

令和 2～3 年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	食肉由来耐性菌の全ゲノムシーケンスを用いた薬剤耐性特性解析に関する研究 (課題番号：JPCAFSC20202005) (1 危害要因・ばく露実態の評価に必要な科学的知見の集約 (3) 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：川津 健太郎 所属機関：地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和 2 年度～令和 3 年度（2 年間）

2 研究目的

本研究では、国内の市販食肉および家畜から薬剤耐性菌を分離し、全ゲノムシーケンサーを用いて薬剤耐性遺伝子を含めたゲノムデータの収集を行った。得られたゲノムデータは、薬剤耐性遺伝子の網羅的解析、多剤耐性化に寄与するプラスミドや転位因子の探索、耐性菌や薬剤耐性プラスミドの系統的解析に用いた。この解析の結果により、食肉を介してヒトがばく露されうる薬剤耐性菌、その薬剤耐性遺伝子や関連するプラスミドや転位因子を明らかにするとともに、将来的な薬剤耐性菌の拡散防止対策の評価のための基礎的なデータとして活用が期待できると考えた。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
薬剤耐性菌の特性解析 に関する研究	食肉・家畜試料からの耐性菌分離 (サンプリング)	川津・河原（大阪健康安全基盤研究所） 山本（岐阜大学）、中山（広島大学）
	食肉・家畜試料からの耐性菌分離 (菌株分離)	川津・河原（大阪健康安全基盤研究所）
	細菌学的解析	川津・河原（大阪健康安全基盤研究所）
	ゲノム解析	中村（大阪大学微生物病研究所） 河原（大阪健康安全基盤研究所）

4 倫理面への配慮について

食肉から薬剤耐性菌を分離しその菌株を解析することについては、研究倫理および動物愛護上の問題はない。

本研究では家畜から採取した試料を用いることを想定しているが、食肉衛生検査所や食鳥検査センターで屠畜された家畜から採材するため、研究倫理および動物愛護上の問題はない。

本研究では、食肉および家畜由来の薬剤耐性菌とヒト由来株との比較検討のため、患者または保菌者から分離された菌株を解析に用いる可能性がある。しかしながら、解析に用いるのは菌株そのもので各々の菌株に付随する個人情報等は一切扱わないこと、また各々の菌株はすでに保有しているもので、あらためて取得するものではないことから、研究倫理上の問題はない。

以上のことから、本研究を遂行するにあたり、研究倫理および動物愛護上の問題はない。

Ⅱ 研究内容及び成果等

1 研究項目：薬剤耐性菌の特性解析に関する研究

(1) 食肉・家畜試料からの耐性菌分離

1) サンプルリング（川津・河原（大阪健康安全基盤研究所）、山本（岐阜大学）、中山（広島大学））

令和2年度より大阪府周辺地域（大阪府、奈良県、和歌山県、兵庫県）、岐阜県、さらに令和3年度より関東地域（神奈川県、東京都）をサンプルリング地域に加えて、各地域内の店舗にて市販食肉（牛肉、豚肉、鶏肉）を購入し、菌株分離のための試料とした。また、研究協力機関である大阪市食肉衛生検査所において牛・豚（直腸）・鶏（総排泄腔より直腸）、大阪府食鳥検査センターにおいて鶏（盲腸、総排泄腔より直腸）から便を採取した（家畜試料）。なお、当初の目標試料数は330試料としていたが、最終的には総計で846試料についてサンプルリングを実施した。その内訳は表1の通りである。

表1. 畜種及び地域ごとの試料数

鶏									小計
地域	東京都	神奈川県	埼玉県	岐阜県	大阪府	奈良県	和歌山県	兵庫県	
市販食肉試料数	14	17	2	18	107	12	6	3	179
家畜試料数	-	-	-	-	183	-	-	-	183
豚									小計
地域	東京都	神奈川県	埼玉県	岐阜県	大阪府	奈良県	和歌山県	兵庫県	
市販食肉試料数	14	18	2	18	78	12	6	3	151
家畜試料数	-	-	-	-	81	-	-	-	81
牛									小計
地域	東京都	神奈川県	埼玉県	岐阜県	大阪府	奈良県	和歌山県	兵庫県	
市販食肉試料数	13	18	2	18	69	12	6	3	141
家畜試料数	-	-	-	-	111	-	-	-	111

これらについて次項の菌株分離を実施した。

2) 菌株分離（川津・河原（大阪健康安全基盤研究所））

市販食肉試料については、25 g に 225 mL 緩衝ペプトン水(BPW)増菌培地を加え、 $37\pm1^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養した。サルモネラ分離用には培養後の 100 μL BPW を 10 mL ラパポート・バシリアデイス培地に添加し、 $42\pm1^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養した（2次増菌）。増菌後、耐性菌分離のための選択培地（5種類）に 10 μL を塗布し、 $35\pm1^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。発育したコロニーを、1培地あたり1～5個釣菌して分離菌株とした。また家畜試料についても同様に、5種類の選択培地に家畜試料を直接塗布し、発育コロニーを1培地あたり1～5個釣菌して分離菌株とした。分離対

象とした薬剤耐性菌及び分離培地は以下の通りである。また菌株の同定については、生化学的性状や MALDI-TOF/MS、ゲノム解析によって行なった（後述、(2)および(3)）。

- ・ ESBL 産生大腸菌・腸内細菌目細菌；セフトキシム加 CHROMagar ECC
- ・ ESBL 産生サルモネラ；セフトキシム加 CHROMagar Salmonella
- ・ カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）・カルバペネム耐性 *Pseudomonas* 属菌；
メロペネム加 CHROMagar ECC（M-ECC）
- ・ コリスチン耐性大腸菌；CHROMagar COL-APSE
- ・ VRE；バンコマイシン加 Enterococcosel Agar

研究期間を通じて新たに分離する薬剤耐性菌株は 500 株を想定していたが、それを上回る 587 株（食肉 470、家畜 117）が分離された。

表 2. 畜種ごとの対象薬剤耐性菌分離株数

鶏								
菌種	第 3 世代セファロスポリン耐性			GRE	カルバペネム耐性 <i>Pseudomonas</i> 属菌	コリスチン 耐性大腸菌	VRE	小計
	大腸菌	腸内細菌 目細菌	サルモネラ					
市販食肉試料	159	32	1	3	47	21	0	263
家畜試料	60	2	0	2	6	3	0	71
小計	219	34	1	3	53	24	0	334
豚								
菌種	第 3 世代セファロスポリン耐性			GRE	カルバペネム耐性 <i>Pseudomonas</i> 属菌	コリスチン 耐性大腸菌	VRE	小計
	大腸菌	腸内細菌 目細菌	サルモネラ					
市販食肉試料	5	57	0	2	26	6	0	96
家畜試料	6	1	0	0	0	24	0	31
小計	11	58	0	0	26	30	0	127
牛								
菌種	第 3 世代セファロスポリン耐性			GRE	カルバペネム耐性 <i>Pseudomonas</i> 属菌	コリスチン 耐性大腸菌	VRE	小計
	大腸菌	腸内細菌 目細菌	サルモネラ					
市販食肉試料	0	70	0	0	25	0	0	95
家畜試料	10	0	0	0	0	5	0	15
小計	10	70	0	0	0	5	0	110

分離された主な耐性菌の試料ごとの陽性率は表3～8の通りであった。

- 表3. 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌

	全体	鶏	豚	牛
食肉	25.5 % (120/471)	64.2 % (115/179)	3.3 % (5/151)	0 % (0/141)
家畜	15.2 % (57/375)	24.0 % (44/183)	7.4 % (6/81)	6.3 % (7/111)

なお、家畜試料の鶏について、ブロイラー(63試料)と廃鶏(120試料)で区別して集計した時の陽性率はそれぞれ57.1%、6.7%となり、ブロイラーの保菌率が高いことが示唆された。

- 表4. 第3世代セファロスポリン耐性腸内細菌目細菌

	全体	鶏	豚	牛
食肉	31.0 % (146/471)	15.6 % (28/179)	35.8 % (54/151)	45.4 % (64/141)
家畜	0.8 % (3/375)	1.6 % (3/183)	0 % (0/81)	0 % (0/111)

- 表5. コリスチン低感受性～耐性*大腸菌

	全体	鶏	豚	牛
食肉	4.7 % (22/471)	11.2 % (20/179)	1.3 % (2/151)	0 % (0/141)
家畜	4.8 % (18/375)	1.1 % (2/183)	16.0 % (13/81)	2.7 % (3/111)

*MIC 値(μg/mL) ; コリスチン ≥ 2

- 表6. カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)

	全体	鶏	豚	牛
食肉	1.5 % (7/471)	2.2 % (4/179)	1.3 % (2/151)	0.7 % (1/141)
家畜	0.5 % (2/375)	1.1 % (2/183)	0 % (0/81)	0 % (0/111)

- 表7. カルバペネム低感受性～耐性**Pseudomonas* 属菌

	全体	鶏	豚	牛
食肉	19.3 % (91/471)	23.5 % (42/179)	17.2 % (26/151)	16.3 % (23/141)
家畜	0.8 % (3/375)	1.6 % (3/183)	0 % (0/81)	0 % (0/111)

*MIC 値(μg/mL) ; イミペネム ≥ 4 またはメロペネム ≥ 4 またはセフトアジジム ≥ 16

● 表 8. 第 3 世代セファロスポリン耐性サルモネラ

	全体	鶏	豚	牛
食肉	0.2 % (1/471)	0.6 % (1/179)	0 % (0/151)	0 % (0/141)
家畜	0 % (0/375)	0 % (0/183)	0 % (0/81)	0 % (0/111)

なお研究期間を通じて、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）は、食肉試料・家畜試料いずれからも分離されなかった。

（2）細菌学的解析（川津・河原（大阪健康安全基盤研究所））

（1）で分離した耐性菌 587 株は、生化学的性状や MALDI-TOF/MS を用いて菌種同定を行った後（表 9）、微量液体希釈法による薬剤感受性試験およびディスク法などによる薬剤耐性機構の鑑別等を実施した。また、各菌株は LB 液体培地にて培養した後、菌体を遠心・洗浄・加熱処理し、（3）ゲノム解析のための試料とした。

表 9. 畜種及び試料由来ごとに分離された菌種

	鶏		豚		牛		総計
	市販食肉	家畜	市販食肉	家畜	市販食肉	家畜	
大腸菌	180	63	11	30	0	15	299
腸内細菌目細菌	34	2	59	1	71	0	167
<i>Rahnella aquatilis</i>	2		26		48		76
<i>Hafnia alvei</i>	1		7		7		15
<i>Serratia fonticola</i>	3		10		2		15
<i>Citrobacter freundii</i>	5		4		2		11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	2		1			11
<i>Citrobacter braakii</i>	2		3		4		9
<i>Enterobacter cloacae</i>	3		1		2		6
<i>Serratia liquefaciens</i>	2		4				6
<i>Enterobacter asburiae</i>	1				3		4
<i>Serratia proteamaculans</i>	3						3
<i>Lelliottia amnigena</i>			1		2		3
<i>Obesumbacterium proteus</i>			1		1		2
<i>Klebsiella variicola</i>	2						2
<i>Yersinia enterocolitica</i>			1				1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1						1
<i>Citrobacter werkmanii</i>			1				1
<i>E. fergusonii</i>	1						1
<i>Pseudomonas</i> 属菌	47	6	26	0	25	0	104
<i>Pseudomonas protegens</i>	16		9		5		30
<i>Pseudomonas koreensis</i>	3	2	10		8		23
<i>Pseudomonas sp.</i>	6	1	6		2		15
<i>Pseudomonas otitidis</i>	14						14
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	1			5		8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6				2		8
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>		2	1		1		4
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>					1		1
<i>Pseudomonas rhodesiaescens</i>					1		1
サルモネラ	1	0	0	0	0	0	1
その他*	10	0	2	0	4	0	16
総計	272	71	98	31	100	15	587

* *Aeromonas* 属菌(15)、*Shewanella putrefaciens*(1)

- 表 10. 食肉由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌・腸内細菌目細菌（株数）

(表現型)	大腸菌				その他腸内細菌目細菌			
	ESBL	ESBL/AmpC	AmpC	不明	ESBL	ESBL/AmpC	AmpC	不明
鶏肉	122	3	34	0	13	5	13	1
豚肉	4	0	1	0	30	6	15	6
牛肉	0	0	0	0	50	0	14	6
計	126	3	35	0	93	11	42	13

表 10 に示す通り、食肉から分離された第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌及び腸内細菌目細菌は ESBL 表現型を示すものがもっとも多く、AmpC 表現型や ESBL/AmpC 複合型を示すものもあった。食肉の種類別では、第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌は、ほとんどが鶏肉から分離されたが、第 3 世代セファロスポリン耐性腸内細菌目細菌については、牛肉や豚肉からも多く分離された。これらの第 3 世代セファロスポリン耐性腸内細菌目細菌は、*Rahnella aquatilis* や *Serratia fonticola* といった ESBL に類似した β -ラクタマーゼを生来保有する菌種が半数以上を占めていたのが特徴的であった。また、第 3 世代セファロスポリン耐性の *Salmonella* Infantis が 1 株分離され、薬剤耐性の表現型は AmpC 型であった。

- 表 11. 家畜由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌・腸内細菌目細菌（株数）

(表現型)	大腸菌				その他腸内細菌目細菌			
	ESBL	ESBL/AmpC	AmpC	不明	ESBL	ESBL/AmpC	AmpC	不明
鶏	40	3	15	0	2	0	0	0
豚	1	1	4	0	1	0	0	0
牛	9	1	0	0	0	0	0	0
計	50	5	19	0	3	0	0	0

第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌及び腸内細菌目細菌は、食肉と同様に ESBL 表現型が多く、また、鶏由来株が多い傾向が見られた。ESBL 型を示した腸内細菌目細菌は 3 株とも *Klebsiella pneumoniae* であった。

- 表 12. 食肉及び家畜由来コリスチン低感受性～耐性大腸菌（株数）

	鶏	豚	牛
食肉	20	2	0
家畜	2	24	2

CHROMagar COL-APSE で分離されたコリスチン低感受性～耐性大腸菌 (MIC 値 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$) は、食肉由来 22 株、家畜由来 28 株であった。動物別では、食肉試料では鶏肉が最も多かったが、家畜試料では豚が最も多く、異なる傾向を示した。

また、カルバペネム耐性菌分離用培地である M-ECC で、*E. cloacae* complex (2 株、鶏肉及び牛肉)、*Hafnia alvei* (2 株、豚肉)、*Raoultella ornithinolytica* (1 株、鶏肉)、大腸菌 (2 株、鶏) の 7 株のカルバペネム耐性腸内細菌目細菌が分離された。他に、カルバペネム低感受性～耐

性を示す *Shewanella* 属菌 1 株、*Pseudomonas* 属菌 104 株（うち家畜由来 4 株）、*Aeromonas* 属菌 15 株が分離された。

（3）ゲノム解析（中村（大阪大学微生物病研究所）、河原（大阪健康安全基盤研究所））

（1）で分離した 587 株及び 2009 年食肉試料由来 165 株のゲノム解析用試料から多検体用自動抽出機を用いて DNA を抽出した。さらに抽出した DNA からライブラリを調整し、DNBSEQ-G400 (MGI 社) にて各菌株のゲノムデータを取得した。得られたデータから、アセンブリソフトウェア (Unicycler 等) を用いてドラフトゲノムを構築した。752 株（食肉由来 470 株、家畜由来 117 株、2009 年分離食肉由来 165 株）についてゲノムデータを取得し、MLST 解析および kraken2 を用いて菌種の検索及び系統解析を行った。さらに、ABRicate ソフトウェアを用いて、薬剤耐性遺伝子の検出等の解析を行った。別添の別表 1～3 に由来動物種別に検出されたセファロスポリン耐性遺伝子 (*bla*)、別表 4 にコリスチン耐性遺伝子 (*mcr*)、別表 5 に分離大腸菌における各抗菌薬耐性関連遺伝子（アミノグリコシド、キノロン（プラスミド性）、サルファ・トリメトプリム、テトラサイクリン、フェニコール、ホスミシン）の検出結果を示した。

- 別表1. 鶏由来セファロスポリン耐性遺伝子 (*bla*) の検出結果
- 別表2. 豚由来セファロスポリン耐性遺伝子 (*bla*) の検出結果
- 別表3. 牛由来セファロスポリン耐性遺伝子 (*bla*) の検出結果
- 別表4. コリスチン耐性遺伝子 (*mcr*) の検出結果
- 別表5. 分離大腸菌における各抗菌薬耐性関連遺伝子の検出結果

第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌からは、*bla*_{CTX-M-2, 14, 55, 15} や *bla*_{SHV-12}、*bla*_{TEM-20} 等の ESBL 遺伝子、*bla*_{CMY-2} の AmpC 遺伝子が検出され、いずれも国内で検出報告のあるタイプであった。また、第 3 世代セファロスポリン耐性のサルモネラ (6 株、2009 年分離株含む) は *bla*_{CMY-2}、*bla*_{CTX-M-2}、*bla*_{TEM-106} を保有していた。食肉から分離された CRE 株については、セファロスポリナーゼは保有していたがカルバパネマーゼ遺伝子は検出されず、カルバペネマーゼ非産生型 CRE であることが示唆された。

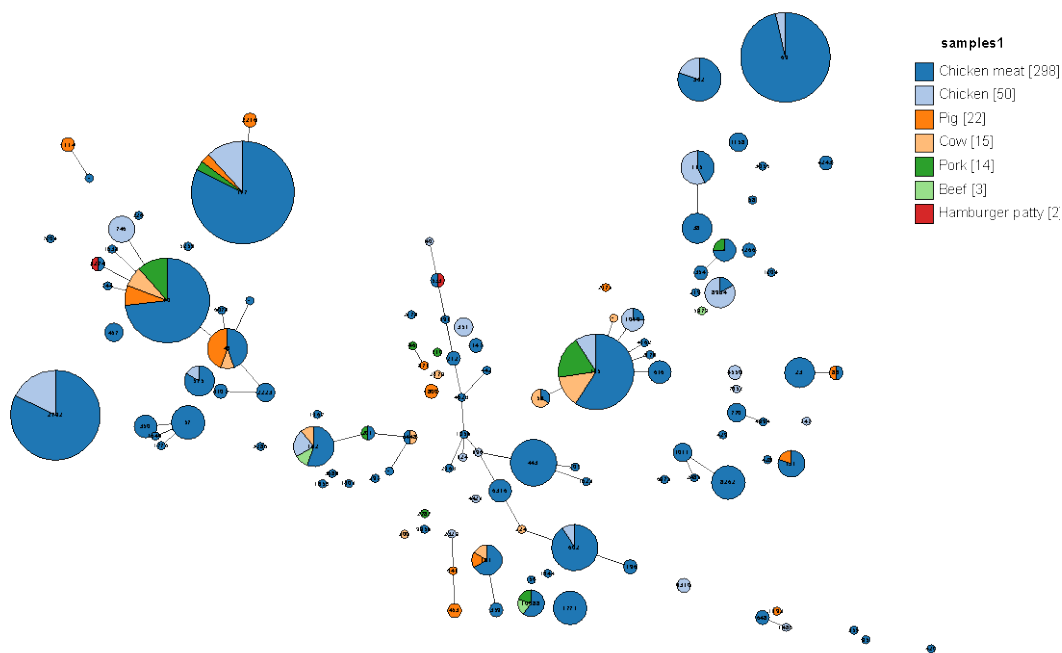


図 1. MLST に基づく大腸菌の Minimum Spanning Tree (試料由来別)

大腸菌について、GrapeTree を用いて MLST に基づく Minimum Spanning Tree を作成した（上図）。系統と由来（家畜・食肉）の関連性については、同じ系統の中に由来が混ざり合っていることから、家畜～食肉で関連した薬剤耐性大腸菌が広がっていることが示唆された。

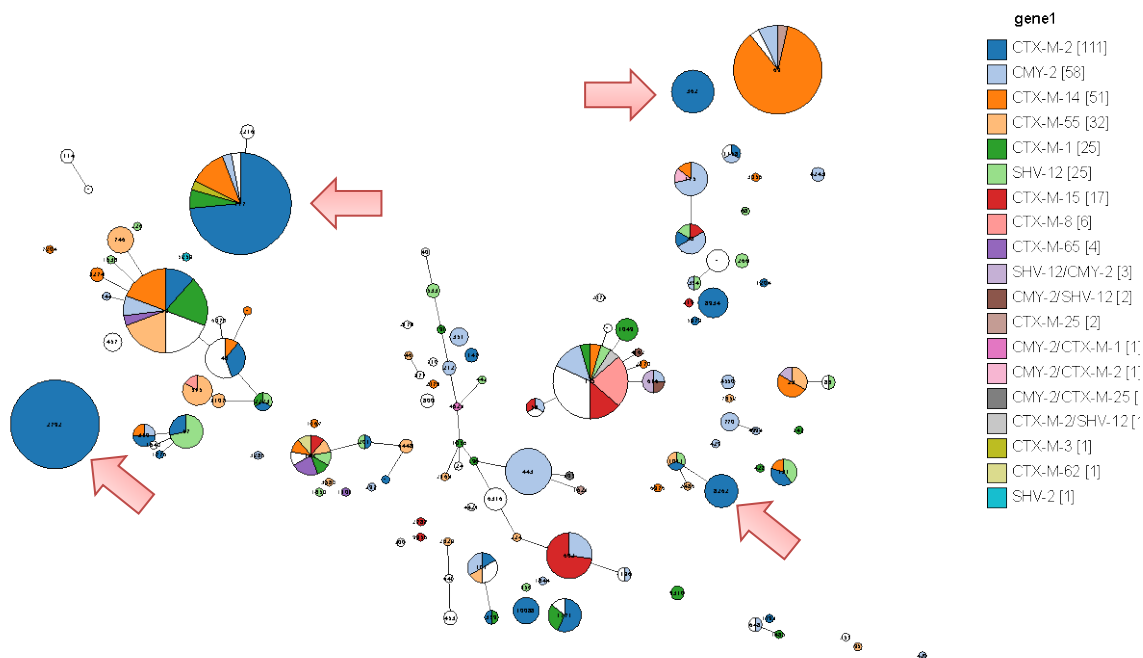


図 2. MLST に基づく大腸菌の Minimum Spanning Tree (セファロスポリナーゼ遺伝子別)

先の図 1 について、検出されたセファロスポリナーゼ遺伝子色分けして表示させると、いくつかの遺伝子型、特に *bla*_{CTX-M-2} において MLST 型との相関性が示唆された（図 2）。緑色矢印で示

した ST2792 は 28 株で、これらのゲノムデータから *bla*_{CTX-M-2} を含む配列を抽出して検討したところ(図 3)、周辺遺伝子の構造が似通っていることが明らかとなった。



図 3. ST2792 型大腸菌の保有する *bla*_{CTX-M-2} 周辺構造の比較

このことは、*bla*_{CTX-M-2} は染色体上に存在することを強く示唆しており、126 株から ST 型及び *bla*_{CTX-M-2} 周辺構造の違いに基づき 15 株を選択し、ロングリードシーケンサー (MinION、Nanopore 社) による全ゲノム配列の決定を試みた。その結果、同じ ST 型で集団を構成する株は、染色体上に *bla*_{CTX-M-2} を保有していることが明らかとなった。

一方で、東南アジアを中心として報告の多い *bla*_{CTX-M-55} については、MLST 型が多様であったため、プラスミド上に存在することが示唆された。同様に、26 株から 6 株を選択しロングリードシーケンサー (MinION、Nanopore 社) による全ゲノム配列の決定を試みたところ、構築したプラスミド配列上に *bla*_{CTX-M-55} が存在していることが明らかとなった (図 4)。これらのプラスミドの構造は異なっており、同時にフェニコール耐性 (*florR*)、テトラサイクリン耐性 (*tetA*)、アミノグリコシド耐性 (*aac(6')-Ib*, *aadA*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*)、ST 耐性 (*su12*, *drfA*)、キノロン耐性 (*qnrS2*) を持つ「多剤耐性プラスミド」も検出された (図 4B)。これらの耐性遺伝子はトランスポゾンやインテグロンといった「Mobile genetic elements (MGE)」を介してプラスミドに組み込まれており、こういったプラスミドそのものや MGE が多剤耐性化に寄与していることが示唆された。

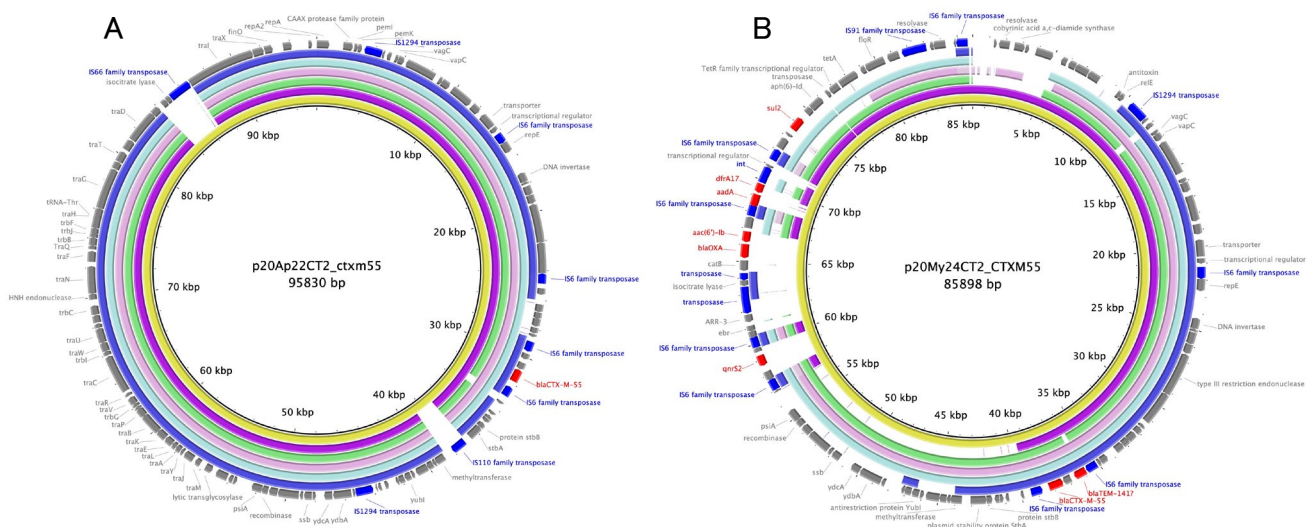


図 4. *bla*_{CTX-M-55} 保有プラスミドの構造比較

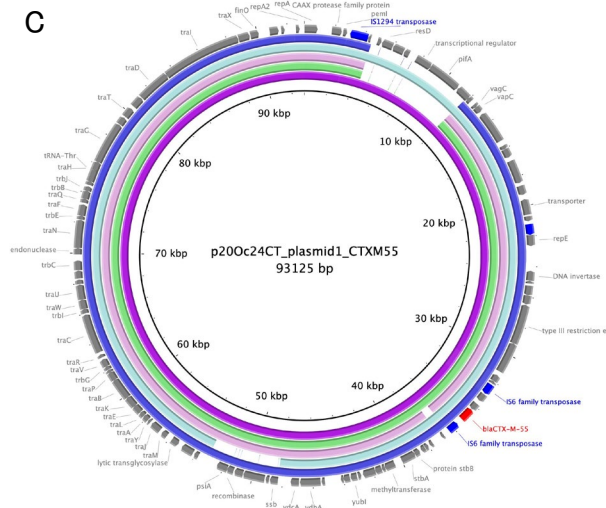


図 4. *bla*_{CTX-M-55} 保有プラスミドの構造比較

コリスチン耐性大腸菌については、コリスチン耐性遺伝子である *mcr-1.1* が 43 株で検出された。*mcr-1* は伝達性プラスミドによって世界中に拡散していることが報告されているが、一部染色体上に組み込まれている株も報告がある。今回分離した菌株については、MLST 型が多様であること、一部菌株の解析の結果から、*mcr-1.1* はプラスミド上にあることが示唆された。また、2009 年に食肉から分離した ESBL 陽性大腸菌 5 株からは *mcr-5.1*、牛由来 2021 年分離株でコリスチンの感受性は低いものの (MIC 値 : 1 µg/mL)、*mcr* 様遺伝子が検出されており、これらについてはさらに解析が必要である。

別表 5 に示したように、その他のアミノグリコシド、ST 合剤 (サルファ剤・トリメトプリム合剤)、テトラサイクリン、フェニコール系薬剤に対する耐性遺伝子が多数検出された。ST 合剤では *sul2*、テトラサイクリンでは *tet (A)* 及び *tet (B)*、フェニコールでは *floR* が多い傾向であった。いずれも 2009 年の食肉試料由来株や今回の家畜試料由来株でも検出されており、国内に拡散・定着した耐性遺伝子であることが推測された。一方、検出数は少ないものの、プラスミド性キノロン耐性遺伝子である *qnrS* やホスミシン耐性遺伝子である *fosA* が検出されており、特にホスミシンはヒトの下痢症で第一選択とされる薬剤であることから、今後の動向に注意が必要と考えられた。

他に検出された特徴的な耐性遺伝子について以下に示す。これらについてもさらに詳細な解析を今後行いたいと考えている。

- *bla*_{IMP-6} (カルバペネマーゼ遺伝子) *K. pneumoniae* 2009 年合挽きミンチ由来
- *bla*_{POM-1} (カルバペネマーゼ遺伝子) *P. oitidis* 鶏肉、豚肉由来
- *bla*_{POM-2} (カルバペネマーゼ遺伝子) *P. oitidis* 鶏肉由来
- *bla*_{Oxa-252} (カルバペネマーゼ遺伝子) *Shewanella* 属菌 鶏肉由来
- *bla*_{SPR-1} (カルバペネマーゼ遺伝子) *Serratia*・*Pseudomonas* 属菌 食肉由来

ゲノムデータの解析に関連し、ロングリードシーケンサー (MinION、Nanopore 社) の活用について検討を行った。簡易な DNA 抽出法と MinION によるデータ取得および専用解析サーバを組み合わせ、リアルタイムかつ迅速な薬剤耐性菌の解析を行うことができるシステムとして試験運用を行った。現在の方法では、一部の菌種でシーケンスが動かなかったため、さらに改善が必要だと考えられた。

(4) その他(川津・河原(大阪健康安全基盤研究所)、山本(岐阜大学))

VRE(2008~2017年、28株)およびベトナムまたはエクアドル由来コリスチン耐性大腸菌の一部について、ゲノム解析を実施した。

VREについては、ゲノムデータを取得して、食肉由来株と大阪府内の医療機関で流行しているVREとの比較検討を行った。現在の流行株は、その耐性遺伝子である *vanA* の搭載プラスミドの構造に特徴があり、今回取得した DNBSEQ-G400 データをそのプラスミド配列に対してマッピングしたところ、*vanA* と周辺遺伝子のみマッピングされた。このことから、食肉から検出されたVREと現在の流行株とは特に関連性がないことが明らかとなった。

ベトナムまたはエクアドル由来コリスチン耐性大腸菌については、染色体上に *mcr-1.1* を保有する株やプラスミド上に複数の *mcr-1.1* を保有する株が見つかっており、それらについてさらに解析を行なっている。また、ベトナムでは *mcr-3* が検出されているが、本研究の国内分離株からは見つからなかった。

2 研究全体の成果、考察及び結論

市販食肉及び家畜試料からの薬剤耐性菌検出状況は、全体として食肉の方が多く検出され、特に鶏肉においてESBLを主とする第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の検出率が高かった(64.2%)。一方、第3世代セファロスポリン耐性腸内細菌目細菌の検出率は同様に食肉で高かったものの、*Rahnella aquatilis* や *Serratia fonticola* がといった生来耐性を保有する菌種が多数であった。コリスチン耐性大腸菌の検出率は高くはなかったものの、鶏肉と豚で10%を超えていた。

分離株からゲノムデータを取得し、網羅的な薬剤耐性遺伝子の検出やMLST解析を実施した。MLSTによる薬剤耐性大腸菌の系統解析の結果から、ST131など人への病原性が高いとされるものは少数であった。また、家畜・食肉それぞれの由来株が同じMLST型に含まれることから、分離された薬剤耐性菌は相互に関連していることが示唆された。

第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の耐性遺伝子で最も検出数が多かったのは *bla_{CTX-M-2}* で、ゲノム解析の結果からその多くが染色体上にコードされていることが示唆された。このことから、*bla_{CTX-M-2}* がプラスミドを介して広く拡散するリスクは低いものと考えられた。

一方、*bla_{CTX-M-55}* はプラスミドにコードされているものが主要であることが示唆され、さらに同じプラスミド上に多数の薬剤耐性遺伝子を持っているものも検出された。コリスチン耐性大腸菌からは *mcr-1.1* が検出され、家畜におけるコリスチン使用禁止以降もこの耐性遺伝子が保持・定着していること、またプラスミド上にコードされていることなどが示唆されるデータを得ることができた。こういった薬剤耐性プラスミドの存在は、伝達による耐性遺伝子拡散のリスク、また多剤耐性化のリスクとなりうると考えられた。

以上の結果は、多くの家畜及び食肉試料数、分離した薬剤耐性菌株の解析結果に基づくものであり、現在の薬剤耐性菌の浸潤状況や薬剤耐性遺伝子の分布についての基礎データとして有用であると考えられた。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

なし。

2 本研究を基にした学会発表の実績

第 32 回日本臨床微生物学会総会・学術集会「CHROMagar COL-APSE を用いた食肉からのコリスチン耐性菌の分離について」、山口貴弘、河原隆二、中村昇太、元岡大祐、山本容正、川津健太郎（2021）

第 50 回薬剤耐性菌研究会「国産食肉からの薬剤耐性菌の分離状況とゲノム解析について」、山口貴弘、河原隆二、原田哲也、若林友騎、中村昇太、元岡大祐、松本悠希、中山達哉、山本容正、川津健太郎（2021）

3 特許権等の出願・申請等の状況

なし。

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

なし。

5 その他（各種受賞、プレスリリース等）

なし。

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) 市販食肉および家畜試料から薬剤耐性菌を分離し、菌種同定や抗菌薬に対する感受性試験などの解析を実施する。	5	サンプリングについては滞りなく実施しており、特に関東地域での食肉サンプルを増やすことができた。家畜試料についても、サンプル数を十分に得ることができた。また、目標数を超える耐性菌を分離、解析することができた。
(2) 分離した薬剤耐性菌について、全ゲノムシーケンスを行い、薬剤耐性遺伝子の網羅的検出を行う。	4	分離菌株のゲノムデータの取得から耐性遺伝子の検出までのワークフローにはほぼ問題なく実施することができた。研究協力機関がコロナ流行の影響を受けたため、一部の菌株解析が遅延したが、当初の目標を達成できた。
(3) 全ゲノムデータから薬剤耐性遺伝子のロケーションや周囲の遺伝的構造を調べ、多剤耐性化に寄与するプラスミドや転位因子の存在を明らかにする。	3	特に注目される耐性遺伝子 (<i>bla_{CTX-M-2}</i> 等) について、その周辺構造の解析や全ゲノム構造の決定などを実施した。菌株数が多数に及ぶため、詳細な解析が一部にとどまっており、今後継続して進めていきたい。
(4) 全ゲノムデータから分離した薬剤耐性菌・薬剤耐性プラスミドの系統的解析を行う。また、保有する過去および海外由来の分離株や公開されているヒト・家畜等由来株データとの関連性の検討を行う。	3	解析データが得られたものについて、MLST 解析やプラスミド解析を実施した。家畜～食肉ではそれぞれの耐性菌に関連性があることが示唆された。また、プラスミドを介して広がっていると思われた ESBL 遺伝子が染色体上に存在することが明らかとなった。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

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	4	耐性菌の分離・解析、ゲノムデータの取得は予定通り達成できた。より詳細な解析がさらに必要だと考えている。
(2) 研究成果の有用性	4	現時点での食肉由来耐性菌のデータが多数得られており、将来的な基礎データとなることが明らかになることが期待できる。
総合コメント 食肉および家畜由来耐性菌の分離・解析、ゲノムデータを多数蓄積することができた。今後さらなる解析を進めることが必要と考える。		

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。

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。