

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 28 年度 分担研究報告書食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 家畜に由来する薬剤耐性菌が食品へ伝播する経路に関する研究

研究分担者 浅井 鉄夫（岐阜大学大学院連合獣医学研究科・応用獣医学・教授）
研究協力者 杉山 美千代（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）
研究分担者 Montira Yossapol（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

研究要旨

この研究では、肉養鶏農場における薬剤耐性菌の抗菌薬投与後の変動と出現要因を調査した。さらに、食鳥処理場における薬剤耐性菌の制御方法を検討するため、食鳥処理過程での汚染状況を調査した。最初に、初生ヒナ導入 5～7 日にアモキシシリンと 25～27 日目に ST 合剤を投与する肉用鶏生産農場で、アンピシリン耐性とセファロスポリン耐性菌の動向について 2 鶏群を対象に調べた。糞便中の大腸菌に対するアンピシリン耐性大腸菌の割合は、アモキシシリン投薬後と ST 合剤投薬後に増加し、交差耐性と共耐性の影響で耐性菌が選択されていると考えられた。一方、セファロスポリン耐性菌は 1 鶏群のみで認められ、大腸菌 (CMY-2 と CTX-M-3) の他、CTX-M-3 型 ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* と *Enterobacter cloacae* であった。次に、肉用鶏農場でのセファロスポリン耐性菌の分布要因を検討するため、3 孵化場から導入したヒナの盲腸便におけるセファロスポリン耐性菌の汚染実態について敷紙を用いて調査した。敷紙 66 検体中、CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が 4 検体及び CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae* が 1 検体から分離され、導入鶏が農場での耐性菌分布に関与することが示唆された。最後に、鶏肉等で交差汚染が認められた食鳥処理場で、食鳥処理の各工程で使用された汚水の細菌検査を実施した。大腸菌は、内臓処理工程の汚水 2 検体のみで検出され、1 検体でセファロスポリン耐性大腸菌 (CMY-2) が分離された。汚水中の大腸菌に対する割合は、約 100 分の 1 であった。同日に処理された 2 個体の糞便からは、CMY-2 及び CTX-M-2G 産生大腸菌が分離された。

A. 研究目的

家畜由来の薬剤耐性及び耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を与える可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。国内のプロイラーから分離される大腸菌やサルモネラにおいて、第 3 世代セファロスポリン耐性が 2004 年ごろから増加し、ワクチンを卵内接種する時にセフチオフル（動物用第 3 世代セファロスポリン製剤）を混合することが要因として指摘された。わが国において、2012 年にセフチオフル（動物専用、第 3 世代セファロスポリン）の卵内接種およびヒナへの使用に対して養鶏団体による自主的注意喚起が行われた以降、農場の鶏糞から ESBL/AmpC 産生大腸菌の出現率が減少した。しかし、市販鶏肉から第 3 世代セファロスポリン耐性菌は依然として分離されるため、肉養鶏から鶏肉処理過程での薬剤耐性菌の伝播状況を明らかにする必要がある。本研究は、肉養鶏生産農場において、抗菌薬投与が薬剤耐性菌の同行に与える

影響を調査し、導入鶏における第三世代セファロスポリン耐性菌の分布状況を明らかにし、食鳥処理過程で薬剤耐性菌の分布に関する問題を明らかにして、科学的データに基づき畜産物の薬剤耐性菌対策を提案することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 試験 1：肉養鶏農場における薬剤耐性菌の抗菌薬投与後の変動

5～7 日齢にアモキシシリン (20mg/L) と 25～27 日齢に ST 合剤 (sulfamonomethoxine 75mg/L + ormetoprim 25mg/L) を投与する岐阜県内の肉用鶏生産農場で、薬剤投与後のアンピシリン耐性とセファロスポリン耐性菌の動向について 2 鶏群を対象に調べた。

導入から出荷までの期間に、5、12、19、26、33 及び 40 日齢に 3～5 羽の糞便を採取した。滅菌生理食塩水を用いて、プールした糞便 1g を 10 倍段階希釈し、アンピシリン (AMP) 及びセファレキシン (CEX) を 50mg/L 添加した DHL 寒天培

地（栄研化学、栃木）及び薬剤非添加の DHL 寒天培地に希釈液 50 μ L を接種し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。薬剤添加及び非添加の DHL 寒天培地に認められた赤色コロニー数を測定し、糞便 1g 中の大腸菌数及び AMP または CEX 耐性数を求め、その割合を算出した。コロニーが認められた最高希釈の CEX 添加 DHL 寒天培地から、赤色の 5 コロニーを単離して、TSI 培地及び LIM 培地を用いて性状を確認した後、API20E（シスメックス・ピオメリュール、東京）を用いて同定した。

（2）試験 2：肉養鶏農場における薬剤耐性菌の出現要因

異なる 3 箇所の孵化場から初生雛を導入する農場で、輸送箱の敷紙 66 サンプル（A 孵化場 38 サンプル、B 孵化場 7 サンプル、C 孵化場 21 サンプル）を採取し、検査材料とした。敷紙（25 cm^2 ）を細切後、5ml の生食中で懸濁して、50 μ L を CEX 加 DHL 培地に接種し、培養した。同時に、敷紙（25 cm^2 ）を CEX を 50mg/L 添加した MHB を用いて 37 $^{\circ}$ C で一晩増菌培養後、同培地に接種した。発育したコロニーを単離して、TSI 培地及び LIM 培地を用いて性状を確認した後、API20E で同定した。

（3）試験 3：食鳥処理場における薬剤耐性菌の制御

予備実験として、昨年度の調査で、AmpC/CTX-M- β -ラクタマーゼ産生大腸菌が確認された無薬鶏飼育農場の食鳥処理場で、鶏肉等が耐性菌に汚染しているかを調査した。食肉処理場で鶏肉等（肝臓、手羽先、手羽元、砂肝、ムネ肉、モモ肉、ササミ）を採材し、各部位 25 cm^2 を綿棒でふき取り、DHL 培地及び CEX 加 DHL 培地に直接塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 1 晩培養した。分離菌はバイテック 2 コンパクトを用いて同定した。

次に、食鳥処理工程の排水（脱羽排水、内臓検査排水 及び 、内外洗浄水、予備チラー水、本チラー水）6 サンプルを用い、前述した方法で、大腸菌数と CEX 耐性菌数を算出した。赤色の 5 コロニーを単離して、バイテック 2 コンパクトを用いて同定した。

（4）薬剤感受性試験

薬剤の最少発育阻止濃度（以下 MIC）は、Clinical Laboratory Standards Institute（CLSI）法に準拠したドライプレート‘栄研’（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法により決定した。供試薬剤は、アンピシリン（ABPC）、CEZ、セフォタキシム（CTX）、メロペネム（MEPM）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）、コリスチン（CL）、クロラムフェニコール（CP）、

トリメトプリム・スルファメトキサゾール（ST）の 12 剤を用いた。

（5）ラクタマーゼ型別

CTX 耐性株（MIC \geq 4mg/L）は、PCase 試験と DDST 法によるスクリーニング後、Daillenne らのマルチプレックス PCR 法により、ラクタマーゼ産生遺伝子型を決定した。

（6）PFGE

PulseNet のプロトコールに準拠して実施した。

（倫理面への配慮）

配慮すべき倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

（1）試験 1

大腸菌数は $10^6 \sim 10^8$ CFU/g で推移した。糞便中の大腸菌に対するアンピシリン耐性大腸菌の割合は、アモキシシリン投薬後と ST 合剤投薬後に増加した（図 1）。また、ST 合剤耐性を除くその他の薬剤耐性は、ST 合剤投薬後に認められなかった（図 2）。一方、セファロsporin 耐性菌は 1 鶏群のみで認められ、薬剤投与の影響は認められなかった。大腸菌（CMY-2 と CTX-M-3）の他、CTX-M-3 型 ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* と *Enterobacter cloacae* であった（表 1）。

（2）試験 2

3 孵化場から導入したヒナの盲腸便におけるセファロsporin 耐性菌の汚染実態について敷紙を用いて調査した。A 孵化場由来敷紙 38 検体中、1 検体（2.63%）から CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae*、もう 1 検体（2.6%）から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が分離された。B 孵化場由来敷紙 7 検体中 2 検体（28.6%）から、また、C 孵化場由来 21 検体中 1 検体（4.8%）から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が分離された（表 2）。分離した CTX-M-25 産生 *E. cloacae* 4 株は、農場ごとに異なる PFGE 型を示した。接合伝達試験により得られた接合伝達株は、 β -ラクタム耐性の他、カナマイシン耐性を示した。

（3）試験 3

昨年度の調査で、無薬鶏群と有薬鶏群の両郡でセファロsporin 耐性大腸菌が継続的に分離されたことから、食鳥処理場における交差汚染が懸念された。そこで、食鳥処理の各工程で使用された汚水の細菌検査を実施した。大腸菌は、内臓処理工程の汚水 2 検体のみで検出され、1 検体でセファロsporin 耐性大腸菌（CMY-2）が分離された。

汚水中の大腸菌に対する割合は、約 100 分の 1 であった。同日に処理された 2 個体からは、CMY-2 及び CTX-M-2G 産生大腸菌が分離された（図 3）。

D. 考察

昨年度実施した調査で、有薬（アモキシシリン投与）飼育鶏 1 群で継続的にセファロスポリン耐性大腸菌が認められ、選択圧としてセファロスポリン耐性大腸菌の分布に影響したと考えられた。しかし、今年度の結果から、アモキシシリン投薬による選択圧は、アンピシリン耐性の増加に影響するが、セファロスポリン耐性を増加させなかった。したがって、セファロスポリン耐性は、アモキシシリン投薬の影響を受けないと考えられた。アンピシリン耐性は、アモキシシリン投薬後と ST 合剤投薬後に増加した。これは、共耐性が影響したと考えられる。しかし、鶏の糞便には ST 耐性を含む多剤耐性型の大腸菌が存在していたが、ST 合剤投与後 ST-AMP 耐性が選択された理由は不明である。

今回認められた CTX-M-3 産生菌については、大腸菌、*K. pneumoniae* 及び *E. cloacae* の 3 菌種が認められた。飼育期間中に耐性因子の伝播について明らかにするため、保有するプラスミドの性状比較を実施する必要がある。

今年度の調査で、導入ヒナがセファロスポリン耐性菌及び耐性因子を伝播することが明らかとなった。導入ヒナにおけるセファロスポリン耐性菌は、分離頻度は低いが、全て同じ CTX-M-25 産生株であった。調査した 3 孵化場由来 *E. cloacae* は、PFGE 型が異なり、保有する耐性因子は、農場ごとに異なる可能性が示唆された。

CTX-M 型遺伝子の腸内細菌間及び食中毒菌への伝播及び拡散は、公衆衛生上重要な課題である。CTX-M-25 保有プラスミドは、大腸菌へ接合伝達したことから、当該農場由来サルモネラ保存株（現在約 3000 株保有）の薬剤感受性試験を実施して、耐性遺伝子の伝播状況について明らかにする必要がある。CTX-M-25 は、家畜では比較的新しいタイプの ESBL であり、耐性遺伝子に関する情報を整備して、今後の流行に備えることが大切である。

今年度は、食鳥処理場における交差汚染の概要を知るため、予備実験として 7 部位（モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝）の耐性菌汚染状況を調べて、各工程で使用した汚水の検査を実施した。最終製品で耐性菌汚染が確認されている食鳥処理場においても、汚水の耐性菌汚染

は低度で、使用する水の消毒剤添加は適切に実施されていると考えられた。

予備実験では、耐性菌汚染状況は部位別に異なり、処理工程の違いが影響する可能性が考えられた。そこで、現状の実施状況を聞き取るとともに、7 部位各 20 サンプルを用いて定量的に検査し、汚染状況に基づいて詳細に調べて優先順位をつけるとともに処理工程の違いを明らかにする。

農場から食品に至る耐性菌の伝播状況とその伝播要因を明らかにすることで、科学的根拠を伴った適正なリスク管理オプションの選択及びその実効性の予測が可能になる。

E. 結論

薬剤耐性菌の伝播には、導入動物が関与し、その増加は、抗菌剤の使用による交差耐性や共耐性が関与している。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

浅井鉄夫：耐性菌とは？養豚の課題は何？ *Pig Journal* 19(12):15-17, 2016. 平成 28 年 12 月 15 日 アニマルメディア社

2. 学会発表

浅井鉄夫 動物由来ESBL産生菌の現状と人へのリスク 動物用抗菌剤研究会・四学会合同事業セミナー「One Healthから見た耐性菌の現状と課題」（東京、平成28年8月28日）

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

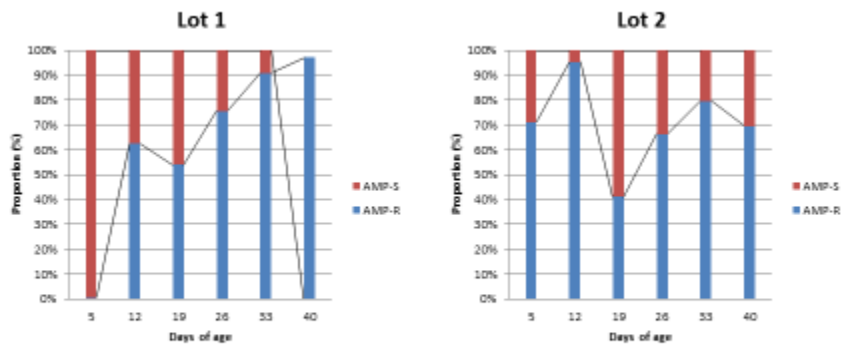
なし

2. 実用新案登録

なし

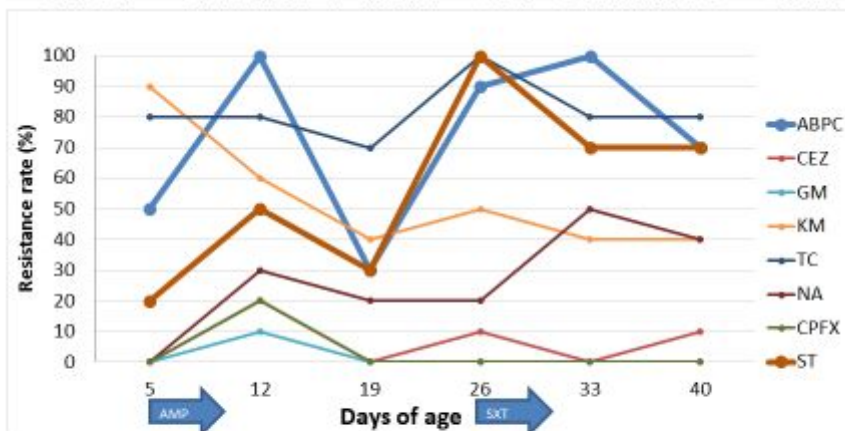
3. その他

なし



- 投薬
 - 5～7日アモキシシリン (20mg/L)
 - 24～26日 ST合剤(sulfamonomethoxine 75mg/L and ormetoprim 25mg/L)

図1 プロイラーの糞便における飼育期間中のアンピシリン耐性大腸菌の推移 (%)



アンピシリン耐性の割合は、12日目と26日目以降に上昇した。
 ST耐性の割合は、26日目以降に上昇した。
 KM耐性の割合は、発育とともに減少した。
 TC耐性の割合は、70%以上で推移した。

図2 薬剤投与したプロイラーにおける薬剤耐性大腸菌の変動

表1 Lot 2 鶏群から分離されたセファロスポリン耐性腸内細菌

Days of age	Strain No	Bacteria species	MIC									
			ABPC	CTX	GM	KM	TC	NA	CL	CP	ST	Multi I
5	CEX-1	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	8	64	8	≥ 64	4	0.25	≥ 128	19/1	CMY-2
	CEX-2	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	8	32	8	≥ 64	4	0.25	128	19/1	CMY-2
	CEX-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	≥ 128	≥ 128	64	8	4	8	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 128	32	32	≥ 128	≥ 64	8	0.25	128	≥ 152/8	CTX-M-3
19	CEX-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	≥ 128	≥ 128	64	8	2	4	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-6	<i>Enterobacter cloacae</i>	≥ 128	≥ 128	≥ 64	8	2	16	≥ 16	8	≥ 152/8	CTX-M-3
33	CEX-24	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	64	≥ 128	≥ 64	32	2	≥ 128	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-25	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	0.5	4	≥ 152/8	CTX-M-3
40	CEX-14	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 128	≥ 64	≥ 128	0.5	16	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-15	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	32	≥ 128	≥ 64	≥ 128	1	16	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-16	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-17	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	1	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 128	≥ 128	32	8	≥ 64	16	1	≥ 128	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-19	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	64	8	≥ 64	≥ 128	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-20	<i>Escherichia coli</i> /	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	1	4	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-22	<i>Enterobacter cloacae</i>	32	4	≤ 0.5	≥ 128	≥ 64	32	1	128	≥ 152/8	
	CEX-23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 128	≥ 128	64	4	4	4	1	64	≥ 152/8	CTX-M-3

表 2 初生雛から分離された ESBL 産生腸内細菌

Organisms	Strains	Methicins	β-lactamase types	MIC (μg/L) of antimicrobials									
				CTX*	MEPM	GM	KM	TC	NA [†]	CPFX	CL	CP	ST
				≥4 [‡]	≥4 [‡]	≥16 [‡]	≥64 [‡]	≥16 [‡]	≥32 [‡]	≥4 [‡]	≥2 [‡]	≥32 [‡]	≥76/4 [‡]
<i>K. pneumoniae</i>	CC57	A	CTX-M 25, SHV-11	64	≥0.25	2	2128	264	4	≥0.05	1	2	19/1
<i>E. cloacae</i>	CC23	A	CTX-M 25, TEM-1	264	≥0.25	4	2128	4	16	≥0.05	1	8	19/1
	CC5	B	CTX-M 25	264	≥0.25	32	64	4	2	≥0.05	2	8	38/2
	CC6	B	CTX-M-25	264	≥0.25	32	64	4	2	≥0.05	1	8	38/2
	CC52	C	CTX-M 25	264	≥0.25	≥0.5	2128	2	4	≥0.05	216	8	9.5/0.5

*CTX: ceftazidime, MEPM: meropenem, GM: gentamicin, KM: kanamycin, TC: tetracycline, NA: nalidixic acid, CPFX: ciprofloxacin, CL: colistin, CP: chloramphenicol and ST: sulfamethoxazole and trimethoprim; [‡]CLSI Resistance breakpoint (μg/mL); [†]EUCAST Resistance breakpoint (μg/mL)



図3 食鳥処理場におけるセファロスポリン耐性菌の調査