

薬剤耐性パターンは、TC,KM,ABPC,NA の 4 薬剤耐性 (2 株), TC,SM,SIX の 3 薬剤 (1 株) および KM,ABPC の 2 薬剤耐性株 (1 株) であった。食品由来の 7 株は全て耐性株であり、うち 4 株は 5 薬剤以上の耐性株であった。一方、ヒト由来 SM の耐性パターンは全て TC,SM,SIX, 食品由来株の耐性パターンは、TC,SM,ABPC,SIX の 4 薬剤耐性 (3 株), TC,SM,SIX の 3 薬剤耐性 (2 株), TC,SM,NA,SIX の 4 薬剤耐性 (1 株) であった。いずれの血清型においてもヒト由来株と食品由来株の薬剤耐性パターンは非常に似ていることから、何らかの関連が推定された。

2008 年に分離された下痢症患者由来 *C.jejuni* のキノロン系薬剤耐性率は 37.9% であり、例年と同様の耐性率であった。分離数は少ないが、*C.coli* 8 株のキノロン系薬剤耐性率は 87.5% であり、*C.jejuni* と比較して耐性率が高い傾向が認められた。EM については、*C.jejuni* ではほとんど耐性菌は出現していないが、*C.coli* では 2003 年以降 10~40% の耐性率が認められた。

食中毒関連食品中の MRSA 汚染を調べた結果、食品 296 検体中 1 検体 (牛の小腸) から MRSA が検出された。また糞便検体 3,021 件から MRSA は 5 件 (0.17%) 検出された。いずれも MRSA 検出率は高くないが、今後さらに食品中の汚染状況を把握すると共にヒト由来株との詳細な比較も必要である。

F. 健康危機情報

2009 年に分離されたヒトおよび食品由来の ST および SM の薬剤耐性率を調べた結果、いずれもヒト由来株より食品由来株

の方が耐性率が高かった。

2008 年に分離された下痢症患者由来 *C.jejuni* のキノロン系薬剤耐性率は 37.9% であり、例年と同様の耐性率であった。分離数は少ないが、*C.coli* 8 株のキノロン系薬剤耐性率は 87.5% であり、*C.jejuni* と比較して耐性率が高い傾向が認められた。さらに耐性株の動向に注意する必要がある。

G. 研究発表

準備中

H. 知的所有権の取得状況

無し

表1. *Salmonella* Typimurium の耐性菌出現状況(2009年, 東京都)

耐性パターン						ヒト由来株	食品由来株
		KM	ABPC			1	1 (鶏肉ササミ)
TC			ABPC				1 (ハツ)
TC	SM			SIX		1	
TC		KM	ABPC	NA		2	1 (ササミ)
TC		KM	ABPC	NA	SIX		1 (トリ生レバー)
TC	SM		CP	ABPC	SIX		2 (牛レバー、ミノ)
TC	SM	KM		ABPC	NA	SIX	1 (レバー)
小計						4 (40%)	7 (100%)
感受性						6 (60%)	0
計						10 (100%)	7 (100%)

表2. *Salmonella* Manhattan の耐性菌出現状況(2009年, 東京都)

耐性パターン						ヒト由来株	食品由来株
TC		SM		SIX		4	2 (ツクネ・トリユッケ、セセリ)
TC		SM	ABPC		SIX		3 (モモ、レバ刺し、モモタタキ)
TC		SM		NA	SIX		1 (鶏レバー)
感受性						2	0
計						6	6

表3. 腸管出血性大腸菌O157の耐性菌出現状況(2009年、東京都)

耐性パターン						ヒト由来株	食品由来株
				ABPC		2	
TC						2	
	SM				SIX	2	
TC					SIX	6	
TC	SM					1	
TC		ST				1	
TC	SM			SIX		4	
		ST	ABPC	SIX		3	
	SM		ABPC	SIX		1	1 (牛ハツ・国産)
TC				ABPC	SIX	1	
TC	CP	SM			SIX	4	
TC		SM		ABPC	SIX	18	
	SM	ST	ABPC	SIX		5	
小計						50 (17.8%)	1 (14.3%)
感受性						231 (82.2%)	6 (85.7%)
計						281 (100%)	7 (100%)

表4. 食品からのMRSAの検出

供試菌株数	検出数	%	食品
296	1	0.3	牛の小腸

生菌数: 1.6×10^5 個/g
 黄色ブドウ球菌数: 300個以下/g

表5. 糞便検体からのMRSA検出状況

供試数	陽性数	
	<i>S. aureus</i>	MRSA
3,021	308 (10.2%)	5 (0.17%)

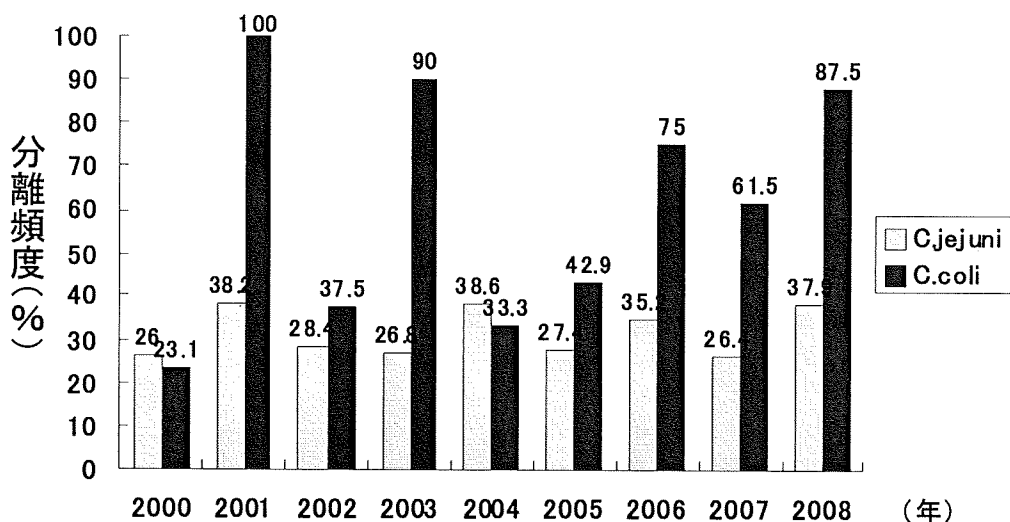


図1. ヒト由来ニューキノロン剤耐性
C.jejuni, *C.coli* の分離頻度

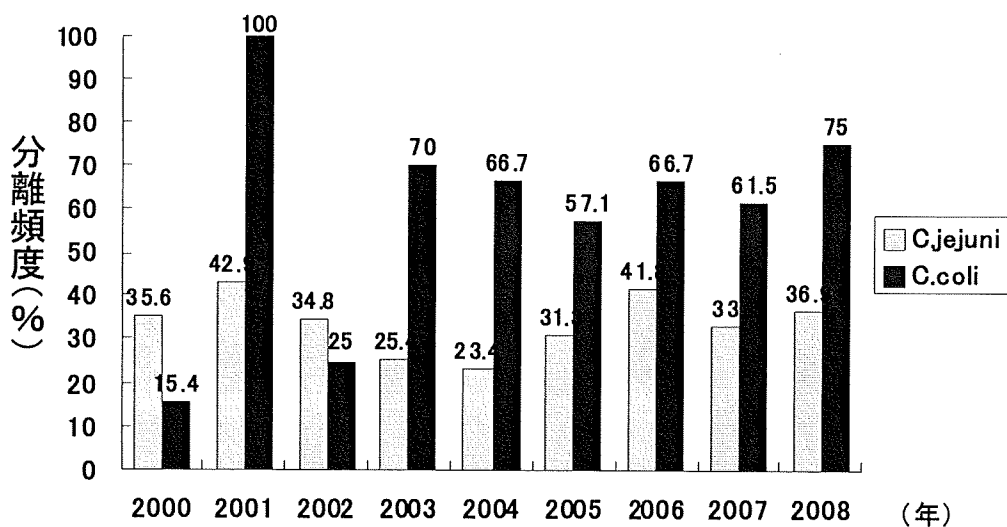


図2. ヒト由来Tetracyclin 耐性
C.jejuni, *C.coli* の分離頻度

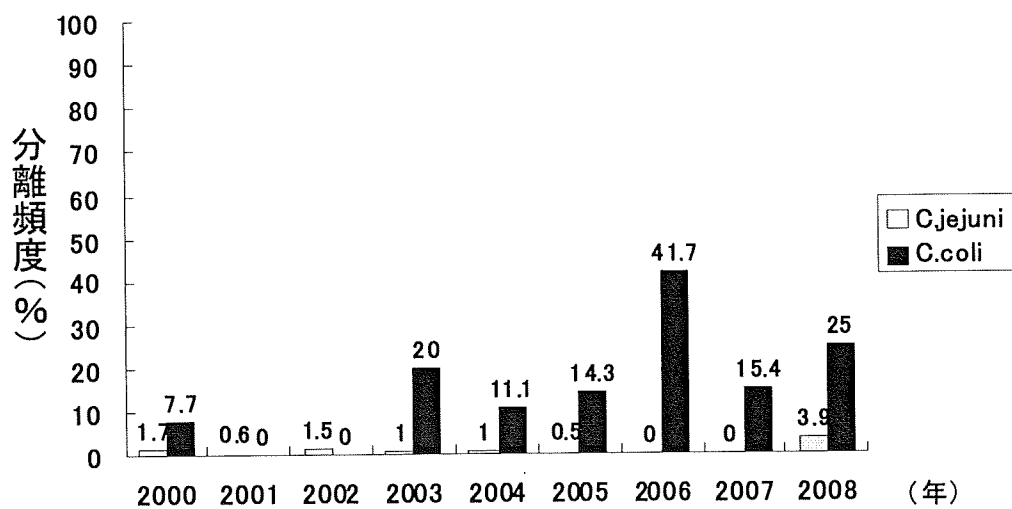


図3. ヒト由来Erythromycin 耐性
C.jejuni, *C.coli* の分離頻度

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの高度化
に関する研究」
平成 21 年度 分担研究報告書

課題名：食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネ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 岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所
門田 修子 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
横山 敬子 東京都健康安全研究センター
小澤 真名緒 農林水産省動物医薬品検査所
石井 良和 東邦大学医学部

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、鶏に用いられたアボパルシンと、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飼料中に抗菌物質を使用することがあるため、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なりうるという指摘がある。一方、牛については病畜の治療として抗生物質の投与が行われてはいるが、一般的には飼育中に上述のような目的で抗菌物質を使用しない。鶏由来のカンピロバクター分離株と、牛由来のカンピロバクター分離株では PFGE パターンが異なり、その由来が推定可能であることが以前の検討結果から明らかとなっている。本年度はヒト臨床由来株と生産現場由来株につき、PFGE 型別を行い、そのパターンにより菌株の由来を推定し、カンピロバクターの生産現場からヒト臨床への経路について考察を行った。

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および分離菌株の遺伝子型情報を収集し、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、生産現場由来株とヒト臨床分離株の抗生物質耐性獲得状況と遺伝子型の特徴を明らかにする。

実験としては、以下の研究班分担研究者から分離株の提供を受け、2005～2006年に分離された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、パルスフィールドゲル電気泳動により、典型的な牛由来株や鶏由来株の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、浅井鉄夫研究分担者（動物医薬品検査所）、臨床分離株は、田口真澄研究分担者（大阪府立公衆衛生研究所）及び甲斐明美研究分担者（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、耐性パターン等）について明らかにした。

C. 研究結果

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（動物医薬品検査所）、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。菌株情報としては、ディスク法またはMP法により、耐性獲得状況、Penner血清型などを明らかにした。生産現場からの分離株39株の9薬剤の耐性獲得状況は表1に示した。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表2に示した。東京都に於いて食中毒事例から分離されたヒト臨床分離株50株の血清型別情報は表3に示した。

一方、昨年までの検討により、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、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ており、同様な解析方法により、生産現場分離株、ヒト臨床分離株につき系統樹を作成した。菌株数が多いため系統樹は図1、図2と分けて示した。これらの図を統合し、図3を作成し、全体像を系統樹として示した。

D. 考察

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、生焼けの鶏肉も含まれる。特に、生の喫食を前提としている食肉の場合は、カンピロバクター食中毒の危険性が増大する。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。一般的には、鶏肉が最もヒトの食中毒の原因となっていると考えられている。本研究では、これら2種の動物の生産現場由来株とヒト臨床分離株特徴を比較することにより、生産現場から、食肉さらにヒトへの感染を起こしうるカンピロバクターの流れと、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。

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。

一般的に抗菌物質に暴露される可能性が高い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示されているが、抗菌物質への暴露が治療時に限られると思われる牛においては抗生物質耐性株の頻度は鶏肉由来に比べ低い。牛舎周辺由来株と鶏舎周辺由来株がヒト臨床株の遺伝子型との相関により、カンピロバクターがどのルートで感染しているかを推定可能と思われる、収集した生産現場分離株、ヒト臨床分離株の遺伝子型の特徴の比較を試みた。

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を以前示したが、ヒト臨床分離株の耐性株の割合は鶏分離株の耐性割合より低い傾向がある。昨年までの検討から、市販鶏肉由来株の耐性獲得が高く、牛肝臓由来株の耐性獲得が

低値であることも示されており、ヒト臨床分離株が、鶏型と牛型の両者の遺伝子型を示すとすると、カンピロバクター食中毒に牛由来株がある程度寄与していることが示される。

図1～2に示すように東京都と大阪府のヒト臨床由来株のパルスフィールドゲル電気泳動法により遺伝子型分析を試み、遺伝子レベルで由来株の相関を解析した。図5に総合的な分析結果を示す。牛舎周辺由来株は4株分析したが、内1株(18B4)は鶏型と思われ、ヒト臨床株と鑑別できないクラスターを形成した。もう1株(17B8)は、ヒト臨床株とそれほど類似性は高くないが同一の集団に含まれていた。一方、2株は、臨床株との相同性が低く、牛型の遺伝子型と思われる。

一方、図1～2で17C、18C、17L、18Lで示される鶏舎周辺由来株は、ヒト臨床分離株と同一のクラスターに含まれていた。これらの菌株は鶏型の遺伝子型と思われる。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のクラスターに牛舎由来株の1株が認められたことである。

この事実は以前行った鶏肉と牛レバー分離株でも見られた様に、牛と鶏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、生産現場由来株とヒト臨床分離株の提供を受け、その菌株の特徴は表1～3に示したが、牛舎周辺由来株4株の内、3株は多剤耐性が認められなかった。

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）を介したヒトへの健康影響の評価を検討する上で、重要なデータを取得・提供できたものと思われる。

E. 結論

牛舎周辺由来株の一部は、遺伝子型は鶏型と思われヒト臨床由来株と同一のクラスターを形成していた。牛舎由来株の半数は、遺伝子型は牛型と思われ、ヒト臨床分離株とは遺伝子型がそれほど近くはなかった。鶏舎周辺由来株（産卵系、ブロイラー共）鶏型と思われる遺伝子型は、ヒト臨床由来株と同一のクラスターに含まれている株が多かった。

またパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型の比較により、牛舎周辺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。以前の鶏肉及び牛レバー分離株の検討結果と同様、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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

口頭・ポスター発表

Igimi, S., Ishiwa, A., Yamasaki, M., Okada, Y., Monden, S., Asakura, H., Yamamoto, S. Antimicrobial resistance and genotyping of the pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* isolated from bovine and poultry. 15th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and related Organisms (2009.9) (Niigata)

五十君静信。カンピロバクターによる食中毒について。食品の安全・安心に関するリスクコミュニケーション。(2010.1.21)千葉市

論文発表

なし

表1. 生産現場由来株の耐性パターン

動物種	株番号	分離年	報告書		ABPC	DSM	GM	EM	OTC	CP	NA	ERFX	SDMX	耐性パターン
			同定菌種	Penner 血清型										
01B	5	平成17年	jejuni	D	4	0.5	0.5	4	64	1	256	16	>512	OTCNAERFX
01B	8	平成17年	jejuni	D	4	0.25	0.25	2	16	2	4	0.0625	256	OTC
01B	12	平成17年	jejuni	UT	2	2	1	2	2	4	256	0.5	>512	NA
03L	1	平成17年	jejuni	C	2	0.5	0.25	1	64	2	4	0.0625	4	OTC
03L	3	平成17年	jejuni	Y	2	0.5	0.25	1	64	2	4	0.0625	4	OTC
03L	9	平成17年	jejuni	K	4	0.5	0.25	0.5	32	2	2	0.0625	2	OTC
03L	15	平成17年	jejuni	UT	64	1	0.5	2	64	2	4	0.0625	4	ABPCOTC
03L	20	平成17年	jejuni	UT	32	1	0.25	0.25	64	2	2	0.0625	2	ABPCOTC
03L	35	平成17年	jejuni	B	2	0.5	0.5	2	64	2	8	0.125	8	OTC
03L	37	平成17年	jejuni	A	4	1	0.5	2	128	4	4	0.125	4	OTC
03L	42	平成17年	jejuni	F	32	1	0.5	2	64	4	4	0.0625	4	ABPCOTC
03L	44	平成17年	jejuni	E	8	0.5	0.5	2	64	4	4	0.0625	4	OTC
03L	49	平成17年	jejuni	A	64	0.5	0.5	2	128	2	8	0.125	8	ABPCOTC
03L	51	平成17年	jejuni	C	2	0.5	0.5	1	128	4	64	4	64	OTCNAERFX
03L	60	平成17年	jejuni	UT	16	0.5	0.25	1	1	4	64	2	64	NAERFX
03L	63	平成17年	jejuni	UT	4	0.5	0.25	2	64	2	4	1	4	OTC
03L	65	平成17年	jejuni	UT	4	0.5	0.25	2	128	4	16	0.25	16	OTC
04C	1	平成17年	jejuni	UT	32	0.5	0.5	0.25	64	2	512	8	512	ABPCOTCNAERFX
04C	5	平成17年	jejuni	D	4	0.5	0.5	2	0.5	2	256	4	256	NAERFX
04C	6	平成17年	jejuni	D	4	0.5	0.5	2	0.25	2	256	4	256	NAERFX
04C	7	平成17年	jejuni	UT	4	0.5	0.5	2	0.25	2	256	4	256	NAERFX
04C	8	平成17年	jejuni	G	64	0.5	0.5	1	32	4	4	0.0625	4	ABPCOTC
04C	9	平成17年	jejuni	UT	16	0.5	0.25	1	128	4	8	0.0625	8	OTC
04C	13	平成17年	jejuni	UT	4	1	0.5	2	256	2	4	0.0625	4	OTC
04C	15	平成17年	jejuni	B	2	0.5	0.5	0.5	32	1	128	4	128	OTCNAERFX
04C	19	平成17年	jejuni	B	2	0.25	0.25	2	64	2	4	0.0625	4	OTC
04C	22	平成17年	jejuni	F	8	128	0.5	0.5	64	4	64	0.25	128	DSMOTCNA
01B	4	平成18年	jejuni	B	2	1	0.5	0.5	32	2	4	0.06	128	OTC
03L	1	平成18年	jejuni	UT	4	1	0.25	2	64	8	8	0.125	128	OTC
03L	16	平成18年	jejuni	B	2	0.5	0.25	0.5	128	2	4	0.03	64	OTC
04C	1	平成18年	jejuni	UT	2	0.5	0.25	0.5	16	1	128	4	64	OTCNAERFX
04C	6	平成18年	jejuni	UT	8	1	1	1	64	1	128	4	>512	OTCNAERFX
04C	8	平成18年	jejuni	G	8	0.5	0.25	4	4	8	128	8	128	NAERFX
04C	12	平成18年	jejuni	Y	8	1	0.25	2	256	4	256	8	64	OTCNAERFX
04C	16	平成18年	jejuni	UT	4	0.5	0.25	0.5	32	2	256	4	32	OTCNAERFX
04C	18	平成18年	jejuni	UT	32	1	0.25	0.5	64	2	256	4	128	ABPCOTCNAERFX
04C	20	平成18年	jejuni	B	16	2	0.5	4	128	16	8	0.125	>512	OTCCP
04C	24	平成18年	jejuni	F	32	1	4	1	64	2	2	0.03	32	ABPCOTC
04C	28	平成18年	jejuni	UT	4	>512	0.5	16	64	4	2	0.125	128	DSMOTC

表2. ヒト臨床分離株の耐性パターン①

	菌株番号	菌種		薬剤感受性							
		分離年・月	血清型	L10型	NFLX	OFLX	CPFX	NA	EM	TC	
1	C05-	26	2005年2月	jejuni	L109	R	R	R	R	S	S
2	C05-	60	2005年4月	jejuni	L1010	S	S	S	S	S	R
3	C05-	70	2005年4月	jejuni	L102	S	S	S	S	S	R
4	C05-	71	2005年4月	jejuni	L1050	S	S	S	S	S	S
5	C05-	85	2005年5月	jejuni	L1027	R	R	R	R	S	S
6	C05-	86	2005年5月	jejuni	L107	S	S	S	S	S	S
7	C05-	87	2005年5月	jejuni	L1030	S	S	S	S	S	S
8	C05-	89	2005年5月	jejuni	L101	S	S	S	S	S	R
9	C05-	91	2005年6月	jejuni	TCK26	R	R	R	R	S	R
10	C05-	95	2005年6月	jejuni	L104	R	R	R	R	S	R
11	C05-	132	2005年6月	jejuni	L104	R	R	R	R	S	S
12	C05-	134	2005年6月	jejuni	L1018	R	R	R	R	S	R
13	C05-	135	2005年6月	jejuni	L1050	S	S	S	S	S	S
14	C05-	140	2005年6月	jejuni	L104	R	R	R	R	S	R
15	C05-	164	2005年7月	jejuni	UT	S	S	S	S	S	S
16	C05-	177	2005年10月	jejuni	L109	R	R	R	R	S	R
17	C05-	186	2005年10月	jejuni	L104	S	S	S	S	S	S
18	C05-	223	2005年11月	jejuni	L104	S	S	S	S	S	R
19	C05-	302	2005年11月	jejuni	L1028	R	R	R	R	S	R
20	C05-	303	2005年12月	jejuni	TCK1	R	R	R	R	S	S
21	C06-	9	2006年3月	jejuni	L104	S	S	S	S	S	S
22	C06-	15	2006年3月	jejuni	L102	R	R	R	R	S	S
23	C06-	16	2006年3月	jejuni	UT	S	S	S	S	S	S
24	C06-	18	2006年4月	jejuni	L104	S	S	S	S	S	S
25	C06-	22	2006年4月	jejuni	L1027	S	S	S	S	S	R
26	C06-	38	2006年4月	jejuni	UT	S	S	S	S	S	S
27	C06-	42	2006年4月	jejuni	L1018	S	S	S	S	S	S
28	C06-	45	2006年5月	jejuni	L106	S	S	S	S	S	S
29	C06-	55	2006年5月	jejuni	TCK1	S	S	S	S	S	R
30	C06-	56	2006年5月	jejuni	L1050	S	S	S	S	S	S
31	C06-	73	2006年6月	jejuni	L107	S	S	S	S	S	S
32	C06-	75	2006年6月	jejuni	L102	R	R	R	R	S	R
33	C06-	76	2006年6月	jejuni	L104	S	S	S	S	S	R
34	C06-	83	2006年6月	jejuni	L102	R	R	R	R	S	S
35	C06-	109	2006年6月	jejuni	L107	R	R	R	R	S	S
36	C06-	125	2006年8月	jejuni	L1027	S	S	S	S	S	S
37	C06-	126	2006年8月	jejuni	L1011	S	S	S	S	S	S
38	C06-	143	2006年8月	jejuni	L1036	S	S	S	S	S	S
39	C06-	164	2006年10月	jejuni	L104	R	R	R	R	S	S
40	C06-	166	2006年10月	jejuni	UT	S	S	S	S	S	S
41	C06-	175	2006年10月	jejuni	L1018	S	S	S	S	S	S
42	C06-	176	2006年10月	jejuni	L104	R	R	R	R	S	R
43	C06-	188	2006年10月	jejuni	UT	S	S	S	S	S	S
44	C06-	197	2006年10月	jejuni	L104	S	S	S	S	S	S
45	C06-	208	2006年10月	jejuni	L1010	S	S	S	S	S	R
46	C06-	209	2006年12月	jejuni	UT	S	S	S	S	S	S
47	C06-	214	2006年12月	jejuni	L104	R	R	R	R	S	R
48	C06-	230	2006年12月	jejuni	L104	R	R	R	R	S	S
49	C06-	247	2006年12月	jejuni	L1028	S	S	S	S	S	R
50	C06-	250	2006年12月	jejuni	L1017	S	S	S	S	S	S

表3. ヒト臨床分離株②の血清型別データ

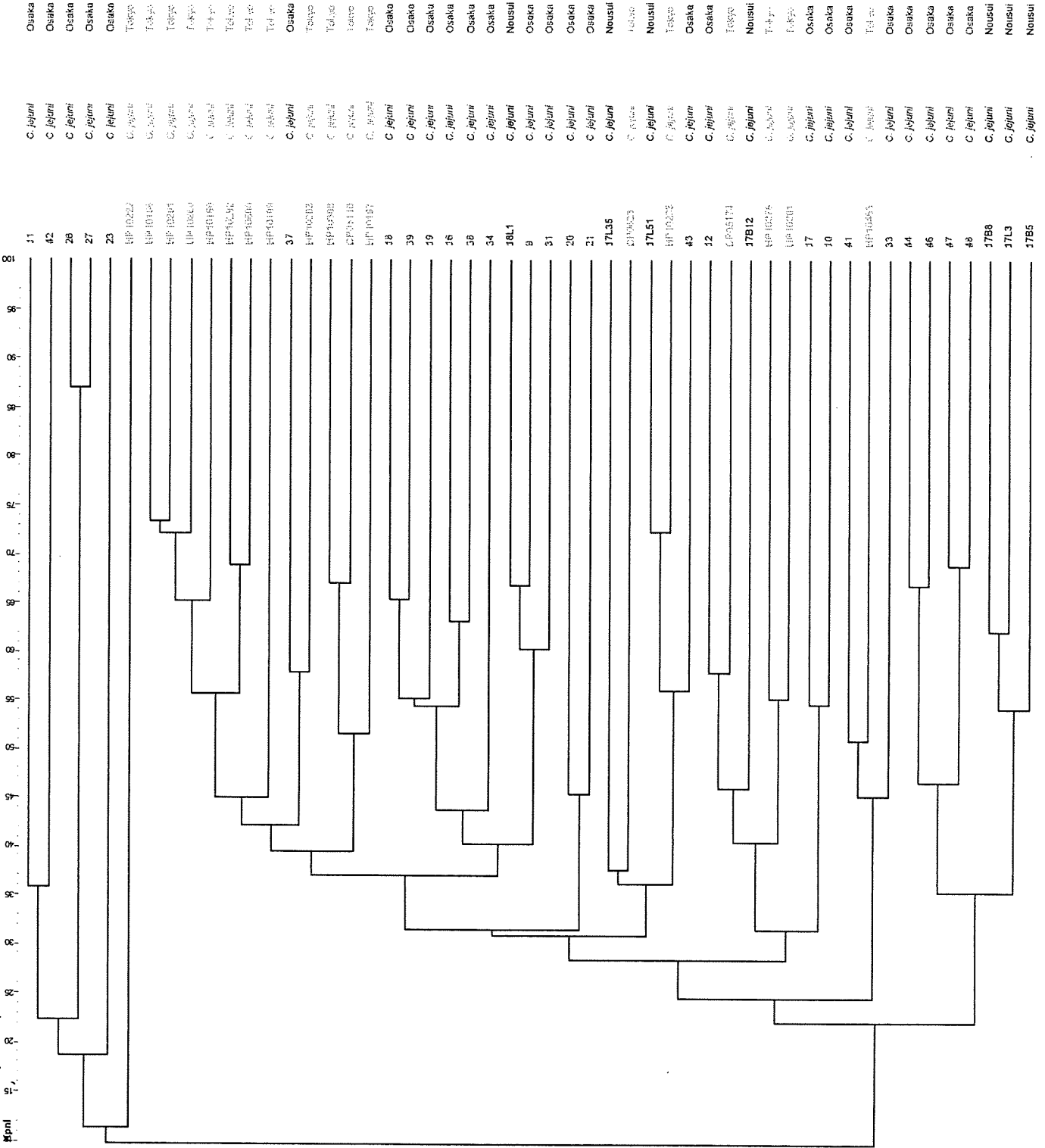
散発患者由来 <i>C. jejuni</i>			
HP-No.	LIO	PEN	
1	10143	4	B
2	10150	28	Y
3	10156	2	A
4	10157	11	UT
5	10197	TCK12	J
6	10199	TCK26	D
7	10201	36	C
8	10222	7	O
9	10226	TCK13	K
10	10229	33	A
11	10233	4	B
12	10240	6	F
13	10256	50	R
14	10260	TCK1	L
15	10267	41	N
16	10276	10	G
17	10278	TCK12	J
18	10291	7	O
19	10292	36	C
20	10303	TCK13	K
21	10307	UT	UT
22	10308	28	Y
23	10318	4	B
24	10344	TCK26	D
25	10350	49	G
26	10397	TCK24	E
27	10463	61	Z7
28	10468	2	A
29	10500	60	N
30	10504	36	C

食中毒事例患者由来 <i>C. jejuni</i>			
菌株番号	LIO	PEN	推定原因食品
1	CP05-16	11	UT
2	CP05-29	4	B
3	CP05-34	TCK26	D
4	CP05-43	36	C
5	CP05-50	4	B
6	CP05-93	18	N.T
7	CP05-116	TCK26	D
8	CP05-174	19	N.T
9	CP05-183	36	C
10	CP06-23	36	C
11	CP06-30	7	O
12	CP06-40	50	R
13	CP06-42	36	C
14	CP06-74	TCK12	J
15	CP06-104	1	D
16	CP06-114	49	G
17	CP06-169	77	O
18	CP06-276	7	D
19	CP06-328	TCK12	J
20	CP06-340	4	B

鶏肉
鶏肉
鶏肉
焼肉、レバ刺し
レバ刺し、ささみ
とり刺し
焼鳥、ささみ
鳥レバ刺し
ユッケ、焼肉
焼肉、レバ刺し
軍鶏鍋コース
レバ刺し
レバ刺し
焼鳥
ささ身串焼き
鶏のたたき、半生レバー串
レバ刺し
焼鳥等
豚肉レバー
鳥唐揚げ

Pearson correlation (0.0%~100.0%)

図2系統樹2



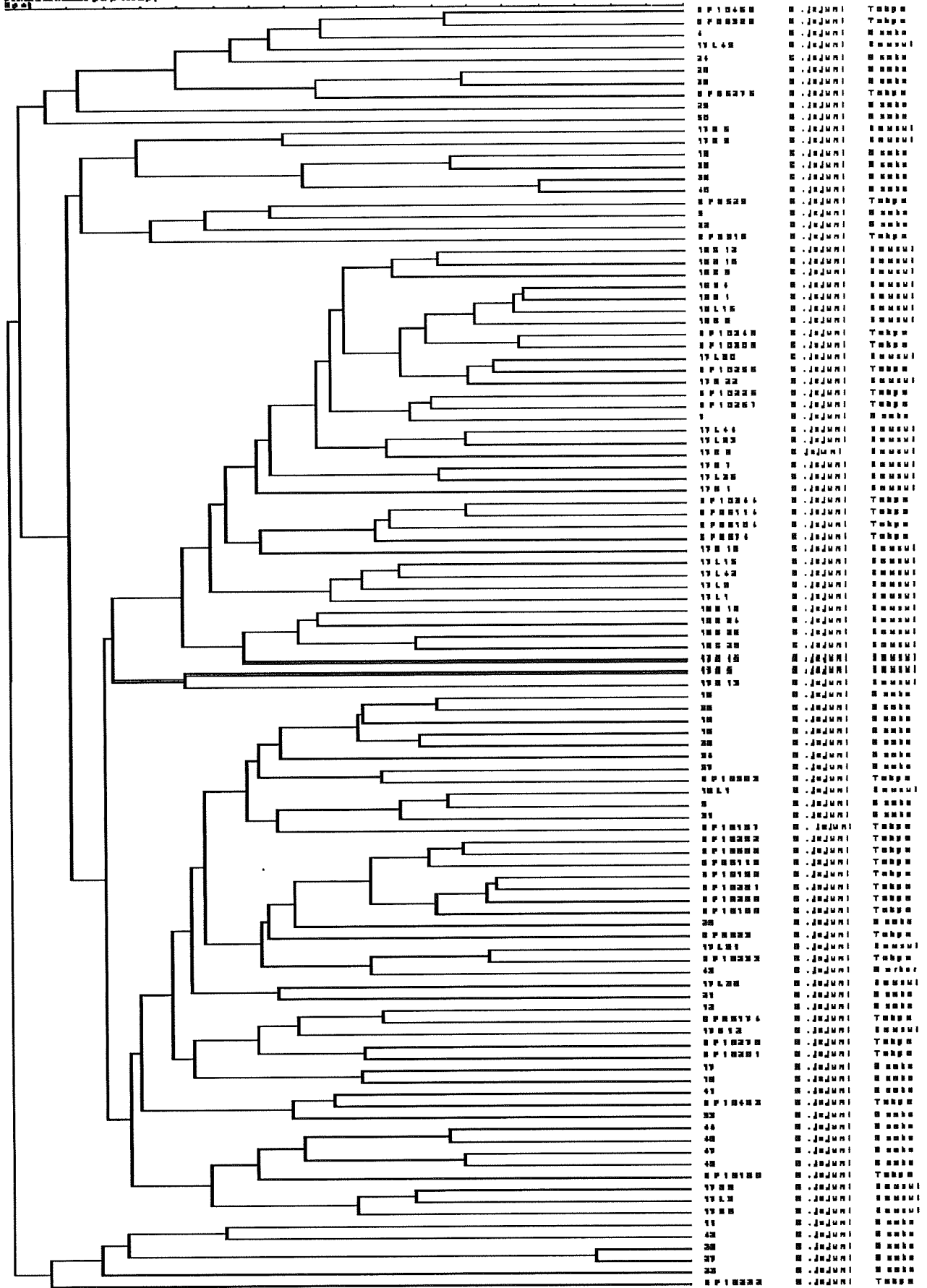


図3 系統樹3

平成21年度厚生労働省食品の安心・安全確保推進研究事業
「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及び
サーベイランスシステムの高度化に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究

分担研究者：浅井鉄夫、（農林水産省動物医薬品検査所）
研究協力者：小澤真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）
研究協力者：馬場光太郎（農林水産省動物医薬品検査所）
研究協力者：石原加奈子（酪農学園大学）

研究要旨

食用動物に抗菌性物質が使用される中で出現した薬剤耐性菌もしくは耐性遺伝子が食品を介して、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、科学的なリスク分析が不可欠である。家畜における薬剤耐性菌の分布には様々な要因が関与するため、薬剤耐性菌のリスク管理は、生産から流通・消費にわたる幅広い視点で検討する必要がある。本研究では、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 事業より、全国から収集された家畜由来のサルモネラ及びカンピロバクターの薬剤耐性についての全国動向を解析した。また、欧米で報告されている豚における MRSA の東日本の分布を調査した。

A. 研究目的

畜産現場において、抗菌性物質は、法的規制の下で使用され、細菌感染症による損耗の抑制や安全な畜産物の安定供給に貢献してきた。一方、医療や獣医療において使用された抗菌性物質によって薬剤耐性菌が出現・増加し、薬剤耐性菌による感染症は、治療効果の低下につながる深刻な問題となっている。家畜由来の食中毒菌の薬剤耐性が、食品を介してヒトの健康へ悪影響が発生する可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおけるモニタリングの重要性が国際的に認識されている。我々は、1) 国内において分離される各種家畜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、JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistant Monitoring System) を実施してきた。

これまで、食中毒菌としてサルモネラとカンピロバクターに注目して、家畜由来株の薬剤耐性動向の把握及び耐性菌の疫学的解析を行ってきた。フードチェーンの各段階で分離される食中毒菌が類似していることを示唆してきたが、家畜由来を含む各段階で分離される株間の本質的な関連性の解明には至っていない。

平成21年(2009)度は、2008年度に全国で分離された家畜由来サルモネラとカンピロバクターの薬剤耐性動向の

調査及び、欧米諸国で問題となっている豚における MRSA の分布状況の調査を行った。

B. 研究方法

(1)サルモネラの薬剤感受性：

2008 年度に全国の家畜保健衛生所で病性鑑定材料から分離された 179 株（牛由来 73 株、豚由来 85 株、鶏由来 21 株）を用いた。薬剤感受性は、CLSI 法に準じた寒天平板希釈法により実施した。薬剤は、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 薬剤を用いた。各薬剤の耐性限界値（ブレイクポイント）は、CLSI のガイドライン及び既報（J Antimicrob Chemother. 53: 266-270, 2004.）に基づいた。

(2)供試カンピロバクター株：

薬剤感受性動向のとりまとめは、2008 年度に全国の家畜保健衛生所で健康な家畜の糞便から分離したカンピロバクター 157 株（牛 36 株、豚 42 株、採卵鶏 41 株、肉用鶏 38 株）を用いた。薬剤感受性は、CLSI 法に準じた寒天平板希釈法により実施した。供試薬剤は、ABPC、DSM、OTC、CP、エリスロマイシン (EM)、NA、ERFX の 7 薬剤である。各薬剤の耐性限界値（ブレイクポイント）は、既報（J. Appl. Microbiol. 100: 153-160, 2006）に従い設定した。

(3) メチシリン耐性ブドウ球菌の調査：

2009 年 3 月～9 月に、東日本の 7 県下 23 農場から食肉処理場へ出荷された豚

から採取した鼻腔スワブ 115 検体と糞便 115 検体（採取した個体は必ずしも一致していない）からメチシリン耐性ブドウ球菌の分離を行った。

分離は、7.5%塩化ナトリウム (NaCl) 加 HIB (Heart Infusion Broth)を用いて 35 度で 18 時間増菌培養を行った。増菌培養後、クロモアガーMRSA スクリーン培地（関東化学）と MRSA 選択培地（ベクトンディッキンソン社）に増菌培養液一白金耳を塗布し、37 度で 24 時間培養した。ブドウ球菌を疑うコロニーは、オキシダーゼ、カタラーゼ試験及びグラム染色を行った。同定は、コアグラエゼ反応と N-ID テスト SP-18（ニッスイ）を用いて実施した。

ブドウ球菌は、既報（Kawano ら、J. Clin. Microbiol. 34: 2072-2077, 1996）の PCR 法により *mecA* 遺伝子を検索した。さらに、既報のマルチプレックス PCR 手法（Oliveira ら 2002 と Milheirico ら 2007）を用いて SCC_{mec} TYPE の分類を行った。*mecA* 陽性 *S. aureus* は、multilocus sequence typing (MLST) による遺伝子型別を実施した（Enright ら 2000）。薬剤感受性試験は、15 薬剤を対象に CLSI 法に準じた微量液体法により実施した。

(4)qnr 保有 *S. Typhimurium* の疫学性状

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)の性状を調べた。各種フルオロキノロン剤に対する感受性試験を、CLSI 法に準じた微量液体法により実施した。また、耐性遺伝子の所在は、プラスミドを抽出後、サザンハイブリダイゼーションを用いて調べた。同一農場で、2005 年に分離された株を用いて、パルスフィールドゲ

ル電気泳動 (PFGE) により遺伝子型を比較した。PFGE は、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。

C. 研究結果

1. 2008 年度分離サルモネラの薬剤感受性 (表 1, 2)

家畜由来サルモネラ株の血清型は、38 種類認められ、Typhimurium (71株)、Choleraesuis (36株)、Infantis (12株)が優勢だった。

牛及び豚由来株では、ABPC (44%及び51%)、DSM (70%及び94%) 及びOTC (42%及び82%) に対する耐性が高率に認められた。一方、鶏由来株では、DSM (62%) KM (48%) 及びOTC (62%) に対する耐性が高率に認められた。また、豚及び鶏由来株では、TMPに対する耐性も35%及び38%に認められた。全畜種で、ERFXは認められず、CEZ耐性は、牛由来Typhimurium 及び鶏由来Infantisで認められた。

2. 2008 年度分離カンピロバクターの薬剤感受性 (表 3)

C. jejuni では、DSM、OTC、NA 及びERFX に対する耐性率の低下傾向が認められた。*C. coli* では、ABPC 及びEM 耐性の増加傾向が認められたが、NA 及びERFX に対する耐性の減少傾向が認められた。

3. 牛由来フルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* (図 1、図 2、表 4)

2006-2007年に分離されたTyphimuriumのqnrS1遺伝子は、9.6Kbのプラスミド上に存在した (図1)。各種フルオロキノロン剤に対する薬剤感受性を表4にし

めした。

当該農場で2005年に分離された株とPFGE型は同一で、これら全ての株は、DT104であった (図2)。

4. 豚からのメチシリン耐性ブドウ球菌の分離

ブドウ球菌は、鼻腔スワブ115検体中10検体 (8.7%)から、また、糞便115検体中5検体 (4.3%)から増菌培養法により分離された (表5)。鼻腔スワブから分離されたブドウ球菌は、*S. aureus*、*S. capitis*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. lentus*及び*S. spp* (各1検体)、*S. ludunensis*(2検体)、*S. warneri* (5検体)であった。糞便からの分離株は、*S. aureus* (1検体)、*S. haemolytica* (2検体) 及び*S. warneri*(2検体)であった (表6)。

鼻腔スワブから分離された*S. aureus* は、*mecA*を保有していた。コアグラウゼ陰性ブドウ球菌(CNS)においても*mecA*は、*S. warneri* (4検体)、*S. haemolytica* (3検体)、*S. epidermidis*、*S. lentus*、*S. spp* (各1検体)で認められた。

鼻腔から分離された*S. epidermidis*のSCC*mec*型はIV、鼻腔から分離された*S. warneri*2株 (NS66, 68) と糞便から分離された *S. haemolyticus* 2株のSCC*mec*型は Vであった。その他の*mecA*保有株のSCC*mec*型は、決定できなかった

MRSAは、MLST によりST221と型別された。分離されたMRSA株は、アンピシリンとストレプトマイシンに耐性を示し、テトラサイクリンやエリスロマイシンには感受性を示した (表7)。

D. 考察

家畜由来サルモネラにおいて、伝達性フルオロキノロン耐性因子を保有する *S. Typhimurium* が分離されたため、過去に

当該農場で分離された Typhimurium 株との比較を行った。フェージ型及び PFGE 型は同一で、農場に分布していた株に、*qnrS1* 遺伝子保有プラスミドが伝播した可能性が示唆された。しかし、2002~2007 年に家畜から分離された *S. Typhimurium* では、その他の農場への分布は確認されていない (H20 年度報告書)。家畜における伝達性キノロン耐性因子の分布は、フルオロキノロン耐性株の増加につながる重要な要因であることから、継続的にモニタリングしていく必要がある。

国内で飼育されている豚に MRSA が分布する可能性が示唆された。しかし、欧米で分布する MRSA ST398 の分布は認められなかった。

MLST のデータベースによると、ST221 に属する株は、フランスとスコットランドの病院で分離されたメチシリン感受性株とメチシリン耐性株であった。その他に、韓国の病院で SCCmec II 型の MRSA ST221 が分離されている (Cho ら 2006)。MLST のデータベースとインターネットで検索する限り ST221 が動物から分離されたという報告はなく、人に分布する系統の株である可能性が示唆された。

分離された MRSA ST221 株は、10 薬剤中アンピシリンとストレプトマイシンの 2 剤にのみ耐性を示した。欧米からの報告 (de Neeling ら 2005、Smith ら 2009) でも豚由来 MRSA は特にテトラサイクリンに高率で耐性を示している。一般的に院内感染型の MRSA は多剤耐性といわれている (Lemmen ら 2004)。

本調査において豚の鼻腔スワブから分離された ST221 は、これまで人から分離されている系統の株であること、養豚場で使用されるテトラサイクリンに感受性

である。このことから、今回豚から分離された MRSA 感染源及び汚染状況については、継続的な調査が必要である。

E. 結論

豚における MRSA の分布を調査した結果、欧米で高率に分布する ST398 の汚染は認められなかった。また、プラスミド性キノロン耐性因子 (*qnr*) は、農場に分布した Typhimurium DT104 に伝播した可能性が示唆された。

F. 健康危害情報

耐性菌の food chain を介した耐性菌の伝播を防止するため、各分野における耐性菌対策を構築する必要がある。

G. 研究発表

1. Harada, K., Ozawa, M., Ishihara, K., Asai, T., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Prevalence of antimicrobial resistance among serotypes of *Campylobacter jejuni* isolates from cattle and poultry in Japan. *Microbiol. Immunol.* 53:107-11.
2. Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Relationships between multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 198-200.
3. Ishihara, K., Takahashi, T., Morioka, A., Kojima, A., Kijima, M., Asai, T., Tamura, Y. National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 2009 51:35.

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。