

# 學術研究報告編



[短報]

## 牛用ワクチン接種後の牛精製ツベルクリン (PPD) 皮内反応への影響に関する実験的調査

岩本聖子, 小澤真名緒, 小島明美

(令和4年7月27日受付、令和4年11月7日受理)

[BRIEF NOTE]

### **Intradermal tuberculin test with bovine purified protein derivative after vaccination for calves**

Shoko IWAMOTO, Manao OZAWA, Akemi KOJIMA

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,*

*1-15-1 Tokura, Kokubunji-Shi, Tokyo, 185-8511 Japan*

(Received: 27th Jul 2022, Accepted: 7th Nov 2022)

#### **Abstract**

We prepared 8 calves immunized with domestic bacterial or viral bovine vaccines widely distributed in Japan, human BCG in subcutaneous as a positive control and unvaccinated negative controls; then all the animals were subsequently injected with bovine purified protein derivative (PPD) intradermally according to the dosage and administration of PPD. After 72 hours of PPD injection, the skin thickness at the test site was measured, which revealed a negative result in vaccinated and unvaccinated calves but a positive result in the calf immunized with human BCG. This finding suggested that PPD can be used in bovine tuberculosis screening test with no interaction of hereby tested commercial vaccines distributed in Japan.

#### **要旨**

牛8頭を用いて、国内のみで使用されている牛用ワクチン接種牛、無接種対照牛及び人用BCGワクチン5ドーズを皮下接種した陽性対照牛を作出し、用法用量に従い牛精製ツベルクリン(PPD)を皮内注射した。72時間後に注射部位の皮膚厚を測定し、注射前の皮膚厚と比較した。その結果、牛用ワクチン接種牛及び無接種対照牛ではツベルクリン検査陰性であり、陽性対照牛では検査陽性であった。牛PPDは日本の市販ワクチンに影響されず、牛結核スクリーニング検査に利用可能であることが示唆された。

#### **緒言**

牛の結核病は、家畜伝染病予防法において家畜伝染病に指定されている。我が国では全国サーベイランスによる摘発とう汰によって清浄化を達成したと考えられており、令和3年度からは清浄性維持サーベイランスが開始された。本病のスクリーニング検査には、長らく既承認のツベルクリン製剤が用いられてきたが、当該製剤は既に製造が終了した。これに代わる製剤として、令和3年に *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) AN5株由来のPPD(以後「牛PPD」とする)が新たに承認された。牛PPDは、従来の *Mycobacterium tuberculosis* を主成分とするPPD(以後「ヒトPPD」とする)よりも牛結核病に対する特異

性が高いとされ (Leslie ら 1975)、国際的なツベルクリン皮内反応法の抗原として採用されている (WOAH 2022)。しかしながら、国内のみで使用されているワクチンを接種した牛に牛 PPD を使用した場合の検査への影響については未検討であることから、当所において実際に牛を用いた実験的調査を実施した。

また、牛 PPD による *M. bovis* 感染牛のツベルクリン陽性反応を担保するため、陽性対象牛の作出方法を検討した。

## 材料及び方法

### 供試牛及びワクチン接種

国内産のホルスタイン系の牛 8 頭を導入し、3 頭に市販の牛用 5 種混合アジュバント加トキソイド [一般名：牛クロストリジウム感染症 5 種混合 (アジュバント加) トキソイド (シード)] を用法用量通り 2 回筋肉内接種した。また、1 頭には 6 種混合ウイルスワクチン [一般名：牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢 2 価・牛パラインフルエンザ・牛 RS ウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン] を用法用量通り筋肉内に単回接種した。さらに、ツベルクリン検査の陽性対照牛として、1 頭に人用 BCG ワクチン 5 ドーズを皮下接種した。残り 3 頭は無接種対照群とした。供試牛及びワクチン接種の別について表 1 にまとめた。

### 牛 PPD によるツベルクリン反応

牛 PPD を用法用量通りに、牛用 5 種混合アジュバント加トキソイドを接種した 3 頭の牛には 2 回目接種 4 週間後に、6 種混合ウイルスワクチンを接種した牛には接種 13 週間後に、人用 BCG ワクチンを接種した牛には接種 6 週間後に、無接種対照群と併せて、それぞれ 0.1 mL を頸部に皮内注射した。

注射予定部位はあらかじめ 5 cm 四方を剃毛して皮膚をつまみ、皮膚厚をカリパスで測定した。皮内注射後、72 時間時点で、注射部位の疼痛、注射部位周囲の浮腫、滲出物、壊死、リンパ節の腫脹等の臨床徴候の有無を観察するとともに、注射部位の皮膚厚を測定した。皮膚厚の測定は、2 名の測定者によりそれぞれ 3 回ずつ実施し、測定者ごとの測定値から平均値及び標準偏差を算出するとともに、計 6 回のすべての測定値から平均値及び標準偏差を算出した。

注射前と 72 時間時点の皮膚厚の測定値及び臨床徴候から、以下の基準で陽性、疑反応又は陰性を判定した。

- 陽性：臨床徴候の発現、又は注射部位の皮膚の厚さが 4 mm 以上増加した場合
- 疑反応：臨床徴候の発現がなく、注射部位の皮膚の厚さが 2 mm を超え 4 mm 未満増加した場合
- 陰性：臨床徴候の発現がなく、注射部位の皮膚の厚さが 2 mm 以下の増加である場合

### 実験成績

ツベルクリン検査の結果は表 1 のとおりであった。ワクチン接種牛及び無接種対照牛はいずれの個体も陰性であった一方、BCG ワクチン接種牛では注射前と注射後の平均皮膚厚の差が 11.57 mm であり、陽性と判定された。いずれの牛においても臨床徴候は認められなかった。

判定者ごとの測定値の標準偏差は注射前で最大 0.27 及び 0.39、注射後では 0.21 及び 0.37 であった。また、2 名の判定者による計 6 回の測定値の標準偏差は注射前で最大 0.67 mm、注射後で 0.30 mm であった。

## 考察

牛結核の清浄性維持サーベイランスとして、現在は対象群を指定した検査が実施されている。このうちスクリーニング検査においては、牛結核を引き起こさないマイコバクテリウム属の感染により偽陽性とな

る可能性がある (WOAH 2022)。日本ではマイコバクテリウム属の細菌を主成分とした動物用ワクチンは承認及び使用はされていないものの、市販ワクチンの使用が偽陽性の原因となる可能性が否定されていなかったため、子牛に使用されるワクチンのうち販売数量の多い2種類について調査した。

今回の結果では、いずれのワクチン接種牛でもツベルクリン検査は陰性であり、牛 PPD は少なくとも使用した市販ワクチンに含まれる5種類の細菌由来成分及び6種類のウイルス由来成分には影響されず、サーベイランスの信頼性を低下させないことが示唆された。

皮膚厚の測定は手技によるばらつきの影響を考慮し、複数名で複数回実施することとした。注射後の測定のばらつきは注射前のそれに比べ小さくなったことから、試験実施者の手技習熟により、正確な判定が可能となると考えられた。

これまで、陽性対照牛の作出には生菌又は死菌による感作が試みられている (Chen ら 2014; Doherty ら 1996; Radunz ら 1985; Rennie ら 2010; Whipple ら 2001)。牛型結核菌である *M. bovis* は、人用ワクチンの主成分として汎用されている弱毒牛型結核菌 BCG 株を除き、家畜伝染病予防法によりその所持において保管、取扱施設の構造設備要件等の規制が行われている。このため、生菌を用いた感作は、供試動物を封じ込め施設で飼養管理するのが困難である一方、死菌感作ではアジュバントの混合による賦活化を行った上で複数回の感作をしなければならず長期の飼養管理が必要となる。Buddle ら (2013) は、BCG 生ワクチン5ドーズの牛への接種によるツベルクリン検査陽性牛の作出に成功していることから、これを応用し、日本国内で市販されている人用 BCG ワクチンを用いて陽性対照牛の作出を試みたところ、陽性判定が得られ、BCG ワクチンの利用により短期間で簡便かつ確実な陽性対照の作出が可能であった。なお、人用 BCG ワクチンの牛への接種は人用医薬品の適応外使用であることから、試験研究目的外での使用は認められていない。

本試験では、ホルスタイン系の牛に対して計11種類の細菌及びウイルス抗原を含む国内製造ワクチン2製品を接種し、これらの牛用ワクチン成分が、新規に承認された牛 PPD によるツベルクリン反応に影響を及ぼさないことを明らかにした。牛品種によるツベルクリン反応の差異は、これまでも大きな問題となっていなかったことを踏まえると、牛 PPD を用いた清浄性維持サーベイランスの信頼性はこれまでどおり担保されると考えられた。今後、サーベイランスの現場において牛 PPD の感度及び特異性に対する評価が積み重なることにより、さらなる信頼性検証の進展が期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただきました細菌学的検査領域及び飼養管理ユニット各位に深謝いたします。

## 引用文献

- Buddle, B.M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M. & Wedlock, D.N. (2013) Subcutaneous administration of a 10-fold-lower dose of a commercial human tuberculosis vaccine, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin Danish, induced levels of protection against bovine tuberculosis and responses in the tuberculin intradermal test similar to those induced by a standard cattle dose. *Clinical and Vaccine Immunology*. **Oct;20(10)**, 1559–1562.
- Chen, S., Parlane, N.A., Lee, J., Wedlock, D.N., Buddle, B.M. & Rehm, B.H. (2014) New skin test for detection of bovine tuberculosis on the basis of antigen-displaying polyester inclusions produced by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. **Apr;80(8)**, 2526-2535.
- Doherty, M.L., Bassett, H.F., Quinn, P.J., Davis, W.C., Kelly, A.P. & Monaghan, M.L. (1996) A sequential study of the bovine tuberculin reaction. *Immunology*. **Jan;87(1)**, 9-14.
- Leslie, I.W., Herbert, C.N., Burn, K.J., MacClancy, B.N. & Donnelly, W.J.C. (1975) Comparison of the specificity of

- human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. *Veterinary Record*. **96**, 332-334.
- Radunz, B. L. & Lepper, W.D. (1985) Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat tests. *Australian Veterinary Journal*. **vol62 no6**, 191-194.
- Rennie, B., Filion, L.G. & Smart, N. (2010) Antibody response to a sterile filtered PPD tuberculin in *M. bovis* infected and *M. bovis* sensitized cattle. *BMC Veterinary Research*. **Nov 9;6:50**.
- Whipple, D.L., Palmer, M.V., Slaughter, R.E. & Jones, S.L. (2001) Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **Mar;13(2)**, 117-122.
- WOAH (2022) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022*, chapter 3. 1. 13. Mammalian Tuberculosis.

Table 1. Details of calves prepared and results of bovine PPD test

No.*	Age in weeks**	groups	Skin thickness 1** (SD) (mm)	Skin thickness 2*** (SD) (mm)	difference (mm)	clinical signs	Result †
1	23	vaccinated (bovine bacterial pentavalent)	4.19 (0.43)	4.34 (0.12)	0.15	-	negative
2	22		3.81 (0.35)	3.57 (0.15)	-0.24	-	negative
3	23		3.59 (0.12)	4.09 (0.14)	0.50	-	negative
4	51	vaccinated (bovine viral hexavalent)	8.64 (0.67)	8.52 (0.28)	-0.12	-	negative
5	22	negative control (unvaccinated)	3.84 (0.10)	3.85 (0.11)	0.01	-	negative
6	24		4.42 (0.25)	4.74 (0.13)	0.32	-	negative
7	23		3.80 (0.28)	4.55 (0.23)	0.75	-	negative
8	53	positive control (human BCG, 5 dose)	8.56 (0.24)	20.13 (0.30)	11.57	-	positive

\* Breed: Holstein (all calves)

\*\* at the time of bovine PPD injection

\*\*\* at 72 hours after injection of bovine PPD

† negative: difference of skin thickness is < 2mm and no clinical signs, positive: difference of skin thickness is ≥ 4mm and no clinical signs

[プロジェクト研究終了報告]

薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020 の  
達成及びフォローアップに向けた対応  
—動物分野における薬剤耐性菌のモニタリング調査及び疫学研究—

関口秀人、嶋崎洋子、松田真理、赤間亮子、古谷ゆかり、原田咲、  
小澤真名緒、川西路子、白川崇大、熊川実旺、関谷辰朗

(受付：令和4年8月23日、受理：令和4年11月2日)

---

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

**Measures to achieve and follow up on the National Action Plan  
on Antimicrobial Resistance 2016–2020  
-An epidemiological study of antimicrobial resistance in bacteria isolated  
from domestic and companion animals in Japan-**

Hideto SEKIGUCHI, Yoko SHIMAZAKI, Mari MATSUDA, Ryoko AKAMA, Yukari FURUYA, Saki HARADA,  
Manao OZAWA, Michiko KAWANISHI, Takahiro SHIRAKAWA, Mio KUMAKAWA, Tatsuro SEKIYA

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,*

*1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan*

(Received: 23rd Aug 2022, Accepted: 2nd Nov 2022)

---

**Abstract**

During the fiscal years 2018–2021, we conducted the following studies under the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (JVARM) according to the Japanese National Action Plan on Antimicrobial Resistance. 1) Since 2018, a monitoring system for antimicrobial-resistant bacteria derived from healthy companion animals was established. Furthermore, 2) we performed continued monitoring of antimicrobial-resistant bacteria derived from healthy domestic animals, sick domestic animals, and sick companion animals. 3) Considerations were made toward an integrated one-health trend survey with the field of human medicine. Finally, 4) standardization, education, and training of the testing methods for antimicrobial resistance were promoted. These results are useful findings and might contribute to the promotion of control measures for antimicrobial-resistant bacteria.

**要旨**

動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) として、平成 30 年度から令和 3 年度に実施した成績を取りまとめるとともに、「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020」に基づいて以下の取り組みを行った。1) 平成 30 年度より健康な愛玩動物由来の薬剤耐性菌モニタリング体制の構築を行った。また、2) 健康家畜由来、病畜由来及び病気の愛玩動物の薬剤耐性菌モニタリングを継続した。その他、3) 人医療分野との統合的ワンヘルス動向調査に向けた検討、4) 薬剤耐性に対する検査手法の標準化・教育、研修の推進を行った。これらの成績は、薬剤耐性菌の制御を行う上で有用な知見及び取組であり、薬剤耐性対策の推進に寄与するものと考えられた。

## 緒言（背景）

本報告は、平成30年度から令和3年度までの4年間に実施したプロジェクト研究「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン2016-2020の達成及びフォローアップに向けた対応－動物分野における薬剤耐性菌のモニタリング調査及び疫学研究－」について、その成果をまとめたものである。

## 目的

動物医薬品検査所では、動物分野における薬剤耐性対策における主要な取組として、プロジェクト研究という枠組みの中で、平成11年より動物由来薬剤耐性菌モニタリング（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System：JVARM）（動物医薬品検査所ホームページ）を実施している。

また、平成28年4月に、我が国における薬剤耐性菌対策の行動計画である「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン2016-2020」（以下「アクションプラン」）（国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議2016）が取りまとめられた。このアクションプランの中で、動物医薬品検査所は、動物分野の薬剤耐性菌対策の中心的役割を担う基幹検査機関として位置づけられ、これまでのJVARMの取組が、動物分野における全国の薬剤耐性菌モニタリングとして評価されるとともに、一層の体制強化及び動向調査の充実を図ることが求められた。

本プロジェクト研究の目的は、アクションプランに設定された各分野の目標と戦略に従って、①専門職等への教育・研修の推進、②愛玩動物における薬剤耐性に関する動向調査・監視体制の確立及び家畜・養殖水産動物の動向調査の拡充、③薬剤耐性に関する検査手法の標準化、④人医療分野との連携、⑤国際協力といった取組を実施することにある。

## 研究成果

### 1. 薬剤耐性菌の動向調査・監視体制の確立・強化

#### （1）病気の愛玩（伴侶）動物由来細菌の薬剤耐性モニタリング

アクションプランを受けて平成29年度から疾病に罹患した犬及び猫由来細菌の薬剤耐性モニタリングを開始した。平成29年度は6菌種915株（犬由来561株、猫由来354株）、平成30年度は5菌種681株（犬由来452株、猫由来229株）、令和元年度は5菌種914株（犬由来557株、猫由来357株）、令和2年度は6菌種1,058株（犬由来570株、猫由来488株）について微量液体希釈法による薬剤感受性試験を実施した。平成29年度から収集を継続している大腸菌等の令和2年度の耐性率の成績は、全体として同様の傾向であり、図1として平成30年度の愛玩動物、家畜及び人に使用される抗菌剤系統別割合を示したが、愛玩動物で使用される抗菌剤系統別割合は家畜より人医療分野との類似性があり、病気の犬及び猫由来大腸菌の第3世代セファロスポリン及びフルオロキノロン系の耐性率は病気の家畜よりも高い傾向がみられた（図2として令和元年度の耐性率を示した）。

また、動物用には承認されていない人医療上最も重要なカルバペネム系抗菌剤の1つであるメロペネム（MEPM）耐性株は分離されず、院内感染などで大きな問題となるバンコマイシン耐性の腸球菌属菌も確認されなかった。（[https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3.html](https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3.html)）

#### （2）健康な愛玩（伴侶）動物由来細菌の薬剤耐性モニタリング

平成30年度より健康な犬及び猫を対象とした調査を開始した。大腸菌及び腸球菌について、平成30年度は547株（犬由来298株、猫由来249株）、令和元年度は628株（犬由来351株、猫由来277株）、令和2年度は498株（犬由来275株、猫由来223株）について微量液体希釈法による薬剤感受性試験を実施した。健康な犬及び猫由来の大腸菌の耐性率は、多くの薬剤で病気の犬及び猫由来の大腸菌よりも低い耐性率を示す傾向がみられ、病気の犬及び猫由来大腸菌の耐性率は抗菌剤による治療が影響している可能性が示唆

された。病気の犬及び猫並びに健康な犬及び猫由来菌のいずれからも MEPM 耐性大腸菌やバンコマイシン耐性の腸球菌属菌は確認されず、第3世代セファロスポリン及びフルオロキノロン系の耐性率は病気の犬及び猫由来細菌と比較して低かった。（[https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3.html](https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3.html)）

### （3）病性鑑定材料由来細菌の薬剤耐性モニタリング

#### 1）サルモネラ及び黄色ブドウ球菌

病性鑑定由来の牛、豚及び鶏から分離されたサルモネラ及び黄色ブドウ球菌を対象とし、ディスク拡散法又は微量液体希釈法による薬剤感受性試験を実施した。

サルモネラについては、平成29年度は103株（牛由来59株、豚由来44株）、平成30年度は143株（牛由来57株、豚由来64株、鶏由来22株）、令和元年度は142株（牛由来57株、豚由来69株、鶏由来16株）を収集した。分離割合の高い血清型は、牛及び豚では4:i:-と*S. Typhimurium*、鶏では*S. Schwarzengrund*であった。最小発育阻止濃度（MIC）測定の結果、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、アンピシリン（ABPC）の順に耐性率の高い傾向がみられたが、シプロフロキサシン（CPFX）、セフトキシム（CTX）及びコリスチン（CL）の耐性率は低く推移していた。

黄色ブドウ球菌については、平成29年度は255株（牛由来175株、豚由来49株、鶏由来31株）、平成30年度は248株（牛由来172株、豚由来51株、鶏由来25株）、令和元年度は193株（牛由来136株、豚由来40株、鶏由来17株）を収集した。MIC測定の結果、ABPCやベンジルペニシリン（PCG）及びTCで耐性率が高い傾向にあった。畜種別では豚における耐性率が比較的高く、牛における耐性率は低い傾向が認められた。（[https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_AMR\\_2.html](https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_AMR_2.html)）

また、サルモネラと黄色ブドウ球菌について微量液体希釈法とディスク拡散法による判定結果の一致性を確認し、ディスク拡散法による耐性判定が有用な薬剤を確認した。（[https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3\\_5.html](https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3_5.html)）

#### 2）大腸菌等

病性鑑定等の際に分離された大腸菌、*パストツレラ・ムルトシダ*、*アクチノバシラス・プルロニューモニエ*、*マンヘミア・ヘモリチカ*などを収集し微量液体希釈法による薬剤感受性試験を実施した。大腸菌は、平成29年度に249株、平成30年度に259株、令和元年度に236株が収集され、耐性率は、TC、ABPC及びSMで50%を超え、CL、CTXやCPFXでは25%未満であった。*パストツレラ・ムルトシダ*は、平成29年度に123株、平成30年度に138株が収集され、ナリジクス酸（NA）及びCPFXで耐性率が高い傾向を示した。*アクチノバシラス・プルロニューモニエ*は、平成29年度に46株、平成30年度に35株収集され、TCに高い耐性率を示す傾向が確認された。*マンヘミア・ヘモリチカ*は令和元年に88株収集され、ABPC及びジヒドロストレプトマイシン（DSM）では40%を超える耐性率であったが、フロルフエニコール（FFC）、セフトオフル（CTF）、エンロフロキサシン（ERFX）では10%未満であった。*ストレプトコッカス・スイス*は令和元年に61株収集され、TCやエリスロマイシン（EM）には80%を超える耐性率であったが、PCG、セファゾリン（CEZ）、ゲンタマイシン（GM）、クロラムフェニコール（CP）及びCPFXには10%未満の耐性率であった。（[https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_AMR\\_2.html](https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_AMR_2.html)）

また、CLはディスク拡散法での薬剤感受性の判定が困難であるため、臨床検査標準協会（CLSI）から提唱された新たな薬剤感受性試験法である Colistin Broth Disk Elution（CBDE）法を病畜由来大腸菌及びサルモネラで実施し有用性を確認した。その結果、CBDE法と微量液体希釈法の両試験における感度（耐性一致率）は1.000、特異度（感受性一致率）は0.760以上、耐性・感受性の一致率は88%以上と高くCBDE法が感受性判断において有用であることが示唆された（表1）。

### （4）健康家畜（と畜場及び食鳥処理場）由来細菌の薬剤耐性モニタリング

平成29年度から令和元年度までの健康家畜（と畜場及び食鳥処理場）由来の収集株の成績は、大きな変

動はなかったが、鶏由来大腸菌の耐性率について令和元年度の成績を平成 24 年度以降の複数年度の成績と比較した結果、CEZ の耐性率は低かったが、カナマイシン (KM)、TC 及び CPFY の耐性率は高かった。また、牛由来カンピロバクター・ジェジュニでは、TC、NA 及び CPFY の耐性率が過去複数年度の成績と比べて令和元年度では高かった。(https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\_AMR\_2.html)

またアクションプランの成果指標である大腸菌の TC の耐性率は、平成 29 年度から令和元年度では 40.8% から 44.3% と目標値 (2020 年に 33% 以下) よりも高い耐性率が続いている状況であったが、第 3 世代セファロスポリン耐性率、フルオロキノロン耐性率については 10% 以下と低く維持されていた (表 2)。

#### (5) 動物用抗菌剤の販売量のモニタリング

抗菌剤販売量については、テトラサイクリン系は減少していたが、全体量についてはアクションプランの開始時期から横ばい状態であり、令和 2 年度は前年よりも若干増加していた。動物種別の販売量推移では豚での販売量は減少しているものの水産用抗菌剤 (海水魚用) で増加する傾向がみられた (図 3)。これは養殖海水魚において  $\alpha$  溶血性レンサ球菌症の発生が増加したことにより、マクロライド系抗菌剤の使用の増加したことによると推察される。

また、関係団体の協力の下、飼育動物診療施設へ販売された人用抗菌剤について平成 28 年から令和元年に調査を行った。販売された人用抗菌剤の約 9 割は愛玩動物分野であり、愛玩動物の診療施設で使用される抗菌剤の約 4 割を人用抗菌剤が占めていた。販売された抗菌剤の系統は、第 1 世代セファロスポリン及びペニシリン系が最も多く、フルオロキノロン系は全体の 7% 前後で推移しているものの、第 3 世代セファロスポリン及びマクロライド系は全体の 1~2% 程度、カルバペネム系、ポリペプチド系及びグリコペプチド系は全体の 0.01~0.05% と限定されていた。(https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\_p3.html)

## 2. 人医療分野との統合的ワンヘルス動向調査に向けた検討

アクションプランにおけるワンヘルスの取組みとして、以下、①から③の厚生労働科学研究費補助金研究等による国立感染症研究所や大学との共同研究により家畜由来株と人や食品由来株等との比較を行った。

- ①食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究 (令和 2 年度まで) 及びワンヘルスに基づく食品由来薬剤耐性菌のサーベイランス体制の強化のための研究 (令和 3 年度から) (厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業)
- ② WHO サーベイランスと協調したワンヘルス薬剤耐性菌動向調査に係る研究 (日本医療研究開発機構 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
- ③家畜由来薬剤耐性菌の水圏・土壌環境を介した野菜汚染の定量評価およびヒトへの伝播に関する研究 (食品安全委員会 食品健康影響評価影響評価技術研究)

## 3. 薬剤耐性に対する検査手法の標準化・教育、研修の推進

都道府県の家畜保健衛生所の職員を対象とした「動物用医薬品の危機管理対策に関する研修会」を毎年開催し、薬剤耐性対策に関する講義や薬剤感受性試験などの技術伝達を行った。なお、新型コロナウイルス感染症拡大のため令和 2 年度は動画及びテキストの配布、令和 3 年度はオンラインで開催した。

また、水産試験場等の職員を対象とした研修会や産業動物獣医師を対象とした講義を行った。また、動物看護学生向けの教科書に薬剤耐性菌対策について執筆した。

## 4. 薬剤耐性に関する国際協力の推進

### (1) アジアの研修生に対する薬剤耐性に関する研修会の開催

国際獣疫事務局 (WOAH) コラボレーティングセンターとして平成 30 年度はアジア 13 か国の獣医療分

野の政府機関担当者を招いた短期研修を、令和元年度は中国の担当者に長期研修を実施した。令和2年度から3年度には研修要請があったネパールの担当者に研修動画等を送付し技術的支援を行なった。

## （2）国際機関の薬剤耐性対策関連作業部会等への参加

Codex の薬剤耐性に関する特別部会（TFAMR）におけるガイドラインの改正等に主導的な立場で参画した。また、国連農業食糧機関（FAO）、WOAH の AMR 関連の専門家会議等に参加し情報提供・収集を行った。

### まとめ

本プロジェクトはアクションプランの戦略に沿って着実に実施された。特に動物分野における主要課題とされた国際的にも先駆的な取組である愛玩動物の薬剤耐性菌モニタリングについて、病気の動物に加え、健康な動物についても体制が確立され、これまで確実にモニタリングの成績が蓄積できていることは大きな成果である。今後、愛玩動物分野における薬剤耐性菌の動向を継続的に把握し活用することで愛玩動物分野での抗菌剤の慎重使用の推進につなげていくことができるものと考えられる。

その他、JVARM の各種モニタリングを確実に実施し、リスク評価やリスク管理措置、各種普及啓発に活用した。モニタリング結果において、アクションプランの成果指標である「2020年に健康な家畜由来の大腸菌の TC 耐性率を 33%以下に減らす」ことについては、これまでの成績では厳しい状況にあることが示されている。耐性率の低下が進まない要因として、現場での TC 等の投与が必ずしも必要ではない場合における使用が考えられるが、抗菌剤の販売量が最も多い豚での TC の販売量は減少傾向にあり、抗菌剤の適正使用・慎重使用が進んだ兆しも認められている。耐性率及び抗菌剤の不必要な使用を減らしていくには、農場における抗菌剤の使用実態を明確に把握し、飼養衛生管理の向上などの必要な疾病対策を検討し、抗菌剤に頼らない畜産物生産へと促す必要がある。

アクションプランでは、動物医薬品検査所を基幹検査機関として動物分野の薬剤耐性菌対策の中心的役割を担うことが期待されていることから、これまでの活動を充実・加速させるとともに、関係機関との連携を強め、次期アクションプランで盛り込まれる課題も確実に実施していく必要がある。

### 学術雑誌への投稿

1. Furuno, M., Uchiyama, M., Nakahara, Y., Uenoyama, K., Fukuhara, H., Morino, S., Kijima, M. (2018) A Japanese trial to monitor methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in imported swine during the quarantine period. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 14, 182-184.
2. 松田真理、磯村れん、Nigel C. L. Kwan、川西路子、小澤真名緒、木島まゆみ、杉浦勝明（2018）家畜暴露レベルを指標とした日本の動物用抗菌剤使用量の算出。家畜衛生学雑誌 43 (4), 161-168.
3. 木島まゆみ、川西路子、白川崇大、松田真理（2018）動物由来薬剤耐性菌モニタリング（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System; JVARM）における最近の取組み。獣疫学雑誌 22 (2), 112-113.
4. 木島まゆみ（2018）小動物医療分野における薬剤耐性モニタリング。獣医畜産新報 71 (5), 343-348.
5. 川西路子（2018）動物用抗菌性物質を取り巻く現状（XX）動物用抗菌剤の各論（その9）サルファ剤。日本獣医師会雑誌 71 (4), 166-169.
6. 木島まゆみ（2018）動物用抗菌性物質を取り巻く現状（XXI）動物用抗菌剤の各論（その10）キノロン系抗菌剤。日本獣医師会雑誌 71 (5), 227-232.
7. 川西路子（2018）FAO/WHO 合同食品規格計画 第5回薬剤耐性に関する特別部会（TFAMR）。食品衛生研究 9月, 43-49.

8. Kijima,M.,Shirakawa,T.,Uchiyama,M.,Kawanishi,M.,Ozawa,M.,Koike,R. (2019) Trends in the serovar and antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* from cattle and pigs between 2002 and 2016 in Japan. *Journal of Applied Microbiology*. 127,1869-1875.
9. 川西路子、松田真理 (2019) 愛玩 (伴侶) 動物における薬剤耐性に関する動向調査について. *獣医学雑誌* 23 (2),121-123.
10. 岡村行岳 (2019) FAO/WHO 合同食品規格計画 第 6 回薬剤耐性に関する特別部会 (TFAMR). *食品衛生研究* 10 月, 47-54.
11. Shirakawa,T.,Sekizuka,T.,Kuroda,M.,Suzuki,S.,Ozawa,M.,Abo,H.,Furuya,Y.,Akama,R.,Matsuda,M.,Shimazaki,Y., Kijima,M.,Kawanishi,M. (2020) Comparative genomic analysis of third-generation-cephalosporin-resistant *Escherichia coli* harboring the *bla*<sub>CMY-2</sub> positive IncI1 group, IncB/O/K/Z and IncC plasmids isolated from healthy broilers in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 64(7), e02385-19.
12. 古谷ゆかり (2020) FAO/WHO 合同食品規格計画 第 7 回薬剤耐性に関する特別部会 (TFAMR). *食品衛生研究* 12 月, 29-37.
13. Ozawa,M.,Kawanishi,M.,Uchiyama,M.,Mitsuya,D.,Abo,H.,Koike.,R.Kijima,M. (2021) Correlation of minimum inhibitory concentrations between human and animal antimicrobials against *Escherichia coli* isolated from livestock. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 33(4),744-748.
14. 嶋崎洋子 (2021) 動物分野の薬剤耐性菌対策とモニタリング. *月刊技術士* 12 月, 20-23.
15. 松田真理 (2022) 抗菌薬と薬剤耐性菌: 愛玩動物看護師カリキュラム準拠教科書 3 巻「基礎動物看護学 動物感染症学」3 月, 156-160.
16. 古谷ゆかり (2022) FAO/WHO 合同食品規格計画 第 8 回薬剤耐性に関する特別部会 (TFAMR). *食品衛生研究* 3 月, 37-43.
17. Furuya,Y.,Matsuda,M.,Harada,S.,Kumakawa,M.,Shirakawa,T., Uchiyama,M.,Akama,R.,Ozawa,M.,Kawanishi,M., Shimazaki, Y.,Sekiguchi,H. (2022) Nationwide monitoring of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from diseased and healthy dogs and cats in Japan. *Frontiers in Veterinary Science*. 9, doi: 10.3389/fvets.2022.916461,(9 pages).

#### 謝辞

本プロジェクト研究の実施に当たり、多大な尽力を頂いた全国の家畜保健衛生所の関係者各位、関係団体の関係者各位に深謝します。

#### 引用文献

動物医薬品検査所ホームページ: 家畜分野での薬剤耐性菌のモニタリング.

国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議 (2016) 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020.

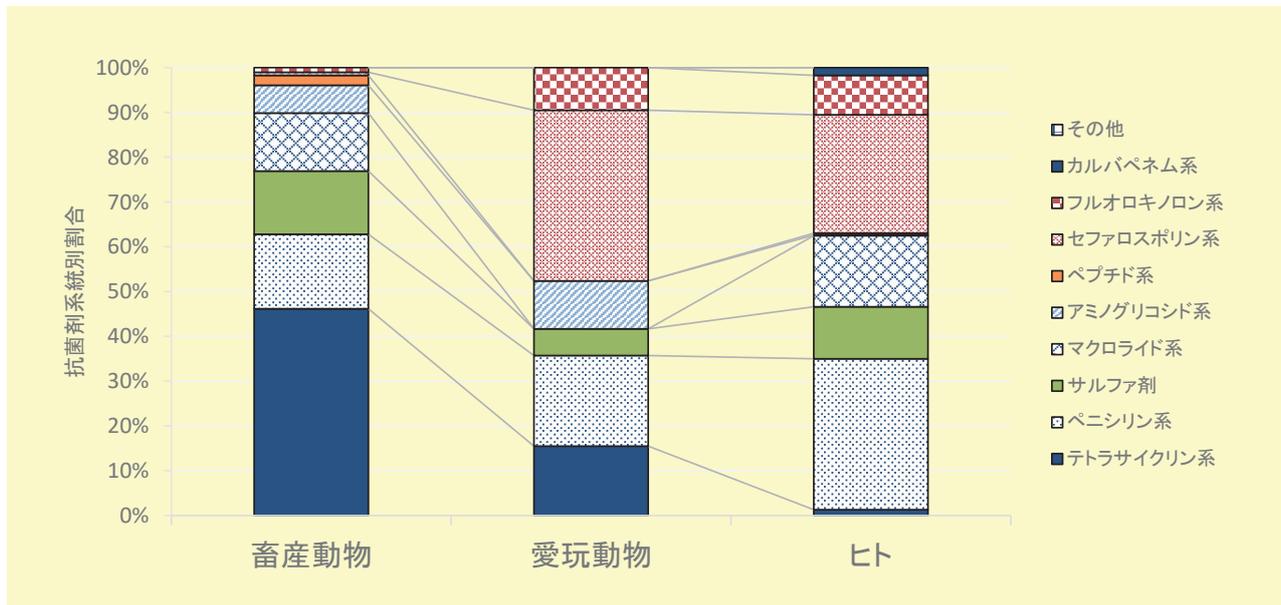


図1 愛玩動物、家畜及び人に使用される抗菌剤系統別割合（平成 30 年度）

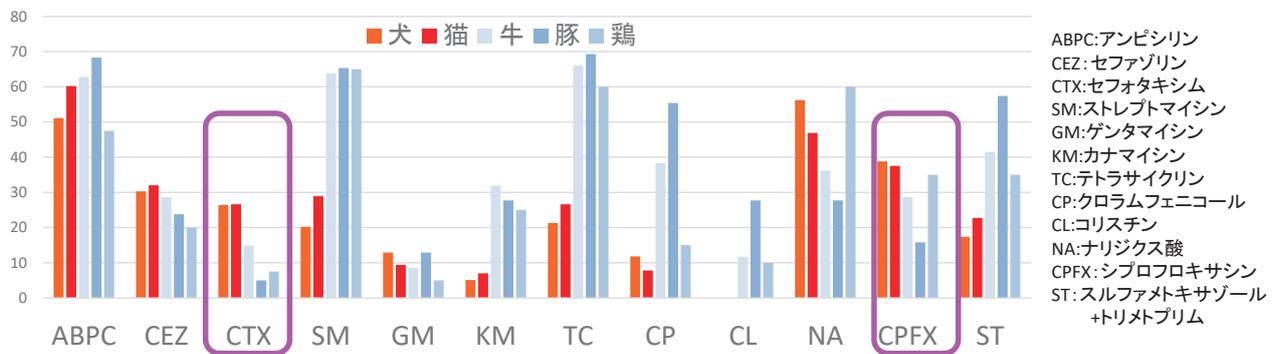


図2 病気の犬、猫及び家畜由来大腸菌の耐性率（令和元年度）



図3 動物用抗菌剤の販売量推移

表1 Colistin Broth Disk Elution（CBDE）法と微量液体希釈法との耐性・感受性一致率

CBDE法		微量液体希釈法		感度 (耐性一致率)	特異度 (感受性一致率)
		感受性	耐性		
サルモネラ 属菌	感受性	28	0	1.000	0.903
	耐性	3	29		
大腸菌	感受性	19	0	1.000	0.760
	耐性	6	25		

表2 健康家畜（と畜場及び食鳥処理場）由来大腸菌の耐性率の推移  
 (薬剤耐性アクションプラン成果指標の達成状況)

(%)

大腸菌の薬剤耐性率の 成果指標	2015 年度	2016 年度	2017 年度	2018 年度	2019 年度	2020年度 目標値
テトラサイクリン耐性率	39.8	47.6	40.8	43.5	44.3	33%以下
第3世代セファロスポリン耐性率	0.7	2.4	2.1	1.1	2.1	G7各国の数値 と同水準
フルオロキノロン耐性率	2.7	5.0	4.0	4.7	5.1	

## サルモネラ否定試験法の改良

小島明美、松本幸子、一色ゆかり、岩本聖子、永井英貴

(令和4年8月2日受付、令和4年10月20日受理)

---

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

### Improvement of the *Salmonella* contamination test

Akemi KOJIMA, Sachiko MATSUMOTO, Yukari ISSIKI, Shoko IWAMOTO, Hidetaka NAGAI

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,*

*1-15-1 Tokura, Kokubunji-Shi, Tokyo, 185-8511 Japan*

(Received: 2nd Aug 2022, Accepted: 20th Oct 2022)

---

#### Abstract

The *Salmonella* contamination test is defined as the General test in the Minimum Requirements for Veterinary Biological Products. Current test methods require special storage controls because they use media containing toxic selenium compounds. Moreover, the performance testing of the media used in current test methods requires the use of the pathogen of monitored infectious disease, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum which must be handled in a BSL-3 facility, making the process more complicated.

Therefore, we improved the current test method to a simple and efficient test method and conducted a basic study. Our results suggested that the improved method is as good as or better than the current method.

#### 要旨

サルモネラ否定試験法は動物用生物学的製剤基準の一般試験法に規定されている試験方法である。現行の試験法は毒物であるセレン化合物を含む培地を用いるため、特別な保管管理が必要である。さらに、当該試験に供する培地の性能試験には監視伝染病の病原体である *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum を用いる必要があり、BSL-3 レベルの施設で取り扱う必要があることから、作業が煩雑となっている。そこで我々は現行の方法を簡便で効率的な試験方法に改良することを目的として、基礎的な検討を行った。その結果、改良を予定する試験方法は、特異性及び検出感度において現行のサルモネラ否定試験法と同等以上の試験法であることが示唆された。

#### 背景

サルモネラ否定試験法は、動物用生物学的製剤基準（農林水産省 2002、以下、「動生剤基準」という。）の一般試験法に規定される試験であり、無菌試験法が適用できない鶏用生ワクチン（主として鶏卵や臓器乳剤を用いて製造されたもの等）に適用されている。

当該試験は、日本薬局方（以下、「局方」という。）の一般試験法の特定微生物試験を準用して規定されている。局方では第十五局まで使用されていたセテナイト培地が平成 19 年 9 月 28 日付け厚生労働省告示第 316 号の第十五改正日本薬局方第一追補から削除された。この背景として、セテナイト培地に含有され

るセレン化合物が毒物であるため特別な保管管理が必要であり、かつ使用者の安全を守る必要があったことが考えられる。

また、動生剤基準における当該試験の培地性能試験に用いられるひな白痢菌 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum、以下、「S. Pullorum」という。) は監視伝染病病原体であるため、培地性能試験を BSL-3 レベルの封じ込め施設で実施する必要がある、取扱いが煩雑となっている。

以上のことから、動生剤基準の当該試験法は毒物を含まない培地への変更及び S. Pullorum を取り扱わない簡便で効率的な試験方法に変更することが求められている。

## 目的

局方第十六局以降の一般試験法の特定微生物試験 (サルモネラ) を参考とし、セレン化合物を含まない培地を使用し、培地性能試験用菌株として S. Pullorum を使用しない試験方法に変更するための基礎となる知見を得る。

## 研究成果

### 1. 材料及び方法

#### 1.1 培地の性能試験用菌株の選定

改良を予定する方法 (以下、「改良法」という。) で用いる培地の性能試験用の菌株は、局方第十六局以降の一般試験法の特定微生物試験 (サルモネラ) に基づき、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony (以下、「S. Abony」という。) 又は S. Typhimurium を用いることとした。S. Abony は培地性能試験用微生物株として BioBall SingleShot30 *Salmonella abony* ACM5080 及び EZ-Accu Shot™ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony 等が市販されている (bioMérieux Japan Ltd., Tokyo, Japan 及び RAVEN JAPAN CO.,LTD., Saitama, Japan)。S. Typhimurium については培地性能試験用微生物株として国内で販売されていないことから、S. Typhimurium を培地の性能試験に用いる菌株に選定することを目的とし、当所で保有する候補株から、基本的な性状検査として TSI 寒天培地及び LIM 培地 (EIKEN CHEMICAL CO.,LTD., Tokyo, Japan) による性状確認、血清学的な検査としてサルモネラ免疫血清、サルモネラ相誘導用免疫血清及びサルモネラ相誘導用培地 (Denka Company Limited., Tokyo, Japan) による抗原構造決定及び遺伝子学的な検査としてサルモネラ同定キットシリーズ (*Salmonella* serover Typhimurium Identification Kit、*Salmonella* serover Choleraesuis Identification Kit、*Salmonella* serover Enteritidis Identification Kit、*Salmonella* serover Dublin Identification Kit 及び *Salmonella* serover Gallinarum Identification Kit) (TaKaRa bio inc., Shiga, Japan) を用いて血清型を決定した。

#### 1.2 培地

動生剤基準のサルモネラ否定試験法 (以下、「現行法」という。) では、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地 (以下、「SCD」という。)、セレナイト培地 (以下、「セレナイト」という。)、BTB 乳糖寒天培地 (以下、「BTB」という。) 及び DHL 寒天培地 (以下「DHL」という。) (Japan Becton, Dickinson, co., ltd., Tokyo, Japan) を用いて培養した。改良法では、局方第十六局以降の一般試験法の特定微生物試験 (サルモネラ) に基づき、SCD、ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地 (以下、「RVS」という。) 及びキシロース・リシン・デソキシコール酸寒天培地 (以下、「XLD」という。) (Japan Becton, Dickinson, co., ltd., Tokyo, Japan) を用いて培養した。培養温度については現行法 (35 ~ 37℃) 及び局方の規定を参照した改良法 (30 ~ 35℃) から、試験法を比較するため共通の温度として 35℃ で培養した (図 1)。

### 1.3 特異性及び検出感度

*S. Abony* (ACM5080 株)、*S. Typhimurium* (11-PLS-127 株及び 424 株)、家畜に関連するその他のサルモネラ血清型株として *S. Enteritidis* (HY-1 株及び AL1190 株)、*S. Choleraesuis* (RF-1 株)、*S. Dublin* (PS87 株) 及び *S. Pullorum* (9-25 株及び NVAL-6 株) (表 1) の菌数を 100CFU 未満に調製して培養し、検出感度を確認した。また、同時に *Escherichia coli* (以下、「*E. coli*」という。) (BioBall SingleShot30 *Escherichia coli* NCTC12923) 及び *Staphylococcus aureus* (以下、「*S. aureus*」という。) (BioBall SingleShot30 *Staphylococcus aureus* NCTC10788) (bioMérieux Japan Ltd., Tokyo, Japan) を供試して培地の特異性を確認した。

### 1.4 ワクチンを用いた添加回収試験

市販の鶏用生ワクチン 4 種類 (鶏コクシジウム感染症 (アセルブリナ・テネラ・マキシマ) 混合生ワクチン (シード)、ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シード)、ニューカッスル病生ワクチン (シード) 及び鶏脳脊髄炎生ワクチン (シード)) に、現行法及び改良法に共通する培地の性能試験用の菌株として *S. Typhimurium* (11-PLS-127 株) を、または現行法の培地性能試験に供する *S. Pullorum* (9-25 株) を混入させて検出を試みた。

添加は希釈しないワクチンに菌を  $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL (培地への接種量当たり数個～数十個) を混入させた。菌が混入したワクチンを接種量当たり 1 投与量となるように希釈したものを接種材料として、現行法及び改良法で培養した。

## 2. 成績

### 2.1 培地の性能試験用菌株の選定

*S. Typhimurium* 候補株について、TSI 寒天培地及び LIM 培地によりサルモネラの性状を確認し、免疫血清により抗原構造を決定し、PCR による遺伝子学的な血清型別を行った。その結果、11-PLS-127 株は抗原構造が 4 : i : 1, 2 であり、PCR において *S. Typhimurium* に固有のバンドパターンが認められたため、培地の性能試験に用いる菌株として妥当と判断し、凍結乾燥品を保存した。

### 2.2 特異性及び検出感度

培地に接種した菌数は、*S. Typhimurium* は 11-PLS-127 株が 5.8CFU、424 株が 4.5CFU、*S. Choleraesuis* (RF-1 株) は 4.0CFU、*S. Dublin* (PS87 株) は 4.1CFU、*S. Enteritidis* は HY-1 株が 4.9CFU、AL1190 株が 4.5CFU、*S. Abony* (ACM5080 株) は 4.5CFU、*S. Pullorum* は 9-25 株が 7.3CFU 及び NVAL-6 株は 8.5CFU に調製して現行法及び改良法で培養した。また、*E. coli* は 6.8CFU、*S. aureus* は 9.0CFU に調製して SCD 及びセレナイトに接種した。

SCD 及びセレナイトにおける菌の増殖を確認するため、選択性のない SCD 寒天培地を用い、SCD 及びセレナイトの培養菌液中の菌数を確認した。セレナイトで培養する系では *S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*S. Dublin* 及び *S. Abony* は SCD で培養する系に比べて 10 分の 1 程度に菌の増殖が抑制された。また、セレナイトでは *S. Choleraesuis* は増殖が抑制されてその後の寒天培地への継代で集落が形成されず、*S. Pullorum* は SCD による培養に比べて 100 分の 1 程度に菌の増殖が抑制された (表 2)。

現行法のうち、SCD から培養を開始する系においては、供試したサルモネラ 9 株、*E. coli* 及び *S. aureus* は良好に発育し、SCD 培養菌液から BTB に継代するとサルモネラは全て灰色がかかった固有の集落を形成した。*S. Pullorum* は他のサルモネラに比べて小型の集落を形成した。*E. coli* 及び *S. aureus* は BTB では黄色の集落を形成した。同様に DHL に継代するとサルモネラは *S. Pullorum* 以外の血清型では硫化水素産生による黒色の集落を形成し、TSI 寒天培地における硫化水素産生が他のサルモネラに比べて弱かった *S. Pullorum* は白色の集落を形成した。*E. coli* は大腸菌に特有の赤桃色の集落を形成し、

*S. aureus* は DHL では集落を形成しなかった。

現行法のうち、セレナイトから培養を開始する系においては、*S. Choleraesuis* 以外の血清型株はセレナイトで規定の培養時間内に増殖し、セレナイトの培養菌液から BTB 及び DHL に継代するとサルモネラに固有の集落を形成した。*E. coli* 及び *S. aureus* はいずれもセレナイトで増殖せず、セレナイト培養菌液から BTB 及び DHL に接種しても集落の形成は認められなかった。また、*E. coli* 及び *S. aureus* はセレナイトへの接種菌数を約  $10^7$ CFU に増やしても増殖は認められなかった。

*S. Choleraesuis* の接種菌数を 10 倍、 $10^2$  倍及び  $10^4$  倍に調製してセレナイトに接種した場合、 $35^\circ\text{C}$  で現行法における規定の時間（18～24 時間）よりも長い時間（48～72 時間）培養することによって増殖が認められた。また、栄養要求性を考慮し、*S. Choleraesuis* 及び *S. Pullorum* についてはシスチンを添加したセレナイトも検討したが、いずれの株についてもセレナイトにおける増殖はシスチン添加の有無による影響は認められなかった。

改良法では供試したサルモネラは全て SCD 培養菌液から RVS に継代すると増殖して培地を混濁した。RVS では SCD による培養に比べて 10 分の 1 程度に菌の増殖が抑制された。サルモネラの RVS 培養菌液を XLD に接種して培養した結果、*S. Pullorum* 以外の血清型では培養中の 18～48 時間までに赤色があった集落から硫化水素産生による黒色の集落を形成し、*S. Pullorum* は赤色があった集落を形成した（表 3）。

改良法における培地の特異性を確認するため、*E. coli* 及び *S. aureus* の SCD 培養菌液の 10 倍階段希釈菌液それぞれを RVS に接種したところ、いずれの菌の希釈段階においても RVS を混濁する増殖は認められなかった。このうち、局方で RVS の培地の特性として発育しないことが規定されている *S. aureus* を接種した RVS 培養菌液を XLD に接種しても集落の形成は認められなかった。一方、*E. coli* の RVS 培養菌液を XLD に接種すると、RVS に SCD 培養菌液の原液（約  $10^9$ CFU）を接種して培養した場合に限り、XLD を黄変する集落の形成がわずかに認められた。

### 2.3 ワクチンを用いた添加回収試験

ワクチンに *S. Typhimurium* を混入した試料を培養した結果、現行法及び改良法のいずれの方法でも検出が可能であった（表 4-1、4-2 及び 4-5）。同様にワクチンに *S. Pullorum* を混入した試料を接種して培養した結果、改良法では供試したいずれのワクチンも、混入させた菌が SCD 及び RVS で増殖し、XLD で集落の検出が可能であった（表 4-6）。一方、現行法では SCD を用いる系では検出が可能であったが（表 4-3）、セレナイトを用いる系において、鶏脳脊髄炎生ワクチン（シード）に混入させた場合に菌の増殖が抑制され、検出可能な場合と検出できない場合があった（表 4-4）。

## 3. 考察

現行法は非選択増菌培地（SCD）及び選択増菌培地（セレナイト）を用いることにより、検体への汚染菌数の多少に関わらず確実にサルモネラを検出することを目的として設定されていると考えられる。しかし、今回の検討においてセレナイトで培養する系では、規定の条件では増殖しない事例があり、血清型もしくは株によって検出ができない可能性が示唆された。また、ワクチンへの添加回収試験において、鶏脳脊髄炎生ワクチンのように抗菌性物質を保存剤として含む製剤に *S. Pullorum* を混入させてセレナイトで培養する系では、BTB 及び DHL に継代すると菌の増殖が抑制されて検出可能な場合（約  $10^3$  個の集落形成）と検出できない場合（集落形成なし）があり、確実に検出できない状態であった。これらのことから現行法では検体によっては混入した菌を検出できない可能性が示唆された。以上の現象及びセレン化合物が毒物であることを勘案し、セレナイトを用いない培養方法に変更することは妥当と考えられた。

今回の検討ではワクチンへ混入した菌を検出する場合、現行法ではセレナイトを用いる系において *S. Pullorum* の混入を見落とす可能性があった。一方、改良法では *S. Pullorum* の検出が現行法に比べて安定していることから、培地性能試験に *S. Pullorum* を供さなくても問題はないと考えられた。

局方の一般試験法の特定微生物試験を準用した改良法では、非選択増菌用培地として SCD から培養を開始している。非選択増菌培養を始めに行う理由は、汚染菌数が少ない場合や損傷菌修復などを考慮し、サルモネラの検出率を高めるためと考えられる。製剤等の検体がサルモネラに汚染された場合、GMP で管理された製造工程において多量の菌が混入・生存する可能性は低いと考えられる。仮に混入した場合は、製造工程により菌が損傷を受けたり、または休眠状態であったりする可能性がある。このような場合、選択増菌培養に先立って非選択増菌培養を行うことは必要と考える。

改良法を選択増菌培養として用いる RVS は、マラカイトグリーン含有、塩化マグネシウム濃度及び低い pH の特徴によってサルモネラを特異的に増菌する。局方では RVS による培養温度は 30 ~ 35℃ と設定されているが、一般的にサルモネラを選択増菌培養においては、低い培養温度では夾雑菌が増殖してサルモネラの増殖を阻害する可能性があるため、40℃ 程度の高い温度で培養する。第十五改正局方以前では、特定微生物試験におけるサルモネラの培養において、選択増菌培養の温度は明確に規定されておらず、現行の局方における 30 ~ 35℃ の温度設定に関する根拠は明らかにされていない。一方、平成 19 年 9 月 28 日付け薬食発第 0928001 号の厚生労働省医薬食品局長通知「第十五改正日本薬局方第一追補の制定について」では、4.05 微生物限度試験法は薬局方の国際調和に伴い改正したとされており、その培養温度は 30 ~ 35℃ とされている。微生物限度試験法においてこの温度設定はその妥当性が広く認められていると考えられる。

以上のことから、毒物を含む培地及び特殊な管理を要する菌による培地性能試験を削除し、簡便な方法に移行することは妥当と考えられる。

今後は動生剤基準の改正に向けて、さらに多種類の製剤や、製造材料を踏まえたサルモネラの血清型で安定的に混入したサルモネラを改良法で検出できることを確認する必要があると考える。

## 引用文献

- 農林水産省（2002）動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）
- 厚生労働省（2006）第十五改正日本薬局方（平成 18 年 3 月 31 日厚生労働省告示第 285 号）
- 厚生労働省（2011）第十六改正日本薬局方（平成 23 年 3 月 24 日厚生労働省告示第 65 号）
- 厚生労働省（2016）第十七改正日本薬局方（平成 28 年 3 月 7 日厚生労働省告示第 64 号）
- 厚生労働省（2021）第十八改正日本薬局方（令和 3 年 6 月 7 日厚生労働省告示第 220 号）

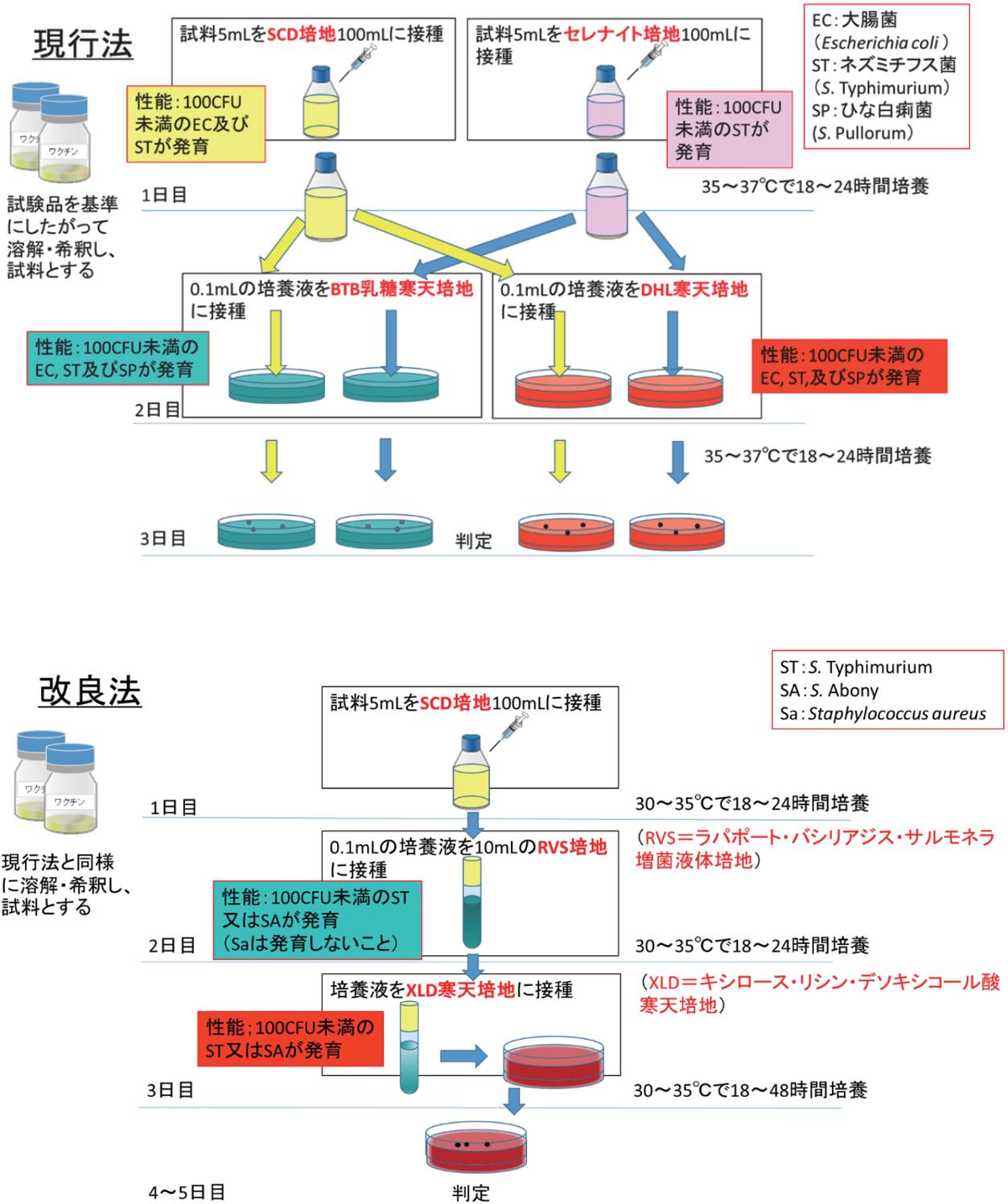


Figure 1 The *Salmonella* contamination test, current method (upper) and improvement method (lower).

Table 1 *Salmonella* strains used in this study

血清型	株名	由来
<i>Salmonella</i> Typhimurium	11-PLS-127	平成 11 年度 PL 収集株
<i>Salmonella</i> Typhimurium	424	家畜衛生試験場
<i>Salmonella</i> Enteritidis	HY-1	J.Vet. Med. Sci. 1993, Feb 55(1), p135-136
<i>Salmonella</i> Enteritidis	AL1190	J.Vet. Med. Sci. 1992, Oct 54(5), p845-850
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	RF-1	J.Vet. Med. Sci. 1992, Dec 54(6), p1175-1178
<i>Salmonella</i> Dublin	PS87	動物医薬品検査所
<i>Salmonella</i> Abony	ACM5080	BIOBALL <sup>®</sup> (=NCTC6017、NBRC100797 等)
<i>Salmonella</i> Gallinarum-Pullorum	9-25	家畜衛生試験場
<i>Salmonella</i> Gallinarum-Pullorum	NVAL-6	動物医薬品検査所

Table 2 Sensitivity of detection by current method  
(upper: start with SCD broth, lower: start with selenite medium)

株名 (接種した菌数・CFU)	SCD→SCD 平板 (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→BTB (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→DHL (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→BTB (原液 100μL を継代)	SCD→DHL (原液 100μL を継代)
<i>S. Typhimurium</i> 11-PLS-127 (5.8)	16*	19	21	∞****	∞
<i>S. Typhimurium</i> 424 (4.5)	12	12	13	∞	∞
<i>S. Enteritidis</i> HY-1 (4.9)	16	11	10	∞	∞
<i>S. Enteritidis</i> AL1190 (4.5)	12	16	14	∞	∞
<i>S. Choleraesuis</i> RF-1 (4.0)	10	9	10	∞	∞
<i>S. Dublin</i> PS87 (4.1)	10	5	17	∞	∞
<i>S. Abony</i> ACM5080 (4.5)	16	13	23	∞	∞
<i>S. Pullorum</i> 9-25 (7.3)	11.5	8.5	17.5	∞	∞
<i>S. Pullorum</i> NVAL-6 (8.5)	7.5	10	24	∞	∞
株名 (接種した菌数・CFU)	セレンナイト→SCD 平板 (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	セレンナイト→BTB (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	セレンナイト→DHL (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	セレンナイト→BTB (原液 100μL を継代)	セレンナイト→DHL (原液 100μL を継代)
<i>S. Typhimurium</i> 11-PLS-127 (5.8)	32	30	31	∞	∞
<i>S. Typhimurium</i> 424 (4.5)	14	20	11	∞	∞
<i>S. Enteritidis</i> HY-1 (4.9)	20	22	23	∞	∞
<i>S. Enteritidis</i> AL1190 (4.5)	15	7	15	∞	∞
<i>S. Choleraesuis</i> RF-1 (4.0)	-**	-	-	-	-
<i>S. Dublin</i> PS87 (4.1)	16	27	18	∞	∞
<i>S. Abony</i> ACM5080 (4.5)	22	25	26	∞	∞
<i>S. Pullorum</i> 9-25 (7.3)	56***	4	14	∞	∞
<i>S. Pullorum</i> NVAL-6 (8.5)	11.5***	1	9	∞	∞

\* : Number of colonies, \*\* : No colony, \*\*\* : 100μL of 10<sup>-5</sup> dilution was inoculated, \*\*\*\* : Too many colonies Not measurable.

Table 3 Sensitivity of detection by improvement method.

株名 (接種した菌数・CFU)	SCD 液体→RVS (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	RVS→SCD 平板 (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	RVS→XLD (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	RVS→XLD (原液をエーゼで継代)
<i>S. Typhimurium</i> 11-PLS-127 (5.8)	+	57**	36	∞***
<i>S. Typhimurium</i> 424 (4.5)	+	43	52	∞
<i>S. Enteritidis</i> HY-1 (4.9)	+	33	28	∞
<i>S. Enteritidis</i> AL1190 (4.5)	+	47	50	∞
<i>S. Choleraesuis</i> RF-1 (4.0)	+	23	19	∞
<i>S. Dublin</i> PS87 (4.1)	+	34	16	∞
<i>S. Abony</i> ACM5080 (4.5)	+	41	41	∞
<i>S. Pullorum</i> 9-25 (7.3)	+	7.5	15	∞
<i>S. Pullorum</i> NVAL-6 (8.5)	+	13	5	∞

\* : Bacterial growth is observed, \*\* : Number of colonies, \*\*\* : Too many colonies Not measurable.

Table 4-1 The detection of *S. Typhimurium* from vaccines contaminated with *S. Typhimurium* by the current method (start with SCD broth).

製剤	ワクチンに混入した菌数 (接種材料中の菌数)	SCD 中の菌数を確認するための継代			現行法による継代	
		SCD→SCD 平板 (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→BTB (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→DHL (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→BTB (原液 100μL を継代)	SCD→DHL (原液 100μL を継代)
鶏コクシジウム感染症 (アセルブリナ・テネラ・マキシマ) 混合生ワクチン (シード)	5.25×10 <sup>3</sup> (26.25)	22*	10	10	∞**	∞
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シード)	2.25×10 <sup>2</sup> (5.63)	7	9	11	∞	∞
ニューカッスル病生ワクチン (シード)	2.10×10 <sup>3</sup> (10.50)	27	14	13	∞	∞
鶏脳脊髄炎生ワクチン (シード)	5.25×10 <sup>3</sup> (26.25)	23	12	12	∞	∞

\* : Number of colonies, \*\* : Too many colonies Not measurable.

Table 4-2 The detection of *S. Typhimurium* from vaccines contaminated with *S. Typhimurium* by the current method (start with selenite medium).

製剤	ワクチンに混入した菌数 (接種材料中の菌数)	セレンナイト中の菌数を確認するための継代			現行法による継代	
		セレンナイト→SCD 平板 (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	セレンナイト→BTB (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	セレンナイト→DHL (10 <sup>-6</sup> 希釈 100μL を継代)	セレンナイト→BTB (原液 100μL を継代)	セレンナイト→DHL (原液 100μL を継代)
鶏コクシジウム感染症 (アセルブリナ・テネラ・マキシマ) 混合生ワクチン (シード)	5.25×10 <sup>3</sup> (26.25)	16*	14	12	∞**	∞
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シード)	2.25×10 <sup>2</sup> (5.63)	4	10	14	∞	∞
ニューカッスル病生ワクチン (シード)	2.10×10 <sup>3</sup> (10.50)	20	11	9	∞	∞
鶏脳脊髄炎生ワクチン (シード)	5.25×10 <sup>3</sup> (26.25)	24	8	5	∞	∞

\* : Number of colonies, \*\* : Too many colonies Not measurable.

Table 4-3 The detection of *S. Pullorum* from vaccines contaminated with *S. Pullorum* by the current method (start with SCD broth).

製剤	ワクチンに混入した菌数 (接種材料中の菌数) *	SCD 培地中の菌数を確認するための継代*			現行法による継代*	
		SCD→SCD 平板 (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→BTB (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→DHL (10 <sup>-7</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→BTB (原液 100μL を継代)	SCD→DHL (原液 100μL を継代)
鶏コクシジウム感染症 (アセルプリナ・テネラ・マキシマ) 混合生ワクチン (シード)	3.25×10 <sup>3</sup> /1.56×10 <sup>3</sup> (16.25/7.80)	16/18**	20/16	12/26	∞/∞***	∞/∞
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン(シード)	1.63×10 <sup>3</sup> /7.80×10 <sup>2</sup> (8.13/3.90)	19/18	17/25	13/13	∞/∞	∞/∞
ニューカッスル病生ワクチン (シード)	1.30×10 <sup>3</sup> /6.25×10 <sup>2</sup> (6.50/3.13)	18/12	15/12	35/15	∞/∞	∞/∞
鶏脳脊髄炎生ワクチン (シード)	3.25×10 <sup>3</sup> /1.56×10 <sup>3</sup> (16.25/7.80)	1/21	1/13	2/17	∞/∞	∞/∞

\* : First test / Second test, \*\* : Number of colonies, \*\*\* : Too many colonies Not measurable.

Table 4-4 The detection of *S. Pullorum* from vaccines contaminated with *S. Pullorum* by the current method (start with selenite medium).

製剤	ワクチンに混入した菌数 (接種材料中の菌数) *	セレナイト中の菌数を確認するための継代*			現行法による継代*	
		セレナイト→SCD 平板 (10 <sup>-5</sup> 希釈 100μL を継代)	セレナイト→BTB (10 <sup>-5</sup> 希釈 100μL を継代)	セレナイト→DHL (10 <sup>-5</sup> 希釈 100μL を継代)	セレナイト→BTB (原液 100μL を継代)	セレナイト→DHL (原液 100μL を継代)
鶏コクシジウム感染症 (アセルプリナ・テネラ・マキシマ) 混合生ワクチン (シード)	3.25×10 <sup>3</sup> /1.56×10 <sup>3</sup> (16.25/7.80)	101/140**	80/119	81/84	∞/∞***	∞/∞
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン(シード)	1.63×10 <sup>3</sup> /7.80×10 <sup>2</sup> (8.13/3.90)	18/103	15/63	11/90	∞/∞	∞/∞
ニューカッスル病生ワクチン (シード)	1.30×10 <sup>3</sup> /6.25×10 <sup>2</sup> (6.50/3.13)	66/122	77/141	78/123	∞/∞	∞/∞
鶏脳脊髄炎生ワクチン (シード)	3.25×10 <sup>3</sup> /1.56×10 <sup>3</sup> (16.25/7.80)	0/0	0/0	0/0	約 10 <sup>3</sup> /0	約 10 <sup>3</sup> /0

\* : First test / Second test, \*\* : Number of colonies, \*\*\* : Too many colonies Not measurable.

Table 4-5 The detection of *S. Typhimurium* from vaccines contaminated with *S. Typhimurium* by the improvement method.

製剤	ワクチンに混入した菌数 (接種材料中の菌数)	SCD 中の菌数を確認するための継代	RVS 中の菌数を確認するための継代		改良法による継代	
		SCD→RVS (10 <sup>7</sup> 希釈 100μL を継代)	RVS→SCD 平板 (10 <sup>6</sup> 希釈 100μL を継代)	RVS → XLD (10 <sup>6</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→RVS (原液 100μL を継代)	RVS → XLD (原液をエーゼで継代)
鶏コクシジウム感染症 (アセルブリナ・テネラ・マキシマ) 混合生ワクチン (シード)	5.25 × 10 <sup>3</sup> (26.25)	+	54**	46	+	∞***
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン(シード)	2.25 × 10 <sup>2</sup> (5.63)	+	29	18	+	∞
ニューカッスル病生ワクチン (シード)	2.10 × 10 <sup>3</sup> (10.50)	+	46	34	+	∞
鶏脳脊髄炎生ワクチン (シード)	5.25 × 10 <sup>3</sup> (26.25)	+	52	51	+	∞

\* : Bacterial growth is observed, \*\* : Number of colonies, \*\*\* : Too many colonies Not measurable.

Table 4-6 The detection of *S. Pullorum* from vaccines contaminated with *S. Pullorum* by the improvement method.

製剤	ワクチンに混入した菌数(接種材料中の菌数) *	SCD 中の菌数を確認するための継代*	RVS 中の菌数を確認するための継代*		改良法による継代*	
		SCD→RVS (10 <sup>6</sup> 希釈 100μL を継代)	RVS→SCD 平板 (10 <sup>6</sup> 希釈 100μL を継代)	RVS→XLD (10 <sup>6</sup> 希釈 100μL を継代)	SCD→RVS (原液 100μL を継代)	RVS→XLD (原液をエーゼで継代)
鶏コクシジウム感染症 (アセルブリナ・テネラ・マキシマ) 混合生ワクチン (シード)	3.25 × 10 <sup>3</sup> /1.56 × 10 <sup>3</sup> (16.25/7.80)	+/+**	26/18.5***	21/34	+/+	∞/∞****
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シード)	1.63 × 10 <sup>3</sup> /7.80 × 10 <sup>2</sup> (8.13/3.90)	+/+	14/16	16/28	+/+	∞/∞
ニューカッスル病生ワクチン (シード)	1.30 × 10 <sup>3</sup> /6.25 × 10 <sup>2</sup> (6.50/3.13)	+/+	18/16	20/10	+/+	∞/∞
鶏脳脊髄炎生ワクチン (シード)	3.25 × 10 <sup>3</sup> /1.56 × 10 <sup>3</sup> (16.25/7.80)	+/+	12/19	16/10	+/+	∞/∞

\* : First test / Second test, \*\* : Bacterial growth is observed, \*\*\* : Number of colonies, \*\*\*\* : Too many colonies Not measurable.

[プロジェクト研究終了報告]

## 動物用医薬品分野に特化した病理検査平準化に向けた取り組み

落合絢子, 岩本聖子, 細田裕子, 榊基, 須藤加澄, 申田千帆, 川嶋太喜, 能田健

(令和4年8月5日受付、令和4年10月12日受理)

---

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

### **Efforts to level the pathological examination specializing in the field of veterinary medicinal products**

Mariko OCHIAI, Shoko IWAMOTO, Yuko HOSODA, Hajime SAKAKI,  
Kasumi SUDO, Chiho KUSHIDA, Taiki KAWASHIMA, Ken NODA

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,*

*1-15-1 Tokura, Kokubunji-Shi, Tokyo, 185-8511 Japan*

(Received: 5th Aug 2022, Accepted: 12th Oct 2022)

---

#### **Abstract**

In the fiscal year 2018, the Pathology Unit of National Veterinary Assay Laboratory (NVAL-PU) worked on an exploratory research project, “Fact-finding survey on the actual status of the pathological examination practice in the veterinary medicinal product (VMP) industry of Japan and the survey on the needs for holding pathology training workshops in the field,” which enabled grasping their actual status and issues.

Based on the results of those surveys, the NVAL-PU further worked on strengthening the pathological examination ability as a subsequent research project from the fiscal years 2019–2021. In that project, we established a working group with veterinary pathology experts from the industry, academia, and government and developed a “Pathological Examination Manual for Target Animal Safety Test Guidelines” and a “Standard Pathological Specimen on *whole slide imaging system*,” simulating typical pathology specimens in target animal safety tests as tools for the capacity building of pathologists in the field.

Furthermore, using these tools, we organized the “VMP Pathology Workshop” for the first time to provide training opportunities for pathologists of the VMP industry.

#### **要旨**

動物医薬品検査所病理ユニットでは、平成30年度に萌芽研究課題「動物薬分野における病理検査体制の実態調査及び病理研修会開催のニーズ調査」に取り組み、動物用医薬品（以下「動物薬」という。）業界内における病理学的検査の実態や課題を把握した。この結果をふまえ、令和元年度から3年間のプロジェクト研究において病理学的検査の体制を充実するための取組を進めた。本研究では、産学官の動物薬病理の専門家で構成されたワーキンググループを立ち上げ、病理担当者の能力開発ツールとしての「対象動物安全性試験ガイドラインの病理学的検査解説書」を作成するとともに、対象動物安全性試験で観察される典型的な病理組織標本を模擬的に再現した「標準病理標本のバーチャルスライド」を整備した。また、これらのツールを用いて「動物薬病理研修会」を初めて開催し、動物薬業界の病理担当者等に対し適切な能力

開発の場を提供することができた。

## 緒言

動物薬の承認申請にあたっては、対象動物安全性試験等において病理学的検査が実施される。質が高く、ばらつきの少ない病理学的検査の実施には、担当者の技能に加え、画像解釈の平準化（診断基準の統一化）が求められる。家畜衛生、人体薬分野の病理担当者は、各分野に特化した研修会で画像解釈の平準化を図るとともに、病理専門家の認定資格制度により一定の能力を担保している。一方、動物薬分野では、これに特化した研修会が存在せず、担当者の能力開発体制の整備が遅れており、承認申請のための試験資料の質的低下につながるリスク要因となっている。これらの課題を解決するためには、動物薬分野の実態やニーズを正確に把握した上で、最適な能力開発の機会を設ける必要がある。そこで、動物医薬品検査所における病理関係業務の円滑な運営のために所内横断的な組織として設置されている病理ユニットは、平成30年度に萌芽研究課題「動物薬分野における病理検査体制の実態調査及び病理研修会開催のニーズ調査」に取り組み、動物薬メーカーと試験受託機関病理担当者を対象にアンケート調査を実施した。その結果、病理関係業務に携わる病理担当者数は、回答のあった36所社のうち47%にあたる17社で0名であり、その他も1名が20%と、全体的に少ない状況であった。また、病理担当者の多くが他業務との兼任であり、病理業務に多く時間が割けないこと、社内での病理担当者の養成はOn the Job Trainingや勉強会参加で行っているものの、病理専門家資格保持者の不在や症例数不足のため養成が困難であること及び病理学的な内容について相談できる外部機関がないことといった悩みを抱えている現状が浮かび上がった。我々が構想し提案した動物薬に特化した病理研修会の開催については、16社が参加を希望し、11社が参加を検討すると回答があり、両者を合わせると開催要望は回答のあった所社全体の79%にのぼった。一方で、研修会への病理組織標本の提供については、提供可能または検討と回答があったのは3社のみのそれぞれ1症例ずつであり、標本提供元の承諾の必要性や情報公開範囲の制限（顧客情報や開発中の製剤情報）が提供の障壁となっていることが分かった。研修会で取り上げるテーマとしては、安全性試験で観察される注射部位の変化や魚類の症例についての希望が多かった。研修会の開催方法の検討にあたり、標本の確保や研修会の内容について、3所社の病理担当者と意見交換を行ったところ、動物薬の承認申請で必要となる病理検査については、採材部位、所見の取り方及び使用する用語について統一された基準が確立されていないのが現状であり、基準に基づく平準化の必要性が提起された。

この萌芽研究結果をふまえ、令和元年度からプロジェクト研究「動物薬に特化した病理検査平準化に向けた取組み」を立ち上げ、適切な能力開発の場を提供する体制の整備に取り組むこととした。

## 目的

動物薬病理に関する能力開発ツールとして、対象動物安全性試験ガイドラインに沿った病理学的検査解説書を作成するとともに、動物薬スライドカンファレンスに供するための病理組織標本を作製する。標本は対象動物安全性試験で観察される典型的症例をテーマに作製する。さらに、これらのツールを用いた能力開発の場として「動物薬病理研修会」を開催することで、動物薬業界全体の病理学的検査能力の平準化と、将来的な動物薬の安全性や承認申請に係る試験資料の質の向上につなげる。

## 研究成果

### 1. 対象動物安全性試験ガイドラインの病理学的検査解説書の作成

令和元年に、動物薬メーカー病理担当者、試験受託機関病理担当者及び研究機関等の毒性病理学専門家ら6名の外部専門家と、当所の病理ユニットからなるワーキンググループ（以下「WG」という。）を設置

し、対象動物安全性試験ガイドラインの病理学的検査解説書（以下「解説書」という。）について検討を重ねた。また、業界関係者から頂いた意見を踏まえ、動物用医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（動物用医薬品 GLP 省令）における病理学的検査に関する事項、国内で使用されている対象動物安全性試験ガイドラインの紹介、病理学的検査の基本的な流れに沿った情報や留意点、製剤種別の留意点及び参考書籍や文献といった、対象動物安全性試験で求められている病理学的検査について初学者にも分かりやすい基礎的な内容を多く盛り込んだ解説書として取りまとめた。

## 2. 標準病理標本の作製とデジタル化

対象動物安全性試験で観察される典型的な症例の標本作製を目的として、鶏ではアジュバント含有ワクチンの接種部位標本、豚及び牛ではアジュバント含有ワクチンに加え、抗菌剤の接種部位標本を作製した。これら標本のガラススライド（鶏 35 枚、豚 14 枚及び牛 73 枚、合計 122 枚）は全てバーチャルスライド標本としてデジタル化してクラウド上へ保存し、それらを汎用的なブラウザで観察できる環境を整備した。バーチャルスライド化及びオンデマンド閲覧は、メドメイン社の PidPort システムを使用した。

## 3. 動物薬病理研修会

令和3年に、「解説書」と「標準病理標本」のバーチャルスライド標本を用いた動物薬病理研修会を初開催した。本研修会は対面での開催を予定していたが、新型コロナウイルス感染症の感染拡大状況を鑑み、ウェブ会議システムを利用したオンライン開催とした。動物薬メーカー及び試験受託機関で実際に対象動物安全性試験や病理学的検査に携わる動物薬業界病理関係者を主とする 61 名が参加した。研修会は 2 部制で、第 1 部では、解説書について概要を説明するとともに、WG メンバー 2 名を講師に迎え「バーチャルスライドの利活用」及び「病理検査のコツ・注意点」についての講演会を行った。第 2 部では、鶏の標準病理標本を用いて、アジュバント含有ワクチンの接種部位の経時変化についてスライドカンファレンスを行い、標本で認められた病変について意見交換を行った。スライドカンファレンスで使用した標本は、参加登録者にクラウド上のバーチャルスライド標本を事前に観察してもらうことで共有した。また、参加者に、事前に病変のスコアリングを実施、提出していただいたうえで、その集計結果を示しながら討議を行った。研修会後に行ったアンケートでは 35 名から回答があり（回答率 57.4%）、研修会内容の有用性が評価された。また、回答者の約 7 割が病理関係業務経験 5 年未満であり、病理初学者を含む層の参加者が多かったことも分かった (Figure)。以上のように、これまでに検討を重ね作成した「解説書」と、制約なくスライドカンファレンスに供することを目的として作製した「標準病理標本」を病理検査能力開発のツールとして用いて、第 1 回目の動物薬病理研修会を開催し、病理検査能力開発の機会を提供することができた。研修会には、きわめて多くの参加があり、動物薬業界内にこうした研修会の需要があることが再確認された。また、オンライン開催としたことで参加のハードルが下がり、多くの方の参加につながったと考えられる。さらに、オンラインでの開催に合わせて、標本スライドを全てバーチャルスライドとしてクラウド上で利用できる体制を整備できたことで、スライド共有の効率化、標本観察環境の利便性及び将来的なデジタルデータ資産としてのデータの構築が実現され、デジタル化の推進に大きく貢献した。

## 4. まとめ

プロジェクト研究として、動物薬病理研修会の開催を達成したが、このように、動物薬を扱う病理学的な研修会は他にはなく、開催の需要や要望が強いことが確認できたため、今後もこの研修会を継続的に開催していくことで、業界内のニーズに応え、検査能力の向上や平準化の推進に資することができると考えられた。現在本研究については、引き続き当所の業務プロジェクトとして取り組んでおり、継続的な研修

会の開催を計画している。また、具体的な病理学的診断や研修会内で検討したスコアリングについては、技能の平準化に重要な情報であるため、今後解説書の付属文書という形でとりまとめ、公表することを検討している。

### 謝辞

本研究の遂行にあたり、萌芽研究アンケート調査にご尽力いただいた公益社団法人日本動物医薬品協会各位、アンケートにご協力いただいた動物薬メーカー及び試験受託機関病理担当者の皆様、動物薬ワーキンググループメンバーのあすか製薬株式会社創薬研究本部 久田茂先生、一般財団法人日本生物科学研究所 渋谷一元先生、KM バイオロジクス株式会社 松井元先生、一般財団法人生物科学安全研究所 橋爪昌美先生、東京農工大学獣医毒性学研究室 鈴木和彦先生及び麻布大学獣医学部病理学研究室 相原尚之先生に深謝いたします。

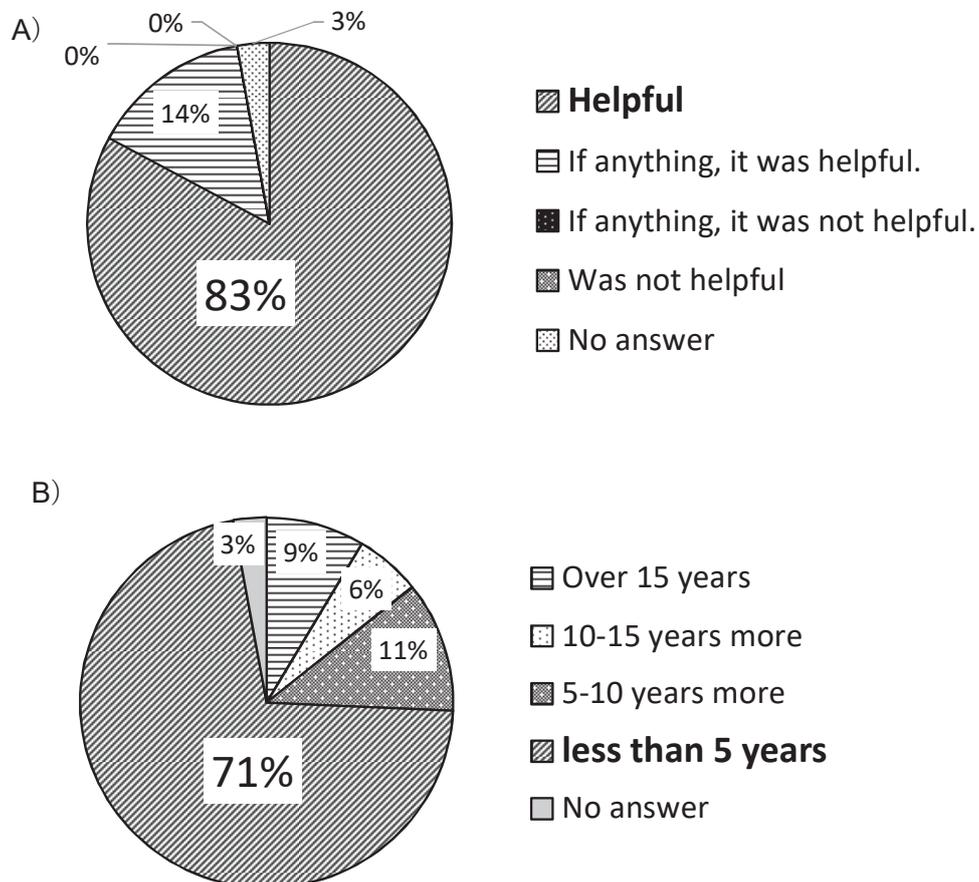


Figure. The results of the participant survey of the first Veterinary medicinal product (VMP) Pathology Workshop. Number of the participants belong to VMP industry were 61 and of which 35 responded to the survey. (Response rate : 57.4%)

図. 第1回動物薬病理研修会アンケート結果。動薬関係参加者61名のうち35名から回答があった（回答率57.4%）。

A) An impression of the workshop.

研修会の感想

B) Length of service in pathology-related work of the participants of the workshop.

研修会参加者の病理関係業務勤務年数

## 栃木県に棲息するハシブトガラスから分離されたカンピロバクター株の特徴づけ

(Characterization of *Campylobacter jejuni* in large-billed crows

(*Corvus macrorhynchos*) in Tochigi prefecture, Japan)

佐々木 貴正<sup>1</sup>、竹田 努<sup>2</sup>、米満 研三<sup>3</sup>、浅井 鉄夫<sup>4</sup>、朝倉 宏<sup>1</sup>、永井 英貴<sup>5</sup>

人のカンピロバクター感染症の原因の多くは汚染鶏肉の喫食である。鶏は農場でカンピロバクターに感染する。カラスは、鶏のカンピロバクター感染における保菌動物である可能性があるため、カラスから分離されたカンピロバクター株の性状を調査した。栃木県に罾を設置し、7回で延べ82羽(27個体)のカラスを捕獲した。27個体中21(77.8%)個体は2回以上捕獲された。*C. jejuni*は延べ82羽中55(67.1%)羽から分離され、19の遺伝子型に分類された。このうち21(72.4%)の遺伝子型は新規の遺伝子型であったが、様々な動物種から広く分離されるST45という遺伝子型(*generalist*)が1株見つかった。2回以上捕獲されたカラスであっても、同じ遺伝子型の*C. jejuni*が分離されることはほとんどなかった。分離株におけるテトラサイクリンとストレプトマイシンの耐性率は、それぞれ18.2%と3.6%であった。耐性株は、プラスミド関連性の*tetO*又は*aadE*遺伝子を保有していた。なお、シプロフロキサシン耐性は認められなかった。

以上の結果は、多種の遺伝子型の*C. jejuni*がカラスに感染することができるが、それらの多くは人や鶏から分離される*C. jejuni*とは異なり、鶏のカンピロバクター感染における保菌動物としてのカラスの重要性は限られていることを示唆している。しかしながら、*generalist*が感染している可能性があることから、継続的にモニタリングすべきである。

(The Journal of Veterinary Medical Science 84(7): 1029–1033, 2022. 英文)

---

1 国立医薬品食品衛生研究所

2 宇都宮大学

3 国立感染症研究所

4 岐阜大学

5 農林水産省動物医薬品検査所