

家畜および伴侶動物における コリスチン耐性菌保菌率に関する調査

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	キベ リョウコ 木邊 量子
所属等	日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 助教
プロフィール	獣医微生物学研究室の助教として、将来獣医師となる学生に病原微生物や常在微生物の存在について、授業、実習を通して紹介しています。 薬剤耐性菌は研究室の主となるテーマです。

1. 研究の概要

本研究は、家畜とくに豚および伴侶動物の犬猫におけるペプチド系抗生物質：コリスチンに対する耐性菌の保菌状況を調査した。

わが国では、2008年に分離された豚由来大腸菌株にコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* が検出され、現在も家畜におけるコリスチン耐性菌の保菌状況は更新され続けている。しかしながら、家畜よりもヒトに接触する機会が多い伴侶動物におけるコリスチン耐性菌の保菌状況に関する調査報告が少ないことから、本研究では豚の便より分離した 122 株、犬猫の臨床検体より分離した 157 株の大腸菌におけるコリスチン耐性とコリスチン耐性遺伝子である *mcr-1* 遺伝子を平板希釈法および PCR 法によりそれぞれ検査した。耐性が確認された菌株は多剤耐性の有無も調査した。その結果、豚において 17% の 21 株においてコリスチン耐性または耐性遺伝子 *mcr-1* の検出を確認した。犬猫に関しては 1 株のみコリスチン耐性を示した。この 1 株は耐性遺伝子を保有していなかった。この結果はわが国の過去における健康豚からの分離率よりも高く、コリスチン耐性菌が増加していることを示唆した。一方で犬猫においてはコリスチン耐性遺伝子や耐性菌の拡散は現在深刻な状況には至っていないことが示された。2012 年 WHO はコリスチンをヒト医療において非常に重要な薬剤として再分類したが、現在もその分類は変更されていない。これはコリスチンに代わる新たな薬剤が開発されていないこと、そしてコリスチン耐性を持つ病原菌の増加が、治療困難な感染症の増加を意味しているからである。ヒト、動物、環境の健康を目指す “One health” の観点から、今後もコリスチン耐性菌の動向をモニタリングしていくことが重要であると考えられた。

2. 研究の動機、目的

薬剤耐性菌の増加が問題となる中、抗生物質の慎重使用が全世界で課題となっている。抗生物質の中でも、コリスチンは多剤耐性菌を治療する「最後の切り札」として 2015 年からヒト医療において再承認され、使用が再開された。その一方で、家畜においては飼料添加剤として 40 年以上使用されていたため、コリスチン耐性菌が畜産領域から拡散しないよう、近年飼料添加目的での使用が停止された。コリスチン耐性遺伝子はゲノム上にあるため、細菌間では伝達しないと考えられてきたが、2015 年に Liu らがプラスミド上に存在するコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* を家畜分離株より検出して以降、世界各国でコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1*、*mcr-2* などに関する調査が行われ、耐性遺伝子の拡散が懸念されている。その中、2016 年米国において、尿路感染症患者より多剤耐性コリスチン耐性大腸菌が分離

され、コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* も検出された。感染経路は不明とされたが、環境から汚染した可能性は否定できない。そこで本研究では家畜とくに豚およびヒトに接触する機会の多い伴侶動物におけるコリスチン耐性菌の保菌状況に関する疫学的調査をおこなった。この調査により畜産または伴侶動物からヒトへの耐性菌感染および環境汚染リスクが明らかとなり、将来的な感染経路の特定、環境汚染の指標の一助となることを目的としている。

3. 研究の結果

【健康豚におけるコリスチン耐性大腸菌の保有率】

健康な豚 51 頭の糞便サンプルから DHL 寒天培地を用いて腸内細菌を分離した結果、大腸菌 122 株を分離した。これら大腸菌分離株を用いて、PCR 法による *mcr-1* 遺伝子の保有状況および平板希釈法によるコリスチン耐性を確認した。その結果を表 1 に示した。

122 株中、耐性遺伝子 *mcr-1* を保有する株は 21 株 (17%)、コリスチン耐性の株は 18 株 (14%) となった。*mcr-1* 保有株およびコリスチン耐性株はいずれも *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* を保有していなかった。分離地域は異なるが、鈴木ら (2016 年) はわが国の健康豚から分離された大腸菌のうち、*mcr-1* 遺伝子を保有していた株は 0.02% と報告している。

<i>mcr-1</i> 遺伝子	耐性	株数
+	+	15
-	+	3
+	-	6
-	-	98
Total		122

また、福田ら (2017) も 9.5% がコリスチン耐性を示したと報告しており、今回の我々の結果は両報告よりも多い結果となったことから、コリスチン耐性菌が増加している可能性が示唆された。また、本研究では *mcr-1* 以外の *mcr* は検出されなかった。福田らの報告によると、下痢豚由来大腸菌株から *mcr-1* や、その他の *mcr* 遺伝子が検出されていることから、疾病豚においては、より高率にコリスチン耐性株が分離できることが示唆され、今後の検討が必要であると考えられた。

【コリスチン耐性腸内細菌科の同定】

コリスチン耐性および耐性遺伝子を持つ大腸菌以外の腸内細菌科の菌 2 株を同定するために 16SrRNA 遺伝子のシーケンスをおこない配列を決定した。これらの 2 株はどちらも *Providencia rettgeri* と同定された。*Providencia* 属の他の種が *mcr-1* を保有している報告はこれまでもあったが、*P. rettgeri* から *mcr-1* 遺伝子が検出されたのは本研究が初めてである。*Providencia* はそもそもコリスチンの作用部位である LPS のリン脂質が修飾されており、コリスチンに対して自然耐性を持つため、生存に *mcr-1* を保有する必要がない。そのため *Providencia* 属菌が *mcr-1* のキャリアーとなって、他の菌に *mcr-1* 遺伝子を伝播している可能性も示唆された。

【コリスチン耐性株の薬剤感受性試験】

コリスチン耐性で *mcr-1* を保有する大腸菌株 15 株に関して他の薬剤の感受性をディスク法により確認した。その結果、ABP (アンピシリン) 耐性が 15 株中 11 株、AMP (アモキシシリン) 耐性が 10 株、ST (スルファメトキサゾール) 耐性 10 株、CP (クロラムフェニコール) 耐性 7 株、CEX (セファレキシン) 耐性 5 株が確認された。ABP、AMP に対する耐性率が高かった。どちらもペニシリン系の抗生物質であり、 β ラクタマーゼにより細菌はこれらの抗生物質に対して耐性を獲得する。ヒトや鶏では、伝達プラスミド上に β ラクタマーゼ遺伝子と *mcr-1* 遺伝子両方を持つ大腸菌の存在が報告されている。本実験結果からも *mcr-1* 遺伝子のプラスミド上に β ラクタマーゼ遺伝子が存在する可能性が示唆された。このプラスミドが他の細菌へと伝播すれば、ペニシリン系およびコリスチンに対して耐性を示す腸内細菌が増加する可能性があるため、追試が必要である。

【伴侶動物におけるコリスチン耐性大腸菌の保有率】

2014 年から 2017 年に来院した犬猫の臨床検体から分離された大腸菌 157 株を使用し、PCR 法

による *mcr-1* 遺伝子の検出および寒天平板希釈法によるコリスチンの感受性試験をおこなった。その結果、157 株全てにおいて *mcr-1* は検出されなかった。一方、ネコ由来の 1 株がコリスチン耐性を有した。これに関しては農林水産省が同様の研究を 30 年度 11 月に報告した。平成 29 年度における犬猫を対象としたコリスチン耐性菌の保有率は、イヌで 1% ネコにおいて 0% となっており、本研究の 0.6% とほぼ同様の結果となった。このことは、伴侶動物におけるコリスチン耐性遺伝子や耐性菌の拡散は現在深刻な状況には至っていないことが示唆された。

【まとめ】

上記の結果をまとめると、

- ・豚において過去の報告よりも多くのコリスチン耐性大腸菌が検出された。
→コリスチン耐性菌が増加している可能性がある。
- ・*mcr-1* を保有していても、コリスチン耐性をもたない大腸菌が存在した。
→*mcr-1* によるコリスチン耐性発現に関して詳細なメカニズム解析が必要。
- ・コリスチンに自然耐性のある *Providencia* 属において、*mcr-1* が検出された。
→*Providencia* 属のキャリアーとしての可能性が示唆された。
- ・コリスチン耐性菌の 7 割がペニシリン耐性を示した。
→他の薬剤耐性遺伝子と *mcr* 遺伝子の位置関係によっては、多剤耐性菌が生まれる危険性を示唆した。
- ・伴侶動物におけるコリスチン耐性遺伝子や耐性菌の保有率は 0~1% であった。
→伴侶動物における耐性菌や耐性遺伝子の拡散は現在深刻な状況には至っていないが、今後の継続的なモニタリングが必要である。

4. これからの展望

本研究の遂行により、長年にわたり資料添加剤としてコリスチンを投与されてきた豚の腸内にはコリスチン耐性菌や遺伝子が存在し、それらの保有率が増加傾向にあることが明らかとなった。一方で、伴侶動物においては保有率が低いことも確認した。しかしながら、この結果には地域性がある。家畜に近いところに住んでいる犬猫では保有率が高くなる可能性があり、様々な地域のサンプルを集める必要がある。残念なことに、コリスチンなどの薬剤耐性菌の動向調査とくに伴侶動物に関しては、この研究と同時期に国が力をあけて調査をはじめた。これは全国を対象としており、規模の面で本研究は足元にも及ばない。しかしながら、本研究の結果は動向調査以上の情報を得ることが出来たと考えており、今後発展させていきたい。特に、耐性遺伝子 *mcr* を *Providencia* 属など、コリスチンに自然耐性のある菌が保有していることは、コリスチン耐性菌の拡散に多大な影響を及ぼすと考えられ、大腸菌や他の菌への *mcr* 伝達様式や伝達速度などを確認する必要がある。また、コリスチン耐性菌が多剤耐性となる可能性も示唆され、この研究をきっかけとして、多くの課題を派生することができた。薬剤耐性菌問題は全世界の課題となっており、今回の研究を一端として、新たな対策法の開発へと発展させていきたい。



5. 社会に対するメッセージ

この度、女性研究者奨励金で「家畜および伴侶動物におけるコリスチン耐性菌保菌率に関する調査」という課題で支援をいただきました。薬剤耐性菌問題は、G7 で取り上げられるなど、全世界が取り組まなくてはならない問題です。薬剤耐性菌が増えると、抗生物質が効かなくなり、多くの感染症が治癒しない原因となります。コリスチンは現在使用中止されましたが、家畜の病気を予防するために飼料に添加されていたため、動物から環境へ、そして人への耐性菌の移行が懸念

されています。問題解決のために、新たな薬剤の開発や抗生物質の慎重使用が早急な課題となっていますが、現に存在する薬剤耐性菌の動向調査は将来的な増減を知るきっかけとなるため、非常に重要です。今回、女性研究者奨励金の支援を受けこの動向調査、特にこれまであまり調査されていなかった伴侶動物に関して調査をすることができました。私事ではありますが、出産・子育てを経験し現職に就任して3年目になります。所属研究室では薬剤耐性菌を対象にした研究を長年おこなっていますが、今回の採択は私にとって研究室に貢献できるものであり、またこの研究から派生して多くのテーマを築くことができました。この支援を励みに、また次の女性研究者の励みになるよう、続くテーマに精力的に取り組みたいと考えております。この度はご支援、誠にありがとうございました。