

6 県内飼養豚におけるプラスミド伝達性キノロン耐性因子の保有状況

県中央家畜保健衛生所

赤間俊輔 南亜矢子 中村真弓

はじめに

フルオロキノロン(FQ)系抗菌剤は、強い殺菌力、広い抗菌スペクトラムを持ち、代替薬に乏しい、临床上重要な抗菌薬のひとつであるが、近年は、ヒト、伴侶動物、家畜等由来を問わず耐性菌の出現が問題となっている。

家畜衛生分野においては、食品安全委員会による食品健康評価等が進められ、第3世代セフェム、15員環マクロライド、コリスチン同様、一次選択薬に効果が認められなかった場合に、二次選択薬として使用する¹⁾など、耐性菌出現防止のため、慎重使用の取組がなされているところである。しかし近年は、病原性大腸菌O116やOSB9などのFQ耐性菌の出現²⁾が確認され、菌種も多様化傾向にある。

従来、FQに対する耐性獲得機序は、主に細菌染色体上のキノロン耐性決定領域(QRDR)によるもので、異菌種間での水平伝播は起こら

ないと考えられていたが、1998年にMartinzら³⁾が*qnr*を報告以降、これまでに*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*qepA*、*oqxAB*、*aac(6')-Ib-cr*⁴⁾等、様々なプラスミド伝達性キノロン耐性因子(PMQR)が発見され、キノロン耐性の高度耐性化や菌種を越えての水平伝播・広がりが危惧される状況となった。

それに伴い国内の家畜衛生分野においても、全国的なサルモネラや鶏由来大腸菌等の病原細菌におけるPMQRの保有状況調査が実施されたが、いずれも0.9~8.5%と低率であった^{5,6)}(表1)。

しかし、PMQRの『異菌種間での水平伝播』といった特徴を考慮すると、限られた特定の病原細菌のPMQR保有状況のみで、PMQRの浸潤実態やリスクは言及できず、今なおPMQRの実態やリスクは不明な点が多いのが現状である。

表1 主な病原細菌のPMQR保有状況

対象菌種	川西ら		浅井ら	参考：赤間ら ⁷⁾
	大腸菌(鶏)		サルモネラ ティフィムリウム (牛、豚)	大腸菌(豚) [*]
分離年度	2004~2007	2012	2003~2007	1999~2015
PMQR	117株中	82株中	225株中	15株中
保有株数	1株	7株	2株	3株
陽性率	0.9%	8.5%	0.9%	-

^{*}栃木県内分離株で、一濃度ディスク法でシプロフロキサシンに中間、耐性を示した株のみ検査

そこで今回、PMQR のより正確な実態を把握するため、特定の病原細菌に限定せず、糞便中に含まれる様々な腸内細菌叢をターゲットに PMQR の浸潤実態の解明を試みた。その結果、PMQR の実態について新しい知見が得られたので、その概要を報告する。

材料

県内養豚場 14 戸の飼養豚 141 頭の糞便を供した。なお、ステージ間での PMQR 保有率のばらつきの可能性を考慮し、各農場において、哺乳、離乳、肥育、繁殖ステージ各 2-3 頭ずつ計 10 頭程度の糞便を採取した。

方法

1. PMQR 保有状況調査

ヨーネスピン ver2 (ファスマック、神奈川) を用いて、糞便から遺伝子抽出を行った。抽出 DNA は、Xiang chen らの報告⁹⁾に準じ、RED Taq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-aldrich、USA) による PCR 法実施し、8 種の PMQR (*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*oqxA*、*qepA*、*aac(6')-Ib-cr*) の保有状況を調査した(図 1)。



図 1 PMQR 保有状況調査

2. PMQR 保有細菌の分離・特定

PCR 陽性糞便については、糞便希釈液を作成し、0.03、0.3 μg/ml シプロフロキサシン含有ハートインフュージョン寒天培地、DHL 寒天培地に接種し、37°C、18-24 時間、好気培養し、分離菌株を最大 8 株選出、PCR 法により PMQR の保有の有無を調べた。PMQR 保有を確認した菌株は、rapidID32E(シスメックス・バイオメリユー株式会社、東京)や 16S rDNA 解析等により菌種同定を試みた(図 2)。

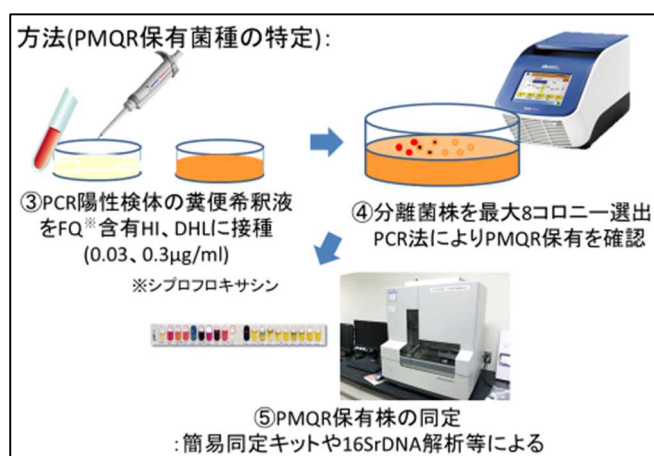


図 2 PMQR 保有菌種の特定

結果

1. PMQR 保有状況調査

PCR では、11 戸 53 検体(農場の 78.6%、個体の 37.6%)から単独もしくは複数の PMQR が検出され、内訳は *qnrS* が 7 戸 36 検体、*aac(6')-Ib-cr* が 5 戸 17 検体、*oqxA* が 4 戸 12 検体、*qnrB* が 3 戸 5 検体、*qnrD* が 2 戸 2 検体であった(表 2)。*qnrA*、*qnrC*、*qepA* は検出されなかった。

また、農場別では最大 5 種類(表 3)、個別の糞便からは最大 4 種類(表 4)の PMQR が検出された。

表 2 PMQR 保有状況調査の結果

PMQR の種類	陽性 農場数	陽性個体 (糞便)数
<i>qnrS</i>	7	36
<i>aac(6') - Ib - cr</i>	5	17
<i>oqxA</i>	4	12
<i>qnrB</i>	3	5
<i>qnrD</i>	2	2
PMQR 全体 (陽性率)	11/14 78.6 %	53/141 37.6 %

表 3 農場別の PMQR 検出状況

検出 PMQR数	<i>qnrS</i>	<i>aac(6') - Ib - cr</i>	<i>oqxA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrD</i>	戸数
5	○	○	○	○	○	1
3	○		○	○		1
	○		○			2
2	○				○	1
		○		○		1
1		○				3
	○					2
0						3
合計						14

表 5 PMQR 保有細菌の分離状況

菌種	保有 PMQR	戸数	検体数	同定法
大腸菌 ^{※1}	<i>qnrS</i>	4	13	RapidID32E
	<i>oqxA</i>	1	1	RapidID32E
緑膿菌	<i>qnrS</i>	1	1	16SrDNA 解析
<i>W. chitiniclastica</i>	<i>aac(6') - Ib - cr</i>	1	1	16SrDNA 解析
合計	3 菌種	5 ^{※2} 戸	16 検体	

※1 エンテロトキシンや志賀毒素等の毒素関連遺伝子を保有せず。

※2 *oqxA* 保有大腸菌、*qnrS* 保有緑膿菌の分離農場は、それぞれ *qnrS* 保有大腸菌の分離農場と重複。

表 4 個別(糞便)の PMQR 検出状況

検出 PMQR数	<i>qnrS</i>	<i>aac(6') - Ib - cr</i>	<i>oqxA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrD</i>	頭数
4	○	○	○	○		1
3		○		○	○	1
	○		○			1
	○					8
2	○	○				1
	○			○		1
	○				○	1
		○		○		1
1	○					23
		○				13
			○			2
0						88
合計						141

2. PMQR 保有細菌の分離・特定

11 戸由来 53 検体のうち、分離・特定された検体は、5 戸 16 検体のみで、残り 37 検体は分離・特定に至らなかった。

分離菌の内訳は、*qnrS* 保有大腸菌が 4 戸 13 検体、*oqxA* 保有大腸菌、*qnrS* 保有緑膿菌及び *aac(6') - Ib - cr* 保有 *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* (*W. chitiniclastica*) が各 1 戸 1 検体であった(表 5)。

また、1 戸では、複数菌種(大腸菌と緑膿菌)から同一 PMQR(*qnrS*) が検出された。

まとめと考察

国内の家畜における PMQR の保有状況については、表 1 に示したように、これまで特定の病原細菌において調査されているものの、その保有率は低く、現時点でそれほど広がっていないと考えられてきた。

しかし、本調査では検査対象を、豚糞便中の腸内細菌叢全体に広げたことで、それらを大きく上回る結果(37.6%)が得られ、県内飼養豚における PMQR の高率な保有状況が確認された。

この結果は、PMQR の深刻な浸潤実態を明らかにするとともに、従来の特定の病原細菌に対する検査のみでは、PMQR 浸潤実態を正確に把握できないことを示唆している。

今回用いた、細菌叢全体の遺伝子保有状況を調査する手法は、近年問題視されている *mcr-1* (プラスミド性のコリスチン耐性遺伝子) 等、PMQR と同様に異菌種間で伝播しうる様々な薬剤耐性因子の実態を正確に把握するために、有効な手法と考えられた。

なお、本調査は、検査対象が栃木県内飼養豚に限られており、畜種や地域性等の偏りが成績に反映している可能性がある。今後、本手法のようなアプローチで、他の畜種も含め、全国的な PMQR 浸潤実態が明らかになることを期待したい。

次に、今回分離された PMQR 保有細菌は、非病原性大腸菌、緑膿菌、*W. chitiniclastica* の 3 菌種であり、これらが豚の腸内細菌叢中で PMQR の供給源となり得ることが示唆された。

W. chitiniclastica は、2008 年に初めて提唱された菌種である。近年は公衆衛生分野において、免疫不全者等に蜂窩織炎、骨髄炎、敗血症を起こした報告等があるが、その報告

数は数例に過ぎず、日和見感染症と考えられている⁹⁾。豚での分離は、これまでに報告されていないことから、豚においても常在性の非病原細菌もしくは日和見菌である可能性が高いと思われた。

また、PCR 陽性にも関わらず PMQR 保有株の分離に至らなかった検体が、53 検体中 37 検体と高率に確認されており、今回の分離培養条件では分離まで至らなかった菌種の関与が強く疑われた。

既報¹⁰⁻¹²⁾で、PMQR 保有菌種については、赤痢菌、クレブシエラ、エンテロバクター等の腸内細菌科細菌を中心に報告されている。分離培養条件を整えば、さらに多くの PMQR 保有菌種の関与を明らかにできるものと考えられた。

以上のように、PMQR 保有菌種については、未だ不明な点が多く、様々な未知の常在菌が関わっている可能性が高い。現時点では、病原細菌での保有率は低く、常在する非病原細菌や日和見菌における PMQR 保有が主と考えられるものの、これら常在菌が PMQR の供給源となり、中長期的に病原細菌における FQ 耐性化が進む可能性は否定できないことから、今後も注意が必要である。

本調査を通じて、PMQR の浸潤実態の一部は明らかになったが、本成績が臨床上どの程度のリスクを示すかは現時点で不明である。そのリスクの解明には、『PMQR 獲得による MIC 上昇の程度』と『農場内における異菌種間伝播の発生とその頻度の調査』が必要と考えられる。

PMQR 獲得による MIC 上昇の程度については、いくつか報告¹³⁾がある。キノロン標的である DNA ジャイレースを保護する Qnr は 4-64 倍、キノロンを修飾する酵素である

Aac(6')-1b-cr は 2-4 倍、薬剤を菌体外に能動的に汲み出すエフラックス機構である QepA は 64 倍と、PMQR の種類による違いに加え、同一 PMQR であっても株によって MIC 上昇の程度に差があることが報告されている。

一方、実際の異菌種間伝播の有無や、その伝播頻度を調査した報告はこれまでなされていない。しかし、今回の調査では、同一農場で複数菌種(大腸菌、緑膿菌)から、同一 PMQR (*qnrS*) が検出されていることから、実際の異菌種間伝播の可能性も考慮する必要がある。

いずれにせよ、PMQR 獲得による MIC 上昇の程度やその伝播頻度に関する知見は少なく、リスクを論じるには未だ不十分である。筆者らは、今回分離された PMQR 保有株についても、MIC 測定、プラスミドプロファイル等によるプラスミド保有やサイズの確認、接合伝達試験による接合伝達能の確認を進め、今後の PMQR のリスク解明の一助としたい。

稿を終えるにあたり、御指導、御助言を賜った国立研究開発法人、農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門、疾病対策部品質保証科、伊藤博哉科長及び暖地疾病防除ユニット楠本正博上級研究員に深謝する。

参考文献

- 1) 農林水産省ホームページ
畜産物生産における動物用抗菌性物質製剤の慎重使用に関する基本的な考え方
http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/pdf/prudent_use.pdf
- 2) Masahiro Kusumoto *et al.*
Journal of Clinical Microbiology.
April 2016 volume 54 Number 4 1074-1081
- 3) Martinez *et al.*
Lancet. 14; 351(9105): 797-9(1998)
- 4) 平井敬二. 日本化学療法学会雑誌.
vol. 53 No. 6 349-356(2005)
- 5) Michiko Kawanishi *et al.*
J vet Med Sci 75: 1539-1542. (2013)
- 6) Tesuo Asai *et al.*
Gut Pathogens 2010, 2: 17(2010)
- 7) 赤間ら 第 56 回栃木県家畜衛生業績発表会集録 p49-53
- 8) Xiang Chen *et al.*
Antimicrobial Agent and Chemotherapy
3423-3427(2012)
- 9) Schrottner P *et al.*
Epidemiol Infect.
2017 May; 145(7): 1292-1303
- 10) Bhattacharya D *et al.*
Lett Appl Microbiol.
2011; 53(2): 247-51
- 11) Kazuki Harada *et al.*
Front Microbiol 7: 1021, 2016
- 12) Kazuki Harada *et al.*
PLOS ONE
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0174178> (2017)
- 13) 嵯峨知生. 臨床と微生物. vol140 No. 3
219-223(2013)
- 14) 厚生労働省ホームページ
薬剤耐性ワンヘルス動向調査
年次報告書 2017