

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

「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強化のための研究」

分担課題名：動物（家畜）由来細菌の薬剤耐性モニタリング：JVARMとの連携

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：関口 秀人（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：松田 真理（農林水産省動物医薬品検査所）
研究協力者：平岡 ゆかり（農林水産省動物医薬品検査所）
研究協力者：原田 咲（農林水産省動物医薬品検査所）
研究協力者：熊川 美旺（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。本研究では当該データの連携を実施するため、動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) のと畜場及び食鳥処理場由来（令和元年度及び令和2年）サルモネラ及びカンピロバクター、と畜場由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 等について次世代シーケンサーによってドラフトゲノム配列を取得し、血清型別、遺伝子型別や薬剤耐性遺伝子等の検出を行った。その結果、サルモネラについて、血清型は Schwarzengrund が、ST (Sequence Type) は ST241 が最も優勢であった。また、カンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) については牛では ST806 が、鶏では ST918 が最も優勢であった。MRSA については ST398 が最も優勢であった。また、MRSA の cgMLST による解析では、過去の病気の豚から分離されたメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) (ST398) 株は、現在国内の豚から検出される MRSA (ST398) と遺伝的な関連性は低いと考えられた。

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、令和2年度にと畜場及び食鳥処理場で分離された大腸菌及びサルモネラのうち、コリスチンの最小発育阻止濃度 (MIC) が $2 \mu\text{g/mL}$ 以上の株についてコリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*~*mcr-10*) の保有状況を確認したところ、大腸菌から *mcr-1* 遺伝子、*mcr-5* 遺伝子及び *mcr-3* 遺伝子は検出されたが低率（各年、動物種毎に、いずれも 5%以下）であった。2010年から2015年に健康家畜（牛、豚、鶏）から分離された大腸菌の *mcr-5* が乗っている環状プラスミドの配列を比較したところ、*mcr-5* 保有プラスミドの中には、動物種に特異的なものもある可能性が示唆された。

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、国内では農林水産省動物医薬品検査

所が基幹検査機関となって実施している動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) 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、動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) において収集した株のゲノムデータを、国立感染症研究所 (感疫研) に提供するとともに、各種解析を行った。

JVARM で収集されたサルモネラ、カンピロバクター及び MRSA については、次世代シーケンサーによってドラフトゲノム配列を取得し、血清型別や遺伝子型別を行うとともに、薬剤耐性遺伝子の検出を行った。さらに、MRSA について、cgMLST 解析による分子疫学的関係を分析した。

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* 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した。

さらに、動物由来株における *mcr* 遺伝子を保有したプラスミドの特徴を把握することを目的として、ショートリードとロングリードを組み合わせたハイブリッドアセンブルによってプラスミドの全長配列を取得して解析を行った。

B. 研究方法

(1)JVARM 由来株のゲノムデータの取得及びそれを用いた解析

と畜場及び食鳥処理場由来サルモネラ 185 株 (鶏由来のみ) 及びカンピロバクター 311 株 (牛由来: 227 株、鶏由来 84 株) (令和元年度及び令和 2 年度) について、DNA を抽出し、感疫研において、次世代シーケンサーによってドラフトゲノム配列を取得し、その配列を用いて血清型別や遺伝子型別を行うとともに、薬剤耐性遺伝子の検出を行った。

(2) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ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

令和 2 年度に分離された、コリスチンの MIC が $2 \mu\text{g/mL}$ 以上のと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌 7 株及び食鳥処理場由来サルモネラ属菌 107 株について DNA を抽出し、各コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-10* を鈴木らのマルチプレックス PCR 法によって検出した。

(3) *mcr* 遺伝子を保有したプラスミドの解析

2010 年から 2015 年に健康家畜 (牛、豚、鶏) から分離された大腸菌のうち、*mcr-5* 遺伝子を保有する 26 株についてハイブリッドアセンブルによって *mcr-5* が乗っている環状プラスミドの配列を取得し、そこに乗っている耐性遺伝子の検出及び Inc 型の決定を行った。

(4) 豚由来 MRSA の遺伝子解析

2022 年に食肉処理場の豚から分離された MRSA40 株について次世代シーケンサーによってドラフトゲノム配列を取得し、その配列を用いて MLST 型別、*spa* 型別、SCC*mec* 型別、を行うとともに、薬剤耐性遺伝子の検出を行った。また、過去の病気の豚から分離された MSSA (ST398) 株との cgMLST 型別による分子疫学的解析を実施した。

C. 研究結果

(1) JVARM 由来株のゲノムデータの取得及びそれを用いた解析

サルモネラについて、血清型は Schwarzengrund (76.8%) が一番多く、次いで Infantis (21.1%) が多かった (図 1)。ST は ST241 (74.1%) が最も多く、次いで ST32 (20.5%) が多かった (図 2)。耐性遺伝子は、アミノグリコシド耐性遺伝子である *aac(6)-Iaa* をすべての株が保有していた。その他、60%以上の株が保有していた耐性遺伝子としてはアミノグリコシド耐性遺伝子である *aadA1* (71.4%) 及び *aph(3')-Ia* (73.5%)、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(A)* (72.4%)、サルファ剤耐性遺伝子である *sul1* (71.4%)、トリメトプリム耐性遺伝子である *dfrA14* (61.1%) が認められた (図 3)。

カンピロバクターについては、*C. jejuni* の ST 型は

牛由来では、ST806 (25.6%)、次いでST21 (17.6%)が多かった(図4)。鶏由来ではST918 (8.3%)が最も多く、次いでST4389 (7.2%)が多かった(図5)。耐性遺伝子は、牛由来、鶏由来ともにβ-ラクタマーゼ遺伝子である *bla_{OXA-193}* (牛: 71.0%、鶏: 50.0%) が最も多く、次いでテトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(O)* (牛: 69.6%、鶏 31.0%) が多かった(図6、7)。牛由来及び鶏由来ともに、マクロライド耐性に関連する遺伝子は保有していなかった。

(2) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ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(図8)

大腸菌について、*mcr-1*、*mcr-3* 及び *mcr-5* 遺伝子のみ検出された。*mcr-1* が豚から5株(4.3%: 割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、鶏から1株(0.6%)、*mcr-3* が豚から1株(0.8%)、*mcr-5* が牛由来から1(0.3%)株検出された。なお、豚由来の *mcr-3* は、*mcr-1* 保有株から検出された。一方サルモネラからはいずれの *mcr* 遺伝子も検出されなかった。

(3) 健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子(*mcr-5*)保有プラスミドの解析(表)

プラスミドに乗っている耐性遺伝子の数は1から11とバリエーションがあったが、*mcr-5* のみが載っているサイズが60Kbから77KbでIncFIIのプラスミドが牛由来株9株及び豚由来株1株から検出された。また、*mcr-5* 及び *bla_{TEM-1B}* が載ったIncFIIのプラスミド牛由来株2株及び豚由来株1株から、*mcr-5* の他に *tet(A)*、*qnrS1* 等が載っているサイズが127Kbから130KbでIncFIBのプラスミドが鶏由来株5株から検出された。

(4) 豚由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の解析

MRSAについては、ST398 (82.5%) が最も多く、次いでST5 (15.0%) であった(図9)。*spa* 型は、t034 (65.0%) が最も多く、SCC*mec* 型は Vc 型 (62.5%) が多かった(図10)。また、全体の67.5%の株が、亜鉛耐性遺伝子である *czrC* を保有していた。

耐性遺伝子は、すべての株がメチシリン耐性遺伝子である *mecA* 及びβ-ラクタマーゼ遺伝子である

blaZ を保有し、その他60%以上の株が保有していた耐性遺伝子としては、アミノグリコシド耐性遺伝子である *ant(9)-Ia* (70.0%)、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(M)* (82.5%) 及び *tet(K)* (80.0%) が認められた(図11)。

cgMLSTの結果では、以前に病畜から分離されたMSSA(ST398)の6株は、国内の豚由来のMRSA ST398/t034株と異なるクラスターを形成した。また西日本、東日本由来株だけで形成されるクラスターも確認された(図12)

D. 考察

サルモネラ及びカンピロバクターは食中毒の原因菌として公衆衛生上重要な細菌であり、JVARMにおいてと畜場及び食鳥処理場より収集している菌株について、次世代シーケンサーによってドラフトゲノム配列を取得し、血清型別、遺伝子型別、耐性遺伝子の検出等を行った。サルモネラについて、*S. Schwarzengrund* 及び *S. Infantis* の占める割合が高く、これはこれまでの傾向と同じであり、食品由来株とは類似しているが、ヒト由来株とは異なっていた。薬剤耐性遺伝子としては、アミノグリコシド耐性遺伝子を全株が保有しており、近年における食鳥処理場由来サルモネラにおける高率なアミノグリコシドの耐性率を裏付けていた。

カンピロバクターについては、*C. jejuni* のST型は多様性が認められた。牛由来株において、最も多いST型の一つであるST806は、以前牛の胆のうやヒト臨床由来株からの分離も報告されている型であった。ヒトのカンピロバクター感染症では、基本的に抗菌剤は使用されないが、重症事例の治療のためにマクロライド系薬剤が使用される。今回解析した株からは、マクロライド系薬剤の耐性遺伝子は検出されておらず、治療に影響を及ぼす懸念は小さいものと考えられた。

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及びサルモネラにおける *mcr-1* ~ *mcr-10* 遺伝子の保有状況について確認したところ、大腸菌で *mcr-1*、*mcr-3* 及び *mcr-5* 遺伝子が検出されたが保有率は低率であり、経年的な上昇傾向は認められなかった。*mcr-5*

遺伝子を保有するプラスミドの性状解析を行ったところ、*mcr-5* 保有プラスミドの中には、動物種に特異的なものもある可能性が示唆された。コリスチンは平成 30 年に飼料添加物としての指定が取消され、動物用医薬品としては第二次選択薬に指定され限定的に使用されている。鶏用の動物用医薬品は販売されておらず、現在はコリスチンの選択圧はないが、コリスチン耐性遺伝子がテトラサイクリン耐性遺伝子と同じプラスミド上にあることから、テトラサイクリンの使用によって、コリスチン耐性が共選択され、消失せずに検出されている可能性も考えられた。したがって、第二次選択薬としてのコリスチンはもちろん、その他の抗菌剤も含めた抗菌剤の慎重使用の徹底や抗菌剤の使用機会の低減につながる飼養衛生管理の向上、ワクチンによる感染防御等の取組の推進が重要である。

MRSA については、ST398 で *spa* 型が t034 の株が一番多く、これは家畜関連 MRSA (LA-MRSA) として報告されている一般的な型であった。テトラサイクリン耐性遺伝子、アミノグリコシド耐性遺伝子や亜鉛耐性遺伝子等を高率に保有していることから、MRSA の選択圧を下げるためには、テトラサイクリンやアミノグリコシド系抗菌剤のより一層の慎重使用の徹底、亜鉛の使用は栄養成分として必要な最小限とすることが重要であると考えられた。

また、分子疫学的な解析の結果、過去の病気の豚から分離された MSSA (ST398) 株は、現在国内の豚から検出される MRSA (ST398) と遺伝的な関連性は低いと考えられ、これらの日本に存在していた MSSA (ST398) 株が国内で *mecA* 遺伝子を獲得し、MRSA として拡散したのではないものと考えられた。なお、MRSA は日本の広い範囲で分離される株と一部の地域でのみ分離される株があることが示唆されたが、母豚の入手経路や、肥育豚流通などが影響している可能性も考えられ、それらを考慮した検討が必要である。

現在のところ、国内において豚から分離される MRSA とヒトから分離される MRSA では遺伝子型等が異なり、豚からヒトに感染した事例はないと考えられるが、海外では豚からヒトへの直接接触による感染事例も報告されていることから、豚の生産者等

において直接感染を防ぐための、手洗い等を徹底するとともに、豚における MRSA の保有状況や遺伝学的状況を引き続きモニタリングしていく必要があると考えられた。

E. 結論

公衆衛生上重要なサルモネラ、カンピロバクター及び MRSA について、JVARM において収集した株から得た全ゲノムデータを用いて解析することにより、血清型や遺伝子型、保有する薬剤耐性遺伝子等を網羅的に把握することができ、ヒト由来株や食品由来株とのデータ連携の実施に資することが可能と考えられた。

今回の結果からは、家畜由来の薬剤耐性菌が、ヒトの感染症の治療に影響を及ぼす懸念を示す明らかな知見は確認されなかったが、今後も薬剤耐性菌が増加することのないよう、動物分野における抗菌剤の慎重使用の徹底、抗菌剤の使用機会の低減などの薬剤耐性対策を引き続き推進していく必要がある。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 1. Ozawa M, Furuya Y, Akama R, Harada S, Matsuda M, Abo H, Shirakawa T, Kawanishi M, Yoshida E, Furuno M, Fukuhara H, Kasuya K, Shimazaki Y. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs in Japan. *Vet Microbiol.* 2022 ;273:109523. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109523.

2. 学会発表

- (1) 川西路子、小澤真名緒、古谷ゆかり、森谷このみ、松田真理、赤間亮子、熊川実旺、首藤江梨奈、関口秀人、嶋崎洋子「健康鶏由来サルモネラにおける薬剤感受性試験結果と全ゲノム解析による薬剤耐性遺伝子の有無の相関について」第 165 回日本獣医学会学術集会

3. 業界関係者向け説明会

なし

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

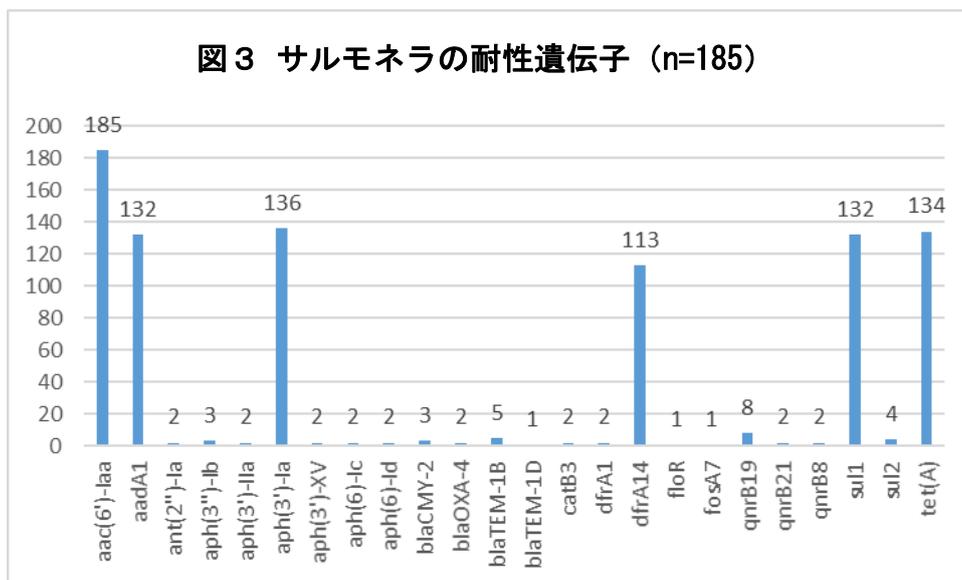
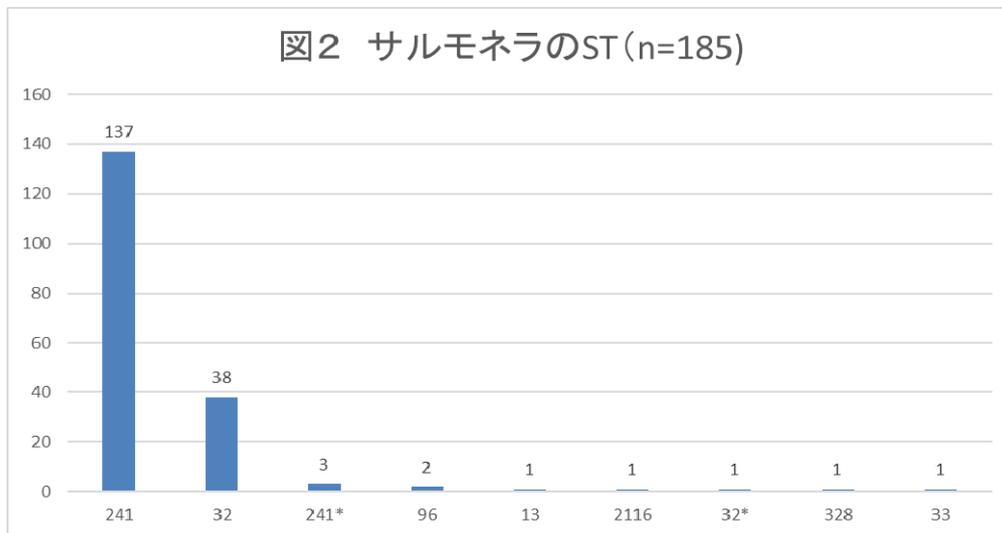
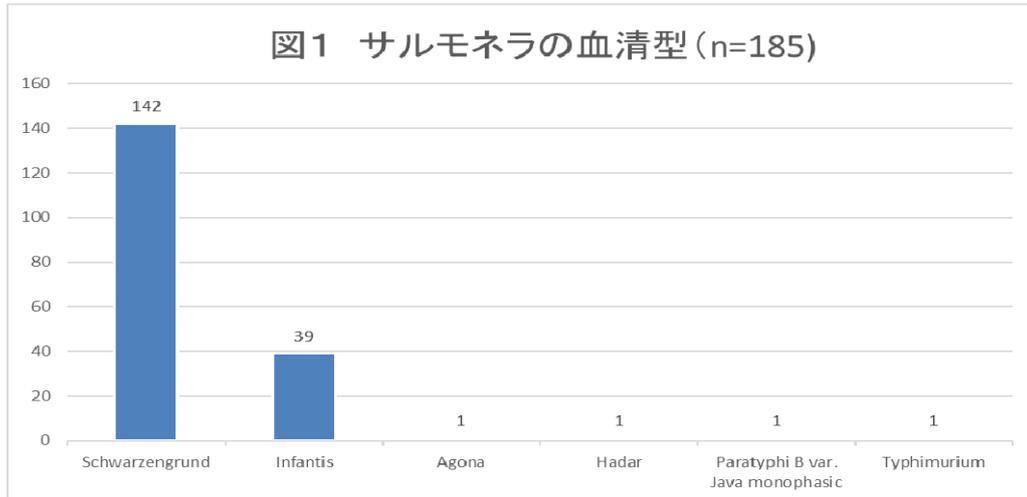


図4 牛由来 *C. jejuni* の ST (n=227)

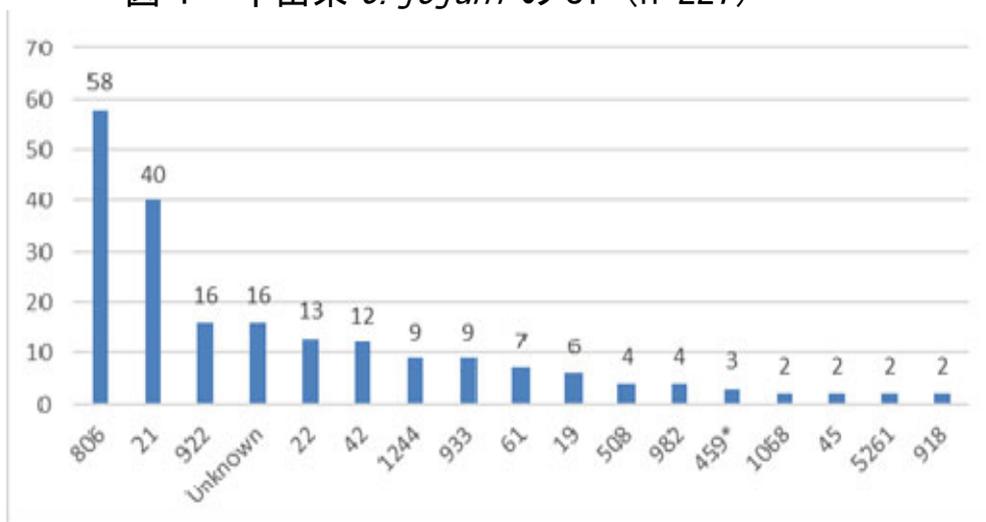


図5 鶏由来 *C. jejuni* の ST (n=84)

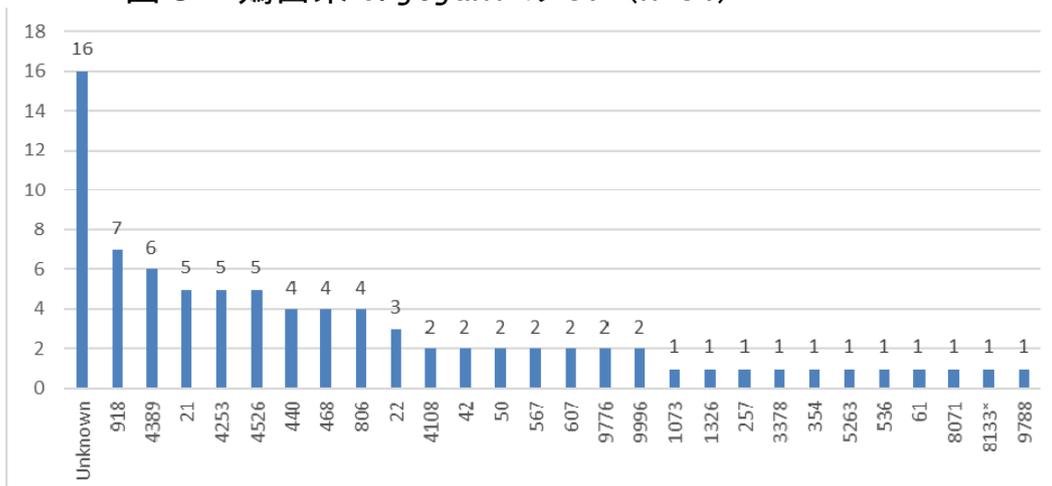


図6 牛由来 *C. jejuni* の耐性遺伝 (n=227)

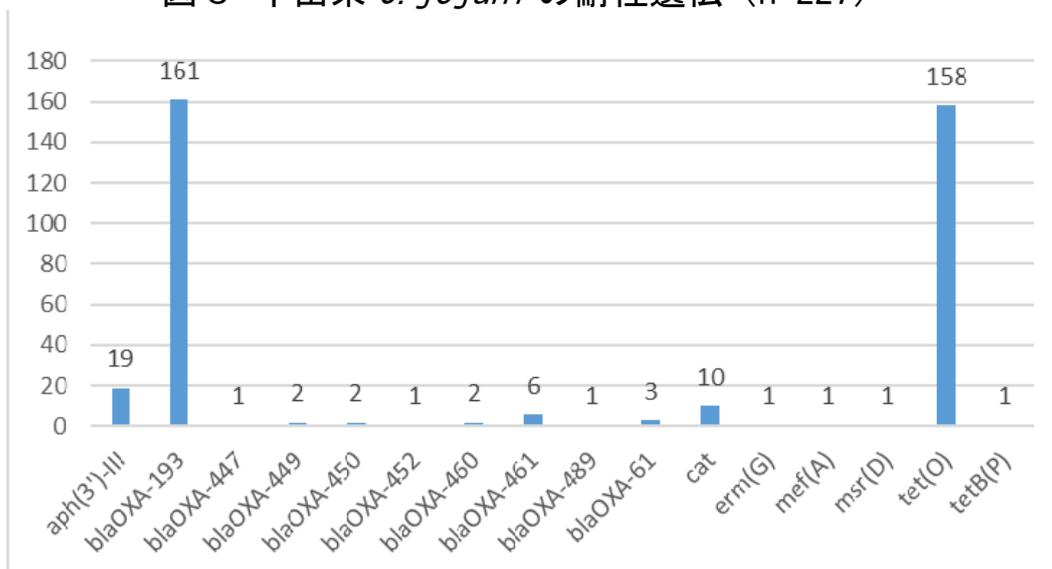


図7 鶏由来 *C. jejuni* の耐性遺伝子 (n=84)

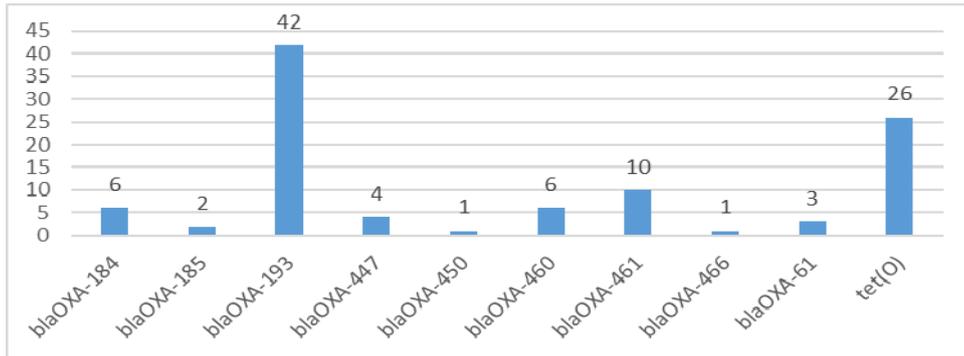


図8 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌 コリスチン耐性遺伝子 (*mcr1*~*mcr10*) の検出

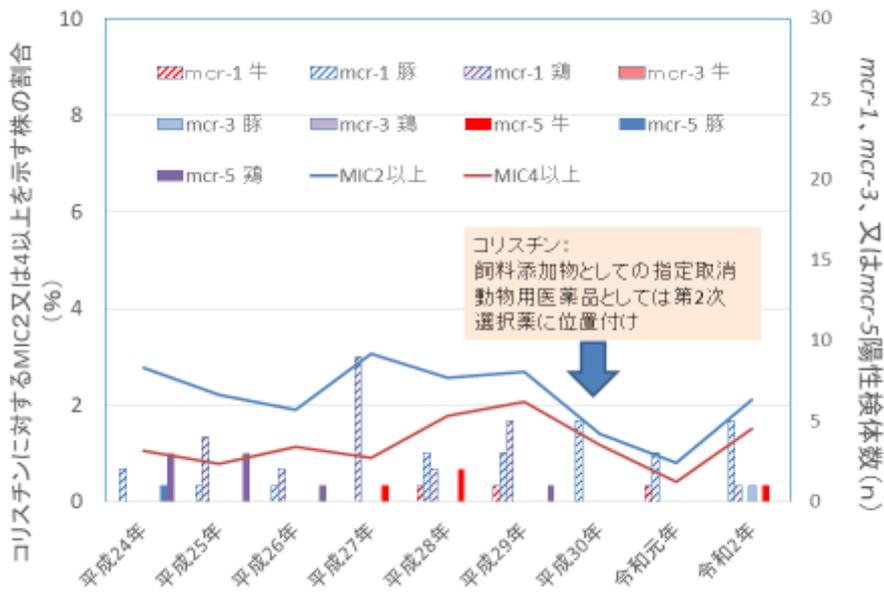


表 *mcr-5* 遺伝子保有プラスミド

Isolates	Contig length	Resistance genes	Plasmid types	No. of resistance genes
23-Ec-B-230	11623	<i>mcr-5.1</i>	CoRNAL1	1
24-Ec-P-72	45345	<i>mcr-5.1</i>	IncX1	1
27-Ec-B-117	60037	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pOco)	1
23-Ec-B-2	63337	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pOco)	1
25-Ec-B-35	68021	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pOco)	1
23-Ec-B-245	70101	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
23-Ec-B-111	70125	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
26-Ec-B-185	70554	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
27-Ec-P-20	74286	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
22-Ec-B-66	75139	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
26-Ec-B-19	77816	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
23-Ec-B-216	77825	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pHNTAB)	1
22-Ec-B-4	100633	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(AP001918),IncFII(p-HNTAB)	1
24-Ec-B-164	21222	<i>mcr-5.1,mcr-5.2</i>	ND	2
22-Ec-P-33	66256	<i>blaTEM-1a,mcr-5.1</i>	IncFII_1	2
24-Ec-B-164	70418	<i>blaTEM-1a,mcr-5.1</i>	IncFII(pOco)	2
24-Ec-B-162	73079	<i>blaTEM-1a,mcr-5.1</i>	IncFII(pOco)	2
23-Ec-C-40	128849	<i>mcr-5.1,catA1</i>	IncFII(AP001918),I	2
27-Ec-P-94	73426	<i>aph(3')-Ib,aph(3')-II,mcr-5.1,blaF</i>	IncFII(pOco)	4
27-Ec-P-95	73432	<i>aph(3')-Ib,aph(3')-II,mcr-5.1,blaF</i>	IncFII(pOco)	4
24-Ec-C-191	127138	<i>catA1,mcr-5.1,qnrS1,blaABCD</i>	IncFII(AP001918)	4
22-Ec-C-148	127186	<i>catA1,mcr-5.1,qnrS1,blaABCD</i>	IncFII(AP001918)	4
23-Ec-C-90	128475	<i>catA1,mcr-5.1,qnrS1,blaABCD</i>	IncFII(AP001918)	4
24-Ec-C-143	130648	<i>aph(3')-Ib,catA1,mcr-5.1,blaABCD</i>	IncFII(AP001918)	4
25-Ec-C-36	128772	<i>catA1,mcr-5.1,qnrS1,blaABCD,blaA14</i>	IncFII(AP001918)	5
24-Ec-P-72	142733	<i>aadA1,aadA2,blaTEM-1a,catA1,mcr-5.1,catA1,catA172</i>	IncFII(AP001918)	8
26-Ec-B-209	211953	<i>aph(3')-Ib,aph(3')-II,aph(6)-I,blaTEM-1a,blaTEM-4,catA1,mcr-5.1,catA1,catA2</i>	IncHI1(BR27)1_R27	9
22-Ec-P-12	155101	<i>aadA1,aadA2,aph(3')-Ib,aph(3')-II,catA1,catA172,mcr-5.1,catA1,catA172,catA172</i>	IncFII(pOco),pOco,IncH1,IncX1_J	11

図9 と畜場の豚由来 MRSA の MLST 型別及び spa type

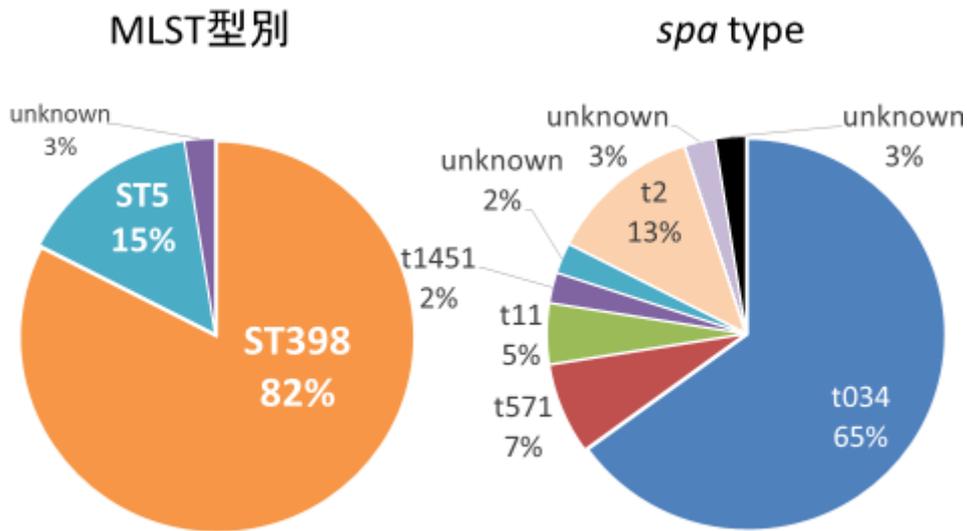


図10 と畜場の豚由来 MRSA の亜鉛耐性遺伝子及び SCCmec 型別

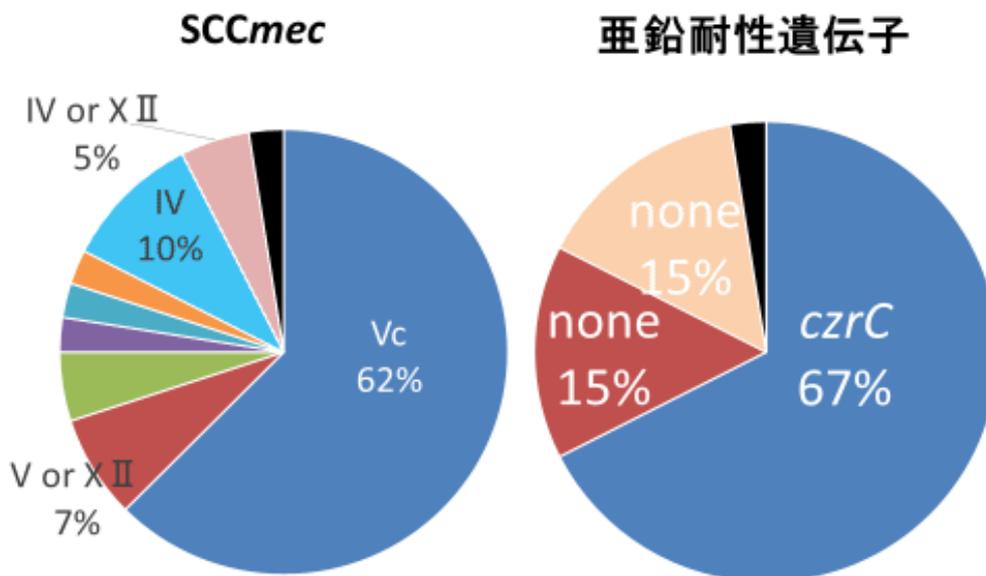


図 11 と畜場の豚由来 MRSA の薬剤耐性遺伝子保有割合 (n=40)

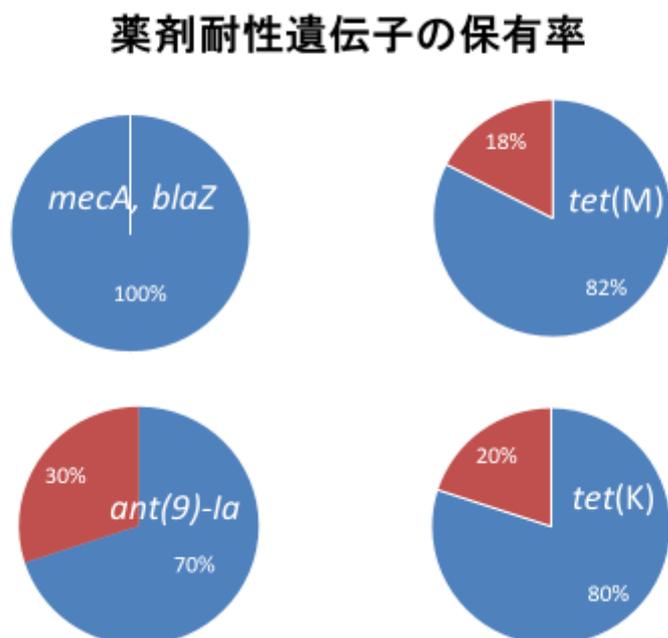


図 12 豚由来 MRSA の cgMLST

