

令和2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：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：嶋崎 洋子（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：赤間 亮子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：古谷 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らによりヒト及び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。

令和2年度は、平成30年度のと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ並びに病畜由来サルモネラのアンチバイオグラムを作成し、国立感染症研究所と情報を共有するとともに動薬検HPで公表した。

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30年度に食鳥処理場及びと畜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MICが2 µg/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、*mcr-1*遺伝子は検出されたが低率(各年、動物種毎に、いずれも8%以下)であった。

また、人のカンピロバクター腸炎は、主にマクロライド系抗菌性物質製剤で治療されることから、国内における家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構を調査したところ、可動性耐性遺伝子である *erm(B)* は検出されなかった。

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。

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。また、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ、病畜由来サルモネラについて、国立感染症研究所において作成されたソフトを用いて、引き続きアンチバイオグラムを作成することとした。

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 *mcr-2*~*10* 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。

人のカンピロバクター腸炎は、主にマクロライド系抗菌性物質製剤で治療される。カンピロバクターにおいてマクロライド耐性は主に染色体上の遺伝子の突然変異の結果として発現するが、2013 年に中国の豚から分離された *Campylobacter coli* が可動性の耐性遺伝子 *erm (B)* を獲得していることが初めて報告された (Qin ら 2013)。そこで、国内における家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構を調査した。

B. 研究方法

(1) と畜場及び食鳥処理場由来株等におけるアンチバイオグラムの作成

国立感染症研究所において開発されたアンチバイオグラム作成ソフトに抗菌剤の種類及び薬剤測定 *range* を JVARM に合うよう改修し、と畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及びサルモネラ、病畜由来のサルモネラの MIC 値を入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(2) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ、病畜由来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

平成 28 年度から 30 年度までの MIC が 2 µg/mL 以

上の株について DNA を抽出し、各コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-10* について、鈴木らが本研究事業において報告しているマルチプレックス PCR 法に基づき、遺伝子を検出した。

(3) 家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構

平成 29 年にと畜場の豚から分離されたマクロライド耐性 *C. coli*19 株及び食鳥処理場の鶏から分離されたマクロライド耐性 *C. jejuni*1 株について、全ゲノム解析によって耐性遺伝子及び遺伝子の変異を確認した。

C. 研究結果

(1) と畜場及び食鳥処理場由来株等におけるアンチバイオグラムの作成

平成 30 年度のと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ、病畜由来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 (例; 図 1 ~ 3 : その他は HP 参照)、動物医薬品検査所 HP

(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。平成 29 年度と 30 年度を比較して、いずれも耐性の傾向に大幅な変動は認められなかった。

(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について

大腸菌では、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子が確認された (図 4)。H30 年分離株では、*mcr-1* が豚由来株のみから 6 株 (7.2% : 割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの) 検出され、*mcr-2* から *mcr-10* 遺伝子は検出されなかった。食鳥処理場由来サルモネラからは、*mcr* 遺伝子は検出されなかった。大腸菌における平成 24 年から 30 年までの経年変化を図 4 に示す。

(3) 家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構 (図 5)

すべての株で、*erm (B)* 遺伝子を保有していなかった。マクロライド耐性に関与する、23s rRNA の変異を保有している株は 2 株のみであった。機能が不

明な 23s rRNA の変異を保有している株が 2 株あった。それぞれの株の Sequence Type には多様性が認められた。

D. 考察

昨年度に引き続き、JVARM のと畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及びサルモネラ、病畜由来のサルモネラについて CLSI2012 の SIR 基準によるアンチバイオグラムを作成した。これらのアンチバイオグラムを動物医薬品検査所 HP に掲載するとともに、入力データを国立感染症研究所と共有した。今後「薬剤耐性ワンヘルス動向調査報告書」及び「薬剤耐性ワンヘルス Web サイト」において、ヒト由来、食品由来、動物由来での比較等に活用することが可能であると考えられる。

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、平成 30 年度分離株では *mcr-1* 遺伝子のみ検出されたが、昨年度と同様に低率であった。

家畜におけるコリスチンの使用が食品を通じてヒトの健康に影響を与えるリスクについては、食品安全委員会におけるリスク評価の結果リスクの程度は「中等度」とされた。この結果を受け、農林水産省では、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 月以降動物用医薬品としての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同年 7 月に指定を取り消すリスク管理措置を講じた。その後、令和 2 年度に新たな科学的知見を踏まえて食品安全委員会において再評価が行われた結果、リスクの程度は「低度」に引き下げられた。ただし、この評価は上記のリスク管理措置を前提としたものであることから、農林水産省はこれらのリスク管理措置を継続することとしている。現在のところ健康家畜由来大腸菌におけるコリスチンの MIC 分布及び *mcr* 遺伝子の保有率に変動はなく、食鳥処理場由来サルモネラから *mcr* 遺伝子は検出されていない。しかし、来年度以降も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を調査していく必要があると考える。

人におけるカンピロバクターによる食中毒の報告はその多くが *C. jejuni* であり、治療にはマクロライド系薬剤が使用される。JVARM のと畜場由来カンピロバクターにおいては、*C. jejuni* 及び *C. coli* のエリスロマイシン耐性率は 3% 以下及び 20~40% 程度で推移している。平成 26 年度食品安全確保推進研究事業「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」で、JVARM で収集した健康豚由来 *C. coli* において、可動性耐性遺伝子 *erm(B)* の保有を報告した。しかし、今回の調査の結果では、*erm(B)* を保有している株は認められなかった。現時点では、国内の農場で *erm(B)* が広まっていないことが示唆された。

ただし、調査した 20 株中、マクロライド耐性に関与する、23s rRNA の変異を保有している株は 2 株のみであり、残りの 18 株についてはマクロライド耐性機構が不明であった。新たな耐性因子の可能性も含め、引き続き動向に注意が必要である。

E. 結論

と畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及びサルモネラ、病畜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。いずれも耐性の傾向に大幅な変動は認められなかった。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検出試験の結果、大腸菌のみから *mcr-1* 遺伝子は検出されたが低率であった。健康家畜由来マクロライド耐性カンピロバクターにおいて耐性遺伝子の検索を行ったが、可動性耐性遺伝子である *erm(B)* は検出されなかった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) M. Ozawa, M. Kawanishi, M. Uchiyama, D. Mitsuya, H. Abo, R. Koike and M. Kijima. Correlation of minimum inhibitory concentrations between human and animal antimicrobials against *Escherichia coli* isolated from livestock. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. (in press)

2.学会等発表

なし

3.業界関係者向け説明会

(1) 嶋崎洋子「人獣共通感染症と薬剤耐性菌の現状

と対策 薬剤耐性菌対策のワンヘルスに向けた動物分野での取り組み」(2020年11月、波止場会館、日本技術士会神奈川県支部 CPD 講座)

(2) 「獣医師に求められる薬剤耐性 (AMR) 対策」(2020年6月～2021年3月、全17獣医系大学におけるオンライン動画配信及びライブ配信)

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。

図1 2018年 と畜場由来株

大腸菌 畜種 (肉用牛 N=189)

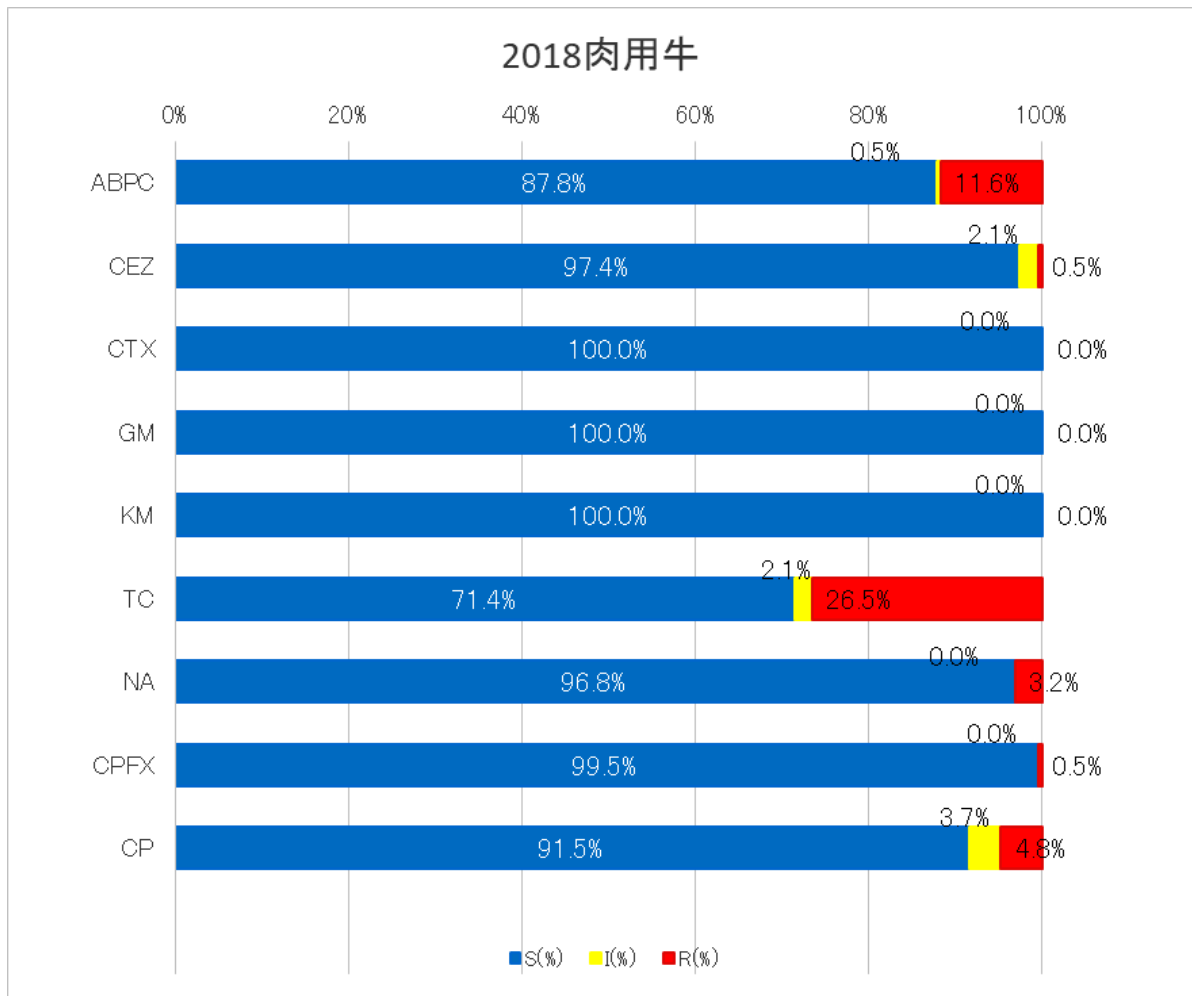


図2 2018年 と畜場由来株

大腸菌 畜種 (豚 N=83)

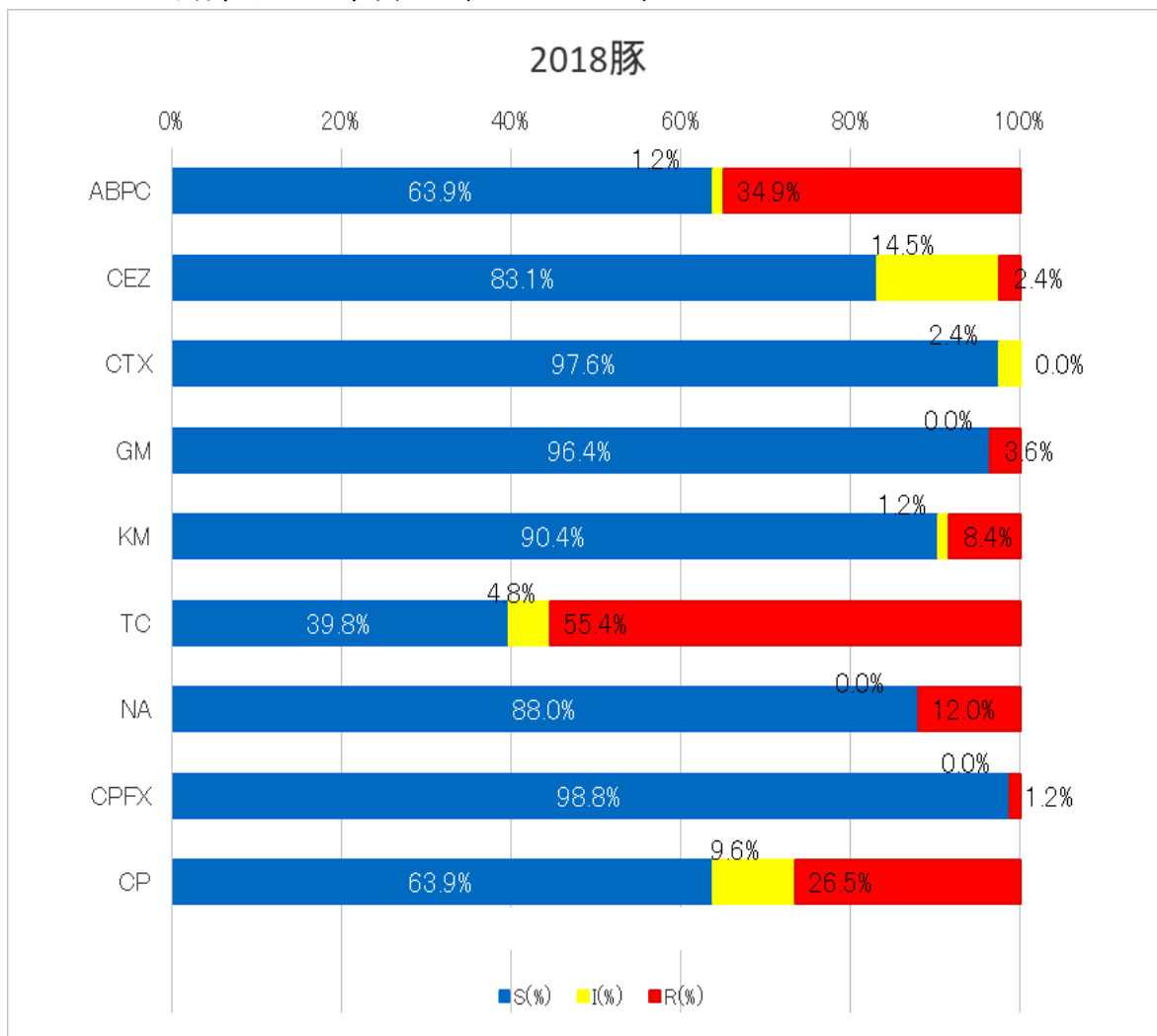


図3 2018年 食鳥処理場由来株

Salmonella spp. 畜種 (肉用鶏 N=117)

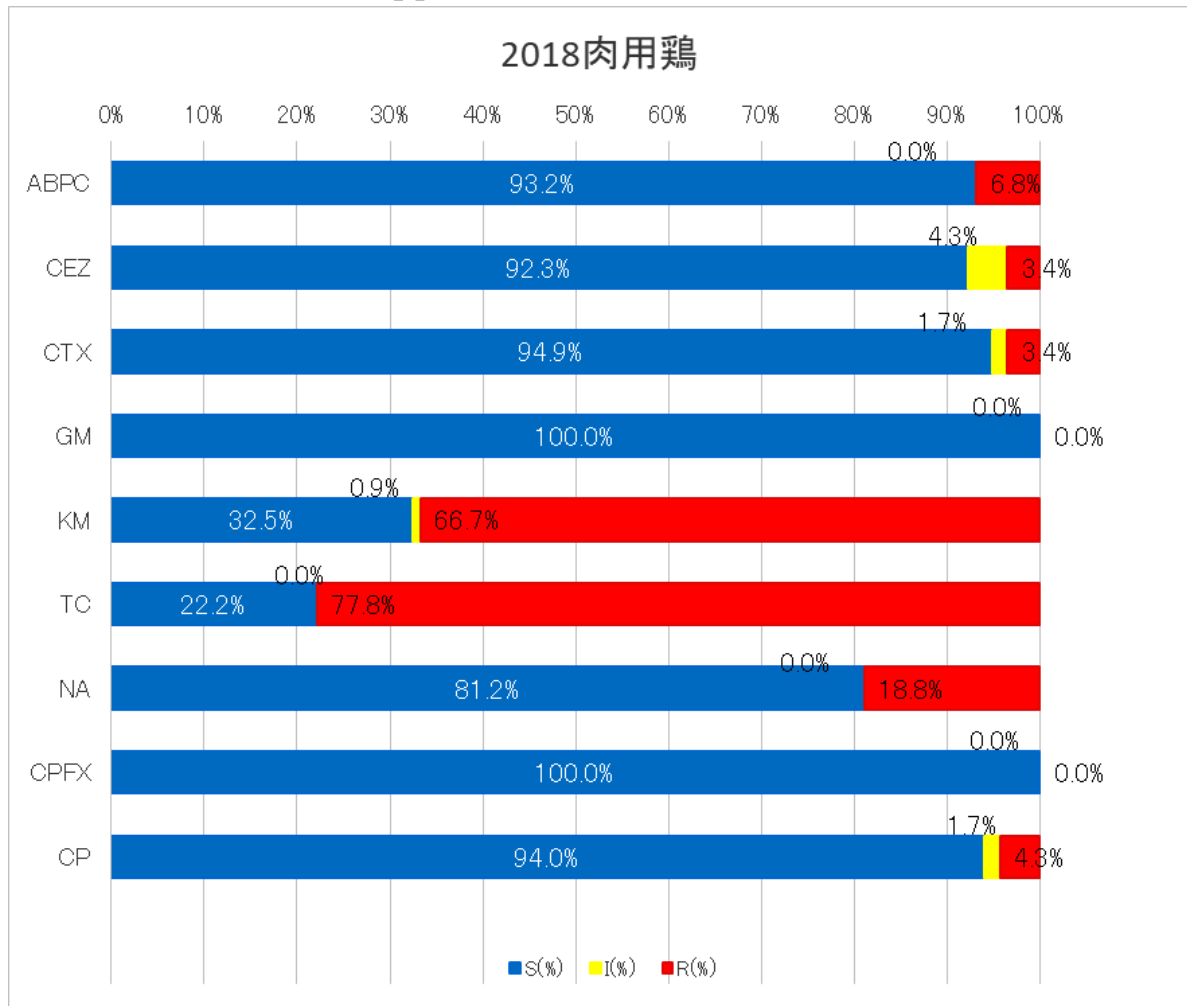
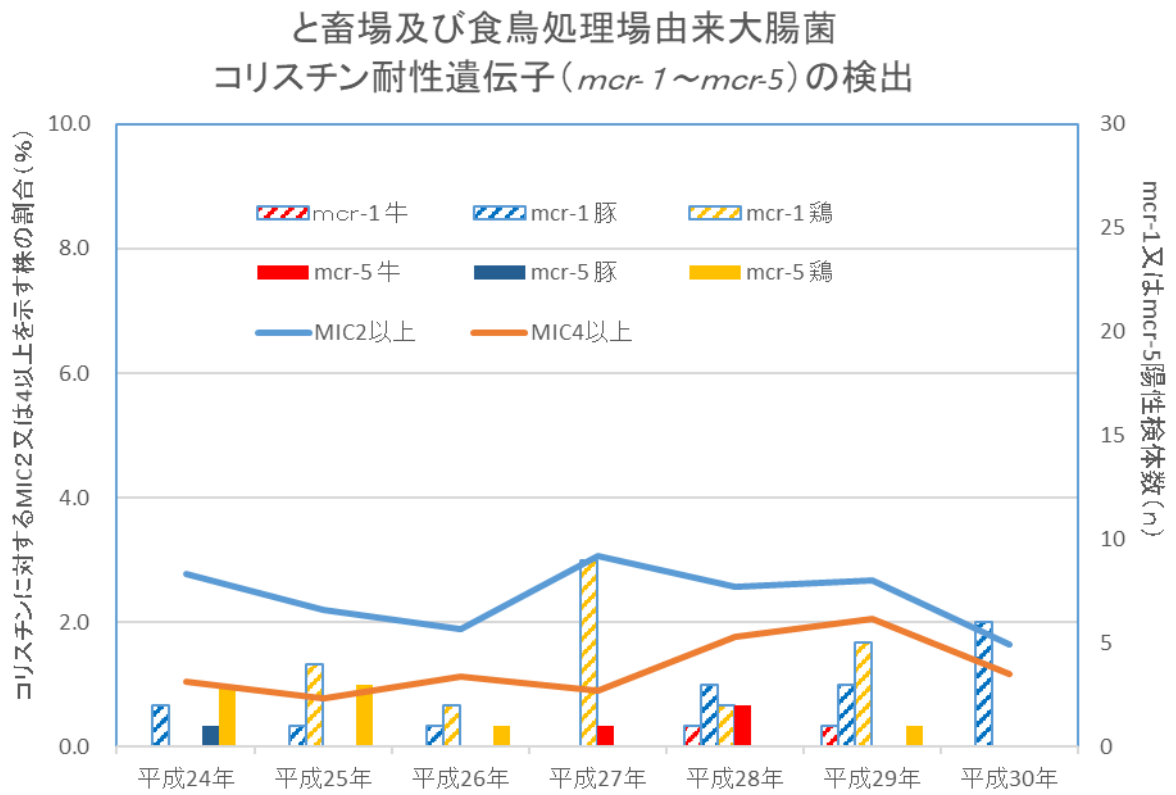


図4 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌コリスチン耐性遺伝子の検出



※平成 28 年から 30 年は、*mcr-1* から *mcr-10* を検出

図5 家畜由来カンピロバクターにおける遺伝子的性状

Isolates	Species	Source	Resistance genes	Mutations		Sequence Types
				Macrolide resistance	Streptomycin resistance	
S-SA-29-CC-TP-26-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;blaOXA-489;tet(O)	-	-	828
S-SA-29-CC-TP-27-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;blaOXA-489;tet(O)	-	-	828
S-SA-29-CC-OP-40-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	rpsL p.K43R	828
S-SA-29-CC-TP-68-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;aph(3')-III;blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;tet(O)	-	rpsL p.K43R	828*
S-SA-29-CC-TP-120-1	<i>C. coli</i>	Pig	blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;lnu(C);tet(O)	-	rpsL p.K43R rpsL p.K88R	828*
S-SA-29-CC-OP-39-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	854
S-SA-29-CC-TP-125-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	-	854*
S-SA-29-CC-KP-41-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;tet(O)	23S r.2075A>G	rpsL p.K43R	890*
S-SA-29-CC-TP-28-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	1016
S-SA-29-CC-TP-118-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	1016
S-SA-29-CC-TP-47-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;tet(O)	23S r.2075A>G	rpsL p.K43R	1112
S-SA-29-CC-TP-30-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;blaOXA-489;lnu(C);tet(O)	-	rpsL p.K88R	1145
S-SA-29-CC-TP-122-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;blaOXA-489;tet(O)	-	-	1145
S-SA-29-CC-TP-87-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O/32/O)	-	rpsL p.K43R	1096
S-SA-29-CC-TP-74-1	<i>C. coli</i>	Pig	blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;tet(O)	-	-	1413
S-SA-29-CJ-MiyaC-57-1	<i>C. jejuni</i>	Broiler	tet(O)	-	-	1767
S-SA-29-CC-OP-113-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	rpsL p.K43R rpsL p.K88R	2713
S-SA-29-CC-OP-5-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	Unknown
S-SA-29-CC-TP-70-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;cat;tet(O)	-	rpsL p.K43R rpsL p.K88R	Unknown
S-SA-29-CC-TP-25-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	rpsL p.K43R rpsL p.K88R	Unknown

*: Nearest Sequence Type