

研究課題名 (研究項目名)	食肉由来腸球菌の抗菌性飼料添加物に対する耐性と多剤耐性伝達性プラスミドとの関係についての調査・研究 (課題番号: 1606) (1) 危害要因・ばく露実態の評価に必要な科学的知見の集積 (2) 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究)
主任研究者	研究者名: 富田治芳 所属機関: 群馬大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成28年度～平成29年度 (2年間)

2 研究目的

家畜や伴侶動物で使用される抗菌薬とヒト由来耐性菌との関係については多くの調査・研究が行われてきた。それらの結果を踏まえ、ヒト治療用抗菌薬と交叉耐性を示す各種抗菌性物質の動物への使用は制限されている。過去においては、グリコペプチド系抗菌薬であるアボパルシンが家畜の肥育目的に使用されていた。その後、ヒト用グリコペプチド系抗菌薬であるバンコマイシンに対する耐性菌であるバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) がヒトの病院内感染症の起原菌として増加し、その原因の一つとして家畜へのアボパルシン投与と家畜環境での VRE の増加が指摘された。そのため、2000 年頃までに順次欧米諸国、および日本においてはアボパルシンの投与を含めヒトに用いられる主要な抗菌薬と同等の薬剤の家畜への投与、治療薬としての使用が禁止された。しかし、一方で飼料添加物としては未だに多くの抗菌性物質の家畜への使用が認可されている。これら抗菌性飼料添加物と菌の薬剤耐性に関しては不明な点が多い。我々は過去の研究において、家畜 (環境) 由来の VRE にはバシトラシン耐性株が多いという疫学データを得た。また台湾においては、それらの耐性は同一の多剤耐性高頻度接合伝達性プラスミド上に存在し、腸球菌間に拡散していることを明らかにしてきた。

本研究では動物 (家畜) とヒトの共通の腸管内常在菌であり、ヒトの主な病院内感染症起原菌である腸球菌を対象として、現在、飼料添加物として用いられている抗菌性物質バシトラシンの薬剤耐性を中心とした調査・研究を行った。腸球菌は哺乳類の腸管内常在菌であり、抗菌性物質の (経口) 投与と耐性菌との関係が比較的明確にリンクしている菌であり、耐性菌の増加のリスク評価として適している。また腸球菌は伝達性プラスミドやトランスポゾンなど複数の遺伝子伝達機構を保持しており、耐性遺伝子のリザーバーとして腸管内の他の各種細菌への耐性遺伝子の伝播、拡散 (耐性化) にも寄与している。バシトラシンはヒト治療薬としては皮膚や粘膜など局所感染症に対し主に外用薬として用いられるため、臨床分離株においてはその薬剤耐性に関する知見はほとんど存在しない。そのため臨床における抗菌薬選択のための薬剤感受性・耐性の判定基準 (ブレイクポイント MIC 値) も存在しない。家畜 (食肉) 由来の腸球菌におけるバシトラシン耐性、バンコマ

イシン耐性など他の耐性との関連性、多剤耐性伝達性プラスミドの有無（保持状況）やその拡散状況について調べることで、腸球菌の多剤耐性化と VRE の増加、および腸内細菌叢の耐性化において抗菌性飼料添加物を与える影響とリスクを評価するための知見となることが期待できる。また本研究で得られた結果を今後のヒト由来腸球菌のバシトラシン耐性株の解析結果と比較することによって、家畜環境中の耐性菌のヒト環境への伝播、拡散についてのリスク評価を適正に行うことが可能となる。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
(1) 食肉検体の収集（国内外の鶏肉）	1) 食肉検体の収集	富田治芳（群馬大学）
(2) 食肉検体からの薬剤耐性腸球菌の分離	1) 食肉検体からの耐性腸球菌の分離	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）
(3) 食肉由来腸球菌のバシトラシン耐性の解析	1) 食肉由来腸球菌のバシトラシン感受性測定	谷本弘一（群馬大学）
	2) ブレークポイント値（感受性、耐性の判定基準MIC値）の決定	富田治芳（群馬大学）
	3) 食肉由来腸球菌の耐性頻度（耐性率）の調査	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）
(4) バシトラシン耐性の伝達性の解析	1) バシトラシン耐性の伝達性の確認	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）
	2) 高頻度接合伝達性プラスミドの確認	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）
(5) バシトラシン耐性遺伝子 <i>bcr</i> の確認	1) バシトラシン耐性遺伝子 <i>bcr</i> の確認	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）
(6) バシトラシン耐性腸球菌の示す各種抗菌薬耐性の解析	1) 各種抗菌薬の感受性（MIC値）測定と耐性頻度（耐性率）の決定	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）
	2) 各種抗菌薬耐性の伝達性の確認	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）
(7) バシトラシン耐性と他の薬剤耐性	1) 各種薬剤耐性の同時伝達性の解析（耐性遺伝子の同一担体上の存在を確認）	富田治芳、谷本弘一（群馬大学）

との関係の解明（多剤耐性プラスミドの同定）	2) 多剤耐性伝達性プラスミドの検出、同定	富田治芳（群馬大学）
-----------------------	-----------------------	------------

4 倫理面への配慮について

調査・研究に用いる材料は食肉（家畜）とその試料から分離された腸球菌の解析であるため、人における倫理的な問題は含まれない。またヒト臨床分離株を対照株として用いるが、その菌株の情報には分離した患者を特定する情報は含まれておらず、倫理的に問題は生じないと考える。

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：食肉検体の収集（国内外の鶏肉）

1) 個別課題名：食肉検体の収集（研究担当者：富田治芳（所属機関名：群馬大学））

平成 28 年度（2016 年度）は国内食肉として各食肉検査所に依頼し、国内産鶏肉検体（拭き取りスワブ）を A 県から 80 検体、B 県から 30 検体、C 県から 40 検体の合計 150 検体を収集した。輸入食肉として鶏肉検体をブラジル産 38 検体、アメリカ産 20 検体、タイ産 8 検体、フィリピン産 8 検体、デンマーク産 2 検体の合計 76 検体を収集した。平成 28 年度は合計、鶏肉 226 検体を解析に用いた（表 1）。なお、A 県からの検体は、当初に収集送付されたスワブ検体がやや乾燥し、ほとんど菌が検出されなかったことから、40 検体を追加収集し再解析を行った。そのため一部の解析結果では最初の 40 検体分のデータを除くこととした（図 1、図 2）。

平成 29 年度（2017 年度）は国内産鶏肉検体（拭き取りスワブ）を A 県から 40 検体、B 県から 30 検体、C 県から 40 検体の合計 110 検体を収集した。輸入食肉としてブラジル産 63 検体、アメリカ産 13 検体、タイ産 11 検体、フィリピン産 1 検体の合計 88 検体を収集した。抗菌性飼料添加物バシトラシンの国内の使用状況としては主に豚や牛にも使用されることから、平成 29 年度は鶏肉検体とともに豚肉や牛肉検体も追加調査することとし、国内産（C 県）の豚肉 58 検体と牛肉 40 検体を収集した（表 1）。豚肉検体と牛肉検体の採取部位等の詳細情報について添付する（表 2）。平成 29 年度は鶏肉 198 検体、豚肉 58 検体、牛肉 40 検体の合計 296 検体を用い、解析を行った。

最終的に本研究では二年間で、国産鶏肉 220 検体（260 検体収集）、輸入鶏肉 164 検体（ブラジル産 101 検体、米国 33 検体、タイ 19 検体、フィリピン 9 検体、デンマーク 2 検体）、国産豚肉 58 検体、国産牛肉 40 検体の合計 482 検体を収集、解析に用いた（収集は 522 検体）。解析検体数としては、本調査研究目的として十分と考えられた。なお、輸入鶏肉の輸入国別数は、現在の各国からの輸入鶏肉量に出来る限り相関するようにサンプリングを依頼した。

(2) 研究項目名：食肉検体からの薬剤耐性腸球菌の分離

1) 個別課題名：食肉検体からの耐性腸球菌の分離（研究担当者：富田治芳、谷本弘

一（所属機関名：群馬大学）

外国産の検体（非加工生肉）は 100g を緩衝ペプトン水 100ml でホモジナイズした。一方、国内産鶏肉の拭き取りスワブは滅菌水 100ml に浸透させホモジナイズした。それぞれのホモジナイズ抽出検体液を腸球菌用選択液体培地（enterococcosel 培地）中で一夜増菌処理を行い、培養液 0.1ml を薬剤添加および薬剤非添加の腸球菌用選択寒天培地（enterococcosel あるいは BEAA 培地など）それぞれ一枚に塗布し培養した。本研究では、これまでの予備実験から、ポリペプチド系抗菌性飼料添加物であるバシトラシン（10 U/ml 濃度）を主な耐性腸球菌選択培地として用いた。今回の解析では網羅的な解析を行うために、各選択培地上に複数のコロニーが発育した場合、1 平板（1 検体）あたり最大 2 コロニーを釣菌し、それぞれ純培養後、各種解析に用いた。

平成 28 年度の結果を表 3 と表 4 に示す。なお、表には後述の研究項目（5）の *bcrD* 遺伝子の保有状況についての結果も示した（図 1）。バシトラシン非含有培地を用いた方法では、226 検体中の 146 検体（65%）から腸球菌を合計 274 株分離した（表 3）。検体不良の 40 検体を除くと 186 検体中 145 検体（78%）から腸球菌を検出した。またバシトラシン含有培地を用いた方法では、226 検体中の 97 検体（43%）から腸球菌を合計 194 株分離した（表 4）。検体不良の 40 検体を除くと 186 検体中 97 検体（52%）から腸球菌を検出した。薬剤非含有の腸球菌選択培地を用いた際、食肉検体から極めて高頻度（不良検体を除くと約 8 割近く）で腸球菌株が分離され、多くの鶏肉検体に腸球菌が付着、存在していることが確認された。薬剤非含有培地と含有培地を用いて分離された腸球菌 468 株（それぞれ 146 検体から 274 株、97 検体から 194 株）は主に *E. faecalis*（218 株、46.6%）と *E. faecium*（165 株、35.3%）であり、これら 2 菌種がいずれの選択培地においても全体の約 8 割を占めた。他の菌種としては *E. gallinarum*（9 株、1.9%）、*E. casseliflavus*（11 株、2.4%）であり、不明菌種（65 株、13.9%）も含まれていた。

平成 29 年度の結果を表 5 と表 6 に示す。バシトラシン非含有培地を用いた方法では、鶏肉 198 検体中 164 検体（83%）から、豚肉 58 検体中 27 検体（47%）から、牛肉 40 検体中 12 検体（30%）から、それぞれ腸球菌を合計 384 株分離した（表 5）。平成 28 年度同様に鶏肉検体からは高頻度で腸球菌株が分離され、多くの鶏肉検体に腸球菌が付着、存在していることが確認された。ただし、A 県産鶏肉については 2 年間いずれも比較的分離頻度は低く、腸球菌による汚染が少ないことが推察された。鶏肉検体と比較し、豚肉、牛肉検体からの腸球菌の分離頻度は低く、特に牛肉においては腸球菌の付着は少ないことが明らかとなった。一方、バシトラシン含有培地を用いた方法では、鶏肉 198 検体中 131 検体（66%）から、豚肉 58 検体中 5 検体（8.6%）から、それぞれ腸球菌を合計 270 株分離した。薬剤添加培地上では牛肉 40 検体からの腸球菌の分離は認めなかった（表 6）。分離された腸球菌 654 株（薬剤非含有培地と含有培地それぞれ 203 検体から 384 株、136 検体から 270 株）は主に *E. faecalis*（405 株、61.9%）と *E. faecium*（120 株、18.3%）であり、前年同様にこれら 2 菌種が全体の約 8 割を占めた。他の菌種としては *E. casseliflavus*（16 株、2.4%）、*E. gallinarum*（25 株、3.8%）、*E. avium*（19 株、2.9%）、*E. durans*（17 株、2.6%）、*E. hirae*（10 株、1.5%）であり、不明菌種（36 株、5.5%）も含まれていた。

表 7 に今回の二年間の調査において、薬剤非含有培地で分離した腸球菌についての、菌

種別内訳のまとめを示す。

(3) 研究項目名：食肉由来腸球菌のバシトラシン耐性の解析

1) 個別課題名：食肉由来腸球菌のバシトラシン感受性測定（研究担当者：谷本弘一（所属機関名：群馬大学））

上記の研究項目（2）で得られた食肉由来腸球菌株のうち、ヒト臨床上問題となる二つの菌種 *E. faecalis* と *E. faecium* についてバシトラシンに対する感受性（MIC 値の測定）を寒天平板希釈法によって測定した。食肉から分離された腸球菌株数が極めて多く全株の測定ではなく、後述の研究項目（5）の解析で明らかとなった（バシトラシン耐性に関与するとされていた）*bcr* 遺伝子（*bcrD*）の保有（陽性）株と非保有（陰性）株の中から *E. faecalis* と *E. faecium* を適宜選び、感受性を測定した。また便宜的に感受性および耐性の対照株としては、それぞれ耐性遺伝子を保持しない実験株および、以前に食肉検体から分離されたバシトラシン耐性遺伝子 *bcrD* を保持する株（高度耐性株と推定される）とその伝達実験株を用いた。2016 年に収集した鶏肉検体からバシトラシン非含有選択培地で分離した株のうち、*bcrD* 陽性であった全ての *E. faecalis* 株と *E. faecium* 株、および産地に偏りがないように無作為に選択した *bcrD* 陰性の *E. faecalis* 32 株と *E. faecium* 20 株についての測定結果を図 1 に示す。なお、*bcr* 遺伝子の保有状況についても同時に示した（青は *bcrD* 非保有・陰性株、赤は *bcrD* 保有・陽性株）。2017 年度は薬剤含有腸球菌選択寒天培地を用いて分離した菌株のうち *bcrD* 陽性の *E. faecalis* 166 株と *E. faecium* 30 株および *bcrD* 陰性の *E. faecium* 23 株、薬剤非含有腸球菌選択寒天培地を用いて分離した菌株のうち各産地に偏りがないように無作為に選択した *bcrD* 陰性の *E. faecalis* 59 株と *E. faecium* 41 株について MIC 値を決定した（図 2）。

2) 個別課題名：ブレイクポイント値（感受性、耐性の判定基準 MIC 値）の決定（研究担当者：富田治芳（所属機関名：群馬大学））

上記の個別課題 1) の解析によって得られた腸球菌のバシトラシン感受性ヒストグラムからブレイクポイント値を設定することとした。2016 年と 2017 年に分離された *E. faecalis* と *E. faecium* についてのバシトラシン感受性ヒストグラムの結果はいずれも MIC 値の 16~32 U/ml を境界とする二峰性のピークが確認され、特に *E. faecalis* についてはピークがより明確であった。*E. faecalis* の低濃度でのピーク値は 2~4 U/ml、*E. faecium* では 2~8 U/ml であったことから、この濃度域が野生型（感受性）腸球菌の MIC 値と考えられた。これらの結果は、*E. faecium* 株は *E. faecalis* に比較し、他の薬剤同様にバシトラシンに対する感受性も若干低い（より耐性である）ことが考えられた。一方で、高濃度域の MIC 値のピークはいずれの菌種も 256 U/ml 近辺にあり、他の（感受性菌の）ピークとは明らかに異なること、また *E. faecalis* の一部の株においては MIC 値 512 U/ml を超える高度の耐性を示すことから外來性の耐性遺伝子、おそらくは *bcrRABD* の存在が示唆された。一方で、*E. faecium* では 32 U/ml を境に *bcrD* 陽性菌群と陰性菌群からなる二峰性のピークが確認されるものの、*bcrD* 陰性菌の一部には 32 U/ml 以上の MIC 値を持つ株が存在した。同じ現象は 1998 年から 1999 年に家畜やペットから分離された *E. faecalis* 及び *E. faecium* におけるバシトラシンの MIC 値を調査した他の報告でも確

認されている。このことは後述の研究項目（5）にあるように、*E. faecium*においては、*bcrAB*や*bcrABR*のような遺伝子型の存在、もしくは未知のバシトラシン耐性機構の存在が考えられた。

MIC値のヒストグラムの結果より、腸球菌に対するバシトラシンのブレイクポイント値は16~32 U/mL前後と考え、本調査では細菌学的なブレイクポイント値を32 U/mLと決定し、これ以上のMIC値を示す株は高度耐性株であると判定した。また後述する研究項目（5）の腸球菌株のバシトラシン耐性遺伝子*bcr*の保有の有無の結果からこのブレイクポイント値について検証した結果からも、妥当であることが確認された。なお、MIC値とバシトラシン耐性遺伝子*bcr*の保有の有無の結果から、明らかな耐性（R）は32 U/ml以上、感受性（S）は16 U/ml以下、16~32 U/mlは中間（I）とすることも適当と考えられた。ただし、これらの値は臨床での治療効果や薬物動態を考慮しない、あくまでも細菌学的な判定基準と考える。

さらに図3に2016年にバシトラシン含有培地で分離した腸球菌179株（*bcrD*陽性*E. faecalis* 128株、*bcrD*陰性*E. faecalis* 1株、*bcrD*陽性*E. faecium* 33株、*bcrD*陰性*E. faecium* 17株）の*bcrD*遺伝子（後述の研究項目（5））の保有状況とバシトラシン感受性との関係を示す。耐性遺伝子*bcrD*の保有とMIC値（耐性の判定）とは高い相関があることから、腸球菌において*bcrD*遺伝子の保有をバシトラシン耐性と判断可能であることが示された。

3) 個別課題名：食肉由来腸球菌の耐性頻度（耐性率）の調査（研究担当者：富田治芳、谷本弘一（所属機関名：群馬大学））

上記にて決定したバシトラシンのブレイクポイント値(32 U/mL)と後述の研究項目(5)で解析した*bcrD*遺伝子の保有状況との相関性に基づき、食肉由来腸球菌の高度バシトラシン耐性頻度（耐性率）は*bcrD*の陽性率として判断可能であることが判った。ここでは薬剤非添加培地による結果は耐性菌の定量的（量的）な検出頻度を示すが、薬剤添加培地（バシトラシン 10 U/ml）による結果は耐性菌の定性的（質的）な検出頻度を示すと考えられる。薬剤非添加培地での*bcrD*陽性株の検出頻度は、2016年収集検体では分離腸球菌株の16.8%であったことから、総検体数では約13%（腸球菌検出率78%×0.168）であった（表3）。また2017年収集検体では総検体数の14.2%であった（表4）。いずれの年も国産鶏肉よりも輸入鶏肉からの*bcrD*保有腸球菌の検出率が高く（30%~50%）、またその多くが*E. faecalis*であった。輸入鶏肉にはバシトラシン耐性*E. faecalis*株が比較的多く付着、存在していることが示された。国産鶏肉には頻度は低いものの、バシトラシン耐性*E. faecium*株が有意に多く付着、存在していることが示された。

一方、薬剤添加培地による定性的検出では、10 U/ml培地で発育するコロニーの約9割が*bcrD*陽性株であった（表4、表6、表7）。国内外の鶏肉検体いずれからも*bcrD*陽性株が高頻度で検出され、2016年収集検体では総検体数の47.3%（186検体中88検体）から、また2017年収集鶏肉検体から66.2%（198検体中131検体）から、それぞれ*bcrD*陽性株が検出された。ただし分離頻度は国内産地、輸入国によって差を認めた。一方、国内産（C県）の豚肉検体と牛肉検体からはバシトラシン耐性腸球菌はほとんど検出されず、豚肉検体の約1割から菌種不明な株が検出されたが、*bcrD*陽性は1株のみで、牛肉検体

からはコロニーの発育自体を全く認めなかった。耐性株の菌種としては *E. faecalis* が優位（約7割）であり、また発育した *E. faecalis*、*E. casseliflavus*、*E. gallinarum*、*E. durans* のほぼ100%が *bcrD* 陽性株であった。一方、*E. faecium* 株は陽性率が約60%と低く、薬剤による耐性菌の選択としては10 U/mlの濃度がやや不十分であったか、あるいは他の耐性機構の存在も考えられた。

2016年のEU諸国での家畜環境における耐性菌調査に関する論文のまとめとして、ブロイラーからのESBL産生多剤耐性大腸菌およびAmpC産生多剤耐性大腸菌の、定量的検出頻度（食肉分離大腸菌あたり）と定性的検出頻度（食肉検体あたり）のデータの両方が報告されている（EFSA Journal. 2018;16(2):5182）。いずれの耐性菌もヒト臨床で重要な第三代セファロスポリン系抗菌薬に耐性を示し、問題となる多剤耐性菌である。その報告では、EU諸国の平均値としてESBL産生もしくはAmpC産生大腸菌の定量的分離頻度と定性的分離頻度はそれぞれ2.2%と57.4%である。本調査対象であるバシトラシン耐性腸球菌の分離頻度（それぞれ13~14%と47~66%）を単純に比較することは適切ではないが、セファロスポリン耐性大腸菌よりもやや高い分離頻度といえるだろう。

2013年のオーストラリア、および2010年のカナダからの調査報告では、食鳥（ブロイラー）の糞便（腸内容物）から分離された腸球菌における *bcrD* 検出率は、それぞれ97.2%、92%と極めて高頻度であることが示されている（Avian Pathology. 2013;42(1):45-54, Appl Environ Microbiol. 2010;76, 8033-8043）。さらにオーストラリアの報告では、それ以前の2000年頃の調査では約50%の検出頻度であったとされ、その頻度が上昇したのは、アボパルシンの使用禁止とバージニアマイシンの使用制限により、バシトラシン使用量が増えた影響であるとされている。我々の結果として、食肉由来腸球菌の *bcrD* 保有率が他国でのバシトラシン耐性腸球菌の分離頻度よりも低いのは、今回の対象が腸管内容物ではなく食肉検体からの分離であり、調査方法の違いによるものと考えられる。

表8にバシトラシン含有(10 U/ml)選択培地を用いて分離された *bcrD* 陽性腸球菌の菌種別内訳を示す。

（4）研究項目名：バシトラシン耐性の伝達性の解析

1）個別課題名：バシトラシン耐性の伝達性の確認（研究担当者：富田治芳、谷本弘一（所属機関名：群馬大学）

本研究課題（2）（3）で分離した食肉由来の高度バシトラシン耐性株（MIC値32U/ml以上を示す株）を供与菌、バシトラシン感受性実験株を受容菌として、固形培地上および液体培地中での接合伝達実験を行いバシトラシン耐性の伝達性を調べた。さらに液体培地による伝達実験で得られた耐性伝達株を用い、再伝達実験を行うことで伝達性の確認を行った。平成28年度分離株の解析の結果、固形培地上で伝達したものは用いた205株（*E. faecalis* 139株、*E. faecium* 53株、その他の菌種13株）中98株（47.8%）であった（表9）。平成29年度分離株の解析結果では、固形培地上で伝達したものは用いた221株（*E. faecalis* 166株、*E. faecium* 55株）中51株（23.1%）であった（表10）。一方、平成28年度分離株で液体培地中で伝達したものは51株（23.1%）であった。そのうち液体培地中での再伝達、再々伝達が可能であったものは42株（全体の21.0%）であり、これらは全て *E. faecalis* でかつ *bcrD* 陽性株であった（表11）。平成29年度分

分離株の解析では、液体培地中で繰り返し伝達性を示したものは 26 株（全体の 11.8%）で、やはり全て *E. faecalis* かつ *bcrD* 陽性株であった（表 1 1）。解析した *E. faecalis* の *bcrD* 陽性株（平成 28 年度 133 株、平成 29 年度 165 株）のうち、それぞれ 32%、16% が明らかな高頻度接合伝達性を示し、バシトラシン耐性が *E. faecalis* に特有の高頻度接合伝達性プラスミド上に存在していると推定された。

2) 個別課題名：高頻度接合伝達性プラスミドの確認（研究担当者：富田治芳、谷本弘一（所属機関名：群馬大学））

本研究では液体培地中で高頻度での接合伝達が可能な、いわゆるフェロモン反応性プラスミドに着目し、これについて詳細に解析、検討を行うこととした。フェロモン反応性プラスミドは腸球菌 *E. faecalis* に特異的に存在する高頻度接合伝達性プラスミドであり、多くの臨床分離腸球菌株が保持している。フェロモン反応性プラスミドには病原性因子として、cytolysin(β 溶血毒素/バクテリオシン)や各種バクテリオシン、紫外線耐性、各種薬剤耐性といった各種の形質がコードされている。例えば pAD1 プラスミド上には cytolysin というヒト赤血球膜と各種細菌の膜を破壊する外毒素（タンパク質）がコードされている。他にも、バクテリオシン産生プラスミド pPD1 やヘモリシン産生プラスミド pAD1、テトラサイクリン耐性プラスミド cCF10 などが知られている。上記の研究課題 1) の液体培地を用いた接合伝達実験において、バシトラシン耐性の伝達性が確認された *bcrD* 陽性 *E. faecalis* 株（2016 年分離株 42 株、および 2017 年分離株 45 株）からプラスミド DNA を抽出し、アガロース電気泳動によるプラスミド DNA の解析を行ったところ、ほとんどの株は複数個のプラスミドを保持していた（データ省略）。一方、バシトラシン耐性の伝達がフェロモン反応性プラスミドによるものであるか調べるため、食肉由来バシトラシン耐性接合伝達株におけるフェロモン反応性試験を実施した。伝達実験で得られた株のうち、2016 年度は再々接合伝達株 42 株を対象に複数のフェロモンを産生する *E. faecalis* FA2-2 株の培養上清(Culture Fluid, CF)に対する反応性および合成フェロモン(cPD1, cAM373, cOB1, cCF10, cAD1)に対する反応性を調べた。2017 年度は 1 回以上の伝達能が認められた分離株 45 株を対象に CF に対する反応性を、最終接合伝達株(1 回だけ伝達した株は接合伝達株、2 回伝達した株は再接合伝達株、3 回伝達した株は再々接合伝達株)を対象に合成フェロモンによる凝集応答性を調べた（表 1 2）。2016 年度は 42 株中 14 株が CF に反応し、このうち 7 株が cOB1 に、1 株が cCF10 に、1 株が cAD1 に反応していた。2017 年度は、45 株中 18 株が CF に反応し、このうち 2 株が cPD1 に、3 株が cOB1 に、3 株が cCF10 に、2 株が cAD1 に反応した。また、CF に対しては反応する一方で、上記の各種合成フェロモンには反応しないバシトラシン耐性接合伝達株も存在した。液体培地中で伝達性を示したバシトラシン耐性腸球菌株の多くがフェロモン反応性プラスミドを保持していることが明らかとなった。

(5) 研究項目名：バシトラシン耐性遺伝子 *bcr* の確認

1) 個別課題名：バシトラシン耐性遺伝子 *bcr* の確認（研究担当者：富田治芳、谷本弘一（所属機関名：群馬大学））

食肉由来腸球菌（合計 468 株）についてバシトラシン耐性遺伝子 *bcrD* に特異的なプラ

イマーを用いた PCR 法によって、耐性遺伝子の有無を確認した (図 6)。その結果、上記研究項目 (3) の解析結果 (表 3～表 6、図 1～図 3) で示したように、平成 28 年度の解析ではバシトラシン非含有培地を用いて分離された腸球菌 274 株中、46 株 (16.8%) が *bcrD* 陽性であった。またバシトラシン含有培地を用いて分離された腸球菌 194 株中、174 株 (89.7%) が *bcrD* 陽性であった。地域別に見ると A 県では 40 検体中 4 検体 (10%) と最も低く、次いで B 県では 30 検体中 6 検体 (20%) であった。一方で、C 県では 40 検体中 39 検体 (98%) と *bcrD* 陽性検体率は高かった。また、菌種別での *bcrD* 陽性率は *E. faecalis* (129 株中 128 株、99%)、*E. casseliflavus* (5 株中 5 株、100%)、*E. gallinarum* (2 株中 2 株、100%) に対し、*E. faecium* では、50 株中 33 株 (66%) であった。

また平成 29 年度の解析では、バシトラシン非含有培地を用いて分離された鶏肉由来腸球菌 309 株中 78 株 (25.2%) が *bcrD* 陽性であった。またバシトラシン含有培地を用いて分離された鶏肉由来腸球菌 261 株中、236 株 (90.4%) が *bcrD* 陽性であった。地域別に見ると A 県では 40 検体中 5 検体 (13%) と 2016 年度と同様に最も低かった。しかし、2016 年度と異なり、B 県では 30 検体中 25 検体 (83%) と上昇した。豚肉検体からはバシトラシン含有培地を用いて分離された株において *bcrD* 陽性株 (菌種不明) が 1 株のみ検出された。一方、牛肉検体からは *bcrD* 遺伝子陽性腸球菌の分離はいずれも認めなかった。菌種別分離率は鶏肉検体由来においては、*E. faecalis* (261 株中 166 株、64%)、続いて *E. faecium* (261 株中 53 株、20%)、*E. gallinarum* (261 株中 19 株、7.3%)、*E. durans* (261 株中 16 株、6.1%)、*E. casseliflavus* (261 株中 5 株、1.9%) となっており、薬剤非含有培地で分離されていた *E. avium* や *E. hirae* は分離されなかった。これは、他の菌種とは異なり、*E. avium* や *E. hirae* ではバシトラシン感受性株が主であり、*bcrD* を含むバシトラシン耐性遺伝子が広がっていない可能性が考えられた。

解析結果では高度バシトラシン耐性を示すほぼ全ての株が *bcr* 遺伝子を保有していたことから、腸球菌の高度バシトラシン耐性は *bcr* 遺伝子を獲得することによると考えられた。しかし一部の株においては、*bcrD* が PCR 法によって検出されないにもかかわらず、32 U/ml 以上の耐性を示す株も含まれていた。これまでに、*bcrD* を持たない *bcrAB* や *bcrABR* のような遺伝子型も報告されている (Matos R. *et al.* 2009. Study on the dissemination of the *bcrABDR* cluster in *Enterococcus* spp. reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance. International Journal of Antimicrobial Agents. 34. 142-147)。 *E. faecium* においては、*bcrAB* や *bcrABR* のような遺伝子型もしくは未知のバシトラシン耐性機構が存在するのではないかと考えられる。

今回の調査では、地域によって、あるいは収集年度によって鶏肉由来バシトラシン耐性 (*bcrD* 陽性) 腸球菌株の分離頻度が異なった。これは産地による差だけではなく、収集した検体の鶏舎による違い、あるいは食鳥処理場等の処理や食肉輸送過程での交差汚染などの影響も考えられる。しかし、検体収集は各施設や業者への依頼 (半ばボランティア) によるもので、正規業務の合間での作業であり、全ての施設と業者において検体採取方法を統一することは現実的には困難である。今回の結果においては検体採取に関する詳細な情報も考慮することが望ましいが、その情報が得られていないのが残念である。平成 29 年度は豚肉と牛肉についても解析を行ったが、豚肉 1 検体から *bcrD* 陽性株が検出

されたのみであり、腸球菌の分離頻度自体が低く腸内容物による汚染が少なく、かつバシトラシン耐性菌の付着、存在も極めて稀であることが明らかとなった。今回、単年度の解析で、かつ産地がC県のみと限定される検体であるものの、鶏肉と比較し、豚肉と牛肉が細菌的に清浄であることが示されたと考える。

(6) 研究項目名：バシトラシン耐性腸球菌の示す各種抗菌薬耐性の解析

1) 個別課題名：各種抗菌薬の感受性 (MIC 値) 測定と耐性頻度 (耐性率) の決定 (研究担当者：富田治芳、谷本弘一 (所属機関名：群馬大学))

食肉由来バシトラシン耐性腸球菌株の各種抗菌薬 (グリコペプチド系、マクロライド系、キノロン系、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系など) に対する感受性を、寒天平板希釈法を用いて測定する。米国 CLSI 基準を用い、その耐性頻度 (耐性率) を調べ、バシトラシン耐性および *bcrD* 陽性株と他の薬剤耐性との関係を解析した。その結果、平成 28 年度分離株の解析からは、エリスロマイシン、ニューキノロン、テトラサイクリン、および一部のアミノグリコシド系 (ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン) の各抗菌薬耐性がバシトラシン耐性株および *bcrD* 陽性株にやや多く認め、それらとの関連性が示唆された (表 1 3 - 1、表 1 3 - 2、表 1 4 - 1、表 1 4 - 2)。

バシトラシン耐性の高頻度伝達性を示す株について、他の薬剤感受性を表 1 5 (2016 年分離株) と表 1 6 (2017 年分離株) に示す。2016 年分離株ではバシトラシン耐性の接合伝達能を持つ分離株 42 株のうち、エリスロマイシン耐性株は 37 株 (88.1%) と最も多く、次いで、ストレプトマイシン耐性株は 21 株 (50%)、カナマイシン耐性株は 21 株 (50%)、テトラサイクリン耐性株は 19 株 (45.2%)、スペクチノマイシン耐性株は 7 株 (16.7%)、ゲンタマイシン耐性株は 2 株 (4.8%) であった。一方で、バンコマイシン耐性株やテイコプラニン耐性株は検出されなかった。

本研究調査において分離された食肉由来腸球菌株においては、高度バンコマイシン耐性を示す VRE 株は含まれていなかった。なお、同じ検体を用いた我々の他の研究からは国内外の鶏肉検体から少数であるものの VRE が検出されている (選択的増菌法による定性的検出法による)。以前の我々の研究から、台湾の家畜環境 (食肉) とヒト臨床から分離される VanA 型 VRE 株においては高度バンコマイシン耐性と高度バシトラシン耐性が高率で同一の伝達性プラスミド上に存在することを明らかにした。今回の調査では国内で流通している鶏肉に関しては、バシトラシン耐性とバンコマイシン耐性との関連性は確認できなかった。

2) 個別課題名：各種抗菌薬耐性の伝達性の確認 (研究担当者：富田治芳、谷本弘一 (所属機関名：群馬大学))

上記の個別課題 1)、および研究項目 (4) の個別課題 2) の解析結果を踏まえ、平成 28 年度分離および平成 29 年度分離のバシトラシン耐性腸球菌株のうち、バシトラシン耐性を高頻度に伝達させるフェロモン反応性プラスミドを保持していると推定される株について、他の薬剤耐性との関連性を検討した。高度バシトラシン耐性高頻度接合伝達性プラスミドを持つと考えられた株およびそれらを供与株として用いた伝達株について、各種抗菌薬感受性を調べた (表 1 1、表 1 5、表 1 6)。その結果、一部の株においてエリ

スロマイシン、テトラサイクリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシンの各高度耐性が同時に伝達することが示された。これら多剤耐性の接合伝達性が確認された株について、伝達実験を繰り返すこと（再伝達実験、再々伝達実験）により得られた伝達株においても耐性が認められたことから、複数の薬剤耐性の同時伝達性が確認された。

2016年分離株でバシトラシン耐性の高頻度接合伝達能が認められた42株の解析では、エリスロマイシン耐性が42株中28株(66.7%)、シプロフロキサシン耐性が3株(7.1%)、テトラサイクリン耐性が14株(33.3%)、ゲンタマイシン耐性が2株(4.8%)、カナマイシン耐性が18株(42.3%)、ストレプトマイシン耐性が18株(42.3%)、スペクチノマイシン耐性が4株(9.5%)、それぞれ再々伝達実験(3回伝達)で高頻度伝達性を示した。これらの耐性遺伝子は高頻度接合伝達性プラスミド上に存在していることが強く示唆された。このうちバシトラシン耐性を含む6剤耐性プラスミドが3株(バシトラシン耐性、エリスロマイシン耐性、シプロフロキサシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性、ストレプトマイシン耐性)、5剤耐性が7株(バシトラシン耐性、エリスロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性、ストレプトマイシン耐性)、4剤耐性が6株、3剤耐性が9株であった。

2017年分離株はバシトラシン耐性の接合伝達能が認められた株は45株あり、このうち再々伝達した株は26株であった。この再々伝達した26株のうち、エリスロマイシン耐性株は20株(76.9%)と最も多く、次いでテトラサイクリン耐性株は15株(57.7%)、カナマイシン耐性株は14株(53.8%)、ストレプトマイシン耐性株は9株(34.6%)、ゲンタマイシン耐性株は5株(19.2%)、クロラムフェニコール耐性株は4株(15.4%)、スペクチノマイシン耐性株は4株(15.4%)、シプロフロキサシン耐性株は1株(3.8%)であった。一方で、バンコマイシン耐性株やテイコプラニン耐性株は検出されなかった。バシトラシン耐性ととも、エリスロマイシン耐性は17株(85%)が、テトラサイクリン耐性は11株(73.3%)が、カナマイシン耐性株は10株(71.4%)が、ストレプトマイシン耐性は5株(55.6%)が、ゲンタマイシン耐性は3株(60%)が、スペクチノマイシン耐性は2株(50%)が共伝達した。一方、クロラムフェニコール耐性及びシプロフロキサシン耐性は共伝達しなかった。

以上、2016年度、2017年度ともに、バシトラシン耐性とマクロライド系薬剤のエリスロマイシンやテトラサイクリン系薬剤のテトラサイクリン、アミノグリコシド系薬剤のゲンタマイシンやカナマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性が共伝達していることが明らかにされた。

最近の報告として、中国の6つの省の養鶏環境由来 *E. faecalis* 109株を解析したデータがある (Chen M. *et al.* 2016. Multilevel selection of *bcrABDR*-mediated bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* from chicken farms. *Scientific Reports*. 6. 34895)。その研究では *bcrABDR* 陽性であった37株すべてがエリスロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、ストレプトマイシンに耐性であった。また37株中ほとんどの株がフロルフェニコール及びカナマイシンにそれぞれ耐性であった。バシトラシン耐性との共伝達に関しては、7株すべてがエリスロマイシン耐性及びストレプトマイシン耐性、カナマイシン耐性を共伝達しており、5株がテトラサイクリン耐性を、2株がフロルフェ

ニコール耐性を共伝達していた。報告は家畜用抗菌薬の使用が家畜環境における腸球菌の多剤耐性化と耐性遺伝子の伝播と拡散に関与することを示している。

本研究調査の結果から、バシトラシンやエリスロマイシン、テトラサイクリン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシンのいずれかが家畜へ使用された場合、多剤耐性菌増加の選択圧として働き、耐性遺伝子の細菌間の拡散を促進する可能性が示された。また、これらの多剤耐性菌が出現し、農産物を介してヒト腸管内に存在する他の各種細菌へ耐性遺伝子を伝播、拡散するリザーバーとなり得る可能性が示唆された。

(7) 研究項目名：バシトラシン耐性と他の薬剤耐性との関係の解明（多剤耐性プラスミドの同定）

1) 個別課題名：各種薬剤耐性の同時伝達性の解析（耐性遺伝子の同一担体上の存在を確認）（研究担当者：富田治芳、谷本弘一（所属機関名：群馬大学））

上記研究項目（6）の個別課題2）によってバシトラシン耐性高頻度接合伝達性プラスミドを保持する株（平成28年度分離42株と平成29年分離45株の *E. faecalis*）の多くで他の薬剤耐性との同時伝達性が確認された（表15、表16）。これら多剤耐性高頻度接合伝達性プラスミドを保持する株について詳細に調べた。

これら宿主株間の関連性を明らかにするために、検体の由来等を考慮して2016年分離42株、2017年分離26株（およびヒト臨床分離7株）をそれぞれ選択し、PFGE（Pulsed Field Gel Electrophoresis）法によって宿主遺伝子型の解析を行った（図5）。PFGE解析の結果では、これらの株の遺伝子型は複数のクラスターに分類され多様性を認めた。このうち由来検体あるいは検体産地が同一の株間では宿主遺伝子型の類似性を認め、同一の多剤耐性腸球菌の拡散、もしくは処理過程による交差汚染が考えられた。一方で、異なる産地、異なる分離年の株の多くが多様な宿主遺伝子型を示すことから、バシトラシン耐性遺伝子がおそらくは高頻度接合伝達性プラスミド等の可動性因子によって異なる腸球菌間へ伝播、拡散していることが示された。

さらに染色体プロファイルの異なる株を2016年分離19株、2017年分離21株（およびヒト臨床分離7株）をそれぞれ選択し、MLST（Multi Locus Sequence Typing）解析を行った（表17、表18）。MLST解析の結果では、PFGE解析結果から予想されるように、多様なST型を認めた。一部のもはデータベース上に登録の無い型であった（現在、新規ST型として登録手続き中）。MLST解析結果からも、バシトラシン耐性遺伝子が家畜環境中の異なる腸球菌間へ伝播、拡散していることが示された。

本研究では、バシトラシン耐性高頻度伝達性プラスミドに着目し、詳細な解析を行ったが、食肉由来のバシトラシン耐性腸球菌株には固形培地上でのみ伝達性を示す株、あるいは伝達性を示さない株も数多く存在していた。今後、これらの株におけるバシトラシン耐性遺伝子の伝播、あるいは腸球菌の獲得機構の解明が望まれるだろう。

2) 個別課題名：多剤耐性伝達性プラスミドの検出、同定（研究担当者：富田治芳（所属機関名：群馬大学））

上記の研究項目（6）によって、2016年収集鶏肉由来の高頻度接合伝達性プラスミド

を保持する腸球菌 *E. faecalis* 株 (表 1 9) の再々伝達実験から得られたバシトラシン耐性伝達株 (宿主菌は実験株 *E. faecalis* FA2-2) の保持するプラスミドをアガロース電気泳動法によって解析した (図 6)。伝達株は野生株と比べ、プラスミド数が減っており、一部の株では単一のプラスミドのみを保持していると考えられた。これらのうち高度バシトラシン耐性と同時に複数の薬剤耐性 (エリスロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性、ストレプトマイシン耐性) を持ちフェロモン反応を示す株 (多くは c0B1 反応性)、あるいはこれらと共通の c0B1 型フェロモン反応性プラスミドを保持する多剤耐性腸球菌 *E. faecalis* 株 (2016 年分離 10 株、うち国内 6 株、国外 4 株) を選び、これらについて詳細な解析を行った。プラスミド DNA のアガロース電気泳動とそのサザン・ハイブリダイゼーション解析によって、高度バシトラシン耐性高頻度接合伝達性プラスミドの相同性を確認した (図 7)。なお、ハイブリダイゼーションにもちいたプローブは図 7 中の No. 40 のプラスミド DNA を標識し使用した。図 7 に示されるように、一部の株においてはプラスミドパターンの類似性と共に、多くの株において DNA レベルでのプラスミド間の相同性を認めた。今後、これらプラスミドの構造解析、塩基配列の決定等を行うことによって、互いの関連性および耐性遺伝子の詳細を明らかにすることが期待できる。

参考として、我々が進めているヒト臨床由来株の解析データの一部を添付する (表 2 0、および図 5 と表 1 8 内にはそれぞれ統合)。現在、バシトラシン耐性を含む多剤耐性腸球菌 *E. faecalis* 株から多剤耐性高頻度接合伝達性プラスミドを同定し、詳細な解析を行っている。

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

本研究で調査した検体は、2016 年度に鶏肉検体 226 検体 (国内 150 検体 {うち 40 検体は検出不良のため実質は 110 検体}、国外 76 検体)、2017 年度は鶏肉検体 198 検体 (国内 110 検体、国外 88 検体)、豚肉 58 検体 (C 県産) 牛肉 40 検体 (C 県産) であった。これらの食肉検体について年度毎に、腸球菌の分離、バシトラシン耐性腸球菌の分離、バシトラシン耐性遺伝子 *bcrD* 遺伝子の検出、菌種の同定、バシトラシン感受性試験、バシトラシン耐性の伝達性の検証、各種抗菌薬感受性試験、フェロモン反応性試験、プラスミドの解析、PFGE による系統解析を順次行った。

食肉検体より、薬剤非含有腸球菌選択培地を用いて腸球菌を分離した結果、分離率は 2016 年度の鶏肉検体で 78%、2017 年度の鶏肉検体で 83%、豚肉検体で 47%、牛肉検体では 30% であった。また、バシトラシン含有 (10 U/ml) 腸球菌選択培地を用いて腸球菌を分離した結果、*bcrD* 陽性検体率 (バシトラシン耐性率と同等) は、2016 年度は鶏肉検体で 47%、2017 年度は鶏肉検体で 61%、豚肉検体で 1.7%、牛肉検体では分離されなかった。菌種別に *bcrD* 陽性率を比較したところ、2016 年度及び 2017 年度において *E. faecalis* や *E. casseliflavus*、*E. gallinarum* ではほぼすべての株が *bcrD* 陽性であるのに対し、*E. faecium* は 60% 程度であった。バシトラシン感受性試験では、*E. faecalis* 及び *E. faecium* において 32 U/ml を境に *bcrD* 陰性群と陽性群の二峰性のピークが得られ、バシ

トラシンの細菌学的ブレイクポイント値を 32 U/ml と決定した。バシトラシン耐性接合伝達株における各種抗菌薬試験では、バシトラシン耐性とマクロライド系薬剤やテトラサイクリン系薬剤、アミノグリコシド系薬剤耐性との関係(同時伝達性)が示され、一部の株では 6 剤耐性伝達性プラスミドも存在した。これらバシトラシン耐性の高頻度伝達 *E. faecalis* 株の多くが多剤耐性フェロモン反応性プラスミド上に存在することが示された。PFGE 法による宿主遺伝子型の系統解析では異なる産地の食肉由来バシトラシン耐性高頻度接合伝達株は異なる複数のクラスターに属していること、また MLST 解析でも多様な遺伝子型に分類されることが明らかとなった。これらはバシトラシン耐性高頻度接合伝達性プラスミドが家畜環境中の多様な腸球菌株に伝播、拡散していることを示している。一方、バシトラシン耐性株にはバンコマイシン耐性やテイコプラニン耐性を認めなかったことから、今回の調査ではバシトラシン投与とバンコマイシン耐性株 (VRE) との関連性(選択的増加)は示されなかった。

今回の調査で得られた結果は、家畜環境とヒト環境での腸球菌の多剤耐性化と家畜用抗菌薬(抗菌性家畜用飼料添加物)の使用との関係についての基礎的なデータ、レファレンスとなり得る。

今後、食肉由来の多剤耐性伝達性プラスミドの構造解析と分子疫学的解析を進めるとともに、ヒト臨床におけるバシトラシン耐性多剤耐性腸球菌株とその耐性プラスミドとの比較解析を行うことで、腸球菌の多剤耐性化、および腸内細菌の耐性化に対し抗菌性飼料添加物が与える影響とリスク評価のためのより多くの知見を得ることが期待される。

III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト(※別添として別刷(投稿中のものは、受理証明書の写し)を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。)なし
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
 - ① 杉岡佳祐、谷本弘一、富田治芳. 「食肉由来腸球菌のバシトラシンなどの抗菌性飼料添加物に対する耐性と多剤耐性伝達性プラスミドとの関係について」第 10 回細菌学若手コロッセウム 平成 28 年 7 月 31 日～8 月 2 日(群馬)
 - ② 杉岡佳祐、野村隆浩、久留島潤、谷本弘一、富田治芳. 「食肉由来腸球菌のバシトラシン耐性についての研究」第 90 回日本細菌学会 平成 29 年 3 月 19 日～21 日(仙台)
 - ③ 杉岡佳祐、野村隆浩、橋本佑輔、久留島潤、谷本弘一、富田治芳. 「食肉由来の腸球菌におけるバシトラシン耐性についての研究」第 91 回日本細菌学会 平成 29 年 3 月 27 日～28 日(福岡)
 - ④ 富田治芳、杉岡佳祐、野村隆浩、橋本佑輔、久留島潤、谷本弘一. Bacitracin-resistant enterococci in livestock and the multiple-drug resistant

pheromone-responsive highly conjugative plasmids. 第5回国際腸球菌学会
平成30年4月19日（フランス）

3 特許及び特許出願の数と概要
なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 食肉（鶏肉、豚肉、牛肉）から分離される腸球菌におけるポリペプチド系抗菌性飼料添加物バシトラシンの耐性頻度を明らかにする	5	食肉検体のうち、国内外の鶏肉検体から約60%の高頻度でバシトラシン耐性腸球菌が分離されることを明らかにした。一方、国産の豚肉検体および牛肉検体からはバシトラシン耐性腸球菌はほとんど分離されないことを明らかにした。当初の目標を達成することができた。
(2) 食肉由来バシトラシン耐性腸球菌における耐性機構と伝達性を明らかにする	5	食肉由来腸球菌の高度バシトラシン耐性は主に <i>bcx</i> D 遺伝子保有によるものであり、その一部は高頻度伝達性プラスミドによって伝達されることを明らかにし、目標を達成した。
(3) 食肉由来バシトラシン耐性腸球菌と他の抗菌性物質（バンコマイシン、マクロライド系、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系）耐性との関連性（同一のプラスミド上に存在するか否か、および同時伝達性）を明らかにする	5	鶏肉由来腸球菌の一部のバシトラシン耐性は多剤耐性高頻度接合伝達性プラスミド上に存在していることを明らかにした。
(4) 食肉由来腸球菌における多剤耐性伝達性プラスミドの保持状況、拡散状況を明らかにする	5	耐性株の解析結果から、鶏肉由来バシトラシン耐性腸球菌の一部が多剤耐性高頻度接合伝達性プラスミドを保持していることを明らかにした。

(5)食肉由来腸球菌の多剤耐性化における抗菌性飼料添加物の影響を明らかにする	5	調査した家畜のうち、牛や豚においては抗菌飼料添加物バシトラシンの影響は認められなかったが、鶏においてはバシトラシン耐性腸球菌が高頻度（約6割）で分離されることから、抗菌薬投与が耐性化に影響している可能性が示された。
(6)バシトラシン耐性腸球菌の示す各種抗菌薬耐性の解析	5	バシトラシン耐性腸球菌株について他の薬剤感受性を解析し、関連性を示すと同時に、高頻度で共伝達する他の薬剤耐性（テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミノグリコシド系）を明らかにした。
(7)バシトラシン耐性と他の薬剤耐性との関係の解明（多剤耐性プラスミドの同定）	4	バシトラシン耐性を含む多剤耐性フェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド保有株の分子疫学的な解析を行い、その関連性を明らかにした。また一部の多剤耐性プラスミドについては類似性、相同性を明らかにすることができた。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	調査した家畜のうち、鶏についての抗菌飼料添加物バシトラシンの影響、すなわち腸内細菌であり、耐性菌の指標となる腸球菌のバシトラシンに対する高度耐性化、およびその原因が <i>bcr</i> 耐性遺伝子の獲得によることを明らかにすることができた。また一部の株においては、高度バシトラシン耐性遺伝子が多剤耐性プラスミド上に存在し、他の耐性と共に家畜環境中に拡散していることを明らかにした。一方で、バシトラシン耐性腸球菌による国産の牛肉、豚肉の汚染はほとんど認められないことを明らかにでき、当初の目的は達成できたと考える。
(2) 研究成果の有用性	5	家畜用の抗菌性飼料添加物であるバシトラシンの使用による家畜の腸管内細菌のバシトラシン高度耐性化、および多剤耐性化との関係についての知見が得られた。この成果は抗菌性飼料添加物使用のリスク評価の

		科学的根拠となることから、有用性が高いと考える。
総合コメント		
国内に流通する国内外産の食肉検体（鶏、豚、牛）を調査、研究することによって、抗菌性飼料添加物であるバシトラシンに対する腸球菌の耐性化の現状、および多剤耐性伝達性プラスミドの拡散状況を明らかにし、抗菌性飼料添加物使用に関する知見を得ることができたと考える。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。