

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

Status of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Genes in Healthy Pig Rectal Stools

福田 千恵美 川西 郁馬* 岩下 陽子 関 和美
Chiem FUKUDA Ikuma KAMANISHI Yoko IWASHITA Kazumi SEKI

薦田 博也* 渡邊 仁
Hiroya KOMODA Hitoshi WATANAE

要 旨

コリスチンは、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*) をはじめとする多剤耐性グラム陰性桿菌の残り少ない代替薬とされるが、2015年に初めてプラスミド性コリスチン耐性遺伝子が中国で確認された。国内では、主に豚において発育促進目的で飼料添加物として使用されてきた経緯がある。薬剤耐性遺伝子は、人、環境、食品、動物の間で伝播される可能性があることから、健康豚におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を調査した。直腸便 80 検体のうち 37 検体(46.3%)から *mcr-1* 保有 *Escherichia coli* が検出され、ヒトへのコリスチン耐性菌の暴露リスクは、従来考えられている以上に高いと考えられた。コリスチンに対する MIC は、微量液体希釈法で 1~8 μ g/mL と高度な耐性は示さなかった。 β -ラクタマーゼ産生遺伝子は、1 株が CTX-M-8 型を同時に保有していた。カルバペネマーゼ産生遺伝子は検出されなかったが、カルバペネム系薬剤耐性時にコリスチン投与を考慮することから、今後も動向に注意する必要がある。

Abstract

While colistin is one of the few medicines effective against multidrug-resistant gram-negative bacteria, such as carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, the plasmid-mediated colistin resistance gene was confirmed in China for the first time in 2015. Within Japan, colistin is mainly added to the feed of pigs in order to promote growth. Because drug-resistant genes can be transferred amongst people, the environment, food products and animals, we investigated the status of plasmid-mediated colistin resistant genes in healthy pigs. Of the 80 stool samples we analyzed, *mcr-1-positive Escherichia coli* was detected in 37 samples (46.3%). As a result, we believe that the risk of humans being exposed to the colistin resistance gene is higher than previously thought. MICs of colistin using the broth microdilution method were 1-8 μ g/mL, which does not indicate a high level of resistance. Of β -lactamase producing genes, one isolate was identified as the CTX-M-8 group. Although the carbapenemase-producing gene was not detected, it is necessary to pay attention to future developments when considering the administration of colistin during this time of carbapenem resistance.

キーワード：プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 養豚場

I はじめに

抗菌薬は、ヒト以外にも畜産業、水産業、農業など幅広い分野で用いられている。特に畜産業では、感染症の治療のみならず発育促進目的で飼料添加物として抗菌薬が使用されており¹⁾、薬剤耐性菌の増加が危惧されている。その1つに硫酸コリスチンがある。

国内の畜産分野での硫酸コリスチンの使用は、動物用医薬品はほぼすべてが豚に、飼料添加物の約70%が豚に使用されている¹⁾。平成29年1月に食品安全委員会は硫酸コリスチンの飼料添加物としての利用は人の健康に悪影響を及ぼす恐れがあると評価し²⁾³⁾、農林水産省は、硫酸コリスチンの飼料添加物としての使用を平成30年7月以降禁止⁴⁾した。

*香川県食肉衛生検査所

一方、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* :CPE) の増加が世界的に問題となっており、CPE 等の多剤耐性菌がコリスチン耐性を獲得した場合には代替薬がほとんどなくなるとの懸念が大きい⁵⁾。

薬剤耐性遺伝子は、人、環境、食品、そして動物の間で伝播されることが指摘され、人、動物、環境の衛生に関わる者が連携して取り組む One Health (ワンヘルス)⁵⁾ という考え方が世界的に広がってきている。畜産分野での薬剤耐性菌の増加は、食品を通して人に伝播する可能性があることから、今回、硫酸コリスチンの飼料添加物の使用禁止前の健康豚におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有及び β -ラクタマーゼ遺伝子について調査を行った。

II 方法

1 検査材料

平成30年5月から6月の間に5県36施設より、と畜場に搬入された健康豚 (A県15施設、B県1施設、C県1施設、D県1施設、E県19施設) から80検体 (A県32検体、B県3検体、C県4検体、D県2検体、E県39検体) の直腸便を採取し、検査材料とした。

2 培養

直腸便をシードスワブ1号 (栄研化学) に採取し、0.5 μ g/mL コリスチン加 DHL 培地 (自家) 及び EC broth (Difco) に接種し、コリスチン加 DHL 培地は 35 $^{\circ}$ C、EC broth は 42 $^{\circ}$ C で 18 時間培養した。18 時間後増菌した EC broth はコリスチン加 DHL 培地に塗布し 35 $^{\circ}$ C 18 時間培養を行った。

3 PCR 法によるコリスチン耐性遺伝子の検出

増菌培養を行った EC broth 1ml を 1.5ml マイクロチューブに取り、12,000rpm 5 分遠心後、上清を捨て沈渣に 5% Chelex (Bio-Rad) 加 TE buffer (pH 8.0) 200 μ L を加え、ボルテックス後 100 $^{\circ}$ C 10 分加熱し、12,000rpm 5 分遠心後、上清を PCR の DNA template とした。

直接及び EC broth 増菌後塗抹したコリスチン加 DHL 培地に発育した菌は、普通寒天培地 (日水) に純培養を行うと同時に 6 株をまとめて 5% Chelex 加 TE buffer (pH 8.0) 200 μ L に懸濁し、ボルテックス後 100 $^{\circ}$ C 10 分加熱し、12,000rpm 5 分遠心後、上清を PCR の DNA template とした。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子が陽性となった場合、まとめた 6 株から 1 株ずつ、再度 P

CR を行い、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有菌株を特定した (図 1)。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は、*mcr-1*~*5*⁶⁾ について、Multiplex PCR 法で、QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用い、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-650 (TaKaRa) にて増幅後、Agarose 電気泳動後、EtBr 染色にて検索した。*mcr-1* 全長の確認を、*mcr-1*-F : 5'-ATGATGCAGCATACTTCTGTGTG-3'、*mcr-1*-R : 5'-TCAGCGGATGAATGCGGTGC-3'⁷⁾ を用い、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) で得られた 1,646 bp の PCR 増幅産物を、DTCS Quick Start Master Mix Kit (ベックマン・コールター) にてシークエンス反応後、Big Dye X Terminator Purification Kit (サーモフィッシャー) で精製、CEQ8000 (BECKMAN) を使用し塩基配列を得た。

4 菌名同定

普通寒天培地の純培養菌を、BBLCRYSTAL E/NF (BD) を用い同定した。

5 コリスチンの薬剤感受性試験

微量液体希釈法、寒天平板希釈法により MIC を求めた。

Muller-Hinton Broth (BD)、Muller-Hinton Ager II、コリスチン硫酸塩を用い、含有量 80.9% として CLSI M7-11 に準拠し 35 $^{\circ}$ C 18 時間培養後判定した⁸⁾。

精度管理として *E. coli* ATCC25922 を用い MIC が 0.5~2 μ g/mL⁹⁾ となることを確認した。

6 PCR 法による β -ラクタマーゼ遺伝子検出

カルバペネマーゼ遺伝子は IMP 型、VIM 型、NDM 型、KPC 型、GES 型、OXA-48 型、クラス A β -ラクタマーゼ遺伝子は TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 型、CTX-M-2 型、CTX-M-8 型、CTX-M-9 型、プラスミド性 Amp C β -ラクタマーゼ遺伝子は MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型、FOX 型¹⁰⁾ について検索した。なお、各々の遺伝子陽性株より抽出した DNA を、PCR の陽性対照として使用した。

7 PFGE による分子疫学解析

制限酵素 Xba I を用い、CHEF DR III (Bio Rad) にて 0.5 \times TBE Buffer 14 $^{\circ}$ C、電圧 6 V/cm、パルスタイム 2.2~54.2sec で 19 時間泳動を行った。

0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド液にて染色脱色後、Gel Doc XR Plus (Bio Rad) で撮影し、BioNumeri

cs (インフォコム株式会社) にて解析を行った。

III 結果

80 検体中 37 検体(46.3%)からプラスミド性コリスチン耐性遺伝子が検出された。その内 1 検体からは、生化学的性状の異なる菌株が 2 株検出され、合計 38 株を得た。その全てが *mcr-1* を保有していた。シークエンス解析で得られた配列は、*mcr-1* (Accession No. KP347127) と 96.5% で一致した。内訳は、県内 32 検体中 13 検体(40.6%)、県外 48 検体中 24 検体(50.0%) (A 県 3 検体中 1 検体、B 県 4 検体中 3 検体、C 県 2 検体中 2 検体、D 県 39 検体中 18 検体) であった。また、*mcr-1* 陽性菌株 38 株は全て *Escherichia coli* と同定された。施設別では全 36 施設中 24 施設(66.7%) で検出された。内訳は、県内 14 施設中 8 施設(57.1%)、県外 22 施設中 16 施設 (A 県 1 施設中 1 施設、B 県 1 施設中 1 施設、C 県 1 施設中 1 施設、D 県 19 施設中 13 施設) (72.7%) で *mcr-1* であった。

薬剤感受性検査の結果、*mcr-1* 保有 *E. coli* におけるコリスチンの MIC は、微量液体希釈法では、1~8 $\mu\text{g/mL}$ であった。寒天平板希釈法では、4~8 $\mu\text{g/mL}$ であった (図 2)。CLSI の判定基準、耐性 (中等度耐性を含む) $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ の割合は、微量液体希釈法で 94.7%、寒天平板希釈法で 100% であった。

同一施設より複数検体から検出された。内訳は、2 検体が 6 施設、3 検体が 4 施設であった。PFGE において同一施設内で同一性を示す株はみられなかった (図 3)。

mcr-1 保有 *E. coli* 37 株の β -ラクタマーゼ遺伝子は、CTX-M-8 型が 1 株検出された。AmpC 遺伝子、カルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。

IV 考察

2015 年、中国でプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 保有の *E. coli* が報告された⁷⁾。国内において遼り調査を行った結果、2007 年病豚由来の *E. coli* で *mcr-1*¹⁾ が確認されている。香川県内では、森西ら¹⁴⁾ によると浮腫病の病性鑑定豚から 2016 年県内 5 施設の *E. coli* 9 株のうち 3 施設 6 株(66.7%) から *mcr-1* が検出された。

今回、硫酸コリスチンの飼料添加物の使用禁止前の健康豚におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を調査した。*mcr-1* を全体の 46.3% が保有しており、地域的な偏りはなく、県を問わず広域に分布していた。国内では、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子として、*mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* の報告¹¹⁾ があり、検出数は、病豚由

来では、2014 年分離株の 51% が *mcr-1* を保有していた¹²⁾ との報告がある。健康豚での保有率は、動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) の調査では *mcr-1* 保有率 0.97%¹³⁾ であった。個体数と菌株数の違いがあり比較は困難だが、ヒトへのコリスチン耐性菌の暴露リスクは、従来考えられている以上に高いと考えられた。

微量液体希釈法、寒天平板希釈法による MIC は、コリスチンは分子量が大きく寒天での拡散が不十分であることから CLSI、EUCAST では液体希釈法が推奨されている¹⁵⁾。今回、微量液体希釈法と寒天平板希釈法の比較では、MIC が 2 管差以上を示す割合は、3 検体で寒天平板希釈法が高値になった。Matuschek ら¹⁴⁾ によると Mueller-Hinton 寒天のメーカーによっても結果に差が出ることで、*mcr-1* を保有していても感性を示すことが報告されている。グラム陰性桿菌の細胞外膜のリポ多糖 (lipopolysacchhalide : LPS) はリン酸基等が結合し、陰性に荷電しているところに、陽イオンが結合して中性を保ち LPS 構造を安定化させている。コリスチンは、強い陽性荷電と疎水性を示す抗菌薬である。LPS からマグネシウムイオンおよびカルシウムイオンを置換し、外膜の局所的障害をもたらす、細胞膜を破壊し殺菌する。コリスチンの耐性機序として、染色体変異の場合、LPS を修飾する二成分調節システムの PhoP-PhoQ と PmrA-PmrB を活性化し、コリスチンの結合が阻害されることにより耐性を獲得する^{16) 17)}。一方、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の場合、pEtN (phosphoethanolamine) トランスフェラーゼをコードしており、LPS に陽性荷電の pEtN を付加し、コリスチン耐性を獲得する¹⁸⁾。今回、*mcr-1* 保有 *E. coli* の MIC は微量液体希釈法で高値でも 8 $\mu\text{g/mL}$ と高度な耐性を示さず、感性を示す株も見られた。*mcr-3*、*mcr-4* 保有株でも耐性を示さない株¹⁹⁾ が報告されており、MIC が高度耐性を示さない場合や感性の場合でも耐性遺伝子を保有している場合があり、見逃されている可能性がある。

同じ施設より採取された菌株を PFGE で確認したが、同一性はみられなかった。同じ施設において同一クローンが蔓延しているというより、プラスミドによる耐性の拡散の可能性が示唆された。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子と同時に ESBL 産生遺伝子を保有する株が検出された。カルバペネマーゼ遺伝子の検出は無かったが、カルバペネム系薬剤に耐性時にコリスチン投与を考慮することから、今後とも動向に注意する必要がある。

謝辞

香川県内のコリスチン耐性菌の検出状況についてご教示いただきました東部家畜保健衛生所片山進亮主任研究員に深謝いたします。

文献

- 1) 食品安全委員会.家畜に使用する硫酸コリスチンに係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価. 2016年11月.
- 2) 食品健康影響評価の結果について.平成29年1月29日府食第18号.
- 3) 食品健康影響評価について(回答).平成29年8月29日.
- 4) 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. <http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/siryo/attach/pdf/index-36.pdf>.
- 5) 薬剤耐性(Antimicrobial Resistance: AMR)対策アクションプラン National Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020, 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議,平成28年4月5日.
- 6) Rebelo AR, V Bortolaia, JS Kjeldgaard, et al. 2018. 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 8; 23(6): 17-672.
- 7) Liu YY, Y Wang, TR Walsh, et al. 2016. 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):161-8.
- 8) CLSI. 2018. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M7-11.
- 9) CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-seventh informational supplement, M100-S28.
- 10) AMED 研究費「薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究」研究開発分担者: 四宮博人
- 11) Fukuda A, T Sato, M Shinagawa, et al. 2018. High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan, Int J Antimicrob Agents; 51(1): 163-164.
- 12) Kusumoto M, Ogura Y, Gotoh Y, et al. 2016. Colistin-resistant *mcr-1*-positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007-2014. Emerg Infect Dis. 22: 1315-7.
- 13) Kawanishi M, H Abo, M Ozawa, et al. 2016. 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. 61(1): e02057-16.
- 14) 森西恵子, 上村圭一. 平成15年と平成28年に病性鑑定豚から分離した志賀毒素産生性大腸菌の比較. 平成28年度(第58回)全国家畜保健衛生業績抄録; 2016: 393
- 15) Matuschek E, J Ahman, C Webster, et al. 2018. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect. 24(8):865-870.
- 16) Cannatelli A, MM D' Andrea, T Giani, et al. 2013. *In vivo* emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. Antimicrob Agents Chemother. 57:5521-5526.
- 17) Lesho E, EJ Yoon, P McGann, et al. 2013. Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel *pmrCAB* operon during colistin therapy of wound infections. J Infect Dis 208: 1142-1151.
- 18) Jeannot K, A Bolard, P Plesiat, 2017. Resistance to polymyxins in gram-negative organisms. Int. J. Antimicrob. Agents 49, 526-535.
- 19) Teo JW P, M Kalisvar, I Venkatachalam, et al. 2018. *mcr-3* and *mcr-4* variants in carbapenemase-producing clinical *Enterobacteriaceae* do not confer phenotypic polymyxin resistance. J Clin Microbiol. 56: 1562-17

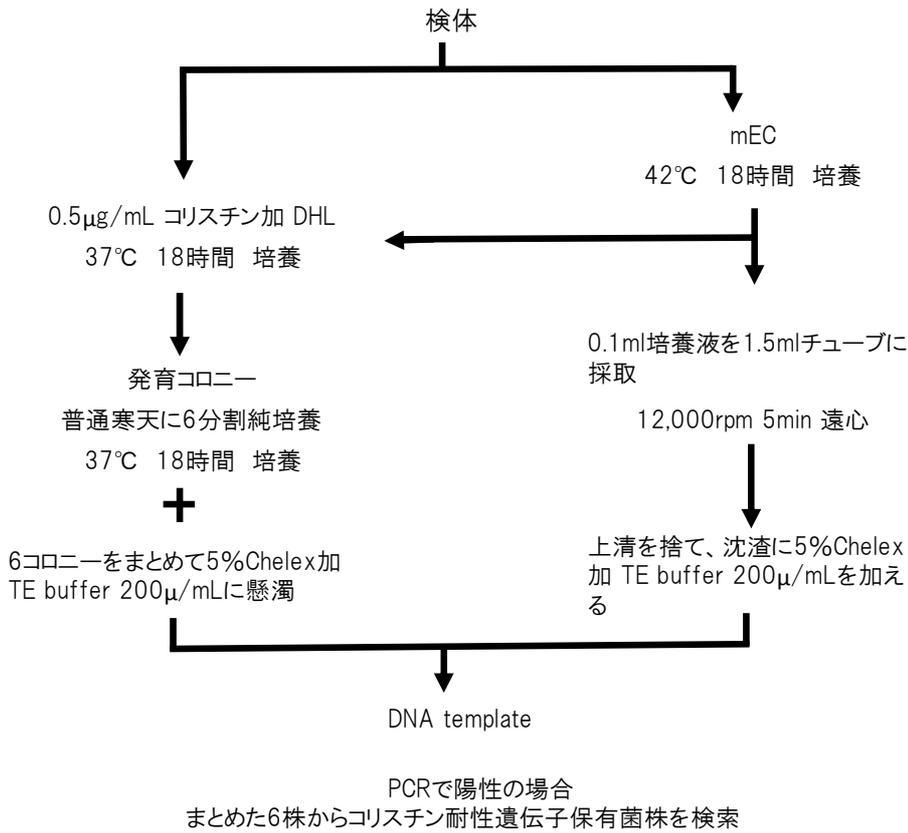


図1 培養からPCRへの流れ

寒天平板希釈法 MIC(μ g/mL)	微量液体希釈法MIC(μ g/mL)							Total
	1	2	4	8	16	32		
1	1							
2		1						
4	1	13	12	4				30
8	1	1	6					8
16					1			
32						1		
Total	2	14	18	4				38

図2 コリスチン薬剤感受性試験

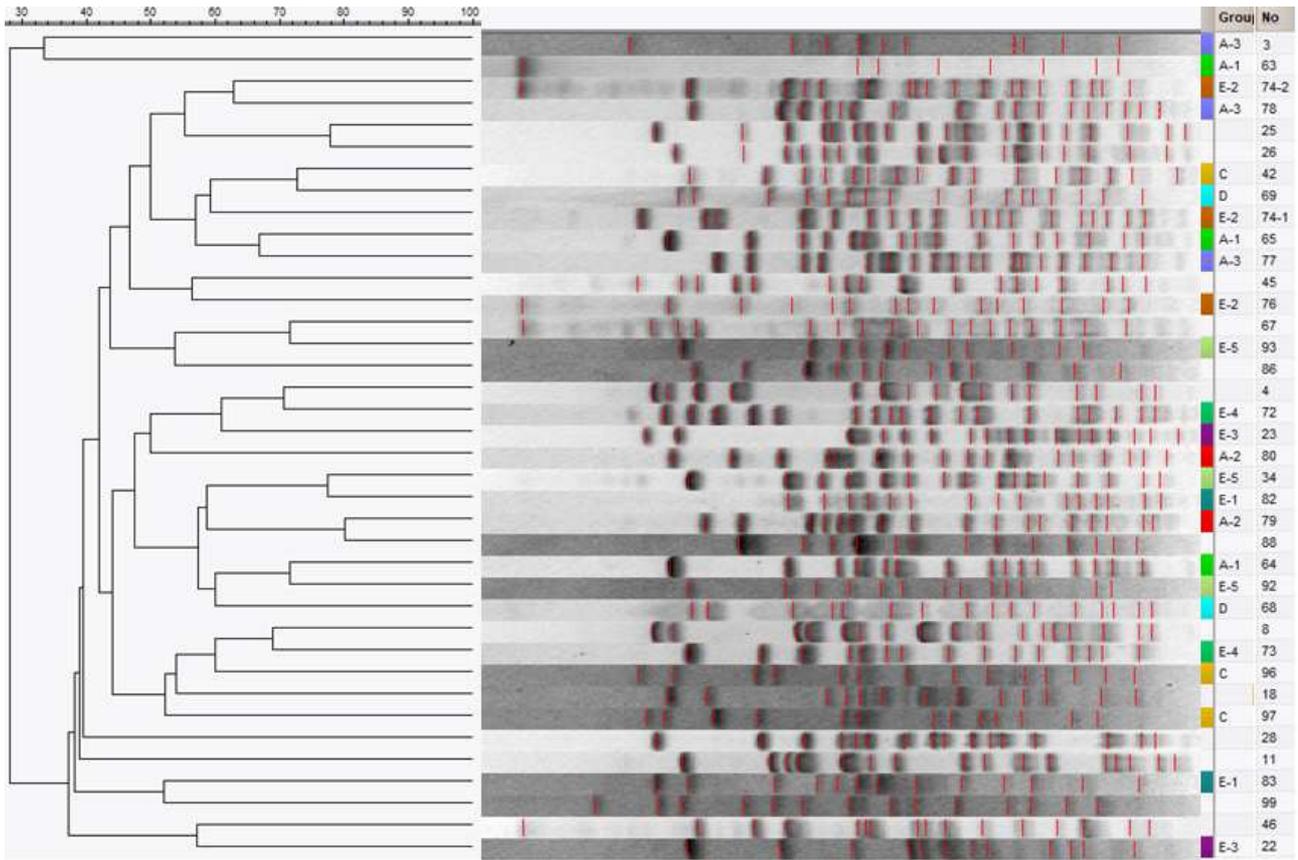


図3 *mcr-1* 保有 *E. coli* のパルスフィールドゲル電気泳動