

令和2年度調査研究

1. 令和2年度残留抗菌性物質検査結果	…	1
2. 仙台市食肉市場に搬入される家畜における β-ラクタマーゼ産生菌保有状況	…	5
3. 牛の胸腔内の腫瘍	…	11

1. 令和2年度残留抗菌性物質検査結果

1. はじめに

食品中への抗菌性物質の残留は、耐性菌の出現や食品アレルギーの誘引になるとも言われており、食品衛生法（食品、添加物等の規格基準）により規制されている。本所においても、昭和59年より食肉中の残留抗菌性物質について検査を実施してきたところであり、以下に令和2年度の検査の概要を報告する。

2. 検査対象

仙台市ミートプラントに搬入された獣畜のうち、次に該当する獣畜を検査対象とした。

- (1) 病畜として搬入された獣畜。
- (2) 健康畜として搬入された1歳未満の牛（とく）。
- (3) 健康畜として搬入され、敗血症を疑わせる所見を認めた獣畜。
- (4) 健康畜として搬入され、抗菌性物質の使用を疑わせる所見を認めた獣畜。

3. 方法

本所独自法に従って検査を行った。

(1) プレミテストによる簡易法

平成20年4月から腎臓、筋肉について実施。

※プレミテストは製造元r-biopharm社、輸入元アヅマックス(株)の検査用培地で、厚生省通知（平成6年7月1日衛乳第107号）に基づく簡易法よりも迅速かつ高感度である。詳細は平成21年度事業概要の調査研究資料「プレミテストによる残留抗菌性物質の簡易検査法の検討」等を参照のこと。

(2) LC/MS/MSIによる残留抗菌性物質一斉分析法

簡易法により残留抗菌性物質陽性と判定された獣畜の筋肉についてLC/MS/MSIによる一斉分析を行った。当所では、抗菌性物質を含む動物用医薬品43成分の一斉分析を行っており、このうち妥当性評価試験により妥当性が得られた31成分を定量可能物質とし、残り12成分を定性可能物質としている。表1に定量可能物質31成分を示した。

表1 令和2年度 LC/MS/MSによる残留抗菌性物質一斉分析法の定量可能物質

対象成分名	
マルボフロキサシン	スルファジメトキシシ
セファロニウム	スルファメキサゾール
トリメプリム	オキシリン酸
シプロフロキサシン	エリスロマイシン
オルメプリム	スルファドキシシ
オキシテトラサイクリン	タイロシ
ダノフロキサシン	ベンジルペニシリン
エンロフロキサシン	デキサメタゾン
テトラサイクリン	オキサシリン
ドキシサイクリン	メントン
メクロプラミド	クロキサシリン
オルビフロキサシン	ナフシリン
セファゾリン	ジクロキサシリン
スルファジミジン	チアンフェニコール
スルファモノメトキシシ	フロルフェニコール
スルファクロルピリダジン	

4. 結果および考察

令和2年度の簡易法の検査結果を表2に示した。検査を実施した218頭のうち簡易法で腎臓検体が陽性を示したのは、牛7頭、とく1頭であった。

簡易法で腎臓陽性となった獣畜の筋肉を用いてLC/MS/MSによる残留抗菌性物質一斉分析(独自法)を行った結果、定量下限値を超えて抗菌性物質が検出された検体はなかった。ただし、腎臓陽性となった牛7頭のうち1頭は、筋肉においてLC/MS/MSによる一斉分析を行わず、簡易法で陰性を確認した。

平成23年度から令和2年度までの簡易法による腎臓からの抗菌性物質の検出頭数(腎陽性率)を表3および図1に示した。平成27年度までは6%前後を推移しており、平成28年度は1.5%と大きく低下したが、平成29年度は再び5.6%に上昇した。その後は減少傾向にあり、今年度は3.7%と過去十年間の平均より低い陽性率となったが、腎臓陽性となった獣畜の8件中5件が投薬歴について未申告であった。これらについては、出荷者から正確な投薬歴の申告をうけるよう、荷受会社へ口頭指導している。

今後も、荷受会社を通じ出荷者に対して投薬歴申告の徹底と薬剤の適切な使用を促すとともに

に、抗菌性物質を含めた動物用医薬品の検査を継続し、安全な食肉の供給に寄与していきたい。

表2 令和2年度 簡易法検査結果

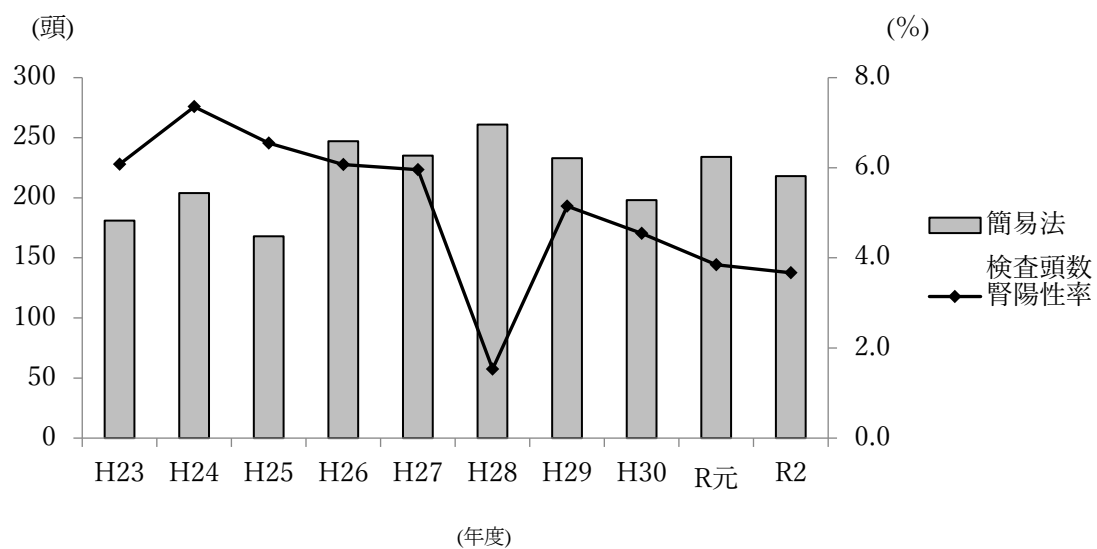
	牛		とく		豚		小計		総計
	健康畜	病畜	健康畜	病畜	健康畜	病畜	健康畜	病畜	
検査頭数	16	106	25	1	70	0	111	107	218
腎陽性頭数	0	7	1	0	0	0	1	7	8
腎陽性率(%)	0.0	6.6	4.0	0	0	0	0.9	6.5	3.7
腎筋陽性頭数	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腎筋陽性率(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 過去10年間の簡易法による腎臓からの抗菌性物質検出頭数の推移

実施年度	牛	とく	豚	計
平成23年度	8 (5)	0 (0)	3 (1)	11 (6)
平成24年度	9 (5)	2 (0)	4 (0)	15 (5)
平成25年度	8 (5)	1 (0)	2 (1)	11 (6)
平成26年度	12 (7)	1 (0)	2 (1)	15 (8)
平成27年度	10 (4)	3 (0)	1 (0)	14 (4)
平成28年度	2 (1)	2 (0)	0 (0)	4 (1)
平成29年度	9 (6)	2 (1)	1 (0)	12 (7)
平成30年度	8 (8)	1 (0)	0 (0)	9 (8)
令和元年度	8 (7)	1 (0)	0 (0)	9 (7)
令和2年度	7 (7)	1 (0)	0 (0)	8 (7)

()は病畜の頭数:再掲

図1 過去10年間の簡易法による検査頭数と腎陽性率の推移



2. 仙台市食肉市場に搬入される家畜における

β -ラクタマーゼ産生菌保有状況

1. はじめに

近年、抗菌性物質が効かない薬剤耐性菌 (AMR: Antimicrobial resistance) による感染症の増加が世界的に問題となっている。日本においても 2016 年 4 月の関係閣僚会議で「AMR 対策アクションプラン(2016-2020)」が策定され、One Health approach の視点から人・動物・環境等の分野を超えて関係機関が協働して取り組むこととなった。

農林水産省においてはすでに平成 11 年度より農場での全国的な調査(動物由来耐性菌モニタリング:JVARM)を開始しており、さらに平成 24 年度よりと畜場および食鳥処理場における薬剤耐性菌のモニタリングを開始し結果を公表している。また、全国の食肉衛生検査所において搬入された家畜の AMR 保有状況についての報告も見受けられるようになっている[1][2]。

当所においてはこれまで AMR に関する調査を実施したことがないが、公衆衛生行政を担う検査機関として搬入される家畜の薬剤耐性菌保有状況を把握しておくことは必要であると考え、今回腸内細菌の主な薬剤耐性機構である β -ラクタマーゼを産生する菌について調査した。

2. 調査方法

2019 年 5 月～2020 年 3 月に搬入された牛 100 頭、豚 105 頭について直腸内容物を採取し、 $1 \mu\text{g/ml}$ セフトキシム(CTX)加マッコンキー寒天培地(以下、CTX 培地)に塗抹し 37°C で 24 時間培養(直性塗抹培養)すると同時に、およそ 2g を mEC 培地、BPW 培地 20ml で 42°C 一晚培養し、CTX 培地に塗抹し 37°C で 24 時間培養(増菌培養)した。各 CTX 培地に発育したコロニーを CTX 耐性菌とし、アルカリ熱抽出法による DNA 抽出後、スクリーニング試験に供した。

スクリーニング試験は Monstein らの方法[3]により実施し、スクリーニング試験で CTX-M 遺伝子陽性となった検体はさらに Li Xu らの Multiplex PCR 法[4]により CTX-M-G 型別を行った。

ESBL 産生性の確認は CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)に準拠し、ESBLs 確認用薬剤感受性試験ディスク(栄研化学)の 4 薬剤、CTX、セフポドキシム(CPX)、セフピロム(CPR)、およびセフトジジム(CAZ)を使用し、クラブラン酸合剤ディスクの阻止円が 5mm 以上

拡大したものを陽性とした。スクリーニング PCR において TEM 遺伝子のみを検出もしくはいずれの遺伝子も検出されなかった菌株および ESBL 産生性試験において ESBL 非産生であった菌株について AmpC/ESBL 鑑別ディスク(関東化学)により AmpC 産生を確認後、さらに Multiplex PCR 法[5]により ACC, FO, MOX, DHA, CIT, EBC の型別を行った。

ESBL 産生菌または AmpC 型菌と判定された菌株について BBL クリスタル E/NF により菌種を同定した。また、CLSI に準拠した KB ディスク(栄研化学)を用いた薬剤感受性試験は、ESBLs 確認試験で用いた CTX, CPX, CAZ, CPR に加えアンピシリン(ABP), セファゾリン(CEZ), フロモキシセフ(FOX), メロペネム(MPM), アズトレオナム(AZT), カナマイシン(KM), ゲンタマイシン(GM), アミカシン(AMK), ナリジクス酸(NA), シプロフロキサシン(CIP), レボフロキサシン(LVX), テトラサイクリン(TC), クロラムフェニコール(CP), ホスホマイシン(FOM), スルファメトキサゾール・トリメプリーム(ST)の 19 薬剤について実施した。

3. 成績

牛および豚における各耐性菌の検出頭数を表1に、培養法による検出頭数の違いを表2に示す。直接塗抹培養もしくは増菌培養で CTX 耐性株が検出されたのは牛 100 頭中 34 頭(34%), 豚 105 頭中 44 頭(42%)であり、その内 ESBL 産生菌は牛 19 頭(19%)・豚 25 頭(23.8%), AmpC 型菌は牛 9 頭(9%)・豚 18 頭(17.1%)であった。また、牛2頭・豚3頭において ESBL 産生菌・AmpC 型菌の両方が検出された。

培養法別では、増菌培養を用いた方が直接塗抹培養のみの場合より検出率が高く($p < .05$) 培地別では BPW 培地が mEC 培地より多く検出される傾向が認められた。一方、豚における AmpC 型菌で直接塗抹法でのみ検出されたものが 1 頭あった。

表1 CTX 耐性菌・ESBL 産生菌・AmpC 産生菌の検出頭数

	CTX 耐性菌	ESBL 産生菌	AmpC 型菌
牛(100 頭)	34 (34%)	19 (19%)	9 (9%)
豚(105頭)	44(41.9%)	25 (23.8%)	18 (17.1%)

表2 培養法別の ESBL 産生菌・AmpC 産生菌の検出頭数

		ESBL 産生菌	AmpC 型菌
牛	直接塗抹	4/19(21.1%)	3/9(33.3%)
	BPW 増菌	16/19(84.2%)	9/9(100%)
	mEC 増菌	13/19(68.4%)	8/9(88.9%)
豚	直接塗抹	8/25(32%)	15/18(83.3%)
	BPW 増菌	23/25(92%)	17/18(94.4%)
	mEC 増菌	14/25(56%)	13/18(72.2%)

検出された菌株数および遺伝子型を表 3 に示した。ESBL 産生菌では牛、豚ともにほとんどが CTX-M-1 もしくは CTX-M-9 群であり、牛で CTX-M-8 群及び TEM+SHV 型が、豚で TEM 型がそれぞれ 1 株ずつ検出された。AmpC 型菌で型別できたものは CIT 型のみでありそれ以外は型別不能であった。また、CIT 型は型不明より有意に($p<.05$)TEM 遺伝子陽性であった。検出された 76 株中 70 株(約 92%)は *E.coli* と同定され、牛で分離された 3 株、豚で分離された 3 株の合計 6 株が *Escherichia species*(4 株), *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* と同定されたが、菌種と遺伝子型に相関は認められなかった。

表 3 検出菌株数および遺伝子型 (n=76)

	ESBL 産生菌 (n=48:牛 22,豚 26)						AmpC 型菌 (n=28:牛 9,豚 19)				
	CTX-M-1G 単独 +TEM		CTX-M-8G 単独 +TEM		CTX-M-9G 単独 +TEM +SHV		TEM 単独 +SHV		CIT (TEM 陽性)	型不明 (TEM 陽性)	
牛(n=31)	9	2	1* ¹	0	4	4* ^{1,2}	1* ²	0	1* ²	4(4)	5(1)
豚(n=45)	5	3	0	0	11* ³	6* ³	0	1	0	13(8)	6(0)

* 1 ~ * 3 : 同一個体で複数株検出(牛 2 頭、豚 1 頭)

検出された合計 76 株の各薬剤における耐性株数および耐性率を表 4 に示した。高い順に ABP, CPX, CEZ(100%), CTX(72.4%), TC(64.5%), ST(47.4%), CP(46.1%), CAZ(34.2%), KM(32.9%), NA,AZT(26.3%), LVX,CIP(22.4%), CPR(19.7%), GM(13.2%), FOM(6.6%), FOX(1.3%) であり、MPM および AMK に耐性を示す株は検出されなかった。ESBL 産生菌は AmpC 型菌より耐性率が高い傾向を示し、CTX, ST, NA, AZT, LVX, CIP, CPR, FOM において有意な差が認められた。(p<.05)

表 4 薬剤耐性株数および耐性率

	薬剤	ABP CPX CEZ	CTX	TC	ST	CP	CAZ	KM	NA	AZT	LVX	CIP	CPR	GM	FOM	FOX	MPM AMK
Total (n=76)	耐性株数	76	55	49	36	35	26	25	20	20	17	17	15	10	5	1	0
	耐性率(%)	100	72.4	64.5	47.4	46.1	34.2	32.9	26.3	26.3	22.4	22.4	19.7	13.2	6.6	1.3	0
ESBL 産生菌 (n=48)	耐性株数	48	47	32	29	25	14	18	17	19	14	14	15	6	5	1	0
	耐性率(%)	100	97.9	66.7	60.4	52.1	29.2	37.5	35.4	39.6	29.2	29.2	31.3	12.5	10.4	2.1	0
AmpC 型菌 (n=28)	耐性株数	28	8	17	7	10	12	7	3	1	3	3	0	4	0	0	0
	耐性率(%)	100	28.6	60.7	25.0	35.7	42.9	25.0	10.7	3.6	10.7	10.7	0	14.3	0	0	0

表5 多剤耐性株の内訳および遺伝子型

また、10 薬剤以上に耐性を示した株の内訳および遺伝子型を表5に示した。14 薬剤耐性株が1株、13 薬剤耐性株が5株、12 薬剤耐性各6株、11 薬剤耐性1株、10 薬剤耐性5株であった。ほとんどが ESBL 産生菌であり2株のみが AmpC 型菌(CIT+TEM)であった。また豚より牛が多い傾向が認められた。

表6に遺伝子型別にセフェム系薬剤に対する耐性状況を示した。なお、CPX, GEZについてはすべての株において耐性であった。ESBL 産生菌ではCTX-M-1とCTX-M-9でCAZとCPRの耐性率

耐性薬剤数	由来畜種	株数 (n=18)	遺伝子型(株数)
14	牛	1	CTXM-1(1)
13	牛	5	CTXM-1+TEM(1)
			CIT+TEM(1)
			CTXM-1 (3)
12	牛	2	CTXM-9+TEM(1)
			CTXM-1(1)
	豚	4	CIT+TEM(1)
			CTXM-9(3)
11	牛	1	CTXM-9(1)
10	牛	3	CTXM-9+TEM(2)
			CTXM-1(1)
	豚	2	CTXM-9(2)

に有意差が認められ、AmpC 型菌ではCIT 型と型不明でCTXとCAZの耐性率に有意差が認められた。(p<.05)

表6 遺伝子型別のセフェム系薬剤耐性状況

	遺伝子型	薬剤	CTX	CAZ	CPR	FOX
ESBL 産生菌	CTX-M-1G (n=19)	耐性株数	19	10	14	1
		耐性率(%)	100	52.6	73.7	5.3
	CTX-M-8G (n=1)	耐性株数	1	0	0	0
		耐性率(%)	100	0	0	0
	CTX-M-9G (n=26)	耐性株数	25	2	1	0
		耐性率(%)	96.2	7.7	3.8	0
TEM (n=2)	耐性株数	2	2	1	0	
	耐性率(%)	100	100	50	0	
AmpC 型菌	CIT (n=17)	耐性株数	5	10	0	0
		耐性率(%)	29.4	58.8	0	0
	型不明 (n=11)	耐性株数	1	2	0	0
		耐性率(%)	9.1	18.2	0	0

4. 考察

β -ラクタマーゼ産生菌の検出法は公定法のように統一されたものがないが、検査法による検出率の違いを具体的な数値として確認できた。今回の検出率は牛・豚いずれもこれまでの報告より高い傾向が認められた[1]が、検出率が低く出ている報告では直接培養法のみで実施されたものもあり、各種報告等における保菌率比較の際には実施された検査法を確認する必要があると思われる。今回の結果よりESBL産生菌またはAmpC型菌は直接塗抹培養では検出できない程度に微量であるものも含めると牛で20%、豚で40%程度またはそれ以上の割合で家畜の糞便中に存在していることが考えられ、それらの耐性菌が不適正な抗菌薬の投与等の要因により過剰に増殖してしまう可能性があると思われた。

今回検出されたESBL産生菌およびAmpC型菌の遺伝子型は人から検出された報告における遺伝子型とおおむね一致していた[6][7]。しかし、遺伝子配列等の詳細な分類を実施しておらず、人が保有する β -ラクタマーゼ産生菌との関連は不明である。CTX-M-1とCTX-M-9においてセフェム系薬剤耐性に有意な差が認められ、更なる解析が必要だがCTX-MグループにはCAZを分解するアミノ基置換を有する型があり、そのような型の割合が関係している可能性も考えられる。また、TEM遺伝子を単独で保有した14株中13株は非ESBL産生菌でAmpC型菌であったためこれはTEM-1遺伝子であったと推定される。AmpC型菌のCIT型と型不明については、型不明株は染色体性AmpCの可能性が高く、プラスミド性のCIT型との差が認められたものと考えられ、CIT型とTEM遺伝子保有には関連性が示唆されたが更なる解析が必要である。ESBL産生菌の治療に用いられる薬剤であるMPMおよびAMKIにはすべての株が感受性を示し、フルオロキノロン系薬剤(LVX,CIP)は耐性率が22.4%と直ちに問題となる薬剤耐性を示す株は検出されなかったが、多くの薬剤に耐性を示す株もあり、更なる多剤耐性獲得や耐性菌の増加が懸念される。

人から検出される薬剤耐性菌と家畜が保有する薬剤耐性菌の因果関係についてはまだ明確ではないことが多いためその動向については注視していく必要があると思われる。今後も状況に応じて検出した株が保有する病原因子、血清型別、経時的な検出状況等の調査を実施するとともに有用なデータの蓄積に努め、公衆衛生行政に寄与していきたい。

[1] 平成30年度全国食肉衛生検査所協議会微生物部会研修会資料

[2] 水谷恵子, 織奥真弓, 大下幸子, 上田豊: 鳥取県内のと畜場における牛・豚の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の保有状況, 日本獣医師会雑誌, 72(2), 117-120 (2019)

[3] Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dombusch K&Nilsson LE: Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in *Enterobacteriaceae*, APMIS, 115, 1400-1408 (2007)

- [4] Li Xu, Vicki Ensor, Savita Gossain, Kathy Nye and Peter Hawkey: Rapid and simple detection of *bla*CTX-M genes by multiplex PCR assay, *J Med Microbiol*, 54, 1183-1187 (2005)
- [5] F. Javier Perez-Perez and Nancy D. Hanson: Detection of Plasmid-mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 40 (6), 2153-2162 (2002)
- [6] 三好そよ美, 根ヶ山清, 森田幸, 高橋美友紀, 荒井健, 村尾孝児: 当院における ESBL 産生菌の検出状況と遺伝子型について, *医学検査*, 63(6), 714-718(2014)
- [7] 山崎勝利, 小松方, 福田砂織, 豊川真弘, 西功, 幸福知己, 中井依砂子, 戸田宏文, 佐藤かおり, 小野 保, 西尾久明, 末吉範行他: 2011 年に臨床材料から分離したプラスミド性 AmpC β -lactamase 産生腸内細菌の調査, *日本臨床微生物学雑誌*, 23(3), 20-28(2013)

3. 牛の胸腔内の腫瘍

1.はじめに

仙台市ミートプラントに健康畜として搬入された牛(雌, 交雑種, 2歳6ヶ月齢, 病歴:不明)のと畜解体検査を行った際、胸腔内に腫瘍形成を認めた為、精査した。その結果、若干の知見を得たのでその概要を報告する(全国食肉衛生検査所協議会病理部会第77回研修会に演題発表)。

2.肉眼所見

解体検査時、左右の肋骨胸膜・肺胸膜(特に両側後葉辺縁)・横隔膜胸膜に小豆大～鶏卵大の乳白色腫瘍が見られ、それらは密集部で癒合し息肉腫状であった。腫瘍は硬結感があり、刀割面は滑沢感を有していた。縦隔リンパ節および前胸骨リンパ節では白色硬化を認めた。

3.組織所見

胸壁腫瘍の迅速凍結切片では、腫瘍性上皮様細胞(以下、腫瘍細胞)による小集簇や腺管状形成が認められ、縦隔リンパ節および前胸骨リンパ節の一部領域に同様組織の浸潤巣を観察した。なお、迅速免疫染色で腫瘍細胞は抗CK AE1/AE3抗体、抗WT-1抗体、抗CK 5-6抗体に陽性、抗Vimentin抗体に陰性であった。

パラフィン切片による検索では、小型腫瘍(小豆大)において豊富な間質結合織の発育内部に腫瘍細胞の小集簇を観察した。これに対し大型腫瘍(鶏卵大)では腫瘍細胞の充実性増殖部や蜂巣状増殖部、更に乳頭状増殖部を認め、各所に粘液様物質の存在を観察した。カリフラワー状腫瘍の腫瘍表面側では扁平な正常様中皮細胞が立方状や円柱状に異型を示す腫瘍移行部を観察した。また、エラスチカワンギーソン染色結果により腫瘍の肺実質内への浸潤は否定された。上記の粘液様物質はPAS反応陽性、アルシアン青pH 2.5-PAS反応で青色、コロイド鉄陽性、同ヒアルロニダーゼ消化性でヒアルロン酸と同定した。

免疫組織化学的検索では迅速凍結切片と同様の結果が得られた他、抗Mesothelin抗体(Bioss)、抗Calretinin抗体(invitrogen)陽性、抗Mesothelial cell抗体(Dako)一部陽性、抗 α -SMA抗体、抗Desmin抗体、抗VIII R-AG抗体陰性であった。※()で記載の無い抗体はすべてニチレイ製。

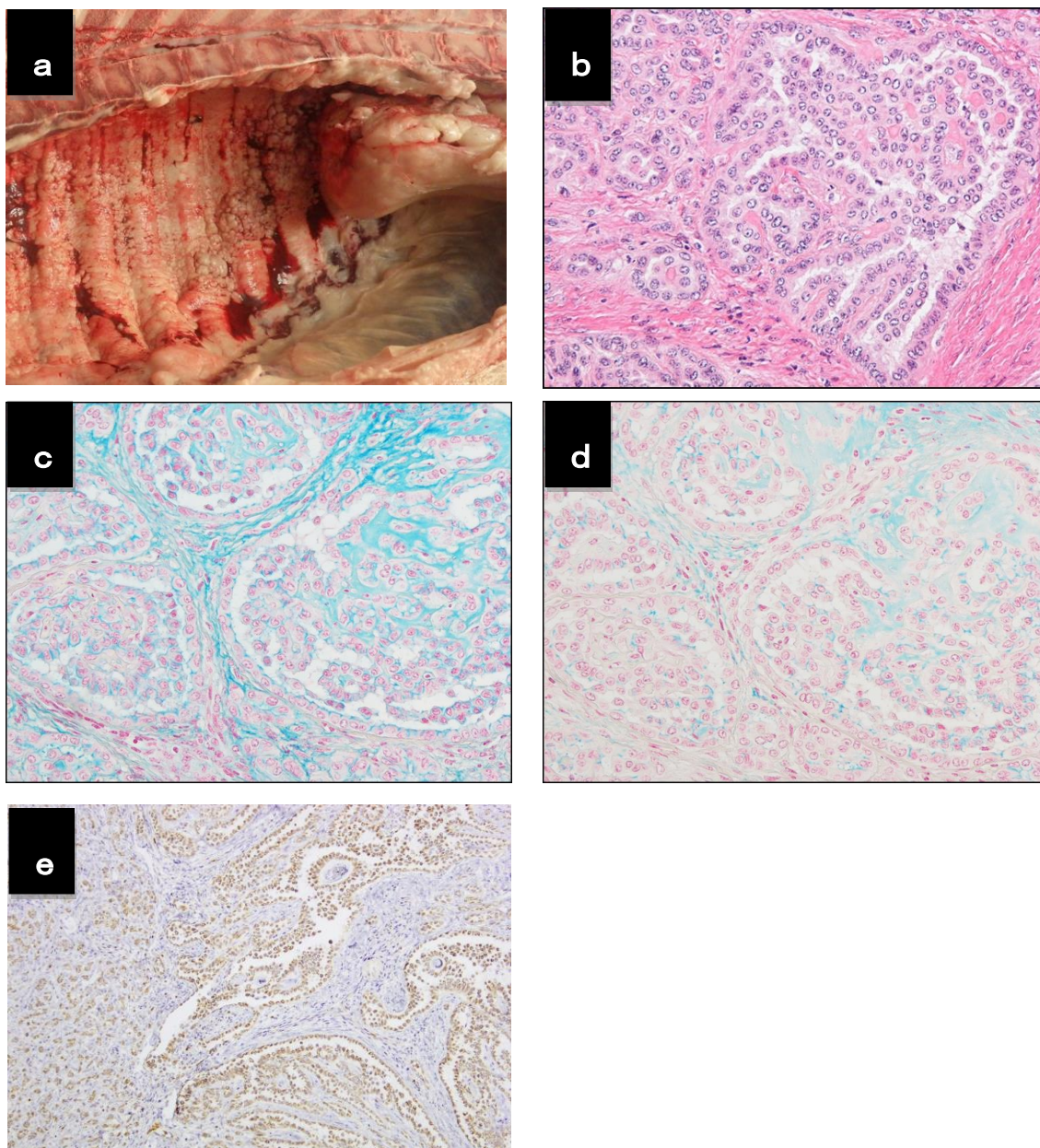
4.診断名

組織診断名:牛の上皮型胸膜中皮腫

疾病診断名:牛の胸膜中皮腫

行政処分:全部廃棄

5.写真



a: 胸腔腫瘍

胸膜全域に播種状腫瘍が認められる。近接腫瘍同士は癒合している。

病理部会では右肋骨胸膜に見られた最大の癒合性腫瘍の一部を切り出し、提出した。

b: 胸腔腫瘍 HE 染色 ×200

右肋骨胸膜の最大腫瘍。腫瘍細胞が乳頭状に増殖し、粘液様物質が存在。

c: 胸腔腫瘍 コロイド鉄染色 ×200

d: 胸腔腫瘍 コロイド鉄染色(ヒアルロニダーゼ消化試験) ×200

腫瘍組織間質にヒアルロニダーゼ反応性のコロイド鉄陽性粘液が存在。

e: 胸腔腫瘍 免疫染色(抗カルレチニン抗体) ×100

抗カルレチニン抗体陽性の腫瘍細胞が腫瘍組織全域に存在。