

健康家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性調査

石原加奈子

農林水産省動物医薬品検査所 (〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1)

1. はじめに

カンピロバクターは家畜には症状を示すことなく腸内に定着しているが、人には腸炎を引き起こし、欧米では最も発生事件数の多い散発性食中毒の原因菌である。最近では、人の細菌性腸炎の治療薬であるフルオロキノロンに対する耐性株が人症例や畜産食品等から分離され、話題となっている。

当所では、昭和51年度に初めて全国的な動物由来細菌（大腸菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌）の薬剤感受性調査を実施した。それ以降、数回にわたり定期的な全国調査が実施されてきているが、最近、「食用動物における抗菌性物質使用の人の健康への影響」について国際的に議論されていることから、平成11年度より、健康家畜糞便由来細菌として人獣共通感染症の原因菌であるサルモネラおよびカンピロバクターと、薬剤感受性動向の指標菌として腸球菌および大腸菌の薬剤感受性調査を実施している。初年度は全国の家畜保健衛生所に家畜糞便の採材を依頼し、当所において菌の分離・同定並びに分離株の薬剤感受性試験を実施したが、平成12年度からは一連の試験を各都道府県で実施している。今回は、平成12年度に収集したカンピロバクターの薬剤感受性について報告する。

2. 材料および方法

1) 分離・同定

検体は、健康な肥育牛155検体、肥育豚148検

体、産卵鶏160検体および肉用鶏116検体の糞便とし、シードスワブ1号（栄研）を用いて検体を輸送後、CEM培地による増菌培養も併用してCCDA培地により、菌分離を行った。分離株について、生化学的性状検査（オキシダーゼ、カタラーゼ、酢酸インドキシル加水分解能、馬尿酸塩加水分解能、温度別発育試験（43, 37および25℃）、1%グリシン、0.04% TTC、1.5% NaClおよび3.5% NaCl添加培地での増殖性、TSI培地による硫化水素産生能、糖分解能）〔5〕およびPCR法〔2〕により菌種同定を行った。分離された菌株は1検体2株について、以下の試験に供試した。

2) 血清型別

C. jejuni について Penner の血清型別を、カンピロバクター免疫血清（デンカ生研）および感作血球調製試薬（デンカ生研）を用いて、受身血球凝集反応により行った。

3) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、日本化学療法学会標準法に準拠した寒天平板希釈法により行った〔4〕。セフトオフル（CTF）、ジヒドロストレプトマイシン（DSM）、ゲンタマイシン（GM）、スペクチノマイシン（SPCM）、エリスロマイシン（EM）、スピラマイシン（SPM）、タイロシン（TS）、オキシテトラサイクリン（OTC）、クロラムフェニコール（CP）、ナリジクス酸（NA）、オキシリン酸（OXA）、エンロフロキサシン（ERFX）、オフロキサシン（OFLX）、トリメトプリム（TMP）、スルファジメトキシシン（SDMX）を供試した。薬剤感受性測定用の基礎培地には5%馬脱線維素血液添加ミューラーヒントン寒天培地（Oxoid）を用い、接種菌は5%馬脱線維素血液添加ミューラーヒン

トン寒天培地で48時間培養したものをミューラーヒントンプロス(Difco)に浮遊させ、約 10^6 CFU/mlに調整し、ミクロプランターを用いて接種した。培養条件は37°C、微好気(O₂ 5%, CO₂ 10%, N₂ 85%), 48時間とした。

供試菌株のMIC分布が二峰性を示した薬剤について、低いMICを示した群を感受性、高いMICを示した群を耐性とし、その中間値をブレイクポイントとした。

3. 結果

1) 分離・同定

肥育牛155検体中38検体(24.5%), 肥育豚148検体中61検体(41.2%), 産卵鶏160検体中48検体(30.0%)および肉用鶏116検体中30検体(25.9%)から計302株のカンピロバクターが分離された(表1)。同定された菌種の内訳は*C. jejuni* 174株, *C. coli* 107株, *C. fetus* 13株, *C. hyointestinalis* 6株, *C. lari* 1株およびその他1株であった(表2)。

2) 血清型別

C. jejuni 174株の血清型は、肥育牛由来株は、A群1株, B群6株, D群22株, R群4株, Z6群2株, 複数の血清と反応を示した複合型3株および型別不能5株に分類され、産卵鶏および肉用鶏由来株はA群24株, B群18株, C群3株, D群17

株, E群1株, G群18株, I群3株, J群2株, K群2株, N群4株, O群2株, Y群2株, Z5群1株, 複合型7株および型別不能26株であった(表3)。

3) 薬剤感受性試験

分離302株の薬剤感受性は供試16薬剤中、10薬剤において、MIC分布に二峰性が認められ、OTC(57.6%), NAおよびOXA(30.5%), DSM(27.8%)が高い耐性率を示した(表4)。また、分離株の主要菌種である*C. jejuni*および*C. coli*の薬剤感受性について比較すると、*C. coli*のMIC値は*C. jejuni*と比べ高い傾向にあり、また耐性率もいずれの薬剤においても有意に高かった(表5)。特にマクロライド系においては、*C. coli*が46.7%と高い耐性率を示したのに対し、*C. jejuni*には耐性株は認められなかった。また、分離された由来ごとに耐性率を見てみると、オールドキノロンを除くいずれの薬剤についても肥育豚由来が最も高い値を示し、マクロライド系のEMでは肥育牛5.0%, 肥育豚43.4%, 産卵鶏2.4%および肉用鶏1.9%で、フルオロキノロン(ERFXおよびOFLX)では肥育牛15.0%, 肥育豚22.6%, 産卵鶏4.9%および肉用鶏7.4%であった。

4. 考察

平成12年度の調査結果では、前年度同様に肥育牛、産卵鶏および肉用鶏からは主に*C. jejuni*が、肥育豚からは主に*C. coli*が分離された〔6〕。*C. jejuni*の血清型は肥育牛由来が5群以上であったのに対し、産卵鶏および肉用鶏由来では、13群以上であった。人のカンピロバクター症の感染源として重視されている鶏においてはより多様な株

表1 カンピロバクター分離率

畜種	分離検体数/検体数	分離率 (%)
肥育牛	38 / 155	24.5
肥育豚	61 / 148	41.2
産卵鶏	48 / 160	30.0
肉用鶏	30 / 116	25.9

表2 カンピロバクター分離株数

由来動物	菌 種						計
	<i>jejuni</i>	<i>coli</i>	<i>fetus</i>	<i>hyointestinalis</i>	<i>lari</i>	spp.	
肥育牛	43	3	13			1	60
肥育豚	1	98		6	1		106
産卵鶏	77	5					82
肉用鶏	53	1					54
計	174	107	13	6	1	1	302

表 3 *C. jejuni* 血清型

由来動物	複合型																型別 計										
	A	B	C	D	E	G	I	J	K	N	O	R	Y	Z5	Z6	A/B		A/Y	A/Z	B/D	B/U	C/D	C/G	D/N	D/S	I/S	不能
肥育牛	1	6	22								4				2			1	1							5	43
肥育豚																								1			1
産卵鶏	12	12	3	10	1	12	2	2	2	4		2	2		1						1	1				14	77
肉用鶏	12	6	7		6	3				2	2	1	1												2	12	53
計	25	24	3	39	1	18	3	2	2	4	2	4	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	31	174

表 4 *Campylobacter* 302 株の MIC 分布

抗菌剤	MIC (μg/ml)																耐性菌		
	≤ 0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100 ^a	200 ^b	400	400<	フレーク ポイント	株数 (%)	MIC ₅₀	MIC ₉₀
CTF									4	17	121	160	*	*	*			100<	100<
DSM				100	73	38	7		2	1	14	67	*	*	*	25	84 (27.8)	0.78	100<
GM			79	153	62	6	2											0.39	0.78
SPCM						1	47	172	76	1		5	*	*	*	50	5 (1.7)	6.25	12.5
EM				37	97	62	44	5	3	1	1	48	*	*	*	25	52 (17.2)	1.56	100<
SPM	1	1		1	13	91	82	39	23	1		51	*	*	*	25	52 (17.2)	3.13	100<
TS						4	25	130	57	15	14	5	52	*	*	100	57 (18.9)	6.25	100<
OTC			8	39	43	23	15	10	9	25	52	46	*	*	*	6.25	174 (57.6)	25	100<
CP					2	60	130	60	10	15	20	4	1	*	*			3.13	25
NA						3	95	84	51	7		5	57	*	*	50	62 (30.5)	6.25	100<
OXA					94	77	63	6	3	13	2	4	40	*	*	12.5	62 (30.5)	0.78	100<
ERFX	3	163	61	32	2		5	24	11	1				*	*	1.56	41 (13.6)	0.1	6.25
OFLX		2	58	150	46	5		3	8	24	6			*	*	3.13	41 (13.6)	0.39	12.5
SDMX									1	1	3	12	11	37	238		100<	100<	100<
TMP											1	301	*	*	*			100≤	100≤

* : non tested

a : TMP については 100 ≤ を示す

b : SDMX を除く薬剤については 100< を示す

表5 *Campylobacter jejuni/coli* の MIC 分布

抗菌剤	菌種	MIC (μ g/ml)			ブレイクポイント	耐性菌株数 (%)
		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
CTF	<i>jejuni</i>	50-100<	100<	100<		
	<i>coli</i>	25-100<	100<	100<		
DSM	<i>jejuni</i>	0.39-100<	0.39	0.78	25	6 (3.4)
	<i>coli</i>	0.78-100<	100	100<	25	66 (61.7)
GM	<i>jejuni</i>	0.2-0.78	0.39	0.39		
	<i>coli</i>	0.2-3.13	0.39	0.78		
SPCM	<i>jejuni</i>	1.56-12.5	6.25	6.25		
	<i>coli</i>	3.13-25	12.5	12.5	50	4 (3.7)
EM	<i>jejuni</i>	0.1-12.5	0.78	1.56		
	<i>coli</i>	0.78-100<	3.13	100<	25	50 (46.7)
SPM	<i>jejuni</i>	0.39-6.25	1.56	3.13		
	<i>coli</i>	0.1-100<	12.5	100<	25	50 (46.7)
TS	<i>jejuni</i>	1.56-25	6.25	12.5		
	<i>coli</i>	1.56-100<	25	100<	100	50 (46.7)
OTC	<i>jejuni</i>	0.2-100<	1.56	100	6.25	73 (42.0)
	<i>coli</i>	0.2-100<	100	100<	6.25	94 (87.9)
CP	<i>jejuni</i>	1.56-12.5	3.13	6.25		
	<i>coli</i>	0.78-100<	6.25	50		
NA	<i>jejuni</i>	1.56-100<	3.13	12.5	50	13 (7.5)
	<i>coli</i>	3.13-100<	12.5	100	50	28 (26.2)
OXA	<i>jejuni</i>	0.39-100<	0.39	1.56	6.25	13 (7.5)
	<i>coli</i>	0.39-100<	1.56	100<	6.25	28 (26.2)
ERFX	<i>jejuni</i>	\leq 0.05-12.5	0.1	0.39	1.56	12 (6.9)
	<i>coli</i>	\leq 0.05-12.5	0.2	6.25	1.56	28 (26.2)
OFLX	<i>jejuni</i>	0.2-25	0.39	0.78	3.13	12 (6.9)
	<i>coli</i>	0.1-50	0.39	25	3.13	28 (26.2)

供試菌株数: *C. jejuni* 174 株, *C. coli* 107 株

ブレイクポイントの設定されたすべての薬剤に関して, 菌種間の耐性率に有意差が認められた ($p < 0.05$)

が定着していることが示された。また, 薬剤感受性については, *C. coli* は *C. jejuni* よりいずれの薬剤においても高い耐性率を示し, 特に人のカンピロバクター症の治療における第一次選択薬である EM では *C. jejuni* には耐性株が認められなかったのに対し, *C. coli* では 46.7% と高い耐性率が認められた。しかし, 現在国際的に議論されているフルオロキノロンについては, *C. coli* の方が 26.2% と高い耐性率を示したものの, *C. jejuni* においても 6.9% の耐性率が認められた。なお, 抗菌剤の使用が制限されている産卵鶏と広範に抗菌剤が使用されている肉用鶏の薬剤耐性率には大きな差は認められなかった。一般に, カンピロバクターのフルオロキノロンに対する感受性は, 多くのグラム陰性菌と比較すると低く, また DNA ジャイ

レース遺伝子の 1 塩基が変異することにより容易に耐性を獲得するため [1, 3, 7], 経口投与と剤による群治療が行われる肉用鶏でのフルオロキノロン耐性株の出現・増加が懸念されている。しかし, 今回の調査では, 肉用鶏由来株のフルオロキノロン耐性率は肥育牛と比べても低く, 推測される畜産現場での抗菌剤の使用実態を反映する結果ではなかった。

5. おわりに

近年, 世界保健機関 (WHO) において, 食用動物における抗菌性物質の使用を制限する必要性が議論されており, 薬剤耐性モニタリングおよびリスク分析の実施に併せて慎重使用 (ブルーデント

ユース)の励行が勧告されている。特にカンピロバクターについては、その農場内や市場などにおける疫学情報および家畜由来や人症例由来株の薬剤感受性調査についてもリスク分析を実施するための十分なデータが集積されていない。その基礎データを得るためにも、今後ともこのような家畜由来細菌の薬剤感受性調査を実施していくと同時に、畜産現場においても抗菌剤の慎重使用の徹底が望まれる。

謝 辞

本調査を実施するに当たり、ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の職員各位に深謝いたします。

要 約

近年の薬剤耐性菌に関する国際的議論を背景に、国内において健康家畜糞便由来カンピロバクターの薬剤感受性調査を実施した。健康な肥育牛、肥育豚、産卵鶏および肉用鶏の糞便 579 検体から計 302 株のカンピロバクターが分離された。これらの耐性率はオキシテトラサイクリン 57.6%、キノロン 30.5%、ジヒドロストレプトマイシン 27.8%、マクロライド 17.1~18.9%、フルオロキノロン 13.6%であった。いずれの薬剤についても *C. coli* が *C. jejuni* と比べて高い耐性率を示し、特にマクロライドに対して、*C. jejuni* は耐性を示さなかった。

引用文献

- 1) Bachoual R, Ouabdesselam S, Mory F, Lascols C, Soussy CJ, Tankovic J: Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Microb Drug Resist, 7, 257-61 (2001)
- 2) Lintond D, Lawson A J, Owen R J, Stanley J: PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol, 35, 2568-2572 (1997)
- 3) Gerald Z, Yu L, Bala S, Frederick A: Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates. Detection of *gyrA* resistance mutations by Mismatch Amplification Mutation Assay PCR and DNA sequence analysis. J Clin Microbiol, 37, 3276-3280 (1999)
- 4) 三橋 進, 五島瑳智子, 徐慶一郎, 河喜多龍祥, 小酒井望, 西野武志, 大沢伸孝, 田波 洋: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. 日本化学療法学会雑誌, 29, 76-79 (1981)
- 5) Nachamkin I: *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Manual of clinical microbiology, 7th ed. (Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH ed), USA, 716-726 (1999)
- 6) 高橋敏雄, 守岡綾子, 石原加奈子, 木島まゆみ, 小島明美, 大園智子, 船橋かおり, 田村 豊: 国内における家畜由来耐性菌について. 動物用抗菌剤研究会報, 23, 9-16 (2001)
- 7) Wang Y, Huang WM, Taylor DE: Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. Antimicrob Agents Chemother, 37, 457-63 (1993)

1) Bachoual R, Ouabdesselam S, Mory F, Lascols C,

Nationwide Monitoring of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Isolated from Healthy Food-Producing Animals in Japan

Kanako ISHIHARA

National Veterinary Assay Laboratory, 1-15-1, Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan

Based on the international discussion about antimicrobial resistance, nationwide monitoring of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from healthy food-producing animals has been carried out in Japan. A total of 302 *Campylobacter* strains (1 or 2 strains from each sample) were isolated from 579 feces of bovine, porcine, layers and broilers during the period of September 2000 to March 2001. The frequencies of *Campylobacter* strains resistant to each drugs were as follows: oxytetracycline 57.6%, quinolones 30.5%, dihydrostreptomycine 27.8%, macrolide 17.1 ~ 18.9% and fluoroquinolones 13.6%. In the *C. coli* strains, the frequencies of resistance to all antimicrobials were higher than those in the *C. jejuni* strains. It was noted that all of *C. jejuni* strains were susceptible to macrolide.

討 論 (座長：五十君静信 国立医薬食衛研， 阪野哲也 全農家畜衛研)

質問 (小川益男，日本食品分析センター)

各家保に対して，共通した検体の取り方を行うために，どのような依頼をしているか。

答 (石原加奈子)

この耐性菌調査は，農林水産省の生産振興総合対策事業の一環として実施しており，事業実施要綱の中で，各都道府県内の一部の地域に偏ることのないよう，調査対象家畜(肥育牛，肥育豚，産卵鶏，肉用鶏)の各畜種ごとに6以上の畜産経営(農家)を選定し，健康な対象家畜の糞便を採取するように規定している。

また，各都道府県の担当者を集めた研修会において，その詳細を説明し，カンピロバクターについてはシードスワブを用いた冷蔵での材料の輸送をお願いしている。

質問 (五十君静信，国立医薬食品衛研)

どのくらいの期間，調査が必要なのですか。

答 (石原加奈子)

特に決まっていますが，カンピロバクターについては過去のデータが少なく，続けたいと思います。

質問 (佐藤静夫，全農家畜衛研)

C. coli と *C. jejuni* の分布が動物により異なるので，*C. coli* のデータは豚での抗菌剤使用を反映していると考えて良いか。

答 (石原加奈子)

C. coli は，豚以外の検体からは，ほとんど分離されていないため，耐性率の差が豚に対する抗菌剤使用を反映しているのか，菌種による耐性獲得能の差を反映しているのかは現在のデータだけではわからない。人のカンピロバクター症の治療に用いられるマクロライド系抗生物質およびフルオロキノロン剤の耐性については特に注目されているが，腸球菌のマクロライド耐性および大腸菌のフルオロキノロン耐性はブロイラーにおいて多く認められている。このことから考えると，豚由来株の耐性率が高いのは，その構成菌種による影響が大きいのではないかと考える。