

参 考

平成17年度

「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査(プロトコル作成)」

報告書(抜粋)

Ⅲ. 試験調査プロトコル

1. サンプルング方法

1) 施設の要件と施設数

消費直前の食品を取り扱い、かつ容易に入手が可能であり、トレースバックが可能な、複数の店舗を有する大手量販店をサンプルングの施設とする。また個々の大手量販店においては、プライベートブランドを含め数種の銘柄しか販売していないことが多いことから、複数の大手量販店の施設を対象とする。

2) 対象食品の種類

国産の畜水産食品の中で、消費直前の食品の牛肉、豚肉、鶏肉、養殖魚肉、鶏卵、牛乳の 6 種を対象食品とする。また牛肉、豚肉、鶏肉、養殖魚肉については加熱調理等がなされていないパック詰めされた商品(最低 300g)を、鶏卵については 10 個入りのパックを、牛乳については 1L のパックを対象とする。原産地(「北海道産」「沖縄県産」など)が記載されて産地が特定できるものを対象とし、単に「国産」と表示されているものは対象としない。

3) 採材方法

対象食品の包装容器及び原産地等が記載されたラベルが破損又は損傷していないことを確認する。異物混入、対象食品が微生物によって汚染されないように採材する。

4) 試料の輸送方法及び保管方法

サンプルングした対象食品(試料)は、サンプルング時の状態を可能な限り維持し、以下の点を注意して運搬し、保管する。

- 試料を入れる容器は、試料の種類、形状等を考慮した形状のもので、運搬、洗浄および滅菌に便利なものを用いる。
- 試料の汚染、破損、損傷および取り違い等が生じないように注意する。
- 8℃以下に保冷し(凍結しない。)、サンプルング後可能な限り速やかに試験に供試する。
- 試料に添付されているラベルを保管すると共に記載事項(「名称」、「原産地」、牛肉においては「個体識別番号」)を記録する。サンプルングの実施日時、対象施設の住所および店舗名を記録する。

5) 試料数

対象食品からの対象細菌の検出率のデータを参考にして試料の総数を算出し、対象食品の都道府県別生産量のデータを参考にして生産量が多い都道府県の食品を優先的にサンプルングする。

①対象細菌の検出率と試料総数

対象食品からの対象細菌の検出率については、当事業の検討会においてこれまで報告されているデータを基に検討し、表 1 に示した。大腸菌の検出率は鶏肉で 35.9% (総 38)、牛肉で 53.7% (資 28)、豚肉で 69.1% (資 28) である。腸球菌の検出率は鶏肉で 100% (腸 56) である。サルモネラの検出率は鶏肉で 11.7% (総 32)、鶏卵では 0.002% (サ 86)、牛肉で 2.5% (資 28)、豚肉で 2.0% (資 28) である。カンピロバクターの検出率は鶏肉で 20% (総 32)、牛肉で 1% (成 27) である。

また第 1 回検討会において、薬剤感受性試験の供試株数は 100 株以上必要であるとした。対象細菌の検出率をもとに 100 株以上の供試株が得られるような試料数を算出した。その結果は表 2 のとおり、大腸菌を 100 株以上得るために必要な牛肉は 187 件、豚肉は 145 件、鶏肉は 279 件以上である。腸球菌を 100 株以上得るために必要な鶏肉は 100 件以上である。サルモネラを 100 株以上得るために必要な牛肉は 4000 件、豚肉は 5000 件、鶏肉は 855 件、鶏卵は 5,000,000 件以上である。カンピロバクターを 100 株以上得るために必要な牛肉は 10,000 件、豚肉は 7,143 件、鶏肉は 500 件以上であった。検出率が低い食品と細菌の組み合わせによっては、非常に多くの採材を必要とした。

表1 食品からの対象細菌検出率

	大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
牛肉	53.7		2.5	1.0
豚肉	69.1		2.0	1.4
鶏肉	35.9	100.0	11.7	20.0
養殖魚				
鶏卵			0.002	0
牛乳	0	0	0	0

(%)

表2 100株以上の供試株を得るために必要な試料数

	大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
牛肉	187		4,000	10,000
豚肉	145		5,000	7,143
鶏肉	279	100	855	500
養殖魚				
鶏卵			5,000,000	0
牛乳	0	0	0	0

(件)

②対象食品別の試料数

各食品について都道府県別の生産量のデータを入力し、生産量を反映して試料

数を平準化した。各食品の都道府県別生産量および各細菌を 100 株以上分離するために必要とされる試料数を表 3 から表 7 および表 9、10 に示した。養殖魚については対象細菌の検出率のデータがないことから、100 株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)は空白とした。今後、データの収集が望まれる。

牛肉、豚肉の都道府県別の生産量は、財団法人日本食肉消費総合センターが発行している「銘柄牛肉ハンドブック」(資 7)および「銘柄豚肉ハンドブック」(資 8)、鶏肉については農林水産統計「平成 16 年食鳥流通統計調査結果の概要」(資 2)、養殖魚については農林水産統計「平成 16 年漁業・養殖業生産統計(概数)」(資 1)、鶏卵については農林水産統計「鶏卵流通統計(平成 17 年 10 月～12 月分)」(資 4)、牛乳については農林水産統計「牛乳乳製品統計(平成 18 年 1 月分)」(資 3)を用いて情報を収集、整理し、サンプリング試料数を決定した。

また鶏卵を除く他の対象食品は、上位 10 県で生産量の過半数を占め、一般的に消費量を反映すると考えられる。さらに生産量の低い地域の食品は、サンプリングできない可能性があることから、生産量の高い県を優先的にサンプリングすることとする。

表3 銘柄牛肉の都道府県別割合と試料数

都道府県	比率(%)	100株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)			
		大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
北海道	17.2	53		1124	2810
熊本	9.9	30		648	1623
群馬	6.6	20		432	1082
山形	5.4	17		353	885
宮崎	4.9	15		320	803
長野	4.5	14		294	734
長崎	4.1	13		268	667
岩手	3.0	9		196	487
静岡	2.8	9		183	454
兵庫	2.8	9		183	454
試料総数		187		4000	10000

表4 銘柄豚肉の都道府県別割合と試料数

都道府県	比率(%)	100株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)			
		大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
群馬	16.8	35		1169	1670
鹿児島	13.1	26		911	1301
神奈川	6.8	14		473	676
山形	6.4	13		445	636
岩手	6.3	13		439	626
栃木	6.2	12		431	616
宮崎	5.0	10		347	497
茨城	4.5	9		313	447
新潟	3.7	7		257	367
沖縄	3.1	6		215	308
試料総数		146		5000	7143

表5 ブロイラーの都道府県別割合と試料数

都道府県	比率(%)	100株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)			
		大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
鹿児島	18.8	72	26	217	127
宮崎	18.2	69	24	209	123
岩手	15.1	56	20	173	100
青森	5.8	21	8	67	38
北海道	4.5	17	6	51	30
徳島	3.2	12	4	37	21
佐賀	2.6	10	3	29	17
熊本	2.3	8	3	26	15
兵庫	2.1	8	3	24	14
鳥取	2.0	6	2	23	13
試料総数		279	100	855	500

表6 鶏卵都道府県別生産割合と試料数

都道府県	生産量(t)	比率(%)	100株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)			
			大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
茨城	172087	7.0			718854	0
鹿児島	162554	6.6			679375	0
千葉	159655	6.5			667259	0
愛知	133821	5.4			559289	0
広島	114035	4.6			476595	0
北海道	105738	4.3			441758	0
岡山	96612	3.9			403278	0
青森	89009	3.6			371502	0
新潟	84726	3.4			353602	0
群馬	78717	3.2			328488	0
試料総数					5000000	0

表7 牛乳都道府県別生産割合と試料数

都道府県	生産量(t)	比率(%)	100株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)			
			大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
北海道	327917	46.9	0	0	0	0
栃木	27776	4.0	0	0	0	0
千葉	24639	3.5	0	0	0	0
群馬	23155	3.3	0	0	0	0
熊本	22860	3.3	0	0	0	0
愛知	21644	3.1	0	0	0	0
岩手	21267	3.0	0	0	0	0
茨城	15899	2.3	0	0	0	0
宮城	13122	1.9	0	0	0	0
兵庫	11574	1.7	0	0	0	0
試料総数			0	0	0	0

表8 海面養殖業魚種別収穫量

魚種	漁獲量(1000t)	比率(%)
海面養殖業計	1216	
魚類計	261	100.0
ぶり類	150	57.5
まだい	81	31.0
ぎんざけ	10	3.8
その他の魚類	7	2.7
ひらめ	5	1.9
ふぐ類	4	1.5
まあじ	3	1.1
しまあじ	3	1.1

表9 海面養殖業都道府県主要魚種別収穫量(ぶり類)と試料数

都道府県	ぶり類(100t)	比率(%)	100株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)			
			大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
鹿児島	540	36.1				
愛媛	292	19.5				
大分	134	9.0				
長崎	118	7.9				
香川	100	6.7				
高知	83	5.6				
宮崎	83	5.6				
熊本	74	4.9				
徳島	25	1.7				
三重	10	0.7				
試料総数						

表10 海面養殖業都道府県主要魚種別収穫量(まだい)と試料数

都道府県	まだい(100t)	比率(%)	100株以上の供試株を得るために必要な試料数(件)			
			大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
愛媛	378	47.0				
熊本	94	11.7				
三重	82	10.2				
高知	62	7.7				
長崎	59	7.3				
和歌山	45	5.6				
佐賀	18	2.2				
大分	18	2.2				
香川	13	1.6				
静岡	11	1.4				
試料総数						

6) 大手スーパー以外からのサンプリング

なお、消費者が直接購入する店舗でのサンプリングを主体とするが、と畜場から出荷されて食肉工場、販売店などを経由することにより、加工工程、輸送時、包装時などの環境、器具、機材あるいはヒトからの細菌汚染を完全には無視することができない。検討委員会の見解から、販売店からのサンプリングの他に、トレースバックが可能なサンプリングも導入する。牛肉、豚肉については協力が可能なと場や食肉工場、あるいは食肉センター協議会等と連携し、と体表面、カット肉、小売肉についてトレースバック可能な方法で材料をサンプリングする。と体表面のふき取り部位は各々20検体とする。さらに同一と場から出荷されたカット肉表面のふき取り、ならびに同一ルートの販売店の肉各々20検体とする。

2. 試料からの細菌の分離及び同定方法

1) 対象菌種

- a 大腸菌
- b 腸球菌およびバンコマイシン耐性腸球菌
- c サルモネラ属菌
- d 腸管出血性大腸菌 O157:H7/-
- e カンピロバクター属菌 (*C. jejuni*, *C. coli*)

ただし、腸管出血性大腸菌 O157 は豚肉、鶏肉、養殖魚、卵、牛乳からの検出がこれまでのところ殆ど報告されていないので、牛肉からの分離方法を示した。

2) 分離方法及び同定方法

食品からの細菌及び病原菌の検査法に関しては国内の検査指針である食品衛生検査指針微生物編(2003年)(成1)、腸管系病原菌検査法(善養寺浩、坂井千三、寺山武、工藤泰雄、伊藤武ら、医学書院、1985)(成2)、米国の *Bacteriological Analytical Manual*(FDA, 2005)(資23-27)、*Culture Media for Food Microbiology*(Coorry, J.E.L., Curtis, G.D.W. and Baird, R.M.: Elsevier, 1995)(成9)などの成書を参考とした。また、米国、カナダ、デンマーク、スウェーデンから報告されている食品由来細菌の薬剤耐性モニタリング(成17-19, 23)に記載されている方法、あるいは各研究者により論文として報告されている食品からの細菌の分離方法を参考とした。

① 検査試料の調整

- a 牛肉、豚肉、鶏肉、養殖魚

それぞれ 200g を秤量し、リン酸緩衝液 200ml を加え、ストマッカーで1分間リンスした液を検査用試料とする。

と体表面のふき取り検査では拭き取った綿棒を 20ml のリン酸緩衝液に浮遊させ、試料とする。

- b 鶏卵

1パック10個入り鶏卵から無作為に5個を選び、卵殻表面を消毒用アルコールで消毒し、35℃、18-24時間保管し、再度卵殻を消毒用アルコールで消毒し、滅菌容器に割卵してよく混和後、本液卵を検査用試料とする。

- c 市販牛乳

1L入りパック牛乳を検査用試料とする。

②細菌の検出法と同定方法

a 大腸菌

食品衛生検査指針や米国 FDA マニュアルでは汚染指標菌としての大腸菌群の検査法が主体であり、食品からの大腸菌検査に関しては満足できる方法でないことから、本調査では米国の食品由来細菌の薬剤感受性モニタリング試験法を基に、国内で広く使用されている培地などに変更した。

食品からの大腸菌検出法を図 8 に示した。すなわち、各試料を直接分離培養として大腸菌の選択分離培地である DHL 寒天と大腸菌検索の酵素基質培地である ES コリーマーク寒天に塗抹し、35°C、18-24 時間培養する。一方、試料の 1ml を EC 培地 (10ml 分注) に接種し、大腸菌の培養温度である 44.5°C、22-24 時間培養後 DHL 寒天および ES コリーマーク寒天で、分離培養を行い、35°C、18-24 時間培養する。分離寒天培地上で大腸菌を疑う集落について図 8 に示す各種の生化学的性状試験を実施し、下記の性状を示したものを大腸菌とする。

TSI 培地	斜面:分解/非分解、高層:分解、硫化水素非産生、ガス産生/非産生
LIM 培地	リジン脱炭酸試験陽性、インドール試験陽性あるいは陰性、運動性陽性
シモンズのクエン酸塩培地	陰性
SIM 培地	IPA 反応陰性
VP 半流動培地	VP 反応陰性
チトクロムオキシダーゼ	陰性

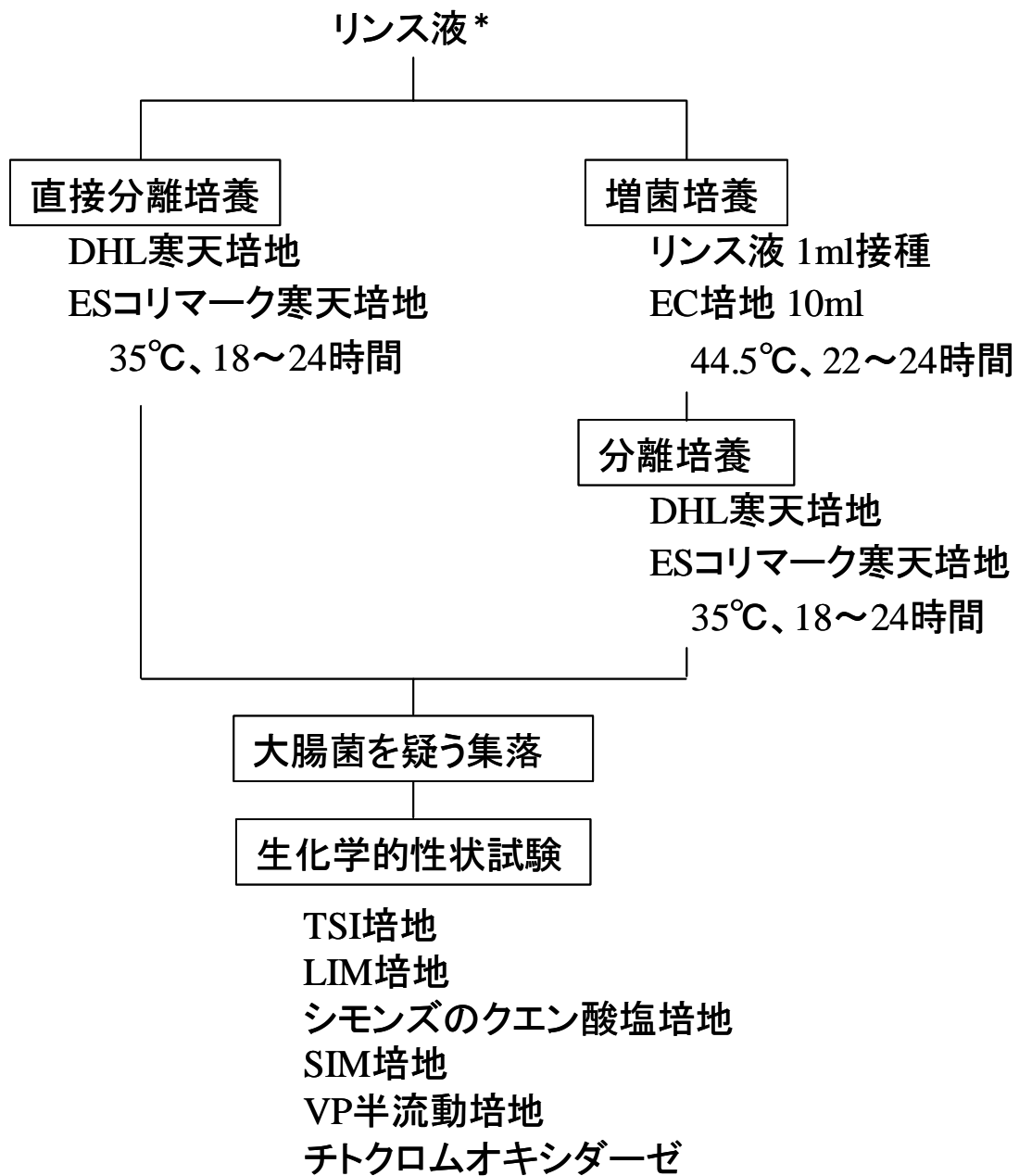


図8 大腸菌の検査方法

* 卵についてはサルモネラ用に割卵混合試料を用いる
 牛乳については、そのまま試料とする

b 腸球菌およびバンコマイシン耐性腸球菌

本調査においては国内の家畜からのモニタリング試験、あるいは自然界(家畜、家禽、食品)での分布状況、あるいは諸外国の報告に従い、対象とする腸球菌は *E.faecalis* および *E.faecium* の 2 菌種とする。

食品からの腸球菌検出法については諸外国のモニタリング調査法と併せて報告書末尾に示した藤瀬ら(腸 56)、土肥ら(腸 53)、石崎ら(腸 51)、Rizzotti *et al.*(腸 44)、Gambarotto *et al.*(腸 40)、Pavia *et al.*(腸 49)、Klein(腸 34)の論文、さらに、池康嘉先生から提供された資料(添付資料 8)を参考とした。

試料を Enterococcosel 培地およびバンコマイシンを 3 μ g/ml 添加した Enterococcosel 培地に塗抹し、35°C、48 時間培養する。一方、試料 1ml を Enterococcosel ブイヨン(10ml 分注)に接種し、35°C、18-24 時間培養後 Enterococcosel 培地およびバンコマイシンを 3 μ g/ml 添加した Enterococcosel 培地に塗抹し、35°C 48 時間培養する。疑わしい集落については図 9 に示す各種の生化学的性状により腸球菌の同定を行う。

グラム染色	陽性 球菌
45°C 発育試験	発育
6.5% 食塩発育試験	発育
Pyrrolidonyl arylamidase 試験	陽性
カタラーゼ試験	陰性

腸球菌と同定された菌株については Klein が報告したマンニトール、ソルビトール、アラビノースおよび 50°C の発育試験を実施し、菌種同定を行なう。

	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
マンニトール	+	+
ソルビトール	+	+/-
アラビノース	-	+
50°C 発育	-	+

ただし、これらの性状試験により明確な菌種同定は困難であるが、スクリーニング試験として実施する。ただし、薬剤感受性試験により耐性菌と認められた菌株については遺伝子学的な試験により正確な菌種同定を行う。

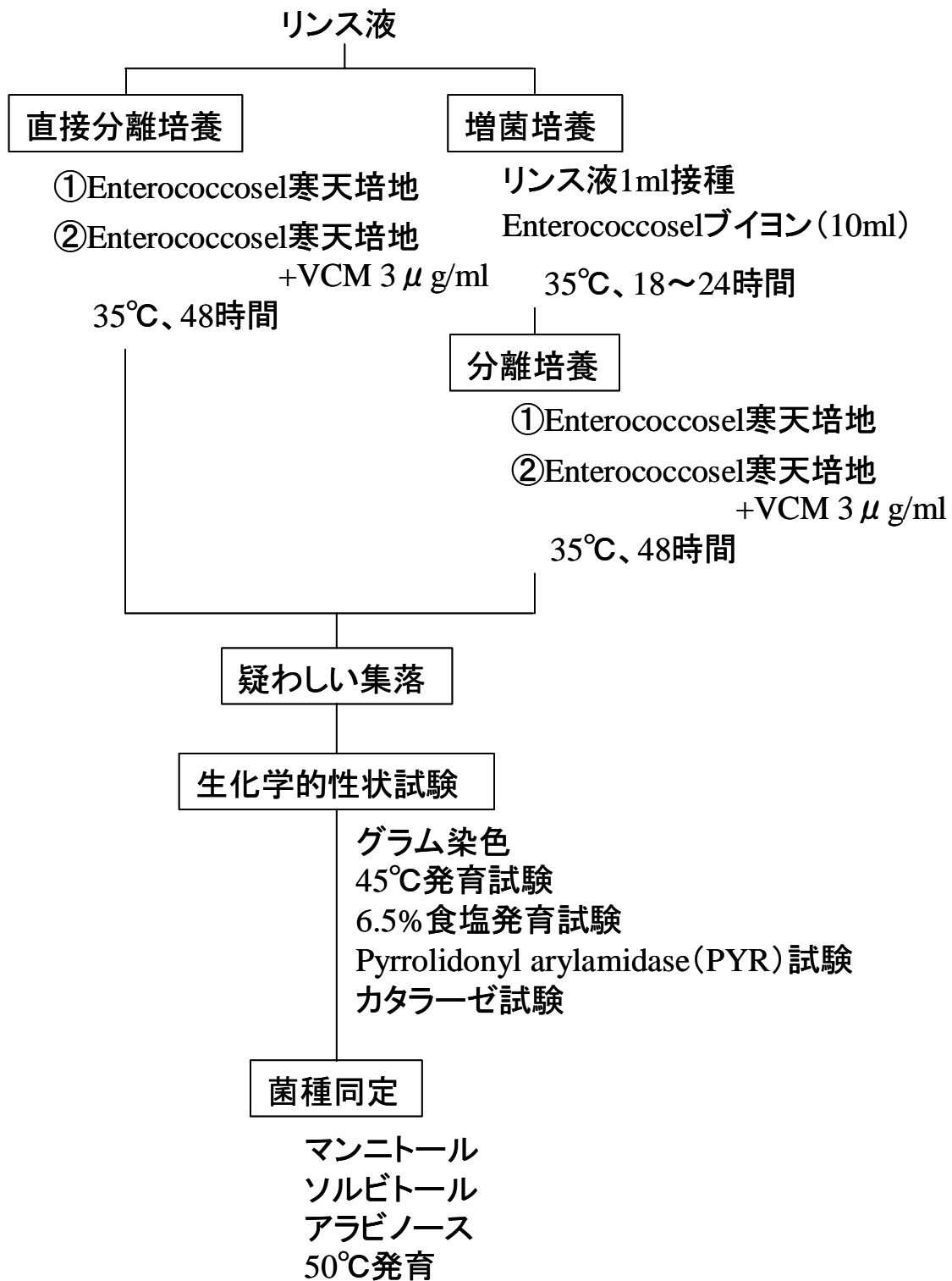


図9 腸球菌の検査方法

c サルモネラ属菌

食品からのサルモネラの検査法については食品衛生検査指針に示された方法が国際的な標準法に準じているのでこれに従った。また、鶏卵についても食品衛生検査指針に従う。食肉および養殖魚のリンズ液 80ml に 2 倍濃度の緩衝ペプトン水 80ml を加え、さらに緩衝ペプトン水を 40ml 加えて全量 200ml とする。本培地を 35°C、18-22 時間前培養を行い、本培養液 0.5ml をテトラチオン酸塩培地(10ml 分注)およびラパポート・バシリアディス培地(10ml 分注)に接種し、43°C、18-22 時間選択増菌培養を行う。分離用培地としてはMLCB 寒天培地とES サルモネラ寒天培地を併用する。両平板で疑わしい集落については生化学的性状試験によりサルモネラを同定する。下記の性状を示したものをサルモネラとする(図 10)。

TSI 培地 斜面:非分解、高層:分解、ガス 産生/非産生、硫化水素産生

LIM 培地 リジン脱炭酸塩反応陽性、インドール反応陰性、運動性陽性

SIM 培地 IPA 反応陰性

シモンズのクエン酸塩培地 クエン酸塩利用陽性

VP 半流動培地 VP 反応陰性

サルモネラと同定された菌株についてはO 抗原、H 抗原を決定し、血清型別を実施する。

と体のふき取り液については 8ml に等量の 2 倍濃度の緩衝ペプトン水を加え、上述に従って培養する。

鶏卵からのサルモネラの検査は図 11 に示すごとく前培養として FeSO₄/7H₂O 64mg/L 添加緩衝ペプトン水 250ml に試料 50ml を接種し、35°C、18-22 時間培養する。選択増菌培地、生化学的性状検査は前記の食肉等のサルモネラの検査に準じる。

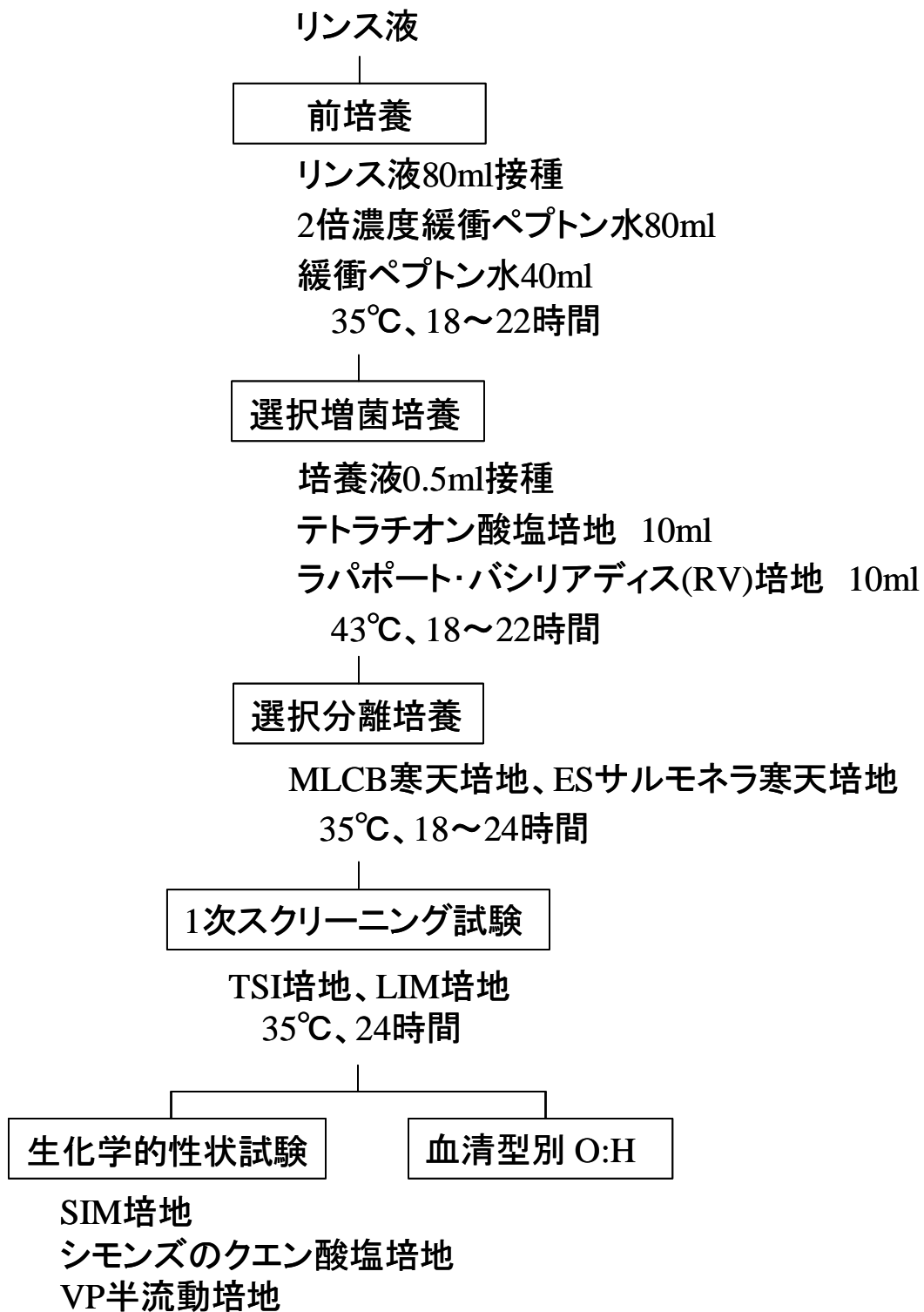


図10 食肉・養殖魚からのサルモネラ属菌の検査方法

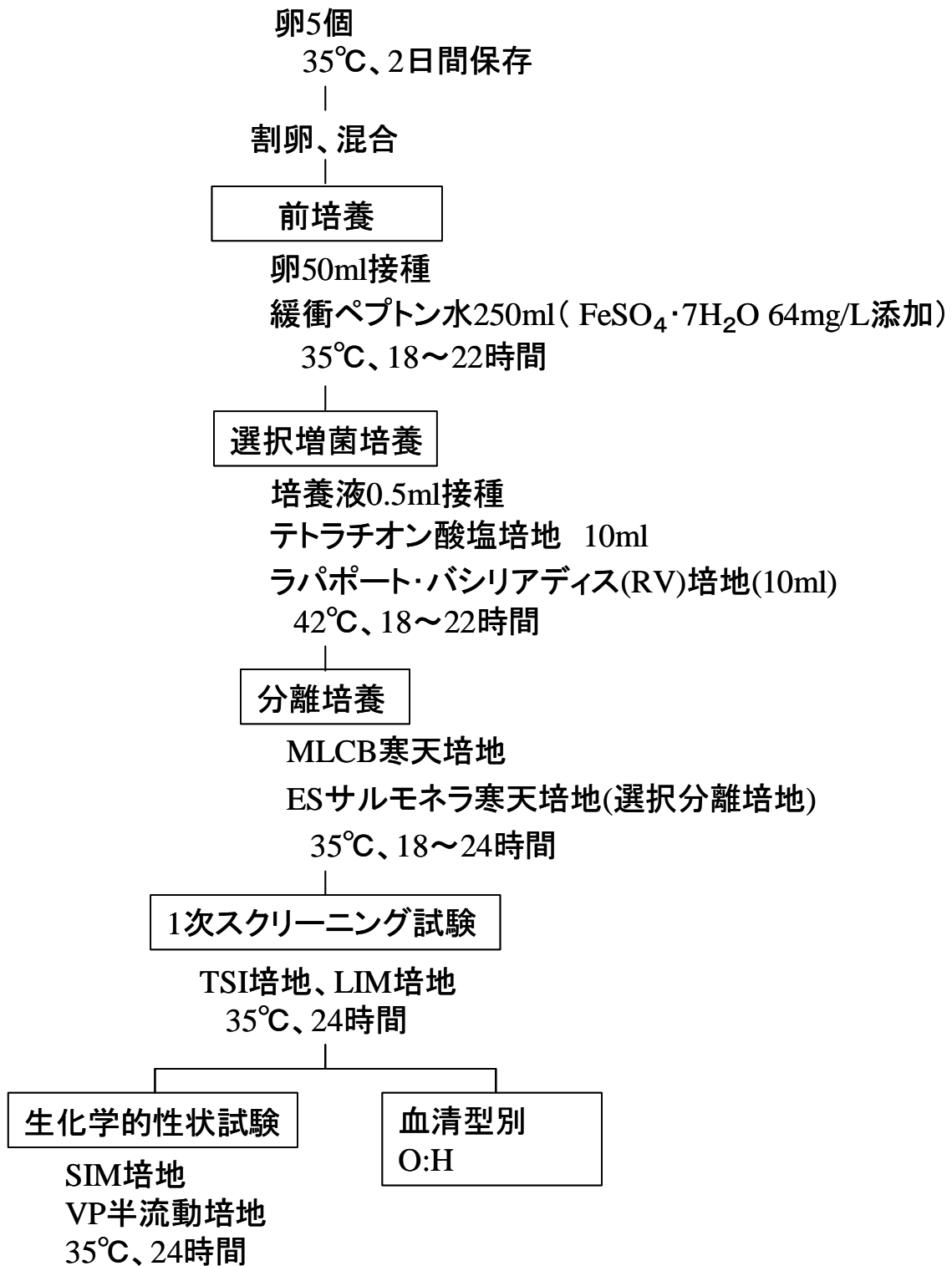


図11 卵からのサルモネラ属菌の検査方法

d 腸管出血性大腸菌 O157:H7/-

牛肉からの腸管出血性大腸菌 O157 検査法は食品衛生検査指針に示された方法が国際的にも認められている方法に準拠していることからこの方法に従う。

牛肉のリンス液 80ml に 2 倍濃度のノボビオシン加 mEC ブロス 80ml を加え、さらにノボビオシン加 mEC ブロス 40ml を加え、42°C、18-24 時間培養する。培養後 ELISA 法或いはこれに類似する免疫学的方法により O157 のスクリーニング試験を実施し、陽性検体について免疫磁気ビーズ法により O157 菌体を濃縮する。分離培地としては CT-SMAC 寒天培地とクロモアガー O157TAM 寒天培地を用いる。疑わしい集落については 1% セロビオース添加 LIG 寒天培地でスクリーニングする。O157 を疑う菌株については図 12 に示す生化学的性状試験を行う。また、O 抗原と H 抗原について検査を実施し、血清型を決定する。ベロ毒素の検査はラテックス凝集反応あるいは毒素遺伝子の検査を実施し、毒素型を決定する(図 12)。

と体のふき取り液については 8ml を 2 倍濃度のノボビオシン加 mEC ブロスを加え、上述のごとく培養する。

O157 の生化学的性状は下記のごとくである。

1% セロビオース添加 LIG 寒天培地 斜面: 非分解、高層: 分解、MUG 反応陰性

TSI 培地 斜面、高層: 分解、ガス産生、硫化水素非産生

LIM 培地 リジン脱炭酸塩反応陽性、インドール反応陽性、運動性陽性/陰性

シモンズのクエン酸塩培地 クエン酸塩の利用性陰性

SIM 培地 IPA 反応陰性

VP 半流動培地 VP 反応陰性

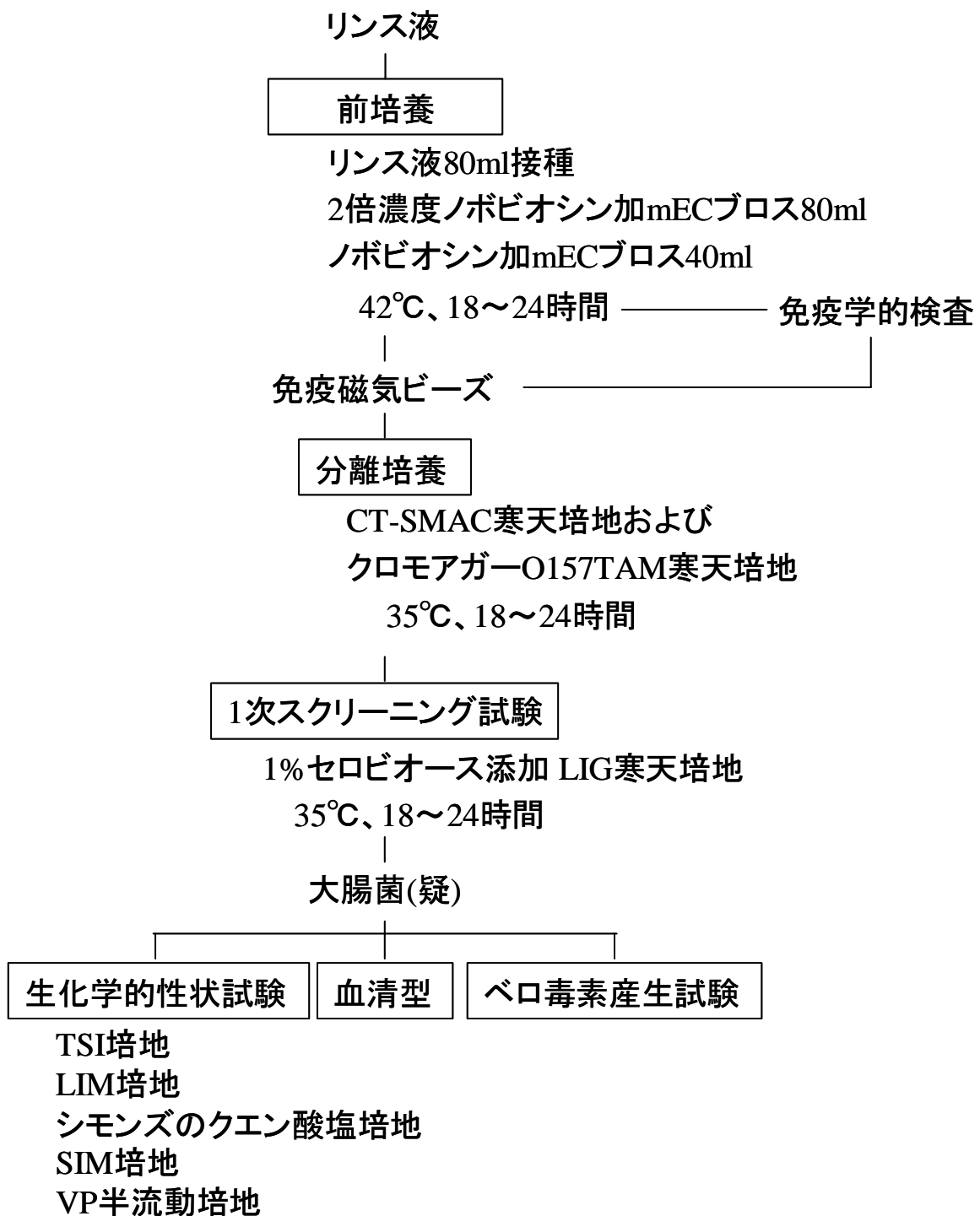


図12 牛肉からの腸管出血性大腸菌O157の検査方法

e カンピロバクター属菌 (*C. jejuni*, *C. coli*)

食品からのカンピロバクター検査は直接分離培養と増菌培養を併用する。直接分離培養は mCCDA 培地および Skirrow 培地あるいはキャンピフード ID 培地を使用する。増菌培養はリンス液 1ml を Preston 培地(10ml) に接種し 42℃ で 18-22 時間微好気培養を行う。増菌培養液からの分離培養は直接分離培養と同一の培地を使用し、42℃、48 時間、微好気培養する。疑わしい集落については図 13 に示す検査を実施し菌種の同定を行う。

C.jejuni および *C.coli* の生化学的性状は下記のとおり。

	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>
グラム染色	陰性 S 字状の螺旋	陰性 S 字状の螺旋
運動性	コルクスクリュ様	コルクスクリュ様
オキシダーゼ試験	陽性	陽性
カタラーゼ試験	陽性	陽性
25℃の発育	陰性	陰性
42℃の発育	陽性	陽性
馬尿酸塩加水分解	陽性	陰性
酢酸インドキシル加水分解	陽性	陽性

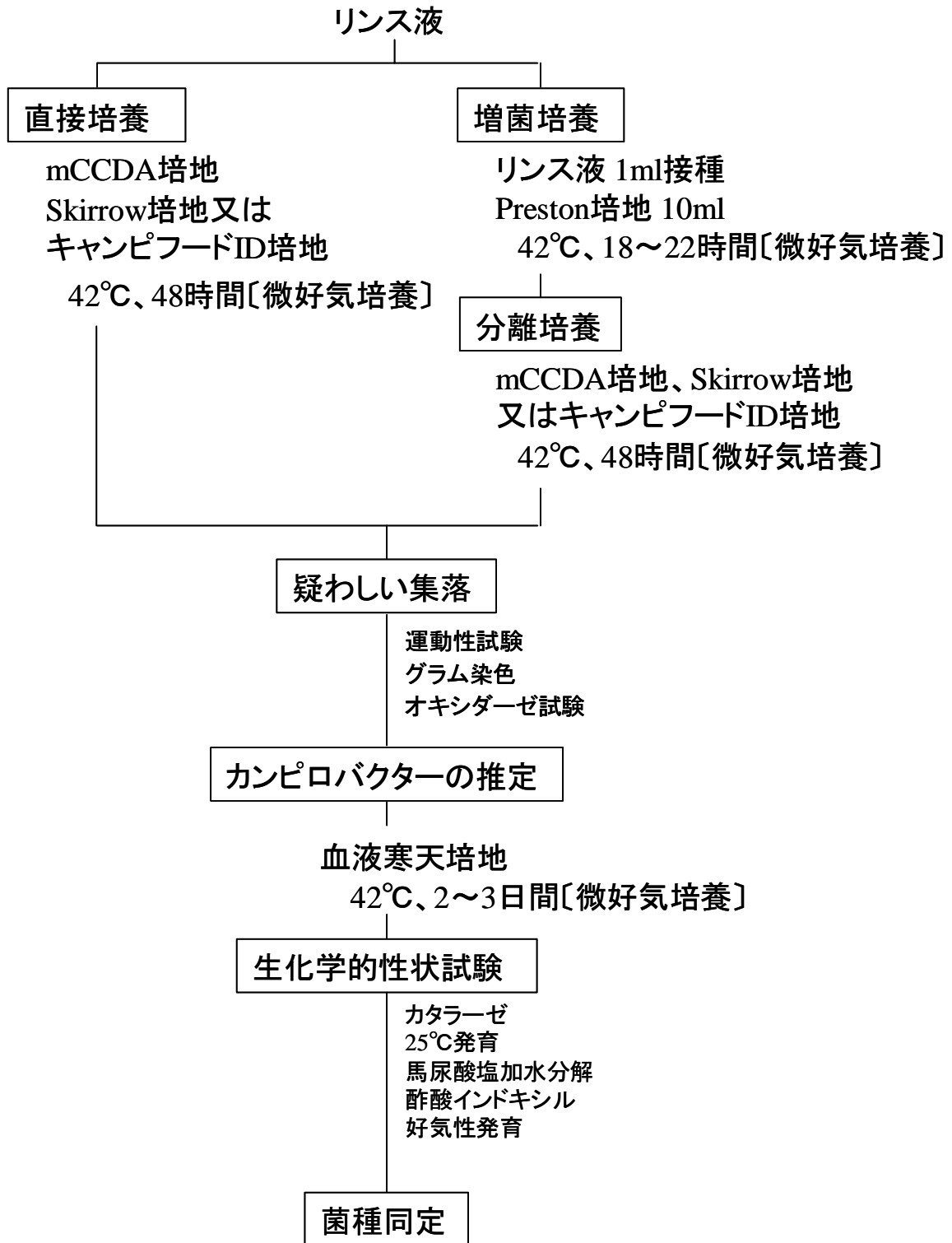


図13 食品からの*Campylobacter jejuni*および*C. coli*の検査方法

3) 分離菌株数 (MIC 分布を作成するために必要な菌株数)

薬剤感受性試験に供する菌株は原則として同一サンプルから検出された 3 菌株とする。ただし、検査法として直接分離培養と増菌培養を併用しており、各々の細菌や病原菌により供試すべき菌株の選択には考慮が必要である。

大腸菌: 直接分離培地検出株 2 菌株、増菌培養からの検出株 1 菌株とするが、直接分離菌株が陰性で、増菌培養のみ陽性の場合には増菌培養由来菌株 3 菌株とする。

腸球菌: 直接培養の Enterococcsel 培地およびバンコマイシン添加 Enterococcsel 培地それぞれ直接分離菌株 3 菌株。直接分離培養が陰性の場合には増菌培養後 Enterococcsel 培地検出 3 菌株、バンコマイシン添加 Enterococcsel 培地検出 3 菌株とする。

サルモネラ: O 血清型が異なるサルモネラ菌株 3 株とするが、同一 O 血清型の場合には 2 菌株とする。

カンピロバクター: 直接分離培養で検出された菌株 2 菌株、増菌培養検出菌株 1 菌株とする。直接分離培養陰性の場合には、増菌培養検出の 2 菌株とする。

腸管出血性大腸菌 O157: 検出菌株 2 菌株を試験菌とする。

4) 菌株の保存方法

薬剤感受性試験用菌株はプラスミドなどが脱落しない方法で保存しなければならない。大腸菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157、腸球菌の各菌株についてはカシトン半流動培地に保存する。乾燥を防ぐためにゴム栓とし、冷暗所に保存する。

カンピロバクターについては寒天培地による保存では死滅が早いので、寒天培地による保存は避ける。BHI ブイヨンに被検菌を接種し、試験管内に微好気混合ガス(酸素ガス 5%、炭酸ガス 10%、窒素ガス 85%)を噴入し、プチル栓で密封後、35°C、18-24 時間、振とう培養する。培養後滅菌グリセリンを 15% になるように添加し、-80°C に保存する。保存菌株は 1 年以内に薬剤感受性試験を実施すること。

3. 薬剤感受性試験方法

1) 測定方法

薬剤耐性サーベイランス事業が世界各国で注目され、MIC (最小発育阻止濃度) の相互比較が極めて重要であることから MIC の測定法の統一化が求められている。わが国ではヒト由来細菌の検査法として米国臨床検査標準委員会 (CLSI/NCCLS) が制

定した方法が導入されているし、2003年には CLSI/NCCLS 法に準拠して動物由来細菌の MIC 測定法ガイドラインが示された。また、国内の家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査で実施している方法は上記の動物由来細菌の MIC 測定ガイドラインに沿っていることから、MIC 測定法はこれらのガイドラインに準拠し、寒天平板希釈法を採用する。

2) 対象薬剤

薬剤感受性試験に供試する薬剤は家畜、家禽および養殖魚に動物用医薬品又は飼料添加物として使用されている抗菌性物質を対象とし、国内の家畜衛生分野におけるモニタリング調査において実施されている薬剤、諸外国で実施されているモニタリング調査の対象薬剤及び抗菌性物質の系統等を参考として、対象抗菌性物質をしぼり込んだ。従来からの家畜衛生分野でのモニタリング調査での対象薬剤にセデカマイシン(マクロライド系)、チルミコシン(マクロライド系)、ホスホマイシンを新たに追加した。オラキンドックスは飼料添加物としての指定が取り消され、使用禁止となっているので、対象としなかった。

表 11 に示すようにサルモネラに対しては 18 薬剤、大腸菌(腸管出血性大腸菌 O157 を含む)はサルモネラと同様な薬剤を対象とする。カンピロバクターは 12 薬剤、腸球菌は 18 薬剤である。

エラー! リンクが正しくありません。

3) 抗菌性物質の調整方法

① 標準品の保存方法

薬剤は吸湿を防止するためにデシケーターに入れ-20 以下で保存する。秤量時も吸湿を避けるために相対湿度が 45%以下の環境で行う。

② 薬剤の溶解と濃度の調整

滅菌蒸留水を用いて溶解するが、水に不溶性の薬剤は表 12 のごとく少量のエタノールや水酸化ナトリウムに溶解後滅菌蒸留水で希釈する。溶解に必要な溶媒の量は下記の計算式により計算する。

溶媒量(ml) = 薬剤の力価 (μ g/mg) \times 秤量(mg) \div 原液の濃度 (μ g/ml)

薬剤の希釈は滅菌蒸留水により表 13 に示すマスター希釈液を作成する。次いで表 13 に示すごとく 2 段階希釈液を調整する。調整した薬剤は当日に使用すること。

表12 試験薬剤の溶解に使用する溶媒と希釈液

薬剤	略号	溶媒	希釈液
アンピシリン	ABPC	緩衝液-2 ²⁾	緩衝液-1 ¹⁾
セファゾリン	CEZ	緩衝液-1	蒸留水
セフトオフル	CTF	蒸留水	蒸留水
アプラマイシン	APM	蒸留水	蒸留水
ジヒドロストレプトマイシン	DSM	蒸留水	蒸留水
ゲンタマイシン	GM	蒸留水	蒸留水
カナマイシン	KM	蒸留水	蒸留水
エリスロマイシン	EM	95%エタノール	蒸留水
リンコマイシン	LCM	蒸留水	蒸留水
コリスチン	CL	蒸留水	蒸留水
ノシヘブタイド	NHT	ジメチルホルムアミド	蒸留水
バンコマイシン	VCM	蒸留水	蒸留水
バージニアマイシン	VGM	少量のメタノール+蒸留水	蒸留水
サリノマイシン	SLM	メタノール	蒸留水
オキシテトラサイクリン	OTC	少量の0.1N HCl+蒸留水	蒸留水
アピラマイシン	AVM	アセトン	蒸留水
バシトラシン	BC	蒸留水	蒸留水
ビコザマイシン	BCM	蒸留水	蒸留水
クロラムフェニコール	CP	95%エタノール	蒸留水
ナリジクス酸	NA	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
エンロフロキサシン	ERFX	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
スルファジメトキシシン	SDMX	下記 ⁴⁾ 参照	蒸留水
トリメプリム	TMP	1/10量 0.05N HCl+蒸留水	温かい蒸留水
セデカマイシン	SCM	メタノール	蒸留水
ホスホマイシン	FOM	蒸留水	蒸留水
チルミコシン		蒸留水 ⁵⁾	蒸留水

- 1) 0.1Mリン酸塩緩衝液 (pH6.0) の調製法
 リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄) 7.0g、リン酸一水素ナトリウム (NaH₂PO₄) 6.0gに蒸留水約750mlを加え、1分間以上煮沸して溶かす。必要があれば、1N NaOHまたはリン酸を用いてpHを5.9-6.1に調整した後、更に蒸留水を加えて1000mlとする。
- 2) 0.1Mリン酸塩緩衝液 (pH8.0) の調製法
 (1) リン酸一水素カリウム (16.73g) / リン酸二水素カリウム (0.523g)
 (2) リン酸一水素カリウム (無水) (13.2g) / リン酸二水素カリウム (0.91g)
 (1) または (2) の処方による。いずれも上記分量をとり、蒸留水約750mlを加えて溶かし、必要があれば、リン酸を用いてpHを7.9-8.1に調整した後、更に蒸留水を加えて1000mlとする。
- 3) 蒸留水1/2容量を加えた後、1N NaOHを溶解するまで滴下し、蒸留水でメスアップする。
 4) 熱い蒸留水1/2容量を加えた後、2.5N NaOHを溶解するまで滴下し、蒸留水でメスアップする。
 5) チルミコシンについては蒸留水で溶解するとしたが、試験時溶媒を検討すること。

表13 寒天平板希釈法のための薬剤希釈調製例

マスター希釈						
5,120 $\mu\text{g/ml}$	A液				
1,280 $\mu\text{g/ml}$	B液	A液1容+蒸留水3容			
160 $\mu\text{g/ml}$	C液	B液1容+蒸留水7容			
20 $\mu\text{g/ml}$	D液	C液1容+蒸留水7容			
2.5 $\mu\text{g/ml}$	E液	D液1容+蒸留水7容			
薬剤の溶液						
段階	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	容量 (ml)	+蒸留水*(ml)	中間濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	寒天での1:10希釈における最終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	\log_2
1	5,120 (A液)	-	-	5120	512	9
2	5,120 (A液)	1.0	1.0	2560	256	8
3	5,120 (A液)	1.0	3.0	1280	128	7
4	1,280 (B液)	1.0	1.0	640	64	6
5	1,280 (B液)	1.0	3.0	320	32	5
6	1,280 (B液)	1.0	7.0	160	16	4
7	160 (C液)	1.0	1.0	80	8	3
8	160 (C液)	1.0	3.0	40	4	2
9	160 (C液)	1.0	7.0	20	2	1
10	20 (D液)	1.0	1.0	10	1	0
11	20 (D液)	1.0	3.0	5	0.5	-1
12	20 (D液)	1.0	7.0	2.5	0.25	-2
13	2.5 (E液)	1.0	1.0	1.25	0.125	-3

*: ABPCの場合は0.1Mリン酸塩緩衝液、pH6.0を用いる。

4) 薬剤含有寒天培地の調整

使用培地はミュラーヒントン寒天培地(報告書には製造所、ロット No を記載する)を用いる。ただし、カンピロバクターについては5%の割合に羊脱線維素血液を添加したミュラーヒントン寒天培地(報告書には製造所、ロット No を記載する)を用いる。

前項で調整した2段階希釈した薬剤液1:培地9の割合で混合し、シャーレに分注して固まらせる。通常直径90mmのシャーレであれば、希釈液2mlと48-50°Cに保持した滅菌寒天培地18mlを混合する。対照として薬剤無添加の寒天培地を作成する。使用前に約30分間ふ卵器内で寒天表面を乾燥させる。

5) 接種用菌液の調整と接種法および培養

サルモネラ、大腸菌、腸球菌については普通寒天培地、カンピロバクターについては血液寒天培地で純培養した被検菌株の3-5集落を鉤菌し、トリブチックブロー(報告書には製造所、ロット No を記載)で、35°C、18-24時間培養する。カンピロバクターについてはトリブチックブローに被検菌を接種後試験管内に微好気混合ガス(酸素ガス5%、炭酸ガス10%、窒素ガス85%)を噴入し、ブチル栓で密封後、35°C、18-24

時間、振とう培養する。

それぞれの培養液を約 $1-2 \times 10^8$ cfu/m (McFarland 標準液 No.0.5) となるように調整する。

マイクロプランターの金属製ピンが直径 1mm (0.5μ l/spot) を使用する場合には上記で調整した培養液をそのまま使用する。マイクロプランターで接種用菌液をとり、薬剤含有培地に接種する。この場合、薬剤を含まない対照培地から接種し、次いで低濃度の薬剤含有培地から高濃度培地へと接種していく。平板培地の菌液が乾燥した後、 35°C 、16-20 時間培養してから判定する。

カンピロバクターの場合は菌接種後、微好気ガス発生袋を使用して 35°C 、45-48 時間微好気培養後に判定する。

6) 薬剤感受性判定方法とブレイクポイント

薬剤含有培地で被検菌の発育が完全に阻止された薬剤の最小濃度をエンドポイントとして判定する。その値が最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) とする。なお、単一集落あるいは微少な発育は CLSI/NCCLS に従い発育阻止と見なす。薬剤不含培地では被検菌の発育を確認する。

ブレイクポイント(耐性限界値)は国内の家畜衛生分野におけるモニタリング調査で示されている値を基本とする(表 14)。ただし、CLSI/NCCLS や諸外国でのモニタリング調査で提唱されている値を参考にする。ブレイクポイントが示されていないアブラマイシン、ノイヘプタイド、バージニアマイシンなどの薬剤については供試菌株の MIC 分布が二峰性を示した場合、感受性菌と耐性菌のピークの間値をブレイクポイントとして設定する。なおブレイクポイントは今後の研究の進展により明確となったものは、それらの報告に従う。

薬剤感受性		対象菌種とブレイクポイント(μg/ml)			
検査の対象抗菌性物質	略号	大腸菌	腸球菌	サルモネラ	カンピロバクター
アンピシリン	ABPC	○ 32	○ 16*	○ 32	○ 32
セファゾリン	CEZ	○ 32	×	○ 32 ¹⁾	×
セフトオフル	CTF	○ 8	×	○ 8 ²⁾	×
アプラマイシン	APM	○	×	○	×
ジヒドロストレプトマイシン	DSM	○ 32	○ 128	○ 32	○ 32
ゲンタマイシン	GM	○ 16	○ 32	○ 16 ¹⁾	○
カナマイシン	KM	○ 64	○ 128	○ 64	×
エリスロマイシン	EM	×	○ 8	×	○ 32
リンコマイシン	LCM	×	○ 128	×	×
コリスチン	CL	○ 16	×	○ 16 ²⁾	×
ノシヘプタイド	NHT	×	○	×	×
バンコマイシン	VCM	×	○ 32	×	×
バージニアマイシン	VGM	×	○	×	×
サリノマイシン	SLM	×	○ 16 ²⁾	×	×
オキシテトラサイクリン	OTC	○ 16	○ 16	○ 16	○ 16
アピラマイシン	AVM	×	○ 16	×	×
バシトラシン	BC	×	○ 128 ²⁾	×	×
ピコザマイシン	BCM	○ 128	×	○ 64	×
クロラムフェニコール	CP	○ 32	○ 32	○ 32	○ 16
ナリジクス酸	NA	○ 32	×	○ 32	○ 32
エンロフロキサシン	ERFX	○ 2	○ 4	○	○ 2
スルファジメトキシシン	SDMX	○	×	○	○
トリメプリーム	TMP	○ 16	×	○ 16	×
セデカマイシン		○	○	○	○
ホスホマイシン	FOM	○	○	○	○
チルミコシン		○	○	○	○

1) CLSI/NCCLS2006による
2) DANMAP2003による

7) 成績の記載

得られた成績から、食品ごとに各抗菌性物質に対する MIC(μg/ml)分布、Range、ブレイクポイント、耐性菌株数(耐性率)、MIC50, MIC90 を記載する。成績記載例を表15、表16に示す。

薬剤	MIC(μg/ml)												MICブレイクポイント	耐性菌株数	(%)	
	≤0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	≥100				
ABPC			2	13	40	6	7						25	12.5	25	(26.9)
CEZ				2	19	44	26						2	12.5	2	(2.2)
CTF			4	22	56	9	1	1								
KM				1	1	18	35	9					2	27	25	(31.2)
GM			1	4	31	29	25	3								
OTC			4	6	15	14	1						53	12.5	53	(57.0)
APM						8	27	48	10							
CP					2	6	27	23	15					20	25	(21.5)
NA							15	36	30	5				7	50	(7.5)
ERFX	12	46	26	5	4											
SDMX														93		
TMP				9	33	24	10	1		1	1	14	12.5	16	(17.2)	

表16 サルモネラの薬剤感受性試験(結果記載例)

薬剤	Range (mg/ml)	MIC50 (mg/ml)	MIC90 (mg/ml)	ブレイクポイント (mg/ml)	耐性菌株数	耐性率 (%)
ABPC	0.25-64 \leq	0.5	64 \leq	16	6	12.0
CEZ	0.5-4	1	2			
CTF	0.25-2	0.5	1			
DSM	2-128 \leq	16	128 \leq	32	14	28.0
KM	16-128 \leq	32	128 \leq	64	20	40.0
GM	0.5-4	1	2			
APM	0.5-4	2	4			
OTC	0.5-32 \leq	32 \leq	32 \leq	16	38	76.0
CL	32-64	64	64			
BCM	16-128 \leq	32	64	64	13	26.0
CP	0.5-128 \leq	1	128 \leq	32	6	12.0
NA	1-128 \leq	2	128 \leq	64	7	14.0
ERFX	\leq 0.06-0.5	\leq 0.06	0.25			
SDMX	128 \leq	128 \leq	128 \leq			
TMP	0.5-128 \leq	1	128 \leq	32	15	30.0

8) 精度管理

薬剤感受性試験は使用培地、培地の量、接種菌量、菌の培養状態、培養時間および培養温度によって影響されるので、常に一定条件を守らなければならない。さらに、薬剤含有培地は自家調製であることから、精度管理用菌株により、その精度と正確性を確保しなければならない。精度管理用菌株は CLSI/NCCLS ガイドラインで示された下記の菌株とする。

Staphylococcus aureus ATCC 29213(JCM 2874)

Enterococcus faecalis ATCC 29212(JCM 7783)

Escherichia coli ATCC 25922(JCM 5491)

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853(JCM 6119)

カンピロバクターの精度管理用菌株

Campylobacter jejuni ATCC 33560

MIC の精度管理限界値(MIC 範囲)は CLSI/NCCLS の規定に準拠する(表 17)。CLSI/NCCLS が規定していない薬剤については農林水産省動物医薬品検査所で実施された成績に基づき暫定的に制定された精度管理限界値を参考とする(表 18)。

表17 CLSIが規定する薬剤におけるMIC($\mu\text{g/ml}$)の精度管理限界値 一般細菌の精度管理限界値													
	薬剤	ABPC	CEZ	CTF	APM	GM	KM	EM	VCM	CP	NA	ERFX	TMP
精度管理用菌株													
<i>S. aureus</i>	ATCC29213	0.5-2	0.25-1	0.25-1	2-8	0.12-1	1-4	0.25-1	2-8	-	0.03-0.12	1-4	0.5-4
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	0.5-2	-	-	-	4-16	16-64	1-4	4-16	-	0.12-1	≤ 1	0.5-4
<i>E. coli</i>	ATCC25922	2-8	1-4	0.25-1	2-16	0.25-1	1-4	-	2-8	1-4	0.008-0.03	0.5-2	>32
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	-	-	16-64	2-16	0.5-2	-	-	-	-	1-4	>64	>32
Campylobacter spp.の精度管理限界値													
	薬剤	EM	GM	NA									
精度管理用菌株													
<i>C. jejuni</i>	ATCC33560	1-8	0.5-4	8-32									
表18 CLSIが規定していない薬剤の寒天平板希釈法によるMIC($\mu\text{g/ml}$)の精度管理限界値(参考値)													
	薬剤	DSM	LCM	CL	BC	NHT	VGM	OTC	AVM	BCM	SDMX		
精度管理用菌株													
<i>S. aureus</i>	ATCC29213	1-8	0.25-2	64-128	32-128	≤ 0.008	0.25-1	≤ 1	0.5-2	≥ 512	-		
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	16-64	8-32	≥ 256	32-128	≤ 0.015	1-4	4-16	0.25-2	≥ 512	≥ 256		
<i>E. coli</i>	ATCC25922	1-4	≥ 256	0.5-2	≥ 256	-	-	0.25-2	-	16-64	≥ 256		
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	4-32	≥ 256	0.5-2	≥ 256	-	-	2-16	-	≥ 512	≥ 512		

4. 薬剤耐性菌株の保存

分離菌株の保存方法に従う。ただし、大腸菌、腸球菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157 の耐性菌株については後日に分子遺伝学的検討に使用されることを考慮して寒天培地による保存以外に、 -80°C に保存する。すなわち、各菌株のトリプトソイブイオン培養液 1 に対しグリセリン 1 を加え -80°C に保存する。

5. 施設に関する情報の管理方法

検査物の購入先、名称、数量、検査成績などを電子媒体(パソコン)あるいはプリントアウトした書類で保存する場合、情報管理規定を制定し、情報の機密保持と漏洩を防止する。表 19 に管理規定のモデルを示したので、参考とする。

規定番号	表 19 情報管理規定モデル		
<p>第1条（目的）</p> <p>本規定は、「畜水産物における薬剤耐性菌の出現実態調査」（以下実態調査）における情報管理に関する事項を定める。</p> <p>第2条（定義）</p> <p>(1)〇〇情報とは、〇〇〇の所有する情報であって、経営情報、顧客情報、営業関連情報、情報システム情報、及びその他財団経営上の必要な全ての情報をいう。</p> <p>(2)機密情報とは、企業の財産、営業、業務執行に重大な影響を及ぼす、機密性の高い文書をいう。</p> <p>(3)〇〇〇ネットワークとは、LAN 及び電話回線で結ばれたサーバーとパソコンの集合体をいう。</p> <p>第3条（情報の漏洩禁止）</p> <p>職員は、財団の情報セキュリティを確保するため、〇〇〇情報を業務以外の目的で使用したり、第三者に漏洩したり、無断で使用または院外に持ち出したりしてはならない。</p> <p>2 退職後も、在職中に知り得た社内情報を第三者に漏洩したり、無断で使用したりしてはならない。</p> <p>3 また、次の事項を守らなければならない。</p> <p>(1)〇〇〇情報を複製する場合は、複製の目的などを申告し管理責任者の許可を得て、機密保護に注意して実施すること。許可なく院外に持ち出さないこと。</p> <p>(2)プリントアウトした〇〇情報については、機密保護に注意し、定められた方法により保管すること。</p> <p>第4条（機密情報の管理）</p> <p>機密情報の院外漏洩などによる、企業経営に与える影響が甚大であることから、機密情報の不正利用、外部漏洩、及びプライバシー侵害などを防止するため、特に厳重な管理を行わなければならない。</p> <p>(1)機密文書の機密度に応じて、発送、受付、整理、保管、保存及び廃棄の作業に、管理者が立ち会うなど、機密保持に特別に注意しなければならない。</p> <p>(2)機密情報を削除する場合、または社内情報が含まれる帳票等を廃棄する場合は、作業担当者及び処理内容を記録し、記録媒体の初期化など情報を復元できないような処理を実施し、不正防止及び機密保護の対策を講じた上で、削除または廃棄しなければならない。</p>			
制定：平成 年 月 日		見直期限：平成 年 月 日	

