

	検査法試案(つづき)	コメント
分離培養	<p>分離培地に増菌培養した液を画線塗抹して 42℃で 24 - 48 時間培養する。</p> <p>分離培地は mCCDA 培地を用いる。また、必要に応じて、下記の二次培地を追加する。</p> <p>Karmali 寒天培地、Modified Butzler 培地、Skirrow 培地、Preston 寒天培地</p>	
コロニーの同定	<p>(1)コロニーの観察</p> <p>疑わしい形状のコロニーを 5 コロニー程度採取。</p> <p>直径 1 - 2 mm 程度の正円形でやや隆起したコロニー(時に扁平する)を対象とする。</p> <p>(2)コロニーの同定準備</p> <p>コロンビア血液寒天培地およびこれと同等の糖の含有が少ない非選択培地に塗抹して 42℃で 24 - 48 時間培養。</p>	

表 4 ページ目 / 全 4 ページ

	検査法試案(つづき)	コメント
<p>コロニーの同定(つづき)</p>	<p>(3)鑑別同定</p> <p>①グラム染色 ラゼン状(球状[コッコイド]の場合もある)のグラム陰性 かん菌</p> <p>②カタラーゼ陰性</p> <p>③オキシダーゼ陽性</p> <p>④ラテックス凝集テスト(DrySpotTest など)で陽性</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>⑤馬尿酸塩加水分解試験(<i>C. jejuni</i> [+], <i>C. coli</i> [-])</p> <p>⑥イントキシル酢酸塩加水分解陽性(<i>C. jejuni</i> [+], <i>C. coli</i> [+])</p> <p>⑦必要に応じて TSI 培地などで生化学試験</p> </div>	<p>(主5)<i>jejunii/coli</i> 以外はほとんど出ない実態があるので⑤-⑦が必要かどうか検討</p>

検討協力機関	東京都健康安全研究センター	埼玉県衛生研究所
	秋田県衛生科学研究所	愛知県衛生研究所
	大阪府立公衆衛生研究所	広島市衛生研究所
	山口県環境保健研究センター	熊本県保健環境科学研究所
	群馬県衛生環境研究所	

別表3 MICの測定結果

*Listeria monocytogenes*

	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
ABPC patient	101	6	85	10							
environment	100	46	48	5	1						
CTF patient	101			1		6	11	13	17	44	9
environment	100					7	7	7	39	31	9
DSM patient	101			10	10	90	1				
environment	100			7	7	93					
GM patient	101	17	44	39	1						
environment	100	12	46	42							
KM patient	101		4	9	57	31					
environment	100			11	69	20					
EM patient	101	4	97								
environment	100	7	86	6				1*			
ECM patient	101			1		1	80	19*			
environment	100				3	9	85	3*			
NHT patient	101	101									
environment	100	100									
VCM patient	101		15	75	11						
environment	100		5	82	13						
VGM patient	101		12	67	22						
environment	100		15	56	16	13					
SNM patient	101	1	73	27							
environment	100	1	97	2					1		
OTC patient	101			4	91	5					
environment	100			7	71						
BC patient	101			1			2	8	55	35	
environment	100			3		2	5	12	47	25	4
CP patient	101			7		77	17				
environment	100			1	15	69	14	1*			
NA patient	101								1	1	99
environment	100					2		1	2	6	89
ERFX patient	101	2	2	42	57						
environment	100	1	1	52	37	10					

\* &gt;16

平成 15 年度厚生労働省食品安全確保事業分担研究報告書

分担課題名 家畜衛生分野における薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究

分担研究者 田村 豊 農林水産省動物医薬品検査所

協力研究者 高橋 敏雄、浅井鉄夫、小島明美、石原加奈子、江寄英剛 農林水産省  
動物医薬品検査所

研究要旨

食品媒介性病原細菌の薬剤耐性が動物と人との間でどの程度発現し、拡散しているかとの疫学的な知見を得るためのモニタリングの重要性が指摘されている。我が国においては①国内において分離される各種動物由来の食品媒介性病原細菌等の抗菌剤感受性を調べ、②その現状を把握することにより、抗菌剤の慎重使用を喚起してその有効性を確保すると共に、③畜産界での抗菌剤使用の公衆衛生分野に及ぼすリスク分析の基礎資料に資する目的で、家畜衛生分野における薬剤耐性菌実態調査システムである JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistant Monitoring System) が 1999 年度から構築された。本調査は、全国規模で実施されており、食品媒介性病原細菌としてサルモネラとカンピロバクターを、薬剤感受性の指標細菌として腸球菌と大腸菌をそれぞれ調査対象 (総分離 収集株数 約 1,500 株/年間) にしている。

耐性菌問題に関する国際的提言としては、①耐性菌の源は多種多様であり、②人-動物-環境間での細菌 遺伝子の交流が行われていること、抜本的な耐性菌対策は、単に抗菌剤の投与を止めればよいという単純な発想ではなく、様々な要因がその出現に関与していることを熟知し、③獣医療 家畜衛生及び医療 公衆衛生等の幅広い観点から検討されなければならないこと等があげられている。従って、医学関係機関や食品衛生関係部所との協力 連携を深め、これら国内外の機関との情報交換及び調査データの共有化等を図っていくことが不可欠である。

耐性菌問題を巡る国内外のこのような現況等を背景にスタートした標記分担研究の初年度においては、畜産分野におけるサルモネラとカンピロバクターの薬剤耐性菌の動向を全国レベルで把握するとともに耐性菌出現の要因等についても疫学的に解析することを試みた。

A 研究目的

動物の各種感染症を治療し、安価で安全な畜産物を生産するため、動物用抗菌剤が使用されている。動物用抗菌剤をめぐる世界的な動きとして、食用動物へ抗菌性物質を使うことにより出現した薬剤耐性菌もしくは耐性遺伝子が食物連鎖を介して人へ伝播し、人の細菌感染症の治療を困難にするという潜在的な危険性について議論されている。このような国際動向を背景に、畜産分野での抗菌剤使用の公衆衛生分野に及ぼす影響をしらべる

目的で、国内の畜産現場において分離される各種動物由来の食品媒介性病原菌 (サルモネラ及びカンピロバクター) の抗菌剤感受性をモニタリングしている。

サルモネラは、食品媒介性病原菌であると同時に、動物のサルモネラ症の原因菌で、一部の血清型による疾病は、家畜伝染病予防法の対象とされている。しかし、家畜の場合、サルモネラに感染しても常に発病するわけではないため、家畜におけるサルモネラ汚染については明らかではなく、薬剤感受性についても報告

は少ない。健康動物からの分離されたサルモネラの薬剤感受性を調べる共に、多剤耐性株及びキノロン耐性株について動物種及び血清型との関連について検討した。

一方、カンピロバクターは、一部の菌種を除き健康家畜が保菌しており、家畜衛生上問題とはならない。しかし、近年、世界的にフルオロキノロン耐性カンピロバクターの増加が報告され、耐性化の原因として、食用動物でのフルオロキノロン剤の使用が指摘されてきた。我が国においても、1991年にエンロフロキサシンが承認され、現在では6成分のフルオロキノロン剤が食用動物などの治療薬として認可されている。我々が、家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性動向を調査した成績では、フルオロキノロン耐性 *C. jejuni* が分離されたほとんどの鶏群で、キノロン剤は使用されておらず、キノロン剤のとの関連は認められなかった。そこで、キノロン耐性株の出現要因を明らかにするため、平成13年度の調査で耐性株が分離されたキノロン使用歴のない二つの養鶏場を対象に、経時的調査を実施した。

## B 研究方法

### 薬剤感受性調査

#### [ ]供試サルモネラ株

2000~2003年度に全国47都道府県の家畜保健衛生所で健康な家畜の糞便から分離したサルモネラ183株(牛25株、豚39株、採卵鶏28株、ブロイラー91株)を用いた。糞便からのサルモネラの分離は、Hajna-tetrathionate broth (HTT)を用いて増菌培養(42°C、20時間)後、ノホビオシン加DHL寒天培地により分離した。サルモネラの同定は、定法に従い生化学的検査後、市販の血清を用

いた凝集反応で血清型別した。

#### [ ]供試カンピロバクター株

農場において健康な家畜の糞便を材料とした。平成11年度は全国47都道府県から肥育牛、肥育豚およびブロイラーの糞便を検体とし、平成12年度以降は地域的に偏りのない11もしくは12都道府県から牛、豚、採卵鶏およびブロイラーの糞便を検体とした。平成11~15年度の間に計2165検体について調査した。平成11~13年度については、CEM培地による増菌を併用し、CCDA培地により分離した。平成14年度以降は増菌を行わず、CCDA培地により直接分離した。分離株は、各種生化学性状検査を実施した後、PCR法により菌種同定した。

#### [III]薬剤感受性試験法

サルモネラは、動物用医薬品および飼料添加物として認可されている20薬剤、カンピロバクターは、13薬剤を供試した(表1)。サルモネラの薬剤感受性試験は、NCCLSガイドラインに準拠した寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。また、カンピロバクターは、平成11及び12年度については、日本化学療法学会標準法に準拠し、5%馬脱繊維素血液添加ミューラーヒントン寒天培地を用いた寒天平板希釈法によりMICを測定した。平成13年度以降はNCCLSがカンピロバクターの薬剤感受性試験方法を示したため、NCCLSガイドラインに準拠した寒天平板希釈法によりMICを測定した。

耐性限界値は、供試株のMIC分布が二峰性を示した場合のみ、感受性菌と耐性菌のピークの間接値として設定した。

#### [IV]耐性関連遺伝子等の検査法

サルモネラについてClass 1 Integronは、Izumiyamaの報告に従い、PCRにより調べた。キノロン耐性株は、キノロン耐

性決定領域 (QRDR) の PCR 産物をダイレクトシーケンシングして、変異部位を調べた。

[V]フルオロキノロン耐性カンピロバクターが分離された養鶏場における追跡調査

モニタリングにおいてフルオロキノロン耐性 *C. jejuni* が分離された2養鶏場の各1鶏群から3週間間隔で鶏糞便および飲水を検体とした。また、環境材料も検体とし、CCDA培地により直接分離を試み、PCR法により菌種を同定した。分離株は、PCR-RFLPにより *fla A* type の遺伝子型別を実施した。

薬剤感受性試験は、6薬剤 (NA、ERFX、DSM、EM、OTC、CL) を供試し、NCCLSガイドラインに準拠した寒天平板希釈法によりMICを測定した。

## C 研究結果

[I]健康動物から分離されたサルモネラの薬剤感受性モニタリング

健康家畜の糞便からのサルモネラの分離率は、牛、豚、及び採卵鶏では2.5~3.8%で、ブロイラーでは20.1%であった。分離されたサルモネラの血清型は、Infantis(SI)が69株と最も多く、Typhimurium(ST 36株)、Agona (10株)の順で、SI69株中65株がブロイラー由来で、ST36株中19株が牛由来、17株が豚由来であった。耐性限界値は、BCMで128µg/ml、ABPC、CP、DSM、KM及びNAで32µg/ml、OTC、CL及びTMPで16µg/ml、OAで1µg/mlであった。フルオロキノロン (ERFX及びOFLX) 及びセフェム系薬剤 (CEZ、CXM及びCTF) に対する耐性株は認められなかった(表2)。耐性率は、DSM 77.6%と最も高く、OTC 67.8%、KM 35.5%、TMP 25.1%、ABPC 20.2%、CP 17.5

%、BCM 3.8%、NA 9.3%、OA 9.3%及びCL 0.5%の順であった。畜種別では、少なくとも1薬剤に対する耐性率は、採卵鶏由来株ではブロイラー、牛、豚由来株に比べて有意に低かった。地域ごとの耐性率には差は認められなかった。薬剤別(図1)では、DSM及びOTCに対する耐性率は、採卵鶏を除く畜種で高く、KM及びTMPに対する耐性率はブロイラーで、ABPCとCPに対する耐性率は牛及び豚で高かった。また、血清型別では、STの35株(97.2%)とSIの67株(97.1%)がいずれかの薬剤に耐性で、それぞれ26株と32株が4剤以上に耐性を示した。4剤以上に耐性を示したST35株の内、12株がDT104であった。NA及びOAに耐性を示した17株は、Infantis(7株)、Dublin (4株)、O群型別不能(r1.5、2株)、Haifa (2株)、Istanbul (2株)で、そのうちDublinとIstanbulでは、*gyrA*の87位でのAsp\_Tyr置換(GAC\_TAC)が認められ、*parC*での変異は認められなかった(表3)。

[II]健康家畜から分離されたカンピロバクターの薬剤感受性モニタリング

健康家畜糞便の14.2~49.5%からカンピロバクターが分離された。牛、採卵鶏およびブロイラーからは主に *C. jejuni* が、豚からは主に *C. coli* が分離された。分離株の菌種は、*C. jejuni* 647株 (牛由来165株、豚由来6株、採卵鶏由来236株およびブロイラー由来240株) および *C. coli* 426株 (肥育牛由来12株、肥育豚由来336株、レイヤー由来50株およびブロイラー由来28株) が大半を占め、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari* などでも分離された。

供試した薬剤のうち、DSM、スペクチノマイシン (SPC)、エリスロマイシン

(EM)、スピラマイシン(SPM)、タイロシン(TS)、CP、OTC、NA、OA、エンロフロキサシン(ERFX)およびオフロキサシン(OFLX)のMIC分布に二峰性が認められた。OTCに対する耐性率が最も高く、次にDSM耐性が高かった。MIC分布が一峰性であったゲンタマイシン(GM)は、全株のMICが4mg/l以下と低く、感受性であった。

*C jejuni* 及び *C coli* の耐性率を比較するといずれの薬剤についても *C coli* の耐性率が高かった。なかでもマクロライド系薬剤については、*C jejuni* の全株が感受性であったが、*C coli* では39-48%と高い耐性率を示した(図2)。フルオロキノロン耐性株は *C jejuni* の10.2~16.3%および *C coli* の24.2~24.8%に認められたが、由来や菌種により異なった。ブロイラーでは年度により異なり、5.7~40.5%であった。平成11年度から顕著な増加傾向は認められなかった。

### [Ⅲ]フルオロキノロン耐性カンピロバクターが分離された養鶏場における追跡調査

調査した2鶏群とも入雛直後は分離陰性で、A農家では3週齢以降、B農家では6週齢以降で80-100%の鶏糞便から *C jejuni* が分離された(表4)。環境材料はいずれも分離陰性、飲水からはA農家の6週齢時に *C jejuni* が分離された。薬剤感受性試験では、A農家分離株の30%がキノロン(NAおよびERFX)及びOTC耐性、B農家分離株の64%がOTC耐性であった(図3)。また、農場で給与されていた飼料に含まれる抗菌性飼料添加物(CL)に対しては、感受性に差は見られなかった。また、遺伝子型は、鶏群内には薬剤耐性パターンと一致したそれぞれ2つの *fla A* type が認められ、その主要 type は週齢と共に変化した。また、

A農家由来キノロン耐性株の耐性パターン及び *fla A* type は、平成13年度の調査で分離された耐性株と一致していた。

### D 考察

サルモネラとカンピロバクターは、食中毒の主要な原因菌で、家畜に広く分布している。両菌種のモニタリングで、動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されているテトラサイクリン、ストレプトマイシンに対する耐性が、高率に認められた。これらの成績は、耐性指標菌である大腸菌における成績と同様の成績であった。テトラサイクリン系抗菌剤及びアミノグリコシド系薬剤は、家畜で最も使用量の多い薬剤であるが、牛や豚の肺炎起因菌である *Mannheimia haemolytica* や *Actinobacillus pleuropneumoniae* では、10%前後の耐性率で有効性が認められている。畜産分野における経済性を考えた場合、安価で有効性の高い重要な薬剤といえるが、特にテトラサイクリン系薬剤の使用量は、他の薬剤に比べ際立っており使用状況については今後詳細に調査する必要がある。

牛と豚由来株ではST、ブロイラー由来株ではSIが、主要な血清型であった。これら血清型の大部分の株は、何れかの薬剤に耐性で、STの70%あるいはSIの45%が4剤以上に耐性であった。DT104以外の多剤耐性STも含まれていた。一方、これらの血清型はOTC及びDSM耐性を共通に、SIはTMP及びKMに耐性率が高く、STはABPC及びCPに耐性を示し、畜種ごとの薬剤耐性率に影響していた。肉牛及び養豚農家でのSTやブロイラー農家でのSIを対象とした衛生対策は、各畜種の主要なサルモネラの低減につながるとともに薬剤耐性サル

モネラの低減に役立つ可能性が示された。

サルモネラに関しては、キノロン剤に対して耐性を示した株は、フルオロキノロン感受性であった。一部の株について遺伝子配列を調べたところ、これまでにキノロン耐性株で報告されているような *gyrA* で 1 塩基変異が認められたのみで、*parC* 領域の変異は見られなかった。これまでに、我々が調べた限り国内の家畜で分離されたキノロン耐性サルモネラは、フルオロキノロン耐性を示した *S. Choleraesuis* 1 株のみが複数の変異を引き起こしていたが、残りのキノロン耐性株は、*gyrA* 領域での 1 塩基変異のみで見られるのみであった。今後、残りのキノロン耐性株の変異部位の確認を進めるとともに、キノロン剤の使用状況との関係を確認していく予定である。

また、カンピロバクターのフルオロキノロン耐性率は、ヘルギー、スペインなどと比較すると低い値ではあるものの、調査年度によっては高い耐性率を示した。フルオロキノロン剤は、1991 年に初めて国内で動物用医薬品として認可され、現在では製剤数も増えており、キノロン耐性についてのモニタリングは、公衆衛生上、重要な意義があると考えられる。

カンピロバクター腸炎の第一次選択薬であるエリスロマイシンに対し、*C. coli* は 50% 近くが耐性を示したが、*C. jejuni* は MIC 12.5 µg/ml 以下で全株感受性であった。*C. jejuni* は、*C. coli* に比べ、マクロライドの MIC 50 が低く、マクロライドに対する耐性率が低い。また、ブロイラーにおけるマクロライドの使用量は、豚に比べ極めて低く、マクロライド耐性が出現しにくいと考えている。今後は、マクロライドに対する感受性をモニ

タリングするとともに、*C. jejuni* が分布する牛とブロイラーでの使用量にも注意を払っていく必要がある。

最後に、モニタリング調査の中で、キノロン剤の投与歴がなく、フルオロキノロン耐性 *C. jejuni* が分離された養鶏場の追跡調査で、B 農家からはキノロン感受性株のみが分離されたが、A 農家からはキノロン耐性株が分離された。この耐性株はモニタリング調査の中で同農場から分離された株と耐性パターン及び遺伝子型が同じであったことから、単一クローンか 1 年半にわたり当該農家を汚染していたことが推測された。また両農場は、複数のカンピロバクターに汚染し、飼育期間中に優勢菌が変化したことから、その要因として、飼料添加物などの抗菌性物質による選択の可能性が考えられた。そこで、調査対象とした鶏群に使用されていた飼料添加物を含む抗菌性物質の感受性を調べたが、差は認められなかった。このことから、調査農場におけるキノロン耐性株の持続的汚染や鶏群を汚染している主要クローンが交替する要因は、使用歴のあった抗菌性物質による co-resistance による耐性株の選択ではないと考えられた。一方で、継続的な汚染が示唆されたことから、農場内およびその周辺で感染環が成立していると考えられたが、ネズミや野鳥の糞便などを含めた環境材料から分離を試みたが、カンピロバクターは分離されず、汚染源を特定することはできなかった。今後、キノロン耐性株の出現に関する調査を進め、耐性株の低減に向けた取り組みへと繋げていく予定である。

## E 結論

サルモネラとカンピロバクターのモニ



タリングで、動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されているテトラサイクリン、ストレプトマイシンに対する耐性が、高率に認められた。牛と豚由来株では ST、ブロイラー由来株では SI が、主要な血清型であった。両血清型の大部分の株は、何れかの薬剤に耐性で、ST の 70%あるいは SI の 45%が 4 剤以上に耐性であった。DT104 以外の多剤耐性 ST も含まれていた。キノロン剤に対して耐性を示した株は、フルオロキノロン感受性であった。一方、また、カンピロバクターでは エリスロマイシンに対し、*C. coli* は 50%近くが耐性を示したが、*C. jejuni* は全株感受性であった。フルオロキノロン耐性率は、調査年度によっては高い耐性率を示した。キノロン未使用のフルオロキノロン耐性株に汚染した農場の調査で、単一の耐性株が継続的に汚染している可能性が示された。キノロン耐性株が持続的に感染した原因は、不明であった。今後、これらの成績を、耐性株の低減に向けた取り組みへと繋げていく予定である

#### F 健康危害情報

本調査において、健康家畜由来サルモネラ及びカンピロバクターにおいて、薬剤耐性菌が存在している。カンピロバクターでは、薬剤の使用に関わらず、フルオロキノロン耐性株が出現する場合は認められた。

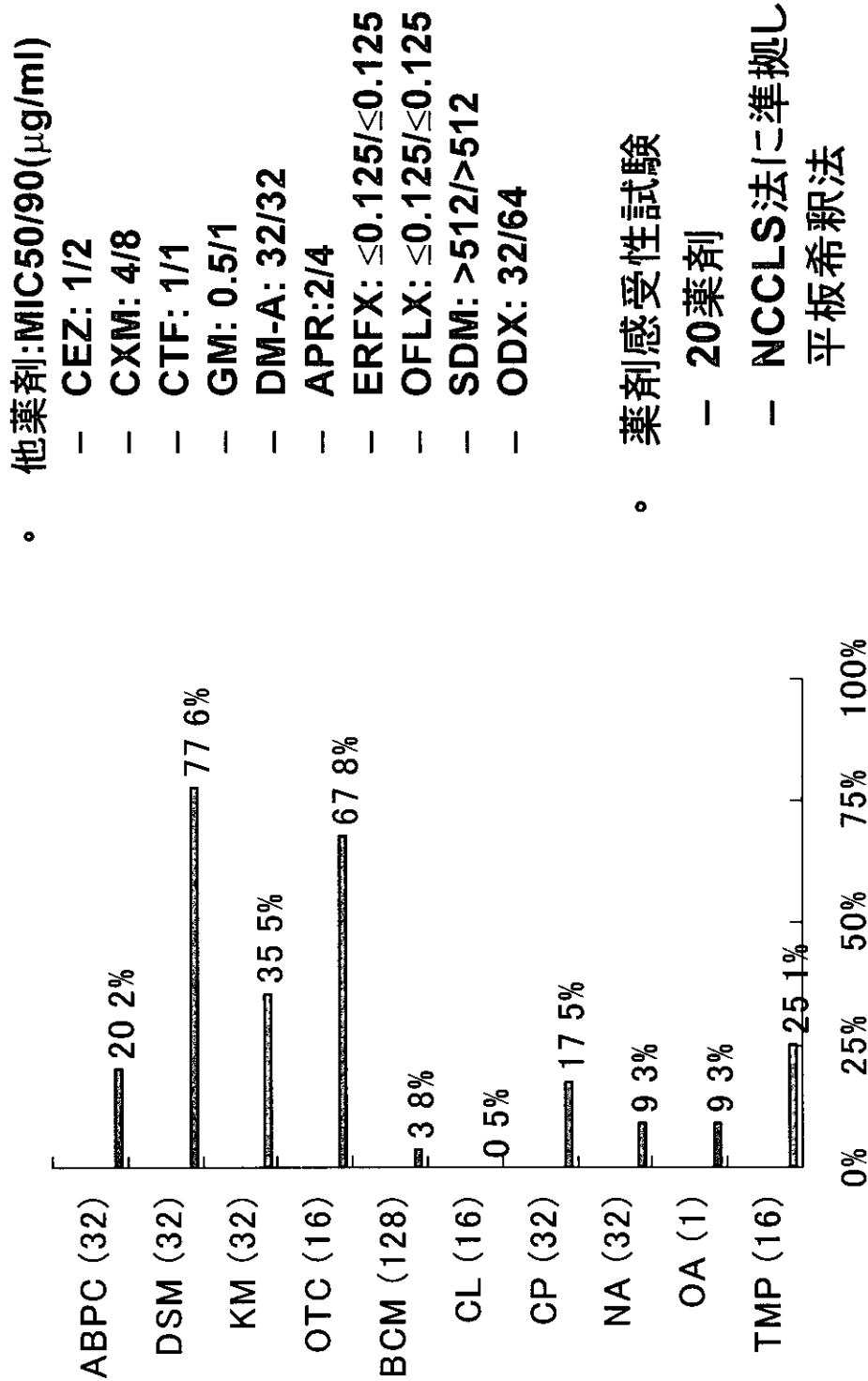
#### G 研究発表

- 1 Kijima M, et al Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51, 447-451, 2003
- 2 Sasaki Y, et al The Journal of Veterinary Medical Science 65, 129-131, 2003
- 3 Osumi T, et al The Journal of Veterinary Medical Science 65, 949-951, 2003
- 4 Esaki H, et al Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53, 266-270, 2004
- 5 Esaki H, et al Journal of Microbiological Methods (accepted for publication)

表1 供試薬剤リスト

<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>
Ampicillin(ABPC)	Dihydrostreptomycin(DSM)
Cefuroxime(CEX)	Gentamicin(GM)
Cefazolin(CEZ)	Spectinomycine(SPCM)
Ceftiofur(CTF)	Erythromycin(EM)
Dihydrostreptomycin(DSM)	Spiramycin(SPM)
Kanamycin(KM)	Tylosin(TS)
Gentamicin(GM)	Oxytetracycline(OTC)
Apramycin(APM)	Chloramphenicol(CP)
Bicozamycin(BCM)	Nalidixic acid(NA)
Colistin(CL)	Oxolic acid(OA)
Chloramphenicol(CP)	Enrofloxacin(ERFX)
Destomycin A(DMA)	Ofloxacin(OFLX)
Nalidixic acid(NA)	Olaquinox(ODX)
Oxolinic acid(OA)	
Enrofloxacin(ERFX)	
Ofloxacin(OFLX)	
Olaquinox(ODX)	
Oxytetracycline(OTC)	
Trimethoprim(TMP)	
Sulfadimetoxin(SDM)	

## 表2 サルモネラの薬剤別耐性率とMIC値の分布

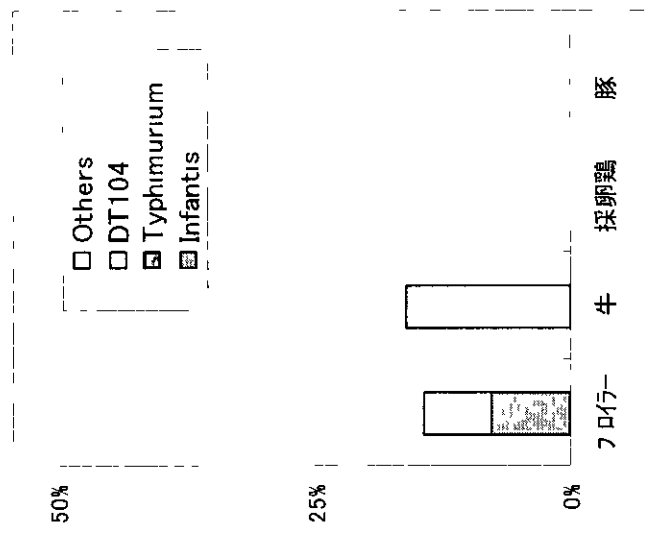


- 他薬剤: MIC50/90 (μg/ml)
  - CEZ: 1/2
  - CXM: 4/8
  - CTF: 1/1
  - GM: 0.5/1
  - DM-A: 32/32
  - APR: 2/4
  - ERFX: ≤0.125/≤0.125
  - OFLX: ≤0.125/≤0.125
  - SDM: >512/>512
  - ODX: 32/64

- 薬剤感受性試験
  - 20薬剤
  - NCCLS法に準拠した寒天平板希釈法
  - 耐性限界値 微生物学的ブレイクポイント

二峰性の分布が認められた薬剤 (BP μg/ml)

# 表3 キノロン耐性サルモネラの血清型と変異部位



由来	血清型	株数	gyrA			parC
			83 Ser	87 Asp	80 Ser	
健康	Dublin	4	---	T--	---	
家畜	Istanbul	2	---	T--	---	
	Haifa	NT(2)				
	Infantis	NT(7)				
	O型別不能 (r 1,5)	NT(2)				

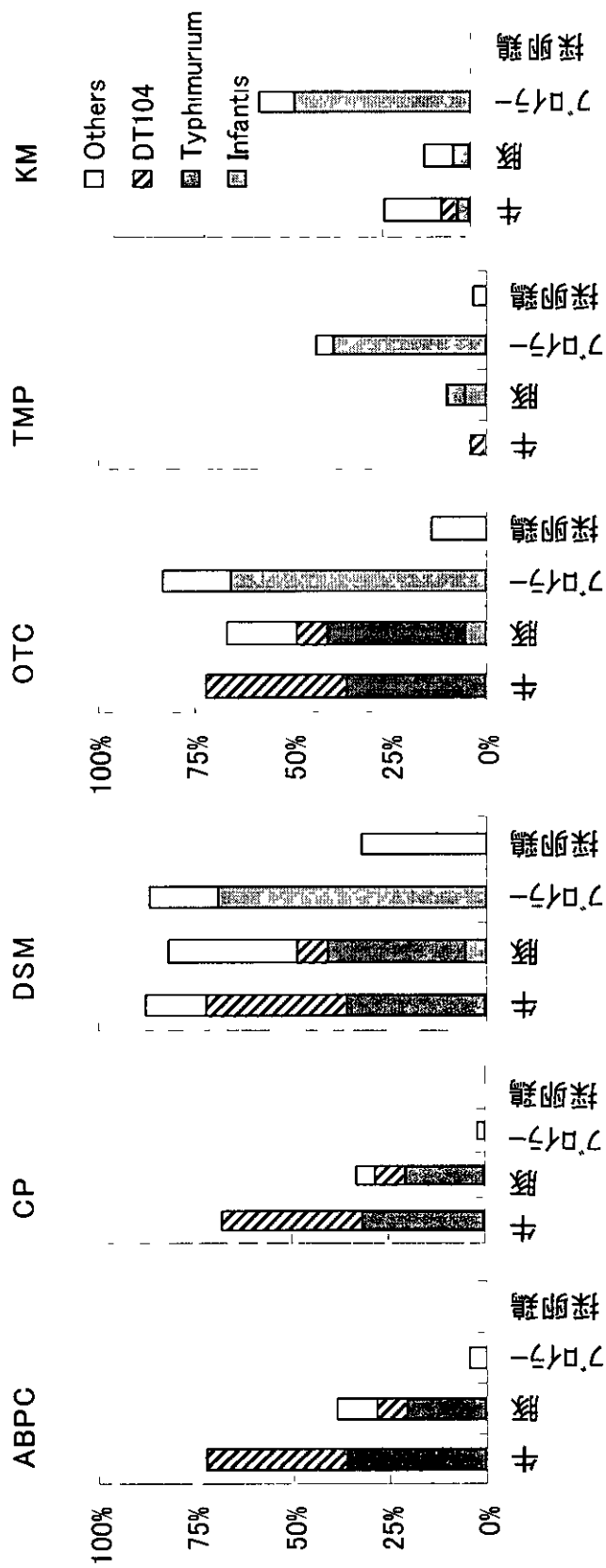
- 健康家畜の調査では、ブロイラー及び牛由来サルモネラでキノロン耐性が認められた。
- 17株中6株(Dublin4株、Istanbul2株)で、gyrAに1箇所(87Asp)の変異が確認された。

# 表4 各検体からの*C. jejuni*分離結果

農家	検体	鶏の週齢								
		0	(3day)	3	6	8	9	total		
A	鶏糞便	0/10	-	8/10	9/10	-	8/10	26/40		
	飲水	0/3	-	0/3	2/3	-	0/3	2/12		
	井水	0/2	-	0/2	0/2	-	0/2	0/8		
	敷き料	0/1	-	-	-	-	-	0/1		
	スズメクアカスワブ	-	-	-	0/2	-	-	0/2		
	ネズミ糞便	-	-	-	-	-	0/2	0/2		
B	鶏糞便	-	0/10	0/13	16/17	15/15	-	31/55		
	飲水	-	0/5	0/5	0/5	0/5	-	0/20		
	敷き料	-	0/1	-	-	-	-	0/1		
	野鳥糞便	-	-	0/1	0/5	0/6	-	0/12		
	ネズミ糞便	-	0/1	0/2	-	-	-	0/3		

<sup>a</sup> 分離検体数/供試検体数

図1 サルモネラの畜種別の耐性率と血清型



・ ファージ型別は、感染研で実施

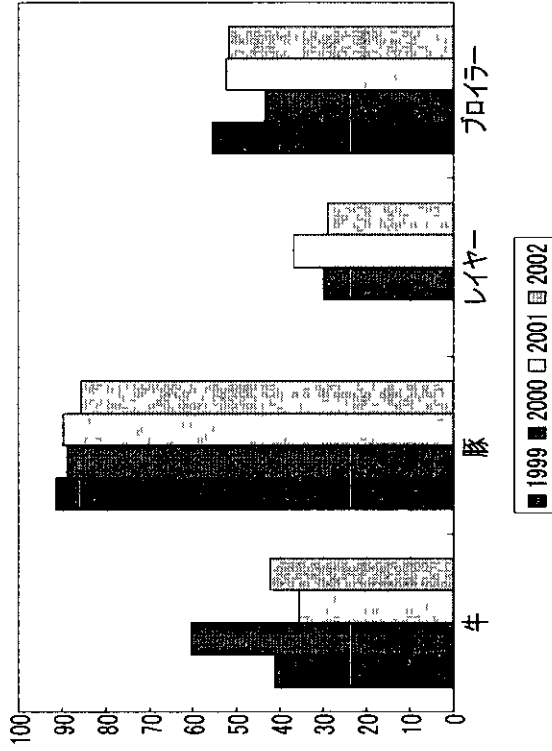
・ 耐性株の中心

— ブロイラー・Infantis

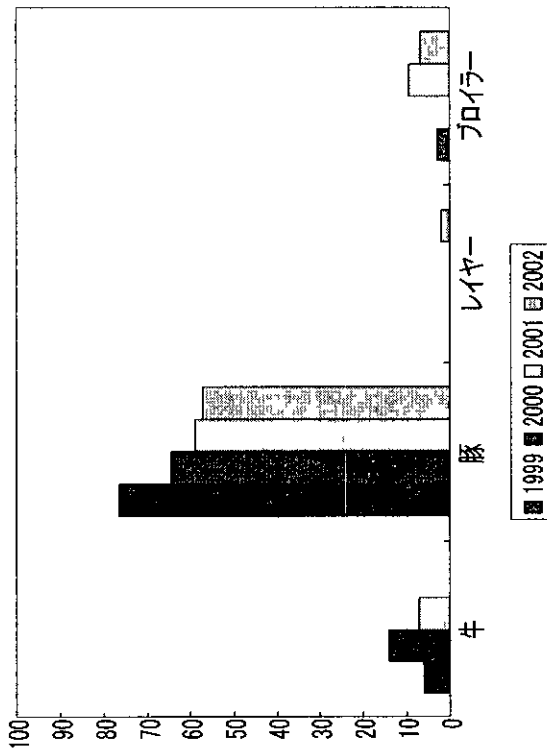
— 豚・牛 Typhimurium、但しDT104は半数

# 図2 カンピロバクターの薬剤耐性率

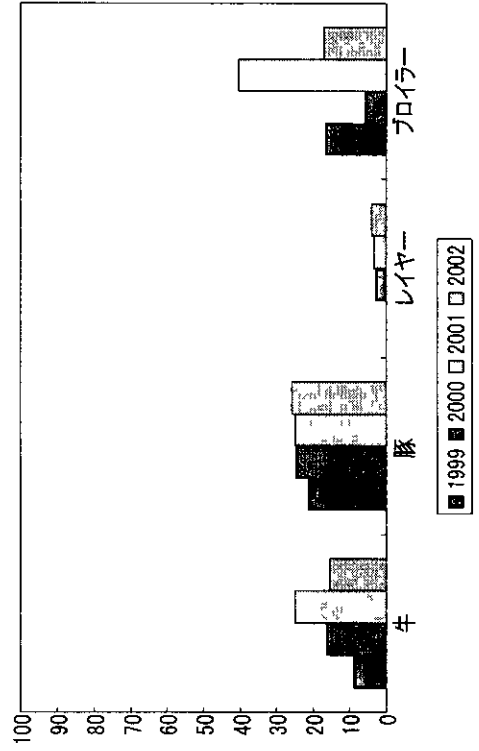
オキシテトラサイクリン



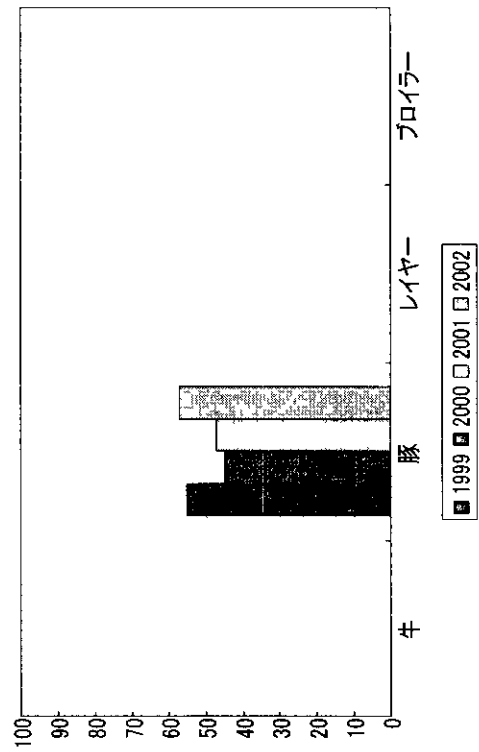
ジヒドロストレプトマイシン



フルオロキノロン



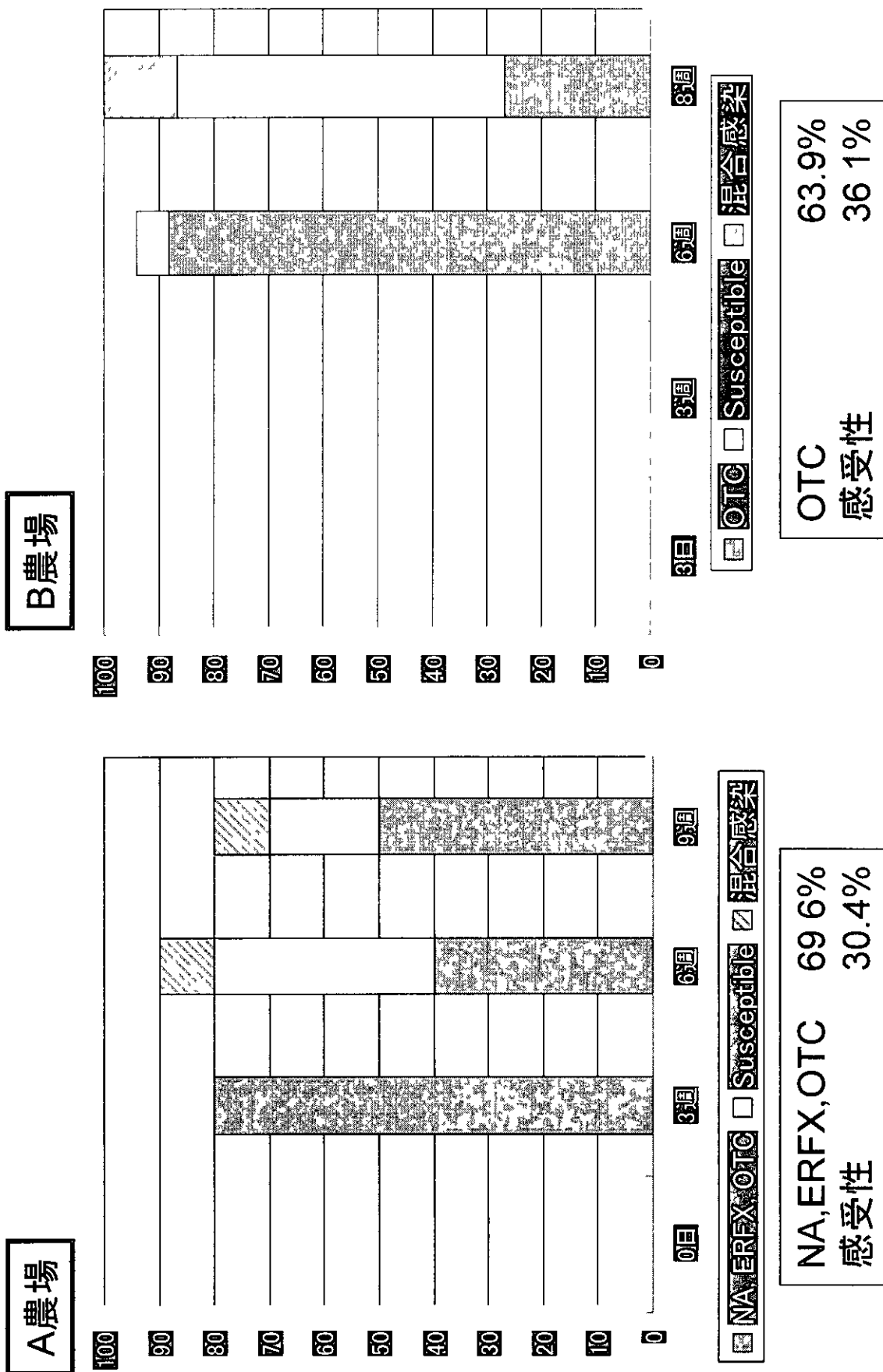
エリスロマイシン



\*牛、レイヤーおよびブロイラーはC jejuni、豚由来はC coliについて示した。

(%) 耐性率

# 図3 薬剤耐性パターンの変化



\*コリスチン、エンラマイシンおよびサリノマイシンの感受性に差はなかった。



平成15年度厚生労働省安全確保研究事業分担研究報告書

分担課題名 家畜由来 *Salmonella* Typhimurium の多剤耐性化の誘因及び耐性化機構の  
解明

分担研究者 氏名 中澤宗生、吉井紀代、鮫島俊哉  
所属 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研  
究所

研究要旨

本研究は多剤耐性化が問題視されている *Salmonella* Typhimurium (ST) の多剤耐性化機構の解明を目的としており、本年度は国内の家畜由来STを対象として近年ファーン型DT104において明らかになったインテグロン性の薬剤耐性因子の浸潤状況についてPCR法を用いて検討した。

A 研究目的

サルモネラは現在食中毒の主要原因菌の一つとして重要視されているか、なかでもネスミチフス菌 (ST, S Typhimurium) は牛のサルモネラ症の主要原因菌であるとともに、多くの抗菌剤に対して耐性を示すことが知られており、家畜衛生、公衆衛生の双方の観点から重要視されている。最近では生産段階における抗菌剤の濫用が多剤耐性化の誘因ではないかという指摘もあるか、その因果関係については今なお明らかにされていない。そこで本研究では家畜由来STを用いてその多剤耐性化の誘因及び耐性化の機構の解明を試みた。

本年度はサルモネラが多剤耐性化へのインテグロンを介した薬剤耐性因子の関与について検討を加えた。

B 研究方法

1) 供試菌株としては家畜及びその飼養環

境から分離されたST 124株および比較対照株として *S. Enteritidis* (SE) 100株、*S. Dublin* (SD) 37株、その他の58血清型61株を用い、必要に応じて現在国内で使用されている主要抗菌剤についての薬剤耐性傾向も同時に調べた。

2) まずST 124株について、近年欧米で問題化しているSTファーン型DT04が既に国内の牛に浸潤している現状を考慮して、Boltonらの報告に従ってPCR検出を実施した (Bolton L F et al J Clin Microbiol 37 1348-1351 (1999))。具体的にはインテグロン性の多剤耐性因子の保有状況をインテグラーゼ遺伝子検出用プライマー (*int* 増幅断片280bp) さらにACSSuT型のDT104に特徴的なフロルフェニコール耐性遺伝子検出用プライマー (*flo* 増幅断片215bp) を用いたPCR法により各遺伝子の検出を試みた。

3) 次にST同様古くから多剤耐性化の研究

か進められてきた*S. Enteritidis*(SE)、*S. Du-*  
*blin*(SD)、さらにその他の血清型につい  
ても同様の遺伝子検索を実施すること  
によりサルモネラ属菌のなかでのインテ  
クロン性耐性因子の分布状況についても検  
討を加えた。

### C 研究結果

インテクロンとは腸内細菌科や緑膿菌  
などで知られている多剤耐性獲得機構の  
一つで、DNA鎖切断と再結合に関与する  
酵素インテグラーゼの作用によりその構  
造内に様々な遺伝子断片を挿入蓄積す  
ることか可能である(Fig 1)。インテクロ  
ンには現在クラス1から4まで知られて  
おり、サルモネラではDT104が保有する  
クラス1インテグロンについて研究が進  
んでいる。本研究において用いたInt プ  
ライマーは各クラスに共通のインテグ  
ラーゼ遺伝子を標的遺伝子としている。

1)これまでサルモネラの多剤耐性機構は  
主にRプラスミドによると考えられてい  
た。しかし、近年広く浸潤しているDT1  
04は染色体上のインテクロンが多剤耐性  
に関与していることから、1973年から19  
99年にかけて分離された家畜由来STに  
ついてInt-PCRによるインテクロンの分  
布状況を調べた。その結果、Int+/Flo+の  
性状を示すDT104は1990年代以降国内で  
分離されているのに対して、Int+/Flo-の  
性状を示す菌株が1980年代初頭には存在  
していたことからDT104の浸潤以前に既  
にウシ由来STにインテグロンを介した  
薬剤耐性が存在することか明らかになっ

た(表1)。

2)Int+/Flo- ST 21株について薬剤耐性  
型を調べたところDT104(Int+/Flo+)  
に典型的なASTC型は見られず、しかもそ  
の多くがDT104と異なりミノサイクリン  
耐性を示した(表2)。これら21株は全  
てサルファ剤にも耐性を示したことから  
DT104と同様にクラス1インテグロンで  
ある可能性が高いか、その薬剤耐性の違  
いからDT104とは異なるインテクロン構  
造ではないかと推察された。

3)近年食中毒の主要原因菌となっている  
SEにおいてもST程ではないか、やはり多  
剤耐性化の傾向にあることか知られてい  
る。そこでSTと同様の手法を用いて1972  
年から1996にかけて分離された野外株10  
0株について薬剤耐性型とInt PCR結果と  
の相関を検討したところ、牛由来の多剤  
耐性株にInt+が多く見られた(表3)。  
分離年次から見るとSTより遡った1970  
年代にSEにおいて既にインテクロンを  
介した多剤耐性が存在していたと推察さ  
れた(表4)。さらにこれらの陽性株は  
DT104とMIC値で比較するとミノサイク  
リンに対して明らかに耐性を示しており、  
STの非DT104型のインテクロンと高い相  
関があることか示唆された(表5)。

4)もう一つの重要な薬剤耐性因子である  
プラスミド性の多剤耐性因子について研  
究が進んでいるSDについても同様の検  
索を実施した。1978~1998年に分離され  
たSD 37株についてInt PCRを実施した  
ところ、ウシ由来1株(1990)のみがInt+を  
示し、残りの36株は全て陰性であった。

このことから、どちらも牛のサルモネラ症の主要な起因菌でありながらその多剤耐性機構についてはSTとSDとは異なっているという興味深い知見が得られた。またその他の58血清型61株についても検討したか、わずかにInfantis, Virchowの2株(Int+/Flo-)のみが陽性を示し、インテグロン性の耐性はサルモネラに広く浸潤している状況にはないと考えられた。

#### D 考察

サルモネラの多剤耐性は既に1980年代から問題視されており、これまでにRプラスミトを介した多剤耐性の獲得、伝播に関する研究が数多く報告されてきた。それに加えて1990年前後から世界各国と時期を同じくしてSTファーン型DT104が国内に浸潤していることが明らかになってきたことにより、インテグロンによる多剤耐性の概念が新たに加わった。そこで本研究ではPCR法を用いてインテグラーゼ遺伝子の一部を検出することにより、家畜由来株におけるインテグロンの浸潤状況を調査した。その結果、国内のSTはDT104の侵入以前の1980年代に既にインテグロン構造を保有しており、インテグロンもまたサルモネラの多剤耐性を論じる上で重要な要因であると考えられた。

SEについても同様の検索を実施したところSTよりさらに遡った1970年代にインテグロンを介した多剤耐性株が分離されており、血清型間の伝播の可能性も示唆された。これらのインテグロンはいずれもサルファ剤に耐性を示すことからDT104同様クラス1インテグロンであると推察されたか、その反面ミノサイクリ

ンに足して耐性を示す菌株が多いことから薬剤耐性遺伝子の保有状況はDT104と異なっていると考えられた。

本研究の結果、サルモネラの多剤耐性化へのインテグロンの関与が明らかになってきたか、その伝播の機構については不明な点が多い。既にプラスミト上に座位するインテグロンの存在も知られていることからプラスミトを介した伝播の可能性も含めて次年度以降の課題としたい。さらに多剤耐性化の現状を正しく把握するために関係機関と協議の上、NCCLS法に準拠したMICを測定することにより、各抗菌剤に対する耐性度の評価及び耐性化の誘因についても検討を進める。

#### E 結論

国の内外において多剤耐性化が問題視されている*Salmonella* Typhimurium(ST)の多剤耐性化機構の解明を目的として、近年ファーン型DT104において明らかになったインテグロン性の薬剤耐性因子の浸潤状況についてPCR法を用いて検討した。その結果、これまでの知見以前にインテグロンを介した薬剤耐性機構が国内の家畜由来STに浸潤していることが明らかになった。また、ST以外の血清型では*S. Enteritidis*においてもSTと同様にミノサイクリン耐性を特徴とするインテグロン性の薬剤耐性因子が存在することが示唆された。

#### F 健康危機情報

なし

G 研究発表

話題 - *Salmonella* Typhimurium DT104  
について -

鮫島俊哉 サルモネラをめぐる最近の  
獣医畜産新報 第56巻 677 - 680  
2003年