

15 コリスチン耐性プラスミド遺伝子 *mcr-1* の保有状況

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○渡邊 弘恭 齋藤 豪
奈良 史子 菅原 健
佐藤 尚人 中村 成宗
古谷 眞

1 はじめに

近年、多くの抗菌剤に耐性を示すため有効な治療薬がほとんどない多剤耐性菌が出現している。一方、現状では、新たな抗菌剤の開発は停滞しており、薬剤耐性を取り巻く状況は深刻化している。

また、国際的にも重要な課題となっており、2015年に世界保健機構（WHO）の総会で薬剤耐性に関する国際行動計画が採択され、G7サミットの議題としても取り上げられている。これを受け、日本でも2016年に政府が薬剤耐性アクションプランを策定し、関係省庁が連携して集中して取り組むこととされた。

多剤耐性菌の治療において現在注目されている抗菌剤の一つがコリスチンである。医療分野では、副作用の問題や新たな抗菌剤の登場により使用されなくなっていたが、カルバペネム耐性菌などの多剤耐性菌のほとんどがコリスチンに耐性を示さないことから、多剤耐性菌に対する最後の手段となっている。

一方、獣医療分野においては、牛、豚の細菌性下痢症の治療薬として、牛、豚、鶏の飼料添加物として承認されており、広く使用されていることから、獣医療現場における

コリスチンの慎重使用の重要性が高まっている。

このような中、2015年、Liuらによりコリスチン耐性プラスミド遺伝子 *mcr-1* が報告¹⁾され、日本を含む世界各国で *mcr-1* 保有菌が確認²⁾³⁾されている。*mcr-1* はプラスミドを介して他の菌に伝達され、感受性菌が容易に耐性を獲得することから、コリスチン耐性が急速に拡大することが懸念される。

そこで、県内の家畜における *mcr-1* 保有状況を調査したので、その概要を報告する。

2 材料と方法

(1) 材料

ア 保存菌株の調査

平成18年度から28年度の県内の病性鑑定で分離された大腸菌19株（由来：牛4株、豚9株、鶏6株）、サルモネラ20株（由来：牛7株、豚11株、鶏2株）を用いた。

イ 健康家畜糞便の調査

平成29年5月から11月に採材した県内健康家畜糞便38戸114検体（1戸あたり3検体、内訳は黒毛和種肥育牛9戸27検体、乳用搾乳牛11戸33検体、

肥育豚 8 戸 24 検体、採卵鶏 6 戸 18 検体、肉用鶏 4 戸 12 検体) を検査に供した。

ウ *mcr-1* 陽性農場の調査

mcr-1 陽性農場の健康家畜糞便、乳用牛 2 戸 36 検体 (子牛 6 検体、育成牛 11 検体、搾乳牛 19 検体)、豚 2 戸 60 検体 (子豚 20 検体、肥育豚 20 検体、繁殖豚 20 検体) を検査に供した。

エ 薬剤感受性試験

コリスチンの薬剤感受性試験では平成 18 から 28 年度の県内病性鑑定で分離された大腸菌 19 株 (由来: 牛 4 株、豚 9 株、鶏 6 株) と本調査で分離された *mcr-1* 陽性大腸菌 6 株を検査に供した。その他の薬剤感受性試験では、本調査で分離された *mcr-1* 陽性大腸菌 6 株を検査に供した。

(2) 方法

ア 遺伝子検査

保存菌株は、InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いて DNA を抽出した。糞便は、DHL 寒天培地に塗布し、35°C で一昼夜培養して得られたシングルコロニー 8 個をマイクロチューブにプールし、保存菌株と同様の方法で DNA を抽出した。PCR は *mcr-1* に特異的な Liu らの報告¹⁾したプライマーと HotStarTaq Master Mix (Qiagen) を用いて実施した。

なお、*mcr-1* 陽性となった検体では、プールせずに個別のコロニーから遺伝子を抽出して PCR を実施し、*mcr-1* 陽性コロニーを特定した。

イ 細菌同定検査

遺伝子検査で *mcr-1* 陽性となったコ

ロニーを分離培養し、api 20E (バイオメリュー) を用いて同定した。

ウ 薬剤感受性試験

コリスチンの薬剤感受性は、Colistin sulfate (Dr. Ehrenstorfer GmbH) を用い、寒天平板希釈法⁴⁾で最小阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) を測定した。

コリスチン以外の薬剤は、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトキサシム (CTX)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (STX)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX) の 11 薬剤について、センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いたディスク法で検査した。

3 結果

(1) 保存菌株の調査

全ての菌株で *mcr-1* は検出されなかった。

(2) 健康家畜糞便の調査

表 1 に示すとおり、乳用牛 2 戸 2 検体、豚 4 戸 4 検体から *mcr-1* 保有菌が検出され、他の畜種からは検出されなかった。また、分離された *mcr-1* 保有菌は 6 株全て大腸菌と同定された。

(3) *mcr-1* 陽性農場の調査

表 2 に示すとおり、乳用牛では 36 検体中子牛 1 検体のみ陽性で、豚では 60 検体中 27 検体が陽性であった。*mcr-1* 陽性率は乳用牛で 2.8%、豚で 45.0% と豚で高く、特に子豚で 80.0% と高い陽性率を示

した。

そこで、*mcr-1* 陽性農場のコリスチン使用状況を調査したところ、乳用牛では当該畜に対する直近 6 か月のコリスチン使用歴はなかったが、同居子牛の代用乳に飼料添加物としてコリスチンが含まれていた。豚では、当該畜及び同居畜の子豚用の飼料に飼料添加物としてコリスチンが含まれていた。

(3) 薬剤感受性試験

コリスチンの薬剤感受性試験の結果を図 1 に示した。感受性と耐性の境界値であるブレイクポイントは EUCAST の基準⁵⁾を適用した。*mcr-1* 陰性の過去の病性鑑定由来株では 19 株中 9 株がコリスチン耐性であったが、*mcr-1* 保有株は MIC が 8~32 $\mu\text{g/ml}$ で全てコリスチン耐性であった。

その他の薬剤感受性試験の結果を表 3 に示した。コリスチン以外に最大で 4 薬剤に耐性を示す株が認められたが、医療分野で重要なセフェム系とキノロン系の薬剤に耐性を示す株は認められなかった。

表1 健康家畜糞便における*mcr-1* 遺伝子検査

畜種	戸数	検体数	<i>mcr-1</i> 陽性			
			戸数	陽性率(%)	検体数	陽性率(%)
肥育牛	9	27	0	0.0	0	0.0
乳用牛	11	33	2	18.2	2	6.1
肥育豚	8	24	4	50.0	4	16.7
採卵鶏	6	18	0	0.0	0	0.0
肉用鶏	4	12	0	0.0	0	0.0
計	38	114	6	15.8	6	5.3

表2 *mcr-1* 陽性農場における*mcr-1* 陽性率

畜種	ステージ	検体数	<i>mcr-1</i> 陽性		コリスチン含有飼料給与
			検体数	陽性率(%)	
乳用牛 (2戸)	子牛	6	1	16.7	あり
	育成	11	0	0.0	なし
	搾乳	19	0	0.0	なし
	計	36	1	2.8	
豚 (2戸)	子豚	20	16	80.0	あり
	肥育	20	10	50.0	なし
	繁殖	20	1	5.0	なし
	計	60	27	45.0	

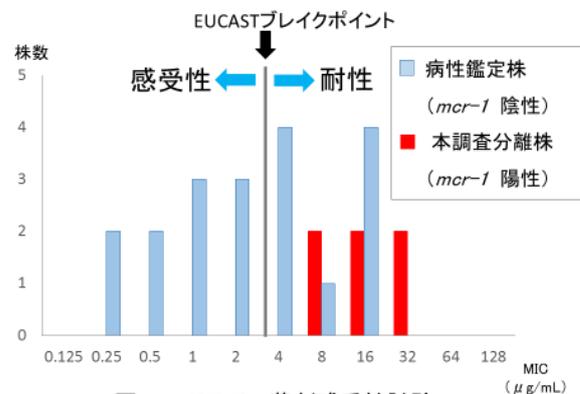


図1 コリスチン薬剤感受性試験

表3 その他の薬剤感受性試験

菌株	畜種	薬剤										耐性薬剤数		
		AB PC	CEZ	CTX	SM	GM	KM	TC	CP	NA	CP FX		SXT	
1	乳用牛	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	0
2	乳用牛	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	0
3	肥育豚	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	1
4	肥育豚	S	S	S	R	S	I	R	R	S	S	S	R	4
5	肥育豚	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	0
6	肥育豚	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	2

R 耐性 I 中間 S 感受性

4 まとめ及び考察

今回、健康な乳用牛と肥育豚の糞便から *mcr-1* 保有大腸菌が分離され、これらは全てコリスチン耐性であった。*mcr-1* 陽性農場では、子牛の代用乳と子豚用飼料で飼料添加物としてコリスチンを含んでいた。

また、陽性農場の同居畜の糞便を調査し

たところ、乳用牛よりも豚で *mcr-1* の陽性率が高く、特にコリスチン含有飼料を給与されている子豚期で最も高かった。

以上から、*mcr-1* はコリスチンの持続的な選択圧により農場に定着している可能性が考えられた。

飼料添加物としてのコリスチンは、食品安全委員会によるリスク評価結果を受け、平成 30 年 7 月から指定が取消される予定である。引き続き *mcr-1* の保有状況を調査し、飼料添加物の指定取消しの効果を検証することが、抗菌剤の慎重使用を推進する上で重要と考える。

<参考文献>

- 1) Liu Y-Y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 16(2) 161-168, Epub 2015 Nov 19
- 2) Kawanishi Mら : 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*, 2016 61(1) e02057-16
- 3) Kusumoto Mら : Colistin-resistance *mcr-1*-positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007-2014, *Emerg Infect Dis*, 2016 22(7), 1315-1317
- 4) Clinical and Laboratory Standards

Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. Document M100-S24

- 5) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing : Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0 [2018-01-01]. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/