

### 3 と畜場における豚尿由来大腸菌の mcr-1 保有状況

○福田純子, 八島由美子

#### 1. 背景と目的

コリスチンはペプチド系の抗生物質で、主に家畜の飼料添加物として世界中で利用されている。医療分野において、コリスチンは副反応が強いことからこれまで使用は限定的であったが、近年カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌などの多剤耐性菌感染症の治療抗菌薬として臨床使用が増えており、医学上重要な抗生物質となっている<sup>1)</sup>。このような状況の中、2015年に中国でプラスミド性コリスチン耐性遺伝子-1 (mobilized colistin resistance, 以下 mcr-1 遺伝子)を持つ大腸菌が初めて確認<sup>2)</sup>され、2018年7月に国は畜産分野における成長促進目的でのコリスチンの飼料添加物としての使用を禁止<sup>3)</sup>した。しかしながら、動物用抗菌剤販売量調査<sup>4,5)</sup>によると、2020年度の硫酸コリスチンの販売量の原末換算量は19,049Kg(2017年度19,980Kg)であり、その96%が豚の経口投与薬として販売され広く利用されている現状がある。

コリスチンによる抗菌作用の主たる機序として、細菌の細胞外膜に作用することにより透過性を亢進させ、細胞の破裂を引き起こすことによる殺菌作用が知られている<sup>6)</sup>。mcr-1 遺伝子による耐性機構は、細菌の細胞外膜の構成成分であるリポ多糖の構造変異により獲得される<sup>6,7)</sup>。この mcr-1 遺伝子は、プラスミドを介して他の菌に伝達されるため、感受性菌が水平伝搬により耐性を獲得することで耐性菌が拡散する。このため、これまでに人、家畜、環境における細菌の mcr-1 遺伝子の保有が数多く報告されている。国内においては、病院の患者から、mcr-1 遺伝子陽性のカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌が検出されており<sup>8)</sup>、市販食肉においても、鶏肉由来大腸菌の9.7%から mcr-1 遺伝子が検出されている<sup>9)</sup>。これらのことを踏まえ、本研究では、と畜場で採材が容易で、かつ膀胱炎の起因菌である大腸菌が一定の割合で分離できる繁殖用雌豚の尿を材料として、mcr-1 遺伝子の保有状況を調査するとともに、同材料のモニタリングとしての使用について検討した。

#### 2. 材料と方法

##### (1) 検査材料

2020年5月から2022年12月の期間に、所管すると畜場に健康畜として搬入された繁殖用雌豚(経産豚)257頭を対象に、解体後検査時に尿を無菌的に採取し検査材料とした。

##### (2) 細菌検査

検査材料を、採取後直ちに DHL 寒天平板培地または5%羊血液加寒天平板培地に塗抹し培養後、DHL 寒天平板培地上に発育した赤色コロニー、もしくは5%羊血液加寒天平板培地上に発育したコロニーのうちグラム陰性を示し大腸菌の形態的特徴を有したものを単離し、普通寒天平板培地にて分離培養した。分離株について、TSI 寒天培地、LIM 寒天培地およびオキシダーゼテストによる生化学性状検査、または細菌培養同定キット(API20E)を用い大腸菌を同定した。

##### (3) 遺伝子検査

###### ① DNA 抽出

供試株として分離した大腸菌株を釣菌し、100  $\mu$  L のバッファーに懸濁後アルカリ熱抽出した。

###### ② PCR 法による mcr-1 遺伝子の検出

Ana らの報告<sup>10)</sup>による mcr-1 遺伝子に特異的なプライマーと、市販の Taq ポリメラーゼ(Hot Start Version)を使用した。アガロースゲル電気泳動にて、320bpのバンドが検出されたものを mcr-1 遺伝子陽性とした。陽性対照として大腸菌 NTCT13846 を用いた。

##### (4) 薬剤感受性試験

大腸菌であることが確認された全ての供試株について、微量液体希釈法により最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) を測定した。Muller-Hinton 培地に、コリスチン硫酸塩 (SIGMA) を  $0.06 \mu\text{g/mL}$  ~  $128 \mu\text{g/mL}$  の範囲で調整し添加した 96 穴プレートを作成し、これに供試株の希釈液 (McFarland 濁度 0.5 の菌液をさらに 10 倍希釈したもの)  $5 \mu\text{L}$  を分注し、 $35^\circ\text{C}$  18 時間培養後に発育を確認し、最小発育阻止濃度 (MIC) を計測した。

### 3. 結果

- (1) 細菌検査: 供試した尿検体 257 検体のうち、26 検体 (10.1%) で大腸菌が分離された。
- (2) 遺伝子検査: 大腸菌 26 株のうち、1 株 (3.8%) から *mcr-1* 遺伝子が検出された。
- (3) 薬剤感受性試験: *mcr-1* 遺伝子陽性大腸菌の MIC は  $16 \text{ mg/L}$  であり、*mcr-1* 遺伝子陰性大腸菌では  $2 \text{ mg/L}$  ~  $32 \text{ mg/L}$  であった。全ての大腸菌 26 株でブレイクポイント MIC ( $>2 \mu\text{g/mL}$ : EUCAST<sup>11)</sup> 基準による) 以上の株は 20 株 (76.9%) であった (表)。

表 コリスチン薬剤感受性試験

抗菌薬濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	Total
<i>mcr-1</i> 遺伝子陰性大腸菌	0	0	0	0	0	6	16	1	1	1	0	0	25
<i>mcr-1</i> 遺伝子陽性大腸菌	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

### 4. 考察およびまとめ

調査の結果、検査材料 257 検体のうち 10.1% で大腸菌が検出され、そのうち 3.8% で *mcr-1* 遺伝子が検出された。我々は過去に、繁殖用雌豚の膀胱炎尿から検出された大腸菌の薬剤感受性を調査し、4 剤以上の薬剤耐性が 7 割で認められたことを報告<sup>12)</sup>していたが、今回の調査で明らかになった *mcr-1* 遺伝子陽性率は、想定を下回るものであった。国内の家畜における *mcr-1* 遺伝子保有大腸菌の検出状況の既報では、外見上健康な豚の糞便由来で 20.4% (2013 年~2015 年採材)<sup>13)</sup> および 46.3% (2018 年採材)<sup>14)</sup>、下痢や浮腫病を呈している豚の糞便由来で 13.2% (1991 年~2014 年採材)<sup>15)</sup> であったとの報告がある。このように、*mcr-1* 遺伝子保有率については、疾病の有無に関わらず様々な調査結果が報告されている。一方、本調査では 1 株 (3.8%) のみの検出であったが、このことは国が 2018 年にコリスチンの飼料添加物の指定を取り消した効果である可能性が考えられた。

コリスチンに対する感受性試験の結果を、*mcr-1* 遺伝子陽性大腸菌は MIC が  $16 \text{ mg/L}$  と高い値であった。しかし、*mcr-1* 遺伝子陰性大腸菌についても高い MIC の株が散見され、このうちブレイクポイント MIC 以上の株は 76.9% と、今回分離された大腸菌のコリスチン耐性率は非常に高い結果であった。このことは、すでに拡散しているコリスチン耐性は、その多くが *mcr-1* 遺伝子とは別のメカニズムによって耐性が獲得されている可能性が示された。

今回、繁殖用雌豚の膀胱から採取した尿を検査材料に供したが、尿から一定の割合で大腸菌検出が可能であったこと、膀胱は無菌的に検体を採材し易いこと、他の臓器に対して汚染等なく採材することなどから、モニタリングの一手法として使用可能であると思われる。

*mcr-1* 遺伝子は、他に *mcr-2* 遺伝子から *mcr-10* 遺伝子のヴァリエントが存在することが報告<sup>16)</sup>されている。Fukuda らの報告<sup>17)</sup>によると、*mcr-1* と *mcr-5* 遺伝子を併存する株の MIC は高く、複数の *mcr* 遺伝子を持つことによる相乗的な影響がある可能性を示唆していることから、今後、*mcr-1* 以外の保有状況についても調査することで、豚におけるコリスチン耐性の獲得状況を正確に把握できるものと考えられる。

国内において医療分野でコリスチンが適用されるカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌の検出頻度

は現状では低いものの、海外においては薬剤耐性菌による治療困難事例が報告されている<sup>18, 19, 20</sup>。今後も、WHO が提唱するワンヘルス・アプローチの概念に基づき、食肉を対象とした継続的な薬剤耐性菌の調査が望まれる。

#### 参考文献

- 1 ) 長野則之, 長野由紀子, 忍び寄る脅威ーコリスチン耐性グラム陰性桿菌, 信州医誌 65 (5):333-335, 2017
- 2 ) Yi-Yun Liu ら, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, *Lancet Infect Dis*, 2016 Feb;16(2):161-8, Epub 2015 Nov 19
- 3 ) 農林水産省, 飼育添加物「硫酸コリスチン」の指定取り消しについて, <https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/siryo/attach/pdf/index-24.pdf>
- 4 ) 農林水産省 動物医薬品検査所, 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, 平成 29 年(2017), <https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/H29hanbaikoukin202211.pdf>
- 5 ) 農林水産省 動物医薬品検査所, 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, 令和 3 年(2021) [https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/R3\\_hanbaikoukin01.pdf](https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/R3_hanbaikoukin01.pdf)
- 6 ) Mohamed Abd El-Gawad El-Sayed Ahmed, Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review(2000-2019), *Emerging Microbes & Infections*, 2020, VOL. 9, <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- 7 ) 小澤真名緒, ー動物用抗菌性物質を取り巻く現状IVー薬剤耐性機構, 日獣会誌 69, 713-717, 2016
- 8 ) Yasuhide Kawamoto ら, The surveillance of colistin resistance and mobilized colistin resistance genes in multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated in Japan , *Int J Antimicrob Agents*, 2022 Jan;59(1):106480
- 9 ) Justice O Odoi, Prevalence of Colistin-Resistant Bacteria among Retail Meats in Japan, *Food Saf (Tokyo)*, 2021 Jun 25;9(2):48-56
- 10 ) Ana ら, Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes, *Euro Surveill*, 2018 Feb;23(6):17-00672
- 11 ) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing , Breakingpoint tables for interpretation of MICs Version13, 2 Jan, 2023, [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- 12 ) 福田ら, と畜場における繁殖用雌豚の膀胱炎, 令和2年度宮城県食肉衛生検査所業績発表抄録より

- 13 ) Akiyo Nakano ら, Prevalence and Relatedness of *mcr-1*-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated From Livestock and Farmers in Japan, *Front Microbiol*, 2021 Apr 26;12:664931
- 14 ) 福田ら, 健康豚糞便中のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有状況, 香川県環境保健研究センター所報 第 18 号(2019):65-70
- 15 ) Masahiro Kusumoto ら, Colistin-Resistant *mcr-1*-Positive Pathogenic *Escherichia coli* in Swine, Japan, 2007-2014, *Emerg Infect Dis*. 2016 Jul;22(7):1315-7
- 16 ) Nadheema Hammood Hussein ら, Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review, *Mol Biol Rep*. 2021 Mar;48(3):2897-2907, Epub 2021 Apr 10
- 17 ) Fukuda A ら, High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 51: 163-4
- 18 ) 平井ら, 1.カルバペネム耐性腸内細菌目細菌, 日本内科学会雑誌第 103 巻第 11 号 2657-2665, 2014
- 19 ) 松本 哲哉, 特集:カルバペネマーゼ耐性腸内細菌目細菌(CRE)に関する Up to date, Ignazzo(イグナッツ), <https://www.bdj.co.jp/safety/articles/ignazzo/>
- 20 ) José R Mediavilla ら, Colistin- and Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *blaNDM-5*, Causing a Complicated Urinary Tract Infection in a Patient from the United States, *mBio*. 2016 Aug 30;7(4):e01191-16