

平成29年度食品の安全確保推進研究事業

「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」

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARMとJANISの連携について

分担研究者：川西 路子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：木島 まゆみ（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：内山 万利子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：白川 崇大（農林水産省動物医薬品検査所）

## 研究要旨

薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」が項目として記載されている。また、同戦略に「食品中の薬剤耐性に関する動向調査・監視体制の確立にむけた調査研究の実施」が記載されており、本研究事業において、愛媛県立衛生環境研究所の四宮所長らにより食品由来の検体からサルモネラを対象として全国調査が進められているところである。本年度は、薬剤耐性動向調査の連携を継続発展させるため、国立感染症研究所において前年度食品由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成したソフトを改修し、JVARMのと畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌のデータを入力しアンチバイオグラムを作成した。また大腸菌と同様の方法で、JVARMの食鳥処理場由来株のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成した。また、ヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについて、平成24年～平成27年度に食鳥処理場及びと畜場で分離された大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-5* の保有状況について確認したところ、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。

### A. 研究目的

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介して人に伝播し、人の健康に危害を与える可能性について評価するため、国内では動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) が構築されている。

一方、医療の分野においては、医療機関における院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況および薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査することで、我が国の院内感染の概況を把握し、医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的に、厚生労働省院内感染対策サーベイランス

(JANIS) が構築されている。

本研究では、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略 2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」のため、JVARM データの整備作業を継続した。昨年度国立感染症研究所において、食品由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成するためのソフトが作成されたことから、当該ソフトを改修し、JVARM のと畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌及びサルモ

ネラのデータを入力しアンチバイオグラムを作成することとした。

また、ヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについては伝達性耐性遺伝子 *mcr-1* が国産の鶏肉からも検出されており、新たなプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5* が国内外で報告されていることから、家畜で使用されるコリスチンのヒト医療への影響について評価するために家畜におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を把握することを目的とする。

## B. 研究方法

(1) と畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成

国立感染症研究所において前年度食品由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成したソフトを抗菌剤の種類及び薬剤測定 range を JVARM に合うよう改修し、と畜場由来株の大腸菌の MIC 値を入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(2)食鳥処理場由来株のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成

(1) と同様のソフトを用いて抗菌剤の種類及び薬剤測定 range を JVARM に合うよう改修し、食鳥処理場由来株のサルモネラの MIC 値を入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(3) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について確認する。

平成 24 年から 27 年度の MIC2mg/L 以上の株 (表 1) について遺伝子を抽出し、各コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-5* について既報の論文の PCR 法 (表 2) に基づき、遺伝子を検出した。

## C. 研究結果

(1) と畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成

平成 27 年度と畜場由来大腸菌のアンチバイオグラムを CLSI2012 の SIR 基準により作成し (図 1～3)、

動物医薬品検査所 HP

([http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3-1.html](http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)) に掲載した。また、入力データを国立感染症研究所と共有した。

(2)食鳥処理場由来株のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成

平成 24 年度～27 年度の食鳥処理場由来株のサルモネラのアンチバイオグラムを CLSI2012 の SIR 基準により作成し (図 4～7)、動物医薬品検査所 HP

([http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3-1.html](http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)) に掲載した。また、入力データを国立感染症研究所と共有した。

(3)と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について *mcr-2*、*mcr-4* 及び *mcr-3* 遺伝子についていずれの菌株からも分離されなかった。*mcr-1* は牛由来株からは検出されなかったが、豚由来株では平成 24 年 2 株 (1.0% : 割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、平成 25 年 1 株 (0.8%)、平成 26 年 1 株 (1.1%)、平成 27 年 0 株 (0%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 0 株 (0%)、平成 25 年 4 株 (2.4%)、平成 26 年 2 株 (1.2%)、平成 27 年 9 株 (4.9%) 検出された。また、*mcr-5* 遺伝子は牛由来株は平成 27 年のみ 1 株 (0.4%)、豚由来株では平成 24 年のみ 1 株 (0.5%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 3 株 (2.3%)、平成 25 年 3 株 (1.8%) 平成 26 年 1 株 (0.6%) 検出された (図 8)。

## D. 考察

JVARM のと畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌について CLSI2012 の SIR 基準によるアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。食品由来株については、全国の地方衛生研究所において収集されたサルモネラについてモニタリングを開始されたことから、食鳥処理場由来のサルモネラについてもアンチバイオグラムを作成した。

今後「薬剤耐性ワンヘルス動向調査報告書」及び「ワンヘルス Web サイト」に活用することが可能であると考えられる。

また、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の動向を把握するため、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌における *mcr-1* ~ *mcr-5* 遺伝子の保有状況について確認したところ、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 遺伝子は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。臼井らの日本の一部の豚由来株における報告 (2017 Int J Antimicrob Agents) においても、病畜由来株からは *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* が検出されているが、農場における健康な豚由来からは今回の調査と同様に *mcr-1* 及び *mcr-5* のみが低率に分離されている。

なお、コリスチン耐性については食品安全委員会におけるリスクの程度は「中等度」との評価を受けて、農林水産省では動物用医薬品としては、これまでに食品安全委員会が「中等度」と評価した医療上重要度の高いフルオロキノロン製剤などと同様、平成30年4月以降コリスチンを第二次選択薬として位置づけ、飼料添加物としては指定を取り消す予定である。

来年度以降コリスチンにおけるリスク管理措置の効果を検証し、ヒト医療への影響について評価するためにも引き続きと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を調査していく必要がある。

## E. 結論

と畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及び食鳥処理場由来のサルモネラについてアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の検出の結果、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 遺伝子は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- (1)川西路子「動物由来細菌薬剤感受性調査 (JVARM) の概要と薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランへの対応」日本獣医師会雑誌 2017年、70巻1号、p 14-17
- (2)Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M, Abo H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Asai T, Hamamoto S. Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftriaxone and third-generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. J Vet Diagn Invest. 29(5):716-720 (2017).

### 2.学会等発表

- (1)「食用動物由来のコリスチン耐性の現状とコリスチンのリスク評価及びリスク管理措置について」抗菌剤研究会シンポジウム (平成29年4月 東京)
- (2)「動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM)」第27回感染研シンポジウム (平成29年5月 感染研)
- (3)「動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM) の概要と薬剤耐性」日本公衆衛生学会一地方衛生研究所フォーラム-(平成29年10月 鹿児島)
- (4)「動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM) の概要について」平成29年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部研究会 (平成29年11月 大阪)

## 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。

表1 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌の菌株数及びMIC2 mg/L以上の菌株数

		平成 24 年	平成 25 年	平成 26 年	平成 27 年
全株数	牛	248	341	263	274
	豚	195	127	93	96
	鶏	133	166	172	184
MIC2mg/L 以上の株数	牛	3	4	5	3
	豚	7	2	2	2
	鶏	6	8	3	12

表2 コリスチン耐性遺伝子検出のPCR

コリスチン耐性遺伝子	プライマー配列	参考文献
<i>mcr-1</i>	F 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3'	Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8.
	R 5'-CTTGGTCCGTCTGTGTA GGG-3'	
<i>mcr-2</i>	F 5' TGGTACAGCCCCTTTATT 3'	Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, <i>mcr-2</i> , in <i>Escherichia coli</i> , Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016;21(27):
	R 5' GCTTGAGATTGGGTTATGA 3'	
<i>mcr-3</i>	F 5'TTGGCACTGTATTTGCATTT-3'	Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene <i>mcr-3</i> in <i>Escherichia coli</i> . mBio 8:e00543-17.
	R 5' TTAACGAAATTGGCTGGAACA-3'	
<i>mcr-4</i>	F 5' ATTGGGATAGTCGCCTTTTT 3'	Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF. Novel plasmid-mediated colistin resistance <i>mcr-4</i> gene in <i>Salmonella</i> and <i>Escherichia coli</i> , Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017;22(31):
	R 5' TTACAGCCAGAATCATTATCA 3'	
<i>mcr-5</i>	F 5'-ATGCGGTTGTCTGCATTTATC-3'	Maria Borowiak, Jennie Fischer, Jens A. Hammerl, Rene S. Hendriksen, Istvan Szabo and Burkhard Malorn. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, <i>mcr-5</i> , conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkx327
	R 5'-TCATGTGGTTGTCCTTTCTG-3'	

図1 2015年 と畜場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Escherichia coli* 畜種 (肉用牛 N=274)

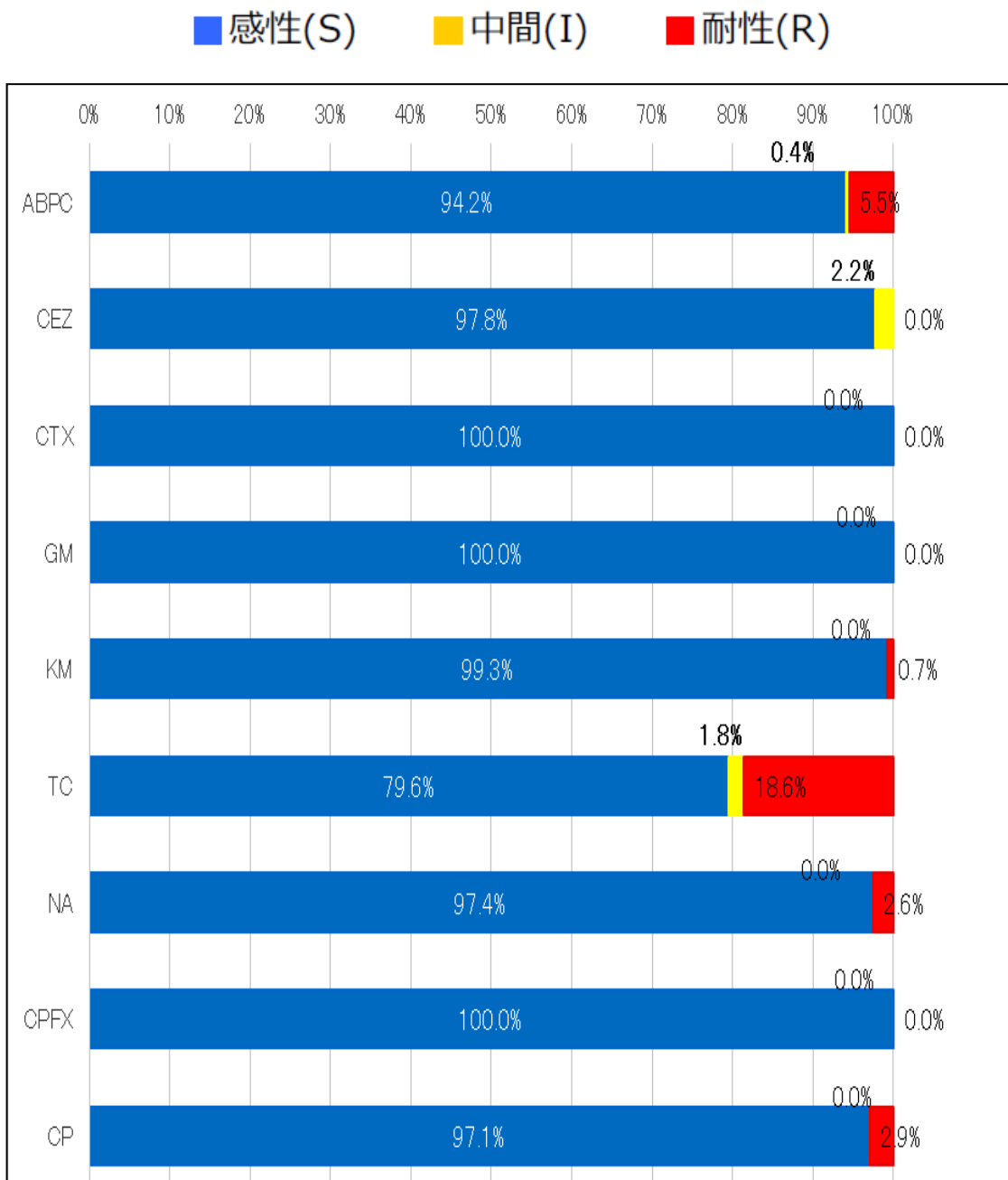


図2 2015年 と畜場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Escherichia coli* 畜種 (豚 N=96)

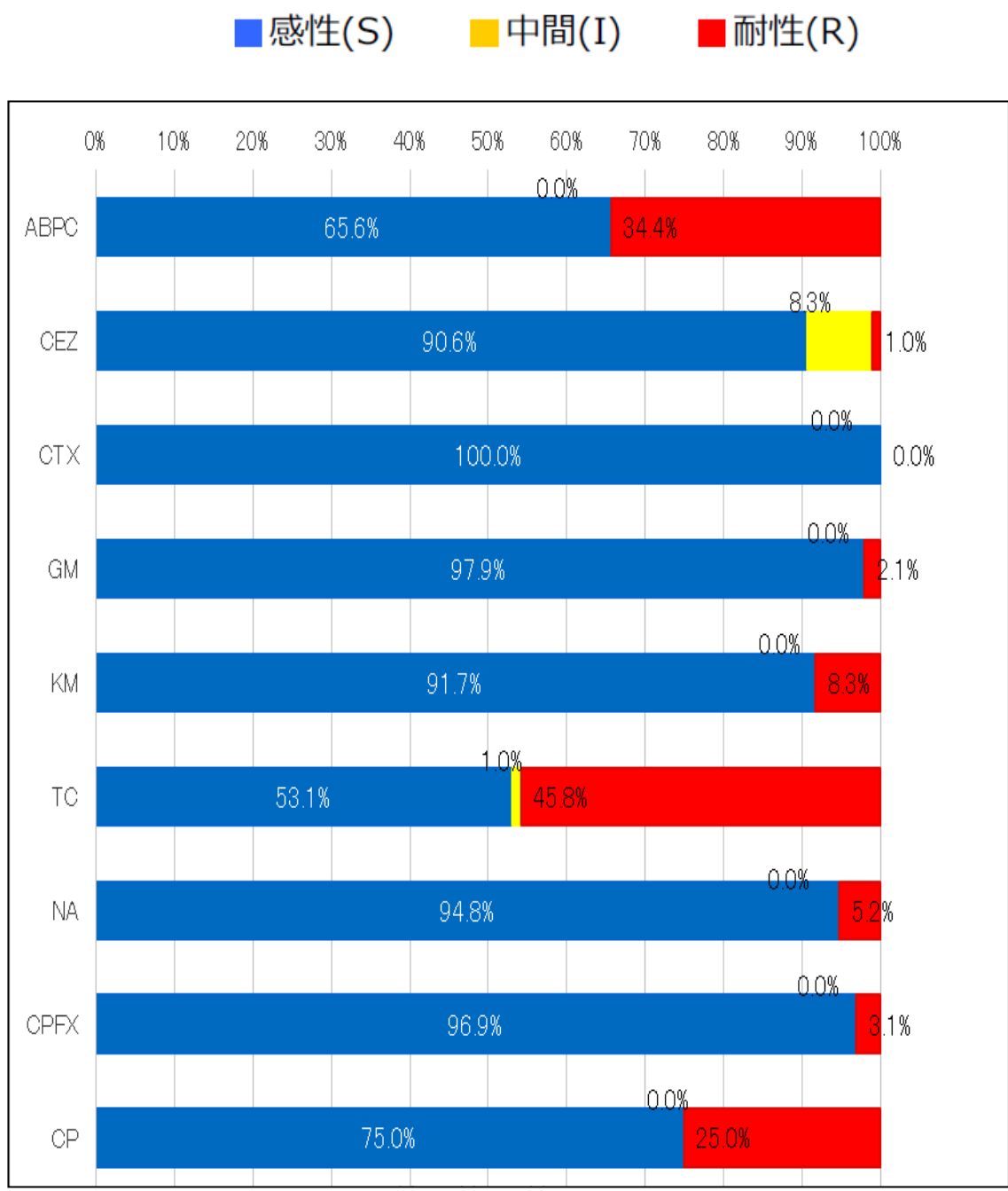


図3 2015年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Escherichia coli* 畜種 (鶏 N=184)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

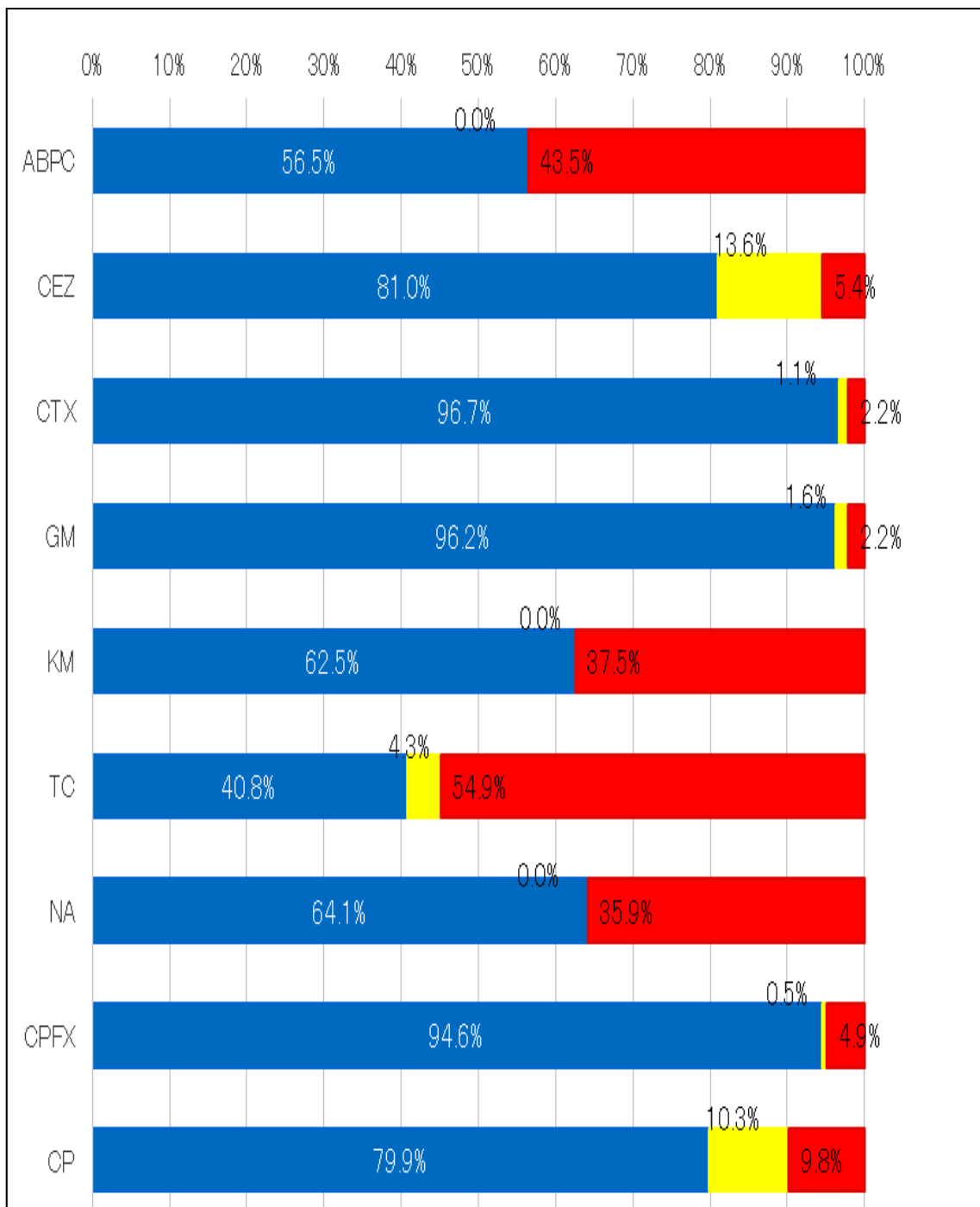


図4 2012年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種（鶏 N=94）

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

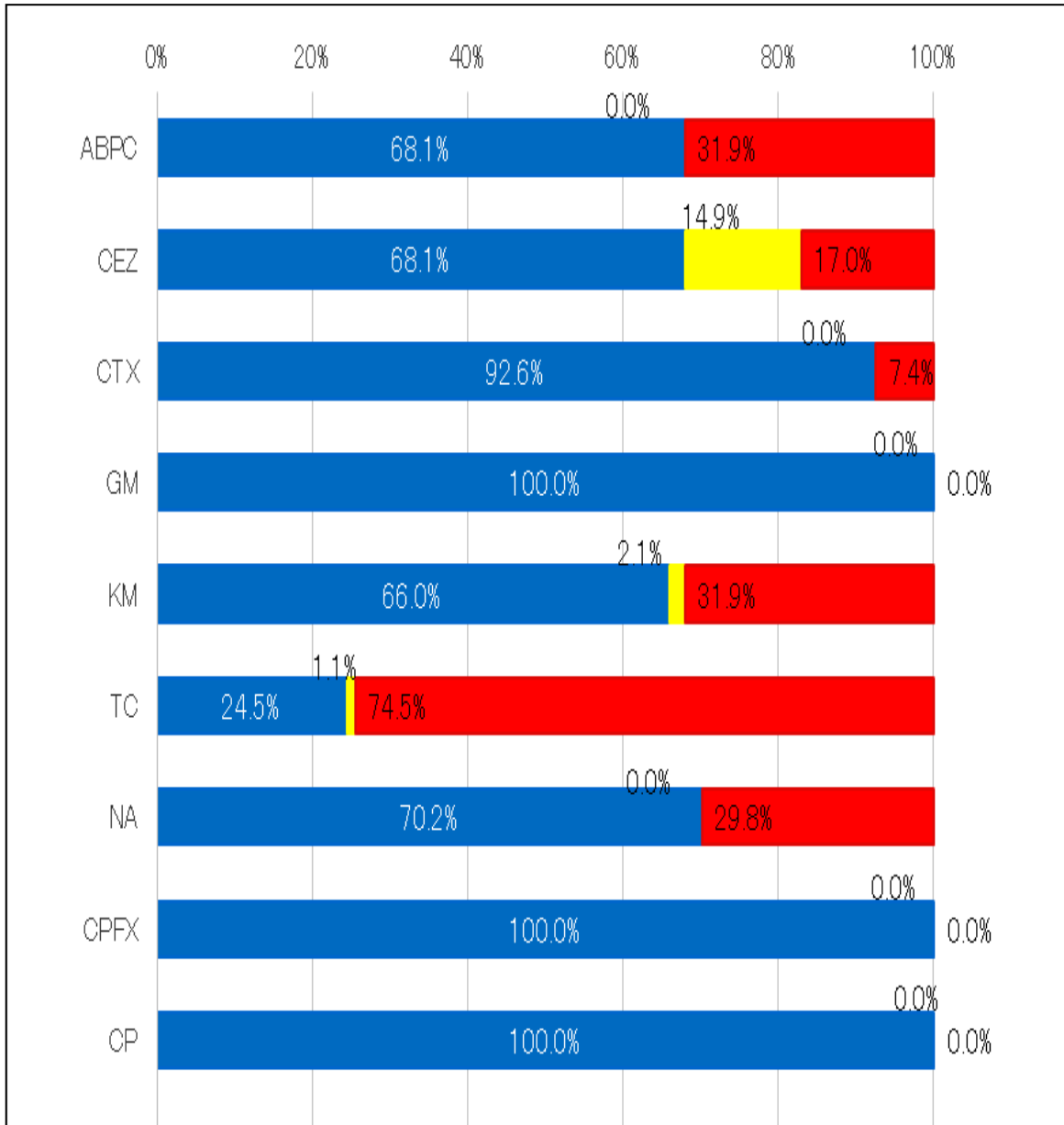




図5 2013年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種 (鶏 N=118)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

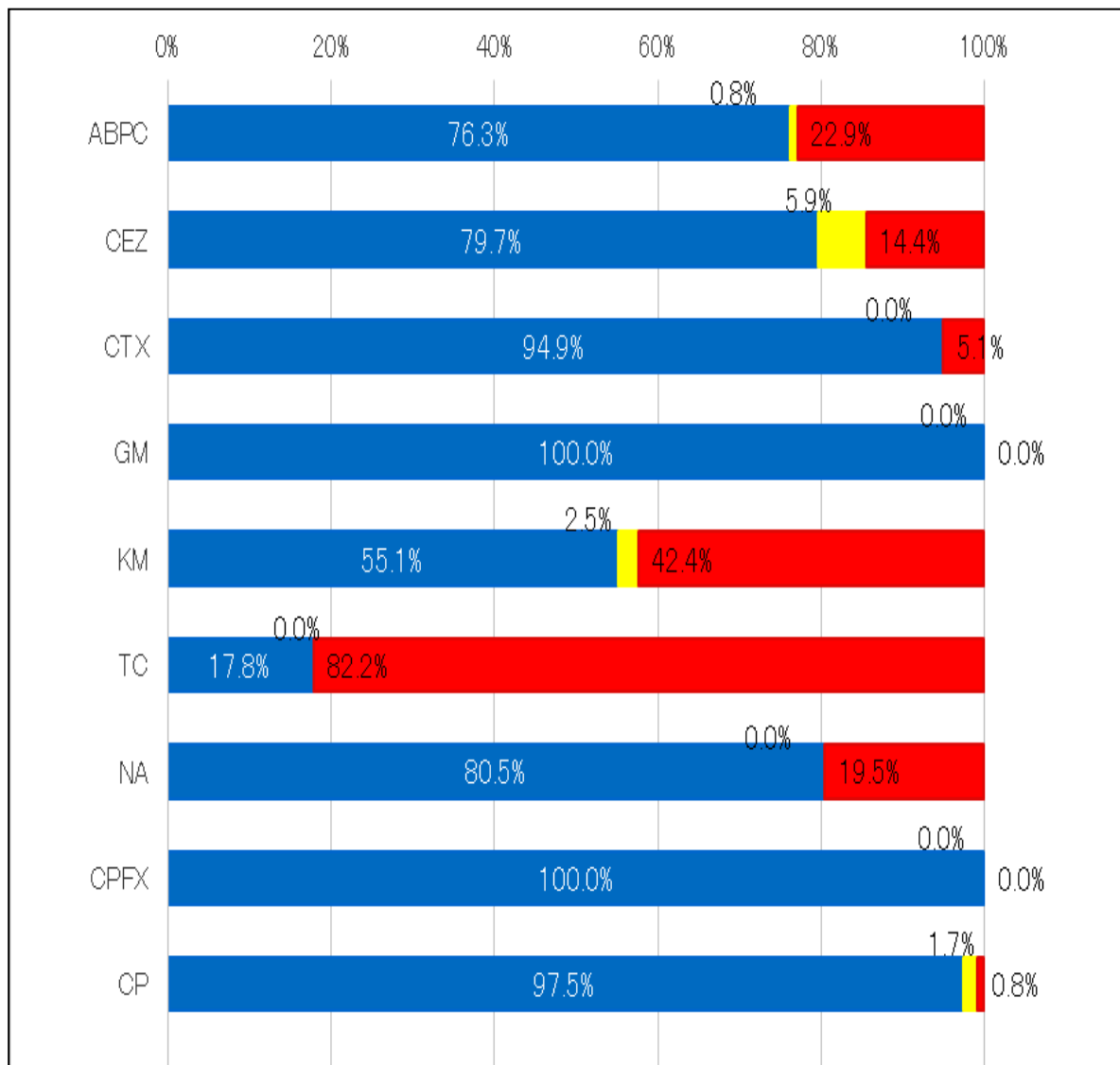


図6 2014年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種 (鶏 N=128)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

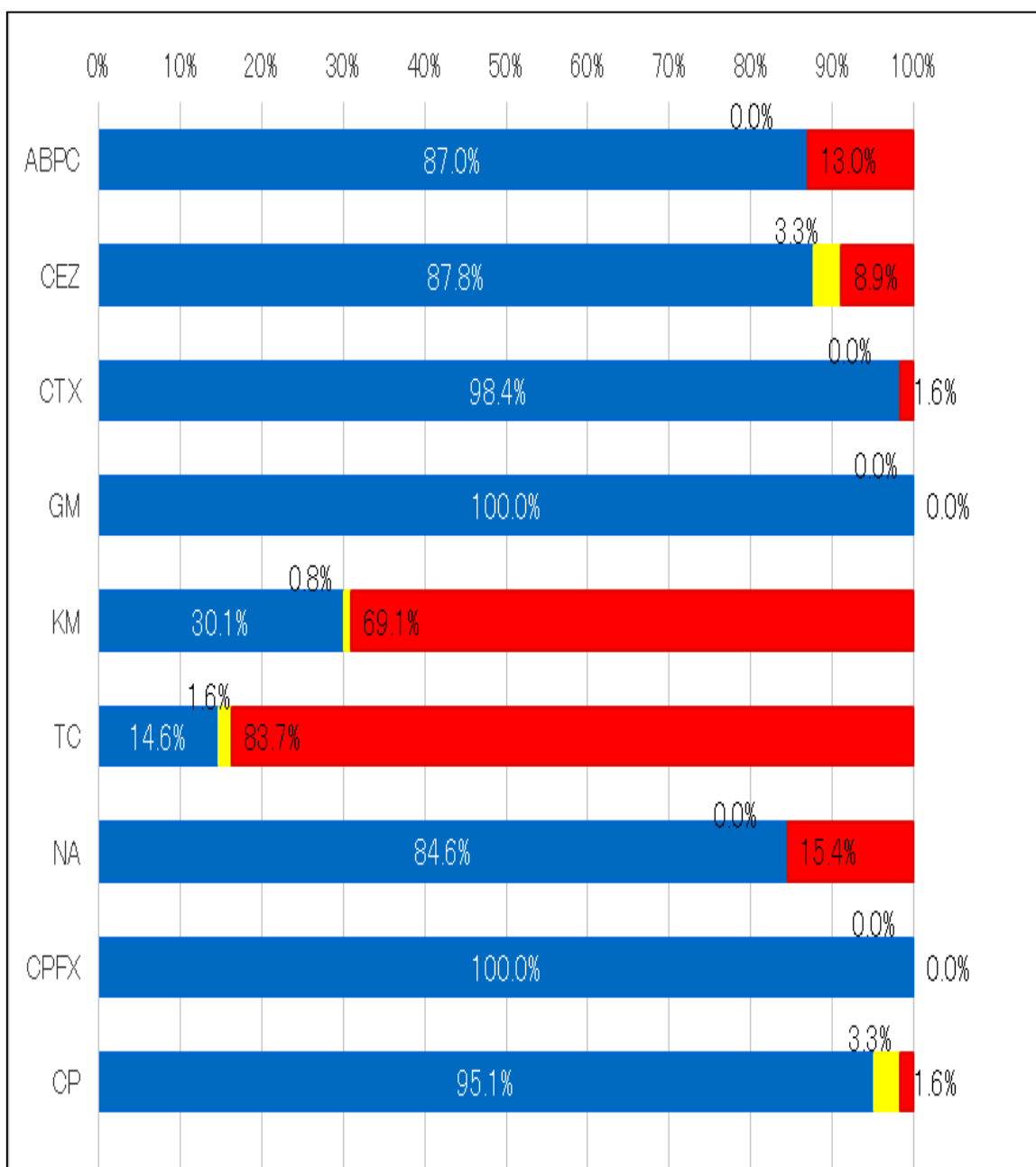


図7 2015年 食鳥処理場由来株

主要菌の抗菌薬感受性

*Salmonella* spp. 畜種 (鶏 N=123)

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)

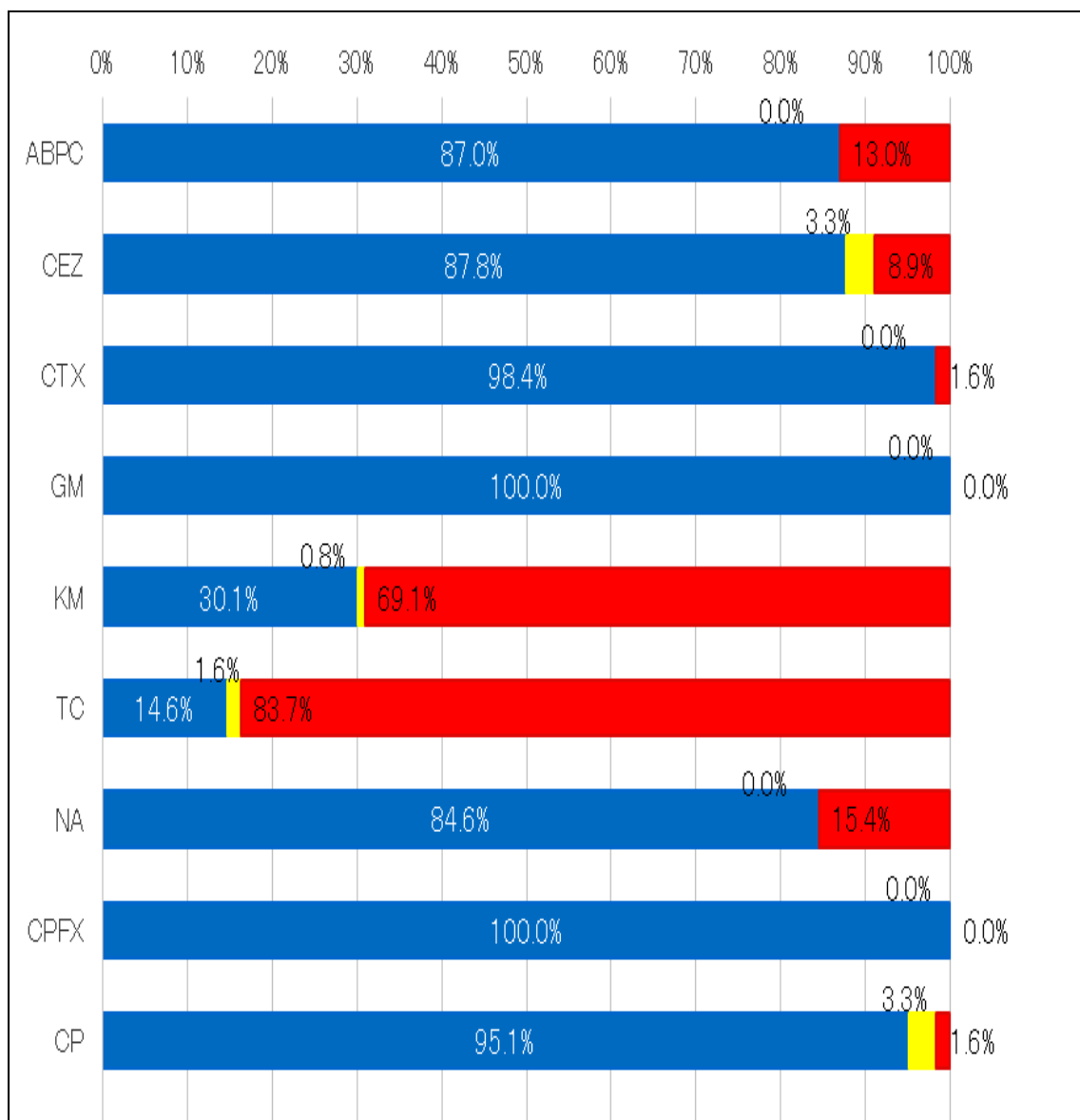


図8 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌株の *mcr1* 及び *mcr5* 遺伝子保有株数及び保有率

