

表 9 食肉および食肉製品から分離されたサルモネラの血清型と耐性パターン(2006)

耐性パターン	血清型				
	Typhimurium	Braenderup	Infantis	Kentucky	Enteritidis
感受性	2				
SM	1				
NA					2
SM,TC				1	
ABPC,NA		1			1
SM,TC,KM			1		
SM,TC,SXT	1				
SM,TC,KM,SXT			2		
CP,SM,TC,ABPC,NA	1				

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究」  
平成18年度 分担研究報告書

課題名 ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

分担研究者 東京都健康安全研究センター・微生物部  
甲斐 明美

協力研究者 東京都健康安全研究センター・微生物部  
横山 敬子, 小西 典子, 山田 澄夫

研究要旨：

食中毒起因菌について耐性化の動向を把握することは、治療を行う際の資料となるだけでなく、耐性菌出現のメカニズムを解明するためにも重要である。そこで下痢症患者、あるいは食品から分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 およびカンピロバクター(*Campylobacter*)を対象に、薬剤耐性菌の出現状況について調べた。

2000年～2006年に分離されたヒト由来 EHEC O157 株について薬剤感受性試験を行なった結果、耐性率は毎年15%で推移していることが明らかとなった。また食品分離株もヒト由来株とほぼ同様の耐性率であった。

散発下痢症由来 *C.jejuni* のニューキノロン耐性率は30%前後で推移していた。治療の第一選択薬であるEMに対する耐性率は毎年1～2%程度で推移しており、大きな変動はなかった。*C.coli* の耐性率は *C.jejuni* よりも高かった。特にEMでは近年耐性率が上昇しており、今後の動向に注意が必要である。

A. 研究目的

最近、食中毒原因菌の薬剤耐性化、特にニューキノロン剤を含む多剤耐性化が世界的に問題になっている。食中毒起因菌について耐性化の動向を把握することは、治療を行う際の資料となるだけでなく、耐性菌出現のメカニズムを解明するためにも重要である。

そこで今回、下痢症患者、あるいは

食品から分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 およびカンピロバクターを対象に、薬剤耐性菌の出現状況について調べた。

B. 研究方法

1. 供試菌株

1) ヒト由来腸管出血性大腸菌

2000年～2006年に当研究センターに搬入されたヒト由来腸管出血性大

腸菌 O157 菌株および当センターで分離した菌株, 合計 1,675 株を供試した。

## 2) 食品由来腸管出血性大腸菌

2000 年～2006 年に食中毒原因調査のために搬入された食品から分離した腸管出血性大腸菌 O157 菌株および同定依頼のために当センターに搬入された 39 株を供試した。

## 3) ヒト由来カンピロバクター

2000 年～2006 年に東京都内で分離された散発下痢症患者由来の *C.jejuni* 1,320 株および *C.coli* 60 株を供試した。

## 2. 薬剤感受性試験

EHEC O157 にはアンピシリン (ABPC), セフォタキシム (CTX), ゲンタマイシン (GM), カナマイシン (KM), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), ST 合剤 (SXT), ナリジクス酸 (NA), シプロフロキサシン (CPFX), オフロキサシン (OFLX), ホスホマイシン (FOM), ノルフロキサシン (NFLX), スルフイソキサゾール (Su) の 14 薬剤を供試した。ただし 2000 年から 2004 年までは OFLX の代わりにトリメトプリム (TMP) を使い, Su は 2004 年から追加した。

カンピロバクターには NA, NFLX, OFLX, CPFX, エリスロマイシン (EM) および TC の 6 薬剤を供試した。

感受性試験は米国臨床検査標準化協会 (CLSI) に従い, センシディスク (BBL) を用いた KB 法によって行った。

## C. 研究結果

### 1. EHEC O157 の薬剤耐性

2000 年～2006 年にヒトから分離された EHEC O157 1,675 株について薬剤感受性試験を行った成績を図 1 に示した。年次別耐性菌出現率は 18.4% (2000 年), 10.7% (2001 年), 15.9% (2002 年), 14.3% (2004 年), 13.1% (2005 年), 18.1% (2006 年) であり, 毎年 15% 前後で推移していた。薬剤別耐性率では, TC が 10.7%, SM 9.2%, Su 4.9%, ABPC 4.4%, CP 0.8%, ST および TMP 0.7%, KM 0.3%, NA 0.1% であった。耐性率が高かった TC, SM, ABPC, Su について, 耐性率の年次変化を調べた結果, いずれも耐性率に大きな変化はなかった (図 2)。

耐性パターン別にみると, TC 単剤耐性が最も多く 45 株, 次いで SM・TC が 41 株, SM・TC・Su が 26 株と多く認められた。分離数は多くないが, ABPC・SM・TC・ST・TMP の 5 剤耐性株 (3 株) や, ABPC・SM・TC・ST・TMP・Su の 6 剤耐性株 (1 株) も認められた (図 3)。

2005 年には NA 耐性株が 2 株分離されたが, それぞれ 5 月と 7 月に分離されており, 毒素型も異なっていたことから関連性は認められなかった。また, これらの 2 株はいずれもニューキノロン系薬剤に対して感受性であった。

一方食品由来株 39 株の耐性率は 15.4% であった。また, 薬剤別耐性率も TC および SM が 10.3%, ABPC および SM が 5.1%, TMP および ST が

2.6%とヒト由来株とほぼ同様の耐性率であった（表1，表2）。

## 2. カンピロバクターの薬剤耐性

2000年～2006年に東京都内で分離された散発下痢症患者由来の *C.jejuni* 1,320株および *C.coli* 60株について薬剤感受性試験を行った。NAやCPFXをはじめとしたニューキノロン剤耐性の *C.jejuni* は26%（2000年），38.2%（2001年），28.4%（2002年），26.8%（2003年），38.6%（2004年），27.4%（2005年），35.2%（2006年）と毎年30%前後で推移していた。

一方，*C.coli*の耐性率は年によって異なっており，2001では分離菌株の100%，2003年は90%，2006年では75%が耐性であったが，その他の年は40%前後の耐性率であった（図4）。

TC耐性率をみると，*C.jejuni*では23.4%～42.9%で推移しており，特に耐性化の傾向は認められなかった。*C.coli*では供試菌株数は少ないが，耐性率15.4%（2000年），100%（2001年），25%（2003年）であったが，それ以降は57～70%で推移している（図5）。

一方，治療の第一選択薬であるEMに対する耐性率をみると，*C.jejuni*では毎年1～2%程度で推移しており，大きな変動はなかった。しかし，*C.coli*では20%（2003年），11.1%（2004年），14.3%（2005年），41.7%（2006年）と，近年増加傾向が認められた（図6）。

## D. 考察

ヒト由来 EHEC O157株について薬剤感受性試験を行った結果，耐性菌出現率は毎年15%前後であったが，やや耐性菌の増加傾向が認められた。また，分離数は少ないものの，5薬剤あるいは6薬剤に耐性を示した多剤耐性株も出現しているため，その動向には注意が必要である。

サルモネラやカンピロバクターではニューキノロン系薬剤に対する耐性化が大きな問題となっている。O157ではNA耐性株が2005年に2株分離されたがニューキノロン系薬剤に対しては感受性であった。これら菌株の関連性を調べた結果，分離時期や毒素型が異なっていたことから，関連性は認められなかった。

食品から分離されるO157は毎年数株で7年間では39株であった。食品由来O157の耐性率は15.4%であった。耐性を示した薬剤はSMおよびTCが10.3%，ABPCおよびサルファ剤が5.1%とヒト由来株とほぼ同様の傾向であった。

下痢症患者由来 *C.jejuni*のニューキノロン剤耐性率は毎年30%前後で推移しており，2001年の38.2%が最も高かった。TC耐性は20～40%の耐性率での増加は認められなかった。治療の第一選択薬であるEMでは耐性菌はほとんど出現しておらず，大きな変動はなかった。

*C.coli*は *C.jejuni*に比べて分離数が少ないため，年によって耐性率に差が認められた。しかしいずれの薬剤で

も *C.jejuni* より耐性率が高い傾向であった。特に EM では近年耐性率が増加しており 2006 年では分離株の 41.7% が耐性を示したことから、今後は更に菌株を増やして検討していく必要がある。

#### E. 結論

2000 年～2006 年に分離されたヒト由来 EHEC O157 株について薬剤感受性試験を行なった結果、耐性率は毎年 15% で推移していることが明らかとなった。また食品分離株もヒト由来株とほぼ同様の耐性率であることが明らかとなった。

*C.jejuni* のニューキノロン耐性率は 30% 前後で推移していた。治療の第一選択薬である EM に対する耐性率は毎年 1～2% 程度で推移しており、大きな変動はなかった。

*C.coli* の耐性率は *C.jejuni* よりも高かった。特に EM では近年耐性率が上昇しており、今後の動向に注意が必要である。

#### F. 健康危機情報

EHEC O157 の薬剤耐性菌出現率を調べた結果、ヒト由来株、食品由来株共に耐性率は 15% 程度であった。ニューキノロン剤耐性菌もほとんど分離されなかった。

カンピロバクターのニューキノロン剤耐性菌出現率は毎年 30% 前後であった。今後、食品の汚染実態調査も含め、耐性菌出現状況を的確に把握し、耐性菌出現の要因についても精査す

る必要がある。

#### G. 研究発表

〈学会発表〉

A.Kai, N.Konishi, H.Obata, Y.Shimajima, C.Monma, A.Nakama, S.Yamada, Epidemiological and Bacteriological aspects of EHEC infection in Tokyo, 6<sup>th</sup> International Symposium on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections, Melbourne 2006

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

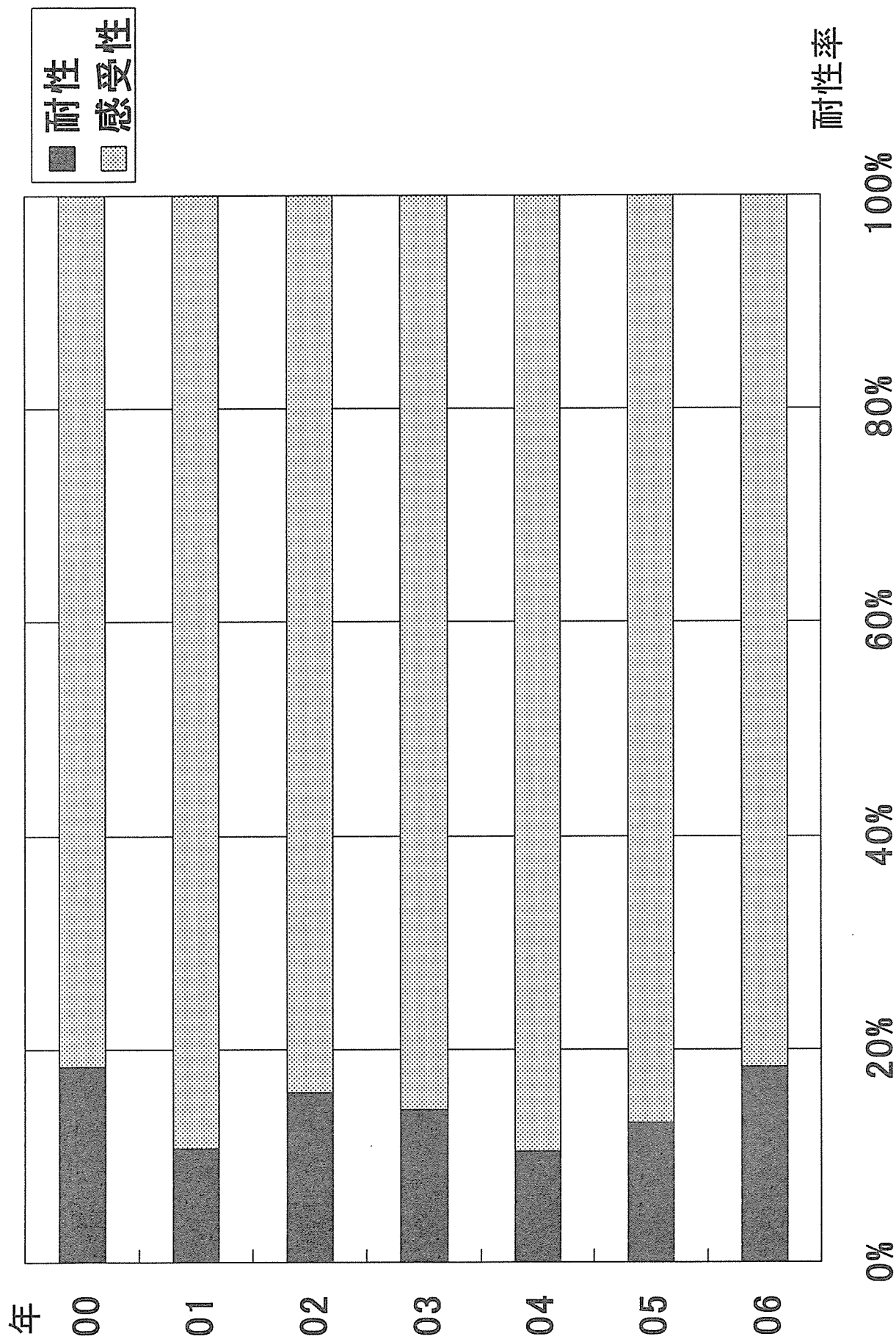


図1 ヒト由来腸管出血性大腸菌O157の年次別耐性菌出現率

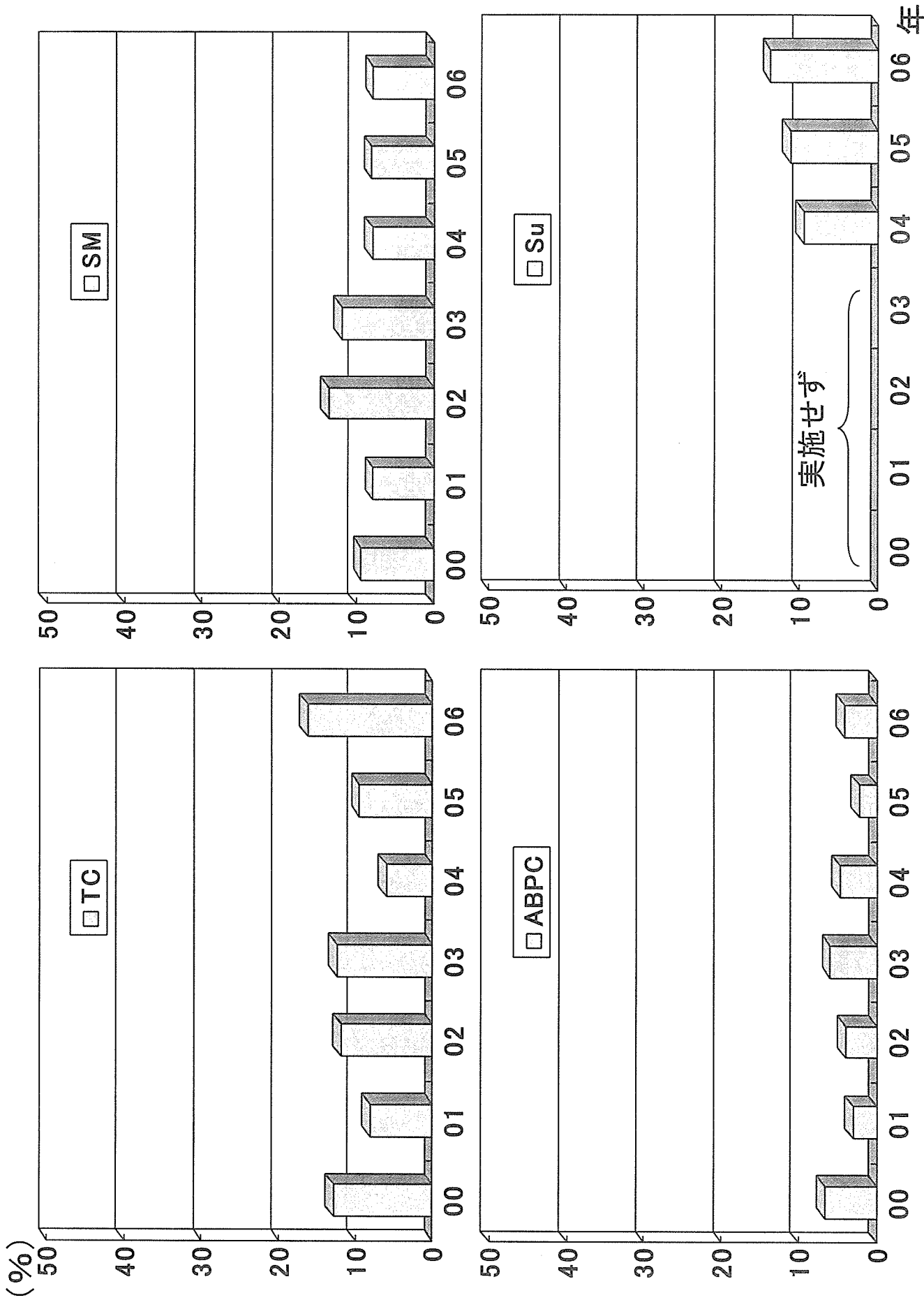


図2 ヒト由来腸管出血性大腸菌 O157の薬剤別耐性率(2000年～2006年)

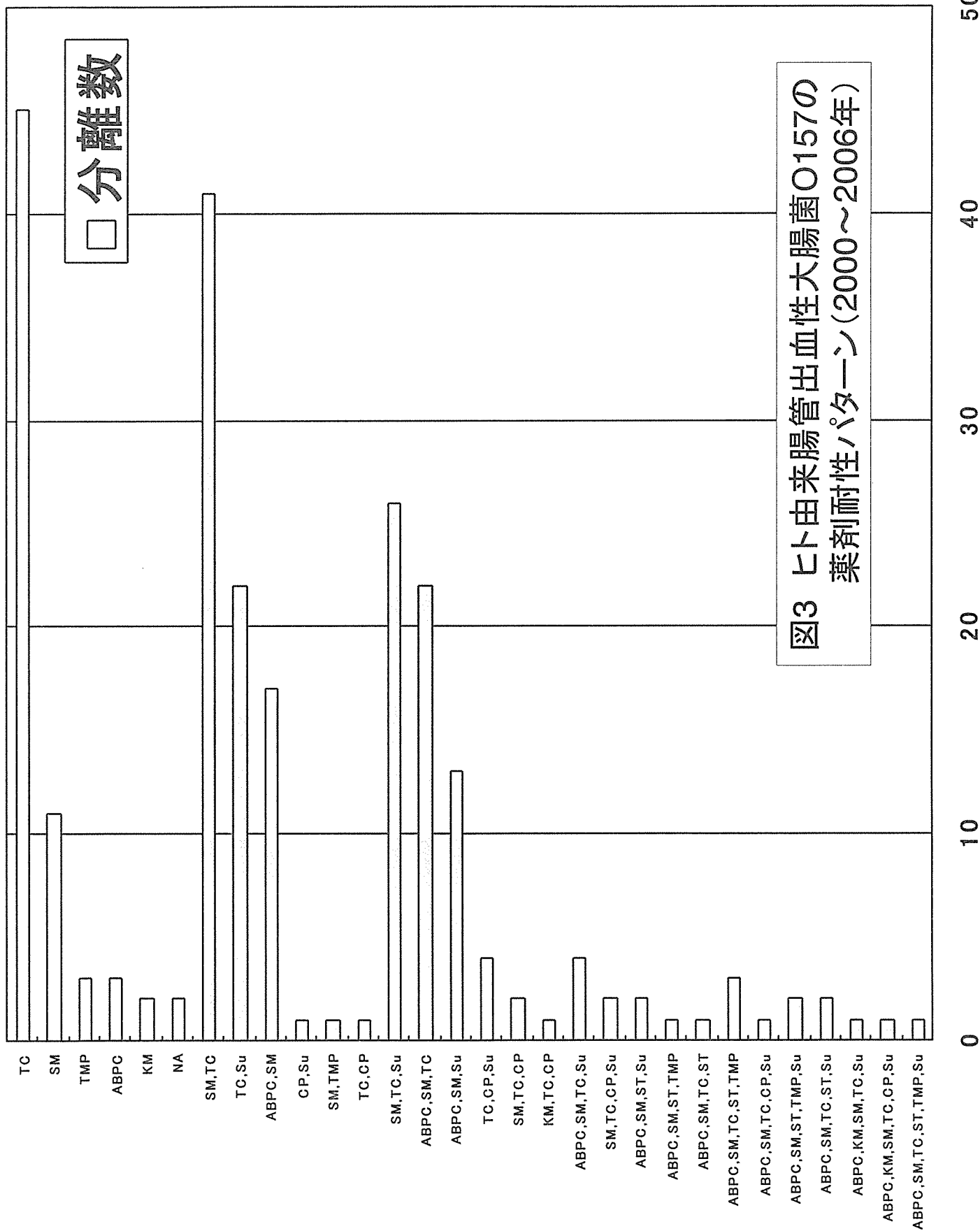


図3 ヒト由来腸管出血性大腸菌O157の  
薬剤耐性パターン(2000~2006年)



図4 ヒト由来ニューキノロン剤耐性  
*C.jejuni*, *C.coli* の分離頻度

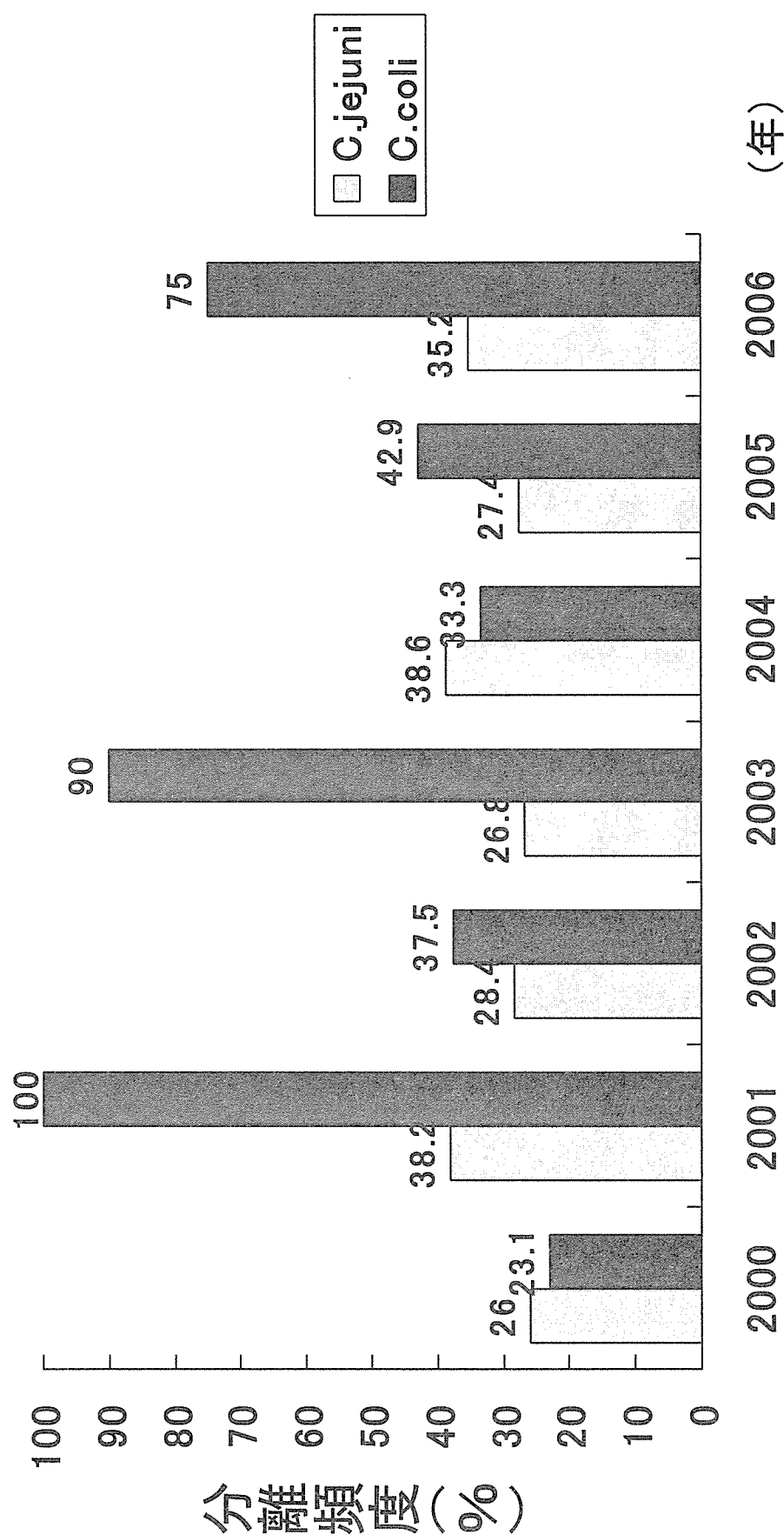


図5 ヒト由来Tetracyclin 耐性  
*C.jejuni*, *C.coli* の分離頻度

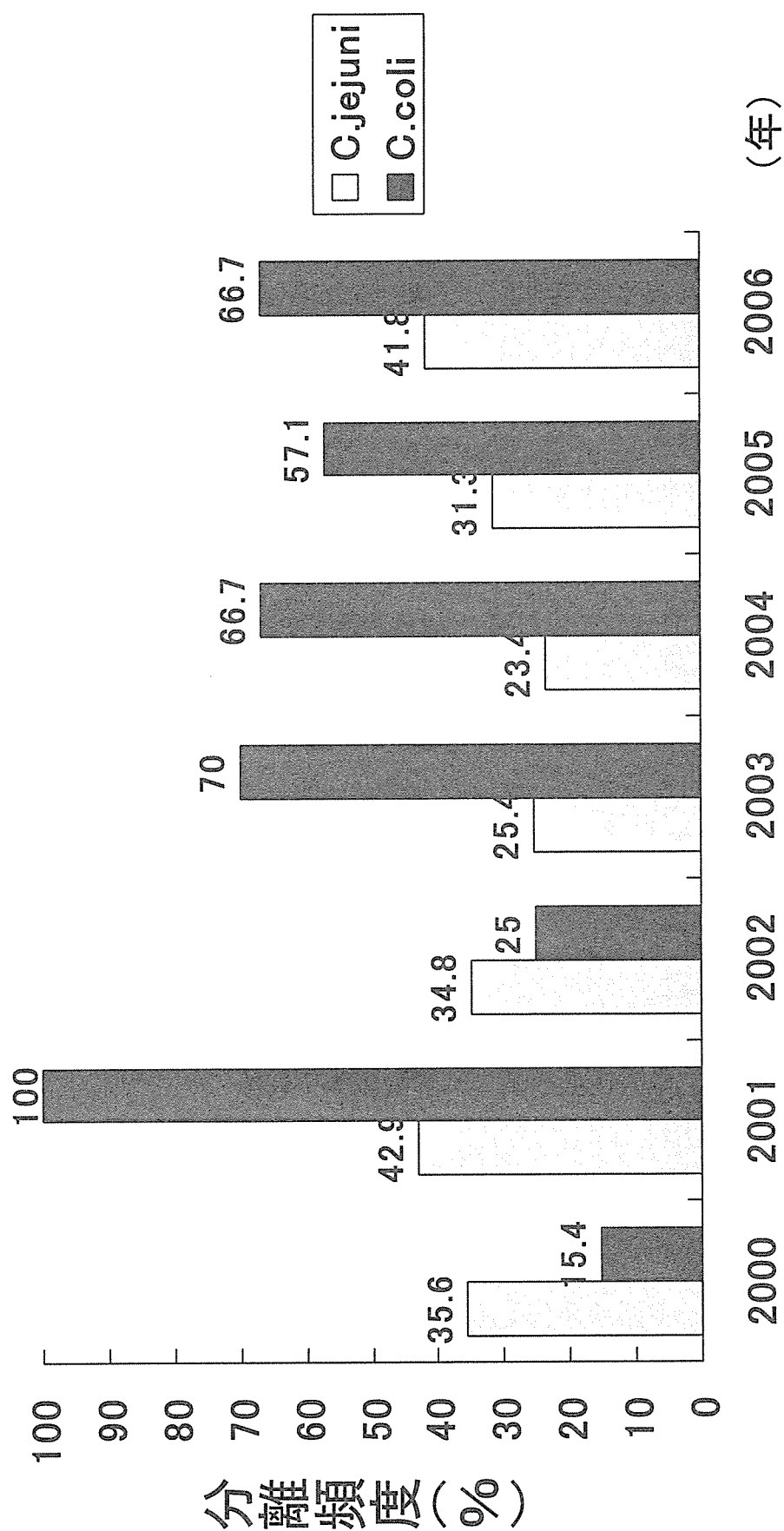


図6 ヒト由来Erythromycin 耐性  
*C.jejuni*, *C.coli* の分離頻度

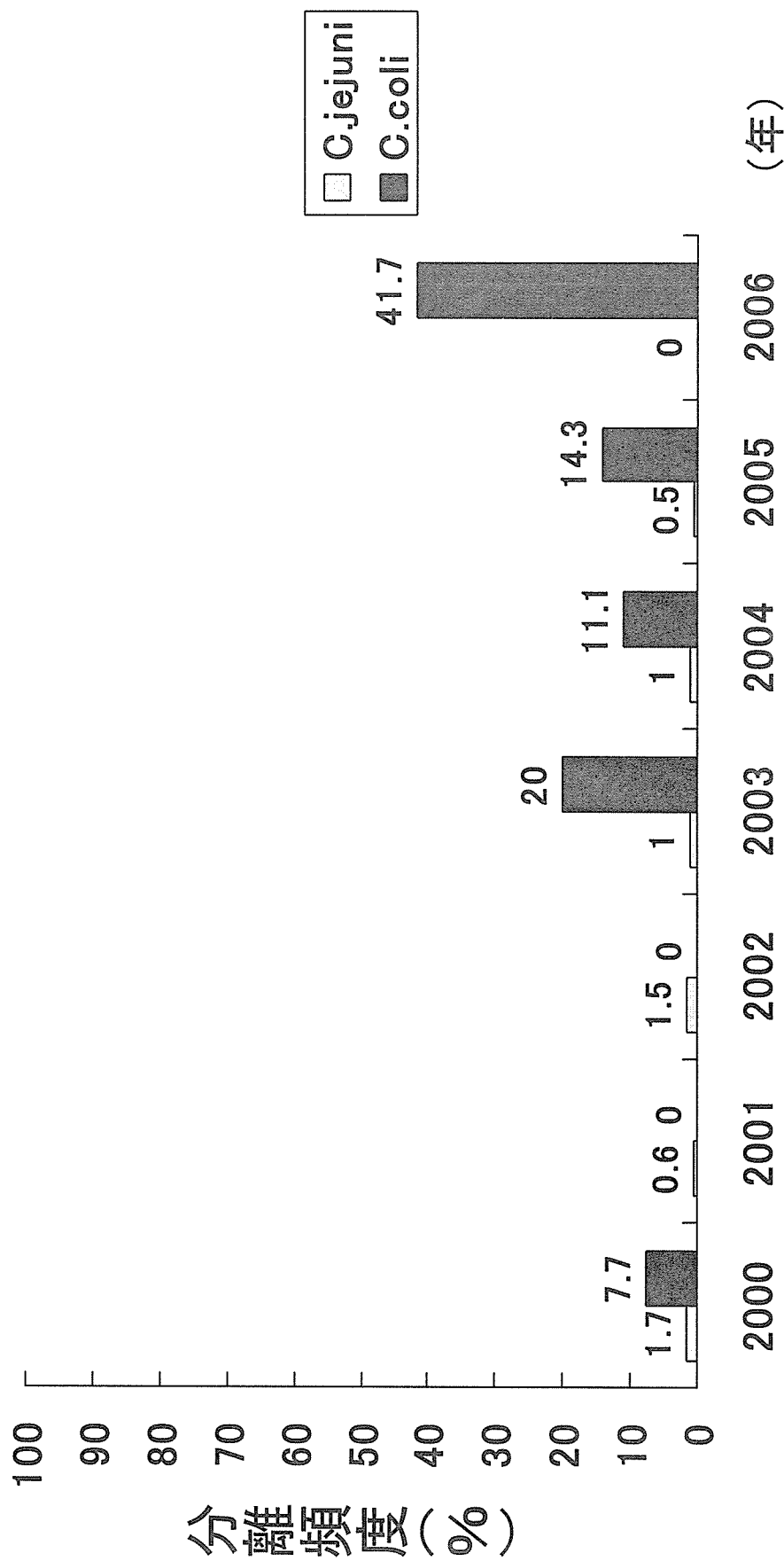


表1 食品由来腸管出血性大腸菌O157の薬剤別耐性菌株数

	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年	2006年	合計 (%)
供試菌株数	5	17	5	4	4	1	3	39
SM		2		1	1			4 (10.3%)
TC		2			1		1	4 (10.3%)
ABPC		1		1				2 (5.1%)
Su	.	.	.	.	1		1	2 (5.1%)
TMP		1				.	.	1 (2.6%)
ST		1						1 (2.6%)

供試薬剤: 14薬剤 (ABPC,CTX,GM,KM,SM,TC,CPFX,NA,ST,CP,OFLX,FOM,NFLX,Su)  
 2004年からSuを追加  
 2004年までTMPを使用, それ以降はOFLXを使用

表2 食品由来腸管出血性大腸菌O157の薬剤耐性パターン

供試株数	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年	2006年	計 (%)
		5	17	5	4	4	1	3
感受性	5	14	5	3	3	1	2	33 (84.6%)
TC		1						1
TC,Su							1	1
SM,TC		1						1
SM,TC,Su					1			1
ABPC,SM				1				1
ABPC,SM,ST,TMP		1						1
合計	0	3	0	1	1	0	1	6 (15.4%)

供試薬剤：14薬剤（ABPC,CTX,GM,KM,SM,TC,CPFX,NA,ST,CP,OFLX,FOM,NFLX,Su）  
 2004年からSuを追加  
 2004年までTMPを使用，それ以降はOFLXを使用

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

平成 18 年度 分担研究報告書

食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメントに関する研究

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長  
協力研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 部長  
協力研究者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官  
協力研究者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 研究員  
協力研究者 山崎 学 国立医薬品食品衛生研究所 協力研究員  
協力研究者 石和 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 協力研究員

研究要旨

わが国において、カンピロバクターやサルモネラは、食中毒発生事例が多く、代表的な食中毒起因菌であるが、抗生物質耐性菌が増加傾向にあり、問題となっている。一方、スウェーデン王立研究所の研究により、鶏に用いられたアポパルシンと、バンコマイシン耐性腸球菌の出現に因果関係が示され、耐性菌の出現に食肉動物の飼料に用いられた抗菌物質が関与していることが示唆されている。本分担研究では、主にカンピロバクターに注目して食品分離株における耐性に関わる検討を行うと共に、研究班全体より得られた生産段階、食品、臨床といったそれぞれの分離株に関する耐性に関する情報を基に、耐性菌出現防止に関わるリスクマネージメント手法の検討を目的とした。H18 年度には、これまでに収集されたカンピロバクター分離株を用いて、各種抗生物質に対する耐性の有無と同時に最小成育阻止濃度（MIC）を判定できるマイクロタイタープレート（MP）法について検討を行った。臨床分離株の耐性判定に広く用いられているディスク法と、ドライプレート‘栄研’を用いて各種抗生物質について MIC を判定する MP 法について比較検討を行った結果、ディスク法と MP 法では、リスクマネージメントにおいて重要となる抗生物質においてほぼ一致するデータが得られることを確認した。この基礎データを踏まえ、MP 法により、全国 9 箇所地方衛生研究所の協力により収集された全国の鶏肉由来カンピロバクター分離株について、各種抗生物質に対する耐性獲得状況および MIC を判定した。同時に、カンピロバクター・リファレンスセンターの協力により、鶏肉由来株が分離された地域と同一地域、同時期に分離された臨床分離株につき、同センターが実施したディスク法による各種抗生物質への耐性獲得状況の調査データの提供を受け、同時期・同一地域における臨床分離株と鶏肉由来株の各種抗生物質に対する耐性獲得状況を比較した。その結果、鶏肉由来の分離株においては、鶏肉由来株が分離された同時期、同一地域で分離された臨床由来株に比べ、調査した全ての抗生物質において、臨床由来株よりも高い頻度で耐性を獲得している傾向が示された。

## A. 研究目的

カンピロバクター等の食中毒菌の抗菌剤耐性獲得に関するデータを収集し、耐性菌出現防止に関わるリスクマネジメント手法の基礎となり、耐性菌の出現の防止に有効な対策に関する情報を提供する。

## B. 研究方法

食中毒菌特にカンピロバクターを主な対象菌として日本国内における情報およびデータの収集を行うとともに、食品（鶏肉）における定量的な汚染実態と抗生物質耐性獲得状況についてわが国の実態を明らかにする。米国 FDA により行われたリスクアセスメントの情報を参考に、耐性獲得リスクマネジメントに関する検討を試みる。実験としては、以下に示す 10 機関において 2005 年度に市販鶏肉より分離されたカンピロバクター分離株の提供を受け、MP 法による薬剤耐性獲得状況の調査を行い、MP 法による検査を行った同一株についてディスク法により得られた薬剤耐性獲得状況検査結果との比較を行った。

国立医薬品食品衛生研究所  
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  
群馬県衛生環境研究所  
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

また、カンピロバクター・リファレンスセンターの協力により、以上の機関の所在地

において 2005 年度に得られた臨床分離株について、地域ごとの発生件数およびディスク法による薬剤耐性獲得状況に関する調査結果の提供を受け、国内で分離された市販鶏肉由来株より得られた結果との比較を行った。

## C. 研究結果

市販鶏肉から 2005 年度に分離されたカンピロバクター株について、MP 法により抗生物質 NA, TC, EM, CP, GM, ABPC, CPFX, LVFX の 8 剤について、耐性獲得状況の検査を行うと同時に、個々の抗生物質 NA, TC, EM, CPFX, LVFX, ABPC について耐性獲得のブレイクポイントとなる最小成育阻止濃度 (MIC) を決定した (図 2~9)。また、本研究班において MP 法により得られた結果と、同一の株についてディスク法により得られた抗生物質耐性獲得データとを比較した (ディスク法による薬剤耐性獲得状況のデータは、平成 17 年度厚生労働科学研究班研究により報告された研究データと比較した)。図 10 に示すとおり、同一株における薬剤耐性獲得状況についてのディスク法と MP 法の結果を比較したところ、いずれの検査手法においてもほぼ同一の結果を得られることが確認された。この基礎データを踏まえ、本年度に得られた MP 法による鶏肉由来株の薬剤耐性獲得状況と、同一地域、同時期に分離された臨床分離株の抗生物質耐性獲得状況を比較検証したところ、検証を行った全ての抗生物質において、臨床分離株に比べ鶏肉由来株のほうがより高い頻度で耐性を獲得している傾向が示された。

#### D. 考察

カンピロバクターにおける抗生物質耐性菌によるリスクの分析にあたり、全国規模での分離株収集および分析を行う必要が生じたため、多数の検体における各種抗生物質獲得状況をより迅速かつ精度良く分析する手法の導入が必須であった。また、各種抗生物質に対する耐性獲得状況把握の一環として、個々の抗生物質について最小成育阻止濃度（MIC）を決定することにより、全国の汚染実態状況の分析精度の向上も期待された。上記の理由により、従来のディスク法と同程度またはそれ以上の検査精度を担保し、かつ、リスクアセスメントモデル構築に際して重要となる複数の抗生物質に対する耐性獲得状況を迅速かつ数量的に判定する手法として、ドライプレート‘栄研’を用いた MP 法を導入した。

地方衛生研究所のネットワークにより図 1 に示す各都府県において 2005 年度に分離された市販鶏肉由来カンピロバクター分離株の抗生物質耐性獲得状況を調べた。なお、MP 法の導入に伴い、NA, EM, TC, CPF, LVFX, ABPC の 6 剤について最小成育阻止濃度(MIC)を決定し、これを用いて各種抗生物質に対する耐性の有無を判定した。

一方、本研究班にて新たに MP 法により得られた抗生物質耐性獲得状況データ以外の耐性判定は、ディスク法で判定されたものを用いた。このため、MP 法によるデータとディスク法によるデータとの比較を行うにあたり、両手法によるデータの精度を検証する必要性が生じた。図 10 に示すとおり、市販鶏肉由来のカンピロバクター分離株を用いてディスク法および MP 法による

抗生物質耐性獲得状況を比較したところ、約 90% の検体においてディスク法と MP 法の判定結果が一致することが示された。この結果から、MP 法によるデータとディスク法によるデータをほぼ同等とみなし、両者を比較検討できるものと判断した。

各種抗生物質に対する耐性菌のリスク分析にあたり特に重要となるのは、医療機関における耐性菌の出現およびその影響に関する予測である。本研究においては、食中毒の直接の原因であり、また、生産過程において高頻度に多様な抗生物質に暴露される食肉由来分離株の抗生物質耐性獲得状況をモニターすることにより、いずれ出現する臨床由来株の耐性獲得状況を予測しうるとの想定のもと、カンピロバクター・リファレンスセンターの協力により、本年度 MP 法により調査した市販鶏肉由来分離株を得た同一地域、同時期の臨床由来株についての各種抗生物質への耐性獲得状況データの提供を受け、市販鶏肉由来株における耐性獲得状況との比較を行った。

表 1 に示すとおり、比較を行った全ての抗生物質について、同時期、同一地域において分離された市販鶏肉由来株は臨床由来株に比べて高頻度に耐性を獲得していることが判明した。従って、市販鶏肉由来耐性菌をモニターすることにより、医療の現場における耐性菌の出現およびその耐性獲得パターンを予測し、対策を講じるための重要なデータを取得・提供できるものと期待される。

#### E. 結論

カンピロバクター分離株の検査法として、ディスク法とほぼ同等の検査結果を得られ、



迅速かつ数値によるデータを得られる MP 法を導入し、また既存のデータとの比較検討が可能であることを証明した。MP 法により、市販鶏肉分離株の耐性状況を明らかにした。また、MP 法による調査を行った市販鶏肉由来株と同時期、同一地域に分離された臨床由来株の耐性情況データとの比較から、調査した全ての抗生物質において市販鶏肉由来株は臨床由来株よりも高頻度に耐性を獲得していた。この結果から、食肉由来株の耐性株をモニターすることにより、将来的に医療機関において出現する耐性株の傾向の予測が可能であると期待された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

口頭発表

Igimi S, Okada Y, Ishiwa A, Yamasaki M, Morisaki N, Kubo Y, Asakura H and Yamamoto S. Antimicrobial resistance of *Campylobacter*: Prevalence and trends in Japan. 10th International Symposium on Toxic Microorganisms. Washington DC November 7, 2006.

論文発表

Igimi S, Okada Y, Ishiwa A, Yamasaki M, Morisaki N, Kubo Y, Asakura H and Yamamoto S. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter*: Prevalence and Trends in Japan. Food Additives and Contaminants. (投稿中)

表 1

カンピロバクターの抗生物質耐性獲得状況について (2005 年度分離株による)

抗生物質	分離株総数	ヒト臨床由来株* (%)		市販鶏肉由来株* (%)	
		数	(%)	数	(%)
抗生物質	分離株総数	655		128	
NFLX 耐性		214	(33)	56	(44)
OFLX 耐性		213	(33)	57	(45)
CPFY 耐性		214	(33)	55	(43)
NA 耐性		202	(31)	64	(50)
TC 耐性		108	(16)	41	(32)
EM 耐性		2	(0)	10	(8)
6 薬剤感受性株		330	(50)	42	(33)

※：カンピロバクター・リファレンスセンターよりデータ提供を受けた。

\*：MP 法により MIC および耐性・感受性を判定。

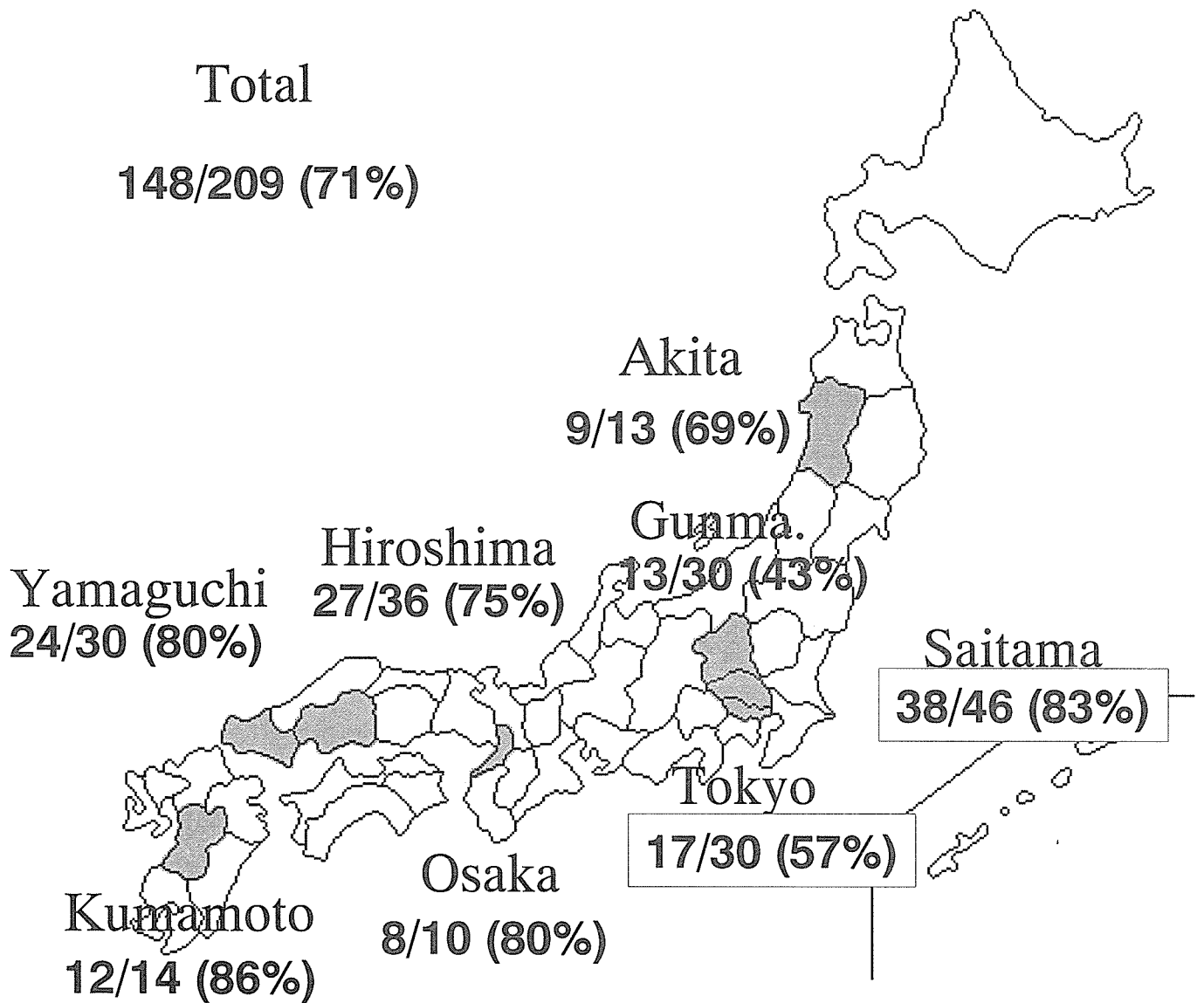
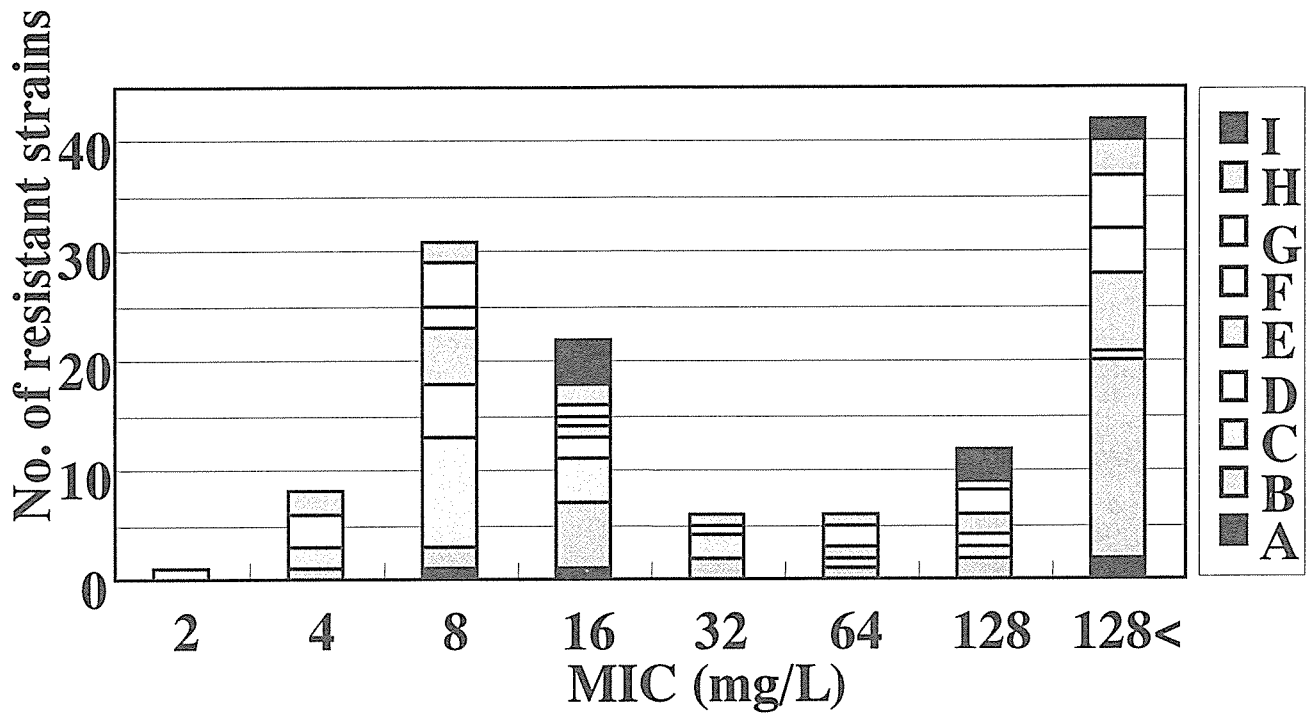
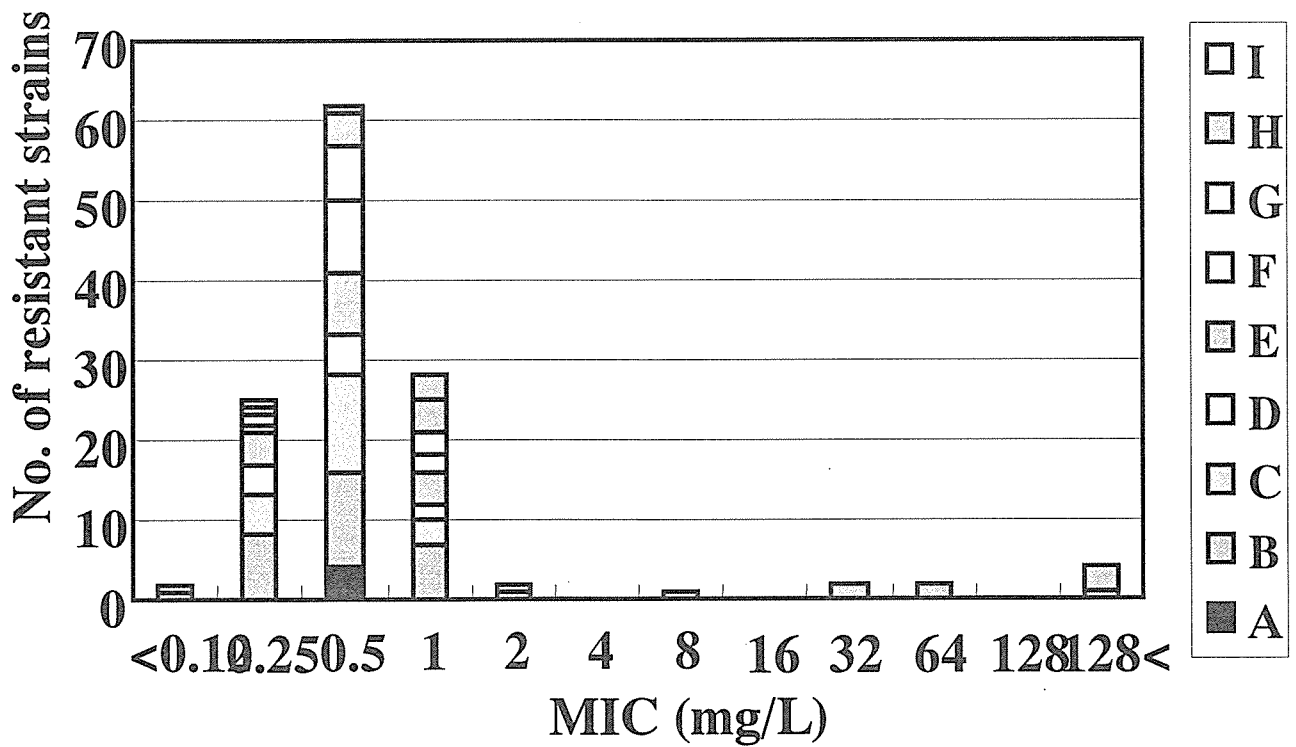


図1. *Campylobacter* isolated from retail poultry



2. Nalidixic acid resistance



3. Erythromycin resistance