

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：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。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（平成 30 年度）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は血清型は Schwarzengrund が、ST (Sequence Type) は ST241 が最も優勢であった。また、カンピロバクターについては、*Campylobacter jejuni* では ST42 及び ST918 が、*Campylobacter coli* では ST1055 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。

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、令和元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 μ 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。また平成 29 年度から平成 30 年度に分離された、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌が保有している *mcr* 遺伝子が乗ったプラスミドの塩基配列を、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取得して解析を行ったところ、サイズが約 60kb で耐性遺伝子としては *mcr-1* のみを保有しているプラスミド型が IncI2 であるプラスミドが最も優勢であった。

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、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トラフとゲノム配列を取得し、血清型別や遺伝子学的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、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 117 株及びカンピロバクター 92 株 (平成 30 年度)、と畜場由来 MRSA29 株 (令和 2 年度) 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、その配列を用いて血清型別や遺伝子学的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

令和元年度に分離された、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 4 株及び食鳥処理場由来サルモネラ属菌 59 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

て検出した。

(3) *mcr* 遺伝子を保有したプラスミドの解析

平成 29 年度から平成 30 年度に分離された、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌 15 株が保有している *mcr* 遺伝子が乗ったプラスミドについて、MiSeq によって取得したショートリードの塩基配列と、MinION を用いて取得したシロングリードの塩基配列をを組み合わせたハイブリッドアセンブルによって環状の塩基配列を得た。その塩基配列について、耐性遺伝子の検出及びプラスミドの Inc 型別を行った。

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

サルモネラについて、血清型は Schwarzengrund (65.0%) が一番多く、次いで Infantis (24.7%) が多かった (図 1)。ST は ST241 (51.3%) が最も多く、次いで ST32 (16.2%) 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* (76.9%) 及び *aph(3')-Ia* (66.7%)、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(A)* (77.8%)、サルファ剤耐性遺伝子である *sul1* (75.2%)、トリメトプリム耐性遺伝子である *dfpA14* (63.3%) 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 ST42 及び ST918 (それぞれ 10.6%) が最も多く、次いで ST21 及び ST440 (それぞれ 7.6%) が多かった (図 4)。*C. coli* では ST1055 (19.2%) が最も多く、次いで ST854 及び ST1125 (それぞれ 7.7%) が多かった (図 5)。耐性遺伝子は、*C. jejuni* では β -ラクタマーゼ遺伝子である *bla_{OXA-61}* (66.7%) 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)* (33.3%) が多かった (図 6)。

フルオロキノロン耐性と関連のある *gyrA* 遺伝子の変異は、25.8%の株が保有していた。*C. coli* では、*tet(O)* (88.5%) が一番多く、次いで *bla_{OXA-61}* (80.8%) が多かった (図 7)。*gyrA* の変異を保有している株は認められなかった。*C. jejuni* 及び *C. coli* とともに、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。

MRSA については、ST398 (86.2%) が最も多く、次いで ST5 及び ST8 (それぞれ 6.9%) であった (図 8)。spa 型は、t034 (69.0%) が最も多く、次いで t002 (6.9%) が多かった (図 9)。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 *bla_Z* 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* (65.5%)、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(M)* (89.7%) が認められた (図 10)。また、全体の 72.4%の株が、亜鉛耐性遺伝子である *czrC* を保有していた。

(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 11)

大腸菌について、*mcr-1* 及び *mcr-3* 遺伝子のみ検出された。*mcr-1* は牛及び豚由来株から検出され、牛由来株では 1 株 (0.3% : 割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、豚由来株では 3 株 (3.8%) 検出された。また、*mcr-3* 遺伝子は豚由来株 1 株 (1.3%) から検出された。サルモネラについて、*mcr* 遺伝子はいずれの畜種においても検出されなかった。

(3) *mcr* 遺伝子を保有したプラスミドの解析 (表)

15 株中 14 株は *mcr-1.1* を保有しており、10 株は耐性遺伝子として *mcr-1.1* のみが乗っているプラスミドサイズ約 60kb の Inc 型が IncI2 のプラスミドを保有していた。*mcr-5.1* は 1 株のみが保有しており、プラスミドサイズが約 70kb の IncFII のプラスミド上に、アミノグリコシド耐性遺伝子である *aph(3')-Ia* 及び β -ラクタマーゼ遺伝子である *bla_{TEM-1B}* と一緒に乗っていた。

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、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、人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が、最も多い ST 型の一つである ST918 は、海外で人でのアウトブレイクの起因菌となっていることが報告されている型であった。フルオロキノロン耐性について、*C. jejuni* ではフルオロキノロン耐性と関連のある *gyrA* の変異が 25.8%の株に認められ、実際の耐性率と類似した値であった。*C. coli* では *gyrA* の変異が認められた株はなかったが、実際の耐性率 (約 60%) との乖離が認められ、この原因については今後検討が必要と考えられた。マクロライド耐性遺伝子は検出されなかったが、*C. coli* ではマクロライド耐性が 20%程度認められており、これについても耐性機構の検討が必要と考えられた。

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。保有している耐性遺伝子もアミノグリコシド耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子、亜鉛耐性遺伝子等、従来のもので変わらなかった。国内において家畜関連 MRSA が人に感染した事例はほとんど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おり、豚における MRSA の保有状況は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。

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* 及び *mcr-3* 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* 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、耐性遺伝子として *mcr-1.1* のみが乗っているプラスミドサイズ約 60kb の Inc 型が IncI2 のプラスミドが優勢なことが判明し、このプラスミドが株から株へ伝達さ

れていることが示唆された。

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、人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。

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-1*及び*mcr-3*遺伝子は検出されたが検出率は低率であった。*mcr-1*遺伝子については、性状の類似したプラスミドが株から株に伝達されている可能性が示唆された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

(1)Manao Ozawa, Yukari Furuya, Ryoko Akama, Saki Harada, Mari Matsuda, Hitoshi Abo, Takahiro Shirakawa, Michiko Kawanishi, Eiji Yoshida, Minako Furuno, Hisae Fukuhara, Kazufumi Kasuya, Yoko Shimazaki. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs in Japan (投稿中)

2.学会発表

(1) 小澤真名緒、原田咲、阿保均、古谷ゆかり、赤間亮子、白川崇大、松田真理、川西路子、嶋崎洋子。「健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子の保有状況について」第164回日本獣医学会学術集会(2021年9月、オンライン開催)

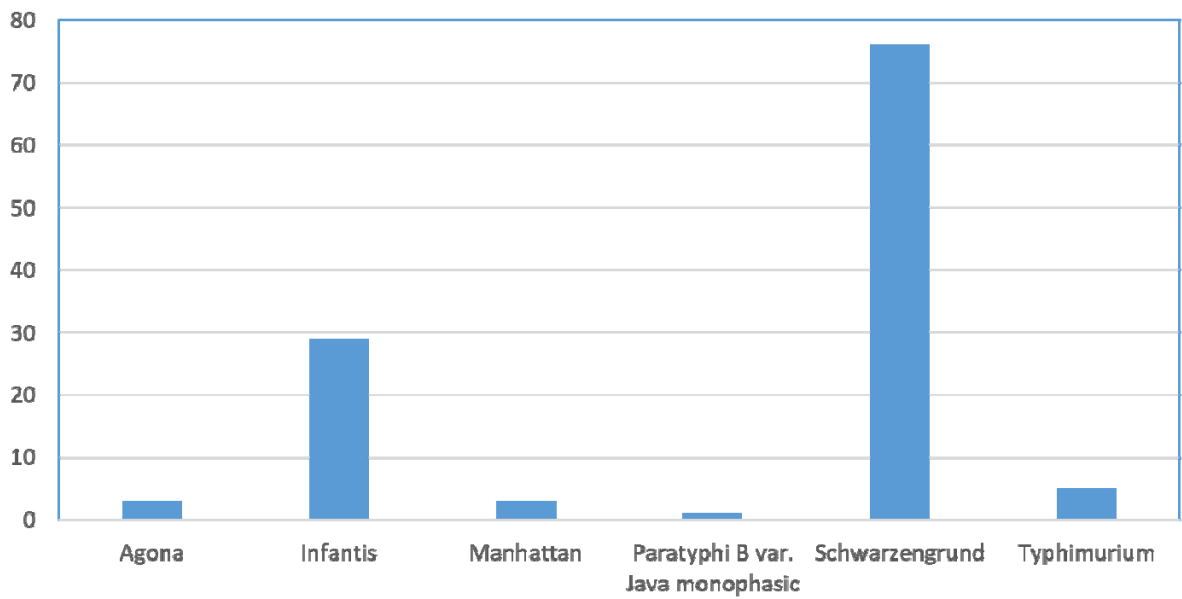
3.業界関係者向け説明会

なし

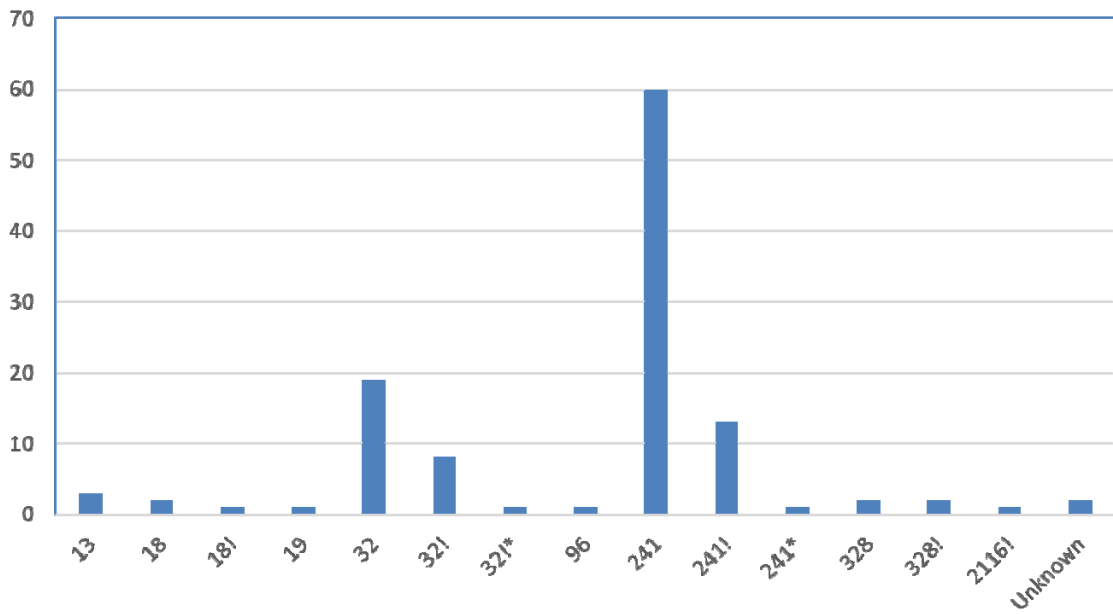
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

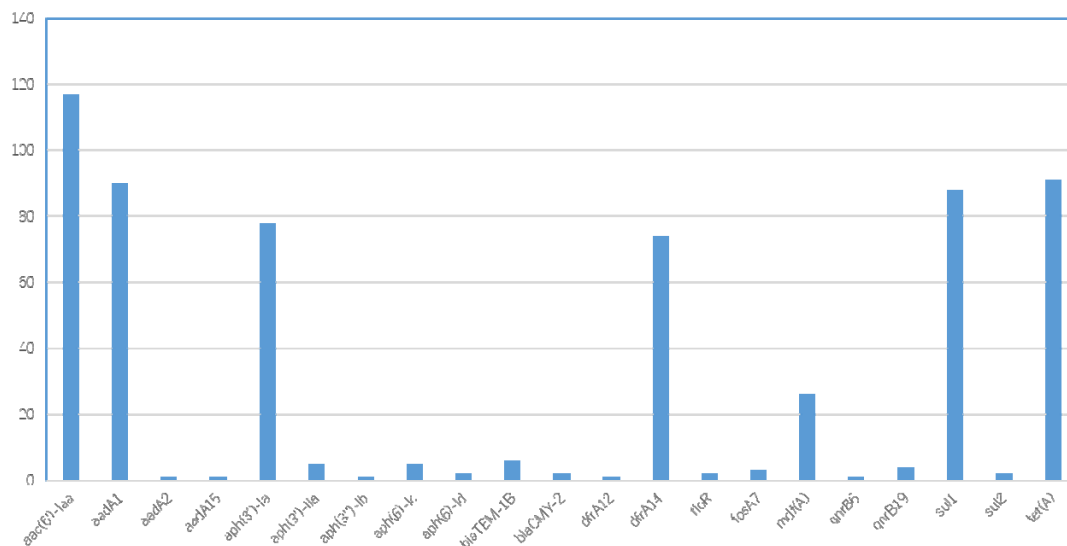
(n) 図1 サルモネラの血清型 (n=117)



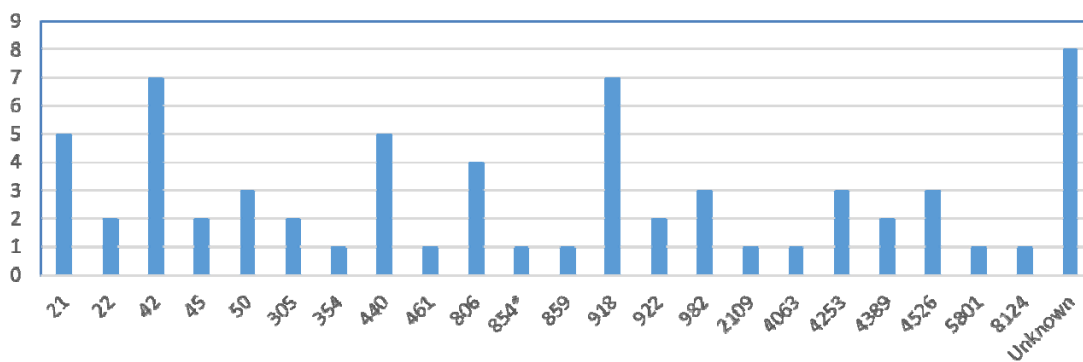
(n) 図2 サルモネラのST (n=117)



(n) 図3 サルモネラの耐性遺伝子 (n=117)



(n) 図4 C. jejuniのST (n=66)



(n) 図5 C. coliのST (n=26)

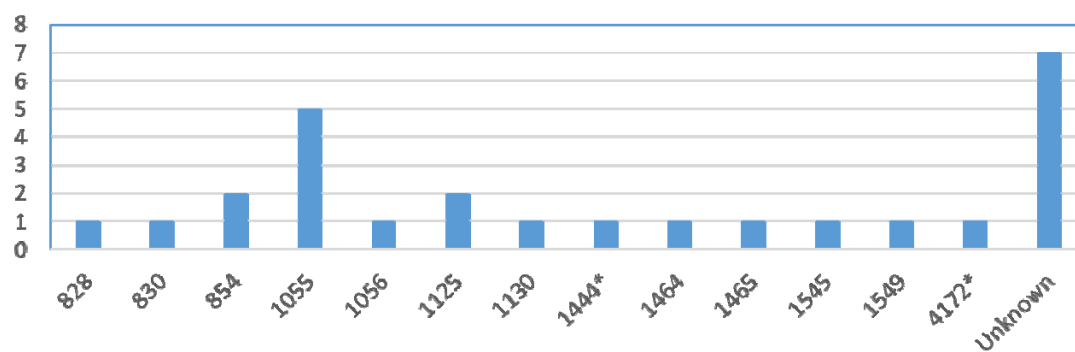


図6 *C. jejuni*の耐性遺伝子 (n=66)

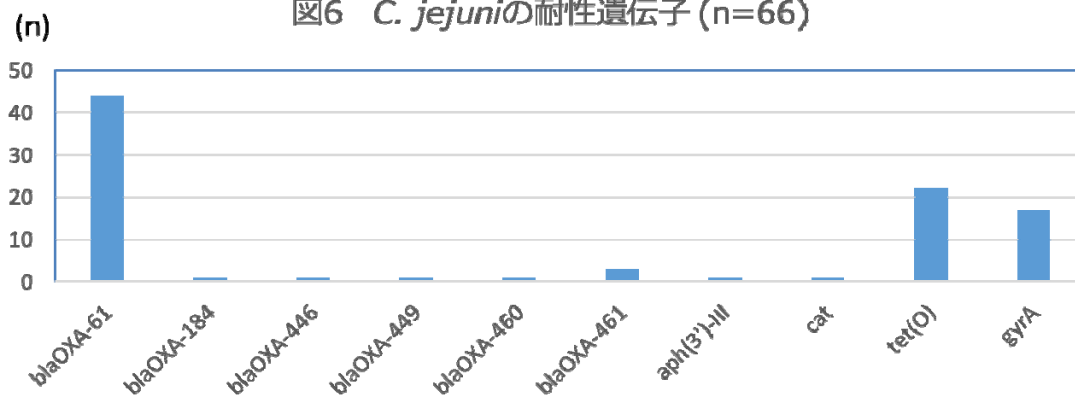


図7 *C. coli*の耐性遺伝子 (n=26)

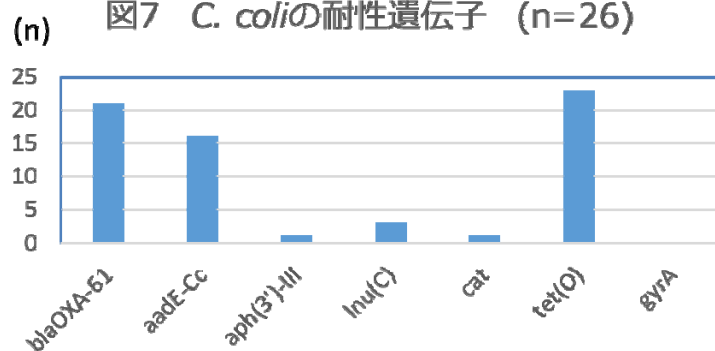


図8 MRSAのST (n=29)

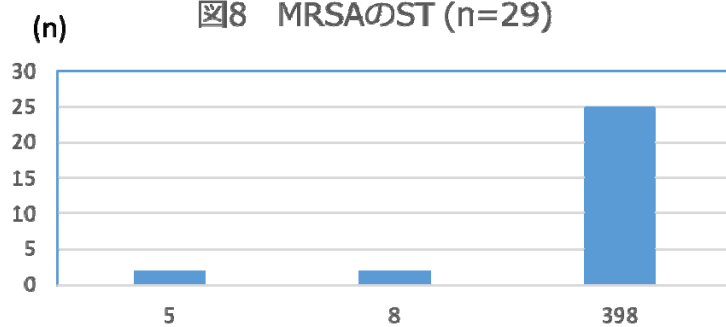
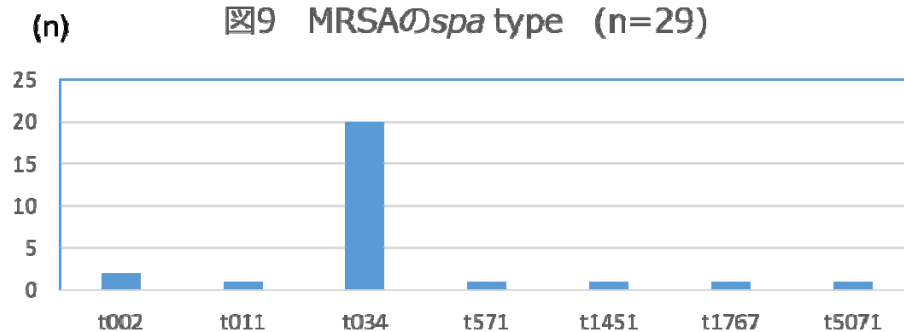


図9 MRSAのspa type (n=29)



(n) 図10 MRSAの耐性遺伝子 (n=29)

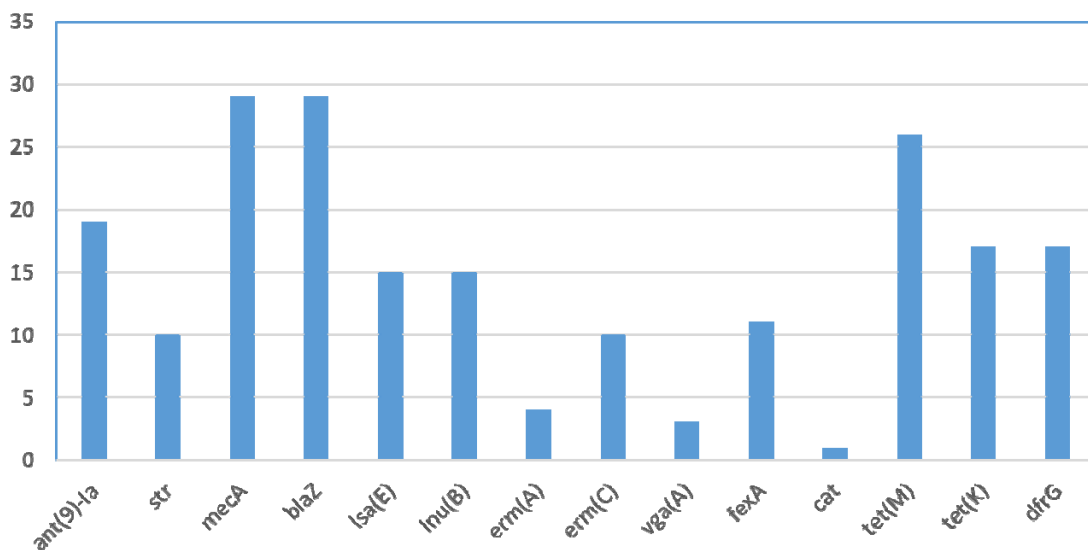


図11 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌
コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*~*mcr-5*) の検出

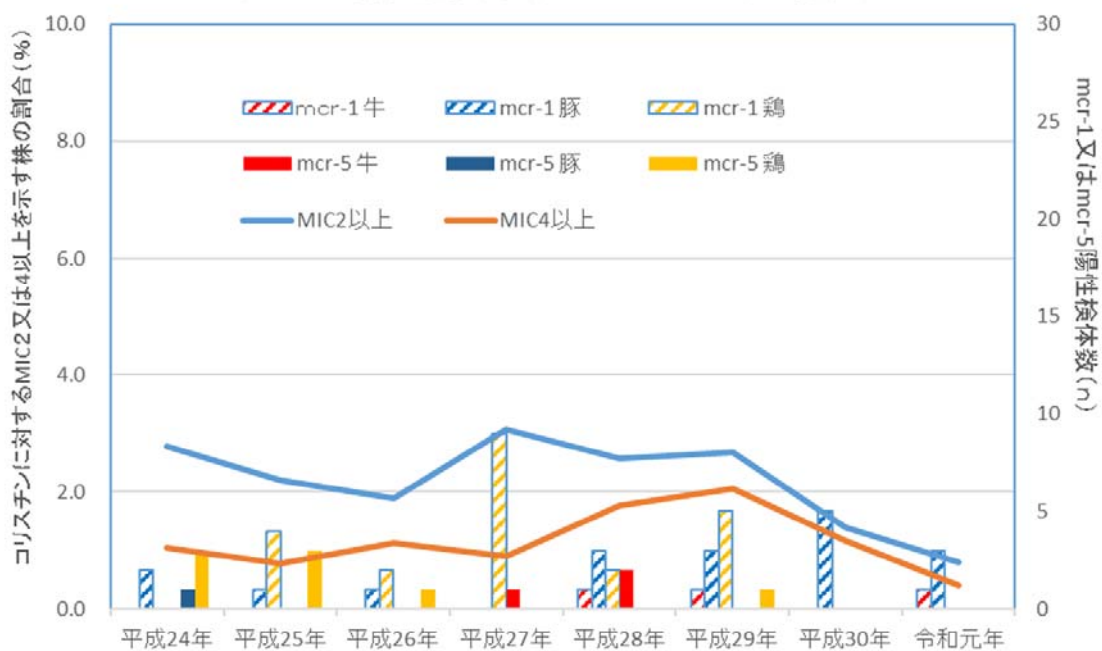


表 *mcr*遺伝子保有プラスミド

Isolates	Contig length	Resistance genes	Inc type
30-Ec-P-9-1	194409	<i>mcr-1.1</i>	IncFIA,IncHI1A,IncHI1B
30-Ec-P-66-1	63162	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
30-Ec-P-111-1	63161	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
30-Ec-P-24-1	61809	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
29-Ec-B-216-1	60888	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
29-Ec-P-25-1	64448	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
29-Ec-P-103-1	67574	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
29-Ec-C-13-1	60757	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
29-Ec-C-14-1	60900	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
29-Ec-C-101-1	60734	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
29-Ec-C-102-1	60833	<i>mcr-1.1</i>	IncI2
30-Ec-P-25-1	61229	<i>mcr-1.1</i>	ND*
29-Ec-P-26-1	60825	<i>mcr-1.1</i>	ND*
29-Ec-C-1-1	33309	<i>mcr-1.1</i>	IncX4
29-Ec-C-81-1	70786	<i>aph(3')-Ia,mcr-5.1,bla_{TEM-1B}</i>	IncFII

* Not determined