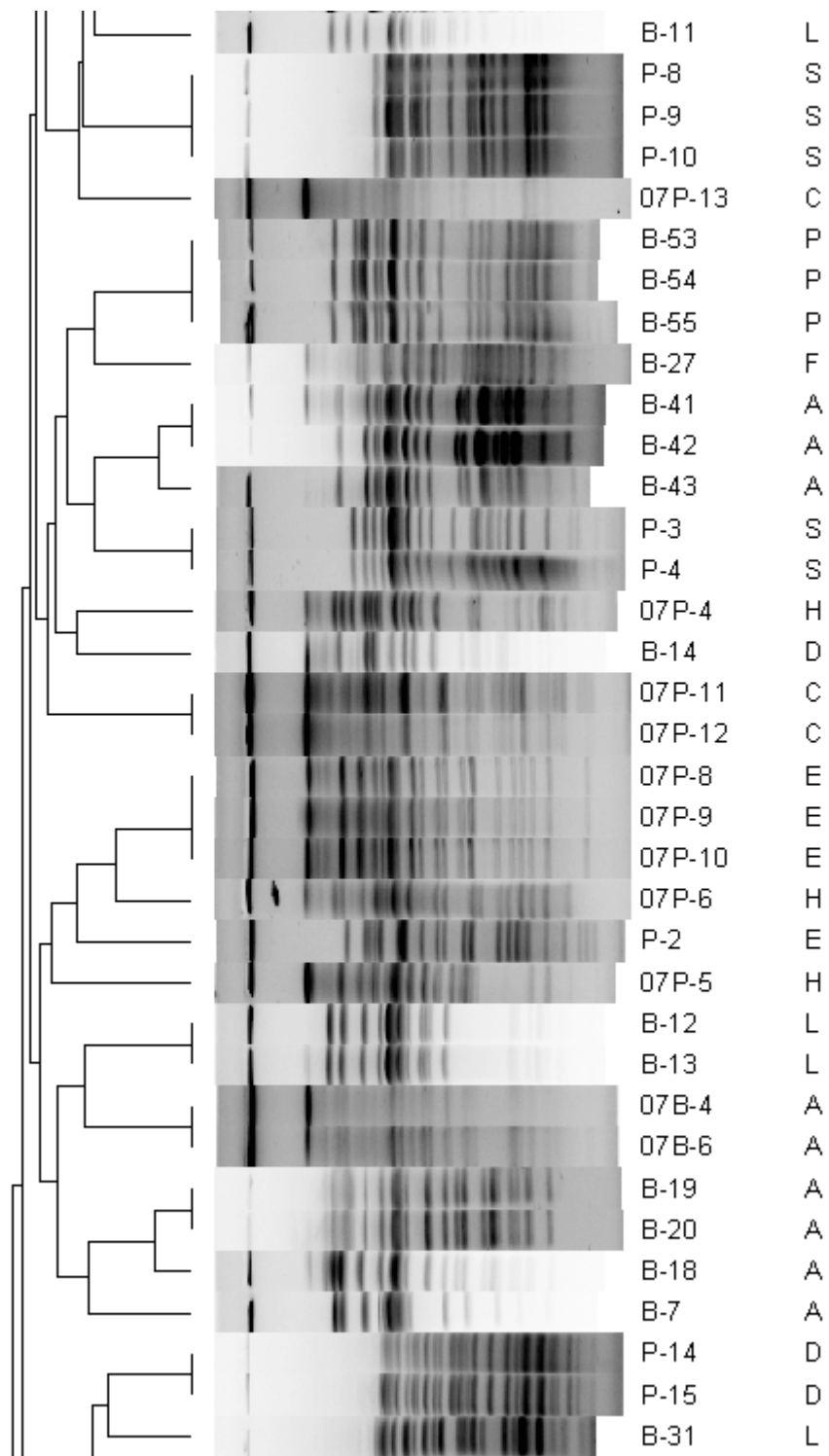


図-1-2 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

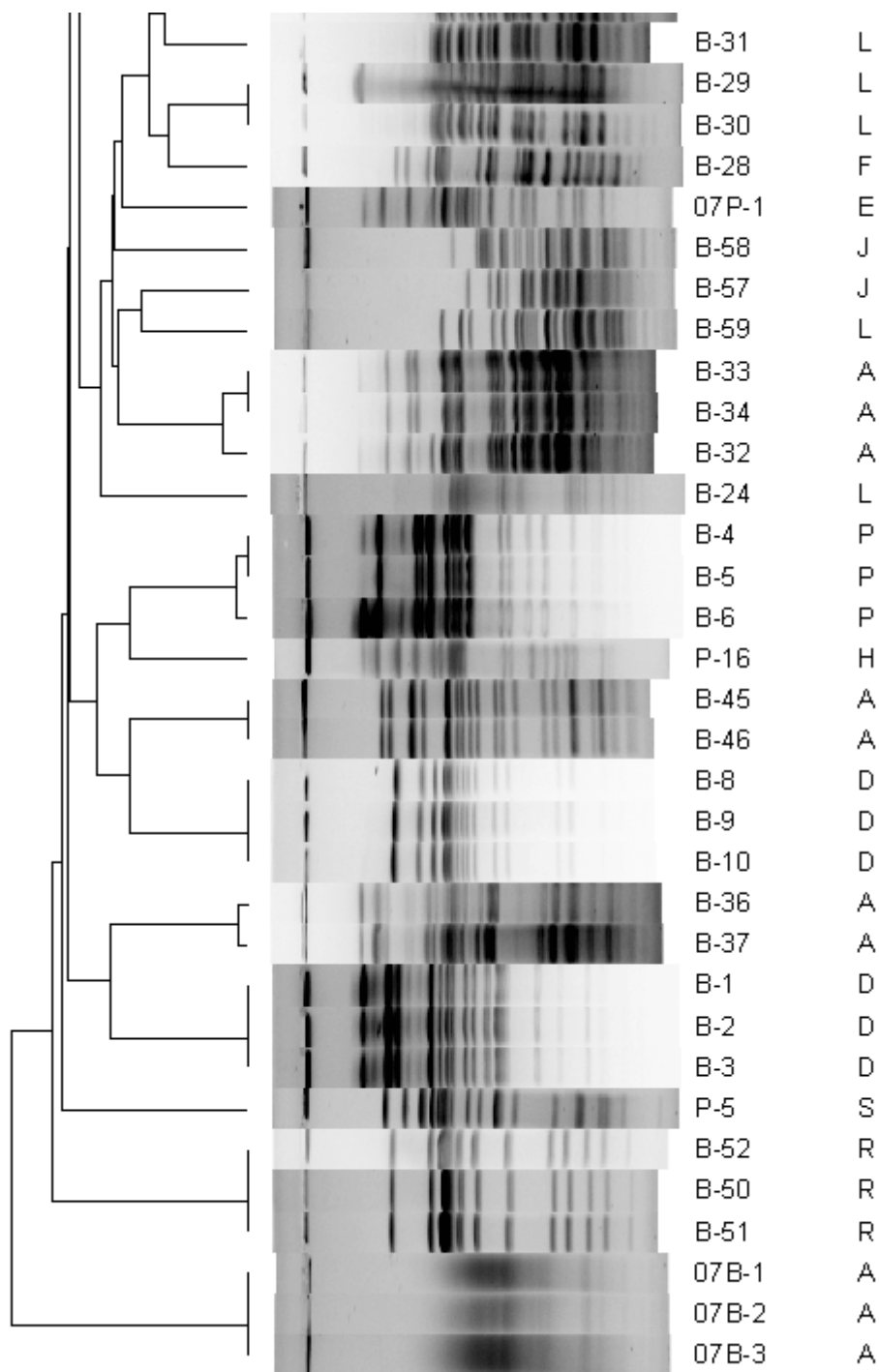


図-1-3 MIC測定試験に用いた全ての大腸菌のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

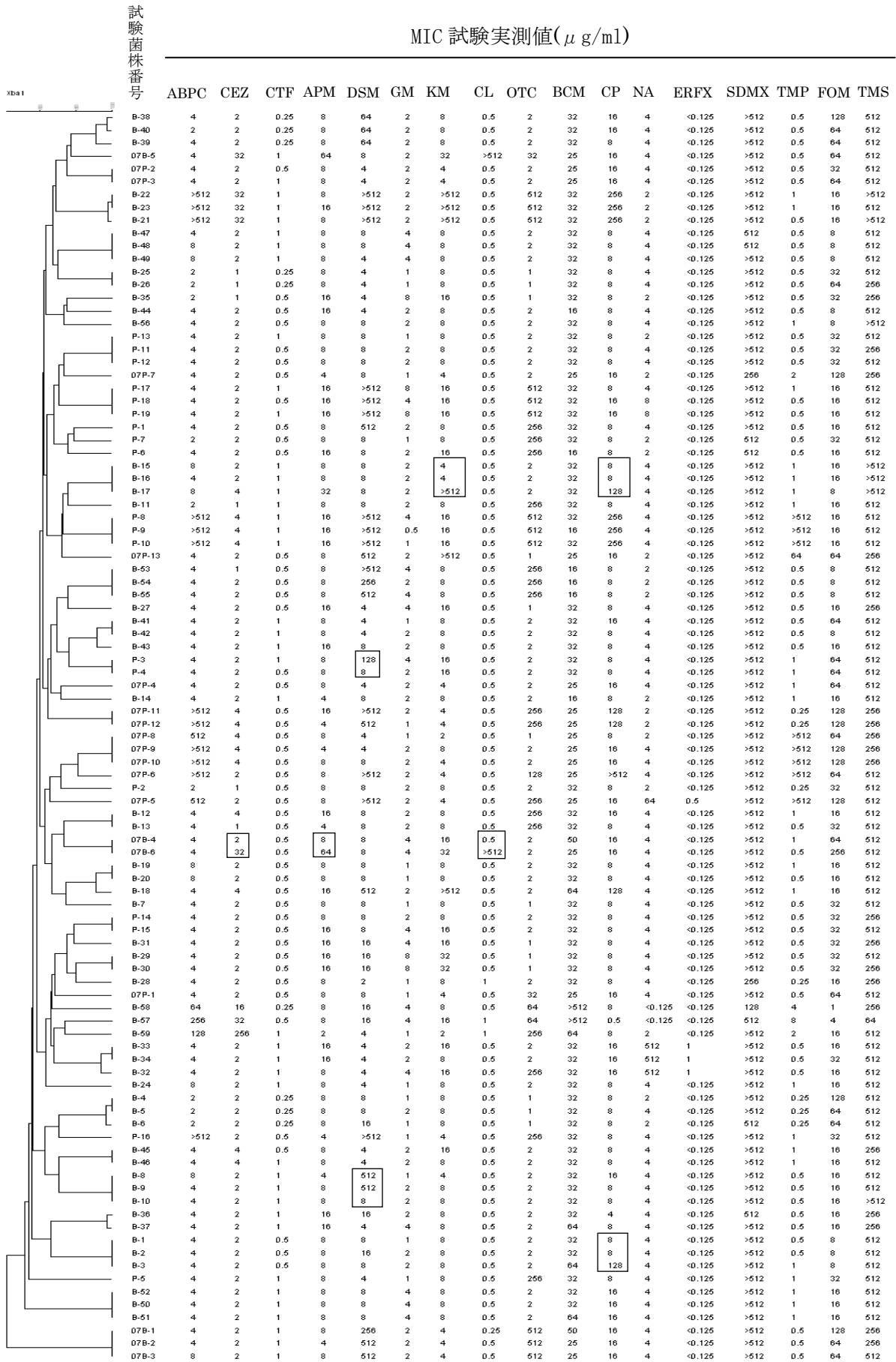
B-1～59：本調査で牛肉から分離された大腸菌

P-1～19：本調査で豚肉から分離された大腸菌

07B-1～6：「内閣府食品安全委員会 平成18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」で牛肉から分離された大腸菌

07P-1～13：「内閣府食品安全委員会 平成18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」で豚肉から分離された大腸菌

MIC 試験実測値(μg/ml)



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を菌種ごとにまとめ、表-22に示した。

表-22 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	45	33	78
腸球菌	137	63	200
バンコマイシン3 μ g/ml で選択された腸球菌	7	9	16
合計	189	105	294

以上