OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	食肉の抗菌性物質および多剤耐性菌の汚染実態と薬剤耐性遺伝子の解析
Author(s)	山口, 貴弘
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69523
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士論文

食肉の抗菌性物質および多剤耐性菌の汚染実態と薬剤耐性遺伝子の解析

2017 年

大阪大学大学院薬学研究科　創成薬学専攻

応用環境生物学分野

山口　貴弘

目次

略語表

緒論 -1

第一章

第一節 緒言 -6

第二節 実験材料及び実験方法 -8

第三節 結果 -14

第四節 考察 -18

第二章

第一節 緒言 -22

第二節 実験材料及び実験方法 -23

第三節 結果 -25

第四節 考察 -29

第三章

第一節 緒言 -31

第二節 実験材料及び実験方法 -33

第三節 結果 -36

第四節 考察 -41

総括 -44

謝辞 -47

参考文献 -49

略語表

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CPFX; ciprofloxacin

CRE: carbapenem-resistant enterobacteriaceae

ESBL: extended-spectrum β-lactamase

FOM; fosfomycin

LC-MS/MS: liquid chromatograph-tandem mass spectrometer

LOQ: lower limit of quantification

mcr: mobilized colistin resistance

MIC: minimum inhibitory concentration

MRM: multiple reaction monitoring

NA; nalidixic acid

S/N: signal to noise

TC; tetracycline

緒論

抗菌性物質の歴史は 1928 年、アレキサンダー・フレミングによるペニシリンの発見に始まり、細菌感染症の治療が飛躍的に向上した。しかし、それと同時に、抗菌性物質が効かない「薬剤耐性菌」との戦いが始まった。サルファ剤やアミノグリコシド系、マクロライド系、キノロン系抗菌性物質等が次々に開発・上市されたが、その度に当該薬剤に対する耐性菌が発見され、まさに「いたちごっこ」の状況となっている。現在の細菌感染症治療には第一選択薬療としてβラクタム系抗菌性物質が選択されることが多い。しかし、第三世代セフェム系抗菌性物質に耐性を示す ESBL（extended-spectrum β-lactamase）産生菌が世界中に蔓延し、細菌感染症の治療の難治化を引き起こしている。また、さらにカルバペネム系抗菌性物質にも耐性を示すカルバペネム耐性腸内細菌（carbapenem-resistant enterobacteriaceae: CRE）が世界各地で検出され、多剤耐性菌感染症のリスクが増大している。その CRE など多剤耐性菌の最終治療薬として近年注目されているのがコリスチンである。コリスチンは、家畜の飼料添加物として世界中で使用されてきた抗菌性物質である [1-4]。ヒトに対しては、腎毒性や神経毒性等の副反応が強く、使用は限定的であったが、耐性菌の治療に選択できる薬剤が限定される中、殺菌効果が高く耐性菌の発生が少ないコリスチンをヒトの感染症治療に使用するケースが増えている。日本においても 2015 年に一部の多剤耐性グラム陰性菌の感染症治療に対する適応が認められた。しかし、2015 年にプラスミド性コリスチン耐性遺伝子（mobilized colistin

resistance gene） *mcr-1* を持つ大腸菌が初めて報告され[5]、さらにコリスチン耐性菌の拡散が加速する恐れが指摘されている。このように世界では感染症治療の選択肢が枯渇しつつあり、保健・医療機関が感染症を治療できないケースも頻発するようになってきている。実際、Centers for Disease Control and Prevention は 2013 年、多剤耐性菌に関するレポートを発表し、アメリカでは年間 200 万人が耐性菌による重篤な感染症に罹患し、1%に相当する 2 万人以上が死亡していると試算した[6]。日本においても、耐性菌の院内感染事例も多数報告されており[7,8]、また死亡事例も報告されている[9,10]。

一般的に、薬剤耐性菌は Figure 1 で示すような、大きく分けて二つの経路で拡散すると考えられている。一つ目はヒトに対する医療行為によるものである。細菌感染症治療目的でヒトに投与された抗菌性物質は、病原菌感染部位や腸管内で薬剤耐性菌を選択する。選択された耐性菌を保有するヒトが、治療が行われた病院、医療施設において、医療スタッフや患者に接触すること、また、医療施設外の地域コミュニティにおいて家族や他人と接触することで、薬剤耐性菌が感染、拡散する。もう一つは、食品生産行為によるものである。抗菌性物質はヒトの医療の現場だけでなく、畜産、養殖など食料生産の現場においても使用されている。そこでは単に感染症治療の目的のみならず、感染症予防や成長促進など生産性や品質の向上を目的に漫然と使用されるケースも多い。抗菌性物質が投与された家畜の腸管内等で発生、増殖した耐性菌は屠畜、加工時に、食肉に付着し、増殖、拡散する。また、糞便等により環境中に放出され、農産物に耐性菌が付着、拡散する可能性もある。これらの耐性菌に汚染した食肉、農産物を摂取することにより、ヒトに耐性菌が感染し、さらに増殖、拡散して

行くことが予想されている。つまり、薬剤耐性菌の発生・拡散リスクは、病院や介護施設だけでなく、食品の生産・流通・消費工程の現場にも存在しており、野生生物も含め家畜・家禽、養殖魚とヒトとの垣根を超えた対策が必要である。この考え方は、近年「One Health」という概念として世界的に認知されるようになってきている[11]。世界保健機構（WHO）は、2015 年にワンヘルス・アプローチに基づく世界的な取り組みを推進するため、「薬剤耐性（AMR）関するグローバル・アクション・プラン」を採択し、加盟各国に自国の耐性菌アクションプランの策定を求めてきた。

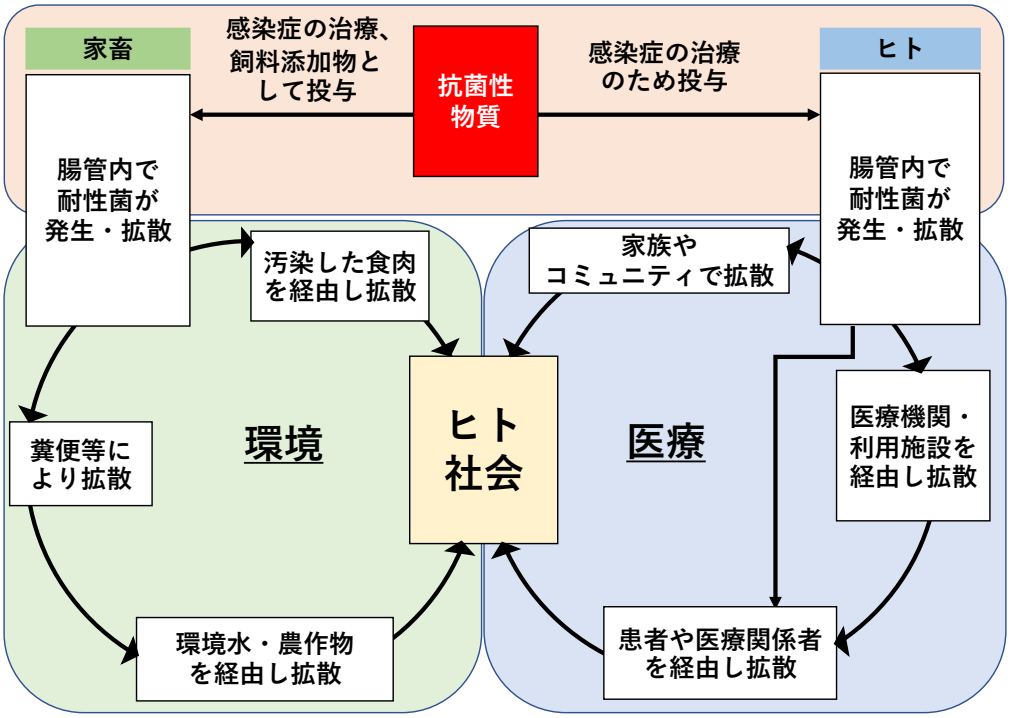


Figure 1. 想定される薬剤耐性菌の発生・拡散経路
参照：Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013, CDC の図を改変

EU 諸国、米国や日本では、処方外使用の禁止、ヒトと畜産動物に使用する抗菌性物質の厳密な区別、畜産動物に対する成長促進目的での使用量の削減等、家畜に対する抗菌性物質使用に関する対応が継続的になされてきた。一方、依然としてアジア、南米地域では抗菌性物質の使用量が増加し続けており、Van Boeckel らのグループは 2030 年に世界の畜産動物に対する抗菌性物質使用量は 2010 年の 167%にまで増加すると推定されている[12]。さらに、ベトナムをはじめとした東南アジア諸国は、市中健常人の薬剤耐性菌保菌率が 50%を超えることが多く、5～7%程度である先進諸国に比べ著しく高い[13]。これらの関係から、東南アジア諸国で薬剤耐性菌が蔓延している原因として畜産、養殖など食料生産現場における抗菌性物質の不適切使用が寄与していることが強く示唆される。しかし、実際にこれらの国々では、ヒトに対する医療の現場においても、一般市民が医師の処方箋なく町中の薬局で抗菌性物質を自由に購入できるなど、不適切な使用が観察され、先に示した食料生産現場における抗菌性物質の不適切な使用の寄与がどの程度なのか、科学的検証を行った例は乏しい。こういった検証を行うためには、これら東南アジア諸国内で流通する食品中の抗菌性物質残留や薬剤耐性菌汚染の実態を解明していく必要がある。さらに、日本はこれらの国から多くの畜水産物、加工食品を輸入しており、また、近年ビジネス、観光のために多くの国民が渡航しており、現地で生産された食品を摂食する機会が激増している。したがって、当該諸国における食品の残留抗菌性物質の汚染実態や、薬剤耐性菌蔓延の状況を把握することは、当該国だけの問題ではなく、我が国の薬剤耐性菌対策にとっても非常に重要である。

そのような背景のもと、2011 年に、科学技術振興機構（JST）、（2015 年より所管が日本医療研究開発機構（AMED）に移行）と国際協力機構（JICA）が共同で実施する地球規模課題対応国際技術協力事業（SATREPS）に「薬剤耐性細菌発生機構の解明と食品管理における耐性菌モニタリングシステムの開発」（代表　山本容正　大阪大学招へい教授）が採択された。本研究課題はベトナムにおいて薬剤耐性菌が市中で蔓延している原因の解明、および、その対応政策立案と社会実装を目的とし、食品生産・流通過程の薬剤耐性菌および抗菌性物質の汚染実態調査と分子疫学解析、さらにこれらのモニタリングシステム構築が実施された。著者は本プロジェクトに参画し、ベトナム国内で流通する生鮮食品中の抗菌性物質の残留実態を明らかにしてきた。また、本プロジェクトで分離された食肉由来薬剤耐性菌について、より詳細な性状や薬剤耐性遺伝子の機能の解析を試み、一定の知見が得られた。本博士論文はこれらの成果をまとめたものである。第一章はベトナムの食品中の抗菌性物質残留実態について、第二章は残留抗菌性物質が同一食材に付着した薬剤耐性菌の薬剤感受性やプラスミド水平伝達に及ぼす影響について、第三章はベトナムの食肉から分離したコリスチン耐性大腸菌が持つプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-3* について、それぞれ解析を行った結果を報告する。

本論

第一章　ベトナムにおける食品中の抗菌性物質汚染実態の解明

第一節　緒言

抗菌性物質は日本をはじめ世界中で、畜水産動物の感染症の予防や治療に使用されており、生産性や品質の維持・向上には必要不可欠なものとなっている。しかし、用法・容量の管理が不十分であれば、食品に残留し、ヒトへの健康被害や、緒論でも述べた薬剤耐性菌の発生・拡散する可能性がある。日本においては、2003 年の食品衛生法改正に基づき、食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（農薬等）について、一定の量を超えて農薬等が残留する食品の販売等を禁止するポジティブリスト制が導入された。この規制のもと、現在では、都道府県および政令市等に設置されている地方衛生研究所を中心として、各地域で製造、流通する食品の残留抗菌性物質モニタリング検査体制が構築されている。また米国、EU 諸国においても、同様にモニタリング検査体制が構築されており、食品中の残留抗菌性物質の監視がされている。一方で、ベトナムをはじめとした新興国では、緒論で述べた通り、国内で流通する食品中の抗菌性物質残留実態の把握が進んでいない。その理由として、分析機器や分析技術者が十分に整備・配置されておらず、残留抗菌性物質モニタリング体制が不十分に整っていないことが推定された。

著者は、大阪府立公衆衛生研究所（現地方独立行政法人　大阪健康安全基盤研究所）において、大阪府内で流通する食肉中の残留抗菌性物質モニタリング

検査業務に従事してきた。さらに当該検査業務の高精度化、高効率化を可能にする新規手法も開発し、公表してきた[14,15]。本手法で採用した前処理法は極めて簡便で、液体クロマトグラフ−タンデム型質量分析計（liquid chromatograph-tandem mass spectrometer、LC-MS/MS）があれば、その他特別な設備は使用しないため、ベトナムにおいても実施可能であると考えられた。そこで、この方法を用いたベトナム国内での食肉中残留抗菌性物質モニタリングが実施可能であるか否かの検証も含め、ベトナム国内における食品中抗菌性物質の残留実態を解明すべく、縦に長い地形であるベトナムで、SATREPS プロジェクト参加機関の協力を得て、北部の農業都市、タイビン（Thai Binh、TB）、中部観光地のニャチャン（Nha Trang、NH） 、最大経済都市、ホーチミン（Ho Chi Minh City、HCMC）、南部メコンデルタ中心都市のカントー（Can Tho、CT）の４つの地域で調査研究を実施した（Figure 2）。

Figure 2. Sampling area

第二節　実験材料及び実験方法

試料

2012 年から 2015 年にかけて、TB、NH、HCMC および CT のと畜場、卸売市場、食肉販売店およびスーパーマーケットから牛肉 68、豚肉 407、鶏肉 298、魚類 265、エビ 248 および鶏卵 111 検体を分析に供した。食肉（牛肉、豚肉、鶏肉）、魚類およびエビについては、各サンプル 0.05–1 kg、鶏卵は包装単位（6 個から 10 個）ごとにサンプリングし、無作為に 3 個を採取した。フードプロセッサーMK-K61（Panasonic, Osaka, Japan）により粉砕し、ポリプロピレンバックに採取し、分析に供するまで-20℃で冷凍保存した。

試薬

スルファクロルピリダジン、スルファクロジン、スルファジメトキシン、スルファメラジン、スルファメサジン、スルファドキシン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファモノメトキシン、スルファピリジン、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、ジフロキサシン、エンロフロキサシン、マルボフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オルビフロキサシンおよびサラフロキサシンは Dr. Ehrenstorfer GmbH（Augsburg, Germany）、アスポキシシリン、アンピシリン、オキサシリン、ペニシリン G、ペニシリン V、スピラマイシン、チルミコシン、トリメトプリムおよびタイロシンは Fluka（Sigma-Aldrich, St Lois, MO, USA）より購入した。分散固相は BONDESIL-C18 をアジレントテクノロジー社（Santa Clara, CA, USA）から購入した。アセトニトリル（HPLC グレード）は Scharlau（Barcelona, Spain）、ギ酸、

メタノール（HPLC グレード）は J. T. Baker （Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA）、メンブレンフィルター（PTFE, 3 mm, φ, 0.2 μm）はアジレントテクノロジー社から購入した。超純水は EASY pure Ⅱ system（Thermo Fisher Scientific Inc., Waltam, MA, USA）により精製し使用した。

標準溶液の調製

サルファ剤、キノロン系抗菌性物質、マクロライド系抗菌性物質およびトリメトプリムについては、まず、各化合物の標準溶液を、ポリプロピレン製メスフラスコを使用し、メタノールを溶媒に用いて、200 μg/mL となるように調製した。その後、a）サルファ剤、b）キノロン系抗菌性物質、c）マクロライド系抗菌性物質およびトリメトプリムの 3 系統に分け、各化合物濃度が 4 μg/mL となるよう混合溶液を調製し、使用するまで-20℃で保存した。β−ラクタム系抗菌性物質は分解されやすいため、別途調製した。超純水を溶媒に用いて、各化合物 200 μg/mL の標準溶液を調製後、各化合物濃度が 4 μg/mL となるよう混合し、4℃で保存し、2 週間を超えない期間で使用した。作業標準溶液は、4 系統の混合標準溶液を混合し、アセトニトリル/超純水（4：6）を用いて、0.5、1、5、10、20 および 50 ng/mL の濃度となるように希釈し使用した。

抽出法

a. 食肉（牛肉、豚肉、鶏肉）[15)]

試料 2 g を 50 mL ポリプロピレン遠沈管にとり、10 mL のアセトリニトリル／精製水（4:1）を加え、ホモジナイザー（PT3100, Kinematica AG, Luzern,

Switzerland）を用いて粉砕・撹拌し抽出を行なった。抽出液を遠心機（himac CF7D2、Hitachi Koki, Tokyo, Japan）1500 × g で 5 分遠心し、上澄液を 15 mL ポリプロピレン遠沈管に回収した。上澄液に 0.3 g の分散固相 BONDESIL-C18 を加え、1 分間撹拌し、1500 × g、5 分間遠心分離後、1 mL を採取し、精製水 1 mL を加えた。この抽出液を polytetrafluoroethylene（PTFE）メンブレンフィルターにより濾過し、分析に供した。

b. 魚介類の抽出法 [16)]

魚介類の抽出・分析については、SATREPS プロジェクトに関連し、内田らが実施した[16]。本論文の魚介類データの一部については内田らのデータを参照した。

c. 鶏卵の抽出法 [17)]

食肉の抽出法を変法し実施した。試料 2 g を 8 mL のアセトニトリルを加え撹拌し、上澄液を回収後 10 mL になるように精製水を加えた。その後の行程は食肉と同様に実施した。

LC-MS/MS 条件

LC-MS/MS分析は、ホーチミン市衛生研究所（IPH）が保有する質量分析計に API-5500QTRAP（AB SCIEX、Framingham、CA、USA）を用い、高速液体クロマトグラムにProminence UFLC（Shimadzu、Kyoto、Japan）を用いて行った。プレカラムにAlltima HP C18プレカラム（5×4.6 mm id、5 μm、Thermo Fisher

Scientific Inc.）と分離カラムはLuna C18カラム（100×3 mm id、2.5 μm）（Phenomenex、Torrance、CA、USA）を用いた。プレカラムとしてAlltima HP C18カラム （5 × 4.6 mm i.d.、5 μm、Thermo Fisher Scientific Inc.） を使用した。カラム温度は40℃、流速は0.4 mL/min、試料注入量を5 μLとした。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法（ESI）を用い、ポジティブモード、multiple reaction monitoring（MRM）により定量を行なった。移動相は、A液に0.1%ギ酸水溶液、B液にアセトニトリルを用いた。溶出グラジエントは以下の通りとした。B 5% （0 min） – 95% （10 min） – 95% （20 min）。 モニターしたイオンの詳細をtable 1に示す。

バリデーション

定量に用いた検量線は、豚肉、鶏肉、牛肉、鶏卵、各々に対して、陰性が確認された試料の抽出液に混合標準溶液を添加したものを使用し作成した。定量下限値（lower limit of quantification、LOQ）は、食肉については、測定ピーク強度のS/N（signal to noise）比が10倍以上となることが確認できた10 μg/kgとした。ただし、チルミコシンは100 μg/ kgでS/N比の10を確保できたため、この値を定量下限値とした。鶏卵の検出下限値は厚生労働省の「妥当性評価ガイドライン」に基づき算出した[18]。

食肉、魚介類および鶏卵のバリデーションはAOAC international および妥当性評価ガイドラインに基づき実施し[18,19]、回収率70–125%、併行精度相対標準偏差15%以下となった抗菌性物質について測定可能と判定した。この結果、食肉、

魚介類および鶏卵で測定可能な抗菌性物質が異なった（抗菌性物質数：食肉28、魚介類32、鶏卵28）。食肉と鶏卵の各抗菌性物質のモニターイオンは同じ条件で測定した。下記のTable 1に示すとおりである。魚介類については内田ら[16]を参照のこと。

Table 1. Retention time （RT）, MS/MS parameters and LOQ of analytes in this study.

compound	RT[a] (min)	precursor ion (*m/z*)	product ion (*m/z*)[b]	LOQ（μg/kg）	
				meat	egg
ampicillin[c]	4.7	350	106 160	10	0.7
aspoxicillin[c]	4.2	494	250 349	10	0.8
ciprofloxacin[d]	4.9	332	314 231	10	2.2
danofloxacin[d]	5.0	358	283 82	10	3.7
difloxacin[d]	5.4	400	356 299	10	0.9
enrofloxacin[d]	5.1	360	316 245	10	0.6
marbofloxacin[d]	4.7	363	72 345	10	1.7
norfloxacin[d]	4.8	320	302 276	10	2.0
ofloxacin[d]	4.8	362	318 261	10	0.6
orbifloxacin[d]	5.2	396	352 295	10	0.3
oxacillin[c]	9.0	402	243 160	10	1.0
penicillin G[c]	8.2	335	176 160	10	4.6
penicillin V[c]	8.7	351	160 114	10	4.0
sarafloxacin[d]	5.4	386	299 342	10	4.3
spiramycin[e]	5.3	422	174 101	10	0.8
sulfachlorpyridazine[f]	6.8	285	156 92	10	0.7
sulfaclozine[f]	7.6	285	92 156	10	3.1
sulfadimethoxine[f]	7.7	311	156 92	10	0.4
sulfadoxine[f]	7.0	311	156 92	10	0.1
sulfamethazine[f]	6.2	279	186 156	10	0.1

Table 1. Continued.

compound	RT[a] (min)	precursor ion (*m/z*)	product ion (*m/z*)[b]	LOQ（μg/kg）	
				meat	egg
sulfamerazine[f]	5.7	265	108 92	10	0.4
sulfamethoxazole[f]	7.0	254	156 92	10	0.8
sulfamethoxypyridazine[f]	6.2	281	156 92	10	0.2
sulfamonomethoxine[f]	6.6	281	156 92	10	0.3
sulfapyridine[f]	5.5	250	156 92	10	0.2
tilmicosin[e]	5.8	435	88 174	100	6.9
trimethoprim	4.7	291	230 261	10	0.2
tylosin[e]	6.7	917	174 83	10	1.3

a: RT: retention time b:upper: quantitation ion, lower: confirmation ion c: ß-lactam group, d: quinolone group, e: macrolide group, f: sulfonamide group

第三節　結果

残留抗菌性物質の検出率は、試験を行った食品全体では 12%（174/1397）の検出率であった（Table 2）。個別の食肉ごとの結果は鶏肉、豚肉、牛肉それぞれ 13%（40/29）、15%（60/407）、7%（5/68）であった。鶏肉は 4 地域で TB の検出率が 17%と高かった。豚肉は 4 地域を比較したところ、検体数は少ないが CT で検出率が高かった。また NT での検出率は低かった。HCMC および CT においては TB および NT と比較して、残留抗菌性物質の検出率が高かった。牛肉検体は HCMC でのみサンプリングし残留分析を行ったが、検出率は比較的低かった。魚類は TB と HCMC でサンプリングを実施したが、TB での残留

抗菌性物質の検出はなかった。鶏卵は HCMC でのみサンプリングを実施し 111 検体中、定量下限値以上での残留は 16 検体でみられた。

Table 2. Antibiotics-positive numbers and ratios of each food material in this study.

		Chicken	Pork	Beef	Fish	Shrimp	Egg	Total
TB	Positive / Sample	11 / 66	10 / 74	-	0 / 62	1 / 56	-	22 / 258
	Ratio (%)	17	14	-	0	2	-	9
NT	Positive / Sample	10 / 84	3 / 85	-	-	1 / 31	-	14 / 200
	Ratio (%)	12	4	-	-	3	-	7
HCMC	Positive / Sample	17 / 127	43 / 232	5 / 68	38 / 203	13 / 161	16 / 111	132 / 902
	Ratio (%)	13	19	7	19	8	14	15
CT	Positive / Sample	2 /21	4 /16	-	-	-	-	6 / 37
	Ratio (%)	10	25	-	-	-	-	16
Total	Positive / Sample	40 / 298	60 / 407	5 / 68	38 / 265	15 / 248	16 / 111	174 / 1397
	Ratio (%)	13	15	7	14	6	14	12

抗菌性物質ごとに検出数を算出した結果を Table 3 に示す。検出した主な抗菌性物質はスルファメサジン、スルファクロジン、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、ジフロキサシン、チルミコシンであった。スルファメサジンの検出した食肉のほとんどが豚肉であった。スルファクロジンは鶏肉のみから検出された。エンロフロキサシン、シプロフロキサシンは魚介類および鶏卵で多く残留が確認された。β−ラクタム系抗菌性物質の残留はみられなかった。残留抗菌性物質の検出濃度については、Figure 3 に示す。

Table 3. Detected antibiotics and their positive numbers in each food material.

	total	chicken	pork	beef	fish	shrimp	egg
sulfamethazine	69		58	4	3	2	2
sulfaclozine	13	13					
enrofloxacin	58	9	1		28	12	8
ciprofloxacin	21				14	2	5
norfloxacin	5	3			1		1
difloxacin	3	1		2			
tilmicosin	18	15					3
others	19	1	1		10	2	5

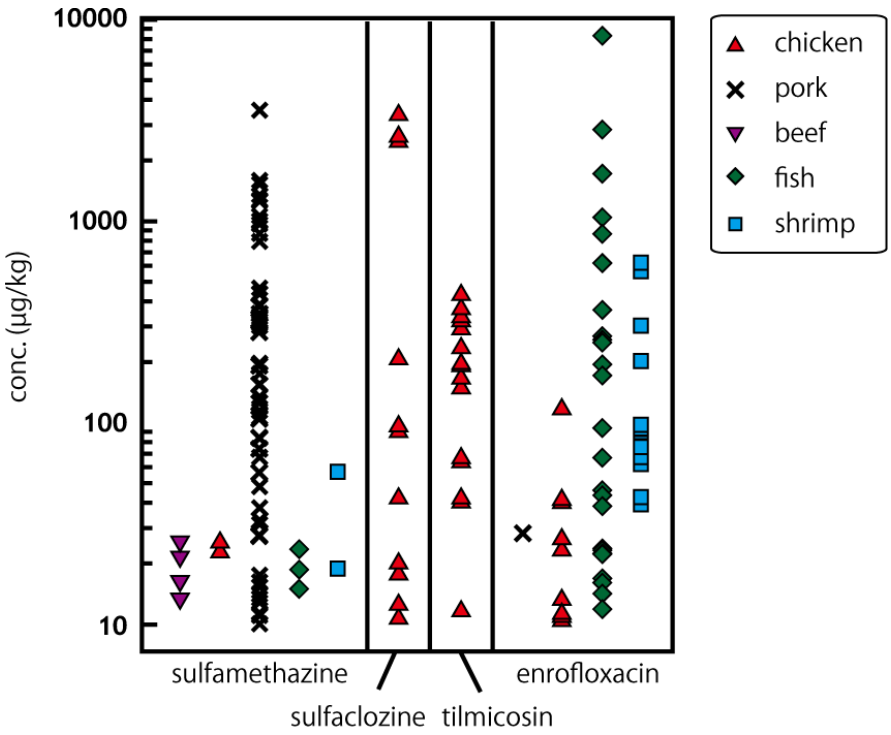


Figure 3. Residual levels of sulfamethazine, sulfaclozine, tilmicosin and enrofloxacin （μg/kg）

鶏卵からはエンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、スルファメサジン、スルファモノメトキシン、チルミコシンおよびトリメトプリムを検出した[8]。10 μg/kg 以上の濃度で検出された検体は 11 検体あり、検出濃度は Figure 4.に示した。10 μg/kg 以上の濃度が検出した 11 検体について販売者ごとの残留抗菌性物質の検出率を Figure 5.に示した。

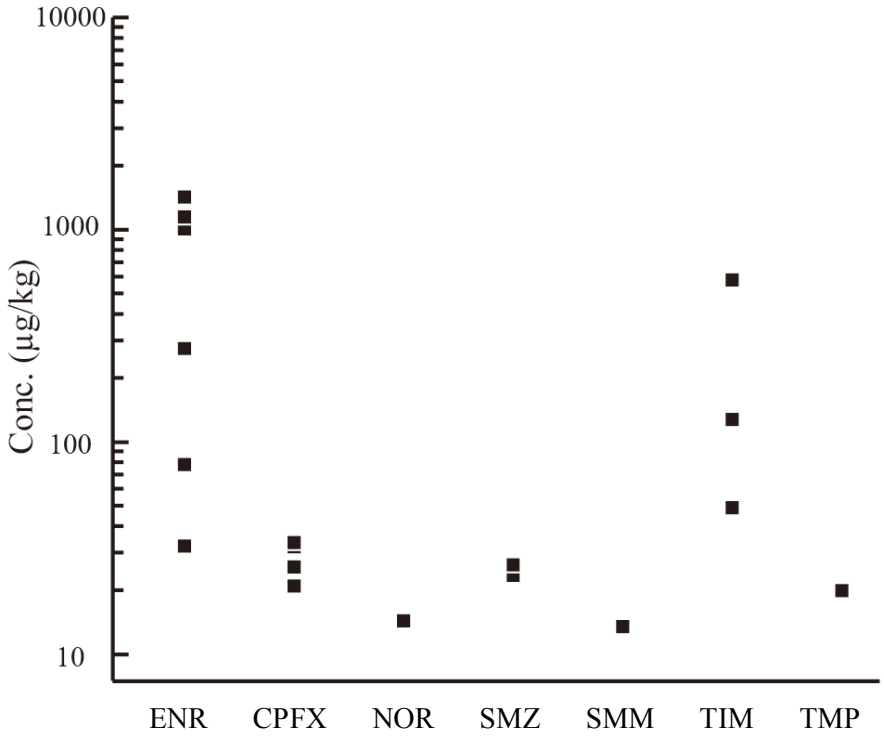


Figure 4. Concentrations of enrofloxacin （ENR）, ciprofloxacin （CPFX）, norfloxacin （NOR）, sulfamethazine （SMZ）, sulfamonomethoxine （SMM）, tilmicosin （TIM） and trimethoprim （TMP） detected in eggs.

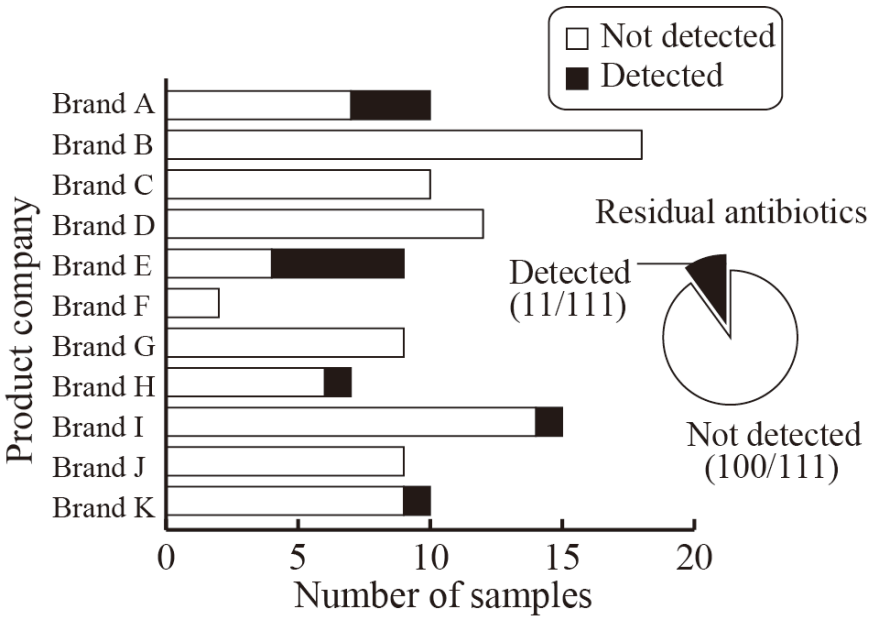


Figure 5. Comparison of residual antibiotic levels in eggs from 11 companies.

第四節　考察

ベトナムにおける食肉中の残留抗菌性物質の汚染率は全体で 12%（174/1397）であった。これは、2008 年から 2012 年の大阪府における食肉検査結果 0.08%（1/1183）、2012 年の EU のモニタリング結果（豚肉 0.13%、牛肉 0.2%、鶏肉 0.12%）と比較しても高い検出率であった[20,21]。地域別に見ると、大都市である HCMC や CT で 10%を超える検出率であったのに対し、ハノイに近い農村地域である TB や水産業が盛んな観光地域 NT では 10%を下回った。大都市部で残留率が高かった原因として、人口の急増に伴い、食肉の需要も高まり、その需要に応えるため、大量飼育による感染症予防・治療や飼料効率を上げるため抗菌性物質の使用頻度、使用量が増加したことが考えられる。

検体別の抗菌性物質陽性率は、鶏肉、豚肉、魚および鶏卵で 10%を超過した。鶏肉からはスルファクロジン、チルミコシンやエンロフロキサシンが高頻度で検出された。一方、牛肉やエビでは 10%を下回った。牛肉については、抗菌性物質陽性であった 5 検体は全てスーパーマーケット、食肉販売店で採取したものあったが、検査検体の半数を占めた屠畜場採取検体からは抗菌性物質は検出されなかった。これらの検体については、後日の調査でオーストラリアから生きたまま輸入されたものであることが判明した。そのため他の食肉に比べて検出率が低かったものと考えられる。

Figure 3 が示す通り、本研究において、豚肉のスルファメサジン、鶏肉のスルファクロジンおよび魚類のエンロフロキサシンは 1000 μg/kg を超過する事例が確認された。スルファクロジンは日本での使用実態はほとんどなく、これらの結果は、ベトナム特有の汚染実態を示すものと言える。当該薬剤は、1967 年に家禽コクシジウム症および特定の細菌性疾患の抗菌性物質として日本で開発された[22]。当該薬剤の製造業者を調査したところ、中国の業者のみが見いだされ、ベトナム国内における家畜用飼料や動物用医薬品の流通に及ぼす中国の影響力が垣間見える結果となった。

豚肉で高頻度に検出されたスルファメサジンは、その合成法が報告された 1941 年以来、家畜に対して細菌性肺炎や細菌性ブタ腸炎の治療に使用されてきた[23,24]。水量の極めて多いメコンデルタ地域の水域において、スルファメサジンが高頻度に検出されている[25]。河川に流入するスルファメサジンの多くが主に豚の家畜施設からであることが報告されており、スルファメサジンはメコンデルタ地域の畜産業者の間で、広く使用されていることが推測されている[26]。

そのため、豚肉からのスルファメサジンの検出率が高くなったと考えられた。また、サルファ剤の家畜の体外排出に関する報告によると、50 mg / kg 体重/日の用量を 3 日間経口投与した場合、鶏肉および七面鳥のスルファクロジンの残留レベルはそれぞれ 14 および 21 日後に 100 μg/ kg 以下に[27,28]、110 mg / kg の飼料を 3 日間経口投与した豚では、8 日後にスルファメサジン濃度は 100 μg/ kg 以下になる[29]。これらの知見から少なくとも投薬後、1 週間以上休薬期間を設ける必要があると考えられ、これに従って規制も行われている。本研究の結果から、鶏肉および豚肉からサルファ剤の残留する検体が多数見受けられたことから、一部の畜産農家では、抗菌性物質を投与した後に必要な休薬期間を遵守せず、出荷していることが推測された。

魚介類では、シプロフロキサシンやエンロフロキサシンのキノロン系抗菌性物質の残留事例が多いことが判明した。また、残留濃度が日本や EU の基準値を大きく超える検体も見出された。ベトナムでは、「VAC 複合農法 」という農業、水産養殖、畜産を複合的に行う伝統的な農法が推奨されてきた[30]。家族世帯での VAC 複合農法の導入や研究、施策より、1980 年代までのベトナム国内における栄養不足の問題や、食物の生産性の改善に大いに役立って来た。しかし、近年、大都市部での食料需要の高まりから大規模生産された魚介類が流通することが多くなり、こういった大規模生産に多くの抗菌薬が使用されることにより、発生した耐性菌がそのまま水産物に取り込まれ、さらに拡散するリスクが指摘されている。

鶏卵は、産卵鶏に投与した抗菌性物質が残留することが懸念されるため、産卵鶏に対する抗菌性物質の投与は各国で厳しく規制されている。本研究で収集

した食肉および魚介類の多くが、生産者の特定が難しい検体であった。それに対し、収集した鶏卵は日本と同様に、ベトナムにおいても販売者が示されていた。このことから、出荷元ごとに、抗菌性物質の汚染状況について調査を実施した。その結果、特に 2 社（A 社および E 社）で高い検出率が見られた（30%および 56%）（Figure 5.）。したがって、販売者ごとに抗菌性物物質に対する意識が大きく異なっていることが推察された。また、鶏卵からは、エンロフロキサシンやその代謝物であるシプロフロキサシンが検出されており、鶏肉と鶏卵のみからチルミコシンが検出したこと等、鶏肉と鶏卵の残留抗菌性物質の傾向は類似していた。この結果は、ベトナムでは産卵鶏に鶏肉用の鶏と同様に抗菌性物質が投与され、産卵鶏に対する抗菌性物質の投薬管理が不十分であり、鶏卵に残留している実態が反映されたものであると考えられた。

ベトナムでは、家畜飼育中の抗菌性物質の乱用により、様々な耐性菌が発生する可能性がある。動物の腸管内や食肉に加工される際での耐性菌汚染により、細菌間での薬剤耐性遺伝子の伝播による耐性菌拡散を助長する可能性がある。

第一章では、ベトナムの食肉から高頻度かつ高濃度で抗菌性物質の残留することを明らかにした。ベトナムでは食肉を介してヒトが抗菌性物質を暴露するリスクが日本や EU 諸国と比較しても高いことを意味し、耐性菌の発生・拡散を助長させる可能性が推測される。薬剤耐性菌の発生・拡散防止のため、ベトナムを含めた ASEAN 諸国において、食肉中の抗菌性物質のモニタリングを強化する必要があると考えられた。

第二章　残留抗菌性物質が同一食肉に付着した薬剤耐性菌の薬剤感受性およびプラスミド伝達能に及ぼす影響の解析

第一節　緒言

食肉中の耐性菌の発生・拡散には抗菌性物質の使用が関連していると指摘されている。この指摘は、比較的古くからなされており、公的な文章で最も古いものは、1969 年、英国議会が発表した「スワンレポート」であると言われている。この指摘以降、現在に至るまで、日本や米国、EU では家畜に対する感染症治療薬および飼料添加物の規制、管理が強化されてきた。しかし、東南アジアなどでは抗菌性物質の知識や管理が不十分であり、耐性菌拡散防止対策を進める必要があった。ASEAN 諸国では健常者の薬剤耐性菌の汚染率が高く、薬剤耐性菌の蔓延が危惧されている [13,31,32]。また、耐性遺伝子の拡散は菌自体の拡散と共に、プラスミドの水平伝達やインサーションシーケンス（IS）を介して薬剤耐性遺伝子が拡散していくことも知られている [33,34]。Nguyen らは、緒論で述べた SATREPS プロジェクトの一環で 2012 年から 2014 年に HCMC の屠殺場、卸売市場およびスーパーマーケットからサンプリングした鶏肉、豚肉、牛肉および魚介類の合計 330 検体について第三世代セファロスポリナーゼ耐性大腸菌（ESBL/AmpC 産生大腸菌）の汚染実態調査を実施した [35]。

著者は、このプロジェクトの成果を受け、食肉中の残留抗菌性物質が同一食品に付着した薬剤耐性菌に及ぼす影響についてより詳細な検証を試みた。具体的には、まず、前述の Nguyen らの用いた食肉検体が、第一章の解析に用いた検体の一部と同一であり残留抗菌性物質と耐性菌の両方の情報が入手可

能であったことから、第一章で検出頻度の高かったサルファ剤、キノロン系抗菌性物質に焦点を絞り、抗菌性物質の残留の有無により、同一検体から分離される耐性菌の性状に変化が見られるか検証した。

また、食肉に残留し得る微量の抗菌性物質がプラスミド水平伝達に及ぼす影響を評価した。

第二節　実験材料及び実験方法

分離株

SATREPS プロジェクトにより行われた HCMC における食肉中の ESBL/AmpC 産生菌汚染実態調査により分離された 342 株の提供を受け実施した。薬剤感受性試験結果は Nguyen らのデータを参照した[35]。Nguyen らの報告では、330 検体のうち 150 検体（45.5%）で ESBL/AmpC 生産大腸菌が検出され、食品ごとの分離率は鶏肉（92.7%）、豚肉（34.8%）、牛肉（34.3%）、魚介類（29.3%）であった。 セフェム系抗菌性物質に関与する耐性遺伝子は、342 株中 CTX-M-9 グループ（31.2%）、CTX-M-1 グループ（29.8%）およびプラスミド性 AmpC に関連する遺伝子である CIT（34.5%）が検出された。

残留抗菌性物質と同時に耐性菌の汚染実態調査を行った食肉の総数は 130 検体（牛肉 19、豚肉 30、鶏肉 63、魚介類 18）であった。そのうち残留抗菌性物質の検出が見られた食肉は Table 4 のとおりであった。牛肉 1 検体（ジフロキサシンとスルファメサジン）、鶏肉 2 検体（スルファクロジンとチルミコシン）から複数の抗菌性物質が検出した。

ESBL/AmpC 産生菌は 130 検体から 285 株を分離した。菌株はホーチミン市衛生研究所において分離された株を Material Transfer Agreement により日本に菌株を搬入し、提供を受けた。プラスミドの水平伝達試験には鶏肉由来 *E coli.* E362 株を用いた。レシピエント株には、あらかじめリファンピシン耐性を発現させた *E. coli* C600 株（以下 C600）（大阪健康安全基盤研究所保存株）[36,37] を作成し用いた。

Table 4. Number of samples that from isolated ESBL/AmpC *E. coli* and detected antibiotics（2012 December–2014 March）

	beef	pork	chicken	seafood	total
Number of samples	19	30	63	18	130
Number of samples that detected residual antibiotics	4	5	16	1	26
Detected sulfamide	4	5	10	0	19
Detected quinolone	1	0	4	1	6
Detected tilmicosin	0	0	4	0	4
Number of ESBL/AmpC *E. coli*	33	65	152	35	285

感受性試験

Nguyen らのデータを参照した [35]。

試薬

生化学用リファンピシン、シプロフロキサシン、ナリジクス酸およびテトラサイクリンは和光純薬工業株式会社（Osaka, Japan）から購入した。LB broth、

agar および Tryptic Soy Agar は Becton Dickinson and Company（Franklin Lakes, NJ, USA）から購入した。

抗菌性物質の添加処理によるプラスミド水平伝達の影響評価

ドナー株に *E. coli* E362、レシピエント株にリファンピシン耐性 C600 を LB broth に摂取し、36℃で一晩培養する。各培養液 1 mL と LB broth 4 mL を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に測りとり、36℃湯浴で 2 時間、140 rpm で振盪培養し、対数期の菌液を OD600=0.6–0.8 に調整した。あらかじめ抗菌性物質を添加し調製した LB broth 0.8 mL を 1.5 mL チューブにとり、ドナーおよびレシピエント培養液を 0.1 mL 加え、36℃湯浴で 2 時間、140 rpm で振盪培養した。その後、培養液を 1000, 10000, 100000 倍に希釈し、プラスミド水平伝達株のみを選択するために、1 μg/mL セフォタキシム、100 μg/mL リファンピシン含有 LB ager に 100 μL 塗布し、36℃、22±2 時間培養後、コロニー数を計測し、CFU/mL を算出した。ドナー株が自然にリファンピシン耐性を獲得することがあるが、一般に頻度は 10^{-7} から 10^{-8} と言われており [38]、予備実験により、リファンピシン耐性ドナー株の発現がない濃度を確認し、本実験ではこの濃度に希釈しコロニーを計測した。

第三節　結果

サルファ剤とキノロン系抗菌性物質の残留の有無による耐性率についての解析結果を Table 5 に示す。残留キノロン剤の検出のあった食肉から分離した株ごとに薬剤耐性率を Fisher's の正確検定（片側）により評価したところ、シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸（NA）およびホスホマイシン（FOM）

で有意な差が見られた。同様に残留サルファ剤についてはCPFXに有意差がみられた。

Table 5. Comparison of resistant antibiotics strains with or without residual antibiotics（%）（a: quinolones, b: sulfonamides）

a.

		CTX	SM	KM	GM	TC	CP	CPFX	NA	ST	FOM
Residual quinolone of test food	detected（18）	79	83	50	44	89	72	100	100	89	56
	ND*1（267）	90	91	56	53	97	82	66	83	85	32
	p-value*2	0.22	0.384	0.479	0.374	0.341	0.335	**0.0004**	**0.02**	0.343	**0.028**

b.

		CTX	SM	KM	GM	TC	CP	CPFX	NA	ST	FOM
Residual sulfonamide of test food	detected（46）	93	85	57	43	96	74	52	80	85	30
	ND*1（239）	85	88	53	52	93	79	68	81	82	32
	p-value*2	0.089	0.326	0.379	0.175	0.380	0.253	**0.029**	0.524	0.390	0.480

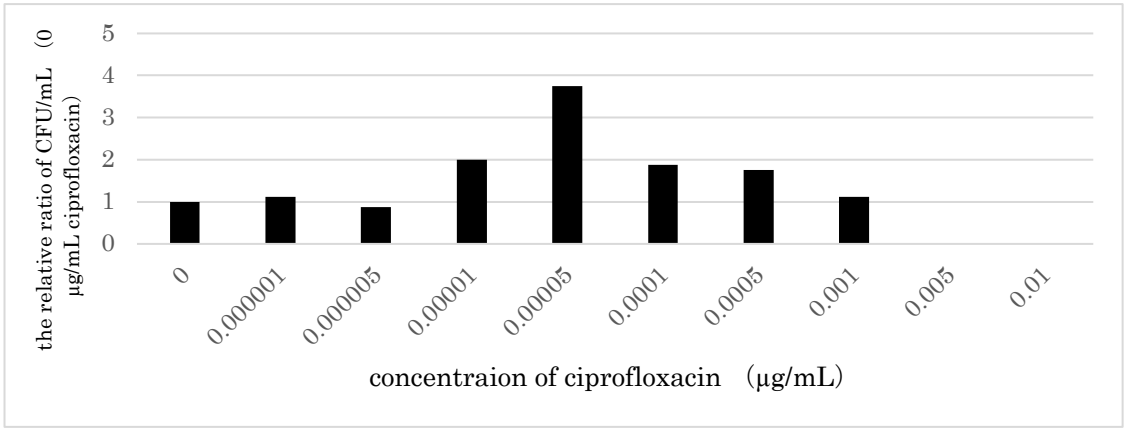
*1 ND: not detected, *2: fisher's test p-value （0.05>p）, CTX; cefotaxime, SM; streptomycin, KM; kanamycin, GM; gentamycin, TC; tetracycline, CP; chloramphenicol, CPFX; ciprofloxacin, NA; nalidixic acid, ST; trimethoprim-sulfamethoxazole, FOM; fosfomycin

続いて、微量抗菌性物質がプラスミド水平伝達に与える影響評価を行なった。ベトナムの食肉から分離した、プラスミド上にAmpCの一種であるCMY-2遺伝子を有するAmpC産生大腸菌株を用いた。レシピエント株はC600にリファンピシン耐性を獲得させた株を使用した。評価に用いた抗菌性物質はエンロフロキサシンの代謝物であり、高い抗菌性を示し，残留事例も多かったCPFX等のニューキノロン系抗菌性物質薬のリード化合物となったオールドキノロン系抗菌性物質のNA、および第1章の研究では測定項目には入れていなかった

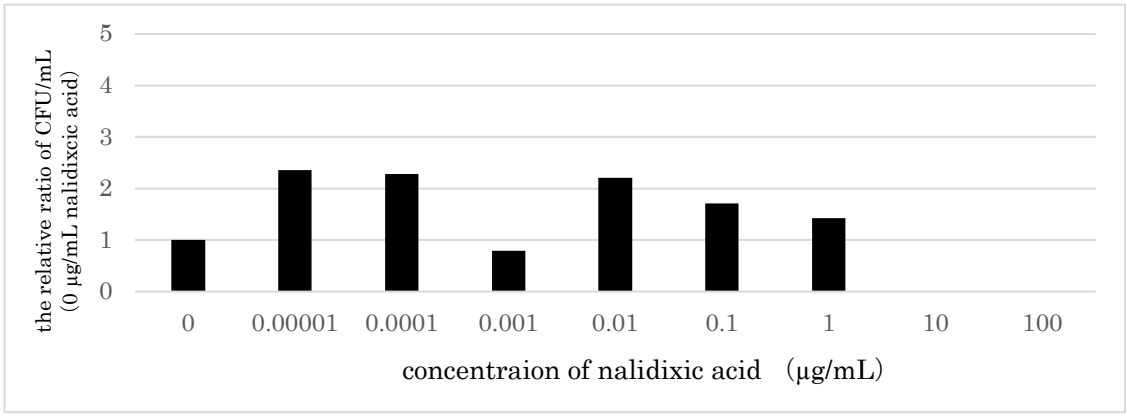
が、畜水産業で多く使用されている TC の 3 種類の抗菌性物質を用いた。水平伝達実験には、レシピエントにあらかじめリファンピシン耐性を獲得した C600 を、ドナーには CMY-2 遺伝子保有大腸菌の E362（CTX、CPFX、NA、TC 耐性）を用いた。

CPFX 存在下でのプラスミド水平伝達実験の結果、1.0×10^{-6} から 0.5×10^{-5} までは水平伝達株数に影響は見られなかったが、50 pg/mL の濃度で処理した時に最大値になり、無添加時と比較して 3.5 倍以上のコロニー数となった（Figure 6）。また、0.5×10^{-2} μg/mL 以上では CPFX の影響によりレシピエント株が影響を受け、水平伝達株の発生が見られなかったと推測された。また TC においても同様に 1 ng/mL で処理した場合に最大（4.2 倍）となったが、NA では処理濃度の変化によるプラスミド伝達株の生成について明確な違いはみられなかった。この結果から、本実験で用いたプラスミド伝達実験系では、一定濃度の CPFX および TC 存在下ではプラスミド水平伝達が促進される傾向が示唆された。

a.



b.



c.

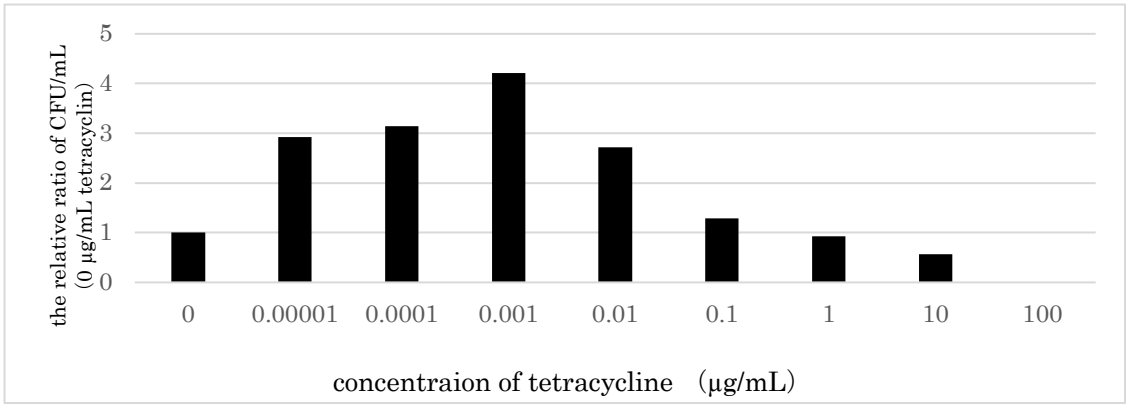


Figure 6. Correlation between plasmid horizontal transmission and ciprofloxacin concentration （a: ciprofloxacin, b: nalidixic acid, c: tetracycline）

第四節　考察

プラスミド水平伝達は耐性菌拡散の主要な要因と言われ[39,40]、また、抗菌性物質がプラスミド水平伝達を促進すると推測されている[41,42]。抗菌性物質が抗菌活性を示す濃度以下で細菌に処理された場合、抗菌性物質は、その細菌の染色体からの移入可能遺伝子の切除を活性化する、もしくはプラスミド水平伝達機構の発現を誘導する、またはその両方の機構によってプラスミド伝達率を高めると考えられている[43-47]。

本論文第一章で述べた研究で観測された食肉中の抗菌性物質残留濃度は最大10 mg/kgであり、抗菌活性を示す濃度に達した検体は皆無であった。本章の結果に示すように、上記のような抗菌性物質陽性検体から分離された薬剤耐性菌のキノロン耐性率が、抗菌性物質陰性検体からの分離株よりも優位に高かったことは、前段落の説と矛盾しない。このことから、食肉中に残留する抗菌性物質が耐性菌の選択圧として働いているのではないかと推測できる。

また、第一章の結果では、第三世代セファロスポリナーゼ産生菌の発生・拡散に関与すると考えられているβラクタム系抗菌性物質は全く検出されなかった。一方で、サルファ剤やキノロン系抗菌性物質の残留は多くみられた。このような検体を用いた第二章の実験において、キノロン系抗菌性物質が残留している食品検体からESBL産生大腸菌が数多く検出されていることが示されている。さらに第二章の接合伝達実験では、CPFXおよびTC処理により、第三世代セファロスポリナーゼ産生遺伝子を有するプラスミドの水平伝達が促進されることが示された。以上のことから、プラスミド水平伝播を誘導する抗菌性物質の種類は、当該プラスミドにコードされる薬剤耐性遺伝子に対応するもの

である必要はなく、異なった種類である可能性もあることが示唆された。このことは、特定の薬剤耐性菌の拡散を防ぐためには、対応する薬剤の使用を制限すればよい、というこれまで常識的に考えられていた対策が、実際には効果がないことを示唆しており、極めて重要な知見と言える。

プラスミド水平伝播の頻度は、周辺に存在する抗菌性物質の種類と存在量以外にも、様々な環境要因の影響を受けることが考えられるため、実際の食肉表面において、残留抗菌性物質が、プラスミド水平伝達を誘導していることを証明するためにはさらなる検証が必要と考えられる[41,48-50]。

具体的には、食肉に抗菌性物質とESBL/AmpC産生大腸菌を塗布し、食肉に付着している菌に対してプラスミドの水平伝達が促進されるかを検討すれば、実際の汚染実態に近い状態を再現でき、食肉表面上でのプラスミド伝達の影響について明確にすることができると考えらえる。また、本研究で調査、検証対象とした薬剤や遺伝子型、プラスミドタイプ、菌株の種類に限らず、その他の種類で検証を行うことにより、現象の一般性、あるいは、例えば、特定の薬剤が他の抗菌性物質に比べ水平伝播を誘導しやすい、特定のドナー株は水平伝播を生じやすい、などの特異性が明らかになる可能性が考えらえる。さらに、ドナー株の全ゲノム解析や、抗菌性物質処理時のトランスクリプトーム解析により発現量が変動する遺伝子を特定することにより、プラスミド水平伝播誘導の分子機構を明らかにする必要もある。これらの研究により、食品に残留する抗菌性物質がESBL産生菌をはじめとした耐性菌の拡散に寄与していることが明らかになれば、抗菌性物質の使用を見直すための重要な知見となり、耐性菌に対するリスク軽減に貢献できると考えられる。

第 3 章　食肉から分離したプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-3* 保有株の分離及び解析

第一節　緒言

近年、多剤耐性菌の治療に効果的であるとしてコリスチンが再注目されている。コリスチンは 1950 年に日本で発見された抗菌性物質であり [51]、主に家畜の飼料添加物として世界中で利用されている。ヒトに対しては、腎毒性や神経毒性等の副反応が強く、使用は限定されていた。しかし、多剤耐性菌の最終選択薬として、感染症治療に使用するケースが増えており、日本でも 2015 年に一部の多剤耐性グラム陰性菌の感染症治療に対する適応が認められた。このように多剤耐性菌に対する「最後の切り札」として期待されているコリスチンであるが、2015 年に *mcr-1* をもつ大腸菌が初めて報告され [5]、それ以降、日本を含め世界各国で臨床検体、食品等からの検出報告が相次いでいる [52-56] 。また、遺伝子型も、2017 年 12 月現在 5 種類(*mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5*)まで報告されており [5,57-60]、家畜におけるコリスチン使用の増加に伴い、コリスチン耐性遺伝子の種類も増加していく可能性が指摘されている [61]。

コリスチンは正電荷を帯びた環状ポリペプチド系の抗菌性物質であり、細菌外膜上に局在するリポ多糖（LPS）の構成成分である負電荷を帯びたリピド A に接近し、そこからペリプラズムを通過後、内膜に挿入・穿孔を形成し、抗菌活性を示す [62-64]。*mcr-1* による耐性メカニズムは主に、LPS 上のリピド A のホ

スホエタノール（PEA）修飾により、コリスチンとリピド A の接合を阻害することによるものである（Figure 7）。

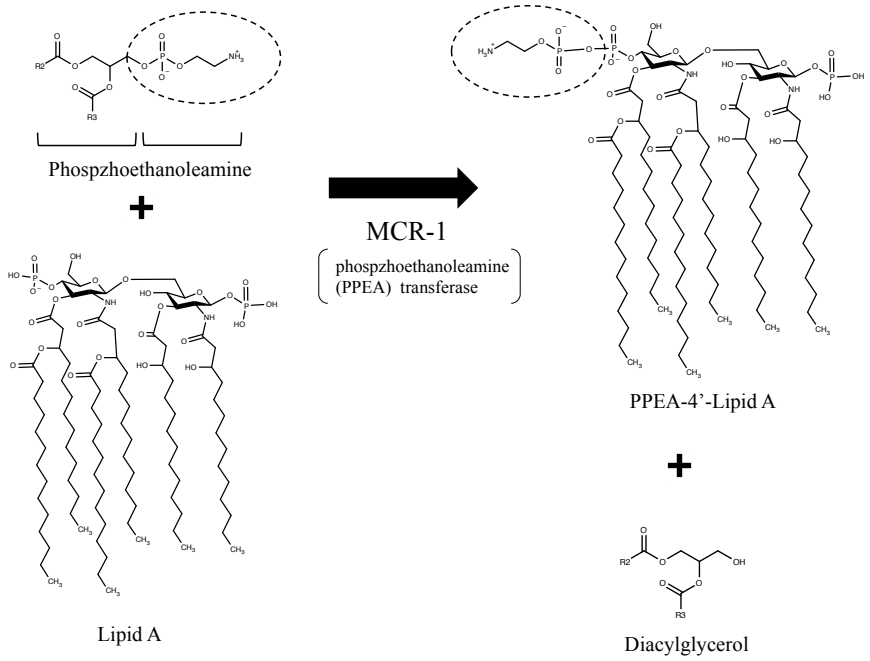


Figure 7. Working model proposed for MCR-1-catalyzed reaction in *E. coli.*
参照：Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance Fig 1.A を改変

近年では、コリスチンによる治療が有効であるとされている CRE のうち、特に強いカルバペネマーゼ産生能を有する NDM-1 遺伝子をもつ株が *mcr-1* を同時に保有していた事例が報告されており [65-67]、多剤耐性菌の治療がさらに困難になる可能性が指摘されている。

第 3 章では、ベトナム・ホーチミンにおける食品中のコリスチン耐性菌の汚染実態を調査するため、SATREPS プロジェクトで分離した ESBL/AmpC 産生

大腸菌 342 株の提供を受け、コリスチン耐性について研究を行なった。また、その中で *mcr-3* を有するコリスチン耐性大腸菌を分離したため、その遺伝子について詳細な解析を実施した。

第二節　実験材料及び実験方法

分離株

SATREPS プロジェクトの食肉中 ESBL/AmpC 産生菌汚染実態調査により分離された 342 株の提供を受け実施した。

試薬

硫酸コリスチンは和光純薬工業株式会社（Osaka, Japan）から購入した。e-test （コリスチン）（bioMérieux, Marcy l'Etoile, France）を使用した。

感受性試験

342 株について、平板希釈法を用いてコリスチン感受性試験を実施した。度は 0 から 8 μg/mL に調製した LB agar を用いた。菌液はマクファーランド No. 0.5 の濃度に調製した菌液を使用した。培養は 36℃、22±2 時間培養後、コロニー形成の有無により最大発育阻止濃度 MIC（μg/mL）を算出した。コリスチン耐性の基準は CLSI の基準に準じて 2 μg/mL 以上を耐性とした。

mcr 遺伝子スクリーニング PCR

QIAGEN Multiplex PCR（QIAGEN、Hilden、Germany）を用いて、*mcr-1,2* および 3 遺伝子のスクリーニング PCR を行なった。DNA テンプレートは、既報[68]に従って、Tris-EDTA 緩衝液 TE で 95℃10 分間煮沸し作成した。 *mcr-1* および *mcr-2* のプライマー配列は既報[57,58]を参照し、*mcr-3* のプライマー配列は下記の通りである。

MCR3-759F; 5'-TGGTGAAACCGCTCGTGGTA-3 '

MCR3-1495R; 5'-ACACCTGCATAGGAACACGG-3 '

PCR 条件は下記の通り実施した。

95℃ 5 min

95℃ 30 sec、58℃ 90 sec、72℃ 30 sec×33 サイクル

68℃ 10 min

PCR 産物は、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA（Shimadzu、Kyoto、Japan）を用いて、試薬に DNA-1000 Reagent Kit（Shimadzu、Kyoto、Japan）を使用し、オンチップの標準操作手順により泳動し PCR 産物を確認した。

mcr-3 の保有するプラスミドの水平伝達実験

ドナーに *mcr-3* 検出コリスチン耐性大腸菌（E155、E769、E771）、レシピエントに C600 を用いた。LB broth に摂取し、36℃で一晩培養する。各培養液 1 mL と LB broth 4 mL を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に測りとり、36℃、140 rpm 水浴で 2 時間培養し対数期に増殖した菌液を OD600=0.6–0.8 に調整した。

各菌液 0.1 mL を LB broth 0.8 mL に加え、36℃、140 rpm、2 時間水浴で震盪培養を行なった後、100,1000,10000 倍に希釈した菌液 100 µL を 1 µg/mL コリスチン、100 µg/mL リファンピシン含有 LB agar に塗布し、36℃、22±2 時間培養後、形成したコロニーを水平伝達株（Co155、Co769、Co771）とした。

プラスミド水平伝達株の確認（パルスフィールドゲル電気泳動）

プラスミド水平伝達株の確認にはドナー株（E155、E769、E771）、レシピエント株（C600）およびトランスコンジュガント株（C0155、Co769、 Co771）を tryptic soy agar で 35℃一晩培養した後、McFarland 0.5 になるように生理食塩水で希釈調整後、150 µL と 1% SeaKem Gold agarose（Lonza、Basel、Switzerland）150 mL と混合し、100 µL をサンプルキャスターに流し込み、プラグを作成する。作成したプラグは、1 mg/mL protease K 溶液（1% *N*-lauroylsarcosine in 0.5 M EDTA （pH=8.0））50℃一晩反応させたのち、プロテアーゼ阻害剤である 4 mM pefabloc SC 溶液（Sigma-Aldrich, St Lois, MO, USA）で処理を行う。その後、プラグを適当な大きさに切り、株の同一性を確認するために、XbaI（Nippon gene, Tokyo, Japan）、プラスミドの確認のために一本鎖 DNA を選択的に切断する SI ヌクレアーゼ（Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて、酵素処理を行い、0.5% TBE 緩衝液で 1%SeaKem Gold agarose を作成し、プラグを埋没させ、固化する。PFGE の泳動には CHEF-DR system （Bio-Rad, CA, USA）[69,70] を用いた。泳動条件は、14℃、Initial: 2.2 s、Final: 54.2 s、6 V/cm、19 時間で行なった。ゲルの染色には gel red （Biotium, CA, USA） を用いた。

次世代シーケンスによる遺伝子配列解析

次世代シーケンスによるゲノム配列解析は、大阪大学微生物病研究所付属遺伝子情報実験センターの協力を得て行なった。トランスコンジュガントのプラスミド短リードシーケンシングは、Illumina MiSeq desktop sequencer （Illumina Inc., CA, USA）を用いて行った。 プラスミドの抽出にはトランスコンジュガントから PureYield Plasmid Midiprep Kit（Promega, Madison, WI, USA）を用いて抽出した。E155 および E769 のホールゲノムシーケンスには PacBio RS II（Pacific Biosciences, CA, USA）を用いて、*mcr-3* を有するプラスミドによる 2 株の全ゲノム配列決定を行った。 PacBio 配列データは、SMRTPipe v1.85 の HGAP 3.0 を使用して *de novo* で構築し得られたデータを使用した。コンティグを、CLC Genomics Workbench v8.0（QIAGEN、Hilden、Germany）を用いて比較した。薬剤耐性遺伝子およびレプリコンタイピングは、ResFinder 2.1、PlasmidFinder 1.3（http://www.genomicepidemiology.org）を用いた [71]。アノテーションは、Microbial Genome Annotation Pipeline（MiGAP）（http://www.migap.org）を用いて行なった [72]。 Easyfig 2.1 および BRIG を用いてプラスミドの遺伝子マップを作成した [73]。 マルチシーケンス配列タイピング（MLST）は、GoSeqIt（https://www.goseqit.com/web-services/）を用いて *in silico* で行なった [74]。

第三節　結果

ベトナムの食品から分離した 342 株のコリスチン感受性試験、及びコリスチン遺伝子（*mcr-1*、*2*、*3*）スクリーニング PCR を行なった（Table 6）。コリ

スチン感受性試験の結果、342 株のうち 83 株 （24%） がコリスチン耐性を示した。そのうち 80 株から *mcr-1* を検出したが、その大部分が鶏肉由来の ESBL 産生大腸菌からの分離であった。*mcr-2* は検出せず、*mcr-3* は豚肉由来の ESBL 産生大腸菌 3 株から検出した。

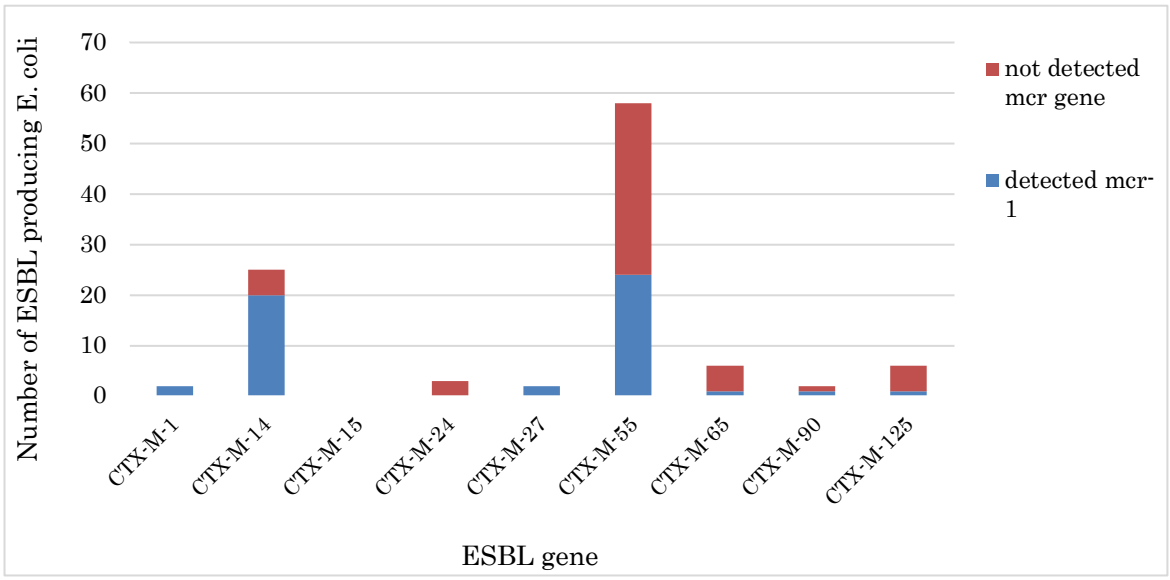
Table.6 The number of strains detected *mcr* gene and MIC of colistin

	beef (38[*1])		pork (75)		chicken (185[*4])		fish and shrimp (44)		total (342)	MIC (colistin) (μg/mL)
	ESBL (24[*2])	AmpC (14[*3])	ESBL (56)	AmpC (19)	ESBL (105)	AmpC (82)	ESBL (28)	AmpC (16)		
mcr-1	0	0	1	4	52	21	0	2	80	4–>8
mcr-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
mcr-3	0	0	3	0	0	0	0	0	3	4–>8

*1: The number of isolates from each sample, *2: The number of ESBL producing *E, coli*, *3: The number of AmpC producing *E. coli.,* *4: including 2 strains had both ESBL and AmpC genes

鶏肉および豚肉の ESBL 遺伝子別に *mcr* 検出数を集計した結果を Figure 8 に示す。

a. chicken



b. pork

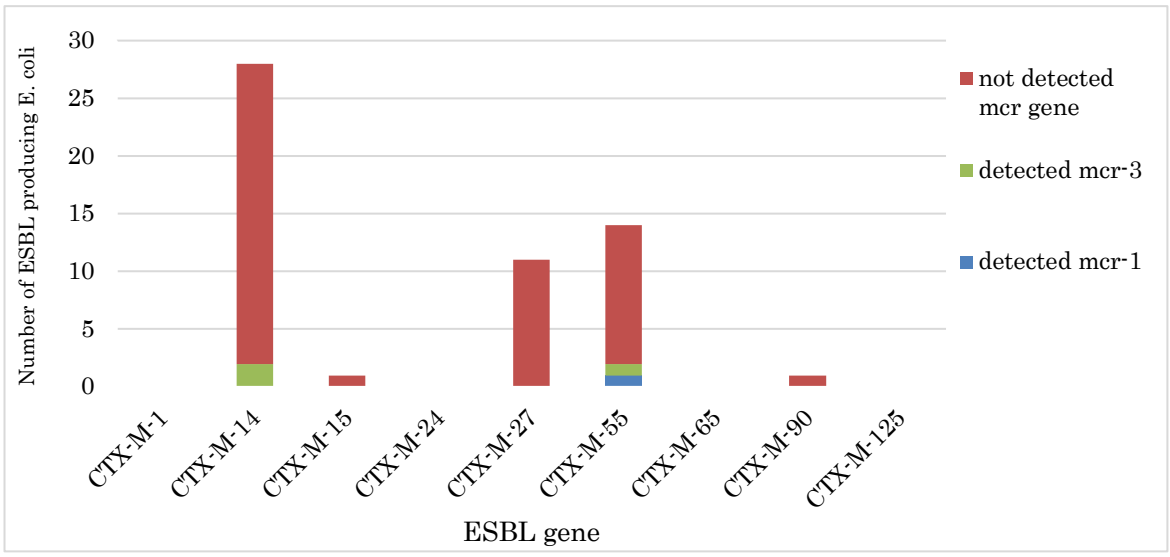


Figure 8. The number of detected mcr gene by ESBL gene （a: chicken, b: pork）

ESBL 遺伝子の検出数が高かった $bla_{\text{CTX-M-14}}$ もしくは $bla_{\text{CTX-M-55}}$ を持つ鶏肉由来 ESBL 産生菌は同時に *mcr-1* の検出数が高かった（80％：20/25 （*mcr-1* と $bla_{\text{CTX-M-14}}$ を検出した株数/$bla_{\text{CTX-M-14}}$ 総検出株数））（41％：24/58 （*mcr-1* と $bla_{\text{CTX-M-55}}$ を検出した株数/$bla_{\text{CTX-M-55}}$ 総検出株数））。一方、豚肉由来 ESBL 産

生菌は *bla*$_{\text{CTX-M-55}}$（7%：1/14）が *mcr-1* を保有していた。また、豚肉 ESBL 産生菌では *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ の有する ESBL 産生菌 2 株、*bla*$_{\text{CTX-M-55}}$ の有する ESBL 産生菌 1 株が *mcr-3* を有することが確認された。

mcr-3 を有する 3 株については、レシピエントに第二章で用いたリファンピシン耐性 C600 を用いて水平伝達実験を行なったところ、3 株とも *mcr-3* を有するプラスミドの伝達が確認された。またパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行なった結果、2 株については同一豚肉検体から分離した株であり、PFGE の遺伝子バンドパターンが一致したため同一株とみなした。E155 および E769、それぞれのトランスコンジュガント株 Co155 および Co769、レシピエント株 C600 の感受性試験結果を Table 7 に示す。この異なる 2 株の *mcr*-3 を持つ大腸菌のプラスミドについて次世代シーケンサーを用いて解析を行った（Figure 9）。

Table 7. The results of the antimicrobial susceptibility testing C600, E155, E769, Co155 and Co769

		disk diffusion method										E-test	
Strain No	MLST	CTX	SM	KM	GM	TC	CP	CPFX	NA	ST	FOM	CO	PO
C600		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.125	0.25
E0155	UN	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	4	4
Co155		S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	6	8
E0769	ST1081	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	4	6
Co769		S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	6	8

CTX; cefotaxime, SM; streptomycin, KM; kanamycin, GM; gentamycin, TC; tetracycline, CP; chloramphenicol, CPFX; ciprofloxacin, NA; nalidixic acid, ST; trimethoprim-sulfamethoxazole, FOM; fosfomycin, CO; colistin, PO; polymyxin B

次世代シーケンスによるプラスミドの遺伝子解析の結果から、本研究で分離した 2 株プラスミド（pVE155 および pVE769）のレプリコンタイプは IncFII であることが判明した（Figure 9）。

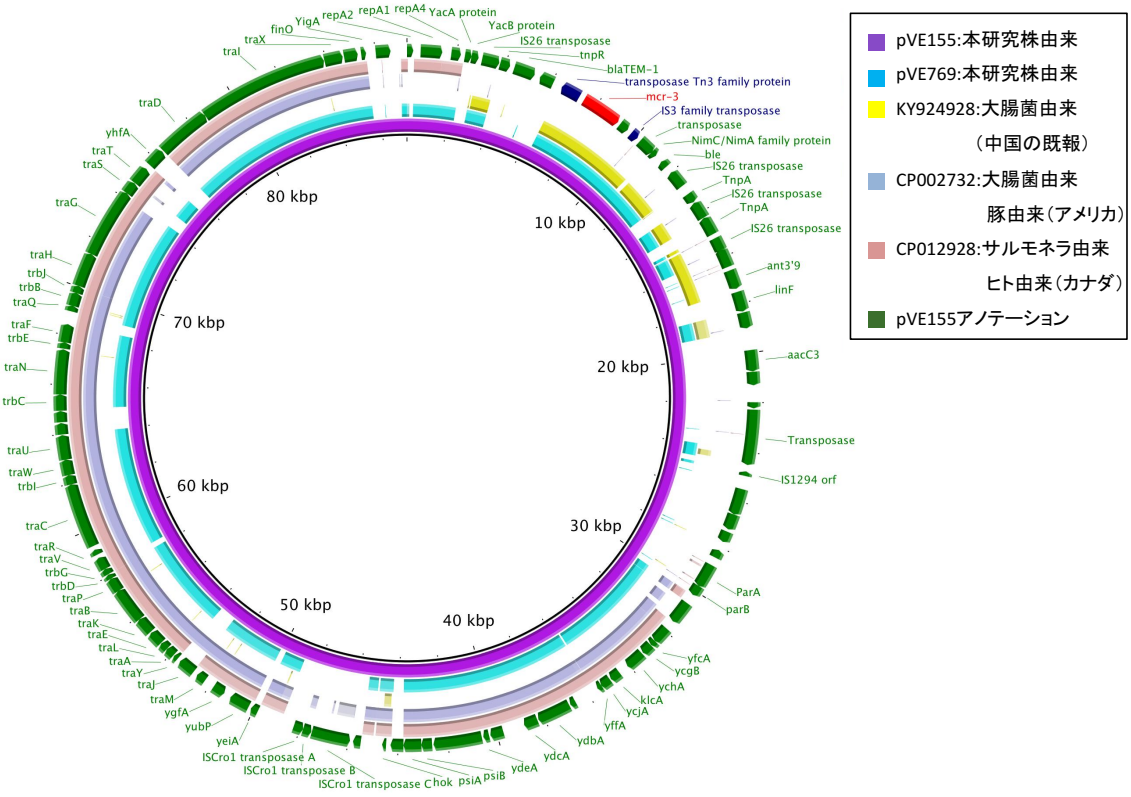


Figure 9. BRIG analysis of the *mcr*-3-carrying plasmids pVE769 and pVE155 in *E. coli* isolates from pork. Three plasmid sequences, KY924928, CP002732 and CP012928, were employed to compare with pVE769 and pVE155; KY924928: *mcr-3* harboring plasmid in *E. coli* isolated from pig faeces in China; CP002732 and CP012928: plasmid complete sequences indicated high homology with pVE769 and pVE155 using blastn program against GenBank database. Each plasmids were detected in *Salmonella enterica* from human and *E. coli* from pig faeces, respectively.

これは既報 [58] のプラスミド（KY924928）のレプリコンタイプ（IncHI2）とは異なることが明らかとなった。本研究で分離したプラスミドの基幹部分が類似

しているプラスミドについて BLAST 検索を行なった結果、ヒトから分離したサルモネラや豚糞便中から分離された大腸菌が保有するプラスミド（CP012928、CP002732）と類似することが明らかとなった。また pVE155 には *mcr-3* の他にβ–ラクタマーゼ遺伝子 TEM-1 およびアミノグリコシド耐性遺伝子（*ant3'9* および *aacC3*）が、pVE769 にはマクロライド耐性遺伝子 *mphA* およびエリスロマイシン *ermB* を有していた。さらに *mcr-3* 遺伝子周辺の遺伝子構造について、比較した結果を Figure 10 に示した。

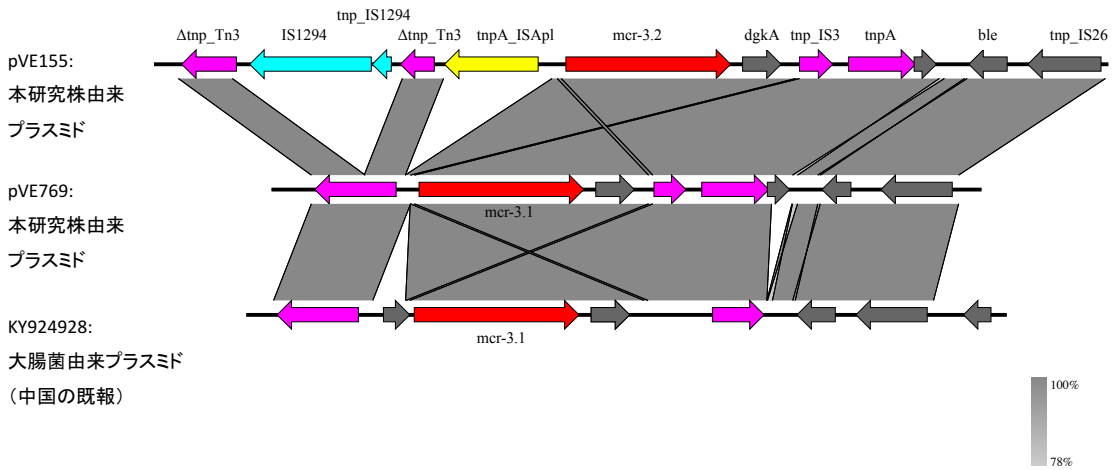


Figure 10. Comparison of the genetic environments of the *mcr-3* gene in three plasmids, pVE769, pVE155 (this study), and KY924928 (Yin *et al.* 2017).

第四節　考察

1980 年代の中国における鶏肉由来大腸菌から *mcr-1* は検出されており [75]、2009 年ごろから急速に増加している [76]。特に中国では、豚肉、鶏肉、ヒトおよび環境試料からから *mcr-1* が検出している報告があり、広く中国国内に *mcr-1* を有するコリスチン耐性菌が拡散していることが推測された [77-80]。また、多く

の国で家畜や、ヒト分離株から報告されていることから[81-83]、*mcr-1* を有するコリスチン耐性菌は世界中に拡散していることが推測された。中国と東南アジアにおけるコリスチンの使用は、他の国よりも大きいと考えられている[13]。

本章の結果から、ESBL 遺伝子の $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ および $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ を持つ鶏肉および豚肉由来 ESBL 産生菌は同時に *mcr-1* もしくは *mcr-3* を同時に持つことが明らかとなった。ヨーロッパやアメリカでは *mcr* 遺伝子は $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ および $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ と共に *mcr* 遺伝子が検出した報告がある[84-87]。これまでの ESBL 産生菌の遺伝子に関する報告では、ヨーロッパで $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ および $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ の検出事例は少なく、中国および東南アジアでは極めて多い[88-90]。このことから中国や東南アジアから $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$ および $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$ と *mcr* 遺伝子を持つ大腸菌もしくはこれらの遺伝子を有するプラスミドが拡散している可能性が推測された。

本研究で分離した *mcr-3* 株の 2 株が保有していたプラスミド（pVE155 および pVE769）のレプリコンタイプは IncFII であり、これは既報のプラスミド（KY924928）のレプリコンタイプ（IncHI2）とは異なっていた。本研究で分離したプラスミドの基幹部分に相同性の高いプラスミドを BLAST 検索した結果、ヒトから分離されたサルモネラや豚糞便中から分離された大腸菌が保有するプラスミド（CP012928、CP002732）と類似することが明らかとなった[91,92] サルモネラからも *mcr-1* が検出された報告があることや、CP002732 は豚下痢症のビルレンス因子を持つプラスミドであることから、これらのプラスミドにも容易に *mcr-3* 遺伝子が挿入され、遺伝子が拡散する可能性が考えられた。また pVE155 には *mcr-3* の他に β–ラクタマーゼ遺伝子 TEM-1 およびアミノグリコシド耐性遺伝子（*ant3'9* および *aacC3*）が、pVE769 にはマクロライド耐性遺

伝子 *mphA* およびエリスロマイシン *ermB* を有することが明らかとなり、*mcr-3* と共にプラスミドの水平伝達により伝播する可能性が示唆された。さらに *mcr-3* 遺伝子周辺の遺伝子構造について詳細に解析を行なった（Figure 10）。既報[58]と同様にトランスポゼース Tn3 を有することが確認できた。一方で pEV769 では既報[58]にはないインサーションシーケンス(IS)を有することが判明した。また *mcr-3.1* とは 1 塩基異なる *mcr-3.2* であることが判明した。*mcr-1* は IS*Apl1* を有することが多く、IS による拡散している可能性があることから[93,94]、同様に *mcr-3* も IS で広くコリスチン耐性が拡散していく可能性が示唆された。また、既報の *mcr-3* 周辺遺伝子構造が類似していることから、中国からベトナムに *mcr-3* が拡散している可能性が示唆された。

mcr-1 は国内の豚由来分離株やヒト由来分離株から検出されている[82,95]。コリスチンは日本でも飼料添加物として認められており、国内の使用量の 7 割が豚に対して使用されている。従ってベトナムと同様に、今後コリスチン耐性遺伝子が次々に日本で検出され、コリスチン耐性菌が急速に蔓延する可能性があるため、家畜や食肉のコリスチン耐性菌の汚染実態を監視することが、多剤耐性菌感染症治療の選択肢の確保につながると考えられる。

総括

本研究においては、ベトナムにおける食品中の残留抗菌性物質実態について調査を行なった。また同時に行なった薬剤耐性に関与するプラスミド水平伝達について研究を実施した。さらに、ベトナムの食肉からプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-3* を保有数する大腸菌を分離し、遺伝子解析を行なった。以下に得られた知見を示す。

1. ベトナムに流通する食肉や魚介類はスルファメサジンをはじめとしたサルファ剤やキノロン系抗菌性物質、チルミコシン等のマクロライド系抗菌性物質が高頻度で残留していることを明らかにした。また、スルファクロジンは、近年日本での使用実績はなく、中国で製造されたものが、ベトナムで使用され流通していることが判明した。また、鶏卵の抗菌性物質残留実態も明らかにし、多くの国で禁止されている採卵期での抗菌性物質の使用が疑われる結果も得られた。ベトナムでの耐性菌発生抑制のためには、喫緊に食品中残留抗菌性物質監視体制を強化する必要がある。

2. ベトナム国内で流通する食肉及び魚介類の耐性菌汚染実態調査の結果、サンプル数330検体中150検体からESBL/AmpC産生大腸菌が検出された。これにより、ベトナムの食品は抗菌性物質とともに耐性菌による汚染が深刻であることが明らかになった。残留抗菌性物質分析を行った食肉お

よび魚介類130検体から分離した耐性菌285株の感受性試験結果と残留抗菌性物質の検出の有無での相関を確認した。その結果、シプロフロキサシン耐性については残留抗菌性物質との関与が示唆された。また、シプロフロキサシンを添加したプラスミド水平伝達試験において一定濃度でプラスミドの水平伝達が促進される可能性が示唆された。しかし、ESBL/AmpC産生大腸菌と食品中の残留抗菌性物質の因果関係を明らかにすることはできなかった。

3. ベトナムの食品から分離したESBL産生菌の24%からコリスチン耐性大腸菌が分離された。多くは*mcr-1*を持っていたが、豚肉由来の3株については*mcr*-3を有することが判明した。これは、初めて中国で報告された*mcr-3*の配列とは類似しており、中国で発生した*mcr-3*を有するコリスチン耐性菌もしくはプラスミドの水平伝達を介して、ベトナムをはじめ東南アジアに拡散し、世界各国に拡散している可能性が考えられた。今後も拡散が懸念されるコリスチン耐性菌のモニタリングを実施することでコリスチン耐性菌の蔓延防止につながると考えられた。

以上の研究結果から、ベトナムでは、抗菌性物質が残留した食肉・魚介類や鶏卵が多く流通している実態が明らかとなった。これは多くの食品を輸入に頼る日本にとって大きなリスクとなる可能性が考えられた。また耐性菌の実態調査において、食肉・魚介類から高頻度で ESBL/AmpC 産生大腸菌が検出された。さらに ESBL/AmpC 産生大腸菌の 24%でコリスチン耐性を示し、ベトナムの豚

肉からは初めて *mcr-3* を検出した。このように ESBL/AmpC 産生大腸菌とコリスチン耐性を併せ持つ耐性菌がベトナムでは拡散している実態が明らかとなった。*mcr-3* を詳細な解析を行なった結果から、コリスチン耐性菌は中国からベトナムをはじめとして東南アジアに拡散し、世界中に拡散したと考えられた。耐性菌の拡散は世界各国で喫緊の問題として取り上げられており、食肉の残留抗菌性物質分析と耐性菌研究を進めていくことは、食品を介した耐性菌の発生・拡散を抑制できる可能性があると考えている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始示唆に富むご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科応用環境生物学分野　教授　平田收正先生に謝意を表します。また、本論文を審査頂き、ご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科　教授　高木達也先生、大阪大学産業科学研究所　教授　西野邦彦先生に感謝申し上げます。本研究を遂行するあたり、終始熱心なご指導、ご助力を賜りました大阪大学大学院薬学研究科応用環境生物学分野　特任准教授 原田和生先生に深く感謝申し上げます。

併せて、本研究の遂行にあたり、ご理解、ご助力、励ましを賜りました大阪大学　名誉教授　山本容正先生、准教授　住村欣範准先生、特任准教授　中村昇太先生、特任助教　元岡大祐先生、助教　一條知昭先生、照屋志帆乃氏、大阪府立大学　教授　山崎伸二先生、准教授　日根野谷淳先生、客員教授　久米田裕子先生、琉球大学　教授　平井到先生、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課　河合高生主幹研究員、河原隆二主任研究員、神吉政史主任研究員、原田哲也主任研究員、余野木伸哉研究員、研究企画課　起橋雅浩課長、食品化学1課　梶村計志課長、小西良昌主任研究員、内田耕太郎主任研究員、国立医薬品食品衛生研究所　中山達哉先生、神奈川県衛生研究所　陣内理生先生、ベトナム国立ホーチミン市衛生研究所　Nguyen Do Phuc先生、Nguyen Duc Thinh先生、Ngoc Do Hoang Mai先生、Bui Thi Long先生に厚く御礼申し上げます。さらに地球規模課題対応国際科学技術協力（SATREPS）の「薬

剤耐性細菌発生機構の解明と食品管理における耐性菌モニタリングシステムの開発」においてJICA専門員として、研究活動の遂行に多大な援助をいただきました安藤亥二郎氏に深く御礼申し上げます。

また、在学中常に温かく迎え入れて頂きました大阪大学大学院薬学研究科応用環境生物学分野の諸氏に感謝致します。

最後に、本研究でベトナムでの研究活動を共にしたベトナム国立ホーチミン市衛生研究所研究員および SATREPS プロジェクト研究員・関係者と、常に精神的な支えであり励みであった家族、友人に感謝致します。

参考文献

1. Merle, R.; Robanus, M.; Hegger-Gravenhorst, C.; Mollenhauer, Y.; Hajek, P.; Käsbohrer, A.; Honscha, W.; Kreienbrock, L. Feasibility study of veterinary antibiotic consumption in Germany-comparison of ADDs and UDDs by animal production type, antimicrobial class and indication. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10* (1), 7.

2. Carrique-Mas, J. J.; Trung, N. V.; Hoa, N. T.; Mai, H. H.; Thanh, T. H.; Campbell, J. I.; Wagenaar, J. A.; Hardon, A.; Hieu, T. Q.; Schultsz, C. Antimicrobial usage in chicken production in the Mekong Delta of Vietnam. *Zoonoses Public Health* **2015**, *62 Suppl 1*, 70–78.

3. Kempf, I.; Jouy, E.; Chauvin, C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48* (6), 598–606.

4. Nguyen, N. T.; Nguyen, H. M.; Nguyen, C. V.; Nguyen, T. V.; Nguyen, M. T.; Thai, H. Q.; Ho, M. H.; Thwaites, G.; Ngo, H. T.; Baker, S.; et al. Use of Colistin and Other Critical Antimicrobials on Pig and Chicken Farms in Southern Vietnam and Its Association with Resistance in Commensal *Escherichia coli* Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82* (13), 3727–3735.

5. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T. R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. 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.

6. Centers for Disease Control and Prevention. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS. **2013**, 1–114.

7. 国立感染症研究所、＜速報＞大阪市内大規模病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の長期間にわたる院内伝播. IASR, **2014**, 35, 290–291.

8. 国立感染症研究所、プラスミド水平伝達が関与した院内感染事例. IASR, **2014**, 35, 289–290.

9. 日本経済新聞、多剤耐性緑膿菌感染症報道、**2014,**

https://www.nikkei.com/article/DGXNASHC06038_W4A100C1AC8000/

10. 朝日新聞デジタル、多剤耐性緑膿菌感染症報道、**2017,** https://www.asahi.com/articles/ASKBW5SKBKBWUDCB01C.html

11. World Health Organization, One Health, http://www.who.int/features/qa/one-health/en/

12. Van Boeckel, T. P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A.; Robinson, T. P.; Teillant, A.; Laxminarayan, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (18), 5649–5654.

13. Nakayama, T.; Ueda, S.; Huong, B. T. M.; Tuyen, L. D.; Komalamisra, C.; Kusolsuk, T.; Hirai, I.; Yamamoto, Y. Wide dissemination of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in community residents in the Indochinese peninsula. *Infect Drug Resist* **2015**, *8*, 1–5.

14. 山口貴弘、柿本健作、永吉晴奈、山口瑞香、起橋雅浩、梶村計志、山本容正、分散固相および固相カートリッジカラムを用いた LC-MS/MS による食肉中の動物用医薬品一斉分析法、食品衛生学雑誌、**2013**, *54* (4), 290–297.

15. Yamaguchi, T.; Okihashi, M.; Harada, K.; Uchida, K.; Konishi, Y.; Kajimura, K.; Hirata, K.; Yamamoto, Y. Rapid and easy multiresidue method for the analysis of antibiotics in meats by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (21), 5133–5140.

16. Uchida, K.; Konishi, Y.; Harada, K.; Okihashi, M.; Yamaguchi, T.; Do, M. H. N.; Thi Bui, L.; Duc Nguyen, T.; Do Nguyen, P.; Thi Khong, D.; et al. Monitoring of Antibiotic Residues in Aquatic Products in Urban and Rural Areas of Vietnam. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (31), 6133–6138.

17. Yamaguchi, T.; Okihashi, M.; Harada, K.; Konishi, Y.; Uchida, K.; Do, M. H. N.; Bui, L. T.; Nguyen, T. D.; Phan, H. B.; Bui, H. D. T.; et al. Detection of antibiotics in chicken eggs obtained from supermarkets in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J. Environ. Sci. Health, Part B.* **2017**, *52* (6), 430–433.

18. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインにつ

いて、平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号

19. AOAC International. Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals; Rockville, MD, USA, 2012; pp 1−32

20. Council of the European Union. *Commission Staff Working Document on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2012 （Council Directive 96/23/EC）*; 2014; pp 1–279.

21. 大阪府立公衆衛生研究所年報 (2009–2013) http://www.iph.pref.osaka.jp/report/report.html

22. Matsuzawa, T.; Kitano, N. Studies on the mode of action of sulfachloropyrazine against coccidia in chickens. *Jpn. Poult. Sci.* **1974**, *11*, 75–85.

23. Caldwell, W. T.; Kornfeld, E. C.; Donnell, C. K. Substituted 2-Sulfanilamidopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63* (8), 2188–2190.

24. Buur, J.; Baynes, R.; Smith, G.; Riviere, J. Use of probabilistic modeling within a physiologically based pharmacokinetic model to predict sulfamethazine residue withdrawal times in edible tissues in swine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50* (7), 2344–2351.

25. Managaki, S.; Murata, A.; Takada, H.; Tuyen, B. C.; Chiem, N. H. Distribution of Macrolides, Sulfonamides, and Trimethoprim in Tropical Waters: Ubiquitous Occurrence of Veterinary Antibiotics in the Mekong Delta. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (23), 8004–8010.

26. Shimizu, A.; Takada, H.; Koike, T.; Takeshita, A.; Saha, M.; Rinawati; Nakada, N.; Murata, A.; Suzuki, T.; Suzuki, S.; et al. Ubiquitous occurrence of sulfonamides in tropical Asian waters. *Sci. Total Environ.* **2013**, *452-453*, 108–115.

27. Łebkowska-Wieruszewska, B.; Kowalski, C. J. Residue depletion of sulfachlorpyrazine in edible tissues of broiler chickens. *Food Addit. Contam. Part A* **2013**, *30* (2), 272–277.

28. Łebkowska-Wieruszewska, B. I.; Kowalski, C. J. Sulfachlorpyrazine residues depletion in turkey edible tissues. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2010**, *33*, 389–395.

29. Korsrud, G. O.; Papich, M. G.; Fesser, A. C.; Salisbury, C. D.; MacNeil, J. D. Residue depletion in tissues and fluids from swine fed sulfamethazine, chlortetracycline and penicillin G in combination. *Food Addit. Contam.* **1996**, *13* (3), 287–292.

30. 住村欣範、農家の屋敷地から見たベトナムにおけるフード・セキュリティの歴史的見取り図、GLOCOL ブックレット. 3, **2010**, 95–105

31. Sasaki, T.; Hirai, I.; Niki, M.; Nakamura, T.; Komalamisra, C.; Maipanich, W.; Kusolsuk, T.; Sa-Nguankiat, S.; Pubampen, S.; Yamamoto, Y. High prevalence of CTX-M beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2010**, *65* (4), 666–668.

32. Luvsansharav, U.-O.; Hirai, I.; Niki, M.; Sasaki, T.; Makimoto, K.; Komalamisra, C.; Maipanich, W.; Kusolsuk, T.; Sa-Nguankiat, S.; Pubampen, S.; et al. Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in asymptomatic individuals in rural Thailand. *J. Med. Microbiol.* **2011**, *60* (Pt 5), 619–624.

33. Carattoli, A. Plamids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* **2013**, *303* (6-7), 298–304.

34. Mahillon, J.; Chandler, M. Insertion Sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62* (3), 725–774.

35. Nguyen, D. P.; Nguyen, T. A. D.; Le, T. H.; Tran, N. M. D.; Ngo, T. P.; Dang, V. C.; Kawai, T.; Kanki, M.; Kawahara, R.; Jinnai, M.; et al. Dissemination of Extended-Spectrum β-Lactamase- and AmpC β-Lactamase-Producing Escherichia coli within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. *Biomed Res Int* **2016**, (1), 1–9.

36. Kawahara, R.; Seto, K.; Taguchi, M.; Nakajima, C.; Kumeda, Y.; Suzuki, Y. Characterization of Third-Generation-Cephalosporin-Resistant Shiga Toxin-Producing Strains of Escherichia coli O157:H7 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53* (9), 3035–3038.

37. Ihara, M.; Oda, Y.; Yamamoto, K. Convenient construction of strains useful for transducing *recA* mutations with bacteriophage P1. *FEMS Microbiol Lett* **1985**, *30* (1-2), 33–35.

38. Chakrabarti, S. L.; Gorini, L. A link between streptomycin and rifampicin mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, *72* (6), 2084–2087.

39. Maiden, M. C. J. Horizontal Genetic Exchange, Evolution, and Spread of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *27* (s1), S12–S20.

40. Mazel, D.; Davies, J. Antibiotic resistance in microbes. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56* (9-10), 742–754.

41. Andersson, D. I.; Hughes, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12* (7), 465–478.

42. Aminov, R. I. Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Front Microbiol* **2011**, *2*, 158.

43. Stevens, A. M.; Shoemaker, N. B.; Li, L. Y.; Salyers, A. A. Tetracycline regulation of genes on *Bacteroides* conjugative transposons. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (19), 6134–6141.

44. Shoemaker, N. B.; Salyers, A. A. Tetracycline-dependent appearance of plasmidlike forms in *Bacteroides* uniformis 0061 mediated by conjugal *Bacteroides* tetracycline resistance elements. *J. Bacteriol.* **1988**, *170* (4), 1651–1657.

45. Salyers, A. A.; Shoemaker, N. B.; Li, L. Y. In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (20), 5727–5731.

46. Whittle, G.; Shoemaker, N. B.; Salyers, A. A. Characterization of genes involved in modulation of conjugal transfer of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (14), 3839–3847.

47. Beaber, J. W.; Hochhut, B.; Waldor, M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **2004**, *427* (6969), 72–74.

48. Johnson, T. J.; Singer, R. S.; Isaacson, R. E.; Danzeisen, J. L.; Lang, K.; Kobluk, K.; Rivet, B.; Borewicz, K.; Frye, J. G.; Englen, M.; et al. In vivo transmission of

an IncA/C plasmid in *Escherichia coli* depends on tetracycline concentration, and acquisition results in variable cost of fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, AEM.04193–14.

49. Schuurmans, J. M.; van Hijum, S. A. F. T.; Piet, J. R.; Händel, N.; Smelt, J.; Brul, S.; Kuile, ter, B. H. Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains. *Plasmid* **2014**, *72* (C), 1–8.

50. Zhang, P.-Y.; Xu, P.-P.; Xia, Z.-J.; Wang, J.; Xiong, J.; Li, Y.-Z. Combined treatment with the antibiotics kanamycin and streptomycin promotes the conjugation of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **2013**, *348* (2), 149–156.

51. 小山, 康.; 黒沢, 秋.; 土屋, 厚. 土壌有芽胞細菌の生産する1新抗菌性物質 Colistin に就いて. *ペニシリンその他抗生物質* ***1950,*** *3* (7), 457–458.

52. Roschanski, N.; Falgenhauer, L.; Grobbel, M.; Guenther, S.; Kreienbrock, L.; Imirzalioglu, C.; Roesler, U. Retrospective survey of *mcr-1* and *mcr-2* in German pig-fattening farms, 2011–2012. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50* (2), 266–271.

53. Tada, T.; Nhung, P. H.; Shimada, K.; Tsuchiya, M.; Phuong, D. M.; Anh, N. Q.; Ohmagari, N.; Kirikae, T. Emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates harboring *mcr-1* in Vietnam. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *63*, 72–73.

54. Ohsaki, Y.; Hayashi, W.; Saito, S.; Osaka, S.; Taniguchi, Y.; Koide, S.; Kawamura, K.; Nagano, Y.; Arakawa, Y.; Nagano, N. First detection of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* gene from retail domestic chicken meat in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2017**, *70* (5), 590–592.

55. Chiou, C.-S.; Chen, Y.-T.; Wang, Y.-W.; Liu, Y.-Y.; Kuo, H.-C.; Tu, Y.-H.; Lin, A.-C.; Liao, Y.-S.; Hong, Y.-P. Dissemination of *mcr-1*-Carrying Plasmids among Colistin-Resistant *Salmonella* Strains from Humans and Food-Producing Animals in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (7), e00338–17–4.

56. Irrgang, A.; Roschanski, N.; Tenhagen, B.-A.; Grobbel, M.; Skladnikiewicz-Ziemer, T.; Thomas, K.; Roesler, U.; Käsbohrer, A. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010-2015. *PLoS ONE* **2016**, *11* (7),

e0159863.

57. Xavier, B. B.; Lammens, C.; Ruhal, R.; Kumar-Singh, S.; Butaye, P.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* **2016**, *21* (27), 161.

58. Yin, W.; Li, H.; Shen, Y.; Liu, Z.; Wang, S.; Shen, Z. *Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in Escherichia coli. MBio. 2017; 8 (3): e00543-17.*

59. Carattoli, A.; Villa, L.; Feudi, C.; Curcio, L.; Orsini, S.; Luppi, A.; Pezzotti, G.; Magistrali, C. F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in Salmonella and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* **2017**, *22* (31), 30589.

60. Borowiak, M.; Fischer, J.; Hammerl, J. A.; Hendriksen, R. S.; Szabo, I.; Malorny, B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica serovar Paratyphi B*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, 72 (12), 3317–3324

61. Pham Thanh, D.; Thanh Tuyen, H.; Nguyen Thi Nguyen, T.; Chung The, H.; Wick, R. R.; Thwaites, G. E.; Baker, S.; Holt, K. E. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese Shigella sonnei isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (8), 2314–2317.

62. Rhouma, M.; Beaudry, F.; Thériault, W.; Letellier, A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol* **2016**, *7* (551), 1789.

63. Falagas, M. E.; Rafailidis, P. I. Re-emergence of colistin in today's world of multidrug-resistant organisms: personal perspectives. *Expert Opin Investig Drugs* **2008**, *17* (7), 973–981.

64. Gao, R.; Hu, Y.; Li, Z.: Sun, J.; Wang, Q.; Lin, J.; Ye, H.; Liu, F.; Srinivas, S.; Li, D.; Zhu, B.; Liu, YH.; Tian, GB.; Feng, Y. Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*(11), e1005957

65. Wang, Y.; Zhang, R.; Li, J.; Wu, Z.; Yin, W.; Schwarz, S.; Tyrrell, J. M.; Zheng,

Y.; Wang, S.; Shen, Z.; et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol* **2017**, 1–7.

66. Liu, B.-T.; Song, F.-J.; Zou, M.; Zhang, Q.-D.; Shan, H. High Incidence of Escherichia coli Strains Coharboring *mcr-1* and bla_{NDM} from Chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (3), e02347–16–7.

67. Kong, L.-H.; Lei, C.-W.; Ma, S.-Z.; Jiang, W.; Liu, B.-H.; Wang, Y.-X.; Guan, R.; Men, S.; Yuan, Q.-W.; Cheng, G.-Y.; et al. Various Sequence Types of Escherichia coli Isolates Coharboring bla_{NDM-5} and *mcr-1* Genes from a Commercial Swine Farm in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (3), e02167–16.

68. Nakayama, T.; Jinnai, M.; Kawahara, R.; Diep, K. T.; Thang, N. N.; Hoa, T. T.; Hanh, L. K.; Khai, P. N.; Sumimura, Y.; Yamamoto, Y. Frequent use of colistin-based drug treatment to eliminate extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in backyard chicken farms in Thai Binh Province, Vietnam. *Trop Anim Health Prod* **2017**, *49* (1), 31–37.

69. Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33* (9), 2233–2239.

70. Barton, B. M.; Harding, G. P.; Zuccarelli, A. J. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* **1995**, *226* (2), 235–240.

71. Carattoli, A.; Zankari, E.; García-Fernández, A.; Voldby Larsen, M.; Lund, O.; Villa, L.; Møller Aarestrup, F.; Hasman, H. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (7), 3895–3903.

72. Sugawara, H.; Ohyama, A.; Mori, H.; Kurokawa, K. Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) for diverse users. *S001-1–2. Abstr. 20th Int. Conf*; Genome Inform. (GIW2009), 2009.

73. Alikhan, N.-F.; Petty, N. K.; Ben Zakour, N. L.; Beatson, S. A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* **2011**,

12 (1), 402.

74. Larsen, M. V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R. L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontén, T.; Ussery, D. W.; Aarestrup, F. M.; et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50* (4), 1355–1361.

75. Shen, Z.; Wang, Y.; Shen, Y.; Shen, J.; Wu, C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis* 2016, *16* (3), 293.

76. Haenni, M.; Métayer, V.; Gay, E.; Madec, J.-Y. Increasing trends in *mcr-1* prevalence among ESBL-producing *E. coli* in French calves despite decreasing exposure to colistin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, AAC.01147–16–9.

77. Zhou, H.-W.; Zhang, T.; Ma, J.-H.; Fang, Y.; Wang, H.-Y.; Huang, Z.-X.; Wang, Y.; Wu, C.; Chen, G.-X. Occurrence of Plasmid- and Chromosome-encoded *mcr-1* in Water-borne *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, AAC.00017–17–29.

78. Yassin, A. K.; Zhang, J.; Wang, J.; Chen, L.; Kelly, P.; Butaye, P.; Lu, G.; Gong, J.; Li, M.; Wei, L.; et al. Identification and characterization of *mcr* mediated colistin resistance in extraintestinal *Escherichia coli* from poultry and livestock in China. *FEMS Microbiol Lett* **2017**, *364* (24).

79. Yang, Y.-Q.; Li, Y.-X.; Song, T.; Yang, Y.-X.; Jiang, W.; Zhang, A.-Y.; Guo, X.-Y.; Liu, B.-H.; Wang, Y.-X.; Lei, C.-W.; et al. Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Its Variant in *Escherichia coli* Isolates from Chickens in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (5), e01204–16–5.

80. Wang, Y.; Tian, G.-B.; Zhang, R.; Shen, Y.; Tyrrell, J. M.; Huang, X.; Zhou, H.; Lei, L.; Li, H.-Y.; Doi, Y.; et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* **2017**, *17* (4), 390–399.

81. Al-Tawfiq, J. A.; Laxminarayan, R.; Mendelson, M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *54*, 77–84.

82. Tada, T.; Uechi, K.; Nakasone, I.; Shimada, K.; Nakamatsu, M.; Kirikae, T.; Fujita, J. Emergence of a colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harboring *mcr-1* in Japan. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, 63, 21–22.

83. Doumith, M.; Godbole, G.; Ashton, P.; Larkin, L.; Dallman, T.; Day, M.; Day, M.; Muller-Pebody, B.; Ellington, M. J.; de Pinna, E.; et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella* entericaand *Escherichia coli* in England and Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (8), 2300–2305.

84. Haenni, M.; Beyrouthy, R.; Lupo, A.; Châtre, P.; Madec, J.-Y.; Bonnet, R. Epidemic spread of *Escherichia coli* ST744 isolates carrying *mcr-3* and blaCTX-M-55 in cattle in France. *J. Antimicrob. Chemother* **2017**. DOI: 10.1093/jac/dkx418.

85. Hernández, M.; Iglesias, M. R.; Rodríguez-Lázaro, D.; Gallardo, A.; Quijada, N.; Miguela-Villoldo, P.; Campos, M. J.; Píriz, S.; López-Orozco, G.; de Frutos, C.; et al. Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Euro Surveill.* **2017**, *22* (31), 30586.

86. Roer, L.; Hansen, F.; Stegger, M.; Sönksen, U. W.; Hasman, H.; Hammerum, A. M. Novel *mcr-3* variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. *Euro Surveill.* **2017**, *22* (31).

87. McGann, P.; Snesrud, E.; Maybank, R.; Corey, B.; Ong, A. C.; Clifford, R.; Hinkle, M.; Whitman, T.; Lesho, E.; Schaecher, K. E. Escherichia coli Harboring *mcr-1* and bla_{CTX-M} on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (7), 4420–4421.

88. Xia, S.; Fan, X.; Huang, Z.; Xia, L.; Xiao, M.; Chen, R.; Xu, Y.; Zhuo, C. Dominance of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China. *PLoS ONE* **2014**, *9* (7), e100707.

89. Liao, X.-P.; Xia, J.; Yang, L.; Li, L.; Sun, J.; Liu, Y.-H.; Jiang, H.-X.

Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. *Front Microbiol* **2015**, *6* (e105016), 1136.

90. Livermore, D. M.; Cantón, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G. M.; Arlet, G.; Ayala, J.; Coque, T. M.; Kern-Zdanowicz, I.; Luzzaro, F.; et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59* (2), 165–174.

91. Anjum, M. F.; Duggett, N. A.; AbuOun, M.; Randall, L.; Nunez-Garcia, J.; Ellis, R. J.; Rogers, J.; Horton, R.; Brena, C.; Williamson, S.; et al. Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016, *71* (8), 2306–2313.

92. Shepard, S. M.; Danzeisen, J. L.; Isaacson, R. E.; Seemann, T.; Achtman, M.; Johnson, T. J. Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2012, *194* (2), 395–405.

93. Snesrud, E.; Ong, A. C.; Corey, B.; Kwak, Y. I.; Clifford, R.; Gleeson, T.; Wood, S.; Whitman, T. J.; Lesho, E. P.; Hinkle, M.; et al. Analysis of Serial Isolates of *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* Reveals a Highly Active IS *Apl1*Transposon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (5), e00056–17–10.

94. Matamoros, S.; van Hattem, J. M.; Arcilla, M. S.; Willemse, N.; Melles, D. C.; Penders, J.; Vinh, T. N.; Thi Hoa, N.; COMBAT consortium; de Jong, M. D.; et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 15364.

95. Kawanishi, M.; Abo, H.; Ozawa, M.; Uchiyama, M.; Shirakawa, T.; Suzuki, S.; Shima, A.; Yamashita, A.; Sekizuka, T.; Kato, K.; et al. 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.