

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立

研究総括

研究代表者 田村 豊

酪農学園大学獣医学群食品衛生学ユニット

研究要旨

本研究では、国際的にも例のない食用動物由来耐性菌に関する定量的リスク評価ガイドライン設定を視野に入れた定量的食品健康影響評価モデルを確立することを目的とした。定量的リスク評価モデルの確立に向けて、対象薬剤をフルオロキノロン剤とし、農場及び生産物の食中毒菌による汚染が深刻な肉用鶏、そして食中毒の年間発生例が極めて多いカンピロバクターを対象菌として検討した。定量的評価モデルを構築するに当たり、公表データがなくリスク評価に必要なデータを集積する実験班と、公表論文から得たデータと実験班から提供されたデータを使用して定量的食品健康影響モデルを確立するリスク評価班が有機的に連携を持ちながら研究目的の完遂を目指した。

公表データや実験班で得られたデータをベースに、新たに発生段階部分も確率論的定量的リスク評価モデルを構築した。モデルによる試算の結果、*Campylobacter* 感染鶏に占める FQ 剤感染鶏の割合を、耐性菌の耐性機構別に推測することができた。ばく露評価については、平成 20～22 年度に食品安全委員会の研究事業「定量的リスク評価の有効な実践と活用のための数理解析技術の開発に関する研究（主任研究者：春日文子）」において、鶏肉調理における *Campylobacter* の交差汚染の定性的・定量的評価が実施されているため、この研究で用いられているばく露段階のデータを収集・整理し、データ更新が必要なものについては最新のデータを収集した。曝露評価については、感染性胃腸炎罹患患者からアンケート調査を実施したものの、研究期間内に耐性菌感染による治療期間の延長や症状の重篤度などの情報が十分に得られなかった。

以上のことから、確率論的定量的リスク評価モデルの構築を通して得られた知見を踏まえて、薬剤耐性菌によるヒトへの健康影響に関する確率論的リスク評価指針骨子素案を作成した。

A. 研究目的

わが国では、食品安全委員会がOIEのガイドラインを参考に「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針」（2004年）を制定し、食用動物に使用される抗菌性物質の食品媒介性のヒトの健康への定性的なリスク評価が行われている。しかし、Codexにより2011年に制定された耐性菌に係るリスク分析ガイドラインでは、定量的なリスク評価の必要性が言及されている。現在のところ、

耐性菌に関する定量的なリスク評価の手法は確立されていないが、効果的なリスク管理対策を実施するためには将来的に科学的データに基づく定量的リスク評価を実施していく必要がある。本研究では、国際的にも例のない食用動物由来耐性菌に関する定量的リスク評価ガイドライン設定を視野に入れた定量的食品健康影響評価モデルを確立することを目的とした。

耐性菌に関する定量的リスク評価が実施されていない最大の理由は、定量的なリスク評価を実施するために必要なデータが公表されていないことである。そこで本研究班を二つに分け、リスク評価に必要なデータを集積する実験班と、公表論文から得たデータと実験班から提供されたデータを使用して定量的食品健康影響モデルを確立するリスク評価班を設けた。それぞれが有機的に連携を持ちながら、研究目的の完遂を目指した。

なお、定量的リスク評価モデルの確立に向けて、食品安全委員会により「きわめて高度に重要」とランク付けされているフルオロキノロン剤、農場及び生産物の食中毒菌による汚染が深刻な肉用鶏、そして鶏用フルオロキノロン剤のリスク評価でハザードとして特定された食中毒の年間発生例が極めて多いカンピロバクターを対象として検討した。また、カンピロバクターの成績を補完することで一部の実験はサルモネラについても実施した。

B. 研究結果の概要

1. 実験班の成果と考察

- (1) JVARM による調査では、フルオロキノロン耐性 *C. jejuni* が分離された農場で殆どがフルオロキノロン剤の使用歴（過去6ヶ月以内）が認められず、耐性 *C. coli* が分離された農場でも使用歴は認められなかった。これまでに、1 鶏群が多様な株に感染することが知られており、鶏の飼育環境周囲にフルオロキノロン耐性菌を含むカンピロバクターの汚染源が存在し、偶発的に耐性菌を獲得していることが一つの要因と考えられた。
- (2) *C. jejuni* ATCC 株及び野外分離株（感受性株）からフルオロキノロン耐性変異株を作出し、鶏腸管内での定着性を確認したところ、野外株 Clonal complex (CC、MLST による遺伝子型) 48 株では耐性株の方が感受性株より定着性が優れている傾向が認められたが、CC21 株及び ATCC 株では定着性に差が認められなかった。この結果は、遺伝子型が影響しているのかは明らかではないが、少なくとも株間で定着性に差異があることを示唆した。
- (3) エンロフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシンの3成分のフルオロキノロン剤が鶏に使用されていることから、*C. jejuni*、*C. coli* 及び *Salmonella* *Infantis* を用いた耐性出現頻度を評価した。全体として、薬剤間の差は認められなかったことから、発生評価では3剤を区別する必要はないと考えられた。
- (4) 一方、野外に分布するフルオロキノロン感受性カンピロバクターとサルモネラ

間では、耐性出現頻度の高い株が存在し、サルモネラでは血清型で耐性出現頻度に差があることが示された。

- (5) フルオロキノロン耐性カンピロバクターにおいて、最小発育阻止濃度 (MIC) の 2 倍量 (2MIC) ~8MIC の薬剤存在下での出現頻度は、*C. jejuni* で 10^{-7} ~ 10^{-8} 、*C. coli* で 10^{-5} ~ 10^{-6} と、菌種間で 100 倍の差が認められた。一方、サルモネラでは、4MIC では耐性出現を認められない株も多く、薬剤濃度の影響を強く受けた。フルオロキノロン耐性サルモネラは、カンピロバクターに比べて出現リスクは低いと考えられた。
- (6) 東京都内の 3 医療施設で収集した臨床分離株と農場の肉用鶏分離株では、*C. jejuni* が占める割合は約 95% と高率で、いずれの *C. jejuni* 株でも CC21 に属する菌株が最も優勢 (31.8% および 25.3%) で、その他の優勢なクローンの構成比率も類似していた。
- (7) 人臨床由来株におけるフルオロキノロン耐性の割合は 43.6% で、JVARM 等が報告しているものに比べて若干高めであった。また、耐性株における主な耐性機序は *gyrA* の変異 (Thr-86-Ile) で、これまで肉養鶏由来株で報告されているものと同様であった。
- (8) 以上のことから、カンピロバクター腸炎は、肉用鶏由来の菌株に汚染した鶏肉を介して人に腸管感染症を引き起こしていること、及び、肉養鶏の耐性割合に一致して耐性菌による胃腸炎引き起こされていることが示唆された。
さらに、臨床分離株におけるフルオロキノロン耐性株は、特定の CC (CC21 および CC48) に属する菌株で割合が高く、特定のクローンがフルオロキノロン耐性を獲得しやすい可能性が示唆された。

2. リスク評価班の成果と考察

- (1) すでに公表されている海外の定量的薬剤耐性リスク評価などの先行研究を検討した結果、そのものを直接的にわが国のフルオロキノロン耐性カンピロバクターのリスク評価モデルに外挿することが困難であった。
- (2) 諸外国の定量的リスク評価モデル、発生評価のメカニズムを基にして、実験班から得た我が国の耐性機構や株間の耐性出現頻度の差等のデータを入力パラメータとして、オリジナルの定量的リスク評価のためのプロトタイプモデル (スプレッドシート) を作成した。
- (3) 本モデルのアウトプットについて感染性胃腸炎罹患患者のアンケート調査などによって、耐性菌感染による治療期間の延長や症状の重篤度などを検討した結果、耐性菌感染に直接的に結びつくものは見いだせなかった。そこで本モデルのアウトプットは、肉養鶏由来カンピロバクター食中毒患者の薬剤耐性菌への感染割合とすることにした。

- (4) 定量的リスク評価モデルによる発生段階の試算の結果の平均値は、*Campylobacter*感染鶏数に占める感受性菌感染鶏数の割合が約 66.0%、FQ 剤耐性菌感染鶏数の割合が約 34.0%となった。さらに、耐性菌感染鶏数の割合の内訳は、GyrA の Thr86Ile 変異以外の耐性菌の感染鶏数の割合が 2.8%、GyrA の Thr86Ile 変異ありで efflux pump の発現量が高い耐性菌の割合は約 10.4%、低い耐性菌の割合は約 20.8%となった。
- (5) ばく露評価については、平成 20～22 年度に食品安全委員会の研究事業「定量的リスク評価の有効な実践と活用のための数理解析技術の開発に関する研究(主任研究者：春日文子)」において、鶏肉調理における *Campylobacter* の交差汚染の定性的・定量的評価が実施されているため、この研究で用いられているばく露段階のデータを収集・整理し、データ更新が必要なものについては最新のデータを収集した。
- (6) ばく露・発生段階について「一人あたりの年間感染回数」を試算した結果、0 回が最も多く、平均は年約 1.02 回、最大値は 88 回という結果となった。最大値である 88 回感染した人において、そのうちの約 58 回は感受性菌への感染で、約 30 回が耐性菌への感染になること想定される。また、耐性菌に感染した場合、30 回のうち約 2 回が GyrA の Thr86Ile 変異以外耐性菌への感染で、残りの 28 回が GyrA の Thr86Ile 変異の耐性菌への感染と推定された。
- (7) 以上のことから、今回構築した定量的リスク評価モデルにより、農場出荷時の耐性機構別の耐性菌感染鶏の大まかな割合を把握することができた。一方で、今回のモデルでは FQ 剤の使用による影響を詳細に把握することまでには至らなかった。今回のモデルでは、FQ 剤使用の場合の出現率に本研究班で得られた実験データを用いている。JVARM のデータに比べると、実験データによる薬剤耐性菌の出現率は非常に低いため、シナリオ解析において、年間のブロイラー生産サイクルにおける薬剤の使用頻度を高く設定しても、薬剤耐性菌の割合はほとんど変わらないという結果となった。今後、農場における過去の FQ 剤の使用歴のデータを入手できれば、薬剤使用による影響をより現実的に把握できると考えられる。また、FQ 剤の過去の販売量などから過去の FQ 剤の使用歴を推定してモデルに反映することでモデルを精緻化することも考えられる。今回構築した確率論的定量的リスク評価モデルは、*C. jejuni* だけでなく *C. coli* にも対応可能であるため、豚などにおけるリスク評価に適用できる可能性もある。

C. 結論

今回、公表データや実験班で得られたデータをベースに、新たに発生段階部分も確率論的定量的リスク評価モデルを構築した。モデルによる試算の結果、*Campylobacter* 感染鶏に占める FQ 剤感染鶏の割合を、耐性菌の耐性機構別に推測することができた。しかし、本モデルでは、FQ 剤の使用による FQ 剤耐性菌感染鶏

の割合への大きな影響は把握できなかった。今後、農場における詳細な過去の FQ 剤の使用歴のデータ（6 か月間以上）を入手することができれば、より実態に即した試算を行うことが可能と考えられる。また、FQ 剤の過去の販売量などから過去の FQ 剤の使用歴を推定してモデルに反映することでモデルを精緻化することも考えられる。確率論的定量的リスク評価モデルの構築を通して得られた知見を踏まえて、薬剤耐性菌によるヒトへの健康影響に関する確率論的リスク評価指針骨子素案を作成した（リスク評価班報告書要旨 別紙）。

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立(課題番号:1305)(生物学関連分野 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究)

実験班報告書 (要旨)

A. 研究目的

現在、食品安全委員会は、OIEのガイドラインを参考に「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針」(2004年)を制定し、定性的なリスク評価を行っている。しかし、Codexにより2011年に制定された耐性菌に係るリスク分析ガイドラインでは、定量的なリスク評価の必要性が言及され、将来的には科学的データに基づく定量的リスク評価が求められている。

本研究の実験班では、食品安全委員会により「きわめて高度に重要」とランク付けされているフルオロキノロン剤、農場及び生産物の食中毒菌による汚染が深刻な肉用鶏、そして鶏用フルオロキノロン剤のリスク評価でハザードとして特定されたカンピロバクター及びサルモネラを対象として、発生、ばく露及び影響評価の各段階で定量的リスク評価モデルの作成に必要な情報を収集した。

B. 研究方法

肉養鶏農場におけるフルオロキノロン剤の使用による耐性菌の出現(発生評価)に関して、Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program (JVARM)のデータの解析(動物医薬品検査所)、鶏を用いたフルオロキノロン耐性カンピロバクターの定着試験(動物医薬品検査所)、フルオロキノロン存在下での耐性出現頻度(酪農学園大学、岐阜大学)及びフルオロキノロン耐性野外分離株の性状解析(動物医薬品検査所)を実施した。

肉養鶏農場由来フルオロキノロン耐性カンピロバクターによる医療現場への影響(ばく露及び影響評価)に関して、JVARM収集株と医療現場収集株を用いて分子疫学解析を実施した(東邦大学)。

C. 研究結果及び考察

ア. 肉養鶏農場におけるフルオロキノロンの使用による耐性菌の分布への影響

2009～2013年のJVARMによる調査では、フルオロキノロン耐性 *C. jejuni* が分離された38農場中4農場(10.5%)でフルオロキノロン剤の使用歴(過去6ヶ月以内)があったが、耐性 *C. coli* が分離された9農場では使用歴は認められなかった。2001～2004年にJVARMの集計においても、同様の成績が報告されている(Asai et al., 2007)。これまでに、1鶏群が多様な株に感染することが知られており(Ishihara et al., 2006)、鶏の飼育環境周囲にフルオロキノロン耐性菌を含むカンピロバクターの汚染源が存在し、偶発的に耐性菌を獲得していることが一つの要因と考えられる。一方で、肉養鶏の飼育期間が2カ月程度で、オールイン・オールアウトで飼養管理されているとはいえ、汚染農場においては、使用歴の調査対象期間を延ばす必要があると考えられる。

次に、*C. jejuni* ATCC 株及び野外分離株（感受性株）からフルオロキノロン耐性変異株（C257T）を作出し、鶏腸管内での定着性を確認した。野外株 Clonal complex（CC、MLST による遺伝子型）48 株では耐性株の方が感受性株より定着性が優れている傾向が認められたが、CC21 株及び ATCC 株では定着性に差が認められなかった。この結果は、遺伝子型が影響しているのかは明らかではないが、少なくとも株間で定着性に差異があることを示唆している。定着性への遺伝子型の影響を明らかにするため、野外で分離されるフルオロキノロン耐性 *C. jejuni* においても MLST 型による偏りがあるかについて検証する必要がある。

現在、エンロフロキサシン(ERFX)、ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX) の 3 成分のフルオロキノロン剤が鶏に使用されていることから、*C. jejuni*、*C. coli* 及び *Salmonella* *Infantis* を用いた耐性出現頻度を評価した。全体として、薬剤間の差は認められなかった。発生評価では、3 剤を区別する必要はないと考えられた。

一方で、野外に分布するフルオロキノロン感受性カンピロバクターとサルモネラ間では、耐性出現頻度の高い株が存在し、サルモネラでは血清型で耐性出現頻度に差があることが示された。このことは、鶏群に分布する株とサルモネラの血清型の構成比率が、発生評価に影響すると考えられた。

フルオロキノロンカンピロバクターにおいて、最小発育阻止濃度（MIC）の 2 倍量（2MIC）～8MIC の薬剤存在下での出現頻度は、*C. jejuni* で 10^{-7} ～ 10^{-8} 、*C. coli* で 10^{-5} ～ 10^{-6} と、菌種間で 100 倍の差が認められた。一方、サルモネラでは、4MIC では耐性出現を認められない株も多く、薬剤濃度の影響を強く受けた。2MIC での出現頻度は、カンピロバクターと比べ、100 倍以下と差があった。これまでも、鶏由来フルオロキノロン耐性サルモネラが国内で報告されていない（Asai et al., 2006; Sasaki et al., 2012）ことから、フルオロキノロン耐性サルモネラは、カンピロバクターに比べて出現リスクは少ないと考えられた。

イ．医療施設由来フルオロキノロン耐性カンピロバクターと肉養鶏農場由来株の関連性

東京都内の 3 医療施設で収集した臨床分離株と農場の肉用鶏分離株では、*C. jejuni* が占める割合は約 95%と高率で、いずれの *C. jejuni* 株でも Clonal complex（CC）21 に属する菌株が最も優勢（31.8%および 25.3%）で、その他の優勢なクローンの構成比率も類似していた。人臨床由来株におけるフルオロキノロン耐性の割合は 43.6%で、JVARM 等が報告しているものに比べて若干高めであったが、耐性株における主な耐性機序は、*gyrA* の変異（Thr-86-Ile）で、これまで肉養鶏由来株で報告されているもの（Chuma et al., 2004）と同様であった。これらのことから、カンピロバクター腸炎は、肉用鶏由来の菌株に汚染した鶏肉を介して人に腸管感染症を引き起こしていること、及び、肉養鶏の耐性割合に一致して耐性菌による胃腸炎引き起こされていることが示唆された。

さらに、臨床分離株におけるフルオロキノロン耐性株は、特定の CC（CC21 および CC48）に属する菌株で割合が高く、特定のクローンがフルオロキノロン耐性を獲得しやすい可能性が示唆された。フルオロキノロン耐性の発生評価を行う上で *C. jejuni* の CC 型の構成比率を考慮するために、肉養鶏に分布する *C. jejuni* の CC 型は、定期的に

実態把握される必要がある。

ウ. 結論

実験班で実施した研究データは、リスク評価班に提供し、定量的リスク評価モデルに利用されている。また、MLST 解析による CC 型別は、*C. jejuni* の定着性や耐性獲得に影響する可能性を検討するため、継続的に情報収集を行う必要がある。

参考文献

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(5):290-4, 2007.

Asai T, Esaki H, Kojima A, Ishihara K, Tamura Y, Takahashi T. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from apparently healthy food-producing animal from 2000 to 2003: the first stage of Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring (JVARM). *J Vet Med Sci.* 68(8):881-4, 2006.

Ishihara K, Yano S, Nishimura M, Asai T, Kojima A, Takahashi T, Tamura Y. The dynamics of antimicrobial-resistant *Campylobacter jejuni* on Japanese broiler farms. *J Vet Med Sci.* 68(5):515-8, 2006.

Sasaki, Y., Ikeda, A., Ishikawa, K., Murakami, M., Kusakawa, M., Asai, T. and Yamada, Y.: Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in Japanese broiler flocks. Epidemiol. Infect. **140**, 2074-2081, 2012.

Chuma T, Maeda T, Niwa H, Okamoto K. Acquisition of quinolone resistance and point mutation of the *gyrA* gene in *Campylobacter jejuni* isolated from broilers and in vitro-induced resistant strains. *J Vet Med Sci.* 66(2):155-60, 2004.

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康評価モデルの確立（課題番号：1305）平成25年－26年度食品安全確保推進研究事業

分担課題名：抗菌性物質の使用と耐性菌の発現、農場由来耐性菌における耐性機構及びフルオロキノロン耐性菌の鶏体内での定着性に関する解析

研究分担者：川西路子（農林水産省動物医薬品検査所）

協力研究者：小池良治（農林水産省動物医薬品検査所）

比企基高（農林水産省動物医薬品検査所）

研究要旨

Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System（JVARM）において平成21年から25年に収集された健康ブロイラー由来のカンピロバクターの調査結果からフルオロキノロンに対する耐性率及び過去6ヶ月以内に使用された動物用抗菌剤の調査データにより、フルオロキノロン剤が使用された農家数を取りまとめた。フルオロキノロン耐性率は、*Campylobacter jejuni* (27.0%)、*C. coli* (8.5%) であり、*C. jejuni* 耐性株が分離された38農場のうち、過去6ヶ月以内にフルオロキノロン剤が使用されたのは、4農場（10.5%）のみであり、*C. coli* が分離された9農場においては、使用歴は認められなかった。

平成23年から24年にJVARMにおいて健康ブロイラーの糞便から分離され、CPFXの耐性限界値（ブレイクポイント）4ug/mL以上の*C. jejuni*（22株）及び*C. coli*（8株）について、フルオロキノロン耐性に関わるジャイレース遺伝子(*gyrA*)の配列を確認した。その結果、*GyrA*の86位のスレオニンからイソロイシンの変異（C257T）が主な耐性獲得機序であることが確認された。

選択圧不在下でフルオロキノロン耐性株の鶏腸内での定着性を確認するため、C257T変異株をATCC株及び野外分離株から*in vitro*で作出し、親株（感受性株）とC257T変異株（耐性株）の鶏腸管内での定着性を確認した。野外株Clonal complex（CC）48株では耐性株の方が感受性株より定着性が優れている傾向が認められたが、有意差は認められなかった。一方、CC21株及びATCC株では定着性に差が認められなかった。

以上の結果を定量的リスク評価の基礎データとしてリスク評価班へ提示した。

A. 研究目的

家畜分野においてフルオロキノロン剤は、1991年に鶏用及び牛用のエンロフロキサシン（ERFX）製剤が承認されて以降、複数の製剤が市販され、家畜に使用されている。そこで、農場で使用されるフルオロキノロン製剤による、カンピロバクターのフルオロキノロン耐性獲得への影響を確認するため、我が国の家畜由来

細菌の抗菌性物質感受性実態調査システム

（JVARM：Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System）において収集されたデータより、フルオロキノロン系抗菌性物質の使用歴とフルオロキノロン耐性の関係を調査する。

また、近年の国内の農場で分離されたブロイラー由来フルオロキノロン耐性株の耐性機構

を確認する。

さらに、Luo ら (2005) は、*Campylobacter jejuni* において GyrA の変異を獲得した株が、フルオロキノロン剤の選択圧の無い鶏体内での定着性が感受性株と比較して優れている可能性があることを報告している。本研究で、選択圧不在でフルオロキノロン耐性カンピロバクターと感受性カンピロバクターの接種試験により、鶏腸内での定着性を比較する。

以上のデータは、フルオロキノロン耐性の定量的リスク評価のための基礎資料としてリスク評価班へ提供する。

B. 研究方法

(1) JVARM におけるフルオロキノロン使用歴と薬剤耐性の関係

JVARM において平成 21 年から 25 年に収集された健康ブロイラー由来のカンピロバクターの調査結果から、カンピロバクターが分離された農場数及び ERFX (平成 22 年からはシプロフロキサシン (CPFEX)) に対する耐性率を集計した。また糞便採取時の過去 6 ヶ月以内に使用された動物用抗菌剤を調査収集したデータから、フルオロキノロン剤の使用された農場数を取りまとめた。なお、リスク評価班からの依頼により調査農場を年間飼養羽数①10 万羽未満②10~30 万羽③30 万羽以上に分けて取りまとめることとした。JVARM で収集しているデータは各農家の調査時点における飼養羽数であるため、農場への聞き取り等により、各農家 1 年間に 5 回転すると仮定して年間飼養羽数を推計した。

(2) 農場由来耐性菌における耐性機構の解析

JVARM において平成 23 年から 24 年に健康ブロイラーの糞便から分離された *C. jejuni* (87 株) 及び *C. coli* (20 株) について、CLSI (臨床検査標準協会) の提唱する微量液体希釈法に準拠した方法により、CPFEX の薬剤感受性を実施した (Table 2 (JVARM データ: 参考))。CPFEX

の耐性限界値 (ブレイクポイント) 4ug/mL 以上の *C. jejuni* (22 株) 及び *C. coli* (8 株) について、フルオロキノロン耐性に関わるジャイレース遺伝子 (gyrA) の配列を以下のプライマーを用いて PCR で増幅後、ダイレクトシーケンスを行い変異について確認した。

プライマー

: F: 5' -GAGTGGTTATTATAGGTCGTGC-3

R: 5'-GGCACTATCACCATCTATAG-3'

(3) フルオロキノロン耐性菌の鶏体内での定着に関する解析

1) 鶏体内での定着試験

試験方法は、Luo ら (2005) の論文に記載の方法に準拠して実施した。

試験菌株は、ATCC33560^T 株及びブロイラー由来野外株 (Clonal complex (CC) 21、CC48 : JVARM のフルオロキノロン耐性株で多く分離される遺伝子型) を選択し、親株 (FQS) とした。親株を ERFX (4 µg/mL) 添加培地で培養することにより得られた耐性株のうち、ダイレクトシーケンス解析の結果 GyrA の 86 位のスレオニンからイソロイシンの変異 (C257T) した株 (FQR) を用いた。

SPF 白色レグホン 4 週齢を導入し、1 週間馴致後に 1 試験あたり以下の通りの羽数で接種試験を実施した。

FQS と FQR 同時接種 : 5 羽以上 FQS : 1 羽 FQR : 1 羽 無接種 : 1 羽 (コンタミネーションの確認)
--

投与菌液は、10⁷ cfu /mL/羽となるよう調整した菌液を 1 mL ずつそ嚢内に接種した。

盲腸便を投与前日、投与後 3 日、6 日、9 日に採取し、採取盲腸便を計量、9 倍量の生理食塩水で懸濁後、CCDA 培地及び CPFEX (4 µg/mL) 添加 CCDA 培地で培養し、菌数の測定し、以下の式により CI 値 (competition Index) を算出した。

$$CI = (X - Y) / (X + Y)$$

X : FQ 耐性菌数、Y : FQ 感受性菌数

また、各試験における耐性菌株数と感受性菌株数の統計解析は、Luo ら (2005) らの方法に準拠し Student-t test を実施した。 ($p < 0.05$)

2) 定着試験菌株の性状解析

1) の定着試験において *in vitro* で作出した耐性株に GyrA の C257T 以外の定着性に関与する遺伝子の変異が生じていないかを確認するため以下の性状試験及び遺伝子解析を実施した。

i) 自家凝集能

定着試験に使用した菌株の自家凝集能を三澤ら (2000) の方法に準拠し実施した。各菌株を 37°C、48 時間血液寒天培地で培養し、PBS に浮遊させ吸光度(A600)を 1 程度に合わせ、37°C、24 時間静置後上清 1ml を採取し、その吸高度を測定した。自家凝集率を以下の式により計算した。

自家凝集率 (%) = ((培養前光度 - 培養後吸光度) / 培養前吸光度) × 100

試験は 3 回繰り返し、Student-t test により解析した。 ($p < 0.05$)

ii) 疎水性

定着試験に使用した菌株の疎水性を三澤ら (2000) の方法に準拠し実施した。各菌株を 37°C、48 時間血液寒天培地で培養し、PB に浮遊させ吸光度(A600)を 1 程度に合わせた。U 字の 96well プレート上で、4M の硫酸アンモニウムを PB で 2 倍階段希釈列を作成し、プレートに調性菌液を接種 25°C、24 時間静置後、凝集価を確認した。試験は 3 回繰り返し、Mann-Whitney U-test により解析した。 ($p < 0.05$)

iii) 定着に関与する遺伝子の解析

C. jejuni の鶏腸管内の定着因子として報告 (Hermans, 2011) されている因子、*cmeABC* , *cmeR*, *cdrR*, *docB*, *docC*, *tlp1*, *flgR*, *racR*, *peb1A*, *tatC*, *flaA* について、全ゲノム解析されたデータより、基準株 *C.jejuni* (NCTC11168 株) の各遺伝子配列をデータベースとして、定着試験に使用

した野外株 (S-2、SR-2-1, S-4, SR-4-1) の Identities および Gaps を比較した (東邦大学: 石井先生解析)。 *flaB* については、J Neal-McKinney ら (2010) 報告のプライマーを用いた PCR 産物をダイレクトシーケンスにより解析し塩基配列を比較した。

C. 研究結果

(1) JVARM におけるフルオロキノロン使用歴と薬剤耐性の関係

平成 21 年から 25 年にかけて調査した 434 農場のうち、161 検体からカンピロバクターが分離され、そのうち過去 6 ヶ月以内にフルオロキノロン剤が使用された農場は 16 農場 (9.9%) であった (Table1)。フルオロキノロン耐性率は、*C.jejuni* 27.0%、*C.coli* 8.5% であり、*C.jejuni* 耐性株が分離された 38 農場のうち、過去 6 ヶ月以内にフルオロキノロン剤が使用されたのは、4 農場 (10.5%) のみであり、*C.coli* が分離された 9 農場においては、使用歴は認められなかった。年間飼養羽数毎に集計した Table1 のデータを、リスク評価班の発生評価におけるリスク評価基礎データとしてリスク評価班へ提示した。

(2) 健康ブロイラー由来フルオロキノロン耐性菌における耐性機構の解析

Table2 に示す薬剤耐性株 *C.jejuni* (22 株) 及び *C.coli* (8 株) について、薬剤耐性機構の解析を実施した結果、Table 3 及び 4 に示すとおり、*C.jejuni* において GyrA の C257T 変異は 22 株中 21 株 (95%)、スレオニンからアラニン変異 (A256G) は 1 株 (5%) であった。その他、アミノ酸の変異をもたらさない silent mutation (C243T, C330T, T357C 又は C360T) が、22 株中 14 株 (63.6%) で、認められた。

C.coli において、GyrA の C257T の変異は 8 株中 7 株 (88%) で、認められ、1 株 CPFX の MIC 値 32ug/mL の株において GyrA に変異がみとめられず、他の機構であることが考えられた。

(3) フルオロキノロン耐性菌の鶏体内での定着に関する解析

1) 鶏体内での定着試験

ATCC33560^T 株及びブロイラー由来野外株 6 株 (CC21: 3 株 CC48: 3 株) から *in vitro* で ERFX 耐性株を作出し、GyrA の変異及び薬剤感受性を確認した。(Table5) CC48 株については当所保有の感受性株全てに (C243T,T357C,C360T,C360T) 変異があった。Table5 に記載の候補菌株のうち S-2 と SR-2-1 (CC21)、S-4 と SR-4-1 (CC48)、ATCC と ATCCSR-1 株を定着試験に使用した。

いずれの試験においても、無接種鶏からは分離されず、親株 (感受性株) 接種鶏からは、感受性株のみ、変異株 (耐性株) 接種鶏からは耐性株のみが分離され、各試験において鶏間で菌株のコンタミネーションはないと考えられた。

S2 株 (CC21) はいずれの個体においても、試験期間中、耐性株と感受性株で分離数に差は認められなかった ($p>0.05$) (図 1)。CI 値は 0.61~0.16 の間であった (図 2)。

S4 株 (CC48) は接種 3 日目で 3 羽/6 羽、接種 6 及び 9 日目で 4 羽/6 羽、S4-R (耐性株) が多く分離された。しかし、耐性株と感受性株で分離株数に有意差は認められなかった ($p>0.05$)。CI 値は図 4 に示すよう 6 日目以降 4 羽以上で 0.5 以上となった。

ATCC 株は S2 株、S4 株と比較して 10^{-1} ~ 10^{-2} 定着菌株数が少なく、3 日目以降 2 羽/5 羽は感受性株、2 羽/5 羽は耐性株が多く分離された。つまり、個体毎に感受性株と耐性株の定着性が異なった。感受性株と耐性株で有意差は認められなかった ($p>0.05$)。(図 5, 6)

2) 自家凝集能

図 7 に示すよう各菌株の自家凝集能に差は認められなかった。 ($p>0.05$)

3) 疎水性

図 8 に示すよう各菌株の最小凝集硫酸アンモニウム濃度に差は認められなかった。

($p>0.05$)

4) 定着に關与する遺伝子の解析

C. jejuni の鶏腸管内の定着因子 *cmeABC*, *cmeR*, *cdrR*, *docB*, *docC*, *tlp1*, *flgR*, *racR*, *peb1A*, *tatC*, *flaA* について、S-2 と SR-2-1、S-4 と SR-4-1 いずれの組合せでも Identities および Gaps の値に変化がないため (Table6)、有意な変異が入っている可能性は低いつまり、変異がない可能性が高いと考えられた。*flaB* について、PCR 産物のダイレクトシーケンス解析の結果 S-2 と SR-2-1、S-4 と SR-4-1 に変異は認められなかった。

D. 考察

平成 21 年から 25 年に JVARM においてカンピロバクターが分離された農場のうち、約 1 割の農場のみフルオロキノロン剤の使用歴があり、フルオロキノロン耐性株が分離された農場においても、約 1 割のみフルオロキノロン剤の使用歴が認められた。つまり、フルオロキノロン剤を投与していない多くの鶏群からフルオロキノロン耐性株が分離されていることが明らかとなった。

JVARM では、糞便分離農場の過去 6 ヶ月間の抗菌性物質製剤の使用歴のみを調査しているため、6 ヶ月より以前に使用されたフルオロキノロン剤により選択された耐性株が農場内で維持され、それ以降に搬入された鶏に感染した可能性やフルオロキノロン耐性カンピロバクターの外部から持ち込まれた可能性が考えられるが原因を特定するにはカンピロバクターの感染ルートを始めさらなる検証が必要である。

平成 23 年から 24 年に JVARM で分離されたフルオロキノロン耐性株は、平成 11 年から 12 年に分離された菌株 (高橋 2005 年) と同様、GyrA の 86 位のスレオニンからイソロイシンの変異 (C257T) が主な耐性獲得機序であることが確認された。

Luo ら (2005) 及び Han ら (2012) の報告で

は、この主な耐性機序である GyrA の C257T 変異したフルオロキノロン耐性カンピロバクターが、フルオロキノロンの選択圧不在下において感受性株より鶏腸管内での定着性が優れているとの報告がある。そのため、同変異株の定着性を確認するため JVARM においてフルオロキノロン耐性株として最も分離される遺伝子型である CC21 株及び CC48 株並びに ATCC 株を用いて鶏腸管内における定着性を、親株（感受性株）と C257T 変異株（耐性株）で確認したところ、CC48 株では、変異株（耐性株）が親株（感受性株）より定着性が優る傾向が認められたが、有意差は認められなかった。CC21 株及び ATCC 株では変異株と親株で、分離株数に差は認められなかった。

Luo らの報告と異なる結果となった要因として、In vitro で作出した変異株（耐性株）において C257T 以外の定着性に関与する遺伝子の変異が入った可能性を考え、定着性に関与すると報告されている遺伝子（*cmeABC* , *cmeR*, *cdrR*, *docB*, *docC*, *tlp1*, *flgR*, *racR*, *peb1A*, *tatC*, *flaA*, *flab*）の塩基配列を確認したが、いずれの株においても親株（感受性株）、変異株（耐性株）、標準菌株とで塩基配列に差が認められなかった。

また、表現型として定着性に関与すると報告されている自家凝集能及び疎水性を確認したが、親株（感受性株）と変異株（耐性株）で差は認められなかった。

以上より、本試験で作出した変異株に、前述以外の定着性に関与する遺伝子の変異が入り定着性への影響した可能性及び限られた試験供試羽数から断定することはできないが、GyrA の 86 位のスレオニンからイソロイシンの変異（C257T）が元株より定着性を増強する程度は、カンピロバクターの菌株によっても異なる可能性が示唆された。

E. 結論

平成 21 年から 25 年に JVARM において分離されたフルオロキノロン耐性カンピロバクターは、9 割がフルオロキノロン剤の使用歴のな

い農場から分離されていたことが確認された。また、近年分離された耐性株の主な耐性機構が GyrA の 86 位のスレオニンからイソロイシンの変異（C257T）であることが確認された。親株（感受性株）と C257T 変異株（耐性株）の鶏腸管内での定着性を確認した結果、CC48 株では耐性株が親株より定着性がよい傾向が認められたが、有意差は認められなかった。また、CC21 株 ATCC 株では定着性に差が認められなかった。以上の結果について定量的リスク評価を実施する際基礎データとしてリスク評価班へ提示した。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

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。

I. 引用文献

1. Han J, Wang Y, Sahin O, Shen Z, Guo B, et al. (2012) A fluoroquinolone resistance associated mutation in gyrA Affects DNA supercoiling in Campylobacter jejuni. Front Cell Infect Microbiol 2: 21.
2. Hermans D, Van Deun K, Martel A, Van Immerseel F, Messens W, et al. (2011) Colonization factors of Campylobacter jejuni in the chicken gut. Vet Res 42: 82.
3. Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, et al. (2005) Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant Campylobacter jejuni in the absence of antibiotic selection pressure. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 541-546.

4. Misawa N, Blaser MJ (2000) Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 68: 6168-6175.
5. Neal-McKinney JM, Christensen JE, Konkel ME (2010) Amino-terminal residues dictate the export efficiency of the *Campylobacter jejuni* filament proteins via the flagellum. *Mol Microbiol* 76: 918-931.
6. Takahashi T, Ishihara K, Kojima A, Asai T, Harada K, et al. (2005) Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* in chickens exposed to enrofloxacin treatment at the inherent dosage licensed in Japan. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52: 460-464.

Table1. ブロイラー由来カンピロバクターの耐性率及びフルオロキノロン剤が投与された農場数

年度	全体										フルオロキノロン耐性株（ <i>C.jejuni</i> ）				フルオロキノロン耐性株（ <i>C.coli</i> ）			
	調査農場数 ①10万羽未満 ②10～30万羽 ③30万羽以上	カンピロバクター が分離され た農場 数	フルオロキノロン剤が 投与された農場数			分離株数		耐性率		農場数	株数	内FQ投与農場数		農場数	株数	内FQ投与農場数		
			農場数	カンピロバ クターが 分離され た農場数	分離 株数	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>			農場数	株数			農場数	株数	
21	計	77	35	3	1	2	55	9	29.1	0.0	9	16	1	2	0	0	0	0
	①	31	21	2	1	2	33	7	30.3	0.0	5	10	1	2	0	0	0	0
	②	23	9	1	0	0	14	2	21.4	0.0	2	3	0	0	0	0	0	0
	③	23	5	0	0	0	8	0	37.5	－	2	3	0	0	0	0	0	0
22	計	81	35	13	3	5	51	12	37.3	33.3	11	19	0	0	2	4	0	0
	①	40	21	3	0	0	29	10	27.6	40.0	5	8	0	0	2	4	0	0
	②	27	12	3	2	4	21	0	52.4	－	6	11	0	0	0	0	0	0
	③	14	2	7	1	1	1	2	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	計	106	39	7	3	5	54	18	18.5	33.3	10	16	1	1	5	6	0	0
	①	46	23	5	2	4	29	14	27.6	28.6	5	8	0	0	3	4	0	0
	②	41	14	2	1	1	21	4	28.6	50.0	4	6	1	1	2	2	0	0
	③	19	2	0	0	0	4	0	50.0	－	1	2	0	0	0	0	0	0
24	計	69	19	4	4	8	32	3	18.8	66.7	3	6	1	2	1	2	0	0
	①	34	9	1	1	2	12	3	0.0	66.7	0	0	0	0	1	2	0	0
	②	22	7	2	2	4	14	0	14.3	－	1	2	0	0	0	0	0	0
	③	13	3	1	1	2	6	0	66.7	－	2	4	1	2	0	0	0	0
25	計	101	33	7	5	10	56	5	17.9	40.0	5	10	1	2	1	2	0	0
	①	45	21	2	1	2	34	5	17.6	40.0	3	6	0	0	1	2	0	0
	②	37	7	4	3	6	13	0	15.4	－	1	2	1	2	0	0	0	0
	③	19	5	1	1	2	9	0	22.2	－	1	2	0	0	0	0	0	0
総計	総計	434	161	34	16	30	248	47	27.0	8.5	38	67	4	7	9	14	0	0
	①	196	95	13	5	10	137	39	23.4	2.6	18	32	1	2	7	12	0	0
	②	150	49	12	8	15	83	6	28.9	33.3	14	24	2	3	2	2	0	0
	③	88	17	9	3	5	28	2	39.3	50.0	6	11	1	2	0	0	0	0

Table2 プロイラー由来カンピロバクターの MIC 分布（参考：JVARM 調査報告の結果より）

	菌種	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	256<	菌株数	耐性株数	%
平成23年	<i>C.jejuni</i>		3	25	4	5		1	2	4	8	2					54	16	29.6
	<i>C.coli</i>			5	1	2	4			3	1	2					18	6	33.3
	総計		3	30	5	7	4	1	2	7	9	4					72	22	30.6
平成24年	<i>C.jejuni</i>			9	9	7	1		1	1	2		2				32	6	18.8
	<i>C.coli</i>					1			1	1							3	2	66.7
	総計			9	9	8	1		2	2	2		2				35	8	22.9

Table 3 フルオロキノロン耐性株の耐性機構

菌種	株数	MIC値		変異	アミノ酸変異	変異株数	(%)
		NA	CPFX				
<i>C. jejuni</i>	22	32-64	4-64	C257T	Thr 86 Ile	21	(95)
		64	4	A256G	Thr 86Ala	1	(5)
<i>C. coli</i>	8	32->128	4-32	C257T	Thr 86 Ile	7	(88)
		>128	32	変異なし	-	1	(12)

Table4 フルオロキノロン耐性株の耐性機構の詳細データ

サンプル番号	菌種	MIC		gyrA-C.jejuni		gyrA-C.coli		フルオロキノロン剤の投与歴
		NA	CPFX	塩基変異	アミノ酸変換	塩基変異	アミノ酸変換	
23-Ca-C-5	<i>C.coli</i>	64	32			C 257 T	Thr 86 Ile	なし
23-Ca-C-7	<i>C.jejuni</i>	64	16	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
23-Ca-C-8	<i>C.jejuni</i>	32	8	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
23-Ca-C-11	<i>C.jejuni</i>	128	16	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-12	<i>C.jejuni</i>	128	16	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-25	<i>C.jejuni</i>	64	8	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-26	<i>C.jejuni</i>	64	16	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-27	<i>C.coli</i>	128	8			C 257 T C 297 T A 366 G	Thr 86 Ile なし(99 Phe) なし(122 Ala)	なし
23-Ca-C-28	<i>C.jejuni</i>	128	16	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
23-Ca-C-29	<i>C.jejuni</i>	128	16	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-30	<i>C.jejuni</i>	32	4	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-32	<i>C.jejuni</i>	64	8	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			オフロキサシン
23-Ca-C-33	<i>C.jejuni</i>	128	16	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-34	<i>C.jejuni</i>	128	8	C 257 T	Thr 86 Ile			なし
23-Ca-C-41	<i>C.coli</i>	32	8			C 257 T	Thr 86 Ile	なし
23-Ca-C-42	<i>C.coli</i>	32	16			C 257 T	Thr 86 Ile	なし
23-Ca-C-50	<i>C.coli</i>	64	8			C 257 T	Thr 86 Ile	なし
23-Ca-C-56	<i>C.jejuni</i>	>128	16	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
23-Ca-C-57	<i>C.coli</i>	>128	32			なし	なし	なし
23-Ca-C-59	<i>C.jejuni</i>	128	32	C 243 T C 257 T C 330 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(110 Gly) なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
23-Ca-C-60	<i>C.jejuni</i>	128	32	C 243 T C 257 T C 330 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(110 Gly) なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
23-Ca-C-62	<i>C.jejuni</i>	64	4	C 243 T A 256 G T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ala なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
24-Ca-C-4	<i>C.jejuni</i>	>128	16	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			エンフロキサシン
24-Ca-C-5	<i>C.jejuni</i>	>128	16	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			エンフロキサシン
24-Ca-C-16	<i>C.jejuni</i>	64	64	C 243 T C 257 T C 330 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(110 Gly) なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
24-Ca-C-17	<i>C.jejuni</i>	128	64	C 243 T C 257 T C 330 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(110 Gly) なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
24-Ca-C-21	<i>C.jejuni</i>	32	4	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
24-Ca-C-22	<i>C.jejuni</i>	128	8	C 243 T C 257 T T 357 C C 360 T	なし(81 His) Thr 86 Ile なし(119 Ser) なし(120 Ala)			なし
24-Ca-C-35	<i>C.coli</i>	64	8			C 257 T	Thr 86 Ile	なし
24-Ca-C-36	<i>C.coli</i>	32	4			C 257 T	Thr 86 Ile	なし

Table5 鶏体内での定着試験実施候補菌株

		NO	株名	分離年度	Clonal complex	NA	ERFX	遺伝子の変異
感受性株	定着試験実施候補株	1	S-1	H.20	21	8	0.5	-
		2	S-2	H.20	21	4	0.12	-
		3	S-3	H.21	21	4	0.12	-
		4	S-4	H.19	48	16	0.12	C243T,T357C,C360T,C360T
		5	S-5	H.21	48	2	0.06	C243T,T357C,C360T,C360T
		6	S-6	H.21	48	4	0.12	C243T,T357C,C360T,C360T
Vitroで感受性株から変異させた耐性獲得株	定着試験実施候補株	23	SR-1-2	H.20	21	128<	64	C257T
		24	SR-2-1	H.20	21	128<	16	C257T
		25	SR-3-3	H.21	21	128	8	C257T
		26	SR-4-1	H.19	48	128	8	C257T、C243T,T357C,C360T,C360T
		27	SR-5-1	H.21	48	16	4	C257T、C243T,T357C,C360T,C360T
		28	SR-6-2	H.21	48	128<	8	C257T、C243T,T357C,C360T,C360T
	定着試験実施株	29	<i>C.jejuni</i> ATCC			0.125	8	-
		30	<i>C.jejuni</i> ATCCSR1			128	16	C257T

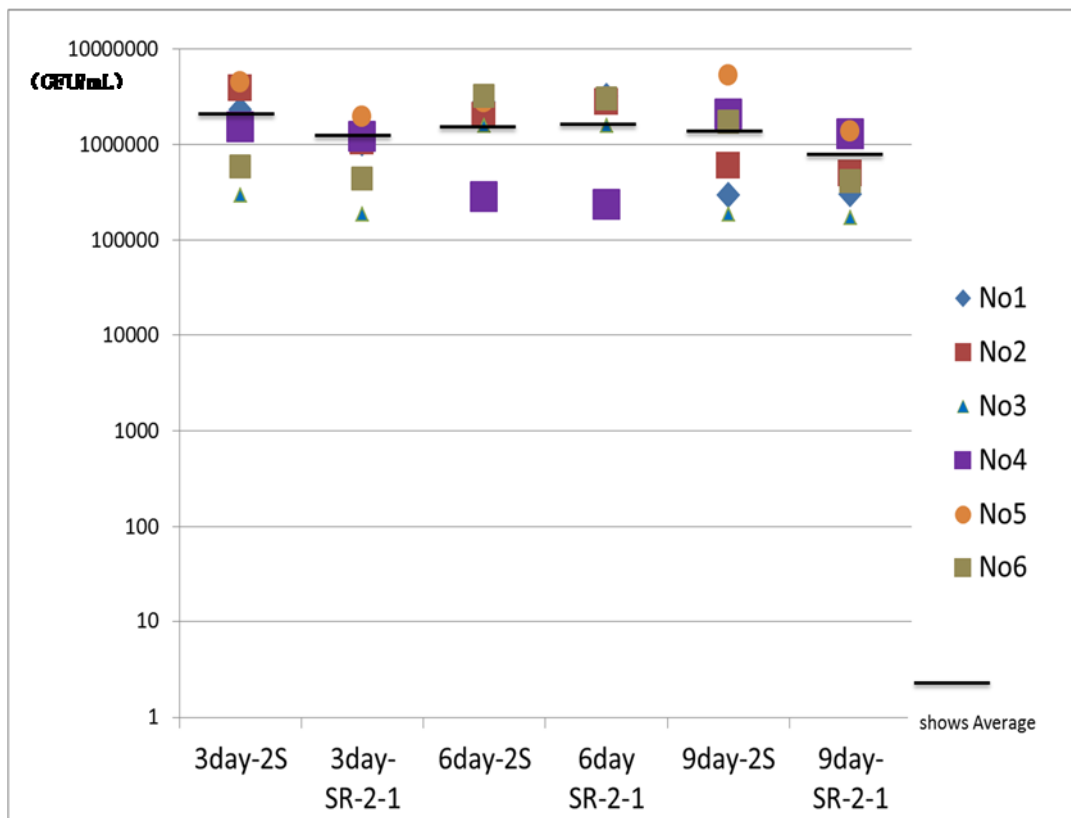


図1 鶏体内競合接種試験分離菌株数 (S2株 VS SR-2-1)

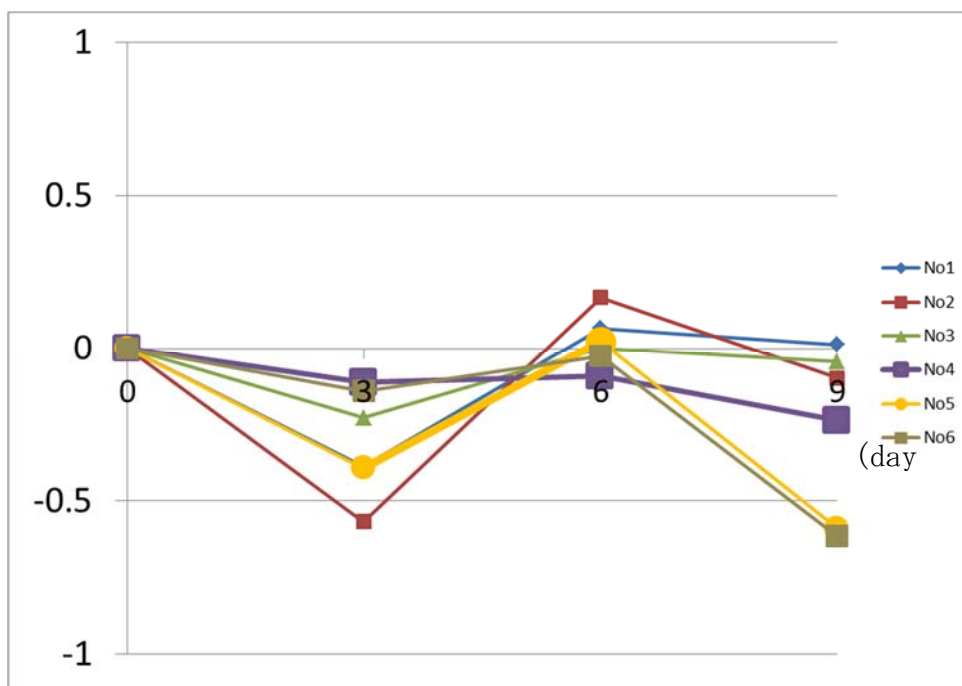


図2 CI値 (S2株 VS SR-2-1)

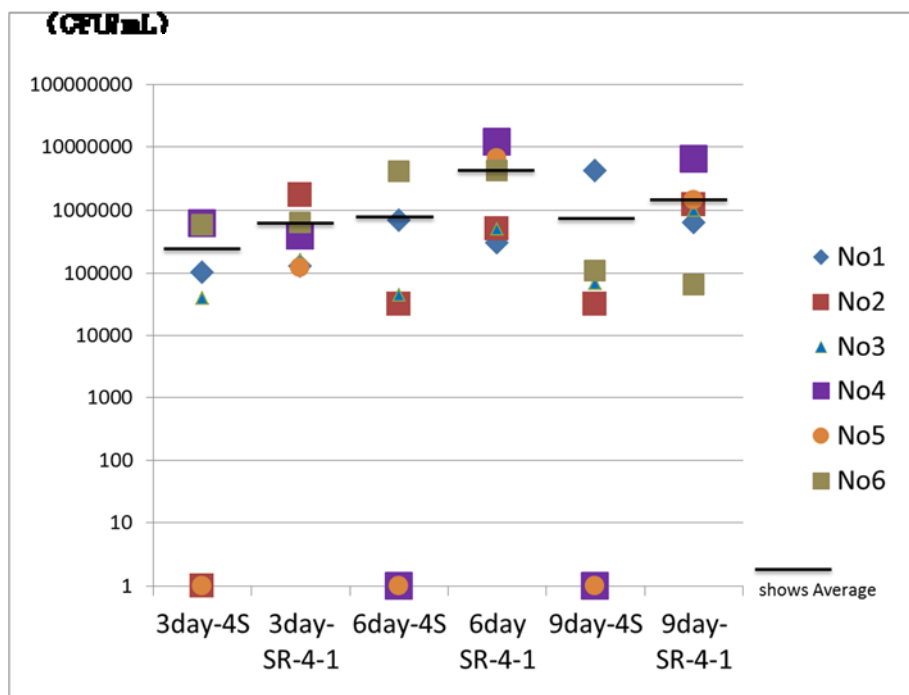


図3 鶏体内競合接種試験分離菌株数 (S4株 VS SR-4-1)

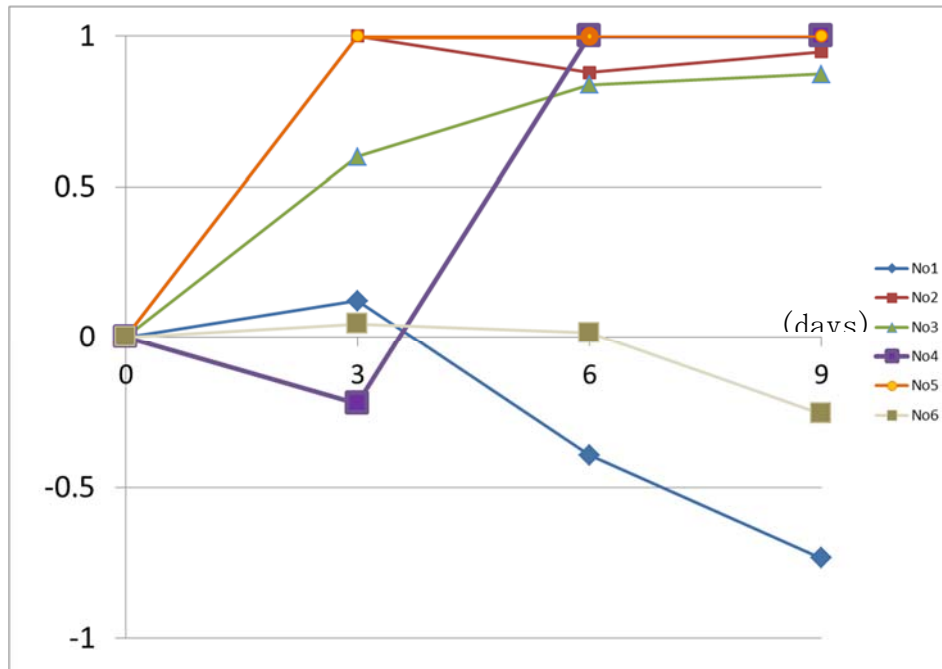


図4 CI値 (S4株 VS SR-4-1)

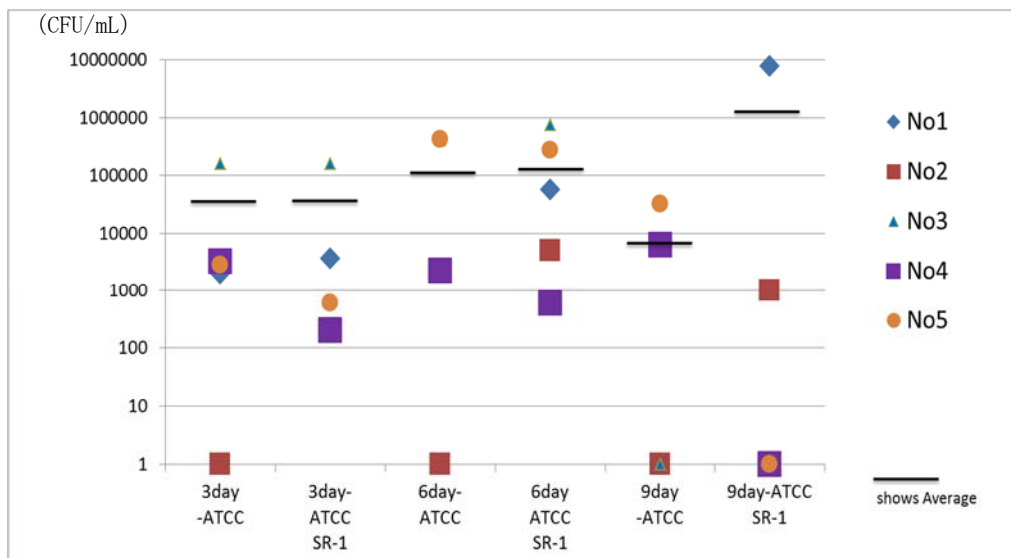


図5 鶏体内競合接種試験分離菌株数 (ATCC株 VS ATCC SR1)

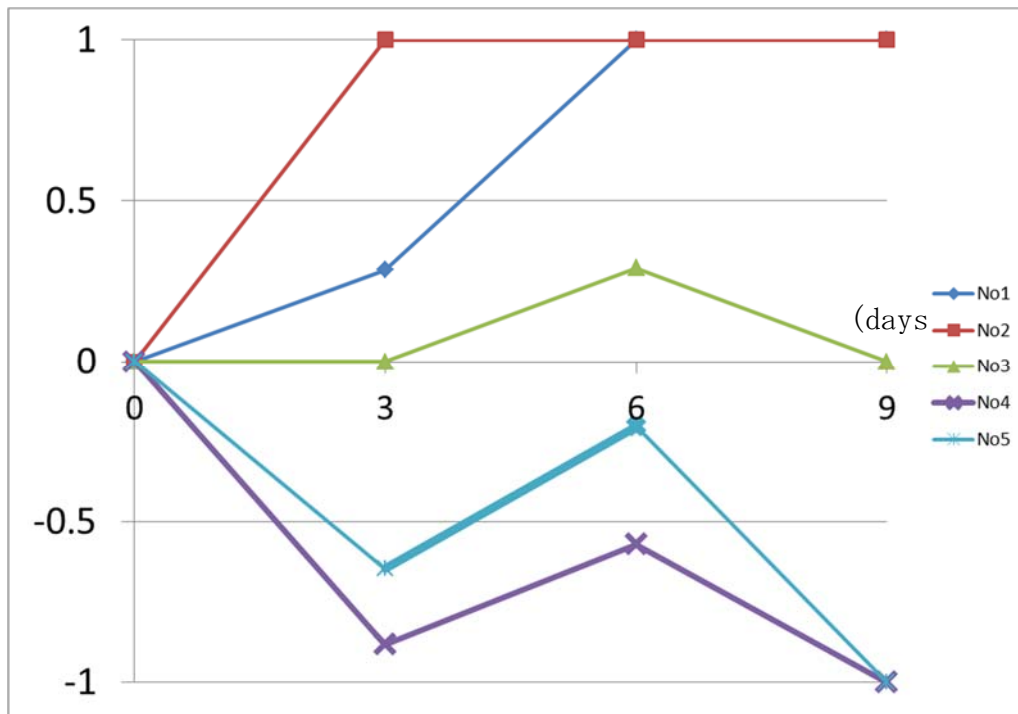


図6 CI値 (ATCC株 VS ATCC SR1)

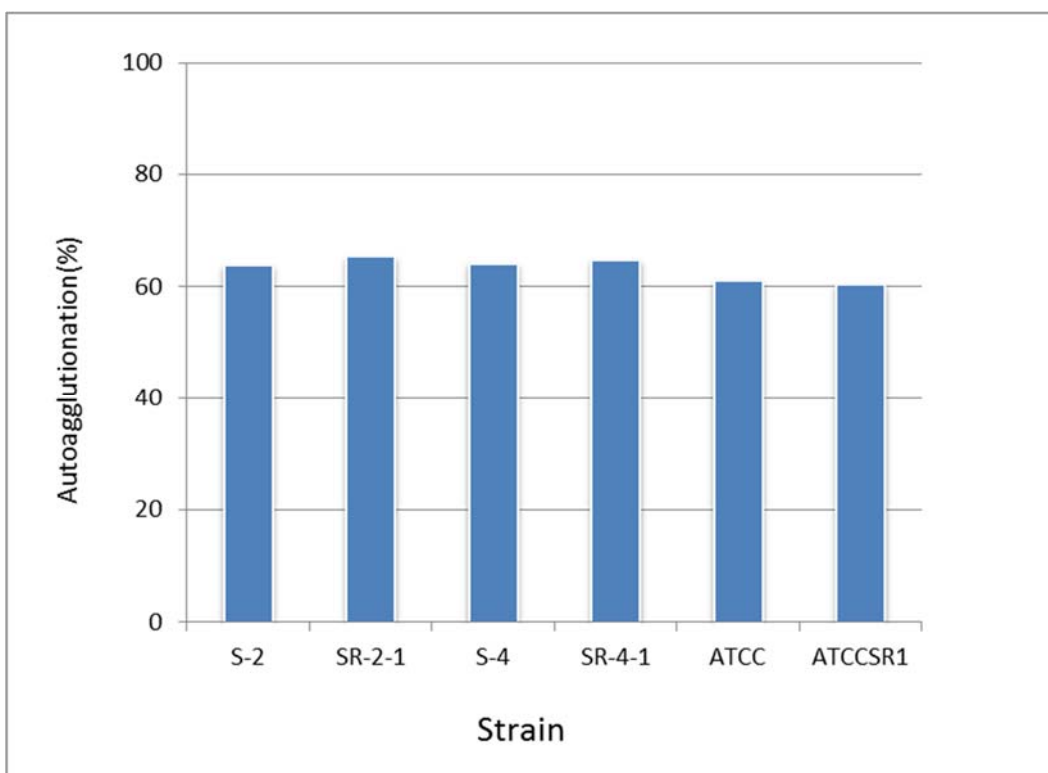


図 7 自家凝集能

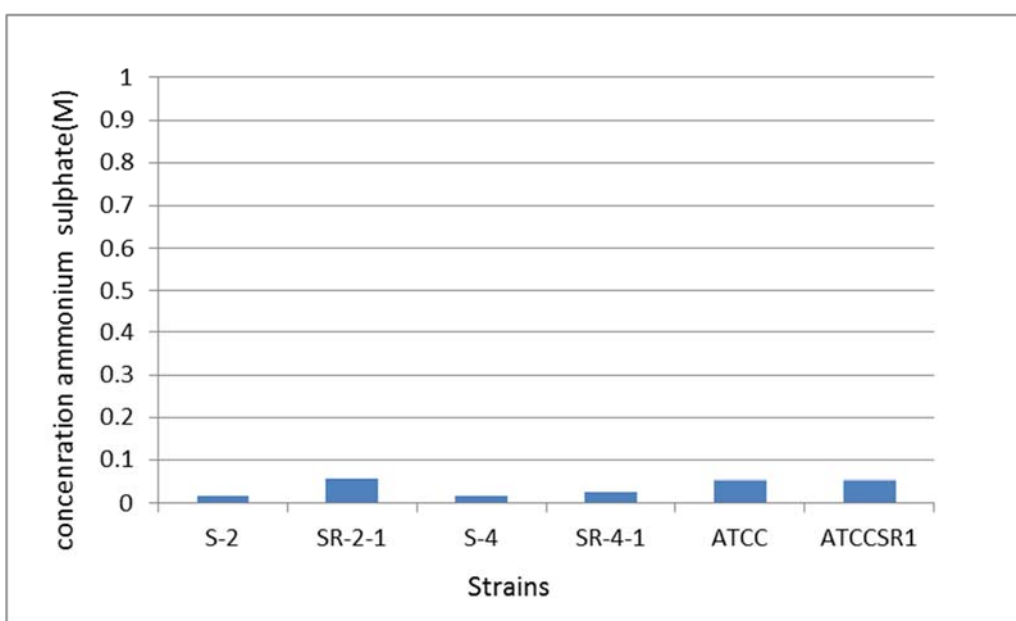


図 8 疎水性

Table6 基準株 (NC11168 株) の各種遺伝子配列をデータベースに BLAST した結果

株名	<i>cmeABC</i> (5697bp)	<i>cmeR</i> (633bp)	<i>cbrR</i> (1245bp)	<i>docB</i> (1779bp)	<i>tlpI</i> (2103bp)	<i>flgR</i> (1302bp)	<i>racR</i> (672bp)	<i>pebIA</i> (780bp)	<i>tatC</i> (738bp)
S-2	Identities = 5695/5697 (99%), Gaps = 0/5697 (0%)	Identities = 633/633 (100%), Gaps = 0/633 (0%)	Identities = 1234/1245 (99%), Gaps = 0/1245 (0%)	Identities = 1741/1779 (98%), Gaps = 0/1779 (0%)	Identities = 2074/2103 (99%), Gaps = 0/2103 (0%)	Identities = 1299/1302 (99%), Gaps = 0/1302 (0%)	Identities = 672/672 (100%), Gaps = 0/672 (0%)	Identities = 780/780 (100%), Gaps = 0/780 (0%)	Identities = 738/738 (100%), Gaps = 0/738 (0%)
SR-2-1	Identities = 5695/5697 (99%), Gaps = 0/5697 (0%)	Identities = 633/633 (100%), Gaps = 0/633 (0%)	Identities = 1234/1245 (99%), Gaps = 0/1245 (0%)	Identities = 1741/1779 (98%), Gaps = 0/1779 (0%)	Identities = 2074/2103 (99%), Gaps = 0/2103 (0%)	Identities = 1299/1302 (99%), Gaps = 0/1302 (0%)	Identities = 672/672 (100%), Gaps = 0/672 (0%)	Identities = 780/780 (100%), Gaps = 0/780 (0%)	Identities = 738/738 (100%), Gaps = 0/738 (0%)
S-4	Identities = 5678/5697 (99%), Gaps = 0/5697 (0%)	Identities = 632/633 (99%), Gaps = 0/633 (0%)	Identities = 1243/1245 (99%), Gaps = 0/1245 (0%)	Identities = 1778/1779 (99%), Gaps = 0/1779 (0%)	Identities = 2101/2103 (99%), Gaps = 0/2103 (0%)	Identities = 1289/1302 (99%), Gaps = 0/1302 (0%)	Identities = 672/672 (100%), Gaps = 0/672 (0%)	Identities = 769/780 (99%), Gaps = 0/780 (0%)	Identities = 731/738 (99%), Gaps = 0/738 (0%)
SR-4-1	Identities = 5678/5697 (99%), Gaps = 0/5697 (0%)	Identities = 632/633 (99%), Gaps = 0/633 (0%)	Identities = 1243/1245 (99%), Gaps = 0/1245 (0%)	Identities = 1778/1779 (99%), Gaps = 0/1779 (0%)	Identities = 2101/2103 (99%), Gaps = 0/2103 (0%)	Identities = 1289/1302 (99%), Gaps = 0/1302 (0%)	Identities = 672/672 (100%), Gaps = 0/672 (0%)	Identities = 769/780 (99%), Gaps = 0/780 (0%)	Identities = 731/738 (99%), Gaps = 0/738 (0%)

平成 25-26 年度 食品健康影響評価技術研究

「Ⅱ 生物学関連分野 1 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究」

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立

分担研究報告書

分担課題名：フルオロキノロン剤や菌株の違いがフルオロキノロン耐性カンピロバクターの出現頻度に与える影響の解明

分担研究者：白井 優 酪農学園大学獣医学群獣医学類食品衛生学ユニット

研究要旨

食中毒原因菌として重要であるカンピロバクター属菌は、鶏肉を主に原因としている。鶏の生産過程においてフルオロキノロン耐性株が出現することが公衆衛生上問題となっており、定量的リスク評価が必要とされている。そこで今回、定量的リスク評価を行う際に有用な情報となる、フルオロキノロン剤や菌株の違いがフルオロキノロン耐性出現に与える影響について明らかにするために複数のフルオロキノロン剤、複数のカンピロバクター属菌を用いた耐性獲得頻度試験を行った。得られた耐性獲得株についての性状解析、耐性獲得頻度と関連が推測されるポンプ発現量の定量を行いその関連について解析した。フルオロキノロン剤の種類の違いによるカンピロバクター属菌の耐性獲得のしやすさには大きな差がないことが示された。一方、株間による耐性獲得のしやすさは差があった。耐性獲得頻度とポンプ発現量の間に関連は認められなかったため、耐性獲得頻度の差の原因は明らかにならなかった。フルオロキノロン耐性を獲得した耐性株はヒトの治療に用いるフルオロキノロン剤に対しても感受性を低下させた。以上の結果より、鶏農場において、いずれのフルオロキノロン剤を使用しても、フルオロキノロン耐性菌は出現し、出現したフルオロキノロン耐性株がヒトの食中毒の原因になった際はフルオロキノロン剤が効きにくくなるリスクがあることが示された。また、以上の結果は定量的食品健康影響評価を実施する際に有用な情報となる。

A. 研究目的

食用動物由来細菌の中でも食中毒を起こす菌として重要であるカンピロバクター属菌は、フルオロキノロン剤の選択圧により比較的容易にフルオロキノロン耐性を獲得することが知られている。日本では、動物用フルオロキノロン剤としてノフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLEX)及びエンロフロキサシン

(ERFX)が承認されている。フルオロキノロン耐性カンピロバクター属菌の定量的食品健康影響評価を実施する際、カンピロバクター属菌のフルオロキノロン耐性出現に与える影響の薬剤間の違いについての情報及び菌株の違いについての情報が有用である。そこで今回、フルオロキノロン剤や菌株の違いがフルオロキノロン耐性株の出現に与える影響を明らかにし定量的食品健康影響評価を実施するための

情報とするため、①日本で鶏用フルオロキノロン剤として承認されている3種類のフルオロキノロン剤を用いたカンピロバクター属菌の耐性出現頻度試験及び②由来の異なる複数のフルオロキノロン感受性カンピロバクター属菌のERFXに対する耐性出現頻度試験を実施した。加えて、耐性出現頻度のばらつきの原因と推定される薬剤排泄ポンプの発現量について、耐性出現頻度との関連を明らかにするため、リアルタイムPCRにより複数のフルオロキノロン感受性及びフルオロキノロン耐性カンピロバクター属菌の薬剤排泄ポンプ(*cmeB*)の相対発現量を定量した。

B. 研究方法

1. フルオロキノロン剤間の耐性出現頻度に与える影響

対象菌株

Campylobacter jejuni(ATCC33560, 鶏肉由来 MN12-5 株) 及び *Campylobacter coli*(ATCC33559 株、豚レバー由来 No. 51 株)を用いた。

耐性菌出現頻度試験

それぞれの菌株について、NFLX, OFLX 及び ERFX の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。それぞれの薬剤について MIC 値の2, 4 及び8 倍の濃度を含む Mueller Hinton 寒天培地を作成し、そこに高濃度の対象菌株を接種した。微好気条件で 37℃、48 時間培養後に出現したコロニーをカウントし耐性菌出現頻度を算出した。各菌株、各薬剤、各濃度ごとに3 株を釣菌・保存し、その後の薬剤感受性試験に用いた。

薬剤感受性試験

薬剤感受性検査は、Clinical and Laboratory Standards Institute のドキュメント(M07-

A9)に記載されている微量液体希釈法に準じたプレートを用いた。作成を依頼した。使用する培地は、カチオン調整済み NAD、酵母エキス、馬溶血液添加 Mueller Hinton broth を用いた。薬剤感受性検査は、シプロフロキサシン(CPFX)、レボフロキサシン(LVFX)、ガチフロキサシン(GFLX)、トスフロキサシン(TFLX)、NFLX、OFLX, ERFX およびナリジクス酸(NA)の8 薬剤を対象薬剤とした。測定濃度範囲は、トスフロキサシンが 0.015 μ g/mL~16 μ g/mL、ナリジクス酸が 0.5 μ g/mL~512 μ g/mL、それ以外の抗菌薬は 0.015 μ g/mL~32 μ g/mL とした。滅菌調整食塩液を用いて McFarland No. 0.5 の基準濁度に調整した菌液を薬剤感受性検査用プレートに接種後、微好気条件下、35℃、16~18 時間培養した。培養後、肉眼で菌の発育を認めない最小の抗菌薬濃度を MIC とした。

キノロン耐性決定領域(QRDR)の配列解析

耐性獲得株について、InstaGene Matrix を用い添付のプロトコールに従い DNA 抽出を行い、QRDR を PCR で増幅後、ダイレクトシーケンスにより配列を決定した。

2. フルオロキノロン耐性出現に与える株間の影響

対象菌株

鶏肉由来フルオロキノロン感受性 *C. jejuni*11 株、糞便由来フルオロキノロン感受性 *C. jejuni*10 株、鶏肉由来フルオロキノロン感受性 *C. coli*1 株、糞便由来フルオロキノロン感受性 *C. coli*10 株を耐性菌出現頻度試験に用いた。耐性菌出現頻度試験に用いた 32 株に加えて、鶏肉由来フルオロキノロン耐性 *C. jejuni*10 株、糞便由来フルオロキノロン耐性 *C. jejuni*10 株、鶏肉由来フルオロキノ

ロン耐性 *C. coli*4 株、糞便由来フルオロキノロン耐性 *C. coli*10 株の薬剤排泄ポンプの発現量の定量に用いた。

耐性菌出現頻度試験及び薬剤感受性試験

「1. フルオロキノロン剤間の耐性出現頻度に与える影響」において用いた方法と同様の方法で行った。

薬剤排泄ポンプの発現量の定量

カンピロバクター属菌を Mueller Hinton Broth 10mL 中、OD 値が 0.2 から 0.4 になるまで 37℃の微好気条件で培養を行った。菌液を回収後、遠心を行い上清を捨て、沈澱に Isogen II500 μ l を加え、Isogen II のプロトコールに従い RNA 抽出を行った。抽出した RNA について DNase 処理、RT 反応を行った。RT 産物について、Light Cycler 480 リアルタイムシステムにより内部コントロールとして 16S リボソーム RNA、*C. jejuni* および *C. coli* のそれぞれの *cmeB* 遺伝子の発現量を定量した。Ct 値を算出し、16S リボソーム RNA で補正をした後、*C. jejuni* 及び *C. coli* のそれぞれの *cmeB* の発現量について平均を算出し、平均値を 1 とした時の相対値を相対発現量とした。

C. 研究結果

1. フルオロキノロン剤間の耐性出現頻度を与える影響

耐性獲得頻度試験

複数のフルオロキノロン剤による耐性獲得頻度試験の結果を薬剤ごとに分類し図 1 に示す。*C. jejuni* ATCC33560 について、2×MIC の NFLX で選択した際、*C. coli* ATCC33559 について、2×MIC の NFLX 及び OFLX、4×MIC の NFLX で選択した際の耐性獲得頻度が高い傾向が認められた。*C. coli* No. 51 について、8×MIC の ERFX で選択した際の耐性獲得頻度は低かった。

耐性獲得株の性状

耐性獲得頻度試験で出現したフルオロキノロン耐性株の性状（フルオロキノロン剤に対する感受性及び QRDR の遺伝子配列）を親株と合わせて表 1 に示す。なお、釣菌した 3 株が同一の性状を示した場合は単一株とみなした。全てのフルオロキノロン耐性獲得株は、選択に用いたフルオロキノロン剤を含む全てのフルオロキノロン剤に対して感受性が低下した。また、QRDR の変異個所については、*C. jejuni* ATCC33560 については、全ての選択株が C257T、G268A だった。*C. jejuni* MN12-5、*C. coli* ATCC33559 では、変異個所の組み合わせは様々であったが、薬剤による変異個所の違いはなかった。*C. coli* No. 51 株を親株とする選択株については、8×ERFX による選択株以外は全て QRDR の C257T 変異があった。C257T に加えて QRDR にもう一つの変異がある場合（複数の変異がある場合）、単一変異に比べてフルオロキノロン剤に対する感受性が大きく低下した。

2. フルオロキノロン耐性出現に与える株間の影響

耐性獲得頻度試験

MIC 値の 2、4 及び 8 倍の濃度の ERFX で耐性菌出現頻度試験を実施したところ、濃度による出現頻度の差は認められなかった。定量的食品健康影響評価には、全ての試験結果を用いるが、この報告書においては、MIC 値の 4 倍濃度の ERFX で実施した試験結果について記載する。

耐性獲得頻度試験の結果、*C. jejuni* で 1 株（糞便由来）、*C. coli* で 1 株（糞便由来）耐性株が出現しなかった。その他の株（*C. jejuni*19 株と *C. coli*10 株）の耐性獲得頻度

を図 2. に示す。耐性株が出現しなかった株もあるが、耐性獲得頻度が高い株については、*C. jejuni* で 5.2×10^{-7} 、*C. coli* で 8.0×10^{-7} であり、株ごとのばらつきが認められた。耐性獲得頻度について *C. jejuni* と *C. coli* で比較すると、*C. coli* の耐性獲得頻度が高い傾向にあったが有意な差は認められなかった。また、*C. jejuni* について鶏肉と糞便ごとの由来による耐性獲得頻度を比較したが有意な差は認められなかった(図 3)。

薬剤排泄ポンプ発現量の定量

薬剤排泄ポンプ発現量について、*C. jejuni* 及び *C. coli* についてそれぞれフルオロキノロン感受性株と耐性株の間での差があるかを比較した(図 4, 5)。*C. coli* において、耐性株がポンプ発現量が高い傾向を示したが、*C. jejuni* と *C. coli* のいずれにおいてもフルオロキノロン感受性株と耐性株でポンプ発現量に有意な差は認められなかった。次に、*C. jejuni* と *C. coli* について鶏肉と糞便の由来による薬剤排泄ポンプの相対発現量を比較したところ、*C. jejuni* では差が認められなかったものの *C. coli* では、鶏肉由来株の *cmeB* ポンプの相対発現量が糞便由来株よりも有意に高かった ($p < 0.05$) (図 6, 7)。

耐性獲得頻度と *cmeB* ポンプ発現量の関係解析

耐性獲得頻度と *cmeB* ポンプ発現量の関係について、*C. jejuni* と *C. coli* のそれぞれについてプロットした(図 8, 9)。いずれにおいても有意な関係は認められなかった。

D. 考察

今回、鶏に対するフルオロキノロン剤で承認されている 3 種類の薬剤に対する耐性獲得頻度を *C. jejuni* および *C. coli* のそれぞれ 2

株で算出したところ、ERFX の耐性獲得頻度が NFLX 及び OFLX に比べて低い傾向を示すものの薬剤の種類による大きな差は認められなかった。また、それぞれの薬剤で出現したフルオロキノロン耐性株は QRDR に変異を生じており、ヒトで使用されている他のフルオロキノロン剤に対しても感受性の低下を示した。QRDR の変異箇所は薬剤による違いではなく、ばく露をうける株により変異が生じやすい個所がある傾向であった。以上の結果より、鶏農場においてフルオロキノロン剤を使用する際、フルオロキノロン耐性株が出現するリスクはフルオロキノロン剤の種類には関係がなく、出現したフルオロキノロン耐性カンピロバクターはヒトの食中毒の原因となった際に、フルオロキノロン剤が効きにくいリスクがあることが示唆された。

C. jejuni と *C. coli* で耐性獲得頻度に有意な差は認められなかった。鶏から分離される *C. coli* は *C. jejuni* よりもフルオロキノロン剤に対する耐性割合が高いことが知られている。*C. jejuni* と *C. coli* でフルオロキノロン耐性割合が異なる理由は、フルオロキノロン曝露時の耐性獲得頻度の差ではない別の要因によることが示唆された。

C. jejuni と *C. coli* においてフルオロキノロン感受性株と耐性株のポンプ発現量を比較したところ、フルオロキノロン感受性株と耐性株で差が認められなかった。大腸菌やサルモネラ属菌では、フルオロキノロン耐性株のポンプ発現量が感受性株よりも高いことが報告されている。加えて、耐性獲得頻度と主要な薬剤排泄ポンプの発現量に関連が認められており耐性獲得頻度の高い株はポンプ発現量が高いことが示されている。しかし、今回の実験では耐性獲得頻度とカンピロバクターの

主要な薬剤排泄ポンプとして知られている *cmeB* の相対発現量に関連は認められなかった。以上の結果よりカンピロバクターの耐性獲得頻度はばらつきがあるが、そのばらつきの要因は、*cmeB* ポンプ発現量ではないことが示唆された。

今回、鶏肉由来 *C. coli* と糞便由来 *C. coli* で *cmeB* ポンプ発現量が鶏肉由来株で有意に高かった。鶏肉由来 *C. coli* の起源は鶏糞便である。以上の結果は、*C. coli* において *cmeB* ポンプ発現量が高い株が鶏肉に残っている可能性を示唆した。

E. 結論

フルオロキノロン剤の種類の違いによるカンピロバクター属菌の耐性獲得のしやすさには大きな差がないことが示された。一方、株間による耐性獲得のしやすさは、その要因は不明であるものの差があった。出現したフルオロキノロン耐性株はヒトが食中毒になった際に使用されるフルオロキノロン剤に対しても感受性の低下を示すことから、ヒトが食中毒になった際にフルオロキノロン剤が効かないリスクがある。以上の結果より、鶏農場におけるフルオロキノロン剤の使用はいずれの種類を使用してもリスクがあることが示された。また、以上の結果は定量的食品健康影響評価を実施する際に有用な情報となる。

F. 研究発表

論文発表

1. Asai T, Usui M, Hiki M, Kawanishi M, Nagai H, Sasaki Y.: *Clostridium difficile* Isolated from the Fecal Contents of Swine in Japan. *J Vet Med*

Sci. 75: 539-541. 2013.

2. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. equal distribution H. M and U. M.: Diversity of plasmid replicons encoding the bla_{CMY-2} gene in broad spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10:243-249. 2013.
3. Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T.: Effect of antimicrobial exposure on AcrAB expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis. *Front. Microbiol.* 4:53. 2013.
4. Sato T, Okubo T, Usui M, Higuchi H, Tamura Y.: Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. *J Vet Med Sci.* 75: 1063-1065. 2013.
5. Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The Role of Flies in Spreading the Extended-Spectrum Beta-lactamase Gene from Cattle. *Microbial Drug Resistance.* 19: 415-420. 2013
6. Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y. : Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance determining region mutations. *Front. Microbiol.* 4:125. 2013.

7. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-01-ST648 *Escherichia coli* carrying bla_{CMY-2} from fecal samples of dogs in Japan. *J Med Microbiol.* 63:263-270. 2014.
8. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y.: Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand). *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 685-692. 2014
9. Usui M, Sakemi Y, Uchida I, Tamura Y. Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.*, 170: 438-441, 2014.
10. Usui M, Uchida I, Tamura Y.: Selection of macrolide-resistant *Campylobacter* in pigs treated with macrolides. *Vet. Rec.*, 175: 430, 2014.
11. Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y.: Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.*, 5: 513, 2014.
12. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-01-ST648 *Escherichia coli* carrying bla_{CMY-2} from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 63: 263-270, 2014.
13. Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y.: Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *J. Infect. Chemother.*, 20: 243-249. 2014.
14. Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyauchi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Isolation of *Escherichia coli* strains with AcrAB-TolC efflux pump-associated intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 937-945., 2014
15. Sato T, Okubo T, Usui M, Yokota SI, Izumiyama S, Tamura Y.: Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from dairy cattle in Japan. *PLOS One.*, 9: e96101, 2014.
16. Okubo T, Tosaka Y, Sato T, Usui M, Nakajima C, Suzuki Y, Imura S, Tamura Y.: Bacterial diversity in sea ice from Southern ocean and the Sea of Okhotsk. *J. Appl. Environ. Microbiol.*,

2: 266-272, 2014.

17. Harada K, Usui M, Asai T.: Application of enrofloxacin and orbifloxacin disks approved in Japan for susceptibility testing of representative veterinary respiratory pathogens. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1427-1430., 2014.
18. Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H, Kojima A, Asai T.: Phylogenetic Grouping, Epidemiological Typing, Analysis of Virulence Genes, and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Japan. *Ir. Vet. J.*, 64: 14., 2014.

学会発表

1. 臼井 優: 細菌のフルオロキノロン耐性機構、第 155 回日本獣医学会、2013 年 3 月 29 日、東京
2. 臼井優、南部雪江、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊: 子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株との比較、第 80 回日本細菌学会北海道支部会、2013 年 8 月 30 日、北海道
3. 間瀬香織、臼井優、大久保寅彦、岩野英知、田村豊: 犬の膿皮症治療のための *Staphylococcus pseudintermedius* 特異ファージの分離と抗菌薬によるファージ溶菌活性の増強、第 64 回北海道獣医師大会、2013 年 9 月 6 日、北海道
4. 大久保寅彦、小野匡、佐藤豊孝、臼井優、田村豊: 動物病院来院猫からのセファロスポリン耐性およびフルオロキノロン耐

性大腸菌の検出、第 64 回北海道獣医師大会、2013 年 9 月 6 日、北海道

5. 南部雪江、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊: 子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株との比較、第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月 21 日、岐阜
6. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊: 薬剤耐性遺伝子はイエバエ腸管内で接合伝達する、第 156 回日本獣医学会、2013 年 9 月 21 日、岐阜
7. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊: 薬剤耐性遺伝子はイエバエ腸管内で接合伝達する、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
8. 大久保寅彦、臼井優、田村豊: ドブネズミ由来 *Enterococcus faecalis* の遺伝子的特徴について-市街地と無人島の比較-、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
9. 臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊: 子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* リボタイプ 078 と欧州で分離されたリボタイプ 078 の比較、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
10. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊: 薬剤耐性大腸菌はイエバエの発育環で維持される、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
11. 大久保寅彦、福田昭、田中和之、臼井優、田村豊: 腸球菌の薬剤耐性性状と人為的影響の関係、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
12. 臼井優、酒見蓉子、内田郁夫、田村豊: 豚へのフルオロキノロン剤投与及び群飼育

- がフルオロキノロン耐性カンピロバクターの選択・拡散に与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
13. 白川崇大、福田昭、大久保寅彦、臼井優、田村豊：農場由来耐性菌ベクターとしてのハエの役割、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
 14. 工藤逸美、臼井優、田村豊：畜舎で 사용되는消毒薬が *Escherichia coli* の薬剤排泄ポンプに与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
 15. 川崎ななみ、臼井優、田村豊：遺伝子導入による多剤耐性大腸菌の感受性回復の可能性、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
 16. 鈴木要人、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊：イヌ糞便由来 *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株の比較、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
 17. 長藤亘、臼井優、岡健太郎、高橋志達、山口博之、田村豊：Flavophospholipol による薬剤耐性遺伝子の接合伝達阻害作用、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
 18. 臼井優、大久保寅彦、福田昭、高田秀重、鈴木聡、田村豊：水圏環境からの薬剤耐性遺伝子伝播におけるハエの役割、環境微生物系合同大会 2014、2014 年 10 月 23 日、浜松
 19. 大久保寅彦、臼井優、鈴木聡、高田秀重、田村豊：バンコク周辺の水圏環境における薬剤耐性菌とその耐性遺伝子の解析、環境微生物系合同大会 2014、2014 年 10 月 23 日、浜松
 20. 臼井優、中島千絵、舘野翔、田勢準也、小野崎正修、大曾根司郎、鈴木定彦、田村豊：CAMERA 法による野外サンプル（鶏肉及び鶏糞便）からの薬剤耐性カンピロバクターの迅速検出法、第 7 回日本カンピロバクター研究会、2014 年 12 月 11 日
 21. 中島千絵、臼井優、鈴木晴香、小野崎正修、大曾根司郎、田村豊、鈴木定彦：DNA アレイ技術を応用した新たなカンピロバクター同定・薬剤耐性検出法の開発、第 7 回日本カンピロバクター研究会、2014 年 12 月 11 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

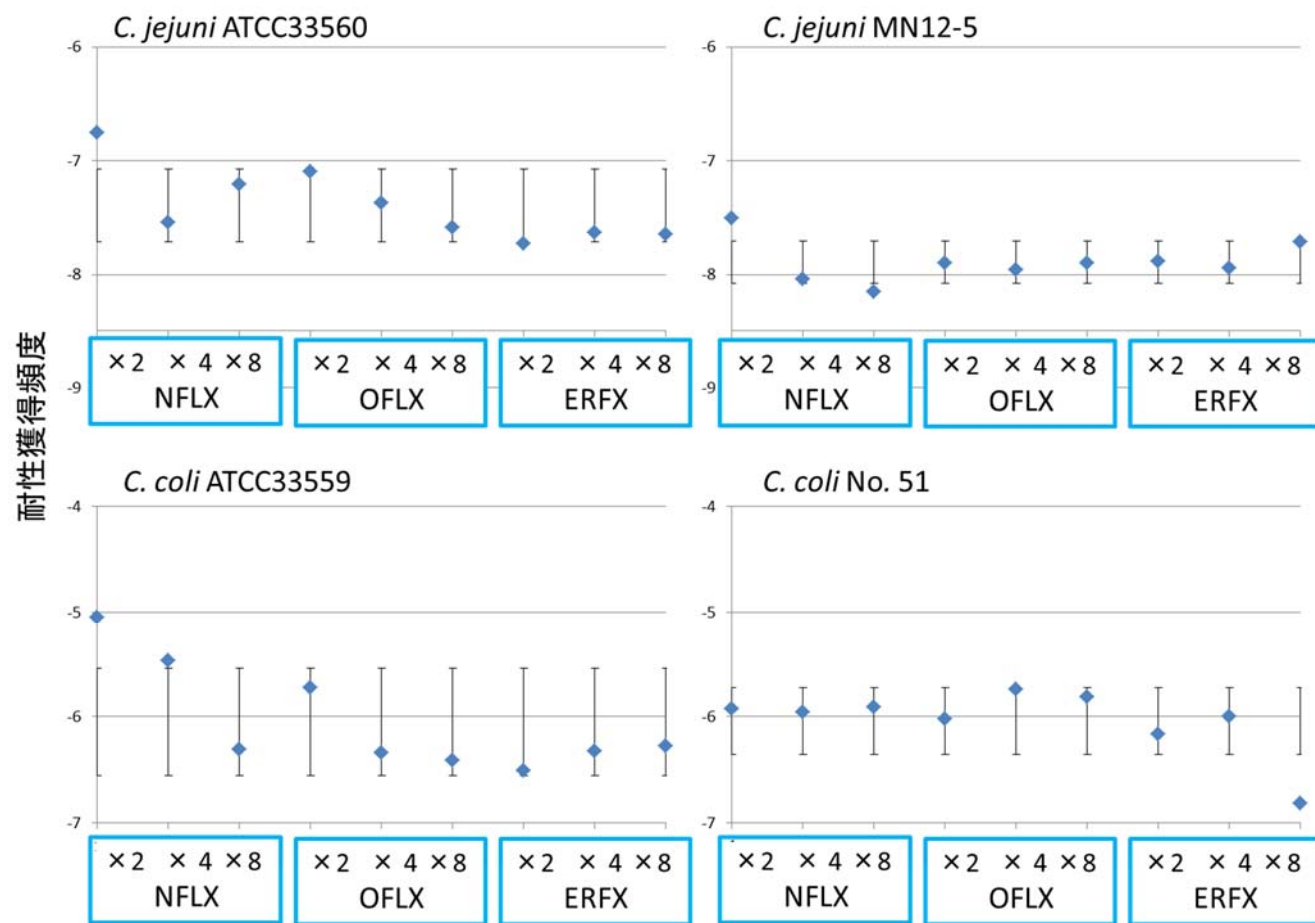


図1、複数のフルオロキノロン剤に対する *C. jejuni* 及び *C. coli* の耐性獲得頻度

表 1. 複数のフルオロキノロン剤に選択された耐性株の性状

Strain No.	選択薬剤	MIC 値(mg/L)								QRDR-mutations	
		CPFX	LVFX	GFLX	TFLX	NFLX	OFLX	ERFX	NA	GyrA	
<i>C. jejuni</i>	Parent	0.25	0.25	0.25	0.06	1	0.5	0.25	16		
ATCC33560	2× OFLX	16	8	4	2	32	16	8	256	C257T	G268A
	4× OFLX	16	8	4	2	32	8	4	256	C257T	G268A
	8× OFLX	16	8	4	2	32	16	8	256	C257T	G268A
	2× NFLX	32	16	4	8	32	16	4	256	C257T	G268A
	4× NFLX	16	8	4	2	32	8	4	256	C257T	G268A
	8× NFLX	16	4	4	2	32	8	4	256	C257T	G268A
	2× ERFX	32	>32	16	4	16	32	8	128	C257T	G268A
	4× ERFX	16	4	4	2	32	8	4	128	C257T	G268A
	8× ERFX	8	4	2	1	32	8	4	128	C257T	G268A
<i>C. jejuni</i>	Parent	0.5	0.5	0.5	0.12	2	1	0.25	8		
MN12-5	2× OFLX	>32	16	16	16	>32	32	16	128	C257T	C267T
		2	1	1	0.25	8	2	0.5	32		C267T
		2	1	1	0.5	4	1	0.25	16		C267T
	4× OFLX	16	8	4	2	>32	16	4	128	C257T	G268A
	8× OFLX	16	8	4	2	>32	16	4	128	C257T	G268A
	2× NFLX	2	1	2	0.25	8	2	1	8	C257T	
		2	1	1	0.25	8	2	0.5	32		C267T
		16	4	4	1	>32	8	4	64		C267T G268A
	4× NFLX	16	16	8	4	>32	32	8	64	C257T	G268A

	8 × NFLX	16	8	4	2	>32	16	4	128		C257T		G268A
	2 × ERFX	32	16	16	8	>32	32	8	64		C257T	C267T	
		>32	16	16	8	>32	32	8	64		C257T	C267T	
	4 × ERFX	32	16	8	8	32	32	8	64		C257T	C267T	
		16	8	4	2	>32	16	4	128			C267T	
	8 × ERFX	16	8	4	2	>32	16	8	128		C257T		G268A
<i>C. coli</i>	Parent	1	0.5	0.5	0.25	2	0.5	0.25	16				
ATCC33559	2 × OFLX	8	4	1	4	32	4	2	64	G250T			
	4 × OFLX	16	4	2	2	>32	8	4	256				G268A
		>32	32	8	>16	>32	>32	16	256				G268A
	8 × OFLX	4	2	0.5	4	16	4	2	64				G268A
	2 × NFLX	32	8	4	8	>32	16	8	128		C257T		
	4 × NFLX	32	8	4	8	>32	16	8	256				G268T
	8 × NFLX	2	1	0.5	0.5	16	1	1	16				G268C
		>32	32	8	>16	>32	32	16	256	C252A	C257T		
	2 × ERFX	8	4	1	8	32	8	4	64		C257T		
	4 × ERFX	32	8	8	16	>32	32	8	256		C257T		
	8 × ERFX	8	2	2	2	32	8	4	128				G268A
		>32	32	8	>16	>32	>32	16	256		C257T		
<i>C. coli</i>	Parent	0.5	0.25	0.25	0.12	2	0.5	0.25	8				
No. 51	2 × OFLX	>32	16	8	16	>32	32	16	128		C257T		
	4 × OFLX	>32	16	8	16	>32	32	16	128		C257T		
	8 × OFLX	>32	16	8	16	>32	32	16	128		C257T		

2 × NFLX	>32	16	8	16	>32	32	16	128	C257T	
4 × NFLX	>32	16	8	16	>32	32	16	128	C257T	
8 × NFLX	>32	16	8	16	>32	32	16	128	C257T	
2 × ERFX	32	16	8	8	>32	32	8	64	C257T	
4 × ERFX	>32	16	8	16	>32	32	16	128	C257T	
8 × ERFX	16	4	2	2	>32	8	4	128		G268A

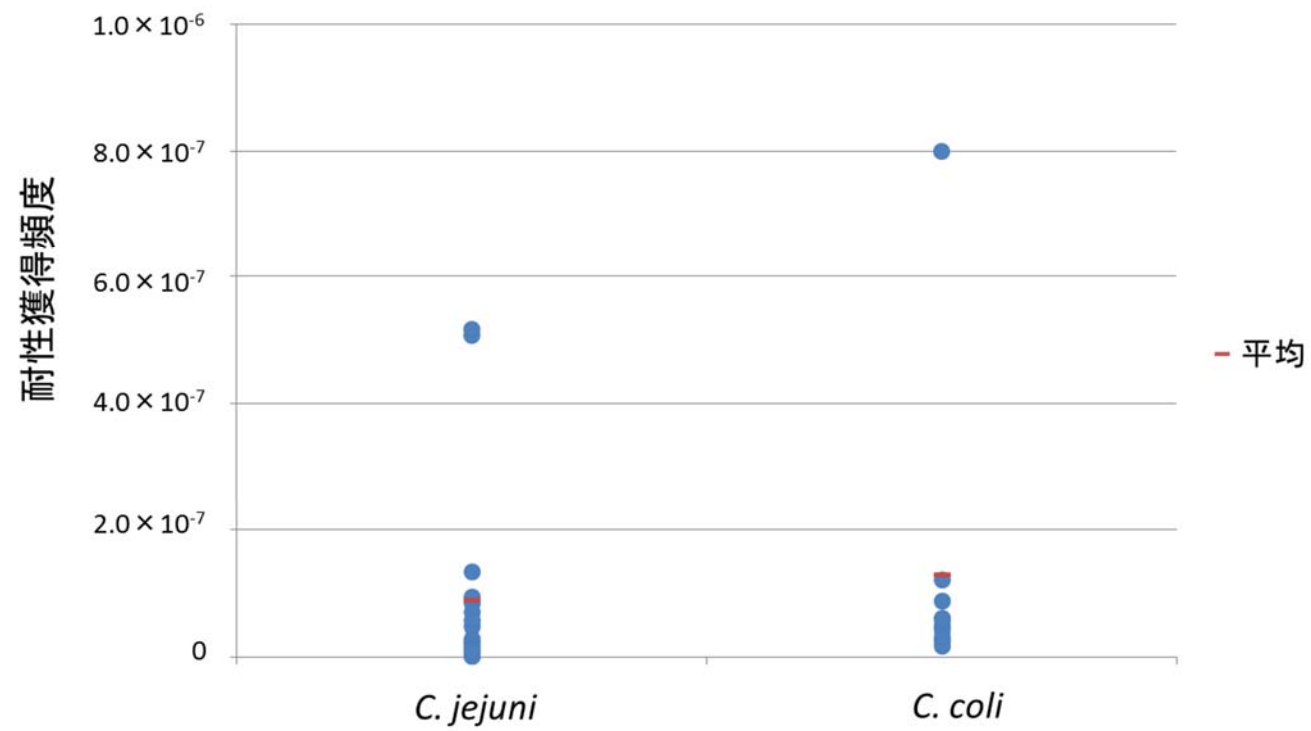


図2. *C. jejuni* (20 株)と *C. coli* (10 株)の耐性獲得頻度

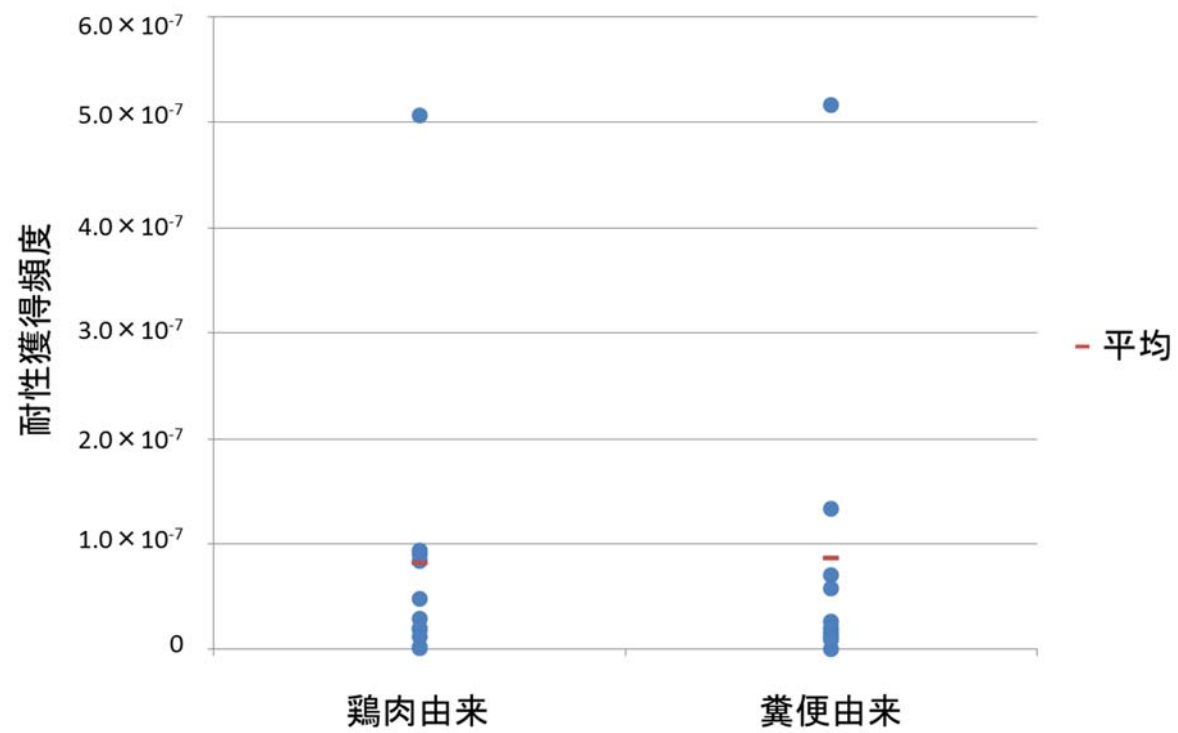


図 3. 鶏肉由来 *C. jejuni* (10 株) と糞便由来 *C. jejuni* (9 株) の耐性獲得頻度

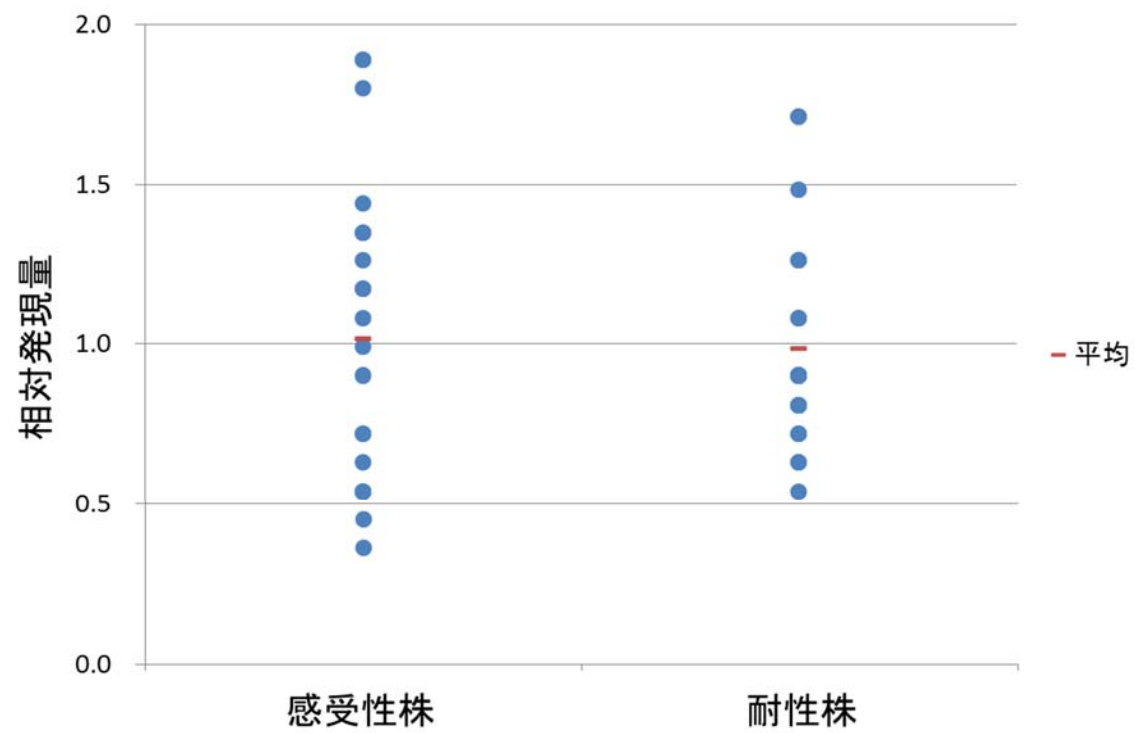


図4. フルオロキノロン感受性 *C. jejuni* (n=21) と耐性 *C. jejuni* (n=20) の *cmeB* の相対発現量

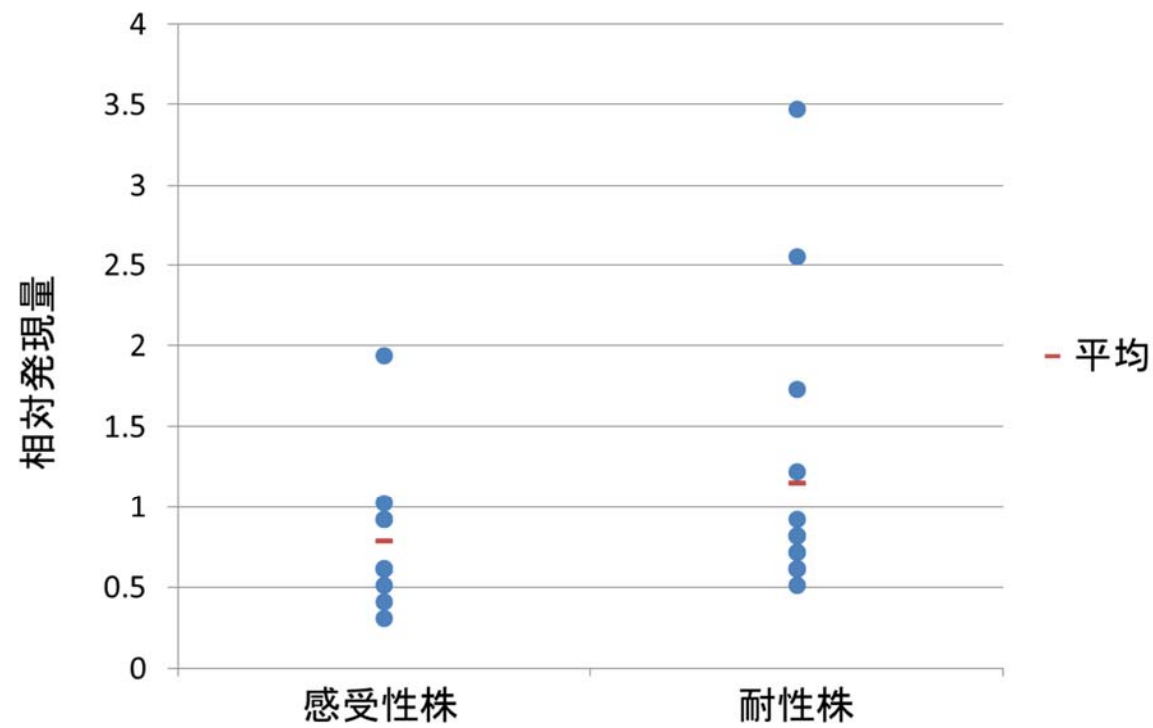


図 5. フルオロキノロン感受性 *C. coli* (n=10) と耐性 *C. coli* (n=14) の *cmeB* の相対発現量

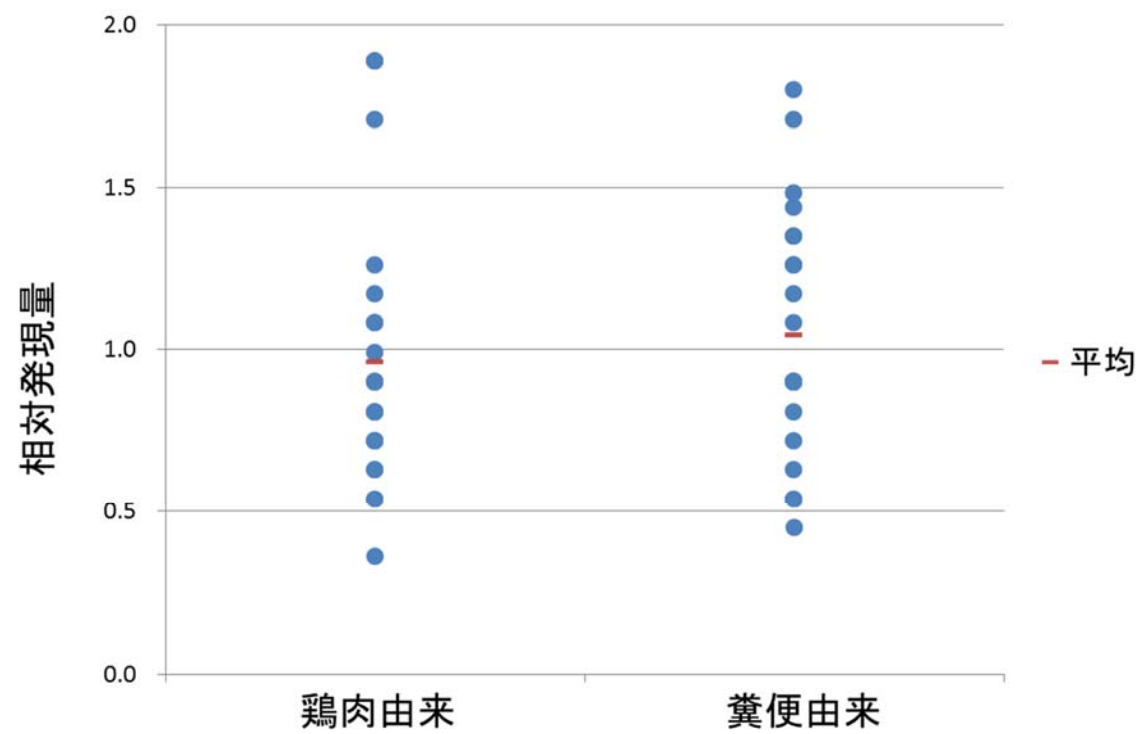


図 6. 鶏肉由来 *C. jejuni* と糞便由来 *C. jejuni* の *cmeB* 相対発現量

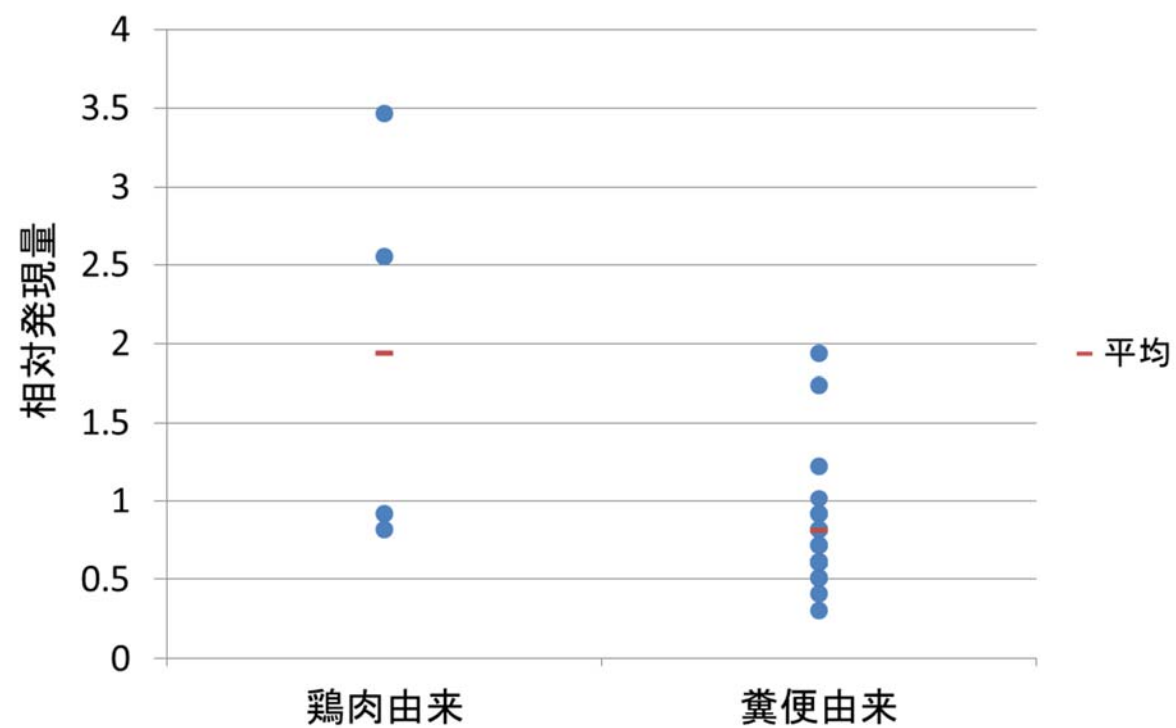


図 7. 鶏肉由来 *C. coli* と糞便由来 *C. coli* の *cmeB* 相対発現量

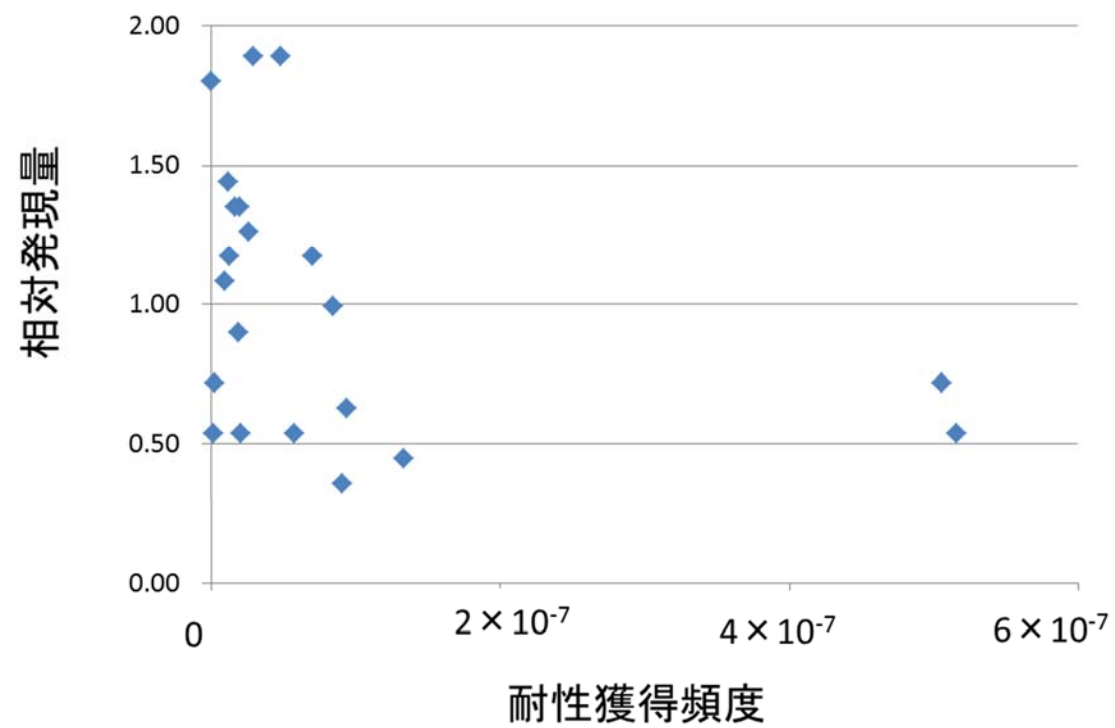


図 8. *C. jejuni* の耐性獲得頻度と *cmeB* 相対発現量の関係

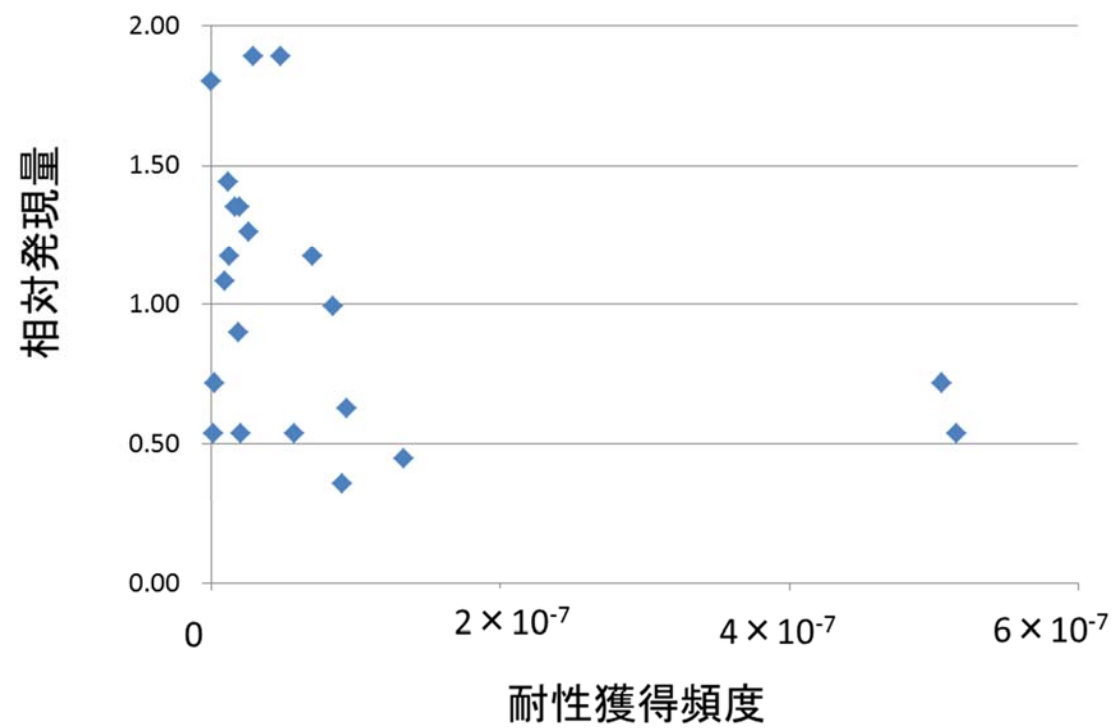


図 9. *C. coli* の耐性獲得頻度と *cmeB* 相対発現量の関係

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立(課題番号:1305)(生物学関連分野 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究)

分担研究報告書

分担課題名：鶏由来 *Salmonella* の耐性出現に与えるフルオロキノロン剤間及びサルモネラ株間の影響に関する研究

研究分担者 浅井鉄夫（岐阜大学大学院 連合獣医学研究所）

研究要旨

フルオロキノロン剤による *Salmonella* *Infantis* の耐性出現に与える影響を明らかにするため、国内で鶏に承認されている3薬剤（ノルフロキサシン、オフロキサシン及びエンロフロキサシン）を用いて耐性出現頻度試験及び得られた耐性株の性状解析を行った。その結果、キノロン耐性株の出現は、薬剤の種類による影響はないものと考えられた。

次いで、国内の鶏用フルオロキノロン剤のうち、最も流通している ERFX を用いて、肉用鶏に分布する主要な血清型（*Infantis*、*Schwarzengrund* 及び *Manhattan*）の複数株を用いて ERFX 存在下での耐性出現を検討した。その結果、*Infantis* や *Schwarzengrund* では、株間で耐性菌の出現頻度に違いがあること、*Schwarzengrund* と *Manhattan* では、耐性菌の出現頻度が *Infantis* に比べ高い傾向があることが示唆された。

A.目的

わが国では、1991年にエンロフロキサシン(ERFX)が承認されて以降、ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)の計3成分のフルオロキノロン剤が鶏の細菌感染症に使用されている。2007～2010年に国内のブロイラー由来サルモネラの薬剤感受性試験を実施した成績では、オールドキノロン剤であるナリジクス酸に対する耐性は認められたが、フルオロキノロン剤に対する耐性は認められなかった(Sasaki et al., 2012)。これまで、国内の家畜から分離されるサルモネラでは、フルオロキノロン耐性は牛由来 *Salmonella* *Typhimurium* (Kawagoe et al.,

2007) 及び豚由来 *S. Choleraesuis* (Esaki et al., 2003) で報告されているため、フルオロキノロン剤を継続的に使用することによるフルオロキノロン耐性の出現が懸念をされる。

長年、国内で飼育されるブロイラーから分離されるサルモネラの主要な血清型として *Infantis* が知られていたが、近年では、*Infantis* の他、*Schwarzengrund* 及び *Manhattan* の計3種があげられるようになった(Sasaki et al., 2012)。これら血清型が国内の鶏群に侵入した時期は明らかではないが、鶏群汚染が顕著になった時期について、筆者らは *S. Infantis* では1997年頃(Asai et al., 2007)、*S. Schwarzengrund*

では 2005 年頃(Asai et al., 2009)と推定しているが、*S. Manhattan* については不明である。

フルオロキノロン剤の定量的食品健康影響評価を実施する際、薬剤間のフルオロキノロン耐性菌出現に与える影響の差異は重要な変動要因となる。最初に、鶏用フルオロキノロン剤による *S. Infantis* の耐性出現に与える影響を明らかにするため、3 薬剤を用いた耐性出現頻度試験及び得られた耐性株の性状解析を行った(試験 1)。

さらに、鶏用フルオロキノロン剤で、最も流通している ERFX を対象に株間及び血清型間での耐性菌出現能の違いを検討した(試験 2)。

B. 方法

(1) 対象菌株

試験 1 では、*S. Infantis* ATCC51741、鶏肉由来 SI 2 ラ M1、7 ラ M1 及び 10 ラ S1 の計 4 株を用いた(表 1)。

試験 2 では、研究室が保有または収集したサルモネラ菌株から、キノロン剤感受性 19 株を選定した。内訳は、血清型 *Infantis* 8 株(糞便由来 6 株、鶏肉由来 2 株)、*Schwarzengrund* 5 株(糞便由来 2 株、鶏肉由来 5 株)、*Manhattan* 4 株(全て鶏肉由来)である(表 2)。

(2) 耐性菌出現頻度試験

それぞれの菌株について、フルオロキノロン剤(NFLX, OFLX 及び ERFX)の最小発育阻止濃度(MIC)を決定した。

試験 1 では、薬剤の MIC 値の 2, 4 及び 8 倍の濃度(以下、2MIC、4MIC、8MIC)を含む Mueller Hinton (MH) 寒天培地を

作成し、試験 2 では、2MIC 及び 4MIC を含む MH 寒天培地を作成し、そこに高濃度(10^{10} cfu/ml 以上)の被検菌を接種した。

菌液の調整は、Luria-Bertani (LB) broth (2mL) 中で 37°C で 1 晩培養した菌液 100µl を 50ml の MH ブロスに接種して、スターラーで攪拌しながら、37°C で約 4 時間培養した。培養液を、3500rpm 10 分遠心後、沈殿に 500µl の生理食塩水に懸濁し接種用濃縮菌液とした。

濃縮菌液を 2 枚の薬剤含有培地に 50µl ずつ接種すると同時に、10 倍希釈を 8 段階実施して、2 枚の薬剤不含 MH 寒天培地へ 50µl ずつ接種した。

好気条件で 37°C、24 時間培養後に出現したコロニーをカウントし耐性菌出現頻度を算出した。各菌株、各薬剤、濃度ごとに 1~2 株を釣菌・保存し、以下の試験に用いた。

(3) 薬剤感受性試験

薬剤感受性検査は、Clinical and Laboratory Standards Institute のガイドライン(M39-A4)に記載されている微量液体希釈法に準じたフローズンプレート(栄研化学(東京)に依頼し、段階希釈された薬剤を含有する Mueller Hinton broth を用いて実施した。シプロフロキサシン(CPFX)、レボフロキサシン(LVFX)、ガチフロキサシン(GFLX)、トスフロキサシン(TFLX)、NFLX、OFLX, ERFX およびナリジクス酸(NA)の 8 薬剤を対象薬剤とした。測定濃度範囲は、トスフロキサシンが 0.015µg/mL~16µg/mL、ナリジクス酸が 0.5µg/mL~512µg/mL、それ以外の抗菌薬は 0.015µg/mL~32µg/mL とした。滅菌整

理食塩液を用いて McFarland No.0.5 の基準濁度に調整した菌液を 10 倍希釈し、薬剤感受性検査用プレートに 2 μ l 接種後、35°C、16~18 時間培養した。培養後、肉眼で菌の発育を認めない最小の抗菌薬濃度を MIC とした。

(4) 耐性機序の解析

耐性菌出現頻度試験で得られた耐性菌株について、フルオロキノロン耐性に関わるジャイレース遺伝子(*gyrA*)の遺伝子配列を既報 (Giraud et al., 1999) のプライマーセット(STGYRA1: 5'-TGTCGAGATGGCCTGAAGC-3', STGYRA12: 5'-CGTTGATGACTTCCGTCAG-3')を用いて PCR で増幅後、ダイレクトシーケンスを行うことで明らかにした。

(5) 薬剤排泄ポンプ関連遺伝子の発現量の評価

サルモネラの主要な薬剤排泄ポンプである AcrA-AcrB-TolC 蛋白複合体を構成する AcrB 蛋白を指標に薬剤排泄能を評価した。MHB (2ml) に接種して一晩 37°C で培養した培養菌液 100 μ l を MHB (10ml) に接種して 37°C で 4 時間静置培養した。遠心 (3500rpm 10 分) した沈査から Isogen (500 μ l)を用いて添付文書に従い RNA を抽出した。抽出した RNA を DNase で処理後、Primescript RT reagent kit を用いて cDNA を作成した。

作成した cDNA をテンプレート DNA として 16s rRNA と *acrB* を既報のプライマーを用いてリアルタイム PCR を実施した。16s rRNA を内在性コントロールとして比

較 Ct 法により *acrB* の mRNA の発現量を相対評価した。

C. 結果

a) 試験 1

(1) 供試株の薬剤感受性

供試株における各薬剤の MIC を表 1 に示した。CPFX の MIC は、鶏肉由来 1 株では ATCC と同じ 0.03 μ g/ml であったが、鶏肉由来の残りの 2 株では $\leq$ 0.015 μ g/ml であった。CPFX 以外の 7 薬剤の MIC は、TFLX を除いて全て同じであった。耐性出現頻度試験に使用する NFLX および OFLX の MIC は 0.12 μ g/ml で、ERFX の MIC は 0.06 μ g/ml であった。

(2) 耐性出現頻度試験

3 種類のフルオロキノロン剤の薬剤濃度を 2MIC、4MIC 及び 8 MIC で調整した培地上での耐性出現頻度を表 3 に示した。2MIC で変異株の出現は認められたが、4MIC 及び 8 MIC で変異株の出現は認められなかった。OFLX、NFLX 及び ERFX 含有培地における耐性出現頻度の平均 (範囲) は、 5.9×10^{-9} ($1.3 \times 10^{-9} \sim 19 \times 10^{-9}$)、 1.9×10^{-9} ($0.67 \times 10^{-9} \sim 4.2 \times 10^{-9}$) 及び 4.3×10^{-9} ($0.76 \times 10^{-9} \sim 13 \times 10^{-9}$) で、薬剤間に差は認められなかった。ATCC51741 株、2 ラ M1 株及び 10 ラ S1 株は、3 薬剤ともに約 1×10^{-9} であったが、7 ラ M1 株は、 $4.2 \times 10^{-9} \sim 19 \times 10^{-9}$ で、4~10 倍出現頻度が高かった。

(3) 変異株の性状

各菌株、各薬剤、各濃度で選択された変異株の薬剤感受性試験及び *GyrA* のキノ

ロン耐性決定領域 (QRDR) の変異を表 4 に示した。各薬剤の各濃度について 2 株を測定した。変異株では、各キノロン剤の MIC の上昇が認められ、ナリジクス酸の MIC にはバラツキが認められた。ナリジクス酸の MIC が高度に上昇している株では、*gyrA* 遺伝子の 83 位または 87 位に変異が認められた。

試験 2

(1) 鶏糞由来と鶏肉由来 *S. Infantis* の耐性出現頻度

供試株における各薬剤の MIC を表 2 に示した。本研究の事前検証として、鶏糞由来と鶏肉由来 *Infantis* 株における ERFX 存在下での耐性出現頻度を比較した。表 5 に示すように、2MIC (0.12 μ g/ml) での鶏糞由来株の耐性出現頻度は 8.4×10^{-9} ($0.71 \sim 23 \times 10^{-9}$) で、鶏肉由来株のそれは、 6.3×10^{-9} ($0.76 \sim 13 \times 10^{-9}$) で、両由来に違いは認められなかった。このことから、以下の実験データの解析は血清型別に集計することとした。

(2) サルモネラ血清型別の耐性出現頻度

選択濃度を 2MIC で実施した耐性出現頻度は、*Infantis* で 7.9×10^{-9} ($2.0 \sim 22.6 \times 10^{-9}$)、*Schwarzengrund* で 14.6×10^{-9} ($4.4 \sim 37.4 \times 10^{-9}$)、*Manhattan* で 15.6×10^{-9} ($12.9 \sim 20.0 \times 10^{-9}$) であった (表 6)。*Infantis* 株の変異株の出現頻度は、*Schwarzengrund* と *Manhattan* に比べて低く、また、*Manhattan* では、株間のバラつきは小さかったが、*Infantis* や *Schwarzengrund* では低頻度株と高頻度株で約 10 倍の違いが認められた。

選択濃度を 4MIC で実施した場合、変異株の出現が認められない時も多く、十分な評価はできなかった (表 7)。

(3) 変異株の性状、

2MIC で選択された 19 株に由来する変異株 40 株の薬剤感受性試験及び *GyrA* のキノロン耐性決定領域 (QRDR) の変異を表 8 に示した。各菌株について 2 株を測定した。

変異株では、各キノロン剤の MIC の上昇が認められた。40 株中 37 株で *gyrA* 遺伝子の 83 位または 87 位に変異が認められたが、3 株では *gyrA* 及びの QRDR に変異は認められなかった。

(4) 薬剤排泄ポンプ関連遺伝子の発現量の評価

サルモネラの主要な薬剤排泄ポンプである *AcrA-AcrB-TolC* 蛋白複合体を構成する *AcrB* 蛋白を指標に薬剤排泄能を評価した。

mRNA の相対発現量の平均値は、*Infantis* (8 株) で 10.22、*Schwarzengrund* (7 株) で 11.43、*Manhattan* (4 株) で 11.53 と同様であった (表 9)。

耐性出現頻度と *arcB* の発現量を比較すると、*Infantis* と *Manhattan* では耐性出現頻度の高い株で *acrB* の発現量が多い傾向が認められたが、*Schwarzengrund* では見られなかった (図 1)。

D. 考察

鶏用フルオロキノロン剤として承認されている 3 薬剤の肉養鶏に対する販売量

は、2002～2007 年には ERFX が 50%以上を占めていたが、その後 NFLX の販売割合が増加している（図 2）。そして、2011 年には、ERFX と NFLX の販売割合は、40%ずつを占め、両薬剤で 80%となった。このような変動が、肉用鶏における耐性菌の出現に影響することが危惧されたが、3 種類のフルオロキノロン剤を用いた耐性出現頻度試験では、薬剤の種類に起因する耐性出現の影響はないものと考えられた。

一方、鶏肉由来サルモネラは、薬剤耐性プロファイルや分子疫学解析により農場で分離される株との類似性から、飼育農場のサルモネラが伝播していることが示唆されてきた。国内のブロイラーから分離されるサルモネラの主要な血清型 3 種を用いた耐性出現頻度試験では、血清型 *Infantis* や *Schwarzengrund* では、分布する株間で耐性菌の出現頻度に違いがあること、さらに、*Schwarzengrund* と *Manhattan* では、耐性菌の出現頻度が高い傾向があることが示唆された。

これまで、日本を含め海外でも、*Manhattan* のフルオロキノロン耐性は報告されていないが、*Infantis* や *Schwarzengrund* でフルオロキノロン耐性が海外で報告されている。*Infantis* については、セルビアで出現したフルオロキノロン耐性株には *clonality* の高い株であること (Velhner et al., 2014) が、*Schwarzengrund* については、台湾と米国でフルオロキノロン耐性菌が報告されている (Olsen et al., 2001; Baucheron et al., 2005; Lauderale et al., 2006)。

長年、*Infantis* が肉養鶏で優勢な血清型

であったが、*Schwarzengrund* や *Manhattan* が出現し、これらの血清型間で耐性菌の出現頻度に差があることが示唆されたことは、フルオロキノロン剤を使用する限り継続的なモニタリングで実態把握を行うことが重要であると考えられる。

これらの試験で、出現した変異株における薬剤耐性出現に係る標的遺伝子の変異型はこれまでの報告と同様であった (Asai et al., 2006; Ozawa et al., 2010)。

菌株間と血清型間で認められた耐性菌の出現頻度の違いを明らかにするため、サルモネラの代表的な薬剤排泄ポンプである *AcrAB-TolC* の発現状況を評価した。これまで、*Typhimurium* (Zeng et al., 2009) や *Choleraesuis* (Usui et al., 2013) など血清型で、その関与が示唆されてきた。今回、血清型間で耐性菌の出現頻度の違いが認められたが、各血清型毎の *arcB* の発現量の平均値には差がなく、一方、血清型毎に株間の発現量と耐性菌の出現頻度を解析した結果では、*Infantis* と *Manhattan* では耐性出現頻度の高い株で *acrB* の発現量が多い傾向が認められた。これらのことから、血清型間で薬剤排泄ポンプによる耐性出現頻度への影響に違いがあることが示唆された。

E. 結論

国内で承認されている 3 薬剤を用いて検討したところ、キノロン耐性株の出現は、薬剤の種類による影響はないものと考えられた。また、国内の肉用鶏に分布する主要な血清型の複数株を用いて ERFX 存在下での耐性出現を検討したところ、血清型及び株間で耐性出現頻度に違いが

あることが示唆された。

参考文献

- Asai, T., Esaki, H., Kojima, A., Ishihara, K., Tamura, Y. and Takahashi, T.: Antimicrobial Resistance in *Salmonella* isolates from apparently healthy food-producing animal from 2000 to 2003: the first stage of Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (JVARM). J. Vet. Med. Sci. **68**, 881-884, 2006.
- Asai, T., Ishihara, K., Harada, K., Kojima, A., Tamura, T., Takahashi, T. and Sato, S.: Long-term prevalence of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis in broiler chicken industry in Japan. Microbiol. Immunol. **51**, 111-115, 2007.
- Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R. and Ishikawa, H.: 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, 2009.
- Baucheron S, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A, Chiu CH, Butaye P. High-level resistance to fluoroquinolones linked to mutations in *gyrA*, *parC*, and *parE* in *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolates from humans in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. **49**(2):862-3, 2005.
- Esaki, H., Chiu, C. H., Kojima, A., Ishihara, K., Asai, T., Tamura, Y. and Takahashi, T.: Comparison of fluoroquinolone resistance genes of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates in Japan and Taiwan. Jpn. J. Infect. Dis. **57**, 287-288, 2004.
- Giraud E1, Brisabois A, Martel JL, Chaslus-Dancla E. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. Antimicrob Agents Chemother. **43**(9):2131-2137, 1999.
- Kawagoe, K., Mine, H., Asai, T., Kojima, A., Ishihara, K., Harada, K., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H., Honda, E., Tamura, Y., Takahashi, T. and 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.
- Lauderdale TL, Aarestrup FM, Chen PC, Lai JF, Wang HY, Shiau YR, Huang IW, Hung CL; TSAR hospitals. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis. **55**(2):149-55, 2006.
- Olsen SJ, DeBess EE, McGivern TE, Marano N, Eby T, Mauvais S, Balan VK, Zirnstein G, Cieslak PR, Angulo FJ. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant salmonella infection. N Engl J Med. **344**(21):1572-9, 2001.
- Ozawa, M., Baba, K., Shimizu, Y. and Asai, T.: Comparison of in vitro activities and pharmacokinetics/pharmacodynamics estimations of veterinary fluoroquinolones against avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Microb Drug Resist. **16**, 327-332, 2010.
- Sasaki, Y., Ikeda, A., Ishikawa, K., Murakami, M., Kusukawa, M., Asai, T. and Yamada, Y.: Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in Japanese broiler flocks. Epidemiol. Infect. **140**, 2074-2081, 2012.
- Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T. Effect of Antimicrobial Exposure on AcrAB Expression in *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Choleraesuis. Front Microbiol. **4**:53, 2013.
- Velhner M1, Kozoderović G, Grego E, Galić N, Stojanov I, Jelesić Z, Kehrenberg C. Clonal spread of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Serbia: acquisition of mutations in the topoisomerase genes *gyrA* and *parC* leads to increased resistance to fluoroquinolones. Zoonoses Public Health. **61**(5):364-70, 2014.
- Zheng, J., Cui, S., and Meng, J. Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux

pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 95-102, 2009.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

Sasaki, Y., Maruyama, N., Zou, B., Haruna, M., Kusakawa, M., Murakami, M., Asai, T., Tsujiyama, Y. and Yamada, Y.: *Campylobacter* cross-contamination of chicken products at an abattoir. *Zoonoses Public Health*. 60(2):134-40, 2013.

Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y. and Asai, T.: Diversity of plasmid replicons encoding the *bla_{CMY-2}* gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10(3):243-9, 2013.

Asai, T., Usui, M., Hiki, M., Kawanishi, M., Nagai, H. and Sasaki, Y.: *Clostridium difficile* isolated from the fecal contents of swine in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 75(4):539-41, 2013.

Yano, S., Kira, T., Morishita, Y., Ishihara, K., Asai, T., Iwata, T., Akiba, M. and Murase, T.: Colonization of chicken flocks by *Campylobacter jejuni* in multiple farms in Japan. *Poultry Science*. 92(2):375-81, 2013.

Haruna, M., Sasaki, Y., Murakami, M., Mori, T., Asai, T., Ito, K. and Yamada, Y.: Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolates from Beef Cattle and Pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 75(5):625-8, 2013.

Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T. Effect of Antimicrobial Exposure on AcrAB Expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis*. *Front Microbiol.* 4:53, 2013.

Hosoi Y, Asai T. Koike R, Tsuyuki M, Sugiura K. Use of veterinary antimicrobial agents from 2005 to 2010 in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 41(5):489-90, 2013.

Ozawa M, Asai T. Relationships between Mutant Prevention Concentrations and Mutation Frequencies against Enrofloxacin for Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates. *J. Vet. Med. Sci.* 75(6):709-713, 2013.

Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T. Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y. Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(5):823-5.

Kawanishi, M., Ozawa, M., Hiki, M., Abo, H., Kojima, A., Asai, T. Detection of *aac(6')-Ib-cr* in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2013, 75(11):1539-42.

Horiuchi N, Aihara N, Mizutani H, Kousaka S, Nagafuchi T, Ochiai M, Ochiai K, Kobayashi Y, Furuoka H, Asai T, Oishi K. Becker muscular dystrophy-like myopathy regarded as so-called "fatty muscular dystrophy" in a pig: a case report and its diagnostic method. *J Vet Med Sci.* 2014;76(2):243-8.

Harada K, Usui M, Asai T. Application of Enrofloxacin and Orbifloxacin Disks Approved in Japan for Susceptibility Testing of Representative Veterinary Respiratory Pathogens. *J Vet Med Sci.* 76(10):1427-30, 2014.

Hiki, M., Usui, M., Akiyama, T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Akemi, K., Asai, T. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Ir Vet J.* 67(1):14, 2014.

Usui, M., Nanbu, Y., Oka, K., Takahashi, M., Inamatsu, T., Asai, T., Kamiya, S., Tamura, Y. Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium*

difficile originating from piglets and their risk associated
with human health. Front Microbiol. 5:513, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 実験 1 で供試した株における各薬剤の MIC

株名	由来	CPFX	LVFX	GFLX	TFLX	NFLX	OFLX	ERFX	NA
ATCC 51741	ATCC	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
CM2 ラ M1	鶏肉	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
CM7 ラ M1	鶏肉	≤0.015	0.06	0.06	0.015	0.12	0.12	0.06	4
CM10 ラ S1	鶏肉	≤0.015	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4

表 2 実験 2 で供試した株の由来、血清型及び各フルオロキノロン剤の最小発育濃度 (MIC)

由来	血清型	株 No.	MIC (mg/L) of							
			CPFX	LVFX	GFLX	TFLX	NFLX	OFLX	ERFX	NA
鶏糞	Infantis	24-PLS-34	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4
		24-PLS-200	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4
		24-PLS-40	0.06	0.12	0.12	0.03	0.25	0.25	0.06	4
		24-PLS-169	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4
		24-PLS-170	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4
		24-PLS-171	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4
	Schwarzengrund	24-PLS-83	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
		24-PLS-202	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
鶏肉	Infantis	24A98	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
		25A73	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
	Schwarzengrund	22A253	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
		23A58	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4
		25A72	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
		25A76	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
		25A89	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
	Manhattan	22A225	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4
		22A341	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4
		23A61	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.25	0.06	8
		23A70	0.03	0.06	0.06	0.03	0.25	0.12	0.06	4

表 3 各薬剤濃度における *S. Infantis* の耐性出現頻度

	OFLX		NFLX		ERFX	
	2MIC	4MIC	2MIC	4MIC	2MIC	4MIC
ATCC51741	1.6	<0.23	1.4	<0.48	2.7	<0.45
2 ラ M1	1.3	<0.66	1.3	<0.43	0.8	<0.25
7 ラ M1	19.0	<0.80	4.2	<0.17	13.0	<0.66
10 ラ S1	1.6	<0.82	0.7	<0.33	0.9	<0.88
平均	5.9		1.9		4.3	
標準偏差	8.8		1.6		5.8	
出現頻度の範囲	1.3～19		0.67～4.2		0.76～13	

表 4 薬剤含有培地で分離した変異株の MIC 及び GyrA のキノロン耐性決定領域の変異

含有薬剤 (濃度 mg/L)	親株	株名	MIC (mg/L)								GyrA	
			CPFX	LVFX	GFLX	TFLX	NFLX	OFLX	ERFX	NA	83 (TCC)	87 (GAC)
OFLX (0.25)	ATCC51741	ATCC51741-1	0.12	0.25	0.25	0.12	0.5	0.5	0.5	256	Wild	AAC
		ATCC51741-2	0.12	0.25	0.25	0.12	0.5	0.5	0.5	256	TAC	Wild
	2 ラ M1	2RM1-1	0.25	0.5	0.25	0.12	1	1	0.5	256	Wild	TAC
		2RM1-2	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	GGC
	7 ラ M1	7RM1-1	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	1	1	512	TTC	Wild
		7RM1-2	0.25	0.5	0.25	0.06	0.12	0.12	0.5	512	TTC	Wild
	10 ラ S1	10RS1-1	0.25	0.5	0.12	0.06	0.12	0.12	0.5	512	TTC	Wild
		10RS1-2	0.25	0.5	0.25	0.12	1	1	0.5	256	TTC	Wild
NFLX (0.25)	ATCC51741	ATCC51741-1	0.06	0.12	0.12	0.06	0.12	0.12	0.12	8	Wild	Wild
		ATCC51741-2	0.25	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	TAC
	2 ラ M1	2RM1-1	0.12	0.25	0.25	0.06	0.5	0.5	0.25	8	Wild	Wild
		2RM1-2	0.12	0.25	0.25	0.06	0.5	0.5	0.25	16	Wild	Wild
	7 ラ M1	7RM1-1	0.03	0.12	0.12	0.06	0.25	0.25	0.12	8	Wild	Wild
		7RM1-2	0.06	0.12	0.12	0.06	0.25	0.12	0.06	8	Wild	Wild
	10 ラ S1	10RS1-1	0.12	0.25	0.12	0.06	0.5	0.5	0.5	256	Wild	AAC
		10RS1-2	0.12	0.5	0.25	0.12	1	1	0.5	256	Wild	AAC
ERFX (0.12)	ATCC51741	ATCC51741-1	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	0.5	>512	TTC	Wild
		ATCC51741-2	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	1	512	TTC	Wild
	2 ラ M1	2RM1-1	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	GGC
		2RM1-2	0.06	0.25	0.25	0.12	0.5	0.5	0.25	8	Wild	Wild
	7 ラ M1	7RM1-1	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	1	512	TTC	Wild
		7RM1-2	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	1	256	TAC	Wild
	10 ラ S1	10RS1-1	0.12	0.5	0.25	0.25	0.5	1	0.5	256	TTC	Wild
		10RS1-2	0.03	0.06	0.06	0.03	0.12	0.12	0.06	4	Wild	Wild

表 5 鶏糞と鶏肉由来 *S. Infantis* 株における耐性出現頻度の比較

由来	株名	出現頻度($\times 10^{-9}$)	
		2MIC(0.12)	4MIC (0.25)
ATCC	ATCC51741	2.7	<0.45
鶏糞	24-PLS-34	4.3	<0.20
	24-PLS-200	8.1	<0.13
	24-PLS-40	11	2.3
	24-PLS-169	3.2	0.45
	24-PLS-170	0.71	<0.24
	24-PLS-171	23	7.5
	平均	8.39	-
鶏肉	2ヲM1	0.76	<0.25
	7ヲM 1	13	<0.66
	10ヲS1	0.88	<0.88
	24A98	9.3	<0.17
	25A73	7.5	<0.26
	平均	6.29	-

表 6 2MIC 濃度での耐性出現頻度における供試株の血清型別耐性出現頻度の比較

血清型	株 No.	由来	出現頻度($\times 10^{-9}$)				
			実験 1	実験 2	実験 3	平均	SD
Infantis	24-PLS-34	鶏糞	4.3	5.2	1.3	3.6	2.0
	24-PLS-200	鶏糞	8.1	1.4	1.6	3.7	3.8
	24-PLS-40	鶏糞	11	2.5	5	6.2	4.4
	24-PLS-169	鶏糞	3.2	<0.67	0.7	2.0	1.8
	24-PLS-170	鶏糞	0.71	6.4	14	7.0	6.7
	24-PLS-171	鶏糞	23	40	4.7	22.6	17.7
	24A98	鶏肉	9.3	9	6.6	8.3	1.5
	25A73	鶏肉	7.5	11	11	9.8	2.0
平均						7.9	6.5
Schwarzengrund	24-PLS-83	鶏糞	0.58	110	1.6	37.4	62.9
	24-PLS-202	鶏糞	2.4	10	47	19.8	23.9
	22A253	鶏肉	6.8	4.7	3.2	4.9	1.8
	23A58	鶏肉	5.5	16	6.7	9.4	5.7
	25A72	鶏肉	3.5	5.3	4.5	4.4	0.9
	25A76	鶏肉	1.7	9.9	9.1	6.9	4.5
	25A89	鶏肉	23	6.8	29	19.6	11.5
平均						14.6	11.9
Manhattan	22A225	鶏肉	11	21	6.7	12.9	7.3
	22A341	鶏肉	38	14	8	20.0	15.9
	23A61	鶏肉	14	18	17	16.3	2.1
	23A70	鶏肉	3	14	22	13.0	9.5
平均						15.6	3.4

表 7 4MIC 濃度での耐性出現頻度試験における供試株の血清型別耐性出現頻度の比較

血清型	株 No.	由来	出現頻度($\times 10^{-9}$)				SD
			実験 1	実験 2	実験 3	平均	
Infantis	24-PLS-34	鶏糞	<0.20	0.8	0.42	0.6	0.3
	24-PLS-200	鶏糞	<0.13	0.34	<0.32	0.3	-
	24-PLS-40	鶏糞	2.3	<0.36	<0.26	2.3	-
	24-PLS-169	鶏糞	0.45	<0.67	<0.35	0.5	-
	24-PLS-170	鶏糞	<0.24	<0.53	0.82	0.8	-
	24-PLS-171	鶏糞	7.5	7.3	<0.34	7.4	0.1
	24A98	鶏肉	<0.17	<1.0	<1.6	-	-
	25A73	鶏肉	<0.26	1.8	0.81	1.3	0.7
			平均			1.9	2.5
Schwarzengrund	24-PLS-83	鶏糞	<0.06	8.5	<0.54	8.5	-
	24-PLS-202	鶏糞	0.14	0.94	15	5.4	8.4
	22A253	鶏肉	<0.08	0.72	0.8	0.8	0.1
	23A58	鶏肉	0.07	1	<0.45	0.5	0.7
	25A72	鶏肉	<0.51	0.81	<0.50	0.8	-
	25A76	鶏肉	<0.42	0.6	0.48	0.5	0.1
	25A89	鶏肉	5.1	1.2	<0.63	3.2	2.8
			平均			2.8	3.1
Manhattan	22A225	鶏肉	2.8	<0.34	0.61	1.7	1.5
	22A341	鶏肉	0.13	0.47	<4.0	0.3	0.2
	23A61	鶏肉	<0.55	3.2	<0.85	3.2	-
	23A70	鶏肉	0.42	<0.56	11	5.7	7.5
			平均			2.7	2.3

-: 算出不可

表 8 薬剤含有培地で分離した変異株の MIC 及び GyrA のキノロン耐性決定領域の変異

	親株	株名	MIC (mg/L)								GyrA	
			CPFX	LVFX	GFLX	TFLX	NFLX	OFLX	ERFX	NA	83 (TCC)	87 (GAC)
Infantis	24-PLS-34	24-PLS-34-1	0.25	0.5	0.5	0.25	2	1	1	>512	Wild	AAC
		24-PLS-34-2	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	0.5	512	Wild	TAC
		24-PLS-34-3	0.5	1	0.5	0.25	0.5	1	1	>512	TTC	Wild
	24-PLS-40	24-PLS-40-1	0.5	1	0.5	0.12	0.5	0.5	1	>512	TTC	Wild
		24-PLS-40-2	0.5	1	1	0.25	0.5	0.5	0.5	>512	TTC	Wild
	24-PLS-169	24-PLS-169-1	0.5	0.5	0.5	0.25	2	1	1	>512	TAC	Wild
		24-PLS-169-2	0.5	1	0.25	0.12	2	2	1	>512	TAC	Wild
	24-PLS-170	24-PLS-170-1	0.25	0.5	0.25	0.12	1	1	0.5	256	Wild	TAC
		24-PLS-170-2	0.25	0.03	0.03	0.12	1	1	0.5	256	Wild	TAC
	24-PLS-171	24-PLS-171-1	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	1	0.5	512	TTC	Wild
		24-PLS-171-2	0.5	0.5	0.5	0.25	2	2	1	512	TTC	Wild
	24-PLS-200	24-PLS-200-2	0.5	0.5	0.5	0.25	2	1	0.03	512	TTC	Wild
		24-PLS-200-3	0.5	0.5	0.5	0.06	0.06	0.06	0.06	512	TTC	Wild
	24A98	24A98-1	0.25	0.5	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	GGC
		24A98-2	0.25	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	GGC
	25A73	25A73-1	0.5	0.5	0.5	0.25	2	1	1	>512	TAC	Wild
		25A73-2	0.25	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	512	Wild	TAC
	22A253	22A253-1	0.25	0.5	0.25	0.25	1	1	0.5	512	Wild	GGC
		22A253-2	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	1	>512	TTC	Wild
Schwarzengrund	24-PLS-83	24-PLS-83-2	0.5	0.5	0.5	0.25	1	1	1	>512	TAC	Wild
		24-PLS-83-3	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	GGC
	24-PLS-202	24-PLS-202-1	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	GGC
		24-PLS-202-2	0.25	0.5	0.25	0.25	1	0.5	0.5	512	Wild	TAC
		24-PLS-202-3	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	>512	Wild	GGC

Manhattan	23A58	23A58-1	0.12	0.25	0.12	0.12	2	0.5	0.5	256	Wild	Wild
		23A58-2	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	0.5	>512	TAC	Wild
	25A72	25A72-1	0.25	0.5	0.25	0.25	1	1	1	>512	TAC	Wild
		25A72-2	0.25	0.5	0.25	0.12	1	1	1	>512	TAC	Wild
	25A76	25A76-1	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	1	>512	TTC	Wild
		25A76-2	0.25	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	>512	Wild	AAC
	25A89	25A89-1	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	1	>512	TAC	Wild
		25A89-2	0.25	0.5	0.5	0.25	1	1	1	>512	TAC	Wild
	22A225	22A225-1	0.5	1	0.5	0.25	2	1	1	>512	TTC	Wild
		22A225-2	0.25	0.5	0.5	0.06	0.12	0.12	0.25	512	TTC	Wild
	22A341	22A341-1	0.12	0.25	0.5	0.06	0.12	0.12	0.25	16	Wild	Wild
		22A341-2	0.12	0.25	0.25	0.06	0.5	0.5	0.25	16	Wild	Wild
	23A61	23A61-1	0.25	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	>512	Wild	TAC
		23A61-2	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.5	256	Wild	TAC
	23A70	23A70-1	0.12	0.25	0.25	0.12	1	0.5	0.25	256	Wild	Wild
		23A70-2	0.12	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	256	Wild	Wild

表 9 *acrB* mRNA 発現量と変異株出現頻度（薬剤濃度 2MIC）

血清型	株 No.	相対発現量*				出現頻度($\times 10^{-9}$)
		1	2	3	平均	
Infantis	24-PLS-34	13.33	7.21	14.65	11.73	3.60
	24-PLS-40	10.79	7.75	12.60	10.38	6.17
	24-PLS-169	5.30	7.41	7.11	6.61	1.95
	24-PLS-170	8.53	10.01	11.70	10.08	7.04
	24-PLS-171	6.58	6.68	12.35	8.54	22.57
	24-PLS-200	13.80	8.11	14.27	12.06	3.70
	24A98	12.86	6.73	9.59	9.72	8.30
	25A73	9.03	13.50	15.45	12.66	9.83
	平均	10.03	8.43	12.21	10.22	7.89
Swarzengrund	24-PLS-83	11.87	16.17	11.84	13.29	37.39
	24-PLS-202	14.62	9.80	9.15	11.19	19.80
	22A253	9.21	9.60	13.59	10.80	4.90
	23A58	10.40	7.26	13.54	10.40	9.40
	25A72	11.40	11.89	14.90	12.73	4.43
	25A76	3.96	11.56	15.35	10.29	6.90
	25A89	10.26	8.76	14.89	11.30	19.60
	平均	10.24	10.72	13.32	11.43	14.63
Manhattan	22A225	11.37	10.56	15.23	12.39	12.90
	22A341	7.91	8.24	7.66	7.93	20.00
	23A61	13.03	14.40	9.90	12.44	16.33
	23A70	10.39	15.10	14.60	13.36	13.00
	平均	10.67	12.07	11.85	11.53	15.56

*16s rRNA 発現量に対する *acrB* mRNA 発現量として算出

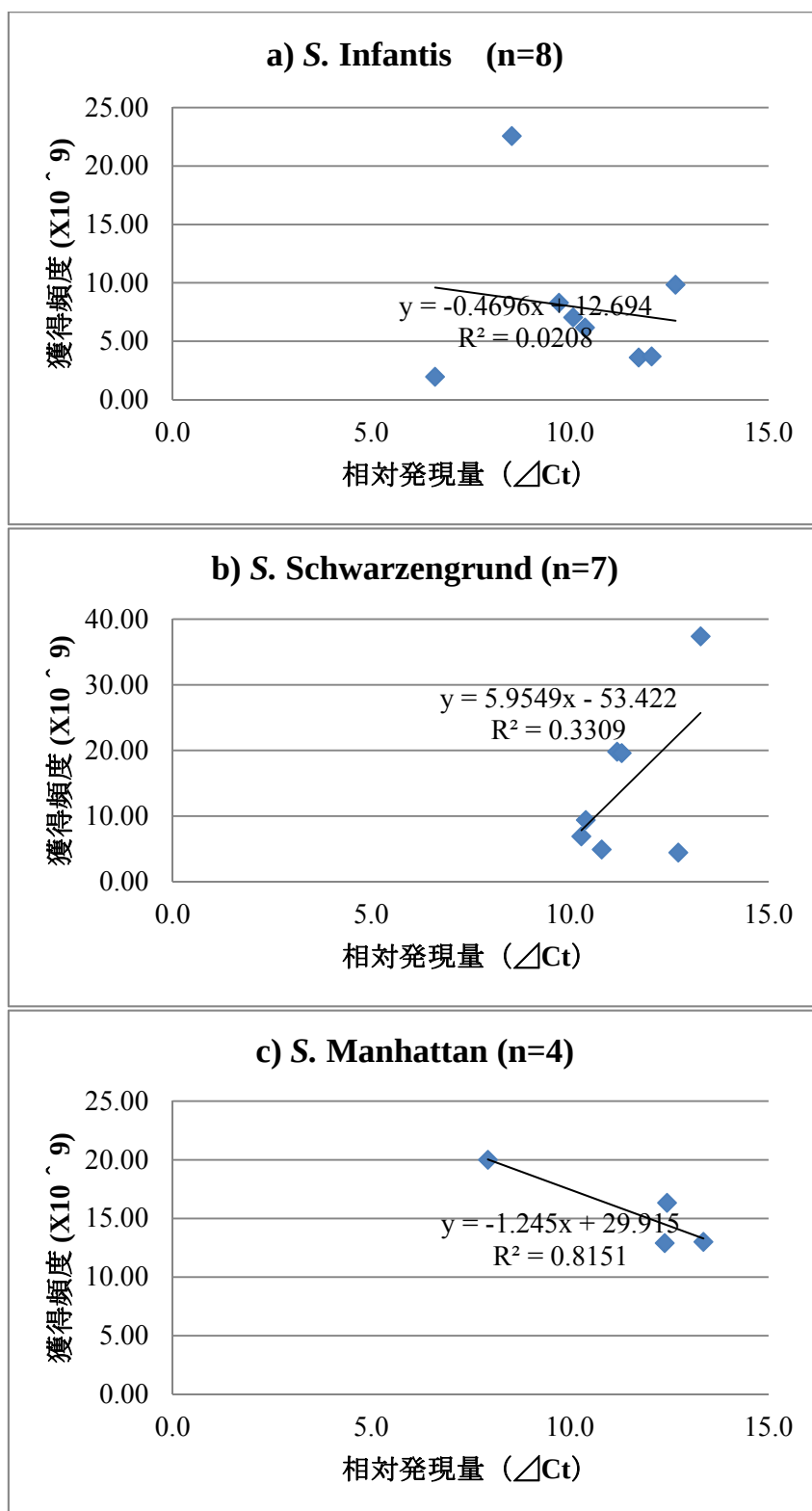


図1 耐性出現頻度と arcB の発現量の各血清型別比較
a) Infantis; b) Schwarzengrund; c) Manhattan

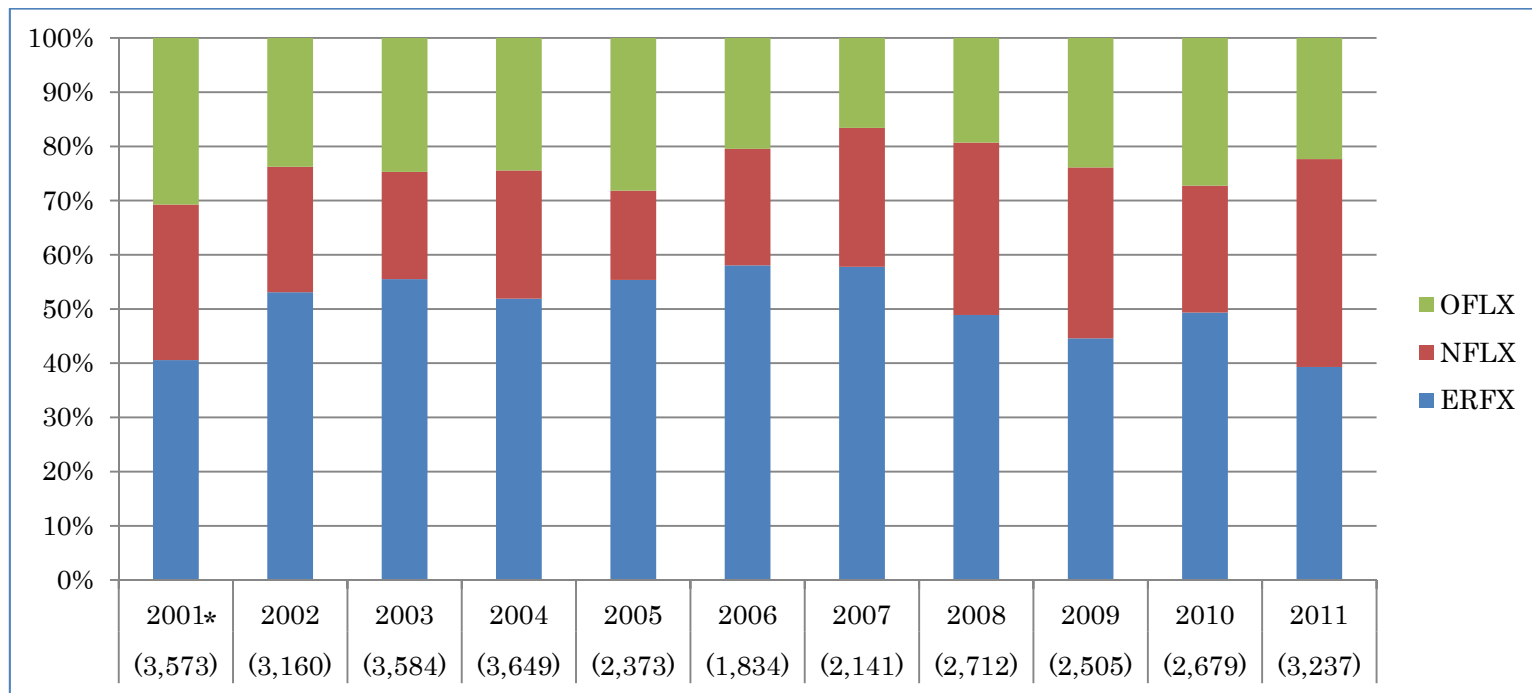


図2 鶏用フルオロキノロン系抗菌性物質の推定原体販売量の比率

*年（合計量、単位：kg）

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康評価モデルの確立（課題番号：1305）平成25年～26年度食品安全確保推進研究事業

分担課題名：鶏およびヒトから分離された *Campylobacter* 属菌のキノロン系抗菌薬耐性に関する分子疫学的検討

研究分担者 石井 良和（東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座）
大西 健児（東京都立墨東病院 感染症科）
角田 隆文（東京都保健医療公社荏原病院 感染症内科）
協力研究者 青木弘太郎（東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座）

研究要旨

牛および鶏用エンロフロキサシン製剤が承認、使用開始されて以来、ブロイラー（肉鶏）由来のフルオロキノロン系薬耐性 *Campylobacter* 属菌が問題となっている。本検討では、2012年から2014年の間に都内の3医療施設で臨床分離された115株および農場のブロイラーから分離された84株の *Campylobacter* 属菌について、キノロン耐性株の頻度、GyrA Thr-86-Ile 変異の有無、耐性機序およびクローナリティの検討を行なった。gyrB 全長塩基配列を用いた菌種同定の結果、供試菌株の *Campylobacter* 属菌に占める *C. jejuni* の割合は、臨床およびブロイラー分離株においてそれぞれ 95.7%および 94.0%であった。臨床分離 *Campylobacter jejuni* はシプロフロキサシン（CPF）に対して 43.6%が耐性を示した。臨床およびブロイラー分離 *C. jejuni* は、GyrA Thr-86-Ile 変異をそれぞれ 40.0%および 53.2%の株が有していた。いずれの分離株でも Clonal complex (CC) 21 に属する菌株が最も優勢（31.8%および 25.3%）であり、その他の優勢なクローンの頻度も共通していたことから、臨床およびブロイラー分離株の分子疫学的な関連が示唆された。さらに、臨床分離株において CC21 および CC48 に属菌株の CPF 耐性率が高く、特定のクローンが高率に CPF 耐性を示す傾向が示唆された。

A. 研究目的

我が国において *Campylobacter* 属菌による食中毒発生件数は 1998 以降、毎年 400～600 件発生しており、最も重要な食中毒病因物質の一つとなっている。*Campylobacter* 属菌は鶏をは

じめ、牛、豚などの健常家畜の腸管内に生息しているが、鶏肉は流通過程で腸内容物によって汚染されてしまう。冷蔵輸送技術の発達により、多量の生菌が付着した鶏肉が食卓に上るようになり、*Campylobacter* 属菌による食

中毒のリスクは高まっている。

近年、食品由来耐性菌によるヒト医療への影響が世界的に議論されている。*Campylobacter* 属菌感染症では、重症度および宿主免疫能によって抗菌薬治療が必要となる場合があるが、フルオロキノロン系薬耐性株が増加しており、家禽に使用されている抗菌薬が問題となっている。我が国において動物用フルオロキノロン系薬は1991年11月に牛および鶏用のエンロフロキサシン製剤が承認されて以来、現在までにオフロキサシン、オルビフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ノルフロキサシンおよびマルボフロキサシンの7製剤が動物の細菌感染症（肺炎と下痢）の治療に使用されている。ブロイラー（肉鶏）由来の *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性株は増加傾向にあり、2009年から2011年にかけて30%近い耐性率推移している（http://www.maff.go.jp/nval/english/pdf/jvarm2000_2007_final_201005.pdf、その他 JVARM データ）。

我が国において、臨床検体およびブロイラー検体より共通したクローンの *C. jejuni* が高率に分離され、そのうちフルオロキノロンキノロンに耐性を示す特徴のあるクローンも報告された。今回、都内の医療施設での分離株および鶏肉およびブロイラーの農場から分離された菌株の関連性およびキノロン系薬に耐性を示す菌株の頻度を明らかにするべく、クローナリティの解析およびキノロン耐性決

定領域（QRDRs）、具体的には Thr-86-Ile の変異の有無(1)、臨床分離株については薬剤感受性試験も合わせて検討した。

B. 研究方法

2012年から2014年の間に都内3医療施設において分離された *Campylobacter* 属菌115株および農場のブロイラーから分離された84株の計199を供試した。

薬剤感受性試験は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の推奨法に準拠し、フローゼンプレート‘栄研’（栄研化学）を用いてシプロフロキサシン（CPFX）、レボフロキサシン（LVFX）、ガチフロキサシン（GFLX）、トスフロキサシン（TFLX）、ノルフロキサシン（NFLX）、オフロキサシン（OFLX）、エンロフロキサシン（ERFX）およびナリジクス酸（NA）の8種のキノロン系薬の最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。

全供試菌株のDNAを抽出し、次世代DNAシーケンサー（MiSeq, イルミナ社）を用いてドラフトゲノム解読を実施した。ドラフトゲノム塩基配列より、*gyrB* 全長塩基配列（2,310bp）による菌種同定、Web ツール MLST1.7 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) を用いた Multilocus sequence typing (MLST)、ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) を用いた獲得性の薬剤耐性遺伝子網羅的検索、および GyrA の QRDRs の変異

解析を行なった。

C. 研究結果

1. 臨床分離株

臨床分離株の *Campylobacter* 属菌に占める *C. jejuni* の割合は 95.7% (115 株中 110 株) であった。*C. jejuni* 以外の菌株は *C. coli* と同定された。*C. jejuni* と *C. coli* の *gyrB* の配列は互いに 90% 未満の相同性であった。以降は、*C. jejuni* についてのみの集計を示した。

C. jejuni 110 株における各種キノロン系薬の MIC 範囲、MIC₅₀ および MIC₉₀ を (表 1) に示した。唯一、CLSI でブレイクポイントが定められているフルオロキノロン系薬の CPFX に耐性 (MIC $\geq 4 \mu\text{g/mL}$) を示した菌株は 42.7% (47/110 株) であった。

各 Clonal Complex (CC, ある ST に属する菌株を共通の祖先とした時の集団) に属する菌株の分布を (図 1) に示した。CC21 に属する菌株が 31.8% (35 株) を占めており、優勢なクローンであった。次いで、割合の高い順に CC464 (7.3%), CC354 (5.5%), CC443 (5.5%), および CC48 (3.6%) であり、上記 CC に属する菌株で半数以上を占めていた。Unknown ST であった 15 株のうち、14 株についてはアリル番号の組合せが新規であるため ST が決定できず、1 株については 7 アリル中、1 アリルの配列が新規であったため ST が決定出来なかった。

フルオロキノロン系薬および NA のいずれの耐性にも寄与する GyrA のス

レオニン (Thr) -86-イソロイシン (Ile) の変異を 40% (44/110 株) の菌株が有していた (表 2)。Thr-86-Ile の変異を有し、CPFX に耐性を示す菌株が 63.6% (28/44 株)、当該変異を有しておらず CPFX に耐性を示す菌株が 40.4% (19/66 株) 存在した (表 2)。優勢な CC (CC21, CC464, CC354, CC443 および CC48) 別における CPFX に対して耐性を示した菌株は、CC21 では 34 株中 23 株、CC48 では 4 株中 3 株であったのに対し、その他の CC では属する菌株数の半数以下であった (表 3)。同様に、CC 別の GyrA Thr-86-Ile の変異の所有菌株数は、CC21 では 34 株中 17 株、CC354 では 6 株中 4 株および CC48 では 4 株中 2 株で、その他の CC では属する菌株数の半数以下であった。

2. ブロイラー分離株

ブロイラー分離株の *Campylobacter* 属菌に占める *C. jejuni* の割合は 94.0% (84 株中 79 株) であった。臨床分離株と同様に *C. jejuni* 以外の菌株は *C. coli* と同定された。以下は *C. jejuni* についてのみの集計を示した。

各 CC に属する菌株の頻度を (図 2) に示した。CC21 に属する菌株が 25.3% (20 株) を占めており、臨床分離株と同様に優勢なクローンであった。次いで、割合の高い順に CC443 (15.2%) および CC464 (11.4%) であり、上記 CC に属する菌株で半数以上を占めていた。Unknown ST であった 12 株のうち、7 株についてはアリル番号の組合せが新

規であるため ST が決定できず、4 株については 7 アリル中、1 アリルないし 2 アリルの配列が新規であったため S T が決定出来なかった。

GyrA の Thr-86-Ile の変異を 53.2%(42/79 株)が有していた(表 2)。

D. 考察

JVARM における平成 25 年の調査結果 (http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/pdf/25jvarm.pdf)によると、ブロイラー由来の *Campylobacter* 属菌の CPFX に対する耐性率は 17.9%(10/56 株)であった。一方、本研究の臨床分離株における *C. jejuni* の CPFX に対する耐性率は 43.6%(48/110 株)であり、ブロイラー由来の菌株に比較して非常に高率であった(表 2)。また、臨床分離株において、GyrA Thr-86-Ile の変異を有している菌株のうち CPFX 耐性を示した菌株は 63.6%に留まった(表 2)。こういった菌株はキノロン耐性に寄与する CmeABC efflux pump (2)の欠損などの薬剤排出機構が破綻している可能性が示唆されたが、今後、当該箇所のドラフトゲノム解析および発現量の解析が必要であると考えられる。一方、GyrA Thr-86-Ile の変異を持たない菌株のうち 28.9%が CPFX 耐性を示した(表 2)。この菌株は CmeABC の発現が亢進している可能性が示唆された。

臨床分離株およびブロイラー分離株においてのいずれも優勢なクローンは CC21 であり、順序は異なるものの、

CC464, CC354, CC443 および CC48 に属する菌株も高率に分離されていることから、ブロイラー由来の菌株が鶏肉を介してヒトに感染症を引き起こしていることが強く示唆される結果であった。さらに、臨床分離された CC21 に属する菌株は、67.6%(23/34 株)が CPFX に対して耐性を示した。また CC48 に属する菌株も 4 株中 3 株が CPFX 耐性を示した。しかしながら、CC464, CC354 および CC443 に属する菌株は CPFX 耐性を示す菌株がごくわずかであり、特定のクローンが高率に CPFX 耐性を示す傾向が示された(表 3)。

E. 結論

本研究課題では、ブロイラー分離株および臨床分離株の *C. jejuni* における MLST 解析の結果、分子疫学的な関連があることが示された。また、特定のクローンがフルオロキノロン系薬に高率に耐性を示す可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

〈口頭発表〉

なし

〈紙上発表〉

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 引用文献

1. Griggs DJ, Johnson MM, Frost JA, Humphrey T, Jørgensen F, Piddock LJV. 2005. Incidence and mechanism of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* spp. isolated from commercial poultry flocks in the United Kingdom before, during, and after fluoroquinolone treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:699-707.
2. Lin J, Michel LO, Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:2124-2131.

表1. *C. jejuni* 臨床分離株における各種キノロン系薬の
薬剤感受性試験成績

薬剤	MIC Range	(ng/mL)	
		MIC ₅₀	MIC ₉₀
CPFX	≤0.015->32	0.25	32
LVFX	0.06-32	0.25	8
GFLX	0.06-16	0.25	4
TFLX	≤0.015-16	0.06	8
NFLX	0.25->32	1	>32
OFLX	0.12->32	0.5	16
ERFX	0.06->32	0.12	8
NA	2-256	8	256

表2. GyrA変異有無別のCPFXに対する*C. jejuni*の感受性

	臨床分離株			ブロイラー分離株		
	CPFX感性- 非感性株 (%)	CPFX 耐性株 (%)	計	CPFX感性- 非感性株 (%)	CPFX 耐性株 (%)	計
GyrA Thr-86-Ile 変異あり	16 (36.3%)	28 (63.6%)	44	NA	NA	42
GyrA Thr-86-Ile 変異なし	47 (71.2%)	19 (28.8%)	66	NA	NA	37
計	63 (57.3%)	47 (42.7%)	110			79

NA:薬剤感受性試験未実施のため

表3. 優勢なCC別の分離菌株数、CPFX耐性菌株数およびGyrA変異保有菌株数

	臨床分離株			ブロイラー分離株		
	菌株数	CPFX耐性株	GyrA Thr-86-Ile 変異所有株	菌株数	CPFX耐性株	GyrA Thr-86-Ile 変異所有株
CC21	34	23	17	20	NA	6
CC464	8	1	2	9	NA	9
CC354	6	0	4	3	NA	2
CC443	6	1	1	12	NA	2
CC48	4	3	2	5	NA	3

NA:薬剤感受性試験未実施のため

図1. *C. jejuni* 臨床分離株のCC分布 (n=110)

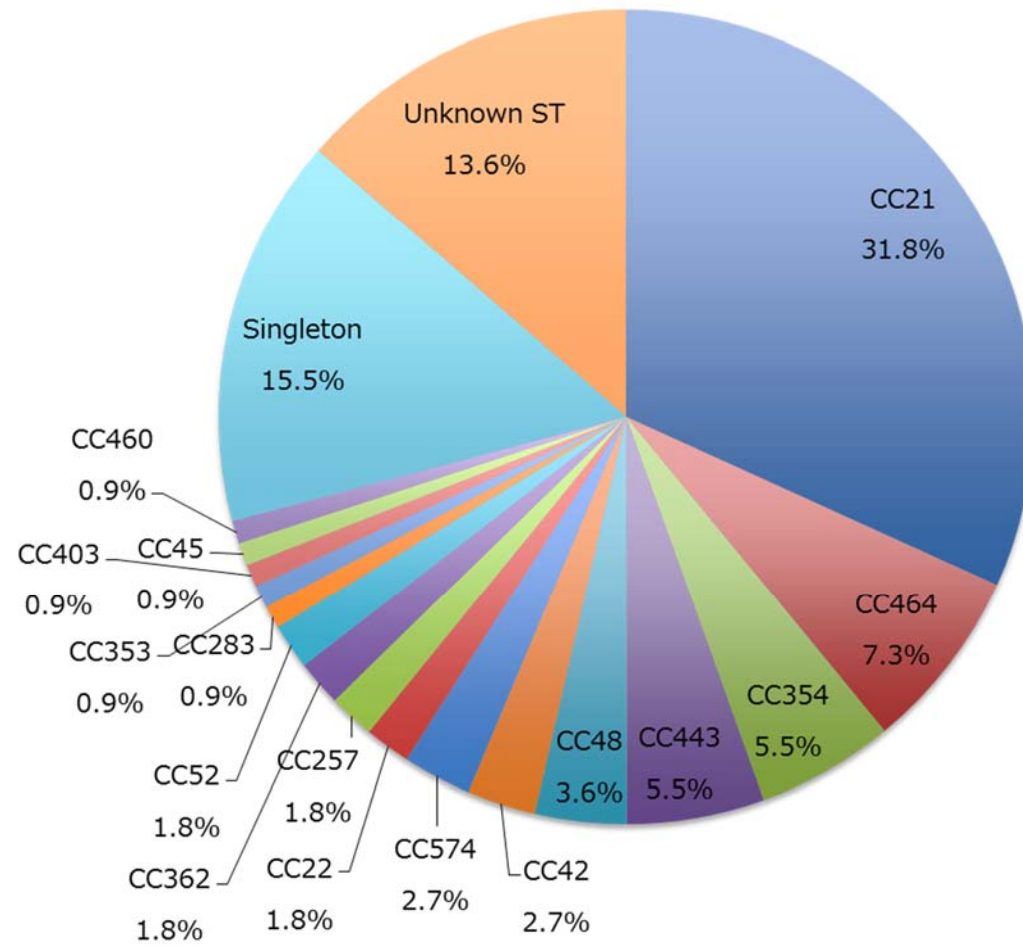
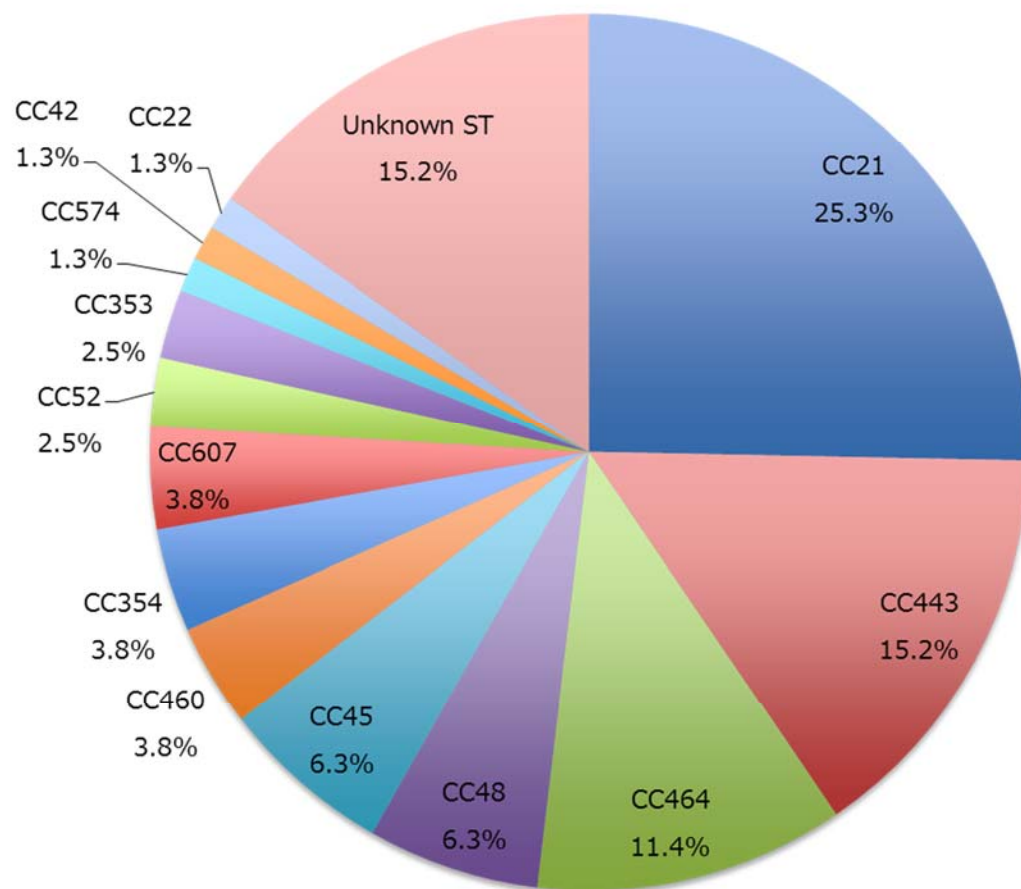


図2. *C. jejuni* ブロイラー分離株のCC分布 (n=79)



食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立(課題番号:1305) (生物学
関連分野 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究)

リスク評価班報告書 (要旨)

A. 研究目的

現在、食品安全委員会は、OIEのガイドラインを参考に「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針」(2004年)を制定し、定性的なリスク評価を行っている。しかし、Codex委員会により2011年に制定された耐性菌に係るリスク分析ガイドラインでは、定量的なリスク評価の必要性が言及され、将来的には科学的データに基づく定量的リスク評価が求められている。

本研究のリスク評価班では、食品安全委員会により「きわめて高度に重要」とランク付けされているフルオロキノロン剤(以下「FQ剤」という。)、農場及び生産物の食中毒菌による汚染が深刻な肉用鶏、そして鶏用フルオロキノロン剤のリスク評価でハザードとして特定されたカンピロバクターを対象として、発生、ばく露及び影響評価のステッププロセスを用い、本研究実験班が作成したデータ及びJVARM等国内のデータを入力し、定量的リスク評価モデルを作成することを目的とした。

B. 研究方法

鶏にフルオロキノロン系抗菌性物質を使用した場合に選択される薬剤耐性菌の発生・ばく露・影響評価に関する公表情報の収集は、公表されている学術論文等の収集と選定、レビューにより行った(山口大学、酪農学園大学、(株)三菱総合研究所、エム・アール・アイリサーチアソシエイツ(株))。

EFSA、FDA等における定量的リスク評価モデルの収集、分析及び検証は、(1)公表されている定量的リスク評価モデルのレビュー、(2)それらを踏まえた定量的リスク評価モデルの確立、(3)(1)、(2)の過程により得られた知見等に基づく定量的リスク評価指針の作成に必要な情報の収集により行った。(山口大学、酪農学園大学、(株)三菱総合研究所、エム・アール・アイリサーチアソシエイツ(株))。

C. 研究結果及び考察

1. 発生評価モデルに使用できる耐性メカニズム及びデータについては Piddock (1999), Engberg ら (2001) Kinga Wieczorek と Jacek Osek(2013) 等の学術論文の情報及び本研究班実験班のデータにもとづき、GyrA の Thr86Ile 変異の有無の割合、efflux pump の発現量の高低の割合をモデルに組み込んだ。
2. ばく露評価については、平成 20～22 年度に食品安全委員会の研究事業「定量的リスク評価の有効な実践と活用のための数理解析技術の開発に関する研究(主任研究者:春日

文字)」において、鶏肉調理における *Campylobacter* の交差汚染の定性的・定量的評価が実施されているため、この研究で用いられているばく露段階のデータを収集・整理し、データ更新が必要なものについては最新のデータを収集した。

3. 諸外国の定量的リスク評価モデル、発生評価のメカニズムを基にして、我が国の耐性機構や株間の耐性出現頻度の差等のデータを入力パラメータとして、オリジナルの定量的リスク評価のためのプロトタイプモデル（スプレッドシート）を作成した。
4. 影響評価においては、FQ 剤耐性 *Campylobacter* による症状の長期化、入院率の増加、致死率の増加といった健康に対する悪影響を示唆するデータを我が国で見つけることができなかったため、一人あたりのブロイラーの喫食により FQ 耐性 *Campylobacter* 年間感染回数を推定するにとどめた。
5. 定量的リスク評価モデルによる発生段階の試算の結果の平均値は、*Campylobacter* 感染鶏数に占める感受性菌感染鶏数の割合が約 66.0%、FQ 剤耐性菌感染鶏数の割合が約 34.0%となった。さらに、耐性菌感染鶏数の割合の内訳は、GyrA の Thr86Ile 変異以外の耐性菌の感染鶏数の割合が 2.8%、GyrA の Thr86Ile 変異ありで efflux pump の発現量が高い耐性菌の割合は約 10.4%、低い耐性菌の割合は約 20.8%となった。
6. ばく露・発生段階について「一人あたりの年間感染回数」を試算した結果、0 回が最も多く、平均は年約 1.02 回、最大値は 88 回という結果となった。最大値である 88 回感染した人において、そのうちの約 58 回は感受性菌への感染で、約 30 回が耐性菌への感染になること想定される。また、耐性菌に感染した場合、30 回のうち約 2 回が GyrA の Thr86Ile 変異以外耐性菌への感染で、残りの 28 回が GyrA の Thr86Ile 変異の耐性菌への感染と推定された。
7. 今回構築した定量的リスク評価モデルにより、農場出荷時の耐性機構別の耐性菌感染鶏の大まかな割合を把握することができた。一方で、今回のモデルでは FQ 剤の使用による影響を詳細に把握することまでには至らなかった。今回のモデルでは、FQ 剤使用の場合の出現率に本研究班で得られた実験データを用いている。JVARM のデータに比べると、実験データによる薬剤耐性菌の出現率は非常に低いいため、シナリオ解析において、年間のブロイラー生産サイクルにおける薬剤の使用頻度を高く設定しても、薬剤耐性菌の割合はほとんど変わらないという結果となった。今後、農場における過去の FQ 剤の使用歴のデータを入手できれば、薬剤使用による影響をより現実的に把握できると考えられる。また、FQ 剤の過去の販売量などから過去の FQ 剤の使用歴を推定してモデルに反映することでモデルを精緻化することも考えられる。今回構築した確率論的定量的リスク評価モデルは、*C.jejuni* だけでなく *C.coli* にも対応可能であるため、豚などにおけるリスク評価に適用できる可能性もある。
8. 現在の Dose Response model ではすべての株が同じ感染性であるという仮定のもとに作成されているが、ヒト臨床株において CC21 が多いことから、仮に特定の株がヒトに急性胃腸炎をおこしやすいことがわかり、より詳しいことがわかれば、特定の遺伝子

型に対する用量反応関係を考えることができ、より正確な解析が可能になると考えられる。ただし、そのためにはばく露評価において、当該電子型の汚染率及び菌数データが必要となる。

9. 我が国の薬剤耐性定量的リスク評価に活用できるモデルの構成を通じて得られた知見をもとに、今後、確率論的、定量的薬剤耐性リスク評価を実施する際の指針に必要な情報を収集し、記載すべき事項を整理した（別紙）。その上で、薬剤耐性菌によるヒトへの健康影響に関する確率論的リスク評価指針骨子素案を作成した。

D. 結論

1. JVARM のデータや本研究班で得られたデータをベースに、新たに発生段階部分も確率論的定量的リスク評価モデルを構築した。
2. モデルによる試算の結果、*Campylobacter* 感染鶏に占める FQ 剤感染鶏の割合を、耐性菌の耐性機構別に推測することができた。
3. 本モデルでは、FQ 剤の使用による FQ 剤耐性菌感染鶏の割合への大きな影響は把握できなかった。
4. 今後、農場における過去の FQ 剤の使用歴のデータを入手することができれば、より実態に即した試算を行うことが可能と考えられる。また、FQ 剤の過去の販売量などから過去の FQ 剤の使用歴を推定してモデルに反映することでモデルを精緻化することも考えられる。
5. 今回構築した確率論的定量的リスク評価モデルは、*C.jejuni* だけでなく *C.coli* にも対応可能であるため、豚などにおけるリスク評価に適用できる可能性もある。
6. 確率論的定量的リスク評価モデルの構築を通して得られた知見を踏まえて、薬剤耐性菌によるヒトへの健康影響に関する確率論的リスク評価指針骨子素案を作成した。
7. 定量的食中毒リスク評価では、複数の段階を経てヒトの健康への影響を定量化するために、確率を乗じる考え方でモデル化が実施されている。モデルに加算を用いる場合もあるが、これは対象動物をその特性に応じてグループ分けし、グループごとに試算した結果を足し合わせる場合に用いるものである。薬剤耐性菌の定量的リスク評価においても、発生、ばく露、影響評価は、農場からヒトへの流れをモデル化しており、通常の定量的食中毒リスク評価と同様に、確率を乗じる考え方とすることが妥当である。上記の考え方は、半定量的リスク評価においても同様であり、質的評価マトリックスを使用するなど、確率を乗じる考え方を導入することが望ましい。

参考文献

1. Jørgen Engberg, Frank M. Aarestrup, Diane E. Taylor, Peter Gerner-Smidt, and Irving Nachamkin. Quinolone and Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance Mechanisms and Trends in Human Isolates. Emerging Infectious Diseases. Vol. 7(1), 24-31. 2001

2. Laura. V Piddock. Quinolone resistance and *Campylobacter*. Cline Microbial Infect; 5: 239-243.1999
3. KingaWieczorek and Jacek Osek. Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. BioMed Research International. Vol 2013, Article ID 340605, 12 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/340605>. (Accessed on 16 February 2015)

薬剤耐性菌によるヒトへの健康影響に関する

確率論的リスク評価指針骨子素案

1. 発生評価（Release assessment）

対象薬剤の使用により選択された耐性菌が農場からリリースされるリスクを評価する。

発生段階のアウトプット：

農場段階における対象薬剤の使用により選択された薬剤耐性菌を保有した動物の出荷頭数/羽数

1.1 内容

発生評価は以下のステップを想定して実施する。

- Step0：動物が評価対象である病原微生物に感染、または保菌している。
- Step1：対象薬剤が対象動物に対し使用される。
- Step2：対象薬剤に対する耐性菌がバックグラウンドレベル（※）を超えて選択される。
- Step3：対象薬剤に対する耐性を有する対象病原体が農場からリリースされる。

※バックグラウンドレベルは、薬剤未使用の農場における耐性菌の出現率とする。

1.2. 必要なデータの種類と収集方法

リスク評価にあたり必要とされるデータには、以下に示すものが含まれる。

- 農場段階での対象動物における対象病原微生物の汚染率
農場単位よりも、対象動物群や建物単位で把握できることが望ましい。
- 農場段階での対象動物に対する対象薬剤の使用率
数か月間など限られた期間での使用歴だけでなく、過去の使用歴に関するデータを収集することが望ましい。
- 対象薬剤の使用歴がない農場における耐性菌の割合
この数値をバックグラウンドレベルとする。
- 農場段階での対象動物に対する対象薬剤の使用に伴う耐性菌の出現率

- 薬剤耐性獲得メカニズムに関するデータ（遺伝子変異パターンごとの耐性獲得頻度および MIC 値）
薬剤耐性獲得メカニズムの違いが耐性獲得頻度や耐性の強さに影響する場合には、耐性獲得メカニズムを考慮することが望ましい。
- ある期間中に農場から出荷される動物の頭数/羽数

1.3 データの選別方針

データの使用に当たっては、以下の点について留意し、必要に応じてデータの選別を行う。特に耐性菌については、薬剤の使用と耐性菌選択の関係が明らかとなるようなデータを選定することが重要である。

- 科学的妥当性のある精度と信頼性が確保されていること
- 評価の目的と整合が取れていること
- データの透明性が確保されていること
- データの変動性と不確実性が説明されていること

2. ばく露評価（Exposure Assessment）

ヒトが薬剤耐性菌を保有した動物由来の食品を喫食するリスクを評価する。

ばく露評価は、食品安全委員会「食品により媒介される微生物に関する食品健康影響評価指針（暫定版）」の「4.1.2 ばく露評価（Exposure Assessment）」に準じて行う。

ただし、対象ハザードは薬剤耐性を有する病原微生物となるので、耐性を有することにより食品や環境中での生残において、感受性菌と異なる挙動を示す可能性がある場合には注意が必要である。

ばく露段階のアウトプット：

薬剤耐性菌に汚染された対象食品を介し、ヒトがばく露される確率

3. 影響評価（Consequence assessment）：

薬剤耐性菌へのばく露されることにより起こり得るヒトの健康上の結果及びヒト用抗菌性物質の医療における重要性を考慮して、治療効果が減弱あるいは喪失する可能性及びその程度を推定する。

影響段階のアウトプット：

ある期間中に、薬剤耐性を有する病原体によって引き起こされた食中毒患者に対して対象薬剤投与による治療が行われた結果、薬剤の効果が得られないことによって症状が長引く、あるいは重症化するなどの健康被害が生じる確率

3.1 内容

影響評価は以下のステップを想定して実施する。

- Step1：ヒトが対象薬剤耐性の病原体に汚染された食品の喫食により疾病に罹患する。
- Step2：薬剤耐性菌に罹患した患者が対象薬剤による治療を受ける。
- Step3：期待される治療効果が得られないことにより症状が長引く、あるいは重症化するなどの健康被害が生じる。

3.2 必要なデータの種類と収集方法

- （耐性の有無に関わらず）対象病原体による食中毒患者の受診率
- 受療患者のうち、耐性菌及び農場（食品）由来の耐性菌に感染した患者の割合
- 受療患者に対する対象薬剤の処方量（投与量）、投与のタイミング及び服薬期間
- 受療患者の予後に関する情報（治癒までの期間、重症度、後遺症の有無等）

4. 実施の手順

実施の手順は、「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する 評価指針」の「第2 リスク評価」に準ずる。

5. データの取り扱い

データの取り扱いは、「食品により媒介される微生物に関する食品健康影響評価指針（暫定版）」の「4.1.6 データの取り扱い」に準ずる。

平成 25-26 年度 食品健康影響評価技術研究

「Ⅱ 生物学関連分野 1 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究」

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立

分担研究報告書

分担課題名：①鶏にフルオロキノロン系抗菌性物質を使用した場合に選択される薬剤耐性菌の発生・ばく露・影響評価に関する情報の作成及び収集

(1) 公表情報の収集

分担研究者：豊福 肇 山口大学共同獣医学部病態制御学講座

分担研究者：蒔田 浩平 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医学ユニット

分担研究者：大橋 毅夫 (株) 三菱総合研究所

研究要旨

食用動物への抗菌性物質の使用による薬剤耐性菌選択の人への健康リスクは重要であるが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施されていない。本研究は、すでに公表されている外国で実施された定量的薬剤耐性リスク評価から、我が国のリスク評価に活用できるモデル構成、インプット、特に発生評価及び影響評価モデルに使用できる耐性メカニズム及びデータを収集した。

A. 研究目的

食用動物への抗菌性物質の使用により選択された薬剤耐性菌による人への健康リスクは非常に重要な公衆衛生上の懸念であり、欧米では定量的リスク評価の取り組みが始まっているが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施されていない。

本分担研究では、我が国で公衆衛生上重要なブロイラー中の *Campylobacter* と、その飼育中に使用され薬剤耐性が問題であるフルオロキノロン系薬剤（以下「FQ」という。）の使用による人への健康リスクに焦点を当て、定量的評価を行うため、諸外国で実施された、定量的リスク評価をレビューし、モデルの設計、構造、データのインプット及

びアウトプット等についてレビューし、発生評価及び影響評価モデルに使用できる耐性メカニズム及びデータを収集することを目的とした。

B. 研究方法

Pubmed により、microbial resistance, risk assessment を検索用語に用いて見つけたリスク評価のうち、*Campylobacter* と FQ の組合せのモデルをレビューした。

また、Piddock (1999), Engberg ら (2001) Kinga Wiczorek と Jacek Osek (2013) 等の学術論文から、発生評価モデルに使用できる耐性メカニズム及びデータを収集した。

C. 研究結果

C.1 耐性による健康への悪影響

米国ミネソタ州ではSmithらが(1999年)キノロン耐性 *C. jejuni* に感染した患者の下痢の持続期間は平均10日で、感受性 *C. jejuni* に感染した患者のそれ(平均7日)より長いと報告をしている。IFT FoundationによるReview(2006年)で引用されているMaranoら(2000年)も同様の報告をしており、FQ耐性菌による下痢の持続期間が平均8日だったのに対し、感受性菌のそれは6日と報告している。

米国のFoodnetの調査ではFQ耐性 *Campylobacter*による下痢の持続期間は12日対し、感受性菌の場合のそれは6日であるが、その違いは医療の失敗ではないとしている。

一方、オーストラリアのUnicombら(2006)は耐性菌と感受性菌で観察された下痢の持続期間に差はなかったと報告している。

Piddock(1999)のレビューで引用されているGaunt(私信)が1998年に行った小規模な後向き研究によると、1997年にFQ耐性 *Campylobacter*による胃腸炎に罹った39名の患者のうち、1名が耐性菌が検出される10日前に、ciprofloxacin感受性の *Campylobacter*の治療のためにciprofloxacinの投与を受けており、また別の1名はタイで購入したnorfloxacinを自ら服用していた。別の7人は糞便検体をラボに提出後ciprofloxacinを投与され、そのうち1名は治療10日後に明確な微生物学的に治療の不成功が認められたとしている。

なお、下記のFDAによるリスク評価で引用されているCDC Nina Marano博士によ

る私信によると *Campylobacter* 症例対照研究によると、耐性か否かによる下痢の持続期間の違いの平均は2日と報告されている。

C.2 耐性メカニズム

FQ耐性 *C. jejuni*は高頻度にDNA gyrase (gyrA)のサブユニットをコードしている遺伝子に突然変異がみられ、ごくまれにtopoisomerase IV (parC)をコードしている遺伝子に突然変異がみられる。*C. jejuni* gyrA 遺伝子のクローニングとシークエンシングにより、gyrAの突然変異はThr-86, Asp-90及びAla-70の位置が原因と分かってきた。Thr-86の位置の突然変異はAsp-90やAla-70に比べ、高いレベルのナリジキ酸及びciprofloxacinに対する耐性と関係があるとされる。Kinga WieczorekとJacek Osek(2013)はgyrA遺伝子のC257Tの変化によるThr86→Ileの置換が最も頻繁にみられる獲得機構としている。gyrA Thr-86及びtopoisomerase IV サブユニットparCのArg-139突然変異の2か所変異している *C. jejuni*はより高いciprofloxacinに対する耐性を示す。

また、種々のefflux pumpのうち、CmeABCのみが *Campylobacter*の耐性システムとして特定されている。

C.3 先行薬剤耐性評価モデルレビュー

本研究でターゲットとしたFQ耐性 *Campylobacter* リスク評価についてのみここに記載する。米国FDA(2000年)による鶏肉中のFQ耐性 *Campylobacter*によるヒトの健康影響を評価したモデルは影響評価のみを対象として確率論的リスク評価モデル

を構築していた。複雑さを避けるため、発生評価・ばく露評価をモデルには含めていなかった。確率論的リスク評価モデルの構築には@Riskを活用しており、スプレッドシートが公表されていた。モデルの一部のセクションで耐性の有無による治療期間を考慮しているが、FQ耐性と感受性*Campylobacter*によるヒトの下痢症の持続期間の違いをモデルに組み込むほど強固なデータはないとしている。

S. Hurdら(2010年)による牛呼吸器病の治療のためのFQ剤の利用がヒトの健康に与える影響を評価するリスク評価においては、発生評価、ばく露評価、影響評価のそれぞれの段階について、確率論的リスク評価モデルを構築していた。確率論的リスク評価モデルの構築には@Riskを活用しているが、スプレッドシートは公表されていなかった。発生段階としては、次の3ステップから：

N1: 20 か月齢未満の牛に Enrofloxacin が用いられたか

N2: バックグラウンドレベルを超えて FQ に対する耐性ができたか

N3: FQ-耐性病原体が農場からリリースされたか

発生段階のアウトプットとしては：出荷時に牛が enrofloxacin の使用により、FQ耐性の病原体を牛が保有する確率としていた。

影響評価のアウトプットとして、耐性による治療期間の長期間化を設定している。

Anderson, S.A.ら(2001)による生牛肉と牛ひき肉由来のフルオノキノロン耐性*Campylobacter*による公衆衛生のリスクを評価するリスク評価では、ハザードの特定、

ばく露評価、用量反応関係、影響評価、のそれぞれの段階について、確率論的リスク評価モデルを構築しているが、発生評価の詳細はなかった。また、用いたソフトやスプレッドシートは公表されていない。

アウトプットとして、FQの使用年と耐性率の変化、治療を求める患者、入院患者及び死者のうち耐性菌によるものの比率を設定している。

D. 考察

本報告書を記載している時点で、我が国の臨床現場においてFQ耐性*Campylobacter*による急性胃腸炎の治療において、治療の失敗、症状持続時間の継続、入院率や致死率の増加のような現象の報告はない。公表されている文献情報から諸外国で実施されたリスク評価と同じようなエンドポイントを用いることができるかと考えていたが、本研究の一部として実施した医療現場での積極的な追跡調査によりデータを積み重ねないかぎり、耐性菌に罹患したことによる健康影響を見ることは難しいと考えられた。

耐性メカニズムとしては種々報告されている中で、データがあればThr86Ileの変異とefflux pumpに焦点を絞り発生段階評価モデルに組み込めるかと考える。今回評価の対象としたリスク評価モデルにおいて、この部分をモデルに組み込んだ事例はなかった。

しかし、FQ剤が使用されていない農場由来の動物から分離された*Campylobacter*のFQ耐性株をどう考えるかが依然として課題として残った。

E. 結論

1. 論文の整理結果を踏まえると、今回も目的のためにそのまま使える定量的リスク評価モデルは認められなかったが、参考となる論文はいくつか見られた。

2. 治療期間の長期化データを用いている論文の元データは、全て米国の CDC サーベイのデータであり、我が国に導入するには検討が必要であると考えられた。

3. 上記より、ある論文のモデルをベースにカスタムするのではなく、モデル構築から進めるアプローチを試み、まずは食品安全委員会のリスク評価書ベースで全体モデルを作成することとした。

4. 有識者や臨床医にヒアリングを行った結果、臨床の現場で取得できるデータからは、薬剤耐性の有無による症状や治癒効果の違いを把握することが困難であることが分かった。

5. 従って、評価の endpoint として、治療の失敗または完治までの時間の延長、あるいは入院率の増加という指標を用いることはデータ不足から断念し、ブロイラー中の *Campylobacter* 患者のうち、x %が薬剤耐性菌であるかを end point とすることにした。

6. 発生段階モデルについては、本研究班メンバーの研究成果及び JVARM のデータを可能なかぎり活用し、最初からモデルを構築することとした。

F. 研究発表

論文発表

Y. Sasaki, M. Haruna, T. Mori, M. Kusukawa, M. Murakami, Y. Tsujiyama, K. Ito, H. Toyofuku, Y. Yamada.

Quantitative estimation of *Campylobacter* cross-contamination in carcasses and chicken products at an abattoir. Food Control. 43 (2014) 10-17.

学会発表

1. 豊福肇、蒔田浩平、大橋毅夫、柿沼美智留、長田侑子、黄色大悲：ブロイラーのフルオロキノロン耐性 *Campylobacter* 定量的リスク評価の試み、第 7 回日本カンピロバクター研究会、2014 年 12 月 11 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

参考文献

1. Smith KE, Besser JM, Hedberg C W, Leano FT, Bender JB, Wicklund JH, et al. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. N.Engl J Med 1999;340:1525-32.
2. United States Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. The human health impact of fluoroquinolone resistant *Campylobacter* attributed to the consumption of chicken. 2000. accessed at www.fda.gov/ohrms=dockets=98fr=bkg0002.pdf, accessed May 19, 2014.
3. Kinga Wieczorek and Jacek Osek. Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. BioMed Research International. Vol 2013, A

- article ID 340605, 12 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/340605>.
 (Accessed on 16 February 2015)
4. H. Scott Hurd, Michael B. Vaughn, Derald Holtkamp, James Dickson, and Lorin Warnick. Quantitative Risk from Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella* and *Campylobacter* Due to Treatment of Dairy Heifers with Enrofloxacin for Bovine Respiratory Disease. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*. 7(11),13-5-22. 2010
 5. S.A. Anderson, R.W. Yeaton Woo, L.M. Crawford. Risk assessment of the impact on human health of resistant *Campylobacter jejuni* from Fluoroquinolone use in beef cattle. *Food Control* 12 (2001) 13-25
 6. L. V. Piddock. Quinolone resistance and *Campylobacter*. *Clin Microbiol Infect*; 5: 239-243.1999
 7. Unicom LE, Ferguson J, Stafford RJ, Ashbolt R, Kirk MD, Becker NG, Patel MS, Gilbert GL, Valcanis M, Micken L. 2006. Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. *Clin Infect Dis* 42:1368–74.
 8. IFT Foundation. Antimicrobial Resistance Implications for the Food System. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*. Vol. 5, 71-137. 2006.

平成 25-26 年度 食品健康影響評価技術研究

「Ⅱ 生物学関連分野 1 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究」

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立

分担研究報告書

分担課題名：①鶏にフルオロキノロン系抗菌性物質を使用した場合に選択される薬剤耐性菌の発生・ばく露・影響評価に関する情報の作成及び収集

(2) 薬剤耐性菌のヒトへの健康影響を評価するためのデータ収集方法の検討

分担研究者：大橋 毅夫 (株) 三菱総合研究所

分担研究者：豊福 肇 山口大学共同獣医学部病態制御学講座

分担研究者：長田 侑子 エム・アール・アイリサーチアソシエイツ (株)

分担研究者：大西 健児 東京都立墨東病院 感染症科

分担研究者：角田 隆文 公益財団法人東京都保健医療公社 荏原病院
感染症内科

分担研究者：石井 良和 東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座

研究協力者：柿沼 美智留 (株) 三菱総合研究所

研究要旨

薬剤耐性菌に関する定量的リスク評価モデルの開発において、流通から喫食段階でのモデル化を検討する場合には、薬剤耐性菌に汚染された鶏肉等の喫食や耐性菌による食中毒の発症状況、また患者の受療状況や重篤度、薬剤の治療効果等に関する定量的な国内情報が必要であるが、これらの情報は全国規模の統計としては整備されていないのが現状である。

そこで本分担研究では、薬剤耐性菌のヒトへの健康影響を評価するためのデータ収集方法の検討を行うことを目的として、薬剤耐性菌に感染した患者の健康影響や臨床データの実態に関して有識者へのヒアリングやアンケートを行った。さらに、ヒアリングやアンケート結果を踏まえ、本研究班で開発した定量的リスク評価モデルにこれらの臨床情報を組み込むための検討を行った。

ヒアリング調査の結果、臨床の現場で取得できるデータからは、薬剤耐性の有無による重症度の違いや治療の効果への影響（臨床症状の長期化など）等、モデルに活用できる定量情報の把握が困難であることが分かった。また、アンケート調査の結果から、カンピロバクター症患者の受療状況、受療前後の喫食状況や症状の様子、服薬状況等を把握することが出来、鶏肉の生食以外の喫食からも発症していること、渡航者の発症も多いこと、腹痛・下痢・発熱といった症状は平均 3 日～5 日間現れることなどが明らかとなった。

ヒアリングやアンケート結果を踏まえ、耐性菌による患者への影響を用いた定量的リス

ク評価を行うために収集すべき情報やその要点について考察した。

A. 研究目的

薬剤耐性菌に関する定量的リスク評価モデルの開発は、農場段階、流通～喫食段階、喫食後～発症段階に分けて検討するが、流通から喫食段階でのモデル化を検討する場合には、薬剤耐性菌に汚染された鶏肉等の喫食、食中毒の発症、受療状況、重篤度、及び薬剤の効果に関する定量的な国内情報が必要である。しかし、これらの情報は全国規模の統計としては未整備であることから、情報の入手可能性や活用可能性について検討する必要がある。

そこで、本分担研究では、薬剤耐性菌のヒトへの健康影響を評価するためのデータ収集方法の検討を行うことを目的として、フルオロキノロン耐性カンピロバクター等の薬剤耐性菌に感染した患者の健康影響に関する有識者へのヒアリングやアンケートを行った。

B. 研究方法

1.臨床現場における処方状況の把握

医療機関の臨床医に対してヒアリングを行い、臨床現場における食中毒患者の動向、診察や処方の実態、影響評価を行うためのデータの入手可能性に関する情報収集を行った。

2.臨床現場における食中毒患者の受療行動および感染実態に関する調査

食中毒症患者の受診後の服薬状況や回復状況の実態把握を目的として、「カンピロバクター感染症やサルモネラ感染症が疑われる患者様の受診後の服薬状況と回復状況に関するアンケート調査」一式を作成し、公益

財団法人東京都保健医療公社荏原病院、東京都立墨東病院への来院患者及び当該患者を診察した医師に対するアンケート調査票を作成し、配布した。

さらに、東京都立墨東病院にて実施したアンケート調査票の集計および分析を行い、診療記録から得られる治療期間や、耐性遺伝子の種類及び選択数と治療期間との関係について検討を行った。

3.リスク評価モデルへの組み込みの検討

1 及び 2 の結果を踏まえ、リスク評価モデルへの組み込みの検討を行った。

C. 研究結果

1.臨床現場における処方状況の把握

有識者や臨床医にヒアリングを行った結果、臨床の現場で取得できるデータからは、薬剤耐性の有無による治療の効果（臨床症状の長期化など）の違いを把握することが困難であることが分かった。

その主な理由として、臨床現場では各医師が自身の経験・知見にもとづき薬剤を選択しているのが現状であり、薬剤の使用状況や効果を定量的に把握することが困難であるということ、また多くの患者は再診しないためいつ症状が治癒したのかを把握できないことが挙げられた。その他、食中毒症患者に対する具体的な臨床現場の処方状況について、以下のような指摘があった。

- ・ 来院のタイミングが食中毒の有症苦情でありこの時点では確定診断を行わないケースが多い。問診や症状からは判断することになる。

- ・カンピロバクター症およびサルモネラ症患者には、小腸炎特有の症状（吐き気）があるため、この症状と問診から総合的に判断している。
- ・カンピロバクター症への治療時の第一選択薬として、アメリカ感染症学会のマニュアルではキノロン系薬剤の使用を推奨しているが、国内では、統一されていない。カンピロバクターの中にキノロン耐性菌がいる可能性も高いため、カンピロバクター症が疑われる場合は、マクロライド系薬剤を選択することがある。
- ・食中毒症は自然治癒が多いため、患者の体力や重症度によって投薬しない判断をすることがある。
- ・入院加療を伴う場合もあるが、患者の希望や病床の状況にも左右される。
- ・初診にて診察・処方後、再診しないこともある。患者統計は取得しているが、薬剤の使用状況や治療効果までは正確に把握していない。
- ・一般的な医療費としては、外来のみで 5,000 円程度（便培養検査料、抗菌薬処方料が主）、入院した場合は 50,000 円程度（DPC 病名の細菌性腸炎は包括払いで 2,500 点/日）。入院中は水と電解質の点滴投与のみの経過観察で翌日退院というケースが多い）である。

2. アンケート調査票の作成

ヒアリング調査結果から、現状では国内の薬剤の使用状況や効果を定量的に把握することが困難であることがわかった。そこで、医療機関に協力を依頼し、食中毒症状により来院した患者にアンケートを渡し、その後の転帰について記載してもらう形式による追跡調査を行うこととした。

臨床医の助言を得て、「カンピロバクター感染症やサルモネラ感染症が疑われる患者様の受診後の服薬状況と回復状況に関するアンケート調査」一式を作成した。調査票は患者向けのアンケートと、医師向けアンケートの 2 種類からなる。患者向け調査票では、主な症状（来院前から治癒の自己判断まで）、発症 1 週間前までの喫食状況および渡航状況、処方薬の服用状況、再診の受診状況に関する設問を設定した。医師向け調査票では、受診日、診断名、来院時に認められた症状、問診時に聴取した患者の喫食歴、処方薬（薬剤名・処方量、抗菌薬とそれ以外に分けて記載）、細菌検査結果、備考に関する自由記述欄を設定した。

調査は平成 26 年 7 月から平成 26 年 12 月までとし、公益財団法人東京都保健医療公社荏原病院、東京都立墨東病院への来院患者及び当該患者を診察した医師に対するアンケート調査票を作成し、任意で配布した。アンケート調査の概要を図 1 に示す。

3. アンケート調査結果の集計・分析

東京都立墨東病院の来院患者向けに実施したアンケート調査では、受診者 25 名に対し調査票を配布し、12 名から回答が得られた（回収率 48%）。主な結果を図 2 から図 7 に示す。

主な自覚症状として腹痛、下痢、発熱のいずれかまたは複数症状を訴えるものがほとんどであった。これら症状の継続期間は 1 日から 6 日以上まで分布していたが、それぞれの平均期間は、腹痛（3.6 日）、下痢（4.9 日）、発熱（2.6 日）であった。受療タイミングの平均は、腹痛、下痢、発熱とも受療 2 日前であった。

症状が出るまでの 1 週間以内に喫食した

料理については、焼き鳥、鶏の唐揚げ、鶏レバーの順に多くなっていた。

12名の患者のうち、渡航者は5名であり、渡航先はベトナム、マレーシア、インド（2名）、ミャンマーであった。

処方された薬剤の服用状況については、12名中7名がすべての薬を指示通りに服用しており、4名が途中まで服用、1名が処方なしであった。

医師票からは受診者 25 名分のデータが得られた（表 1）。25 名中 6 名で抗菌薬（LVFX、TFLX、AMPC、CAM、AZM）が処方されていた。また、細菌検査の結果、25 名中 24 名からカンピロバクター（*C.coli*（1）、*C.jejuni*（11）、*Campyrobacter* sp.（12））が分離された。うち 1 名からはカンピロバクターの他、赤痢菌（*Shigella sonnei*）も分離された。また、患者から分離されたカンピロバクターのうち、レボフロキサシンに耐性を示した菌株は 5 株であった。患者アンケートに回答した 12 名中 1 名にレボフロキサシンが処方されていたが、当該患者から分離された *C.jejuni* はレボフロキサシン感受性菌であったため、耐性菌に対する抗菌剤治療の効果については評価できなかった。

D. 考察

ヒアリング調査結果及びアンケート調査結果を踏まえ、定量的リスク評価モデルへの組み込み可能性の検討を行った。

有識者および臨床医へのヒアリングの結果、定量的なリスク評価モデルの影響評価段階で活用可能な既存の統計データは存在しないこと、また臨床現場では各医師が自身の経験・知見にもとづき薬剤を選択して

いるのが現状であり、薬剤の使用状況や効果を定量的に把握することが困難であること、さらに多くの患者は再診しないためいつ症状が治癒したのかを把握できないことが明らかになった。定量的なリスク評価や評価結果の検証を行うためには、患者統計データが整備されていることが望ましい。国立感染症研究所内にて運用されている院内感染対策サーベイランス（JANIS）のような仕組みを活用した収集システムの開発が望まれる。

続いて実施したアンケート調査の結果から、食中毒症疑いによる患者の受療状況、受療前後の喫食状況や症状の様子、服薬状況等を把握することが出来た。その結果、鶏肉の生食以外の喫食からも発症していること、渡航者の発症も多いこと、腹痛・下痢・発熱といった症状は平均 3 日～5 日間現れることなどが明らかとなった。ただし、これらの調査データを日本全体の患者動向とみなすことは出来ないことや、7 割以上の患者で抗菌薬が処方されていなかったこと、今回患者から分離された耐性菌が鶏肉由来であるかが不明であることから、本研究班で開発した定量的リスク評価モデルへの組み込みは行わないこととなった。今後、定量的リスク評価モデルにより薬剤耐性菌のヒトへの健康影響を評価するためには、薬剤耐性菌感染経路の特定、投薬による治癒までの期間の差異、耐性菌感染による各症状の重篤化の可能性について把握することが課題である。この際、本分担研究で開発したアンケート調査票や集計方法が参考になると考えられる。

なお、感染症患者データについては米国 CDC のデータベースが参考になると思わ

れるが、米国と日本の受療環境の違いについても留意すべきであり、さらなる検討が必要と考えられる。例えば日本の医療はフリーアクセスであるため、米国よりも受診のタイミングが早い傾向があると思われる。今回のアンケート調査において、受療タイミングの平均は、腹痛、下痢、発熱とも受療2日前という結果であった。

また、臨床医の処方手順も、一定の考え方があるものの統一されたガイドラインはないことに留意する必要がある。さらに、日本と米国の使用薬剤の普及状況の違いも留意する必要がある。例えば、フルオロキノロンの種類が日本では米国よりも非常に多いと言われている。

本研究が目指す、薬剤耐性菌による患者への健康影響に関する定量的リスク評価を行うためには、患者から分離された薬剤耐性菌の由来が把握できること、及び耐性菌を有する患者の重篤度や治療効果への影響といった臨床データが把握できることが最も重要であると考えられる。これらの点がモデルに反映できれば、農場段階でのフルオロキノロン系薬剤の使用量変化に伴う臨床現場への影響をシミュレーションすることが可能となる。そのためには、本分担研究で考察した点に留意した上でのデータ整備が望まれる。

E. 結論

本分担研究では、薬剤耐性菌のヒトへの健康影響を評価するためのデータ収集方法の検討を行うことを目的として、薬剤耐性菌に感染した患者の健康影響や臨床データ

の実態に関する有識者へのヒアリングやアンケートを行った。

本分担研究により、薬剤耐性の有無による重症度の違いや治療の効果への影響（臨床症状の長期化など）等、モデルに活用できる定量情報の把握が困難であることが分かった。また、患者及び医師に対するアンケート調査を実施することで、食中毒患者の受療状況、受療前後の喫食状況や症状の様子、服薬状況等を把握することが出来、鶏肉の生食以外の喫食からも発症していること、渡航者の発症も多いこと、腹痛・下痢・発熱といった症状は平均3日～5日間現れることなどが明らかとなった。

今後、定量的リスク評価モデルにより薬剤耐性菌のヒトへの健康影響を評価するためには、さらなる臨床データの蓄積・整備が必要となるが、その際に本分担研究で作成したアンケート調査票や回収・集計方法が参考になると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 豊福肇、蒔田浩平、大橋毅夫、柿沼美智留、長田侑子、黄色大悲：ブロイラーのフルオロキノロン耐性 *Campylobacter* 定量的リスク評価の試み、第7回日本カンピロバクター研究会、2014年12月11日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

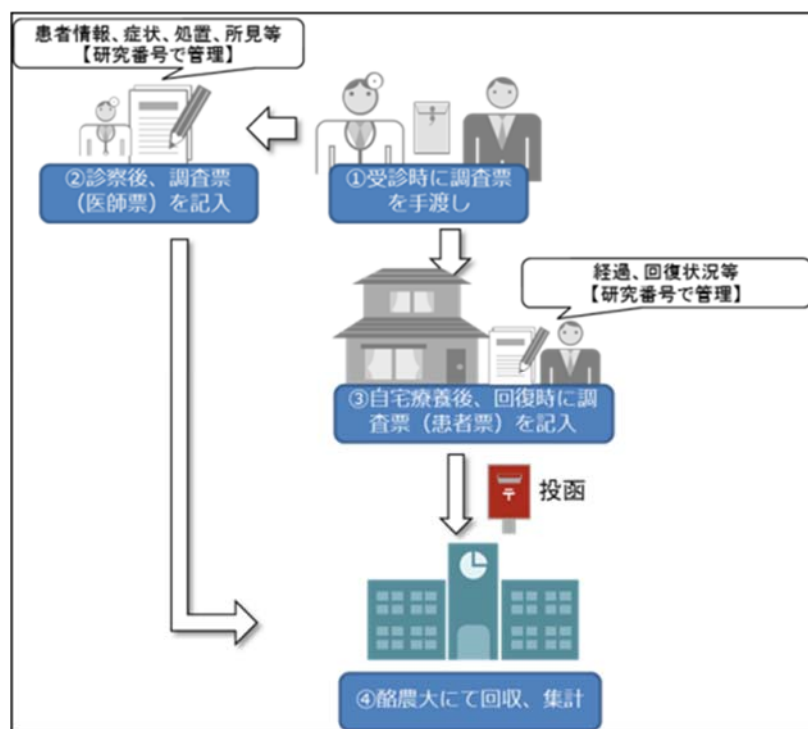


図 1 アンケート調査の概要

(医師記入欄)

カンピロバクター感染症やサルモネラ感染症が疑われる患者様の
受診後の服薬状況と回復状況に関するアンケート調査

.....

問1 どのような症状がありましたか。該当する症状について、症状が出始めた時期（○）と治まった時期（×）をそれぞれ記入してください。

	-3日	-2日	-1日	受診日	1日	2日	3日	4日	5日
	はじまり		(前日)		(翌日)		おわり		
記入例		○				×			
腹痛									
下痢									
発熱									
血便									
おう吐									
その他									

問2 症状が出るまでの1週間以内に、以下に挙げた食べ物を食べましたか。食べたもの全てに○をつけてください。

1. 焼き鳥	2. 鶏の唐揚げ	3. 鶏レバー
4. 北京ダック	5. ささみの刺身	6. 鶏わさ
7. 1～6以外の鶏肉料理（ ）		

問3 症状が出る直前（1週間以内）に海外にいましたか。海外にいた場合、滞在していた国名もお答えください。

1. 海外にいた → （国名： ）
2. 海外には行っていない

【裏面へつづきます】

問4 医師から処方された薬を指示どおり服用しましたか。ひとつに○をつけてください。

1. 全ての薬を指示通りに服用した	2. 途中で服用した
3. 服用しなかった	4. 薬は処方されなかった
5. わからない	

問5 受診後、再度診察を受けましたか。再度診察を受けた場合はその理由もお答えください。

1. 再度診察を受けた → 【理由】（あてはまるもの全てに○）
a. 症状が改善しなかったから
b. 症状が悪化したから
c. 再診予約となっていたから
d. その他（具体的に ）
2. 再度診察を受けなかった

■■■■質問は以上です。ご協力ありがとうございました。■■■■

図 2 アンケート調査票（患者向け）

(番号)

カンピロバクター感染症やサルモネラ感染症が疑われる患者様の
受診後の服薬状況と回復状況に関するアンケート調査

.....

受診日	2014 年 月 日 () 曜日
診断名	
来院時に認められた症状	
問診時に聴取した患者の喫食歴	
処方薬（薬剤名・処方量）	【抗菌薬】 【抗菌薬以外】
備考	

【細菌検査結果】

検体採取日	2014 年 月 日 () 曜日
検査日	2014 年 月 日 () 曜日
検査結果	

図 3 アンケート調査票（医師向け）

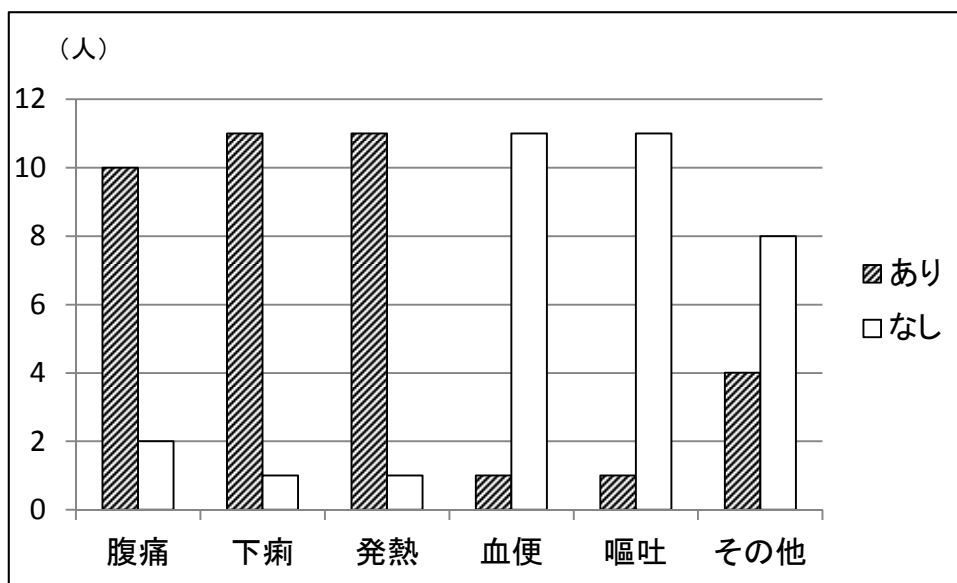


図 4 主な自覚症状 (N=12、複数回答)

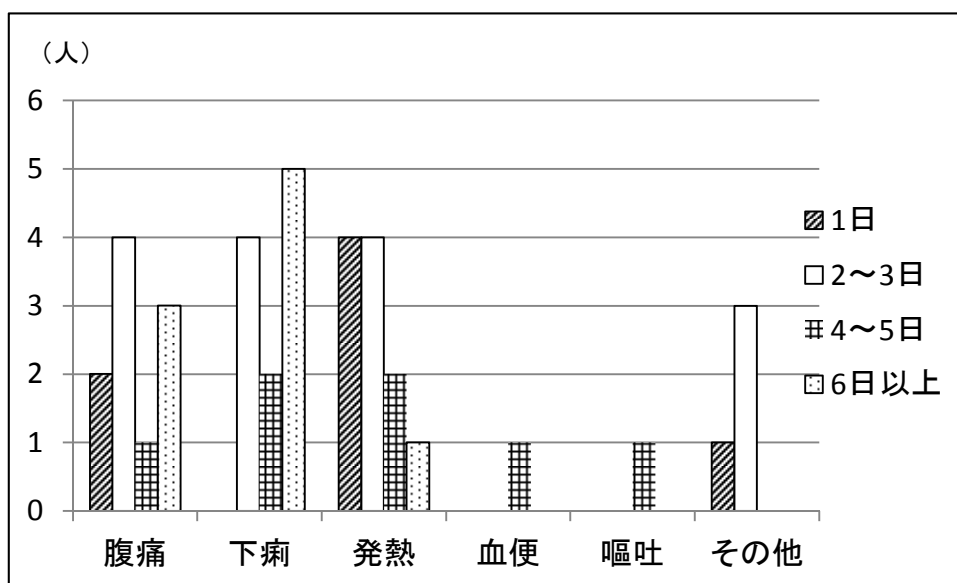


図 5 主な自覚症状の継続期間 (N=12、複数回答)

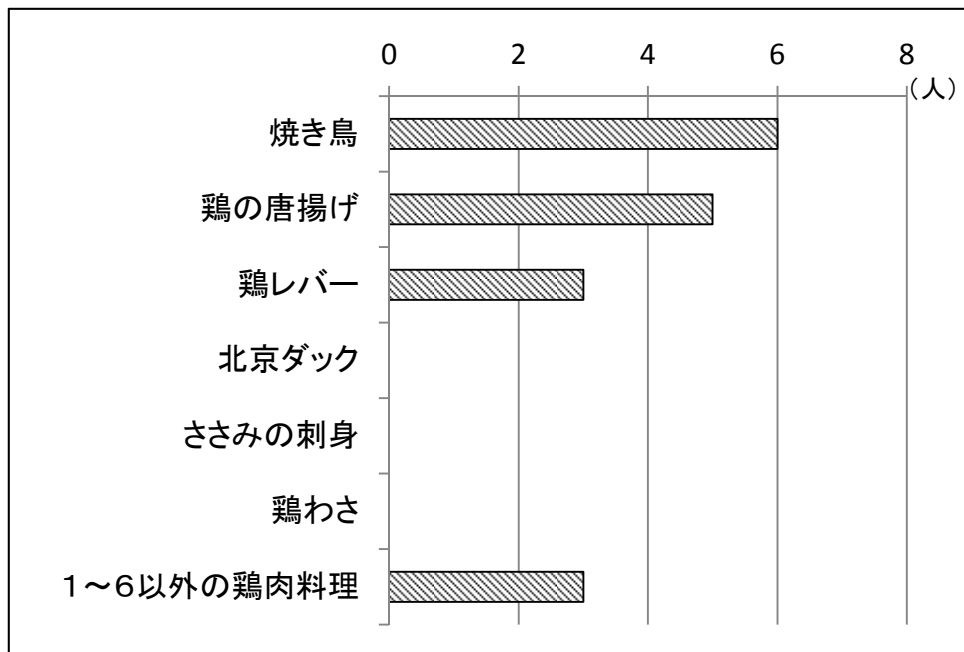


図 6 症状が出るまでの1週間以内に喫食した料理 (N=12、複数回答)

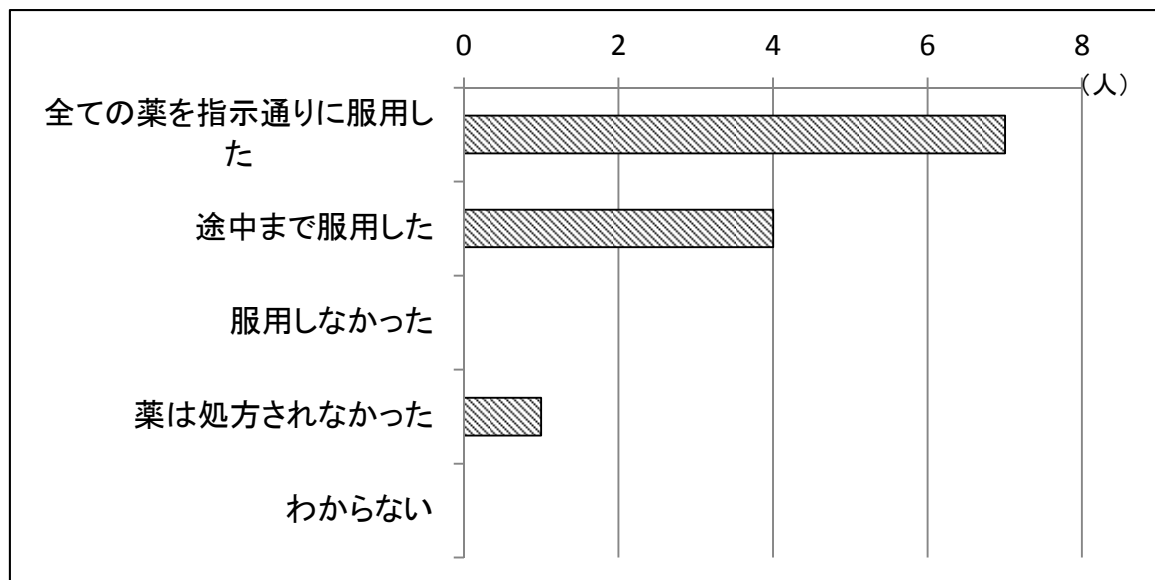


図 7 処方された薬剤の服用状況 (N=12)

表 1 細菌検査結果

No.	抗菌薬処方	細菌検査結果			MIC値							
		分離菌	感受性(S) ※	耐性(R) ※	CPFX	LVFX	GFLX	TFLX	NFLX	OFLX	ERFX	NA
1	なし	Campylobacter coli	CP	ABPC、GM、LVFX、EM、MINO、NA	>32	16	4	16	>32	32	16	128
2	なし	Campylobacter jejuni	GM、CP、LVFX、MINO	ABPC、EM、NA	16	8	4	8	32	16	8	128
3	なし	Campylobacter jejuni	EM、GM、MINO、CP、LVFX	ABPC、NS	0.25	0.25	0.12	0.03	1	0.5	0.06	8
4	なし	Campyrobacter sp.	EM、GM、MINO、CP、NA、LVFX	ABPC	0.25	0.25	0.12	0.03	1	0.5	0.06	8
5	LVFX	Campylobacter jejuni	EM、GM、MINO、CP、NA、LVFX	ABPC	0.06	0.12	0.06	0.06	0.5	0.5	0.06	4
6	なし	Campyrobacter sp.	—	—	0.12	0.06	0.06	0.03	0.25	0.25	0.06	4
7	TFLX 450mg/日5日分、 その後AMPC1500mg/日6 日分	Shigella sonnei, Campyrobacter sp.	—	—	16	8	4	8	32	16	8	128
8	なし	Campylobacter jejuni	ABPC、EM、GM、MINO、CP、LVFX	NA	8	8	4	4	16	16	4	32
9	なし	Campyrobacter sp.	ABPC、EM、GM、MINO、NA、LVFX	—	0.12	0.12	0.12	0.03	0.5	0.25	0.06	4
10	なし	Campylobacter jejuni	EM、GM、MINO、CP、LVFX	ABPC、NA	8	4	2	4	16	16	4	64
11	なし	Campyrobacter sp.	ABPC、EM、GM、MINO、CP、NA、LVFX	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	なし	Campyrobacter sp.	EM、GM、MINO、CP、NA、LVFX	ABPC	0.12	0.12	0.12	0.03	0.5	0.25	0.06	4
13	TFLX	Campyrobacter sp.	EM、GM、MINO、CP	ABPC、NA、LVFX	読み取り不能	8	8	4	16	16	8	64
14	なし	Campyrobacter sp.	EM、GM、MINO、CP	ABPC、NA、LVFX	0.12	4	4	4	32	16	4	32
15	なし	Campylobacter jejuni	ABPC、EM、GM、MINO、CP、LVFX	NA	8	4	2	4	16	8	8	64
16	なし	Salmonella O9	ABPC、PIPC、CTX、CFPM、CAZ、 CTRX、IPM、MINO、FOM、NA、LVFX、ST	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	なし	Campylobacter jejuni	ABPC、EM、GM、MINO、CP、NA、LVFX	—	0.12	0.12	0.12	0.03	0.5	0.25	0.12	4
18	CAM400mg/日、7/30から5 日間	Campyrobacter sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	なし	Campyrobacter sp.	—	—	0.12	0.12	0.06	0.03	0.5	0.25	0.06	2
20	なし	Campylobacter jejuni	ABPC、EM、GM、MINO、CP、NA、LVFX	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	AZM	Campylobacter jejuni	ABPC、EM、GM、MINO、CP、LVFX	NA	2	4	2	4	16	8	4	128
22	LVFX	Campyrobacter sp.	EM、GM、MINO、CP	ABPC、NA、LVFX	16	32	16	8	32	>32	>32	128
23	なし	Campyrobacter sp.	ABPC、CP、EM、GM、MINO、NA、LVFX	—	0.06	0.06	0.06	<=0.015	0.25	0.25	0.06	4
24	なし	Campylobacter jejuni, P.shigelloides	GM、EM	ABPC、NA、MINO、LVFX	16	16	8	8	>32	>32	32	256
25	なし	Campylobacter jejuni	EM、GM、MINO、CP、NA、LVFX	ABPC	0.12	0.12	0.06	0.015	0.5	0.25	0.06	4

※薬剤感受性試験はディスク拡散法により実施。

平成 25-26 年度 食品健康影響評価技術研究

「Ⅱ 生物学関連分野 1 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究」

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立

分担研究報告書

分担課題名：②EFSA、FDA 等における定量的リスク評価モデルの収集、分析及び検証

(1) 情報の収集

分担研究者：豊福 肇 山口大学共同獣医学部病態制御学講座

分担研究者：蒔田 浩平 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医疫学ユニット

分担研究者：大橋 毅夫 (株)三菱総合研究所

研究要旨

食用動物への抗菌性物質の使用による薬剤耐性菌選択の人への健康リスクは重要であるが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施されていない。本研究は、すでに公表されている外国で実施された定量的薬剤耐性評価から、我が国のリスク評価に活用できるモデル構成、インプット、特に発生評価及び影響評価モデルに使用できる耐性メカニズム及びデータを収集した。

A. 研究目的

食用動物への抗菌性物質の使用による薬剤耐性菌選択の人への健康リスクは非常に重要であり、欧米では定量的リスク評価の取り組みが始まっているが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施されていない。

本分担研究では、我が国で公衆衛生上重要なブロイラー中のカンピロバクターと、その飼育中に使用され薬剤耐性が問題であるフルオロキノロン系薬剤の使用による人への健康リスクに焦点を当て、定量的評価を行うため、諸外国で実施された、定量的リスク評価をレビューし、モデルの設計、構造、データのインプット及びアウトプット等についてレビューし、我が国のモ

デル作成に活用できるか検討することを目的とした。

B. 研究方法

Pubmed により、microbial resistance, risk assessment を検索用語に用いて見つけた表 1 に示した定量的リスク評価モデルをレビューした。

これらの構造解析、各入力情報の整理及びデータソースの確認、並びに入力パラメータの確率分布の解析等を行った。必要に応じ、モデル作成者に対する直接面談等によるヒアリングを行い、定量的リスク評価モデルの詳細を調査した。その中で、我が国の定量的リスク評価モデルに利用可能なモデルを探し、我が国への適用にあつ

での課題の抽出及び不足データの洗い出しを行った。評価対象とする定量的モデルの選定基準は次のとおりとした。

ア. リスク評価の目的（リスク管理上の質問）が明確であること

イ. 評価モデルの構造が標準的で、Codex または OIE のリスク分析のガイドラインに一致しているか？

ウ. スプレッドシートが入手可能かまたは再現可能か？

エ. 我が国の定量的リスク評価モデルに有用なモデルであるか？

C. 研究結果

評価した結果の概要は表 1 にまとめた。また、そのうち、4 及び 5 のモデルについてはモデルの概要及びインプットについて表 2, 3 及び図 1 にまとめた。

すべてのリスク評価において、生産段階での薬剤の使用に伴うヒトの健康影響を評価する目的で行われていた。実施機関は米国 FDA2 件、EFSA1 件、他は大学等の研究機関が行ったものであった。

リスク評価の構成は OIE のガイドライン（リリース、ばく露、影響評価）またはコーデックスのリスク評価（ハザードの特定、ハザードの特性解析、ばく露評価、リスクの特性解析）の枠組みを用いていた。

発生段階において、薬剤耐性獲得メカニズムまで踏み込んだモデルを作成していた事例は認められなかった。

アウトプットとしては、データがある場合には対象食中毒菌による食中毒のリスク及び感染後の症状の長期化、治療期間の延長を用いられていた。

影響評価のパラメータとして No.3（S.

Hurd と S. Malladi（2008）の論文ではタイにいた米兵で FQ 耐性カンピロバクターに感染した 16 人中 5 名で下痢の長期化が報告された事例及び ciprofloxacin 耐性菌で患者 13 名中 1 名で下痢の長期化が報告されたという報告から、beta 分布（7, 24）を適用し、平均として 22%を用いていた。一方、No.5 の論文ではヒトが fluoroquinolone で治療された時に症状が長く続く確率を 36%としていた。

D. 考察

今回レビューしたモデルの中で、そのまま使用できる形で、スプレッドシートを公開されているものは 1 事例だけであったが、そのまま使用できるものではなかったため、今後、独自にモデルを構築することにした。

E. 結論

1. 論文の整理結果を踏まえると、今回も目的のためにそのまま使える定量的リスク評価モデルは認められなかったが、参考となる論文はいくつか見られた。
2. 治療期間の長期化データを用いている論文の元データは、全て米国の CDC サーベイのデータであり、我が国に導入するには検討が必要であると考えられた。
3. 上記より、ある論文のモデルをベースにカスタムするのではなく、モデル構築から進めるアプローチを試み、まずは食品安全委員会のリスク評価書ベースで全体モデルを作成することとした。
4. 有識者や臨床医にヒアリングを行った結果、臨床の現場で取得できるデータからは、薬剤耐性の有無による症状や治癒効果

の違いを把握することが困難であることが分かった。

5. 従って、評価の endpoint として、治療の失敗または完治までの時間の延長、あるいは入院率の増加という指標を用いることはデータ不足から断念し、ブロイラー由来のカンピロバクター患者のうち、x % が薬剤耐性菌であるかを end point とすることにした。

6. 発生段階モデルについては、本研究班メンバーの研究成果及び JVARM のデータを可能なかぎり活用し、最初からモデルを構築することとした。

F. 研究発表

学会発表

1. 豊福肇、蒔田浩平、大橋毅夫、柿沼美智留、長田侑子、黄色大悲：ブロイラーのフルオロキノロン耐性 *Campylobacter* 定量的リスク評価の試み、第 7 回日本カンピロバクター研究会、2014 年 12 月 11 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 諸外国の薬剤耐性定量的リスク評価のレビュー結果

Criteria:

C1. リスク評価の目的（リスク管理上の質問）が明確であること

C2. 評価モデルの構造が標準的で、Codex または OIE のリスク分析のガイドラインに一致しているか？ Codex:C, OIE:O

C3. スプレッドシートが入手可能かまたは再現可能か？

C4. 我が国の定量的リスク評価モデルに有用なモデルであるか？

No	文献名	著者	C1	C2	C3	C4	対象菌・食品	論文概要
1	Risk Assessment on the Human Health Impact of Fluoroquinolone Resistant <i>Campylobacter</i> Associated with the Consumption of Chicken	FDA2000	Y	N	Y	N	フルオロキノロン耐性カンピロバクター/鶏肉	【リスク評価の目的】 鶏肉中のフルオロキノロン耐性カンピロバクターによるヒトの健康影響を評価 【モデル概要】 影響評価のみを対象として確率論的リスク評価モデルを構築している。複雑さを除くため、発生評価・ばく露評価をモデルには含めていない。確率論的リスク評価モデルの構築には@Risk を活用しており、スプレッドシートが公表されている。 モデルの一部のセクションで耐性の有無による治療期間を考慮している。
2	A human health risk assessment for macrolide-resistant <i>Campylobacter</i> associated with the use of macrolides in Danish pig production	L. Albanら (2008) Danish Meat Association	Y	C	N	N	マクロライド耐性カンピロバクター/豚肉	【リスク評価の目的】 抗生物質の消費量の削減、マクロライド耐性カンピロバクターの人感染リスク低減 【モデル概要】 ばく露評価段階（流通段階：豚と鶏における <i>Campylobacter</i> の汚染率と <i>Campylobacter</i> のうち、マクロライド耐性の割合）を対象として確率論的リスク評価モデルを構築している。発生評価、影響評価も実施しているが、これら決定論的定量的リスク評価に留まっている。 確率論的リスク評価モデルの構築には@Risk を活用しているが、スプレッドシートは公表されていない。 リリース、ばく露及び影響評価のアウトプットは3段階のレベル (High, Low, negligible) で評価している。

No	文献名	著者	C1	C2	C3	C4	対象菌・食品	論文概要
3	A Stochastic Assessment of the Public Health Risks of the Use of Macrolide Antibiotics in Food Animals	S. Hurd と S. Malladi (2008) オイオワ州立大	Y	O	N	Y	マクロライド耐性カンピロバクター/動物由来食品	【リスク評価の目的】 抗菌剤の利点を考慮して、有効な微生物リスクアセスメント・判断に資するモデルを考案する 【モデル概要】 発生評価、ばく露評価、影響評価のそれぞれの段階について、確率論的リスク評価モデルを構築している。但し、各評価は独立していて、関係付いてはいない。 アウトプットとして治療期間の長期化、下痢の長期化を設定している。
4	Human Health Risk Assessment of Penicillin/Aminopenicillin Resistance in Enterococci Due to Penicillin Use in Food Animals	Cox ら (2009)	Y	O	N	Y/N	ペニシリン耐性腸球菌/動物由来食品	【リスク評価の目的】 アンピシリン耐性腸球菌への感染患者数増加により、ヒトの健康に害を与える動物由来食品におけるペニシリンの継続的利用の可能性を定量化する。 【モデル概要】 影響評価を対象として定量的リスク評価モデルを構築している。（決定論的であり確率分布を用いたモデルではない） ICUにおける感染を対象としており、耐性による死亡率の上昇率をデータとして用いている。
5	Quantitative Risk from Fluoroquinolone-Resistant Salmonella and Campylobacter Due to Treatment of Dairy Heifers with Enrofloxacin for Bovine Respiratory Disease	S. Hurd ら (2010年)	Y	O	N	Y	フルオノキノロン耐性サルモネラ・カンピロバクター/牛肉	【リスク評価の目的】 牛呼吸器病の治療のためのフルオノキノロンの利用がヒトの健康に与える影響を評価する。 【モデル概要】 発生評価、ばく露評価、影響評価のそれぞれの段階について、確率論的リスク評価モデルを構築している。 確率論的リスク評価モデルの構築には@Risk を活用しているが、スプレッドシートは公表されていない。 アウトプットとして、耐性による治療期間の長期間化を設定している。（図1にモデルの概要を示した）

No	文献名	著者	C1	C2	C3	C4	対象菌・食品	論文概要
6	Risk Assessment of Streptogramin Resistance in Enterococcus faecium Attributable to the Use of Streptogramins in Animals	FDA (2004)	Y	O	N	Y/N	ストレプトマイシン耐性腸球菌／動物由来食品	【リスク評価の目的】 フェシウム菌感染症のシナリッドによる治療失敗が人に与えるリスクを評価するとともに、フェシウム菌の耐性株を含む食品摂取の結果としての耐性の獲得の可能性を評価する。 【モデル概要】 発生評価、ばく露評価、影響評価のそれぞれの段階について、確率論的リスク評価モデルを構築している。 確率論的リスク評価モデルの構築には Analytica を活用しているが、スプレッドシートは公表されていない。 アウトプットとして、耐性による治療期間の長期間化を設定している。
7	Risk assessment of the impact on human health of resistant Campylobacter jejuni from Fluoroquinolone use in beef cattle	Anderson, S.A. (2001)	Y	C	N	N	フルオノキノロン耐性カンピロバクター／牛肉	【リスク評価の目的】 生牛肉と牛ひき肉由来のフルオノキノロン耐性カンピロバクターによる公衆衛生のリスクを評価する。 【モデル概要】 ハザードの特定、ばく露評価、用量反応関係、影響評価、のそれぞれの段階について、確率論的リスク評価モデルを構築しているが発生評価の詳細はなかった。また、用いたソフトやスプレッドシートは公表されていない。 アウトプットとして、FQ の使用年と耐性率の変化、治療を求める患者、入院患者及び死者のうち耐性菌によるものの比率を設定している。
8	Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in animals and foods	EFSA (2010)	Y	C	N	N	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌／動物由来食品	【リスク評価の目的】 動物由来食品中の MRSA によるヒトの健康へのリスクを評価する。 【モデル概要】 ハザードの特定、ばく露評価、ハザードの特性解析、リスクの特性解析の4段階においてそれぞれ関連するデータを整理し取りまとめている。定量的リスク評価モデルの構築までには踏み込んでいない。
9	Qualitative Risk Assessment for Antibiotic Resistance; Salmonella Typhimurium and the Quinolone/ Fluoroquinolone class of antimicrobials	Wooldridge (1999)	Y	O	N	N	キノロン・フルオノキノロン耐性サルモネラ／動物由来食品	【リスク評価の目的】 動物用医薬品として家畜にキノロンを用いた場合のサルモネラ菌におけるキノロン耐性獲得が人の健康に与える影響のリスクを評価する。 【モデル概要】 発生評価、影響評価、影響評価段階においてそれぞれ関連するデータを整理し取りまとめている。定量的リスク評価モデルの構築までには踏み込んでいない。

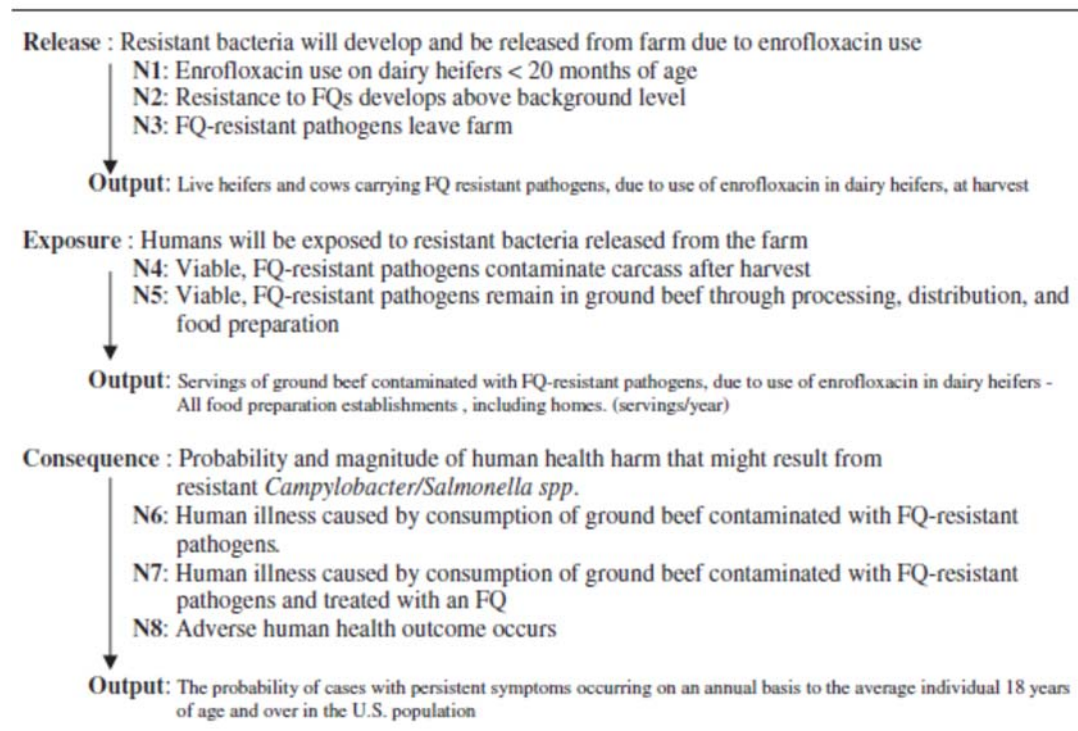
表 2 食用動物へのペニシリン使用によるペニシリン・アンピリリン耐性腸球菌によるヒトの
リスク評価モデルの概要 (Risk Analysis, Vol. 29, No. 6, 2009) 表 1 の No4 の事例

因子	数値
N=年間ICU感染者	N=315000
Pent = Enterococcusによって起きるICU感染の割合	0.1
P E.f.ent =E. faeciumによって起きるenterococcal 感染症の割合	0.25
外来性 (非院内感染)のE. faecium によって起きた enterococcal 感染の割合	≤ 0.17
外来性患者でアンピシリン耐性の割合	0.187
外来性アンピシリン耐性の患者で、バンコマイシン感受性の割合	0.155
バンコマイシン感受性の外来性アンピシリン耐性の患者で、食用動物由来の割合	0.069
バンコマイシン感受性の外来性アンピシリン耐性の患者で、ペニシリンアレルギーでない割合	0.844
もし食用動物にペニシリンを投与するのを止めた場合に患者がペニシリン感受性になる割合	1
アンピシリン耐性のため、患者あたりの死亡率リスクの上昇率	0.06
リスク(年間死亡者数)	0.135

表 3 牛肉中のフルオノキノロン耐性サルモネラ・カンピロバクター (H S Hurd ら) のリスク
評価の要素とパラメータ 表 1 の No. 5 の事例

要素	パラメータ
リリース評価	マクロライド剤 (M 剤) にばく露された動物の比率
	M 剤不使用下での耐性菌の比率
	M 剤使用した農場における耐性菌の比率
	M 剤使用により発生した耐性菌の割合
ばく露評価	培養で確認される年間カンピロバクター (Campy) 患者数
	M 剤使用により食用動物で耐性をもたせられた Campy の比率
	食用動物に使用された M 剤による耐性菌による年間患者数
影響 評価	培養で確認された Campy 患者が M 剤で治療される確率
	M 剤耐性のため重篤な症状に移行する確率
推定される結果	年間、重篤な患者発生数

図1 モデルの概要 Quantitative Risk from Fluoroquinolone-Resistant Salmonella and Campylobacter Due to Treatment of Dairy Heifers with Enrofloxacin for Bovine Respiratory Disease (表1のNo.5の事例から)



平成 25-26 年度 食品健康影響評価技術研究

「Ⅱ 生物学関連分野 1 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究」

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立

分担研究報告書

分担課題名：②EFSA、FDA 等における定量的リスク評価モデルの収集、分析及び検証

(2) 定量的リスク評価モデルの確立

分担研究者：長田 侑子 エム・アール・アイリサーチアソシエイツ (株)

分担研究者：豊福 肇 山口大学共同獣医学部病態制御学講座

分担研究者：蒔田 浩平 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医学ユニット

分担研究者：大橋 毅夫 (株) 三菱総合研究所

研究協力者：柿沼 美智留 (株) 三菱総合研究所

研究協力者：黄色 大悲 エム・アール・アイリサーチアソシエイツ (株)

研究要旨

食用動物への抗菌性物質の使用による薬剤耐性菌選択のヒトへの健康リスクは重要であるが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施されていない。本研究は、既に公表されている海外の定量的薬剤耐性評価など先行研究の結果等から我が国のリスク評価に活用可能性を検討したうえで、可能な限り、本研究班のデータ、特に発生段階における耐性メカニズムのデータ及び JVARM(Japanese Veterinary. Antimicrobial Resistance Monitoring. Program)のデータを用いた確率論的定量的リスク評価モデルを構築した。さらに構築したモデルの試行・検証を行うとともに、本モデルを用いて、鶏肉中のフルオロキノロン耐性 *Campylobacter* による健康影響を評価した。

A. 研究目的

食用動物への抗菌性物質の使用による薬剤耐性菌選択の人への健康リスクは非常に重要であり、欧米では定量的リスク評価の取り組みが始まっているが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施されていない。

本分担研究では、我が国で公衆衛生上重要なブロイラー中の *Campylobacter* と、その飼育中に使用され薬剤耐性が問題である

フルオロキノロン系薬剤 (以下「FQ」という。)の使用による人への健康リスクに焦点を当て、定量的評価を行った。

B. 研究方法

(1) 定量的リスク評価モデルの構築方針
発生評価、ばく露評価、影響評価段階における公表情報の収集結果を踏まえ、以下の方針で定量的リスク評価モデルを構築することとした。

- ✓ 発生段階は、先行研究のモデルをベースにカスタムするのではなく、JVARM (Japanese Veterinary. Antimicrobial Resistance Monitoring. Program)等既存の統計データや本研究班により得られたデータを可能な限り活用し新たにモデル構築する。
- ✓ ばく露・影響段階は、平成 20～22 年食品健康影響評価技術研究「定量的リスク評価の有効な実践と活用のための数理解析技術の開発に関する研究（主任研究者：春日文子）」で検討された鶏肉中のカンピロバクターの定量的リスク評価モデルを活用する。
- ✓ モデルのアウトプットは、ブロイラー由来 *Campylobacter* 患者の薬剤耐性菌への感染割合とする。
- ✓ 用いるデータの不確実性を考慮し、@Risk(PARASIDE)を用いて確率関数を用いた確率論的定量的リスク評価モデルとした。

（２）発生段階のモデル構築

１）モデルの具体化

JVARM のデータや研究により得られるデータを踏まえ、発生段階のモデルの全体像を図 1 に示すとおり検討した。

JVARM のデータでは、農場規模別の集計が可能であるため、モデルも農場規模を考慮したものとした。具体的には、農場規模を大規模農場：出荷羽数 30 万羽以上、中規模農場：出荷羽数 10～30 万羽、小規模農場：出荷羽数 10 万羽未満の 3 段階に分類することとした。さらに、より実態に即したモデルとするため、農場汚染率だけでなく、鶏群単位の汚染率も考慮し、汚染農場であっ

ても *Campylobacter* に感染していない鶏は汚染なし鶏群として分けることとした。

本研究では、薬剤ごとの耐性菌出現率、耐性菌の耐性機構別の種類（GyrA の Thr86Ile 変異のありなし）の割合、耐性菌のうち、GyrA の Thr86Ile 変異があるものについて efflux pump の発現量などのデータを取得していることから、これらのデータもモデルに反映した。なお、本研究では、*C.Jejuni*、*C.coli* とともにデータを取得しているが、モデルへの実装にあたっては鶏での存在率が高い *C.Jejuni* を対象とした。但し、今後、*C.coli* についてもモデルに反映できるよう、*C.coli* のための枠組みの構築やデータの整理は実施した。

２）コンセプト案を踏まえたモデルの実装

本節で各種データのモデルへの具体的な実装方法を述べる。

①農場単位の *Campylobacter* 汚染率・鶏群単位の *Campylobacter* 汚染率

平成 20～22 年食品健康影響評価技術研究「定量的リスク評価の有効な実践と活用のための数理解析技術の開発に関する研究」で構築した定量的リスク評価モデルで用いたデータを用いた。

②FQ 剤使用割合

JVARM データにより、農場規模別の薬剤の使用割合を算出し、これを利用することとした。但し、JVARM データでは、調査時点から過去 6 か月以内の薬剤の使用状況を聞き取りしているため、6 か月間以外の使用状況については把握できていない。ブロイラーは平均して年に 5 回程度出荷されることから、調査時点では薬剤を使用していなくても他の 4 回で薬剤を利用している可能性もある。こうした状況を踏まえ、5 回

のうち 1 回のみ薬剤を使用する割合が最も高いとして、 $(\{1,2,3,4,5\}, \{0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0\})$ とする三角分布を想定した。この分布の場合、薬剤使用回数の期待値は 2 回となるので、上記の農場規模別の薬剤の使用割合にこの期待値 2 回を乗じて、薬剤の使用割合とした。

また、本研究では、宮崎県のある食鳥処理場に 1 年間に搬入されたすべての鶏群に対する投薬記録を閲覧し、農場規模別に 1,648 鶏群の薬剤使用状況も調査した。この結果は表 1 に示すとおりである。本データは宮崎県の 1 処理場のデータではあるが、1 年間の薬剤使用実態を把握できており、JVARM のデータとともに有用であると考えた。そのため、JVARM データとともに本データを用いた場合も試算も行うこととした。データの実装に際しては、データ数も少ないことから離散分布として入力することとした。

③FQ 剤耐性菌出現率

薬剤耐性菌の出現率は、JVARM データと本研究班で得られたデータの両方を用いて入力することとした。FQ 薬剤未使用の場合の出現率は、JVARM データの *C.jejuni* 分離株数とそのうちの FQ 剤耐性株数（薬剤投与していない農場から得られたもの）を用いて、農場規模別の出現率を β 分布として入力した。

FQ 剤使用の場合は、本研究班で得られた薬剤の種類ごとの耐性菌出現率を用いることとした。3 回行われた薬剤の種類ごとの耐性出現頻度実験の結果を三角分布として表現し、さらに各薬剤の販売量から使用割合を推定して出現率とした。但し、JVARM データのとおり、FQ 剤未使用であっても耐

性菌が出現することから、FQ 剤使用の場合の場合についても FQ 剤未使用の場合の耐性菌出現率も考慮することとした。

④GyrA の Thr86Ile 変異の有無の割合

FQ 剤耐性菌の GyrA の Thr86Ile 変異の有無の割合は、本研究班で得られたデータを用いることとした。具体的には、FQ 剤耐性菌株の GyrA の Thr86Ile 変異ありなしを β 部分として入力した。

⑤efflux pump の発現量の高低の割合

efflux pump の発現量の高低の割合については、本研究班で得られたデータを用いることとした。具体的には、鶏の糞便由来の株の efflux pump 発現量から平均を 1 とした場合の相対発現量を算出し、1 以上である株を efflux pump の発現量が高い、1 以下である株を efflux pump の発現量が低いとして、それぞれの株数の割合を β 分布として efflux pump の発現量の高低の割合として入力した。

（3）ばく露・影響段階

平成 20～22 年食品健康影響評価技術研究「定量的リスク評価の有効な実践と活用のための数理解析技術の開発に関する研究」で構築した定量的リスク評価モデルで「一人あたりの年間感染回数」を試算し、（2）で試算した薬剤耐性菌への感染割合を考慮した場合の「一人あたりの年間感染回数」を検討した。

（4）モデルの試行・評価

上記を踏まえ、実装した定量的リスク評価モデルが実際に稼働するかどうかを確認した。さらに、FQ 薬剤の使用割合によって耐性菌感染鶏数の割合がどの程度変化する

のかをいくつかのシナリオを設定して評価した。シナリオとして、机上検討による薬剤使用割合を用いた場合、宮崎県のヒアリング調査による薬剤使用割合を用いた場合、机上検討による薬剤使用割合で、薬剤の利用回数の期待値を、1回、2回（現状の設定値）、5回と設定して試算した場合を仮定し、試算を行った。

C. 研究結果

（１）構築した定量的リスク評価モデルによる試算結果

定量的リスク評価モデルによる発生段階の試算の結果の平均値は、*Campylobacter* 感染鶏数に占める感受性菌感染鶏数の割合が 66.0%、FQ 剤耐性菌感染鶏数の割合が 34.0%となった。さらに、耐性菌感染鶏数の割合の内訳は、GyrA の Thr86Ile 変異以外耐性菌の感染鶏数の割合が 2.8%、GyrA の Thr86Ile 変異ありで efflux pump の発現量が高い耐性菌割合は 10.4%、低い耐性菌の割合は 20.8%となった。確率分布で示した割合は図 2-1～2-5 に示すとおりである。

また、ばく露・発生段階について「一人あたりの年間感染回数」を試算した結果、0 回が最も多く、平均は年約 1.02 回、最大値は 88 回という結果となった。図 3 に本試算結果を確率分布で示した図を示す。

以上を踏まえると、例えば、年間カンピロバクターに 10 回感染した人において、そのうちの約 7 回は感受性菌への感染で、約 3 回が耐性菌への感染になること推定された。また、耐性菌に感染した場合、3 回のうちほとんどが GyrA の Thr86Ile 変異耐性菌への感染で、GyrA の Thr86Ile 変異の以外の耐性菌に感染する確率は非常に低いと推定さ

れた。

（２）シナリオごとの試算結果

B.（４）で設定したシナリオで用いて試算した結果、いずれのシナリオについても感受性菌感染鶏数の割合と FQ 剤耐性菌感染鶏数の割合は通常設定の場合とほとんど同様であり、今回構築したモデルでは、薬剤の使用割合による影響は把握できなかった。

D. 考察

今回構築した確率論的定量的リスク評価モデルにより、農場出荷時の耐性機構別の耐性菌感染鶏数の大まかな割合を把握することができた。

一方で、今回のモデルでは FQ 剤の使用による影響を詳細に把握することまでには至らなかった。今回のモデルでは、FQ 剤使用の場合の出現率に本研究班で得られた実験データを用い、JVARM の薬剤未使用の場合の耐性菌の出現率をベースラインのデータとして用いている。JVARM の出現率のデータに比べると、実験データによる出現率は非常に低いため、薬剤の利用割合を高く設定しても、薬剤耐性菌の割合はほとんど変わらないという結果となった。上述のとおり、JVARM の薬剤使用歴は調査時点から過去 6 か月を対象としたものであり、それ以前に薬剤を使用していたとしても、現行のデータ上では未使用としてカウントされてしまう。以前に使用した薬剤により耐性菌が出現し、これが農場に残存することで耐性菌が見つかるのであれば、薬剤の使用が耐性菌の出現率に与える影響は大きいと考えられるが、現時点で入手可能なデータからは薬剤による影響を把握することは難しい。今後、JVARM 等の調査に

において、農場における過去の FQ 剤の使用歴を把握することができれば、薬剤使用による影響をより現実的に把握できると考えられる。

一方、FQ 剤は 1991 年から販売が開始されており、多少の増減はあるものの、最近では、販売量は頭打ちとなっている状況である。過去の FQ 剤の販売状況から、農場における過去の FQ 剤の使用を推定できれば、FQ 剤の使用歴をモデルに反映できる可能性はある。今回構築したモデルは単年を対象としたものであるが、より実態に即した FQ 剤の影響を把握するためには、経年変化も考慮したモデルの構築も検討する必要がある。

今回構築した確率論的定量的リスク評価モデルでは、*C.jejuni* だけでなく *C.coli* にも対応可能な形としている。鶏の場合は *C.jejuni* の存在割合が高いが、豚では *C.coli* の存在割合が高いため、今回のモデルを豚における *C.coli* の薬剤耐性菌のリスク評価に応用することも考えられる。

E. 結論

- ✓ 本研究では、JVARM のデータや本研究班で得られたデータをベースに、新たに発生段階部分も確率論的定量的リスク評価モデルを構築した。
- ✓ モデルによる試算の結果、*Campylobacter* 感染鶏に占める FQ 剤感

染鶏の割合を、耐性菌の耐性機構別に推測することができた。

- ✓ 本モデルでは、FQ 剤の使用による FQ 剤耐性菌感染鶏の割合への大きな影響は把握できなかった。
- ✓ 今後、農場における過去の FQ 剤の使用歴のデータを入手することができれば、より実態に即した試算を行うことが可能と考えられる。
- ✓ また、FQ 剤の過去の販売量などから過去の FQ 剤の使用歴を推定してモデルに反映することでモデルを精緻化することも考えられる。
- ✓ 今回構築した確率論的定量的リスク評価モデルは、*C.jejuni* だけでなく *C.coli* にも対応可能であるため、豚などにおけるリスク評価に適用できる可能性もある。

F. 研究発表

学会発表

1. 豊福肇、蒔田浩平、大橋毅夫、柿沼美智留、長田侑子、黄色大悲：ブロイラーのフルオロキノロン耐性 *Campylobacter* 定量的リスク評価の試み、第 7 回日本カンピロバクター研究会、2014 年 12 月 11 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

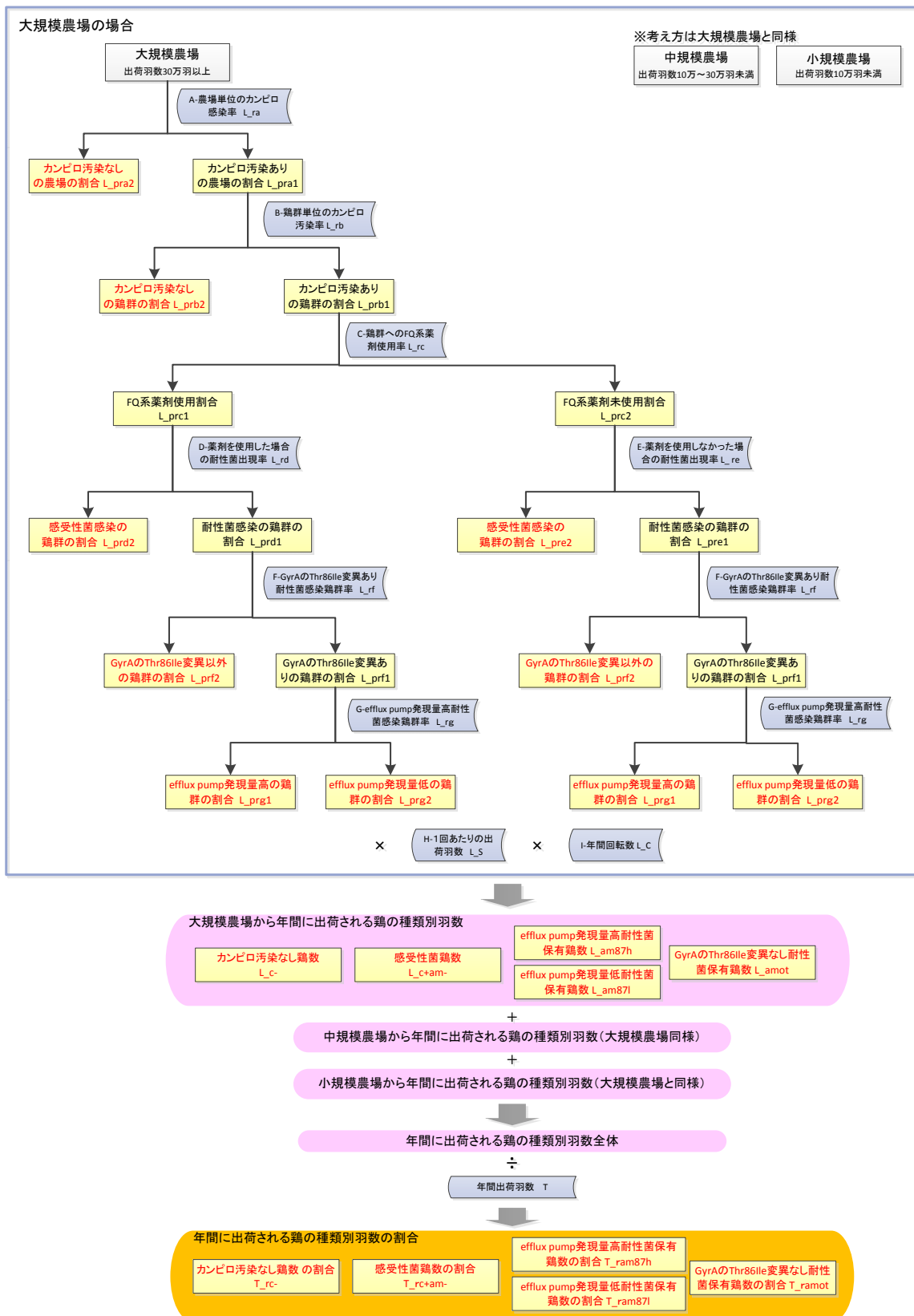


図1 発生段階の定量的リスク評価モデルの全体像

表 1 宮崎県の食鳥処理場における薬剤使用状況のヒアリング結果

薬剤投与回数	小規模農場	中規模農場	大規模農場	合計
1 回	5	14	3	22
2 回	2	19	0	21
3 回	2	9	1	12
4 回	0	3	0	3
5 回	0	0	2	2

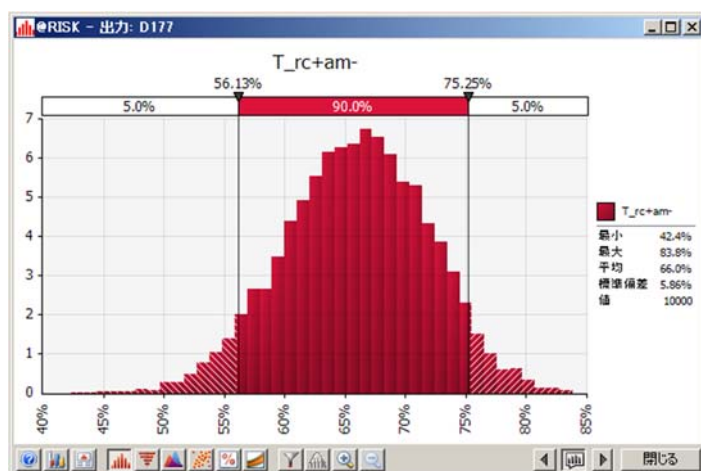


図 2-1 感受性菌感染鶏の割合の確率分布

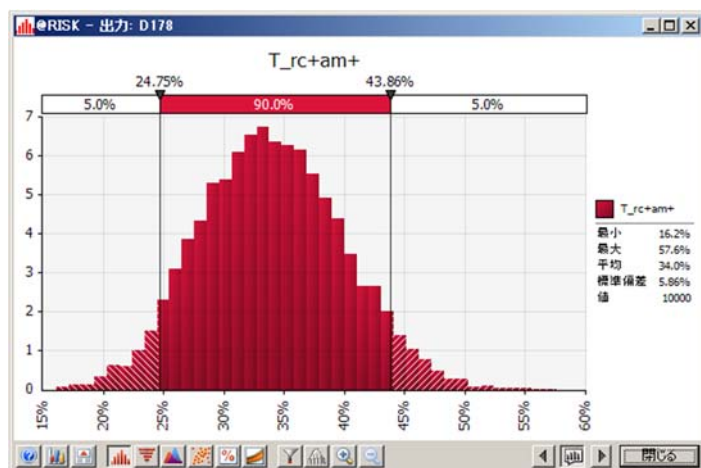


図 2-2 FQ 剤耐性菌感染鶏の割合の確率分布

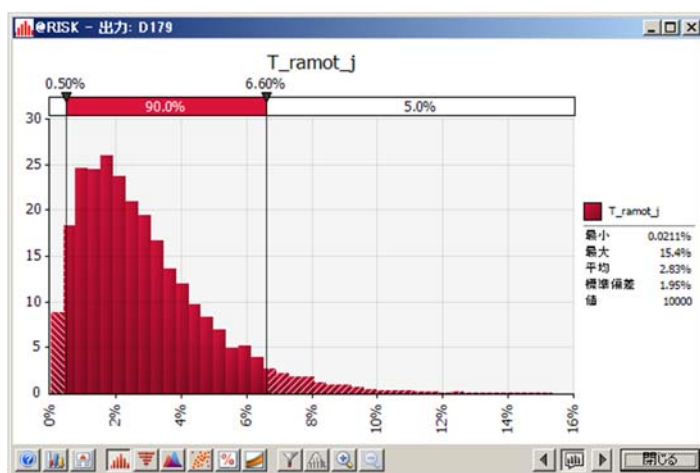


図 2-3 FQ 剤耐性菌（GyrA の Thr86Ile 変異以外）感染鶏の割合の確率分布

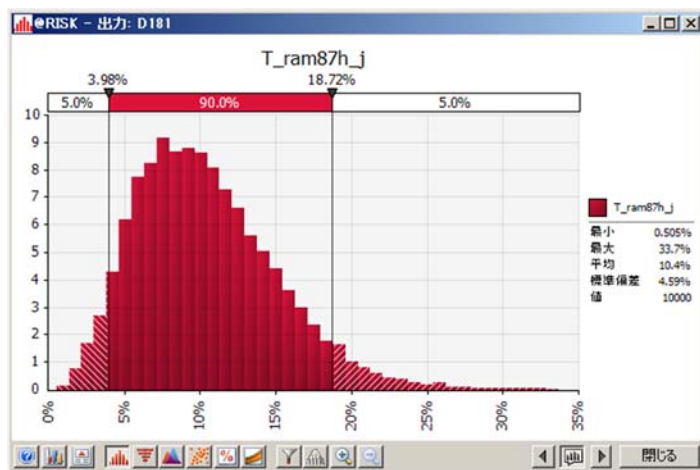


図 2-4 FQ 剤耐性菌（GyrA の Thr86Ile 変異+efflux pump の発現量高）感染鶏の割合の確率分布

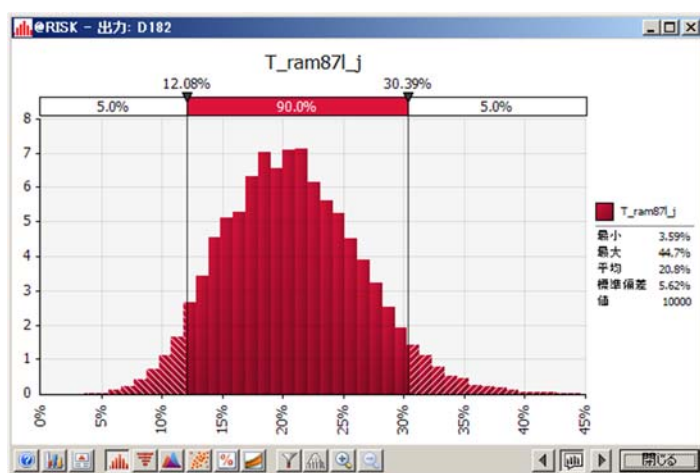


図 2-5 FQ 剤耐性菌（GyrA の Thr86Ile 変異+efflux pump の発現量低）感染鶏の割合の確率分布

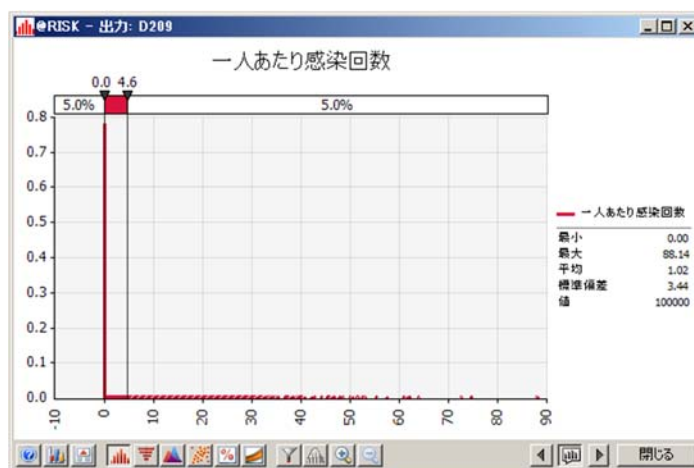


図3 一人当たり年間感染回数の確率分布

平成 25-26 年度 食品健康影響評価技術研究

「Ⅱ 生物学関連分野 1 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究」

食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立

分担研究報告書

分担課題名：②EFSA、FDA 等における定量的リスク評価モデルの収集、分析及び検証

(3) 定量的リスク評価指針の作成に必要な情報の収集

分担研究者：蒔田 浩平 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医疫学ユニット

分担研究者：豊福 肇 山口大学共同獣医学部病態制御学講座

研究要旨

食用動物への抗菌性物質の使用による薬剤耐性菌選択の人への健康リスクは重要であるが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施されていない。本研究は、薬剤耐性と食の安全の研究において先進的な Danish Agriculture and Food Council (DAFC)、人の健康を守る立場の WHO-EU、そして Codex 委員会の構成機関でありリスク評価のフレームワークを検討・公表する立場の FAO の専門家から、食用動物由来薬剤耐性菌の定量的リスク評価に取り組むうえで、またさらに全体的なコントロールのあり方について現在どのような取り組みがなされているか情報収集し、意見交換を行った。

結果から、発生・ばく露・影響評価全体に渡る完全な定量的リスク評価、特に耐性機構を考慮したモデルはまだ実施されていないことが分かった。一方で、デンマークでは技術的な側面だけでなく問題全体を大きくとらえていること、WHO からは薬剤耐性のコントロールには分野横断的アプローチが有効であること、FAO からはバリューチェーン全体に沿った考え方は重要であることを学んだ。本調査から、本課題では食鳥由来フルオロキノロン耐性 *Campylobacter* の定量的リスク評価を通して、世界でも類を見ない耐性機構を考慮したモデルによる定量的リスク評価とともに、動物と人双方の分子疫学的比較による総合的なリスクの捉え方を目指すのがわが国にとって、また世界にとっても有用であることが示唆された。

A.研究目的

食用動物への抗菌性物質の使用による薬剤耐性菌選択の人への健康リスクは非常に重要であり、欧米では定量的リスク評価の取り組みが始まっているが、わが国ではこれまで定性的リスク評価までしか実施され

ていない。

本分担研究では、課題であるフルオロキノロン系薬剤の肉用鶏への使用による人への健康リスクを定量的の実施を通して、定量的リスク評価指針の作成に必要な情報を、海外の先進的または取りまとめ機関から収

集することを目的として調査を実施した。
また、数理的なモデルに限定せず、当該国や
機関の薬剤耐性問題に関する取り組みにつ
いても調査した。

B. 研究方法

1. *Danish Agriculture and Food Council* (DAFC)訪問

会議日時

2014 年 2 月 11 日 10 時から 16 時

議題と対応者

以下の議題について、情報収集と意見交
換を行った。本研究班から豊福と蒔田が参
加した。

(1) デンマークにおける家畜衛生および薬
剤耐性問題対応 (10:00-12:00)

Dr. Jan Dahl (DAFC)

(2) 定量的薬剤耐性リスク評価モデルに関
する討議 (13:30-15:00)

Dr. Lis Alban (DAFC)

Dr. Jan Dahl (DAFC)

Dr. Danilo Lo Fong (WHO)

(3) WHO による薬剤耐性に関する取り組み
(15:00-16:00)

Dr. Danilo Lo Fong (WHO)

2. *Food and Agriculture Organization* (FAO)訪問

会議日時

2014 年 2 月 12 日 10 時から 12 時

議題と対応者

以下の議題について、情報収集と意見交
換を行った。本研究班から蒔田が参加した。

(1) FAO の薬剤耐性問題の取り組みにつ
いて

(2) FAO プロジェクトで取組んでいるリス
ク評価について

Dr. Katinka de Bologh (Neglected
Zoonoses 担当)

Dr. Patrick Otto (AMR 担当)

3. *Federal Institute for Risk Assessment* (BfR)訪問

会議日時

2014 年 2 月 12 日 10 時から 16 時

議題と対応者

(1) ドイツにおける薬剤耐性戦略

(2) ドイツにおける薬剤耐性モニタリング

(3) ドイツにおける薬剤耐性リスク評価

Thomas Alter

Andreas Schroeter

C. 研究結果

1. *Danish Agriculture and Food Council* (DAFC)訪問

(1) デンマークにおける家畜衛生および薬
剤耐性問題対応

<リスク評価実施組織>

デンマークで農業関連問題を議論する場
合、政府が産 (Danish Agriculture & Food
Council) ・学 (大学) に分析を依頼する。
DAFC は農業者団体であり、農場と屠畜場
の衛生管理指導を行う他、独自にまたは大
学と連携してリスク評価を実施する。

<DAFC の抗菌性物質の規制>

・ Growth promoter の肥育豚、次いで離乳
豚への使用禁止 (1998 年 (EU 決定の 7 年
前))

・フルオロキノロンは 10 年以上前から許可
なしでの使用禁止。豚への FQ 使用は年間

1 kg。

- ・第3・4世代セファロスポリンの使用禁止（2010年（ESBL懸念への対応、乳牛乳房炎には使用可））

- ・セファロスポリンについては、法律はないが生産者自ら使用を控えており、2011年の使用量は1.3kg。

<Vetstat>

- ・かつて獣医師が利益を上げるため必要以上に薬剤を使用していたことから2000年に始まった薬剤使用記録管理システム。

- ・獣医師が薬剤を処方→薬局が生産者に販売→Vetstatシステムに自動的に記録される→生産者が自ら動物に投与

- ・母豚・肥育豚・子豚一日一頭当たり使用量が決められており、薬局はこの量だけ販売。

- ・生産者は使用時に記録用紙に記録し、獣医師がこれを監査する。

<Yellow Card Initiative>

- ・食用動物への抗菌性物質の使用を減らすため2010年に導入。

- ・農場平均使用量の二倍を9か月に渡り使用した農場にはYellow Cardとして管理獣医師と交流のない他獣医師の管理下に置かれる。それでも使用量が減らなければRed Cardとして豚の生産量割り当てが減らされる。

<細菌の薬剤耐性状況>

- ・サルモネラについて、FQおよびセファロスポリン耐性の報告はなし。

- ・大腸菌のESBL耐性率はほぼ0%。

(2) 定量的薬剤耐性リスク評価モデルに関

する討議

<当研究班のモデル案説明>

- ・当研究班では、Campylobacterのフルオリキノロン耐性発生頻度に関して、GyrAとEfflux pump活性に影響するレギュレーター、cme-Rについて実験により定量化し、発生モデルを作成する考えを説明。人での影響評価の評価項目の選定と発生・ばく露・影響の各段階の繋ぎ方について検討段階であることを説明し、最後に現在のデンマークにおける考え方について質問した。

<デンマークの豚由来マクロライド耐性Campylobacterのリスク評価>

Alban et al. (2008). Risk assessment for macrolide-resistant *Campylobacter* associated with macrolide use for Danish pigs

- ・量的評価はばく露評価まで。

- ・ばく露評価まではシナリオ・ツリーを使用。

- ・理由は影響評価（Helms et al. 2005*）で人のCampylobacter症は単発症例であり、マクロライド感受性Campylobacterと比較して耐性Campylobacterの懸念すべきリスクの上昇は低いから。

- ・Campylobacter感染後90日以内の侵入型感染または死亡の確率は0.63%であり（しかも90日以内というのは老人の他の原因による死亡も含む可能性がある）、そもそも重篤化するリスクが非常に低い。

<デンマークの食用肉由来ESBL耐性大腸菌のばく露評価>

Carmo et al. (2014). Exposure assessment of ESBL/AmpC beta-lactamases-

producing *E. coli* in meat in Denmark

・ヒトと食用肉の ESBL/AmpC genotype はあまり一致しないため、動物由来 ESBL/AmpC beta-lactamases-producing *E. coli* のリスクは高いとは言えない。

＜食鳥由来 FQ 耐性 *Campylobacter* の定量的リスク評価モデルに関する意見交換＞

・上記の例に挙げたとおりデンマークでは、リスクの考え方は掛け算なので、発生・ばく露・影響評価のどの段階でもほぼ 0 ならば、掛けても 0 となるので、この場合定量的リスクは三段階全体を通して実施する意義はないと考えている。

・デンマークではこれまで耐性機構を考慮した定量的リスク評価は実施していない。

・遺伝子レベルでの耐性機構をモデルに入れると複雑になり何を分析しているのか分からなくなるのではないか。

・またデンマークでは、人での抗生物質使用による耐性サルモネラ感染リスクを Maike Koningstein がデンマーク技術大学の博士課程で研究した。

・デンマークでは、リスクが定量的に評価されようがされまいが、FQ 耐性が危険なことは一般常識であるので、予防原則として FQ 規制は当たり前と考えている。

(3) WHO-EU による薬剤耐性に関する取り組み

＜12 Action Plan＞

2001 年に WHO では、STAG (Strategic Technological Advisory Group) が Global Strategy for Containment of AMR を打ち出した。最近では STAG で出された 12 のアクション・プランを EU 管轄地域ごとに

推奨している。内容はセクター間コラボレーションやサーベイランスの強化、新薬開発など。慎重使用の啓もう活動は主に東ヨーロッパで実施。

＜CAESAR Network＞

IPC (Infection Prevention & Control) など、耐性菌研究と食品衛生学の連携を推進。

＜AGISAR＞

WHO、OIE、FAO の連携。

2. Food and Agriculture Organization (FAO) 訪問

(1) FAO の薬剤耐性問題の取り組みについて

＜本研究班のリスク評価案の説明＞

・前述のデンマークでの発表に同じ。

＜FAO の取り組み＞

・FAO の目的は世界の食糧供給のための農業なので、焦点は発展途上国に当てられている。

・発展途上国では薬剤耐性菌のリスク評価は始まっているが、全て質的評価。

・FAO は WHO とともに Codex 委員会を組織し、Codex 委員会による薬剤耐性菌リスク分析のガイドラインを作成してきた。

・FAO が関係している薬剤耐性菌リスク評価対象は、畜産物（鶏肉、豚肉、牛肉 (Limited) ）、および水産物である。

(2) FAO プロジェクトで取組んでいるリスク評価について

i. ベトナムの水産物バリューチェーン（餌から一次生産まで）は輸出用のみ実施して

いる。国内用の評価は政府が制限しているので出来ない。

ii. カンボジアの鶏肉バリューチェーンは実施終了した。

iii. インド（パンジャブ、ニューデリー、ウッタルプラデッシュ）における鶏肉。

iv. ケニヤ（KEMRI）が牛肉と豚肉について実施している。

・バリューチェーン分析は、サンプリングの仕方も考慮しやすくなるので重要である。

・Codex も人材育成プログラムを実施中である。日本が定量的リスク評価をするようになったら人材育成に協力して欲しい。

<Codex と OIE フレームワークについて>

・Codex と OIE の薬剤耐性リスク評価のフレームワークが異なることについて、現在 OIE と Codex は合同会議（FAO、WHO、OIE の Tripartite working group）で運用上の摺り合わせについて、Guideline for Guidelines を作成中である。

3. Federal Institute for Risk Assessment (BfR)訪問

(1) ドイツにおける薬剤耐性戦略

ヒトの領域では：

- 薬剤耐性モニタリングと使用量の把握
- 効果的な抗生物質の使用を促すための治療委員会の設置
- 関連する stakeholder の協力を促進するための省庁間横断的 WG の設置

獣医領域では：

- 包括的な薬剤耐性の状況の記録
- 薬剤耐性発生状況の継続的なモニタリング
- 科学的に健全な管理措置の実施

- 獣医外科医、農場及び消費者の情報を改善する
- 獣医療及び動物飼育における管理措置の幅広い受入及び実施
- 抗生物質使用の最小化と感染性疾患を防ぐための疾病予防及び衛生の改善
- 将来の抗生物質の効果を保存するための薬剤耐性の状況のモニタリング

(2) ドイツにおける薬剤耐性モニタリング

ドイツでは動物、食品についてサルモネラを最も主眼を置き、そのほか *Campylobacter*、大腸菌等について薬剤耐性モニタリングを行っている。ここでは2009年の *Campylobacter* について簡単に報告する。ズーノーシスモニタリングで分離された合計464株の *Campylobacter* spp.（*C. jejuni* 328株及び *C. coli* 136株）について、5つの抗菌剤のクラス（aminoglycosides, phenicols, [fluoro]quinolones, macrolides 及び tetracycline）について耐性を調べていた。

ブロイラー肉由来株は *C. jejuni* 116株及び *C. coli* 52株、このうち Ciprofloxacin 耐性は *jejuni* で45%、*coli* で66.7%であった。ブロイラー由来株は *C. jejuni* 20株及び *C. coli* 6株であ、このうち Ciprofloxacin 耐性は *C. jejuni* で65%、*C. coli* で66.7%であった。

(3) ドイツにおける薬剤耐性リスク評価

ドイツにおいては、まだデータ収集段階であり薬剤耐性リスク評価は公表されていない

D. 考察

今回のデンマーク DAFC と FAO での視察から、最も分かったことは、本研究で想定している耐性機構を考慮し、かつ発生・ばく露・影響の全段階を含む定量的リスク評価モデルは、世界でも先進的なデンマークでさえも実施されていないということである。定量的リスク評価としては、米国が鶏由来フルオロキノロン耐性 *Campylobacter* について実施しているが、耐性機構は考慮されておらず、治療効果の延長など影響評価での定量的な評価までは実施されていない。

デンマークの考え方としては、問題を全体でとらえて必要な部分についてのみ定量的評価を試みるというものである。また、根底として予防原則の立場から、危険と考えられるものは定量的評価を経ずして禁止としている。

しかしながら本課題の立ち位置としては、科学の進展により徐々に明らかになりつつある薬剤耐性のメカニズムを考慮した抗菌性物質の食用動物への使用から来る健康評価を定量的にリスク評価する指針を作成するために、実際にリスク評価に取り組んでみるものであり、別の意義を有している。このため、本海外調査で得られた知見を照らし合わせて考えるならば、本課題の方向性から見て、先行研究のリスクモデルに習うのではなく、耐性機構を定量的に考慮した、新しいタイプの定量的リスク評価モデルを作成することが必要である。

WHO での取り組みではセクター間連携や慎重使用の普及啓蒙も実施しており、薬剤耐性問題には、耐性のメカニズムや単なる法規制によるコントロールに加えて、教育や社会学的側面の理解を含む、分野横断的な考え方が重要であるとの見方が重要で

あった。

FAO での調査からは、定量的リスク評価はそのフレームワークを検討・公表する立場の FAO でも実施していないことが明らかとなった。食品安全委員会で推奨する発生・ばく露・影響評価のステップは元来 OIE リスク評価のフレームに基礎を置いておりデンマークでもすでに使用され、薬剤耐性を扱う上では分かりやすいフレームワークである。一方で Codex 委員会がガイドラインで推奨している評価フレームワークは微生物学的リスク評価手法を基礎に置いており、異なるステップを踏む。今回の FAO への出張で、Codex 委員会は OIE と共同でこれについても議論を重ねているところであることが分かった。今後 Codex と OIE の摺り合わせが進む中で、わが国においてもこの両者から新たな案が出される可能性があることを理解しておくことは必要であると思われた。また FAO はバリュー・チェーン全体をモデル化する方式を推奨しており、これについてはわが国でのモデルにおいても考慮すべき点であると考えられた。

食用動物由来薬剤耐性菌の健康リスクを考える上で、動物と人の双方での評価は重要である。デンマークでは分子疫学を用いて EBSL のリスクについてこれを明らかにしている。本課題の研究班は動物における薬剤耐性の専門家と人の保健における専門家が集結されており、一つのリスクモデルの中で考える取り組みと、デンマークのように分子疫学を用いてアプローチする立体的な取り組みが期待されている。本海外調査で、その両方のアプローチが有効であることが示唆された。

ドイツにおいては動物、食品及びヒトの

医療の 3 機関が共同して薬剤耐性に取り組み、また毎年医療及び家畜生産現場での抗菌剤使用実態及びヒト、動物及び食品中での耐性菌の汚染実態をモニタリングしており、緊急対応が必要となった場合は対応をとるという姿勢であった。

E. 結論

食用動物由来薬剤耐性菌の健康リスク評価で、発生・ばく露・影響評価の全段階に渡る定量的リスク評価は、世界でも先進的なデンマークでさえも実施されておらず、フレームワーク自体も現在も Codex と OIE との間で検討中であることが、フレームワークを検討・公表する Codex 委員会の構成機関である FAO への調査で明らかとなった。

今回得られた知見で重要な点は、全体を見て必要な点についてリスク評価を実施する姿勢、予防原則の考え、フードチェーン全体を見ること、そして動物と人双方の分子疫学的比較によるリスクの判断、という考

え方である。

本研究班では、世界ではまだ例を見ない耐性機構を考慮したモデルと、さらに動物と人双方の分子疫学的比較を通して、総合的なリスク評価を目指すことが世界にとっても有用であると考えられた。

本研究で作成したモデルをもとに、別紙の確率論的リスク評価指針の骨子を提案する。

D. 研究発表

学会発表

1. 豊福肇、蒔田浩平、大橋毅夫、柿沼美智留、長田侑子、黄色大悲：ブロイラーのフルオロキノロン耐性 *Campylobacter* 定量的リスク評価の試み、第 7 回日本 *Campylobacter* 研究会、2014 年 12 月 11 日

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。