内 閣 府 食 品 安 全 委 員 会
平成 25 年度食品安全確保総合調査

畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査報告書

平成 26 年 3 月

一般財団法人　東京顕微鏡院

目　次

Ⅰ. 調査背景および目的 1
Ⅱ. *Campylobacter* の検出試験 1
1.試料のサンプリング 1
1)施設の要件および施設数 1
2)対象食品の種類 1
3)試料のサンプリング、輸送及び保管方法 1
4)試料数 2
2.試料からの *Campylobacter* の分離及び同定 2
1)対象菌 2
2)分離及び同定 2
3.試験方法 2
1)試料液の調製 2
2)検出方法及び同定方法 2
3)試験に使用した培地・試薬 3
4.結果 5
1)試料のサンプリング 5
2)*Campylobacter* の検出成績 8
Ⅲ. *Campylobacter* の薬剤感受性試験（MIC の測定） 13
1.分離菌株の選定 13
1)牛肝臓からの分離株 13
2)豚肝臓からの分離株 13
3)市販鶏肉からの分離株 13
4)食鳥処理場鶏肉からの分離株 13
2.測定方法 13
1)対象薬剤 13
2)MIC 測定試験方法 14
3)PFGE 解析 16
4)試験に使用した機器・培地 16
5)EM 耐性菌株の解析 17
3.結果及び考察 17
1)牛肝臓由来株の MIC と耐性出現頻度 17
2)豚肝臓由来株の MIC と耐性出現頻度 22
3)市販鶏肉由来株の MIC と耐性出現頻度 28
4)食鳥処理場鶏肉由来株の MIC と耐性出現頻度 33

5）牛肝臓、豚肝臓、鶏肉由来 *C. jejuni* の薬剤耐性パターン.....38
6）牛肝臓、豚肝臓、鶏肉由来 *C. coli* の薬剤耐性パターン.....40
7）CPFX 耐性株の地域分布 42
8）PFGE 解析.....44
9）EM 耐性菌株の解析 52
4.薬剤耐性株の保存 55

Ⅰ. 調査背景および目的

家畜等への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するに当たり、畜水産食品等の薬剤耐性菌の出現に関する科学文献及び調査報告数が極めて少ないことから、畜水産食品等の薬剤耐性菌の出現状況を定量的に把握しておく必要がある。平成17年度には、畜水産食品における薬剤耐性菌について情報収集するとともに、薬剤耐性菌の出現状況を定量的に把握するためのプロトコルを作成した(平成 17 年度「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査(プロトコル作成)」報告書)。このプロトコルに従い、平成 18、19 及び 20 年度に畜産食品(牛肉、豚肉、鶏肉)における薬剤耐性菌の出現状況を調査したが、*Campylobacter* による食中毒の原因食品として最も頻度の高い鶏肉における *Campylobacter* については、平成 18 年度にしか調査が行われていない。また、牛肉及び豚肉における *Campylobacter* については、これまでの知見から分離頻度が低いことが判明しているが、*Campylobacter* による食中毒の原因食品として重要な牛及び豚の肝臓における薬剤耐性菌の状況については知見が少ない。

本調査では家畜等への抗菌性物質の使用に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響評価をより科学的に実施するため、鶏肉、牛及び豚の肝臓における薬剤耐性 *Campylobacter* の調査を実施し、薬剤耐性菌の食品健康影響評価を実施するための基礎資料とした。

Ⅱ. *Campylobacter* の検出試験

1.試料のサンプリング

1)施設の要件および施設数

牛肝臓、豚肝臓及び鶏肉を国内産に限って、かつ生産地を明らかにして採取する必要があることから、広くと畜場、卸、量販店、小売店の施設を対象とした。牛肝臓、豚肝臓に関しては、量販店、小売店での販売がなされていない状況や、「国産」といった表記しかなされていない状況であることから、と畜場、卸での採取を行った。鶏肉に関しては、パック詰めされた商品でも生産地の表記がなされていることが多いことから、量販店、小売店での採取を行った。

また出荷地域が明らかになる食鳥処理場 10 か所から鶏肉を採取した。

2)対象食品の種類

国内産の牛肝臓、豚肝臓および鶏肉の 3 種類を対象食品とした。また、対象食品は加熱調理等がなされていないもので、原産地(「○○県産」など)が明らかであり、産地が特定できるものを対象とし、単に「国産」と表示されているものは対象外とした。

3)試料のサンプリング、輸送及び保管方法

牛肝臓、豚肝臓に関しては主としてと畜場で採取を実施することから、個体間の汚染

が起きないように、解体後直ちに一頭分を個体毎にビニール袋に入れるなどの採取方法を依頼した。市販鶏肉に関しては包装容器及び原産地等が記載されたラベルが破損又は損傷していないことを確認してサンプリング（購入）した。また、サンプリングした試料は凍結しないように保冷して運搬し、速やかに試験に供試した。

4）試料数

牛肝臓及び豚肝臓の試料数はそれぞれ 500 サンプル以上、鶏肉は 200 サンプル以上とした。また食鳥処理場からの試料数は 100 サンプル以上とした。

なお、平成 17 年度食品安全確保総合調査「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査（プロトコル作成）報告書（平成 18 年 3 月）」に記載されている都道府県別生産量のデータを参考にして、生産量が多い都道府県の対象食品を優先的にサンプリングした。本調査では、最新の生産量のデータ（平成 24 年畜産統計；農林水産統計）を参考に試料数を決定した。

2.試料からの *Campylobacter* の分離及び同定

1）対象菌

Campylobacter jejuni , Campylobacter coli

2）分離及び同定

試験方法は原則として、平成17年度食品安全確保総合調査「畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査（プロトコル作成）報告書（平成 18 年 3 月）」に準拠して、分離及び同定を行った。また最新の試験方法として「食品からの微生物標準試験法」等を参考に、使用する分離平板培地などを選択した（図 1）。

3.試験方法

1）試料液の調製

牛肝臓及び豚肝臓に関しては、通常の流通経路での暴露を考慮して、表面を含む 2 か所（1 か所当たり縦 5cm×横 5cm×深さ 1cm）、表面を取り除いた内部 3 か所（1 か所当たり縦 5cm×横 5cm×深さ 1cm）の合計 5 か所から採取し、細切したものを原試料とした。市販鶏肉及び食鳥処理場鶏肉に関しては、3～5 か所から採取し、細切したものを原試料とした。

原試料 25g を秤量し、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）25ml を加えた後、1 分間ストマッカー処理したものを試料液（リンス液）として用いた。

2）検出方法及び同定方法

①直接分離培養法

試料液 0.1ml を mCCDA 培地及び Skirrow 寒天培地にそれぞれ塗抹し、42℃で 48 時間微好気培養した。

②増菌培養法

試料液 1ml を Preston 培地 15ml に接種し、42℃で 24 時間微好気培養した。その後、培養液の 1 白金耳量を mCCDA 培地に画線塗抹し、42℃で 48 時間微好気培養

した。

③生化学的性状試験及び菌種同定

直接分離培養法及び増菌培養法の各寒天培地上に *Campylobacter* と疑われる集落が出現した場合は、グラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験等の生化学的性状試験を行った(表 1)。また菌種同定(*C. jejuni* 及び *C. coli*)は PCR 法で行った。

表 1 *Campylobacter* の生化学的性状試験

試験項目	*C. jejuni , C. coli*
グラム染色	陰性
形態	S 字状の螺旋
運動性	コルクスクリュー様
オキシダーゼ試験	陽性
カタラーゼ試験	陽性

3)試験に使用した培地・試薬

Campylobacter の検出及び同定に使用した培地、試薬を表 2 に示した。

表 2 使用培地、試薬一覧

名称	メーカー名
Preston 培地	Oxoid
mCCDA 培地(SEL)	関東化学
Skirrow 寒天培地	極東製薬
アネロパック・微好気	三菱ガス化学
チトクロム・オキシダーゼ試験用ろ紙	日水製薬
オキシドール	和光純薬
コロンビア 5%ヒツジ血液寒天培地	BD
Campylobacter(*cdt* gene) PCR Detection and Typing Kit	TaKaRa

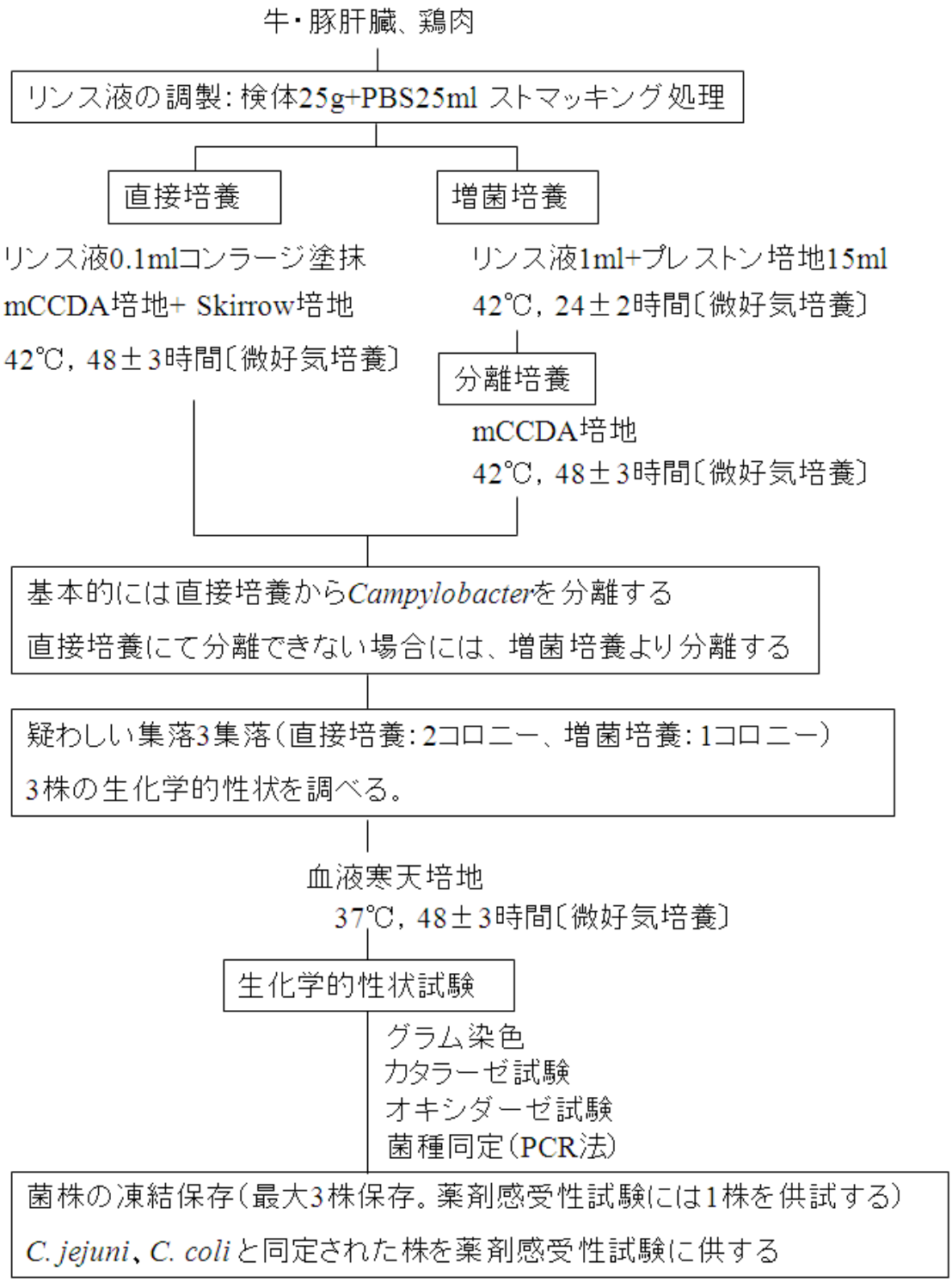


図1　*Campylobacter*の分離方法

4.結果

1)試料のサンプリング

対象食品の全国飼養頭数割合又は全国出荷量割合と検体採取目標数を表 3～表 5 に示した。

表3 肉用牛の全国飼養頭数割合と牛肝臓の検体採取目標数

生産地(都道府県)	飼養頭数割合(%)	500検体中の割合	検体採取目標数
A	19.6	98	100
B	13.0	65	70
C	9.2	46	50
D	5.2	26	30
E	3.9	19	20
F	3.4	17	20
G	3.3	16	20
H	3.1	16	20
I	3.0	15	15
J	2.4	12	10
K	2.2	11	10
L	2.1	11	10
M	2.1	11	10
N	2.1	11	10
O	2.1	10	10
P	2.0	10	10
Q	1.9	10	10
R	1.5	8	
S	1.4	7	
T	1.3	6	
U	1.3	6	
V	1.2	6	
W	1.0	5	
X	1.0	5	
Y	1.0	5	
Z	1.0	5	
a	0.9	4	
b	0.9	4	
c	0.8	4	
d	0.7	4	
e	0.7	4	
f	0.7	3	75
g	0.6	3	
h	0.6	3	
i	0.6	3	
j	0.5	3	
k	0.3	1	
l	0.3	1	
m	0.2	1	
n	0.2	1	
o	0.2	1	
p	0.1	1	
q	0.1	1	
r	0.1	1	
s	0.1	1	
t	0.0	0	
u	0.0	0	

表4　豚の全国飼養頭数割合と豚肝臓の検体採取目標数

生産地（都道府県）	飼養頭数割合（%）	500検体中の割合	検体採取目標数
B	14.0	70	70
C	9.1	45	45
S	6.8	34	40
J	6.5	32	40
A	6.1	30	30
P	6.1	30	30
E	5.0	25	30
M	4.1	21	25
F	4.0	20	25
Q	3.6	18	20
D	3.0	15	15
d	2.8	14	15
I	2.6	13	10
H	2.3	12	10
h	2.3	11	10
G	2.2	11	10
j	2.0	10	
R	1.7	9	
L	1.6	8	
N	1.3	7	
b	1.2	6	
e	1.2	6	
Z	1.1	6	
T	1.1	5	
K	0.9	5	
X	0.8	4	
a	0.8	4	
n	0.7	4	
c	0.7	3	
Y	0.6	3	
W	0.5	2	
U	0.4	2	75
f	0.4	2	
V	0.4	2	
o	0.4	2	
r	0.4	2	
m	0.3	1	
O	0.3	1	
i	0.2	1	
l	0.2	1	
k	0.2	1	
g	0.1	0	
p	0.1	0	
q	0.0	0	
t	0.0	0	
u	0.0	0	
s	0.0	0	

表5　鶏肉の全国出荷量割合と鶏肉の検体採取目標数

生産地（都道府県）	全国出荷量割合（%）	200検体中の割合	検体採取目標数
B	20.0	40	50
C	18.9	38	50
E	16.7	33	40
M	6.0	12	20
A	5.2	10	10
W	2.6	5	5
K	2.4	5	5
D	2.4	5	5
c	2.1	4	5
O	2.0	4	5
H	1.8	4	5
L	1.8	4	50
U	1.6	3	
G	1.5	3	
f	1.4	3	
S	1.2	2	
i	1.1	2	
a	1.0	2	
h	0.9	2	
Q	0.9	2	
b	0.9	2	
P	0.8	2	
s	0.7	1	
Y	0.6	1	
T	0.6	1	
J	0.5	1	
j	0.5	1	
Z	0.5	1	
I	0.5	1	
N	0.4	1	
R	0.4	1	
k	0.4	1	
l	0.3	1	
m	0.3	1	
X	0.3	1	
V	0.3	1	
F	0.2	0	
q	0.1	0	
d	0.0	0	
e	0.0	0	
o	0.0	0	
r	0.0	0	
g	0.0	0	
p	0.0	0	
u	0.0	0	
n	0.0	0	
t	0.0	0	

2）*Campylobacter* の検出成績

①牛肝臓からの検出状況

牛肝臓からの *Campylobacter* の検出状況を表 6 に示した。牛肝臓 505 検体中 109 検体が *Campylobacter* 陽性であり、陽性率は 21.6％であった。また *C. jejuni* が 99 株、*C. coli* が 10 株の合計 109 株が分離された。

表6　牛肝臓からの*Campylobacter*の検出状況

生産地(都道府県)	検体数	陽性数	陽性率(%)	分離菌株数	
				C. jejuni	*C. coli*
A	99	24	24.2	21	3
B	65	13	20.0	12	1
C	46	9	19.6	9	0
D	26	8	30.8	5	3
E	19	1	5.3	1	0
F	17	4	23.5	4	0
H	16	4	25.0	4	0
G	16	3	18.8	3	0
I	15	1	6.7	1	0
J	12	2	16.7	2	0
M	11	2	18.2	2	0
L	11	0	0.0	0	0
K	11	2	18.2	2	0
N	11	5	45.5	5	0
Q	10	3	30.0	3	0
P	10	1	10.0	1	0
O	10	3	30.0	3	0
R	9	2	22.2	2	0
S	7	1	14.3	1	0
j	7	2	28.6	2	0
U	6	1	16.7	0	1
T	6	1	16.7	1	0
V	6	3	50.0	2	1
W	5	0	0.0	0	0
X	5	2	40.0	2	0
Y	5	0	0.0	0	0
a	5	2	40.0	2	0
Z	5	2	40.0	1	1
d	4	1	25.0	1	0
e	4	1	25.0	1	0
b	4	1	25.0	1	0
c	4	1	25.0	1	0
h	3	3	100.0	3	0
f	3	0	0.0	0	0
g	3	1	33.3	1	0
u	3	0	0.0	0	0
i	3	0	0.0	0	0
n	1	0	0.0	0	0
p	1	0	0.0	0	0
s	1	0	0.0	0	0
合計	505	109	21.6	99	10

②豚肝臓からの検出状況

豚肝臓からの *Campylobacter* の検出状況を表 7 に示した。豚肝臓 500 検体中 74 検体が *Campylobacter* 陽性であり、陽性率は 14.8%であった。また *C. jejuni* が 3 株、*C. coli* が 72 株の合計 75 株が分離された。なお生産地 B の 1 検体からは、*C. jejuni* と *C. coli* の両方が分離された。

表7　豚肝臓からの*Campylobacter*の検出状況

生産地(都道府県)	検体数	陽性数	陽性率(%)	分離菌株数	
				C. jejuni	*C. coli*
J	73	14	19.2	1	13
B*	71	7	9.9	1	7
S	60	12	20.0	0	12
E	50	5	10.0	0	5
P	49	7	14.3	1	6
A	45	9	20.0	0	9
C	45	1	2.2	0	1
F	35	2	5.7	0	2
d	20	2	10.0	0	2
e	10	4	40.0	0	4
N	10	2	20.0	0	2
G	6	2	33.3	0	2
n	5	0	0.0	0	0
b	5	5	100.0	0	5
X	5	0	0.0	0	0
j	5	0	0.0	0	0
l	5	1	20.0	0	1
u	1	1	100.0	0	1
合計	500	74	14.8	3	72

*1検体から*C. jejuni*と*C. coli*の両方分離

③市販鶏肉からの検出状況

市販鶏肉からの *Campylobacter* の検出状況を表 8 に示した。市販鶏肉 315 検体中 109 検体が *Campylobacter* 陽性であり、陽性率は 34.6%であった。また *C. jejuni* が 100 株、*C. coli* が 14 株の合計 114 株が分離された。なお生産地 C の 3 検体および生産地 E の 2 検体からは、*C. jejuni* と *C. coli* の両方が分離された。

表8　市販鶏肉からの*Campylobacter*の検出状況

生産地(都道府県)	検体数	陽性数	陽性率(%)	陽性数	
				C. jejuni	*C. coli*
B	69	22	31.9	20	2
C*	59	32	54.2	29	6
E**	55	19	34.5	16	5
M	30	4	13.3	4	0
A	18	2	11.1	2	0
W	16	6	37.5	6	0
G	8	2	25.0	2	0
D	6	2	33.3	2	0
b	5	1	20.0	1	0
c	5	3	60.0	2	1
O	5	5	100.0	5	0
P	4	2	50.0	2	0
e	4	1	25.0	1	0
S	4	3	75.0	3	0
Z	4	0	0.0	0	0
Q	3	0	0.0	0	0
K	3	1	33.3	1	0
a	3	0	0.0	0	0
d	2	1	50.0	1	0
L	2	0	0.0	0	0
T	2	0	0.0	0	0
k	2	1	50.0	1	0
N	2	1	50.0	1	0
h	1	0	0.0	0	0
F	1	1	100.0	1	0
X	1	0	0.0	0	0
i	1	0	0.0	0	0
合計	315	109	34.6	100	14

*3検体から*C. jejuni*と*C. coli*の両方分離

**2検体から*C. jejuni*と*C. coli*の両方分離

④食鳥処理場鶏肉からの検出状況

食鳥処理場鶏肉からの *Campylobacter* の検出状況を表 9 に示した。食鳥処理場鶏肉 192 検体中 69 検体が *Campylobacter* 陽性であり、陽性率は 35.9%であった。また *C. jejuni* が 66 株、*C. coli* が 6 株の合計 72 株が分離された。なお食鳥処理場 AD で処理された生産地 B の 1 検体および食鳥処理場 AI で処理された生産地 C の 2 検体からは、*C. jejuni* と *C. coli* の両方が分離された。

表9 鶏肉(食鳥処理場)からの*Campylobacter*の検出状況

処理場	生産地	検体数	陽性数	陽性率(%)	陽性数	
					C. jejuni	*C. coli*
AA	M	2	0	0.0	0	0
	E	8	0	0.0	0	0
AB	E	10	0	0.0	0	0
AC	B	35	10	28.6	10	0
AD	B*	35	16	45.7	15	2
AE	T	10	4	40.0	4	0
	Z	1	1	100.0	1	0
AF	J	7	0	0.0	0	0
	F	3	0	0.0	0	0
AG	E	15	13	86.7	13	0
AH	C	18	8	44.4	8	0
AI	C**	29	11	37.9	9	4
AJ	C	19	6	31.6	6	0
合計		192	69	35.9	66	6

*1検体から*C. jejuni*と*C. coli*の両方分離

**2検体から*C. jejuni*と*C. coli*の両方分離

Ⅲ. *Campylobacter* の薬剤感受性試験（MIC の測定）

1.分離菌株の選定

対象食品ごとに分離された *Campylobacter* について、直接分離培養で分離された菌株を優先的に採用し、直接分離培養陰性の検体については、増菌培養で分離された菌株を用いた。また基本的に 1 試料について 1 株を採用したが、異なる菌種が分離された検体については、各 1 株を採用した。

1）牛肝臓からの分離株

牛肝臓から分離された *Campylobacter*109 株（*C. jejuni*99 株、*C. coli*10 株）を試験用菌株とした。

2）豚肝臓からの分離株

豚肝臓から分離された *Campylobacter*75 株（*C. jejuni*3 株、*C. coli*72 株）を試験用菌株とした。

3）市販鶏肉からの分離株

市販鶏肉から分離された *Campylobacter*114 株（*C. jejuni*100 株、*C. coli*14 株）を試験用菌株とした。

4）食鳥処理場鶏肉からの分離株

食鳥処理場鶏肉から分離された *Campylobacter*72 株（*C. jejuni*66 株、*C. coli*6 株）を試験用菌株とした。

2.測定方法

米国臨床検査標準委員会（CLSI）の試験法に準拠し、寒天平板希釈培養法により最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration：MIC）を測定した。なお国内の家畜衛生分野におけるモニタリング調査で採用されている 8 薬剤について MIC を測定した。

1）対象薬剤

対象とした薬剤を表 10 に示した。

表 10　調査対象薬剤

薬剤名	略号
アンピシリン	ABPC
ストレプトマイシン	SM
ゲンタマイシン	GM
エリスロマイシン	EM
テトラサイクリン	TC
クロラムフェニコール	CP
ナリジクス酸	NA
シプロフロキサシン	CPFX

2）MIC 測定試験方法

①抗生物質の調製方法

a)標準品の保存方法

薬剤はデシケーター等に入れ、それぞれの保存方法に従って保存した。

b)薬剤の溶解と濃度の調製

各薬剤の溶解に使用した溶媒と希釈液を表 11 に示した。なお各薬剤については 2,560～1.25μg/ml までの 2 段階希釈液を調製した。ただし、シプロフロキサシンについては 640～0.3μg/ml までの 2 段階希釈液を調製した。

表 11 試験薬剤の溶解に使用する溶媒と希釈液

薬剤名	溶媒	希釈液
アンピシリン	緩衝液 2[2)]	緩衝液 1[1)]
ストレプトマイシン	蒸留水	蒸留水
ゲンタマイシン	蒸留水	蒸留水
エリスロマイシン	95%エタノール	蒸留水
テトラサイクリン	蒸留水	蒸留水
クロラムフェニコール	95%エタノール	蒸留水
ナリジクス酸	下記[3)]参照	蒸留水
シプロフロキサシン	蒸留水	蒸留水

1）0.1M リン酸塩緩衝液（pH6.0）

リン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）7.0g、リン酸一水素ナトリウム（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）6.0g に蒸留水約 750ml を加え、1 分間以上煮沸して溶解した。必要があれば 1M NaOH またはリン酸を用いて pH を 5.9-6.1 に調製した後、更に蒸留水を加えて 1,000ml とした。

2）0.1M リン酸塩緩衝液（pH8.0）

リン酸一水素カリウム（16.73g）、リン酸二水素カリウム（0.523g）に蒸留水約 750ml を加えて溶解し、必要があれば、リン酸を用いて pH を 7.9-8.1 に調製した後、さらに蒸留水を加えて 1,000ml とした。

3）蒸留水 1/2 容量を加えた後、1M NaOH を溶解するまで滴下し、蒸留水でメスアップした。

②薬剤含有寒天培地の調製方法

シャーレ（直径 90mm）に各薬剤希釈液をそれぞれ 2ml 分注し、5%の割合に緬羊脱繊維素血液を添加したミューラーヒントン寒天培地（Oxoid）18ml を添加して混合、固化させた後、フラン器内で寒天表面を乾燥させた。薬剤無添加の寒天培地についても同様に作成し、対照とした。

③接種用菌液の調製

Campylobacter は、血液寒天培地で 42℃、24 時間微好気培養後、生育した集落を 1～2×10^8cfu/ml となるように調製し接種用菌液とした。

④菌液の接種及び培養

ミクロプランターを用いて、薬剤を含まない対照培地、次いで低濃度の薬剤含有寒天培地の順に菌液を接種し、培地上の菌液が乾燥した後、37℃で 48 時間微好気培養した。

⑤薬剤感受性判定方法とブレークポイント

薬剤含有寒天培地で被検菌の発育が完全に阻止された薬剤の最小濃度をエンドポイントとして判定し、その値を MIC 値とした。なお、単一集落のみの発育あるいは微小な発育は CLSI のガイドラインに従い発育阻止とみなした。また、薬剤を含まない対照培地で被検菌の発育を確認した。なおブレークポイント（耐性限界値）は、農林水産省及び（独）農林水産消費安全技術センターの平成 24 年度家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査を参考にした（表 12）。

表 12　各薬剤に対するブレークポイント

薬剤名	ブレークポイント（μg/ml）
アンピシリン	32
ストレプトマイシン	32
ゲンタマイシン	-
エリスロマイシン	32
テトラサイクリン	16
クロラムフェニコール	16
ナリジクス酸	32
シプロフロキサシン	4

⑥精度管理

CLSI のガイドラインで示された下記の菌株を用いて精度管理を行った。

Campylobacter jejuni ATCC33560

なお、MIC の精度管理限界値（MIC 範囲）については CLSI の規定に従った（表 13）。

表 13 CLSI が規定する薬剤における MIC（μg/ml）の精度管理限界値

薬剤名	精度管理用菌株 *C. jejuni* ATCC33560
アンピシリン	-
ストレプトマイシン	-
ゲンタマイシン	0.5-4
エリスロマイシン	1-4
テトラサイクリン	-
クロラムフェニコール	-
ナリジクス酸	-
シプロフロキサシン	0.06-0.5

-:規定なし

3）PFGE 解析

MIC 測定した *Campylobacter* のうち、CPFX に耐性の認められた菌株について、以下に示したパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による核型解析を行った。供試菌株のプラグを作成し、制限酵素 *Sma* Ⅰで 30℃、5 時間の処理を行った後、CHEF DRⅢを用いて電気泳動を行った。なおゲルは 1％Seakem Gold Agarose、泳動バッファーは ×0.5TBE を用いた。また泳動条件は温度 14℃、電圧 6V/cm、角度 120°、パルスタイム 2.2-54.0 秒を 18 時間で行った。泳動終了後、Ethidium bromide により染色を行い、GelDox XR を用いて画像データとした。さらに、得られた画像データをもとに BioNumerics を用いて平均距離法（UPGMA 法）により系統樹を作成した。

4）試験に使用した機器・培地

MIC 測定に使用した機器および培地を表 14 に、PFGE 解析に使用した機器および試薬を表 15 に示した。

表 14 MIC 測定に使用した機器および培地等一覧

	名称	メーカー名	ロット No.
機器	ミクロプランター	佐久間製作所	-
培地等	ミューラーヒントン寒天培地	Oxoid	1333385
	繊羊脱繊維素血液	日本バイオテスト研究所	-

表 15　PFGE 解析に使用した機器および試薬一覧

	名称	メーカー名	機種番号
機器	パルスフィールドゲル電気泳動装置	Bio-Rad	CHEF DRⅢ
	画像解析装置	Bio-Rad	GelDoc XR
試薬等	*Sma* Ⅰ	TaKaRa	-
	Seakem Gold Agarose	TaKaRa	-

5）EM 耐性菌株の解析

EM 耐性菌株について、PCR-RFLP 法[文献 1)]による点変異の確認を行った。

文献　1）Vacher S., Menard A., Bernard E., Megraud F.. 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 47:1125–1128.

3.結果及び考察

1）牛肝臓由来株の MIC と耐性出現頻度

牛肝臓から分離された *Campylobacter* の Range、MIC_{50}、MIC_{90}、耐性菌株数及び耐性率を表 16、MIC 分布を表 17、薬剤耐性パターンを表 18 に示した。また二峰性が認められた *C. jejuni* の MIC 分布（TC 及び CPFX）を図 2、3 に示した。

①*C. jejuni*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 7 薬剤に認められ、耐性率は 2.0%（EM、CP）～58.6%（TC）であった。TC と CPFX に対して、0.25μg/ml および 64μg/ml、0.125μg/ml および 8μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンに関しては 1～5 薬剤耐性の 14 パターンに分類され、5 薬剤耐性菌が 1 株、4 薬剤耐性菌が 5 株、3 薬剤耐性菌が 15 株、2 薬剤耐性菌が 17 株、1 薬剤耐性菌が 37 株、感受性菌が 24 株であった。耐性株の内訳に関しては、TC の 1 薬剤耐性が 33 株（33.3%）で最も多く、次いで NA-CPFX の 2 薬剤耐性が 13 株（13.1%）、TC-NA-CPFX の 3 薬剤耐性が 13 株（13.1%）であった。

②*C. coli*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 3 薬剤に認められ、耐性率は 80.0%（CPFX）～90.0%（TC、NA）であった。また薬剤耐性パターンに関しては 1～3 薬剤耐性の 4 パターンに分類され、3 薬剤耐性菌が 7 株、2 薬剤耐性菌が 2 株、1 薬剤耐性菌が 1 株であった。耐性株の内訳に関しては、TC-NA-CPFX の 3 薬剤耐性が 7 株（70.0%）で最も多かった。

表16　*Campylobacter*の薬剤感受性試験（牛肝臓）

薬剤名	種	菌株数	Range（μg/ml）	MIC_{50}（μg/ml）	MIC_{90}（μg/ml）	ブレークポイント（μg/ml）	耐性菌株数	耐性率（%）
ABPC	*C. jejuni*	99	0.5-64	2	4	32	6	6.1
	C. coli	10	4-16	8	8		0	0.0
SM	*C. jejuni*	99	0.25->256	1	2	32	5	5.1
	C. coli	10	1-4	2	4		0	0.0
GM	*C. jejuni*	99	0.25-1	0.5	0.5		0	0.0
	C. coli	10	0.5-1	0.5	1		0	0.0
EM	*C. jejuni*	99	0.25-128	1	2	32	2	2.0
	C. coli	10	1-16	8	8		0	0.0
TC	*C. jejuni*	99	≦0.125->256	32	256	16	58	58.6
	C. coli	10	0.5->256	256	256		9	90.0
CP	*C. jejuni*	99	0.25-64	2	2	16	2	2.0
	C. coli	10	2-8	4	8		0	0.0
NA	*C. jejuni*	99	2-256	8	64	32	36	36.4
	C. coli	10	16-256	128	128		9	90.0
CPFX	*C. jejuni*	99	≦0.03-16	0.125	8	4	32	32.3
	C. coli	10	0.125-16	16	16		8	80.0

表17　*Campylobacter*のMIC分布（牛肝臓）

種	菌株数	薬剤名	MIC（μg/ml）														
			≦0.03	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
C. jejuni	99	ABPC			-	-	4	10	50	26	2	1	4	2	-	-	-
		SM			-	1	10	69	14	-	-	-	1	-	-	-	4
		GM			-	6	81	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			-	8	27	31	25	6	-	-	-	-	2	-	-
		TC			9	27	4	-	-	-	1	1	9	24	7	15	2
		CP			-	2	5	26	50	12	2	-	1	1	-	-	-
		NA			-	-	-	-	4	36	17	6	12	7	14	3	-
		CPFX	7	10	40	8	-	2	-	7	19	6	-	-			
C. coli	10	ABPC			-	-	-	-	-	3	6	1	-	-	-	-	-
		SM			-	-	-	2	5	3	-	-	-	-	-	-	-
		GM			-	-	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			-	-	-	2	1	-	6	1	-	-	-	-	-
		TC			-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	7	1
		CP			-	-	-	-	2	5	3	-	-	-	-	-	-
		NA			-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	7	1	-
		CPFX	-	-	1	1	-	-	-	-	-	8	-	-			

表18　*Campylobacter*の薬剤耐性パターン（牛肝臓）

種	菌株数	感受性株	耐性株	耐性率（%）	耐性株の内訳													
					1薬剤耐性				2薬剤耐性			3薬剤耐性			4薬剤耐性			5薬剤耐性
					ABPC	SM	TC	NA	ABPC-TC	TC-NA	NA-CPFX	ABPC-EM-TC	SM-TC-CP	TC-NA-CPFX	ABPC-TC-NA-CPFX	SM-TC-NA-CPFX	TC-CP-NA-CPFX	ABPC-EM-TC-NA-CPFX
C. jejuni	99	24	75	75.8	2	1	33	1	1	3	13	1	1	13	1	3	1	1
C. coli	10	0	10	100.0	-	-	1	-	-	1	1	-	-	7	-	-	-	-

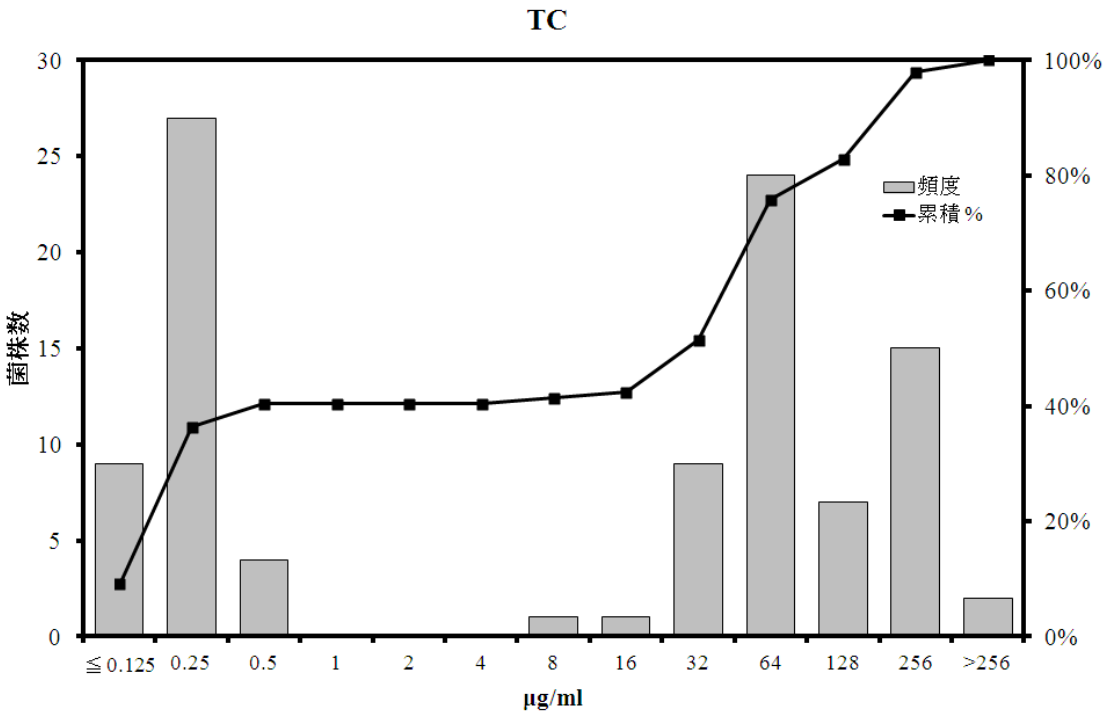


図 2　牛肝臓由来 *C. jejuni* の MIC 分布（TC）

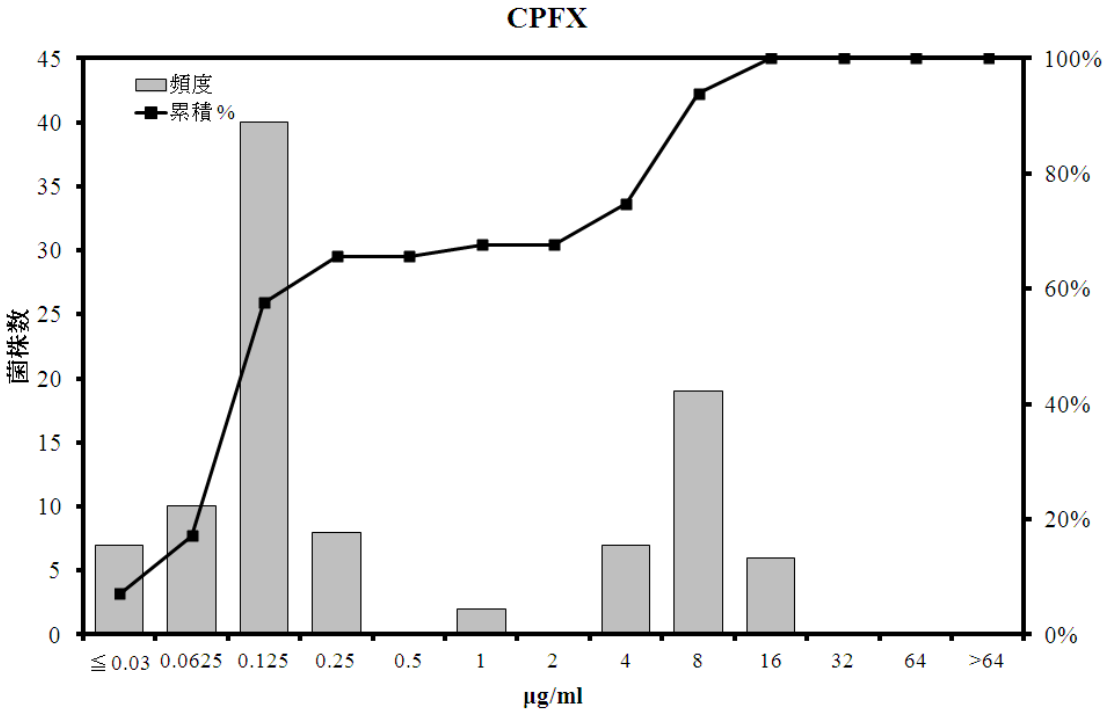


図 3　牛肝臓由来 *C. jejuni* の MIC 分布（CPFX）

2)豚肝臓由来株の MIC と耐性出現頻度

豚肝臓から分離された *Campylobacter* の Range、MIC_{50}、MIC_{90}、耐性菌株数及び耐性率を表 19、MIC 分布を表 20、薬剤耐性パターンを表 21 に示した。また二峰性が認められた *C. coli* の MIC 分布（ABPC、SM、EM、TC、CPFX）を図 4～8 に示した。

①*C. jejuni*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 3 薬剤に認められ、耐性率は 66.7%（SM、NA、CPFX）であった。また薬剤耐性パターンに関しては 1～3 薬剤耐性の 3 パターンに分類され、3 薬剤耐性菌が 1 株、2 薬剤耐性菌が 1 株、1 薬剤耐性菌が 1 株であった。

②*C. coli*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 7 薬剤に認められ、耐性率は 8.3%（CP）～84.7%（TC）であった。ABPC、SM、EM、TC、CPFX に対して、8μg/ml および 64μg/ml、4μg/ml および>256μg/ml、4μg/ml および 256μg/ml、1μg/ml および 128μg/ml、0.25μg/ml および 8μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンに関しては 1～6 薬剤耐性の 23 パターンに分類され、6 薬剤耐性菌が 12 株、5 薬剤耐性菌が 12 株、4 薬剤耐性菌が 11 株、3 薬剤耐性菌が 12 株、2 薬剤耐性菌が 16 株、1 薬剤耐性菌が 9 株であった。耐性株の内訳に関しては、SM-TC の 2 薬剤耐性が 9 株（12.5%）、ABPC-SM-EM-TC-NA-CPFX の 6 薬剤耐性が 9 株（12.5%）で最も多く、次いで SM-EM-TC-NA-CPFX の 5 薬剤耐性が 8 株（11.1%）であった。

表19　*Campylobacter*の薬剤感受性試験（豚肝臓）

薬剤名	種	菌株数	Range（μg/ml）	MIC_{50}（μg/ml）	MIC_{90}（μg/ml）	ブレークポイント（μg/ml）	耐性菌株数	耐性率（%）
ABPC	*C. jejuni*	3	2-8	2	8	32	0	0.0
	C. coli	72	0.5-128	8	64		15	20.8
SM	*C. jejuni*	3	2->256	>256	>256	32	2	66.7
	C. coli	72	2->256	128	>256		59	81.9
GM	*C. jejuni*	3	1	1	1		0	0.0
	C. coli	72	0.25-2	1	1		0	0.0
EM	*C. jejuni*	3	0.25-4	0.5	4	32	0	0.0
	C. coli	72	≦0.125->256	8	256		32	44.4
TC	*C. jejuni*	3	2-8	4	8	16	0	0.0
	C. coli	72	≦0.125->256	64	256		61	84.7
CP	*C. jejuni*	3	1-8	2	8	16	0	0.0
	C. coli	72	1-64	4	8		6	8.3
NA	*C. jejuni*	3	4-256	256	256	32	2	66.7
	C. coli	72	8-256	32	128		44	61.1
CPFX	*C. jejuni*	3	0.125-32	16	32	4	2	66.7
	C. coli	72	0.0625-32	2	16		35	48.6

表20　*Campylobacter*のMIC分布（豚肝臓）

種	菌株数	薬剤名	MIC（μg/ml）														
			≦0.03	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
C. jejuni	3	ABPC			-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-
		SM			-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
		GM			-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
		TC			-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
		CP			-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-
		NA			-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-
		CPFX	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-			
C. coli	72	ABPC			-	-	1	7	11	14	15	9	1	8	6	-	-
		SM			-	-	-	-	3	8	2	-	-	8	19	5	27
		GM			-	2	11	58	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			1	-	-	-	8	17	11	3	-	-	5	25	2
		TC			2	1	3	3	1	1	-	1	8	19	25	7	1
		CP			-	-	-	5	18	29	14	4	-	2	-	-	-
		NA			-	-	-	-	-	-	15	13	10	12	17	5	-
		CPFX	-	2	12	14	7	-	2	10	14	6	5	-			

表21　*Campylobacter*の薬剤耐性パターン（豚肝臓）

種	菌株数	感受性株	耐性株	耐性率（%）	1薬剤耐性		2薬剤耐性						3薬剤耐性						4薬剤耐性					5薬剤耐性			6薬剤耐性	
					SM	TC	ABPC-TC	SM-TC	SM-CP	SM-NA	EM-TC	NA-CPFX	ABPC-SM-TC	SM-EM-TC	SM-TC-NA	SM-NA-CPFX	EM-TC-NA	TC-NA-CPFX	ABPC-SM-TC-NA	SM-EM-TC-NA	SM-TC-CP-NA	SM-TC-NA-CPFX	EM-TC-NA-CPFX	ABPC-SM-TC-NA-CPFX	SM-EM-TC-NA-CPFX	EM-TC-CP-NA-CPFX	ABPC-SM-EM-TC-NA-CPFX	SM-EM-TC-CP-NA-CPFX
C. jejuni	3	0	3	100.0	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. coli	72	0	72	100.0	6	3	1	9	1	2	1	2	1	5	2	-	1	3	1	3	1	5	1	3	8	1	9	3

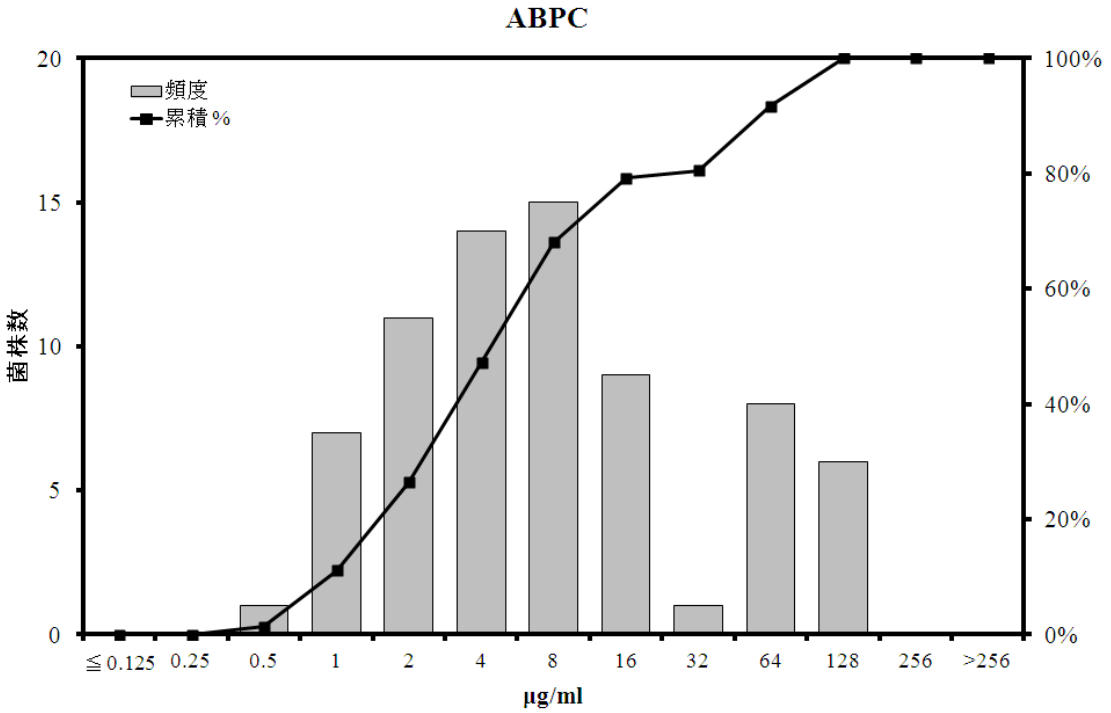


図 4　豚肝臓由来 *C. coli* の MIC 分布（ABPC）

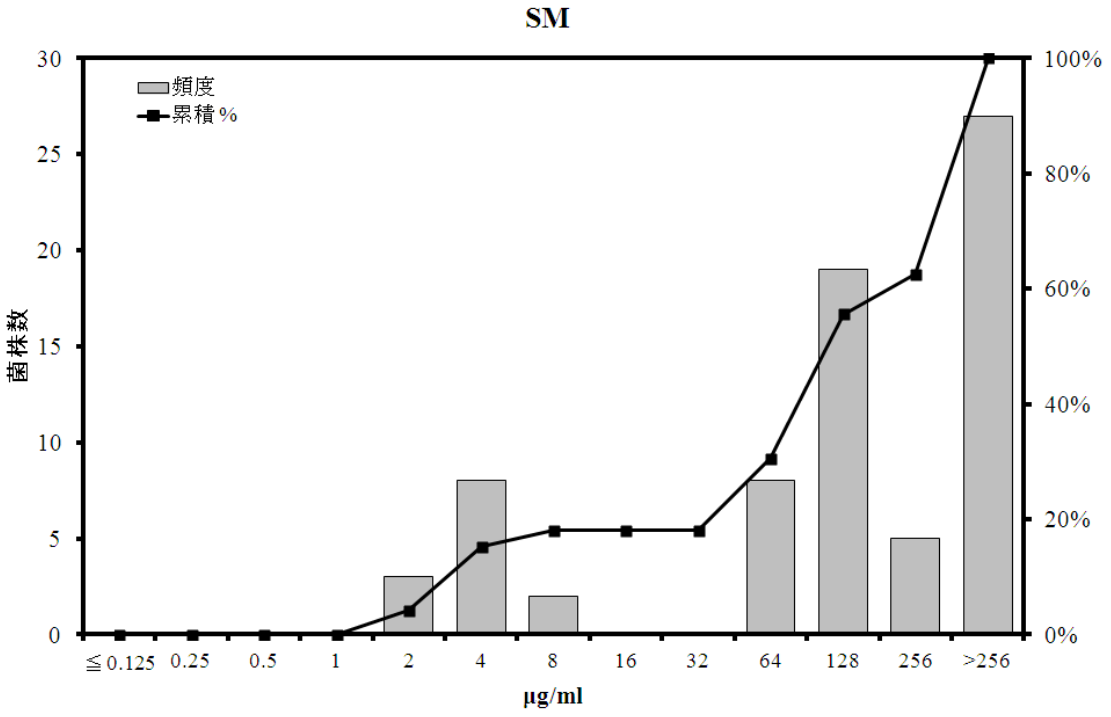


図 5　豚肝臓由来 *C. coli* の MIC 分布（SM）

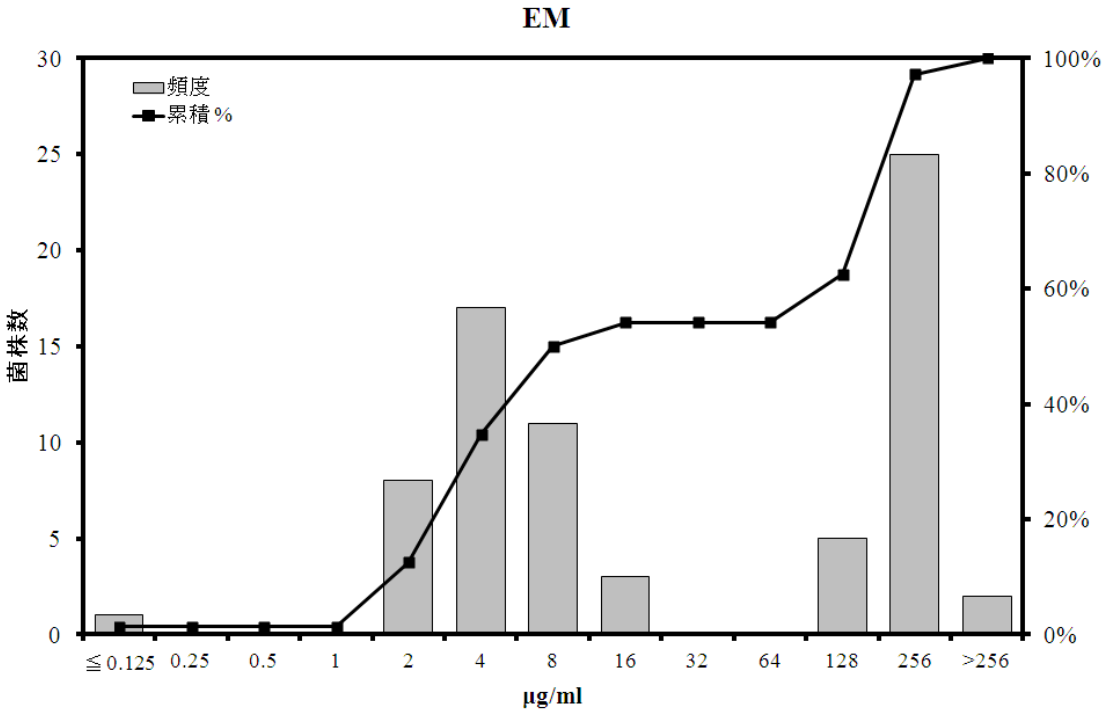


図 6　豚肝臓由来 *C. coli* の MIC 分布（EM）

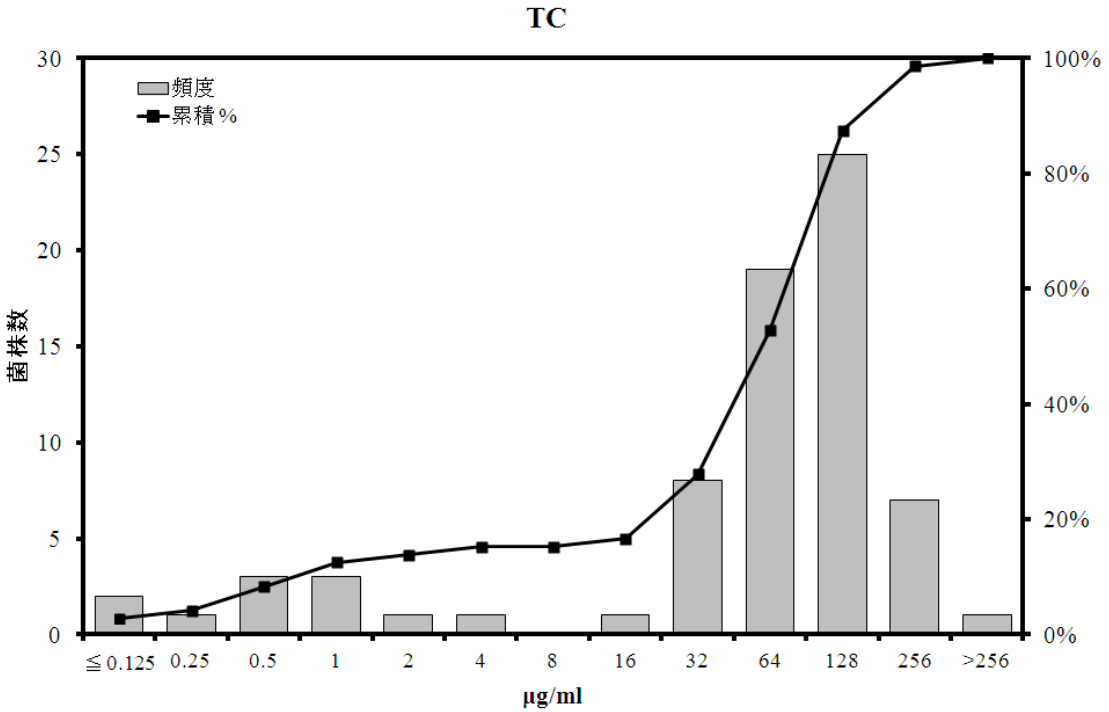


図 7　豚肝臓由来 *C. coli* の MIC 分布（TC）

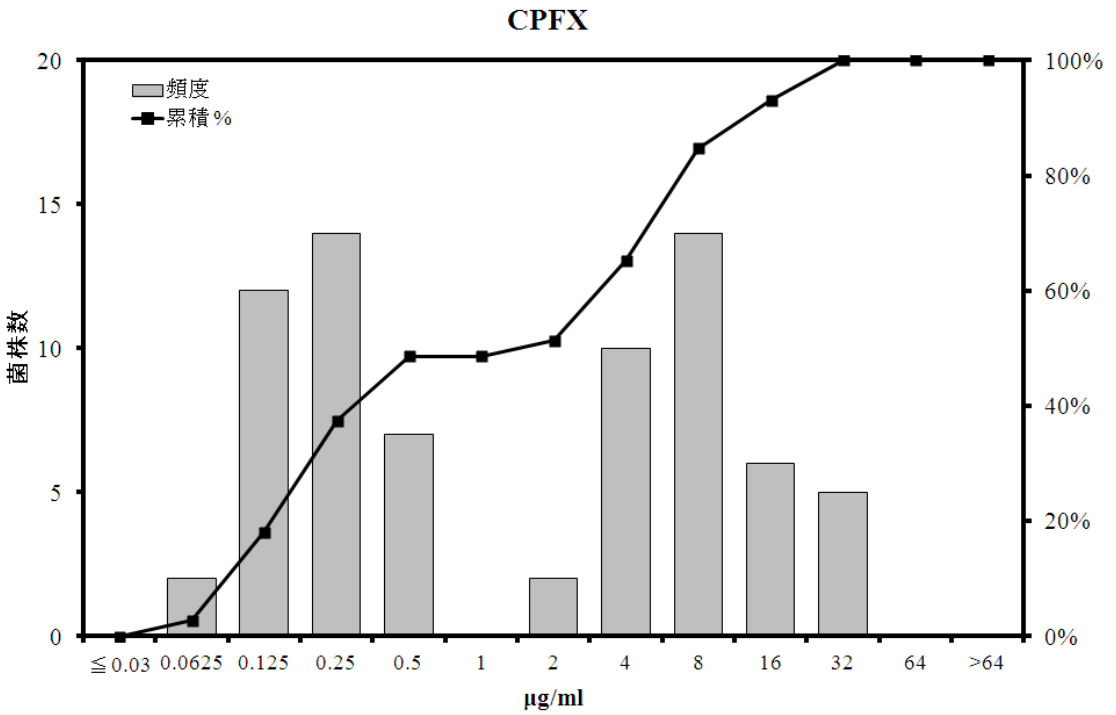


図 8　豚肝臓由来 *C. coli* の MIC 分布（CPFX）

3）市販鶏肉由来株の MIC と耐性出現頻度

市販鶏肉から分離された *Campylobacter* の Range、MIC_{50}、MIC_{90}、耐性菌株数及び耐性率を表 22、MIC 分布を表 23、薬剤耐性パターンを表 24 に示した。また二峰性が認められた *C. jejuni* の MIC 分布（TC、CPFX）を図 9、10 に示した。

①*C. jejuni*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 6 薬剤に認められ、耐性率は 1.0%（SM）～37.0%（NA）であった。TC、CPFX に対して、0.25μg/ml および 64μg/ml、0.125μg/ml および 16μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンに関しては 1～4 薬剤耐性の 11 パターンに分類され、4 薬剤耐性菌が 4 株、3 薬剤耐性菌が 21 株、2 薬剤耐性菌が 13 株、1 薬剤耐性菌が 15 株、感受性菌が 47 株であった。耐性株の内訳に関しては、TC-NA-CPFX の 3 薬剤耐性が 18 株（18.0%）で最も多く、次いで NA-CPFX の 2 薬剤耐性が 11 株（11.0%）、ABPC の 1 薬剤耐性が 8 株（8.0%）であった。

②*C. coli*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 6 薬剤に認められ、耐性率は 21.4%（CP）～42.9%（TC）であった。また薬剤耐性パターンに関しては 3 及び 6 薬剤耐性の 3 パターンに分類され、6 薬剤耐性菌が 3 株、3 薬剤耐性菌が 3 株、感受性菌が 8 株であった。

表22　*Campylobacter*の薬剤感受性試験（市販鶏肉）

薬剤名	種	菌株数	Range（μg/ml）	MIC_{50}（μg/ml）	MIC_{90}（μg/ml）	ブレークポイント（μg/ml）	耐性菌株数	耐性率（%）
ABPC	*C. jejuni*	100	1-64	8	32	32	15	15.0
	C. coli	14	1-8	8	8		0	0.0
SM	*C. jejuni*	100	0.5->256	1	2	32	1	1.0
	C. coli	14	0.5->256	2	>256		4	28.6
GM	*C. jejuni*	100	0.25-2	0.5	1		0	0.0
	C. coli	14	0.5-2	1	1		0	0.0
EM	*C. jejuni*	100	0.25-8	1	2	32	0	0.0
	C. coli	14	0.5->256	4	>256		4	28.6
TC	*C. jejuni*	100	≦0.125-256	0.5	128	16	30	30.0
	C. coli	14	0.25->256	0.5	256		6	42.9
CP	*C. jejuni*	100	1-16	2	4	16	2	2.0
	C. coli	14	1-32	8	16		3	21.4
NA	*C. jejuni*	100	2-256	8	256	32	37	37.0
	C. coli	14	4-256	8	256		5	35.7
CPFX	*C. jejuni*	100	0.125-64	0.25	16	4	35	35.0
	C. coli	14	0.125-64	0.25	32		5	35.7

表23　*Campylobacter*のMIC分布（市販鶏肉）

種	菌株数	薬剤名	MIC（μg/ml）														
			≦0.03	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
C. jejuni	100	ABPC			-	-	-	5	12	26	37	5	12	3	-	-	-
		SM			-	-	1	78	18	2	-	-	-	-	-	-	1
		GM			-	4	73	22	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			-	2	29	32	27	5	5	-	-	-	-	-	-
		TC			6	33	14	9	4	3	1	-	4	12	10	4	-
		CP			-	-	-	18	48	26	6	2	-	-	-	-	-
		NA			-	-	-	-	2	38	18	5	4	10	7	16	-
		CPFX	-	-	39	16	8	2	-	-	11	18	5	1			
C. coli	14	ABPC			-	-	-	2	1	1	10	-	-	-	-	-	-
		SM			-	-	1	3	5	1	-	-	-	-	1	-	3
		GM			-	-	4	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			-	-	1	2	1	5	1	-	-	-	-	2	2
		TC			-	3	5	-	-	-	-	-	-	2	2	1	1
		CP			-	-	-	2	3	1	5	2	1	-	-	-	-
		NA			-	-	-	-	-	3	6	-	-	1	1	3	-
		CPFX	-	-	6	3	-	-	-	-	3	-	1	1			

表24　*Campylobacter*の薬剤耐性パターン（市販鶏肉）

種	菌株数	感受性株	耐性株	耐性率（%）	耐性株の内訳												
					1薬剤耐性			2薬剤耐性		3薬剤耐性					4薬剤耐性		6薬剤耐性
					ABPC	TC	NA	ABPC-TC	NA-CPFX	ABPC-CP-NA	ABPC-NA-CPFX	SM-EM-TC	TC-NA-CPFX	CP-NA-CPFX	ABPC-TC-NA-CPFX	SM-TC-NA-CPFX	SM-EM-TC-CP-NA-CPFX
C. jejuni	100	47	53	53.0	8	6	1	2	11	1	1	-	18	1	3	1	-
C. coli	14	8	6	42.9	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	3

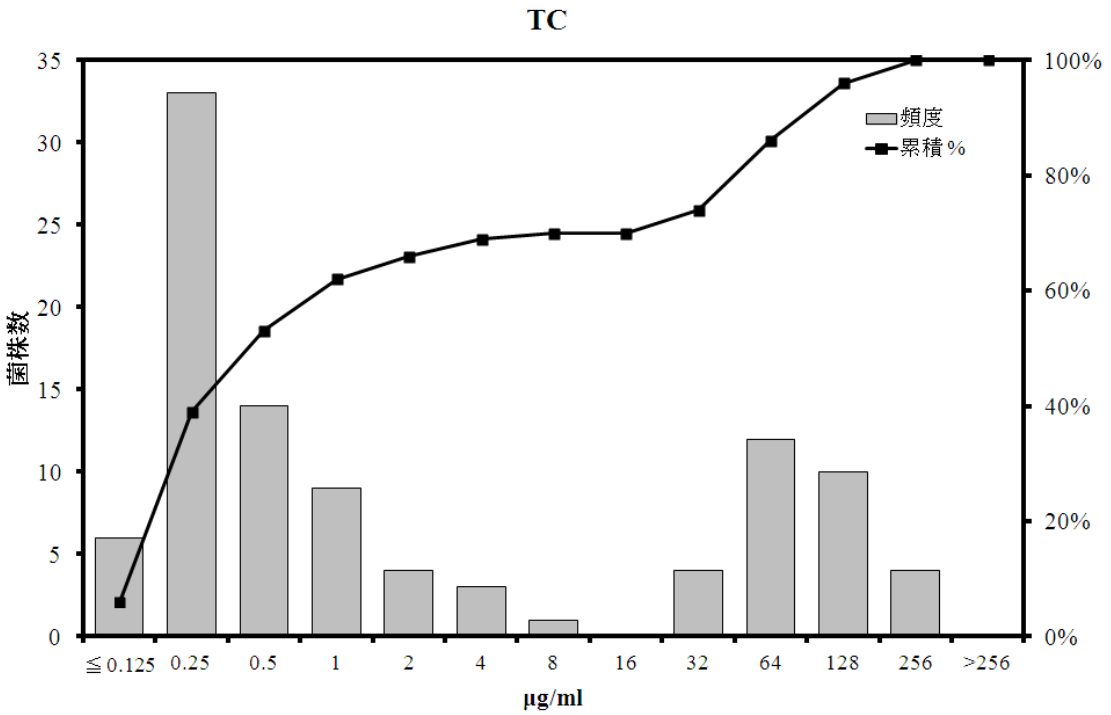


図 9　市販鶏肉由来 *C. jejuni* の MIC 分布（TC）

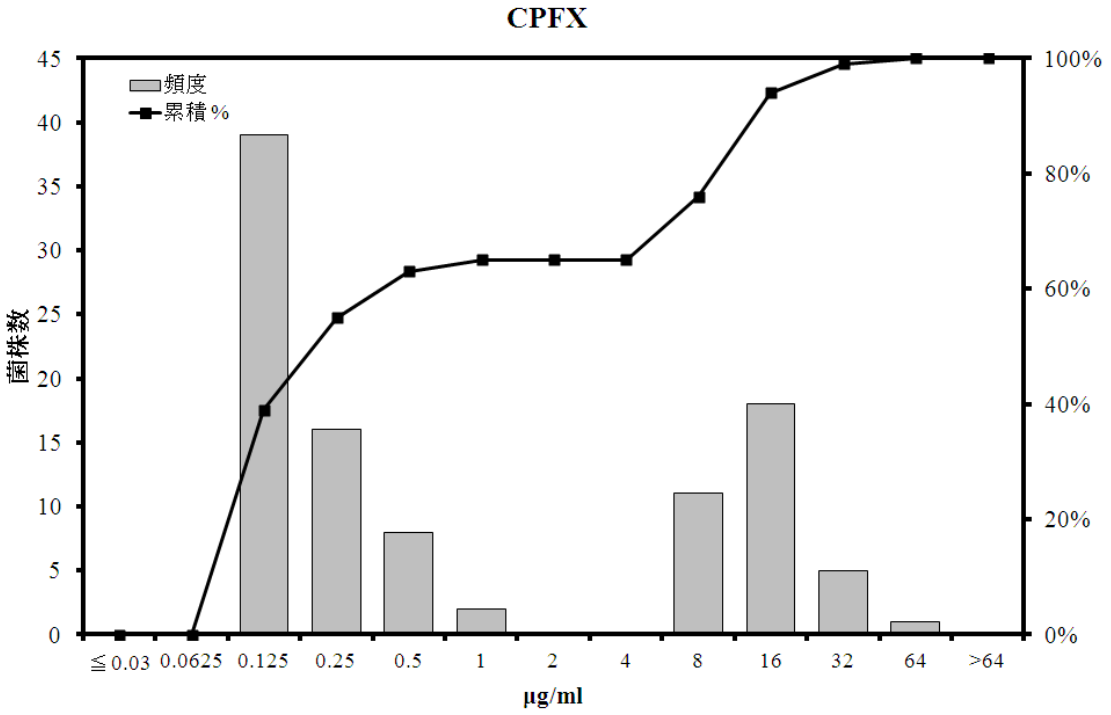


図 10　市販鶏肉由来 *C. jejuni* の MIC 分布（CPFX）

4)食鳥処理場鶏肉由来株の MIC と耐性出現頻度

食鳥処理場鶏肉から分離された *Campylobacter* の Range、MIC_{50}、MIC_{90}、耐性菌株数及び耐性率を表 25、MIC 分布を表 26、薬剤耐性パターンを表 27 に示した。また二峰性が認められた *C. jejuni* の MIC 分布（TC、CPFX）を図 11、12 に示した。

①*C. jejuni*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 5 薬剤に認められ、耐性率は 4.5%（SM）～43.9%（NA）であった。TC と CPFX に対して、0.25μg/ml および 64μg/ml、0.125μg/ml および 16μg/ml を MIC のピークとする二峰性が認められた。また薬剤耐性パターンに関しては 1～4 薬剤耐性の 12 パターンに分類され、4 薬剤耐性菌が 4 株、3 薬剤耐性菌が 13 株、2 薬剤耐性菌が 15 株、1 薬剤耐性菌が 8 株、感受性菌が 26 株であった。耐性株の内訳に関しては、NA-CPFX の 2 薬剤耐性が 10 株（15.2%）で最も多く、次いで TC-NA-CPFX の 3 薬剤耐性が 6 株（9.1%）、TC の 1 薬剤耐性が 5 株（7.6%）、ABPC-TC の 2 薬剤耐性が 5 株（7.6%）であった。

②*C. coli*

薬剤耐性株は供試した 8 薬剤のうち 7 薬剤に認められ、耐性率は 16.7%（ABPC、CP）～83.3%（TC）であった。また薬剤耐性パターンに関しては、2～6 薬剤耐性の 5 パターンに分類され、6 薬剤耐性菌が 1 株、5 薬剤耐性菌が 1 株、4 薬剤耐性菌が 1 株、3 薬剤耐性菌が 1 株、2 薬剤耐性菌が 1 株、感受性菌が 1 株であった。

表25　*Campylobacter*の薬剤感受性試験（食鳥処理場鶏肉）

薬剤名	種	菌株数	Range（μg/ml）	MIC_{50}（μg/ml）	MIC_{90}（μg/ml）	ブレークポイント（μg/ml）	耐性菌株数	耐性率（%）
ABPC	*C. jejuni*	66	1->256	8	64	32	14	21.2
	C. coli	6	2-32	8	32		1	16.7
SM	*C. jejuni*	66	0.5->256	1	2	32	3	4.5
	C. coli	6	2-256	128	256		4	66.7
GM	*C. jejuni*	66	0.25-2	0.5	1		0	0.0
	C. coli	6	1-2	1	2		0	0.0
EM	*C. jejuni*	66	0.5-8	1	4	32	0	0.0
	C. coli	6	4->256	8	>256		2	33.3
TC	*C. jejuni*	66	0.25-256	0.5	128	16	22	33.3
	C. coli	6	0.5-256	128	256		5	83.3
CP	*C. jejuni*	66	1-8	2	4	16	0	0.0
	C. coli	6	2-16	8	16		1	16.7
NA	*C. jejuni*	66	2->256	16	256	32	29	43.9
	C. coli	6	8->256	32	>256		4	66.7
CPFX	*C. jejuni*	66	0.0625-64	0.5	32	4	25	37.9
	C. coli	6	0.25-64	2	64		3	50.0

表26 *Campylobacter*のMIC分布（食鳥処理場鶏肉）

種	菌株数	薬剤名	MIC（μg/ml）														
			≦0.03	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
C. jejuni	66	ABPC			-	-	-	1	10	18	21	2	7	6	-	-	1
		SM			-	-	1	41	21	-	-	-	-	-	-	1	2
		GM			-	2	34	29	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			-	-	2	31	24	8	1	-	-	-	-	-	-
		TC			-	28	7	9	-	-	-	-	1	10	5	6	-
		CP			-	-	-	5	45	10	6	-	-	-	-	-	-
		NA			-	-	-	-	1	7	20	9	4	1	4	20	-
		CPFX	-	1	17	14	6	3	-	-	4	13	8	-			
C. coli	6	ABPC			-	-	-	-	1	-	3	1	1	-	-	-	-
		SM			-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	3	-
		GM			-	-	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
		EM			-	-	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	2
		TC			-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-
		CP			-	-	-	-	1	1	3	1	-	-	-	-	-
		NA			-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	1	2
		CPFX	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	2	1			

表27　*Campylobacter*の薬剤耐性パターン（食鳥処理場鶏肉）

種	菌株数	感受性株	耐性株	耐性率（%）	耐性株の内訳														
					1薬剤耐性			2薬剤耐性			3薬剤耐性					4薬剤耐性		5薬剤耐性	6薬剤耐性
					ABPC	TC	NA	ABPC-TC	EM-TC	NA-CPFX	ABPC-TC-NA	ABPC-NA-CPFX	SM-TC-NA	SM-NA-CPFX	TC-NA-CPFX	ABPC-TC-NA-CPFX	SM-TC-NA-CPFX	SM-EM-TC-NA-CPFX	ABPC-SM-TC-CP-NA-CPFX
C. jejuni	66	26	40	60.6	1	5	2	5	-	10	1	4	1	1	6	3	1	-	-
C. coli	6	1	5	83.3	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1

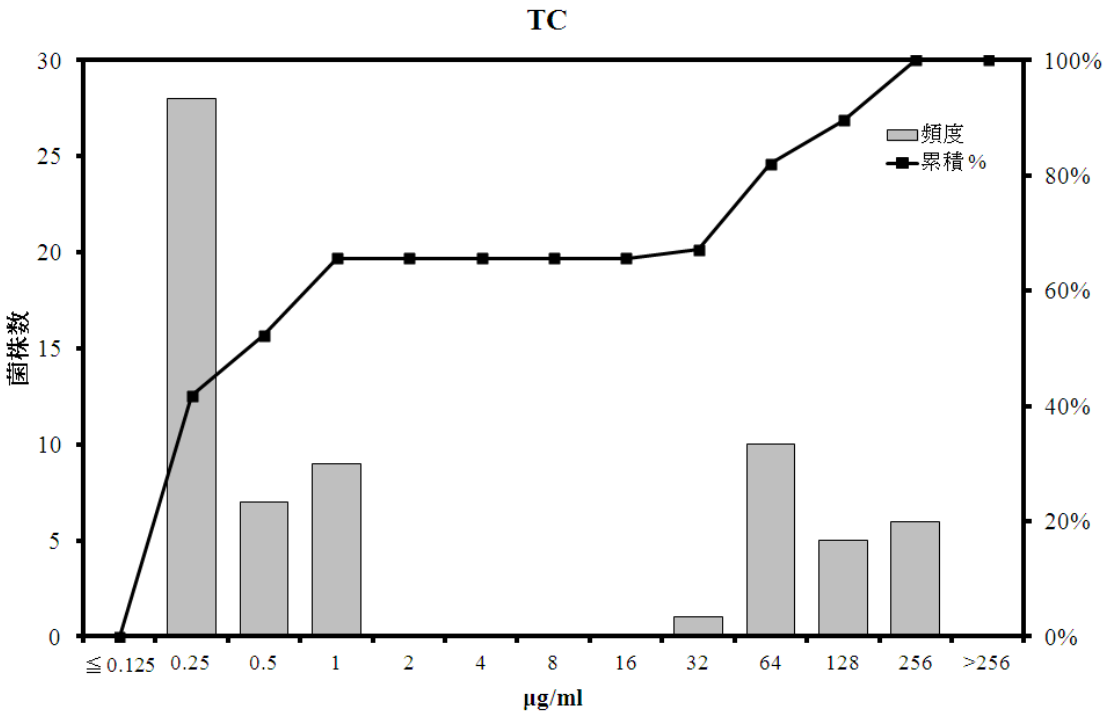


図 11　食鳥処理場鶏肉由来 *C. jejuni* の MIC 分布（TC）

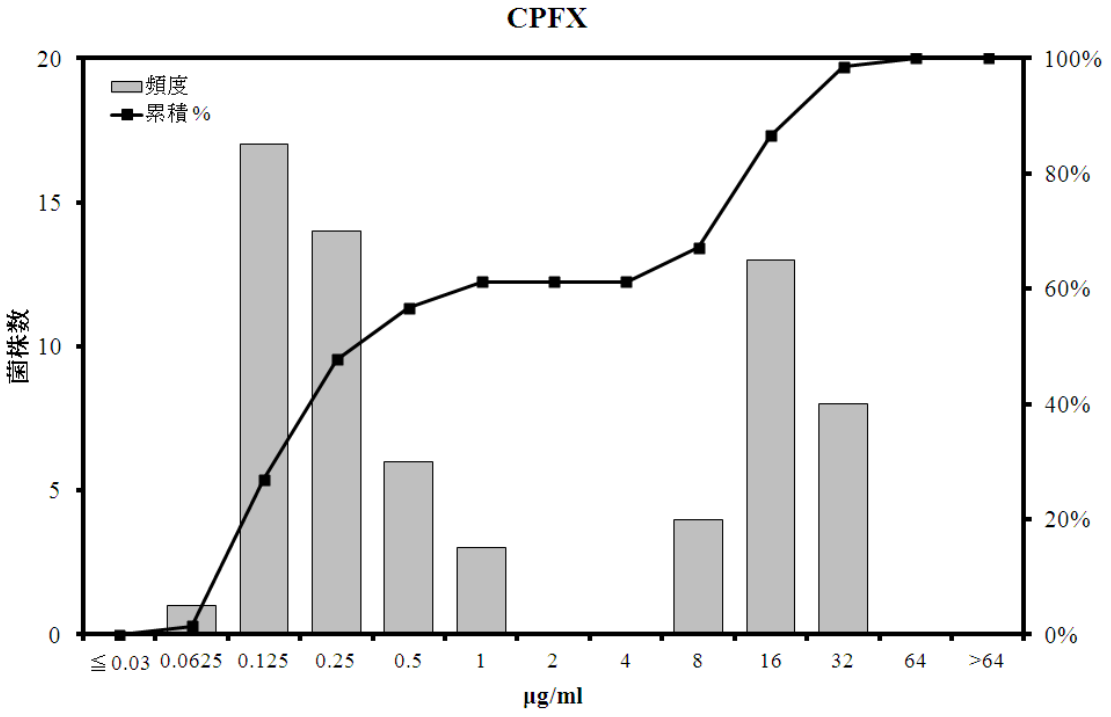


図 12　食鳥処理場鶏肉由来 *C. jejuni* の MIC 分布（CPFX）

5)牛肝臓、豚肝臓、鶏肉由来 *C. jejuni* の薬剤耐性パターン

牛肝臓、豚肝臓、市販鶏肉、食鳥処理場鶏肉から分離された *C. jejuni* 全 268 株の薬剤耐性パターンを表 28 に示した。薬剤耐性パターンに関しては 1～5 薬剤耐性の 20 パターンに分類され、5 薬剤耐性菌が 1 株、4 薬剤耐性菌が 13 株、3 薬剤耐性菌が 50 株、2 薬剤耐性菌が 46 株、1 薬剤耐性菌が 61 株、感受性菌が 97 株であった。耐性株の内訳に関しては、TC の 1 薬剤耐性が 44 株（16.4％）で最も多く、次いで TC-NA-CPFX の 3 薬剤耐性が 37 株（13.8％）、NA-CPFX の 2 薬剤耐性が 35 株（13.1％）であった。

また今回の調査において EM 耐性菌が 2 株分離され、薬剤耐性パターンは ABPC-EM-TC の 3 薬剤耐性が 1 株、ABPC-EM-TC-NA-CPFX の 5 薬剤耐性が 1 株であった。

表28　*C. jejuni*の薬剤耐性パターン

食品種	菌株数	感受性株	耐性株	耐性率(%)	薬剤耐性パターン																				
					1薬剤耐性				2薬剤耐性			3薬剤耐性										4薬剤耐性			5薬剤耐性
					ABPC	SM	TC	NA	ABPC-TC	TC-NA	NA-CPFX	ABPC-EM-TC	ABPC-TC-NA	ABPC-CP-NA	ABPC-NA-CPFX	SM-TC-NA	SM-TC-CP	SM-NA-CPFX	TC-NA-CPFX	CP-NA-CPFX	ABPC-TC-NA-CPFX	SM-TC-NA-CPFX	TC-CP-NA-CPFX	ABPC-EM-TC-NA-CPFX
牛肝臓	99	24	75	75.8	2	1	33	1	1	3	13	1	-	-	-	-	1	-	13	-	1	3	1	1
豚肝臓	3	0	3	100.0	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
市販鶏肉	100	47	53	53.0	8	-	6	1	2	-	11	-	-	1	1	-	-	-	18	1	3	1	-	-
食鳥処理場鶏肉	66	26	40	60.6	1	-	5	2	5	-	10	-	1	-	4	1	-	1	6	-	3	1	-	-
合計	268	97	171	63.8	11	2	44	4	8	3	35	1	1	1	5	1	1	2	37	1	7	5	1	1

6）牛肝臓、豚肝臓、鶏肉由来 *C. coli* の薬剤耐性パターン

牛肝臓、豚肝臓、市販鶏肉、食鳥処理場鶏肉から分離された *C. coli* 全 102 株の薬剤耐性パターンを表 29 に示した。薬剤耐性パターンに関しては 1～6 薬剤耐性の 25 パターンに分類され、6 薬剤耐性菌が 16 株、5 薬剤耐性菌が 13 株、4 薬剤耐性菌が 12 株、3 薬剤耐性菌が 23 株、2 薬剤耐性菌が 19 株、1 薬剤耐性菌が 10 株、感受性菌が 9 株であった。耐性株の内訳に関しては、TC-NA-CPFX の 3 薬剤耐性が 12 株（11.8％）で最も多く、次いで SM-TC の 2 薬剤耐性が 9 株（8.8％）、SM-EM-TC-NA-CPFX の 5 薬剤耐性が 9 株（8.8%）、ABPC-SM-EM-TC-NA-CPFX の 6 薬剤耐性が 9 株（8.8%）であった。

表29　*C. coli*の薬剤耐性パターン

食品種	菌株数	感受性株	耐性株	耐性率(%)	薬剤耐性パターン																							
					1薬剤耐性		2薬剤耐性							3薬剤耐性					4薬剤耐性					5薬剤耐性			6薬剤耐性		
					SM	TC	ABPC-TC	SM-TC	SM-CP	SM-NA	EM-TC	TC-NA	NA-CPFX	ABPC-SM-TC	SM-EM-TC	SM-TC-NA	EM-TC-NA	TC-NA-CPFX	ABPC-SM-TC-NA	SM-EM-TC-NA	SM-TC-CP-NA	SM-TC-NA-CPFX	EM-TC-NA-CPFX	ABPC-SM-TC-NA-CPFX	SM-EM-TC-NA-CPFX	EM-TC-CP-NA-CPFX	ABPC-SM-EM-TC-NA-CPFX	ABPC-SM-TC-CP-NA-CPFX	SM-EM-TC-CP-NA-CPFX
牛肝臓	10	0	10	100.0	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
豚肝臓	72	0	72	100.0	6	3	1	9	1	2	1	-	2	1	5	2	1	3	1	3	1	5	1	3	8	1	9	-	3
市販鶏肉	14	8	6	42.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
食鳥処理場鶏肉	6	1	5	83.3	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-
合計	102	9	93	91.2	6	4	1	9	1	2	2	1	3	1	6	3	1	12	1	3	1	6	1	3	9	1	9	1	6

7）CPFX 耐性株の地域分布

牛肝臓、豚肝臓、市販鶏肉、食鳥処理場鶏肉から分離された *C. jejuni*、*C. coli* のうち、CPFX に対して耐性を示した菌株を地域毎（北海道・東北、関東、中部、関西、中国、四国、九州・沖縄）で整理し、表 30 に示した。

①*C. jejuni*

牛肝臓由来の CPFX 耐性株の出現状況は 0%～53.1%であり、九州・沖縄が 17 株（53.1%）で最も多く、次いで北海道・東北の 6 株（18.8%）であった。

市販鶏肉由来の CPFX 耐性株の出現状況は 0%～54.3%であり、九州・沖縄が 19 株（54.3%）で最も多く、次いで北海道・東北の 5 株（14.3%）であった。

食鳥処理場鶏肉由来の CPFX 耐性株の出現状況は 0%～64.0%であり、九州・沖縄が 16 株（64.0%）で最も多く、次いで北海道・東北の 7 株（28.0%）であった。

全体として、北海道・東北、九州・沖縄が多く、その他の地域は低い傾向であった。

②*C. coli*

豚肝臓由来の CPFX 耐性株の出現状況は 0%～54.3%であり、関東が 19 株（54.3%）で最も多く、次いで北海道・東北の 8 株（22.9%）であった。

牛肝臓、市販鶏肉、食鳥処理場鶏肉からも検出数は少ないものの CPFX 耐性株が認められた。

表30　CPFX耐性株の地域分布

食品種	種	耐性株	地域						
			北海道･東北	関東	中部	関西	中国	四国	九州･沖縄
牛肝臓	*C. jejuni*	32	6(18.8%)	2(6.3%)	4(12.5%)	2(6.3%)	1(3.1%)	0	17(53.1%)
	C. coli	8	2(25.0%)	0	0	0	1(12.5%)	1(12.5%)	4(50.0%)
豚肝臓	*C. jejuni*	2	0	1(50.0%)	0	0	0	0	1(50.0%)
	C. coli	35	8(22.9%)	19(54.3%)	3(8.6%)	0	0	0	5(14.3%)
市販鶏肉	*C. jejuni*	35	5(14.3%)	4(11.4%)	0	2(5.7%)	1(2.9%)	4(11.4%)	19(54.3%)
	C. coli	5	2(40.0%)	0	0	0	0	0	3(60.0%)
食鳥処理場鶏肉	*C. jejuni*	25	7(28.0%)	0	1(4.0%)	1(4.0%)	0	0	16(64.0%)
	C. coli	3	0	0	0	0	0	0	3(100.0%)

地域
北海道･東北：北海道、青森県、岩手県、宮城県、秋田県、山形県、福島県
関東：茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県
中部：新潟県、富山県、石川県、福井県、山梨県、長野県、岐阜県、静岡県、愛知県
関西：三重県、滋賀県、京都府、大阪府、兵庫県、奈良県、和歌山県
中国：鳥取県、島根県、岡山県、広島県、山口県
四国：徳島県、香川県、愛媛県、高知県
九州･沖縄：福岡県、佐賀県、長崎県、熊本県、大分県、宮崎県、鹿児島県、沖縄県

8）PFGE 解析

CPFX 耐性 *C. jejuni* および *C. coli* の PFGE による電気泳動図および平均距離法（UPGMA 法）により作成した系統樹を、図 13～図 16 に示した。

CPFX 耐性 *C. jejuni*94 株および *C. coli*51 株のうち、本調査の条件で適切な消化断片の得られた *C. jejuni*73 株および *C. coli*27 株の計 100 株について系統樹を作成したところ、少なくとも牛肝臓由来 *C. jejuni* は 17 パターン、豚肝臓由来 *C. coli* は 19 パターン、市販鶏肉由来 *C. jejuni* は 19 パターン、食鳥処理場由来 *C. jejuni* は 19 パターンに区別され、動物種や菌種に関わらず、多様な菌株が散在していると考えられた。また PFGE パターンが同一であると判断された菌株は、*C. jejuni* では 11 パターン（j-1 から j-11）、*C. coli* では 3 パターン（c-1 から c-3）存在した。同一の生産地由来の菌株で同一の PFGE パターンを示す場合が多かったが、j-1（生産地 A と D, 牛肝臓由来）、j-3（生産地 A と R, 牛肝臓由来）、j-4（生産地 B、K、D, 牛肝臓由来）、j-8（生産地 E と B, 市販鶏肉由来）のように異なる生産地由来の菌株で同一の PFGE パターンを示す例も存在した。この中で j-1 に関しては、生産地 A と生産地 D は地理的に大きく離れており同一の農場由来の汚染とは考えられず、またと畜日時も異なる事から、と畜時に同じ *Campylobacter* に汚染された可能性は低いと考えられた。また j-8 に関しても、生産地 E と生産地 B は地理的に大きく離れており同一の農場由来の汚染や、食鳥処理場での交差汚染の可能性も考えにくく、PFGE で同一のパターンを示す菌株が散在していると考えられた。

次に PFGE パターンが同一であった *C. jejuni* および *C. coli* から作成した系統樹を MIC 値と合わせ、図 17、18 に示した。なお *C. coli* の系統樹は、牛肝臓由来の 6 株を追加して作成した。

PFGE パターンと薬剤耐性パターンが一致したのは *C. jejuni* で 7 パターン、*C. coli* で 5 パターン（牛肝臓由来の *C. coli*2 パターンを含む）であった。逆に、*C. jejuni* では 4 パターンが異なっていた。PFGE パターンと薬剤耐性の関連性を見ると、同一の PFGE パターンを示した菌株は薬剤耐性パターンも同様である場合が多かった。しかし、*C. jejuni*（図 17）の□で囲んだ同一の PFGE パターンの菌株間で、SM、TC、CP のいずれかに対する薬剤耐性に相違が認められたため、さらに詳細な解析が必要と考えられた。

CPFX 耐性 *C.jejuni*74 株（豚肝臓由来の *C. jejuni*1 株を含む）の系統樹を図 19 に示した。この中で食鳥処理場由来の菌株番号 330 がj-1 と、市販鶏肉由来の菌株番号 215 がj-9 と同一のパターンと判断された。菌株番号 330 の生産地は E であり、生産地 A、D とは地理的に大きく離れていた。一方、菌株番号 215 とj-9 の生産地は E で同一であり、同じ由来の菌株であることが疑われた。

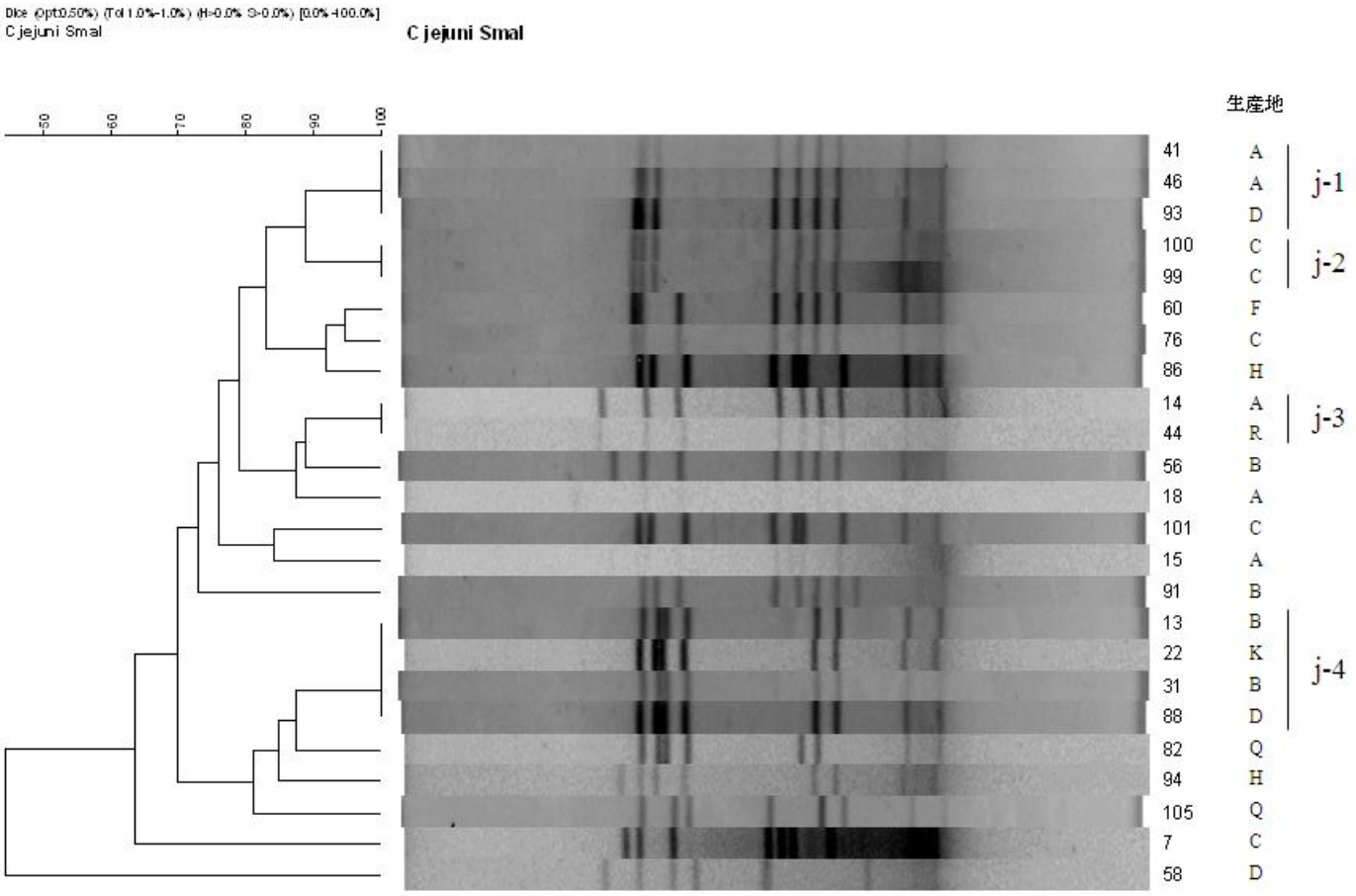


図13　牛肝臓由来CPFX耐性*C. jejuni*のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

＊j-1～j-4はPFGEパターンが同一であると判断された菌株

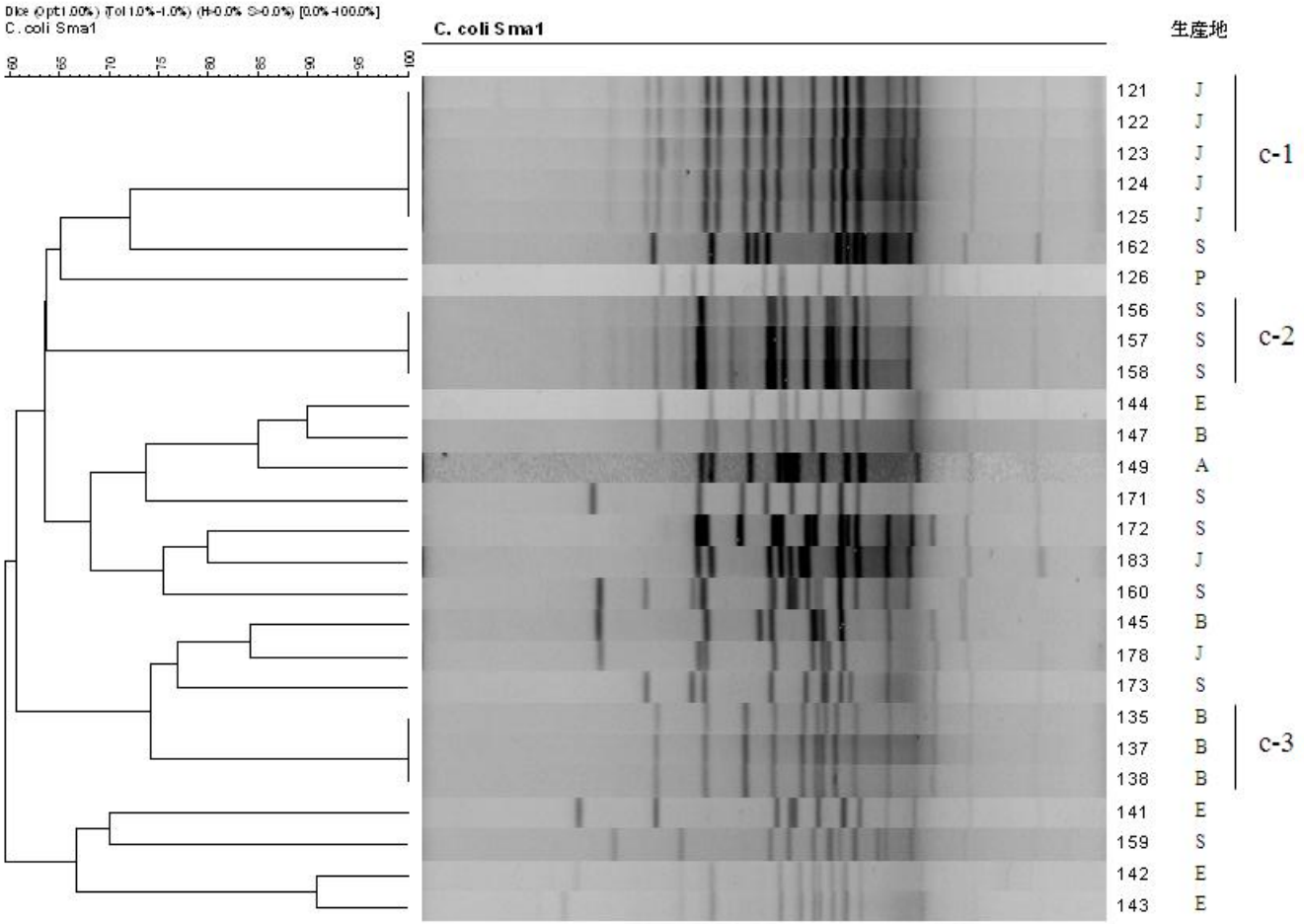


図14　豚肝臓由来CPFX耐性*C. coli*のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

＊c-1～c-3はPFGEパターンが同一であると判断された菌株

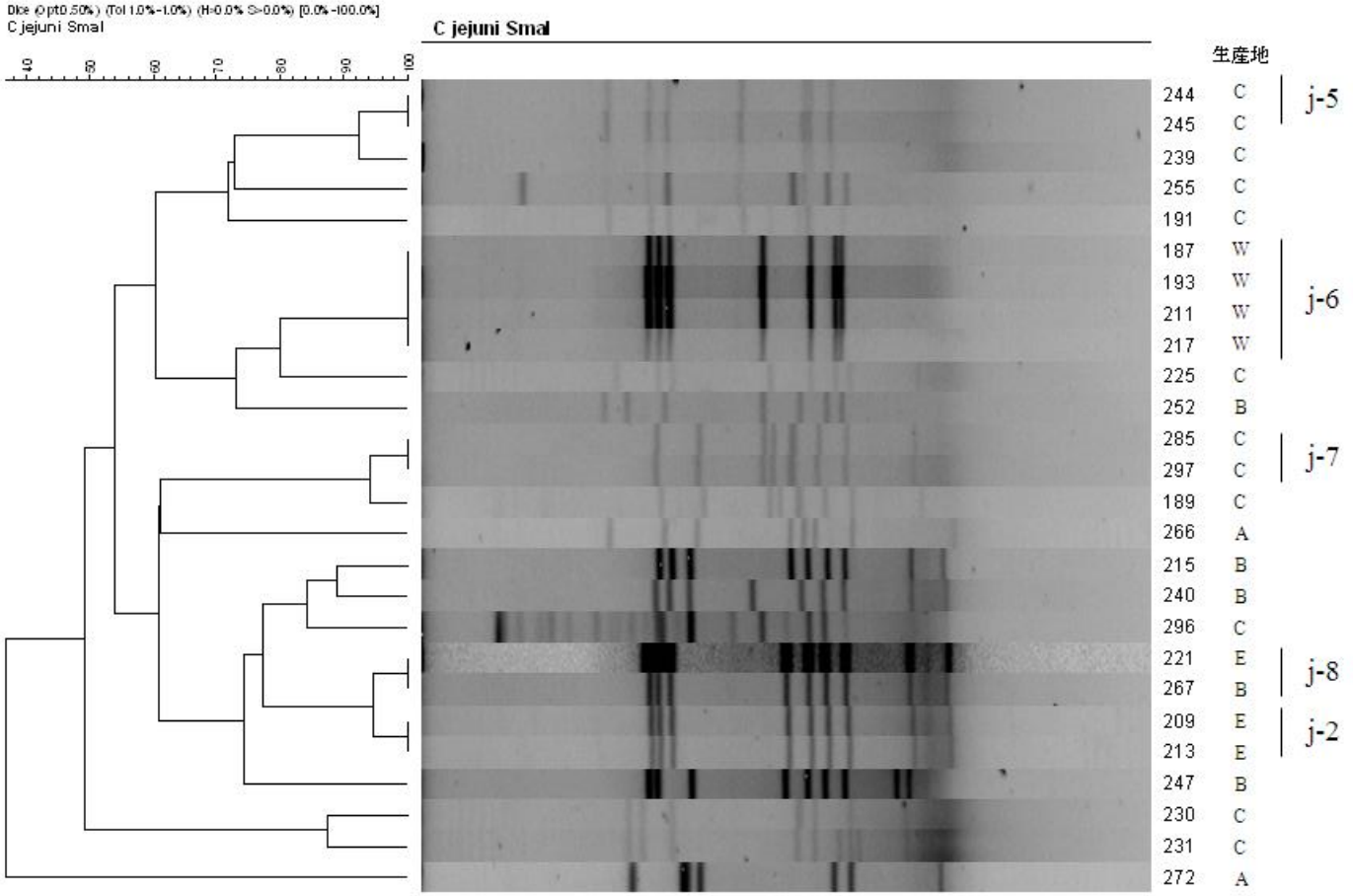


図15　市販鶏肉由来CPFX耐性*C. jejuni*のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

＊j-2、j-5～j-8はPFGEパターンが同一であると判断された菌株

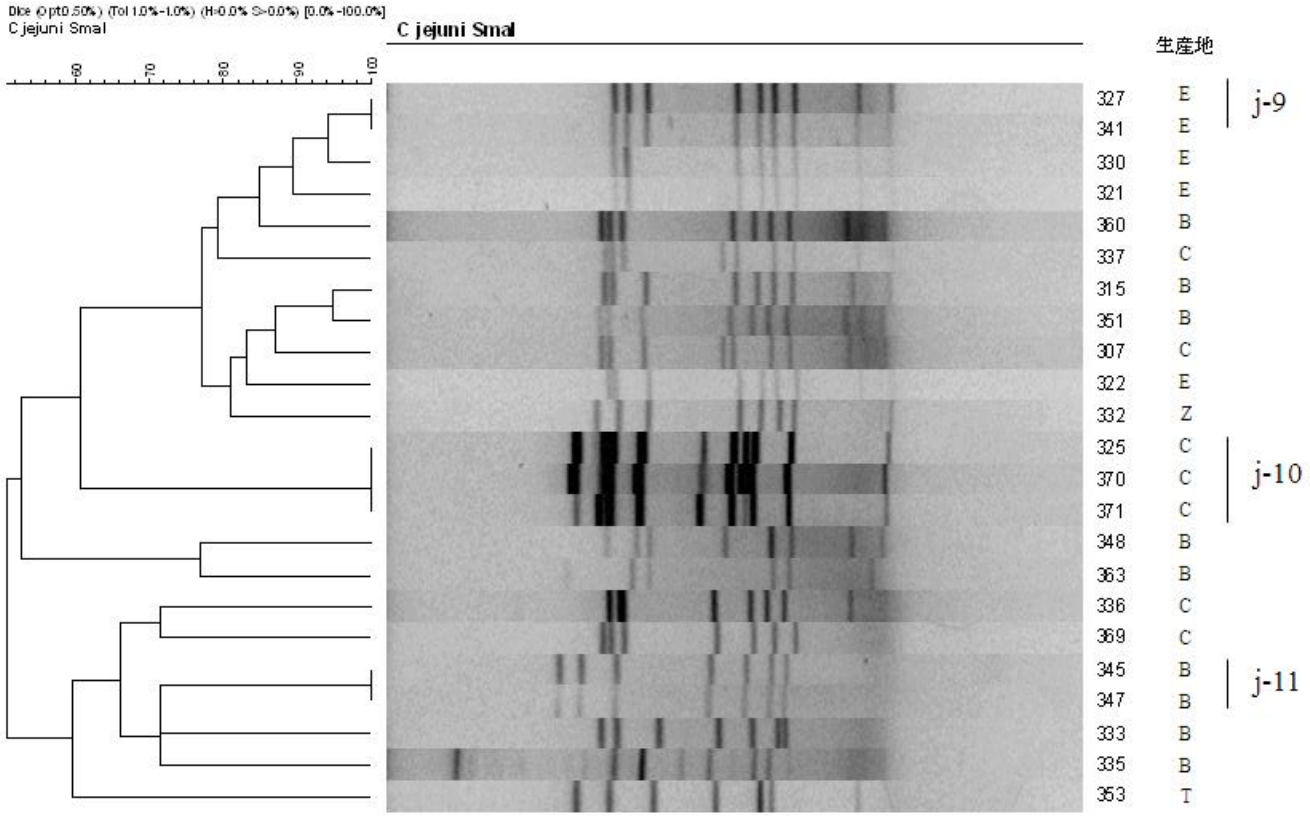
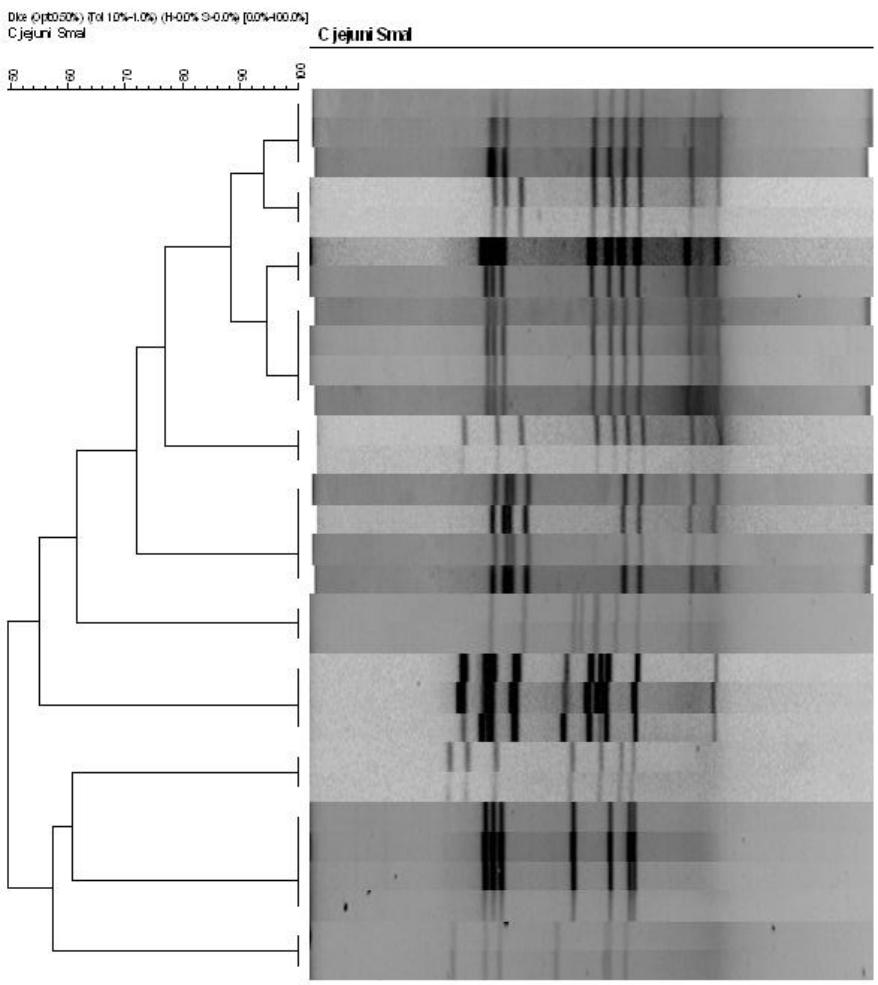


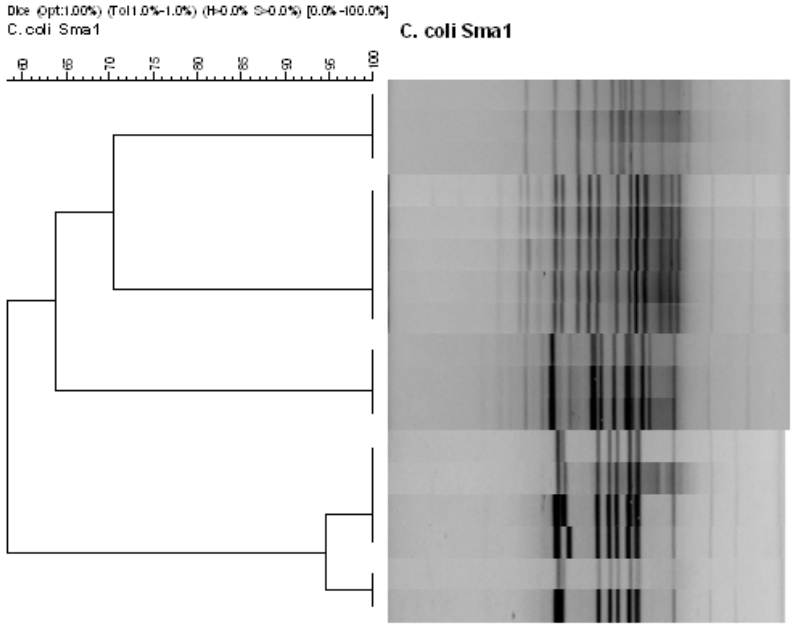
図16　食鳥処理場鶏肉由来CPFX耐性*C. jejuni*のPFGEによる電気泳動図及び系統樹
＊j-9からj-11はPFGEパターンが同一であると判断された菌株



		生産地	MIC(μg/ml) ABPC	SM	GM	EM	TC	CP	NA	CPFX
41	j-1	A	2	1	0.5	1	0.25	2	32	4
46		A	2	2	0.5	1	128	2	128	8
93		D	2	1	0.5	2	256	64	256	16
327	j-9	E	8	1	0.5	1	0.25	2	256	32
341		E	8	1	0.5	2	0.25	2	256	32
221	j-8	E	4	1	0.5	0.5	64	1	32	8
267		B	4	2	0.5	1	256	2	64	16
100	j-2	C	2	>256	0.5	0.5	64	0.5	32	8
209		E	2	1	0.5	0.5	128	1	32	8
213		E	2	1	0.5	0.5	128	1	64	8
99		C	4	>256	0.5	0.5	64	1	64	8
14	j-3	A	2	0.5	0.5	0.5	64	1	32	4
44		R	2	1	0.5	0.5	≦0.125	1	32	8
13	j-4	B	2	1	0.5	0.5	≦0.125	2	128	8
22		K	2	1	0.5	2	≦0.125	2	128	16
31		B	2	1	0.5	2	64	2	128	4
88		D	4	2	0.5	2	128	4	128	16
285	j-7	C	8	2	1	2	8	16	256	32
297		C	8	1	1	2	4	8	256	32
325	j-10	C	64	1	1	1	0.25	2	256	16
370		C	64	1	1	1	0.25	2	256	8
371		C	64	2	1	1	0.25	2	256	8
345	j-11	B	8	1	0.5	2	64	4	256	16
347		B	8	1	0.5	4	64	4	256	16
187	j-6	W	32	1	0.5	0.5	256	4	64	16
193		W	16	1	0.5	0.5	128	2	64	8
211		W	32	1	0.5	0.5	256	4	64	16
217		W	32	1	0.5	0.5	128	1	32	8
244	j-5	C	8	1	0.5	2	64	4	256	16
245		C	8	1	0.5	2	64	4	256	16

図17　PFGEパターンが同一であった*C. jejuni*におけるPFGEによる電気泳動図・系統樹およびMIC値

◀—▶：牛肝臓由来株　◀- -▶：市販鶏肉由来株　◀—▶：食鳥処理場鶏肉由来株



	生産地	MIC(μg/ml) ABPC	SM	GM	EM	TC	CP	NA	CPFX
135	B	2	128	1	256	64	4	128	8
137	B	4	128	1	256	128	4	128	16
138	B	4	128	0.5	256	64	4	128	16
121	J	64	>256	1	256	32	2	64	4
122	J	64	>256	1	256	32	2	32	4
123	J	64	>256	1	>256	32	2	128	8
124	J	64	>256	1	256	32	2	64	4
125	J	64	>256	0.5	256	32	2	64	4
156	S	128	128	1	8	128	8	256	32
157	S	128	128	1	8	128	8	256	32
158	S	128	128	1	8	128	4	256	32
4	B	8	1	0.5	8	256	4	128	16
6	A	4	4	1	8	256	2	128	16
8	A	4	4	1	2	256	4	128	16
85	D	8	2	0.5	8	256	4	128	16
21	U	4	2	0.5	8	256	4	128	16
27	V	8	1	0.5	1	256	4	128	16

図18　PFGEパターンが同一であった*C. coli*におけるPFGEによる電気泳動図・系統樹およびMIC値

←→ :牛肝臓由来株　　←--→ :豚肝臓由来株

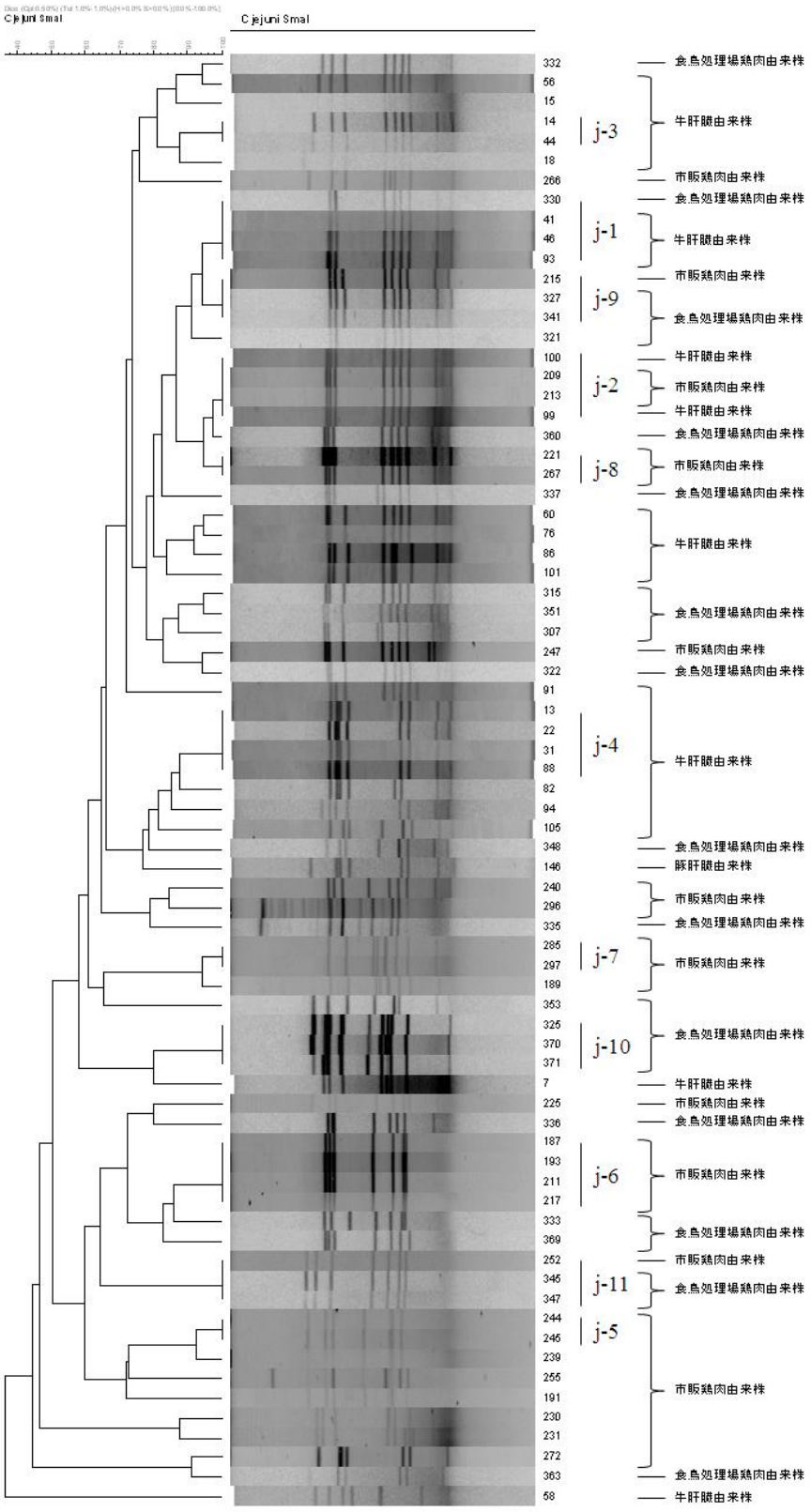


図19　CPFX耐性*C. jejuni*のPFGEによる電気泳動図及び系統樹

9)EM 耐性菌株の解析

EM 耐性 *C. jejuni*2 株および *C. coli*38 株のうち、本調査の条件で適切な PCR 産物の得られた 28 株について、制限酵素 *Bsa* I（図 20）および *Bce*A I（図 21）で処理し、点変異の確認を行った。今回の方法では、23S rRNA 遺伝子の 2075 位におけるアデニンからグアニンへの点変異*を持つ 316bp の産物は、*Bsa* I 処理により 201bp と 115bp の 2 つの産物を生じる。このことから、Lane17、18 および 22 以外の 25 株は A2075G の点変異があると考えられ、EM 耐性株の 89.3%（25/28）で認められた。EM 耐性株は豚由来の *C. coli* を中心に多く認められており、A2075G の点変異が耐性機構と考えられている。本調査では、*C. coli* だけでなく、牛肝臓由来の *C. jejuni*2 株についても EM 耐性が認められ、PCR-RFLP により A2075G の点変異が認められた。

一方、23SrRNA 遺伝子の 2074 位におけるアデニンからシトシンへの点変異を持つ 316bp の産物は、*Bce*A I 処理により 153bp、98bp、41bp、24bp の 4 つの産物を生じる。*C. jejuni*2 株について *Bce*A I 処理をした結果、消化が不十分ではあるが 251bp、65bp、41bp と推定される 3 つの産物が確認された。A2074C の点変異がある場合には、251bp から 153bp と 98bp の 2 つの産物を生じるが、*C. jejuni*2 株については認められず、A2074C の点変異は無いと考えられた。

**Helicobacter pylori* の A2142G、*Escherichia coli* の A2059G に相当

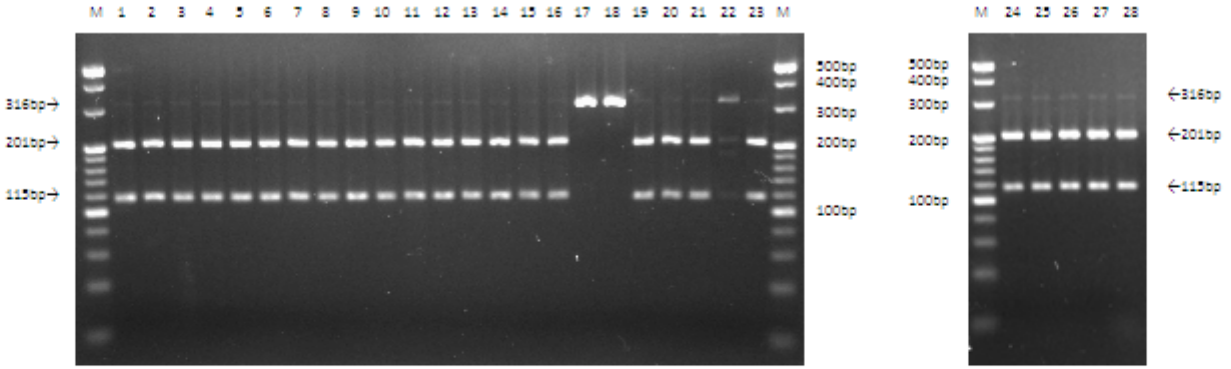


図20　PCR-RFLPパターン（*Bsa* I 処理）

Lanes：M,20bp DNA Ladder(TAKARA Bio.) 1,60(*C. jejuni*) 2,87(*C. jejuni*) 3,112(*C. coli*) 4,115(*C. coli*) 5,121(*C. coli*) 6,130(*C. coli*) 7,133(*C. coli*) 8,134(*C. coli*) 9,135(*C. coli*) 10,140(*C. coli*) 11,147(*C. coli*) 12,148(*C. coli*) 13,150(*C. coli*) 14,151(*C. coli*) 15,152(*C. coli*) 16,159(*C. coli*) 17,165(*C. coli*) 18,166(*C. coli*) 19,171(*C. coli*) 20,178(*C. coli*) 21,181(*C. coli*) 22,185(*C. coli*) 23,186(*C. coli*) 24,227(*C. coli*) 25,232(*C. coli*) 26,281(*C. coli*) 27,286(*C. coli*) 28,338(*C. coli*)

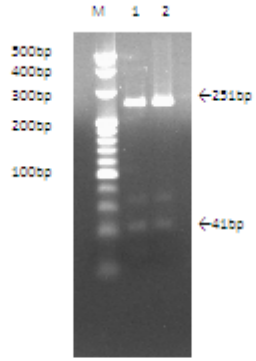


図21　PCR-RFLPパターン（*Bce*A Ⅰ処理）

Lanes：M,20bp DNA Ladder(TAKARA Bio.) 1,60(*C. jejuni*) 2,87(*C. jejuni*)

4.薬剤耐性株の保存

本調査で分離された菌株に関しては、-80℃で凍結保存した。

凍結保存した菌株数を表 31 に示した。

表 31 凍結保存に供した分離菌株数

菌種	菌株数
C. jejuni	268
C. coli	102
合計	370

以 上