

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：杉山美千代（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

市川 隆 （名古屋市食肉衛生検査所）

岩田康一 （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が、食肉の細菌汚染には様々な要因が複雑に関与している。本研究では、生産段階と食肉処理工程に着目して、薬剤耐性菌を含む細菌汚染の実態と要因を解明するため、肉用鶏の種鶏場、孵卵場及び生産農場におけるサルモネラと大腸菌、食肉処理施設では出荷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）と食肉処理工程で分離される腸内細菌科細菌等を対象に性状解析した。本研究によって、生産段階を汚染する薬剤耐性菌は、①種鶏場や孵卵場で使用される抗菌剤が素畜（初生ヒナ）の耐性菌保有状況に関与し、②初生ヒナの保有する薬剤耐性菌と③飼育期間に使用された抗菌剤が薬剤耐性菌の分布に関与することが示唆された。また、食肉処理工程の薬剤耐性菌の汚染は、④家畜が保有する腸内細菌科細菌と⑤食肉処理施設の環境汚染等に起因することが示唆された。今後も継続して、国内の畜産現場と食肉における多様な薬剤耐性菌の疫学研究が必要である。

A. 研究目的

食品を介して人へ伝播する薬剤耐性菌を制御する上で、フードチェーンにおける汚染実態の把握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、畜産の生産現場で抗菌薬を使用すると薬剤耐性菌が選択され、薬剤耐性菌が食肉を汚染する危険性が懸念されている。肉用鶏に分布する第3世代セファロスポリン耐性大腸菌やサルモネラは、2005年ごろから増加して、鶏肉の耐性菌汚染が深刻になった。2012年に鶏へのセフトオフルの適応外使用に関して

養鶏業界の自主規制が行われた結果、肉用鶏からの第3世代セファロスポリン耐性大腸菌やサルモネラが減少した（Hiki et al., 2016; Shigemura et al., 2018）。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高率に分離されている。このように、食肉における薬剤耐性菌の問題は、家畜における薬剤耐性菌の分布実態を反映しない場合もあり、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は深刻な問題である。そのため、食肉処理施設における耐性菌の交差汚染を防止することは重要な課題である。

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。

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、孵卵場と生産農場、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（初生ヒナ）、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。最終年には、枝肉由来腸内細菌科細菌の解析、種鶏場・孵卵場・生産農場における抗菌剤の使用と薬剤耐性菌の分布状況の関係、食肉由来薬剤耐性菌のゲノム解析を行った。

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施設（愛知：A 処理施設、岐阜：B 処理施設）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。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。

さらに、同一農場出荷豚の枝肉から同じ PFGE 型の大腸菌が認められたことから、1 豚房で飼育される複数の豚が保有する大腸菌の類似性を検討した。養豚場の同一豚房で飼育する 3 頭の豚から大腸菌を分離し、薬剤感受性と PFGE 解析した。

また、食肉処理場に搬入された豚の糞便由来 *Escherichia albertii* の薬剤感受性と PFGE 解析を行った。

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、薬剤感受性試験は、Clinical Laboratory Standards Institute（CLSI）法に準拠したドライプレート（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法で実施した。供試薬剤は、アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、メロペナム、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、トリメトプリム・スルファメトキサゾールの 12 剤を用いた。PFGE は、CDC のパルスネットのプロトコールに準拠して実施した。

（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

鶏肉生産企業 5 社（A～E）の協力の下で、鶏肉フードチェーンにおけるサルモネラの薬剤耐性状況について調査した。A 社（九州地方）は、初生ヒナのほとんどを自社生産し、種鶏場でテトラサイクリン、孵卵場でワクチンの卵内接種時にストレプトマイシンを混合使用（ストレプトマイシンの in ovo 使用）していた。B 社（中国地方）では、初生ヒナの多くを自社生産し、一部を他社（抗菌薬の使用状況は不明）から購入していた。B 社の種鶏場では抗菌薬を使用せず、孵卵場でストレプトマイシンの in ovo 使用を実施していた。C 社（九州地方）は、初生ヒナのほとんどを関連会社で生産し、関連会社の種鶏場でテトラサイクリン（TC）、孵卵場でカナマイシン（KM）の in ovo 使用していた。D 社（東海地方）は、自社で種鶏場も孵卵場も所有せず、初生ヒナを外部購入（抗菌薬の使用状況は不明）していた。E 社（東北地方）は、初生ヒナのほとんどを自社生産し、種鶏場ではノルフロキサシンを使用し、孵卵場では抗菌薬を使用していなかった。なお、抗菌薬の使用については、治療目的ではなく、感染症予防目的で使用しているものを記載した。

種鶏場の調査には、新鮮盲腸便（1 農場 2 鶏舎

から採取)を供試した。肉用鶏農場の調査には、食鳥処理場で採取した盲腸内容物(1鶏群5羽)を供試した。孵卵場の調査には、卵内ワクチン接種後に発育中止した鶏卵(死籠り卵:1種卵ロット2個)を供試した。

サルモネラの分離は、緩衝ペプトン水による前増菌培養後、ハーナ・テトラチオン液体培地(栄研化学社)およびラパポート・バシリアデイス液体培地(関東化学)を用いた増菌培養と遅延二次増菌培養法を併用し、選択培養にはクロモアガー・サルモネラ培地(関東化学)およびXLD培地(関東化学)を用いて実施した。

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。

細菌感染症治療に使用する抗菌薬が明らかな肉用鶏を生産する2農場(a農場、b農場)で分離したESBL産生大腸菌のプラスミドを、次世代シーケンサーを用いて解析した。a農場では無薬飼育されていたが、b農場では、5~7日齢でアモキシシリンと24~26日齢でST合剤が投薬されていた。a農場で導入した初生びなから分離したCTX-M-25産生*Enterobacter cloacae* 2株とCTX-M-25産生*Klebsiella pneumoniae* 1株及び1年後の肥育鶏から分離したCTX-M-25産生大腸菌1株の計4株とb農場の一ロットの飼育期間中に分離したCTX-M-3産生腸内細菌科細菌9株(大腸菌3株、*Ent. cloacae* 3株、*K. pneumoniae* 3株)を供試した。供試株のPFGE用プラグを作成し、S1ヌクレアーゼ処理後電気泳動した。プラスミド領域のゲルから遺伝子を抽出し、Miseqにより得られたドラフトゲノムをGPATで解析した。さらに、変異プラスミドの出現状況と抗菌剤使用の影響を検討した。

(3) 食肉等から分離された薬剤耐性菌の分子疫学解析

【LA-MRSAの分布調査】

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。

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。

【LA-MRSAの検査材料の検討】

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加トリプトイブR(S)で前増菌培養し、セフトキシム・アストロオム添加6.5%NaCl加TSBを用いて増菌培養した。その後、増菌培養液をクロモアガー-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。

【分離菌株のゲノム解析】

と畜場で採材した豚耳から分離した家畜関連黄色ブドウ球菌(LA-MRSA)8株、岐阜大学で保存していた市販国産鶏肉から分離されたmcr保有コリスチン耐性大腸菌12株を次世代シーケンサーで解析した。

(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

2018年と2019年に枝肉ふき取り材料から分離された菌を同定した結果、大腸菌、*K. pneumoniae*が比較的優勢な菌種であった(表1)。

2018年に枝肉から分離された大腸菌、*K. pneumoniae*、*Ent. gergoviae*、*K. oxytoca*をPFGE解析したところ、複数の豚枝肉に由来する大腸菌と*K. pneumoniae*(図2)、複数の牛枝肉に由来する*K. oxytoca*と*Ent. gergoviae*で同一のPFGEパターンが2つ認められた。1養豚場の1豚房飼育する豚3頭から分離した大腸菌30株のPFGEパターンは、11に分類された。その内、2パターンは、3頭に共通に認められた(図3)。

食肉加工5施設的环境(まな板、処理ライン等)のふき取り材料の検査において、2施設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、施設②では菌種とPFGE型は部位ごとに異なっていたが、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4)。洗浄消毒状況は処理施設ごとの違いが認められた(表3)

(2) 鶏肉のフードチェーンにおける腸内細菌A社については、この3年間に種鶏場(種鶏群)、孵卵場(種卵ロット)及び食鳥処理場(肉用鶏群)の3地点で調査した。各地点のサルモネラ汚染率は、種鶏群で10.0%(3/30)(表4)、種卵ロットで15.0%(12/80)(表5)および肉用鶏群で95.8%(23/24)(表6)であった。分離されたサルモネラ株の約半数(17/38)がストレプトマイシンとテトラサイクリンの両方に耐性なManhattanで3地点すべてから分離された。次いでストレプトマイシンとテトラサイクリンの耐性を含む多剤耐性Schwarzengrundで、肉用鶏群の盲腸内容物から分離された。

B、C及びD社では、ストレプトマイシンとテトラサイクリンの耐性を含む多剤耐性Schwarzengrundが最も多かった(表6)。ただし、

自社の種鶏場(抗菌薬投与なし)および孵卵場(ジヒドロストレプトマイシンのin ovo投与)を有するB社は、C及びD社と比べ、カナマイシン耐性率が低かった。B社の肉用鶏農場では、農場単位のオールインオールアウトが未実施であり、敷料として戻し堆肥を利用していた。

E社の種鶏場では、5.9%の種鶏群からサルモネラが分離されたが、1株には耐性が認められず、もう1株はカナマイシンに対して耐性であった(表4)。

【腸内細菌科細菌における薬剤耐性プラスミド】

無薬飼育する農場由来CTX-M-25産生腸内細菌科細菌5株(初生ヒナ由来*Ent. cloacae*2株と*K. pneumoniae*1株及び1年後の肥育鶏由来大腸菌1株)を解析したところ、大腸菌のESBLプラスミドは、約1年前に初生ひなから分離した*K. pneumoniae*のプラスミドと近縁であった(図5)。

24~26日齢でST合剤を使用されていた農場の同一ロットから分離されたCTX-M-3産生腸内細菌科細菌9株(大腸菌3株、*Ent. cloacae*3株、*K. pneumoniae*3株)のプラスミドは、19日齢で分離された*Ent. 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。この*Ent. cloacae*のプラスミドは、*aadA2*と*dfrA12*を保有するクラス1インテグロン領域の欠損が認められた(図6、7)。

(3) 国内豚由来MRSAの性状解析

東北地方のと畜場で84農場420頭の豚鼻粘膜スワブでは、MRSAは、9農場(11%)13頭(3.1%)の鼻粘膜スワブから分離され、全てST398であった。spa型はt034(8農場)とt011(1農場)で、SCCmec型はIVa型(いずれもspa型はt034:5株)及びV型(spa型はt011とt034)であった。V型株は亜鉛抵抗性遺伝子(*czrC*)保有した。また、関東地方のと畜場で51農場102頭(2頭/農場)の豚耳サンプルでは、MRSAは

13 農場 (25.5%) 16 検体 (15.7%) から分離され、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 (表 7)。

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%) のいずれかの検体から分離され、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 8)。

(4) 食肉等から分離された薬剤耐性菌の分子疫学解析

LA-MRSA (ST398) 8 株は、全て *blaI*、*blaZ*、*ermC*、*tet(38)*、*tet(M)* と *czrC* 陽性であった。7 株が SCCmecIVb で、1 株が SCCmecV だった。SCCmecIVb 7 株のうち、3 株がフロルフェニコール耐性遺伝子 (*fexA*)、4 株が消毒薬耐性遺伝子 (*qacG*) を保有していた。SCCmecV 1 株は、多剤耐性株で、アミノグリコシド (*ant(6)-Ia*)、トリメトプリム (*dfpG*)、フロルフェニコール (*fexA*)、リンコマイシン (*lnu(B)*、*lsa(E)*) およびテトラサイクリン (*tet(K)*) の耐性遺伝子を保有していた (表 9)。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) 保有大腸菌 10 株の MLST 型は多様 [ST206(2 株、以下 1 株)、ST 10、ST2614、ST101、ST1112、ST135、ST5826、UT (6-5-188-8-24-8-6)、ST1196] であった。*mcr-1* は、IncI2 プラスミド上に存在し、サブタイプは 9 株が *mcr1.1* で 1 株が *mcr1.12* であった。多くの株が多剤耐性で、プラスミド性キノロン耐性遺伝子 (*qnrS13*) を保有する 1 株も認められた (表 10)。

D. 考察

(1) 市販肉におえる薬剤耐性菌の汚染

市販肉の薬剤耐性菌汚染は、家畜の腸内に保

有する細菌が食肉処理工程で枝肉に付着することに起因する。食肉処理施設の枝肉や環境ふき取り材料から様々な細菌が分離され、PFGE 型の同一性から個体が保有する細菌による汚染や交差汚染が示唆された。

本研究では、枝肉のふき取り材料から分離された腸内細菌科細菌を用いて、菌種ごとに PFGE 解析を行った。2020 年度の報告書に示したように、一方、食肉処理業施設の環境材料からの分離菌の PFGE 解析では、施設間の交差汚染の状況に差異が認められ、異なる場所から同一の PFGE 型の細菌が分離された施設も認められた。このように、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、食肉処理施設の衛生管理が重要である。

(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

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、種鶏場や孵卵場で使用された抗菌薬に耐性を示すサルモネラが肉用鶏農場に分布することが示めされた。また、種鶏場及び孵卵場において、感染予防目的で抗菌薬が使用されている実態も明らかとなった。素ビナのほとんどを自社生産する A 社では、肉用鶏農場と孵卵場で同じ薬剤耐性型のサルモネラ (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。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、その上流である種鶏場や孵卵場において使用される抗菌薬の影響を受けることが明らかとなった。また、B 社の肉用鶏農場では、第 3 世代セファロスポリン耐性株が今なお分離されており、当該株が農場内に持続的に存在している可能性が示された。

一方、飼育期間中の抗菌剤使用が、薬剤耐性菌の選択圧として作用することは知られている。無薬飼育する農場において、ESBL 産生

Klebsiella pneumoniae が初生ヒナを介して農場へ侵入し、ESBL プラスミドが大腸菌へ伝播して1年以上の間農場内に分布したことが示された。無薬農場で認められたことから、ESBL プラスミドの菌種間伝播には、抗菌剤が関与しないことが示された。一方、飼育期間中に投薬する農場で大腸菌を含む腸内細菌科細菌の間で、ESBL プラスミドが伝播することが示唆されたが、投薬前に19日齢で分離されたESBL産生エンテロバクター由来ESBLプラスミドにおいて、ストレプトマイシン耐性 (*aadA2*) とトリメトプリム耐性 (*dfrA12*) 遺伝子を保有するクラス1インテグロン領域の欠損が認められた。このことは、飼育期間中に2薬剤に感受性を回復した株が出現したが、その後の投薬(24~26日齢でST合剤を使用)によって、トリメトプリム耐性を消失したプラスミドが選択されなかったことが示唆された。以上から、細菌間のプラスミド伝播や耐性遺伝子の欠損株の出現には抗菌薬の使用は影響しないが、欠損株の分布にはその後の抗菌剤使用が関与すると考えられた。

(3) 食肉等から分離された薬剤耐性菌の分子疫学解析

LA-MRSAは、ヨーロッパやアメリカではST398が主で、アジアではST398の他ST9が分布する。人への伝播には、主に養豚従事者などの畜産関係者への直接的な伝播(動物由来感染症)と豚肉などの畜産物を介した間接的伝播(食品媒介感染症)がある。日本において2012年8月~2013年2月の間に東北地方(10農場)、関東地方(23農場)、東海地方(7農場)、九州地方(10農場)で飼育されていた計500頭の鼻粘膜スワブを検査し、関東地方の1農場の10頭中4頭からST398 MRSAが分離されている(Sasakiら、2020)。このように、国内の一部の地域の養豚場でST398 MRSAが確認されていた。その後、2018年の輸入検疫中の豚からST398 MRSAが分離報告された

(Furunoら、2018)。輸入豚は繁殖雌豚の生産農場(種豚場)へ導入される場合が多く、生産された繁殖雌豚は国内の養豚農家へ広く流通する。そのため、国内の豚におけるST398 MRSAの調査は喫緊の課題と考えられた。本課題で、東北地方と関東地方のと畜場で調査した結果、LA-MRSAが両地方の養豚場に分布すること、性状解析により多様な遺伝子型であること、多剤耐性LA-MRSAが分布することを明らかにした。LA-MRSAの分離率は、農場調査に比べ、と畜場段階で実施した方が高い傾向がある。現在までに、中部から九州における調査は未実施であることから、国内の豚におけるMRSAの分布実態を明らかにするため、全国調査の実施が望まれる。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*)保有大腸菌を解析した結果、*mcr-1* サブタイプは*mcr1.1*と*mcr1.12*で、IncI2プラスミド上に存在していたが、10株のMLST型は多様であった。これらのことから、鶏肉を汚染するコリスチン耐性大腸菌は多様で、国産肉用鶏の大腸菌間でプラスミド伝播を伴いながら分布していることが示唆された。また、薬剤耐性の保有状況も株間で異なっていた。アミノグリコシド耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、プラスミド性キノロン耐性遺伝子を保有する株も認められ、多剤耐性菌への伝播は抗菌剤治療の選択肢を減少させる原因になるため、継続的な監視を要する。

近年、豚熱(豚コレラ)や鶏インフルエンザなどの家畜伝染病の防疫のため、農場採材を継続できなくなることがあり、と畜場段階で採材する方が容易な場合もある。しかし、と畜場搬入された家畜における抗菌剤の使用状況を把握することは、管轄の違いにより困難である。今後、家畜保健衛生所や食肉衛生検査所の協力の下で持続性のあるサーベイランス/モニタリングの耐性を構築する必要がある。

E. 結論

薬剤耐性菌による食品の汚染では、生産段階に分布する薬剤耐性菌がと畜場での食肉処理段階で残存することに起因する。生産段階での薬剤耐性菌の分布には、抗菌剤の使用実態が関連する。

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

- ① 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 佐々木貴正・百瀬愛佳・朝倉 宏・浅井鉄夫 孵卵場におけるセフトオフル使用中止後のブロイラー鶏群由来および鶏肉由来サルモネラの薬剤耐性 鶏病研報 56(2), 47-52, 2020.
- ③ Sasaki Y, Asai T, Haruna M, Sekizuka T, Kuroda M, Yamada Y. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from pigs in Japan. *Jpn J. Vet. Res.* 68(3): 197-202, 2020.
- ④ Sasaki Y, Yamanaka M, Nara K, Tanaka S, Uema M, Asai T, Tamura Y. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from pigs at abattoirs in Tohoku region, Japan. *J Vet Med Sci.* 82(9):1400-1403, 2020.
- ⑤ Yossapol M, Suzuki K, Odoi JO, Sugiyama M, Usui M, Asai T. Persistence of extended-spectrum β -lactamase plasmids among Enterobacteriaceae in commercial broiler farms. *Microbiol Immunol.* 64(10):712-718, 2020.
- ⑥ Sasaki Y, Sakurada H, Yamanaka M, Nara K, Tanaka S, Uema M, Ishii Y, Tamura Y, Asai T.

Effectiveness of ear skin swabs for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs at abattoirs. *J Vet Med Sci.* 83(1):112-115, 2021.

- ⑦ 佐々木貴正・浅井鉄夫 国内養豚場の家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌浸潤状況 All about Swine 57-58:37-44, 2021.

2. 学会発表

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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)
- ⑤ 浅井鉄夫 家畜・食肉・ヒトにおけるコリスチン耐性菌の分離状況 (第 94 回日本感染症学会総会、2020 年 8 月 21 日、東京)

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

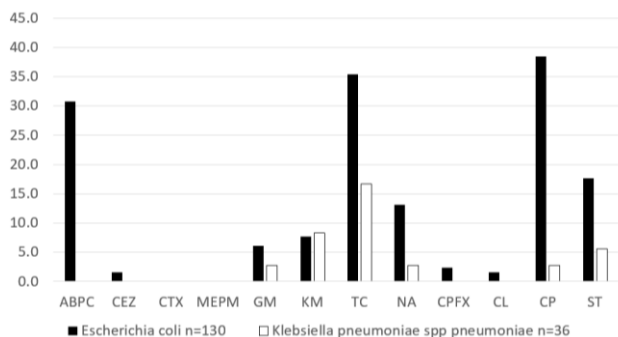
3. その他

なし

表 1 A 食肉処理施設で枝肉から分離された細菌

菌種	2018				2019			
	豚由来		牛由来		牛由来		豚由来	
	検体数	株数	検体数	株数	検体数	株数	検体数	株数
<i>Escherichia coli</i>	37	130	4	6	20	24	6	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	19	36	1	1	16	16	14	14
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	5	6	2	3	10	12	5	5
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4	6	4	10	4	4	5	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	4	11	3	3	1	1
<i>Citrobacter youngae/freundii</i>	2	2			1	1	1	1
<i>Pantoea</i> spp			2	6	2	2		
<i>Kluyvera intermedia</i>			1	1	1	1		
<i>Raoultella ornithinolytica</i>			1	1			1	1
<i>Aeromonas sobria</i>	2	4						
<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>Leclercia adecarboxylate</i>					5	5	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					2	2	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
合計	80	191	12	39	67	73	38	38

a)



b)

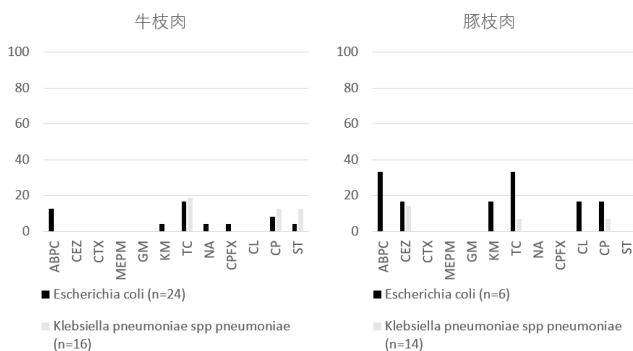


図 1 A 食肉処理施設で枝肉から分離された細菌の薬剤感受性

a)2018 年度、b) 2019 年度

a) 大腸菌



b) *Klebsiella pneumoniae*



図2 豚枝肉由来大腸菌とクレブシエラの PFGE 解析 a)大腸菌、b)*Klebsiella pneumoniae*

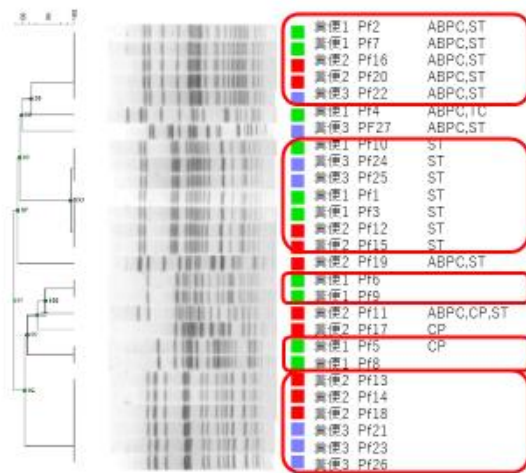
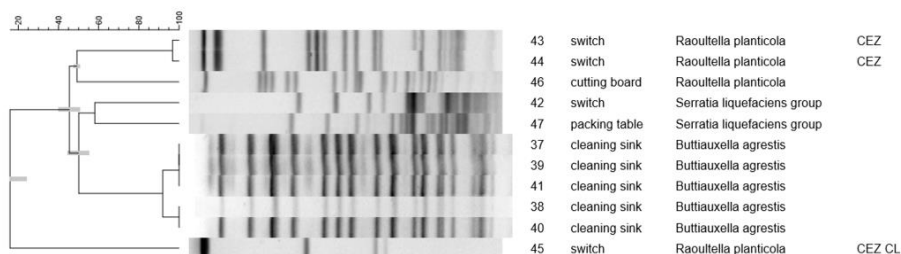


図3 1農場の同居豚から分離した大腸菌の PFGE 及び薬剤感受性

表 2 食肉加工施設で分離された細菌

施設②			施設⑤		
場所	菌種	株数	場所	菌種	株数
洗浄シンク レバー	<i>Buttiauxella agrestis</i>	5	コンベア	<i>Enterobacter cloacae</i>	3
クレーンス イッチ	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1	まな板	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
	<i>Raoultella planticola</i>	3	スクレイパー柄	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
まな板	<i>Raoultella planticola</i>	1	クレーンスイッ チ	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
包装台	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1		<i>Serratia liquefaciens</i> group	1
				<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
			手袋	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
				<i>Enterobacter cloacae</i>	1

a)施設②



b)施設⑤

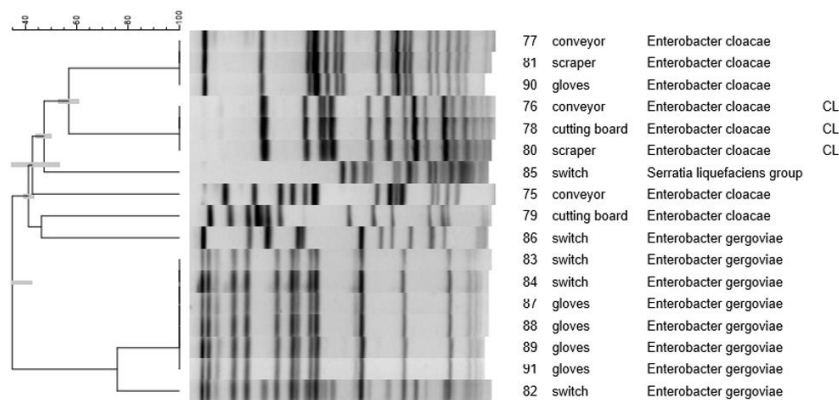


図 4 食肉加工施設で分離された細菌の PFGE 解析

表 3 食肉加工施設における洗浄消毒方法と細菌分離数

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

表4 種鶏場におけるサルモネラ汚染実態調査の結果

企 業	投与抗菌薬	調査鶏群数 陽性/検査	耐性型	
			分離株	
A	OTC	3/30	Manhattan	SM-TC
			Mahattan	SM-TC
			Derby	SM-TC-TMP
E	NFLX	2/34	Schwarzengrund	感受性
			Schwarzengrund	KM

略語 OTC: オキシテトラサイクリン, TC: テトラサイクリン, NFLX: ノルフロキサシン, SM: ストレプトマイシン, KM: カナマイシン, TMP: トリメトプリム

表5 孵卵場におけるサルモネラ汚染実態調査の経過

調査地点	in ovo 使用	材料	陽性数/検査数	分離血清型 (株数)	耐性型
孵卵場	DSM	発育中止卵 (死籠り卵)	12/80	Manhattan (5)	SM-TC
				Infantis (7)	SM-TMP

略語 DSM: ジヒドロストレプトマイシン, TC: テトラサイクリン, SM: ストレプトマイシン, TMP: トリメトプリム

表6 肉用鶏農場におけるサルモネラ汚染実態調査の結果

企 業	投与抗菌薬 (種鶏場)	in ovo 使用 (孵卵場)	鶏群数 陽性/検査	血清型(株数)	耐性株数				
					TC	SM	KM	TMP	CTX
A	OTC	DSM	23/24	Manhattan(13)	10	13	0	0	0
				Schwarzengrund(10)	10	10	2	4	0
B	不使用	DSM(一部不明)	19/20	Schwarzengrund(15)	15	15	4	10	0
				Infantis(3)	2	1	1	1	2
				Untypable(1)	1	1	0	1	0
C	OTC	KM	7/8	Schwarzengrund(7)	6	6	7	6	0
D	不明	不明	5/7	Schwarzengrund(5)	5	5	4	4	0

略号 OTC: オキシテトラサイクリン, TC: テトラサイクリン, DSM: ジヒドロストレプトマイシン, SM: ストレプトマイシン, KM: カナマイシン, TMP: トリメトプリム, CTX: セフトキシム.

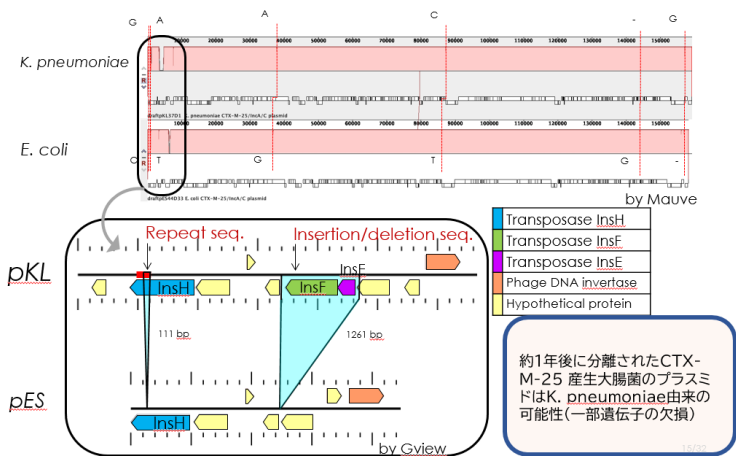
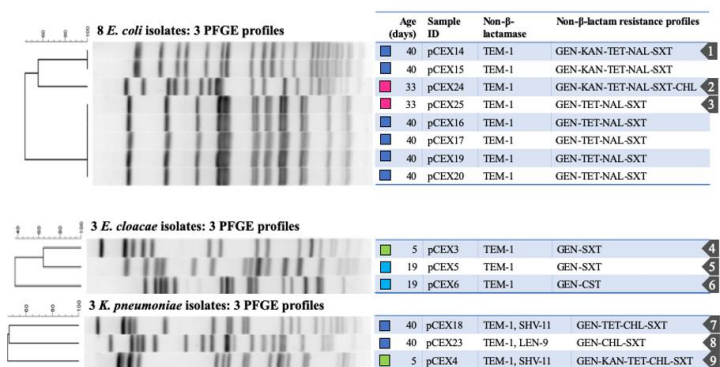
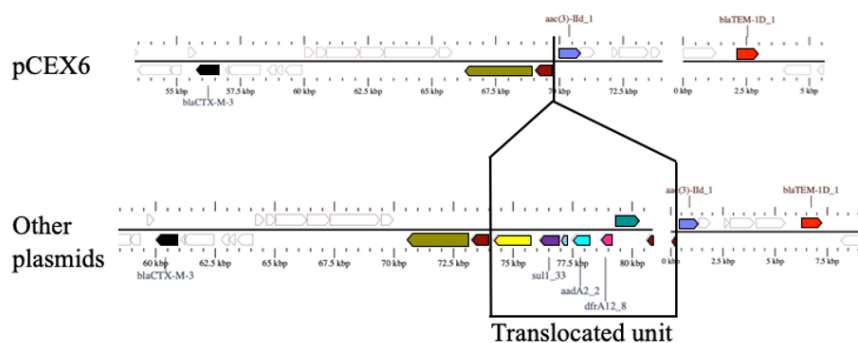


図5 初生びな由来 *K. pneumoniae* と1年後に a 農場で分離した大腸菌の CTX-M-25 プラスミドの類似性



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6 肉用鶏農場(b 農場)の1 鶏群から経時的に分離した腸内細菌科細菌の CTX-M-3 プラスミド保有株の PFGE 解析



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

図7 肉用鶏農場(b 農場)の1 鶏群から経時的に分離した腸内細菌科細菌の CTX-M-3 プラスミドの比較

表 7 と畜場出荷豚からの MRSA の分離

調査年	農場*	頭数*	ST/spa/SCCmec	調査地域
2017	鼻腔スワブ	9/84	ST398/t034/V (8)	東北
		(11.0)	ST398/t011/V (2)	
		(3.1)	ST398/t034/IVa (3)	
2018	耳サンプル	13/51	ST398/t034/IVb (7)	関東
		(25.5)	ST398/t034/V (1)	
		(15.7)	ST5/t1560/V (3)	
			ST5/t002/UT (2)	
			ST8/t18785/IVa (2)	

* 陽性/検査 (%)

表 8 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

表 9 豚耳から分離した ST398/t034 MRSA における耐性遺伝子の分布

株	県	SCCmec	czrC	耐性遺伝子型
a-1	A	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1,</i>
a-2	A	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, fexA, str,</i>
f-1	B	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, str,</i>
g-1	C	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, qacG,</i>
h-1	D	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, qacG,</i>
j-1	A	V	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, fexA, ant(6)-Ia, dfrG, lnu(B), lsa(E), spw, tet(K)</i>
l-1	A	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, fexA, qacG, str,</i>
m-1	E	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>fexA, qacG,</i>

表 10 鶏肉から分離された *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌

Strain No.	Serotype	MLST	<i>mcr</i> gene subtype	Resistance genes against						
				Amino-glycoside	β -lactam	Phenicol	Tri-methoprim	quinolone	Sulfa	Tetracycline
<u>CL-266</u>	O13/O135:H48	ST 10	<i>mcr</i> -1.1							
				<i>aadA5</i> ,						
<u>CL-276</u>	H34	ST2614	<i>mcr</i> -1.1	<i>aph</i> (3'')-Ib,			<i>dfrA17</i>	<i>gyrA</i> (S83L)	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)
				<i>aph</i> (6)-Id						
				<i>aph</i> (3'')-Ib,						
<u>CL-304</u>	H31	ST101	<i>mcr</i> -1.1	<i>aph</i> (3')-Ia,	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>catA1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>gyrA</i> (S83L)	<i>sul1</i> ,	<i>tet</i> (B)
				<i>aph</i> (6)-Id					<i>sul2</i>	
				<i>aph</i> (3'')-Ib,						
<u>CL-21</u>	H27	ST1112	<i>mcr</i> -1.12	<i>aph</i> (3')-Ia,				<i>gyrA</i> (S83L)		<i>tet</i> (B)
				<i>aph</i> (6)-Id						
				<i>aph</i> (3'')-Ib,						
<u>CL-25</u>	O91:H28	ST135	<i>mcr</i> -1.1	<i>aph</i> (6)-Id						<i>tet</i> (A)
<u>CL-480</u>	O81:H7	ST5826	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1B}		<i>dfrA1</i>	<i>gyrA</i> (S83L)	<i>sul1</i>	<i>tet</i> (A)
<u>CL-230</u>	H52	novel	<i>mcr</i> -1.1					<i>qnrS13</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)
								<i>gyrA</i> (S83L,		
<u>CL-184</u>	O91:H28	ST1196	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1B}			D87N)		<i>tet</i> (A)
<u>CL-859</u>	H5	ST206	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1}					
<u>CL-933</u>	H5	ST206	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1}					