

# 琉球大学学術リポジトリ

## 豚枝肉由来大腸菌の薬剤耐性(生物生産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): 豚肉, 大腸菌, 薬剤耐性, Rプラスミド キーワード (En): pork carcass, Escherichia coli, drug resistance, R plasmid 作成者: 日越, 博信, 山城, 倫子, 長田, 健司, Higoshi, Hironobu, Yamashiro, Rinko, Nagata, Kenji メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/3760">http://hdl.handle.net/20.500.12000/3760</a>

## 豚枝肉由来大腸菌の薬剤耐性

日越博信\*・山城倫子\*・長田健司\*

Hironobu HIGOSHI, Rinko YAMASHIRO and Kenji NAGATA : Drug resistance of *Escherichia coli* isolated from dressed pork carcasses

**キーワード** : 豚肉, 大腸菌, 薬剤耐性, R プラスミド

**Key words** : pork carcass, *Escherichia coli*, drug resistance, R plasmid

### Summary

Immediate post-slaughtering contamination of pork carcasses with drug-resistant *Escherichia coli* was investigated in a slaughter house in Okinawa Prefecture. A total of 301 strains of *E. coli* were isolated from dressed pork carcasses. Drug sensitivity testing of these strains to seven antibiotics was performed.

Among the 301 strains of *E. coli* tested, 195 strains (64.8%) exhibited drug resistance. Isolation rates of drug-resistant strains at various stages in processing were 74.1% after halving, 53.4% after cleaning, 57.9% before grading and 65.6% in refrigeration. Strains isolated from visceral fluid samples were 91.7% drug-resistant. No *E. coli* was isolated from the hot water used for dehairing.

The highest resistance found among the antibiotics tested was to CTC (51.5% of strains), SA (35.5%) and SM (29.2%). This same order of resistance was found in all samples. Forty six patterns of resistance were observed, ranging from single-agent to seven-agent resistance. The number of patterns of resistance decreased as the carcasses advanced through processing. For all strains isolated, 29.7% were resistant to one agent, 17.4% to two agents, 18.5% to three agents and 16.9% to four agents. Strains resistant to more than two agents were most commonly isolated from carcasses after halving.

Only nine strains (5.3%) among the 170 drug-resistant strains possessed R plasmids.

### 緒 言

抗生物質は、家畜・家禽の生産部門において発育促進及び疾病予防などの目的で、大量かつ連続的に使用されている<sup>1,7,15-17</sup>。これに伴って、家畜・家禽における薬剤耐性菌の増加をもたらし、家畜疾病の治療を困難にするばかりでなく、これら耐性菌が畜産物を介してヒトへ移行することも懸念され、公

---

\*琉球大学農学部生物生産学科

琉球大学農学部学術報告 41 : 147~153 (1994)

衆衛生の面でも問題視されている<sup>1,7,15-17)</sup>。家畜における薬剤耐性菌がヒトへ移行し得る経路として、家畜飼養現場<sup>18)</sup>、と畜場<sup>14)</sup>及び畜産物<sup>1,7,12,13,17)</sup>を介して等があげられるが、なかでも畜産物の食肉<sup>7)</sup>は最も重要視されている。しかしわが国において、と畜場で解体直後の枝肉について薬剤耐性菌の汚染状況を調査した報告は意外に少ない。

著者らは、沖縄県における家畜糞便由来及び乳・肉由来大腸菌の薬剤感受性について調査中である<sup>2-6)</sup>。そして前報<sup>6)</sup>では、と畜場内の豚枝肉及び枝肉解体器具類の調査を試みたが、大腸菌の分離株数が少なく、薬剤耐性菌による汚染状況を十分に明らかにできなかった。そこで今回は、試料の希釈方法等を改めて、前報同様本県内の某と畜場において、豚枝肉の処理工程別に薬剤耐性大腸菌による汚染状況の調査を行った。また、耐性菌についてはRプラスミドの検索も行ったので、これら成績の概要を報告する。

## 実験材料及び方法

### 1 実験材料及び採取方法

試料は、本県内の某と畜場において、1993年6月と10月の2回、と殺解体直後の豚枝肉から沖縄県中央食肉衛生検査所のと畜検査員によって採取された。試料の採取は、毎回6と体の左側枝肉について、処理工程別に背割後、洗浄後、格付け前、冷蔵庫内の4カ所で、臀部、胸部外側、胸部内側、頸部の4部位からそれぞれ10×10cmの範囲を滅菌ガーゼによる拭き取り法で行った。しかし、部位別には分離菌株数が少なかったため、1と体を1試料とし、各工程12試料ずつ合計48試料である。また、内臓液（内臓摘出時に出てくる液）及び湯漬け水（脱毛のため、と体を浸漬する63～65℃に保持した湯漬け槽の湯で、作業開始直後と200頭浸漬後に採取）各4試料についても調査を行ったが、これらは滅菌採取ビンで直接くみ取った。

採取した試料の調整は、拭き取ったガーゼに滅菌生理食塩水10mlを加え、ストマッカー400で30秒間処理したものを試料原液とした。また内臓液及び湯漬け水はそのままを試料原液とした。

### 2 大腸菌の分離方法と同定

大腸菌の分離にはマッコンキー寒天培地（栄研）平板を用い、これに上記の各試料原液0.1mlを接種し、コンラージ棒で塗抹後35℃20時間培養した。培養後、大腸菌と思われる集落を1試料当たり5個以上釣菌した。

分離菌株の同定は、医学細菌同定の手びき<sup>11)</sup>に準拠し型の通りに行い、合計301株の大腸菌を得た。これら菌株について薬剤感受性試験を行うと共に、耐性菌についてはRプラスミドの検索も行った。

### 3 薬剤感受性試験の方法

薬剤感受性試験は、日本化学療法学会標準法<sup>8)</sup>に準拠し、寒天平板希釈法で行った。使用した薬剤はアンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、クロルテトラサイクリン (CTC)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、ナリジキシン酸 (NA)、スルファジメトキシム (SA) の7種類である。各薬剤の耐性限界濃度は、SAが200 µg/ml、他の6薬剤が25 µg/mlとした。なお耐性菌におけるRプラスミドの検索には、耐性菌を供与菌とし、NA耐性の大腸菌 ML 1410株を受容菌として、既報<sup>2)</sup>及び大前<sup>10)</sup>の方法等に準拠して行った。

## 実験結果

豚枝肉由来及び内臓液由来大腸菌における薬剤別の耐性菌検出率を、試料別に表1に示した。

Table 1. Frequency of drug resistance in *E. coli* isolated from dressed pork carcasses

Drug	After halving (112)*	After cleaning (88)	Before grading (57)	Refrigeration (32)	Visceral fluid (12)	Total (301)
ABPC	17.9	15.9	15.8	31.2	41.7	18.9
CP	18.8	9.1	15.8	15.6	25.0	15.3
CTC	58.9	42.0	45.6	46.9	91.7	51.5
KM	27.7	17.0	19.3	21.9	41.7	22.9
SM	33.9	21.6	22.8	34.4	58.3	29.2
NA	11.6	5.7	3.5	3.1	33.3	8.3
SA	43.8	22.7	29.8	37.5	75.0	35.5
Total	74.1	53.4	57.9	65.6	91.7	64.8

\*: Number of strains tested

供試した大腸菌 301 株のうち 195 株、64.8%がいずれか 1 薬剤に耐性であった。まず試料別の耐性菌の検出率をみると、分離菌株数は少ないが、内臓液が 91.7%で最も高かった。豚枝肉では、背割後が 74.1%で高く、洗浄後に 53.4%と一旦減少したが、格付け前 57.9%、冷蔵庫内 65.6%と、後半には耐性菌の検出率が高くなった。なお、湯漬け水からは、大腸菌は分離されなかった。

次に薬剤別にみた薬剤耐性大腸菌の検出率は、全体では CTC 耐性が 51.5%で最も高く、以下 SA 耐性 35.5%、SM 耐性 29.2%などの順であった。これら 3 薬剤に対する耐性菌の検出順位は各試料とも同じであったが、次いで高かったのは、冷蔵庫内枝肉及び内臓液由来が ABPC 耐性、背割後、洗浄後及び格付け前の枝肉由来が KM 耐性であった。内臓液由来における各薬剤に対する耐性菌の検出率は、枝肉由来に比較していずれも高かった。なお、内臓液由来では CP 耐性が最も低かったが、枝肉では各工程とも NA 耐性が最低であった。

薬剤耐性大腸菌における耐性型を表 2 に示した。耐性型は、全体では 46 種類という多さであったが、その種類は枝肉の処理工程が進むに伴い減少した。またこれらの耐性型では、単剤型が 29.7%で最も高率であり、以下 3 剤型 18.5%、2 剤型 17.4%、4 剤型 16.9%、5 剤型 13.3%、6 剤型 2.6%の順であったが、約 70%が 2 剤以上の薬剤に耐性の多剤耐性菌で占められた。この多剤耐性菌は、枝肉における背割後由来では 80%に達したが、その後の工程では 60~70%にやや減少した。さらに、今回少数株ではあったが、用いた 7 薬剤すべてに耐性の 7 剤耐性型が枝肉の洗浄後由来で 1 株、内臓液由来で 2 株検出された。

Table 2. Drug resistance patterns of *E. coli* isolated from dressed pork carcasses

Resistance patterns	After halving	After cleaning	Before grading	Refrige-ration	Visceral fluid	Total (%)
ABPC	5	1	2	3		11
CP	1	1				2
CTC	12	16	9	3	2	42
SM	1	1				2
SA			1			1
ABPC-CP		1	2			3
ABPC-CTC		1				1
ABPC-SA	4	1				5
CP-CTC	3					3
CP-SM		2				2
CP-SA			1			1
CTC-KM	3	1		1		5
CTC-SM	1					1
CTC-SA	3		1			4
KM-SA		1				1
SM-SA	2	1	2	3		8
ABPC-CP-CTC	1					1
ABPC-CP-SA	1					1
ABPC-CTC-SA	2					2
ABPC-SM-SA	2					2
CP-CTC-SA		2	1			3
CTC-KM-SM	2		1			3
CTC-KM-NA	1					1
CTC-KM-SA	3	2	2			7
CTC-NA-SA	2	1			1	4
CTC-SM-NA	1					1
CTC-SM-SA	7		2	2		11
ABPC-CP-CTC-KM				1		1
ABPC-CP-CTC-SM		1				1
ABPC-CP-CTC-SA	1			1		2
ABPC-CTC-KM-SA		1				1
ABPC-CTC-SM-SA	1	2		2	2	7
CP-CTC-SM-SA	1		1			2
CTC-KM-SM-SA	1	4	1	2	2	10
CTC-KM-SM-NA	3	2				5
CTC-SM-NA-SA	1	1			1	3
KM-SM-NA-SA	1					1
ABPC-CP-CTC-KM-NA			1	1		2
ABPC-CP-CTC-KM-SA		1			1	2
ABPC-CTC-KM-NA-SA	1					1
ABPC-CTC-KM-SM-SA	2	1	3			6
CP-CTC-KM-SM-SA	10		1			11
CP-CTC-KM-SM-NA			1			1
CTC-KM-SM-NA-SA	3					3
ABPC-CP-CTC-KM-SM-SA	1	1	1	2		5
ABPC-CP-CTC-KM-SM-NA-SA		1			2	3
Total	83	47	33	21	11	195
No. of patterns	32	24	18	11	7	46

薬剤耐性大腸菌 195 株のうち、NA 耐性を除く 170 株について伝達性 R プラスミドの検索を行い、その結果を表 3 に示した。

Table 3. Transmitted resistance patterns of R plasmid in resistant *E. coli* strains

Resistance patterns of original strain	Resistance patterns of R plasmid	After halving 70* <sup>1</sup>	After cleaning 42	Before grading 31	Refrigeration 20	Visceral fluid 8	Total 170
ABPC-CP-CTC	ABPC	1					1
ABPC-CTC-SA	〃	1					1
ABPC-CTC-SM-SA	〃				1		1
ABPC-CTC-KM-SM-SA	SM	1					1
ABPC-CTC-SM-SA	SA		1				1
CTC-KM-SM-SA	〃	1					1
ABPC-CP-CTC-KM-SM-SA	〃	1					1
CTC-KM-SM-SA	KM-SM-SA					2	2
							(1.2)
Total		5 (7.1)* <sup>2</sup>	1 (2.4)	0 (0.0)	1 (5.0)	2 (25.0)	9 (5.3)

\*1 : Number of strains tested

\*2 : Number in parenthesis indicates percentage

供試菌株のうち 9 株 (5.3%) が、伝達性の R プラスミド保有菌であり、少なかった。そのうち 5 株は枝肉の背割後由来であり、5 株とも単剤伝達型であった。洗浄後及び冷蔵庫内の枝肉由来で、単剤伝達性の R プラスミド保有菌が各 1 株検出されたが、格付け前由来からは検出されなかった。内臓液由来株においては、3 剤伝達性の R プラスミド保有菌が 2 株検出された。なお、伝達性 R プラスミド保有菌における原菌株の薬剤耐性型は、すべてが 3 剤以上の多剤耐性型であった。

## 考 察

畜産分野における抗生物質の汎用は、家畜腸内細菌、特に大腸菌の薬剤耐性化を促し、薬剤耐性を感受性菌に伝達する R プラスミド保有菌の増加にもつながる<sup>1,15~17)</sup>。これら薬剤耐性菌が畜産物を介してヒトへ伝播することも懸念され、公衆衛生上も問題視されている<sup>1,7,14~17)</sup>。同一養豚場由来の大腸菌とサルモネラから同じ型の R プラスミドが検出され、両菌種間で移行した可能性も示唆されている<sup>17)</sup>。また、家畜における薬剤耐性サルモネラが畜産物を介して、あるいは間接的にヒトに感染し食中毒あるいは下痢症を発生させた例もあり<sup>1,17,18)</sup>、注意が必要であろう。

今回著者らは、豚肉の薬剤耐性大腸菌による汚染状況を知る目的で、と畜場における解体直後の同一豚枝肉について、処理工程別に 4 ヶ所で拭き取り調査を行った。大腸菌の分離株数は後段階ほど減少したが、これら菌株における耐性菌の検出率は、全体では 64.8% を示した。これは前報<sup>6)</sup>の大腸菌のみにおける耐性菌検出率よりは低かったが、佐藤<sup>13)</sup>あるいは Kinjo ら<sup>9)</sup>の市販豚肉由来大腸菌における成績 (39~48.1%) よりは高かった。また、枝肉の処理工程別には、背割後で耐性菌の検出率が最高を示

し、洗浄後に一旦低下するが、その後格付け前、冷蔵庫内と後段階ほど上昇した。と畜場における処理工程の最終段階である冷蔵庫内の枝肉でも耐性菌の検出率は、背割後に次いで高率であり、注目される。このことは洗浄によって一旦減少した耐性菌が、その後の工程で再度汚染し、市販食肉からも検出される可能性を示唆している。

家畜由来大腸菌は、畜産分野で常用される薬剤 (TC, SM, SA, KM, CP, ABPC) のなかでも、特に TC, SM, SA 耐性が多いとされている<sup>1,15,17)</sup>。今回の豚枝肉由来大腸菌でも例外ではなく、各工程ともこれら3薬剤に対する耐性菌が上位を占め、次いで多かったのは豚肉及び豚糞便由来で検出率が高い<sup>17)</sup>とされる KM 耐性菌であり、検出率はともかく地域差があまりないように思われる。しかし、これまで著者ら<sup>3~6)</sup>が本県で調査してきた家畜糞便及び食肉由来大腸菌では、殆ど検出されないかあるいはごく低率であった NA 耐性菌が、今回は 8.3% も検出された。また、薬剤耐性菌における耐性型の種類は、処理工程の後段階ほど減少したが、全体では 46 種類も認められ、さらに少数菌株とはいえ今回初めて 7 剤耐性菌も検出された。これらのことは、本県における薬剤耐性大腸菌の内容が多様化しつつあることを示唆するもので、今後のこの動向に注意する必要がある。

今回の豚枝肉由来薬剤耐性大腸菌における伝達性 R プラスミド保有菌は、5.3% と低率であった。この成績は、先人達<sup>9,12,13,15,17)</sup>の豚肉及び食鳥肉由来で報告した成績よりもかなり低い値であるが、本県の食鳥肉由来大腸菌の調査<sup>4)</sup>でも同様に低率であり、好ましい傾向にあるといえる。しかし、公衆衛生上の懸念が全くなくなった訳ではないので、今後も見守りたい。また、豚枝肉から分離される薬剤耐性大腸菌は、豚糞便由来と見なすべきであり、一旦食肉を汚染した耐性菌の除去はかなり困難であるばかりか、処理工程を経るごとに汚染が増すように思われる。また、分離菌株数は少なかったが、内臓液由来で耐性菌が高率であり、7 剤耐性菌も検出されたことなどから、と畜場におけると体の開腹・解体時及びその後の処理工程での汚染防止に留意し、これら耐性菌の付着を可能な限り減少させる努力が必要である。

## 摘 要

食肉における薬剤耐性大腸菌の汚染状況を知る目的で、沖縄県内の某と畜場とで殺解体直後の豚枝肉について調査を行った。

試料は、解体直後の 6 と体の豚枝肉から、処理工程別に背割後、洗浄後、格付け前、冷蔵庫内の 4 ヶ所で拭き取り法によって採取した。また、湯浸け水 (脱毛のためにと体を浸漬する湯)、内臓液 (内臓摘出時に出てくる液) についても調査した。これらの試料から合計 301 株の大腸菌を分離し、7 薬剤に対する感受性試験を行った。

供試した大腸菌 301 株のうち 195 株 (64.8%) が、いずれか 1 薬剤に耐性であった。枝肉処理の工程別にみた耐性菌の検出率は、背割後 74.1%、洗浄後 53.4%、格付け前 57.9%、冷蔵庫内 65.6% であった。内臓液由来では 91.7% が耐性であったが、湯浸け水からは大腸菌は分離されなかった。

薬剤別には、CTC 耐性が 51.5%、SA 耐性が 35.5%、SM 耐性が 29.2% などの順に高く、これら 3 薬剤に対する耐性菌の検出順位は各試料とも同じであった。耐性型は、単剤型から 7 剤型まで 46 種類認められ、その種類は処理工程が進むほど減少した。また全体では単剤型が 29.7%、3 剤型が 18.5%、2 剤型が 17.4%、4 剤型が 16.9% の順であったが、2 剤以上の薬剤に耐性の多剤耐性菌は、背割後由来で検出率が最も高かった。

耐性菌 170 株のうち 9 株 (5.3%) が R プラスミド保有菌であり、少なかった。

試料を提供して頂いた沖縄県中央食肉衛生検査所微生物検査室の本田善美、平安常寛、与那原良克、新垣千賀子の各氏、試料の提供を許可して頂いた大城孝喜所長に感謝致します。

## 引用文献

1. 吐山豊秋 1986 薬剤耐性菌による畜産食品汚染(1) 米国における PC・TC 系飼料添加剤問題をめぐって, 日獣会誌, **39**: 285~289
2. 日越博信, 藤沢倫彦, 高田潤一 1984 乳牛の分房乳から分離した大腸菌の薬剤耐性と R プラスミド, 琉大農学報, **31**: 111~117
3. 日越博信, 猪俣隆一 1985 子豚ふん便由来大腸菌の薬剤耐性と R プラスミド, 琉大農学報, **32**: 133~141
4. 日越博信, 永山輝代 1991 食鳥肉由来大腸菌の薬剤耐性と R プラスミド, 琉大農学報, **38**: 23~28
5. 日越博信, 野口蘭子, 香西 献 1992 肥育豚ふん便における薬剤耐性大腸菌の経時的消長, 琉大農学報, **39**: 13~19
6. 日越博信, 上原 亮, 内田雅美 1993 豚枝肉及び枝肉解体器具類由来大腸菌群の薬剤耐性, 琉大農学報, **40**: 29~34
7. Hinton, M. H. 1991 家禽産業における抗生物質の使用と公衆衛生, 畜産の研究, **45**: 46~48
8. 河喜多龍祥 1987 薬剤感受性検査, 1版, p66~69, 東京, 近代出版
9. Kinjo T., Simabukuro Y. and Tamaki M. 1977 Drug resistant strain of bacteria isolated from domestic animals in Okinawa. IV. Drug resistance and R factors of *E. coli* isolated from broiler chicken and pork, Sci. Bull. Agr. Univ. Ryukyus, **24**: 475~486
10. 大前憲一 1982 薬剤感受性試験と R プラスミドの検査法, 日獣会誌, **35**: 662~666
11. 坂崎利一訳 1981 医学細菌同定の手びき, 2版, 東京, 近代出版
12. 佐藤昭子 1974 食肉から分離した大腸菌の薬剤耐性とその R 因子の分布について, 食衛誌, **15**: 286~291
13. 佐藤昭子 1977 豚肉汚染大腸菌の薬剤耐性と R プラスミドについて, 食衛誌, **18**: 328~334
14. 佐藤昭子 1985 食肉業従事者から分離した大腸菌の薬剤耐性と R プラスミド, 食衛誌, **26**: 273~278
15. 高橋 勇 1977 家畜における薬剤耐性菌の発現機構と現状, 獣医界, **112**: 16~35
16. 寺門誠致 1990 薬剤耐性菌の功罪, 動薬研究, **43**: 27~40
17. 寺門誠致, 佐藤儀平, 齊田 清, 佐藤昭子, 金井 久 1985 三橋 進ら編, 薬剤耐性菌による環境汚染, 1版, p121~151, 東京, 学会出版センター
18. 矢田谷 健, 寺門誠致, 橋本和典 1983 プラスミド DNA からみた *Salmonella typhimurium* による幼児と子牛の下痢の疫学的観察, 日獣会誌, **36**: 274~277