

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：岩田 康一 （名古屋市食肉衛生検査所）

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について種鶏場、孵化場と肉用鶏農場のサルモネラ及び大腸菌、食肉処理場の汚染について搬入動物である豚の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について腸内細菌科細菌の薬剤感受性を調査した。本研究によって、生産段階における薬剤耐性菌の分布は農場・食肉処理場の耐性菌汚染の要因となることが確認された。肉用鶏農場において耐性菌を制御するためには、耐性菌を保菌したヒナの導入防止と環境からの排除が重要と考えられた。

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・分析が重要な課題である。食肉を汚染する薬剤耐性菌は、家畜が食肉処理される過程において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必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状況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。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場合には薬剤耐性菌が含まれていると予想される。本研究では、食肉処理における交差汚染の対策を構築するため、鶏肉の生産段階として種鶏場、孵化場と生産農場、食肉処理場及び食肉処理工程を対象に腸内細菌科細菌等を指標に解析している。1年目に、各段階の薬剤耐性菌汚染には、素畜（ひな）、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存在することが示唆された。そこで、2年目に、飼育動物と処理工程の低減対策と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）のモニタリング方法について検討した。最終年度は、以下の項目について検討する。

菌等を指標に解析している。1年目に、各段階の薬剤耐性菌汚染には、素畜（ひな）、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存在することが示唆された。そこで、2年目に、飼育動物と処理工程の低減対策と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）のモニタリング方法について検討した。最終年度は、以下の項目について検討する。

B. 研究方法

（1）市販肉の交差汚染経路の解析

愛知県下の牛及び豚の食肉処理場において、「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。

2018年に愛知県の牛及び豚の食肉処理施設で

実施した枝肉や環境（まな板、処理ライン）等のふき取り検査により分離された細菌の性状検査を実施したところ、施設内で細菌の拡散が認められる場合と認められない場合があった。食肉衛生検査所の職員から洗浄消毒方法に着目して聞き取りを行った。

（2）鶏肉のフードチェーンにおける腸内細菌の薬剤耐性獲得ポイントの推定

過去に肉用鶏農場において第3世代セファロスポリン（TGC）耐性サルモネラ株が分離され、孵卵場で使用する抗菌薬を2012年3月末にTGCからSMに変更した鶏肉生産者1社で、孵卵場（死籠り卵）、肉用鶏農場（食鳥処理場の盲腸内容物）および鶏肉におけるTGC耐性サルモネラ汚染状況を中心にサルモネラの耐性状況を調査した。薬剤感受性試験は、微量液体希釈法を用い、12剤（アンピシリン、セファゾリン、セフトキサシム、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、コリスチン、クロラムフェニコール及びトリメトプリム）について実施した。なお、当該鶏肉生産者の種鶏場ではマイコプラズマ症対策としてTCが使用されている。

さらに、上記とは別の鶏肉生産者1社が所有する種鶏場17か所（TC不使用）のサルモネラ汚染状況を調査した。

A農場の一ロット由来CTX-M-3産生腸内細菌科細菌9株（大腸菌3株、*Enterobacter cloacae* 3株、*Klebsiella pneumoniae* 3株）とB農場由来CTX-M-25産生腸内細菌科細菌5株（初生びな由来*Enterobacter cloacae* 2株と*Klebsiella pneumoniae* 1株及び1年後の肥育鶏由来大腸菌1株）のプラスミドの塩基配列を次世代シーケンサーで解析した。

（3）国内豚から分離されたLA-MRSAの分子疫学解析

51農場からと畜場に出荷された豚の耳102検体

（1農場当たり2頭）を収集してMRSAを検索した。また、と畜場において豚のMRSA汚染実態調査を実施する際の適切な分離材料を検討するため、と畜場において92農場276頭から鼻腔内壁、耳介背及び枝肉頸部からスワブを採材し、MRSAを検索した。

分離培養は、6.5%NaCl加トリプトニック（TSB）で前増菌培養し、セフトキサシム・アストラオラム添加6.5%NaCl加TSBを用いて増菌培養した。その後、増菌培養液を加菌液-MRSAとMRSA分離培地II（栄研）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。

（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

枝肉ふき取り材料からの分離菌は、*Klebsiella pneumoniae* spp *pneumonia*（豚14検体、牛16検体）、*Escherichia coli*（豚6検体、牛20検体）、*Enterobacter cloacae* complex（豚5検体、牛10検体）、*Enterobacter gergoviae*（豚5検体、牛4検体）の順で15菌種分離された（表1）。牛枝肉由来*Escherichia coli*（n=24）では、ABPC、TC、CPに対する耐性が約10%で認められ、KM、NA、CPFXとSTに対する耐性が約5%で認められた。一方、*Klebsiella pneumoniae*（n=16）では、TC、CP、STに対する耐性が10~20%で認められた（図1）。豚の枝肉由来*Klebsiella pneumoniae*（n=14）では、TCとCPに対する耐性が1株（7.1%）で認められた。

施設間の洗浄消毒方法に大きな違いは認められなかった。交差汚染の認められた施設と認められなかった施設での違いは、洗剤の使用の有無で、交差汚染の認められない施設では洗剤が

使用されていた。

(2) 鶏肉のフードチェーンにおける腸内細菌の薬剤耐性獲得ポイントの推定

孵卵場の死籠り卵 80 検体中 12 検体 (15.0%)

(表 4)、盲腸内容物 24 検体中 23 検体 (95.8%)

及び鶏肉 24 検体のすべて (100%) から分離された。全株が SM 耐性を示し、TGC 耐性は認められなかった (表 5)。

種鶏場調査では 2 か所 (11.8%) からサルモネラが分離され、1 株は KM 耐性であったもの、残り 1 株は供試薬剤すべてに感受性であった。

同一ロット由来 CTX-M-3 産生腸内細菌科細菌 9 株 (大腸菌 3 株、*Enterobacter cloacae* 3 株、*Klebsiella pneumoniae* 3 株) のプラスミドは、*E. cloacae* (3 株中 1 株) のプラスミドを除いて、きわめて類似していた。また、同一農場由来 CTX-M-25 産生腸内細菌科細菌 5 株 (初生びな由来 *Enterobacter cloacae* 2 株と *Klebsiella pneumoniae* 1 株及び 1 年後の肥育鶏由来大腸菌 1 株) では、大腸菌のプラスミドは *Klebsiella pneumoniae* のプラスミドと近縁であった。

(3) 国内豚由来 MRSA の性状解析

国内の浸潤状況を明らかにするため、2019 年度は豚における LA-MRSA 汚染の実態調査とモニタリング材料の検討を行った。関東を中心に 51 農場からと畜場に出荷された豚の耳 102 検体 (2 頭/農場) を供試した。13 農場 (25.5%) 16 検体 (15.7%) から MRSA 16 株が分離され、ST398 が 7 農場 (13.7%) 8 株、ST5 が 4 農場 (7.8%) 6 株及び ST8 が 2 農場 (3.9%) 2 株であった。ST398 の SCC_{mec} は型別できなかつたが、ST398 の全 8 株が *czrC* を保有し、テトラサイクリンとエリスロマイシン耐性を示した。さらに、と畜場において豚の MRSA 汚染実態調査を実施する際の適切な分離材料を検討するため、と畜場において 92 農場 276 頭から鼻腔内壁、耳介背及び枝肉頸部からスワブを採材し、MRSA は 25 農場 (27.2%) の 48 頭 (17.4%) のいずれかの検体が

ら分離され、耳介背スワブ (40 検体)、鼻腔内壁スワブ (22 検体)、枝肉頸部 (1 検体) の順であった (表 6)。

D. 考察

食肉処理場の枝肉から様々な細菌が昨年と同様に分離された。豚枝肉由来と牛枝肉由来大腸菌や *Klebsiella pneumoniae* における薬剤耐性菌の割合は低率であった。今後、個体ごとに分離菌の遺伝子型を PFGE 等で比較検討する。また、昨年度交差汚染が認められなかった施設では、洗剤が使用されていたことから、交差汚染の認められた施設へ事例として紹介することを検討する。

昨年度、東北地方の 11% の養豚場から MRSA ST398 が分離されたが、関東地方においては 25% の養豚場から分離された。本年、検査材料の検討した結果、東北地方の 27% で ST398 が認められ、家畜関連 MRSA (LA-MRSA) の浸潤が進行している可能性が示された。今年度の検査材料の比較研究では、耳介背スワブ、鼻腔内壁スワブと枝肉頸部の比較を行い、耳介背スワブが適切であることを示唆する成績が得られた。また、枝肉の MRSA 汚染は低度であったことから、細菌の生息部位が汚染の程度に影響する可能性が考えられた。今後、全国モニタリングを実施するためには、検出感度の高い耳介背スワブを用いた検査方法のプロトコールを作成していくことが適切と考えられる。

肉用鶏の生産システムにおける抗菌薬使用とサルモネラの薬剤耐性に関して、素びなのほとんどを自社生産する A 社 (種鶏場でマイコプラズマ症対策として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、肉用鶏農場と孵化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、素びなを自社孵化場 (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。さらに、TC 不使用種鶏場から分離されたサルモネラは TC 感受性であった。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、その上流の抗菌薬使用によっても影響を受ける可能性があることが示唆された。

今回保存菌株を用いて農場内の耐性菌の伝播を調査した。初生ひなによる持ち込みなどによる若齢鶏が保菌する薬剤耐性菌が飼育期間に薬剤耐性因子が腸内細菌科細菌間で伝播すること、農場内で維持される可能性が示唆された。以上から、農場へ持ち込まれる段階（種鶏場と孵化場）の管理が重要であることが明らかとなった。

E. 結論

本研究によって、各段階の薬剤耐性菌による汚染には、素畜（ひな）、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存在することが示唆された。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.* 72(3):179-184, 2019.

2. 学会発表

浅井鉄夫 Antimicrobial-resistant bacteria in animals（第 93 回日本感染症学会総会、2019 年 4 月 5 日、名古屋）

浅井鉄夫 JVARM とリスク管理措置（動物用抗菌剤研究会、2019 年 4 月 20 日、東京、）

浅井鉄夫 畜産分野における薬剤耐性菌の対策と課題（第 89 回日本感染症学会西日本地方学術集会・第 62 回日本感染症学会中日本地方学術集会・第 67 回日本化学療法学会西日本支部総会、2019 年 11 月 8 日、静岡県浜松市）

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 動物由来の薬剤耐性菌について（アルボースセミナー、2019 年 10 月 23 日 大阪・10 月 24 日 名古屋・11 月 12 日 福岡・11 月 28 日 東京、250 名、株式会社アルボース）

表1 枝肉から分離された細菌の構成

菌種	牛由来		豚由来	
	検体数	株数	検体数	株数
<i>Escherichia coli</i>	20	24	6	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	16	16	14	14
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	10	12	5	5
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4	4	5	5
<i>Leclercia adecarboxylate</i>	5	5	1	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	3	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	2	2
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	1	1
<i>Pantoea</i> spp	2	2		
<i>Yersinia enterocolitica/frederikse</i>	2	2		
<i>Serratia liquefaciens</i> group	1	1		
<i>Enterobacter asburiae</i>			1	1
<i>Escherichia hermannii</i>			1	1
<i>Kluyvera intermedia</i>	1	1		
<i>Raoultella planticola</i>			1	1
総計	67	73	38	38

図1 枝肉から分離された*Escherichia coli*と*Klebsiella pneumoniae*の薬剤感受性

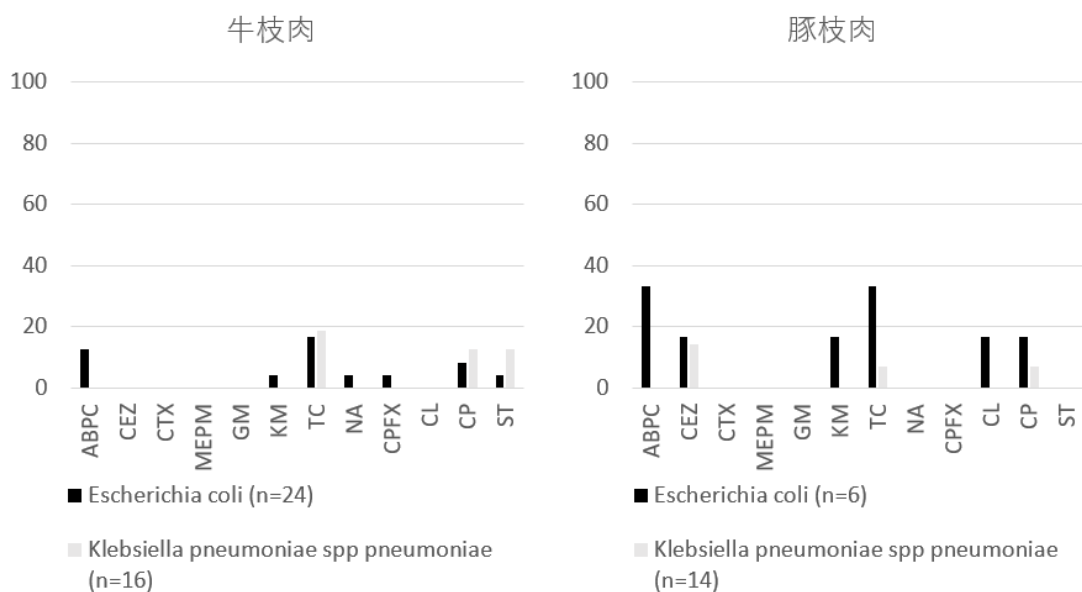


表2 牛の食肉処理施設における洗浄方法と細菌分離数

施設	床洗浄	熱湯	洗剤	次亜塩素酸	菌数 (CFU/cm ²)						
					シンクレバー	クレーンスイッチ	まな板	包装台	手袋	コンベア	スクレイパー柄
施設①	-	+	+	+	6						
施設②	高圧洗浄	+	+	+	17	4	1	1			
施設④	-	+	+	+					1		
施設⑤	ブラシ	+	-	+		20	3		11	1	2

施設⑤では使用器具や場所で交差汚染が認められた

参考（昨年度の成績）：食肉処理施設で分離された細菌のPFGE像

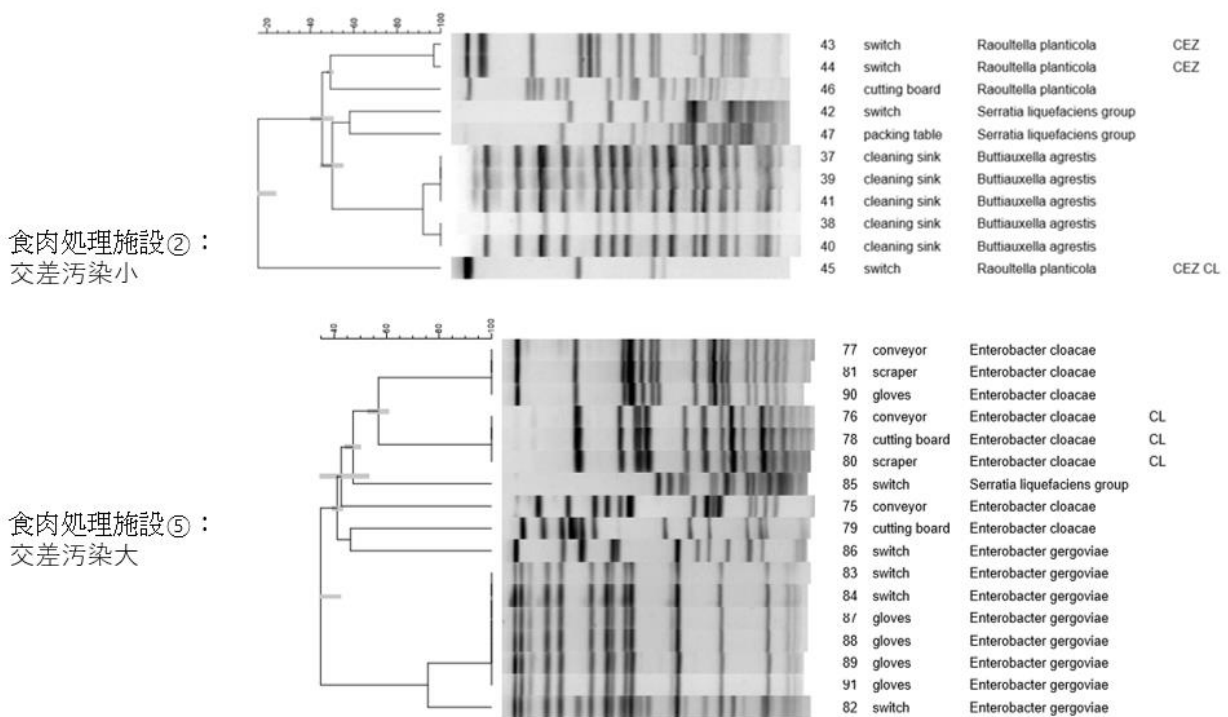
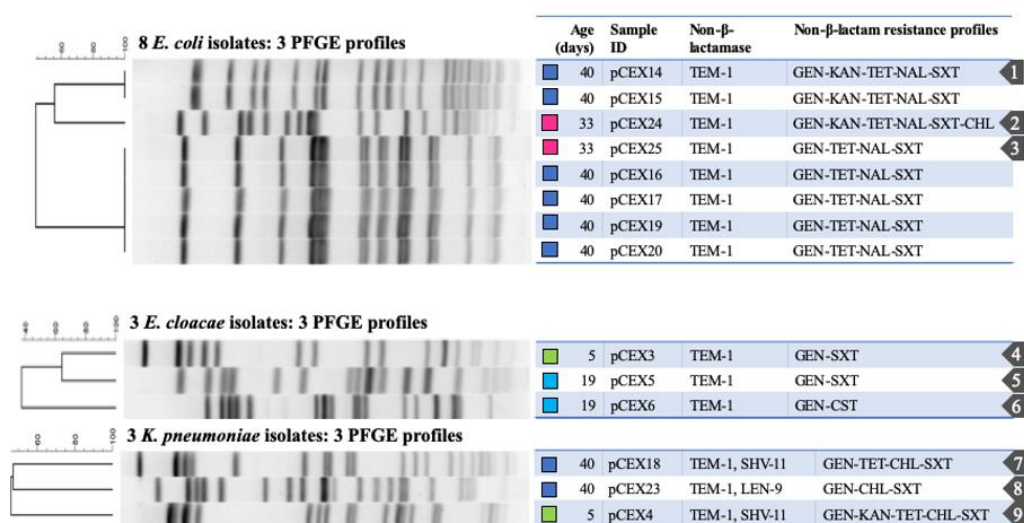
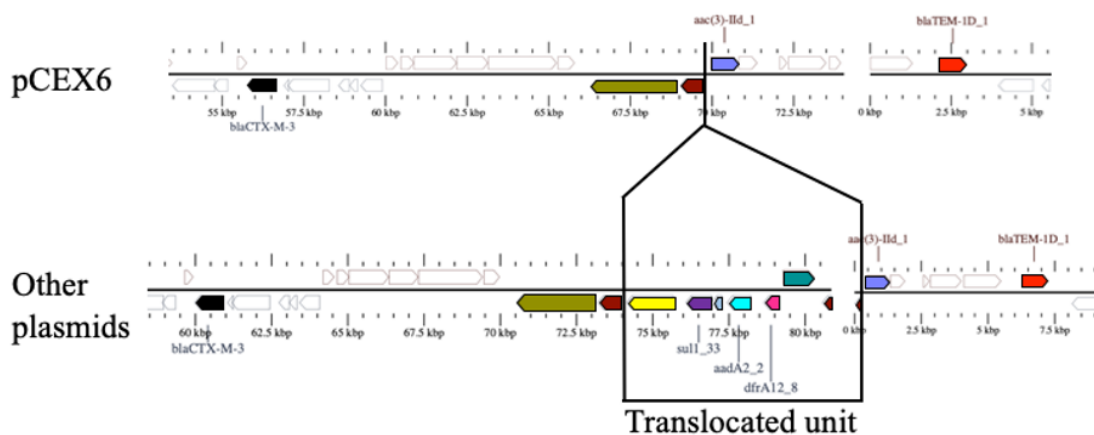


図2 CTX-M-3プラスミドの保有株のPFGE型



3菌種からPFGE型に基づき菌株を選定してトランスコンジュガントを作成し、プラスミドの比較を行った。

図3 鶏群で飼育期間中に認められたプラスミドの比較



CTX-M-3産生腸内細菌科細菌9株（大腸菌3株、*E. cloacae* 3株、*K. pneumoniae* 3株）のプラスミドを比較したところ、19日齢時に分離された*E. cloacae*由来プラスミドpCEX6を除いて同一であった。
飼育期間中に遺伝子の一部が欠損する可能性を示唆

表2 初生びなから分離された CTX-M-25産生菌と1年後に同じ養鶏場で分離されたCTX-M-25産生菌のプラスミド

2016年1~7月に初生びなの敷料由来株

2017年7~8月に肥育鶏の糞便由来株

Yossapol et al., 2017

Plasmid from	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
Size (Kb)	218.2	250.4	166.3	165.6

CTX-M-25 plasmid は*E. coli* DH5α に伝達し、レプリコン型はIncA/Cであった。

図3 初生びなから分離された CTX-M-25産生菌と1年後に同じ養鶏場で分離されたCTX-M-25産生菌のプラスミドの比較

Comparison between draft CTX-M-25 plasmids in *K. pneumoniae* and *E. coli*

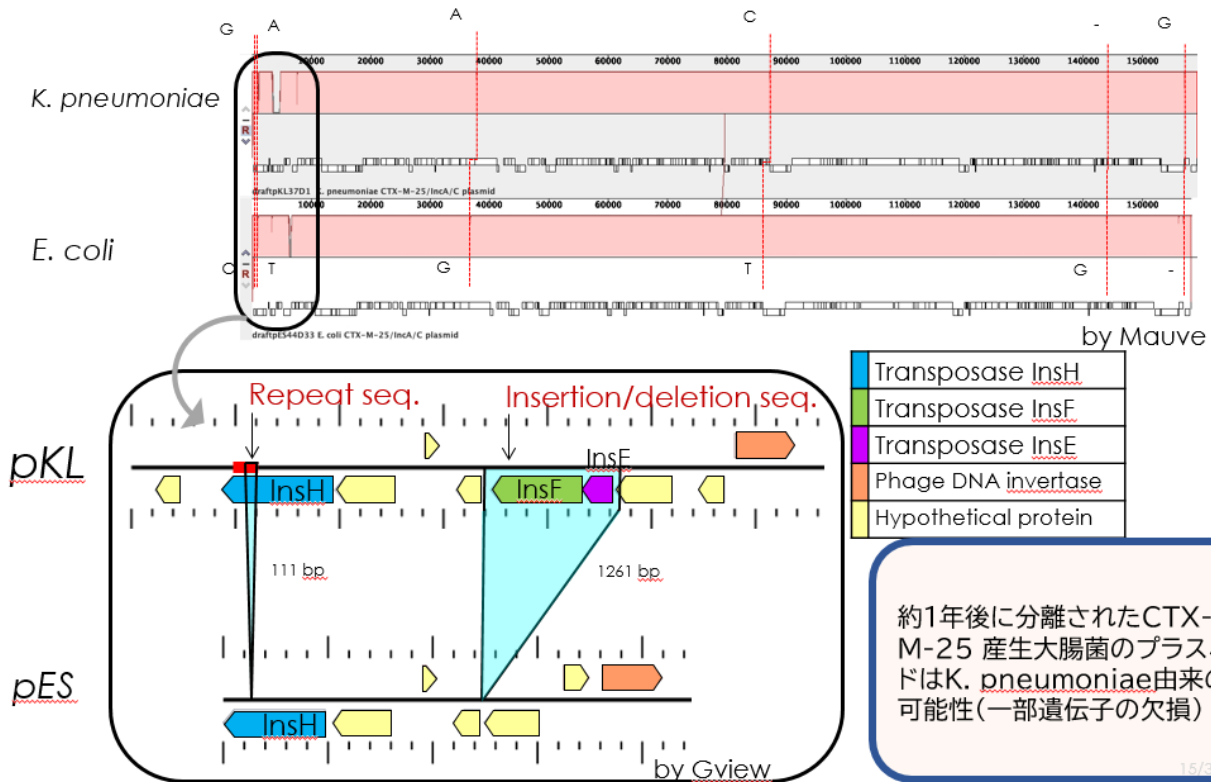


表4 死籠り卵検体におけるサルモネラ分離状況

採取年月日	検体数	陽性数	血清型 (耐性パターン) ¹⁾
2018年11月12日	3	2	<i>S. Manhattan</i> (SM+TC)
2018年11月13日	3	3	<i>S. Manhattan</i> (SM+TC)
2018年11月26日	4	0	-
2018年11月27日	6	0	-
2018年12月6日	9	0	-
2018年12月7日	2	0	-
2018年12月8日	7	0	-
2018年12月21日	3	3	<i>S. Infantis</i> (SM+TMP)
2018年12月24日	5	4	<i>S. Infantis</i> (SM+TMP)
2019年1月7日	6	0	-
2019年2月12日	6	0	-
2019年8月8日	5	0	-
2019年12月12日	2	0	-
2019年12月13日	2	0	-
2019年12月14日	3	0	-
2019年12月18日	6	0	-
2020年1月16日	3	0	-
2020年1月17日	3	0	-
2020年1月18日	2	0	-
合計 (%)	80	12 (15.0%)	

¹⁾SM; ストレプトマイシン, TC; テトラサイクリン,
TMP; トリメトプリム

表5 サルモネラ分離状況と分離株の性状

検体採取日	農場 記号	盲腸内容物			鶏肉（ムネ肉またはと体）		
		検体 数	陽性 数	血清型 ¹⁾ (薬剤耐性パターン) ²⁾	検体 数	陽性 数	血清型 (薬剤耐性パターン)
2018年6月25日	A	5	4	S. M (SM+TC)	1	1	S. M (SM+TC)
2018年7月2日	B	5	5	S. S (SM+TC)	1	1	S. M (SM+TC)
2018年7月9日	C	5	4	S. S (SM+TC)	1	1	S. M (SM+TC)
2018年7月17日	D	5	2	S. M (SM)	1	1	S. S (SM+TC)
2018年7月23日	E	5	1	S. S (SM+TC+TMP)	1	1	S. S (SM+TC+TMP)
2018年8月6日	F	5	1	S. S (SM+TC+TMP)	1	1	S. S (SM+TC+TMP), S. M (SM+TC)
2018年10月22日	G	5	2	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC)
2018年10月29日	H	5	4	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC)
2018年11月5日	I	5	3	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC)
2018年11月19日	J	5	3	S. S (SM+TC)	5	5	S. S (SM+TC), Untypable (SM+TC)
2018年11月26日	D	5	2	S. M (SM)	5	5	S. M (SM), S. S (SM+TC)
2018年12月4日	K	5	2	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+KM+TC), S. S (SM+KM+TC)
2018年12月11日	L	5	2	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC), S. S (SM+KM+TC+TMP)
2018年12月18日	F	5	3	S. M (SM)	5	5	S. M (SM), S. S (SM+KM+TC+TMP)
2019年1月8日	M	5	0	-	5	5	S. M (SM+TC)
2019年2月12日	N	5	4	S. S (SM+KM+TC+TMP)	5	5	S. S (SM+KM+TC+TMP)
2019年6月17日	O	5	4	S. S (SM+TC)	5	5	S. S (SM+TC)
2019年7月1日	P	5	5	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC), S. S (SM+KM+TC+TMP)
2019年7月8日	L	5	4	S. S (SM+KM+TC+TMP)	5	5	S. S (SM+KM+TC+TMP)
2019年7月22日	G	5	1	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC), S. S (SM+TC)
2019年7月29日	M	5	4	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC), S. S (SM+TC)
2019年8月5日	A	5	2	S. M (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC), S. S (SM+KM+TC+NA)
2019年8月26日	O	5	2	S. S (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC), S. S (SM+TC)
2019年10月28日	O	5	3	S. S (SM+TC)	5	5	S. M (SM+TC), S. S (SM+TC)
計		120	67		96	96	

¹⁾S. M; *S. Manhattan*, S. S; *S. Schwarzengrund*.

²⁾SM; ストレプトマイシン, KM; カナマイシン, TC; テトラサイクリン, NA; ナリジクス酸, TMP; トリメトプリム

表6 と殺豚（276頭）からのMRSA分離状況

検査頭数	陽性頭数	内訳
276	48	
		耳介背＋鼻腔内壁＋枝肉頸部 1
		耳介背＋鼻腔内壁 14
		耳介背 25
		鼻腔内壁 8