

研究課題名 (研究項目名)	養殖水産動物における薬剤耐性指標細菌の設定及びモニタリングの試行 (課題番号：JPCAFSC20232303) (4 その他 研究者からの提案に基づく研究)
主任研究者	研究者名：臼井 優 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

令和5年度～令和6年度（2年間）

2 研究目的

養殖水産動物に対して抗菌薬（マクロライド系抗生物質(ML)、テトラサイクリン系抗生物質(TET)、スルホンアミド系合成抗菌薬(SUL)）が使用されるため、養殖水産動物への抗菌薬の使用により選択される薬剤耐性菌の健康影響評価が必要とされている。しかし、抗菌薬の使用と養殖水産動物由来細菌(特に健康魚由来細菌)の薬剤感受性に関する情報は圧倒的に不足している。また、指標となる細菌の設定は国際的にもなされていない。こうした中、国内では、食品安全委員会薬剤耐性菌ワーキンググループにおいて、試行的にブリ類にMLを使用した場合に選択される薬剤耐性菌の食品健康影響評価が行われ、指標菌の選定を含めた評価手法の検討が行われたところである。

研究代表者らは、過去（2021～2022年）の調査において市販海産物（85検体）からグラム陰性菌である *Vibrio* 属菌（45検体由来276株）及び *Aeromonas* 属菌（29検体由来108株）を分離し、薬剤感受性試験を実施した結果、これら在水産食品における薬剤耐性の指標細菌として用いることができる可能性を示した。一方で、指標となるグラム陽性菌は検討できていない。

そこで今回の研究課題では、市販養殖魚及び天然魚におけるグラム陽性菌 (*Lactococcus garvieae*) 及びグラム陰性菌 (*Vibrio* 属菌及び *Aeromonas* 属菌) の分離率、薬剤感受性及び薬剤耐性遺伝子の保有状況を明らかにし、食品健康影響評価に活用可能なばく露評価に関する情報を収集することを1つ目の目的とした。なお、市販魚の購入に際して得られる情報（養殖/天然や原産地域）を踏まえて、得られた結果を分析し、食品健康影響評価の改善に資する提言をまとめた。また、水産食品を介した食中毒の主要原因となる *Vibrio* 属菌について、腸炎ビブリオ食中毒の主な原因菌種である *V. parahaemolyticus* 及び *V. vulnificus* の構成比率を明らかにすると共にその薬剤耐性に関する情報も取得した。2つ目の目的として、養殖水産動物における抗菌薬の使用実態並びに海外先進地域及び日本との関連が強いアジア地域での抗菌薬使用と耐性菌モニタリングについての情報を収集し、情報を整理した。以上のデータをもとに、発生評価における課題の検討を含め定量的リスク評価を試みた。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
総括	研究総括	臼井優（酪農学園大学）
市販養殖魚及び天然魚由来細菌の薬剤耐性の解明	市販養殖魚及び天然魚由来 <i>Lactococcus garvieae</i> のマクロライド系抗生物質に対する薬剤感受性解明	臼井優、福田昭（酪農学園大学）、浅井鉄夫（岐阜大学）
	市販養殖魚及び天然魚由来 <i>Vibrio</i> 属菌及び <i>Aeromonas</i> 属菌の薬剤感受性の解明	
	抗菌性物質を養殖魚に使用した際に選択される薬剤耐性菌の評価への提言の検討	
養殖場における抗菌薬や使用状況調査	日本の養殖場における抗菌薬や使用状況調査	蒔田浩平（酪農学園大学）
	アジアの養殖水産動物への抗菌薬使用と耐性菌モニタリングに関する情報収集	
養殖水産動物での薬剤耐性菌の定量的リスク評価	養殖水産動物での薬剤耐性菌の定量的リスク評価	

4 倫理面への配慮について

本研究課題においては、倫理面への配慮が必要となる研究項目は該当せず、適切に対応した。加えて、動物実験は実施されなかった。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目

(1) 研究総括（臼井優（酪農学園大学））

各研究課題の進捗状況を把握し、計画的に研究が進行するように研究の総括を行った。

採択決定後、令和5年4月にZoomによるオンライン会議を開催し、研究課題の方向性等についての確認を行った。

令和5年7月に、東京 食品安全委員会事務局において、対面の会議を開催し、4～6月までの細菌の分離状況を基に年間を通した分離法の確認を行なった。この会議において、*Vibrio* 属菌と *Aeromonas* 属菌については、培地の種類を2種類から1種類に絞って実施することが決定された。

令和5年9月にメール会議を行い、*Lactococcus* 属菌の分離についても、分離に用いる培地を2種類から1種類に絞る方向性を確認した。

令和6年2月に東京 食品安全委員会事務局において、対面の会議を開催し、1年目の進捗状況の確認及び2年目のとり進め方について確認が行われた。

令和6年7月に東京 食品安全委員会事務局において、対面の会議を開催し、全ゲノム解析の対象となる株の選定、リスク評価の方向性などについて議論、情報交換を行い最終班会議への方向性を確認した。

令和7年2月に東京 食品安全委員会事務局において、対面の会議を開催し、2年間の事業の成果について報告し、最終報告書に記載する内容の方向性についての確認を行なった。

(2) 市販養殖魚及び天然魚由来細菌の薬剤耐性の解明

ア. 市販養殖魚及び天然魚由来 *Lactococcus garvieae* のマクロライド系抗生物質に対する薬剤感受性解明 (白井優、福田昭 (酪農大)、浅井鉄夫 (岐阜大))

研究内容・方法

複数の小売店において、国産加熱用(非冷凍)ブリ類(ブリ、ハマチ)、マダイを R5 年 4 月から R6 年 4 月の期間に、合計 490 検体(表 1)(酪農大 240 検体、岐阜大 250 検体)購入し、*Lactococcus garvieae* の分離を行った。

表 1. 本試験において購入し使用したサンプル

検体数	ブリ類	(ブリ類内訳)		マダイ	合計
		ブリ	ハマチ		
天然	118	100	18	59	177
養殖	201	188	13	112	313
合計	319	288	31	171	490

最初に、*L. garvieae* の分離方法の検討を行うため、R5 年 4 月から R5 年 9 月までに購入した 190 検体について、以下の方法による分離を行った。すなわち、購入した検体の可食部位 25 g を切り出し、225 mL のバッファードペプトン水と共にストマッキング(200rpm、1 分)後、30°C で 24 時間培養した。培養液について白金耳を用いて、Mitis Salivarius agar (MSA) 培地と De Man Rogosa Sharpe (MRS) 培地 (最終濃度 50 ppm のアジ化ナトリウム、1% CaCO₃ 添加) に塗布し、30°C で 24 時間培養した。培養後、培地上に発育が認められたコロニーを最大 3 コロニー/培地を継代培養し単離した。単離した菌株について、MALDI-TOF MS、PCR 等 (Ohbayashi et al., 2017; Saticioglu et al., 2023; Ustaoglu et al., 2024) を実施することによる菌種同定を行った。

結果、MRS 培地を用いることで 190 検体中 17 検体、MSA 培地を用いることで 190 検体中 12 検体から *L. garvieae* が分離されたことから、MRS 培地を用いることで、MSA 培地より高率に *L. garvieae* を分離することが可能であることが示された(表 2)。一方で、MRS 培地単独で分離を実施する場合、MRS 培地と MSA 培地を併用する場合(190 検体中 24 検体から分離された)に比べて、分離率が低くなる可能性がある。しかし、継続的なモニタリングでは作業の効率化が必要であることを勘案し、9 月のメール会議での議論の結果、10 月以降 MRS 培地単独で分離試験を実施することとした。そのため、以降の結果は MRS 培地単独での分離結果を記載する。

表 2. R5 年 4 月から 9 月の *L. garvieae* の分離同定結果

	MRS 単独	MSA 単独	MRS, MSA 併用
合計(n=190)	17	12	24

L. garvieae と同定された菌株について PCR による血清型別 (Ohbayashi et al., 2017)、シユクロース利用能試験 (Laura et al., 2017) を実施した。薬剤感受性試験はドライプレートを用いた微量液体希釈法によって、最小発育阻止濃度 (MIC) の測定を実施した。薬剤感受性を測定した抗菌薬の種類とブレイクポイントを表 3 に示す。

以上の性状解析をもとに、同一検体から分離され、同一の菌種、血清型、薬剤感受性プロファイルを示した株について、クローン株として扱った。また、近年、 α 溶血性レンサ球菌症の原因菌の菌種同定について、multiplex PCR (Saticioglu et al., 2023; Ustaoglu et al., 2024) やシュクロース利用能 (Laura et al., 2017) による同定法が報告されているが、まだ確立されていない。本事業では一部の株について、上記の multiplex PCR による同定も実施したが、JVARM¹の結果との比較をするため、本報告書では、*L. garvieae* としてまとめ、PCR による血清型別 (Ohbayashi et al., 2017) による同定結果とシュクロース利用能 (Laura et al., 2017) の結果を記載することとした。

表 3. 今回使用した抗菌薬と *L. garvieae* におけるブレイクポイント

(mg/L)	エリスロマイシン (EM)	リンコマイシン (LCM)	オキシテトラサイクリン (OTC)	アンピシリン (ABPC)
Break point	≥8	≥4	≥8	≥8
Reference	JVARM	JVARM	JVARM	JVARM

薬剤感受性試験の結果、EM もしくは OTC に耐性を示した 13 株に加え、同一検体において複数の血清型を示す株が分離された株とランダムに選択した株の計 34 株について Nova seq を用いた全ゲノム解析を行った。得られたデータを用いて再度菌種の同定を PubMLST の species ID と Average Nucleotide Identity (ANI) により行った。また、薬剤耐性遺伝子を検索し (Resfinder, AMRfinder)、Shovill によるアセンブル後に得られた contig から薬剤耐性遺伝子がプラスミド性の可能性があるかを確認した。さらに、ゲノムデータをもとにした近縁性の解析 (パンゲノム解析と SNPs 解析) を実施した。パンゲノム解析は contig に Prokka を用いてアノテーション後、Roary により core genome を検出し、RAxML により系統樹を作成した。SNPs 解析は snippy により SNPs の検出を行い、Gubbins を用い組み換え領域を除去後、RAxML により系統樹を作成した。Reference ゲノムとして、*L. garvieae* (GCF1026695)、*L. formosensis* (GCF0327892375) と *L. petauri* (GCF023499275) をそれぞれ用いた。

研究結果

L. garvieae の魚種、血清型別、天然・養殖別の分離結果を表 4、表 5 及び図 1 に示す。*L. garvieae* は 490 検体中 79 検体 (16.1%) から分離された。2 検体において同一検体から異なる血清型・糖 (シュクロース) 利用能を示す株が分離された。分離率について、天然・養殖間、魚種別で差は認められなかった。

表 4. *L. garvieae* の魚種別分離率

<i>L. garvieae</i> 分離率 (%)	総計 (490)	ブリ類 (319)	ブリ類の内訳		マダイ (171)
			ブリ (288)	ハマチ (31)	
	(天然 (177) 養殖 (313))	(天然 (118) 養殖 (201))	(天然 (100) 養殖 (188))	(天然 (18) 養殖 (13))	(天然 (59) 養殖 (112))
総計	16.1 (79)	14.1 (45)	14.6 (42)	9.7 (3)	19.9 (34)
天然	13.6 (24)	10.2 (12)	9.0 (9)	16.7 (3)	20.3 (12)
養殖	17.6 (55)	16.4 (33)	17.6 (33)	0 (0)	19.6 (22)

¹ ※JVARM において、 α 溶血性レンサ球菌症の原因菌はすべて *Lactococcus garvieae* としていたが、従来の血清型と異なる型が発生し、従来の型 (I 型) と区別して II 型としていたものが 2023 年に *Lactococcus formosensis* として分類された。加えて、2020 年からさらに別の血清型 (III 型) の α 溶血性レンサ球菌も発生している。(薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2024 年版より)

カッコ内は、検体数を示す。

表 5. *L. garvieae* の血清型別分離率

<i>L. garvieae</i>	血清型		
	1 型	2 型	3 型
分離率 (%)			
総計	10.2 (50)	5.5 (27)	0.8 (4)
天然 (177)	10.7 (19)	2.8 (5)	0.6 (1)
ブリ類 (118)	7.6 (9)	2.5 (3)	0.8 (1)
マダイ (59)	16.9 (10)	3.4 (2)	0 (0)
養殖 (313)	9.9 (31)	7.0 (22)	1.0 (3)
ブリ類 (201)	6.5 (13)	9.0 (18)	1.0 (2)
マダイ (112)	16.1 (18)	3.6 (4)	0.9 (1)

カッコ内は、検体数を示す。

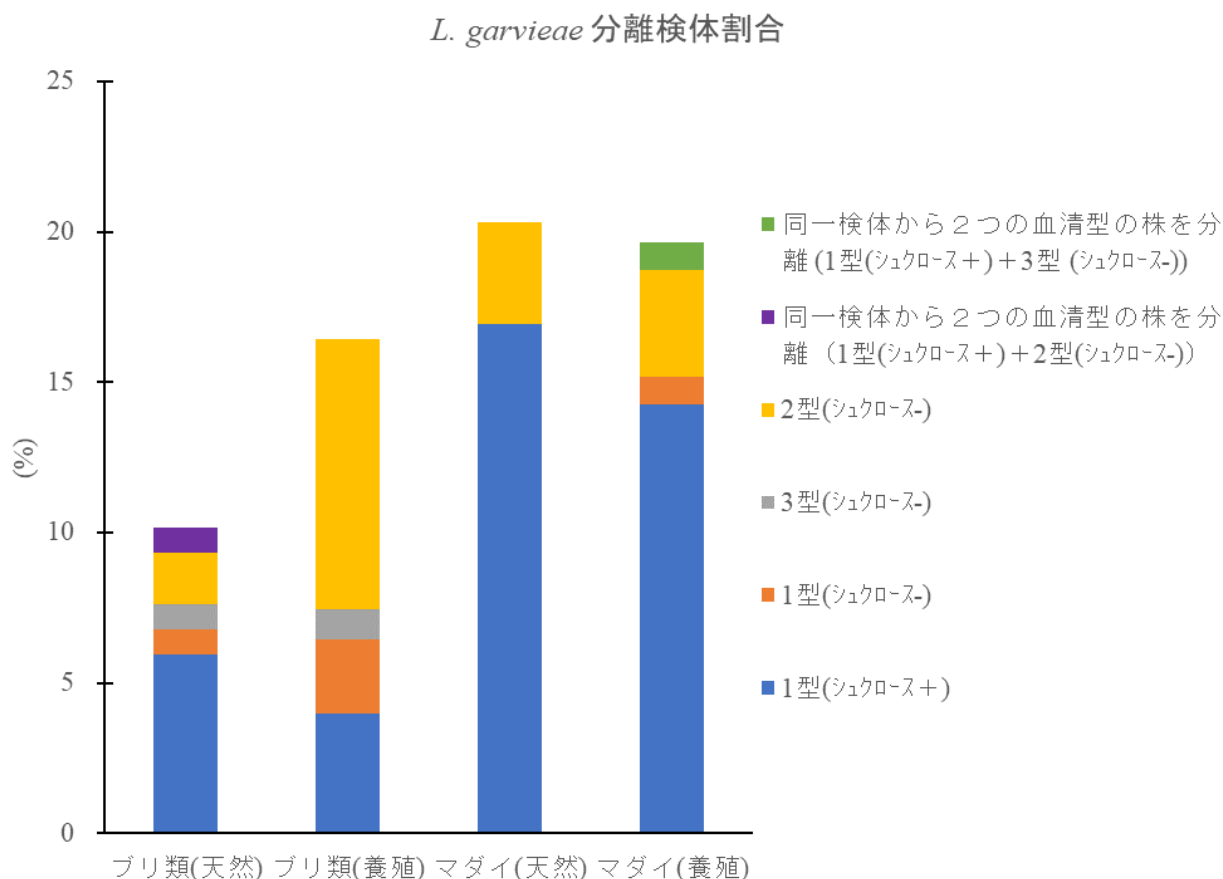


図 1. *L. garvieae* の血清型、糖(シクロース)利用能による型別ごとの分離率

分離された 86 株(76 検体より分離)の *L. garvieae* の薬剤耐性割合を示す(表 6)。また、分離株の情報、MIC の分布を別表にて示す。今回の事業で分離された *L. garvieae* は、LCM に対して、高い耐性割合を示した。EM と OTC 耐性株がそれぞれ 5.8%と 11.6%の割合で検出されたが、ABPC 耐性株は検出されなかった。耐性割合は養殖魚由来株で高い傾向を示したものの、天然魚由来と養殖魚由来の間で耐性割

合に有意差は認められなかった。魚種、血清型、糖利用能別での耐性割合の傾向については検体数を増やして、その関連性の有無について解明していく必要があるが、参考までに魚種別及び血清型糖利用能別に *L. garvieae* を分けた耐性割合の表を示す（表 7 及び表 8）。また、図 2 に示すように薬剤耐性株は、魚種、天然・養殖に関わらず、検出された。

表 6. *L. garvieae* の薬剤耐性割合

株数	耐性割合 (%)			
	EM	LCM	OTC	ABPC
Total (86)	5.8 (5)	88.4 (76)	11.6 (10)	0 (0)
天然 (28)	3.6 (1)	82.1 (23)	10.7 (3)	0 (0)
養殖 (58)	6.9 (4)	91.4 (53)	12.1 (7)	0 (0)

かっこ内は、株数を示す。

表 7. 魚種別 *L. garvieae* の薬剤耐性割合

魚種	由来	株数	耐性割合 (%)		
			EM	LCM	OTC
ブリ類	天然	13	0 (0)	69.2 (9)	0.0 (0)
	養殖	33	0 (0)	87.9 (29)	6.1 (2)
マダイ	天然	15	6.7 (1)	93.3 (14)	13.3 (2)
	養殖	25	8.0 (2)	96.0 (24)	20.0 (5)

かっこ内は、株数を示す。

別の <i>L. garvieae</i> の薬剤耐性割合血清型	シュクロース利用能*	由来	株数	耐性割合 (%)		
				EM	LCM	OTC
1 型	+	天然	20	5.0 (1)	85.0 (17)	10.0 (2)
		養殖	27	7.4 (2)	96.3 (26)	22.2 (6)
1 型	-	天然	1	0 (0)	100 (1)	0 (0)
		養殖	6	0 (0)	100 (6)	0 (0)
2 型	-	天然	6	0 (0)	66.7 (4)	16.7 (1)
		養殖	22	9.1 (2)	81.8 (18)	4.5 (1)
3 型	-	天然	1	0 (0)	100 (1)	0 (0)
		養殖	3	0 (0)	100 (3)	0 (0)

* 2 型と 3 型の株においてはシュクロース利用能(+)の株はなかった。

かっこ内は、株数を示す。

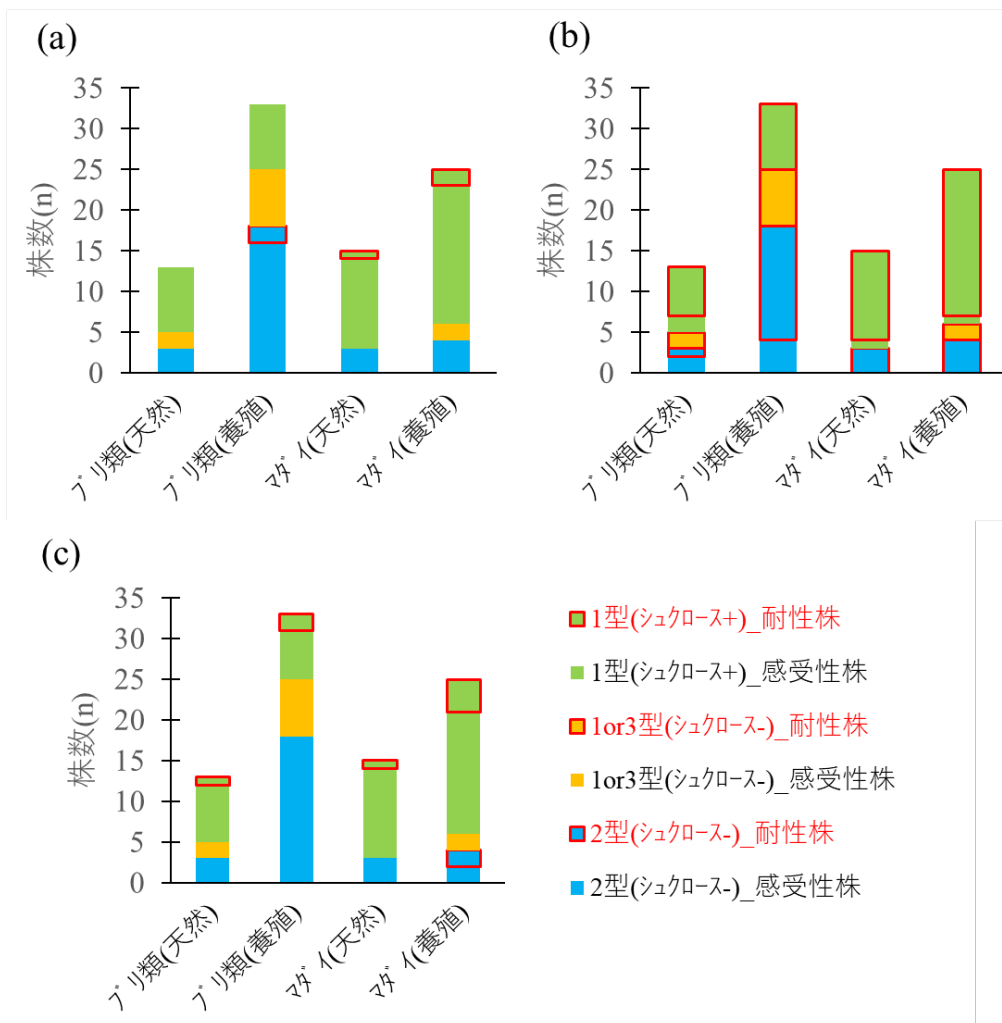


図2. 試験した抗菌薬それぞれに対する *L. garvieae* の感受性株と耐性株の検出状況
(a) EM 感受性、(b) LCM 感受性、(c) OTC 感受性
赤字赤枠で囲った部分が耐性株の検出を示す。

EM もしくは OTC 耐性を示した株の性状解析の結果、薬剤感受性、全ゲノム解析で得られたデータから検出された薬剤耐性遺伝子 (Resfinder による結果と AMRfinder による結果を併記する) について表 9 に示す。EM 耐性 5 株全てから *erm(B)* 遺伝子、OTC 耐性 10 株全てから *tet(S)* and/or *tet(L)* 遺伝子が Resfinder、AMRfinder の両方で検出された。LCM 耐性 13 株のうち、Resfinder では 1 株から、AMRfinder では全ての株から *Isa(A)* 遺伝子または *Isa(D)* 遺伝子が検出された。G166_d、G241_d において 27kbp 程度の同一 contig 上に *erm(B)* とプラスミドの replicon に関わる遺伝子である *rep1* が確認され (ARG ではないので表には記載せず)、pubMLST 上のプラスミド性の *erm(B)* と高い相同性を示し、プラスミド性に *erm(B)* を保有していることが示唆された。G170_d において *tet(S)* 遺伝子を含む 53kbp 程度の contig、G197_d と G215_d において *erm(B)* を含む 19kbp 程度の contig が確認され、pubMLST 上のプラスミド性のそれぞれの薬剤耐性遺伝子と高い相同性を示したことから、これらもプラスミド性に耐性遺伝子を保有していることが示唆された。

表 9. EM もしくは OTC 耐性 *L. garvieae* 株 (n=13) の薬剤耐性表現型と薬剤耐性遺伝子保有状況

菌株 No	魚種	由来	血清型	シュクロース利用能	MIC (mg/L)				薬剤耐性遺伝子	
					EM	LCM	OTC	ABPC	Resfinder	AMRfinder
R170_f	マダイ	養殖	1	+	≤ 0.12	64	32	0.5	<i>mdt(A), tet(S)</i>	<i>tet(S), lsa(D)</i>
R215_d	マダイ	天然	1	+	>128	<128	≤ 0.25	0.5	<i>erm(B), lsa(A)</i>	<i>erm(B), lsa(A), lsa(D)</i>
G93_f	ブリ類	天然	1	+	0.5	128	32	1	<i>mdtA, tet(S)</i>	<i>tet(S), lsa(D)</i>
G99_e	マダイ	天然	1	+	0.25	128	>32	0.5	<i>mdtA, tet(S)</i>	<i>tet(S), lsa(D)</i>
G128_d	マダイ	養殖	2	-	≤ 0.12	64	>32	0.5	<i>tet(S)</i>	<i>tet(S), lsa(D)</i>
G143_d	ブリ類	養殖	1	+	4	128	>32	1	<i>cat, mdtA, str, tet(L), tet(S)</i>	<i>catA, str, tet(L), tet(S), msr(D), mef(A), lsa(D)</i>
G166_d	ブリ類	養殖	2	-	>128	>128	0.5	0.5	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B), lsa(D)</i>
G170_d	マダイ	天然	2	-	≤ 0.12	64	>32	0.5	<i>tet(S)</i>	<i>tet(S), lsa(D)</i>
G177_d	ブリ類	養殖	1	+	≤ 0.12	32	>32	1	<i>mdtA, tet(S)</i>	<i>tet(S), lsa(D)</i>
G197_d	マダイ	養殖	1	+	>128	>128	>32	0.5	<i>erm(B), mdt(A), tet(L), tet(S)</i>	<i>erm(B), tet(L), tet(S), lsa(D)</i>
G197_e	マダイ	養殖	1	+	0.25	64	32	0.5	<i>mdtA, tet(S)</i>	<i>tet(S), lsa(D)</i>
G215_d	マダイ	養殖	1	+	>128	>128	>32	0.5	<i>erm(B), mdt(A), tet(L), tet(S)</i>	<i>erm(B), tet(L), tet(S), lsa(D)</i>
G241_d	ブリ類	養殖	2	-	>128	>128	0.5	0.5	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B), lsa(D)</i>

※赤ハイライト：EM 耐性、水色ハイライト：LCM 耐性、緑ハイライト：OTC 耐性、赤文字：EM 耐性遺伝子、水色文字：LCM 耐性遺伝子、緑文字：OTC 耐性遺伝子

パンゲノム解析の結果を図 3 に示す。血清型、シュクロース利用能ごとに cluster の形成が認められた。

血清型、シュクロース利用能ごとに SNPs 解析の結果を図 4 に示す。異なる産地の養殖ブリにおいて同一 or 異なる店舗(北海道、岐阜)・異なる月のサンプルから高い相同性(13-36SNPs)を示す株が分離された(図 4(a, b))。また、異なる産地・魚種において同一 or 異なる店舗(北海道、岐阜)・異なる月のサンプルから高い相同性(8-61SNPs)を示す株が分離された(図 4(c))。

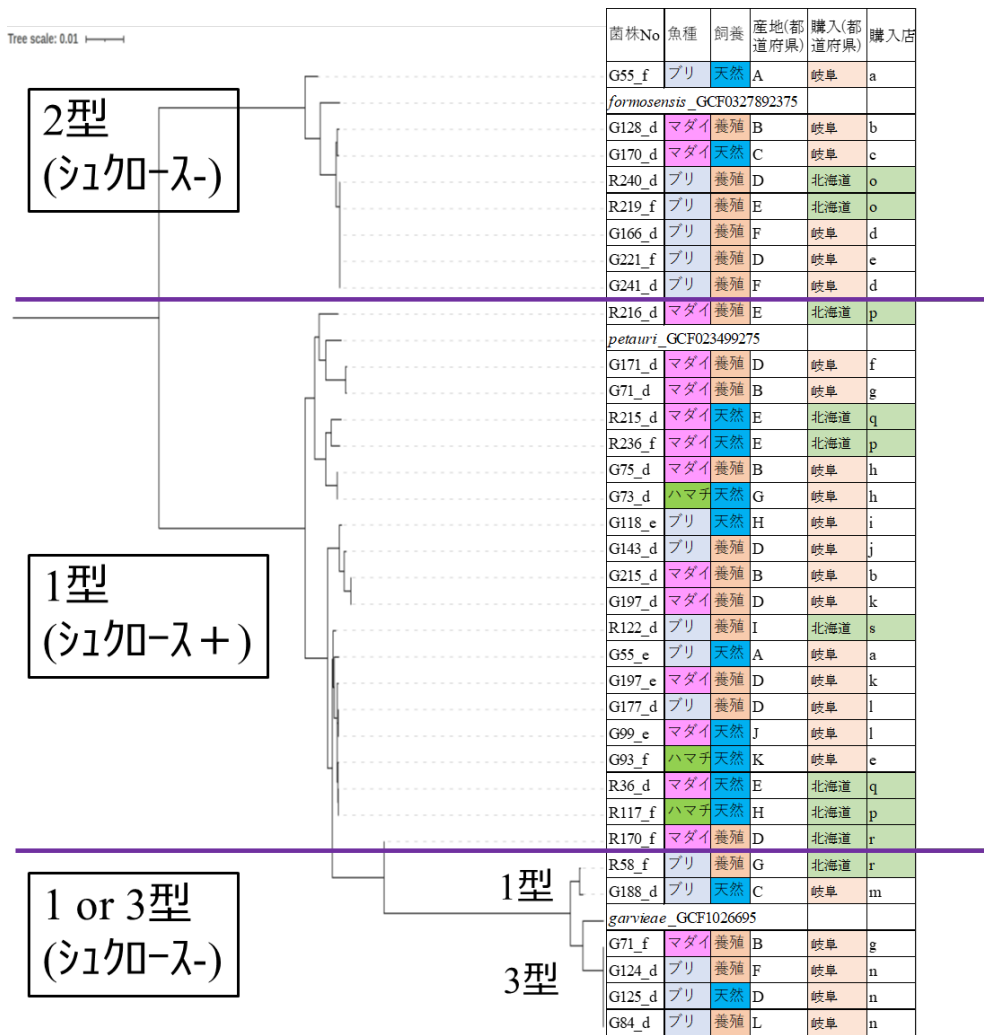


図 3. *L. garvieae*(34 株) のパンゲノム解析

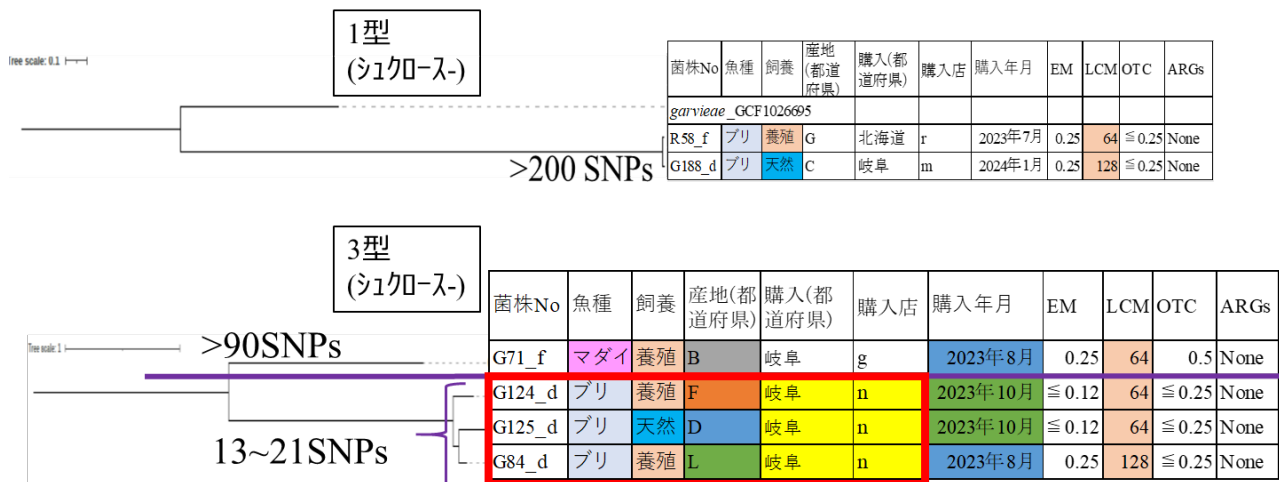
(a)

>2500SNPs

菌株No	魚種	飼養	産地(都道府県)	購入(都道府県)	購入店	購入年月	EM	LCM	OTC	ARGs
G55_f	ブリ	天然	A	岐阜	a	2023年7月	≤0.12	≤0.12	≤0.25	None
<i>formosensis</i> _GCF0327892375										
G128_d	マダイ	養殖	B	岐阜	b	2023年10月	≤0.12	64	32	<i>tetS</i>
G170_d	マダイ	天然	C	岐阜	c	2023年12月	≤0.12	64	32	<i>tetS</i>
R219_f	ブリ	養殖	E	北海道	o	2024年3月	0.5	128<	0.5	None
G221_f	ブリ	養殖	D	岐阜	e	2024年3月	≤0.12	64	≤0.25	None
R240_d	ブリ	養殖	D	北海道	o	2024年4月	0.25	128<	0.5	None
G241_d	ブリ	養殖	F	岐阜	d	2024年4月	128<	128<	0.5	<i>ermB</i>
G166_d	ブリ	養殖	F	岐阜	d	2023年12月	128<	128<	0.5	<i>ermB</i>

18~36SNPs

(b)



(c)

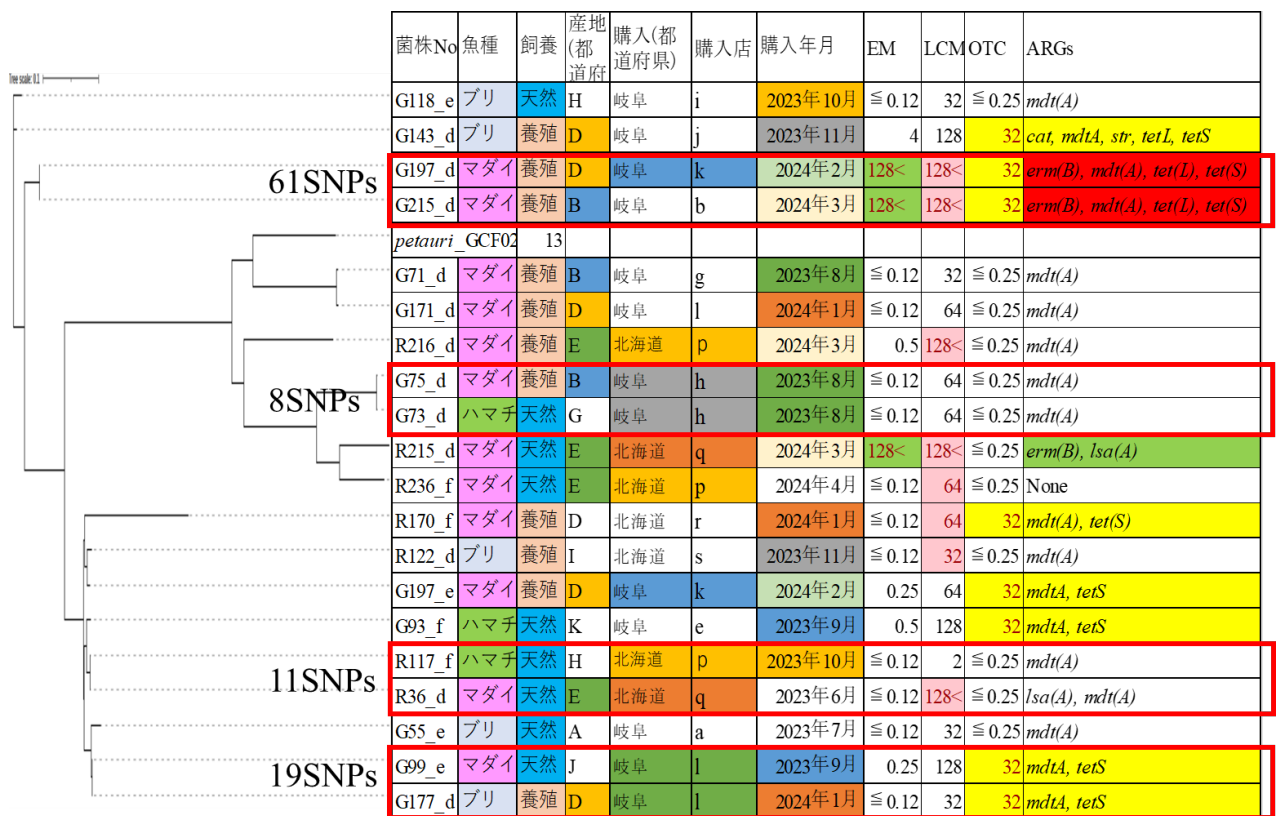


図4. *L. garvieae* の SNPs 解析

(a) 2型(シクロ-ス-)株のみ、(b) 1 or 3型(シクロ-ス-)株のみ、(c) 1型(シクロ-ス+)株のみ

赤枠は近縁な株を示す。

考察、総括

考察及び総括は、イの項目とともに行う。

【参考文献】

- Ohbayashi, K., Oinaka, D., Hoai, T. D., Yoshida, T., & Nishiki, I. (2017). PCR-mediated Identification of the Newly Emerging Pathogen *Lactococcus garvieae* Serotype II from *Seriola quinqueradiata* and *S. dumerili*. *Fish Pathology*, 52(1), 46–49. <https://doi.org/10.3147/JSFP.52.46>
- Saticioglu, I. B., Onuk, E. E., Ay, H., Ajmi, N., Demirbas, E., & Altun, S. (2023). Phenotypic and molecular differentiation of *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri* isolated from trout. *Aquaculture*, 577, 739933. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2023.739933>
- Ustaoglu, D., Öztürk, R. Ç., Ture, M., Colussi, S., Pastorino, P., Vela, A. I., Kotzamanidis, C., Volpatti, D., Acutis, P. L., & Altinok, I. (2024). Multiplex PCR assay for the accurate and rapid detection and differentiation of *Lactococcus garvieae* and *L. petauri*. *Journal of Fish Diseases*, 47(11), e14004. <https://doi.org/10.1111/JFD.14004>
- Laura, B. G., Marie R. L., Rebecca J. F., Renee R. A., Lynn S., Anil J. T., Martin W., Claire B. M., Samuel D. A., and Jasna K. (2017). *Lactococcus petauri* sp. nov., isolated from an abscess of a sugar glider. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67, 4397-4404. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002303>

イ. 市販養殖魚及び天然魚由来 *Vibrio* 属菌及び *Aeromonas* 属菌の薬剤感受性の解明（臼井優、福田昭（酪農大）、浅井鉄夫（岐阜大））

研究内容・方法

上記アで購入したサンプルと同一のサンプルを用いて、*Vibrio* 属菌及び *Aeromonas* 属菌の分離を行った。*Vibrio* 属菌及び *Aeromonas* 属菌の分離方法の検討のため、R5年4月からR5年6月までに購入した80検体については、以下の方法で分離を実施した。すなわち、購入した検体の可食部位25gを切り出し、225 mLの2% NaCl アルカリペプトン水と共にストマッキング後、30°Cで24時間培養した。培養液について、白金耳を用いて Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) 培地と CHROMagarVibrio 培地に塗布し、さらに30°Cで24時間培養した。培養後、培地上に発育が見られたコロニーを最大2コロニー/コロニーの色ごとに (TCBS: 最大4コロニー(黄、緑)、CHROMagarVibrio: 最大6コロニー(藤、青、白))分離した。分離された菌株は、MALDI-TOF MS、PCR(Kim et al., 2019; Persson et al., 2015)により菌種を同定した。

結果、*Vibrio* 属菌及び *Aeromonas* 属菌は、TCBS 培地を用いることで CHROMagarVibrio を用いる場合と比較して、高率に分離することができた(表 10)。一方で、TCBS 培地単独で分離を実施する場合、TCBS 培地と CHROMagarVibrio を併用する場合と比べて分離率が低くなる可能性がある。しかし、7月の会議での議論の結果、7月以降の分離の際は、継続的なモニタリングでの作業の効率化を勘案し、TCBS 培地単独で分離試験を実施することとした。そのため、以降の結果は TCBS 培地単独での分離結果を記載する。

表 10. R5年4月から6月の *Vibrio* 属菌、*Aeromonas* 属菌の分離同定結果

		TCBS 単独	CHROMagarVibrio 単独	TCBS, CHROMagarVibrio 併用
合計 (n=80)	<i>Vibrio</i> 属菌	37	34	41
	<i>Aeromonas</i> 属菌	40	33	47

Vibrio 属菌及び *Aeromonas* 属菌と同定された菌株について、ドライプレートを用いた微量液体希釈法による薬剤感受性試験により MIC の測定を実施した。薬剤感受性を測定した抗菌薬の種類とブレイクポイントを表 11 に示す。また、*Vibrio* 属菌及び *Aeromonas* 属菌においては同一検体から分離され、同一の菌種、薬剤感受性プロファイル、薬剤耐性遺伝子保有を示した株について、クローン株として扱った。

表 11. 今回使用した抗菌薬と *Vibrio* 属菌、*Aeromonas* 属菌におけるブレイクポイント

Vibrio 属菌

(mg/L)	ABPC	OTC	SMMX	SMMX/トリメプ [®] リム(ST)合剤	セフトキシ シム (CTX)	シプロフロキサ シン (CPFX)
Break point	≥32	≥16	≥512	≥76/4	≥4	≥4
Reference	JVARM	One Health Report 2023	CLSI M45	CLSI M45	CLSI M45	CLSI M45

Aeromonas 属菌

(mg/L)	OTC	ST 合剤	CTX	CPFX	オキシリン酸 (OA)
Break point	≥8	≥76/4	≥4	≥4	≥1
Reference	CLSI vet04	CLSI M45	CLSI M45	CLSI M45	CLSI vet04

OTC もしくは SMMX 耐性の *Vibrio* 属菌と *V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* について、Nova seq を用い全ゲノム解析を行った。得られたデータを用い、再度菌種の同定を PubMLST の species ID と ANI により行った。また、薬剤耐性遺伝子の検索 (Resfinder 及び AMRfinder) を実施した。*V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* においては Virulence finder を用いて病原性遺伝子 (TDH および TRH) の検索を行った。

研究結果

Vibrio 属菌及び *Aeromonas* 属菌の魚種、天然・養殖別の分離結果を表 12、13 に示す。*Vibrio* 属菌は 33.9% (490 検体中 166 検体) から分離された。魚種、天然・養殖間で分離率に有意な差が認められた。つまり、*Vibrio* 属菌において、マダイからの分離率はブリ類に比べて有意に高く、養殖検体でも同様であった。また、天然魚からの分離率は養殖魚に比べ、有意に高く、ブリ類でも同様であった。*Aeromonas* 属菌は、全体の 38.8% (490 検体中 190 検体) から分離されたが、魚種、天然・養殖間で分離率に有意な差は認められなかった。

表 12. 検体別 *Vibrio* 属菌の分離率

<i>Vibrio</i> 属菌 分離率 (%)	総計 (490) (天然 (177) 養殖 (313))	ブリ類 (319) (天然 (118) 養殖 (201))	内訳		
			ブリ (288) (天然 (100) 養殖 (188))	ハマチ (31) (天然 (18) 養殖 (13))	マダイ (171) (天然 (59) 養殖 (112))
総計	33.9 (166)	27.6 ^a (88)	25.7 (74)	45.2 (14)	45.6 ^a (78)
天然 (177)	43.5 ^b (77)	39.8 ^c (47)	36.0 (36)	61.1 (11)	50.8 (30)
養殖 (313)	28.4 ^b (89)	20.4 ^{c,d} (41)	20.2 (38)	23.1 (3)	42.9 ^d (48)

a, b, c, d: $p < 0.01$ (同一アルファベット間で有意差が認められた)

カッコ内は検体数を示す。

表 13. 検体別 *Aeromonas* 属菌の分離検体率

<i>Aeromonas</i> 属菌 分離率 (%)	総計 (490) (天然 (177) 養殖 (313))	ブリ類 (319) (天然 (118) 養殖 (201))	内訳		
			ブリ (288) (天然 (100) 養殖 (188))	ハマチ (31) (天然 (18) 養殖 (13))	マダイ (171) (天然 (59) 養殖 (112))
総計	38.8 (190)	41.1 (131)	41.0 (118)	41.9 (13)	34.5 (59)
天然 (177)	36.2 (64)	36.4 (43)	38.0 (38)	27.8 (5)	35.6 (21)
養殖 (313)	40.3 (126)	43.8 (88)	42.6 (80)	61.5 (8)	33.9 (38)

カッコ内は検体数を示す。

Vibrio 属菌の種レベルの菌種同定の結果を表 13 に示す。*Vibrio* 属菌が分離された 166 検体中 144 検体 (86.7%) から *V. alginolyticus* が分離され大部分を占めた。魚種、天然・養殖による分離菌種の偏りは見られなかった。食中毒起因菌種の *V. parahaemolyticus* が 490 検体中 0.4% (養殖ブリ 2 検体)、*V. vulnificus* が 0.2% (養殖マダイ 1 検体) から分離された。

Aeromonas 属菌については、*Vibrio* 属菌と比較した際に、海産物が保有する菌種としての環境適応性や分離に用いた TCBS 培地が一般的には *Vibrio* 属菌の分離培地として認識されていること、種レベルで

の同定が非常に難しいこと、さらに、食品安全委員会における水産用抗菌薬のリスク評価のトライアルにおいて水産動物由来グラム陰性菌の指標としては *Vibrio* 属菌を用いたことから、属レベルまでの同定を行った。

表 14. 分離された *Vibrio* 属菌の菌種

	検体数	<i>Vibrio</i> 属分離 検体数	種別の分離検体数					<i>Vibrio</i> spp. ※	
			<i>algino- lyticus</i>	<i>anguil- larum</i>	<i>mimicus</i>	<i>har- veyi</i>	<i>parahae- molyticus</i>		<i>vulnificus</i>
総計	490	166	144	1	6		2	1	27
天然	177	77	75	2	3				5
ブリ類	118	47	45	1	1				3
内訳									
ブリ	100	36	34	1	1				2
ハマチ	18	11	11						1
マダイ	59	30	30	1	2				2
養殖	313	89	68	4	3	3	2	1	21
ブリ類	201	41	33	1	2		2		6
内訳									
ブリ	188	38	30		2		2		6
ハマチ	13	3	3	1					
マダイ	112	48	35	3	1	3		1	15

※ 今回用いた PCR では菌種の同定できなかった *Vibrio* 属菌

分離された *Vibrio* 属菌 202 株(166 検体より分離)の薬剤耐性割合を示す(表 15)。また、分離株の情報、MIC の分布を別表にて示す。自然耐性であることが報告されている ABPC に対しては 90%以上の耐性割合を示した。OTC, SMMX 耐性は低い耐性割合を示し(1.0 または 13.4%)、ST 合剤、CTX、CPFX に耐性を示す株は検出されなかった。また、魚種、天然・養殖で耐性率に有意な差は認められなかった。

表 15. *Vibrio* 属菌の薬剤耐性割合

<i>Vibrio</i> 属菌 耐性割合 (%)	ABPC	OTC	SMMX	ST 合剤	CTX	CPFX
Total (202)	94.6 (191)	1.0 (2)	13.4 (27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
天然 (97)	95.9 (93)	1.0 (1)	15.5 (15)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ブリ類(57)	94.7 (54)	0 (0)	15.8 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
マダイ(40)	97.5 (39)	2.5 (1)	15.0 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
養殖 (105)	93.3 (98)	1.0 (1)	11.4 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ブリ類(47)	91.5 (43)	0 (0)	6.4 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
マダイ(58)	94.8 (55)	1.7 (1)	15.5 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

かっこ内は株数を示す。

分離された *Aeromonas* 属菌 258 株(190 検体より分離)の薬剤耐性割合を示す(表 16)。また、分離株の情報、MIC の分布を別表にて示す。CPFX 以外の試験を行った抗菌薬に対しては、5-15%程度の耐性割合を示した。CPFX に耐性を示す株は認められなかった。

表 16. *Aeromonas* 属菌の薬剤耐性割合

<i>Aeromonas</i> 属菌 耐性割合 (%)	OTC	ST 合剤	CTX	CPFX	OXA
Total (258)	15.1 (39)	7.8 (20)	10.1 (26)	0 (0)	10.5 (27)
天然 (84)	14.3 (12)	6.0 (5)	13.1 (11)	0 (0)	8.3 (7)
ブリ類(61)	19.7 (12)	8.2 (5)	16.4 (10)	0 (0)	11.5 (7)
マダイ(23)	0 (0)	0 (0)	4.3 (1)	0 (0)	0 (0)
養殖 (174)	15.5 (27)	8.6 (15)	8.6 (15)	0 (0)	11.5 (20)
ブリ類(122)	17.2 (22)	10.7 (13)	9.8 (12)	0 (0)	14.8 (18)
マダイ(52)	11.5 (5)	3.8 (2)	5.8 (3)	0 (0)	3.8 (2)

かっこ内は株数を示す。

Vibrio 属菌において、SMMX もしくは OTC に耐性を示した 27 株(内、3 株は read 数不足のため、結果に含めていない)と *V. vulnificus* 1 株, *V. parahaemolyticus* 2 株の薬剤感受性と全ゲノム解析で得られたデータから検出された薬剤耐性遺伝子と病原性遺伝子を表 17 に示す。薬剤耐性遺伝子の検出について、Resfinder と比較し、AMRfinder の方が多くの薬剤耐性遺伝子が検出された。AMRfinder で検出された耐性遺伝子から、例えば ABPC 耐性と *bla* 遺伝子の保有について、一定の関連性が認められる傾向はあるものの、感受性試験の結果と一致しない染色体性の薬剤耐性遺伝子が AMRfinder では複数検出され、結果の解釈が困難となることから、今回の事業において、以降は Resfinder の結果を使用することとした。全ゲノム解析でデータが得られた SMMX 耐性を示した 24 株の内、関連する薬剤耐性遺伝子 (*sul1*, *sul2*) が検出されたのは 1 株のみであった。OTC 耐性を示した 2 株から *tet(B)*, *tet(M)* もしくは *tet(Y)* が検出された。*V. vulnificus* 1 株, *V. parahaemolyticus* 2 株から病原性遺伝子 (*tdh*, *trh*) は検出されなかった。

表 17. SMMX もしくは OTC 耐性と食中毒関連の *Vibrio* 属菌株の薬剤耐性表現型と薬剤耐性遺伝子保有状況

菌株No	由魚 菌種 来種	MIC (mg/L)				薬剤耐性遺伝子			
		ABPC	OTC	SMMX	ST	CTX	CPFX	Resfinder	AMRfinder
R16_2	マ 天 ダ 然 イ <i>alginoliticus</i>	64	1	512	≤2.38/0.12	≤0.25/0.25		<i>bla</i> _{AMP-42}	<i>tet(34)</i> , <i>tet(35)</i> , <i>catC</i> , <i>norM</i> , <i>bla</i> _{AMP-42}

R25_1	天ブ 然リ	<i>alginoliticus</i>	128<2	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.5	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}</i>	
R38_4	天ブ 然リ	<i>anguillarum</i>	32	≤0.5	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	≤0.06	None	<i>tet (34)</i>
R51_2	天ブ 然リ	<i>alginoliticus</i>	128<1	>512	9.5/0.5	0.5	0.5	<i>fos</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-57}, fos</i>	
R52_1	マ 養 殖 イ	<i>alginoliticus</i>	128<2	>512	≤2.38/0.12	0.5	0.5	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}, fos</i>	
R55_1	マ 天 然 イ	<i>alginoliticus</i>	128<2	512	4.75/0.25	≤0.25	0.12	<i>bla_{CARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}</i>	
R63_2	マ 天 然 イ	<i>alginoliticus</i>	128<1	512	4.75/0.25	≤0.25	0.25	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}</i>	
R66_1	天ブ 然リ	<i>alginoliticus</i>	128<1	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.25	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}</i>	
R70_2	マ 養 殖 イ	<i>alginoliticus</i>	128<1	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	0.5	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-56}</i>	
R77_2	ハ 養 殖 チ	<i>alginoliticus</i>	128<1	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.25	<i>fos</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-57}, fos</i>	
R86_2	天ブ 然リ	<i>alginoliticus</i>	128<2	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.5	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}</i>	
R89_1	天ブ 然リ	<i>alginoliticus</i>	128<1	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	≤0.06	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}</i>	
R89_3	天ブ 然リ	<i>alginoliticus</i>	64	≤0.5	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	0.25	<i>bla_{CARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-42}</i>
R100_1	天ブ 然リ	<i>alginoliticus</i>	128<2	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.25	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-56}</i>	
R119_3	マ 天 然 イ	<i>alginoliticus</i>	128<1	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.25	<i>bla_{ARB-42}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-56}</i>	
R174_1.1	ハ 天 然 チ	<i>alginoliticus</i>	16	≤0.5	>512	≤2.38/0.12	1	≤0.06	None	None
R181_1	マ 養 殖 イ	<i>harveyi</i>	128<	≤0.5	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.25	None	<i>tet (34), tet (35), bla_{MH-1}</i>

R223_1	マ 養 殖 イ ダ harveyi	128	<0.5	>512	4.75/0.25	≤0.25	0.25	None	<i>bla_{MH-1}</i>
R225_2	ハ マ チ マ anguiillarum	32	≤0.5	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	≤0.06	<i>qnrVC6</i>	<i>tet (34), qnrVC6</i>
R226_4	マ 天 然 イ ダ anguiillarum	32	≤0.5	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	≤0.06	None	<i>tet (34)</i>
R238_4	マ 養 殖 イ ダ anguiillarum	128	<0.5	>512	≤2.38/0.12	0.5	≤0.06	<i>bla_{HA-16}</i>	<i>tet (34), tet (35), catA2, bla_{MH-16}</i>
R239_3	マ 養 殖 イ ダ anguiillarum	32	≤0.5	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	≤0.06	<i>qnrVC6</i>	<i>tet (34), qnrVC6, varG</i>
R217_1	マ 養 殖 イ ダ anguiillarum	128	<64	>512	≤2.38/0.12	0.5	0.5	<i>bla_{HA-17}, floR, qacE, tet (34), tet (B), sull1, sull2, tet (Y), catA2, tet (B), bla_{MA-1}, bla_{MH-1}, tet (M), floR, sull1, sull2, tet (Y)</i>	<i>tet (34), tet (B), tet (D), tet (M), bla_{HA-12}</i>
R226_1	マ 天 然 イ ダ anguiillarum	128	<64	>512	≤2.38/0.12	≤0.25	≤0.06		<i>tet (B), tet (D), tet (M), bla_{HA-12}</i>
G51_1	マ 養 殖 イ ダ vulnificus	2	≤0.5	4	≤2.38/0.12	≤0.25	≤0.06	None	<i>tet (34)</i>
G88_4	マ 養 殖 リ paraahaemolyticus	>128	≤0.5	16	≤2.38/0.12	≤0.25	0.25	<i>bla_{CARB-21}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-20}</i>
G220_3	マ 養 殖 リ paraahaemolyticus	>128	≤0.5	16	≤2.38/0.12	≤0.25	0.5	<i>bla_{CARB-24}</i>	<i>tet (34), tet (35), catC, norM, bla_{CARB-18}</i>

※黄色ハイライト：ABPC 耐性、緑ハイライト：OTC 耐性、青ハイライト；SMMX 耐性、緑文字：OTC 耐性表現型に關与する OTC 耐性遺伝子、赤文字：SMMX 耐性遺伝子

考察

薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書（2024年版）では、2022年度の水産動物（海水魚、淡水魚及び觀賞魚）に対する推定販売量（原末換算）は、テトラサイクリン系（79t）、マクロライド系（74t）スルホンアミド系（21t）、ペニシリン系（16t）の順で、4系統が全体（201t）の約95%を占めている。今回の調査で、市販魚から分離した *L. garvieae* 及び *Vibrio* 属菌の薬剤感受性試験を実施することで、食品健康影響評価のうち、ばく露評価に必要な市販魚におけるマクロライド系抗菌薬、テトラサイクリン系、スルホンアミド系抗菌薬に対する耐性動向をモニタリングすることが可能であることが

示された。一方で、*Aeromonas* 属菌については、十分な分離率を示したものの、選択分離に用いる汎用性の高い培地が *Vibrio* 属菌に比べて存在しないこと、生化学性状を基に同定することが難しく、さらに、PCRによる種同定も誤同定する場合があることなどから、*Vibrio* 属菌と比較して海水養殖魚における指標菌とする積極的な理由がないと考えられた。また、*L. garvieae* では、ペニシリン系抗菌薬に対する耐性株は認められず、*Vibrio* 属菌ではペニシリン系抗菌薬に対して高い耐性率を示したことから（自然耐性の可能性）、ペニシリン系抗菌薬の使用による薬剤耐性動向をモニタリングするには、他の菌種を用いたモニタリングを検討する必要があることが示された。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「ブリ類に使用するマクロライド系抗生物質に係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価（トライアル）」では腸炎ビブリオをハザードとして仮置きして実施したが、腸炎ビブリオの起因菌である *V. parahaemolyticus* の分離率は 0.4%と低率であり評価に十分なデータを得ることは困難であることが予想される。そのため、養殖場から市販流通との関連を検討する上で、水産動物由来グラム陰性菌の指標としては、*Vibrio* 属菌を用いることを検討する必要がある。

今回の試験では、養殖魚由来 *L. garvieae* と天然魚由来 *L. garvieae* の間で耐性率に有意差は認められなかったが、*Vibrio* 属菌についても養殖魚由来と天然魚由来で、耐性率の有意な差は認められなかった。過去に実施された調査においては、市販魚から分離された *Vibrio* 属菌の内、スルホンアミド系抗菌薬に耐性を示したのは養殖魚由来菌のみであり、テトラサイクリン系は天然魚由来株に比べ、養殖魚由来株で高い耐性割合の傾向が見られた（表 18）（Fukuda et al., 2023）。試験をした株数は少ないものの、養殖現場での抗菌薬の使用状況によっては、テトラサイクリン系抗菌薬やスルホンアミド系抗菌薬に対する耐性割合は変動する可能性がある。今回の試験で、*Vibrio* 属菌についてテトラサイクリン系抗菌薬の耐性割合は数%と低率であったこと、スルホンアミド系抗菌薬に対する耐性菌については耐性遺伝子の保有が確認されない株がほとんどであり、自然耐性などの要因が存在することが、耐性率の差が出なかった理由となっている可能性がある。テトラサイクリン系抗菌薬耐性については、*tet(B)*, *tet(M)*, *tet(Y)* の保有が確認された株ではテトラサイクリン耐性を示したが、*tet(34)*, *tet(35)* 保有株ではテトラサイクリンに対して感性であった。今回、薬剤耐性遺伝子の検索に用いた Resfinder と AMRfinder において結果が異なり、検出される薬剤耐性遺伝子数は AMRfinder の方が多かったが、表現型に現れない染色体性の薬剤耐性遺伝子も多数検出された。今回、Resfinder での検索結果を用いることで、マクロライド系抗菌薬とテトラサイクリン系抗菌薬の表現型と薬剤耐性遺伝子の保有状況の関連性が明確になった。一方で、Resfinder では関連性が認められなかった、*L. garvieae* のリンコマイシン耐性や *Vibrio* 属菌の ABPC 耐性について、AMRfinder では表現型と遺伝子保有の関連性が示唆された。以上のことから、現時点では、Resfinder と AMRfinder の検索結果について、その両方を確認する必要がある。今後、水産領域でテトラサイクリン型抗菌薬が多く使用されるなど使用量の変化があった際にはテトラサイクリン耐性 *Vibrio* 属菌が選択されることが予想される。一方、スルホンアミド系抗菌薬に対する耐性は、*V. parahaemolyticus* および *V. vulnificus* を除く全ての *Vibrio* 属菌で認められたが、耐性遺伝子を保有していなかった。これまでの報告では、スルホンアミド系合成抗菌薬に耐性を示す *Vibrio* 属菌は、*sul1* または *sul2* 遺伝子を保有することもあるが、一部は保有していなかった（Fukuda et al., 2023）。また、表現型と耐性遺伝子が必ずしも一致しないとする報告がある（Sebastian et al., 2025）。スルホンアミド系抗菌薬耐性 *Vibrio* 属菌の耐性機序、耐性遺伝子保有の関連性については、将来的にゲノムベースでの食品健康影響評価におけるハザードの特定を行う際の情報整理のためにも、さらなる研究による解明が求められる。

L. garvieae について、マクロライド系、テトラサイクリン系抗菌薬に対する耐性株が既知の関連する耐性遺伝子を保有していたが、ペニシリン系抗菌薬に対する耐性株は認められなかった。過去に、国

内で実施された調査では、養殖段階の魚から分離された *L. garvieae* の 44% (75/170) がエリスロマイシン、リンコマイシン、オキシテトラサイクリンに対して共耐性を示し、*ermB* および *tet (S)* 遺伝子を保有することが報告されている (Kawanishi et al., 2005)。今回の結果では、*tet (S)* の他、*tet (L)* が確認されたものの、必ずしも共耐性を示さなかった。今回の事業結果とは、分離年度、調査段階（養殖段階と市販段階）、調査魚種の違いなどもあるため単純な比較をすることはできないが、耐性遺伝子の特徴の違いが見られることから、食品健康影響評価における正確な発生評価や暴露評価を行うためには、それぞれの段階において、魚種を絞った継続的なモニタリングを実施することが効果的であると考えられた。また、薬剤感受性の表現形と耐性遺伝子保有について関連性が認められたことから、魚由来 *L. garvieae* が保有する耐性遺伝子の特徴について、データを蓄積していくことで、耐性遺伝子を検出することによる食品健康影響評価につながるゲノムモニタリングが可能となるかもしれない。また、*L. garvieae* の血清型別・菌種同定方法は、現在、細分類化がされており、型別・種別毎での分離率・耐性率の違いについても、今後、検体数を増やす・異なる由来との比較を行うことで、その関連性を明らかにしていくことが必要である。

Vibrio 属菌のうち、食中毒細菌種である *V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus* の分離率は、それぞれ 0.4%、0.2% と低率であり、食中毒としてのリスクが低いことが示された。一方、全ゲノム解析のデータをもとにした *L. garvieae* の解析により、異なる産地の養殖ブリ、異なる店舗、異なる期間から高い相同性を示す株が分離されたことから、養殖場からの輸送以降の段階における交差汚染の可能性が示された。加えて同一店舗の異なるサンプルからも、高い相同性を示す株が分離されたことから、店舗内での交差汚染の可能性が示された (同一店舗でのクラスターが認められたのは、全ゲノム解析を実施した 34 株中 7 株) (図 4b, c)。また、異なる産地・店舗・時期の養殖ブリにおいて近縁性の高い株が分離されたことから日本の養殖ブリにおいて、遺伝学的に近縁な株が存在している可能性が考えられる (5 株 1 クラスター) (図 4a)。これらのことから、市販魚が保有する耐性菌の多くは養殖段階由来であるが、一部については養殖場からの輸送以降の段階における交差汚染による影響を受ける可能性が考えられた。加えて、今回の事業で分離された *V. anguillarum* は、養殖段階で分離された *V. anguillarum* とは薬剤感受性傾向が異なる (養殖段階の分離菌株に比べて耐性傾向を示す) ことから、*Vibrio* 属菌についても、一部については養殖場からの輸送以降の段階での交差汚染の可能性が考えられた。以上のことから、今回のような市販魚を用いた薬剤耐性モニタリングの場合、養殖段階でのリスク (発生) に加えて、養殖場からの輸送以降の段階における交差汚染を含めたリスクを考慮した評価のデータとして用いることができることが示された。また、市販魚が保有する薬剤耐性菌の大部分は養殖段階で発生したと考えられる。そのため、それらの耐性菌が食品を介してヒトへ伝播 (ばく露) する可能性についても十分評価可能であると考えられた。

表 18. 過去に実施された調査における市販海産物から分離された *Vibrio* 属菌の薬剤耐性割合 (Fukuda et al., 2023 から引用)

Table 2. Antimicrobial resistance rates of *Vibrio* spp. isolated from seafoods

Antimicrobial resistance rates (%)	Wild-caught fish (n = 13)	Farm-raised fish (n = 22)	Shellfish (n = 52)	Mollusks (n = 24)	Crustacean (n = 4)
Tetracycline	7.7	13	0	0	0
Sulfamethoxazole	0	8.7	0	0	0
Trimethoprim/sulfamethoxazole	0	4.3	0	0	0
Ampicillin	61.5	82.6	82.7	75	100

総括

今回の事業により、食品健康影響評価のばく露評価に用いるデータとしての薬剤耐性モニタリングを実施するため市販魚からの *L. garvieae* 分離方法、*Vibrio* 属菌分離方法を確立した。分離された *L. garvieae* 及び *Vibrio* 属菌を用いた薬剤感受性試験によって、マクロライド系、テトラサイクリン系抗菌薬、スルホンアミド系合成抗菌薬に対する耐性状況を明らかにできたことから、分離と感受性試験を継続して実施することで、薬剤耐性モニタリングが可能であること、グラム陽性菌の指標菌として *L. garvieae*、グラム陰性菌の指標菌として *Vibrio* 属菌が適切であることが示唆された。また、特に *L. garvieae* については、薬剤感受性に関する表現型と耐性遺伝子の保有状況に明確な関連が認められたことから、将来的には、ゲノムモニタリングに移行することも可能となるかもしれない。今後、さらに継続的な調査を行い、情報を蓄積するとともに、他の分離元の株との比較を行うことで、耐性傾向の変動や菌の伝播経路を明確にすることが期待される。

【参考文献】

- Fukuda, A., Tsunashima, R., & Usui, M. (2023). Antimicrobial Resistant Bacteria Monitoring in Raw Seafood Retailed: a Pilot Study Focused on *Vibrio* and *Aeromonas*. *Food Safety*, 11(4), 65–77.
<https://doi.org/10.14252/FOODSAFETYFSCJ.D-23-00006>
- Kim, K. Il, Won, K. M., Lee, E. S., Cho, M., Jung, S. H., & Kim, M. S. (2019). Detection of *Vibrio* and ten *Vibrio* species in cage-cultured fish by multiplex polymerase chain reaction using house-keeping genes. *Aquaculture*, 506, 417–423. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.03.073>
- Kawanishi, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., Suzuki, S. & Tamura, Y. (2005). Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Letters in Applied Microbiology*. 40(5), 322-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01690.x>.
- Persson, S., Al-Shuweli, S., Yapici, S., Jensen, J. N., & Olsen, K. E. P. (2015). Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 653–656.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01963-14>
- Sebastian P. J., Schlesener C. S., Byrne, B. A., Miller M., Smith W., Batac F., Goertz, C. E. C., Weimer B. C. & Johnson, C. K. (2025). Antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. from the coastal California system: discordance between genotypic and phenotypic patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 91(3), e0180824.
<https://doi.org/10.1128/aem.01808-24>

ウ. 抗菌性物質を養殖魚に使用した際に選択される薬剤耐性菌の評価への提言の検討（臼井優、福田昭（酪農大）、浅井鉄夫（岐阜大））

養殖魚に対しては、マクロライド系抗菌薬、テトラサイクリン系抗菌薬、スルホンアミド系抗菌薬およびペニシリン系抗菌薬を中心に治療される。今回の事業で、市販魚からの *L. garvieae* 及び *Vibrio* 属菌の分離方法を確立した。マクロライド系、テトラサイクリン系抗菌薬に対する薬剤感受性は、*L. garvieae* を用いて、テトラサイクリン系、スルホンアミド系抗菌薬に対する薬剤感受性は *Vibrio* 属菌を用いてモニタリングをすることが可能と考えられた。しかし、自然耐性の可能性が示唆されたペニシリン系抗菌薬に対する耐性のモニタリングには他の菌種を選定する必要がある。また、*L. garvieae* のマクロライド系抗菌薬、*L. garvieae* と *Vibrio* 属菌のテトラサイクリン系抗菌薬に対する薬剤感受性表現型とその耐性遺伝子の保有状況は明確な関連が認められた。このことから、これらの耐性遺伝子は、将来的なゲノムモニタリングの指標となる可能性がある。一方で、スルホンアミド系抗菌薬に対する耐性遺伝子については、表現型との明確な関連を明らかにすることはできなかった。薬剤耐性菌の評価にゲノムモニタリングを用いることは、国際的にも方法が確立することができていないが、今回の知見にデータをさらに蓄積することで、水産領域でもゲノムモニタリングを評価に組み込んでいくことが期待される。

今回の調査で、養殖魚由来細菌と天然魚由来細菌で耐性率に有意な差は認められなかった。ゲノム解析の結果からも示されたとおり、市販魚において養殖場からの輸送以降の段階での交差汚染が一定の割合では起こっている可能性が考えられた。以上のことから、市販魚由来細菌は、養殖段階での抗菌薬の使用状況を反映するものの、特にばく露評価に用いるデータとして有効である。養殖段階での抗菌薬の使用状況を反映するための正確な発生評価を行うためには、養殖場での調査が必要となる。

(3) 養殖場における抗菌薬や使用状況調査

ア. 日本の養殖場における抗菌薬や使用状況調査（蒔田浩平（酪農大））

研究内容・方法

国内4県の養殖場、魚類防疫員から抗菌薬の使用状況等の聞き取りと施設見学を実施した。加えて、民間企業を訪問し、魚病担当者からも抗菌薬の使用状況等の聞き取りを実施した。また、水産養殖の領域で、魚病治療を獣医師が実施している民間企業の職員から聞き取り調査を行った。これら水産養殖関係者の聞き取り内容を総論的にまとめることにより、水産養殖、魚病診断、水産用医薬品使用の申請と使用の状況を理解することで、この後の定量的発生評価の試行に反映させた。

研究結果

1. 水産養殖のシステム

今回の調査では主に海水面水産養殖を中心に情報を収集したが、魚種によって養殖形態は様々で、魚卵または種苗を購入し内水面養殖から成長に従い海水面に移行するもの、海近くの内水面で海水を用いて養殖するもの、民間業者から種苗を導入し沿岸で海面養殖するもの、海水面でも野生の稚魚を捕獲して養殖するもの等があった。

養殖業者には大手企業と、零細の養殖場があり、漁業権行使のためいずれも地域の漁業協同組合に所属していた。

2. 魚病対応

養殖場における基本的な魚病対応は以下の通りである。

- ・養殖魚を健康に保つ飼養管理
- ・ワクチン
- ・早期発見、対応
- ・適正な抗菌剤の使用

調査県では、県庁と水産に関する試験場・研究所に魚類防疫員が配置されており、魚病診断の他、以下の業務を行っていた。

- ・ワクチンの使用指導書の交付
- ・水産用医薬品使用指導書の交付（組合を通して申請を受け付ける）
- ・魚病発生時の防疫対策の助言
- ・農林水産省が実施する魚病被害、水産用医薬品使用状況調査への回答

漁業協同組合には、魚病診断施設を保有しているところもあり、魚類防疫協力員が魚病診断と指導を行っていた。大手企業の中には獣医師を雇用しているところもあれば、外部獣医師に水産用医薬品の投薬処方を依頼しているところもある。所属漁協や近隣の漁協の魚類防疫協力員が、魚病診断後養殖業者に水産用抗菌薬使用指導書を交付することもある。県は、漁協や民間企業が行った魚病診断については把握できないことが多い。魚病原菌が培養できた場合、全ての県で薬剤感受性試験が実施されていた。分離菌の中には様々な菌種で薬剤耐性菌もあるとのことであった。

抗菌薬の購入・使用は、指導書の発行から一年間有効であるため、年度当初に年度内の使用を見越して申請されることが多い。一般養殖業者の場合、抗菌薬の使用申請は年度ごとに漁協で取りまとめ、県庁に提出されていた。魚病の発生と使用履歴については漁協から県庁水産振興課へ報告され集計されていた。また保険申請のため、診断結果と被害報告は漁協に提出されていた。

魚病発生確認時、生け簀では死んだ魚を介して魚群に感染が広がってしまう可能性があるため、見つけたらすぐに生け簀から出すとのことであった。養殖業者は早朝に海へ行き、魚病発生があった場合死亡魚を回収し、持ち込みあるいは冷蔵輸送で検査に提出していた。一方、異常発見後に抗菌薬使用開始が遅れると、抗菌薬の効果が出ず大量死してしまうため、魚類防疫員による魚病発生時の防疫対策の助言の範囲内において、養殖業者が死亡魚を検査に出さずに、あるいは出す前に速やかに抗菌薬を投与することは、各県で一般的であった。また発生後生け簀内で再発がある場合、使用基準の範囲内であるが、なかなか使用を中止できず、抗菌薬の投与を継続せざるを得ない事例もある。抗菌薬は、在庫がある場合は倉庫から使用し、なければ水産用医薬品販売会社に注文するとのことだった。

ワクチンの開発により、死亡が激減した魚病がある一方、ワクチンがないエドワジエラなど細胞内寄生菌による魚病発生が多く、疾病の種類が増加している。日本の魚病発生情報として、農林水産省が「魚病被害の発生状況に関する情報」¹⁾を公表している。

考察

養殖業者は水産用抗菌剤を使用しようとする場合には、当該水産用抗菌剤の使用の対象となる水産動物を養殖する施設等の所在する水域を管轄する都道府県の魚類防疫員若しくは魚類防疫協力員又は獣医師に対し、水産用抗菌剤使用指導書交付申請書にこれまで使用した水産用医薬品を記載した使用記録票の写しを添えて提出し、水産用抗菌剤使用指導書の交付を申請する仕組みとなっている。魚病発生時には、養殖業者が獣医師、魚類防疫員または魚類防疫協力員が発行する使用指導書を基に直接抗菌薬販売業者に注文し、抗菌薬を受け取ることが出来る。都道府県によっては魚病発生と抗菌薬による治療の情報について、ある程度詳細に把握している場合もあるが、養殖が盛んな県では、漁協等の魚類防疫協力員や獣医師による処方も行われており、その場合県は、魚類防疫協力員や獣医師から提出された使用記録票・申請書・指導書の写しから養殖場ごとの医薬品使用状況を把握することとなる。抗菌薬使用量については、現時点では、地域や養殖種別のデータはなく、JVARM による日本全体での抗菌薬推定販売量²⁾が最も信頼できる情報となる。

魚病診断は、獣医師が雇用されている民間企業か漁協または地方自治体の魚病診断施設で行われるが、地域によって利用診断施設の形態（企業・漁協・自治体）は異なる。各県のデータは魚病診断については県の診断施設で実施した実績しか把握していない場合が多いようである。漁協では保険支払請求実績が利用可能であれば魚病被害を推定するには適している可能性があるが、保険支払請求がされない部分は捉えることが出来ないため留意する必要がある。管轄都道府県は管内養殖業者の魚病の発生記録すべてを集計しているとは言えず、発生状況の集計は、他の複合的な情報の補填が不可欠である。

総括

本研究では、国内4県において水産養殖場における魚病対応の現状について分析した。魚病発生および抗菌薬の使用について、データを集積する枠組みはあるものの、魚種毎の養殖稚魚重量等魚病発生前の生産データ、魚病・魚種毎の適応症発生データ、発生生け簀のバイオマス重量、抗菌薬による治療履歴等のデータが公表されている状況ではない。このため現状では農林水産省による魚病被害お

よび水産用医薬品販売高³⁾の報告が定量的リスク評価には適したデータであり、今後漁協や企業の診断データ、漁協の保険支払請求データ、小売りの動物用医薬品販売業者等からデータを収集することについて検討すると有用である。

【参考文献】

1. 農林水産省 HP 魚病被害の発生状況に関する情報
[https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/disease/gyobyou_higai_jyoukyou.html]
2. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会（2023）薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 p102。
3. 農林水産省動物用医薬品検査所 HP 動物分野での薬剤耐性モニタリング
[https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3.html]

イ. アジアの養殖水産動物への抗菌薬使用と耐性菌モニタリングに関する情報収集（蒔田浩平（酪農大））

研究内容・方法

2023年8月にタイに出張し、FAO 薬剤耐性菌レファレンスラボラトリーであるチュラロンコン大学を訪問し、水産に関する国際的な取り組みの状況とタイの状況について調査した。また、カセサート大学の協力を得て、稚魚から幼魚、および幼魚から出荷までを扱うセラピア養殖場、および熱帯魚販売店における聞き取り調査を実施した。

研究結果

1. チュラロンコン大学

FAOは、AMRガイドラインを順次発行しており、水産に関するアジア太平洋地域のガイドライン⁴⁾がUS-AIDによる支援で発行されている（調査時点では発行前に情報を入手した）。本ガイドラインはFAOのDr. Mary Joy Gordoncilloが調整しており、水産分野についてはシンガポールが担当していた。

タイ国では、水産動物の薬剤耐性菌に関する研究はされているものの、抗菌薬使用量と耐性菌の両方で薬剤耐性に関するモニタリングシステムはない。

2. カセサート大学、セラピア養殖場等

先進的な稚魚養殖場では、解放式であるが環境・水質管理により細菌感染症を予防していた。この養殖場では抗菌薬は使用されていなかった。しかし、感染症予防に積極的でない養殖場では、薬局で抗菌薬を獣医師の処方なく簡単に購入できることから、多量に使用されているとのことであった。また畜産の副産物を水産に利用していることもあり、家畜に使用した残留抗菌薬および耐性菌が含まれる可能性がある副産物が養殖生け簀に投入されることがある実態も聞かれた。水産を専門に診断・薬剤感受性試験をする民間の獣医師はおらず、カセサート大学ではタイ国内中部、南部の広い範囲で可能な限り養殖現場への技術支援を行っていた。これら地域で発生の多い細菌性感染症は、*Aeromonas*、*Streptococcus*、*Flavobacterium*、*Francisera*であった。

観賞魚販売店では、観賞魚にエルバージュ（ニフルスチレン酸ナトリウムを有効成分とする製剤、ニトロフラン系抗菌薬）が使用されていた。

考察

タイで聞き取られた実情は、本事業におけるわが国での使用実態調査では見られなかったが、海外におけるAMRリスクパスの多様性が明らかとなった。本調査でFAOによるアジア太平洋地域の水産に関するAMRガイドラインの発行について知見を得たが、その後2024年にはWOAHが水産養殖分野での抗菌薬の使用と薬剤耐性ワークショップをアジア太平洋地域で行うなど、水産分野における抗菌薬の慎重使用と薬剤耐性の普及が行われている⁵⁾。

総括

本調査から、アジア太平洋地域でも水産における抗菌薬使用モニタリング、薬剤耐性モニタリングの必要性は認識されており、AMRガイドラインの作成と水産用抗菌薬の慎重使用に関する普及が行われている実態が分かった。一方、聞き取り調査において、タイにおいて感染症予防に積極的でない養

殖現場での抗菌薬の使用量は多く、そのモニタリングは進んでいないことから、実際の使用量および耐性菌の選択に関する状況の把握には至っていないことが分かった。

【参考文献】

4. FAO; NParks; SFA. (2023) Monitoring and surveillance of antimicrobial resistance in bacterial pathogens from aquaculture. Regional Guidelines for the Monitoring and Surveillance of Antimicrobial Resistance, Use and Residues in Food and Agriculture - Volume 3, Bangkok, Thailand.

[<https://openknowledge.fao.org/items/d029efb3-e897-47bd-91b4-0b99b6c5c2ed>]

5. WOH. (2024) Asia Pacific AMU-AMR workshop for aquaculture. [<https://rr-asia.woah.org/en/events/asia-pacific-amu-amr-workshop-for-aquaculture/>]

(4) 養殖水産動物での薬剤耐性菌の定量的リスク評価

ア. 養殖水産動物での薬剤耐性菌の定量的リスク評価（蒔田浩平（酪農大））

研究内容・方法

1. 目的

本研究は、わが国の主要養殖魚種であるブリ類とマダイ由来細菌における定量的薬剤耐性発生評価を試行することを目的に行われた。発生評価は、WOAHによるリスク評価の枠組みである発生評価、暴露評価、影響評価の最初のステップであり、養殖場における抗菌薬の使用により、出荷時の魚において選択された薬剤耐性菌を保有する確率などを評価するものである。今回の事業においては、ハザードとして、養殖ブリ類およびマダイ由来の①マクロライド系薬剤耐性 α 溶血性レンサ球菌症原因菌 I~III 型 (*L. garvieae*, *L. formosensis* 等)、および②テトラサイクリン系薬剤および③スルホンアミド系合成抗菌剤耐性 *Vibrio* 属菌とした。

2. フォルトツリーによる水産養殖薬剤耐性菌リスクの整理

本研究では発生評価に絞って定量的に分析するが、将来の定量的リスク評価の試行の可能性に備え、水産養殖由来薬剤耐性菌による人の健康影響イベントの発生を起点として、起こりうるシナリオを遡るフォルトツリー解析を行った。フォルトツリーでは、リスクの見逃しを防ぐため日本では「あり得ない」と思われるシナリオについても、日本に加えアジア地域での現地調査および文献調査^{6,7,8,9)}を参考にし、未広に捉えた。

3. 定量的発生評価の試行

上記目的のとおり、対象魚種はブリ類とマダイに、対象魚病は連鎖球菌症とビブリオ症に絞って評価した。理想としては、魚種毎の養殖稚魚重量、水産用抗菌薬適応症発生生け簀中のバイオマス重量、抗菌薬による治療履歴、魚病発生後生残した養殖魚の出荷バイオマス重量あるいは魚種毎、魚病毎致命率、および水揚げした養殖魚の持つ細菌の耐性率がモニタリングされており、データがあることが望ましい（図5）。水産養殖魚由来細菌の薬剤耐性率については、一部薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書に記載がある¹⁰⁾。しかしながら、日本ではこれら魚種および魚病のデータについて、信頼できる直接的なデータの入手ができなかった。そこで下記のステップで、主要魚種と主要魚病の全てを対象とした解析により、抗菌薬使用確率を推定する方法を構築した（図5）。

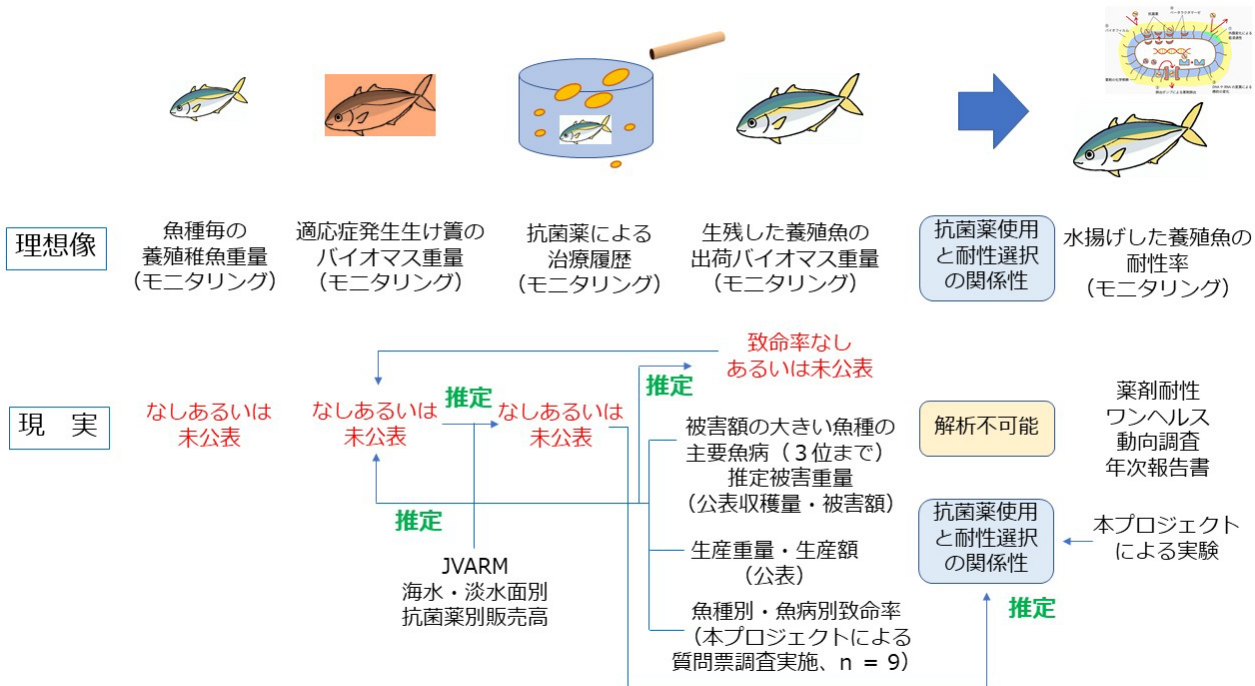


図 5. 本定量的発生評価のアプローチ

農林水産省公表の海水面・淡水面（ I ）養殖抗菌薬 i の使用量 AMU_{il} （令和 3 年度販売量のデータ¹¹⁾ で代用）を用いて魚種別の魚病発生率、魚種・魚病別の抗菌薬投与量を推定できるか検討した。

$$AMU_{il} = \sum_1^k \sum_1^j a_{ijkl} Dose_{ijkl} \frac{Death_{jk}}{CFR_{jk}} \quad \text{式 1}$$

ここで、 a_{ijkl} は淡水面または海水面（ I ）養殖の魚種 j に主要魚病 k が発生した場合の抗菌薬 i 使用率、 $Dose_{ijkl}$ は同じく抗菌薬 i の魚体重当たり 1 日投与量、 $Death_{jk}$ は魚種 j 、魚病 k 被害重量、 CFR_{jk} は魚種 j 、魚病 k 致命率。魚種 j 、魚病 k 被害重量についてはその報告がなく、農林水産省は主要魚種別推定生産額および被害額と、その主要疾病が占める割合を 3 位まで公表している¹²⁾。このため主要魚種のバイオマス当たり単価を、農林水産省公表の全国養殖魚種別収穫量統計¹³⁾ および養殖業の全国魚種別産出額統計^{14,15)} を用いて算出し、被害額を除すことで令和 3 年度の被害重量を推定した。この際、魚病の頻発月齢から収穫までタイムラグがあることを見越して令和 4 年度の収穫量を用いた。

魚種、魚病ごとの抗菌薬 i の使用実態についてはその情報がないため、それらに共通の使用率 a_{il} があると仮定し、式 1 を変形した（式 2）。使用率は適応魚病が発生した場合の抗菌薬使用日数である。メーカーが推奨する各抗菌薬の使用日数は、動物用医薬品等データベース¹⁶⁾ から調査した。

$$a_{il} = \frac{AMU_{il}}{\sum_1^k \sum_1^j Dose_{ijkl} \frac{Death_{jk}}{CFR_{jk}}} \quad \text{式 2}$$

CFR_{jk} は魚病治療経験者 9 名に質問票を送付し、致命率区分ごとの経験頻度回答からベータ分布を最尤推定し、中央値を得た。解かれた値と魚種 j の年間生産量 $Production_j$ を用いて魚種別魚病発生率 IR_{jk} を計算した（式 3）。この発生率は、魚個体レベルでの発生率ではなく、任意の生け簀で、一

年を通して例え数匹単位でも、何回魚病 k が発生しているかを示す、生け簀レベルでの発生率である。

$$IR_{jk} = \frac{Death_{jk}/CFR_{jk}}{Production_j + \sum_1^k Death_{jk}} \quad \text{式 3}$$

出荷養殖魚におけるハザードの保有割合について、本プロジェクトでは市販魚における細菌の耐性率を実験で得たが、市販魚の場合、養殖段階より後の段階における交差汚染の可能性があり、養殖段階での抗菌薬使用と薬剤耐性選択との関係を正確に検証するために実験結果を用いることは困難であると考えられた。このためプロジェクトの実験結果は採用せず、公表情報¹⁰⁾を整理した。

研究結果

1. フォルトツリー解析

図 6 に人の健康影響から養殖魚の流通・加工まで遡ったフォルトツリーを示す。なお図 6 の下痢・嘔吐の発生と抗菌薬の効果減弱との間に記載していないが、軽症～中等症の腸管感染症の場合、抗菌薬の使用が推奨されないことがある。人の健康影響は食中毒と腸管内から排泄された菌からの経皮感染等による腸管外感染に分けられた。魚は生食される場合があり、キッチンまたは加工段階、あるいは養殖場からの輸送以降での魚表面の不十分な洗浄、交差汚染により、生産段階で魚表面に付着した薬剤耐性菌および耐性遺伝子が人に喫食されるシナリオが考えられた。流通・加工段階での交差汚染は、魚の腸管内および筋肉内に存在する薬剤耐性菌が生食する魚の体表に付着するシナリオも考えられた。また生産段階で魚体内に存在する薬剤耐性菌についても生食で喫食されるシナリオが考えられた。

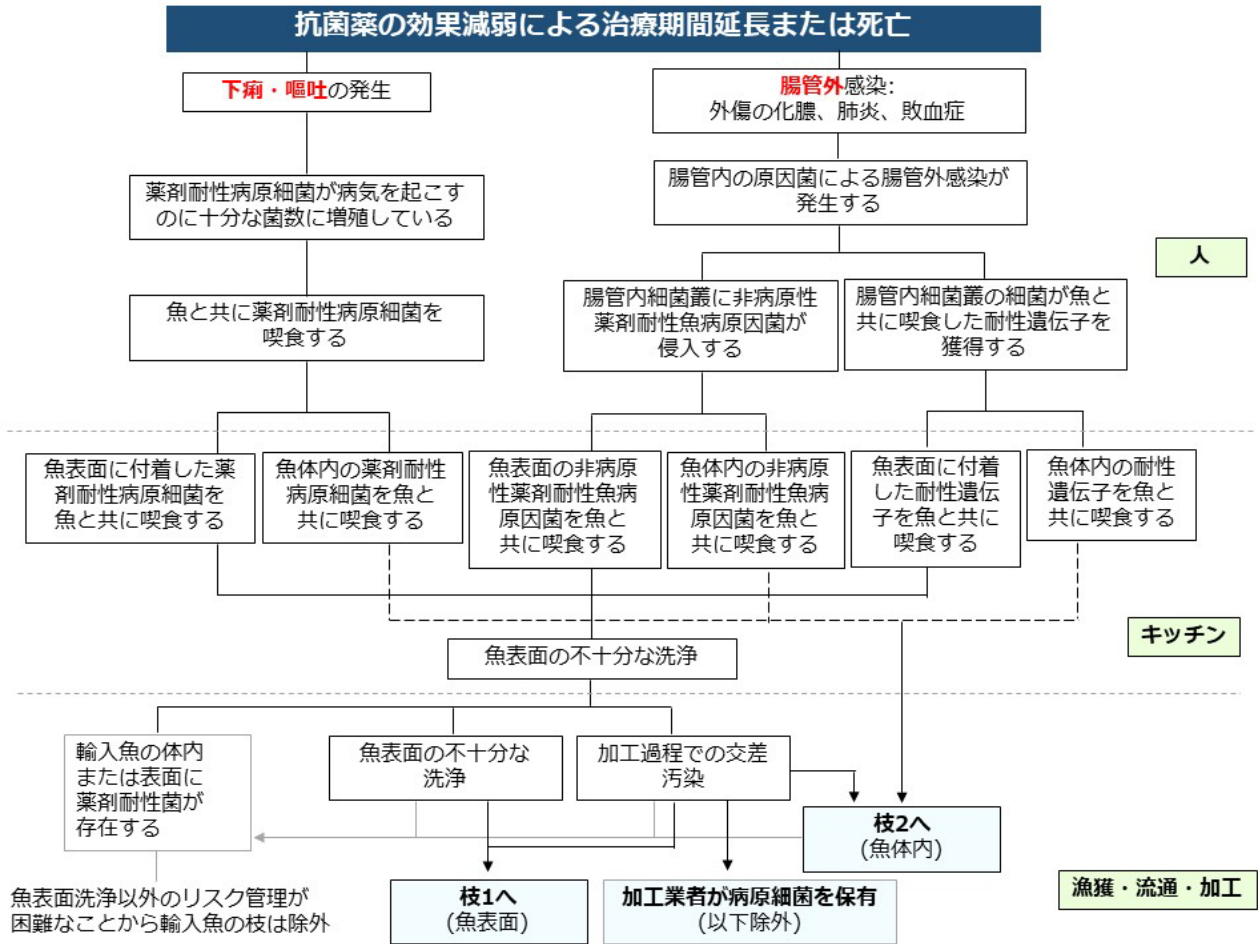


図 6. 人の健康影響から養殖魚の流通・加工まで遡ったフォルトツリー

図 7 に海水面および内水面養殖段階でのフォルトツリーを示す。本フォルトツリーは、養殖以外で使用された抗菌薬の影響や、国内およびアジア地域のフィールド調査結果や文献調査結果を含めて作成された。養殖魚体内では、筋肉または内臓内に病原性または非病原性薬剤耐性菌が存在する可能性がある。このフォルトツリーで焦点を当てている非病原性薬剤耐性菌は、魚病由来細菌である。一方、病原性薬剤耐性菌には、魚病由来細菌と、畜産および人由来薬剤耐性菌を含めた。本プロジェクトでのタイでの調査および文献調査^{6,7,8,9}から、タイやメコンデルタ地帯で人や家畜排泄物、副産物を魚の飼料にする養殖が一般的に見られることが明らかになったのでツリーに含めた。内水面養殖においては降水量が増加した場合などに養殖池において糞便微生物や潜在的な病原体の量が増加する¹⁷シナリオは起こりうる。魚病の発生には感染稚魚の導入、近隣養殖場などからの水源の汚染などによる生け簀内の汚染、体表の傷、他の感染症や環境ストレス、高密度飼育によるストレスが引き金となる¹⁸。魚病対応に、抗菌薬が使用されるが、発生生け簀および隣接する未発生生け簀への水等を介した病原体の伝播の可能性を考慮して、臨床症状初期の段階において、抗菌薬が使用される可能性がある。養殖水が薬剤耐性魚病細菌や薬剤耐性病原細菌に汚染されている場合、魚の体表がこれら薬剤耐性菌に汚染されているシナリオもありうる。

ブリのビブリオ病は、主に *V. anguillarum* の感染によるが、高水温期には *V. harveyi* など他のビブリオ属細菌が原因になることがある²⁰⁾。ブリのモジャコ期に発生するビブリオ病は外観的病徴が見られないが多く魚が死亡する。以後の時期には体表にスレ様の患部が形成されることが多く、時に潰瘍化が見られる。この場合、直腸にカタル性炎が認められることが多い²⁰⁾。

マダイのビブリオ病は、沖出しの稚魚がストレスとスレで発生した滑走細菌症に続いて *V. anguillarum* が感染してある程度大きな被害を受ける場合、高水温期に養成魚の生け簀内に数個体の規模で *V. anguillarum*、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* が感染して発生する場合、および低水温期である越冬期に滑走細菌症に続き未同定の *Vibrio* sp. が感染し時にビバギナ症を併発して大量死を起こす場合の3種類に類別される²⁰⁾。

ブリのビブリオ病ワクチンには J-0-3 型ビブリオ病対象の注射剤があり、 α 溶結性連鎖球菌症との混合ワクチンならびに α 溶血性連鎖球菌症、類結節症、イリドウイルス病との混合ワクチン、さらに I 型および II 型 α 溶血性連鎖球菌症、類結節症、イリドウイルス病との混合ワクチンが販売されている。マダイ用のビブリオ病ワクチンは市販されていない。

ブリとマダイを含むスズキ目魚類のビブリオ病に対する水産用医薬品として認可されている抗菌薬には、全て経口薬として、チアンフェニコール、スルファモノメトキシシンまたはそのナトリウム塩、塩酸オキシテトラサイクリン、およびアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリンがある。これに加えて、ブリのみに対して認可されているビブリオ病および類結節症に対する抗菌薬としてスルフィソゾールナトリウムがある(表 19)。

ブリとマダイのビブリオ病に対して認可されているスルフォンアミド系合成抗菌剤はこれらのうちスルファモノメトキシシンである。

ブリおよびマダイに①エリスロマイシンの使用が認可されている疾病は連鎖球菌症、②塩酸オキシテトラサイクリンの使用が認可されている疾病はビブリオ病、およびアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリンの使用が認可されている疾病は連鎖球菌症およびビブリオ病、③スルファモノメトキシシンの使用が認可されている疾病はノカルジア症およびビブリオ病である。

表 19. ブリとマダイの連鎖球菌症およびビブリオ病に対して認可されている水産用抗菌剤

対象魚種	有効成分	投与方法	用量	投与期間	使用禁止期間
スズキ目	チアンフェニコール	経口	50mg/kg・日	5-7 日間	15 日間
スズキ目	スルファモノメトキシ ンまたはそのナトリウ ム塩	経口	200mg/kg・日	-	15 日間
スズキ目	塩酸オキシテトラサイ クリン	経口	50mg (力価) /kg・日	-	30 日間
スズキ目	アルキルトリメチルア ンモニウムカルシウム オキシテトラサイクリ ン	経口	50mg (力価) /kg・日	-	20 日間
ブリのみ	スルフィソゾールナト リウム	経口	200mg/kg・日	-	10 日間

*農林水産省「水産用医薬品について 第 37 報」²¹⁾から転載。

(ii) 被害の大きい細菌性魚病

被害の大きい魚種は、被害重量順（参照 12-15）に、ブリ類（4,240t）、マダイ（1,587t）、ヒラメ（340t）、クロマグロ（320t）、シマアジ（218t）、ウナギ（216t）、トラフグ（193t）、アユ（105t）であった。これら魚種について被害の大きい細菌性疾病は、ブリ類で連鎖球菌症とノカルジア症、マダイでビブリオ病とエドワジエラ症、クロマグロで連鎖球菌症、ウナギでパラコロ病（エドワジエラ症）、ヒラメで連鎖球菌症、エドワジエラ症、トラフグでビブリオ症、シマアジで連鎖球菌症とノカルジア症、アユで冷水病であった。

(iii) 致命率

主要魚種の主要魚病ごと致命率に関する質問票の致命率カテゴリ別集計結果と最尤推定された致命率中央値を表 20 に示す。魚病発生時の致命率はほとんどの魚病で 5%未満であったが、ヒラメのエドワジエラ症とシマアジの連鎖球菌症で 5-6%、アユの冷水病は 28%と高かった。しかし、アユの専門家を探すのに苦労し、冷水病に関する回答者は 1 名のみであった。トラフグに関する回答者も 1 名のみであった。魚種 j 、魚病 k の致命率は式 1-3 で CFR_{jk} として表記されている。

表 20. 主要魚種魚病の致命率中央値および致命率カテゴリ別集計結果

魚種と魚病	中央値 (%)	有経験者	0-1%	2-3%	4-5%	6-10%	11-15%	16-20%	21-25%	26-30%	31-40%	41-50%
ブリ類連鎖球菌症	2.7	7	36	13	4	6	3	4	1	1	1	0
ブリ類ノカルジア症	3.7	7	28	15	9	6	1	3	4	4	0	0
マダイビブリオ病	1.4	6	31	21	8	1	0	0	0	0	0	0
マダイエドワジエラ症	3.0	5	15	14	12	7	2	1	1	0	0	0
クロマグロ連鎖球菌症	1.5	4	24	9	6	2	0	0	0	0	0	0
ウナギパラコロ病	2.6	2	1	7	2	0	0	0	0	0	0	0
ヒラメ連鎖球菌症	1.9	4	21	8	6	6	2	0	0	0	0	0
ヒラメドワジエラ症	5.2	6	16	10	6	10	8	6	2	1	1	0
トラフグビブリオ病	1.2	1	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0
シマアジ連鎖球菌症	5.5	6	17	12	8	7	4	3	5	1	2	2
シマアジノカルジア症	1.6	4	19	12	6	3	0	0	0	0	0	0
アユ冷水病	28.0	1	0	0	0	0	0	2	3	2	2	1

(iv) 生け簀レベルでの推定年間発生率

表 21 に主要魚種に主要魚病が任意の生け簀で一年間のうちに発生する頻度を示す。魚種 j 、魚病 k の年間発生率は、式 3 で IR_{jk} と表記されている。ヒラメのエドワジエラ症は特に発生率が高く、専門家からも令和 3 年度に例年になく本病が多発したことを指摘されている(パーソナルコミュニケーション)。

表 21. 生け簀レベルでの主要魚種・魚病の推定年間発生率

魚種	主要魚病	年間発生率
ブリ類	連鎖球菌症	0.576
ブリ類	ノカルジア症	0.338
マダイ	ビブリオ病	0.088
マダイ	エドワジエラ症	0.454
クロマグロ	連鎖球菌症	0.845
ウナギ	パラコロ病	0.167
ヒラメ	連鎖球菌症	0.229
ヒラメ	エドワジエラ症	2.798
トラフグ	ビブリオ病	1.079
シマアジ	連鎖球菌症	0.714
シマアジ	ノカルジア症	0.318
アユ	冷水病	0.053

(v) 適応症発生時の推定抗菌薬使用率

表 22 に主要魚種における主要魚病発生時の抗菌薬推定使用率を示す。この値は、1 回の適応症発生時に使用する抗菌薬の使用日数に相当する。オキシテトラサイクリン、アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン、スルファモノメトキシシとそのナトリウム塩、スルフィソゾールについてはメーカーによる推奨使用日数は記載がなかった¹⁶⁾。マダイおよびトラフグのビブリオ病、ヒラメの連鎖球菌症発生時のオキシテトラサイクリンなど、数式上(式 2 の a_{il})、使用率が非常に高く推定された魚種、魚病があった。

表 22. 主要魚種における主要適応魚病発生時の抗菌薬推定使用率

抗菌薬	魚種と魚病*1	発生当たり使用率 (a_{il}) *2	投薬期間
アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン (海水)	ブリ類：連鎖球菌症 マダイ：ビブリオ病 クロマグロ：連鎖球菌症 ヒラメ：連鎖球菌症 シマアジ：連鎖球菌症	1.438	-
オキシテトラサイクリン (海水)	マダイ：ビブリオ病 ヒラメ：連鎖球菌症 トラフグビブリオ病	122.317*3	-
オキシテトラサイクリン (淡水)	ウナギ：パラコロ病	3.290	
ドキシサイクリン (海水)	ブリ類：連鎖球菌症 クロマグロ：連鎖球菌症 シマアジ：連鎖球菌症	0.291	3 - 7 日
エリスロマイシン (海水)	ブリ類：連鎖球菌症 クロマグロ：連鎖球菌症 シマアジ：連鎖球菌症	19.031*3	5 日間
リンコマイシン (海水)	ブリ類：連鎖球菌症 クロマグロ：連鎖球菌症 シマアジ：連鎖球菌症	0.896	6 日間
オキシリン酸 (経口、淡水)	ウナギ：パラコロ病	0.263	5 日間
スルファモノメトキシとそのナトリウム塩 (海水)	ブリ類：ノカルジア症 マダイ：ビブリオ病 シマアジ：ノカルジア症	4.243	-
スルフィゾゾール (海水)	ブリ類：ノカルジア症	0.623	-
スルフィゾゾール (淡水)	アユ：冷水病	30.796*3	-
チアンフェニコール (海水)	マダイ：ビブリオ病	7.075	5 - 7 日間

フロルフェニコール（海水）	ブリ類：連鎖球菌症 クロマグロ：連鎖球菌症 シマアジ：連鎖球菌症	0.416	5日間
フロルフェニコール（淡水）	ウナギ：パラコロ病 アユ：冷水病	7.037	5日間
オルメトプリム（淡水）	ウナギ：パラコロ病	0.259	5-7日間

*1 適応症のうち被害が大きく被害報告が公表されているもののみで計算

*2 各抗菌薬について、記載魚種と魚病が発生した場合、共通の使用確率が存在すると仮定した推定値

*3 数式上、魚病被害報告が実態より少ない可能性、質問票調査による推定致命率が高いことなどにより、現実的でない推定になっている可能性がある。

(vi) 養殖魚における薬剤耐性率の文献調査

2023年度ワンヘルス動向調査年次報告書¹⁰⁾によると、*L. garvieae*は魚の病原菌であるため健康養殖ブリの調査が行われた10施設のうち6施設で分離されなかったと記載があり、薬剤耐性率については記載がなかった。魚種を限定しない病魚由来*L. garvieae*はエリスロマイシン耐性率が2019年は3.1%、2020年は0.6%、2021年は14.5%と大きくばらついている。オキシテトラサイクリン耐性率は、2019年は2.6%、2020年は0.6%、2021年は1.0%であった。

健康養殖ブリ由来ビブリオ属菌については、同じく10施設10尾ずつ採材された魚から分離された169株のうち10.7%がオキシテトラサイクリン耐性¹⁰⁾であった。スルファモノメトキシシンについてはブレイクポイントを定めることができなかったと報告されている。魚種を限定しない病魚由来ビブリオ属菌のオキシテトラサイクリン耐性率は、2019年は0%、2020年は11.9%、2021年は4.2%であった。

考察

本研究では、わが国の水産養殖主要魚種のブリ類とマダイにおける3種類のハザードについて魚病と認可されている抗菌薬を文献から整理^{19,20,21)}した上で、令和3年度の公表データからブリ類についてはマクロライド系薬剤耐性*L. garviae*グループ、マダイについてはテトラサイクリン系薬剤およびスルフォンアミド系合成抗菌剤耐性ビブリオ属菌の発生評価を行った。

生け簀レベルでの年間発生率は、マダイのビブリオ病と比較してブリ類の連鎖球菌症は頻発していると推定された。ブリ類の連鎖球菌症対応にはエリスロマイシンが好んで使用されている傾向が推察された(表22. 発生当たり推定使用率が19.031日分)。マダイのビブリオ病の発生率は低いものの、その発生に際してオキシテトラサイクリンが頻繁に用いられている可能性が示された。一方、専門家からは本研究で推定された抗菌薬の使用率は非常に高く、現場の感覚と乖離しているとの指摘を受けている(パーソナルコミュニケーション)ため、現場で妥当性が検証されていない本研究結果の取り扱いは、十分気を付けるべきである。

使用率が高く推定される理由は、数式上いくつか考えられる。一つは被害重量の報告値が実態より少ない可能性である。オキシテトラサイクリンの使用が認可されている主要魚種では、マダイの生産量が圧倒的に多いことから、マダイのビブリオ病の被害報告が現実よりも少ない可能性がある。次にマダイにおけるビブリオ病の致命率が今回の質問票調査で高く推定されており、実際発生があった生け簀中のバイオマス量はもっと大きいのかも知れない。一方、水等を介した病原体の伝播の可能性を考慮して、隣接する他生簀への病原体への暴露又は臨床症状初期の段階において、抗菌薬投与の可能性はある。各県での聞き取り調査でも、魚病発生があった場合、治療が遅れると魚群全体に魚病が拡大するリスクを養殖業者は経験的に高く感じていた。また、発生後生け簀内で再発がある場合、使用基準の範囲内であるが、なかなか使用を中止できず、抗菌薬の投与を継続せざるを得ない事例も聞き取っている。以上から魚病被害から使用率を推定することには限界がある。魚病が発生する生育ステージが調査されていないことは、数式での理論上、影響は少ないことが予想されるが、正確な発生評価の妨げになる要因ではある。本研究は令和3年度の単年度評価であり、定量的な発生評価を試行したものであるが、今後複数年度分実施して傾向を確認することが望まれる。また致命率について、日本の養殖現場で活躍する魚病専門家への質問票調査数を増やすことが望まれる。仮に定量的評価を実施する場合には、さらに得られた致命率の確率分布を用いて中央値前後の値を代入し、感度分析を行うとさらに現場感覚との乖離の理由について考察できると思われる。

文献調査では健康ブリ由来オキシテトラサイクリン耐性率は10.7%と報告されている¹⁰⁾もののマダイ由来細菌に関する情報は無い。本プロジェクトでは、市販魚が保有する耐性菌の一部については養殖場

からの輸送以降の段階での交差汚染の可能性が指摘されているため取扱いに気を付ける必要があるが、養殖マダイのビブリオ属菌オキシテトラサイクリン耐性率は1.7%であった。

本研究では定量的な発生評価の試行に必要なデータが限定的である状況で、工夫して公表データから推定する手法を開発した。しかしその妥当性には、疑問が残る。定量的な発生評価の試行には、主要魚種の漁獲量が多い地域での養殖現場における主要魚病の発生、被害、抗菌薬使用の実態、魚病原因菌の薬剤耐性に関するデータの収集が必要である。このような必要データが蓄積されると、食品安全委員会の半定量的な食品健康影響評価も、より養殖現場の実情を反映した内容となることが期待される。

総括

本研究では、定量的な発生評価の試行において、主要魚種、主要魚病についてできえ魚病発生、治療、および養殖水揚げ直後の魚における薬剤耐性に関するデータが限定的である中、公表データを用いて魚病の年間発生率と抗菌薬使用率を推定する手法を開発した。

解析結果から魚病発生時の使用率が高く推定される抗菌薬があることが示唆されたが、入手できない情報が多いことから、その取扱いについては十分気を付けるべきである。本研究期間中にはできなかったが、今後複数年度について評価を実施する、感度分析を実施するなど、評価を深めることが望まれる。また、定量的な発生評価を試行する場合にデータが必要と認識された部分についてはフィールド調査の実施が望まれる。

【参考文献】

6. Giri, SS. (2024) Sustainable aquaculture practices in South Asia: a comparative analysis of feed formulation and utilization. *Animal Frontiers* 14(4), 6-16. <https://doi.org/10.1093/af/vfae020>
7. Mukherjee, T.K. (1991) Proceedings of the FAO/IPT Workshop on Integrated Livestock-Fish Production Systems, 16-20 December 1991, Institute of Advanced Studies, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia. [<https://www.fao.org/4/ac155e/AC155E00.htm#TOC>]
8. Thongsanitkan, P., Worapussu, T., Siriustananum, N., Bangbai, P. (2024) Improvement of blood meal as an ingredient in hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias garepinus*). *Recent Science and Technology* 16(3), 813-825. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/rmutsvrj/article/view/254256>
9. Nhan DK, Verdegem MCJ, Binh NT, Duong LT, Milstein A, Verreth JAJ. (2008) Economic and nutrient discharge tradeoffs of excreta-fed aquaculture in the Mekong Delta, Vietnam. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 124(3-4), 259-269. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.10.005>
10. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会 (2023) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書.
11. 農林水産省動物医薬品検査所. (2021) 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量. 動物用医薬品、医薬部外品、医療機器及び再生医療等製品販売高年報 (別冊) .
12. 農林水産省. (2022) 魚病被害の内訳 (令和3年度) . 農林水産省 HP [https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/disease/gyobyoyou_higai_jyoukyou_kako.html]
13. 農林水産省. (2023) 養殖魚種別収穫量 (種苗養殖を除く) . 漁業・養殖業生産統計 (e-Stat) .
14. 農林水産省. (2023) 魚種別産出額累年統計 (海面養殖業) . 漁業・養殖業生産統計 (e-Stat) .

15. 農林水産省. (2023) 魚種別産出額累年統計 (内水面養殖業). 漁業・養殖業生産統計 (e-Stat).
16. 農林水産省動物医薬品検査所. (2025) 動物用医薬品等データベース. 2025年2月1日アクセス.
[<https://www.vm.nval.go.jp/>]
17. Tryland, I., Robertson, A., Blankenberg, AGB., Lindholm, M., Rohrlack, T., Liltved, H. (2011) Impact of rainfall on microbial contamination of surface water. *International Journal of Climate Change Strategies and Management* 3(4), 361-373. DOI: 10.1108/17568691111175650
18. Svobodová, Z., Lloyd, R., Máchová, J., Vykusová, B. (1993) 6 Pollution and fish diseases. In: *Water quality and fish health*. FAO Fisheries Department, Rome.
[<https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/aquaculture/a0844t/docrep/009/T1623E/T1623E00.htm#TOC>]
19. Vendreii D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. (2006) *Lactococcus garvii* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 29, 177-198.
20. 小川和夫・佐野元彦・横山博. (2002) 新魚病図鑑第3版. 緑書房.
21. 農林水産省. (2023) 水産用医薬品について 第37報.

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

現在のところはない。

2 本研究を基にした学会発表の実績

木暮 健人、福田 昭、浅井 鉄夫、臼井 優，市販国産魚における継続可能な薬剤耐性モニタリングの試行，第 167 回日本獣医学会，2024 年 9 月 10 日帯広

Masaru USUI, Models of Surveillance: Implementation in Livestock and Companion Animals, and Trials in Environmental and Aquatic Animals. AMR workshop in Brunei., 2024 年 9 月 21 日, オンライン (成果の一部について紹介)

蒔田浩平、福田昭、浅井鉄夫、臼井優、養殖ぶり・まだい由来細菌の薬剤耐性発生評価、第 65 回獣医学学会学術集会、2025 年 3 月 9 日 東京

3 特許権等の出願・申請等の状況

現在のところはない。

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

現在のところはない。

5 その他 (各種受賞、プレスリリース等)

現在のところはない。

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) 市販養殖魚及び天然魚から分離される <i>Lactococcus garvieae</i> のマクロライド系抗生物質に関する薬剤感受性を明らかにする。	5	<i>Lactococcus garvieae</i> について、分離法を確立し、薬剤感受性を明らかにすることができた。
(2) 市販養殖魚及び天然魚から分離される <i>Vibrio</i> 属菌と <i>Aeromonas</i> 属菌のテトラサイクリン系抗生物質及びスルフォアミド系合成抗菌剤に関する薬剤感受性を明らかにする。	5	<i>Vibrio</i> 属菌と <i>Aeromonas</i> 属菌について、分離法を確立し、薬剤感受性を明らかにすることができた。
(3) 市販養殖魚及び天然魚から分離される <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 及び <i>V. vulnificus</i> の分離率及び薬剤感受性を明らかにする。	5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 及び <i>V. vulnificus</i> の分離率及び薬剤感受性を明らかにすることができた。
(4) (1)～(3)の情報をもとに食品健康影響評価に活用できるデータを整備する。また、評価手法の改善に資する提言をまとめる。	5	指標細菌の妥当性について確認ができた。ゲノムモニタリングの可能性について示すことができた。
(5) 養殖場における抗菌薬使用実態を調査し、情報を整理する。	5	養殖場における抗菌薬の使用実態の調査を行うことで実態を明らかにすることができた。
(6) 海外先進地域及びアジア地域における養殖水産動物への抗菌薬使用と耐性菌モニタリングに関する情報を収集し、情報を整理する。	4	アジア地域での養殖水産動物への抗菌薬使用実態やモニタリングに関する情報を収集することができた。
(7) 市販養殖魚が保有する薬剤耐性菌の定量的リスク評価を試みる。	5	発生評価を実際に試行することができた。

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	5	当初の計画通り、市販魚から細菌株を分離する方法を確立し、薬剤耐性モニタリングを実施できる体制を整えることができた。今回の事業で確立できたモニタリングの実施により、ばく露評価に用いることができる市販魚由来薬剤耐性菌の信頼性の高いデータを得ることができる。さらに、ゲノム解析を実施することで、表現型と耐性遺伝子の関係を解明す

		<p>ることができた。また、養殖場からの輸送以降の段階での耐性菌の交差汚染の可能性を示すことができ、市販魚由来耐性菌のデータをリスク評価に用いる際のデータの取り扱いにおいて注意が必要であることを示すことができた。また、養殖現場での抗菌薬の使用実態を解明した上で、薬剤耐性発生評価を具体的に試行する事ができた。</p>
(2) 研究成果の有用性	5	<p>市販魚が保有する細菌の薬剤感受性を明らかにする事ができ、薬剤耐性モニタリング手法を確立する事ができた。今回の研究成果を用いて継続的に薬剤耐性モニタリングをすることで、食品健康影響評価におけるばく露評価のデータとして用いることが期待できる。ただし、養殖場からの輸送以降の段階での交差汚染が起こる可能性があるため、抗菌薬使用の影響を評価する検査材料として用いる際は、データの取り扱いに注意が必要であることが示唆された。発生評価を行うためのデータを得るには、養殖場での調査が必要となる。薬剤耐性発生評価を試行する事ができた。この試行結果を基に、データや試行の際のパラメータを調整し、より正確なリスク評価に繋げていくことが期待できる。</p>
<p>総合コメント</p> <p>概ね研究計画通りに事業を進めることができた。リスク評価に活用できる研究成果、継続的なモニタリングを可能にする手法を確立することができ、この手法を用いることで食品健康影響評価の特にばく露評価に用いる信頼性の高いデータを得られることが期待できる。また、リスク評価に有用な、薬剤耐性発生評価を試行することができた。</p>		

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。

(別添1)

研究成果の概要 (和文)

養殖水産動物に対して抗菌薬（マクロライド系抗生物質(ML)、テトラサイクリン系抗生物質(TET)、スルホンアミド系合成抗菌薬(SUL)）が使用されるため、養殖水産動物への抗菌薬の使用により選択される薬剤耐性菌の健康影響評価が必要とされている。しかし、抗菌薬の使用と養殖水産動物由来細菌（特に健康魚由来細菌）の薬剤感受性に関する情報は圧倒的に不足している。また、指標となる細菌の設定は国際的にもなされていない。今回、市販養殖魚及び天然魚におけるグラム陽性菌 (*Lactococcus garvieae*) 及びグラム陰性菌 (*Vibrio* 属菌及び *Aeromonas* 属菌) の分離率、薬剤感受性及び薬剤耐性遺伝子の保有状況を明らかにし、食品健康影響評価に活用可能なべく露評価に関する情報を収集することを1つ目の目的とした。2つ目の目的として、養殖水産動物における抗菌薬の使用実態並びに海外先進地域及び日本との関連が強いアジア地域での抗菌薬使用と耐性菌モニタリングについての情報を収集し、情報を整理した。以上のデータをもとに、発生評価における課題の検討を含め定量的リスク評価を試みた。結果、薬剤耐性モニタリングを実施するため市販魚からの *L. garvieae* 分離方法、*Vibrio* 属菌分離方法を確立した。分離された *L. garvieae* 及び *Vibrio* 属菌を用いた薬剤感受性試験によって、マクロライド系、テトラサイクリン系抗菌薬、スルホンアミド系合成抗菌薬に対する耐性状況を明らかにできたことから、分離と感受性試験を継続して実施することで、食品健康影響評価のべく露評価に用いることができる薬剤耐性モニタリングが可能であること、グラム陽性菌の指標菌として *L. garvieae*、グラム陰性菌の指標菌として *Vibrio* 属菌が適切であることが示唆された。また、特に *L. garvieae* については、薬剤感受性に関する表現型と耐性遺伝子の保有状況に明確な関連が認められたことから、将来的には、ゲノムモニタリングのデータを活用することも可能となるかもしれない。また、養殖水産動物における抗菌薬の使用実態とモニタリング実態を調査するとともに、公表データを用いて魚病の年間発生率と抗菌薬使用率を推定し、定量的な薬剤耐性発生評価の試行を実施する事ができた。しかし、不足するデータが多いため、今回の試行に用いた解析手法を基に、今後複数年度について評価を試行する、感度分析を実施するなど、評価を深めることが望まれる。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Establishment and Trial Monitoring of Antimicrobial Resistance Indicator Bacteria in Aquaculture Animals
Research project number	JPCAFSC20232303
Research period	FY 2023 – 2025
Name of principal research investigator (PI)	Masaru USUI

Abstract/Summary

Since antimicrobial agents (macrolide antibiotics (ML), tetracycline antibiotics (TET), and sulfonamide synthetic antimicrobials (SUL)) are used in aquaculture animals, it is necessary to assess the health impact of antimicrobial-resistant bacteria selected due to the use of these agents. However, there is a significant lack of information on the relationship between antimicrobial use and the antimicrobial susceptibility of bacteria derived from aquaculture animals, particularly those from healthy fish. Additionally, there is no internationally established standard for indicator bacteria. In this study, the first objective was to elucidate the isolation rates, antimicrobial susceptibility, and presence of antimicrobial resistance genes in Gram-positive *Lactococcus garvieae* and Gram-negative *Vibrio* and *Aeromonas* species from farmed and wild fish, thereby collecting information for exposure assessment applicable to food safety evaluations. The second objective was to gather and organize information on antimicrobial use in aquaculture animals, as well as antimicrobial use and resistance monitoring in advanced overseas regions and Asian countries with strong ties to Japan. Based on these data, we attempted a quantitative risk assessment, including an examination of challenges in incidence evaluation. As a result, we established methods for isolating *L. garvieae* and *Vibrio* species from commercial fish to facilitate antimicrobial resistance monitoring. Antimicrobial susceptibility testing of the isolated *L. garvieae* and *Vibrio* species clarified their resistance profiles against macrolide antibiotics, tetracycline antibiotics, and sulfonamide synthetic antimicrobials. This confirmed that continuous isolation and susceptibility testing could enable antimicrobial resistance monitoring, and suggested that *L. garvieae* is suitable as an indicator bacterium for Gram-positive bacteria, while *Vibrio* species are suitable for Gram-negative bacteria. Furthermore, a clear correlation between antimicrobial susceptibility phenotypes and the presence of resistance genes was observed in *L. garvieae*, indicating the potential for future use of genomic monitoring data. Furthermore, using publicly available data in addition to the investigation into the actual use of antimicrobials and monitoring practices in aquaculture animals, we estimated the annual incidence rate of fish diseases and the antimicrobial usage rate, allowing for a preliminary quantitative evaluation of antimicrobial resistance occurrence. However, due to the significant lack of necessary data, future studies should deepen the evaluation by conducting multi-year assessments and sensitivity analyses based on the analytical methods used in this study.

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose. All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1 . List of papers published on the basis of this research

Not so far.

2 . List of presentations based on this research

Kogure K, Fukuda A, Asai T, Usui M. Trial of Sustainable Antimicrobial Resistance Monitoring in Commercially Available Domestic Fish. The 167th Japanese Society of Veterinary Science, September 10, 2024, Obihiro

Usui M, Models of Surveillance: Implementation in Livestock and Companion Animals, and Trials in Environmental and Aquatic Animals. AMR workshop in Brunei., September 21, 2024, web.

Makita K, Fukuda A, Asai T, Usui M. Evaluation of Antimicrobial Resistance Emergence in Bacteria from Farmed *Buri* and *Madai*, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society of Veterinary Epidemiology, March 9, 2025, Tokyo

3 . The number and summary of patents and patent applications

Not so far.

4 . Others (awards, press releases, software and database construction)

Not so far.