

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

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 動物分野 AMR センター）
研究協力者：関口 秀人（農林水産省動物医薬品検査所 動物分野 AMR センター）
研究協力者：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所 動物分野 AMR センター）
研究協力者：松田 真理（農林水産省動物医薬品検査所 動物分野 AMR センター）
研究協力者：細井 悠太（農林水産省動物医薬品検査所 動物分野 AMR センター）
研究協力者：原田 咲（農林水産省動物医薬品検査所 動物分野 AMR センター）
研究協力者：熊川 実旺（農林水産省動物医薬品検査所 動物分野 AMR センター）
研究協力者：石井 智子（農林水産省動物医薬品検査所 動物分野 AMR センター）

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 4 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。

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 4 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いずれも低率 (3%以下) であった。現在、*mcr-1* 遺伝子の保有率は低い、IncI2 型プラスミドにより *mcr-1* 遺伝子が豚において伝播している可能性が示唆され、引き続きコリスチンの第二次選択薬としての使用の徹底が必要であると考えられた。

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 (令和 5 年度分離) の全ゲノム解析による遺伝子型別、薬剤耐性遺伝子の検出を実施した。その結果、ST398/t034 株が優勢で、次いで ST5/t002 株が占めており、令和 4 年度以前に分離された MRSA と同様の傾向を示した。MRSA は、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系等複数の薬剤耐性遺伝子を高率に保有していることから、MRSA を選択しないため、農場における抗菌薬の慎重使用の徹底が重要であると考えられた。

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、JVARMにおいて収集したサルモネラ及び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、次世代シーケンサーによってゲノム配列を取得し、遺伝子型別等を確認した。

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136株(鶏由来のみ)及びカンピロバクター179株(牛由来:129株、鶏由来50株)(令和4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(薬剤耐性(AMR)ワンヘルス動向調査報告書2023)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4年度に分離された、コリスチンのMICが2 µg/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。また、平成29年から令和4年度に分離された*mcr*遺伝子保有株について次世代シーケンサーによってゲノム配列取得し遺伝子解析を実施した。

(3)豚由来MRSAの遺伝子解析

令和5年度に、日本国内で飼育された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)、選択培地でMRSAを分離してMLST型別等を行い、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。MRSA35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、薬剤耐性遺伝子の検出を行った。

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(85.3%)が、最も多く、次いでInfantis(9.6%)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*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たが、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

大腸菌について、*mcr-1*遺伝子と*mcr-3*遺伝子が豚由来株からのみ検出された。*mcr-1*は、3株（4.9%）、*mcr-3*は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（図4）。

*mcr-1*遺伝子を保有する株のMLST解析の結果、多様な型が確認された。一方、*mcr-3*遺伝子保有株については、同一県内で分離された2株が同一のMLST型であった。また、*mcr*遺伝子保有株のPhylogroup解析の結果、病原性が高いとされるB2群やD群の占める割合は低く、大半はA群またはB1群に分類された。なお、O血清型についても多様な型を示した（図5）。

令和3年度及び令和4年度に豚由来株から検出された*mcr-1*保有プラスミドは、いずれもIncI2型に分類され、他の薬剤耐性遺伝子は確認されなかった。これらのプラスミドは自己伝達因子である*Ori*および*rlac*を保有し、サイズは約70 kbで、配列上も高い類似性を示した。これらの*mcr-1*保有プラスミドが伝播し、豚への定着している可能性が示唆された（図6）。

(3) 豚由来MRSAの解析

MRSAについては、ST398（57.1%）が最も多く、次いでST5（31.4%）であった（図7）。*spa*型は、t034（57.1%）が、SCC*mec*型はVc型（54.3%）が最も多く、平成30年から令和4年に分離されたMRSAと同様の傾向を示した（図8）。

耐性遺伝子は、すべての株がメチ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*（57.1%）、テトラサイクリン耐性遺伝子である*tet(M)*（62.9%）及び*tet(K)*（60.0%）、トリメトプリム耐性*dfxG*（42.9%）が認められた。

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. Schwarzengrund*及び*S. Infantis*のKM、SM及び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. 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。*mcr-1*遺伝子を保有する株は多様な型が確認され、特定のクローン株の拡散ではなく、*mcr-1*遺伝子を保有するIncI2型プラスミドを介した水平伝播が主な拡散経路である可能性が示唆された。*mcr-3*遺伝子保有株については、同一菌株による伝播の可能性が考えられた。

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。

豚由来の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が重要であると考えられた。

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、コリスチン耐性大腸菌及びMRSAについて、JVARMにおいて収集した株から得た薬剤感受性結果や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把握し、ヒト由来株や食品由来株と比較等を実施した。

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

(国内誌等)

(1)松田真理「日本における動物用抗菌剤使用と耐性菌の状況」臨床獣医8月号, 2-6 (2024)

(2)関口秀人「養鶏における薬剤耐性の現状」鶏病研究会報,60増刊号, 17-30 (2024)

(3) 川西路子「「AMRアクションプラン2023-2027」動物分野の取り組みー動向調査、国際協力ー」動物用抗菌剤研究会会報第46号

2.学会発表

(1)第167回日本獣医学会学術集会、9月、帯広市、「国内の健康鶏由来第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の薬剤感受性と遺伝子性状解析」川西路子、細井悠太、原田咲、森谷このみ、首藤江梨奈、Scott C. Eisenhower、宮澤一枝、高岡寿子、熊川実旺、小澤真名緒、松田真理、関口秀人

3.業界関係者向け説明会

(1) 川西路子「「AMRアクションプラン2023-2027」動物分野の取り組みー動

向調査、国際協力ー」動物用抗菌剤研究会第50回シンポジウム (2024年4月)

(2)細井悠太「鶏における薬剤耐性菌の動向」令和6年度家畜衛生講習会（鶏疾病特殊講習会） (2024年6月)

(3)松田真理「豚における薬剤耐性菌の動向」令和6年度家畜衛生講習会（豚疾病特殊講習会） (2024年7月)

(4)関口秀人「養鶏における薬剤耐性の現状」2024年度秋季全国鶏病技術研修会 (2024年8月)

(5)熊川実旺「動物分野AMRセンターにおけるワンヘルスに関する取組及び研究」令和6年度家畜衛生研修会（病性鑑定：生化学部門） (2024年10月)

(6)細井悠太「ブロイラーにおける大腸菌の薬剤耐性モニタリング」令和6年度動物分野における薬剤耐性対策ミニセミナー (2024年11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

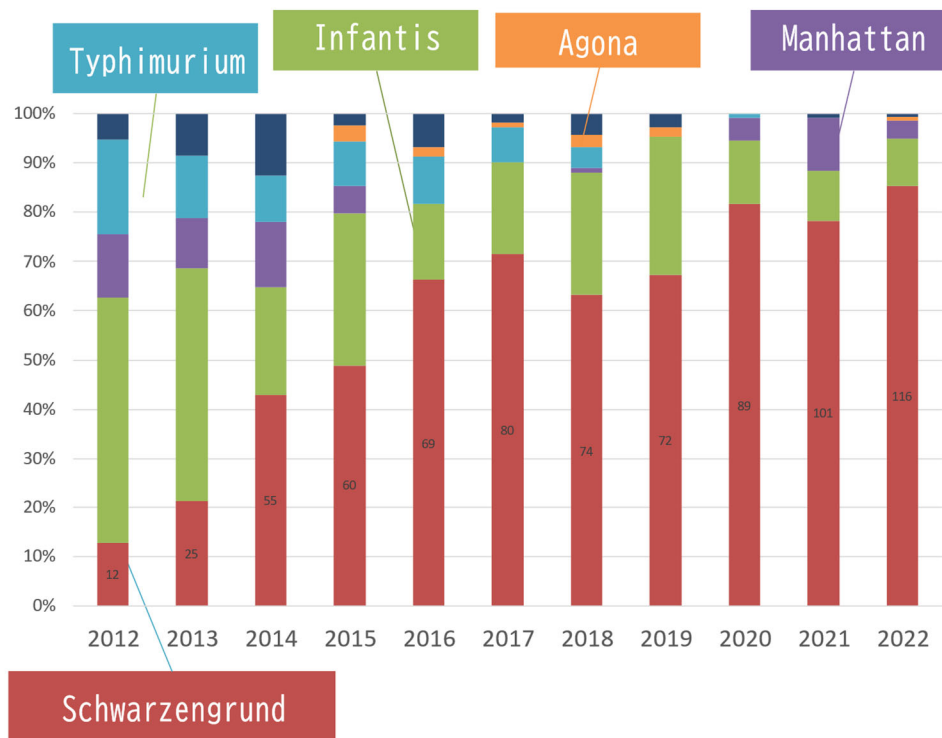


図2 サルモネラ由来別血清型割合（2015-2022）

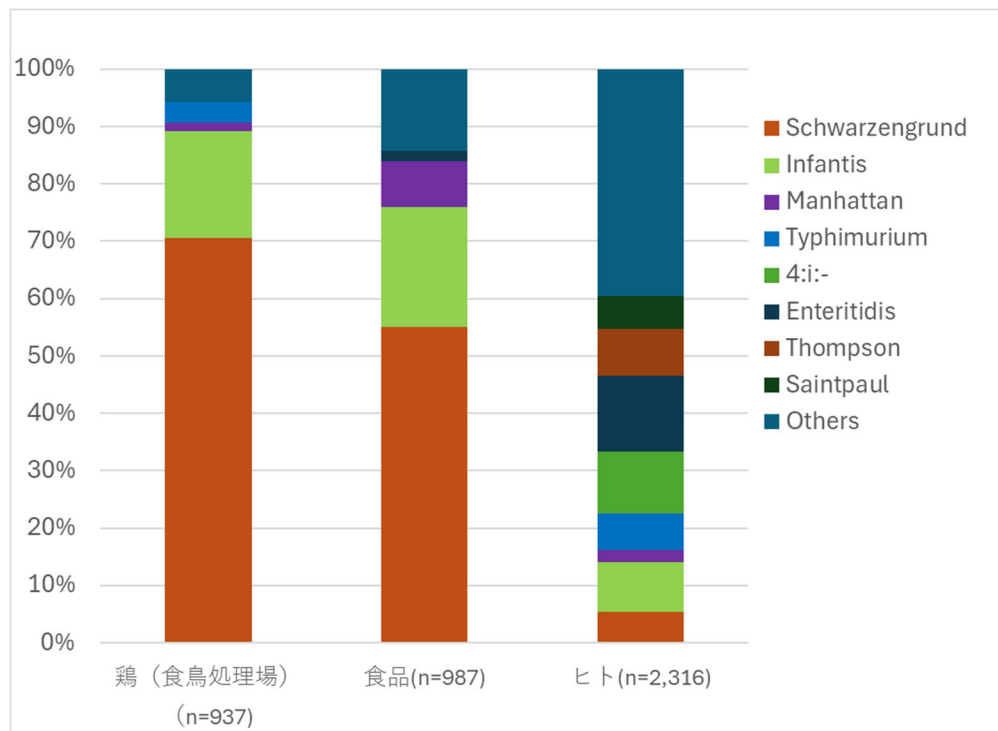
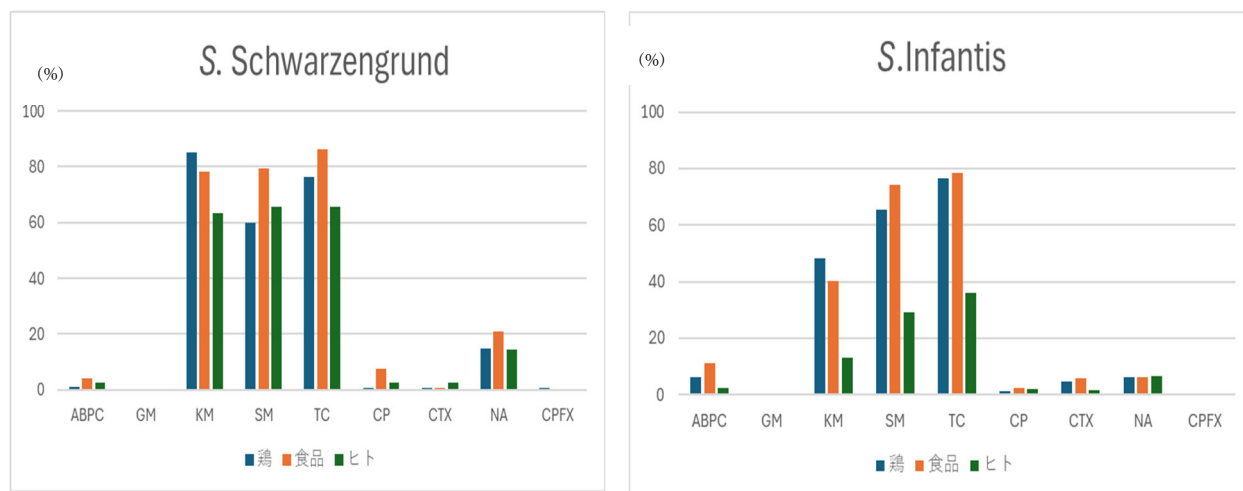
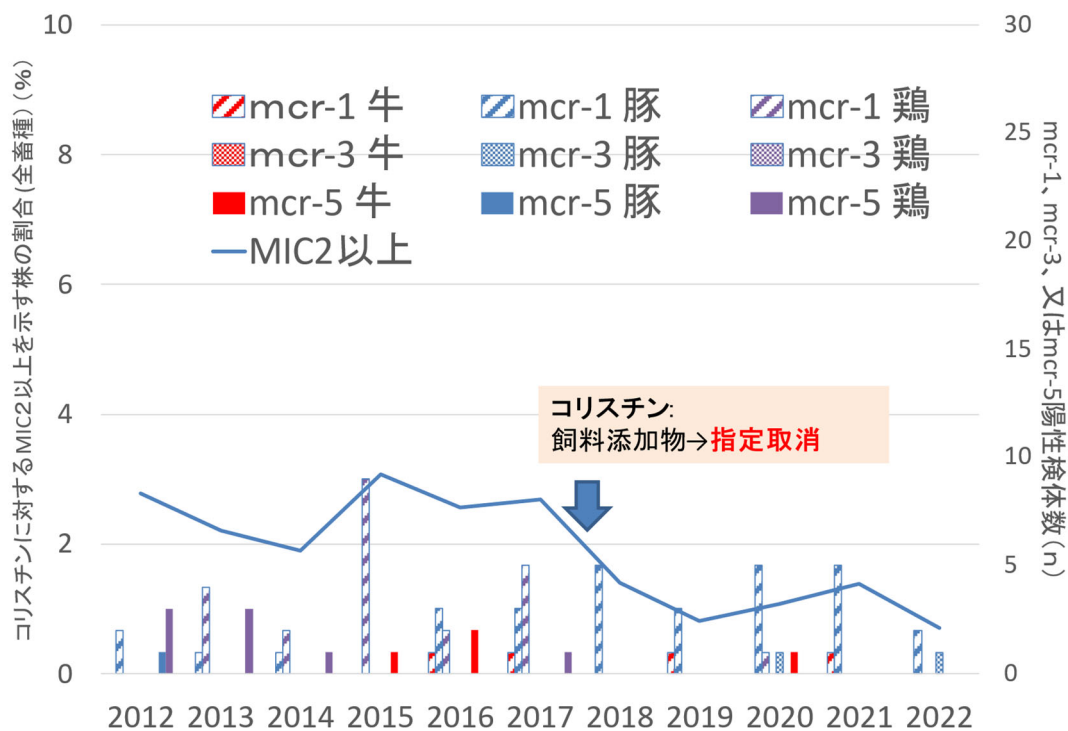


図3 2015～2022年に人、食品及び食鳥処理場に出荷された鶏から分離された *S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* の耐性率



ABPC ; アンピシリン、GM:ゲンタマイシン、KM ; カナマイシン、SM:ストレプトマイシン、TC ; テトラサイクリン、CP ; クロラムフェニコール、CTX ; セフトキシム、NA ; ナリジクス酸、CPFX ; シプロフロキサシン

図4 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*～*mcr-5*)の検出



MLST型別

Figure 1 consists of two pie charts. The left chart, titled 'phylogroup', shows the distribution of EHEC strains across five phylogenetic groups: A (blue), B1 (red), B2 (green), C (purple), and D (cyan). The right chart, titled 'O血清型' (O blood type), shows the distribution of EHEC strains across various O blood types, including O2, O5, O9, O13, O15, O16, O19, O24, O25, O43, O45, O51, O66, O69, O86, O88, O100, O103, O105, O141, O153, O157, and an '不明' (unknown) category.

S-SA-03-EC-P-8-1

100% identity

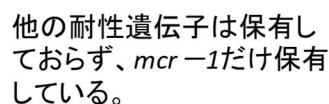
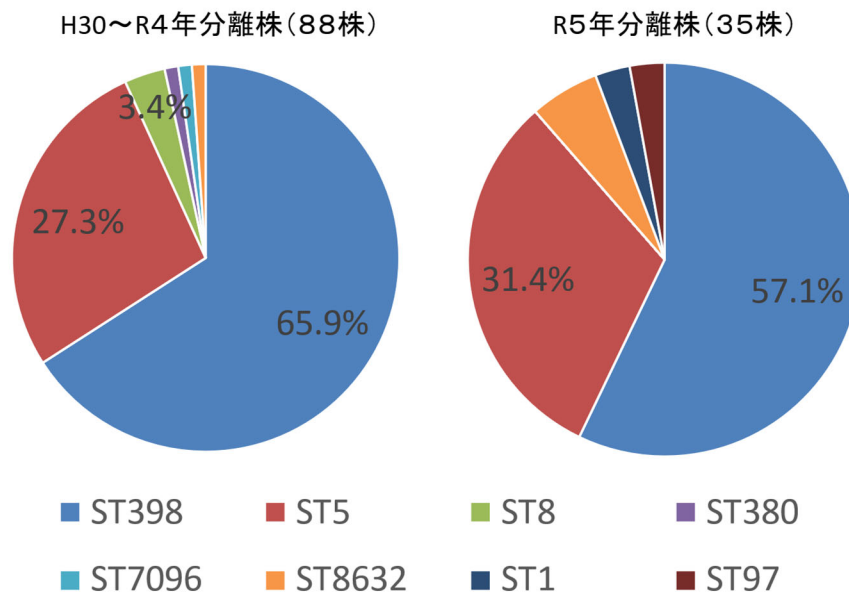


図7 と畜場の豚由来 MRSA の MLST 型



豚における主なST型
(欧州: ST398 米国: ST398, ST5 アジア: ST9, ST398)

図8 豚由来の MRSA の遺伝子性状 (ST398 VS ST5)

