

平成 29～30 年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 (研究項目名)	コリスチン耐性菌の出現状況と特性解析に関する研究 (課題番号：1703) (1 危害要因・ばく露実態の評価に必要な科学的知見の集積 (1) 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究)
主任研究者	研究者名：田村 豊 所属機関：酪農学園大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成 29 年度～平成 30 年度（2 年間）

2 研究目的

硫酸コリスチンは、ポリペプチド系の抗生物質で飼料添加物あるいは治療用医薬品として家畜において約半世紀に亘って使用されている。一方、医療では近年増加が懸念される多剤耐性グラム陰性菌感染症に対する「最終救済薬」とも称させる抗生物質である。特に、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症は、グラム陰性菌感染症の治療において最も重要な抗菌薬であるカルバペネム系抗菌薬および広域β-ラクタム系抗菌薬に対して耐性を示す腸内細菌科細菌による感染症であり、コリスチンはCRE感染症に対する最も有効な治療薬とされている。わが国の人からのCRE分離率は必ずしも高くないが、海外の医療現場で急速に蔓延しており、何時日本で増加するのかは全く予想がつかない状態である。JVARMのデータにより、これまで家畜でのコリスチン耐性大腸菌の出現率については大きな変動がなく、人の健康への影響は無視できるものと考えられてきた。ところが2015年11月に中国において家畜や食肉、および人からプラスミド性コリスチン耐性遺伝子である*mcr-1*を保有する腸内細菌科細菌の分離報告がなされ、その後、*mcr-1*は、世界各地で分離報告が相次いだ。2016年7月には*mcr-1*とアミノ酸相同性が高い*mcr-2*も報告され、現在のところ、*mcr-9*までプラスミド性コリスチン耐性遺伝子が報告されている。日本においても、2016年に病畜あるいは健康家畜由来株から*mcr-1*が検出されたとの報告が出され人の健康に対する影響が懸念された。

以上のような背景から2016年7月から食品安全委員会の薬剤耐性菌に関するワーキンググループにおいて、家畜に使用するコリスチンに係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価が開始された。しかし、コリスチン耐性菌に関するデータが大腸菌に限定されるなど評価に使用するデータが絶対的に不足している。一方、海外の報告では同じ腸内細菌科細菌であるサルモネラ属菌や肺炎桿菌などからの*mcr-1*分離報告がなされている。そこで本研究では家畜に使用するコリスチンに関する食品健康影響評価の精度を高めるため、不足データを収集することを目的に試験を行った。また、これらのデータを基に、定量的リスク評価を試みた。

3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
研究総括	研究総括	田村豊（酪農学園大学）
プラスミド性 コリスチン耐 性遺伝子の出 現実態に関す る研究	家畜由来大腸菌のカルバペネム系 抗菌薬に対する感受性調査	川西路子（動物医薬品検査所） 、田村豊（酪農学園大学）
	家畜由来サルモネラ属菌のプラス ミド性コリスチン耐性遺伝子の出 現実態調査	川西路子（動物医薬品検査所） 、田村豊（酪農学園大学）
	人由来腸内細菌科細菌のプラスミ ド性コリスチン耐性遺伝子の出現 実態調査	高橋聡、横田伸一、佐藤豊孝（ 札幌医科大学）
	食肉におけるコリスチン耐性菌の 出現実態調査	浅井鉄夫（岐阜大学）
コリスチン耐 性菌の特性解 析に関する研 究	染色体性コリスチン耐性に係る機 構の解析	横田伸一、佐藤豊孝（札幌医科 大学）
	家畜および食肉由来コリスチン耐 性腸内細菌科細菌のプラスミド性 コリスチン耐性遺伝子の性状解析	田村豊、臼井優（酪農学園大学 ）
	プラスミド性コリスチン耐性遺伝 子の薬剤感受性に及ぼす影響	田村豊、臼井優（酪農学園大学 ）
	多剤耐性への影響	川西路子（動物医薬品検査所） 、横田伸一、佐藤豊孝（札幌医 科大学）、浅井鉄夫（岐阜大学 ）、臼井優（酪農学園大学）
	家畜および食肉由来コリスチン耐 性大腸菌の遺伝子型の検討	臼井優（酪農学園大学）
コリスチン耐 性菌感染症に おけるコリス チンの有効性	コリスチン耐性菌のマウスにおけ る定着性	横田伸一、佐藤豊孝（札幌医科 大学）
	マウスのコリスチン耐性菌感染に おけるコリスチンの治療効果	横田伸一、佐藤豊孝（札幌医科 大学）
コリスチンの 定量的食品影 響評価	コリスチンの定量的食品影響評価	蒔田浩平（酪農学園大学）

4 倫理面への配慮について

本研究で人由来腸内細菌に関する情報を得るが、菌株の研究への使用は、札幌医科大学

倫理委員会の承認を得ている。更に、疫学倫理に基づき個人が特定できる情報の連結は行わない。研究の結果が菌株に由来した個人の治療を含めた医療行為に影響を与えることはない。以上から、疫学倫理上問題はないと考えるが、酪農学園大学における人を対象とする医学研究系研究倫理委員会の審査を受けるとともに、共同研究機関である札幌医科大学が必要と判断した場合に札幌医科大学倫理委員会の審査も受け、審査結果を受けて適切に対処した。

また動物実験に関しては、札幌医科大学実験動物委員会の審査および承認のもと、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議）および札幌医科大学動物実験規程の定めるところにより、動物愛護及び管理に動物実験計画の立案および実施、動物の愛護、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準等を遵守し本実験を遂行した。

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：研究総括

1) 個別課題名：研究総括（研究担当者名：田村豊（所属機関名：酪農学園大学））

本研究では家畜に使用する硫酸コリスチンに係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価を実施するに当たっての不足データを収集することを目的に各種試験を実施した。当初、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は *mcr-1* 及び *mcr-2* しか報告されていなかったが、研究実施中に他の *mcr* 遺伝子も報告されたことから追加して実験した。また、今回得られたデータに既存データを加味して、これまで例がない豚における *mcr* 遺伝子保有大腸菌の定量的な発生評価を実施した。その概要は以下の通りである。

1. プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の出現実態に関する研究

- a. 健康な家畜からの *mcr-1* 保有大腸菌は先の報告通りに 2008 年の豚からの分離株から最初に検出され、その後、牛や鶏からも検出された。また、*mcr-1* の後に報告された *mcr-3* と *mcr-5* もほぼ同時期に国内の家畜由来大腸菌で検出した。なお、医療におけるコリスチンの治療対象であるカルバペネム耐性大腸菌は家畜から検出されなかった。
- b. 病畜から分離されたサルモネラ属菌に関する *mcr* 遺伝子の検出状況は大腸菌とは異なるものであった。*mcr-1* は 2012 年に豚由来分離株で最初に検出されたものの、*mcr-3* は 2008 年の豚からの分離株であり、*mcr-5* はさらに古く供試した最も古い 2005 年の牛からの分離株で検出された。
- c. 医療において分離された腸内細菌科細菌について調べたところ、*E. coli* で 0.67%、*Klebsiella* spp. で 0.30%、*Enterobacter* spp. で 23.73%、*Citrobacter* spp. では 0 %、*Raoultella ornithinolytica* group では 3.92% でコリスチンに耐性を示した。その内の *E. coli* の 1 株から *mcr-1* が検出された。分離株は phylogroup A-ST23 であり、これまで報告のない遺伝型であった。また、*mcr-1* は約 60kb の Inc2 plasmid に存在した。
- d. 市販肉の 310 検体を CL (0.1mg/L) 添加 DHL 寒天培地で培養したところ 281 検体 (90.6%) から分離した 1,125 株を同定後、薬剤感受性試験を実施した。その内、526 株がコリスチンに自然耐性を示す菌種であった。MIC 値が 1mg/L 以上の 503 株の内、鶏肉 9 検体 (8.7%) 由来 *E. coli* から *mcr-1*、鶏肉 1 検体 (1.0%) 由来と豚肉 1 検体 (1.0%) 由来 *Aeromonas* spp. から *mcr-3* が検出された。市販肉は CL 耐性菌に汚染しており、*mcr* 遺伝子保有株が鶏肉の 9.7% 及び豚肉の 1.0% で認められ大腸菌以外の菌種から検出されることを示した。

2. コリスチン耐性菌の特性解析に関する研究

- a. 大腸菌の染色体性コリスチン耐性機構には、*pmrAB* のアミノ酸置換または欠損が関与していることが明らかとなった。具体的には、PmrA の L105P と、PmrB の Δ27-45_LISVFWLWHESTEQIQLFE と G206D であった。また、*Klebsiella* spp. においては PhoQ に認められた S347R 変異がコリスチン耐性に関与している可能性が考えられた。さらに、*Enterobacter* spp. のコリスチン耐性にはヘテロ耐性に関わっていることが示唆さ

- れ、特定の系統に属することが明らかとなった。
- b. 大腸菌から腸内細菌科細菌 (*K. pneumoniae*, *E. cloacae*) への *mcr-1* の接合伝達については、ブロスメイティング法により30の組み合わせのうち3組(10%)で伝達が認められた。これら3組から得られた接合伝達体のコリスチンに対するMIC値はレシピエントと比較して上昇したが、他の抗菌薬に対するMIC値は変化しなかった。また、多剤耐性グラム陰性菌 (緑膿菌、*Acinetobacter baumannii*) をレシピエントとした接合伝達試験においては、ブロスメイティング法とフィルターメイティング法のいずれにおいても接合伝達体は確認されなかった。
- c. *mcr* 保有大腸菌から実験室内大腸菌である ML4909 へ *mcr* 保有プラスミドの伝達が認められた (42.7%)。接合伝達体のコリスチンに対する MIC 値は、伝達した *mcr* 遺伝子の型によって違いが認められ、*mcr-1* は *mcr-3* 及び 5 に比べて、コリスチンの感受性を低下させた。また、*mcr-1* と *mcr-5* 単一保有プラスミドが伝達した接合伝達体では、コリスチン耐性のみが伝達した。*mcr-3* 保有プラスミドが伝達した接合伝達株では、コリスチン耐性の他にアンピシリン、セファゾリン、ストレプトマシン、カナマイシン、トリメトプリム耐性が伝達したことから、*mcr-3* 保有プラスミドは他の抗菌薬に対する感受性も変化させる可能性がある。。
- d. *mcr* 遺伝子保有細菌について、耐性型、Inc型、プラスミド長の性状について次世代シーケンス解析を行った。*mcr-1* 保有細菌について、他の薬剤に対しても耐性を示す株は存在したが、*mcr-1* 保有プラスミドと同一のプラスミド上に他の耐性遺伝子を保有するものは認められず、全てレプリコン型はIncI2であった。*mcr-1* 保有プラスミドのプラスミド長については、一部を除いて全て約60kbpであった。一方、*mcr-3* および *mcr-5* 保有プラスミドは同一のプラスミド上に、*bla*_{TEM-1B}をはじめとする他の耐性遺伝子が存在しており、複数のInc型およびプラスミド長を示した。
- e. *mcr-1* 及びおよび *mcr-3* 保有家畜及びハエ由来大腸菌52株は26のST型に分類され、その内11のST型 (7404-7412、7433、7542) は本研究で新たに登録されたものであった。また、分離されたST101やST10は医療現場から分離されるものであった。PFGE解析の結果、同一農場内で一部の *mcr* 保有株がクローナルに広がっていたが、農場間伝播などは起こっておらず、*mcr* 遺伝子がプラスミドとして拡散していることを示唆した。
- f. 試験管内での染色体性コリスチン耐性大腸菌と感受性大腸菌との競合培養の結果、染色体性コリスチン耐性の獲得による増殖性への影響は、PmrA の変異は影響を与えるが、PmrB の変異は影響を与えないことが示唆された。一方、プラスミド性コリスチン耐性変異株では、どの変異株においても感受性大腸菌と同程度の増殖性を示した。また、染色体性およびプラスミド性コリスチン耐性大腸菌の血清感受性を調べたところ、一部のコリスチン耐性機構 (PmrB に G206D, *mcr-1* または *mcr-3* プラスミドの獲得) は血清感受性を増強することが明らかとなり、宿主に感染した際に侵襲性の低下をもたらすことが示唆された。
- g. 生体内でのコリスチン耐性大腸菌の定着性についてマウス全身感染モデルを用いて評価した。染色体性コリスチン耐性大腸菌では、親株では2日以内に全てのマウスが死亡したのに対し、染色体性変異株では1週間後も50%生残するか、死に至る時間が有意に遅くなった。一方、プラスミド性コリスチン耐性大腸菌では、*mcr-1* および

mcr-3 保有プラスミド並びに *mcr-1* および *mcr-3* 欠損プラスミド保有大腸菌では全てのマウスは1週間後も生存した。以上から、コリスチン耐性の獲得はマウス生体内で病原性を減弱させることが明らかとなった。特に、*pmrA* の変異、*mcr-1* 保有プラスミド、*mcr-3* 保有プラスミドの獲得は他のコリスチン耐性機構と比較し、大きく病原性の低下をもたらすことが明らかとなった。

- h. マウス生体内における各コリスチン耐性変異株の定着性の評価をコリスチン感受性の親株との競合試験で行なったところ、*mcr-1* または *mcr-3* 保有プラスミドの獲得は、マウス生体内における細菌の定着性を低下させることが明らかとなった。*mcr-1* または *mcr-3* 保有プラスミドの獲得が生菌数の低下を伴うマウスへの病原性の低下に関与していることに加え、マウス生体内での菌の増殖性の低下をもたらしていることが示唆された。
- i. マウス全身感染モデルを用いてコリスチン耐性変異株の感染におけるコリスチンの治療効果を評価したところ、一部のコリスチン耐性機構は感染宿主におけるコリスチン治療効果を減弱することが明らかとなった。特に染色体性コリスチン耐性機構はプラスミド性コリスチン耐性機構よりもコリスチンの治療効果の減弱に大きな影響を与えることが明らかとなった。
- j. European Medicine Agency (EMA), European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP), Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System, およびCenters for Disease Control and Prevention (CDC)が2016年から2017年に掛けて公表した薬剤耐性、特にコリスチンに関する記述のある報告書を収集しまとめた。この時点では本研究班が実施する定量的発生評価は公表されていなかった。
- k. 公表データを精力的に収集するとともに今回の研究で得た成績を加味して定量的発生評価を試みたところ、現在日本ではと畜場に出荷される豚の約5%で*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢であり、農場でのリスク管理には、大腸菌ワクチンの使用も含めたコリスチン適応症発生頻度の減少と、臨床現場でのコリスチン使用方法の工夫も含めたさらなる使用量の低減が有効であると示唆された。

以上のように、これまで不明な点が多かった染色体性およびプラスミド性コリスチン耐性菌の出現実態や性状解析に関する多くの成績を得ることができた。これらの成績と既存の成績を用いて世界的に類を見ない定量的な発生評価を実施した。これらの研究成果は、今後、既存の硫酸コリスチンに関する食品健康影響評価書を再評価する際に有用な情報を提供するものと思われる。

(2) 研究項目名：プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の出現実態に関する研究

1) 個別課題名：家畜由来大腸菌のカルバペネム系抗菌薬に対する感受性調査（研究担当者：川西路子（所属機関名：動物医薬品検査所）、田村豊（酪農学園大学））

研究内容・方法

- ① 動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）において平成25年から平成27年に分離された健康家畜（牛、豚、肉用鶏、採卵鶏）由来大腸菌1,972株（25年639株、26年779株、27年554株）のうちCefazolin（CEZ）に対するMIC値が32mg/L以上の28株について表1のカルバペネム系薬剤等感受性測定プレートにより薬剤感受性を確認した。

表1. 薬剤感受性プレート

第4世代 セファロスポリン	セファマイシン系	カルバペネム系		阻害剤	モノバクタム系
cefepime	cefmetazole	meropenem	imipenem	piperacillin/t azobactam	aztreonam
64	128	8	8	128/4	32
32	64	4	4	'64/2	16
16	32	2	2	'32/1	8
8	16	1	1	16/0.5	4
4	8	0.5	0.5	8/0.25	2
2	4	0.25	0.25	4/0.125	1
1	2	64/32	32/16	16/8	0.5
0.5	1	'8/4	'4/2	'2/1	control
		阻害剤		amoxicilline/ clavulanic acid	

- ② JVARMにおいて平成21年～平成27年に分離された健康家畜由来大腸菌4993株中、コリスチンに対するMIC値が2mg/L以上を示した344株におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* 遺伝子の保有状況について国立感染症研究所の鈴木らが開発したマルチプレックスPCR法により確認した。

研究結果

- ① 健康家畜由来大腸菌における薬剤感受性試験の結果について表2のMIC分布に示す。CEZに対するMIC値が32mg/L以上の28株の大腸菌について、Cefmetazole(CMZ)、Cefepime(CFPM)、Aztreonam(AZT)、tazobactam/piperacillin(TAZ/PIPC)、amoxicillin/clavulanic acid(ACV)に対して耐性を示す株が認められたが、カルバペネム系薬剤であるMeropenem(MEPM)及びImipenem(IPM)に対して耐性を示す株は認められなかった。
- ② 平成21年～平成27年に分離された健康家畜由来大腸菌からは、*mcr-2*及び*mcr-4*遺伝子は、検出されなかった。一方、*mcr-1*遺伝子は平成22年以降の株より計48株、*mcr-3*遺伝子は平成21年以降の株より計4株、*mcr-5*遺伝子は平成21年以降に分離された株から

計60株検出された。なお、採卵鶏由来株からはいずれの遺伝子も検出されなかった(表3)。*mcr-1*の検出率は僅かに増加している傾向が認められたが、*mcr-3*、*mcr-5*には増加傾向は確認されなかった(表3)。

考察

これまでの報告から健康な豚から分離した大腸菌株で*mcr-1*が最初に検出されたのは2008年であった。今回の調査では2010年の豚からの分離株で検出されており、*mcr-1*はほぼこの時期に国内の健康家畜に出現したものと思われた。また、今回の調査から*mcr-1*の後で報告された*mcr-3*と*mcr-5*もほぼ同時期には国内の大腸菌で出現していたことが分かった。

一方、医療においてコリスチンの治療対象となるのは、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)であることから、健康家畜での検出状況を調べたところ、全く検出されなかった。家畜ではカルバペネム系薬は承認されておらず、経済性からも全く使用されていないことが反映したものと思われた。

表2. CEZに対するMIC値が32mg/L以上を示した大腸菌28株のMIC分布

薬剤	MIC分布(mg/L)													ブレイクポイント	耐性株数	*耐性率(%)	**耐性率(%)
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128				
CFPM					20	3		1		3		1		16	4	0.2(%)	14.3(%)
CMZ						7	5			3	3	8	2	64	10	0.5(%)	35.7(%)
MEPM				28										4	0	0.0(%)	0.0(%)
IPM				26	2									4	0	0.0(%)	0.0(%)
AZT					3	1	3	5	8	5	3			16	8	0.4(%)	28.6(%)
TAZ/PIPC																	
		0.12/4	0.25/8	0.5/16	1/32	2/64	4/128										
		4	1	6	10	6	1							4/128	1	0.1(%)	3.6(%)
ACV																	
							2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32		32/16	16	0.8(%)	57.1(%)

*全1972株中の耐性率

**CEZのMIC32mg/L以上の28株における耐性率

表中の縦線はブレイクポイントを示す

表 3. 国内健康家畜由来大腸菌における *mcr-1,2,3,4,5* 遺伝子検出状況

年度	動物種	<i>mcr-1</i> 陽性株数	<i>mcr-1</i> 陽性率(%)	<i>mcr-2</i> 陽性株数	<i>mcr-2</i> 陽性率(%)	<i>mcr-3</i> 陽性株数	<i>mcr-3</i> 陽性率(%)	<i>mcr-4</i> 陽性株数	<i>mcr-4</i> 陽性率(%)	<i>mcr-5</i> 陽性株数	<i>mcr-5</i> 陽性率(%)	MIC2以 上の株数	全株数
平成21年度	牛	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	8	3.0	64	265
	豚	0	0.0	0	0.0	2	1.4	0	0.0	5	3.6	47	138
	ブロイラー	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	25	96
	採卵鶏	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	39	113
	小計	0	0.0	0	0.0	2	0.3	0	0.0	13	2.1	175	612
平成22年度	牛	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.7	6	293
	豚	4	2.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	4.3	15	140
	ブロイラー	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.5	2	195
	採卵鶏	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	188
	小計	4	0.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	9	1.1	23	816
平成23年度	牛	1	0.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	2.2	17	273
	豚	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	1.4	6	145
	ブロイラー	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	2.5	8	160
	採卵鶏	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	8	172
	小計	1	0.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	12	1.6	39	750
平成24年度	牛	2	0.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	2.0	7	299
	豚	5	3.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	1.4	9	143
	ブロイラー	2	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	3.1	11	195
	採卵鶏	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	206
	小計	9	1.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	14	1.7	30	843
平成25年度	牛	1	0.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.4	10	240
	豚	3	2.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	10	132
	ブロイラー	2	1.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	1.5	8	131
	採卵鶏	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	136
	小計	6	0.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	0.5	30	639
平成26年度	牛	1	0.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	1.4	7	284
	豚	7	5.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	7	134
	ブロイラー	10	5.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	12	182
	採卵鶏	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	179
	小計	18	2.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	0.5	26	779
平成27年度	牛	0	0.0	0	0.0	1	0.5	0	0.0	2	0.9	6	216
	豚	7	6.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	2.8	11	107
	ブロイラー	3	2.7	0	0.0	1	0.9	0	0.0	0	0.0	3	110
	採卵鶏	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	121
	小計	10	1.8	0	0.0	2	0.4	0	0.0	5	0.9	21	554

2) 個別課題名：家畜由来サルモネラ属菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の出現実態調査（研究担当者：川西路子（所属機関名：動物医薬品検査所）、田村豊（酪農学園大学））

研究内容・方法

JVARMにおいて、平成13年～平成27年に分離された病畜（牛、豚、鶏）由来サルモネラ属菌2,036株中、コリスチンに対するMIC値が2mg/L以上を示した330株について、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*の保有状況について国立感染症研究所の鈴木らが開発したマルチプレックスPCR法により確認した。さらにPCRで*mcr*遺伝子が検出された菌株についてXbaI 酵素処理によるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を実施し、結果について系統樹解析（FPQuest）を実施した。

研究結果

*mcr-2*及び*mcr-4*遺伝子は、検出されなかった。一方、*mcr-1*遺伝子は平成24年以降に分離された株より計4株、*mcr-3*遺伝子は平成20年以降に分離された株より計4株、*mcr-5*遺伝子は平成17年以降に分離された株から計18株検出された。なお、鶏由来株からはいずれの遺伝子も検出されなかった（表4）。また、*mcr*遺伝子保有株の多くはTyphimurium及び、その単相変異型のO4:i:-であり、*mcr-5*遺伝子保有株にはその他の血清型Livingstone、Grumpensis、Newportが確認された（図1）。なお、血清型Livingstone、Grumpensis、Newportについては、これまで国内外で*mcr*遺伝子が検出された報告はない。また、PFGE解析の結果、分離年地域、由来動物にかかわらず、*mcr-1*及び*mcr-3*保有株は近いクラスター内に認められた。一方、*mcr-5*は牛由来と豚由来では異なるクラスター内に認められた（図1）。

考察

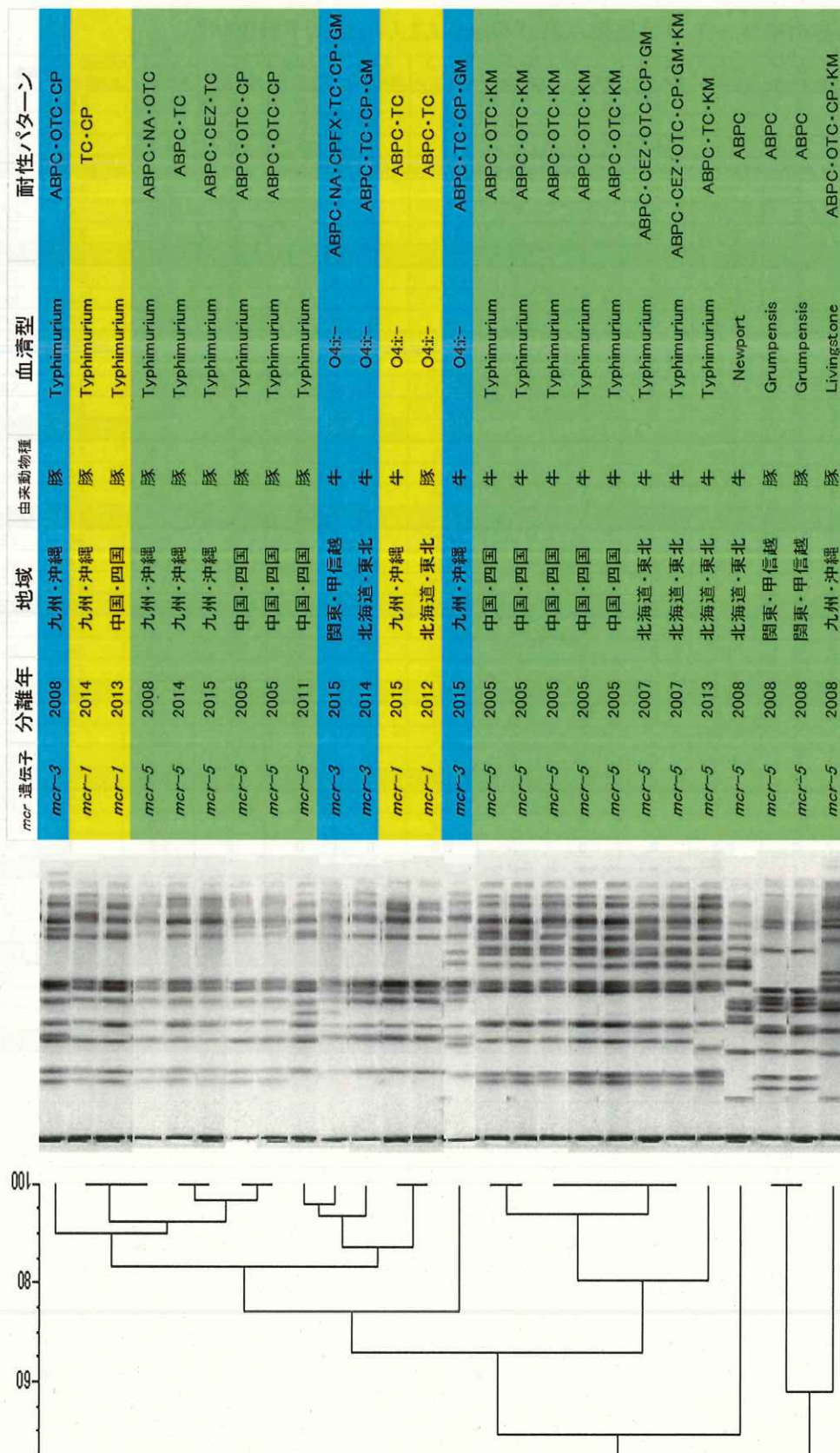
わが国で最初に病豚から*mcr-1*を保有するサルモネラ属菌が分離されたのは2013年と報告されている。今回は病豚からの分離が2012年であり、この時期に*mcr-1*保有サルモネラ属菌が出現したものと考えられた。さらに、健康な家畜から分離された大腸菌では、*mcr-1*とほぼ同じ時期の分離株から*mcr-3*と*mcr-5*が検出されたのに対し、サルモネラ属菌では*mcr-3*が2008年の病豚分離株から、*mcr-5*がさらに古く2005年の病牛分離株から検出された。このことは*mcr-3*および*mcr-5*は*mcr-1*より早期にサルモネラ属菌に出現したことを示しており大腸菌と異なる出現状況であった。

一方、*mcr*を保有する血清型は主に病原性の強いTyphimuriumと、近年、牛での分離率の高いO4:i:-であった。中にはPFGE型が類似し、分離場所や分離年が異なるTyphimuriumから*mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5*が検出されており、*mcr*の出現状況を考える上で興味深く思われた。

表 4. 国内病畜由来サルモネラ属菌における *mcr-1,2,3,4,5* 遺伝子検出状況

年度	動物種	<i>mcr-1</i> 陽性株数	<i>mcr-1</i> 陽性率(%)	<i>mcr-2</i> 陽性株数	<i>mcr-2</i> 陽性率(%)	<i>mcr-3</i> 陽性株数	<i>mcr-3</i> 陽性率(%)	<i>mcr-4</i> 陽性株数	<i>mcr-4</i> 陽性率(%)	<i>mcr-5</i> 陽性株数	<i>mcr-5</i> 陽性率(%)	MIC2以 上の株数	全株数
平成17年度	牛	0	0.0	0	0	0	0	0	0	5	6.8	34	73
	豚	0	0.0	0	0	0	0	0	0	2	2.2	24	92
	鶏	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	27	57
	小計	0	0.0	0	0	0	0	0	0	7	3.2	85	222
平成18年度	牛	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	34	73
	豚	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	24	92
	鶏	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	27	57
	小計	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	85	222
平成19年度	牛	0	0.0	0	0	0	0	0	0	2	2.7	34	73
	豚	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	24	92
	鶏	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	27	57
	小計	0	0.0	0	0	0	0	0	0	2	0.9	85	222
平成20年度	牛	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	1	1.4	34	73
	豚	0	0.0	0	0	1	1.1	0	0	4	4.3	24	92
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	27	57
	小計	0	0.0	0	0	1	0.5	0	0	5	2.3	85	222
平成21年度	牛	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	34	73
	豚	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	24	92
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	27	57
	小計	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	85	222
平成22年度	牛	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	34	73
	豚	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	24	92
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	27	57
	小計	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	85	222
平成23年度	牛	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	34	73
	豚	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	1	1.1	24	92
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	27	57
	小計	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	1	0.5	85	222
平成24年度	牛	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	0	82
	豚	1	1.2	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	2	83
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	1	32
	小計	1	0.5	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	3	197
平成25年度	牛	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	1	1.8	3	56
	豚	1	1.7	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	2	60
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	1	50
	小計	1	0.6	0	0	0	0.0	0	0	1	0.6	6	166
平成26年度	牛	0	0.0	0	0	1	1.6	0	0	0	0.0	2	63
	豚	1	1.7	0	0	0	0.0	0	0	1	1.7	3	58
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	3	51
	小計	1	0.6	0	0	1	0.6	0	0	1	0.6	8	172
平成27年度	牛	1	1.3	0	0	2	2.6	0	0	0	0.0	8	76
	豚	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	1	2.0	3	49
	鶏	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	6	7
	小計	1	0.8	0	0	2	1.5	0	0	1	0.8	17	132

図 1. *mcr* 保有病畜由来サルモネラ属菌の PFGE (XBaI) 及び疫学情報



3) 個別課題名：人由来腸内細菌科細菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の出現実態調査（研究担当者：高橋聡、横田伸一、佐藤豊孝（所属機関名：札幌医科大学））

研究内容・方法

我が国における人由来腸内細菌科細菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の拡散は明らかではない。本試験では、人の臨床材料由来腸内細菌科細菌についてコリスチン感受性およびプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の有無を明らかにすることを目的として試験を行った。

2008年から2015年に本学附属病院または札幌市内の病院の外来または入院患者の臨床検体から分離された大腸菌(*E. coli*)と、2017年5月から8月にかけて本学附属病院の臨床検体から分離された腸内細菌科細菌(1677株、表5)を用いて、コリスチンに対する薬剤感受性試験(コリスチンに対するMIC値の測定)を実施した。さらに、コリスチン耐性のブレイクポイント以上を示した株(コリスチン MIC値が2 mg/L以上)について(コリスチンに自然耐性を示す菌種は除く)は、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr*) の保有の有無をPCRで調

表5. 供試した腸内細菌科細菌

菌 種	株 数
<i>Escherichia coli</i> (2008-2015年)	514
<i>E. coli</i> (2017-2018年)	375
<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca/variicola/others</i>	333
<i>Enterobacter cloacae/aerogenes/gergoviae</i>	177
<i>Citrobacter freundii/koseri</i>	76
<i>Raoultella ornithinolytica</i> group	51
<i>Proteus mirabilis/vulgaris</i>	36
<i>Serratia marcescens/liquefaciens/grimesii</i>	86
<i>Morgenella morganii</i>	18
その他*	11
Total	1677

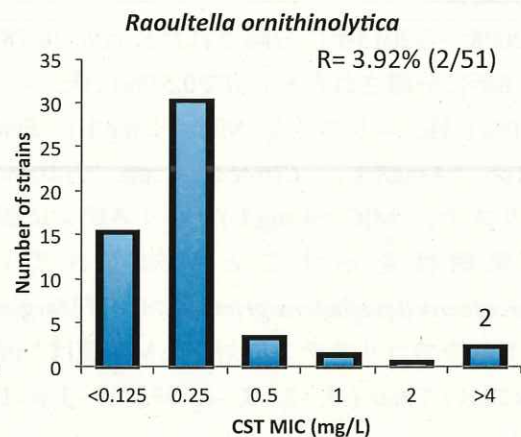
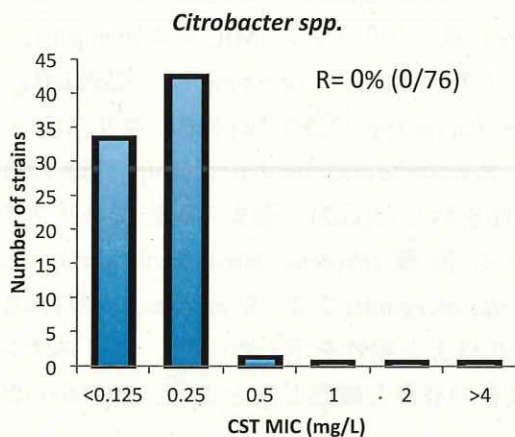
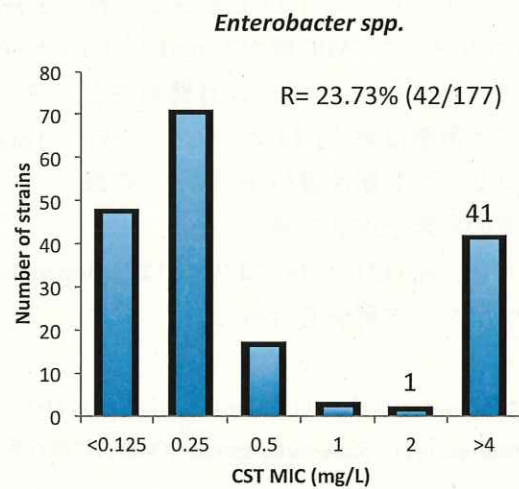
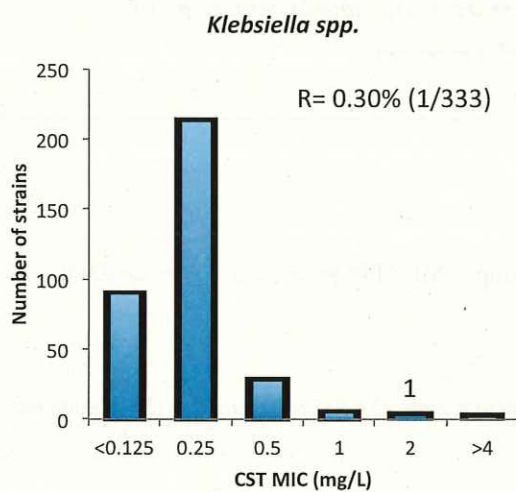
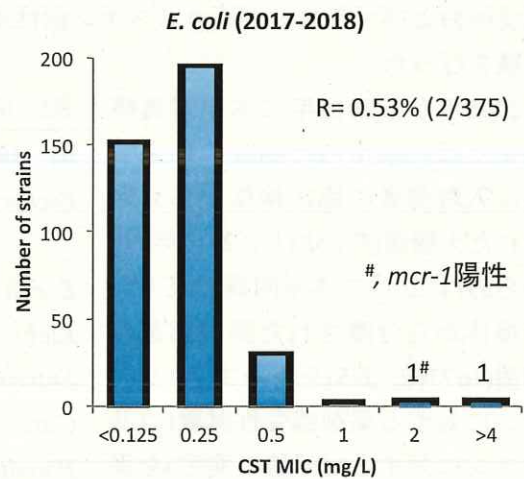
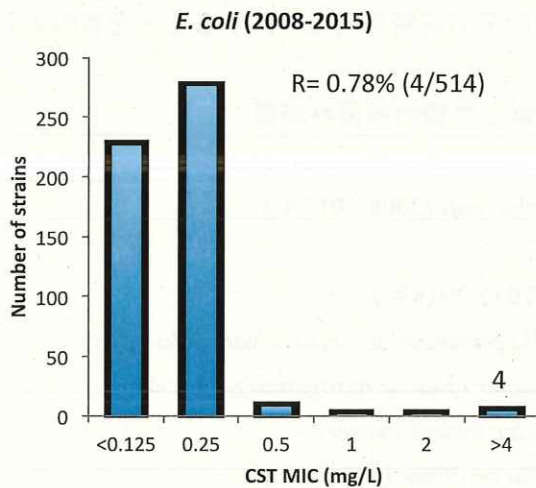
べた。*mcr*陽性の株においてはPhylogenetic group、MLST解析によるクローンの同定およびプラスミド解析を行った。

**Kluyvera ascorbata* (1), *Edwardsiella tarda* (1), *Providencia rettgeri* (3), *Rahnella aquatilis* (3), *Aeromonas hydrophila* (1), *Salmonella* species (O4群, O7群) (各1),

研究結果

2008から2015年に分離された*E. coli*で0.78% (4株, コリスチン MIC = 4-16 mg/L)、2017-2018年に分離された*E. coli*で0.53% (2株, コリスチン MIC = 2 or >4 mg/L)、*Klebsiella* spp.で0.30% (1株, コリスチン MIC = 2 mg/L)、*Enterobacter* spp.で23.73% (42株, コリスチン MIC = 2 or >4 mg/L)、*Citrobacter* spp. では0%、*Raoultella ornithinolytica* groupでは3.92% (2株, コリスチン MIC >4 mg/L)でコリスチンに耐性を示した(図2)。過去の報告でコリスチンに自然耐性を示すことが知られている菌種(*Proteus mirabilis/vulgaris*, *Serratia marcescens/liquefaciens/grimesii*, および *Morganella morganii*)では、*S. marcescens*の1株を除く全ての株でコリスチンに対するMIC値は2 mg/L以上と耐性を示した(図2)。コリスチン耐性株において*mcr* (-1, -2, -3, -4, および -5)の保有の有無を確認したところ、2017から2018年

に分離された*E. coli*の1株でのみ*mcr-1*が陽性であった。*mcr-1*が陽性だった*E. coli*のMLST解析を行ったところ、phylogroupA-ST23であることが判明した。本STはこれまで*mcr*陽性株では報告されていないものであった。プラスミド解析の結果、*mcr-1*は約60kbのInc2 plasmidに存在することが明らかとなった。なお、本菌は子宮がん患者から分離されたものであり、抗菌薬の投与歴はなく、食肉の喫食に関する情報はなかった。



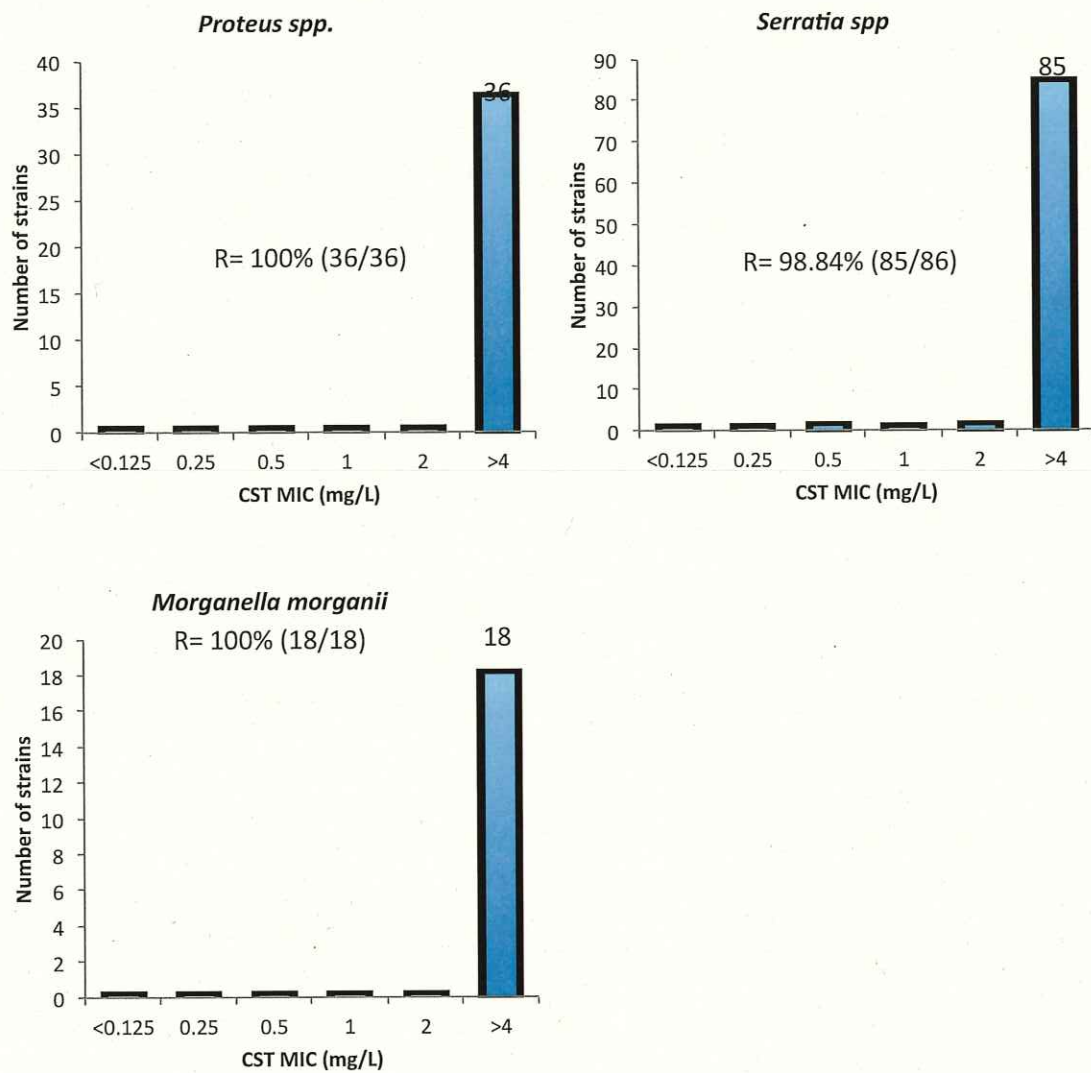


図2. 人由来腸内細菌科細菌におけるコリスチン(CST)感受性試験の結果

4) 個別課題名：食肉におけるコリスチン耐性菌の出現実態調査（研究担当者：浅井鉄夫（所属機関名：岐阜大学））

これまでの食品健康影響評価で食肉由来株に関するデータは少なく、食用動物と人をつなぐ経路は明らかにされていない。そこで市販肉（牛、豚、鶏）を各100検体購入し、腸内細菌科細菌（大腸菌、サルモネラ属菌、*Klebsiella*属菌、*Enterobacter*属菌など）等の分離を行い、コリスチンに対する薬剤感受性を調べるとともにコリスチン耐性機構を調べた。

実施方法

① 市販肉からコリスチン耐性菌の分離方法の検討

第1回研究班会議でコリスチン（CL）添加濃度を1mg/Lと設定したので、DHL寒天培地にCL 1mg/Lを添加した試作品を作成してCL耐性大腸菌保存株を用いて評価したところ、生育が認められない株が認められた。そこで、基礎培地がCLのMIC値に与える影響について評価を行った。

材料と方法

CLに対するMIC値が異なる（0.5～16 mg/L）牛由来大腸菌48株を供試した。

CLに対するMIC値は、CLSIのガイドラインに準拠したミュラーヒントン培地(MHA)及び分離培地として分離試験に用いることを予定していたDHL寒天培地による寒天平板希釈法で決定した。

結果

2種類の培地を用いたコリスチンに対するMIC値は相関した($R^2 = 0.6365$)が、全体的にはDHL培地を用いて測定したMIC値（縦軸）は、MHA培地を用いて測定したMIC値（横軸）に比べて約10分の1 ($y = 0.1075x + 0.1343$)であった(図3)。

MHA培地でMIC値0.5～8mg/Lを示した株の一部の、DHL寒天培地を用いたMIC値は0.25 mg/Lを示した。

考察

CL添加DHL寒天培地は、添加濃度より高いMIC値を示す株の発育を抑制することが示された。追加実験より、マッコンキー寒天培地及びデオキシコール酸添加MHA寒天培地を用いても同様の影響が観察されたことから、培地に含まれる胆汁酸がコリスチンに対する感受性に影響を与えていると考えられた。

供試した株では、コリスチン耐性株（MIC $4 \mu\text{g/mL}$ 以上）がDHL寒天培地ではMIC値0.25mg/L以上を示したことから、食肉中の汚染を精度高く調査することを目的とする本試験においては、DHL培地へのCL添加量としては0.1mg/Lが妥当であると判断した。本濃度では、感受性株の一部も発育するため、基礎培地についてさらに検討するなど、食肉からの

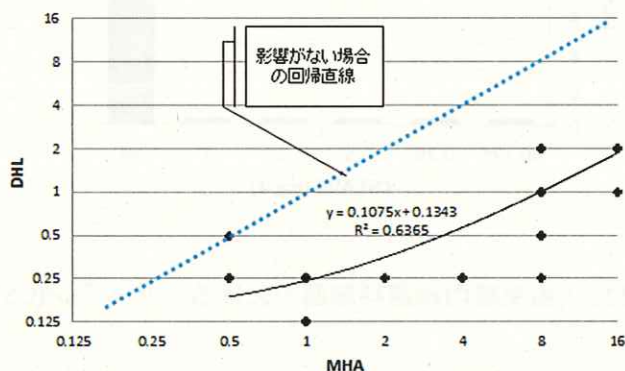


図3. コリスチンのMIC値に与える基礎培地の影響 (n=48)
) 縦軸と横軸の単位はコリスチン添加濃度(mg/L)

コリスチン耐性株の効率の良い分離法については、改善が必要と考えられる。

② 基礎培地の検討

基礎培地を検討するため、市販のCL耐性株選択培地（CHROMagar COL-APSE、COL培地）とCL（0.1mg/L）加DHL培地を用いて市販食肉からのCL耐性菌を分離した。COL培地は、CHROMagar オリエンタシオンが基礎培地で、菌種によりコロニーの色調が異なる利点がある。

材料と方法

岐阜県及び大阪府内のスーパーで購入した市販食肉 29 検体（牛肉 12 検体、豚肉 7 検体、鶏肉 10 検体）を供試した。

COL 培地と CL（0.1mg/L）添加 DHL 培地に、直接塗抹と TSB 培地での増菌培養物を塗抹して、37℃で一晩培養した。培養後最大 5 コロニーを釣菌し、純培養後、-80℃で保存した。

分離菌は自動細菌同定装置（バイテック II）で同定し、本研究用に作成したフローズンプレートを用いて薬剤感受性試験を実施した。

結果

市販食肉29検体のうち、CL加DHL培地で26検体（89.7%、うち直接培養で25検体）、COL培地で29検体（100%、うち直接培養で23検体）から細菌が分離された。CL加DHL培地で分離した105株を同定したところ、CLに自然耐性を示す*Morganella morganii*（1株）、*Serratia* 属菌2菌種（45株）及び*Providencia*属菌（1株）を含む18菌種であった。一方、COL培地で分離した97株を同定したところ、*M. morganii*（1株）、*Proteus vulgaris*（1株）、*Serratia* 属菌3菌種（47株）及び*Providencia*属菌（1株）を含む16菌種であった。自然耐性菌の割合はCL加DHL培地では44.8%(47/105)及びCOL培地では51.5%(50/97)で、両者に差はなかった。

考察

両培地を用いて検討したが、大きな差は見られなかった。市販培地は簡便であるが、コストを考慮してCL加DHL培地で以降の実験を実施することとした。

③ 市販肉からの分離試験

上記の試験により検討した薬剤含有DHL培地を用いて、国内5地域（北海道・東北、関東、中部、関西及び九州）の小売店から市販食肉（牛、豚、鶏）を購入し、腸内細菌科細菌（大腸菌、サルモネラ属菌、*Klebsiella*属菌、*Enterobacter*属菌など）等の分離を行い、コリスチンに対する薬剤感受性を調べるとともにコリスチン耐性機構を調べた。

材料と方法

平成29年5月から平成30年7月に5地域で購入した牛肉104検体、鶏肉103検体、豚肉103検体計310検体を供試した(表6)。検体から直接塗抹とTSB培地を用いた増菌培養物をCL（0.1mg/L）添加DHL寒天培地に塗抹して、37℃で一晩培養した。分離菌は自動細菌同定装置（バイテック II）で同定した。薬剤感受性試験は、CLSIの方法に準拠した微量液体培地希釈法で実施し、CLに対するMIC値が1mg/L以上の株については、PCR法により *mcr-1*～*5*を検索した。腸内細菌科細菌についてはEUCASTブレイクポイントに基づき

4mg/L以上、*Aeromonas*と*Pseudomonas*についてはCLSIブレイクポイントに基づき8mg/L以上を耐性と判断した。

結果と考察

市販肉310検体中281検体（90.6％）から1,125株が分離された。種類別では、鶏肉98検体（95.1％）454株、豚肉95検体（92.2％）348株、牛肉88検体（84.6％）323株であった。同定した結果、CLに対する自然耐性菌として*Serratia*、*Proteus*、*Cedecea*など526株が分離された。自然耐性菌以外は、鶏肉52検体（50.5％）、豚肉52検体（50.5％）、牛肉44検体（42.3％）から分離された599株で、鶏肉から*Aeromonas* や*Hafnia*、豚肉と牛肉から*Hafnia*や*Yersinia*が多く分離され、CL耐性大腸菌の他、多様な菌種でCL耐性を示す株が認められた（表7、表8）。MIC値が1mg/L以上の503株のうち、鶏肉9検体（8.7％）由来*E. coli*から*mcr-1*、鶏肉1検体（1.0％）由来と豚肉1検体（1.0％）由来*Aeromonas*から*mcr-3*が検出された（表9）。以上、市販肉はCL耐性菌に汚染していること、*mcr*遺伝子保有株が鶏肉の9.7％及び豚肉の1.0％で認められ、大腸菌以外の菌種から検出されることを明らかにした。

表6. 供試した国産市販肉の購入地方と生産県

購入地方	購入県(店舗数)	生産県	鶏肉	豚肉	牛肉	計
北海道・東北	北海道 (4)	北海道	9	12	9	30
		青森	1			1
		岩手	1			1
		不明	1			1
		小計	12	12	9	33
	岩手 (5)	岩手	5	7	6	18
		青森	2		2	4
		栃木			1	1
		不明	1	2	1	4
		小計	8	9	10	27
	合計		20	21	19	60
関東	千葉 (4)	千葉	3	2		5
		北海道			3	3
		鹿児島	1	2		3
		群馬			1	1
		山口			1	1
		宮崎			1	1
		不明	4	4	2	10
		小計	8	8	8	24
	東京 (8)	宮城	2		3	5
		鹿児島		3	1	4
		北海道		1	2	3

		岩手	3			3
		神奈川		3		3
		徳島	3			3
		青森	2			2
		山形			1	1
		茨城		1		1
		千葉			1	1
		東京		1		1
		長野			1	1
		岐阜		1		1
		佐賀	1			1
		宮崎			1	1
		沖縄		1		1
		不明	5	4	5	14
		小計	16	15	15	46
		合計	24	23	23	70
中部	岐阜 (11)	岐阜	2	6	2	10
		北海道			6	6
		愛知	1	1	3	5
		宮崎	2	1	1	4
		鹿児島	2	1	1	4
		岡山	1			1
		長崎			1	1
		不明	10	11	8	29
		合計	18	20	22	60
近畿	滋賀 (5)	北海道			2	2
		岩手	1			1
		岐阜		1		1
		宮崎		1		1
		鹿児島			1	1
		群馬			1	1
		不明	6	6	5	17
		小計	7	8	9	24
		合計				
	大阪 (8)	鹿児島		3	2	5
		北海道		2	2	4
		岩手	2			2
		兵庫	2			2
		鳥取	2			2
		徳島	1		1	2

	宮崎	1	1		2	
	群馬	1			1	
	岐阜			1	1	
	京都	1			1	
	岡山			1	1	
	不明	3	6	4	13	
	小計	13	12	11	36	
	合計	20	20	20	60	
	九州	福岡		2	2	4
		佐賀	2	1	1	4
宮崎				2	2	
青森				1	1	
熊本			1		1	
鹿児島			1		1	
不明		9	4	4	17	
小計		11	9	10	30	
熊本 (5)		熊本	2	2	3	7
		鹿児島	3	1	3	7
	佐賀	1		1	2	
	長崎		1		1	
	宮崎		1		1	
	不明	4	5	3	12	
	小計	10	10	10	30	
合計	21	19	20	60		
市販肉合計		103	103	104	310	

表7. 市販肉からのCL耐性菌の分離状況

	CL (0.1mg/L) 添加DHL寒天培地で 発育菌分離数/検体数 (%)	CL耐性 <i>E. coli</i> 分離数/検体数 (%)
鶏肉	52 / 103 (50.5)	13 / 103 (12.6)
豚肉	52 / 103 (50.5)	2 / 103 (1.9)
牛肉	44 / 104 (42.3)	1 / 104 (1.0)
計	148 / 310 (47.7)	16 / 310 (5.2)

表8. 食肉由来株におけるCL MICの分布 (n=1125)

菌種	MIC[μg/mL]							株数	耐性株数 (%)
	≤0.25	0.5	1	2	4	8	>8		
CLに自然耐性を示す菌種									
<i>Aeromonas sobria</i>		8	54	42	3	1	9	117	10 (8.5)
<i>hydrophila/caviae</i>		8	19	8	4	3	32	74	35 (47.3)
<i>veronii</i>			2	2	1		3	8	3 (37.5)
spp.		1	5	1				7	0
<i>Hafnia alvei</i>		1		3	82	43	11	140	136 (97.1)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	23	57	14		1	4	100	5 (5.0)
<i>frederiksenii</i>		3	5	1				9	0
<i>intermedia</i>		1	2					3	0
<i>Escherichia coli</i>	1	10	3	2	15	1	7	39	23 (59.0)
<i>Citrobacter freundii</i>	1	7	4	1		1	1	15	2 (13.3)
<i>braakii</i>		4	3		2			9	2 (22.2)
<i>amalonaticus</i>		1	1					2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>		5	9	1		1		16	1 (6.3)
<i>oxytoca</i>	1	4			1			6	1 (16.7)
<i>pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i>			1					1	0
<i>Raoultella planticola</i>	1	6	4	1	1			13	1 (7.7)
<i>ornithinolytica</i>			1	1			1	3	1 (33.3)
<i>Enterobacter</i> spp.		3	3	1			7	14	7 (50.0)
<i>Pseudomonas</i> spp.		3	4				1	8	1 (12.5)
<i>Pantoea</i> spp.		2					5	7	5 (71.4)
<i>Ewingella americana</i>			1	2	1			4	1 (25.0)
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex				2				2	0
<i>Kluyvera intermedia</i>			1			1		2	1 (50.0)
小計								599	235 (39.2)

表9. 食肉由来株におけるmcr 遺伝子保有株

菌種	mcr 遺伝子	由来	購入県	検体数	CL MIC [μg/mL]	株数
Escherichia coli	mcr-1	鶏肉	岐阜	3	4->8	5
			東京	2	4	2
			千葉	1	4	1
			大阪	1	>8	1
			滋賀	1	4	2
			熊本	1	4-8	3
			計	9		14
Aeromonas sobria	mcr-3	鶏肉	福岡	1	1	1
		豚肉	滋賀	1	1	1
		計	2		2	

(3) 研究項目名：コリスチン耐性菌の特性解析に関する研究

1) 個別課題名：染色体性コリスチン耐性に係る機構の解析（研究担当者：高橋聡、横田伸一、佐藤豊孝（所属機関名：札幌医科大学））

研究内容・方法

家畜、食肉、人由来コリスチン耐性株について染色体性耐性機構を調べ、人由来腸内細菌科細菌における染色体性コリスチン耐性の現状を明らかにすることを目的として試験を実施した。研究項目(2)の個別課題3)から、大腸菌で5株(2008から2015年で4株、2017から2018年で1株)、*Klebsiella* spp.で1株、*Enterobacter* spp.で42株の *mcr* を保有しないコリスチン耐性株を認めたため、これらを供試した。

結果と考察

大腸菌においては、5株の *mcr* 非保有コリスチン耐性株のうち4株(SRE34, SRE44, SME296, SMEc986)はO25b:H4-ST131という世界中の臨床現場に広がっているフルオロキノロン耐性大腸菌のクローンであった(表10)。これらコリスチン耐性株をコリスチンに対して感受性を示す実験室内株の大腸菌MG1655と比較すると、染色体性遺伝子の *phoPQ*, *pmrAB* に複数のアミノ酸置換または欠損が認められた(表10)。さらに、人臨床検体から分離されたコリスチン感受性大腸菌O25b:H4-ST131のSME98と比較すると、5株のコリスチン耐性株は、*phoQ* (R6H)、*pmrA* (L105P, I128N, G144S)、*pmrB* (Δ 27-45_LISVFWLWHESTEQIQLFE, G206D)にアミノ酸置換または欠損が認められた(表10.下線)。このうち、*phoQ* に認められたR6H、*pmrA* に認められたI128NおよびG144Sはコリスチン耐性に関与しない変異であることが過去の報告で明らかとなっている(Luo Q et al., 2017. Front Microbiol. 8:2262, PMID: 29250039)。よって、*pmrA* に認められたL105P、*pmrB* に認められた Δ 27-45_LISVFWLWHESTEQIQLFE および G206D がコリスチン耐性に関与していることが示唆された。さらに、コリスチン耐性株から *pmrAB* を欠損させると、コリスチン感受性は耐性から感受性(コリスチン MIC = 0.5 mg/L)へと変化した。コリスチン耐性への関与が疑われたコリスチン耐性株と同様な *pmrA* または *pmrB* の変異を、コリスチン感受性株のSME98に導入するとコリスチンに対するMIC値が上昇し、コリスチン耐性株(SRE34, SRE44, SME222, SME296, SMEc986)と同様な値を示した(表11)。

以上の結果より、大腸菌の染色体性コリスチン耐性機構には、表11に示す *pmrAB* のアミノ酸置換または欠損が関与していることが明らかとなった。

表10. コリスチン耐性大腸菌における染色体性耐性機構の解析

Strains (serotype-sequence type)	Year of isolation	PhoP	PhoQ	PmrA	PmrB	CL MIC (mg/L)
SRE34 (O25b:H4-ST131)	2008	I44L (ATA→TTA)	WT	S29G (AGC→GGC), T31G (ACA→AGC)	H2R(CAT→CTG) <u>Δ27-45_LISVFWLWHESTEQIQLFE,</u> E123D(GAA→GAT), D283G(GAC→GGC), V351I(GTA→ATA)	16

SRE44 (O25b:H4-ST131)	2008	I44L (ATA→TTA)	WT	S29G (AGC→GGC), T31G (ACA→AGC), <u>L105P (CTG→CCG)</u>	H2R(CAT→CGT), E123D(GAA→GAT), D283G(GAC→GGC), V351I(GTA→ATA)	16
SME222 (O18-ST416)	2015	I44L (ATA→TTA)	<u>R6H</u> <u>(CGT→CAT)</u>	S29G (AGC→GGC), T31G (ACA→AGC), <u>I128N (ATT→AAC)</u> , <u>G144S (GGC→AGC)</u>	H2R(CAT→CGT), E123D(GAA→GAT), <u>G206D (GGT→GAT)</u> , D283G(GAC→GGC), V351I(GTA→ATA)	4
SME296 (O25b:H4-ST131)	2015	I44L (ATA→TTA)	WT	S29G (AGC→GGC), T31G (ACA→AGC)	H2R(CAT→CGT), E123D(GAA→GAT), <u>G206D (GGT→GAT)</u> , D283G(GAC→GGC), V351I(GTA→ATA)	8
SMEc986 (O25b:H4-ST131)	2018	I44L (ATA→TTA)	WT	S29G (AGC→GGC), T31G (ACA→AGC), <u>L105P (CTG→CCG)</u>	H2R(CAT→CGT), E123D(GAA→GAT), D283G(GAC→GGC), V351I(GTA→ATA)	16
SME98 (O25b:H4-ST131)	2015	I44L (ATA→TTA)	WT	S29G (AGC→GGC), T31G (ACA→AGC)	H2R(CAT→CGT), E123D(GAA→GAT), D283G(GAC→GGC), V351I(GTA→ATA)	0.5

表11. *pmrAB*変異導入株のコリスチンに対する感受性の変化

Strains	PmrA	PmrB	CL MIC (mg/L)
SME98	-	-	0.5
SME98PORTpmrB34	-	$\Delta 27-45_LISVFWLWHESTEQIQLFE$	16
SME98PORTpmrA105	L105P	-	16
SME98PORTpmrB206	-	G206D	8

Klebsiella spp.においては1株(*K. pneumoniae*, SMKp719)のみコリスチンに対して耐性を示した(図2)。過去に*Klebsiella* spp.においてコリスチンに対する感受性に影響があるとされる染色体性遺伝子(*mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*)の変異をコリスチン感受性株(NTUH-K2055株)と比較したところ、PhoQでのみSMKp719特有の変異(D150G, S347R)が認められた。PhoQのD150G変異は過去の報告においてコリスチン耐性に関与がないことが知られている (Cheng YH et. Al., 2015)が、PhoQのS347R変異のコリスチン感受性への影響はこれまでのところ報告されていない。以上のことから、PhoQに認められたS347R変異が*Klebsiella* spp.のコリスチン耐性に関与している可能性が考えられた。

コリスチン耐性率が高かった*Enterobacter* spp.においては、「ヘテロ耐性」という一つの菌株集団にコリスチン耐性の菌株集団が高頻度(約 $10^{-1} \sim 10^{-6}$)に存在する現象が知られている。人臨床検体由来*Enterobacter* spp.においてヘテロ耐性を評価するため、population analysis (同一菌株集団の中にコリスチンに耐性を示す集団がどの程度含まれているのかを、[コリスチン耐性を示した菌数]/[総生菌数]にて測定)を行なったところ、多くの株は $10^{-1} \sim 10^{-6}$ の頻度でコリスチン耐性を示す菌株集団を有していた (図4)。Population analysisの値が高頻度であった株($10^{-1} \sim 10^{-3}$)の多くはコリスチンに対する感受性試験においてMIC値が4mg/L以上を示したが、Population analysisの値が中等度であった株($10^{-4} \sim 10^{-6}$)は、コリスチン感受性試験で「スキップウェル現象[2倍段階希釈系列のコリスチン濃度(0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/L)を含む各液体培地のウェルにて、一度菌の増殖を抑制したウェルが認められたが、より高

濃度のコリスチンを含むウェルで再び菌の増殖を認める現象」が認められた(例えば、0.5mg/Lのウェルで一度菌の増殖を認められなかったが、2 mg/Lで再び菌の増殖が認められた場合)。本現象は、ヘテロ耐性株の主な表現系であることが知られている。以上の結果より、*Enterobacter* spp.のコリスチン耐性にはヘテロ耐性が関わっていることが示唆された。

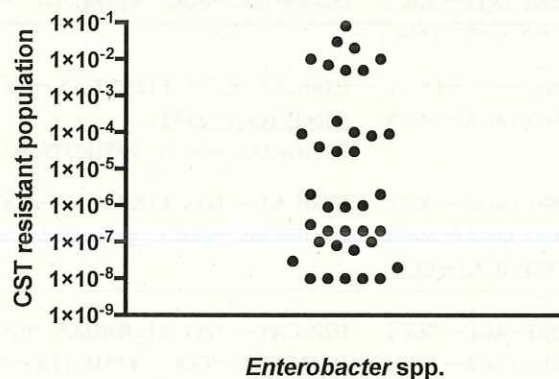


図4. *Enterobacter* spp.におけるコリスチンヘテロ耐性の評価

次に、*Enterobacter* spp.について*hsp60*遺伝子の塩基配列を用いた系統樹解析を行ったところ、コリスチンに対してヘテロ耐性を示す*Enterobacter* spp.は特定の系統に属することが明らかとなった。特に系統dやfはほぼ全ての株がコリスチンに対してヘテロ耐性を示す集団から構成されていた(図5)。

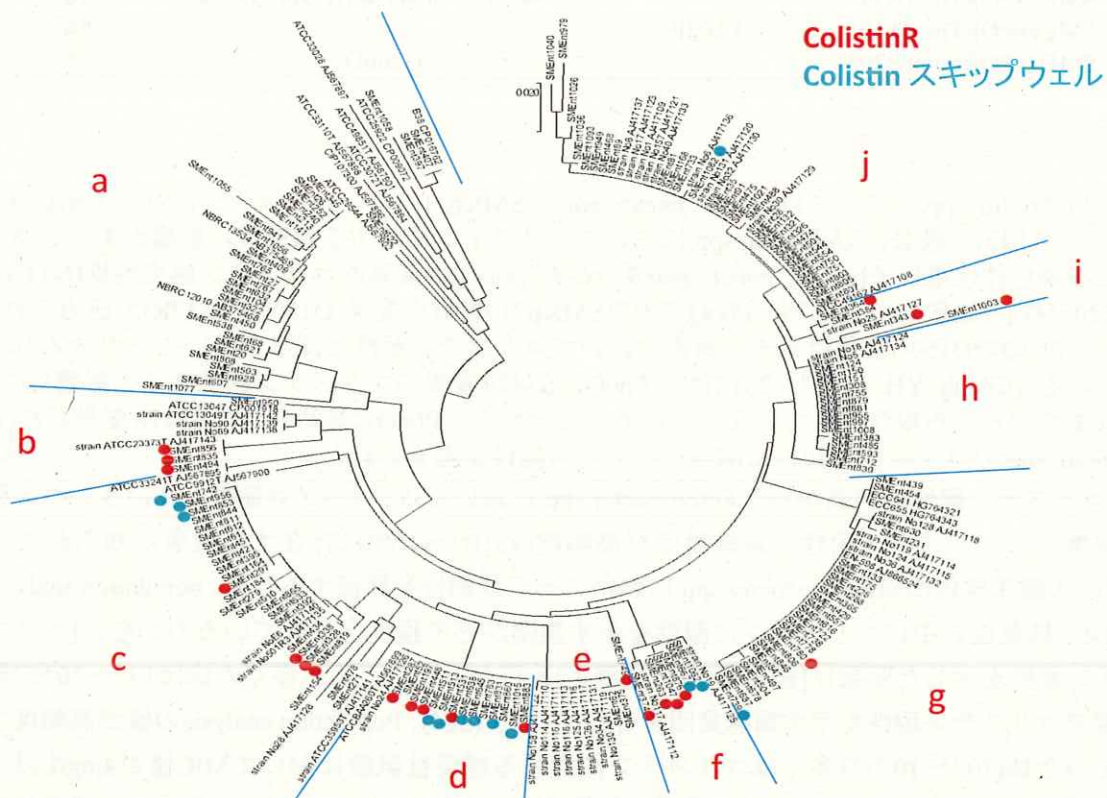


図5. *Enterobacter* spp.における*hsp60*遺伝子を用いた系統樹解析

さらに*Enterobacter* spp.について、MLST解析を実施したところ系統dは、ST52, ST125,

ST365-like, ST423, ST1001, ST-unknownから構成されていることが明らかとなった。系統dで主要なST型であったST125(6株)のうち1株はコリスチン感受性株(Ent860)であった。よって、Ent860と5株のST125-コリスチンヘテロ耐性株において、これまで*Enterobacter* spp.のコリスチン耐性に関連があるとされている染色体性遺伝子(*phoP*および*phoQ*)の塩基配列を次世代シーケンサー(NGS)解析により比較したが、全て同一の配列を有しており、コリスチンヘテロ耐性株に特有の変異は認められなかった。NGS解析により、Ent860と5株のST125-コリスチンヘテロ耐性株間での網羅的遺伝子変異の検出を行ったところ、ST125-コリスチンヘテロ耐性株のみが共通して保有する45の遺伝子変異を同定した(表12)。これら候補遺伝子の中に*Enterobacter* spp.のコリスチンヘテロ耐性に関与する変異が含まれている可能性があり、今後の解析が求められる。

表 12. ST125-コリスチンヘテロ耐性株に共通して認められる染色体性遺伝子変異

	Amino acid change	Coding region change	product (Emt860annotation_CDS)	gene
1	LOCUS_39980:p.Phe352Ser	LOCUS_39980:c.1055T>C	glycosyl transferase	<i>rfaG</i>
2	LOCUS_13530:p.Thr765Ala	LOCUS_13530:c.2293A>G	adhesin autotransporter	
3	LOCUS_22720:p.Tyr350Ser	LOCUS_22720:c.1049A>C	hypothetical protein	
4	LOCUS_45560:p.*412Gln	LOCUS_45560:c.1234T>C	MFS transporter	
5	LOCUS_32820:p.Cys519Ser	LOCUS_32820:c.1555T>A	UvrABC system protein C	<i>uvrC</i>
6	LOCUS_06250:p.Leu469His	LOCUS_06250:c.1406T>A	methionine synthase	
7	LOCUS_24150:p.Phe439Cys	LOCUS_24150:c.1316T>G	thiamine/thiamine pyrophosphate ABC transporter permease ThiP	
8	LOCUS_26840:p.Glu1163Asp	LOCUS_26840:c.3489A>T	chromosome partition protein MukB	<i>mukB</i>
9	LOCUS_07630:p.Arg208Gln	LOCUS_07630:c.623G>A	DNA-binding transcriptional regulator CytR	
10	LOCUS_07630:p.Pro286Ser	LOCUS_07630:c.856C>T	DNA-binding transcriptional regulator CytR	
11	LOCUS_20510:p.Phe311Val	LOCUS_20510:c.931T>G	methionine import ATP-binding protein MetN	<i>metN_1</i>
12	LOCUS_39090:p.Ser61Arg	LOCUS_39090:c.181A>C	ribonucleoside-diphosphate reductase	
13	LOCUS_39620:p.Lys373Gln	LOCUS_39620:c.1117A>C	branched chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	<i>livK_2</i>
14	LOCUS_03300:p.Val291Ala	LOCUS_03300:c.872T>C	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2, 6-diaminoheptandioate ligase	<i>mpl</i>
15	LOCUS_26970:p.Gly427Glu	LOCUS_26970:c.1280G>A	30S ribosomal protein S1	
16	LOCUS_43500:p.Met296Leu	LOCUS_43500:c.886A>C	Lon protease	
17	LOCUS_27540:p.Phe34Ile	LOCUS_27540:c.100T>A	RpiR family transcriptional regulator	
18	LOCUS_05270:p.Ser61Gly	LOCUS_05270:c.181A>G	hypothetical protein	
19	LOCUS_30370:p.Ala161Val	LOCUS_30370:c.482C>T	fimbrial adhesin FimH	<i>fimH</i>
20	LOCUS_20900:p.Pro162Leu	LOCUS_20900:c.485C>T	glutathione S-transferase	
21	LOCUS_08080:p.Ala104Thr	LOCUS_08080:c.310G>A	formate dehydrogenase subunit gamma	
22	LOCUS_40570:p.Thr192Ala	LOCUS_40570:c.574A>G	MFS transporter	<i>lacY</i>
23	LOCUS_26330:p.Thr91Ala	LOCUS_26330:c.271A>G	alpha/beta hydrolase	
24	LOCUS_26370:p.His127Gln	LOCUS_26370:c.381T>G	glyoxalase	
25	LOCUS_33920:p.Phe20Val	LOCUS_33920:c.58T>G	hypothetical protein	
26	LOCUS_42700:p.Pro505Ala	LOCUS_42700:c.1513C>G	oxidoreductase	
27	LOCUS_05550:p.Pro844Leu	LOCUS_05550:c.2531C>T	sensor histidine kinase RcsC	<i>rscC</i>
28	LOCUS_19300:p.Thr8Ala	LOCUS_19300:c.22A>G	tagatose-6-phosphate ketose isomerase	
29	LOCUS_34090:p.Thr169Ala	LOCUS_34090:c.505A>G	MFS transporter	
30	LOCUS_05820:p.His106Gln	LOCUS_05820:c.318T>G	chemotaxis protein CheV	
31	LOCUS_28320:p.Glu280Gln	LOCUS_28320:c.838G>C	flagellar hook protein FlgE	<i>flgE</i>
32	LOCUS_07330:p.*83Lys	LOCUS_07330:c.247T>A	hypothetical protein	

33	LOCUS_05930:p.Gln266His	LOCUS_05930:c.798G>C	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	<i>nuoC</i>
34	LOCUS_31900:p.Val772Gly	LOCUS_31900:c.2315T>G	outer membrane autotransporter barrel domain-containing protein	
35	LOCUS_15430:p.Gly757Glu	LOCUS_15430:c.2270G>A	enterobactin synthase subunit F	<i>entF</i>
36	LOCUS_15480:p.Phe140Ile	LOCUS_15480:c.418T>A	membrane protein	<i>sitD</i>
37	LOCUS_15490:p.Met143Val	LOCUS_15490:c.427A>G	membrane protein	<i>sitC</i>
38	LOCUS_09590:p.Thr167Ala	LOCUS_09590:c.499A>G	thiol:disulfide interchange protein DsbG	
39	LOCUS_01380:p.Leu541Pro	LOCUS_01380:c.1622T>C	sensor domain-containing phosphodiesterase	
40	LOCUS_13490:p.Ala281Val	LOCUS_13490:c.842C>T	membrane protein	
41	LOCUS_10780:p.Cys59Arg	LOCUS_10780:c.175T>C	TyrR family transcriptional regulator	
42	LOCUS_32260:p.Glu10fs	LOCUS_32260:c.27_28del	hypothetical protein	
43	LOCUS_13270:p.Ala326fs	LOCUS_13270:c.973_974dup	hypothetical protein	
44	LOCUS_24230:p.Gly319_Ala321del	LOCUS_24230:c.956_964del	3-isopropylmalate dehydrogenase	<i>leuB</i>
45	LOCUS_31220:p.Gly649fs	LOCUS_31220:c.1944_1945dup	Lon protease	<i>lon</i>

2) 個別課題名：家畜および食肉由来コリスチン耐性腸内細菌科細菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の性状解析（研究担当者：田村豊、臼井優（所属機関名：酪農学園大学））

研究内容・方法

本課題では、家畜および食肉由来プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の性状を明らかにするとともに、各種腸内細菌科細菌および多剤耐性グラム陰性菌（緑膿菌およびアシネトバクター属菌）への大腸菌からのプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の伝達性状を確認した。具体的には、*mcr-1*保有株を用いて、ブロスメイティング法もしくはフィルターメイティング法による接合伝達試験を実施した。ドナーとして2012年に分離された下痢症の豚由来プラスミド性コリスチン耐性遺伝子*mcr-1*保有大腸菌3株、レシピエントとして腸内細菌科細菌10株（レシピエントとして利用可能な腸内細菌科細菌として犬由来*Klebsiella pneumoniae*:5株、*Enterobacter cloacae*:5株）を用いた。多剤耐性グラム陰性菌への*mcr-1*伝達性を確認するためには、ドナーとして上記の3株を含む2012年に分離された下痢症の豚由来*mcr-1*保有大腸菌7株、レシピエントとしてヒト臨床由来多剤耐性緑膿菌10株と*Acinetobacter baumannii*2株を用いた。接合伝達試験により得られた接合伝達体に対しては、コリスチンおよびその他の抗菌薬に対する薬剤感受性試験をCLSIの方法に準じて実施した。

また、コリスチンは人の臨床において他の薬剤と併用されることが多く、相乗効果が認められるとされている。しかし、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子がコリスチンの相乗効果へ与える影響は不明である。そこで、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子がコリスチンの相乗効果へ及ぼす影響を明らかにするため、人工合成したプラスミド性コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*から5）を実験室内大腸菌(*E. coli* MG1655)に導入し、コリスチン2mg/L存在下における薬剤(臨床、コリスチンと併用されることの多い以下の5薬剤：アズトレオナム、セフトジジム、シプロフロキサシン、リファンピシン、メロペネム)の感受性について調べた。

結果と考察

大腸菌から腸内細菌科細菌（*K. pneumoniae*、*E. cloacae*）への*mcr-1*の接合伝達については、ブロスメイティング法により30の組み合わせのうち3組(10%)で伝達が認められた。これら3組から得られた接合伝達体のコリスチンに対するMIC値はレシピエントと比較して上昇したが（表13）、他の抗菌薬に対するMIC値は変化しなかった。

一方、多剤耐性グラム陰性菌（緑膿菌、*A. baumannii*）をレシピエントとした接合伝達試験においては、ブロスメイティング法とフィルターメイティング法のいずれにおいても接合伝達体は確認されなかった。このことは、緑膿菌や*A. baumannii*へは大腸菌からプラスミド性コリスチン耐性遺伝子が伝達しない、または伝達したとしても低率であることを示唆した。

相乗効果への影響試験については、*mcr*遺伝子を保有することにより、リファンピシンを除く4薬剤ではコリスチン2mg/Lと併用した際の相乗効果が抑制された（図6）。特に*mcr-3*及び*mcr-5*保有は、他の*mcr*遺伝子保有と比べて相乗効果の抑制が顕著に認められた。一方、リファンピシンについては、*mcr-1*、2、4遺伝子を保有したとしても、コリスチ

ンの影響によるMIC値の低下の程度が大きく、強い相乗効果が認められた（図6）。以上のことから、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子はコリスチンの相乗作用を減弱させることが示唆されたが、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子を保有する株に対してもコリスチンとリファンピシンの併用は有効である可能性が示された。

表13. 腸内細菌科細菌に*mcr-1*保有プラスミドが伝達した株のコリスチンに対する感受性

ドナー	レシピエント	接合伝達株 (コリスチン MIC値 (μg/mL))	
		En20 (1)	4
<i>E. coli</i>	No.20 (≥16)	<i>E. cloacae</i>	En20 (1)
	No. 193 (8)	<i>K. pneumoniae</i>	KI19 (1)
	No. 193 (8)	KI59 (1)	4

※Q内は微量液体希釈法によるコリスチンに対するMIC値 (mg/L)を示す。

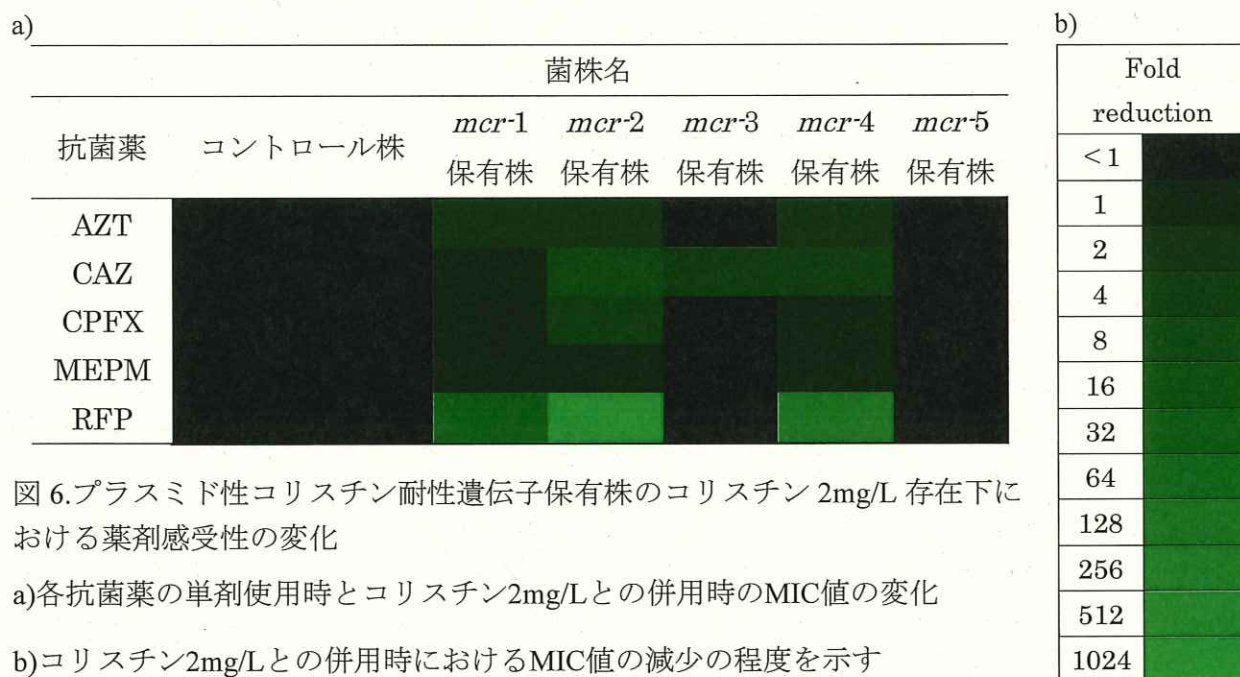


図 6. プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有株のコリスチン 2mg/L 存在下における薬剤感受性の変化

a) 各抗菌薬の単剤使用時とコリスチン 2mg/L との併用時の MIC 値の変化

b) コリスチン 2mg/L との併用時における MIC 値の減少の程度を示す

AZT, アズトレオナム ; CAZ, セフトアジジム ; CPFX, シプロフロキサシン ; MEPM, メロペネム ; RFP, リファンピシン

3) 個別課題名：プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の薬剤感受性に及ぼす影響（研究担当者：田村豊、臼井優（所属機関名：酪農学園大学））

研究内容・方法

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子および染色体変異がコリスチンの感受性に及ぼす影響を明らかにすることを目的として試験を行った。

異なる*mcr*遺伝子を保有する野外分離株をドナーとして、レシピエントとして、実験室内大腸菌株に加えて野外臨床分離大腸菌および染色体性コリスチン耐性の大腸菌株を用いて、ブロスメイティング法もしくはフィルターメイティング法により接合伝達試験を実施した。つまり、ドナー菌株として、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子（*mcr*）保有大腸菌82株（*mcr*-1:34株、*mcr*-3:13株、*mcr*-5:30株、*mcr*-1, -5:4株、*mcr*-1, -3, -5:1株）（全て2012年に下痢症の豚から分離された大腸菌）を用い、レシピエント菌株としてリファンピシン耐性実験室系統大腸菌株（ML4909）及びヒト臨床由来大腸菌2株（SRE54、SME108）、ヒト臨床由来大腸菌株を用いて作出した染色体性コリスチン耐性大腸菌2株（SRE54CL8、SME108CL8）を用いた。SRE54CL8、SME108CL8はそれぞれ親株と比較し染色体上の遺伝子である*pmrB*（T156M(ACG→ATG)）、*pmrA*（G53R(GGG→AGG)）に変異が認められる。

*mcr*遺伝子および染色体変異のコリスチン感受性への影響を明らかにするため、接合伝達体について、コリスチンに対する薬剤感受性をCLSIの方法に準拠し実施した。また、これらの菌株について他の複数の種類の薬剤に対する薬剤感受性を微量液体希釈法により決定した。

結果と考察

*mcr*保有大腸菌82株のうち35株（*mcr*-1:24株、*mcr*-3:1株、*mcr*-5:5株、*mcr*-1, -5:4株、*mcr*-1, -3, -5:1株）から実験室内大腸菌であるML4909へ*mcr*保有プラスミドの伝達が認められた（42.7%）。接合伝達体のコリスチンに対するMIC値は、伝達した*mcr*遺伝子の型によって違いが認められ（表14）、*mcr*-1は*mcr*-3及び5に比べて、コリスチンの感受性を低下させた。また、*mcr*-1と*mcr*-5単一保有プラスミドが伝達した接合伝達体では、コリスチン耐性のみが伝達した。*mcr*-1, -5保有株と*mcr*-1, -3, -5保有株をドナーとした接合伝達体では、*mcr*-1及び*mcr*-5の両遺伝子の伝達が認められ（*mcr*-3は伝達せず）、Strain No. 291を由来とする接合伝達体を除き、コリスチン耐性のみが伝達した。Strain No. 291をドナーとした接合伝達体は、コリスチン耐性の他にアンピシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、トリメトプリム耐性が伝達した（表15）。*mcr*-3保有プラスミドが伝達した接合伝達株（Strain No. 261）では、コリスチン耐性の他にアンピシリン、セファゾリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、トリメトプリム耐性が伝達した（表15）。また、ヒト由来染色体性コリスチン耐性大腸菌株へ*mcr*-1遺伝子を伝達させたところ、親株と比較してコリスチンに対するMIC値が上昇した。染色体性耐性機構とプラスミド性耐性機構はコリスチンに対する感受性に関して相乗または相加効果があることが認められた（表16）。

表14. *mcr*保有プラスミド接合伝達体のコリスチンに対する感受性

	接合伝達体					レシピエント
	<i>mcr-1</i> (<i>n</i> =24)	<i>mcr-3</i> (<i>n</i> =1)	<i>mcr-5</i> (<i>n</i> =5)	<i>mcr-1, -5</i> (<i>n</i> =4)	<i>mcr-1, -3, -5</i> (<i>n</i> =1)	ML4909
コリスチン	8 or 16	4	2 or 4	8	8	1
MIC 値 (mg/L)	(8)	(4)	(2 or 4)	(4 or 8)	(8)	(0.5)

※ コリスチンに対するMIC値;寒天平板希釈(微量液体希釈)

表15. コリスチン以外の薬剤に対する感受性の変化が認められた*mcr-1, -5*及び*mcr-3*保有プラスミド伝達体の薬剤感受性

供試薬剤	MIC (mg/L)				
	Strain No. 291 (<i>mcr-1, -5</i>)		Strain No. 261 (<i>mcr-3</i>)		ML4909
	ドナー	接合伝達体	ドナー	接合伝達体	レシピエント
コリスチン	16 (4)	8 (8)	2 (4)	4 (4)	1 (0.5)
アンピシリン	>128	>128	>128	>128	≤1
セファゾリン	32	1	32	8	≤1
セフトキシム	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
ストレプトマイシン	>128	64	>128	>128	4
ゲンタマイシン	≤0.5	≤0.5	≤0.5	1	≤0.5
カナマイシン	8	4	>128	>128	2
テトラサイクリン	>16	2	>16	1	1
ナリジクス酸	>32	8	4	8	4
シプロフロキサシン	0.5	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03
クロラムフェニコール	>32	32	8	4	4
トリメトプリム	>16	>16	>16	>16	0.5

※ コリスチンに対するMIC値;寒天平板希釈(微量液体希釈)

表16. *mcr-1*保有プラスミドが伝達した伝達体のコリスチンに対する感受性

レシピエント株	コリスチン MIC 値 (mg/L)	
	レシピエント	接合伝達体
ML4909	1 (0.5)	8 or 16 (8)
SRE54	1 (0.5)	16 (16)
SRE54CL8	16 (16)	64 (>16)
SME108	1 (0.5)	8 (8)
SME108CL8	8 (8)	16 (16)

4) 個別課題名：多剤耐性への影響（研究担当者：川西路子、横田伸一、佐藤豊孝、浅井鉄夫、臼井優（所属機関名：動物医薬品検査所、札幌医科大学、岐阜大学、酪農学園大学））

研究内容・方法

コリスチン耐性菌が多剤耐性であれば治療がさらに困難となることから、コリスチン耐性菌の多剤耐性性状を明らかにし、多剤耐性の共伝達の可能性について検討を行った。具体的には、ヒト、食肉、家畜から分離された*mcr*遺伝子保有細菌について、耐性型、Inc型、プラスミド長の性状について次世代シーケンス解析を含む方法で解析を行った。

研究結果

コリスチン耐性である病畜由来サルモネラ属菌（26株；動物医薬品検査所より）、家畜由来大腸菌（80株；酪農学園大学より）、ハエ由来大腸菌（1株；酪農学園大学より）、食肉由来菌（12株：岐阜大学より）、ヒト由来大腸菌（1株；札幌医大より）について、次世代シーケンサーによるプラスミドの全長解析を行った（表17）。

次世代シーケンス解析の結果、市販鶏肉由来の*Aeromonas* spp.を除いて、プラスミド上に*mcr*遺伝子が存在することが確認された。市販鶏肉由来*Aeromonas* spp.は、染色体上に*mcr3.3*を保有していた。

いずれの由来株においても、*mcr-1*保有細菌について、他の薬剤に対しても耐性を示す株は存在したが、*mcr-1*保有プラスミドと同一のプラスミド上に他の耐性遺伝子を保有するものは認められず、全てレプリコン型はIncI2であった。*mcr-1*保有プラスミドのプラスミド長については、鶏肉由来の2株（Strain No. 21および230）を除いて全て約60kbpであった。約60kbpのIncIの*mcr-1*保有プラスミドの性質は、世界的に拡散している*mcr-1*保有プラスミドと同一であり、日本の家畜、食肉、人医療でも同様のプラスミドが広がっていることが示された。一方、*mcr-3*および*mcr-5*保有プラスミドは同一のプラスミド上に、*bla*_{TEM-1B}をはじめとする他の耐性遺伝子が存在しており、複数のInc型およびプラスミド長を示した。

以上の結果より、日本で分布が認められた*mcr-1*保有プラスミドは、共選択による多剤耐性の可能性が低いことが示唆された。一方、*mcr-5*保有プラスミドは、個別課題3では、コリスチン耐性のみを他の菌へ伝達したが、次世代シーケンス解析の結果より、*mcr-3*保有プラスミドと同様に同一のプラスミド上に他の耐性遺伝子を保有することがあり、*mcr-3*及び*mcr-5*保有プラスミドは、多剤耐性に関わる可能性が示唆された。*mcr-1*保有プラスミドは、コリスチンに対する感受性への影響が他の*mcr*遺伝子比べて高く（個別課題3より）、今回の研究課題でも全ての由来で認められ、海外においても最も拡散している*mcr*であるが、日本においては飼料添加物としてのコリスチンが2018年7月から使用禁止とされており、今後の分布状況がどのようになるかについての注視が必要である。

由来	Strain No.	菌種	血清型	mcr遺伝子	耐性型	Inc	mcr遺伝子保有プラスミド表(kbp)	他のR gene (mcr 保有プラスミドにおける他のR gene)
家畜	001	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	006	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	011	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-NA-CPFX-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	020	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	021	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CP	N	NT	NT
	028	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-NA-CP	NT	NT	NT
	041	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-KM-CP-TMP	IncFII	NT	NT
	046	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-KM-CP-TMP	NT	NT	NT
	051	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-KM-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	060	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-KM-TC-CP-TMP	IncFII	NT	NT
	092	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1 and 5</i>	CL-TC-NA-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	100	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1 and 5</i>	CL-TC-NA-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	101	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1 and 5</i>	CL-TC-NA-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	107	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-3</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	111	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-CP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	116	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-TC-NA-CPFX-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
130RGU		<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-3</i>	CL-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	136	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL	IncFII	NT	<i>mer-5</i>
	141	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL	IncFII	NT	<i>mer-5</i>
	146	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL	NT	NT	NT
	157	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-TMP	NT	NT	NT
	161	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-TMP	X4	NT	NT
	181	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1 and 5</i>	CL-KM-TC-CP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	188	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-TC-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	193	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	198	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-TC-NA-CP-TMP	Col440I	NT	NT
	201	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-TC-CP-TMP	IncFII	NT	<i>mer-5</i>
	207	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-TC-CP-TMP	IncFII	NT	<i>mer-5</i>
	212	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	221	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	226	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	231	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	236	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	256	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-3</i>	CL-ABPC-KM-TC-TMP	NT	NT	NT
	261	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-3</i>	CL-ABPC-CEZ-KM-TC-TMP	NT	NT	<i>mer-3, bla_{SM}</i>
	271	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-TMP	NT	NT	NT
	276	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA	NT	NT	NT
	281	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-5</i>	CL-ABPC-CEZ-KM-TC-NA	NT	NT	NT
	289	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-NA-TMP	NT	NT	NT
	291	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1 and 5</i>	CL-ABPC-TC-NA-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1, aadA2, cmIA1, dfrA12(mcr-5)</i>
	304	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	306	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	332	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-TC-NA-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>
	338	<i>Escherichia coli</i>		<i>mer-1</i>	CL-ABPC-CEZ-TC-NA-CPFX-CP-TMP	IncI2	60	<i>mer-1</i>

由来	Strain No.	菌株	血清型	mcr遺伝子	耐性型	Inc	mcr遺伝子保有プラスミド長(kbp)	他のR gene (mcr 保有Plasmidにおける他のR gene)
家畜	349	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-CTX-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	351	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-GM-KM-TC-NA-CPFX	IncI2	60	mcr-1
	355	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-GM-KM-TC-NA-CPFX	IncI2	60	mcr-1
	361	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-ABPC-GM-KM-TC-TMP	NT	NT	NT
	365	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-ABPC-KM-TC-TMP	NT	NT	NT
	371	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-TMP	NT	NT	NT
	416	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL	IncI2	60	mcr-1
	421	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-ABPC-CEZ-CTX-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	427	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-ABPC-CEZ-CTX-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	431	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-ABPC-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	441	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL	NT	NT	NT
	451	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
	458	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-ABPC-CEZ-KM-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	467	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-GM-KM-TC-NA-CPFX	NT	NT	NT
	476	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-GM-KM-TC	NT	NT	NT
	482	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-ABPC-KM-TC-NA-CPFX-CP	NT	NT	mcr-5, catA1
	486	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-ABPC-CEZ-KM-TC-NA-CPFX-CP	NT	NT	mcr-5, catA1
	491	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-ABPC-CEZ-KM-TC-NA-CP	NT	NT	mcr-5, catA1, blaTEM1-B
	507	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-TC-TMP	IncI2	60	mcr-1
	511	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-CTX-TC	IncI2	60	mcr-1
	516	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-TC	IncI2	60	mcr-1
	521	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-TC-TMP	IncI2	60	mcr-1
	531	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-ABPC-TC-CP-TMP	IncFII	NT	NT
	556	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	563	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL	NT	NT	mcr-5
	568	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-KM-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	571	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	576	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-NA-CP-TMP	NT	NT	NT
	581	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	586	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-TC-CP-TMP	IncI2	60	mcr-1
	591	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-TC-CP-TMP	IncI2	60	mcr-1
	596	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-TC-CP-TMP	IncI2	60	mcr-1
	D11A	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-ABPC-CEZ-KM-CP-TMP	NT	NT	NT
	D201	<i>Escherichia coli</i>		mcr-5	CL-CP-TMP	Col44011	NT	NT
	D205B	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-TC-CP-TMP	NT	NT	NT
	D7B	<i>Escherichia coli</i>		mcr-3	CL-ABPC-CEZ-GM-KM-TC-NA-CPFX-CP-TMP	NT	NT	NT
ハエ	D38B	<i>Escherichia coli</i>		mcr-1	CL-ABPC-CEZ-TC-NA-CPFX-CP-TMP	IncI2	60	mcr-1

NT, not tested.

5) 個別課題名：家畜および食肉由来コリスチン耐性大腸菌の遺伝子型の検討（研究担当者：臼井優（所属機関名：酪農学園大学））

研究内容・方法

動物あるいは人から分離される大腸菌の遺伝子型は特徴があることが知られている。そこで動物から分離されたプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr*) 保有コリスチン耐性大腸菌について分子疫学的解析を行い、動物由来株のヒトへの伝播の可能性について検討した。

2008-2013年に家畜及び畜舎周辺で捕獲したハエから分離された*mcr*保有大腸菌82株を供試した（表18）。その内、52株（*mcr-1*:34株、*mcr-3*:13株、*mcr-1*, -5:4株、*mcr-1*, -3, -5:1株）について、MLST（Multilocus sequence typing）型の決定と、PFGE（Pulsed-Field Gel Electrophoresis）による型別を行った。また、*mcr-1*保有プラスミド解析のため、S-1 nuclease PFGE後、Southern blottingを行った。この個別課題では、特に拡散が懸念される*mcr-1*保有大腸菌及び*mcr-1*と異なる特徴を持つことが予想される*mcr-3*に注目して試験を実施した。

結果と考察

家畜及びハエ由来*mcr*保有大腸菌52株は26のST型に分類された。その内11のST型（7404-7412、7433、7542）は本研究で新たに登録されたものであった（図7）。今回、認められたST型のなかで、ST101は、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株としてヒト医療現場から分離され、世界的な拡散が報告されている。また、*mcr-1*を保有するST10はスイスでインド旅行から帰国した旅行者からの分離報告がなされている。これらのST型が*mcr*遺伝子を保有することは臨床上的リスクとして高いことが示唆された。

PFGE型は同一農場内の菌株間において高い相同性 (>80%) を示す場合と、同一農場内の菌株間において異なるPFGE型を示す場合があった。また、異なる農場間の菌株においては異なるPFGE型を示した。このことは、同一農場内で一部の*mcr*保有株がクローナルに広がっていたが、農場間伝播などは起こっておらず、*mcr*遺伝子がプラスミドとして拡散していることを示唆した。

S1-PFGE解析およびSouthern blottingの結果より、今回の解析に用いた*mcr-1*保有プラスミドは約60kbpのIncI2 typeであり、世界的に拡散が見られる*mcr-1*保有プラスミドと類似していた。また、*mcr*保有株については、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。この結果については、他の由来の*mcr*保有菌の結果と合わせて4) の個別課題に記載した。

表18. 供試*mcr*保有大腸菌株

保有 <i>mcr</i> 遺伝子	由来（分離年）			
	下痢症豚 (2012)	健康牛 (2010, 2013)	健康豚 (2013)	ハエ (2010)
<i>mcr-1</i> (34株)	31	1	1	1
<i>mcr-3</i> (13株)	10	1	0	2
<i>mcr-5</i> (30株)	29	0	0	1
<i>mcr-1</i> , -5 (4株)	4	0	0	0
<i>mcr-1</i> -, -3, -5 (1株)	1	0	0	0

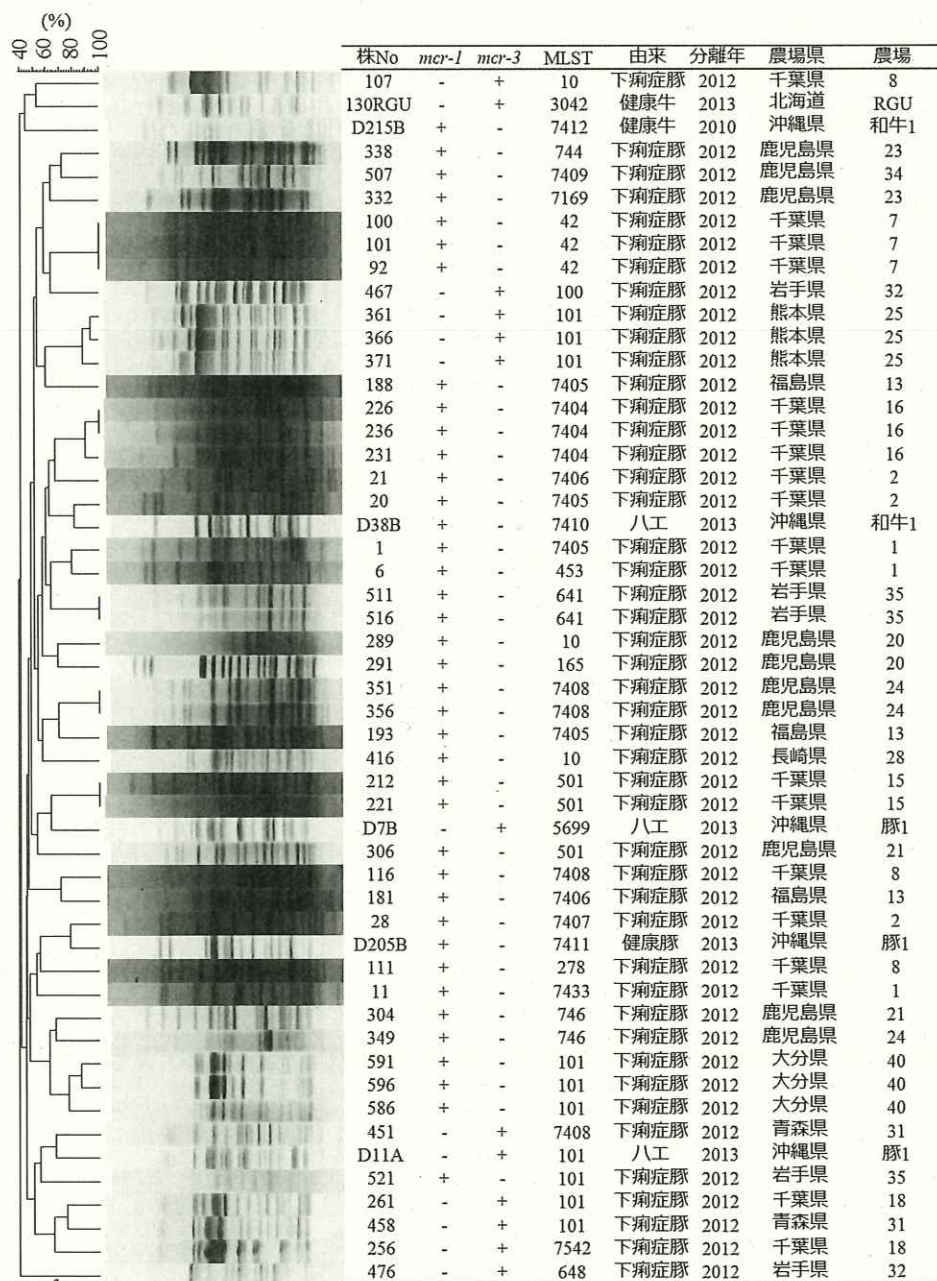


図7. 複数場所、検体由来*mcr*保有大腸菌株のMLSTおよびPFGEによる型別

(4) 研究項目名：コリスチン耐性菌感染におけるコリスチンの有効性

1) 個別課題名：コリスチン耐性菌のマウスにおける定着性（研究担当者：横田伸一、佐藤豊孝（所属機関名：札幌医科大学））

研究内容・方法

コリスチン耐性を獲得することによる増殖性や定着性への影響を調べるために、コリスチン耐性菌の試験管内・生体内(マウス全身感染モデル)での増殖性・定着性を評価した。コリスチン耐性菌の定着性については、コリスチン感受性菌をマウスに混合感染させることにより検討した。本課題では、上記の研究項目(コリスチン耐性菌の特性解析に関する研究)からプラスミド性や染色体性のコリスチン耐性機構が認められた大腸菌(図2および表10およびその変異株(表19)を用いて評価を行った。

表19. 染色体性またはプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の導入株および欠損株

菌株/変異株名	特徴	コリスチン MIC (mg/L)
SME98	コントロール株(人の臨床検体由来コリスチン感受性 O25b-H4:ST131株)	0.5
<染色体性コリスチン耐性変異株>		
SME98PORTpmrB34	SME98に SRE34と同様な <i>pmrB</i> 変異 ($\Delta 27-45_LISVFWLWHESTEQIQLFE$)を導入した株	16
SME98PORTpmrA105	SME98に SRE44と同様な <i>pmrA</i> 変異(L105P)を導入した株	16
SME98PORTpmrB206	SME98に SME222/SME296と同様な <i>pmrB</i> 変異(G206D)を導入した株	8
<プラスミド性コリスチン耐性変異株>		
SME98EC92	SME98に <i>mcr-1</i> 保有 plasmid を導入した株	8
SME98EC92 $\Delta mcr-1$	SME98EC92から <i>mcr-1</i> のみを欠損させた株	0.5
SME98B27	SME98に <i>mcr-3</i> 保有 plasmid を導入した株	8
SME98B27 $\Delta mcr-3$	SME98B27導入株から <i>mcr-3</i> のみを欠損させた株	0.5
SME98EC181	SME98に <i>mcr-5</i> 保有 plasmid を導入した株	8
SME98EC181 $\Delta mcr-5$	SME98EC181から <i>mcr-5</i> のみを欠損させた株	0.5

結果と考察

<in vitroにおけるコリスチン耐性変異株の増殖性・定着性の評価>

染色体性コリスチン耐性大腸菌4株(SRE34, SRE44, SME222, SME296)の増殖性を単独培養法で調べたところ、これら全てのコリスチン耐性株はコリスチン感受性株のSME98よりも弱い増殖性を示した(図8A)。しかし、コリスチン耐性株と同様な遺伝子変異をSME98に導入した変異株(表19)においては、増殖性に変化は認められなかった(図8B)。コリスチン耐性付与による大腸菌の定着性への影響を評価するため、試験管内でSME98RIF(SME98にリ

ファンピシン耐性を付与した株)との競合培養(SME98RIFと被験株を1:1になるように調整した液体培地で培養)を行った。その結果、3株の染色体性コリスチン耐性株(SRE34, SRE44, SME222)はSME98RIFよりも優位となり、SME296ではSME98RIFよりも劣勢であった。

*pmrAB*導入変異株においては、PmrAにL105Pのアミノ酸置換が導入された株(SME98PORTpmrA105)はSME98RIFより劣勢となったが、その他の*pmrAB*導入変異株

(SME98PORTpmrB34およびSME98PORTpmrB206)ではSME98RIFと同等の菌数となった(図8C)。以上の結果より、染色体性コリスチン耐性の獲得による*in vitro*での定着性への影響は、PmrAの変異は影響を与えるが、PmrBの変異は影響を与えないことが示唆された。また臨床分離コリスチン耐性株の優位(SRE34, SRE44, SRE222)または劣勢(SME296)な定着性は、*pmrAB*の変異以外の要因が関与していると考えられた。

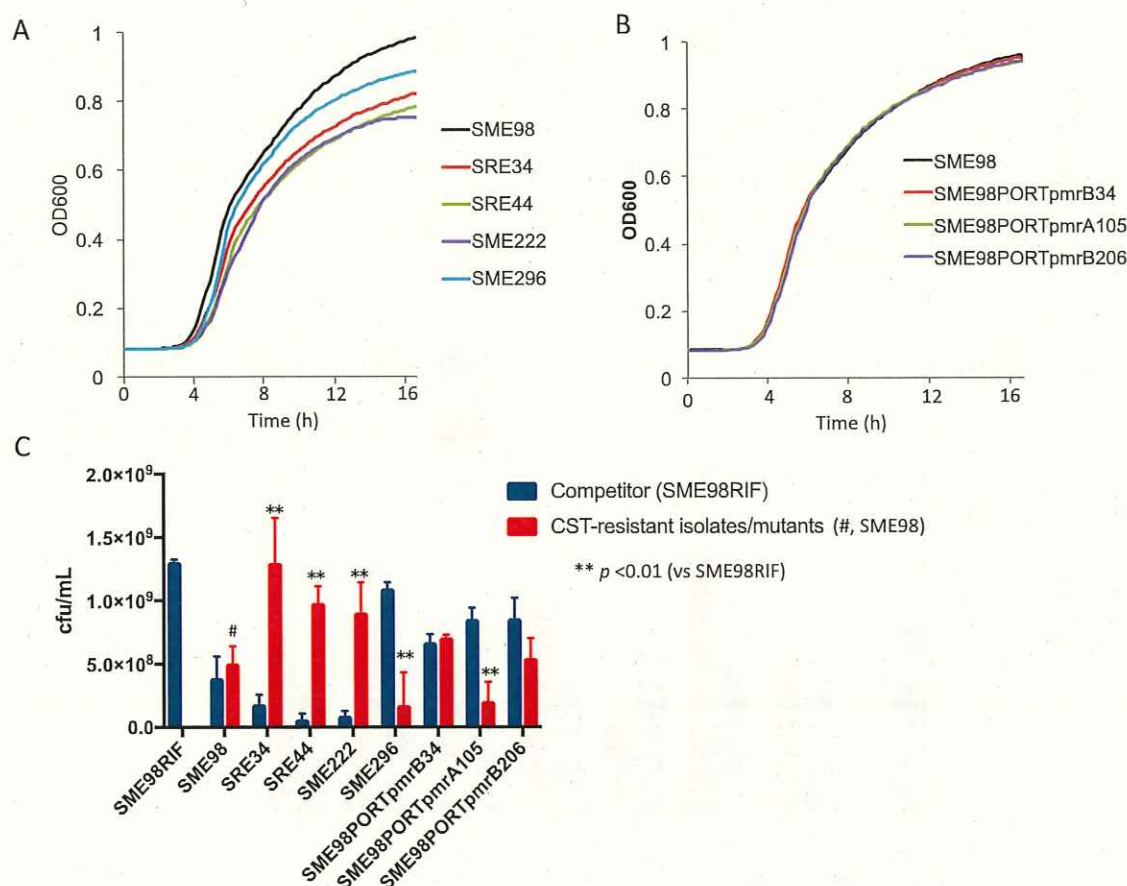


図8. *in vitro*におけるコリスチン耐性株の増殖性・定着性の評価

プラスミド性コリスチン耐性変異株の増殖性を単独培養法で調べたところ、*mcr-1*または *mcr-3*保有プラスミド導入株(SME98EC92または SME98B27)の増殖性は SME98に比較し低くなった(図9)。この増殖性の低下は *mcr-1*または *mcr-3*欠損株(SME98EC92 Δ *mcr-1*または SME98B27 Δ *mcr-3*)でも同様であったことから、増殖能の低下は *mcr-1*または *mcr-3*自体の獲得ではなく、*mcr-1*または *mcr-3*保有プラスミドの獲得による影響であると考えら

れた(図9)。 *mcr-5*保有プラスミド導入株(SME98EC181)または *mcr-5*欠損株(SME98EC181 Δ *mcr-5*)では SME98に比較し増殖性の変化は認められなかったことから、*in vitro*での *mcr-5*保有プラスミドの獲得による菌の増殖性への影響はないことが示唆された。

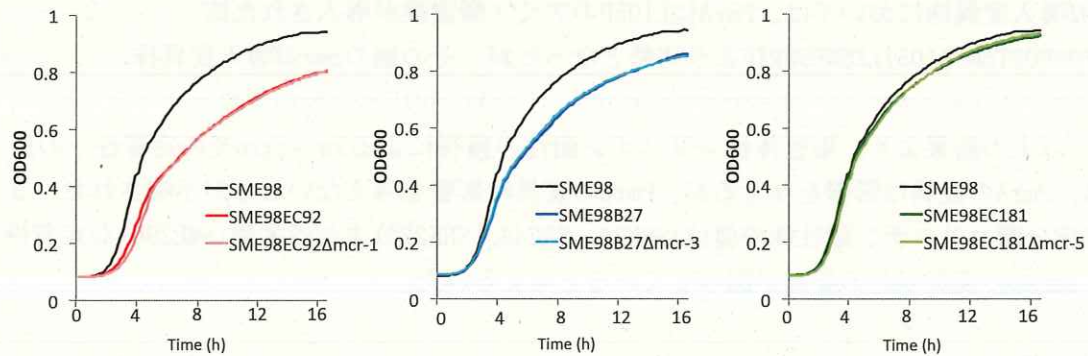


図 9. プラスミド性コリスチン耐性変異株の増殖性の評価

試験管内でのプラスミド性コリスチン耐性変異株と SME98RIF (SME98 にリファンピシン耐性を付与した株)との競合培養を行った結果、どの変異株においても SME98RIF と同程度の増殖性を示した(図 10)。以上の結果より、プラスミド性コリスチン耐性の獲得による *in vitro*での定着性への影響はないことが示唆された。

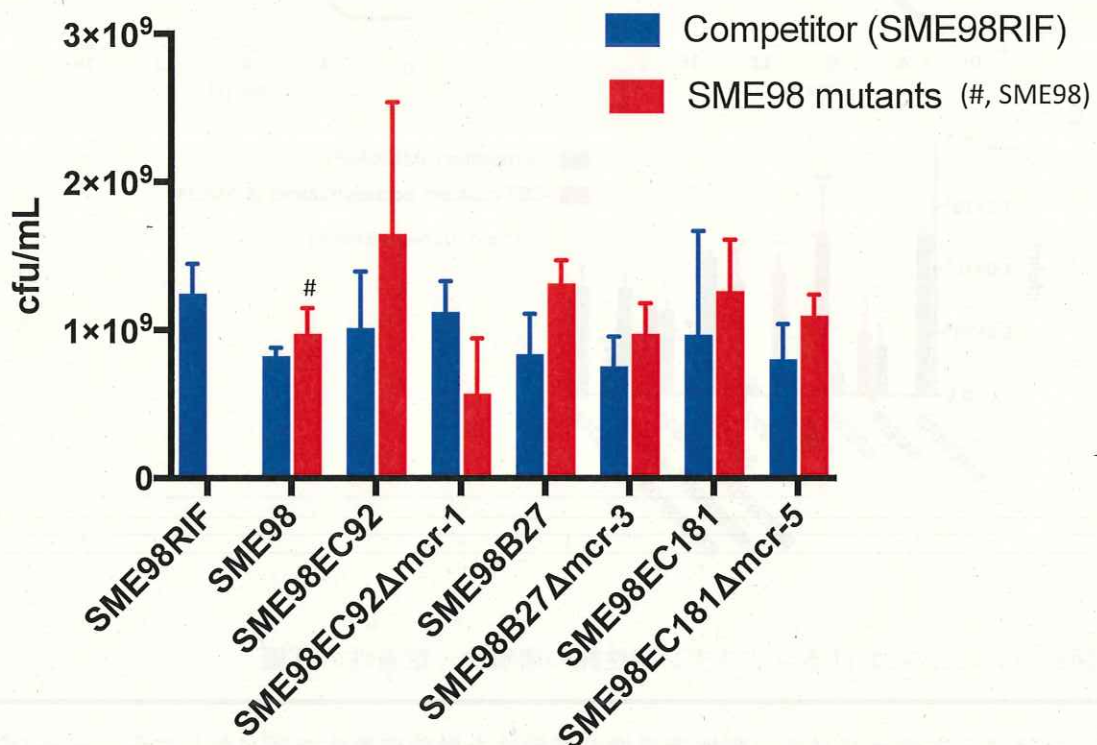


図 10. *in vitro*におけるプラスミド性コリスチン耐性変異株と SME98RIF との競合試験の結果

次に、*in vitro*における染色体性コリスチン耐性変異株およびプラスミド性コリスチン耐性変異株の血清感受性について評価した。SME98(32%血清存在下液体培地で菌の増殖を抑制)に比較し、染色体性コリスチン耐性変異株の SME98PORTpmrA105 および SME98PORTpmrB206 では 16%の血清存在下の液体培地で菌の増殖を抑制した(図 11)。プラスミド性コリスチン耐性変異株では SME98EC92 では 16%、SME98EC92 $\Delta mcr-1$ では 8%の血清存在下で菌の増殖が抑制された。また、SME98B27 および SME98B27 $\Delta mcr-3$ では 4%の血液存在下で菌の増殖が抑制された。SME98EC181 $\Delta mcr-5$ では 16%の血液存在下で菌の増殖が抑制された。以上から、一部のコリスチン耐性機構(PmrB に G206D, *mcr-1* または *mcr-3* プラスミドの獲得)は血清感受性を大きく増強することが明らかとなった。血清はヒトを含む哺乳動物の血液成分であり、血清に含まれる補体は病原菌が血液内に侵入した際に菌体外膜を破壊し、殺菌効果を示す自然免疫の役割を担う。よってこれらの血清感受性の増強をもたらすコリスチン耐性菌が宿主に感染した際、侵襲性(血液内に侵入し菌血症や敗血症などの重篤な症状を起こす性質)の低下をもたらすことが示唆された。

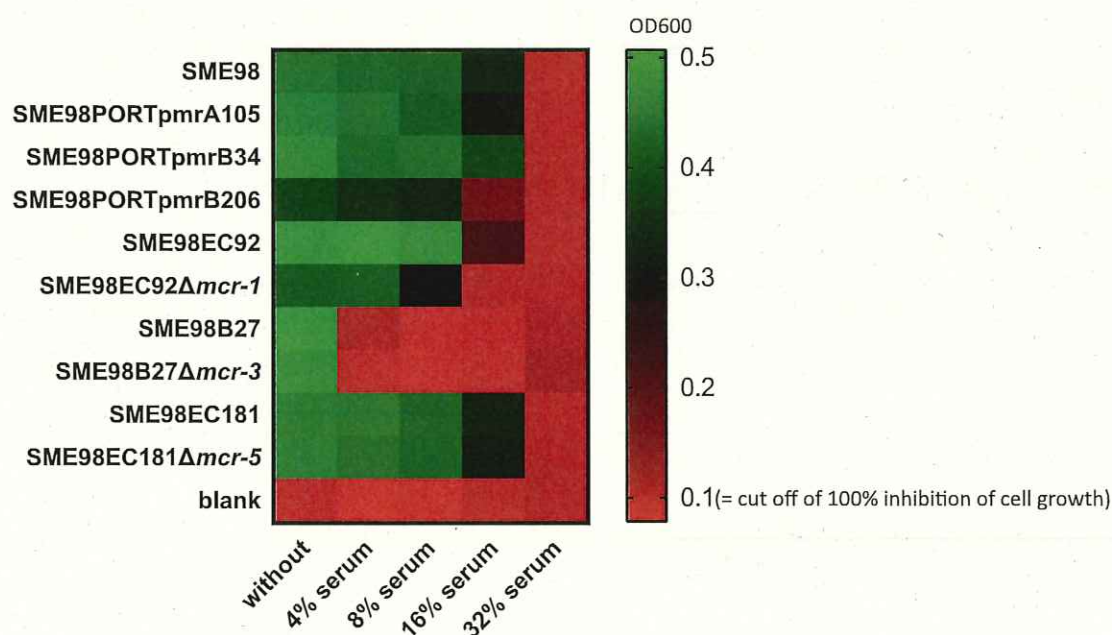


図 11. *in vitro*におけるコリスチン耐性変異株の血清感受性の評価

<マウス生体内でのコリスチン耐性変異株の増殖性・定着性の評価>

生体内でのコリスチン耐性株の定着性の評価については、マウス全身感染モデルを用いた。被験株はSME98(人の臨床検体由来コリスチン感受性O25b-H4:ST131株)をコンロートル株とした。本株をもとに作製した染色体性またはプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の導入株および欠損株を用いた(表19)。これらの変異株に対し、生体内での病原性・増殖性・定着性を評価し、コリスチン耐性の付与による生体内での影響を評価した。

最初に、マウスの全身感染モデルにおける病原性の評価を行なった。SME98 または各コリスチン耐性変異株 (2.5×10^4 cfu) を含む 2.5% ムチン懸濁液を 6 週齢 BALB/c マウス (雌) の腹腔内に接種し、感染マウスの生存を一週間観察した (各群 6 匹)。一週間後のマウス生存率の差を Long-rank test, 各測定時におけるマウス生存率の差を Gehan-Breslow-Wilcoxon test で評価した。

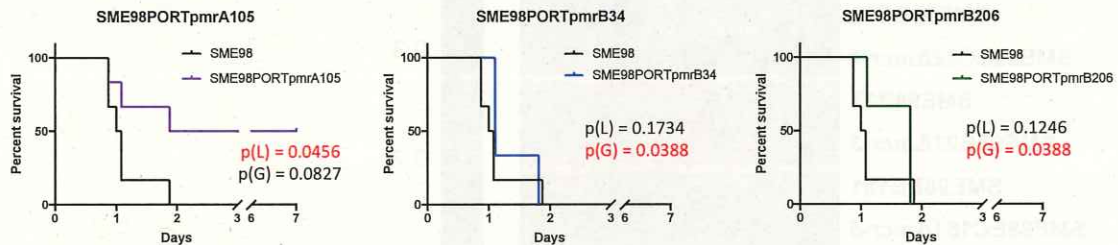
SME98 では 2 日以内に全マウスが死亡したのに比較し、染色体性コリスチン耐性変異株では、SME98PORTpmrA105 では 50% のマウスが一週間経過後も生存した [$p(L) < 0.05$]

(図 12)。SME98PORTpmrB34 および SME98PORTpmrB206 ではどちらも 2 日以内に全てのマウスが死亡したが、致死に至る時間は SME98 に比較し有意に遅くなった [$p(G) < 0.05$]。

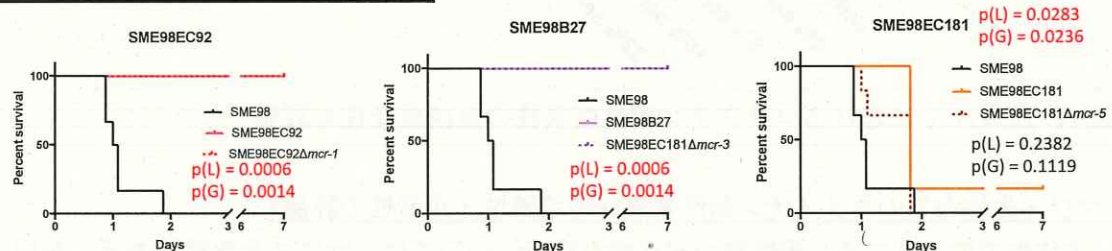
プラスミド性コリスチン耐性変異株では、SME98EC92 および SME98 $\Delta mcr-1$, SME98B27 および SME98B27 $\Delta mcr-3$ では全てのマウスが一週間経過後も生存した。SME98EC181 では 1 匹のマウスのみ一週間が経過しても生存し、SME98 との間に統計学的差が認められた。SME98EC181 $\Delta mcr-5$ では、SME98 接種時のマウス生存率との間に統計学的差は認められなかった。以上から、コリスチン耐性の獲得はマウス生体内での病原性を減弱させることが明らかとなった。特に、*pmrA* の変異、*mcr-1* 保有プラスミド、*mcr-3* 保有プラスミドの獲得は他のコリスチン耐性機構と比較し、大きく病原性の低下をもたらすことが明らかとなった。

Survival rate

Chromosomal mediated colistin resistance



Plasmid mediated colistin resistance



BALB/c, 6 week, female,
 2.5×10^4 cfu w/2.5% mucin, ip,

p(L); Long-rank (Mantel-Cox) test
 p(G); Gehan-Breslow-Wilcoxon test

図 12. マウス全身感染モデルを用いたコリスチン耐性変異株感染時のマウス生存率の評価

上記の条件において、感染後 12 時間での生菌数の比較を行なった(図 13)。腹腔内および肝臓中ともに、死亡率の低かった SME98EC92, SME98EC92 $\Delta mcr-1$, SME98B27, SME98B27 $\Delta mcr-3$ では SME98 に比較し低い生菌数であった。以上の結果から *mcr-1* および *mcr-3* 保有プラスミドの獲得は、生体内での菌の増殖に大きな影響を与え、そのことがマウスへの病原性の低下に影響していることが示唆された。また、本病原性の低下は *mcr-1* または *mcr-3* 自体の獲得ではなく、これらの耐性遺伝子が存在しているプラスミドの獲得によるものであることが考えられ、*mcr* 以外の病原性を低下する因子(遺伝子)の存在が示唆された。

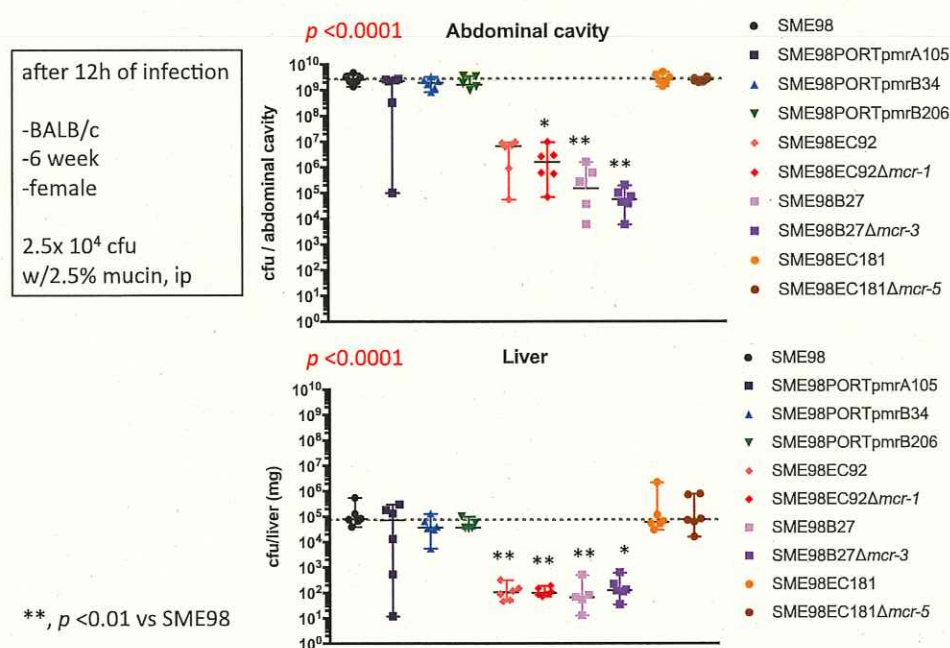


図 13. コリスチン耐性変異株感染マウスの腹腔および肝臓中における生菌数の評価

次に、マウス生体内における各コリスチン耐性変異株の定着性の評価を SME98RIF との競合試験で行なった(図 14)。本試験は SME98RIF と各コリスチン耐性変異株をそれぞれ 5×10^2 cfu で 1:1 になるように 2.5% ムチン混濁液に混合した。本混合液を 6 週齢 BALB/c マウス(雌)の腹腔内に接種し、48 時間後に各臓器(腹腔、肝臓、腎臓)を摘出し生菌数を測定した。SME98RIF と各コリスチン耐性変異株のどちらが優位に定着したかを Competition index [コリスチン耐性変異株の生菌数/SME98RIF の生菌数]を求めて評価した。染色体性コリスチン耐性変異株(SME98PORTpmrA105, SME98PORTpmrB34, SME98PORTpmrB296)、*mcr-5* 保有プラスミド導入株(SME98EC181)または *mcr-5* 欠損株(SME98EC181 $\Delta mcr-5$)での Competition index はほぼ 1(SME98RIF と同程度の定着性)を示したことから、これらのコリスチン耐性機構は生体内での定着性に影響を与えないことが明らかとなった。一方で、先の病原性の評価で病原性の顕著な低下をもたらしたコ

リスチン耐性変異株 (SME98EC92, SME98EC92 $\Delta mcr-1$, SME98B27, SME98B27 $\Delta mcr-3$) の Competition Index は肝臓や腎臓において約 0.05-0.1 (SME98RIF より低い定着性が)であった。以上のことから *mcr-1* または *mcr-3* 保有プラスミドの獲得は、マウス生体内における細菌の定着性を低下させることが明らかとなった。*mcr-1* または *mcr-3* 保有プラスミドの獲得が生菌数の低下を伴うマウスへの病原性の低下に関与していること (図 12、13) に加え、本試験の結果からも *mcr-1* または *mcr-3* 保有プラスミドの獲得はマウス生体内での菌の増殖性の低下をもたらしていることが示唆された。

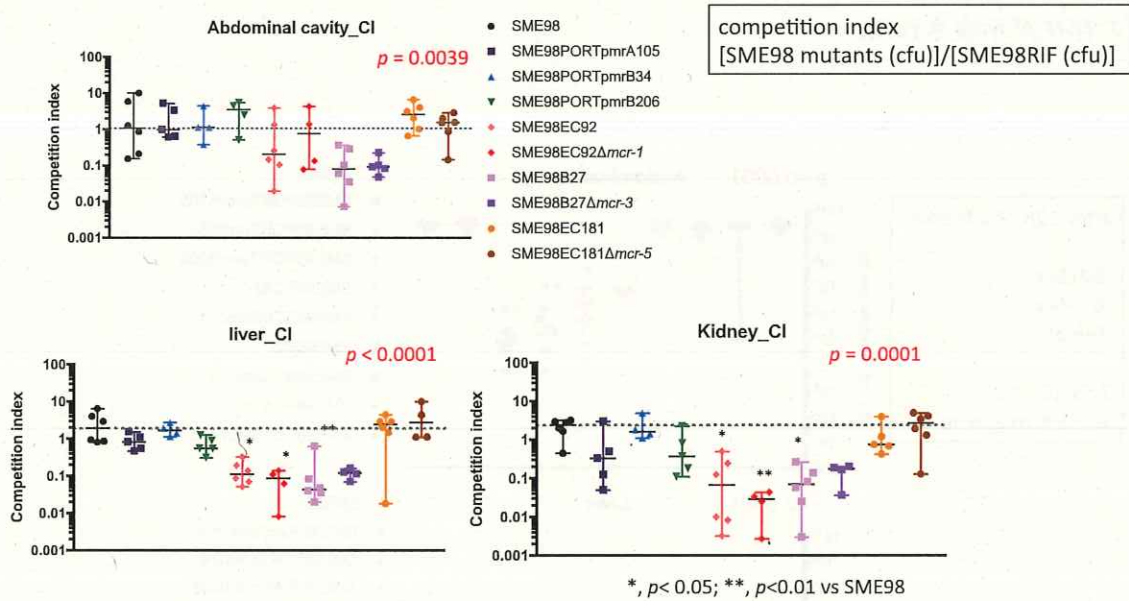


図 14. マウス生体内におけるコリスチン耐性変異株の定着性の評価

2) 個別課題名：マウスのコリスチン耐性菌感染におけるコリスチンの治療効果（研究担当者：横田伸一、佐藤豊孝（所属機関名：札幌医科大学））

研究内容・方法

コリスチン耐性大腸菌をマウスに実験感染させ、その後、コリスチンを投与することによる治療効果を明らかにすることを目的として試験を行った。本課題で使用するコリスチン耐性変異株は、研究項目(4)個別課題1)を参考に、マウスに致死をもたらさなかったコリスチン耐性変異株(SME98EC92, SME98EC92 Δ *mcr-1*, SME98B27, SME98B27 Δ *mcr-3*)を除く株を供試した(表19)。

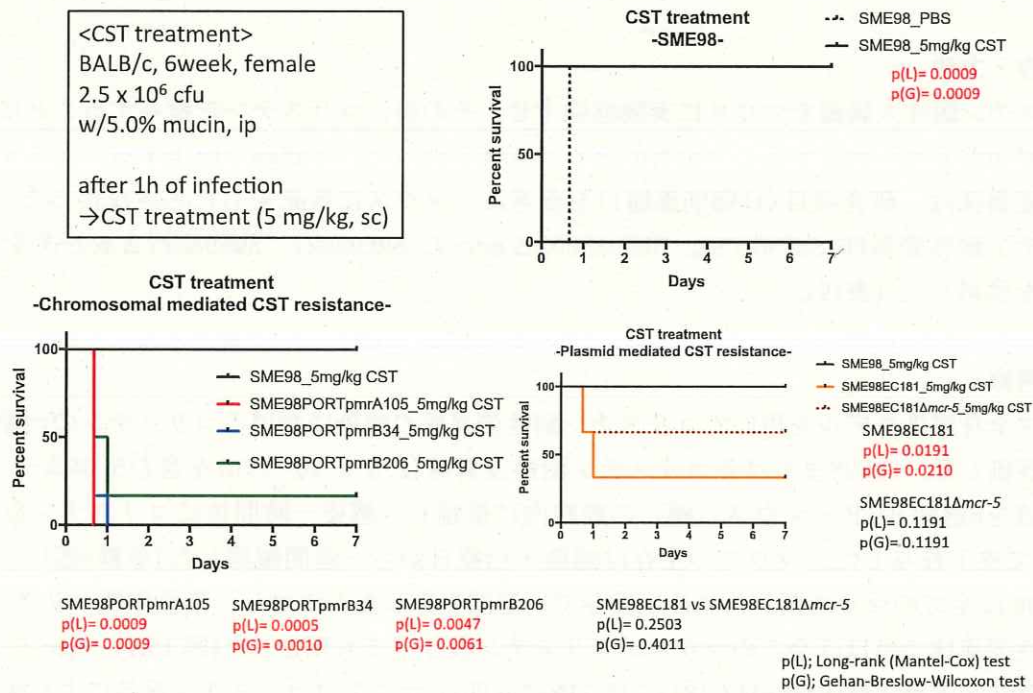
結果と考察

マウス全身感染モデルを用いてコリスチン耐性変異株の感染におけるコリスチンの治療効果を評価した。SME98または各コリスチン耐性変異株(2.5×10^6 cfu)を含む5.0%ムチン懸濁液を6週齢 BALB/c マウス(雌)の腹腔内に接種し、感染一時間後にコリスチンを5mg/kg で皮下投与した。マウスの生存は感染・治療日から一週間観察した(各群6匹)。

SME98 は全てのマウスがコリスチン投与で一週間生存したのに対し、染色体性コリスチン耐性変異株ではほぼ全てのマウスがコリスチン投与下でも死亡した(図 15A)。*mcr-5* 保有プラスミド導入株(SME98EC181)では 33%(2/6 匹)のマウスはコリスチン投与により生存した。*mcr-5* の欠損株(SME98EC181 Δ *mcr-5*)では 67%(4/6 匹)のマウスがコリスチン投与下で生存し、SME98 感染・コリスチン投与下でのマウス生存率との間に有意な差は認められなかった(図 15A)。本条件で腹腔内および肝臓中での生菌数の測定では、*mcr-5* 欠損株(SME98EC181 Δ *mcr-5*)感染マウスの肝臓で有意な生菌数の低下(SME98 感染マウスの肝臓中の生菌数と同様)が認められたが、その他のコリスチン耐性変異株ではコリスチン投与における生菌数の低下は認められなかった(図 15B)。

以上の結果より、一部のコリスチン耐性機構は感染宿主におけるコリスチン治療効果を減弱することが明らかとなった。特に染色体性コリスチン耐性機構はプラスミド性コリスチン耐性機構よりもコリスチンの治療効果の減弱に大きな影響を与えることが明らかとなった。本治療効果の減弱には感染部位(特に肝臓などの侵襲が起きた部位)における生菌数の維持(コリスチン投与ではコリスチン耐性株の殺菌効果が得られない)が関係することが考えられた。

A



B

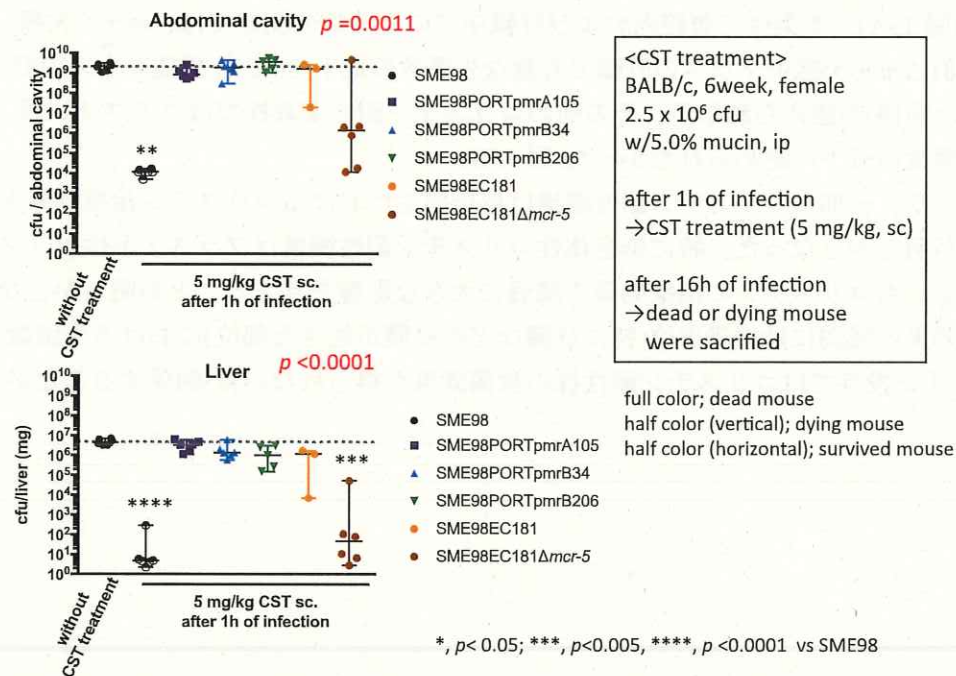


図 15. コリスチン耐性変異株感染マウスへのコリスチン治療効果の評価

(5) 研究項目名：コリスチンの定量的食品影響評価

1) 個別課題名：コリスチンの定量的食品影響評価（研究担当者：蒔田浩平（所属機関名：酪農学園大学））

研究内容・方法

近年コリスチン耐性菌について膨大なデータが公表されていることから、本課題では、これまでの公表データを精力的に収集するとともに今回の研究で得た成績を加味して定量的食品健康影響評価を試みた。

(1) 情報の収集

初年度には、European Medicine Agency (EMA), European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), DANMAP, Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System, およびCDCが2016年から2017年に掛けて公表した薬剤耐性特にコリスチンに関する記述のある報告書を収集しまとめた。この時点では本研究班が実施する定量的発生評価は公表されていなかった。また動物医薬品検査所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター、宮崎県および鹿児島県の養豚獣医師を訪問し、必要情報の収集を行った。

この関係機関における情報収集と実験班とのディスカッションを経て、さらなる公開論文情報の収集と養豚獣医師へのインタビューおよび日本豚病臨床研究会所属獣医師を主な対象としたコリスチン使用に関するリスク管理措置開始前後の2017年および2018年11-12月の二度の質問票郵送調査を実施した。

(2) リスク評価目標の設定

本リスク評価では、農場での飼料添加物として、および治療用でのコリスチン使用による*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌の発生評価を実施した。発生リスクは、全国の養豚場でのと畜場出荷直前のステージの豚における出荷豚総数に占める*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚（ $\ast 10^{5.08}$ CFU/gの状態を優勢と判断。その根拠は下記に示す）の割合とした。

わが国で確認されている*mcr-1*保有大腸菌のうち、MIC値が $2\mu\text{g/mL}$ を示す株は少なくないことが報告されている¹⁾。本リスク評価でのコリスチン耐性とは、MIC $4\mu\text{g/mL}$ 以上のMIC値を示すこととする。その根拠はEUcaastの基準値であること、また過去の豚における消化管内コリスチン濃度測定実験結果²⁾から計算した感受性菌への最低有効濃度の確認による。寺門ら²⁾は、平均体重2.5kgのgnotobiotc-豚7頭を用い、硫酸コリスチンを治療用量の40mg力価を経口投与した。結腸、直腸の最高分布は投与後16時間後に認められ、濃度はそれぞれ $162.5\mu\text{g/g}$ および $181.3\mu\text{g/g}$ であり、48時間以上まで分布が観察された。定着大腸菌の菌数減少には試験管内でのコリスチンの最小発育阻止濃度（ $1.56\mu\text{g/mL}$ ）の約30倍以上の分布量と4-10時間以上の濃度持続が必要であったと報告している。上記下部消化器官内最高濃度の30分の一は結腸、直腸で $162.5/30 = 5.42\mu\text{g/g}$ 、直腸で $181.3/30 = 6.04\mu\text{g/g}$ であり、基準値MIC $4\mu\text{g/mL}$ を若干超える値である。すなわち、治療用量のコリスチン濃度では菌数が減少したとしてもMIC $4\mu\text{g/mL}$ の大腸菌を全て殺滅することは困難であると考

えられるので、コリスチン耐性と判断するにはMIC4 μ g/mL以上の基準値は適していると考えられた。

最近になり2019年2月3日に*mcr-9*の発見³⁾が報告されたとおり、世界でこれまで*mcr-1-9*までの報告があるが、JVARMではこれまでに2006年から2015年までに収集された1315株の大腸菌について*mcr1-5*の遺伝子保有状況を調査している。このうちMIC4 μ g/mL以上のコリスチン耐性株は59株であり、このうち41株 (41/59, 69.5%) が*mcr-1-5*のうちのいずれかを保有していた。残りの30.5%については染色体性あるいは他の*mcr*による耐性であることが考えられるが、本リスク評価では*mcr-1-5*によるプラスミド性コリスチン耐性大腸菌の発生リスクを検討するので、本評価よりも多くの割合でコリスチン耐性大腸菌が優勢となっている豚は存在していることになる。

(3) リスクモデルの構築

・モデルの仮定

ソフトウェア R バージョン 3.5.1⁴⁾を用いてシミュレーションを実行するため、ソフトウェア RStudio バージョン 1.1.456 を用いてリスクモデルを作成した (図 16.17)。本モデルでは、飼料添加物が使用されていた 2017 年度において、日本の繁殖農場、一貫経営農場を代表する仮定の 1000 農場 (小規模: 母豚頭数 10-50 頭 212 農場、中規模: 母豚頭数 51-200 頭、474 農場、大規模: 母豚頭数 201-600 頭、314 農場) で同時に全ての母豚が一斉に出産し、離乳期一か月間の間に治療用コリスチン適応症である浮腫病と細菌性下痢症の発生に伴い獣医師が飼料にコリスチンを投与する。豚腸管内に MIC4 μ g/mL 以上の *mcr 1-5* 保有大腸菌がいた場合、これがコリスチン投与により選択され優勢となる。*mcr 1-5* 保有コリスチン耐性大腸菌が優勢となった豚のうちある割合はフィットネスを考慮し出荷直前にはコリスチン耐性大腸菌は優勢でなくなると仮定する。最終的に出荷直前のステージで、1000 農場で生まれた全ての豚から浮腫病により死亡した豚を除いた出荷頭数のうち、*mcr 1-5* 保有コリスチン耐性大腸菌が優勢である豚の割合をリスクとして計算する。

リスクモデルの構造： 個体ベースモデル（1000農場で飼育）

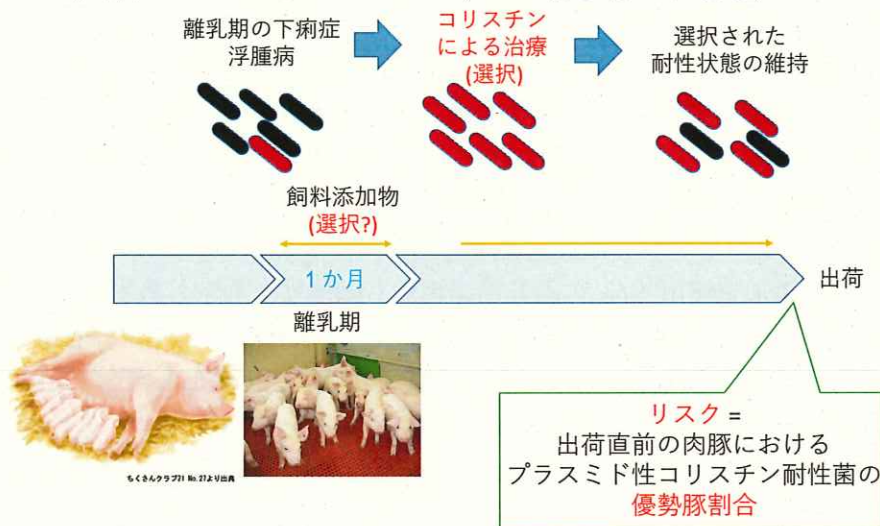


図16. モデル化する *mcr* 1-5保有コリスチン耐性大腸菌選択と腸管内の優勢維持

・仮想農場の作成と農場サイズおよびコリスチン含有飼料添加物使用状況の付与

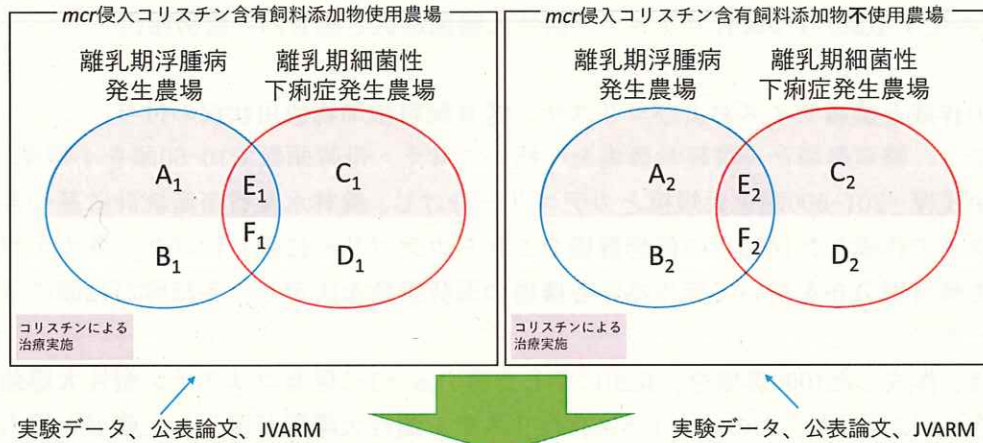
本モデルでは、繁殖農場と一貫経営農場を一括して考え、母豚頭数で10-50頭を小規模、51-200頭を中規模、201-600頭を大規模とカテゴリー分けし、農林水産省畜産統計に基づきコンピュータ上で作成した1000戸の仮想農場をこれらカテゴリーに割り付けた。各カテゴリーについて無情報分布を用いて無作為に各農場の母豚頭数を決定し、各母豚が12頭の子豚を産むとした。

モデルでは、作成した1000農場を、表20に示した真の *mcr* 1-5保有コリスチン耐性大腸菌侵入農場割合 P_{TF} に基づき、この *mcr* 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が侵入した農場と侵入していない農場に分けた。このそれぞれの農場数は二項分布（Binomial関数）を用いシミュレーションごとに決定した。飼料添加物使用農場・不使用農場の振り分けについては、リスク管理措置が取られる前の2017年度に28名の臨床獣医師に対して実施した質問票調査の回答（93%の農場で使用）をもとに、各農場サイズカテゴリーについて同等の割合で分配した。モデルの実装では *mcr* 1-5保有コリスチン大腸菌侵入農場についてのみ、3種類の農場サイズと飼料添加物使用の有無の、合計6枚のワークシートに分けてプログラミングを行った（図17、数式1）。本モデルでは、発生リスク（Risk：全国の養豚場でのと畜場出荷直前のステージの豚における出荷豚総数に占める *mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚の割合）は数式1のように求められる。

$$\text{Risk} = \frac{N_{mcr}}{T_{slaughtered}} = \frac{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^2 (A_{jres} + B_{jres} + C_{jres} + D_{jres} - E_{jres} - F_{jres})}{T_{slaughtered}} \quad \text{数式1}$$

ここで、 N_{mcr} はモデルで作出した1000農場の全母豚が一回12頭ずつ出産し生産された出荷直前の豚のうち *mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となった豚の総

数、 $T_{slaughtered}$ は1000農場で全母豚が一回出産し、出荷される総頭数。 A_{jres} はコリスチン含有飼料添加物使用状況 j ($j=1$ が使用、 $j=2$ が不使用) の離乳期浮腫病発生かつコリスチンによる治療が行われた農場において出荷直前に mcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となった豚の頭数、 B_{jres} は浮腫病発生かつコリスチンによる治療が行われなかった農場において mcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となった豚の頭数。 C_{jres} はコリスチン含有飼料添加物使用状況 j の離乳期細菌性下痢症が発生しかつコリスチンによる治療が行われた農場において出荷直前に mcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となった豚の頭数、 D_{jres} は下痢症発生かつコリスチンによる治療が行われなかった農場において mcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となった豚の頭数。 E_{jres} はコリスチン含有飼料添加物使用状況 j の離乳期浮腫病も細菌性下痢症も発生しかつコリスチンによる治療が行われた農場において出荷直前に mcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となった豚の頭数、 F_{jres} は離乳期浮腫病も細菌性下痢症も発生しかつコリスチンによる治療が行われなかった農場において出荷直前に mcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となった豚の頭数。これらの頭数を飼養規模 i 毎 (i : 大中小規模) に集計し、合計したものが N_{mcr} となる。



出荷時の mcr 保有CL耐性大腸菌優勢 ($10^{5.08}$ CFU以上) 豚頭数

i は規模カテゴリー
 j は飼料添加物使用状況

$$N_{mcr} = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^2 (A_{jres} + B_{jres} + C_{jres} + D_{jres} - E_{jres} - F_{jres})$$

コンピュータで作出した1000農場の総出荷豚頭数

図17. モデルで実装した6つのワークシート (飼料添加物使用・不使用と大・中・小規模別) で計算される mcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌優先豚数 (A_{jres} から F_{jres}) で求まる合計頭数 (N_{mcr}) を出荷豚頭数で除したリスクの計算

・ *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚数推定の実装

本モデルでは、浮腫病と細菌性下痢症発生時に、飼料へのコリスチン投与で豚群の治療をすると、*mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌侵入農場では、腸管内に *mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌を持つ豚でそれらが選択されて必ず優勢となると仮定した。しかし離乳期（1.5 か月齢まで）の腸管内での *mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌選択後、出荷までにこの株が腸管内で優勢を維持する確率に関する論文は公表されていない。本研究ではデフォルトとして優勢維持が80%保たれるとして実装した。

コリスチンによる治療を受けない豚腸管内で *mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌が優勢になっている割合については、実験班から提供されたデータ（本研究以外で実施）を用いて推計したが、その方法は「豚腸管内で *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌が優勢となっている確率」の項に記載する。

・ コリスチン含有飼料添加物使用状況別のパラメータ設定

質問票調査結果のうち、コリスチン含有飼料添加物使用農場のパラメータは2017年度実施調査結果から、不使用農場のパラメータは2018年度実施調査結果から導出した（表20）。

・ 真に農場に *mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌が侵入している割合の推定

真に *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌が農場に侵入している割合 P_{TF} は、図18のように推定できる。JVARMで一農場につき一頭から採材された出荷間近の豚糞便から *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌が分離される確率 P_{JVARM} は、 P_{TF} と *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌の侵入している農場で *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢となっている確率 P_{dom} の積に等しい。よって、求めたい真に農場に *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌が侵入している割合 P_{TF} は以下の数式2のように求められる。

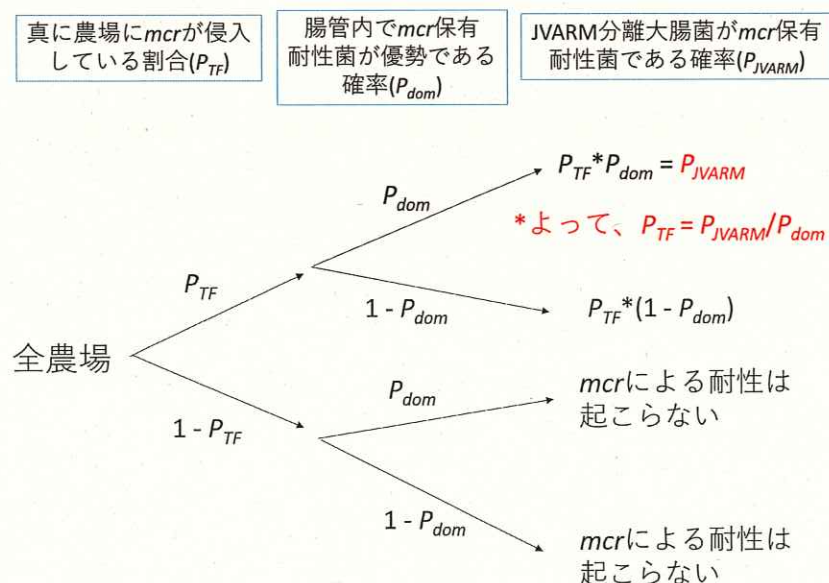


図18. 真に農場に *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌が侵入している割合 P_{TF} の求め方

$$P_{TF} = P_{JVARM}/P_{dom} \quad \text{数式 2}$$

・豚腸管内で*mcr* 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が優勢となっている確率

上述の P_{TF} の推定に必要な、コリスチンによる治療を受けていない豚の腸管内で*mcr* 1-5保有コリスチン耐性大腸菌が優勢となっている確率 P_{dom} は次のように求めた。

実験班が今回の研究以外にコリスチン含有飼料添加物給与かつ、治療でコリスチンを使用していない、かつ*mcr*保有コリスチン耐性大腸菌の存在が確認されている4つの農場で、以下の実験を行った。離乳豚あるいは肥育豚糞便を採材し、同一サンプルを用いて (i) コリスチン未添加DHL培地で優勢菌3株を採取し*mcr*遺伝子の有無とコリスチン耐性をMIC4 μ g/mL以上の基準値で確認し、また (ii) コリスチン加CHROMagarを用い色の識別で確認したコリスチン耐性大腸菌数を測定した。(i)と(ii)は同一サンプルを用いて実施しているので、理論的には糞便1g当たりのあるコリスチン耐性大腸菌数が多いならば、腸管内で優勢であるためコリスチンを加えていないDHL培地で分離できるはずである。そこで、(i)の結果を基準に、感度と特異度の両方が出来るだけ高くなるよう、優勢と判断する至適カットオフ値を、ROC解析を用いて求めた。

次に実験データ数には限りがあるため、このカットオフ値を用いて実験で得られたコリスチン耐性大腸菌数データを無作為抽出し、カットオフ値を超す割合、すなわち P_{dom} をシミュレートした。このシミュレーション結果についてベータ分布に当てはめ、規定パラメータを最尤推定法にて導出した。

なお P_{dom} については、2018年度にも実験は行われていたが、値としては2017年時点よりも若干高いがほぼ変わらない優勢割合が推定されている。このため本リスク評価では、全てのシミュレーションについて2017年度の優勢割合確率分布を用いた。

表20. リスク評価モデルに使用したパラメータ

パラメータ	確率分布	平均値 (中央値)	95%信頼区 間	出展
1. <i>mcr</i> 侵入農場設定				
<i>mcr</i> 侵入農場における コリスチン耐性菌優勢 豚の割合 (P_{dom})	Beta (12. 851, 28. 739)	31. 0% (30. 6%)	18. 0-45. 6%	臼井先生 2017年度 実験デー タ
<i>mcr</i> 侵入農場における コリスチン耐性菌優勢 豚の割合 (P_{dom})	Beta (14. 245, 28. 937) *モデルには不使用。	33. 0% (32. 7%)	20. 0-47. 5%	臼井先生 2018年度 実験デー タ
JVARMでの <i>mcr</i> 保有コリ スチン耐性大腸菌割合 (P_{JVARM})	Beta (31+1, 706-31+1)	4. 5% (4. 5%)	3. 1-6. 2%	JVARM
JVARMでの <i>mcr</i> 保有大腸 菌割合 (P_{JVARM2})	Beta (48+1, 706-48+1)	6. 8% (6. 8%)	5. 2-8. 9%	JVARM
真の耐性化可能 <i>mcr</i> 侵 入農場割合 (P_{TF})	$P_{TF} = P_{JVARM} / P_{dom}$	15. 5% (14. 8%)	8. 6-26. 5%	理論的計 算 (2017 年度)
真の <i>mcr</i> 侵入農場割合 (P_{TF2})	同上	23. 7% (22. 6%)	13. 9-40. 1%	理論的計 算 (2017 年度)
2. 2017年コリスチン 含有飼料添加物使 用農場割合	点推定93%	93%	NA	獣医師質 問票調査
3. 離乳期浮腫病				
コリスチン含有飼料添 加物使用小規模農場に おける1か月以内の浮 腫病発生確率	Beta (0. 345, 70. 463)	0. 5% (0. 1%)	<0. 01-3. 0%	2017年度 獣医師質 問票調査
コリスチン含有飼料添 加物不使用小規模農場 における1か月以内の 浮腫病発生確率	Beta (0. 907, 12. 414)	6. 7% (4. 8%)	0. 1-24. 6%	2018年度 獣医師質 問票調査
コリスチン含有飼料添 加物使用中規模農場に おける1か月以内の浮 腫病発生確率	Beta (4. 295, 210. 557)	2. 0% (1. 9%)	0. 6-4. 3%	2017年度 獣医師質 問票調査

コリスチン含有飼料添加物不使用中規模農場における1か月以内の浮腫病発生確率	Beta(14.960, 254.329)	5.6% (5.4%)	3.2-8.6%	2018年度 獣医師質 問票調査
コリスチン含有飼料添加物使用大規模農場における1か月以内の浮腫病発生確率	Beta(35.170, 305.776)	10.2% (10.2%)	7.3-13.8%	2017年度 獣医師質 問票調査
コリスチン含有飼料添加物不使用大規模農場における1か月以内の浮腫病発生確率	Beta(24.601, 242.539)	9.2% (9.1%)	6.0-12.9%	2018年度 獣医師質 問票調査
小規模農場における浮腫病発生時の農場内発症割合	Beta(1.185, 12.660)	8.6% (6.6%)	0.4-27.5%	2017年度 獣医師質 問票調査
中規模農場における浮腫病発生時の農場内発症割合	Beta(0.288, 1.243)	18.4% (6.4%)	<0.01- 84.8%	2017年度 獣医師質 問票調査
大規模農場における浮腫病発生時の農場内発症割合	Beta(0.360, 1.453)	20.6% (9.7%)	<0.01- 83.3%	2017年度 獣医師質 問票調査
4. 離乳期細菌性下痢症				
コリスチン含有飼料添加物使用小規模農場における1か月以内の下痢症発生確率	Beta(1.387, 43.623)	3.1% (2.4%)	0.2-9.7%	2017年度 獣医師質 問票調査
コリスチン含有飼料添加物不使用小規模農場における1か月以内の下痢症発生確率	Beta(0.688, 8.288)	7.7% (4.8%)	0.1-30.8%	2018年度 獣医師質 問票調査
コリスチン含有飼料添加物使用中規模農場における1か月以内の下痢症発生確率	Beta(28.128, 128.691)	17.9% (17.7%)	12.3-24.3%	2017年度 獣医師質 問票調査
コリスチン含有飼料添加物不使用中規模農場における1か月以内の下痢症発生確率	Beta(41.237, 113.062)	26.7% (26.6%)	20.1-34.0%	2018年度 獣医師質 問票調査

コリスチン含有飼料添加物使用大規模農場における1か月以内の下痢症発生確率	Beta(111.600, 166.215)	40.1% (40.1%)	34.5-46.0%	2017年度 獣医師質問票調査
コリスチン含有飼料添加物不使用大規模農場における1か月以内の下痢症発生確率	Beta(86.945, 154.822)	36.0% (35.9%)	30.0-42.1%	2018年度 獣医師質問票調査
小規模農場における浮腫病発生時の農場内発症割合	Beta(1.185, 12.660)	8.7% (6.6%)	0.4-20.5%	2017年度 獣医師質問票調査
中規模農場における浮腫病発生時の農場内発症割合	Beta(0.866, 6.476)	11.7% (8.4%)	0.2-41.2%	2017年度 獣医師質問票調査
大規模農場における浮腫病発生時の農場内発症割合	Beta(111.600, 166.215)	20.3% (10.8%)	<0.01- 82.8%	2017年度 獣医師質問票調査
5. コリスチン使用確率				
離乳期浮腫病発生時 (一次選択薬)	Beta(67.058, 54.922)	55.0% (55.0%)	46.1-63.7%	2017年度 獣医師質問票調査
離乳期浮腫病発生時 (二次選択薬)	Beta(73.076, 91.425)	44.4% (44.4%)	36.9-52.0%	2018年度 獣医師質問票調査
離乳期下痢発生時 (一次選択薬)	Beta(66.339, 111.587)	37.2% (37.3%)	30.3-42.5%	2017年度 獣医師質問票調査
離乳期下痢発生時 (二次選択薬)	Beta(88.762, 193.777)	31.4% (31.4%)	26.1-36.9%	2018年度 獣医師質問票調査
6. 治療用コリスチン 使用時農場内給与割合				
デフォルト：飼料タンク投与	点推定	100%		獣医師インタビュー
豚房毎の給与	点推定	20%		発生割合を参照
7. 生存確率				

離乳期浮腫病発生時	点推定	0%		インタビュー
離乳期下痢発生時	点推定	100%		インタビュー
8. コリスチン治療による耐性選択				
<i>mcr</i> 侵入コリスチン含有飼料添加物使用農場で浮腫病・下痢症発生時にコリスチンを用いた治療によりコリスチン耐性大腸菌優勢となる豚の割合	Beta(22+1, 22-22+1)	95.9% (97.0%)	85.2-99.9%	臼井先生 2017年度 実験データ
<i>mcr</i> 侵入コリスチン含有飼料添加物不使用農場で浮腫病・下痢症発生時にコリスチンを用いた治療によりコリスチン耐性大腸菌優勢となる豚の割合	Beta(31+1, 35-31+1)	86.5% (87.1%)	73.9-95.3%	臼井先生 2018年度 実験データ
<i>mcr</i> 侵入コリスチン含有飼料添加物使用農場でコリスチンによる治療なしに出荷直前のステージでコリスチン耐性大腸菌優勢となる豚の割合	Beta(12.851, 28.739)	31.0% (30.6%)	18.0-45.6%	臼井先生 2017年度 実験データ
<i>mcr</i> 侵入コリスチン含有飼料添加物不使用農場でコリスチンによる治療なしに出荷直前のステージでコリスチン耐性大腸菌優勢となる豚の割合	Beta(14.245, 28.937)	33.0% (32.7%)	20.0-47.5%	臼井先生 2018年度 実験データ
<i>mcr</i> 侵入コリスチン含有飼料添加物使用農場で豚房毎コリスチン治療でコリスチン耐性大腸菌優勢となる豚の割合	Beta(22+1, 22-22+1)* min((0.2+(1-0.2)* Beta(12.851, 28.739)), 1)	40.1% (39.8%)	30.0-51.3%	理論値

合				
<i>mcr</i> 侵入コリスチン含有飼料添加物不使用農場で豚房毎コリスチン治療でコリスチン耐性大腸菌優勢となる豚の割合	$\text{Beta}(31+1, 35-31+1) * \min((0.2+(1-0.2) * \text{Beta}(14.245, 28.937)), 1)$	43.0% (42.8%)	32.2-54.6%	理論値
9. コリスチン治療で耐性菌選択後に出荷直前まで腸管内で耐性菌が優勢を維持する確率	点推定	80%		根拠が存在しないため感度分析を実施

・農場レベルでの浮腫病と細菌性下痢症の一か月発生率の推定

農場レベルでの一か月発生率、換言すれば農場集団における離乳期一か月の間に浮腫病（細菌性下痢症）が起こる農場の割合、あるいは任意の農場で離乳期一か月の間に浮腫病（細菌性下痢症）が起こる確率 P_{Dis} は、飼料添加物使用・不使用、また大・中・小規模農場の6パターンについて、また浮腫病と細菌性下痢症について、それぞれ推定した。なお前述のとおり、飼料添加物使用農場での発生率は2017年度調査結果から、不使用農場での発生率は2018年度調査結果を用いて推定した（表20）。

質問票では、前段で定義した大・中・小規模農場について、それぞれ6種類の発生頻度区分（①月1回以上、②2-3か月・③4-6か月・④7-12か月・⑤2-3年に一度、⑥ほぼなし）に該当する農場数を質問している。まず各年度の全回答から、各規模の発生頻度区分 i 該当農場数 n_i を集計した。これらの選択肢では、発生間隔の範囲を質問しているため、①については毎月一回発生とし、②から⑤については、数式3のとおり発生頻度区分 i について a_i から b_i か月に一度の発生の場合、 a_i-b_i 間の任意の値を無情報分布から抽出し、この逆数を取ることによって任意の農場の一か月間での発生確率に変換した。次に各区分 n_i 戸の農場において、それぞれ離乳期一か月以内に疾病が発生する回数を、ポワソン分布を用いて推計し、これを合計した（該当区分におけるのべ発生農場数）。最後に各年度の各飼養規模において、全ての発生頻度区分での一か月間のべ発生数を、求める飼養規模の合計農場数 T_{Farm} で除して、 P_{Dis} を求めた。

$$P_{Dis} = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^{n_i} \text{Pois} \left(n_i, \left(\frac{1}{\text{Uniform}(a_i, b_i)} \right) \times 1 \right) / (T_{Farm} \times 1)$$

数式 3

計算された P_{Dis} は、5000回反復することで発生確率の事後分布とし、パッケージfitdistrplus⁵⁾のfitdist

関数のmatching moment estimationを用いてベータ分布に当てはめパラメータの最尤推定を実施した。

- ・浮腫病および細菌性下痢症発生時の農場内発生割合の推定

任意の農場でコリスチン適応症例が発生した場合の農場内発生割合を、特に浮腫病では発症豚のほぼ100%が死亡し、リスクを計算する集団から除外しなければならないため計算した。

この推定は、飼料添加物使用の有無、および各飼養規模について実施した。

質問票では、浮腫病と細菌性下痢症のそれぞれについて、飼養規模別に発生時の離乳豚の発生割合区分（1割未満、1-2割、3-4割、5-6割、7-8割、9-10割）への該当農場数の記載を依頼している。飼養規模別に、sample(確率=区分該当農場数/同一飼養規模ない合計農場数)関数を用いて各区分に該当する農場数に基づく選択確率で一つの区分を選択し、選択された区分について割合の範囲から無情報分布を用いて一つの値を無作為抽出した。

この抽出を各飼養規模について5000回反復処理し、得られた事後分布をfitdist関数を用いてベータ分布に当てはめ最尤推定した。

- ・浮腫病および細菌性下痢症発生時の治療でのコリスチン使用確率の推定

浮腫病および細菌性下痢症発生時のコリスチン使用確率は、回答者に点推定の%として回答を得た。2017年度および2018年度回答のそれぞれについて、無情報分布を用いて年度ごとの全回答から100件無作為抽出し、その平均を計算した。この処理を5000回反復処理し、得られた事後分布をfitdist関数を用いてベータ分布に当てはめパラメータの最尤推定を実施した。

- ・浮腫病および細菌性下痢症発症時の生存確率

浮腫病および下痢症発症個体の生存確率はコリスチンによる治療の有無に関わらずそれぞれ0%および100%とした。なお、臨床現場では農場における浮腫病発生時には、罹患した豚を救うためではなく、集団の中の未発症個体の発症を防ぐことを目的にコリスチンが使用されている。

- ・浮腫病発生時における *mcr* 1-5保有コリスチン耐性大腸菌選択と腸管内優勢の維持

浮腫病発生農場において、コリスチンで農場内全頭の治療を実施する場合は、腸管内に低濃度（CFU/g）でもMIC4 μ g/mL以上のコリスチン耐性を示す *mcr* 保有大腸菌がいる場合、この耐性菌は選択され優勢となり、モデルで指定した優勢維持確率に基づきと畜時に腸管内で優勢を保つ（図19）。この *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌が低濃度でも腸管内にいる確率の計算には、前述の本研究以外の実験班による農場実験データを用い、調査糞便の中でコリスチン加ChromAgar上に低濃度でもコリスチン耐性大腸菌が培養された検体の割合を、ベータ分布を用いて推定した（表20）。

これに対してコリスチンを使用しない場合の *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢割合には、上述の実験データでROC解析により求められた P_{dom} を用いた。

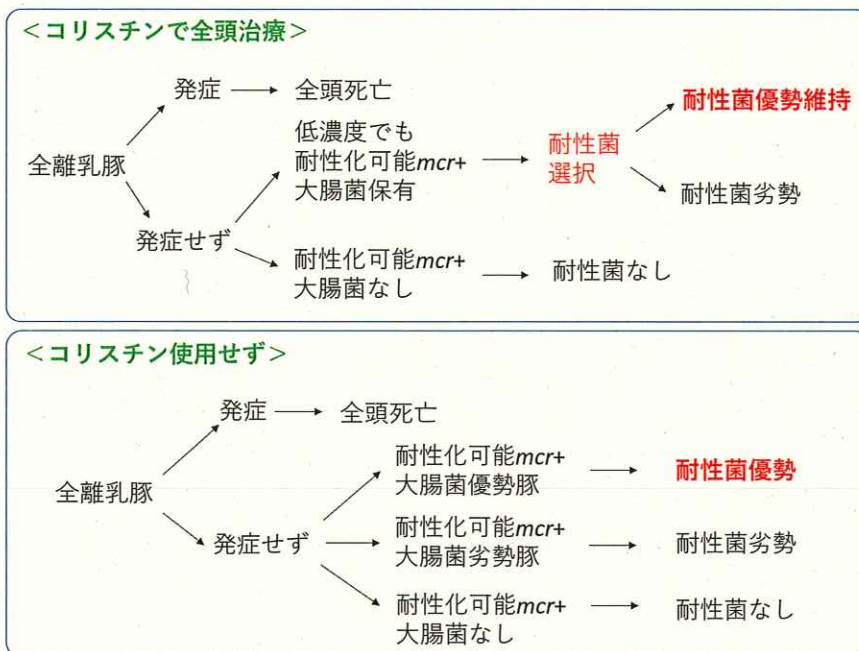


図19. 浮腫病発生時にmcr保有コリスチン耐性大腸菌が優勢となるパターン

- ・下痢症発生時におけるmcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌選択と腸管内優勢の維持

細菌性下痢症発生農場において、コリスチンで農場内全頭の治療を実施する場合は、浮腫病のように死亡はモデル化しないが、浮腫病と同様のパターンが考えられるので(図20)、耐性菌が選択され優勢が維持されるステップに同様の確率分布を用いた(表20)。コリスチンによる治療を行わない場合においても、浮腫病と同様の確率分布を用いた。

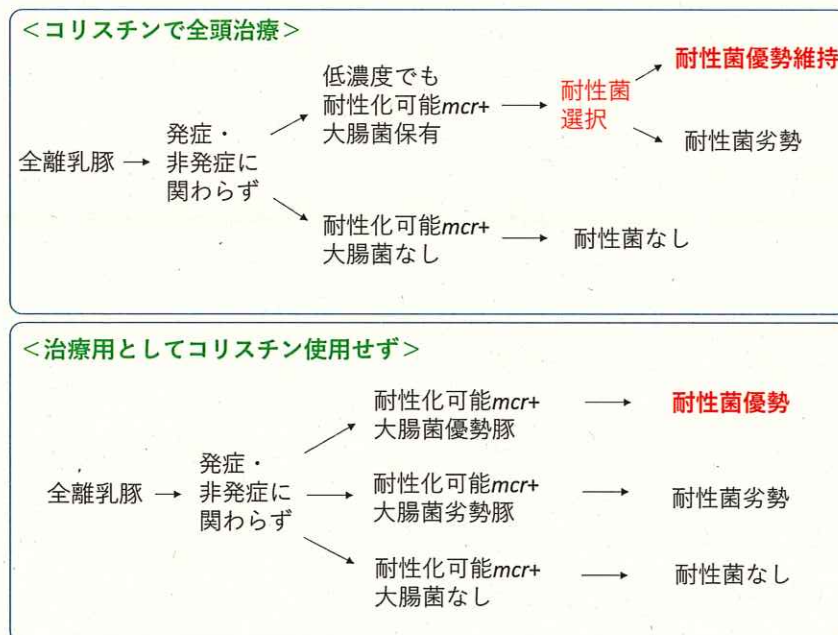


図20. 細菌性下痢症発生時にmcr保有コリスチン耐性大腸菌が優勢となるパターン

- ・浮腫病・下痢症非発生農場におけるmcr 1-5保有コリスチン耐性大腸菌優勢状況

この場合コリスチンによる治療を行わないため、*mcr*保有コリスチン耐性大腸菌優勢割合には、上述の実験データでROC解析により求められた P_{dom} を用いた。

(3) シミュレーション

最終リスクはforループを用いて5000回反復処理した。

(4) シナリオ分析

・耐性菌選択後の優勢維持率

コリスチン治療による耐性選択後の耐性菌優勢状態維持確率については情報がないため、点推定の80%に加え、40%、60%、100%の場合についてシナリオ分析を実施した。

・コリスチン適応症例発生頻度の抑制

2017年度のモデルを用い、浮腫病と細菌性下痢症の発生頻度をそれぞれ、また同時に20%、50%、80%抑制した場合の*mcr*保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化を検証した。

・コリスチンを用いた治療確率の抑制

2017年度モデルを用い、コリスチン治療適応症例発生時のコリスチン使用確率を20%、50%、80%抑制した場合、農場全体の飼料タンク投与でなく、豚房ごとの治療を実施した場合、80%使用確率を抑制しかつ使用時に豚房ごとに治療する場合、さらに使用確率と適応症発生確率を同時に抑制した場合についてシミュレーションを実施した。

豚房ごとに治療する場合は、質問票の結果から農場の2割程度の発生が多かったことから農場内2割の豚にコリスチンによる治療を実施することとした。治療を受けない豚については、*mcr*保有コリスチン耐性大腸菌が侵入している農場の場合、コリスチンを使用しない場合の優勢割合に準じて*mcr*保有コリスチン耐性大腸菌が優勢であるよう P_{dom} を用いて実装した。

・リスク管理措置開始後2018年度のリスク

2018年度の質問票調査で明らかとなった浮腫病ならびに細菌性下痢症の発生頻度、発生時のコリスチンによる治療確率、飼料添加物給与中止後のコリスチン加ChromAgarでのコリスチン耐性大腸菌培養確率を用い、リスク管理措置開始直後（2018年11-12月）における出荷直前の豚における*mcr*保有コリスチン大腸菌優勢豚の割合を推定した。

(5) リスク管理措置後のコリスチン適応症発生頻度、コリスチン治療確率の変化検証

浮腫病と細菌性下痢症の発生頻度を、数式2を用いて2017年度と2018年度についてシミュレーションをし、シミュレートされた結果からそれぞれ50サンプル無作為抽出した値をロジット変換 ($\log_{10} \frac{P}{1-P}$) し、ウェルチのt検定を用いて比較した。サンプル数はロジット変換した値を用いて2群の平均値の比較のための計算式を用い、十分多く確保するよう設定した。

適応症に遭遇した際のコリスチン治療確率が一次選択薬から二次選択薬に変更されたこ

とで減少しても、適応症の発生頻度が増加した場合、農場当たり一定期間内コリスチン治療確率は減少しないかも知れない。このため浮腫病と下痢症の発生確率それぞれについて2017年度と2018年度の発生確率と発生時のコリスチンによる治療確率を乗じた一定期間あたり治療確率 P_{use} （数式4）を5000回反復処理のモンテカルロシミュレーション法により作出し、ここから50サンプルずつ無作為抽出し、ロジット変換した値のt検定を行った。

$$P_{use} = P_{disease} \times P_{use|disease} \quad \text{数式 4}$$

（6）リスク管理措置後 mcr が消失した農場の増加に伴うリスクの変化予測

イギリスではオールインオールアウトを実施している飼料添加物非使用農場でコリスチンによる治療を中止した場合、20か月後には農場内から mcr が見られなくなった⁶⁾。またスペインでは、2016年9月にスペイン医薬品医療機器機構（Spanish Agency of Medicines and Medical Devices: AEMPS）が作成した自主的コリスチン使用自粛プログラムに豚頭数ベースにスペインの80%を占める70%の農場が参加した。これによるコリスチンの使用減少に伴い、 mcr -1の検出率が2015年の70%から2017年の53%までの2年間で約24%（ $(70-53)/70$ ）低下した⁷⁾。このような効果を表現するため、2018年度のモデルを用いJVARMでのサンプルから mcr 保有大腸菌の割合が一年で10%、20%、30%減少すると想定シミュレーションを5年分実施し、出荷直前の豚における mcr 保有コリスチン大腸菌優勢豚の割合の変化を観察した。

なお実装には、数式5のとおり、農場集団からの農場レベルでの mcr 1-5 遺伝子の消失率を $r\%$ としたとき、 t 年後のJVARMでの mcr 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌の検出率を P_{JVARMt} として発生リスクをシミュレートした。

$$P_{JVARMt} = P_{JVARM} \times \left(1 - \frac{r}{100}\right)^t \quad \text{数式 5}$$

研究結果

（1）質問票調査

日本豚病臨床研究会会員 82 名のうち 2017 年度には 28 名（回答率 34.1%）から、2018 年度には 43 名（回答率 52.4%）から回答があった。情報が得られた農場数は 2017 年度が 294 農場、2018 年度が 455 農場で、共に全国の都道府県別一貫農場・繁殖農場数と有意な相関があった（2017 年度 $\rho = 0.78$, $p < 0.01$; 2018 年度 $\rho = 0.77$, $p < 0.01$, 図 21）。コリスチン適応症発生率やコリスチンによる治療確率など、解析結果は表 20 に示す。

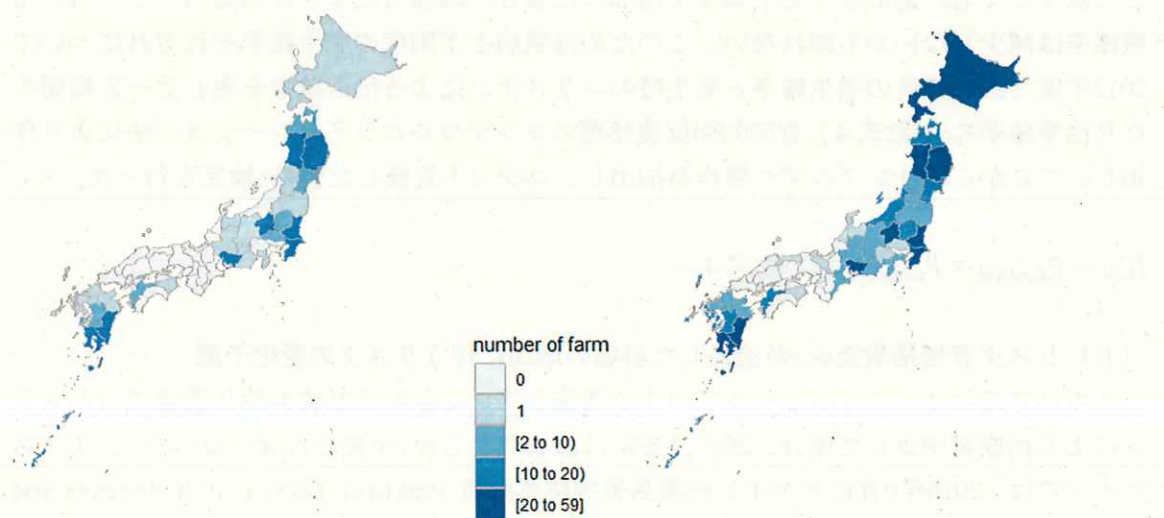


図 21. 調査農場数（左パネル 2017 年度 294 農場、右パネル 2018 年度 455 農場）

（2）パラメータの推定

本リスク評価の要となる *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢のカットオフ値は、ROC 曲線の観察と最大正確性指数 0.77 を示したことにより（図 22）、 $10^{5.08}$ CFU/g が至適とみなされ、この値を採用した。

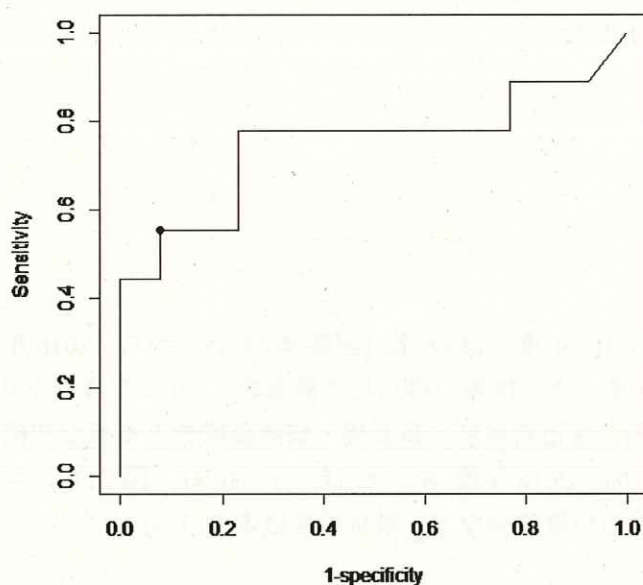


図 22. *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌が優勢と判断する基準設定のための ROC 曲線。黒丸で示したのが至適カットオフ値。

これにより 2017 年度時点で *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌が侵入したコリスチン含有飼料添加物使用農場で治療用コリスチンを使用しない場合、*mcr* 保有コリスチン耐性大腸

菌が優勢である割合は平均値 31.0%、中央値 30.6% (95%信頼区間(CI): 18.0-45.6%)と推定された。一方同農場でコリスチンによる治療を実施した場合、*mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌が優勢である割合は治療直後で平均値 95.9%、中央値 97.0% (95%CI: 85.2-99.9%)と推定された。

日本の養豚場のうち *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌が侵入している農場の割合は平均値 15.5%、中央値 14.8% (95%CI: 8.6-26.5%)と推定された。また JVARM データより、*mcr*-1-5 を保有していても感受性を示す大腸菌を考慮すると、*mcr* 保有大腸菌が侵入している農場の割合は平均値 23.7%、中央値 22.6% (95%CI: 13.9-40.1%)にも上ると推計された。

(3) 発生評価結果

2017 年時点でのと畜場出荷直前の *mcr* 1-5 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚平均割合は 5.8%で、中央値 5.4% (95%CI: 4.4 - 10.3%)であった (図 23)。

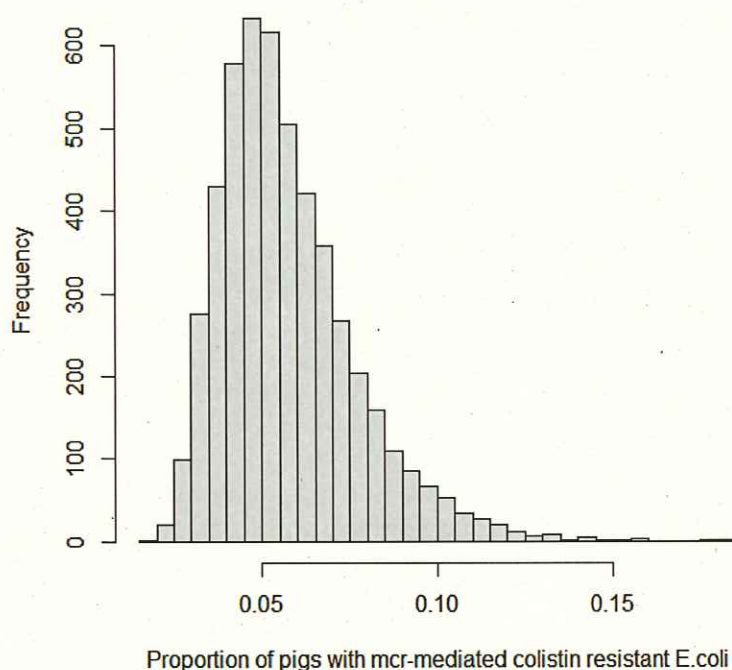


図 23. 出荷直前の出荷豚総頭数に占める *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合

コリスチン使用による耐性選択後の優勢維持確率のシナリオ分析結果を表 21 に示す。耐性菌選択後の優勢維持の程度によって異なる値を示し、デフォルトの 80%と 40%の優勢維持確率では全農場の中央値で 14.8% ((5.4%-4.6%)/5.4%) の変化率を示した。

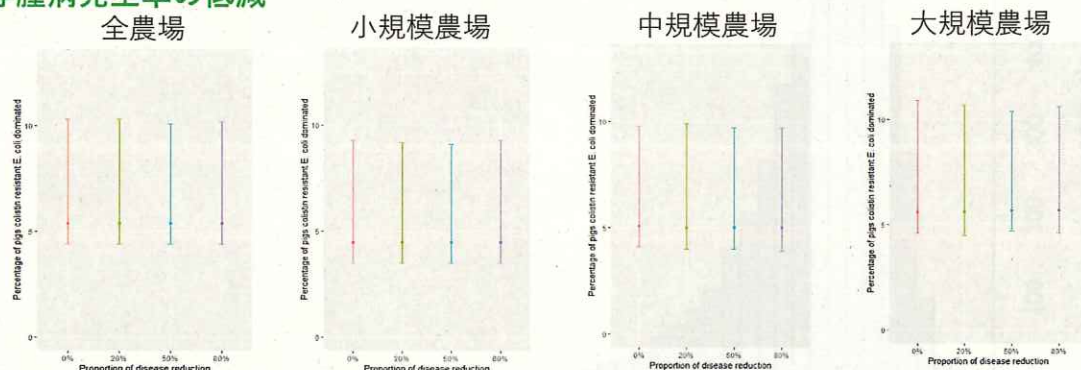
表 21. 2017 年度出荷直前 *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の選択耐性菌優勢維持率に関するシナリオ分析（平均値、中央値（95%信頼区間））

優勢維持率	全農場	小規模農場	中規模農場	大規模農場
40%	5.0%, 4.6% (3.7 - 9.1%)	4.8%, 4.5% (3.5 - 9.2%)	4.9%, 4.6% (3.7 - 9.2%)	5.0%, 4.7% (3.8 - 9.1%)
60%	5.4%, 5.0% (4.1 - 9.8%)	4.8%, 4.5% (3.5 - 9.3%)	5.2%, 4.9% (3.9 - 9.5%)	5.5%, 5.1% (4.2 - 9.9%)
80%	5.8%, 5.4% (4.4 - 10.3%)	4.8%, 4.5% (3.5 - 9.3%)	5.4%, 5.1% (4.1 - 9.8%)	6.0%, 5.6% (4.6 - 10.9%)
100%	6.1%, 5.8% (4.7 - 11.2%)	4.9%, 4.6% (3.5 - 9.5%)	5.6%, 5.2% (4.2 - 10.4%)	6.5%, 6.0% (4.9 - 11.7%)

（４）リスク低減のシナリオ分析

コリスチン適応症である浮腫病と細菌性下痢両方の発生頻度を抑制した場合に、80%抑制では、出荷直前の *mcr*1-5 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合は 11.1% ((5.4%-4.8%)/5.4%) 減少した（表 22）。疾病別では特に下痢症抑制の効果が高いことが観察された（表 22、図 24）。

浮腫病発生率の低減



細菌性下痢症発生率の低減

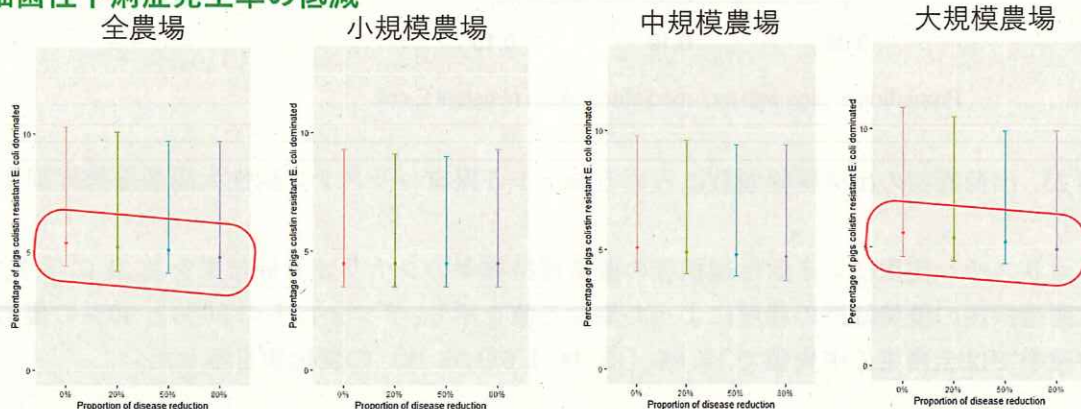


図 24. 浮腫病・細菌性下痢症発生低減による *mcr*1-5 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化（各パネル左から右へ、0%、20%、50%、80%低減）

表 22. 大腸菌症低減による豚出荷直前 *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合低減シナリオ分析 (2017 年度モデル)

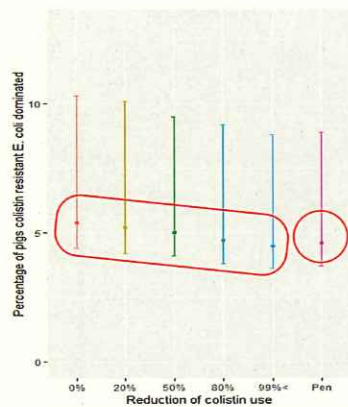
シナリオ	全農場	小規模農場	中規模農場	大規模農場
デフォルト (優勢維持率80%)	5.8%, 5.4% (4.4-10.3%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.3%)	5.4%, 5.1% (4.1-9.8%)	6.0%, 5.6% (4.6-10.9%)
農場浮腫病発生				
20%低減	5.7%, 5.4% (4.4-10.3%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.2%)	5.3%, 5.0% (4.0-9.9%)	5.9%, 5.6% (4.5-10.7%)
50%低減	5.7%, 5.4% (4.4-10.1%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.1%)	5.3%, 5.0% (4.0-9.7%)	6.0%, 5.7% (4.7-10.4%)
80%低減	5.7%, 5.4% (4.4-10.2%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.3%)	5.3%, 5.0% (3.9-9.7%)	6.0%, 5.7% (4.6-10.6%)
農場下痢症発生				
20%低減	5.5%, 5.2% (4.2-10.1%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.1%)	5.3%, 4.9% (4.0-9.6%)	5.7%, 5.4% (4.4-10.5%)
50%低減	5.4%, 5.1% (4.1-9.7%)	4.8%, 4.4% (3.5-9.0%)	5.1%, 4.8% (3.9-9.4%)	5.5%, 5.2% (4.3-9.9%)
80%低減	5.2%, 4.8% (3.9-9.7%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.3%)	5.0%, 4.7% (3.7-9.4%)	5.3%, 4.9% (4.0-9.9%)
農場浮腫病・下痢症				
20%低減	5.6%, 5.2% (4.3-10.0%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.3%)	5.3%, 5.0% (4.0-9.6%)	5.7%, 5.4% (4.4-10.4%)
50%低減	5.4%, 5.0% (4.0-9.8%)	4.8%, 4.5% (3.4-9.2%)	5.1%, 4.8% (3.8-9.6%)	5.5%, 5.2% (4.2-10.0%)
80%低減	5.1%, 4.8% (3.8-9.6%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.2%)	4.9%, 4.6% (3.6-9.4%)	5.2%, 4.9% (3.9-9.6%)

コリスチンによる治療については、治療での使用中止と、農場の2割程度の豚房に限って使用する措置に、ほぼ同程度の効果が推定された(表23、図25)。豚房ごとの治療で使用確率を2017年時点の20%に抑え、2017年時点から16.7% $((5.4\% - 4.5\%)/5.4\%)$ 豚出荷直前コリスチン耐性 *mcr* 保有大腸菌優勢豚割合が減少した。

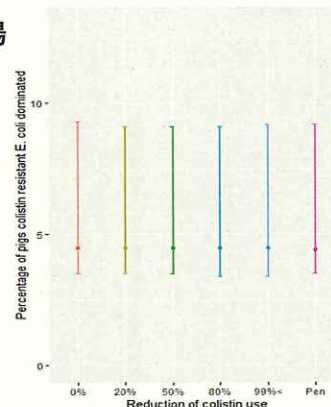
表 23. コリスチンでの治療機会減少による豚出荷直前コリスチン耐性 *mcr* 保有大腸菌優勢豚割合低減シナリオ分析 (2017 年度モデル)

シナリオ	全農場	小規模農場	中規模農場	大規模農場
デフォルト (優勢維持率80%)	5.8%, 5.4% (4.4-10.3%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.3%)	5.4%, 5.1% (4.1-9.8%)	6.0%, 5.6% (4.6-10.9%)
治療でのコリスチン 使用				
20%低減	5.5%, 5.2% (4.2-10.1%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.1%)	5.2%, 4.9% (3.9-9.6%)	5.7%, 5.3% (4.4-10.4%)
50%低減	5.3%, 5.0% (4.1-9.5%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.1%)	5.1%, 4.7% (3.8-9.3%)	5.4%, 5.1% (4.2-9.6%)
80%低減	5.1%, 4.7% (3.8-9.2%)	4.8%, 4.5% (3.4-9.1%)	4.9%, 4.6% (3.7-9.1%)	5.1%, 4.8% (3.8-9.3%)
使用中止	4.8%, 4.5% (3.6-8.8%)	4.8%, 4.5% (3.4-9.2%)	4.8%, 4.5% (3.6-9.0%)	4.8%, 4.5% (3.6-8.9%)
豚房ごとの治療 (2割の豚房)	4.9%, 4.6% (3.7-8.9%)	4.8%, 4.4% (3.5-9.2%)	4.9%, 4.6% (3.7-9.1%)	4.9%, 4.6% (3.7-8.9%)
豚房ごと治療 (2割の 豚房) かつ80%低減	4.8%, 4.5% (3.6-8.8%)	4.8%, 4.4% (3.5-9.0%)	4.8%, 4.5% (3.6-8.8%)	4.8%, 4.5% (3.6-8.8%)
治療でのコリスチン 使用と下痢・浮腫病				
20%同時低減	5.4%, 5.1% (4.1-9.7%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.2%)	5.1%, 4.8% (3.8-9.5%)	5.5%, 5.2% (4.3-10.1%)
50%同時低減	5.1%, 4.8% (3.8-9.4%)	4.8%, 4.4% (3.5-9.2%)	4.9%, 4.6% (3.7-9.3%)	5.2%, 4.9% (3.9-9.5%)
80%同時低減	4.8%, 4.5% (3.5-9.0%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.2%)	4.8%, 4.5% (3.5-8.9%)	4.8%, 4.5% (3.6-9.0%)
豚房ごと治療かつ 80%同時低減	4.8%, 4.5% (3.5-8.9%)	4.8%, 4.5% (3.5-9.1%)	4.8%, 4.4% (3.5-9.0%)	4.8%, 4.5% (3.6-8.9%)

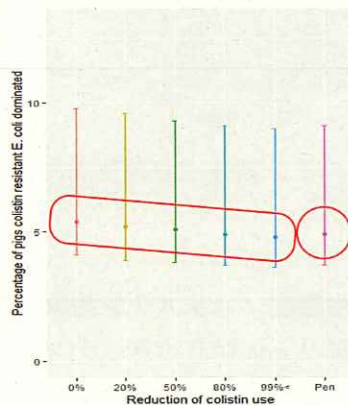
全農場



小規模農場



中規模農場



大規模農場

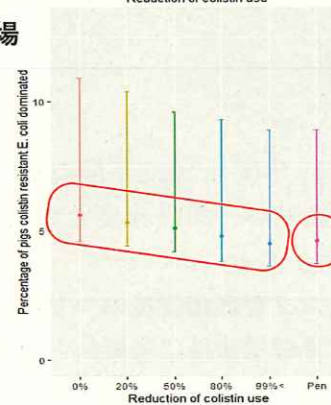


図 25. 治療用コリスチンの使用低減による *mcr1-5* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化（各パネル左から右へ、0%、20%、50%、99%以上低減、豚房毎の治療）

（5）リスク管理措置後のリスク

2018 年度の質問票調査結果に基づく出荷直前 *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合は、選択後の耐性菌優勢維持確率 80% のデフォルトでは、2017 年度の平均値 5.8%、中央値 5.4%（95%CI: 4.4 - 10.3%）と比較して平均値 5.7%、中央値 5.4%（95%CI: 4.4 - 10.4%）とほぼ同じ値に推定された（表 24、図 26）。

表 24. リスク管理措置開始後 2018 年度出荷直前 *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の耐性菌優勢維持率シナリオ分析（平均値、中央値（95%信頼区間））

優勢維持率	全農場	小規模農場	中規模農場	大規模農場
40%	5.1%, 4.8% (3.9-9.3%)	5.1%, 4.8% (3.8-9.7%)	5.0%, 4.7% (3.8-9.4%)	5.1%, 4.8% (3.9-9.3%)
60%	5.4%, 5.1% (4.1-9.8%)	5.3%, 4.9% (3.9-10.0%)	5.3%, 5.0% (4.0-9.7%)	5.5%, 5.1% (4.2-9.9%)
80%	5.7%, 5.4% (4.4-10.4%)	5.4%, 5.0% (4.0-10.2%)	5.6%, 5.2% (4.2-10.2%)	5.8%, 5.5% (4.5-10.5%)
100%	6.0%, 5.7% (4.6-10.9%)	5.5%, 5.2% (4.1-10.6%)	5.8%, 5.5% (4.4-10.6%)	6.2%, 5.8% (4.7-11.2%)

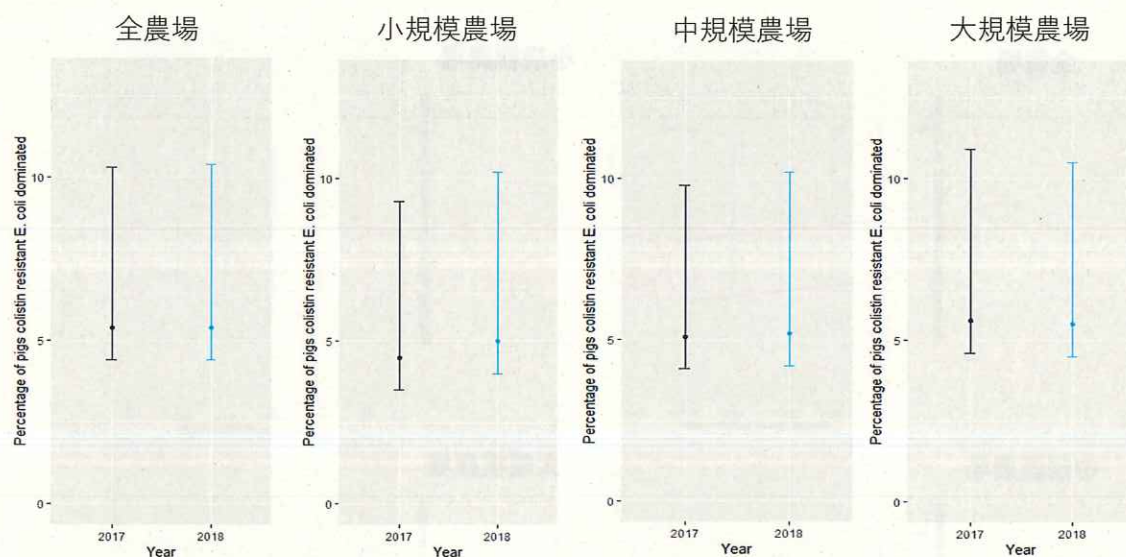


図 26. 2017 年度と 2018 年度の *mcr1-5* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化（各パネル左から右へ、2017 年度と 2018 年度）

（6）リスク管理措置後のコリスチン適応症発生頻度、コリスチン治療確率の変化検証

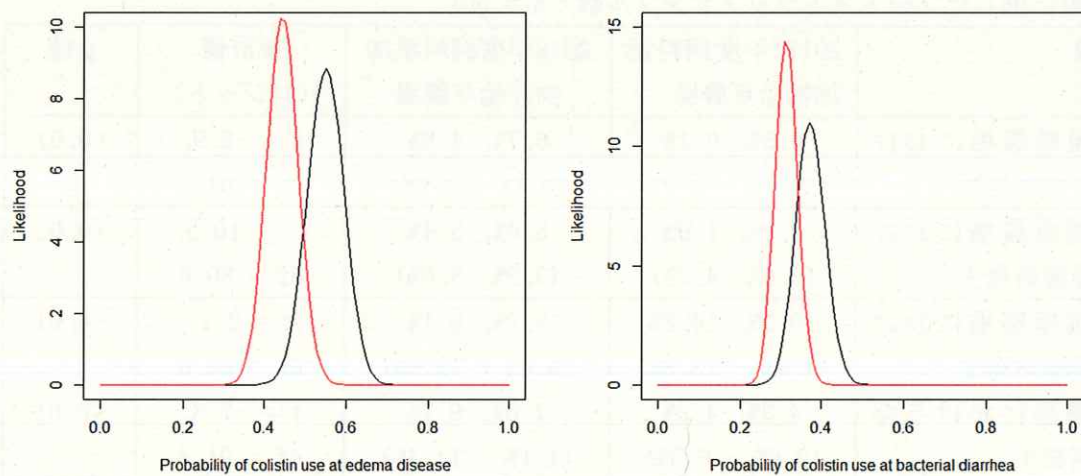
リスク管理措置後に措置前と比較して出荷直前の *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合が変化しない理由の検証に、コリスチン適応症発生頻度の変化について解析したところ、浮腫病、細菌性下痢症ともに、2018 年度には 2017 年度と比較して小規模と中規模農場で有意に発生頻度が高くなっていた ($p < 0.05$ 、表 25)。大規模農場については、逆に浮腫病、細菌性下痢症ともに有意に発生頻度が減少していた ($p < 0.05$)。

表 25. 飼料添加物使用中止前後の離乳期 1 か月におけるコリスチン適応症発生確率の比較
(統計に供したブートストラップサンプル数 : n = 50)

項目	2017 年度飼料添加物給与農場	2018年度飼料添加物非給与農場	統計値 (ロジット)	p 値
小規模農場における浮腫病発生	0.5%, 0.1% (<0.1% - 3.0%)	6.7%, 4.8% (0.1% - 24.6%)	t = -2.9, df = 94.5	<0.01
中規模農場における浮腫病発生	2.0%, 1.9% (0.6% - 4.3%)	5.6%, 5.4% (3.2% - 8.6%)	t = -10.5, df = 80.6	<0.01
大規模農場における浮腫病発生	10.2%, 10.2% (7.3% - 13.8%)	9.2%, 9.1% (6.0% - 12.9%)	t = 2.7, df = 85.6	<0.01
全農場における浮腫病発生	4.3%, 4.3% (2.6% - 6.3%)	7.0%, 6.7% (4.1% - 11.4%)	t = -7.8, df = 91.4	<0.01
小規模農場における下痢症発生	3.1%, 2.4% (0.2% - 9.7%)	7.7%, 4.8% (0.1% - 30.8%)	t = 2.4, df = 191.6	0.02
中規模農場における下痢症発生	17.9%, 17.7% (12.3% - 24.3%)	26.7%, 26.6% (20.1% - 34.0%)	t = -12.3, df = 91.2	<0.01
大規模農場における下痢症発生	40.1%, 40.1% (34.5% - 46.0%)	36.0%, 35.9% (30.0% - 42.1%)	t = 7.7, df = 97.3	<0.01
全農場における下痢症発生	21.7%, 21.7% (17.5% - 26.1%)	25.6%, 25.6% (20.3% - 32.2%)	t = -7.3, df = 97.3	<0.01

* 統合した全農場での推定結果以外の各規模の確率は表 20 にも記載。

浮腫病および細菌性下痢症発生時のコリスチンによる治療確率は、表 20、図 27 のとおり 2018 年度には減少していたが、小・中規模農場では適応症の発生頻度の増加により、一定期間当たりの治療確率は有意に増加していた(表 26)。これに対して大規模農場では、一定期間当たりのコリスチンによる治療確率は 2018 年度には有意に減少していた(表 26)。規模の区別をしない全農場でのコリスチン治療確率では、浮腫病発生と関連した治療確率は有意に増加しているが、下痢症発生と関連した治療確率は変化がなかった ($p = 0.92$, 表 26)。



(A) 浮腫病

(B) 細菌性下痢症

図 27. 適応症発生時のコリスチン使用確率の変化. X 軸が発生確率、Y 軸は尤度を表す. 黒線（両パネルとも右）は 2017 年度、赤線（両パネルとも左）は 2018 年度.

表 26. 飼料添加物使用中止前後の離乳期 1 か月におけるコリスチンを用いた治療確率の比較（統計に供したブートストラップサンプル数：n = 50）

項目	2017 年度飼料添加物給与農場	2018年度飼料添加物非給与農場	統計値 (ロジット)	p 値
小規模農場における浮腫病発生	0.3%, 0.1% (<0.1 - 1.5%)	3.0%, 2.1% (<0.1 - 11.3%)	t = -6.2, df = 58.0	<0.01
中規模農場における浮腫病発生	1.1%, 1.0% (0.3 - 2.4%)	2.5%, 2.4% (1.4 - 3.9%)	t = -13.2, df = 70.8	<0.01
大規模農場における浮腫病発生	5.7%, 5.7% (3.9 - 7.8%)	4.1%, 4.0% (2.5 - 5.9%)	t = 8.4, df = 89.1	<0.01
全農場における浮腫病発生	2.4%, 2.3% (1.2 - 3.7%)	3.1%, 3.0% (1.6 - 5.2%)	t = -3.1, df = 98.0	<0.01
小規模農場における下痢症発生	1.1%, 0.9% (0.1 - 3.6%)	2.4%, 1.5% (<0.1 - 9.4%)	t = -1.1, df = 89.6	0.27
中規模農場における下痢症発生	6.7%, 6.6% (4.4 - 9.5%)	8.4%, 8.3% (6.0 - 11.1%)	t = -5.8, df = 97.4	<0.01
大規模農場における下痢症発生	15.0%, 14.9% (11.6 - 18.8%)	11.3%, 11.3% (8.7 - 14.1%)	t = 11.1, df = 87.2	<0.01
全農場における下痢症発生	8.1%, 8.1% (5.9 - 10.7%)	8.0%, 8.0% (5.7 - 10.7%)	t = -2.4, df = 97.6	0.92

(7) リスク管理措置後 *mcr* が消失した農場の増加に伴うリスクの変化予測

図 28、29、30 に、それぞれ年間 10%、20%、30% の速度で *mcr* 1-5 侵入農場から *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌が消失し清浄化していく場合の 2018 年をベースラインとした今後 5 年間の *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化を示す。

スペインでは年間 10% 強の速度で *mcr*-1 が農場集団から消失して行った⁷⁾と考えられるので、図 28 と図 29 のシナリオの間に該当する。図 29 のシナリオでは、4 年後に中央値でベースラインの 5.4% から 2.3% と、リスクは半分以下 ($57.4\%: (5.4 - 2.3) / 5.4$) に減少した。

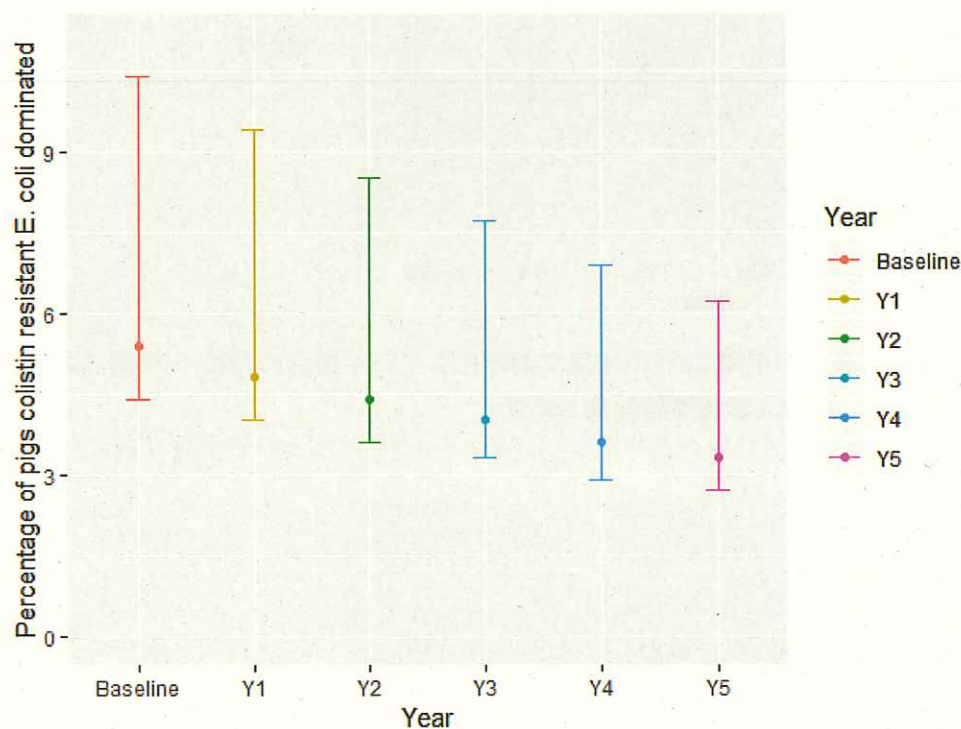


図 28. *mcr* 1-5 侵入農場が年間 10% の速度で清浄化していく場合の今後 5 年間における *mcr* 1-5 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化

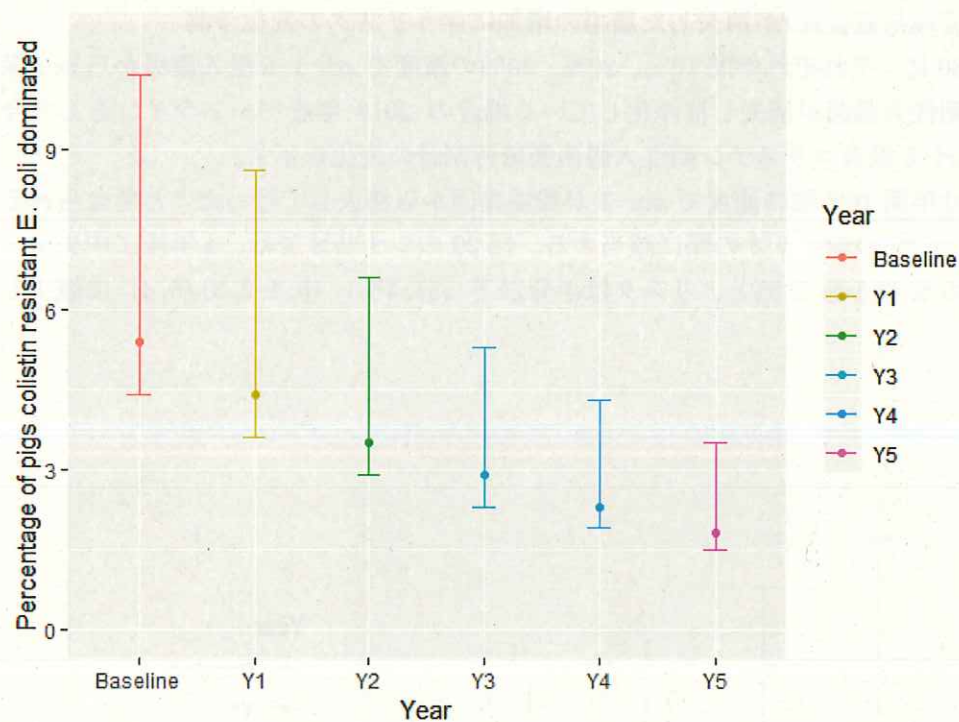


図 29. *mcr* 1-5 侵入農場が年間 20%の速度で清浄化していく場合の今後 5 年間ににおける *mcr*1-5 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化

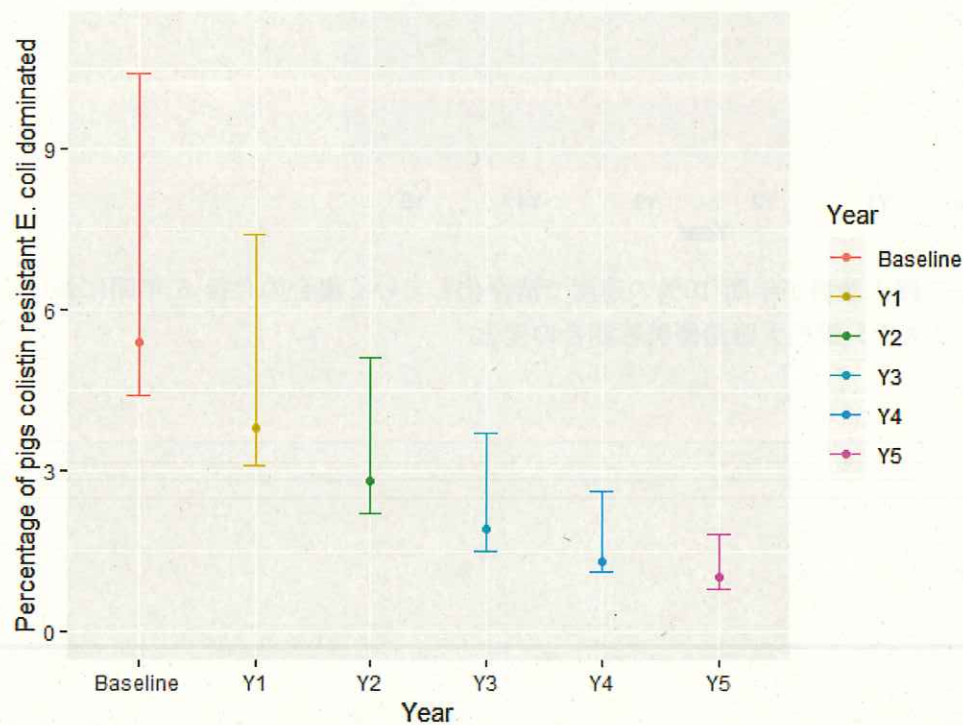


図 30. *mcr* 1-5 侵入農場が年間 30%の速度で清浄化していく場合の今後 5 年間ににおける *mcr*1-5 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合の変化

研究全体の成果、考察及び結論

二年間を通して、世界でのコリスチンのリスク評価に関する情報、ならびに国内でのリスク評価に必要な情報の収集を行い、これに基づき実験班との議論を重ねながら農場での発生モデルを構築し、定量的リスク評価を実施した。本研究班で作成した詳細な定量的リスクモデルは、国内にも、そして海外にもまだ例がない。

2017年度およびリスク管理措置開始直後の2018年度における出荷直前 *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合は、中央値で両方とも 5.4% という結果であった。コリスチン耐性を起こさない *mcr* を考慮すると、わが国の肉豚集団には *mcr* がより広く蔓延していると言える。

本リスク評価で作成した定量的リスクモデルは個体ベースモデルであるため豚でのコリスチン使用と耐性菌選択の状況が詳細にモデル化出来ており、2017年度の出荷直前 *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚割合が JVARМ でのプラスミド性コリスチン耐性大腸菌保有豚割合と概ね合致することから、妥当性が確保されていることが考えられる。

一方モデルの限界として、すでに世界で報告されている *mcr-6-9*³⁾ および染色体性コリスチン耐性を考慮していないこと、疾病発生データが質問票によるもので実際の情報が入手できないこと、耐性菌選択後の耐性菌優勢状態の維持率が分からないこと、飼料添加物使用中止後の *mcr* の農場からの消失に関する疫学的情報がまだ十分でないこと、豚個体間・豚房間・農場間の *mcr* 保有大腸菌の伝播様式をモデル化していないこと、農場内衛生対策の詳細な内容のモデル化は想定していないことが挙げられる。

1 番目の *mcr-6-9* と染色体性コリスチン耐性について、*mcr-6-9* についてはプラスミド性の伝達が起こるので、人への健康影響を考えた場合に、JVARМ 保存株で *mcr-6-9* を保有している株が新たに見つかった場合、その割合分だけリスクは高いことになる。染色体性コリスチンについては、他の菌への耐性伝達が起こらないので、今回のリスク評価の根底にある多剤耐性菌への影響を考えた場合には、ハザードとして扱っていないことは適切であると考えられる。一方、これらを合わせたコリスチン耐性菌自体のリスクは、JVARМ データを用いて容易に推計できる。

疾病発生データについて、過去の浮腫病の発生報告から、発生した場合に農場の離乳豚に広く、時に長期間に渡り断続的に発症する様式^{8,9)}が、臨床獣医師からの質問票への回答と類似しているので、信頼性があると考えられる。同一農場での数か月おきの断続的発生報告は、本質問票の「1か月に一度」、「2-3か月に一度」の発生に当たると考えられ、シミュレーションでは正確に発生率を表現できたと考えている。一方、細菌性下痢症について2017年度の質問票では離乳期下痢症について質問しており、回答獣医師から細菌性下痢症との定義付けがされていない問題について調査後指摘を受けた。2018年度に実施した質問票調査では、2017年度に回答した獣医師28名のうち16名が回答しており、このうち1名(6.3%)が2017年度質問票で下痢症に細菌性以外のものも含んでいた、また7名(43.8%)は覚えていないと回答している。2017年度に細菌性以外の下痢症も含めて回答した発生頻度のうちどの程度の割合が細菌性下痢であったかは残念ながら定かではない。ただ2018年度には小・中規模農場で下痢症の発生頻度が有意に増加していたことから、2017年度に細菌性下痢症発生頻度をかなり高く推定していたということは考えにくいと思われる。

耐性菌選択後の優勢維持率に関してはデータがないので早急に同一動物をトレースする実験の計画が望まれる。コリスチン使用量の減少に伴う *mcr* 保有コリスチン耐性菌分離率の変化については、イギリスではコリスチン使用中止 20 か月後の農場からの *mcr* の消失が報告されている⁶⁾。イギリスでは *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌のアウトブレイクが当該農場のみで終息しており、これ以上の疫学的知見はない。スペインにおいては、コリスチン使用の減少に伴い、豚糞便由来サンプル中コリスチン耐性菌分離率は 2015 年の 60% (40 サンプル中 24 サンプル) から 2017 年の 35% (14/40) に、PCR による糞便サンプルの *mcr*-1 検出率は 2015 年の 70% から 2017 年には 53% に減少している⁷⁾。*mcr* の伝達やプラスミド中での維持頻度については全ゲノム解析から、プラスミドそのもののタイプやサイズに影響を受けることが報告されている⁸⁾。わが国の肉豚集団における *mcr* 保有菌の分布は、イギリスとスペインの例から考えると減少していくことが予想される。本事業で実施したリスク評価の結果では、いくつかの想定速度での *mcr* の消失による影響がこれに当たるが、この速度は現時点では正確に推定することは出来ない。なぜならば、参考にしたスペインでは EU 域内であるためコリスチン含有飼料添加物は給与していない状況で 2016 年にさらにコリスチン使用の自粛をしているため、日本でのコリスチン使用量低下と必ずしも一致しないからである。日本では 2018 年のコリスチン使用に関するリスク管理措置後時間が経過していないため、本報告書執筆段階では販売量の公表がされておらず、スペインのコリスチン使用量低下と連動した計算はまだ実施出来ない。

農場内での *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌の消失のモデル化については、農場内の数理モデルの作成が必要である。フランスで *mcr* 伝達の数理モデルが公表されている¹⁰⁾ことから日本での応用も短期間で可能であると考えられる。

リスク管理措置について、リスク評価の結果から、細菌性下痢症発生頻度の抑制とコリスチン使用頻度および使用量の抑制が短期的にも効果があることが明らかとなった。特にコリスチンによる治療では、豚房毎の治療といった治療方法の工夫によりコリスチンへの暴露を受ける豚の割合を抑えることで効果的に *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚の割合が減少することが明らかとなったことは、農場でのコリスチン使用の選択肢を残す上で有用な知見であったと考えられる。本研究で作成したモデルの応用という観点からは、大腸菌ワクチンの使用と治療頻度の減少については効果の定量的推計は可能であるが、より詳細な農場内衛生対策の効果予測には前述のとおり限界がある。

本リスクモデルの評価では短期的な変化を予測するため、2018 年度の結果にも見られるように、一見リスク管理措置の効果がないような印象を与えかねない。しかしながら、実際飼料添加物は使用されなくなったことで農場からの *mcr* の消失が進むことが予想されるため、農場衛生対策の向上の強化と、治療時のコリスチン使用頻度・量の抑制により、数年後には出荷直前の *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌優勢豚の割合は確実に減少していると推測する。

本研究では発生リスクのみ実施しており、食品安全委員会のリスク評価書¹¹⁾に記載されている食品の生産から流通、喫食、環境由来細菌の介在など複雑な経路を考慮した定量的健康影響リスク評価には至っていない。実験に基づく研究成果は本研究班からも多く上がっているので、統合的かつ定量的なリスク評価を検討することも重要と考えられる。

結論として、現在日本ではと畜場に出荷される肉豚の約 5%で *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性大腸菌が腸管内で優勢であり、農場でのリスク管理には、大腸菌ワクチンの使用も含めたコリスチン適応症発生頻度の減少と、臨床現場でのコリスチン使用方法の工夫も含めたさらなる使用量の低減が有効である。今後豚における *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性菌検出率のモニタリングと、ゲノムレベルでの解析によるより正確な伝達様式の解明が重要であると考えられた。

参考文献

1. Kawanishi M, Kijima M et al. (2017) Prevalence of colistin resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food-producing animals in Japan. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 61(1): e02057-16.
2. 寺門誠致・畦地速言・大前憲一・小山敬之・二宮幾代治・柏崎守 (1972) 経口投与による硫酸コリスチンの豚体内分布と腸管内大腸菌数の経時的推移について. 第 73 回日本獣医学会記事.
3. Carroll LM, Wiedman M, et al. (2019) Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate using a combination of high-throughput, in silico screening and functional analysis. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/539361>.
4. The R Foundation. (2019) The R Project for Statistical Computing. [<https://www.r-project.org/>]
5. Delignette-Muller ML, Dutang C. (2019) Package ‘fitdistrplus’. [<https://cran.r-project.org/web/packages/fitdistrplus/fitdistrplus.pdf>]
6. Duggett NA, Anjum MF, et al. (2018) Molecular epidemiology of isolates with multiple *mcr* plasmids from a pig farm in Great Britain: the effects of colistin withdrawal in the short and long term. *J. Antimicrob. Chemother.* 73: 3025-3033.
7. Miguela-Villoldo P, Ugarte-Ruiz M, et al. (2019) National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. *Res. Vet. Scie.* 123: 141-143.
8. 目見田清・菊池正健・大澤哲也・山崎勝・藤岡一彦・田中博・山崎伸二・竹田美文 (1991) 豚浮腫病由来大腸菌の Vero 毒素産生性. *日獣会誌* 44: 1167-1171.

9. 川嶋和晴・影山実・伊藤謙一・加藤三郎・溝口徹・土屋守（1997）豚大腸菌性腸管毒血症の集団発生例. 日獣会誌 50: 80-91.
10. Mourand G, Andraud M, Jouy E, Chauvin C, Le Devendec L, Paboeuf F, Kempf I. (2019) Impact of colistin administrated before or after inoculation on the transmission of a *mcr-1* colistin-resistant *Escherichia coli* strain between pigs. Vet. Microbiol. 230, 164-170.
11. 食品安全委員会. (2017) 家畜に使用する硫酸コリスチンに係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価.

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）

なし。

1. Contribution of Novel Amino Acid Alterations in PmrA or PmrB to Colistin Resistance in *mcr*-Negative *Escherichia coli* Clinical Isolates, Including Major Multidrug-Resistant Lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and Non-x.

Sato T, Shiraishi T, Hiyama Y, Honda H, Shinagawa M, Usui M, Kuronuma K, Masumori N, Takahashi S, Tamura Y, Yokota SI.

◎ Antimicrob Agents Chemother. 2018 Aug 27;62(9). pii: e00864-18. doi: 10.1128/AAC.00864-18. Print 2018 Sep.

PMID: 29914952

2. Isolation of a *mcr-I*-harbouring *Escherichia coli* isolate from a human clinical setting in Sapporo, Japan.

Sato T, Fukuda A, Usui M, Shinagawa M, Shiraishi T, Tamura Y, Takahashi S, Yokota SI.

◎ J Glob Antimicrob Resist. 2018 Jun;13:20-21. doi: 10.1016/j.jgar.2018.02.010. Epub 2018 Feb 21. No abstract available.

PMID: 29476984

3. High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3*, and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan.

Fukuda A, Sato T, Shinagawa M, Takahashi S, Asai T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y.

◎ Int J Antimicrob Agents. 2018 51 (1). 163-164.

2 本研究を基にした学会発表の実績

1. 高柳瑳余、杉山美千代、浅井鉄夫 選択培地を用いた市販肉からのコリスチン耐性菌の分離 平成30年度 獣医学術中部地区学会 平成30年9月2日 名古屋
2. 高柳瑳余、杉山美千代、臼井 優、浅井鉄夫 コリスチン耐性菌の選択培地に添加するコリスチン濃度の検討 第161回日本獣医学会学術集会 平成30年9月11～13日 つくば市
3. 高柳瑳余、杉山美千代、浅井鉄夫 市販肉におけるコリスチン耐性菌の分布と*mcr*遺伝子保有状況 第161回日本獣医学会学術集会 平成30年9月11～13日 つくば市
4. Toyotaka Sato, Masaru Usui, Masaaki Shinagawa, Akira Fukuda, Hiroyuki Honda, Tsukasa Shiraishi, Hiroki Takahashi, Yutaka Tamura, Satoshi Takahashi, Shin-ichi Yokota. Colistin and tigecycline resistance in an epidemic clone, ST131,

Escherichia coli clinical isolates. (大腸菌臨床分離株における epidemic clone, ST131のコリスチン及びチゲサイクリン耐性). 第91回日本細菌学会総会(ポスター発表)

5. Toyotaka Sato. Molecular epidemiological analysis of antimicrobial resistant bacteria isolated from animals and human 第7回細菌学オープンセミナー(招待講演)
6. 菅原菜未・日本豚病臨床研究会・三山豪士・田村豊・蒔田浩平 (2018) わが国の養豚場におけるコリスチン使用状況. 獣医疫学会学術集会 2018 年 3 月 17 日, 東京大学.
7. 蒔田浩平・藤本悠理・三山豪士・菅原菜未・臼井優・浅井鉄夫・川西路子・田村豊 (2019) 個体ベースドモデルを用いたわが国の養豚場におけるプラスミド性コリスチン耐性大腸菌発生評価. 獣医疫学会学術集会 2019 年 3 月 16 日, 東京大学.
8. 菅原菜未・日本豚病臨床研究会・田村豊・蒔田浩平 (2019) わが国の養豚場における飼料添加物コリスチン使用中止による影響. 獣医疫学会学術集会 2019 年 3 月 16 日, 東京大学.

3 特許及び特許出願の数と概要

なし。

4 その他(各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

プラスミド性コリスチン耐性大腸菌発生評価リスクモデルの構築

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 家畜におけるカルバペネム耐性菌の出現状況を明らかにする	5	家畜におけるカルバペネム耐性菌の出現状況を明らかにした。
(2) 家畜由来腸内細菌科細菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の性状を明らかにする	5	家畜由来腸内細菌科細菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の性状について、当初の計画だった <i>mcr-1</i> だけでなく <i>mcr2, 3, 4, 5</i> まで明らかにすることができた。
(3) プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の各種細菌への伝達性状や薬剤感受性に及ぼす影響を明らかにする。また、多剤耐性性状との関連も明らかにする	5	プラスミド性コリスチン耐性遺伝子として、当初の計画に含まれていた <i>mcr-1</i> だけでなく <i>mcr2, 3, 4, 5</i> まで明らかにすることができた。

(4) コリスチン耐性菌の染色体性耐性機構について明らかにし、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子との関連を明らかにする	4	得られたコリスチン耐性腸内細菌科細菌の染色体性機構を網羅的に解析した。不明な部分も存在したが、本耐性機構の候補となる遺伝子変異を複数検出できた。
(5) 食肉由来コリスチン耐性菌の汚染状況を明らかにする	5	牛肉、豚肉及び鶏肉について、各 100 検体以上を日本中から収集し、自然耐性菌を含めコリスチン耐性菌が高率に汚染していることを明らかにした。また、 <i>mcr-1</i> 及び <i>mcr-3</i> 保有株が鶏肉と豚肉で認められ、大腸菌以外の菌種からも検出されることを明らかにした。
(6) 人由来腸内細菌科細菌でのコリスチン耐性菌の出現状況を明らかにする	5	1500 株以上の人由来腸内細菌科細菌を用いた大規模な調査を行うことができた。これまで不明だったわが国の臨床現場からのコリスチン耐性菌の出現頻度を明らかとした。
(7) コリスチン耐性菌の定着性やコリスチン治療効果についてマウス実験で明らかにする	5	これまで不明だったコリスチン耐性の獲得による生体内での増殖性・定着性・病原性の評価を詳細に解析できた。コリスチン耐性の獲得によるコリスチン治療効果への影響も明らかとした。
(8) 定量的食品健康影響評価を試みる	4	無料統計ソフト R による定量的発生評価モデルを作成し、本報告書の付録として提出する。なお、公表データの不足から、暴露評価と影響評価は実施できなかった。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	研究開始当初、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は <i>mcr-1</i> しか報告されておらず、 <i>mcr-1</i> だけを研究対象としていた。しかし、新たな遺伝子が報告されてきたことから主要な <i>mcr-1</i> ~5 を研究対象とした。また、染色体性のコリスチン耐性菌に関する試験も実施し、食品健康影響評価にあたって重要な知見を得ることができた。さらに大腸菌のみならず他の腸内細菌科細菌に関しても

		情報を集積することができた。
(2) 研究成果の有用性	5	先に食品安全委員会で実施した硫酸コリスチンの食品健康影響評価は、 <i>mcr-1</i> のみを対象としたものであった。今回の研究成果により新たなプラスミド性コリスチン耐性遺伝子のみならず染色体性コリスチン耐性大腸菌に関する評価も可能となった。さらに、コリスチン耐性菌の生体での定着性に関しても成績を出すことができ、公表情報の乏しい影響評価にも貢献するものと思われる。
総合コメント 医学関係者にも関心の深いコリスチン耐性菌に対して、獣医学と医学分野で耐性菌に関して活発に研究を実施している研究者により研究班を構成した。その結果、2年間という短期間で、最新の分子生物学技術を駆使することにより、開始当初の予想を遥かに超える成果を上げることができた。これらの成果は食品安全委員会が実施する食品健康影響評価に反映される多くの情報を含むものであった。また、これらの実験成績と既存の成績を合わせて、定量的な発生評価に結びつけることができ、大変満足のゆくものになった。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

※次のただし書を枠で囲って記載すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。