

別表1の重要項目を、前述の10研究機関のネットワークを作り、分担して検討し、市販鶏肉を用いてそれぞれの分担部分のプロトコールの妥当性につき検討を加えた。

(2)図1に示した検査方法により、市販鶏肉30検体につき分離を試みたところ、17検体(57%)から合計20株のカンピロバクターが分離された。これら分離株20株につき、同定の生化学性状を確認したデータを、表1に示す。食中毒菌の耐性獲得状況の基礎データとしては、市販鶏肉から分離した分離株20株の7薬剤に対する耐性状況を、表2に示した。さらに、*C. jejuni*15株の多剤耐性に関する結果を表3にまとめた。

D. 考察

国内における食品からのカンピロバクター検査法は統一された方法がこれまでなかった。一方、実際の食品特に食中毒で問題となる鶏肉について、市販食品から分離を試みるとその手法により分離頻度は全く異なることが知られている。耐性に関する定量的リスクアセスメントには、食品がカンピロバクターにどの程度汚染されているか、そのうちどの割合が耐性菌であるかの定量的データが必要である。そのため、食品におけるカンピロバクターの実態を調べるには、食品からの分離方法を標準化し、定量的な調査をおこなうことは、必須である。我々は、標準的な食品からの分離方法を検討し、その方法を用いて食品からのカンピロバクター分離を行い、その分離株の耐性状況を明らかにすることにした。これを機に研究班に限らず、食品検査に広く用いることの可能な食品からの標準法を作成することを目標とした。そこで、

海外で標準法として用いられている英国のPHLS法、米国FDAのBAM法、そしてISO法について詳しく検討を行い、標準法原案を作成した。このプロトコールにつき、臨床や食品からのカンピロバクター分離の実績のある衛生研究所に意見を求め、実施にあたって特に重要となる点、実験的にデータを出して検討が必要と思われる点を明らかにした。さらに検討を要する重要ないくつかのポイントについては、国立医薬品食品衛生研究所に加え、9の衛生研究所のネットワークを作り、プロトコールの検討を行った。増菌培地および選択培地、培養時間等の骨格となる部分は昨年の検討により、ほぼ確定しており、カンピロバクターの特徴である微好気培養をどの様に行うかを中心に、スパイク実験と市販鶏肉から分離を試みる実験を行い、検討した。それぞれの結果を持ち寄り比較してみると、プロトコールを少し変更するだけで、市販鶏肉からの分離頻度は変化し、本菌の分離方法の統一が大変重要であることを再確認した。今後の定量的リスクアセスメントを考えると、食肉からの分離を定量的にかつ再現性良く行う必要がある。様々な観点でプロトコールに検討を加えたが、このようなちょっとした手法の違いで市販鶏肉からの分離率は変化してしまった。また、実施した機関同士の差も認められた。即ち、ある機関で実施したある操作は、同一の市販鶏肉からの分離率が基のやり方より良かったのに対し、他の機関で同様な比較を行うと、基の方法で分離率が高くでたりすることがある。酸素透過性の低い素材を使ったストッカー袋による増菌は、市販鶏肉での分離結果が良好であり、特殊な微好気培養装置を必要としないことから、大変有望な方法と思われた。

しかし、この方法も、スパイクした鶏肉による定量的な比較では、微好気培養にやや劣っていた。カンピロバクターの分離を左右しているのは、どうやら大変微妙なちょっとした検体の取り扱いの差から生まれているようである。

リスクアセスメントに必要な基礎データについては、カンピロバクターの市販鶏肉分離株につき、7薬剤を対象に耐性を調べた。対象とした7薬剤に全て感受性のものが6株(33%)であったのに対し、4薬剤耐性4株(27%)、5薬剤耐性3株(20%)と多剤耐性株が多いことが示された。これについては、来年度全国規模で菌株数を増やし、検討する予定である。

E. 結論

食品からのカンピロバクター分離の標準法の原案を作成し、その妥当性を検討するネットワークをつくり、食品からの分離プロトコルの検討をおこなった。市販鶏肉由来のカンピロバクターの耐性状況を予備的に調べたところ、4薬剤以上の多剤耐性株が、47%程度の *C. jejuni* 分離株で認められた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(英文発表)

1. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, and Igimi S. 2004. Nationwide survey of *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiol Infect* 132: (4)769-772.
2. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. 2004. Overview of *Listeria*

monocytogenes contamination in Japan. *Int J Food Microbiol* 93:131-140.

3. Tanaka Yasuhito, Takizawa Makiko, Igimi Shizunobu, and Amano Fumio. 2004. Enhanced release of prostaglandin D2 during re-incubation of RAW 264.7 macrophage-like cells after treatment of both lipopolysaccharide and non-steroidal anti-inflammatory. *Drugs Biol Pharm Bull* 27(7): 985-991.
4. Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. 2004. Identification and characterization of an oxidative stress-responsive protein from *Campylobacter jejuni*, homologous to rubredoxin oxidoreductase/rubredoxin. *FEMS Microbial Letters* 235(1):57-63.
5. Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, Tamaoki H, Shirahata T, Igimi S and Makino S-I. 2004. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *J Appl Microbiol* 96:1347-1353.
6. Asakura H, Panutdaporn N, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, and Makino S-I. 2004. Isolation of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg sensitive to NaCl-induced osmotic stress. *Microbiol Immunol.* 48:981-984.

(和文発表)

1. 五十君静信. 2004. 乳児用調製粉乳中の *Enterobacter sakazakii* など微生物に関

- する問題. 食品衛生研究 48(12):981-984.
2. 五十君静信、山本茂貴、春日文字. 2004. 腸管出血性大腸菌の食品汚染と対策. 化学療法領域. 20(9):1350-1354.
 3. 五十君静信. 2004. 海外における食品を紹介したリステリア症集団事例紹介. 食品衛生研究. 54(9):7-14.
 4. 五十君静信. 2004. どう防ぐ?食品を紹介したリステリア感染. 食の科学. No. 320:44-51.
- 静信、馬場栄一郎、水本直恵. SE 不活化ワクチン接種鶏由来の卵における抗 SE ベン毛抗体価の検討. 第 25 回日本食品微生物学会. 2004 年 9 月 28 日. 東京
6. 山崎学、天野富美夫、片山葉子、山本茂貴、五十君静信. 食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響. 日本微生物生態学会第 20 回大会. 2004 年 11 月 21 日. 仙台

(学会発表)

1. 山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* の 27kDa タンパク質の好気ストレスに対する応答性. 第 77 回日本細菌学会総会. 2004 年 4 月 2 日. 大阪
2. 朝倉宏、五十君静信、柳忠湖、鈴木荘介、春日文字、山本茂貴、熊谷進. *Providencia alcalifaciens* における LPS の病原性への関与. 第 138 回日本獣医学会学術集会. 2004 年 9 月 10 日. 北大
3. 石井啓行、江川智哉、豊田有樹子、大田博昭、五十君静信、水本直恵、馬場栄一郎. SE の FliC フラグメント 9kDa(Sep9) に対する抗 Sep9 抗体の運動阻害作用と増殖抑制作用. 第 138 回日本獣医学会学術集会. 2004 年 9 月 10 日. 北大
4. 山崎学、長谷部保彦、北村和之、矢内原千鶴子、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* 検出用抗体: 31 kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体の検討. 第 25 回日本食品微生物学会. 2004 年 9 月 29 日. 東京
5. 江川智哉、石井啓行、豊田有樹子、五十君

サンプル の調製	食品からのカンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の検査法試案	コメントおよび検討事項
<p>(1) サンプルの採取 25 g (25 mL) のサンプルを採取し、ストマックバッグに入れる。</p> <p>検討手法: サンプルを等量の増菌培地または緩衝液等で、洗浄しその洗い液を増菌および直接選択培地に接種する。</p> <p>(2) サンプルの調製 増菌培地 225 mL に入れてホモジネートする。 増菌培養は通常の場合、Preston 増菌培地を利用する。 また、菌損傷の可能性の高い場合は Bolton 培地を使用する。</p>	<p>(注1) 増菌培地使用量の削減のために以下の方法の採用について Sample 25 g を等量の buffer (生理食塩水 or PBS) または増菌培地 (抗生物質なし) にて洗浄した後、0.5 ml の洗い出し液を 10 ml の増菌培地に接種し、微好気条件下にて増菌培養。 欧米の主な公定法 (PHLS, FDA, ISO) ではこのような方法は設定されておらず、従って、これらの方法と実験的に比較したデータから有効性が確認されれば、この方法も採用する。 【期待される効果】 菌の濃縮になる。また、使用する培地、supplements 及び添加する血液量の削減。</p> <p>(注2) 使用する増菌培地について 現在、日本では増菌培地として Preston 培地が広く用いられている。一方、近年の欧米の公定法では、<i>Campylobacter</i> が環境中では損傷を受けやすいことから、損傷菌を含めた増菌のために Bolton 培地の導入が認められる。我が国において設定する公定法についても、欧米の主な公定法と釣り合いをとる必要があり、従って、Preston 培地と Bolton 培地を実験的に比較したデータが必要と考えられる。</p>	

	検査法試案(つづき)	コメント
増菌培養	<p>(Preston 培地) 微好気条件にて 42℃ で 24 - 48 時間培養する。</p> <p>(Bolton 培地) 微好気条件下にて 37℃ で 4 時間培養の後に、42℃ で 24 - 44 時間培養する。</p> <p>微好気条件については以下の方法が推奨されており、微好気条件が保持される事を市販の指示薬などで確認して利用すること。 微好気条件とは酸素 5%、二酸化炭素ガス 10%、チツ素 85%を基本とする。</p> <p>①培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータ ②市販の微好気ジャーシステム(ガスキットシステムなど)を利用する方法。 ③微好気ガスで容器の気相を置換し、ガスを透過しない容器で密閉する。 ④300 mL 容の通気性のない材質の容器(ないし袋)に空隙部分を少なくして増菌培養液を直接入れる。</p>	<p>(注3)Bolton 培地を用いた場合の培養温度のシフトアップについて 培養温度のシフトアップは操作が大変になると考えられる。一方、欧米の公定法ではシフトアップが設定されている。従って、培養温度をシフトアップする方法としない方法を実験的に比較したデータが必要と考えられる。</p> <p>(注4)微好気条件の設定方法について 記載した各々の設定方法を実験的に比較したデータが必要と考えられる。</p>

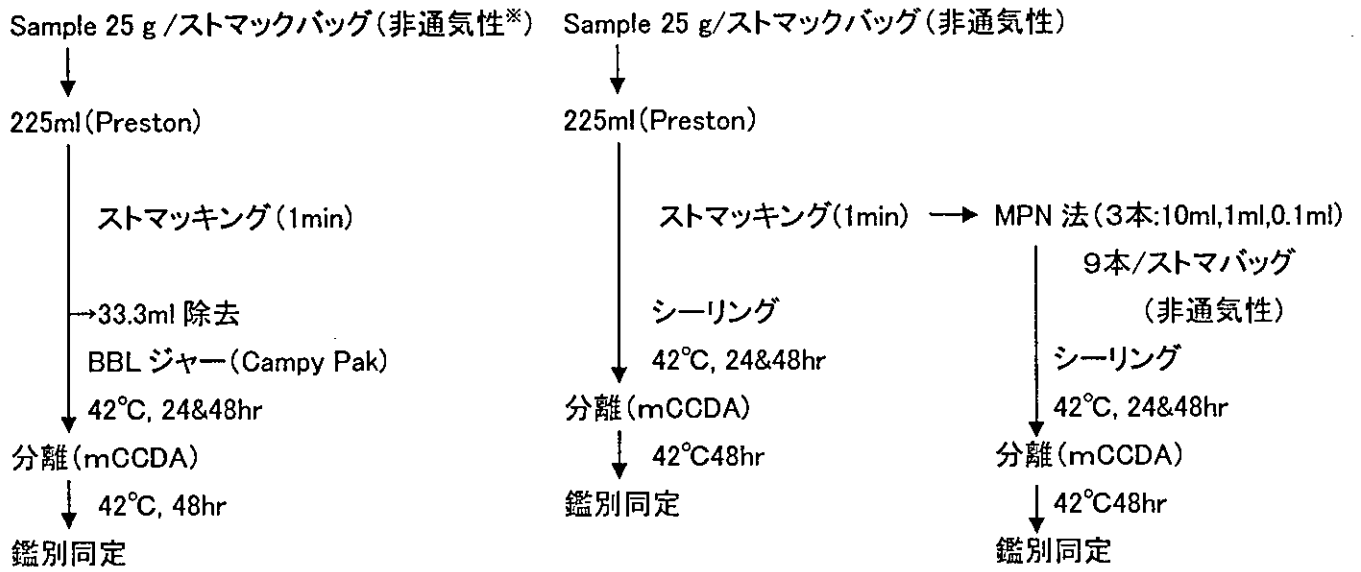
	検査法試案(つづき)	コメント
分離培養	<p>分離培地に増菌培養した液を画線塗抹して42°Cで24 - 48時間培養する。</p> <p>分離培地はmCCDA 培地を用いる。また、必要に応じて、下記の二次培地を追加する。</p> <p>Karmali 寒天培地、Modified Butzler培地、Skirrow培地、Preston寒天培地</p>	
コロニーの同定	<p>(1)コロニーの観察 疑わしい形状のコロニーを5コロニー程度採取。 直径1 - 2 mm程度の正円形でやや隆起したコロニー(時に扁平する)を対象とする。</p> <p>(2)コロニーの同定準備 コロンビア血液寒天培地および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

	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:ラセン状(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> <p>⑤馬尿酸塩加水分解試験(<i>C.jejuni</i> [+], <i>C.coli</i> [-])</p> <p>⑥インドキシニ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>	<p>(注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	甲斐明美、横山敬子	埼玉県衛生研究所	山口 正則、小野一晃
秋田県衛生科学研究所	斎藤 志保子	愛知県衛生研究所	平松 礼司
大阪府立公衆衛生研究所	田口 真澄	広島市衛生研究所	石村 勝之
山口県環境保健研究センター	富田 正章	熊本県保健環境科学研究所	八尋 俊輔
群馬県衛生環境研究所	藤田雅弘	国立医薬品食品衛生研究所	

図1. 市販生鶏肉からのカンピロバクターの検出



※BBL ジャーで微好気培養した分は通気性材のストマックバッグを用い、上部を開封状態で培養した。

表 1. 市販鶏肉から分離されたカンピロバクター菌株の性状結果

生化学的性状および PCR	菌株 No.(食品サンプル No.)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(1)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
25°C 微好気	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
42°C 微好気	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37°C 好気	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
カタラーゼ	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
オキシダーゼ	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
馬尿酸塩加水分解	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
酢酸インドキシル加水分解	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ラテックス凝集 (test kit)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ナリジクス酸感受性	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R
セフアロシン	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PCR																				
<i>C.jejuni</i> : 159bp	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>C.coli</i> : 500bp	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
同定菌株	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>coli</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>coli</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>

※菌株 No. 7...馬尿酸塩加水分解:初検(-), 冷凍保存株を用いた PCR の結果を確認後再検査(+)

No.15...酢酸インドキシル:初検(-), 冷凍保存株を用いた PCR の結果を確認後再検査(+)

表2. 鶏肉から分離されたカンピロバクターの薬剤耐性試験結果

Stock No.	菌種	薬剤 (BD Sensi-Disc)						
		EM	TC	NFLX	OFLX	CPFX	NA	CF
		15	30	10	5	5	30	30
1	<i>C.jejuni</i>	S	S	R	R	R	R	R
2	<i>C.jejuni</i>	LA	LA	LA	LA	LA	LA	R
3	<i>C.jejuni</i>	S	R	R	R	R	R	R
4	<i>C.jejuni</i>	LA	LA	LA	LA	LA	LA	R
5	<i>C.jejuni</i>	S	S	S	S	S	S	R
6	<i>C.jejuni</i>	S	S	R	R	R	R	R
7	<i>C.jejuni</i>	S	S	S	S	S	S	R
8	<i>C.jejuni</i>	S	R	S	S	S	S	R
11	<i>C.jejuni</i>	S	S	R	R	R	R	R
12	<i>C.jejuni</i>	S	S	R	R	R	R	R
13	<i>C.jejuni</i>	S	S	S	S	S	S	R
14	<i>C.jejuni</i>	S	R	R	R	R	R	R
16	<i>C.jejuni</i>	S	R	S	S	S	S	R
17	<i>C.jejuni</i>	S	S	S	S	S	S	R
18	<i>C.jejuni</i>	S	S	S	S	S	S	R
19	<i>C.jejuni</i>	S	S	S	S	S	S	R
20	<i>C.jejuni</i>	S	R	R	R	R	R	R
9	<i>C.coli</i>	S	S	R	R	R	R	R
10	<i>C.coli</i>	S	S	R	R	R	R	R
15	<i>C.coli</i>	S	R	R	R	R	R	R

LA: 平板培地 (MHA) 上に菌非生育→測定不可

表3. 鶏肉から分離された *C.jejuni* の薬剤耐性パターン

耐性パターン	株数(%)
TC	2(13.3%)
NA	0(0%)
EM	0(0%)
NA・TC	0(0%)
NA・TC・EM	0(0%)
NFLX・OFLX・CPFX	0(0%)
NFLX・OFLX・CPFX・NA	4(26.7%)
NFLX・OFLX・CPFX・NA・TC	3(20.0%)
NFLX・OFLX・CPFX・NA・TC・EM	0(0%)
感受性	6(33.4%)
計	15(100%)

平成 16 年度厚生労働省食品の安全性高度化推進研究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 高橋 敏雄 農林水産省動物医薬品検査所

協力研究者 浅井鉄夫、小島明美、石原加奈子、原田和記 農林水産省動物医薬品検査所

研究要旨

耐性菌問題に関する国際的提言としては、□耐性菌の源は多種多様であり、□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認識し、□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。耐性菌問題を巡る国内外のこのような現況等を背景に、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全国動向及びその出現要因等について疫学的に解析した成績を報告した。今年度は、人と動物間での耐性菌・耐性遺伝子の伝播を検討するため、動物由来株と市販肉由来株（サルモネラ）あるいは人患者由来株（カンピロバクター）との性状解析を行った。また、耐性菌出現と抗菌剤の使用状況との関連性を検討するため、薬剤耐性菌が分離された農場における抗菌剤の使用状況を試行的に調査した。

A. 研究目的

動物用抗菌剤は、動物の各種細菌感染症を治療するために使用され、安全で安価な畜産物の生産に寄与している。しかし、動物用抗菌剤をめぐる国際的な動きとして、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問題に対しては、科学的根拠に基づく適正なリスク管理の実施が不可欠であるとの共通認識が示されてきている。このような国際動向を背景に、我々は畜産分野での抗菌剤使用の医療・公衆衛生分野に及ぼす影響を調べる目的で、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）について、それらの抗菌剤感受性を全国レベルで調査している。

本研究の目的は、国際命題である「食用動物に対して抗菌性物質を使用することにより、どの程度耐性菌が選択され、家畜で新たに生じた耐性菌あるいは耐性遺伝子が食物連

鎖を介して人へ伝播され、拡散しているのか。更に、このことが人への細菌感染症の治療を困難にする潜在的危険性を評価し、それをどの程度予測できるのか」等に少しでも近づき、それらに貢献できる有用なデータを提供していくことにある。

B. 研究方法

薬剤感受性調査

【I】供試 *Salmonella Infantis* 株：

2000~2003 年度に市販食肉由来 100 株（鶏肉 98 株と豚肉 2 株）と健康家畜の糞便由来 69 株（ブロイラー 65 株、豚 2 株、採卵鶏 2 株）を用いた。食肉由来株は、岐阜県環境保健研究所より分与された。

【II】供試カンピロバクター株：

2000~2003 年度に人症例及び家畜から分離された *Campylobacter jejuni* 355 株（人 126 株、牛 60 株、採卵鶏 100 株、ブロイラー 69 株）及び *C. coli* 183 株（人 8 株、豚 121 株、採卵鶏 34 株、ブロイラー 20 株）を用いた。人の症例由来株は、群馬県伊勢崎市民病院より分与された。

【III】薬剤感受性試験法

サルモネラは、7 薬剤（表 1）、カンピロバクターは、6 薬剤（図 1）を供試した。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。

耐性限界値は、サルモネラでは NCCLS ガイドラインに従い、定義のない薬剤では、カンピロバクターと同様に、供試株の MIC 分布に基づき、感受性菌と耐性菌のピークの間値として設定した。

【IV】サルモネラの耐性遺伝子の検査

サルモネラの薬剤耐性遺伝子は、Gebreyes の報告に準拠して、PCR により調べた。キノロン耐性株は、Giraud の報告に準拠して、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、変異部位を調べた。

【V】*Campylobacter jejuni* の O 群血清型別

Penner らの方法による血清型別は、市販の抗血清（デンカ生研）を用いて、添付文書に従い実施した。

【VI】*Campylobacter jejuni* の *fla A* type の遺伝子型別

C. jejuni 由来株の *fla A* type は、PCR-RFLP により遺伝子型別を実施した。Chuma らの方法に準拠して実施し、UPGMA を用いて樹型図解析を行った。

C. 研究結果

【I】市販食肉及び家畜由来 *Salmonella* *Infantis* の薬剤感受性及び耐性遺伝子の比較

食肉由来株と家畜由来株の耐性率は、全体的に類似していた（表 1）。また、薬剤耐性パターンにおいても、DSM や OTC 耐性を中心に KM もしくは TMP 耐性を付加した耐性株が、農場由来と食肉由来で共通に認められた（表 2）。薬剤耐性株の保有する薬剤耐性遺伝子は、両由来とも同じ遺伝子であった（表 2）。

一方、相違点としては、TMP 耐性は動物由来で高く、また、ABPC 及び CEZ 耐性は動物由来株で認められなかった。さらに、キノロン耐性株の *gyrA* の変異は、食品由来株の方が多様で、主要な変異型は異なっていた（表 3）。

【II】人症例及び動物由来カンピロバクターの薬剤感受性、血清型及び遺伝学的特徴の比較

C. jejuni のアンピシリン耐性率は、レイヤー（33.0%）およびブロイラー（20.3%）由来株で高く、牛由来株では認められなかった。人由来株のアンピシリン耐性率は、5.6%と低率であった。一方、人由来 *C. coli* 株の耐性率は、豚由来株のものと類似していた（図 1）。

C. jejuni の血清型 B および D 群は、全ての由来（人、牛、ブロイラー及びレイヤー）株で共通に認められた。血清型 O 及び R 群は、人及び牛由来で認められた（図 2）。

人、牛及びブロイラー由来 *C. jejuni* 株は、*flaA*-type により大きく 5 つのクラスターに分類された。クラスター 1 は人及び牛由来株で、クラスター III～V は人、牛及びブロイラー由来株でそれぞれ構成されていた（図 3）。

【III】薬剤耐性菌が分離された農場における薬剤使用状況（2001～2003 年）

薬剤耐性 *S. Infantis* 株が分離されたブロイラー農場における抗菌性物質の使用状況を調査したところ、23 農場中 3 農場で抗菌剤の治療が行われていた。残りの 20 農場で抗菌性飼料添加物が使用されていたのは、9 農場であった。抗菌剤を使用した 3 農場のうち、分離株の薬剤耐性パターンに含まれる薬剤で治療された農場は、1 農場のみであった（表 4）。

一方、カンピロバクターでは、EM 耐性株が分離された 99 農場のうち、交差耐性と関連する薬剤（タイロシン等の同系統薬剤）を使用していた農場は 11.1% で、分離株の耐性

パターンに含まれる薬剤を使用していた農場は25.3%であった。ERFX耐性株が分離された140農場のうち、交差耐性と関連する薬剤（キノロン及びフルオロキノロン剤）を使用していた農場は2.8%で、分離株の耐性パターンに含まれる薬剤を使用していた農場は16.2%であった（図4）。

D. 考察

初年度に実施した両菌種のモニタリングにおいて、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。今年度は、人-食肉-家畜間での薬剤耐性菌・耐性遺伝子の伝播を検討することを目的に、サルモネラにおいては「市販食肉-家畜」、また、カンピロバクターにおいては「人-家畜」由来株を用いて、薬剤耐性に関連する疫学的・遺伝学的性状の解析を実施した。

S. Infantis は、ブロイラー農場で分離されるサルモネラの主要な血清型であり、かつ、国内産の鶏肉において最も優勢に分離される血清型でもある。また、家畜から分離される*S. Infantis*の大部分は、OTC・DSM耐性を保有する多剤耐性株で、家畜由来サルモネラの薬剤耐性率を引き上げている原因の一つとなっている。今回、両由来*S. Infantis*の性状を比較すると、薬剤耐性率や薬剤耐性パターンは、非常に類似した傾向が認められ、ブロイラー由来の薬剤耐性*S. Infantis*が、大部分の鶏肉の汚染に関与していることが示唆された。

しかし、鶏肉由来*S. Infantis*においてのみ、β-lactam剤（ABPC、CEZ）に対する耐性株が認められ、また、キノロン耐性株のDNAジャイレースの変異部位の比率が、両由来株で異なっていたことから、他の汚染源が存在する可能性が示唆され、汚染源を特定していく上での調査範囲を拡大する

必要性も考えられた。

国内においては、*S. Infantis*に起因する食中毒の発生は低率ではあるが、デンマークにおいては1993年に豚肉に起因する*S. Infantis*の食中毒の発生事例がある。今後、人由来株を加えて、PFGE型別などの解析を進めていく予定である。

人のカンピロバクター食中毒の事例では、*C. coli*によるものは極めて少なく、収集した人症例由来株においても*C. coli*は134株中8株（6.0%）であったが、薬剤耐性率は、豚由来*C. coli*と類似しており、両者の関連が示唆された。特に、両由来株で耐性を示したEMは、人のカンピロバクター腸炎の治療薬（第一次選択薬）であり、医療上の極めて重要な薬剤の一つである。*C. coli*のEM耐性機構やPFGE型を検討することで、両者の関連性を解析していくことができると考えられる。

*C. jejuni*に関しては、薬剤耐性パターン比較の他に、血清型別と鞭毛遺伝子（*flaA*）の型別を行った。調査薬剤にABPCを加えたことにより、人由来*C. jejuni*におけるABPC耐性の分布は、ブロイラーや採卵鶏由来株に比べ、牛由来株と同様に低率であることが判った。また、血清型と*flaA*型の解析によって、一部の人症例由来株が、牛由来株と近縁であることが示唆された。このことは、カンピロバクター食中毒の原因として、鶏肉が重要視されてきたが、牛（生レバー等）についても注意を要することが必要となることを示すものである。牛に分布する*C. jejuni*の性状解析は、*C. jejuni*による食中毒の疫学を解析する上で重要な情報となると考えられる。

一般に、食用動物における薬剤耐性菌の分布は、農場での抗菌剤使用と関連すると言われてきた。そこで、試行的に一部の薬剤を対象に使用状況と耐性出現との関連を検討した。サルモネラに関しては、ブロイ

ラーにおける多剤耐性 *S. Infantis* の分布は、農場レベルでの薬剤使用との関連性は乏しく、薬剤耐性率を低減する上では、抗菌剤の使用をコントロールだけでは困難なことが示された。また、カンピロバクターにおいても、薬剤耐性と関連する抗菌剤を使用していた農場は、全体の 20~40%程度であった。初年度に行った追跡調査においても、フルオロキノロン剤を使用していない農場でフルオロキノロン耐性株が 1 年以上にわたり継続的に分離された。供試例数が少なく、十分な解析は実施できなかったが、農場での抗菌性物質の使用制限のみでは耐性菌を完全にコントロールすることは難しい可能性が示唆された。今後、関連となるデータを蓄積して畜種別などの要因解析を進めていく予定である。

E. 結論

鶏肉から分離される *S. Infantis* は、その多くがブロイラーに由来することが示唆された。*C. jejuni* に関しては、鶏肉が食中毒の原因として注目されているが、一部の人症例由来株は、牛由来株と近縁であることが示された。また、*C. coli* に関しては、人症例由来の供試菌株数が 8 株と極めて少数であり、限定的なデータではあるが、人症例由来株での薬剤耐性率は、豚由来 *C. coli* と類似しており、両者の関連が示唆された。一方で、農場での抗菌剤の使用歴が全くないにも関わらず、薬剤耐性株が分布しているケース散見されたことは、今後、薬剤耐性菌のリスク管理オプションの適否を検討していく中でのひとつの大きな課題と考えられた。

F. 健康危害情報

由来の異なるサルモネラとカンピロバクターの各種性状を詳細に比較解析することにより、断片的ではあるが、人-食肉-家畜

との間の関連が明らかとなった。今後、food-chain における耐性株の低減に向けた取り組みへと繋げていく必要がある。

G. 研究発表

1. Esaki H., Morioka A., Ishihara K., Kojima A., Shiroki S., Tamura Y., Takahashi T.: 2004 Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 266-270.
2. Esaki, H., Noda, K., Otsuki, N., Kojima, A., Asai, T., Tamura, Y. and Takahashi, T. 2004 Rapid detection of quinolone-resistant *Salmonella* by real time SNP genotyping. *Journal of Microbiological Methods* 58, 131-134.
3. Esaki, H., Morioka, A., Kojima, A., Ishihara, K., Asai, T., Tamura, Y., Izumiya, H., Terajima, J. Watanabe, H. and Takahashi, T. 2004 Epidemiological characterization of *Salmonella* Typhimurium DT104 prevalent among food-producing animals in the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program (1999-2001). *Microbiology and Immunology* 48, 553-556.
4. Ishihara, K., Kira, T., Ogikubo, K., Morioka, A., Kojima, A., Kijima-Tanaka, M., Takahashi, T. and Tamura, Y. 2004 Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999-2001): results from the Japanese Veterinary Antimicrobial

resistance Monitoring Program.
International Journal of Antimicrobial
Agents 24, 261-267.

5. Esaki, H., Chiu, CH., Kojima, A.,
Ishihara, K., Asai, T., Tamura, Y., and
Takahashi, T. 2004 Comparison of
fluoroquinolone resistance genes of
Salmonella enterica serovar
Choleraesuis isolates in Japan and
Taiwan. Japanese Journal of
Infectious Disease. 57, 287-288.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 食肉 (n=100)と家畜 (n=69)由来Salmonella Infantis株
の薬剤感受性 (2000-2003)

抗菌剤*	耐性 限界値**		耐性株数(%)		MIC ₅₀ **		MIC ₉₀ **	
	食肉	家畜	食肉	家畜	食肉	家畜	食肉	家畜
Ampicillin (ABPC)	16	3 (3)/ 0 (0)	1/1	2/1	1/1	2/1	2/1	2/1
Cefazolin (CEZ)	32	2 (2)/0 (0)	2/1	2/1	2/1	2/1	2/1	2/1
Dihydrostreptomycin(DSM)	32	92 (92)/ 68 (97)	64/128	64/128	64/128	64/128	64/128	64/128
Kanamycin (KM)	16	59 (59)/ 49 (70)	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512	>512/>512
Nalidixic acid (NA)	64	13 (13) /7 (10)	4/4	4/4	4/4	4/4	256/128	256/128
Oxytetracycline (OTC)	16	92 (92)/65 (93)	256/128	256/128	256/128	256/128	256/128	256/128
Trimethoprim (TMP)	16	37 (37)/ 37 (53)	0.5/256	0.5/256	0.5/256	0.5/256	>512/>512	>512/>512

* GM、ERFXに対する耐性株は、認められなかった。

** µg/ml

表2 市販食肉と家畜由来S. Infantis株の薬剤耐性パターンと耐性遺伝子

耐性パターン(耐性遺伝子)	食肉由来株		動物由来株 (ブロイラー/豚/レイヤ)
	(鶏肉/豚肉)		
DSM(aadA)-OTC(tetA)-KM(aphA1)-TMP-NA	2	2	2
DSM(aadA)-OTC(tetA)-KM(aphA1)- ABPC-CEZ	1	0	0
DSM(aadA)-OTC(tetA)- NA-ABPC-CEZ	1	0	0
DSM(aadA)-OTC(tetA)-KM(aphA1)- TMP	21	29	
DSM(aadA)-OTC(tetA)-KM(aphA1)- NA	6	1	
DSM(aadA)-OTC(tetA)-KM(aphA1)- ABPC(blaTEM)	1	0	
DSM(aadA)-OTC(tetA)-KM(aphA1)	24	10	
DSM(aadA)-OTC(tetA)-TMP	12	6(4/2/0)	
DSM(aadA)-OTC(tetA)-NA	4	4	
DSM(aadA)-KM(aphA1)- TMP	2(1/1)	1	
DSM(aadA)-OTC(tetA)	20(19/1)	10	
DSM(aadA)-KM(aphA1)	1	0	
DSM(aadA)	3	2	
KM(aphA1)	1	2	
susceptive	1	2(0/0/2)	

表3 キノロン耐性*S. Infantis*株の *gyrA*の変異と耐性パターン

変異部位	鶏肉由来 (n=13)	ブロイラー由来 (n=7)
Ser83 to Phe (TCC)	DSM-OTC-KM-TMP (1)	DSM-OTC(1)
Tyr (TAC)	DSM-OTC(1)	-
Asp87 to (GAC)	DSM-OTC(1) DSM-OTC-KM-TMP (1)	DSM-OTC-KM-TMP (2)
Asn (AAC)	DSM-OTC(1)	DSM-OTC(4)
Tyr (TAC)	DSM-OTC(1) DSM-OTC-KM (6) DSM-OTC-KM-TMP (2) ABPC-CEZ-DSM-OTC (1)	-

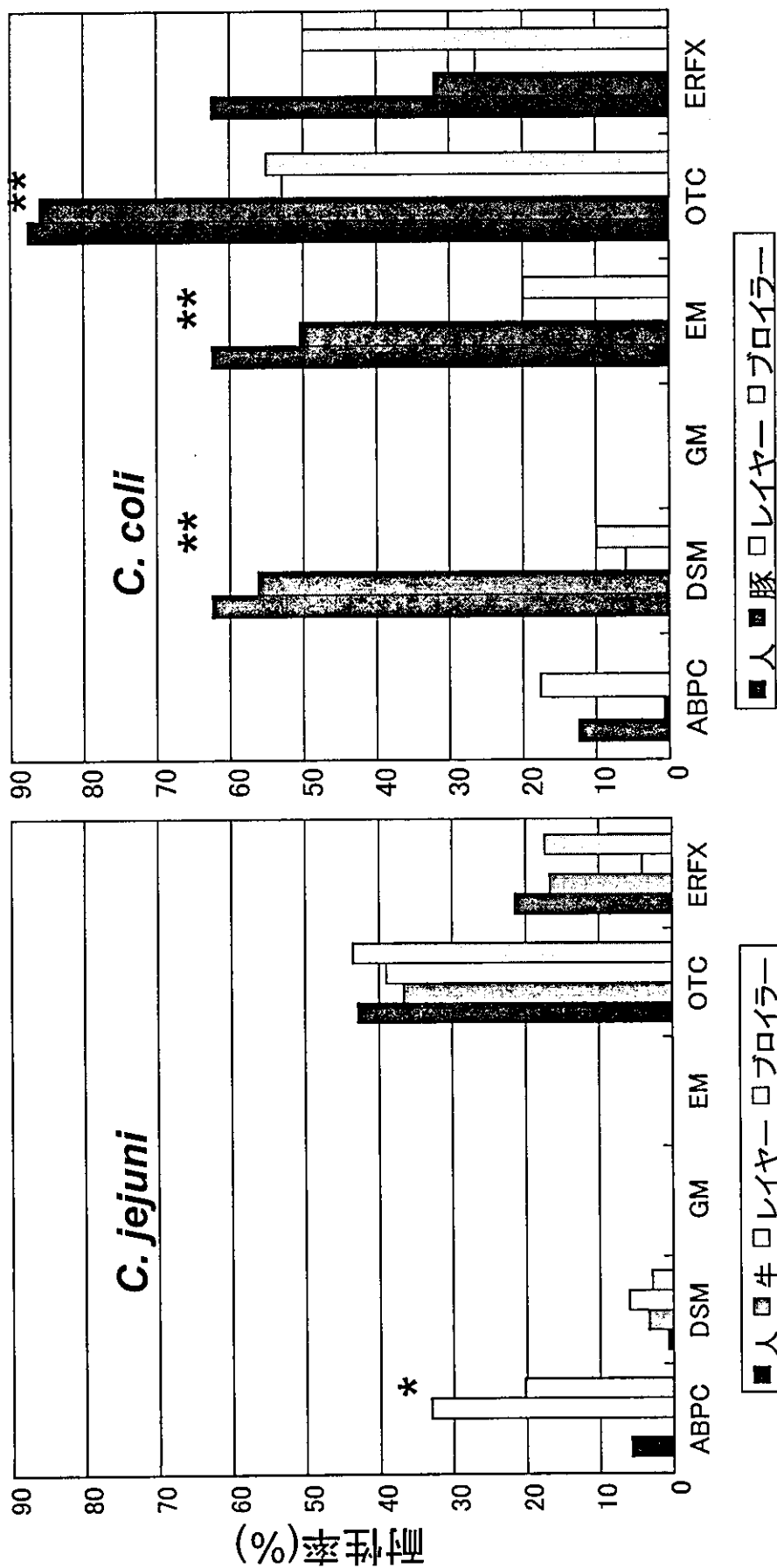


図1 2001-2003年における *Campylobacter* の薬剤耐性率

C. jejuni 355株(人126株、牛60株、採卵鶏100株、ブロイラー69株)

C. coli 183株(人8株、豚121株、採卵鶏34株、ブロイラー20株)

*: 人由来および鶏由来に大きな差が認められた。

** : 人由来および豚由来で同様の傾向が認められた。