

# 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」

## 平成18年度調査報告

平成 19年 11月 6日

財団法人 日本食品分析センター

I. 検出試験

II. 薬剤感受性試験

III. PFGE解析

# I. 検出試験

## 試料のサンプリング

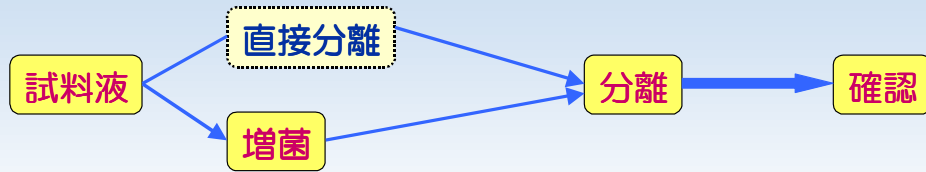
大手量販店から牛肉，豚肉及び鶏肉をサンプリング(購入)



地区ごとのサンプリング数は、  
平成17年度プロトコルの都道府県別生産量をもとに算定した

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

## 試験方法(検出試験)



| 対象菌      |      | 増菌培地                                     | 分離培地                    | 備考                      |
|----------|------|--|-------------------------|-------------------------|
| 大腸菌      | 直接分離 | ****                                     | ESコリマーク寒天培地             | プロトコルのDHL寒天培地をクロモアガーに変更 |
|          | 増菌培養 | EC培地                                     | クロモアガー-E.coli           |                         |
| 腸球菌      | 直接分離 | ****                                     | Enterococcosel寒天培地      | ****                    |
|          | 増菌培養 | Enterococcoselパイヨン                       |                         |                         |
| VRE *    | 直接分離 | ****                                     | Enterococcosel寒天培地      | いずれの培地にもバンコマイシンを3ppm添加  |
|          | 増菌培養 | Enterococcoselパイヨン                       |                         |                         |
| サルモネラ    | 増菌培養 | 緩衝ペプトン水 ⇒<br>テトラチオン酸塩培地<br>リポート・バリアンティ培地 | MLCB寒天培地<br>カモガ-サルモ寒天培地 | 対象は鶏肉のみ                 |
| カンピロバクター | 直接分離 | ****                                     | Skirrow寒天培地             | 対象は鶏肉のみ                 |
|          | 増菌培養 | Preston培地                                | mCCDA寒天培地               |                         |

\* バンコマイシン 3 ppmを添加した培地で選択された腸球菌

## 各食肉からの対象菌の検出率

|    | 大腸菌  | 腸球菌  | VRE * | サルモネラ   | カンピロバクター        |               |
|----|------|------|-------|---------|-----------------|---------------|
|    |      |      |       |         | <i>C.jejuni</i> | <i>C.coli</i> |
| 牛肉 | 1.0  | 5.9  | 0     | 検出対象とせず |                 |               |
| 豚肉 | 2.5  | 8.4  | 1.5   |         |                 |               |
| 鶏肉 | 80.9 | 60.2 | 8.2   |         | 59.9            | 47.7          |
|    |      |      |       |         | 45.7            | 3.9           |

\* バンコマイシン 3 ppmを添加した培地で選択された腸球菌

## 各食肉からの対象菌の分離菌株数

|    | 大腸菌 | 腸球菌                |                   | VRE *              |                   | サルモネラ   | カンピロバクター         |                |
|----|-----|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------|------------------|----------------|
|    |     | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecium</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecium</i> |         | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
| 牛肉 | 6   | 11                 | 16                | 0                  | 0                 | 検出対象とせず |                  |                |
| 豚肉 | 13  | 37                 | 9                 | 6                  | 3                 |         |                  |                |
| 鶏肉 | 695 | 258                | 227               | 31                 | 30                | 373     | 338              |                |
|    |     |                    |                   |                    |                   |         | 315              | 23             |

\* バンコマイシン 3 ppmを添加した培地で選択された腸球菌

## II. 薬剤感受性試験

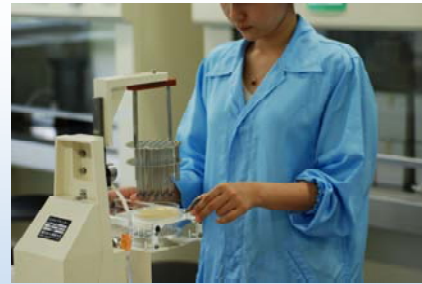
## 試験方法(薬剤感受性試験)

米国臨床検査標準委員会(CLSI/NCCLS)の試験法に準拠した寒天平板培養法により、最小発育阻止濃度を測定した

正確で精度の良い結果のために

CLSI/NCCLS  
ガイドラインで  
示されている  
標準菌株を用いた  
精度管理

マイクロプランター  
を用いた定量的  
な接種による  
正確さの追求



マイクロプランターによる菌液の接種

## 分離菌株の選定

1. 牛肉及び豚肉由来の菌株は、すべて薬剤感受性試験に供試
2. 鶏肉由来のVRE菌株もすべて薬剤感受性試験に供試

|    | 大腸菌 | 腸球菌 | VRE* | サルモネラ | カンピロバクター |
|----|-----|-----|------|-------|----------|
| 牛肉 | 6   | 27  | 0    |       |          |
| 豚肉 | 13  | 46  | 9    |       |          |
| 鶏肉 | 100 | 100 | 61   | 100   | 100      |

\* バンコマイシン 3 ppmを添加した培地で選択された腸球菌

鶏肉の大腸菌、腸球菌、サルモネラ及びカンピロバクターについては、分離菌株の血清型、菌種地域ごとの検出率等を考慮して100株を選定した。

## 各菌種における感受性試験対象薬剤数

|                  | 大腸菌 | 腸球菌 | VRE* | サルモネラ | カンピロバクター |
|------------------|-----|-----|------|-------|----------|
| プロトコルにおける調査対象薬剤数 | 18  | 18  | 18   | 18    | 12       |
| 調査実施薬剤数          | 17  | 17  | 17   | 17    | 11       |

\* バンコマイシン 3 ppmを添加した培地で選択された腸球菌

ただし、セデカマイシンについては、平成17年以降日本での使用実績が無く、製造も中止されていることから、除外することとした。

## 各薬剤に対する分離株の耐性化率

|             |      | 牛肉        |            |            | 豚肉         |            |            | 鶏肉          |             |             |                   |              |
|-------------|------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|--------------|
|             |      | 大腸菌<br>6株 | 腸球菌<br>27株 | VRE*<br>0株 | 大腸菌<br>13株 | 腸球菌<br>46株 | VRE*<br>9株 | 大腸菌<br>100株 | 腸球菌<br>100株 | VRE*<br>61株 | サルモ<br>ネラ<br>100株 | カンピロ<br>100株 |
| アンピシリン      | ABPC | 0         | 0          |            | 53.8       | 0          | 0          | 53.0        | 0           | 0           | 8.0               | 3.0          |
| セフトリアキソン    | CEZ  | 0         |            |            | 0          |            |            | 26.0        |             |             | 7.0               |              |
| セフトロキソン     | CTF  | 0         |            |            | 0          |            |            | 25.0        |             |             | 4.0               |              |
| アピシリン       | APM  | 33.3      |            |            | 0          |            |            | 3.0         |             |             |                   |              |
| ジヒドロステロイド   | DSM  | 50.0      | 0          |            | 38.5       | 41.3       | 55.6       | 45.0        | 17.0        | 29.5        | 81.0              | 6.0          |
| ゲンタマイシン     | GM   | 0         | 0          |            | 0          | 0          | 0          | 4.0         | 3.0         | 4.9         | 1.0               | 1.0          |
| カナマイシン      | KM   | 0         | 0          |            | 7.7        | 6.5        | 22.2       | 19.0        | 17.0        | 23.0        | 39.0              |              |
| エリスロマイシン    | EM   |           | 0          |            |            | 4.3        | 22.2       |             | 35.0        | 42.6        |                   | 4.0          |
| リンコマイシン     | LCM  |           | 0          |            |            | 4.3        | 22.2       |             | 36.0        | 35.7        |                   |              |
| コリスチン       | CL   | 33.3      |            |            | 0          |            |            | 2.0         |             |             | 1.0               |              |
| ノビペリン       | NHT  |           |            |            |            |            |            |             |             |             |                   |              |
| バンコマイシン     | VCM  |           | 0          |            |            | 0          | 0          |             | 0           | 3.3         |                   |              |
| バネジニドマイシン   | VGM  |           | 59.3       |            |            | 58.7       | 66.7       |             | 86.0        | 60.7        |                   |              |
| サリナマイシン     | SLM  |           | 0          |            |            | 0          | 0          |             | 0           | 1.6         |                   |              |
| オキシテトラサイクリン | OTC  | 66.7      | 22.2       |            | 38.5       | 41.3       | 55.6       | 62.0        | 56.0        | 54.1        | 83.0              | 34.0         |
| アピシリン       | AVM  |           | 0          |            |            | 0          | 0          |             | 5.0         | 6.6         |                   |              |
| バシロキサシン     | BC   |           | 18.5       |            |            | 10.9       | 55.6       |             | 22.0        | 42.6        |                   |              |
| ヒコサチン       | BCM  | 0         |            |            | 0          |            |            | 0           |             |             | 11.0              |              |
| クロラムフェニコール  | CP   | 0         | 11.1       |            | 23.1       | 4.3        | 22.2       | 12.0        | 17.4        | 0           | 0                 | 3.0          |
| ナリジクサン      | NA   | 0         |            |            | 7.7        |            |            | 36.0        |             |             | 12.0              | 42.0         |
| エンロフロキサシン   | ERFX | 0         | 0          |            | 0          | 4.3        | 22.2       | 11.0        | 4.0         | 21.3        |                   | 41.0         |
| スルファジメトキシ   | SDMX |           |            |            |            |            |            |             |             |             |                   |              |
| トリメトプリム     | TMP  | 0         |            |            | 46.2       |            |            | 20.0        |             |             | 59.0              |              |
| ホスホマイシン     | FOM  |           |            |            |            |            |            |             |             |             |                   |              |
| チルミコシン      | TMS  |           |            |            |            |            |            |             |             |             |                   |              |

\* バンコマイシン 3 ppmを添加した培地で選択された腸球菌

## 各薬剤に対する菌種ごとの耐性化率

|               | 大腸菌  | 腸球菌  | VRE* | サルモネラ | カンピロ |
|---------------|------|------|------|-------|------|
| アンピシリン        | 50.4 | 0.0  | 0.0  | 8.0   | 3.0  |
| セファゾリン        | 21.8 | 0.0  | 0.0  | 7.0   | 0.0  |
| セフチオフル        | 21.0 | 0.0  | 0.0  | 4.0   | 0.0  |
| アブラマイシン       | 4.2  | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  |
| ジヒドロストレプトマイシン | 44.5 | 20.8 | 32.9 | 81.0  | 6.0  |
| ゲンタマイシン       | 3.4  | 1.7  | 4.3  | 1.0   | 1.0  |
| カナマイシン        | 16.8 | 11.6 | 22.9 | 39.0  | 0.0  |
| エリスロマイシン      | 0.0  | 21.4 | 40.0 | 0.0   | 4.0  |
| リンコマイシン       | 0.0  | 22.0 | 34.0 | 0.0   | 0.0  |
| コリスチン         | 3.4  | 0.0  | 0.0  | 1.0   | 0.0  |
| ノシヘプタイト       | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  |
| バンコマイシン       | 0.0  | 0.0  | 2.9  | 0.0   | 0.0  |
| バージニアマイシン     | 0.0  | 74.6 | 61.5 | 0.0   | 0.0  |
| サリノマイシン       | 0.0  | 0.0  | 1.4  | 0.0   | 0.0  |
| オキシテトラサイクリン   | 59.7 | 46.8 | 54.3 | 83.0  | 34.0 |
| アピラマイシン       | 0.0  | 2.9  | 5.8  | 0.0   | 0.0  |
| バシトラシン        | 0.0  | 18.5 | 44.3 | 0.0   | 0.0  |
| ピコザマイシン       | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 11.0  | 0.0  |
| クロラムフェニコール    | 12.6 | 12.9 | 2.9  | 0.0   | 3.0  |
| ナリジクス酸        | 31.1 | 0.0  | 0.0  | 12.0  | 42.0 |
| エンロフロキサシン     | 9.2  | 3.5  | 21.4 | 0.0   | 41.0 |
| スルファジメトキシシン   | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0  |
| トリメトプリム       | 21.9 | 0.0  | 0.0  | 59.0  | 0.0  |
| ホスホマイシン       | ***  | ***  | ***  | ***   | ***  |
| チルミコシン        | ***  | ***  | ***  | ***   | ***  |

\* バンコマイシン 3 ppmを添加した培地で選択された腸球菌

## 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 (μg/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 <sup>1)</sup> | —                |
| セフチオフル        | CTF  | 8                | —                  | 8 <sup>2)</sup>  | —                |
| アブラマイシン       | APM  | 16 <sup>2)</sup> | —                  | ***              | —                |
| ジヒド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 <sup>1)</sup> | 16 <sup>2)</sup> |
| 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 <sup>2)</sup> | —                |
| ノシヘプタイト       | NHT  | —                | ***                | —                | —                |
| バンコマイシン       | VCM  | —                | 32                 | —                | —                |
| バージニアマイシン     | VGM  | —                | 1.56 <sup>3)</sup> | —                | —                |
| サリノマイシン       | SLM  | —                | 16 <sup>2)</sup>   | —                | —                |
| オキシテトラサイクリン   | OTC  | 16               | 16                 | 16               | 16               |
| アピラマイシン       | AVM  | —                | 16                 | —                | —                |
| バシトラシン        | BC   | —                | 128 <sup>2)</sup>  | —                | —                |
| ピコザマイシン       | 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シン   | 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接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

## Ⅲ. PFGE解析

### カンピロバクターのPFGE解析で判明したこと

- ① 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た。
- ② ある地域では、15組が同じ菌株と判定されたが、その内3組は原産地が異なっていた。  
しかし、サンプリング日時と店舗の関係から、同一店舗内あるいは同一加工処理施設内での汚染も考えられた。
- ③ 同一のPFGEパターンを示した菌株は薬剤耐性の傾向もほとんど同じであった。  
しかし、顕著な相違を示した菌株も存在した。



# 生物性状と遺伝子解析

特異的PCRを行って見ると...

