

表3 2007年に分離された *C. coli* のMIC値
(東京散发患者由来 13株)

	MIC(μ g/ml)												
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128(100)	128(100)<	256
NA	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0	0	8
CPFX	2	3	0	0	0	0	0	4	3	0	1	0	0
LVFX	0	3	2	0	0	1	3	2	1	0	1	0	0
EM	0	0	3	0	6	1	0	0	0	0	1	2	0
TC	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	8	0
ABPC	0	0	0	0	0	2	1	4	5	0	0	1	0
GM	0	0	1	9	3	0	0	0	0	0	0	0	0
CP	0	0	0	0	0	1	9	2	0	0	1	0	0

表4. 食肉における黄色ブドウ球菌およびMRSAの検出

検体	検体数	陽性数(%)	
		<i>S.aureus</i>	MRSA
鶏肉	54	22 (40.7)	0
豚肉	79	36 (45.6)	1 (1.3)
牛肉	123	58 (47.2)	1 (0.8)
その他	29	7 (24.1)	0
合計	285	123 (43.1)	2 (0.7)

MRSA検出食品の原産国

豚肉:アメリカ合衆国

牛肉(サイコロステーキ):オーストラリア

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

研究分担者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所
	浅井 鉄夫	農林水産省動物医薬品検査所
	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山本 茂貴	国立医薬品食品衛生研究所
	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
	山崎 学	国立医薬品食品衛生研究所
	石和 玲子	国立医薬品食品衛生研究所
	入口 翔一	国立医薬品食品衛生研究所
	横山 敬子	東京都健康安全研究センター
	西本 清仁	大分県食肉衛生検査所

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の提供を受け、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研究を進めた。

鶏は飼育中に生産性向上のため抗菌物質を使用するため、これが鶏由来カンピロバクター分離株に抗生物質耐性菌が高率に出現する一因と考えられている。一方、牛については一般的には飼育中にこのような目的で抗菌物質を使用しないため、鶏由来のカンピロバクター分離株と比較した場合、牛由来のカンピロバクター分離株は抗生物質耐性菌の出現率は低いものと推測される。

カンピロバクターの耐性評価には、ディスク法とマイクロタイタープレート法、寒天平板希釈法などが用いられるが、一般的にはディスク法が用いられている。MIC 測定にはマイクロタイタープレート法が適していることから、初年度は分離株についてこれらの試験法の違いによるデータの互換性を評価し、両者の値は 90% が一致し、ほぼ互換性があることを

確認した。続いて、大分県食肉衛生検査所から提供を受けた牛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の調査を行い、全国9箇所の地方衛生研究所の協力により収集された全国の鶏由来カンピロバクター分離株の抗生物質耐性獲得状況との比較を行った。その結果、牛由来カンピロバクター分離株においては、調査した全ての抗生物質について、鶏由来カンピロバクター分離株よりも耐性獲得株が少ないことが判明した。しかし、鶏由来分離株に比べて低頻度ではあっても、牛由来カンピロバクター分離株の中にも抗生物質耐性株が含まれており、これらの抗生物質耐性株の動物並びに環境中での挙動を推定するため、パルスフィールドゲル電気泳動法により、鶏由来カンピロバクター分離株と、牛由来カンピロバクター分離株のゲノムレベルの相関性を調べた。その結果から、ウシ型、ニワトリ型といったタイプが存在すること、一部で鶏と牛間のカンピロバクター菌株の移動があることが示唆された。さらに研究班の他の分担研究により分離されたカンピロバクター分離株を用いて同様な検討を進めた。

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（鶏肉および牛肉）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2005～2006年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法により得られた抗生物質耐性獲得状況を、同様に2006年に大分県食肉衛生検査所で分離された牛由来カンピロバクター分離株の提供を受け、MP法により得

られた抗生物質耐性獲得状況と比較した。

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。

上記10機関の分離株の一部について、パルスフィールドゲル電気泳動により、牛肝臓由来株と電気泳動パターンを比較しゲノムレベルの相関性を調べた。生産現場から

の分離株は、農水省動物医薬品検査所、ヒト臨床分離株は、大阪府立公衆衛生研究所及び東京都健康安全研究センターに協力を依頼し検討を行った。尚、ゲノムパターンを比較した株については、パルスフィールドゲル電気泳動と併せて、各種形質（Penner 血清型、PCR による遺伝子マーカーの検出、プラスミドの有無等）についての調査も行った。

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, CPF, 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, CPF, 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。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。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 (図 1 及び平成 18 年度分担研究報告書参照)。この基礎データを踏まえ、MP 法による市販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ヒト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、ヒト臨床分離株に比べ市販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。

ゲノムレベルでの比較を検討したカンピ

ロバクター分離株は、生産現場からの分離株 (農水省動物医薬品検査所)、食品としては、市販鶏肉由来株 (国立医薬品食品衛生研究所と 9 箇所の地方衛生研究所、日本冷凍食品検査協会仙台支所など) ウシ肝臓分離株 (大分県食肉衛生検査所)、ヒト食中毒臨床分離株 (大阪府立公衆衛生研究所、東京都健康安全研究センター) で、2005～2006 年に分離されたカンピロバクター・ジェジュニ株を対象とした。協力機関の県別所在地は図 2 に示した。耐性の評価はディスク法または MP 法により抗生物質 NA, TC, EM, CP, GM, ABPC, CPF, LVFX の 8 剤について、耐性獲得状況を明らかにした。牛肝臓由来株の 8 薬剤の耐性獲得状況は市販鶏肉由来株に比べ、低かった。大阪府に於いて食中毒事例から分離されたヒト臨床分離株 50 株の 6 薬剤の耐性獲得状況は市販鶏肉由来株に比べ低かった (平成 20 年度分担研究報告書参照)。市販鶏肉由来株と牛肝臓由来株の薬剤耐性獲得状況を比較したところ、検証を行った全ての抗生物質において、牛肝臓由来株に比べて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見られた (図 3)。しかしながら、牛の飼育中には一般的に抗生物質を使用しないにも関わらず、牛由来のカンピロバクター分離株にも低頻度ながら抗生物質耐性菌が含まれることが判明した。

一方、全国 9 地域から収集された市販鶏肉由来株の一部について、牛肝臓由来株とともにパルスフィールドゲル電気泳動法 (制限酵素は *KpnI* を使用) により、各分離株のゲノムを比較し、分離株同士の類縁関係を解析した (図 3)。市販鶏肉由来株、牛肝臓由来株はそれぞれに由来動物ごとの

クラスターを形成していることが判明した。市販鶏肉由来株は牛肝臓由来株のクラスターに比べ、より近縁な菌株が多数集合したクラスターを形成していた。更に、市販鶏肉由来株のクラスター内部には一部の牛肝臓分離株が含まれており、牛由来のカンピロバクター分離株の一部は鶏から移動した可能性が強く示唆された。また、少数ながらウシ型のクラスターにも一部鶏からの分離株が含まれており、鶏と牛の間で一部にカンピロバクター菌株の移動が起こりうると考えられた(図6)。

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を中心に、図5に示す各都府県において分離された市販鶏肉および牛肝臓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、

CPFX、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1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法の耐性の値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。

カンピロバクター食中毒の直接の原因となる危険性が高いのは、鮮度が高い状態で供給される食用肉や内臓肉であり、更に、生の喫食を前提としている食肉の場合は、危険性が増大する。わが国において、これらの条件に該当し、既にカンピロバクターによる汚染・感染事例が確認されている食肉として挙げられるものには鶏肉(鮮度が高い状態で供給される場合が多く、時に生あるいは不完全な加熱調理を行って喫食される)および「牛のレバ刺し」(生食を前提に鮮度の高い状態で供給されるため)がある。本研究では、これら2種の動物由来の食肉を重点的にモニターすることにより、ヒトへの感染を起こしうるカンピロバクターの抗生物質耐性獲得状況を効率よく把握できるものと判断した。

大分県食肉衛生検査所より 2006 年に分離された牛肝臓由来カンピロバクター分離株の提供を受け、抗生物質耐性獲得状況を調べた。更に、前年度に地方衛生研究所のネットワークにより図 2 に示す各都府県において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と比較した。

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。各種抗生物質に対する耐性菌のリスク分析にあたり、ヒトに感染を起こすカンピロバクターがどのような由来でどのような経路から感染しているかを明らかにすることは重要である。

生産過程において抗菌物質暴露されうる鶏肉に由来するカンピロバクター分離株には、抗生物質耐性菌が高頻度に出現することが調査により判明しているが、生産過程において抗生物質を一般的にはほとんど使用しない食肉（牛レバー）分離株をモニターし、両者の耐性獲得状況を比較することにより、生産過程における抗生物質の使用がどの程度ヒトにおける臨床的な耐性菌分離に影響を与えているかを示す目的で、収集した市販鶏肉由来株と牛肝臓由来株についての耐性獲得状況の比較を行った。

図 3 に示すとおり、比較を行った全ての抗生物質について、市販鶏肉由来株は牛肝臓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。鶏肉分離株の耐性獲得が高く、牛の肝臓からの分離株の耐性獲得が低値であることは予測通りであった。牛分離株がある程度の耐性を獲得していることからこの耐性獲得について検討を進め

た。図 4 に示すように鶏肉及び牛の肝臓分離株をバルスフィールドゲル電気泳動法によりゲノム分析を試み、遺伝子レベルで由来株の相関を解析した。図 5 にその結果を示す。牛肝臓由来株は図 5 下部にクラスターを形成し、このような遺伝子型がウシ型と呼ぶようなゲノムを持つと思われる。このクラスターに含まれる菌株の耐性獲得は稀でほとんどみられない。一方、図 5 の上部に示された菌株はニワトリ型のゲノムと思われる。そのほとんどに耐性獲得が見られる。興味深いのはこれらに牛肝臓由来株が認められる。この事実は鶏と牛の間である程度の菌株の移行が存在することを示すと思われる。菌株の移行により鶏で耐性を獲得したカンピロバクター菌株が牛へ移行しているものと考えられる。

研究班の研究分担者から臨床分離株の提供を受け、その耐性獲得状況を整理し、今後これらの臨床分離株のゲノムがニワトリ型かウシ型であるかは興味深い。市販鶏肉由来株の耐性頻度は、臨床分離株よりやや高い。市販鶏肉由来分離株、屠畜場にて分離される牛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すると同時に、抗生物質耐性菌の伝播経路の推定およびヒトへの感染経路の推定にも有用であると期待される。抗生物質耐性菌の伝播・循環経路を推定し、鶏-牛間および家畜（食肉製品）を介したヒトへの県境影響の評価を検討する上で、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、また既存のディスク法による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。

調査した全ての抗生物質において市販鶏肉由来株は牛肝臓由来株よりも高頻度に耐性を獲得していたことが明らかになる一方で、低頻度ながら牛肝臓由来株にも抗生物質耐性菌が含まれることが確認された。また、パルスフィールドゲル電気泳動によるゲノムの比較により、牛肝臓由来株の一部は鶏から移行したものである可能性が示唆された。これにより、カンピロバクターの鶏-牛間の移動により、抗生物質耐性株の伝播・拡散があることが示された。市販鶏肉由来株やと畜場での牛肝臓分離株における耐性獲得状況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ヒト臨床分離株における動物性食品を介すると思われる耐性株の傾向の予測が可能となりうる期待される。

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.

石和玲子、山崎学、岡田由美子、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信「市販鶏肉から分離されたカンピロバクター株の抗生物質耐性に関する検討」日本食品微生物学会 2007/9/28

論文発表

藤尾公輔、清水晃、松村浩介、河野潤一、北川浩、五十君静信。(2007) 市販食肉、ヒト、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性。日本食品微生物学会雑誌 24(2):100-106

Igimi S., Okada Y., Ishiwa A., Yamasaki M., Morisaki N., Kubo Y., Asakura H. and Yamamoto S. (2008) Antimicrobial resistance of *Campylobacter*: Prevalence and trends in Japan. Food Addit Contam. 25(9):1080-1083.

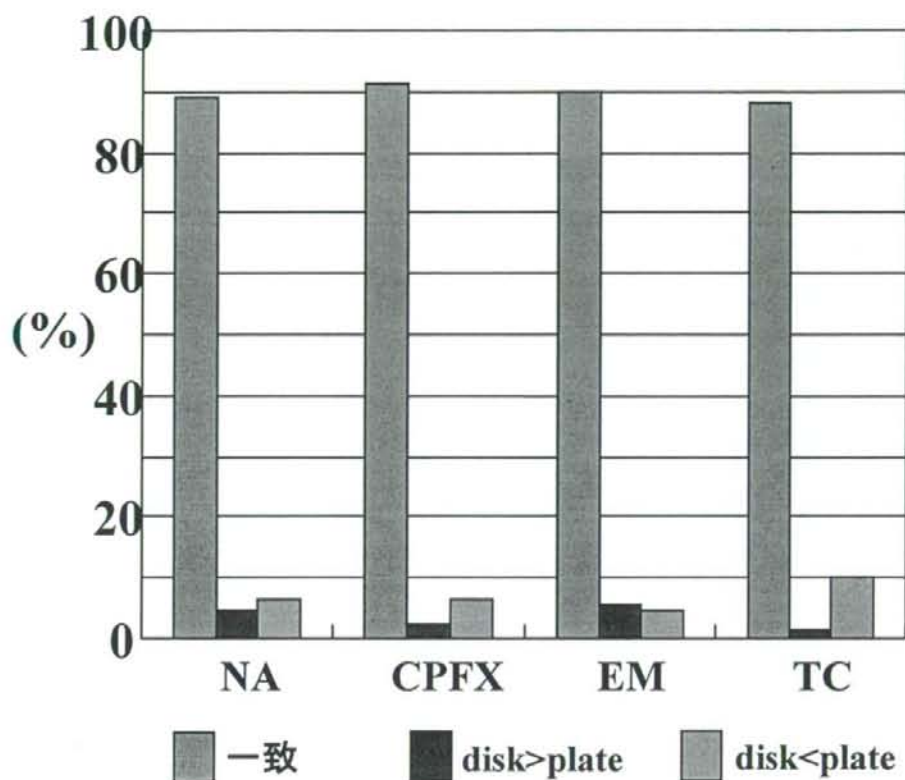


図1. カンピロバクター分離株の耐性評価の方法論による差異

ディスク法とマイクロタイタープレート法の比較



図2. 市販鶏肉または牛由来カンピロバクター
分離株採集地

上記9都府県において市販鶏肉または牛由来検体の収集、
カンピロバクターの分離および薬剤耐性獲得状況について
調査を行った

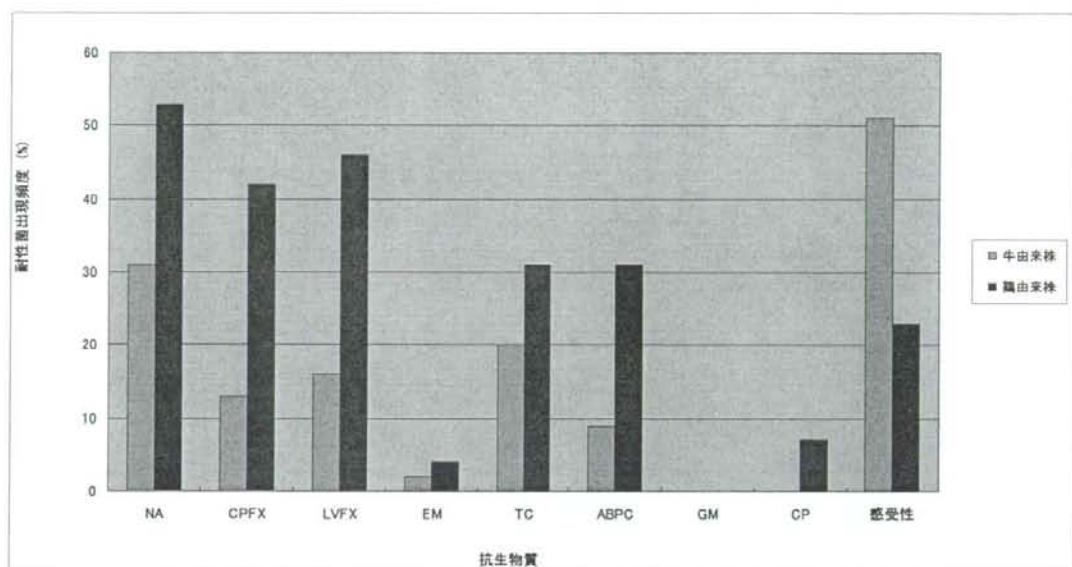
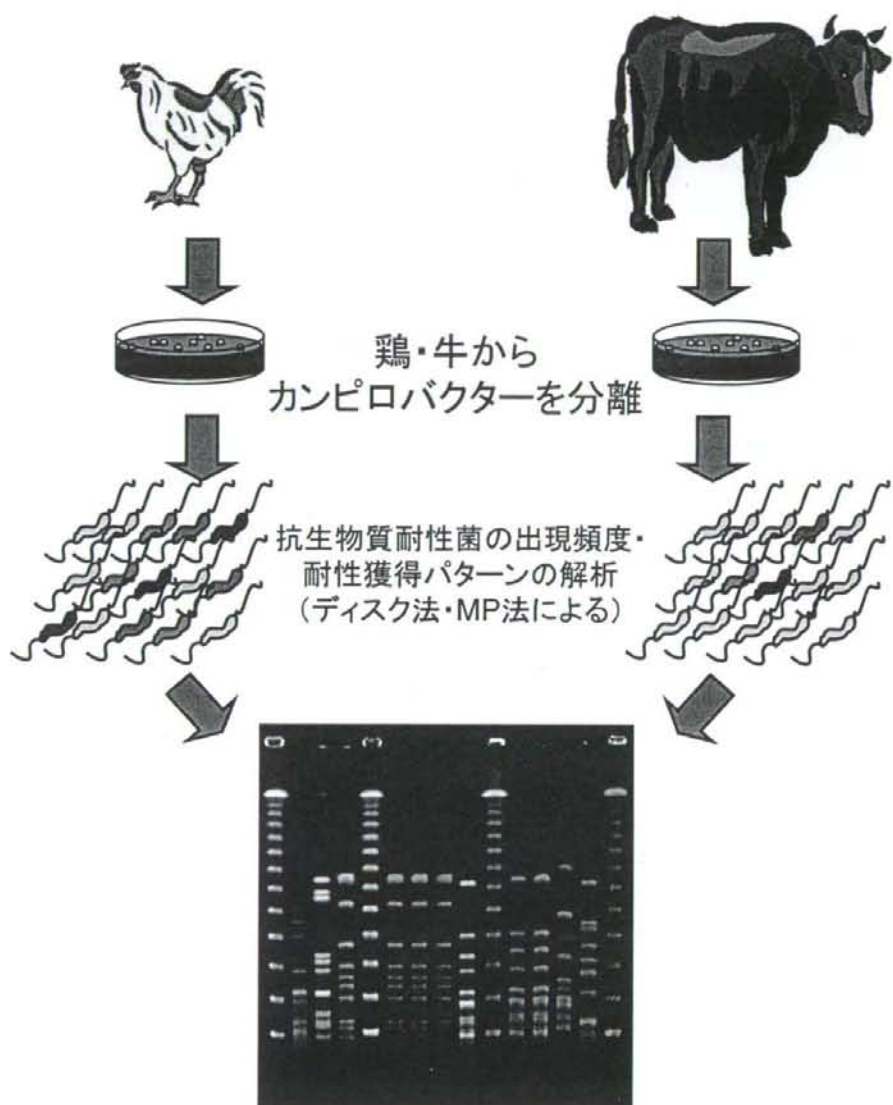
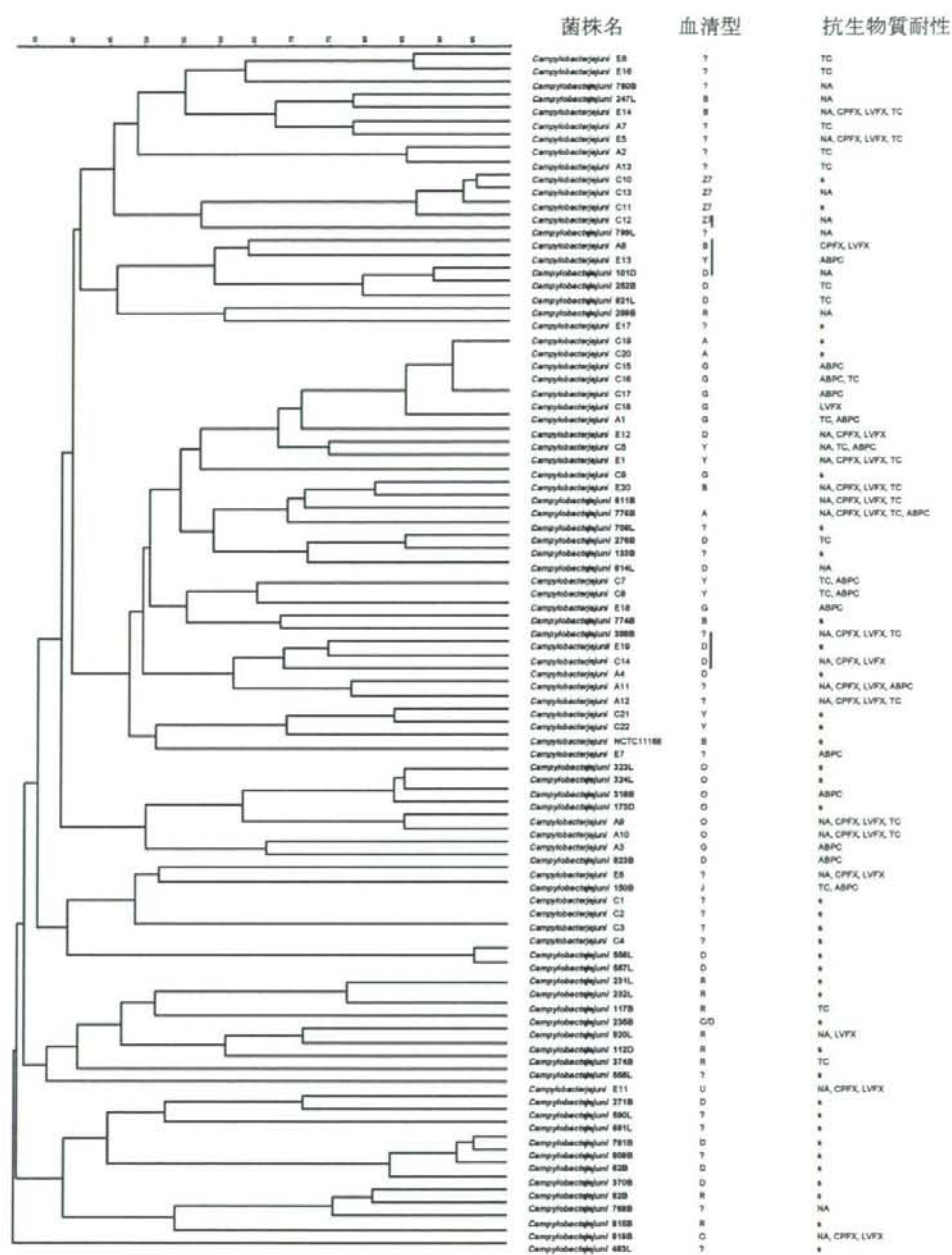


図3. 各種抗生物質耐性株出現頻度の比較(鶏と牛由来株)



パルスフィールドゲル電気泳動により
 牛・鶏由来株のゲノムを比較し、
 牛から分離された抗生物質耐性菌の供給経路を推測

図4. 解析方法の概要



緑: 鶏由来株 青: 牛由来株

図5. 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

平成 18～20 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
「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
研究分担者 浅井 鉄夫、鮫島 俊哉*、石川 整 農林水産省動物医薬品検査所
研究協力者 小池良治、荻野智絵、小澤真名緒
農林水産省動物医薬品検査所
(*：現農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所)

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)国内で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 年度から実施されて、現在も継続している。本調査は、全国 47 都道府県の協力を得て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にしている。本研究では、JVARM の調査結果を参考とし、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、健康家畜の糞便由来株についてそれらの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・遺伝学的解析を試みた。

最近の 4 年間 (2004～2007 年度)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、牛と豚から分離される *S. Typhimurium* で多剤耐性パターンや肉用鶏から分離される *S. Infantis* の薬剤感受性に変化が見られた。家畜における薬剤の使用状況に大きな変化がないことから、使用された抗菌剤の影響とは異なる要因と考えられた。また、家畜から分離されたサルモネラで、フルオロキノロンやセファロスポリン耐性が認められ、家畜間に医療上重要な薬剤に対する耐性菌の浸潤が危惧された。一方、カンピロバクターでは、フルオロキノロンに対する耐性率の上昇が認められ、動物におけるフルオロキノロン使用状況のより詳細な調査が必要と考えられた。

これらの成績は、今後、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

家畜の細菌感染症を治療して疾病による損耗を最小限に抑制し、安全な畜産物を安定生産するため、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また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) 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発生は、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訳では

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も十分にはされていない。そこで本研究では、JVARM による家畜から分離されたサルモネラの薬剤感受性の調査結果に基づき、多剤耐性及びキノロン耐性の出現要因について由来畜種及び血清型との関連、抗菌剤の使用状況など多方面からの解析を進めた。

一方、カンピロバクターは、家畜に対する病原性は明らかではなく、家畜衛生上それほど問題視されていない。しかし、近年、カンピロバクターの食中毒は増加傾向にあり、その原因の一つとして家畜の関与が示唆されていることから、本研究ではサルモネラと同様に薬剤感受性の調査結果を踏まえ、その疫学的な解析を試みた。

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、

2004~2007年に健康家畜の糞便から分離された179株(肥育牛由来0株、肥育豚由来30株、採卵鶏由来27株及び肉用鶏由来122株)と病畜から分離された478株(牛由来199株、肥育豚由来129株、鶏由来150株)を供試した。

多剤耐性 *Salmonella* 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 *S. 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年にプ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。

セファロスポリン耐性サルモネラの性状調査は、2005~2006年にプロイラーから分離された3株(*S. Infantis* 2株とO型別不能(H:r/1,5)1株)と2002~2003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:512µg/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ィールを調べた。また、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。

プロイラー由来 *S. Schwarzengrund* は、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株と平成17~19年に市販鶏肉から分離された10株を用いて、薬剤感受性とPFGE型を調べた。

S. Choleraesuis は、2006~2008年に豚から分離された37株と2007~2008年に人症例から分離された2株を用いて、薬剤感受性とPFGE型を調べた。

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、2005~2007年に健康動物の糞便から分離された464株(肥育牛由来43株、肥育豚由来143株、採卵鶏由来158株及びプロイラー由来120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。

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。また、アンピシリン

(ABPC)耐性 *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 42株を用いて、ABPC耐性遺伝子を検索した。

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。

サルモネラは、ABPC、セファゾリン(CEZ)、ジヒドロストレプトマイシン(DSM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、オキシテトラサイクリン(OTC)、コリスチン(CL)、クロラムフェニコール(CP)、ナリジクス酸(NA)、エンロフロキサシン(ERFX)、トリメトプリム(TMP)、の11薬剤について、カンピロバクターはABPC、DSM、OTC、CP、エリスロマイシン(EM)、NA、ERFXの7薬剤について薬剤感受性を調べた。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。

4. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

米国疾病管理センター(CDC)により推奨されているパルスネットプロトコールに準拠して行った。

5. 耐性遺伝子の解析

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ィールを調べた。

多剤耐性 *S. Typhimurium* 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。

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

フェージ型別を国立感染症研究所に依頼した。

サルモネラのキノロン耐性遺伝子 (*qnr*) の検索は、Cattoirらの報告したプライマーを用いて *qnrA*、*qnrB* 及び *qnrS* を対象にPCR法で実施した。PCR産物は、ダイレクトシークエンスを行った。

カンピロバクターではアンピシリン耐性の遺伝子の検索は、*blaOXA₆₁* の塩基配列からプライマーを設計しPCR法で実施した。

C. 研究結果

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解析し、以下の成績が得られた。

1. 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

(1) 家畜由来サルモネラの血清型と薬剤感受性 (表1、図1、2) : 2004-2007年に健康家畜から分離されたサルモネラは、*Infantis* が約半数を占め、次いで *Typhimurium* (15%) であった。一方、病畜由来株の血清型は、牛及び豚由来株では *Typhimurium*、鶏由来株では *Infantis* が優勢だった。

健康家畜由来株では、DSM及びOTCに対する耐性率は約60%を示し、KM及びTMPでは約40%、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に対する耐性率は約60%、ABPC及びKMに対する耐性率は30%を示した。病畜由来株において、CEZ及びERFXに対する耐性株が認められた。

(2) 家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性 (図3、4)

2004-2007年に収集された *C. jejuni* 及び *C. coli* の総計679株の薬剤感受性試験では、これまでと同様に、OTCに対する耐性率が最も高く、また、ほとんどの薬剤で *C. coli* の耐性率が *C. jejuni* より高かった。両菌種で、キノロン剤 (NA及びERFX) に対する耐性の増加傾向が見られたが、その他の薬剤に対する耐性率に変動は見られなかった。

2. 血清型別耐性動向

(1) 多剤耐性 *S. Typhimurium* DT104 の動向調査

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 関連フェージ型株は、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、*blaTEM* 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。

(2) 2004-2006 年に分離された *S. Infantis* の薬剤感受性

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。

3. 薬剤耐性菌の性状解析

(1) 牛由来フルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium*

2005年に血便を呈し死亡した牛から分離されたERFX耐性 *S. Typhimurium* (17-PLS-75) は、NA (256µg/ml) 及びERFX (16µg/ml) ともに高いMICを示し、*blaOXA-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。GyrA(S83F, D87N) と ParC(S80R) のキノロン耐性決定領域 (QRDR) に変異が認められた。

2006-2007年に同一農場の異なる牛の下痢便から分離されたERFX耐性 *S. Typhimurium* (18-PLS-16及び19-PLS-45) では、NA (32µg/ml) 及びERFX (4µg/ml) のMICが、17-PLS-75より低く、*qnrS1* を保有していた。

2002-2007年に分離された *S. Typhimurium* 237株では、2株を除いて *qnrS* 遺伝子は陰性で、*qnrS* 遺伝子の陽性率は0.8%であった。*qnrA* 及び *qnrB* の陽性株は認められなかった。フルオロキノロン耐性サルモネラ

(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

2005年に分離された *S. Infantis* と O 型別不能株は *bla_{CMY-2}* を保有し、2006年に分離された *S. Infantis* は *bla_{CTX-M-2}* を保有していた。市販鶏肉由来株は、*bla_{CMY-2}* を保有していた。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 耐性の伝達も認められた。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かった。

4. 薬剤耐性菌の疫学解析

(1) 薬剤耐性 *S. Infantis* の遡り調査

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。

(2) ピコザマイシン耐性 *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。

鶏肉由来株は、肉用鶏由来株と同様、ピコザマイシン (BCM) とサルファ剤 (SDMX) に耐性を示し、DSM、OTC、KM、TMP 耐性を高率に保有していた。PFGE 型は、肉用鶏由来株で区分された 2 つの PFGE 型のうち、優勢な PFGE 型と一致していた。

(3) 人と豚由来 *S. Choleraesuis* の性状比較
埼玉衛研から分与された人症例由来 SC は、硫化水素非産生株 (*Choleraesuis*) と産生株 (Kunzendorf) であった。豚由来株は、*Choleraesuis* 26 株、Kunzendorf 10 株、Decatur 1 株であった。

人由来 *Choleraesuis* 株は、8 剤 (ABPC-DSM-GM-KM-OTC-CP-NA-TMP) 耐性、Kunzendorf 株は、DSM-NA 耐性であった。豚由来 *Choleraesuis* 株は、26 株中 17 株が 6~7 剤耐性で、7 種類の耐性パターンを示し、Kunzendorf 株は、5 種類の耐性パターンを示したが、人由来株と同一の耐性型は認められなかった。人由来株の PFGE プロファイルは、豚由来株と類似していた。

(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。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。

ABPC 耐性カンピロバクターの β -lactamase を調べたところ、ABPC 耐性 *C. jejuni* 42 株中 40 株が blaOXA61 を保有していた。また、血清群別では、B 群 12 株中 11 株、D 群 9 株中 9 株、G 群 21 株中 20 株で差は認められなかった。

D. 考察

1. 動物由来サルモネラ及びカンピロバクターの薬剤耐性の動向

家畜へ抗菌性物質を使用することは、家畜における薬剤耐性の出現や分布に関与することが知られている。しかし、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。このように、サルモネラでは、薬剤耐性菌の分布状況は血清型の構成と深く関わっている。

牛や豚由来サルモネラの最も主要な血清型である *S. Typhimurium* では、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。その要因として、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の有意な減少 (χ^2 乗検定、 $P < 0.01$) に起因していることを明らかにした (Kawagoe ら、2006)。

ブロイラー由来サルモネラの最も主要な血清型である *Infantis* の薬剤感受性は、NA 耐性の増加、また、DSM 及び KM 耐性の減少が観察されている。現状では、ブロイラーで使用された薬剤の流通量に起因しているかは明らかではない。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。大部分の *Schwarzengrund* は、2005 年以降特定の PFGE 型の多剤耐性株が優勢であることから、同一起源由来株による汚染拡大が示唆された。この血清型が、10 年以上国内のブ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。現状では、肉用鶏の間では *S. Infantis* が優勢であるが、*S. Schwarzengrund* の汚染が拡大した場合、肉用鶏でのサルモネラ汚染様式の解明につながる可能性があるため、*S. Schwarzengrund* の動向については継続的に把握する必要があると考えられる。

S. Enteritidis は、国内で発生するサルモネラ食中毒において最も優勢な血清型であるが、家畜由来では、DSM 耐性が 50%程度認められるものの、その他の主要な薬剤に対する耐性率は低いことを報告した (Asai ら、2008)。このことは、*S. Typhimurium* や *Infantis* に比べ、薬剤耐性菌の人への伝播に関してリスクが低いと考えられる。家畜由来株で観察された、*S. Typhimurium* や *Infantis* の薬剤感受性の変化が人症例由来株の感受性の動向に与える影響は、薬剤耐性サルモネラの人への健康危害を評価する上で、継続的にモニタリングする必要があると考えられる。

健康家畜の糞便由来カンピロバクターでは、畜種により分離血清型に特徴があること、*C. jejuni* に比べ、*C. coli* に薬剤耐性が多く認められることを報告してきた。特に、カンピロバクター腸炎の第一次選択薬である EM に対して、*C. coli* は高い耐性率を示したが、人のカンピロバクター腸炎の主な原因である *C. jejuni* は家畜由来全株で EM に対して感受性であったことから人の医療の観点からはマクロライド系薬剤は有効であると考えられた。健康家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性の動向として、*C. jejuni* と *C. coli* ともにフルオオキノロン耐性の増加傾向が認められた。増加要因として、肉用鶏由来 *C. jejuni* 及び豚由来 *C. coli* における ERFX 耐性の増加に起因していた。しかし、JVARM の調査において m 肉用鶏や豚由来の大腸菌やサルモネラでのキノロン (NA、ERFX) 耐性の増加は認められていない (図 5-9)。現在、動物におけるフルオオキノロン剤の流通量との関連について解析中である。

サルモネラでは、血清型やファージ型による特徴的な薬剤耐性型を示しているが、*C. jejuni* においても血清型による ABPC 耐性の発現状況に違いがある可能性が示唆された。今後、カンピロバクターの ABPC 耐性の動向解析では、構成する血清型の割合が耐性率に影響する危険性があることを考慮しなければならない。

2. 家畜における医療上重要な薬剤に対する耐性菌の出現

家畜由来サルモネラにおいても、セファロ

スポリン耐性及びフルオロキノロン耐性株が、継続的に分離され、家畜間での人の医療上重要な薬剤に対する耐性サルモネラの蓄積が示唆されている。特に、セファロスポリン耐性サルモネラは、セファロスポリンが承認されていない鶏からも分離され、伝達性プラスミ上に CMY-2 や CTX-M-2 遺伝子を保有していた。セファロスポリン耐性サルモネラは、2006 年以降、牛及び肉用鶏由来 Newport、Typhimurium、Infantis、Senftenberg など多様な血清型で認められている。今後、サルモネラ間でのプラスミド伝播も含めたセファロスポリン耐性サルモネラの動向を解析して、衛生対策に繋げていかなければならない。

我が国の家畜におけるフルオロキノロン耐性サルモネラは、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* (Izumiya ら、2001) で報告されているのみであった。しかし、2005~2007 年では、毎年 1 株ずつではあるが、FQ 耐性 *S. Typhimurium* が分離された。2005 年に分離されたフルオロキノロン耐性株は、既報と同様、フルオロキノロン剤の標的部位に変異が認められたが、2006~2007 年に分離された株は、キノロン耐性プラスミドを保有する株で、同一農場の異なる個体由来していた。2002~2007 年に分離された *S. Typhimurium* を対象に保有状況を調べたが、広範な分布は認められない。家畜において新たな耐性機構の株であることから、継続的に調査を行う必要がある。

3. 多剤耐性菌の疫学

国内で肉用鶏や鶏肉から分離される *S. Infantis* は TC と SM に対して耐性を示す株が多いことが知られているが、テトラサイクリンやストレプトマイシンは肉用鶏農場であまり利用されていない。本研究班で実施した遡り調査で 1997 年頃から国内の肉用鶏農場で広範に浸潤した耐性型と遺伝子型の類似株が、1993 年の肉用鶏由来株で認められている。このタイムラグや広域に拡散した要因については不明であるが、TC-SM 耐性 *S. Infantis* は、薬剤の使用状況を反映しないで、長期間分布している (Asai ら、2006)。

S. Choleraesuis は、近年、と場出荷豚の食肉検査で摘発されるサルモネラ症の主要な血清型で、東京、神奈川、栃木、鹿児島等の食肉衛生検査所で報告されている。埼玉県で分離された人症例由来株の性状を調べたところ、豚由来株と類似した性状を示した。本血清型は、豚に宿主適合性が高いことから、豚や豚肉との関連について背景を調査する必要があ

る。

また、鶏肉由来株 *S. Schwarzengrund* は、の性状を調べたところ、肉用鶏由来株と同一性状を示すことが明らかとなった。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。

E. 結論

家畜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、医療上重要なフルオロキノロンやセファロスポリン耐性食中毒菌の出現や増加傾向が明らかとなった。人症例及び食品（市販鶏肉）由来サルモネラ株は、家畜由来株との関連性も示唆されていることから、様々な要因で食用動物に分布している薬剤耐性菌の実態と共に、食品及び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は、動物で使用される抗菌性物質の影響を検討する上で、継続的にモニタリングする必要がある。

F. 健康危害情報

健康家畜由来サルモネラ及びカンピロバクターにおけるフルオロキノロン剤やセファロスポリンに対する耐性菌の food chain を介した耐性菌の伝播を防止するため、畜種、分離菌の菌種及び血清型等要因を反映した耐性菌対策を構築する必要がある。

G. 研究発表

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.

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

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

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. 2007. 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.

Asai, T., Harada, K., Kojima, A., Sameshima, T., Takahashi, T., Akiba, M., Nakazawa, M., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H. 2008. Phage type and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* from food-producing animals between 1976 and 2004. *New Microbiologica* 31: 557-561.

Harada, K., Ozawa, M., Ishihara, K., Koike, R., Asai, T. and Ishikawa, H. 2009. Prevalence of antimicrobial resistance among serotypes of *Campylobacter jejuni* isolates from cattle and poultry in Japan. *Microbiol Immunol.* (in press)

Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Relationship of Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Schwarzengrund* between broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

※ JVARM 事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に深謝いたします。

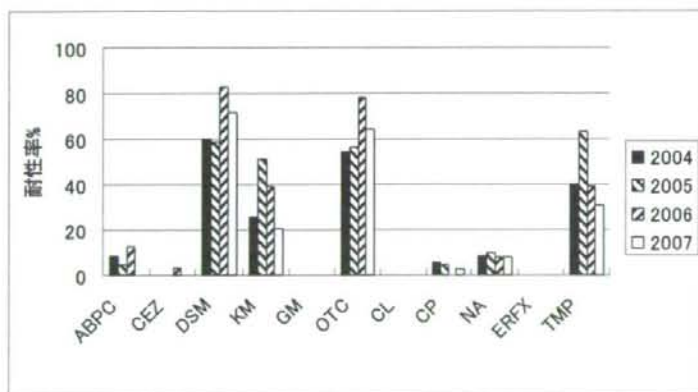


図1 健康家畜由来 *Salmonella* の薬剤感受性

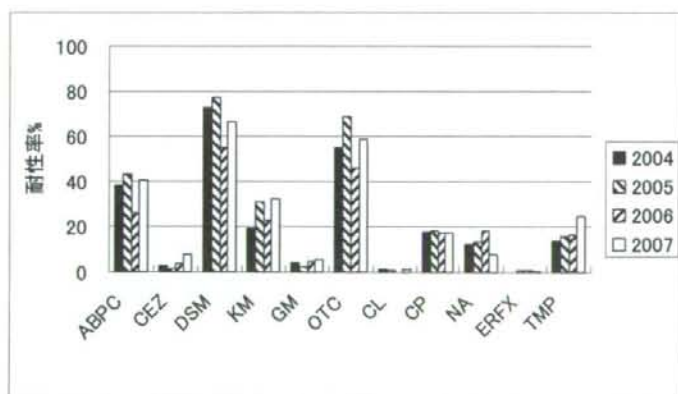


図2 病畜由来 *Salmonella* の薬剤感受性

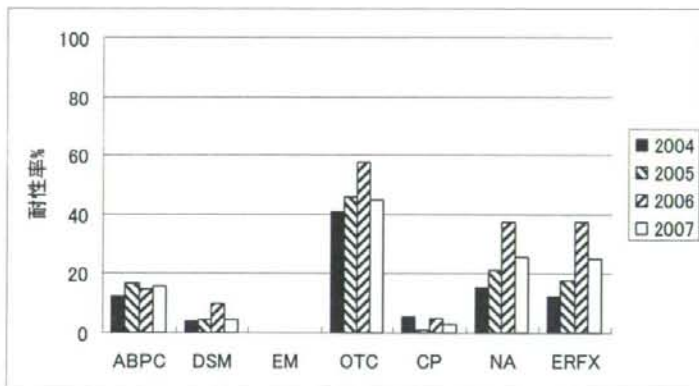


図3 家畜由来*Campylobacter jejuni*の薬剤感受性

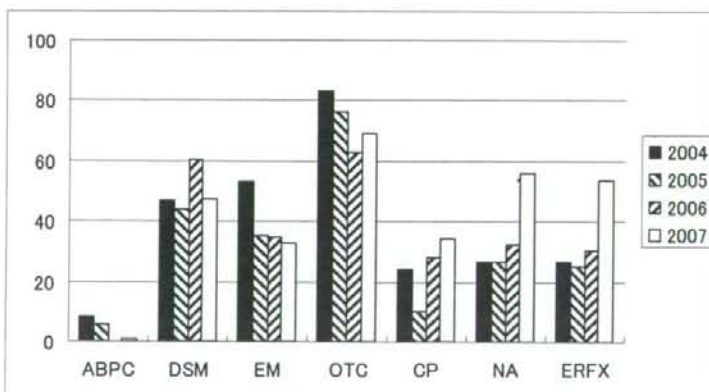


図4 家畜由来*Campylobacter coli*の薬剤感受性