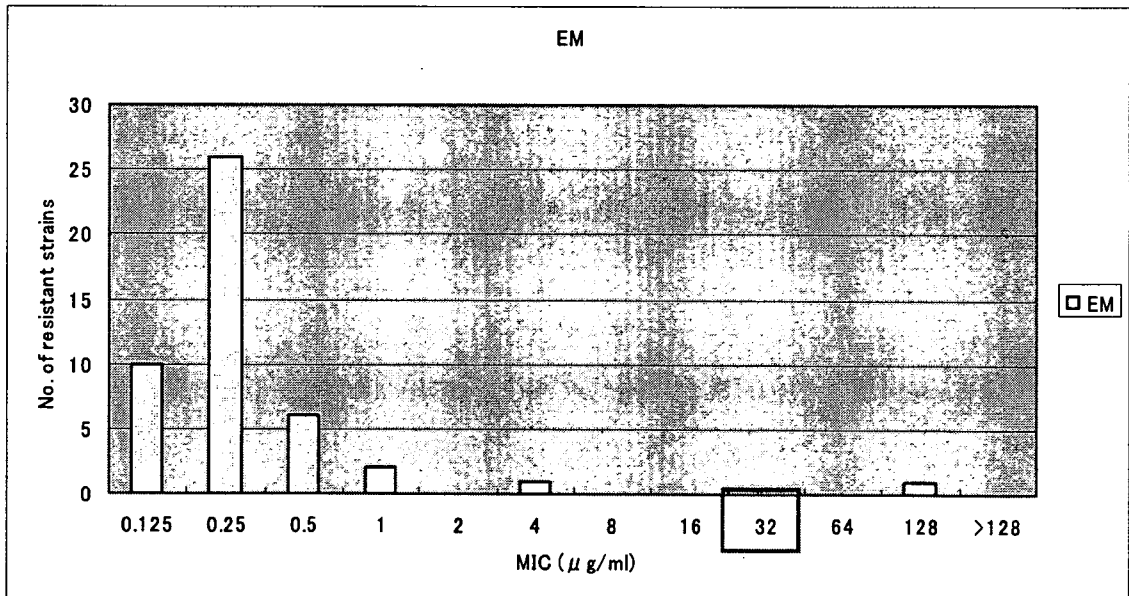
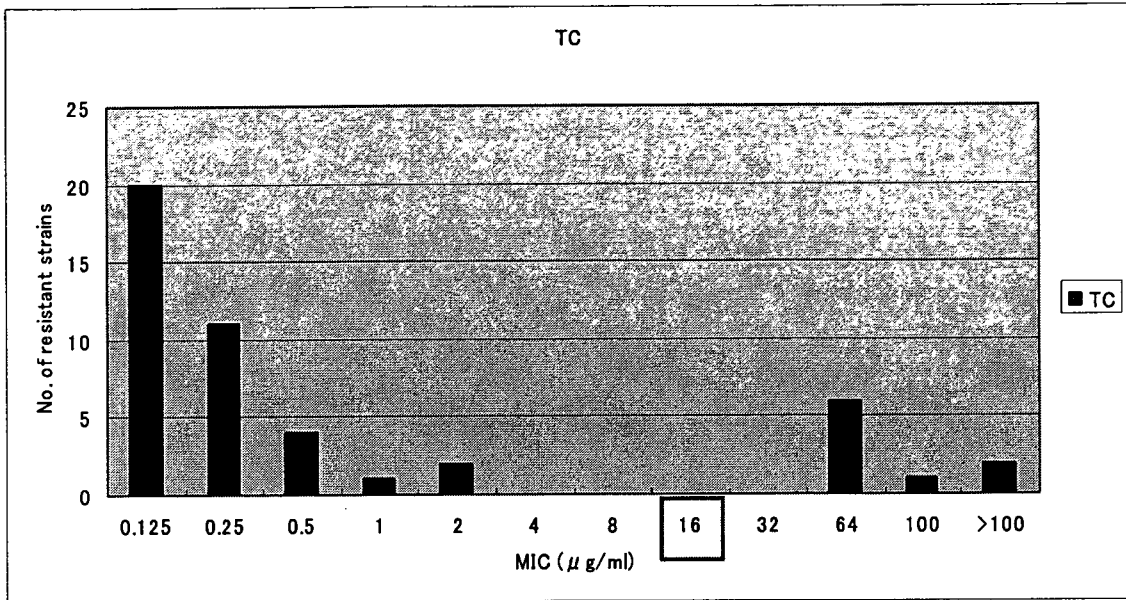


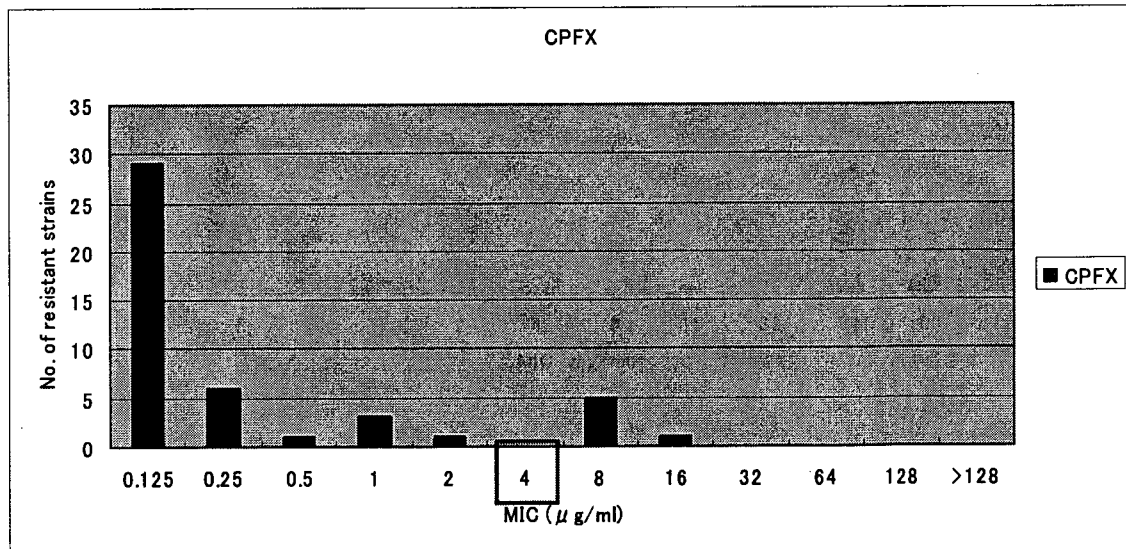
**☒ 2. Nalidixic acid resistance**



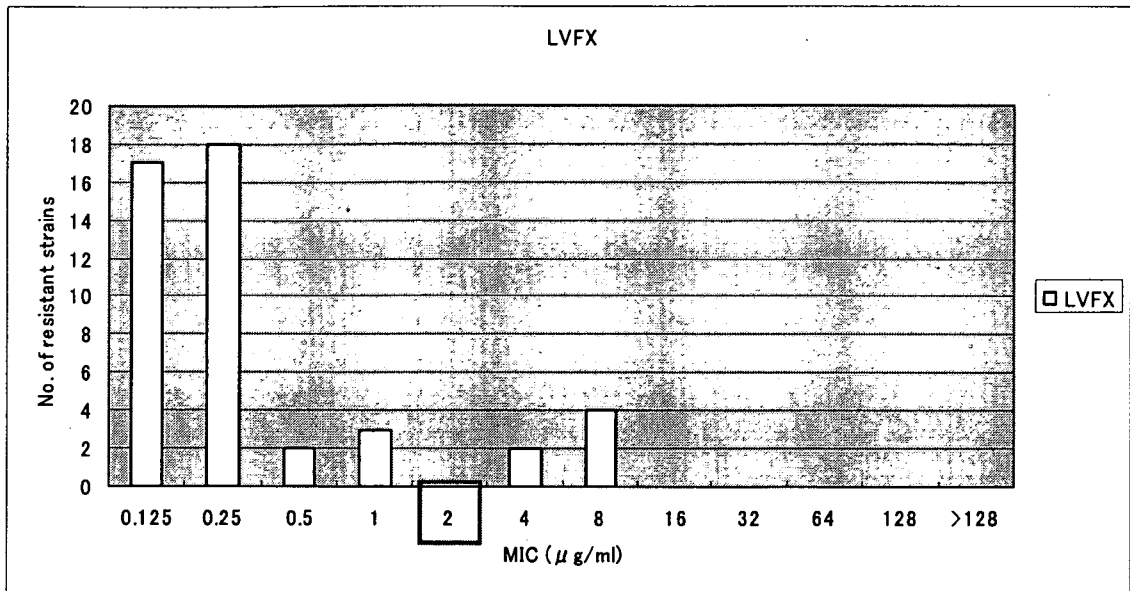
**☒ 3. Erythromycin resistance**



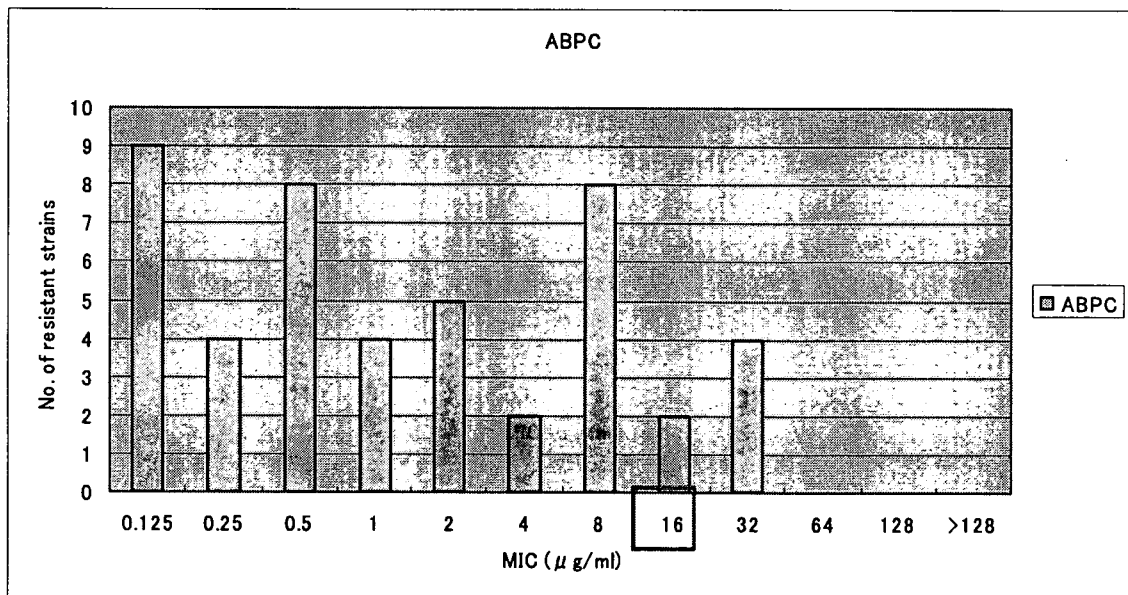
**☒ 4. Tetracycline resistance**



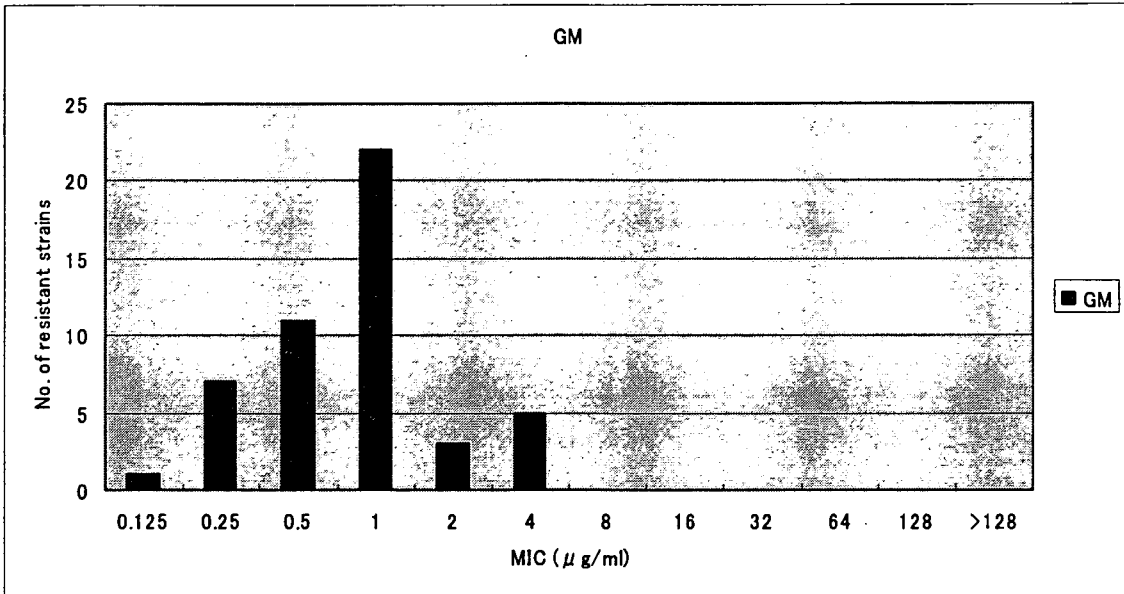
**☒ 5. Ciprofloxacin resistance**



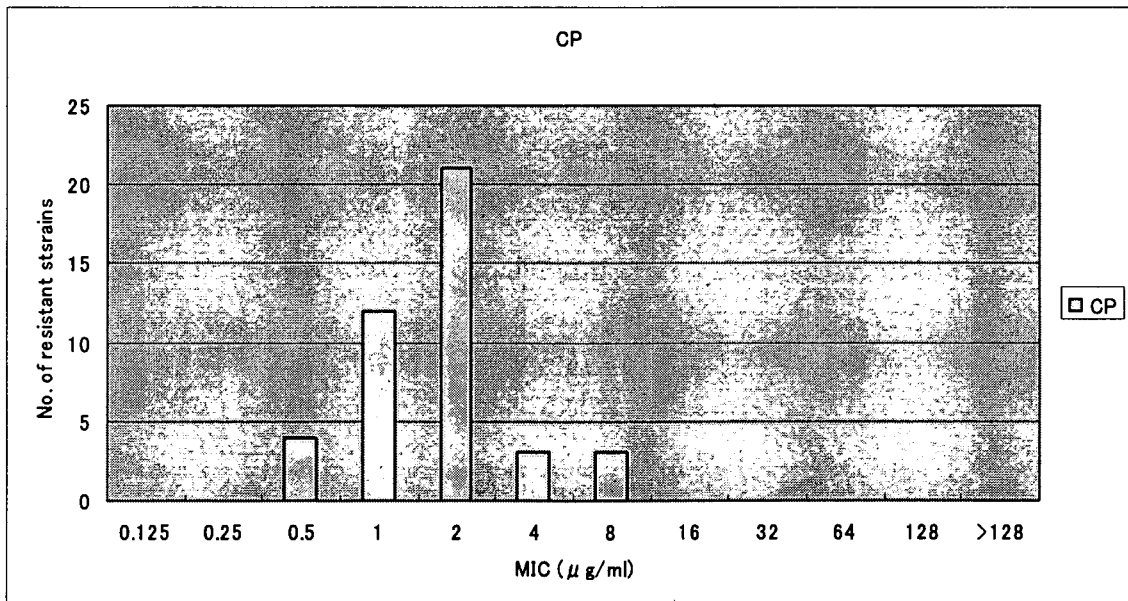
☒6. Levofloxacin resistance



☒7. Ampicillin resistance

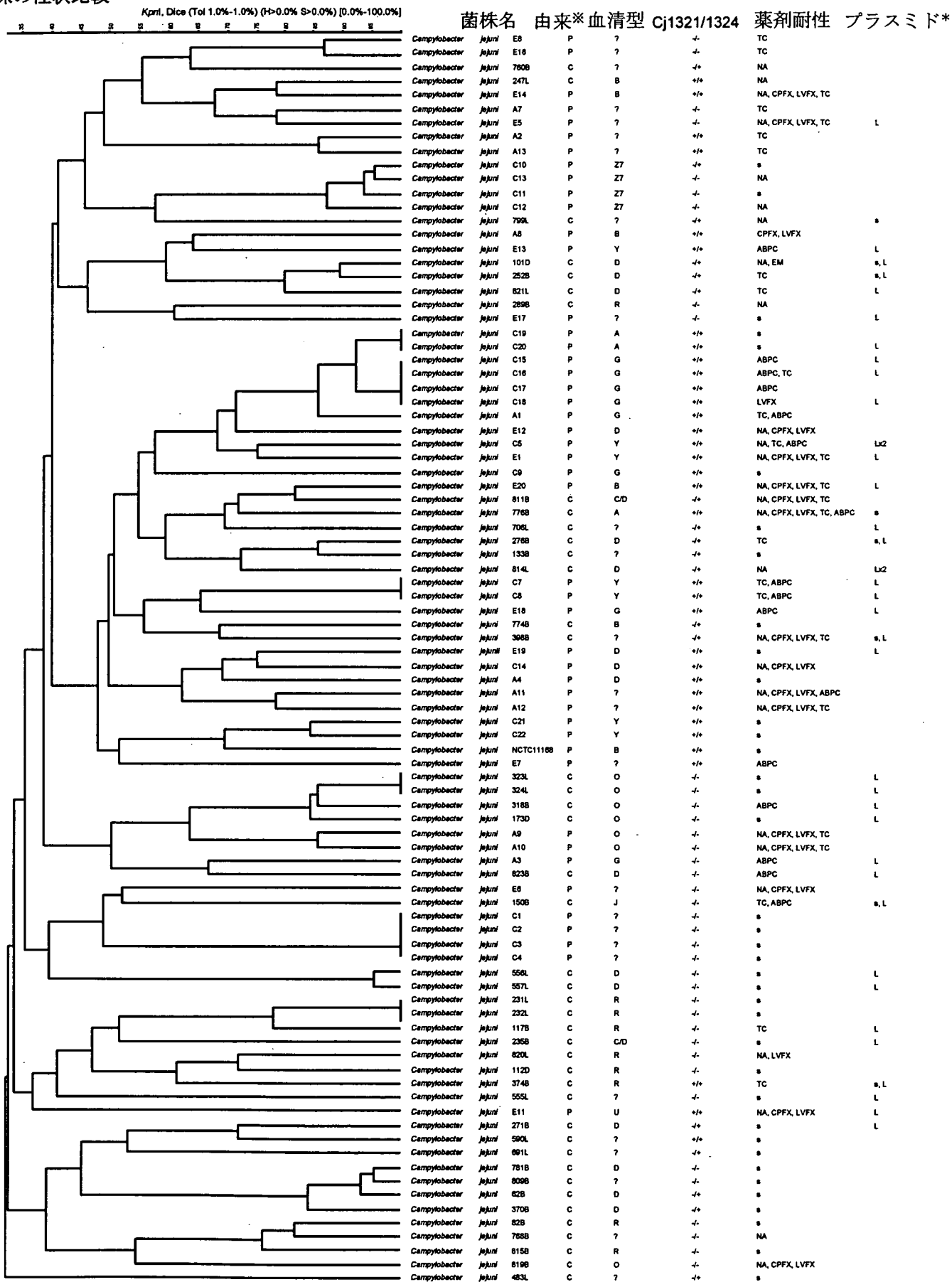


☒8. Gentamicin resistance



☒9. Chloramphenicol resistance

図10 パルスフィールドゲル電気泳動パターンによる牛・鶏由来*Campylobacter jejuni* 分離株の系統樹解析および各菌株の性状比較



※: P(鶏由来)、C(牛由来)

\*: s(小型プラスミド保有)、L(巨大プラスミド保有の可能性有)

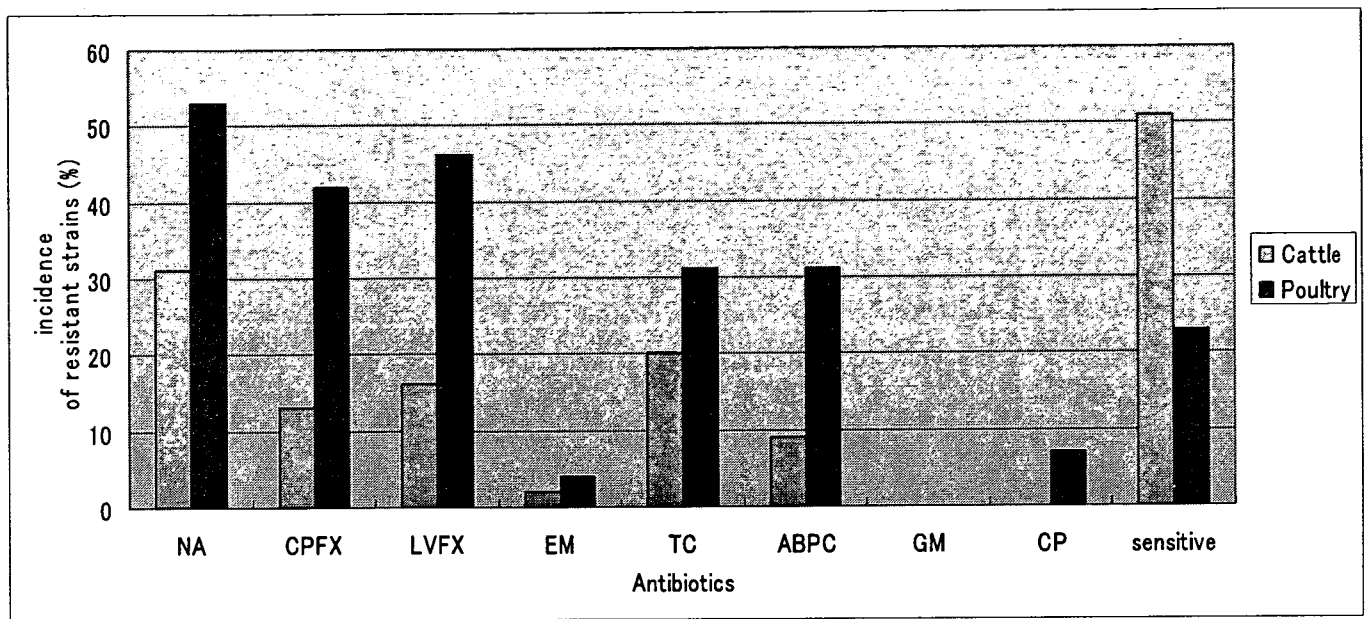


図11 各種抗生物質耐性株出現頻度の比較  
(鶏由来株・牛由来株)

表1

MP法によるカンピロバクターの抗生物質耐性獲得情況の比較 (2005-6年分離株)

抗生物質	分離株総数	市販鶏肉由来株 (%)	牛肉由来株 (%)
NA耐性	72	(53)	14 (31)
CFPX耐性	57	(42)	6 (13)
LVFX耐性	63	(46)	7 (16)
TC耐性	43	(31)	9 (20)
EM耐性	6	(4)	1 (2)
ABPC耐性	43	(31)	4 (9)
GM耐性	0	(0)	0 (0)
CP耐性	10	(7)	0 (0)
8薬剤感受性株	32	(23)	23 (51)

表2

カンピロバクターの抗生物質耐性獲得状況比較 (2006年ヒト分離株及び2005-6年鶏、牛由来株の比較)

抗生物質	ヒト臨床由来株 <sup>※</sup> (%)		市販鶏肉由来株 <sup>*</sup> (%)		牛肉由来株 <sup>*</sup> (%)	
	分離株総数					
抗生物質	分離株総数	655		137		45
NFLX耐性		214 (33)		56 (44)		NT <sup>**</sup>
OFLX耐性		213 (33)		58 (42)		NT
CPFX耐性		214 (33)		57 (42)		6 (13)
NA耐性		202 (31)		71 (52)		14 (31)
TC耐性		108 (16)		42 (31)		9 (20)
EM耐性		2 (0)		6 (4)		1 (2)
6薬剤感受性株		330 (50)		47 (34)		24 (53)

※:ヒト臨床株のデータはカンピロバクター・リファレンスセンターより2006年度のデータの提供を受けた。

\* :MP法によりMICおよび耐性・感受性を判定。

\*\* :Not tested

平成19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：石川 整（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：浅井鉄夫、小池良治、小澤真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）

## 要旨

2005~2006年の2年間に収集した全国的な健康家畜及び病性鑑定畜（病畜）に由来するサルモネラのモニタリングでは、薬剤耐性に大きな変動は見られていない。しかし、ERFX耐性は、病畜由来では牛由来 Typhimurium（1株）で認められ、CEZ耐性は、健康家畜由来株で同一個体から分離された Infantis(2株)、病畜由来株で Typhimurium(牛由来2株)、Infantis(プロイラー由来1株)及び Newport(牛由来1株)に認められた。また、プロイラー鶏由来 CEZ耐性サルモネラ4株を用いて作出したトランスコンジュガントでは、セファロスポリン耐性以外に OTC、DSM、SDMX耐性の伝達が認められたが、分離農場では、1農場で ABPC と ST 合剤が使われていたが、他の農場で抗菌剤は使用されていなかった。プロイラー鶏由来サルモネラにおいて、*S. Schwarzengrund* の分離地域が2005年1県、2006年2県、2007年4県と2005年以降増加し、分離株間のクローナリティーが高く、BCM耐性を保有していた。一方、家畜由来 *Campylobacter jejuni* の Penner の血清型と薬剤感受性を調べたところ、G群において ABPC に対する耐性率が高く、血清型による ABPC 耐性への影響が示唆された。

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. 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、拡散しているのかと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)畜産現場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) は、1999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、その中で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、健康家畜及び病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、2007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. 材料と方法

### 1. 供試サルモネラ

サルモネラの薬剤感受性試験には、2006年に健康動物(牛、豚及び鶏)の糞便から分離された64株(肥育牛由来0株、肥育豚由来6株、採卵鶏由来8株及びブロイラー由来47株)と病畜等から分離された111株(牛由来35株、肥育豚由来25株、鶏由来51株及びその他由来1株)を供試した。

ブロイラー関連CMY-2型βラクタマーゼ産生サルモネラとして、2005～2006年に健康なブロイラーから分離された*S. Infantis* 2株とO型別不能(H:r/1, 5) 1株及び2002～2003年に市販鶏肉から分離された*S. Infantis* 2株の各種βラクタム剤に対する感受性を調べた。プラスミド性CMY-2型βラクタマーゼ産生サルモネラ4株を用いて、接合伝達試験(メンブランフィルター法)を行い、トランスコンジュガントの薬剤感受性を調べた

健康家畜の薬剤耐性発現調査で、ブロイラー由来サルモネラにおいて、Schwarzengrundの比率の増加及び分離地域の拡大傾向が認められたため、1999年(1県2個体由来2株)、2005年(1県4個体由来4株)、2006年(2県6個体由来6株)及び2007年(3県6個体由来6株)に分離された計7県18個体由来18株を用いて、PFGE型を調べた。

### 2. 供試カンピロバクター

2001～2006年に国内の健康家畜(牛、豚及び鶏)から分離された*C. jejuni* 601株を本試験

に供試した。Pennerの血清型別は、市販の抗原を用いて実施した。

### 3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、CLSI(旧NCCLS)のガイドラインに準拠した寒天平板希釈法及びE-testで実施した。各薬剤の耐性限界値(ブレイクポイント)は、サルモネラについてはCLSIのガイドライン及び既報(J Antimicrob Chemother. 53: 266-270, 2004.)、カンピロバクターについては既報(J. Appl. Microbiol. 100: 153-160, 2006)に従い設定した。

## C. 結果

### 1. 2006年度分離サルモネラの薬剤感受性

健康動物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32株(全てブロイラー由来)で、約半数を占めていた(表1)。一方、病畜由来株の血清型は、28種類認められ、そのうち*S. Typhimurium*が36株(32.4%)と最も多く、次いで*Infantis*が16株(14.4%)であった(表2)。

健康動物由来株では、DSM及びOTCに対する耐性率は70%以上を示し、KM、BCM及びTMPに対する耐性率は約30%であった。一方、病畜由来株では、DSM及びOTCに対する耐性率は約50%で、ABPC、KM及びNAに対する耐性率は約20%を示した。病畜由来株では、CEZ耐性が4株(*Typhimurium* 2株、Newport 1株、*Infantis* 1株)及びERFX耐性が1株(*Typhimurium*)で認められた(表3)。

2004～2006年に健康家畜及び病畜から分離されたサルモネラの血清型を由来動物及び年度別に集計した(表1及び2)。病畜由来では主に牛と豚に由来する*Typhimurium*の割合が最も多く、鶏に由来する*Infantis*が次いでい

た。健康家畜由来株では、ブロイラー鶏に由来するInfantisが最も優勢であった。

2004～2006年に分離された*S. Infantis*の薬剤感受性を由来動物別に集計した(図1)。ブロイラー由来株では、DSM、KM、OTC、TMPに対する耐性率は、採卵鶏及び豚由来株より高い傾向が見られた。2001～2003年に調査した*S. Infantis*の成績と比べると、DSM及びKMに対する耐性率の低下とNAに対する耐性率の上昇が認められた(表4)。

## 2. ブロイラー由来 CMY-2 型 βラクタマーゼ産生サルモネラ

CMY-2型βラクタマーゼ産生サルモネラ4株の各種βラクタム剤に対するMICを、表5に示した。トランスコンジュガントの薬剤感受性を調べたところ、セファロスポリン耐性以外にOTC、DSM、SDMX耐性の伝達が認められた(表6)。分離された4農場における薬剤使用状況は、1農場でABPCとST合剤が使われていたが、他の農場で抗菌剤は使用されていない。

## 3. ビコザマイシン耐性 *S. Schwarzengrund*

*S. Schwarzengrund*の薬剤感受性は、DSM、KM、OTC、BCMあるいはTMPの薬剤に耐性を示し、全ての株がBCM耐性を保有していた。PFGE型は、XbaIで2種類、BlnIで5種類のプロファイルに分類され、2つのクラスターに分類された。2005年以降に分離された株は、1株を除いて、1999年分離2株とは異なる1つのクラスターに分類された(図2)。

## 4. 家畜由来カンピロバクターのPenner血清型と薬剤感受性

2001～2004年度に健康家畜の糞便から分離された*Campylobacter jejuni* 601株について、

Penner血清型の分布を調べた。B群、D群、G群及びY群が多く、その他は5%未満であった(図3)。4種類の血清群を対象に薬剤耐性率を比較したところ、G群においてABPCに対する耐性率が高かったが、その他の薬剤に対する耐性率に血清型による違いは見られなかった(図4)。

## D. 考察

2004～2006年に健康家畜及病畜びから分離されたサルモネラの血清型を由来動物及び年度別に集計した結果、Typhimuriumは、牛(67%, 92/137)や豚(49%, 40/81)のサルモネラ症の主要な原因血清型となっている。宿主適応性サルモネラであるDublin及びCholeraesuisは、それぞれ牛(5%, 7/137)及び豚(31%, 25/81)で2番目に多い血清型である。Typhimuriumの薬剤耐性については、昨年の本研究班で報告した(Kawagoe et al., J. Vet. Med. Sci. 69: 1211-1213, 2007.)。近年、Choleraesuisについては、と畜場出荷豚のと畜検査で、肝病変保有豚から分離され、公衆衛生上の問題となっているため、今後の疫学研究が必要な血清型と考えている。

Infantisは、健康なブロイラー由来株の約70%を占め、依然として最も優勢な血清型である。近年分離されたInfantisの薬剤耐性を集計し、過去の成績と比較した。また、2005年以降、ブロイラー由来サルモネラのうち、Schwarzengrundの占める割合が増加し、分離される地域も拡大しているため、PFGEによる分子疫学的解析を行った。

ブロイラー由来 Infantis の薬剤感受性は、NA 耐性の増加がみられている。この増加が、ブロイラーで流通しているキノロン剤及びフルオロキノロン剤に起因しているかは明らかでは

ないが、今後も十分な監視が必要と考えられる。また、DSM 及び KM 耐性の減少がみられるが、この点についても流行株の遺伝子型の変化も含めた疫学解析が必要といえる。

Schwarzengrund は、2005 年以降同一の PFGE 型の株が分離されていることから、同一起源由来株による汚染拡大が示唆されている。この血清型が、10 年以上国内のプロイラー農場で優勢であった *Infantis* と置き換わっているのか、非汚染農場に侵入しているのか不明であるが、分離地域も拡大しているため、注視すべき状況といえる。また、本血清型は、侵入性サルモネラ患者からも分離される血清型であること、キノロン耐性を獲得しやすい可能性があることなどが海外で報告されており、継続的なモニタリングと汚染拡大の防止に向けた取り組みが必要といえる。

今回、プロイラー由来セファロスポリン耐性サルモネラを用いて、抗菌剤使用の耐性発現への影響を検討した。セファロスポリン系抗菌剤が国内では鶏に承認されていないため、その他の抗菌剤の関与を評価するため、セファロスポリン耐性遺伝子と共伝達 (co-transfer) する薬剤の系統を、トランスコンジュガントの耐性型から特定した。共伝達した耐性には国内で最も使用されている TC 耐性が含まれていたが、分離された 3 農場中 1 農場で PC 系あるいはサルファ剤 (ST 合剤) の使用による共選択 (co-selection) の関与が示唆されたのみであった。他の 2 農場では、抗菌剤及び抗菌性飼料添加物は使用されておらず、抗菌性物質の使用による出現ではなかった。近年、牛由来株を含めて、継続的にセファロスポリン耐性サルモネラが分離され、家畜間でのセファロスポリン耐性サルモネラの蓄積

が示唆されている。健康家畜由来大腸菌におけるセファロスポリン耐性が低率ではあるが継続的に認められている。国内で分離されたセファロスポリン耐性大腸菌から遺伝子の伝播が行われた可能性や、特定の起源に由来するセファロスポリン耐性サルモネラの拡散は、家畜衛生及び公衆衛生上重要な問題として捉え、継続的に調査研究を実施していく必要があるといえる。

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されている。しかし、サルモネラに関しては、セファロスポリン耐性サルモネラの分布は、農場レベルでの薬剤使用との関連性は不明で、耐性因子の由来等を検討していかなければならない。また、プロイラー農場における薬剤耐性 Schwarzengrund 汚染の拡大は、鶏群におけるサルモネラ伝播様式の知見として今後の疫学対策につながると考えられる。

*C. jejuni* では、採卵鶏由来株に比べ、牛や肉用鶏由来株で薬剤耐性菌が多く認められることを既に報告してきた。サルモネラでは、家畜別で耐性率に違いが見られるが、血清型やファージ型による特徴的な耐性発現も知られているため、これまでに収集した *C. jejuni* の血清型と耐性保有状況について検討した。家畜由来 *C. jejuni* では由来家畜により耐性率が異なる傾向があるため、血清群間で耐性率を比較するとともに、血清群ごとに由来動物別耐性率を解析することで、由来動物の影響を考慮した。国内の家畜で分離頻度の高い、B 群、D 群、G 群及び Y 群を対象に ABPC、DSM、OTC、CP 及び ERFX に対する耐性率の解析を行ったところ、G 群で高い ABPC 耐性が認め

られ、その他の薬剤では、血清型の影響は見られなかった。血清群及び畜種別薬剤耐性率を比較したところ、G群で採卵鶏及び肉用鶏由来株共に高いABPC耐性率を示したが、D群では肉用鶏由来株のみで高率であったこと、B群やY群では採卵鶏と肉用鶏由来株共に低率であったことから、構成する動物種のみの影響に起因しているとは考えられなかった。したがって、国内の*C. jejuni*において血清型によるABPC耐性の発現状況に違いがある可能性が示唆された。

フルオロキノロン耐性はG群で低い傾向が見られたが、由来動物種の影響と考えられた。フルオロキノロン剤が家畜に使用されて以降、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ている。血清群及び畜種別薬剤耐性率を比較したところ、4血清群で共通して、採卵鶏由来株の耐性率は低く、大腸菌やサルモネラで見られる動物別のERFX耐性率の傾向と同様であった。G群の採卵鶏由来株の割合(62.9%)が、B群(49.6%)、D群(28.4%)及びY群(50%)に比べて高いことが、ERFXに対する耐性率がG群で低い傾向を示した要因と考えられた。今回、B群、D群、G群及びY群のみを対象に血清群別耐性率の解析を行ったが、*C. jejuni*の血清型の割合は、各国・地域で特有である。他の血清群における耐性率は、各国・地域に由来する株を用いて、同様の試験を実施することで明らかにすることができると思われる。

#### E.健康危害情報

家畜に分布するサルモネラにおいて、セファロスポリン耐性の蓄積傾向が認められ、また、プロイラーにおける新たな血清型の

浸潤拡大傾向が認められた。薬剤耐性サルモネラとカンピロバクターの各種性状を詳細に解析することにより、人-食肉-家畜間での薬剤耐性菌の伝播の低減に向けた取り組みへと繋げていく必要がある。

#### F.研究発表

(1)Asai, T., Harada, K., Ishihara, K., Kojima, A., Sameshima, T., Tamura, Y., Takahashi, T. Association of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food-producing animals with antimicrobial use on farms. Jpn. J. Infect. Dis. 60: 290-294, 2007.

(2)Kawagoe, K., Mine, H., Asai, T., Kojima, A., Ishihara, K., Harada, K., Ozawa, M., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H., Honda, E., Takahashi, T., Sameshima, T. Changes of multi-drug resistance pattern in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. J. Vet. Med. Sci. 69: 1211-1213, 2007.

表1 2004～2006年度に分離されたサルモネラの血清型

血清型	豚			ブロイラー			探卵鶏			合計			
	2004	2005	2006 計	2004	2005	2006 計	2004	2005	2006 計				
S.Infantis				14	19	32	65			2	67		
S.Schwarzengrund					8	12	20			2	22		
S.Typhimurium	4	2	8								8		
S.Enteritidis		1	1							2	5		
Hader				1	2	3				2	5		
S.Mbandaka						1	1			2	5		
S.Cerro										2	4		
S.Montevideo				2		2	4			2	4		
Thompson	2		2							1	3		
S.Agona			2								2		
S.Choleraesuis		2	2								2		
S.Kottbus		2	2								2		
S.Litchfield			2								2		
S.Livingstone			2								2		
S.Newport					2		2				2		
Bareilly	2		2							1	1		
型別不能										2	2		
合計	8	6	9	23	17	31	47	95	10	4	8	22	140

表2 病畜由来株におけるサルモネラの血清型  
—2004~2006—

2004		2005		2006	
血清型	n=73	血清型	n=128	血清型	n=111
Typhimurium	35	Typhimurium	68	Typhimurium	36
Choleraesuis	8	Infantis	15	Infantis	20
Enteritidis	8	Choleraesuis	7	Choleraesuis	10
Infantis	3	Enteritidis	5	Kentucky	7
Dublin	3	Dublin	3	Enteritidis	6
Newport	3	Mbandaka	3	Thompson	3
その他血清型	11	Newport	3	Virchow	2
型別不能	2	Agona	2	Corvallis	2
		Montevideo	2	Shwarzengrund	2
		Thompson	2	Othmarschen	2
		Virchow	2	その他血清型	17
		Oranienburg	2	型別不能	4
		その他血清型	9		
		型別不能	5		

表3 2006年度に分離されたサルモネラの薬剤感受性

	健康畜 (n=64)				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	512	8	12.5	1	>512	29	26.1
CEZ	32	1	2	2	3.1	1	4	4	3.6
DSM	32	64	256	53	82.8	32	512	61	55.0
KM	64	2	>512	25	39.1	2	>512	25	22.5
GM	16	0.5	1	0	0	1	2	5	4.5
OTC	16	128	256	50	78.1	1	256	51	45.9
CL	16	1	4	0	0	1	1	0	0
CP	32	8	8	0	0	4	256	19	17.1
NA	32	4	8	5	7.8	4	256	20	18.0
ERFX	2	≤0.125	≤0.125	0	0	≤0.125	0.5	1	0.9
TMP	16	0.25	>512	25	39.1	0.5	>512	18	16.2

# 表4 ブロイラー由来Infantisの薬剤耐性率の比較

	2001-2003 n=70	2004-2006 n=87
薬剤		
ABPC	0	6.9
CEZ	0	4.6
DSM	97.1	86.2 *
GM	0	0
KM	70.0	47.1 **
OTC	92.9	85.1
NA	10.0	26.4 **
ERFX	0	0
TMP	52.9	52.9

年度間で有意差あり \* P<0.05, \*\* P<0.01



表5 ブロイラー由来サルモネラのβ-lactumに対する感受性

Antimicrobial	MIC (μg/ml) for isolate:						
	GF73	GF113	17-PLS-18	17-PLS-19	18-PLS-18	18-S-C-13	
Amoxicillin	CMY-2	CMY-2	CMY-2	CMY-2	CMY-2	CMY-2	CTX-M-2
	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Cefazolin*	512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
Cefiofur*	16	32	64	64	32	>512	>512
Cefotaxime	4	4	8	8	8	64	64
Cefpodoxime	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Cefepime	0.094	0.125	0.25	0.25	0.38	8	8
Cefoxitin	32	96	>256	96	96	2	2
Aztreonam	1	1.5	6	4	4	4	4
Imipenem	0.094	0.094	0.125	0.19	0.19	0.064	0.064

- \*の薬剤は、寒天平板希釈法で実施し、その他の薬剤は、E-testで実施した。

# 表6 トランスコンジュガントの薬剤耐性型及び 分離農場における抗菌性物質の使用状況

株名	元株名・由来(分離年)	耐性パターン	抗菌剤	飼料添加物
pGF113-1	GF113・鶏肉(2003)	ABPC-CEZ-DSM-OTC-SDMX	不明	不明
p17-PLS-18-2	17-PLS-18・ブロイラー(2005)	ABPC-CEZ-DSM-OTC-CP-SDMX	ABPC、 SMMX/OMP	なし
p17-PLS-19-1	17-PLS-19・ブロイラー(2005)	ABPC-CEZ-DSM-OTC-CP-SDMX	なし	なし
p18-PLS-18-1	18-PLS-18・ブロイラー(2006)	ABPC-CEZ-DSM-OTC-SDMX	なし	なし

ABPC: Ampicillin, SMMX/OMP: Sulfamonomethoxine/Ometoprim

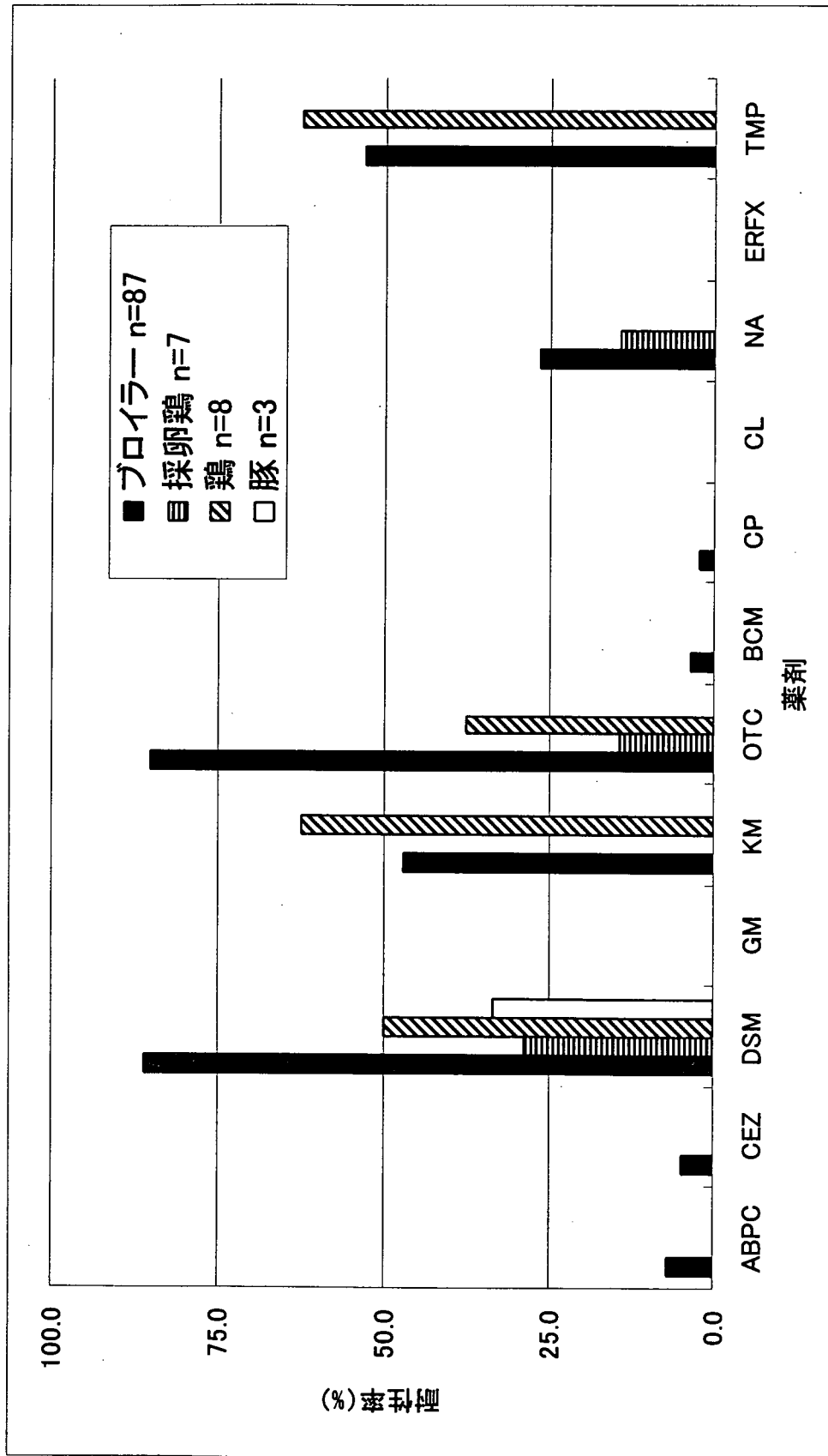


図1 由来動物別*S. Infantis*の薬剤感受性

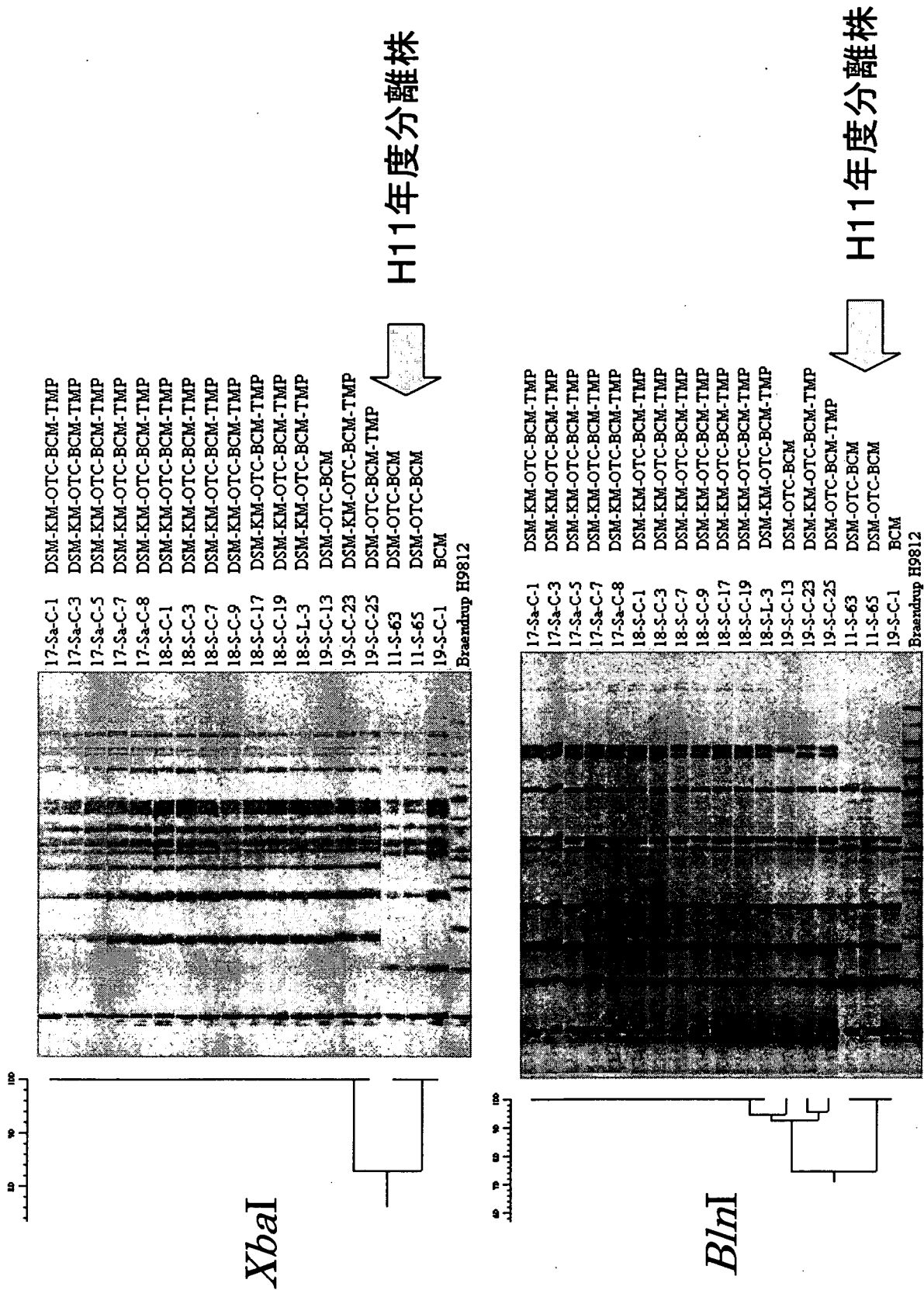


図2 ブロイラーから分離されたS. SchwarzengrundのPFGE型