

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：細井 悠太（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 実旺（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3年度分離）サルモネラ及びカンピロバクターについて、DNAを抽出、国立感染症研究所に提供するとともに、サルモネラについて人、食品、鶏由来の血清型や耐性率について比較した。鶏、食品由来株で優勢な血清型 *S. Schwarzengrund* 及び *S. Infantis* の耐性率を比較したところ、両血清型において、食品由来株と鶏由来株で類似性が認められたが、ヒト由来 *S. Infantis* の耐性率は鶏及び食品由来株とは傾向が異なった。ヒト由来 *S. Infantis* については、鶏及び食品以外からの由来も示唆された。また、欧州において人への伝播が問題となっている豚由来のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）について、日本国内で飼育されと畜場に搬入された豚から分離された MRSA（平成30年度から令和4年度分離）の全ゲノム解析による遺伝子型別、薬剤耐性遺伝子、亜鉛耐性遺伝子及び免疫回避遺伝子の検出や SNPs 解析を実施した。その結果、豚由来 MRSA は、ST398/t034 株が優勢で、次いで ST5/t002 株が占めており、多くの抗菌薬クラスに対する耐性遺伝子を有していた。また、ST398 株の 91.4% が亜鉛耐性遺伝子を保有していた。豚由来の ST398 と ST5 は、免疫回避遺伝子を保有しておらず、SNPs 解析の結果、ヒト由来株とは異なる MRSA のクラスターに分類され、現在のところ、豚からヒトに伝播、感染し人医療上問題となっている状況ではないと考えられた。

人用医薬品として注射剤が再承認され、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3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、牛及び豚由来の大腸菌から *mcr-1* 遺伝子が検出されたが低率（いずれも5%以下）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、JVARM において収集したサルモネラ、カンピロバクターの遺伝子を抽出し、国立感染症研究所 (感染研) に提供するとともに、サルモネラの血清型、耐性率について、鶏、食品、人の比較を実施した。

また、人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人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。

欧州において人への伝播が問題となっている豚由来のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) については、日本の豚由来株の性状を確認し、感染拡大を防ぐ対策の検討や、人への伝播、感染の状況について把握するため、薬剤感受性を確認するとともに、次世代シーケンサーによってゲノム配列を取得し、遺伝子型別、SNPs 解析等を実施した。

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 129 株 (鶏由来のみ) 及びカンピロバクター 173 株 (牛由来: 114 株、鶏由来 59 株) (令和 3 年度分離株) について、DNA を抽出し、感染研へ送付した。感染研

において、次世代シーケンサーによってゲノム配列を取得し、家畜、人、食品由来株との比較解析が実施された。鶏由来のサルモネラと食品、人由来株 (ワンヘルス動向調査報告書 2022 年) の血清型と主な血清型の耐性率を比較した。

(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 3 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 47 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) 豚由来 MRSA の遺伝子解析

2018 年から 2022 年にかけて、日本国内で飼育されと畜場に搬入された豚の鼻腔スワブを採材し (5 検体/農場)、MRSA 選択培地により家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (LA-MRSA) の陽性率を調査した。MRSA88 株について薬剤感受性試験を実施するとともに、次世代シーケンサーによって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* 型別の判定を行うとともに、薬剤耐性遺伝子、亜鉛耐性遺伝子 (*czrC*)、免疫回避遺伝子 (*scn*, *sak*, *chp*) の検出を行った。また、日本の豚由来 MRSA に、NCBI に登録されている欧州、米国の豚由来と日本の人由来 MRSA のゲノム配列情報を加え、コアゲノム SNPs 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

鶏由来のサルモネラの血清型は Schwarzengrund (78.3%) が一番多く、次いで Infantis (10.0%) が多かった (図 1)。鶏由来と食品由来で多くを占める血清型はこれらの 2 血清型であるが、人由来株とは異なる傾向が示された (図 2)。鶏、食品で多くの割合を占める *S. Schwarzengrund*、*S. Infantis* の耐性率を比較すると、*S. Schwarzengrund* 及び *Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* のカナマイシン (KM)、ス

トレプトマイシン (SM) 及びテトラサイクリン (TC) の耐性率は食品由来株と食鳥処理場由来株で類似性が認められ、*S. Infantis* では人由来株の耐性率と類似性が認められるが、人由来 *S. Infantis* 株の耐性率とは傾向が異なっていた (図 3)。

(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 4)

大腸菌について、*mcr-1* 遺伝子のみ検出された。*mcr-1* は、豚から 5 株 (4.9% : 割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、牛から 1 株 (0.4%) 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) 豚由来 MRSA の解析

MRSA については、ST398 (65.9%) が最も多く、次いで ST5 (27.3%) であった (図 5)。*spa* 型は、t034 (54.5%) が最も多く、SCC*mec* 型は Vc 型 (45.5%) が多かった (図 6)。また、全体の 63.6% 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* を保有し、その他 50% 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* (52.2%)、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(M)* (68.2%) 及び *tet(K)* (61.4%)、トリメトプリム耐性 *dfpG* (55.7%) が認められた (表 1)。

SNPs 解析の結果では、ST 毎に異なるクラスターを形成し (図 7)、欧米の豚から分離された MRSA ST398 株は、日本の豚から分離された株と同じクラスターに同定されたのに対し (図 8)、米国で豚から分離された ST5 株は、日本から分離された豚と同じクラスターに分類されなかった (図 9)。日本で優勢な分離株 ST398/t034、SCC*mec* 型の Vc、V は、亜鉛耐性遺伝子を保有しており、SNP 解析では同じクラスターに分類され、すべての地域から単離され、全国に広く分布していた。一方、その他の ST 型、*spa* 型、SCC*mec* 型の株は、地域毎のクラスターを形成した。また、人由来の MRSA CC398 と MSSA ST398、豚由来の MRSA ST398 は異なるクラスターを形成しており、

人から分離された MRSA CC398 は免疫回避遺伝子と PVL を有しているが、亜鉛耐性遺伝子は有していないことが示された。また、人由来の ST5 株 Mu50 は、豚由来の分離株 ST5 とは異なるクラスターに存在した。

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、DNA を抽出し、感染研における人、食品由来株との比較ゲノム解析のため提供した。サルモネラの血清型は、近年 *S. Schwarzengrund* の占める割合が高く、次に *S. Infantis* が一定程度分離されている。この割合は、食品由来株とは類似しているが、人由来株とは異なっていた。また、*S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* の KM、SM 及び TC の耐性率は食品由来株と食鳥処理場由来で類似性が認められ、*S. Schwarzengrund* では人由来株の耐性率と類似性が認められるが、人由来 *S. Infantis* 株の耐性率とは傾向が異なることから、人由来 *S. Infantis* については鶏及びその食品以外にも由来している可能性が示唆された。

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* 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。コリスチンは平成 30 年に飼料添加物としての指定が取り消され、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。引き続き、第二次選択薬として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、TC 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。

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 と人から分離される MRSA では遺伝子型等が異なり、豚から人に感染した事例はないと考えられるが、海外では豚から人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、人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がないように、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) Ozawa M, Shirakawa T, Moriya K, Furuya Y, Kawanishi M, Makita K, Sekiguchi H.
Role of Plasmids in Co-Selection of Antimicrobial

Resistances Among Escherichia coli Isolated from Pigs. Foodborne Pathog Dis. 2023 Oct;20(10):435-441

- (2) Kawanishi M, Matsuda M, Abo H, Ozawa M, Hosoi Y, Hiraoka Y, Harada S, Mio Kumakawa M, Sekigushi H. Prevalence and genetic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs in Japan. Antibiotics, 2024, 13, 155.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13020155>

2.学会発表

- (1)第 166 回日本獣医学会学術集会、9 月 5 日～8 日、WEB 開催、「国内の豚由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分離状況と遺伝子性状解析」川西路子、松田真理、小澤真名緒、阿保均、森谷このみ、平岡ゆかり、原田咲、熊川実旺、首藤江梨奈、宮澤一枝、関口秀人

3.業界関係者向け説明会

- (1)第 41 回獣医師会獣医学術学年次大会、12 月 1 日～3 日、神戸国際会議場、シンポジウム「動物分野からみた AMR 対策アクションプランの成果と今後の課題」AMR 対策アクションプラン (2016-2020) の成果
- (2) 平岡ゆかり「JVARM : 動物由来薬剤耐性菌モニタリング～新アクションプラン～」日本家畜衛生学会家畜衛生フォーラム 2023 (2023 年 12 月)
- (3) 松田真理「豚における薬剤耐性菌の動向」令和 5 年度家畜衛生講習会 (豚疾病特殊講習会) (2023 年 6 月)
- (4) 平岡ゆかり「鶏における薬剤耐性菌の動向」令和 5 年度家畜衛生講習会 (鶏疾病特殊講習会) (2023 年 6 月)
- (5) 熊川実旺「家畜における薬剤耐性菌の動向」令和 5 年度家畜衛生研修会 (病性鑑定: 細菌部門) (2023 年 10 月)
- (6) 熊川実旺「JVARM 等動物分野における薬剤耐性対策について」令和 5 年度動物薬事講習会

(2024年1月)

(7) 細井悠太「動向調査等動物分野での薬剤耐性対策の取組について」第4回全国畜産マネジメント研究会 (2024年3月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 鶏由来サルモネラの血清型の推移

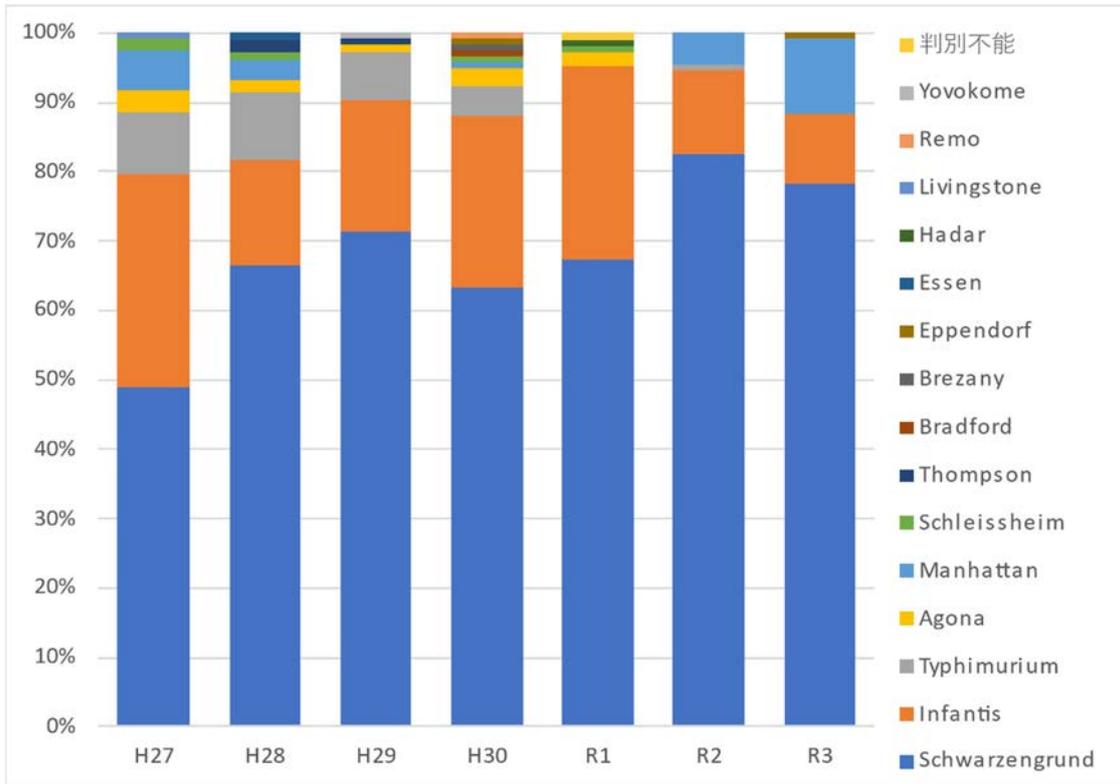


図2 由来別血清型割合 (2015-2021)

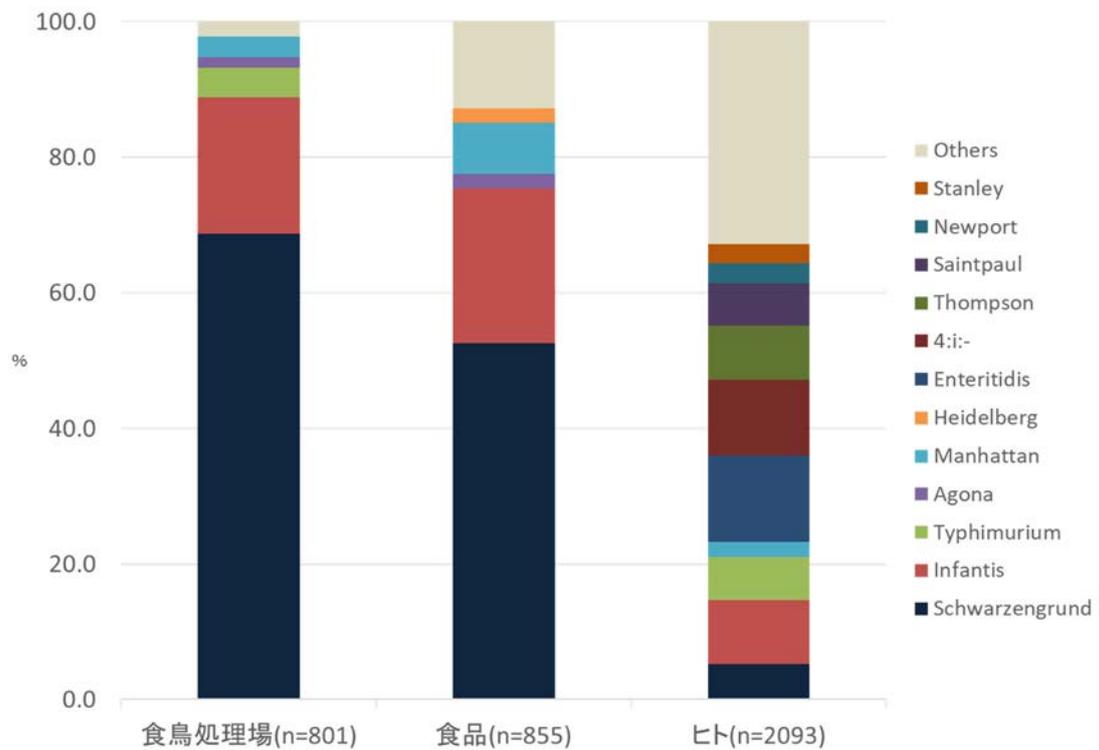
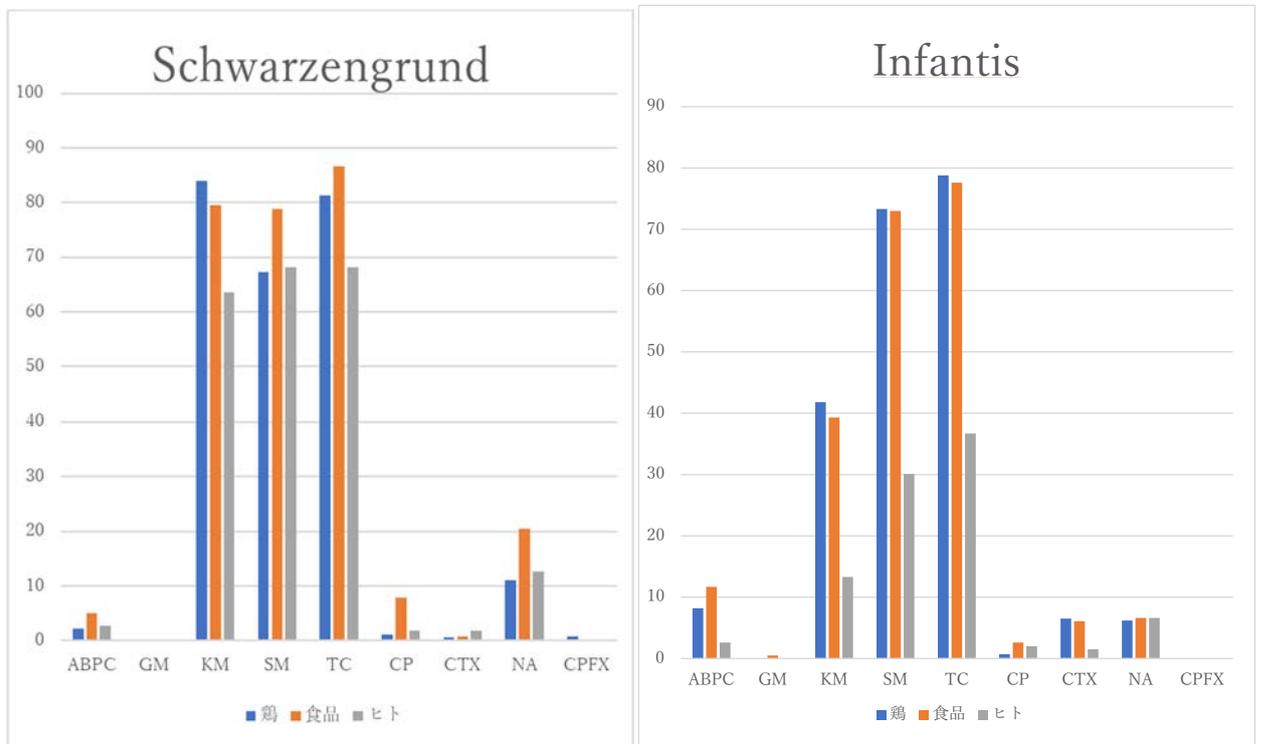


図3 2015～2021年に人、食品及び食鳥処理場に出荷された鶏から分離された*S. Infantis*及び*S. Schwarzengrund*の耐性率



(人由来と食品由来の耐性率は薬剤耐性ワンヘルス動向調査報告書 2022 のデータを引用)

図4 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



図5 と畜場の豚由来 MRSA の MLST 型 (n=88)

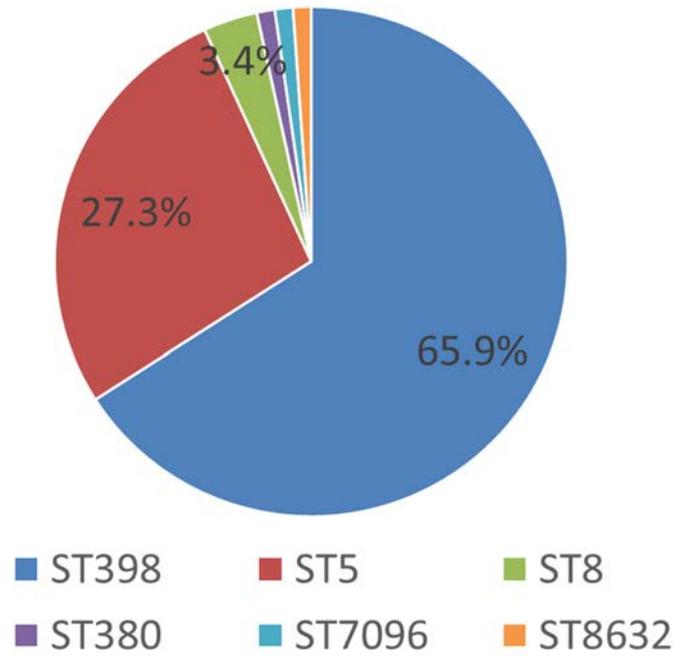


図6 豚由来の MRSA の遺伝子性状 (ST398VS ST5)

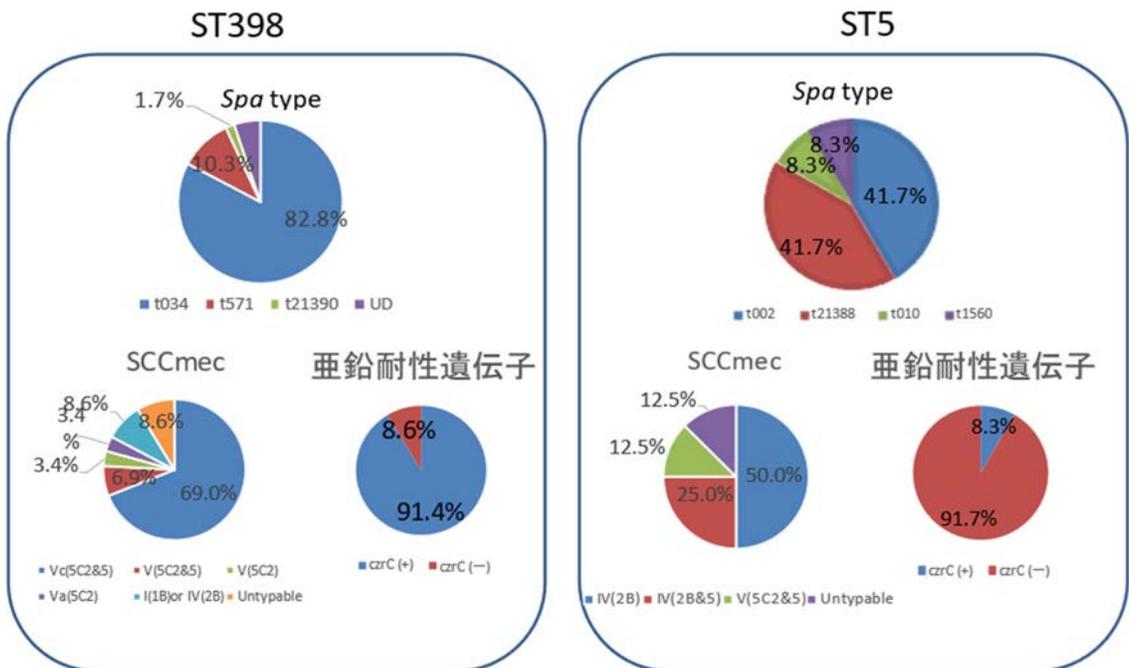


表 1 豚由来 MRSA が保有する薬剤耐性遺伝子 (ST398 VS ST5)

系統	薬剤耐性遺伝子 薬剤耐性に関する突然変異	Total(n=88)		ST398(n=58)		ST5(n=24)	
		number	rate(%)	number	rate(%)	number	rate(%)
BETA-LACTAM	<i>mecA</i>	88	100	58	100	24	100
TETRACYCLINE	<i>tet(K)</i>	7	8.0			6	25.0
	<i>tet(L)</i>	8	9.1			8	33.3
	<i>tet(M)</i>	11	12.5	10	17.2		
	<i>tet(K) + tet(M)</i>	47	53.4	46	79.3		
	<i>tet(L) + tet(M)</i>	2	2.3	2	3.4		
		75	85.2	58	100	14	58.3
MACROLIDE	<i>erm(A)</i>	4	4.5	3	5.2		
	<i>erm(C)</i>	40	45.5	22	37.9	17	70.8
		44	50.0	25	43.1	17	70.8
LINCOSAMIDE	<i>vga(A)</i>	24	27.3	2	3.4	22	91.7
/STREPTOGRAMIN	<i>vga(E)</i>	2	2.3	2	3.4		
	<i>lsa(E)+lnu(B)</i>	36	40.9	36	62.1		
	<i>lsa(E)+lnu(B) + vga(A)</i>	1	1.1	1	1.7		
	<i>lsa(E)+lnu(B) + vga(E)</i>	5	5.7	5	8.6		
	<i>lsa(E)+vga(A)</i>	2	2.3		0.0	2	8.3
		70	79.5	46	79.3	24	100.0
PHENICOL	<i>catA</i>	3	3.4	3	5.2		
	<i>fexA</i>	32	36.4	20	34.5	12	50.0
		35	39.8	23	39.7	12	50.0
AMINOGLYCOSIDE	<i>aadD1</i>	6	6.8			6	25.0
	<i>aadD1 + ant(6)-Ia + spw</i>	1	1.1			1	4.2
	<i>aadD1 + ant(6)-Ia + spw + str</i>	1	1.1			1	4.2
	<i>ant(9)-Ia</i>	31	35.2	30	51.7		
	<i>ant(9)-Ia + str</i>	15	17.0	15	25.9		
	<i>aac(6)-Ie/aph(2'')-Ia</i>	2	2.3				
	<i>str</i>	4	4.5	3	5.2	1	4.2
		60	68.2	48.0	82.8	9	37.5
TRIMETHOPRIM	<i>dfrG</i>	49	55.7	46	79.3	3	12.5
		49	55.7	46	79.3	3	12.5
QUINOLONE	<i>gyrA_S84A + parC_S80F</i>	7	8.0			7	29.2
	<i>gyrA_S84L + parC_S80F</i>	5	5.7			2	8.3
	<i>gyrA_S84L + parC_S80Y</i>	4	4.5	4	6.9		
	<i>parC_S80F</i>	7	8.0	3	5.2	4	16.7
		23	26.1	7	12.1	13	54.2

图 7 SNPs 解析_全株

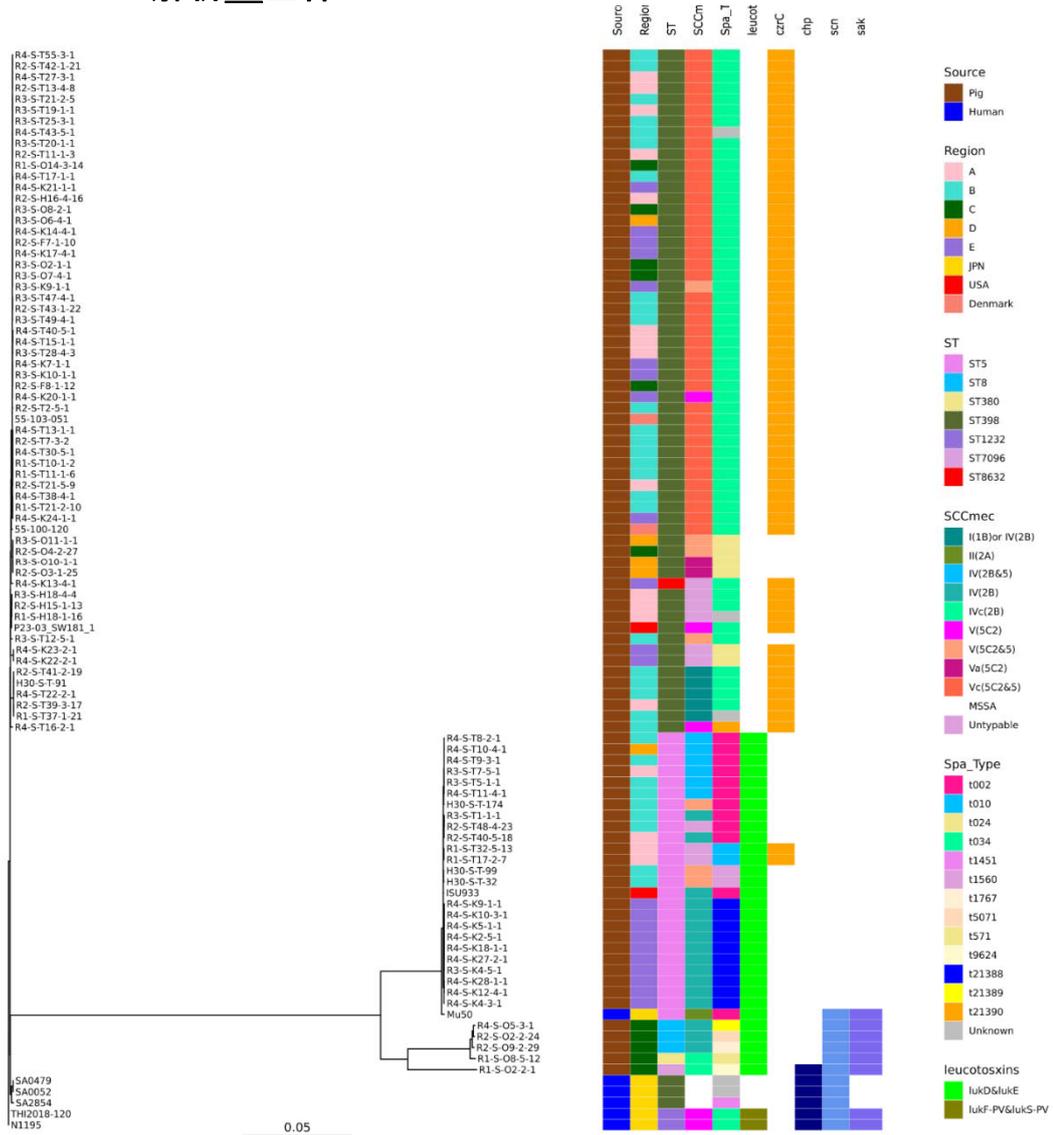


图 8 SNPs 解析_ST398

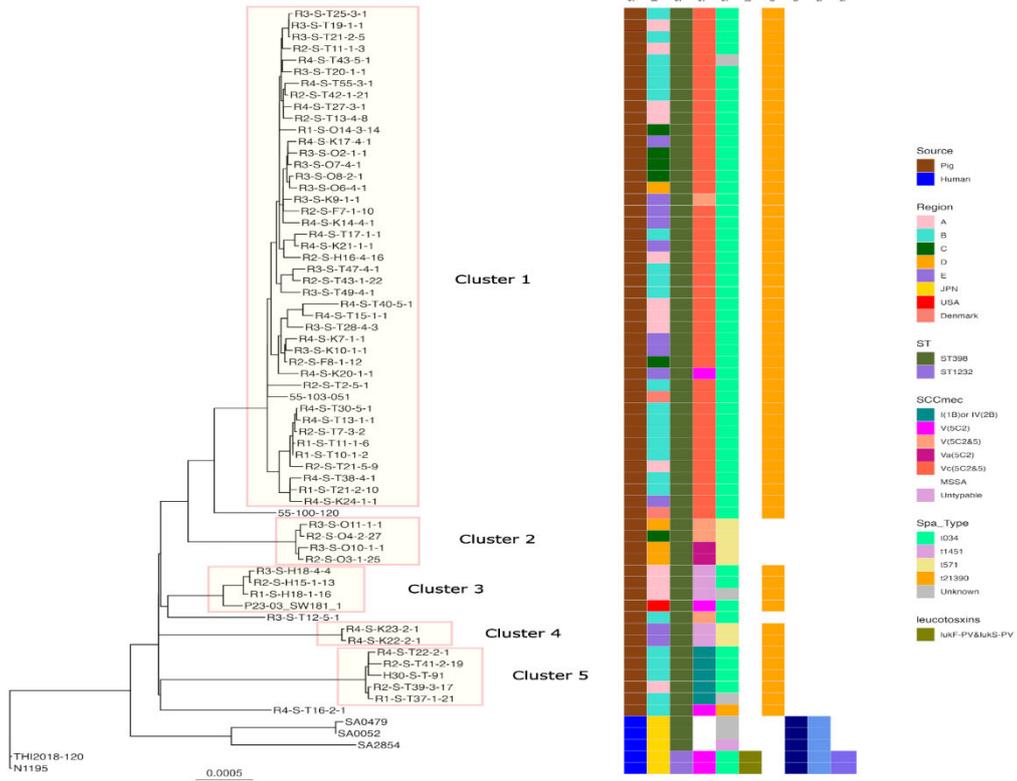


图 9 SNPs 解析_ST5

