

图4. Tetracycline resistance

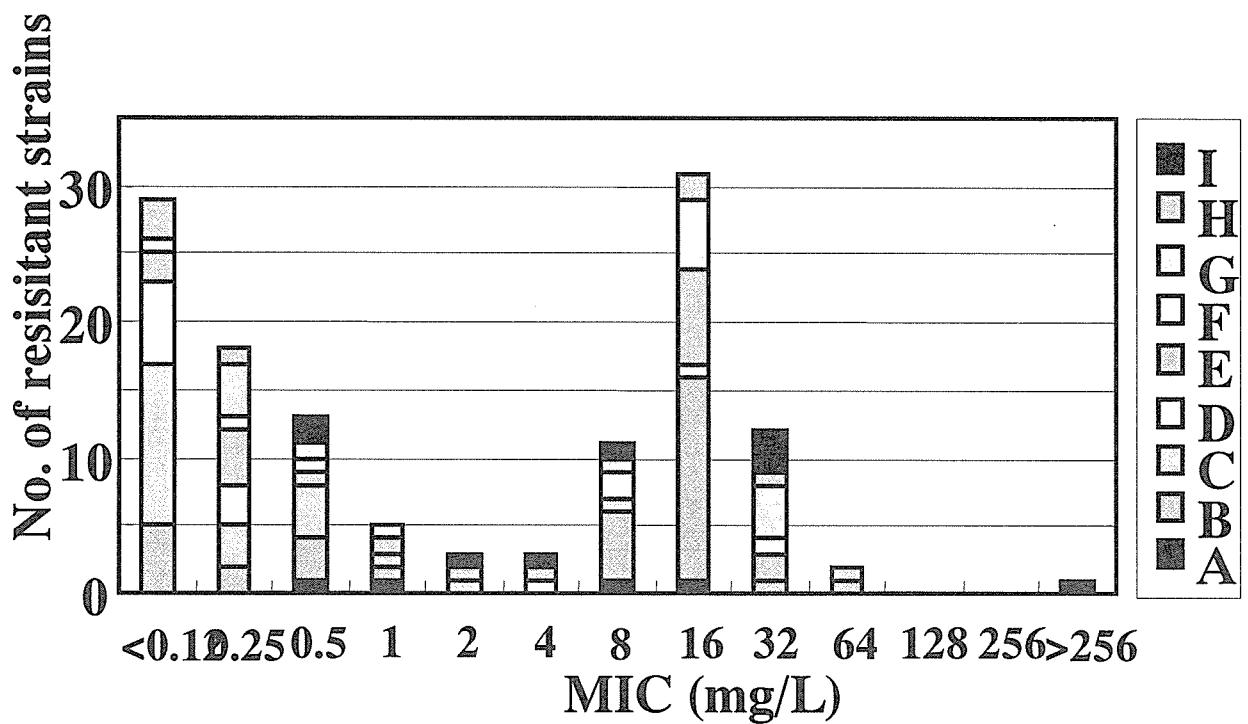


图5. Ciprofloxacin resistance

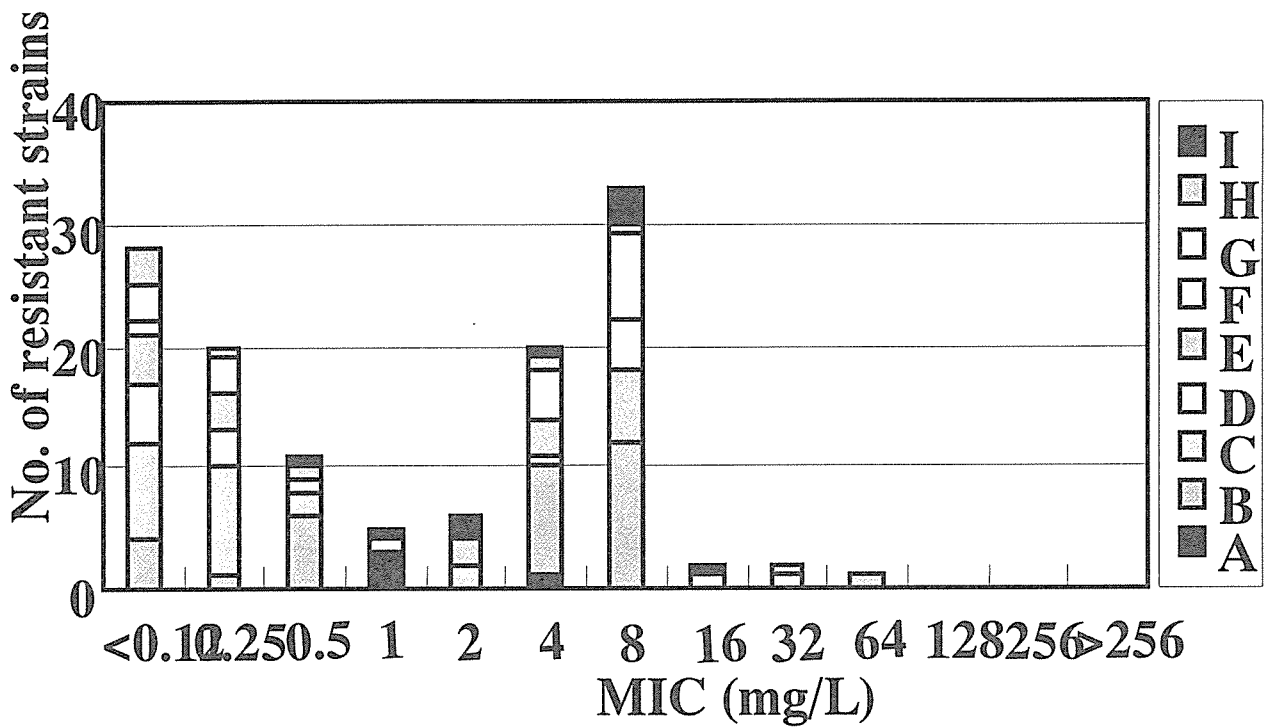


Fig. 6. Levofloxacin resistance

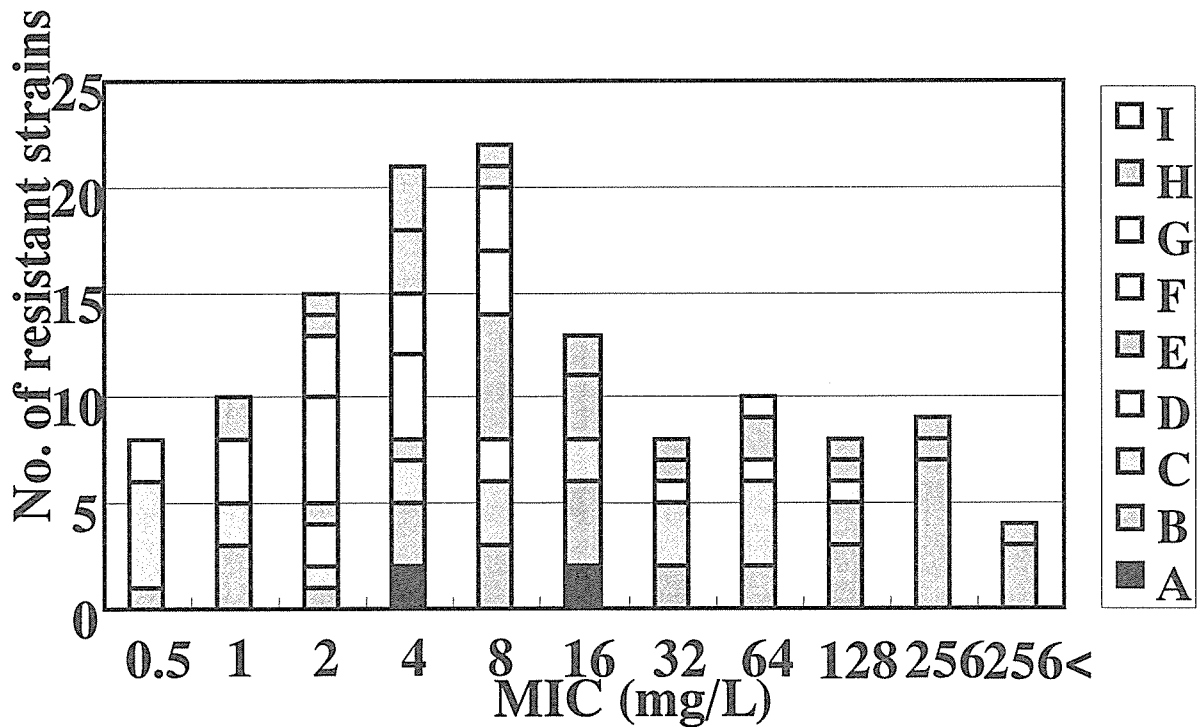


Fig. 7. Ampicillin resistance

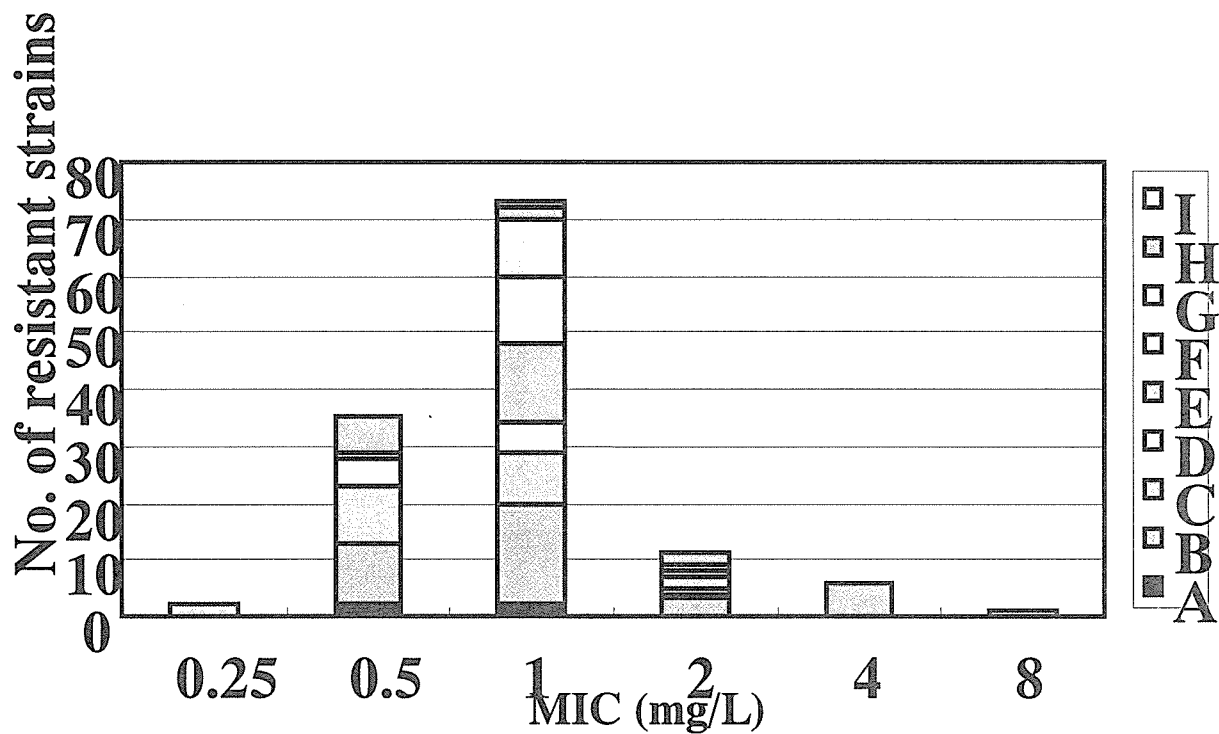


图8. Gentamicin resistance

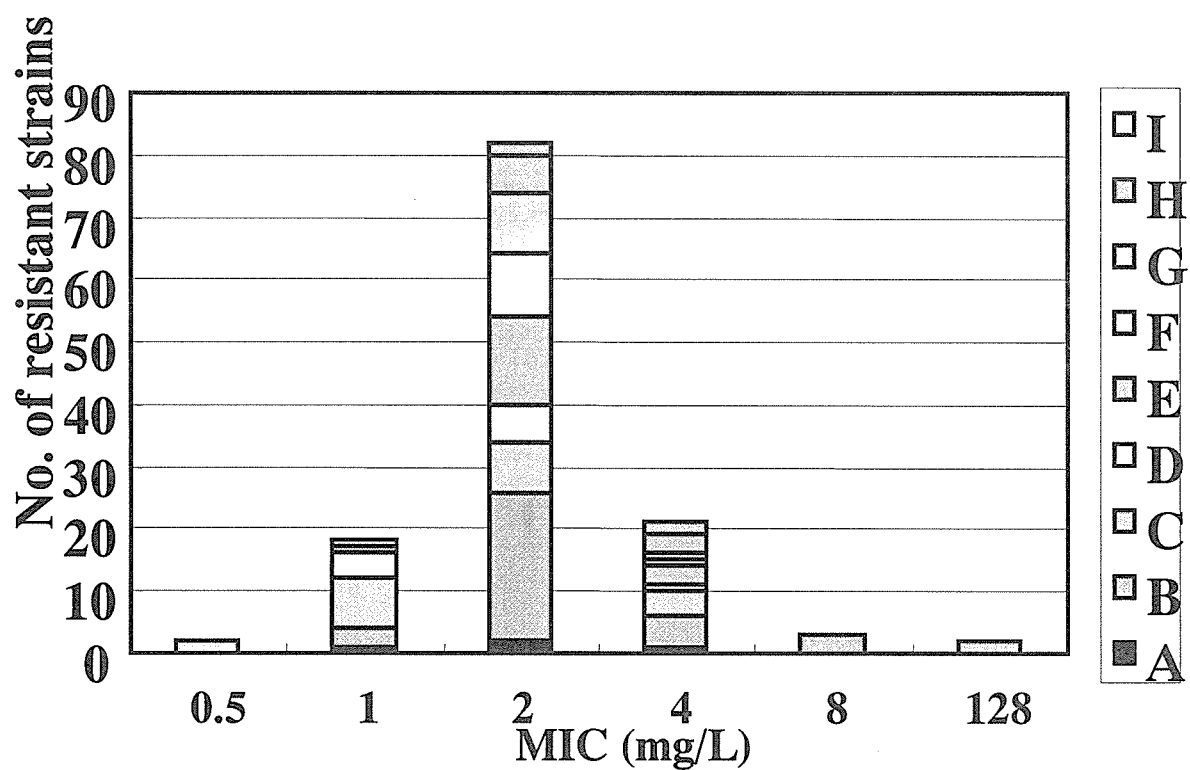
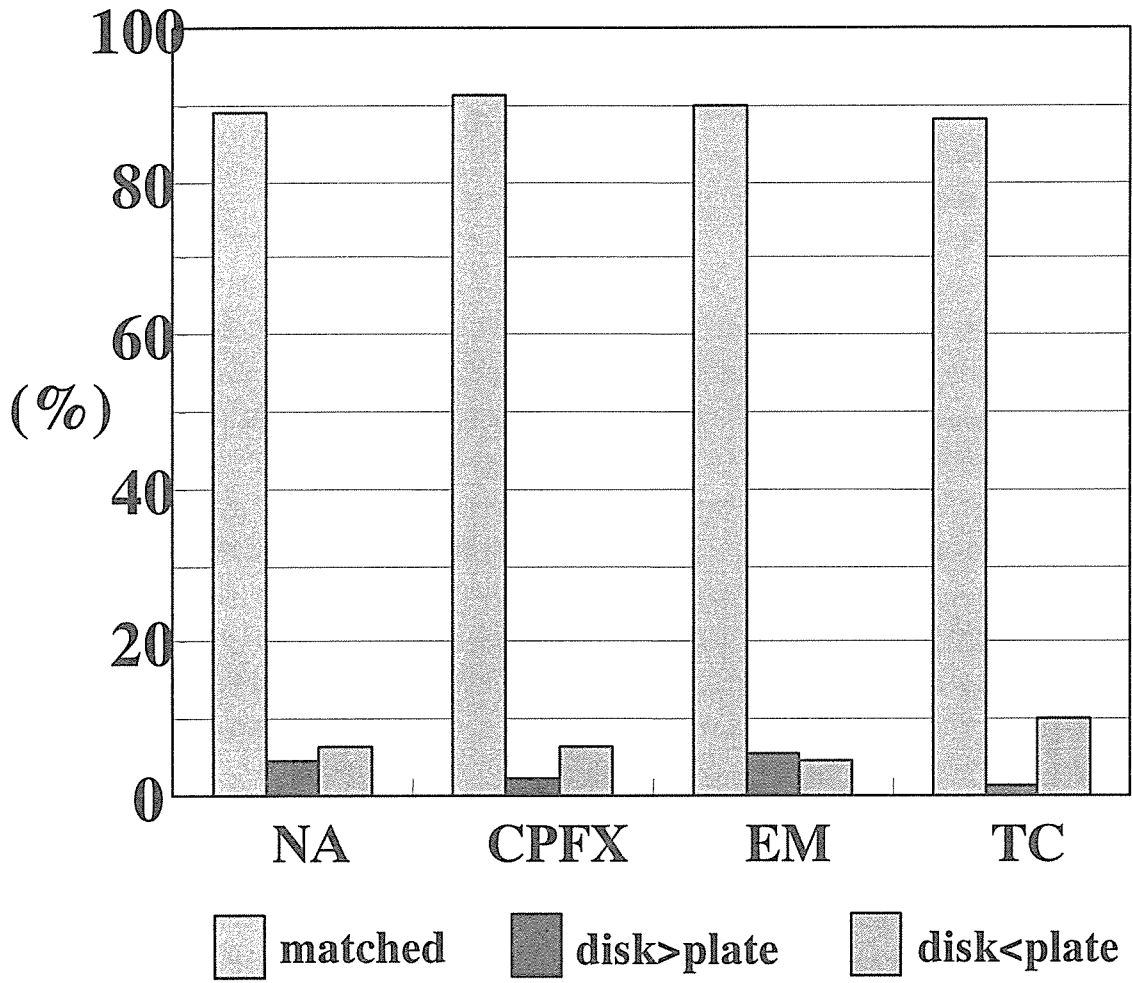


图9. Chloramphenicol resistance



☒ 10. Comparison of results between disc method and MP method.

平成18年度厚生労働省食品の安心・安全確保推進研究事業分担研究報告書

研究課題名：薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究

分担研究者 鮫島俊哉 農林水産省動物医薬品検査所

協力研究者 浅井鉄夫、小澤真名緒

農林水産省動物医薬品検査所

研究要旨

最近の2年間における全国的な薬剤耐性サルモネラのモニタリングでは、大きな変動は見られていない。しかし、牛と豚から分離される*S. Typhimurium*で、多剤耐性パターンの変化が見られ、牛や豚由来*S. Typhimurium* (ST)の中で、DT104の割合は、2002年以降有意に減少していた。また、セファロスポリンが使用されていないブロイラー鶏に由来するサルモネラでセファロスポリン耐性*S. Infantis* 2株及び型別不能 1株 (CMY-2, 2株; CTX-M2, 1株) が認められた。一方、カンピロバクターでは、豚由来*C. coli*において、食用動物への使用が禁止されたCPに対する耐性率の減少がみられた。1989~98年のブロイラー鶏由来*S. Infantis*の中に、近年分離される薬剤耐性株と同様の耐性遺伝子とPFGE型の株が認められたことから、*S. Infantis*は、ブロイラー鶏の間で長期間維持されていることが示唆された。これらの成績は、動物で使用される抗菌性物質の影響を検討する上で重要な知見であると共に、食品や人から分離される食品媒介性病原細菌の薬剤耐性の発現状況と比較し、対策を構築する上で有意義な知見であると考えられた。

A. 研究目的

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、拡散しているかについての疫学的な知見を得るためにモニタリングの重要性が国際的に認識されている。わが国においても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 Resistance Monitoring System) が、2000年度から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、薬剤耐性指標菌として腸球菌と大腸菌をそれぞれ調査対象として、全国47都道府県の協力を得て全国規模で実施されている。本研究では中でも公衆衛生上重要性の高いサルモ

ネラとカンピロバクターに注目して、家畜由来株について薬剤耐性動向の把握及び耐性菌出現要因についての疫学的・遺伝学的解析を目的に、平成18年度は、1) 薬剤耐性の現状と薬剤耐性因子の分布状況の確認及び、2) 分離された薬剤耐性菌についての分子遺伝学的手法による疫学解析を実施した。

B. 研究方法

1. 供試サルモネラ菌株

サルモネラの薬剤感受性試験には、平成17年に健康家畜の糞便から分離された41株 (肥育牛由来0株、肥育豚由来6株、採卵鶏由来4株及びブロイラー由来31株) と病畜から分離された127株 (牛由来61株、肥育豚由来37株、鶏由来29株) を供試した。ERFX (フルオロキノロン剤: FQ) 耐性株は、Izumiyaら (2005) が報告した*oxa30-1321F*と *aadA1-3'*を用いて耐性遺伝子の検索後、ファージ型別を国立感染症研究所に依頼した。

薬剤耐性 *Salmonella* *Infantis* の遡り調査には、(独)動物衛生研究所より分与された1989~1998年にブロイラーから分離された *S. Infantis* 11株(過去分離株)を供した。これらの株を用いて耐性遺伝子の検索、薬剤感受性試験、PFGEを実施し、過去分離株と近年分離株を比較した。

多剤耐性 *S. Typhimurium* DT104 の動向調査には、2002~2005年の間に国内で集められた臨床由来 *S. Typhimurium* 160株(牛由来104株、豚由来48株及び鶏由来8株)を供試した。薬剤耐性遺伝子は、クラス1インテグロン、 β ラクタマーゼ遺伝子(*bla*TEM、*bla*PSE及び*bla*OXA)及びストレプトマイシン耐性遺伝子(*aadA1*及び*aadA2*)の検索を行った。PCR法による遺伝子の検索の結果、1.0と1.2kbp増幅クラス1インテグロン陽性株、1.0kbpのクラス1インテグロンを保有し*aadA2*陽性株あるいは1.2kbpのクラス1インテグロンを保有し*bla*PSE陽性株について、DT104及びその関連ファージ型の同定を国立感染症研究所に依頼した。

セファロsporin耐性サルモネラの性状調査は、2005年に健康なブロイラーから分離された *S. Infantis* とO型別不能(H:r/1,5)各1株及び2006年にブロイラーから分離された *S. Infantis* 1株及び2001年に市販鶏肉から分離された *S. Infantis* 2株を供試した(CEZのMIC:512 μ g/ml以上)。Kojimaら(2005)の報告に従い β -ラクタマーゼの型別を実施し、PFGE型及びプラスミドプロファイル調べた。

2. 供試カンピロバクター

カンピロバクターの薬剤感受性試験には、平成17年に健康動物の糞便から分離された158株(肥育牛由来12株、肥育豚由来51株、採卵鶏由来66株及びブロイラー由来29株)を供試

した。菌種は、生化学検査を実施後、PCRにより同定した。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、NCCLSのガイドラインに準拠した寒天平板希釈法で実施した。

C. 研究結果

1. 平成17年度分離サルモネラの薬剤感受性(表1)

健康家畜由来サルモネラ株の血清型は、7種類認められ、そのうち *S. Infantis* が21株(ブロイラー由来19株、採卵鶏由来2株)で、約半数を占めていた。一方、病畜由来株の血清型は、21種類認められ、そのうち *S. Typhimurium* が67株(牛由来42株、肥育豚由来21株、鶏由来4株)で、約半数を占めていた。

健康家畜由来株では、DSM、KM、OTC及びTMPに対する耐性率は50%以上を示し、その他の薬剤に対する耐性率は20%未満であった。一方、病畜由来株では、DSM及びOTCに対する耐性率は60%以上、ABPC及びKMに対する耐性率は30%以上を示した。病畜由来株において、CEZ及びERFXに対する耐性株がそれぞれ2株と1株で認められた。

ERFXに対して耐性を示した株は、2005年に血便を呈し死亡した牛から分離された *S. Typhimurium* 1株(ERFXのMIC:16 μ g/ml)で、*bla*OXA-30保有し、ABPC-CP-DSM-GM-OTC-NA-TMPに耐性を示す多剤耐性DT12であった。

CEZに耐性を示した株は、2005年に健康なブロイラーから分離された *S. Infantis* とO型別不能(H:r/1,5)各1株であった。

健康動物由来株と病畜由来株の耐性率を比べると、健康動物由来株は、TMPに対する耐性率が高く、ABPCに対する耐性率が低かった(P<0.01)。平成17年度に分離された株の薬剤感受性試験成績は、平成16年度のものと比較では耐性率に大きな違いは見られなかった。

2. 多剤耐性 *S. Typhimurium* DT104 の動向調査 (表 2, 表 3)

牛由来 104 株のうち、DT104 は 28 株、DT104B 及び U302 はそれぞれ 2 株で、DT104 関連ファージ型株は、全体の 31% であった。その他、DT104 は、豚由来 48 株中 2 株 (4%)、鶏由来 8 株中 1 株 (13%) で認められた。牛由来 *S. Typhimurium* では、1.0kbp クラス 1 インテグロン、*bla*TEM 及び *aadA1* を保有し ABPC・DSM・KM・OTC 耐性を示す株が 48 株 (46%) で優勢に認められた。豚由来 *S. Typhimurium* で優勢であった株は、DSM・OTC 耐性を示す株で、27 株 (56%) で認められた。

3. 薬剤耐性 *S. Infantis* の遡り調査 (表 4, Fig.1)

過去分離株のうち、1993 年以降に分離された 7 株は、少なくとも OTC・DSM 耐性を示し、*aadA1* を含むクラス 1 インテグロンと *tetA* を保有していた。これらの成績は、近年市販鶏肉と健康ブロイラー鶏から分離される *S. Infantis* 株のもの (Asai ら、2006) と類似していた。

2001~2003 年に健康ブロイラー鶏から分離された 23 株との PFGE 型を比較するため、PFGE 像をクラスター解析したところ、31 株で構成される PFGE 型 A と 2 株で構成される PFGE 型 B の 2 つのクラスターに分けられた。PFGE 型 B に分けられた 2 株は、1998 年と 2002 年に分離された感受性株であった。

4. セファロスポリン耐性サルモネラの性状調査

2005 年に分離された *S. Infantis* と O 型別不能株は *bla*CMY₂ を保有し、2006 年に分離さ

れた *S. Infantis* は *bla*CTX-M₂ を保有していた。市販鶏肉由来株は、*bla*CMY₂ を保有していた。

5. 平成 17 年度分離カンピロバクターの薬剤感受性 (表 5)

分離された 158 株の内訳は、*Campylobacter jejuni* 90 株及び *C. coli* 68 株で、*C. jejuni* は主に肥育牛、採卵鶏及びブロイラー、*C. coli* は肥育豚由来であった。薬剤感受性試験では、供試した 9 薬剤のうち 7 薬剤 (ABPC、DSM、EM、OTC、CP、NA 及び ERFX) に対する耐性株が認められ、それらの耐性率は 5.1~58.9% であった。菌種別の耐性率は、EM では *C. jejuni* 0% 及び *C. coli* 35.3% であった。ERFX では *C. jejuni* 17.8% 及び *C. coli* 25.0% であった。

平成 16 年度の薬剤感受性試験成績と比較すると、*C. coli* において EM 耐性率 (53% → 35%、 $P < 0.05$) と CP 耐性率 (24% → 10%、 $P < 0.05$) で低下していた。その他の薬剤に対する耐性率に大きな違いは見られなかった。

D. 考察

家畜由来サルモネラの薬剤耐性に関して、健康家畜由来株と病畜由来株で比較した成績では、健康家畜由来株で TMP に対する耐性率が高いという成績であった。この耐性率の違いは、健康家畜由来株ではブロイラー由来 *S. Infantis* (DSM・OTC・KM・TMP 耐性) が、また、病畜由来株では牛由来 *S. Typhimurium* (ABPC・DSM・KM・OTC 耐性) が優勢であるといった供試株の由来動物及び血清型の違いが主な要因と考えられた。

我が国の家畜におけるフルオロキノロン (FQ) 耐性サルモネラは、2001 年に病豚から分離された *S. Choleraesuis* (Ezaki ら、2003) 及び 2001 年に牛から分離された *S. Typhimurium* が報告されているのみである。平成 17 年度に分離された FQ 耐性 *S.*

Typhimurium は、*bla_{OXA-30}* 保有し、ABPC-CP-DSM-GM-OTC-NA-TMP に耐性を示す多剤耐性 DT12 であった。これらの性状は、Izumiya らが報告した 2001 年に牛からの分離された株と極めて類似していた。

多剤耐性 *S. Typhimurium* については、1990 年代に流行した成牛のサルモネラ症に罹患した病牛から、ファージ型 104 (DT104) が分離され、DT104 は、1990 年代初期に国内の牛に侵入していたことが明らかにされている。また、我々は、1999~2001 年の調査では、牛から分離された 71.9% と豚から分離された 31.4% の *S.*

Typhimurium は、DT104 または 104B であったことを報告している (Esaki ら、2004)。2002~2005 年の 4 年間の病畜から分離された *S. Typhimurium* の薬剤感受性試験の成績を集計したところ、牛由来株では CP 耐性率の低下と KM 耐性率の上昇が見られ、豚由来株では ABPC 耐性率及び CP 耐性率の低下が認められた。また、ファージ型別の結果、2002 年以降の分離株における DT104 及びその関連ファージ型の割合は、1999~2001 年の成績に比べ、有意に低下していた (χ^2 乗検定、 $P < 0.01$)。このことから、DT104 及びその関連ファージ型の動向が、それぞれの動物種における耐性率に影響していると考えられた。また、CP 耐性の減少が牛と豚由来株で共通に認められたが、我が国では CP は 1998 年以降食用動物に対しての使用が禁止されているが、チアンフェニコールやフロルフェニコールは現在も継続して使用されている。豚由来株では、CP 耐性だけではなく ABPC 耐性率の低下も認められているが、ペニシリン系薬剤は、各種細菌感染症の第 1 次選択薬として使用されている。DT104 及びその関連ファージ型の割合が低下した原因については、今後も継続的な調査を続けて明らかにする必要がある。

S. Infantis は、ブロイラーから分離されるサルモネラの主要な血清型で、鶏肉における本

血清型の汚染は、1997 年以降優勢となっていることから、ブロイラーにおいても同時期に本血清型の汚染が広がっていたと推察される。ブロイラー由来 *S. Infantis* の大部分が、少なくとも SM-TC 耐性を保有しているが、両系統の薬剤は、ブロイラーの治療剤としてほとんど使用されていない。そこで、ブロイラー農場に分布する薬剤耐性 *S. Infantis* の衛生対策を検討するため、過去において分離された *S. Infantis* の性状を調べ、近年分離された株との比較を行った。その結果 1997 年以降市販鶏肉から *S. Infantis* が優勢に分離されている (Kusunoki ら、2000) が、近年分離される株と類似した性状を示す株が、1993 年以前にも国内のブロイラー鶏に分布していたことが明らかになった。

市販鶏肉において優勢となるためには、ブロイラー鶏に *S. Infantis* を伝播した媒介物の存在が考えられるため、主要な媒介物として疑われる飼料及び飼育用素ビナに関して文献調査を行った。1979~1996 年の飼料原料からのサルモネラの分離率は 12% で、そのうち血清型 *Infantis* は全分離株の 6% と極めて低率であった (原田ら、1998)。また、調査時期は異なるが、飼料原料から分離されるサルモネラは、感受性株が大部分を占めている (Yoshimura ら、1980)。一方、ブロイラー鶏種が 1995 年以降チャンキーとコブ種に変化していた (佐藤、2001) が、それらのサルモネラの汚染状況については情報が得られなかった。結局、*S. Infantis* が国内のブロイラー鶏へ浸潤・伝播にあたり、飼料原料や種鶏がどのように関与したかについては、今後の課題として残された。

また、興味深いことに鶏に承認されていないセファロsporin 耐性サルモネラの分離が確認された。これまで、家畜においてセファロsporin 耐性大腸菌が、牛 (CTX-M-2) 及びブロイラー鶏 (CTX-M-2、CTX-M-18 及び

CMY-2) から分離され、また、多剤耐性 *S. Newport* (CMY-2) が牛から分離されている。ブロイラー鶏由来 *S. Infantis* で CMY-2 及び CTX-M-2、同由来型別不能株で CMY-2 が認められた。これらの株と市販鶏肉に由来するセファロsporin耐性 *S. Infantis* 2 株 (Asai ら、2006) と比較したところ、全ての株で異なる PFGE 型を示したことから、異なる由来と推察された。また、CMY-2 型 4 株は、ブロイラー鶏由来 2 株と GF113 株と同様のプラスミドプロファイルを示したことから、共通の耐性因子による耐性機構と推察された。

抗菌性物質の使用との関係については、薬剤耐性 *S. Infantis* 分離農場における使用状況と関係していないことは、先の研究班報告書の中で示したが、薬剤耐性 *S. Infantis* が長期にわたり国内のブロイラー鶏飼育農場から分離されていること、また、承認されていない薬剤に対する耐性サルモネラが分離されたことについて、さらに検討していく必要がある。

カンピロバクターの EM 及び CP に対する耐性率に関しては、主な由来動物である豚由来株のみでは、平成15年度の EM 耐性率は 48% で、平成16年及び17年度の成績 (それぞれ、60% 及び 45%) と比べたところ平成16年度のみで高いことから、収集株の影響と考えている。一方、CP 耐性については、豚由来株では平成13年度 (41%) 以降、徐々に減少している。これは、1998年に食用動物における CP の使用禁止の影響も考えられるが、健康豚由来の大腸菌では1999年以降の CP 耐性率は 17~30% の間で変動し、低下傾向は見られていない。このことは、菌種、耐性機構及び多剤耐性状況等の違いが引き起こしている可能性も考えられる。また、耐性菌のリスク管理上で、ハザードとして特定された菌種及び耐性機構を含む各種性状を考慮してリスク管理措置を決定する必要があると考えられる。

E. 結論

最近の2年間における全国的な薬剤耐性サルモネラのモニタリングでは、大きな変動は見られていない。しかし、本研究の結果、牛と豚から分離される *S. Typhimurium* で、多剤耐性パターンの変化が見られ、また、セファロsporinが使用されていないブロイラー鶏に由来するサルモネラでセファロsporin耐性株が存在することが明らかになった。

一方、カンピロバクターでは、豚由来 *C. coli* において、食用動物の使用が禁止された CP に対する耐性率の減少がみられおり、本成績は、動物で使用される抗菌性物質の影響を検討する上で重要な知見であると共に、食品や人から分離される食品媒介性病原細菌の薬剤耐性の発現状況と比較する上で有意義な知見であると考えられる。

F. 研究発表

1) Asai T., Ishihara K., Harada K., Kojima A., Tamura Y., Sato S., and Takahashi T. 2007. Long-term prevalence of Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis* in Broiler Chicken Industry in Japan. *Microbiol. Immunol.* 51, 111-115.

2) Harada K., Asai T., Kojima A., Sameshima T., and Takahashi T. 2006. Characterization of Macrolide-resistant *Campylobacter coli* isolates from Food-Producing Animals on Farms Across Japan during 2004. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 1109-1111.

表1. 平成17年度に分離されたサルモネラの薬剤感受性

	健康畜 (n=41)					病畜 (n=127)				
	BP (mg/l)	MIC50 (mg/l)	MIC90 (mg/l)	耐性 菌株数	耐性率 (%)	MIC50 (mg/l)	MIC90 (mg/l)	耐性 菌株数	耐性率 (%)	
ABPC	32	1	1	2	4.9	1	>512	55	43.3	
CEZ	32	1	4	0	0	2	4	2	1.6	
DSM	32	32	128	24	58.5	128	>512	98	77.2	
KM	64	>512	>512	21	51.2	2	>512	39	30.7	
GM	16	0.5	1	0	0	0.5	1	3	2.4	
OTC	16	128	256	23	56.1	128	256	88	68.5	
CL	16	1	4	0	0	1	4	1	0.8	
CP	32	4	8	2	4.9	8	256	23	18.1	
NA	32	4	8	4	9.8	4	256	17	13.4	
ERFX	2	≤0.125	≤0.125	0	0	≤0.125	0.25	1	0.8	
TMP	16	64	>512	26	63.4	0.25	>512	20	15.7	

(参考) 平成16年度に分離されたサルモネラの薬剤感受性

	健康畜 (n=35)					病畜 (n=73)				
	BP (mg/l)	MIC50 (mg/l)	MIC90 (mg/l)	耐性 菌株数	耐性率 (%)	MIC50 (mg/l)	MIC90 (mg/l)	耐性 菌株数	耐性率 (%)	
ABPC	32	1	4	3	8.6	1	>512	28	38.4	
CEZ	32	1	2	0	0	2	4	2	2.7	
DSM	32	64	128	21	60	64	>512	53	72.6	
KM	64	2	>512	9	25.7	2	>512	14	19.2	
GM	16	0.5	1	0	0	0.5	1	3	4.1	
OTC	16	64	256	19	54.3	64	256	40	54.8	
CL	16	1	2	0	0	1	8	1	1.4	
CP	32	4	16	2	5.7	8	512	13	17.8	
NA	32	4	8	3	8.6	4	256	9	12.3	
ERFX	2	≤0.125	≤0.125	0	0	≤0.125	0.25	0	0	
TMP	16	1	512	14	40	0.5	>512	10	13.7	

表2. 2002～2005年に食用動物から分離されたDT104及びその関連ファージ型

Isolation year	Cattle				Pig		Poultry	
	Typhimurium	Phagetyped as:		Typhimurium	Phagetyped as:	Typhimurium	Phagetyped as:	
		104	104B					U302
2002	13	5	0	0	11	0	4	0
2003	24	8	2	0	8	0	0	0
2004	25	3	0	2	8	1	0	0
2005	42	12	0	0	21	1	4	1
Total	104	28	2	2	48	2	8	1

表3. 2002 ~ 2005年に家畜から分離されたS. Typhimuriumの薬剤耐性パターン

Resistance type*	class 1 integron	b-lactamase type	Streptomycin resistance type	No. of isolates (%)						
				of cattle origin		of pig origin		of poultry origin		
				Other than DT104	DT104 related	Other than DT104	DT104 related	Other than DT104	DT104 related	
ABPC, CP, DSM, GM, OTC, NA, ERFX, TMP	-	blaOXA	NT**	1***						
ABPC, CP, DSM, GM, KM, OTC, TMP	-	blaTEM	NT	1						
CP, DSM, OTC, NA, TMP	1.6	blaTEM	NT	1						
ABPC, CP, DSM, KM, OTC	1.0, 1.2	blaPSE	aadA2	1	1					
	1.0	blaTEM	aadA1			1				
ABPC, CP, DSM, OTC, TMP	1.0	blaTEM	aadA1	5		3				
ABPC, CP, DSM, OTC, TMP	1.0	blaTEM	aadA1			1				
DSM, OTC, NA, TMP	-	-	NT		30		2			1
ABPC, CP, DSM, OTC	1.0, 1.2	blaPSE	aadA2	1						
ABPC, DSM, KM, OTC	1.0	blaTEM	aadA1	48						
ABPC, DSM, OTC, TMP	1.0	blaTEM	aadA1			1				
CP, DSM, OTC, TMP	-	-	NT	1		1				
DSM, GM, OTC, TMP	2	-	NT	1		1				
ABPC, DSM, NA	1.2	blaPSE	aadA1		1					
ABPC, DSM, OTC	1.0	blaTEM	aadA1	1		2				
DSM, OTC, TMP	-	-	NT			2				
CP, DSM, OTC	-	NT	NT			2				
ABPC, NA	-	blaTEM	NT	1						
DSM, OTC	-	-	NT	2		27				1
DSM	-	-	NT	3						
OTC	-	-	NT	1		2				
Susceptible	-	-	NT	6		3				6
Total				72	32	46	2	7	1	

* ABPC: Ampicillin, CP: Chloramphenicol, DSM: Dihydrostreptomycin, GM: Gentamicin, KM: Kanamycin, OTC: Oxytetracycline, NA: Nalidixic acid.

ERFX: Enrofloxacin, TMP: Trimethoprim

** Not tested

*** Phagotyped as DT12.

表4. 1989～1998にプロイラーから分離された*S. Infantis*の薬剤耐性パターンと遺伝子型

Year	Strain No.	Resistanc e pattern* *	Pulsotype*	Size(Kb)***	<i>aadA1</i>	<i>tetA</i>	<i>aphA1</i>
1989	1313	-	A	-	-	-	-
1993	2005	STKTm	A	1	+	+	+
	2011	-	A	-	-	-	-
1996	2543	STK	A	1	+	+	+
1997	2617	STKTm	A	1	+	+	+
	2583	STK	A	1	+	+	+
	2623	STK	A	1	+	+	+
	2576	KTm	A	-	-	-	+
	2830	STK	A	1	+	+	+
1998	2973	STK	A	1	+	+	+
	2908	-	B	-	-	-	-

* S: Dihydrostreptomycin, T: Oxytetracycline, K: Kanamycin, Tm: Trimethoprim, -: Susceptible

** Classification according to Figure 1.

*** PCR products by 5'-CS and 3'-CS of class

表5. 平成16-17年度に分離されたカンピロバクターの薬剤感受性

agent	species	平成16年度*			平成17年度**				
		MIC 50 (mg/L)	MIC 90 (mg/L)	耐性菌株数	耐性率 (%)	MIC 50 (mg/L)	MIC 90 (mg/L)	耐性菌株数	耐性率 (%)
Ampicillin	<i>C. jejuni</i>	4	32	16	12.1	4	32	15	16.7
	<i>C. coli</i>	4	8	7	8.4	4	8	4	5.9
Dihydrostreptomycin	<i>C. jejuni</i>	0.5	1	5	3.8	0.5	1	4	4.4
	<i>C. coli</i>	16	>512	39	47.0	2	256	30	44.1
Gentamicin	<i>C. jejuni</i>	0.25	1			0.5	0.5		
	<i>C. coli</i>	0.5	2			0.5	1		
Erythromycin	<i>C. jejuni</i>	1	4	0	0.0	2	2	0	0.0
	<i>C. coli</i>	256	>512	44	53.0	4	256	24	35.3
Oxytetracycline	<i>C. jejuni</i>	4	128	54	40.9	4	128	41	45.6
	<i>C. coli</i>	64	256	69	83.1	64	256	52	76.5
Chloramphenicol	<i>C. jejuni</i>	1	8	7	5.3	2	4	1	1.1
	<i>C. coli</i>	4	32	20	24.1	4	16	7	10.3
Nalidixic acid	<i>C. jejuni</i>	4	128	20	15.2	4	256	19	21.1
	<i>C. coli</i>	8	128	22	26.5	8	128	18	26.5
Enrofloxacin	<i>C. jejuni</i>	<0.125	2	16	12.1	<0.125	4	16	17.8
	<i>C. coli</i>	<0.125	4	22	26.5	<0.125	8	17	25.0
Sulfadimetoxin	<i>C. jejuni</i>	256	>512			8	512		
	<i>C. coli</i>	>512	>512			512	>512		

*: *C. jejuni* 132株、*C. coli* 83株

** : *C. jejuni* 90株、*C. coli* 68株

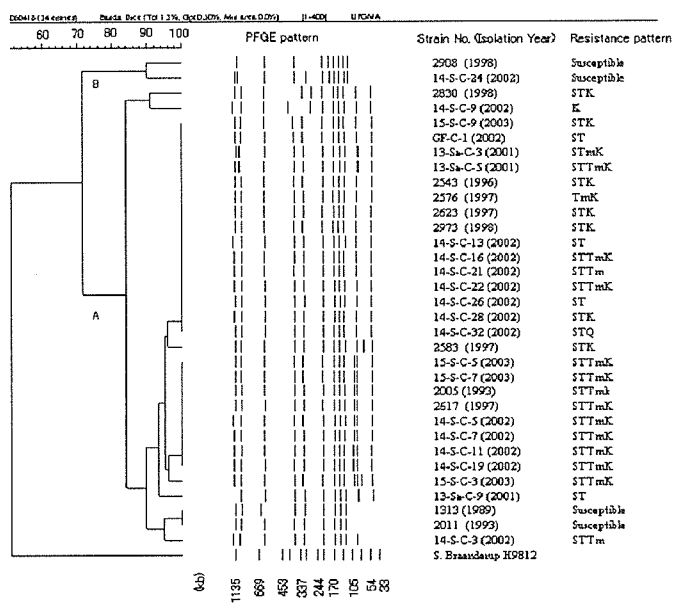


Figure 1

分担課題名：家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析

分担研究者 秋庭正人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
協力研究者 吉井紀代 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
協力研究者 中澤宗生 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
協力研究者 片岡 康 日本獣医生命科学大学獣医微生物学教室

研究要旨

食用動物に対して抗菌薬を使用することが、どの程度耐性菌を選択するかとの命題に対する科学的評価を行うことを目的として、1981 年から 2005 年の 25 年間に国内の牛から分離された *Salmonella* Dublin (SD) の薬剤感受性と耐性化機構を調べた。1980 年代前半から 1990 年代前半までは薬剤耐性 (R) プラスミドを保有し、4 剤以上の薬剤に耐性を示す株が優勢であったが、1990 年代後半以降は R プラスミドを保有しない株が優勢となった。SD 感染症の治療薬として N が多用された 1980 年代後半には N 耐性菌が急増し、1990 年代前半以降はほとんどの株が N 耐性を示した。N 耐性菌では単一の GyrA 変異 (Asp87Tyr) しか認められないにもかかわらず、フルオロキノロン系薬剤 (FQ) に対する MIC は不定であった。そこで、多剤排出ポンプの関与を疑い、変異株を作出して解析したところ、アミノ酸置換、Asp87Tyr は N の野外における使用により選択されたもので、N 耐性に加えて FQ に低感受性を示した株では、多剤排出ポンプが FQ 抵抗性に関与している可能性が示唆された。また、FQ に対する MIC₉₀ は 1990 年代後半にピークを形成し、その後低下した。これらの薬剤感受性の変化は野外における薬剤の使用状況を反映している可能性が考えられた。

A. 研究目的

食用動物に対して抗菌薬を使用することが、どの程度耐性菌を選択するかとの命題に対する科学的評価を行うことが求められている。個々の農場における薬剤使用歴と耐性菌出現状況は必ずしも相関しないことが、昨年度までの当研究班における調査で示されている。そこで、本研究では長期間にわたって日本全国から収集した牛由来 *Salmonella* Dublin

(SD) の薬剤感受性を調べ、野外における薬剤使用状況に関する情報と突き合わせることで、上記命題に対する科学的評価を行うことを企図した。SD は食中毒の起因菌ではないが、牛サルモネラ症の原因菌として重要であり、発症牛にはほとんどの場合、抗菌剤治療が施されることから、命題の科学的評価を行う一つのモデルとなり得る。

B. 研究方法

1) 供試菌株

1981年から2005年の25年間に国内の牛から分離したSD 161株を用いた。

2) 薬剤感受性試験

市販の感受性ディスクを用いて、NCCLSガイドラインに準拠した方法で耐性を判定した。供試抗菌剤としてアンピシリン (A)、セファゾリン、セフトリアキソン、クロラムフェニコール (C)、カナマイシン (K)、ストレプトマイシン (S)、テトラサイクリン (T)、スルファメチゾール、ST 合剤、ナリジクス酸 (N)、シプロフロキサシン (CPFX)、オフロキサシン (OFLX)、ノルフロキサシン (NFLX)、ホスホマイシンの14薬剤を選択した。さらに、N、エンロフロキサシン (ERFX)、CPFX、NFLX、OFLXを含むキノロン系薬剤については、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。

3) 薬剤耐性 (R) プラスミドの伝達試験

定法に従い、大腸菌 ML1410 を受容菌とした R プラスミドの伝達試験を行った。

4) キノロン系薬剤耐性化機構の解析

トポイソメラーゼ遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) の Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) を PCR 増幅し、その塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。これによりナリジクス酸耐性を引き起こしたトポイソメラーゼのアミノ酸置換部位を特定した。さらに、温度感受性ベクター pTH18ks1 または pTH18cs1 を用いた遺伝子交換法により、*gyrA* 復帰変異株またはサルモネラの主要な多剤排出ポンプを規定する遺伝

子 *acrRAB* の欠失変異株を作出し、親株との間でキノロン系薬剤に対する MIC を比較した。

C. 結果

1) 薬剤耐性型とプラスミドプロファイルによる SD の型別

SD 野外分離株の多くは、75 kb の血清型特異的病原性プラスミドの他に1種類の R プラスミドを保有していた (図1)。そこで、我々は薬剤耐性型とプラスミドプロファイルを組み合わせて SD 161 株の型別を行った (表1)。1型は75 kb の病原性プラスミドのみ保有し、いずれの供試薬剤にも感受性、もしくは S、K、N のいずれかに耐性を示す株で、合計 58 株と全体の 36.0% を占めた。2型は75 kb プラスミドに加えて、T、S、K、A に対する耐性遺伝子をのせた 60 kb の R プラスミドを保有する株で、N 耐性の有無により、さらに 2a 型と 2b 型に型別した。2a、2b 型は合わせて全体の 45.3% を占めた。3型は75 kb プラスミドに加えて、S、K、A に対する耐性遺伝子をのせた 54 kb の R プラスミドを保有する株で、全体の 11.2% を占めた。4、5、6型は、75 kb プラスミドに加えて、それぞれ 45、200、208 kb の R プラスミドを保有し、各1株認められた。R プラスミドを2種保有する株、機能不明なプラスミドを保有する株は型別不能株 (UT) とし、合わせて9株と全体の 5.6% を占めた。

2) プラスミドプロファイルの年次分布

1980年代前半から1990年代前半までは R プラスミドを保有し4剤以上の薬剤に耐性を示す2~6型が優勢であったが、

1990年代後半からはRプラスミドを保有せず、K及びNに耐性を示す1型菌が優勢となった(表2)。

3) ナリジクス酸感受性の推移

図2にNに対するMICの推移を示した。1980年代前半の株に耐性菌は認められなかったが、1980年代後半には典型的な2峰性分布を示し、1990年代前半以降の株は、ほとんどがN耐性を示した。

4) フルオロキノロン系薬剤(FQ)感受性の推移。

N耐性はトポイソメラーゼのアミノ酸置換により引き起こされることが知られており、変異が蓄積することでフルオロキノロン系薬剤(FQ)にも耐性を示すようになる。そこでSD 161株のFQに対するMICを測定した。FQに対して明らかに耐性を示す株は認められなかったが、感受性の低下した株は散見された。図3にFQに対するMIC₉₀の推移を示した。ERFX及びOFLXのMIC₉₀は1990年代後半にピークを形成し、その後低下した。

5) FQ感受性とトポイソメラーゼ変異

N感受性の5株とN耐性の9株を選び、トポイソメラーゼ遺伝子のQRDRの塩基配列からアミノ酸置換部位の特定を試みたところ、N耐性株では*gyrA*遺伝子の87番目のアスパラギン酸(Asp)がチロシン(Tyr)に変異していることが明らかとなった。本研究では単一の変異しか認められないにもかかわらず、FQに対するMICは不定であり(表3)、特にOFLXでは*GyrA*変異の認められた9株の中でMICが8倍異なる例も認められ、トポイソメラーゼ変異以外の耐性化機構の関与が示唆された。

6) *gyrA*復帰変異と*acrRAB*欠失変異がFQ感受性に及ぼす影響の解析

AcrAB-TolCシステムはサルモネラの主要な多剤排出ポンプである。SDのFQ低感受性に対する本システムの関与を検証する目的で、表3で強調した6株を用いて*acrRAB*遺伝子欠失変異株及び*gyrA*復帰変異株を作出し、親株との間でキノロン系薬剤に対するMICを比較した。

表4にNとERFXに対するMICを、表5にCPFX及びOFLXに対するMICを示した。Nでは*gyrA*復帰変異株の方が*acrRAB*遺伝子欠失変異株よりもMICの減少幅が大きかった。FQでは*acrRAB*遺伝子欠失変異株の方が*gyrA*復帰変異株よりもMICの減少幅が大きく、親株のMICが大きい株ほど*acrRAB*遺伝子欠失変異によるMICの減少幅が大きい傾向が示された。

D. 考察

SDは1976年、大分県で乳用雄仔牛に発生したサルモネラ症の原因血清型として、わが国では初めて検出された。当初の分離菌は1型の薬剤感受性菌であったが、1980年代前半に獲得したRプラスミドが、本菌の日本全国への分布域拡大に寄与したものと考えられる。Rプラスミド保有菌(2~6型菌)は1990年代前半まで全体の70%以上を占めていたが、1990年代後半には25%以下となり、変わってK及びNに耐性を示す1型菌が優勢となった(表2)。また、Nに対するMICは1980年代後半には典型的な2峰性分布を示し、それ以降は分離菌のほとんどがN耐性を示した(図2)。1980年代後

半に、SD による牛サルモネラ症の治療薬として、N が多用されたと言われており、これを反映した変化かも知れない。

N 耐性はトポイソメラーゼのアミノ酸置換により引き起こされることが知られており、変異が蓄積することでヒトの治療薬として重要な FQ にも耐性を示すようになる。今回の調査では N 耐性 SD に単一のアミノ酸置換 (Asp87Tyr) を認めしたが、それらの株の FQ に対する MIC は不定であった。そこで主要な多剤排出ポンプである AcrAB-TolC システムの関与を疑い、*acrRAB* 遺伝子欠失変異株及び *gyrA* 復帰変異株を作出し、親株との間でキノロン系薬剤に対する MIC を比較した。その結果、N では *gyrA* 復帰変異株の方が *acrRAB* 遺伝子欠失変異株よりも MIC の減少幅が大きく、FQ では *acrRAB* 遺伝子欠失変異株の方が *gyrA* 復帰変異株よりも MIC の減少幅が大きい傾向が示されたことから、アミノ酸置換、Asp87Tyr は N の野外における使用により選択されたもので、N 耐性に加えて FQ に低感受性を示した株では AcrAB-TolC システムが FQ 抵抗性に関与していることが示唆された。

多剤排出システムは通常の見現レベルでは生得的な薬剤耐性に関与するが、過剰見現により獲得耐性にも関与することが知られている。*S. Typhimurium* では AcrAB-TolC システムが CPFY 耐性に関与する主要なメカニズムであることが報告されており、SD でも FQ 低感受性に同システムが関与しているものと推察される。FQ がわが国の動物用医薬品市場に導入さ

れたのは 1990 年代前半であり、当時、野外において FQ が第一選択薬剤として多用された。しかし、FQ はヒトの治療薬としても重要であることから、動物疾病の予防、治療の第一選択薬剤としての使用は控えるべきであるとの認識が、現在では広く現場に普及するに至っている。ERFX 及び OFLY の MIC₉₀ が 1990 年代後半にピークを形成し、その後低下したことは、このような FQ の野外における使用状況を反映したものかも知れない。

E. 結論

1981 年から 2005 年の 25 年間に国内の牛から分離した SD 161 株の薬剤感受性を調査したところ、R プラスミドの保有状況やキノロン系薬剤に対する感受性において、野外での薬剤使用状況を反映したと推察される変化を認めた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 秋庭正人、喜田宗敬、中岡祐司、内田郁夫、吉井紀代、中澤宗生. 2006. わが国の牛から分離された *Salmonella* Dublin の薬剤感受性. 第 142 回日本獣医学会学術集会. 2006 年 9 月 22 日. 山口.
2. Akiba M., Uchida I., Yoshii N., and Nakazawa M., Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from cattle in Japan, 10th International Symposium on Toxic Microorganisms, Nov. 8, 2006, Washington D.C., US

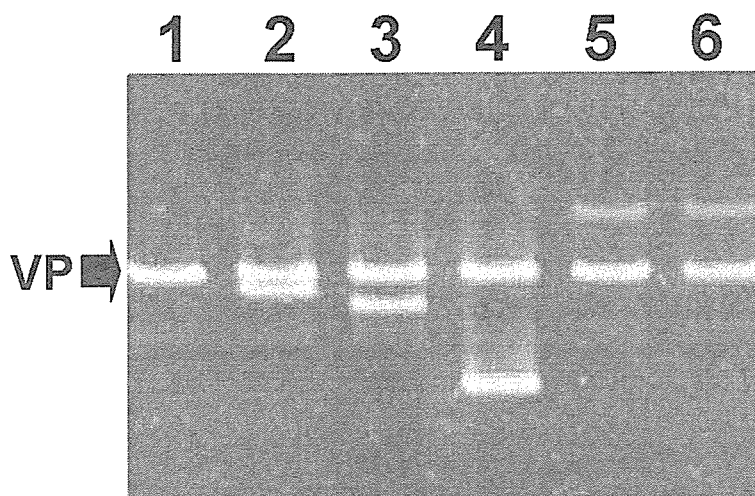


図1. *S. Dublin* のプラスミドプロファイル
VP: 75 kb 病原性プラスミド

表1. 薬剤耐性型と保有プラスミドによる型別

型	薬剤耐性型	保有プラスミド	株数(%)
1	感受性または耐性 ¹	75	60 (37.3)
2a	TSKA	75, 60	12 (7.5)
2b	TSKAN	75, 60	62 (38.5)
3	SKAN	75, 54	18 (11.2)
4	SKNC	75, 45	1 (0.6)
5	TSKANC	75, 200	1 (0.6)
6	TSKANCTm	75, 208	1 (0.6)
UT ²	-	-	6 (3.7)

T:テトラサイクリン、S:ストレプトマイシン、K:カナマイシン

A:アンピシリン、N:ナリジクス酸、C:クロラムフェニコール

Tm:トリメトプリム

¹S、K、Nのいずれかに耐性

²プラスミド非保有または機能不明プラスミド保有