

厚生労働科学研究費補助金補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題名：食品中の耐性菌汚染、と畜場等における交差汚染の役割解析

研究分担者：浅井鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科・教授

研究協力者：市川 隆 （名古屋市食肉衛生検査所）

梶本 真希 （岐阜県中央食肉衛生検査所）

佐々木貴正 （国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

フードチェーンにおける薬剤耐性菌の制御は重要な課題である。本研究では、肉用鶏の生産段階の汚染を孵化場と生産農場におけるサルモネラ、食肉処理場の汚染を搬入動物として豚における家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（LA-MRSA）、食肉処理工程における汚染を腸内細菌科細菌等を指標に解析した。本研究によって、各段階を汚染する薬剤耐性菌は、素畜（ヒナ）、飼育期間に感染した動物の食肉処理場への搬入、食肉処理工程での環境等複数の要因が示唆された。

A. 研究目的

食品を介して人へ伝播する薬剤耐性菌を対策する上で、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。畜産現場において、抗菌薬は細菌感染症を治療し、安全な畜産物を安定供給するために必要な資材として長い間利用されてきた。しかし、畜産現場で抗菌薬を使用すると薬剤耐性菌が増加するため、食肉における薬剤耐性菌汚染が増大する危険性がある。一方、2012年に鶏へのセフトオフルの適応外使用に関して自主規制が行われた結果、肉用鶏からの第三世代セファロスポリン耐性大腸菌の出現率が減少したが（Hiki et al., 2016）、市販鶏肉から第三世代セファロスポリン耐性菌は高率に分離される。このように、家畜における薬剤耐性菌の実態を反映しない場合もあり、家畜が食肉処理される過程での家畜由来の薬剤耐性菌による交差汚染が影響すると考えられる。そのため、食肉処理施設における耐性菌の交差汚染を制御することは、食肉の薬剤耐性菌汚染を制御する需

要な課題と考えられる。

食肉処理施設では HACCP の導入により衛生管理は改善されているが、依然として食肉から薬剤耐性菌が分離される。食肉処理施設において汚染が拡大する薬剤耐性菌は、家畜により持ち込まれたものと推察されるが、どのような処理工程で汚染が拡大しているかについては不明な点が多い。食肉における細菌汚染は、牛肉や豚肉に比べて鶏肉で高率である。平成 27～29 年に食鳥処理施設で実施した調査では、肉用鶏製品における耐性菌汚染は、レバーで高率で、部位により異なることを明らかにした。薬剤耐性菌は腸内の細菌中に一定の割合で存在するため、細菌汚染が高度であると薬剤耐性菌が含まれていると予想される。また、抗菌薬の使用時期や方法が異なる家畜の種類により腸内の細菌中に占める薬剤耐性菌の割合は異なる。農林水産省により 1999 年から継続的に実施されている畜産分野における耐性菌のモニタリングでは、豚や肉用鶏は肉牛に比べて耐性割合が高い。この

薬剤耐性菌の分布の違いが市販食肉における耐性菌汚染を反映しているかは明らかではない。さらに、鶏肉生産における抗菌薬使用については、肉用鶏農場の上流に当たる種鶏場及び孵卵場でも使用され、肉用鶏農場由来株の薬剤耐性はこれらを含むフードチェーン全体での抗菌薬使用の影響を受ける。本研究では、肉処理施設へ搬入（出荷）された家畜が保有する薬剤耐性菌が食肉処理される各過程で汚染する状況を解明することを目的とする。

B. 研究方法

（1）市販肉の交差汚染経路の解析

愛知及び岐阜県下の牛及び豚の食肉処理場（愛知：A 処理場、岐阜：B 処理場）において、「と畜場における枝肉の微生物汚染実態調査」により枝肉等のふき取り材料と環境材料から分離された細菌の同定と薬剤感受性を実施した。細菌の同定は生化学的性状に基づく同定システム（バイテック）を用い、薬剤感受性は市販の微量液体希釈法で実施した。同一菌種について、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法で分子疫学解析を実施した。

（2）国内豚由来 MRSA の性状解析

84 農場から出荷された 420 頭（各農場 5 頭）の鼻粘膜スワブを収集し、MRSA 検査を実施した（第 1 回調査）。その後、さらに 6 農場（1 農場は第 1 回調査で MRSA 陽性、5 農場は第 1 回調査で MRSA 陰性）から出荷された 30 頭（各 5 頭）から鼻粘膜スワブ及び耳スワブを採取した。分離培養は、6.5%NaCl 加トリプトイブ・ロア（TSB）で前増菌培養し、セフチゾキシム・アストレオナム添加 6.5%NaCl 加 TSB を用いて増菌培養した。その後、増菌培養液をカモエガ-MRSA/オキサリシ添加スクリーニング培地へ塗抹し、MRSA を分離した。分離菌の SCCmec 型、MLST 型、spa 型及び薬剤感受性を常法で調べた。Panton-Valentine-Leukocidin (PVL) 遺伝子及び *czrC* 遺伝子は PCR 法により

検出した。亜鉛の MIC は寒天平板希釈法で決定した。

（3）養鶏場等における抗菌剤使用とサルモネラの薬剤耐性

孵卵場におけるワクチンの卵内接種時にストレプトマイシンを混合している鶏肉生産社 2 社（A 及び B）の協力の下、ブロイラー鶏群の盲腸及び素ビナ導入元の孵卵場の使用抗菌剤に関する情報を入手し、分離サルモネラの薬剤耐性状況を鶏肉生産者単位で解析した。さらに、A 社の孵卵場において、卵内ワクチン接種後に発育中止した鶏卵を採取し、サルモネラ検査を実施した。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

（1）市販肉の交差汚染経路の解析

A 処理場の枝肉ふき取り材料からの分離菌は、*Escherichia coli* (豚 37 検体、牛 4 検体)、*Klebsiella pneumoniae* spp *pneumonia* (豚 19 検体、牛 1 検体)、*Enterobacter gergoviae* (豚 4 検体、牛 4 検体)、*Enterobacter cloacae* complex (豚 5 検体、牛 2 検体)、*Klebsiella oxytoca* (豚 1 検体、牛 4 検体)の順で 14 菌種分離された（表 1）。豚の枝肉由来 *Escherichia coli* (n=130) では、ABPC、TC、CP に対する耐性が 30~40%で認められ、NA と ST に対する耐性が約 15%で認められた。一方、*Klebsiella pneumoniae* (n=36)では、TC に対する耐性が 15%で認められた。両菌種ともその他の薬剤に対する耐性は、10%未満であった（図 1）。

B 処理場の枝肉ふき取り材料からは、*Acinetobacter baumannii* complex (10 検体)、*Acinetobacter junii* (4 検体)、*Escherichia coli* (3 検体)、*Aeromonas salmonicida* (1 検体)、*Enterobacter amnigenus* (1 検体)、*Enterobacter cloacae* complex (1 検体)、*Pseudomonas aeruginosa* (1 検体)、*Stenotrophomonas maitophilia*

(1 検体)、*Yersinia intermedia* (1 検体) であった。薬剤感受性試験では、ほとんどの薬剤に対して感受性を示す株が多く認められた。

食肉処理業施設 5 施設の環境 (まな板、処理ライン等) のふき取り材料の検査において汚染 13 検体のうち、優勢に分離された菌種は、*Enterobacter cloacae* complex (5 検体)、*Serratia liquefaciens* group (4 検体)、*Raoultella planticola* (3 検体)、*Enterobacter gergoviae* (2 検体)、*Buttiauxella agrestis* (1 検体)、*Enterobacter amnigenus* (1 検体)、*Klebsiella pneumoniae* (1 検体)、*Escherichia coli* (1 検体) であった。同一日の複数のふき取り材料から同じ菌種が分離されたため、PFGE 解析を実施したところ、食肉処理業施設②では菌種と PFGE 型は部位ごとに異なっていたが、食肉処理業施設⑤では、同一の PFGE 型の細菌が、複数から分離された (表 2、図 2、図 3)。

(2) 国内豚由来 MRSA の性状解析

第 1 回調査では 9 農場 (11%) 13 頭 (3.1%) から、さらに第 2 回調査では第 1 回調査で MRSA 陽性であった農場の 2 頭の耳スワブから MRSA が分離された。MRSA15 株は MLST 解析により ST398 で、spa 型では t034 (8 農場) 及び t011 (1 農場) の 2 型に分類された (表 1)。薬剤耐性については、すべての株が β -ラクタム系以外にもテトラサイクリンに耐性な多剤耐性株であり、エリスロマイシンやクロラムフェニコールに耐性な株も存在した。さらに、SCCmec 型では IVa 型 (いずれも spa 型は t034 : 5 株) 及び V 型 (spa 型は t011 と t034) の 2 型に分類され、V 型株は亜鉛抵抗性遺伝子 (*czrC*) を有し、寒天平板希釈法により亜鉛抵抗性 (MIC=4mM) であった (表 3)。

(3) 養鶏場等における抗菌剤使用とサルモネラの薬剤耐性

A 社の 16 肉用鶏農場から分離された 13 株

(Manhattan 10 株及び Schwarzengrund 6 株) は、全株ストレプトマイシン耐性、81% (13/16) がテトラサイクリン耐性を示したが、セフトキシムとカナマイシン耐性は認められなかった (表 4)。また、A 社の孵卵場で採取した発育中止卵の 54 検体 (各ロット 2 個) のうち、12 検体 (22%) からサルモネラが分離され、5 検体は A 社の肉用鶏農場から最も多く分離されたストレプトマイシンとテトラサイクリンに対して耐性を示す Manhattan であった。

一方、B 社の 11 農場から分離された 11 株 (Schwarzengrund 8 株及び Infantis 3 株) は、全株がストレプトマイシン耐性、91% (10/11) がテトラサイクリン耐性を示した。さらに、セフトキシム耐性株が 2 株 (いずれも Infantis) 及びカナマイシン耐性株が 3 株 (Schwarzengrund 2 株及び Infantis 1 株) 認められた。

D. 考察

食肉処理場の枝肉から様々な細菌が分離された。豚枝肉のふき取り材料から大腸菌や *Klebsiella* が主要な分離菌であったが、牛枝肉材料から大腸菌以外に *Enterobacter gergoviae* や *Klebsiella oxytoca* が分離され、汚染菌種が異なる可能性が考えられる。また、分離菌には *Aeromonas* など含まれていたことから、家畜の腸内容物以外に、処理施設等の環境に由来する可能性があることから、食肉処理場の環境調査が必要である。

食肉処理業施設の環境材料から分離菌に関して、ある施設では 2 か所 (クレーンスイッチとまな板) から *Raoultella planticola* が分離されたが、PFGE 型が異なっていた。他方の施設では *Enterobacter cloacae* が 4 か所 (コンベア、まな板、スクレイパー柄、手袋) から、*Enterobacter gergoviae* が 2 か所 (クレーンスイッチ、手袋) から分離され、異なる場所から同一の PFGE 型の細菌が分離された。このように施設間の交差汚染の状況に差異が認められたことから、衛生

管理方法について詳細に比較する計画である。

今回の結果から、東北地方の11%の養豚場からMRSA ST398が分離され、東北地方に家畜関連MRSA (LA-MRSA)が浸潤していることが示された。これまで、関東地方の養豚場においてもLA-MRSAが浸潤していることを明らかにしているが(Sasakiら投稿中)、国内の広い地域に分布していると推察される。今回のと畜場分離株は海外及び輸入検疫中の豚から分離されたMRSA株の性状と酷似していることが示唆され、国内の豚におけるLA-MRSAサーベイランスが必要である。

肉用鶏の生産システムにおける抗菌剤使用とサルモネラの薬剤耐性に関して、素ビナのほとんどを自社生産するA社(種鶏場でテトラサイクリン使用、孵化場でストレプトマイシンをin ovo使用)では、肉用鶏農場と孵卵場で同じ薬剤耐性型を示すサルモネラ(Manhattan)が分離され、孵化場に浸潤するサルモネラによって肉用鶏農場が汚染することが示唆された。また、素ビナを自社孵化場(ストレプトマイシンin ovo使用)及び複数他社(抗菌薬の種類は不明)から導入するB社では、分離株の一部がカナマイシン耐性を示し、自社以外の孵化場からの導入が影響する可能性が示唆された。このように、肉用鶏由来サルモネラの薬剤耐性は、肉用鶏農場で使用される抗菌薬に加え、その上流における抗菌薬使用によって影響を受ける可能性が示唆された。今後は、鶏肉生産の各段階における抗菌剤使用による肉用鶏由来サルモネラの耐性状況への影響について、サーベイランスの可能性について検討する。

E. 結論

本研究によって、各段階を汚染する薬剤耐性菌は、素畜(ヒナ)、飼育期間に感染した動物の食肉処理場への搬入、食肉処理工程での環境等複数の要因が示唆された。飼育期間中の耐性菌対策を講じるために、飼育農場における薬剤耐

性菌の拡散様式を明らかにするとともに、食肉処理場における薬剤耐性菌制御システムを構築することが必要である。

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

Suzuki K, Yossapol M, Sugiyama M, Asai T. Effects of antimicrobial administration on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in broiler flocks. Jpn J Infect Dis. 2019. (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

浅井鉄夫 「畜産分野における薬剤耐性菌の実態について」、平成30年度岐阜県家畜衛生推進者研修会、平成30年6月12日、岐阜県中央家畜保健衛生所、岐阜県

浅井鉄夫 「畜産における抗菌性物質の使用と耐性菌問題」、One Health シンポジウム、2018年7月5日、東京コンファレンスセンター・品川、エランコジャパン株式会社

浅井鉄夫 「畜産物の微生物汚染～薬剤耐性菌を中心に～」、平成30年度岐阜県食品セミナー、2018年10月10日、岐阜県産業技術センター、岐阜県

表1 A処理場の食肉処理工程で分離された細菌

菌種	豚由来		牛由来	
	検体数	株数	検体数	株数
<i>Escherichia coli</i>	37	130	4	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	19	36	1	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4	6	4	10
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	5	6	2	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	4	11
<i>Pantoea</i> spp			2	6
<i>Aeromonas sobria</i>	2	4		
<i>Citrobacter youngae/freundii</i>	2	2		
<i>Morganella morganii</i> spp <i>morganii</i>	1	3		
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	1	1		
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1		
<i>Cronobacter sakazakii</i> group	1	1		
<i>Kluyvera intermedia</i>			1	1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>			1	1
合計	80	191	12	39

図1 豚由来*Escherichia coli*と*Klebsiella pneumoniae*の薬剤感受性 (A処理場)

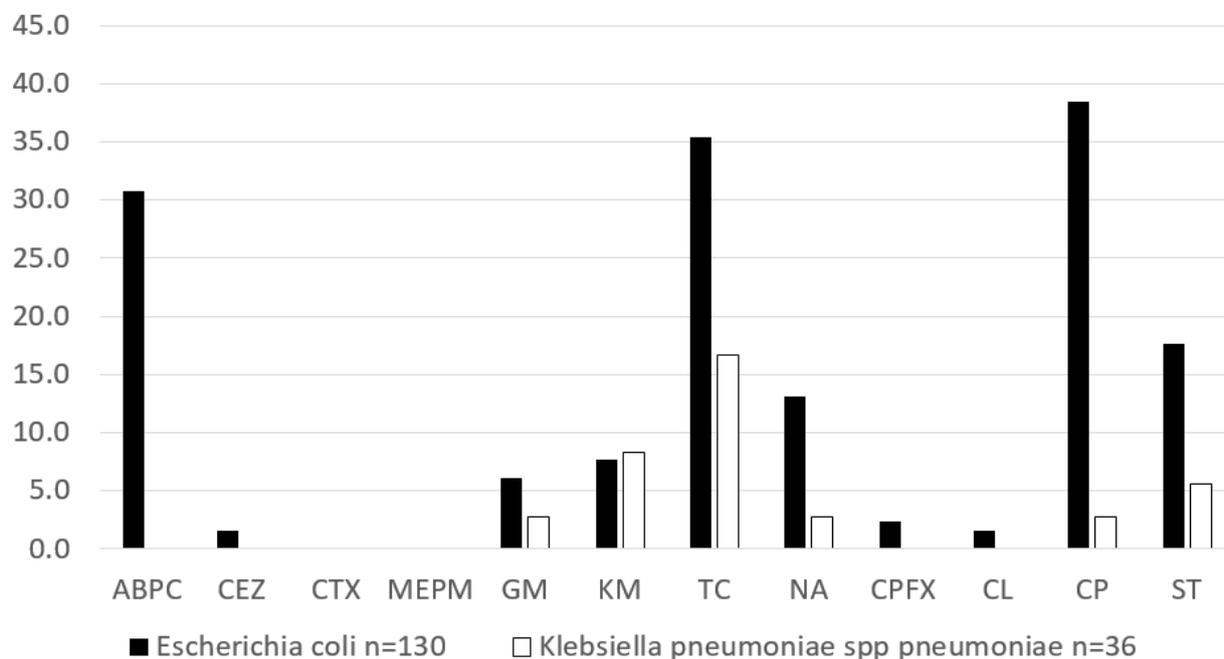


表2 同一日の食肉処理業施設検査で分離された細菌

食肉処理業施設②

場所	菌種	株数
洗浄シンク レバー	<i>Buttiauxella agrestis</i>	5
クレーンス イッチ	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1
	<i>Raoultella planticola</i>	3
まな板	<i>Raoultella planticola</i>	1
包装台	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1

食肉処理業施設⑤

場所	菌種	株数
コンベア	<i>Enterobacter cloacae</i>	3
まな板	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
スクレイパー柄	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
クレーンスイッ チ	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1
手袋	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1

図2 食肉処理業施設②で分離された細菌のPFGE像

Nagoya-Xba1

Nagoya-Xba1

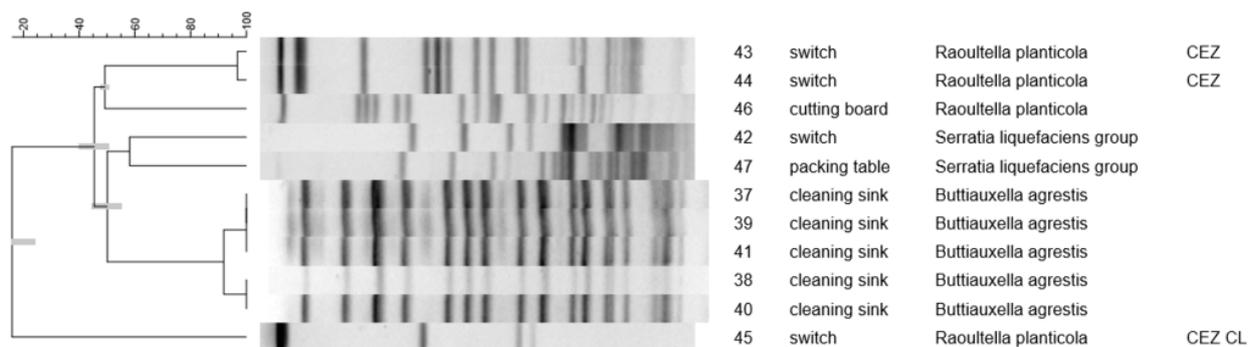


図3 食肉処理業施設⑤で分離された細菌のPFGE像

Nagoya-Xba1

Nagoya-Xba1

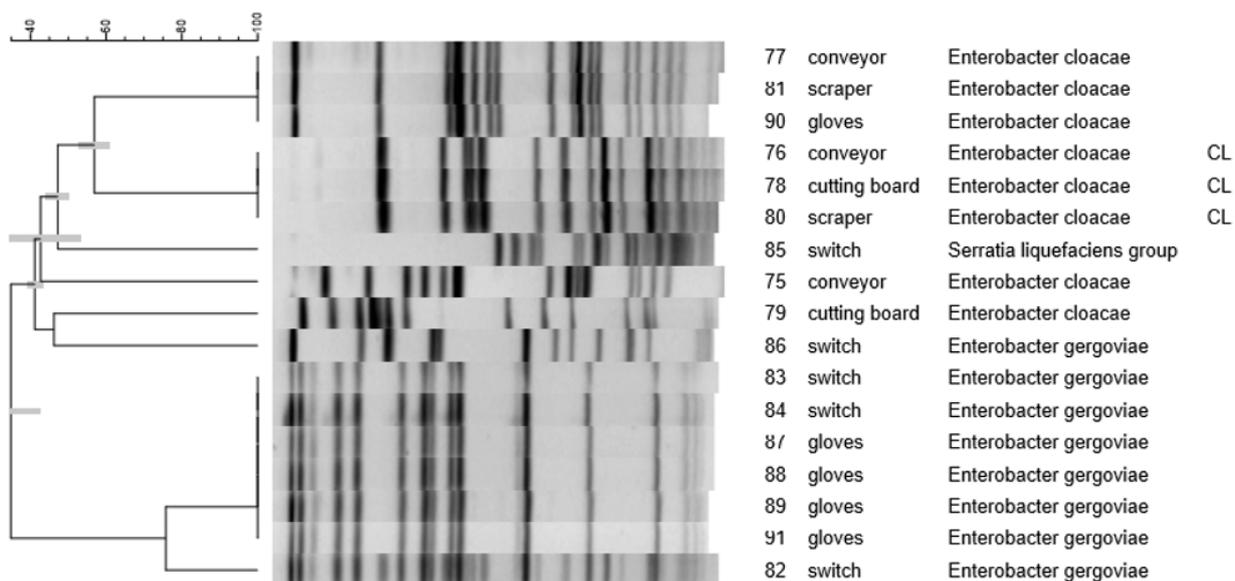


表3 と畜豚から分離されたMRSAの性状

分離株	と畜場	農場	採材日	検体 ¹⁾	ST	spa type	SCC _{mec} type	pvl	czrC	薬剤耐性パターン	亜鉛抵抗性 (MIC:mM)
a-1	a	fa	5月8日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
b-1	a	fb	5月22日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
b-2	a	fb	5月22日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
c-1	a	fc	5月22日	NS	398	t011	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
c-2	a	fc	5月22日	NS	398	t011	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
d-1	a	fd	9月13日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
e-1	a	fe	9月27日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
f-1	b	ff	5月22日	NS	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, CP, TMP	1
f-2	b	ff	5月22日	NS	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC	1
g-1	b	fg	9月14日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
g-2	b	fg	9月14日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, TMP	4
h-1	b	fh	9月29日	NS	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, CP, TMP	1
i-1	b	fi	10月13日	NS	398	t034	V	—	+	ABPC, TC, EM, TMP	4
f-3	b	ff	10月12日	ES	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, EM, CP, TMP	1
f-4	b	ff	10月12日	ES	398	t034	IVa	—	—	ABPC, TC, EM, CP, TMP	1

¹⁾NS:鼻粘膜スワブ, ES: 耳スワブ

表4 A社におけるサルモネラ陽性率と株性状

肉用鶏農場(食鳥処理場で採取)		孵卵場	
盲腸内容物 (各群5羽)	血清型 (薬剤耐性パターン)	ワクチン接種後 発育中止鶏卵 (各ロット2個)	血清型 (薬剤耐性パターン)
100% (16/16)	<u>Manhattan (SM, TC)</u> 7株 Manhattan (SM)3株 Schwarzengrund (SM, TC)4株 Schwarzengrund (SM, TC, TMP)2株	22% (12/54)	<u>Manhattan (SM, TC)</u> 5株 Infantis (SM, TMP)7株