

[技術資料]

動物用医薬品の休薬期間の計算手順（その2）
—最大許容濃度の上限の算出—

小池良治、大森純一、山田安里沙、赤間亮子、江口 郁

(平成30年7月31日受付、平成30年10月2日受理)

[TECHNICAL REPORT]

Procedure for Calculation of a Withdrawal Period of Veterinary Drugs (Part 2)
– Calculation of a 95% confidence intervals for the upper one-sided tolerance limit on given
99% of the population –

Ryoji KOIKE, Junichi OHMORI, Arisa YAMADA, Ryoko AKAMA, Kaoru EGUCHI

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan

(Received: 31th Jul 2018; Accepted: 2nd Oct 2018)

Abstract

We already reported a calculation procedure of the withdrawal period of veterinary drugs in Japan by using hypothetical data. In the calculation procedure, we need to use a “noncentral t-distribution” to estimate of a “confidence intervals for the upper one-sided tolerance limit on given higher percentiles of the population (UTL)”. The usage of a “noncentral t-distribution” is complicated and difficult. However, it is easy to estimate a "UTL" by “software-based workbook for statistical evaluation of residue depletion data for veterinary drugs” shared by JECFA.

Therefore, this paper describes a estimation procedures of the "UTL" by workbook.

要旨

以前の我々は、仮想データを用いて日本での統計学的解析による休薬期間の計算手順を報告した。その計算手順では、最大許容濃度の上限を算出するために非心t分布を算出していたが、その算出方法は煩雑である。しかし、JECFAが公表している残留データの統計学的評価のためのワークブックを利用することにより、非心t分布を算出せずに、容易に最大許容濃度を算出することができることから、その方法を紹介する。

I 緒言

動物用医薬品の休薬期間の計算手順については、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて」の別添2の14の14-6「動物用医薬品の休薬期

間設定のための統計学的解析」(以下「通知」という。)に示されている(農林水産省 2000)。通知には仮想データや計算例が示されていないため、以前我々は、通知を補完し、申請者が容易に休薬期間を計算できるように、仮想データを用いた計算例により、通知に従って休薬期間計算するための具体的手順(以下「以前の計算手順」という。)を紹介したところである(小池ら 2008)。

以前の計算手順では、最大許容濃度の上限を算出するために、通知に従い、非心度 d の t 分布での上側 95% 点の値(以下「非心 t 分布値」という。)を求めている。しかし、表計算ソフトとして多用されている Microsoft Office Excel(以下「エクセル」という。)にはこの値を求めるための関数はないため、統計数値表 JSA-1972 の値(日本規格協会 1972)を用いて比例補間(2つの数値の間が比例関係にあると仮定してその間の数値を推測すること)によりこの値を求める方法を紹介したが、その計算手順は煩雑である。

一方、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(以下「JECFA」という。)では、エクセルのワークブック(Software-based workbook for statistical evaluation of residue depletion data for veterinary drugs. 以下「JECFA ワークブック」という。)を、第 66 回会合(2006 年 2 月開催)で、残留基準値作成の際の残留減衰データの統計学的評価に妥当なものとし、公表している(JECFA)。JECFA ワークブックでは、近似式を用いて非心 t 分布値を求めることなく、最大許容濃度の上限を求めている。

そこで、本資料では、通知の計算手順とは若干異なるが、容易に最大許容濃度の上限を算出することができる、JECFA ワークブックの計算式を利用する方法を紹介する。

なお、本資料は、以前の計算手順を補完するものであることから、本資料を利用する際には、通知及び以前の計算手順も参照されたい。

II JECFA ワークブックの計算式

最大許容濃度の上限を算出するための計算式は以下のとおりである。

$$\hat{y} = a_{yx} + b_{yx}x + k_T s_{yx} \text{ 最大}$$

\hat{y} : 最大許容濃度の上限(通知では $Y(t_i)$)

a_{yx} : 切片(通知では a)

b_{yx} : 直線回帰係数(通知では b)

x : 時点(通知では t_i)

s_{yx} : 直線の誤差分散の平方根(通知では s)

$$k_T = \frac{\sqrt{2n-4}}{(2n-4)-u_{1-\alpha}^2} (\sqrt{2n-4}u_{1-\gamma} + u_{1-\alpha}W_n) \text{ (通知では } k)$$

$$W_n = \sqrt{u_{1-\gamma}^2 + ((2n-4) - u_{1-\alpha}^2) \left(\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_x} \right)}$$

n : 全データ数(通知では N)

$u_{1-\alpha}$: 標準正規分布の上側 100 $(1-\alpha)$ % 点の値
(95 % 点の値: 1.6448 を使用)

$u_{1-\gamma}$: 標準正規分布の上側 100 $(1-\gamma)$ % 点の値
(99 % 点の値: 2.3264 を使用)

\bar{x} : 採材時間の総平均(通知では $t_{..}$)

S_x : 採材時間の偏差平方和(通知では Stt)

Ⅲ 計算式を利用したエクセルでの計算

Ⅱの計算式をエクセルの関数等を利用して計算する場合には、以下のような手順で式を作成する。なお、数値については、以前の計算手順で計算済のものを使用した。また、末尾の（ ）内は、セル番地を示すものとする（図参照）。

以前の計算手順で計算済の数値を入力

$$a_{yx} \text{ (a)} = 2.321 \text{ (B2)}$$

$$b_{yx} \text{ (b)} = -2.172 \text{ (B3)}$$

$$s_{yx} \text{ (s)} = 0.805 \text{ (B4)}$$

$$n \text{ (N)} = 9 \text{ (B5)}$$

$$\bar{x} \text{ (t..)} = 2.000 \text{ (B6)}$$

$$S_x \text{ (Stt)} = 6 \text{ (B7)}$$

① k_T 及び W_n 算出用の「 $2n-4$ 」を求める計算式

$$= 2 * B5 - 4 \text{ (B8)}$$

② W_n を求める計算式（時点 x 1 (B15) の値）

$$W_n = \sqrt{u_{1-\gamma}^2 + ((2n-4) - u_{1-\alpha}^2) \left(\frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{S_x} \right)}$$

であることから、

$$= \text{SQRT}(5.41 + (\$B\$8 - 2.706) * (1/\$B\$5 + (\$B15 - \$B\$6)^2 / \$B\$7)) \text{ (B9)}$$

③ k_T を求める計算式（時点 x 1 (B15) の値）

$$k_T = \frac{\sqrt{2n-4}}{(2n-4) - u_{1-\alpha}^2} (\sqrt{2n-4} u_{1-\gamma} + u_{1-\alpha} W_n)$$

であることから、

$$= (\text{SQRT}(\$B\$8) / (\$B\$8 - 2.706)) * (\text{SQRT}(\$B\$8) * 2.326 + 1.645 * B9) \text{ (B10)}$$

④ \hat{y} を求める計算式（時点 x 1 (B15) の値）

$$\hat{y} = a_{yx} + b_{yx}x + k_T s_{yx}$$

であることから、

$$= \$B\$2 + \$B\$3 * B15 + B10 * B4$$

となることから、②及び③と合わせて

$$= \$B\$2 + \$B\$3 * B15 + (\text{SQRT}(\$B\$8) / (\$B\$8 - 2.706)) * (\text{SQRT}(\$B\$8) * 2.326 + 1.645 * (\text{SQRT}(5.41 + (\$B\$8 - 2.706) * (1/\$B\$5 + (\$B15 - \$B\$6)^2 / \$B\$7)))) * \$B\$4$$

以降の得られた \hat{y} を指数変換して実際の濃度とし、残留基準値と比較することについては以前の計算手順に記載していることから省略する。

引用文献

JECFA : Software-based workbook for statistical evaluation of residue depletion data for veterinary drugs (<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/guidelines0/residue-depletion/en/>).

小池良治、水野安晴、小池好子（2008）動物用医薬品の休薬期間の計算手順。動物医薬品検査所年

報 45, 18-29.

日本規格協会（1972）統計数値表 JSA-1972. pp.76, pp.336. 日本規格協会 . 東京 .

農林水産省（2000）農林水産省動物医薬品検査所長通知 12 動薬 A 第 418 号 “医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて”. 平成 12 年 3 月 31 日

	A	B	C
1	項目	値	計算式
2	a_{yx} (a)	2.321	—
3	b_{yx} (b)	-2.172	—
4	s_{yx} (s)	0.805	
5	n (N)	9	—
6	\bar{x} (t..)	2.000	—
7	S_x (Stt)	6	—
8	$2n - 4$	14	=2*B5-4
9	W_n	2.924	=SQRT(5.41+(\$B\$8-2.706)*(1/\$B\$5+(\$B15-\$B\$6)^2/\$B\$7))
10	k_T	4.477	=(SQRT(\$B\$8)/(\$B\$8-2.706))*(SQRT(\$B\$8)*2.326+1.645*B9)
11	\hat{y}	3.752	=\$B\$2+\$B\$3*\$B15+(SQRT(\$B\$8)/(\$B\$8-2.706))*(SQRT(\$B\$8)*2.326+1.645*(SQRT(5.41+(\$B\$8-2.706)*(1/\$B\$5+(\$B15-\$B\$6)^2/\$B\$7))))*\$B\$4
12			
13			
14	時点	値	最大許容濃度の上限
15	x_1	1	3.752
16	x_2	2	1.430
17	x_3	3	-0.592
18	x_4	4	-2.393
19	x_5	5	-4.087
20	x_6	6	-5.729
21	x_7	7	-7.347
22	x_8	8	-8.949
23	x_9	9	-10.543
24	x_{10}	10	-12.132

① c15にc11の式を入力
 ② c15をコピー
 ③ c16からc24までに貼り付け

図 最大許容濃度の上限を求めるためのエクセルのワークシート

[技術資料]

乾乳期用セファゾリン乳房注入剤の残留が疑われる事例における、乳中濃度測定結果

江口 郁、岩附かおり、山本 篤、高橋美幸、水谷まつ枝、小嶋英樹

(受付：平成 30 年 7 月 31 日、受理：平成 30 年 10 月 2 日)

[TECHNICAL REPORT]

Results of cefazolin measurement in milk derived from cow using cefazolin intramammary ointment at non-lactation term, which were suspected the cefazolin residue.

Kaoru EGUCHI¹⁾, Kaori IWATSUKI¹⁾, Atsushi YAMAMOTO²⁾, Yoshiyuki TAKAHASHI¹⁾,
Matsue MIZUTANI³⁾ and Hideki KOJIMA⁴⁾

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan*

(Received: 31th Jul 2018; Accepted: 2nd Oct 2018)

-
- 1) Assay Division II Safety Test Section II
 - 2) Assay division I Viral Assay Section I
 - 3) Planning and Coordination Division Quality Assurance Section
 - 4) Assay division I Technical Support Unit

Abstract

We measured the concentration of cefazolin in the milk derived from the cow administrated a cefazolin intramammary ointment, which reported prolonging the washout period. The measurement methods are based on the official method published by Ministry of Health, Labor and Welfare, and purchased immunochromatograph kit. Over the maximum residue level (0.05ppm) of cefazolin was not detected from any 9 measured samples.

要旨

A 社製乾乳期用セファゾリン乳房注入剤を投与した乳牛において、休薬期間を越えて有効成分が乳中に残留したとの報告を受け、当領域で当該生乳試料中についてセファゾリン濃度の測定を行った。方法は厚生労働省の公定法に準じた方法およびイムノクロマトグラフ (ICG) キットによって行った。その結果、測定を行った 9 試料すべてで残留基準 (0.05ppm) を超える残留は認められなかった。

緒言

乳房炎は平均すると全国で 1 月あたり 34,000 件発生しているとされ、酪農家の損耗も大きな疾病である (齋藤ら 2017)。その治療には抗生物質製剤たる乳房注入剤がよく用いられる。2018 年 7 月

現在、有効成分 10 成分、40 製剤が承認されている（動物用医薬品データベース）。

一般的に同じ有効成分・効能又は効果、投与経路の製剤では先発・後発の関係にあるものが多い。後発品は添加剤を含めた製剤処方はずし先発品と同一ではないが、後発品の承認に際してはガイドラインに従い、先発品との間に一定の基準による生物学的同等性が求められる。薬物動態は製剤設計により変わり得るため、後発品は先発品との生物学的同等性が確保できるような製剤設計が求められている（動物医薬品検査所 2000）。

事情により製剤処方の変更を行う場合においても、変更後においても生物学的同等性が確保されることが当然必要であるが、今般、A 社製乾乳期用セファゾリン乳房注入剤の製剤処方変更により、休薬期間を超えて乳中にセファゾリンの残留が疑われた事例に対し、当領域において当該乳サンプル中のセファゾリン濃度の測定を行ったので、その考察とともに報告する。

材料及び方法

1. 試料

国内酪農場において、A 社製乾乳期用セファゾリン乳房注入剤を使用した牛の分娩後の乳汁検査において、従来より長い抗菌性物質の残留が認められたとの情報があり、抗菌性物質が認められるとする乳 9 試料を入手して被験試料とした。対照試料として同農場で製剤を投与していないとされる牛由来の乳（A コントロール 5 試料）及び A 社から分与を受けた、セファゾリン乳房注入剤を投与した履歴がない牛由来とされる乳（B コントロール 4 試料）を用いた。なお、本稿には詳説しないが、添加回収試験など試験法確立のための試料は、市販の低温殺菌牛乳（分注後 -80℃にて保管のもの）を用いた。

	試料数	由来
被験試料	9	休薬期間を超えて残留が疑われた試料
A コントロール	5	被験試料と同じ酪農場で製剤を投与していない牛由来の試料
B コントロール	4	別の酪農場で製剤を投与していない牛由来の試料

2. ICG による測定

SNAP® ベータ・ラクタム ST テストキット（アイデックス・ラボラトリーズ株式会社製 ロット番号 JN622）を用いた。操作は取扱説明書に従った。1 試料につき 2 回繰り返して再現性を確認した。

本法による被験試料の測定は、分与された 9 件のうち、試料量の制限から 1～5 番及び 9 番について行った。

3. 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）による測定

測定法は厚生労働省の通知法（厚生労働省 2005）（以下「公定法」とする。）に準じて前処理を行い、LC-MS/MS（LC:LC-20 シリーズ（島津製作所製）、MS/MS:4000QTRAP（エービーサイエックス社製））により定量した。以下に使用した試薬・試液等及び LC-MS/MS の条件を示す。

1) 使用試薬等

セファゾリンナトリウム標準品：富士フィルム和光純薬工業製 Lot. DSF3935、含量 99.3 %

アセトニトリル：LC/MS グレード（富士フィルム和光純薬工業製）

水（移動相）：LC/MS グレード（富士フィルム和光純薬工業製）

水（その他）：超純水（メルクミリポア社製 Simplicity® UV により用時製造）

メタノール：HPLC グレード（富士フィルム和光純薬工業製）

メタリン酸：試薬特級（富士フィルム和光純薬工業製）

ギ酸：LC/MS グレード（富士フィルム和光純薬工業製）

けい藻土：化学用（富士フィルム和光純薬工業製）

ジビニルベンゼン -N- ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（60 mg）：Oasis HLB 60 mg 3 cc（Waters 社製）

2) LC-MS/MS

分離カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（ハイブリッド） 粒子径 3 μm 内径 2.1 mm 長さ 100 mm（Atlantis dC18 Waters 社製 Lot. 0114343311）

試料注入量 2 μL

カラム温度 40℃

移動相 A:0.01% ギ酸水溶液 B: アセトニトリル

流速 0.2 mL/min

グラジエント条件 (B: %) 0.0 min 5% → 20.0 min 50% → 25.0 min 50% → 25.1 min 5%

30 min/cycle

イオン化モード ESI (+)

質量分析計の形式 MS/MS（四重極 - コリジョンセル - 四重極）

検出イオン

プリカーサーイオン /		
プロダクトイオン (m/z)	コリジョンエネルギー (V)	コリジョンセル出口電圧 (V)
455/323 (定量イオン)	17	18
455/156 (確認イオン)	23	12

添加回収試験は3人が同時に各々2試料（すべて同じBコントロール（サンプル番号1）を使用、添加濃度0.2 ppm）の試験を行い、うち2人は標準品を添加しない試料（ブランク）を同時に各々1試験行った。ブランクからセファゾリンが検出されたため、回収率の算出時はブランク2試験の平均値を測定値から差し引いた。

被験試料及び各コントロールの測定は各々1回行い、1回の試験では1試料を2人が同時に1回ずつ前処理・測定を行って2人分の測定値を平均して測定結果とした。

なお、LC-MS/MSにおける測定は1本のLC-MS/MS試料につき2回行っているが、試験結果としては1回目の測定値を用いている。これは、サンプルラックは4℃に冷却しているが、1回の測定に30分を要することからバリデーションサンプルを挟んだ測定時間は合計数時間～十数時間を要し、セファゾリンが時間経過に伴って分解し2回目の測定値が減少する恐れが否定できなかったことから、2回の測定値を平均するよりも1回目の測定値のみを採用する方が妥当であると判断したためである。2回目の測定値は、1回目の測定値に外れ値などの異常がないことを確認するための参照値として用いた。

検量線はあらかじめセファゾリンとして 100 mg/L を含有するメタノール溶液（標準原液）を調製し、1 回使用量ごとに分注して -80℃ で保管し、この標準原液を水及びメタノール（7：3）混液で階段希釈したものを用いて調製した。調製濃度は 0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05（各 mg/L）とし、必要に応じて 0.1 mg/L を追加した。

実験成績

LC-MS/MS の試験において、添加回収試験における平均回収率は 95.4 %、相対標準偏差は 1.71 % (n=6) であった。

標準品（水及びメタノール（7：3）混液）と試料溶液のクロマトグラム保持時間、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンを比較したところ、被験試料、A コントロール及び B コントロールの全てから標準品と一致するピークを検出した。検量線は 0.0005 mg/L ～ 0.05 mg/L の範囲で直線性を示した (n=5 $r^2=1.0000$)。定量限界 (S/N=10) は 0.002 mg/kg であった。なお、公定法としての定量限界は 0.01 mg/kg とされている。検出限界は 0.0004 mg/kg であった (S/N=3)。

添加回収試験においては、3 人 × 2 試料の 6 試料の平均回収率は 94 %、標準偏差は 7.6 %、数値範囲は添加濃度の 89 ～ 109 % であり、試験系は妥当であると判断し、試験者間の差も無視できると判断した。

測定値は以下の通り。なお、乳中のセファゾリンの残留基準：0.05 mg/kg である。

被験試料

サンプル番号	測定値 (mg/kg)		ICG による測定結果
	平均値 (n=2)	実測値範囲	
1	0.0022*	0.0019-0.0025	-
2	0.023	0.021-0.025	+
3	0.021	0.020-0.022	+
4	0.015	0.014-0.015	+
5	0.047	0.046-0.049	+
6	0.038	0.037-0.039	n.t.
7	0.019	0.018-0.021	n.t.
8	0.048	0.047-0.049	n.t.
9	0.023	0.023-0.024	+

(+: 陽性 -: 陰性 n.t.: 測定せず)

A コントロール

サンプル番号	測定値 (mg/kg)	
	平均値 (n=2)	実測値
1	0.00056*	0.00052-0.00060
2	0.00049*	0.00044-0.00054
3	0.0019*	0.0016-0.0021
4	0.00068*	0.00045-0.00090
5	0.00083*	0.00036-0.0013

B コントロール

サンプル番号	測定値 (mg/kg)	
	平均値 (n=2)	実測値
1	0.012	0.012-0.013
2	0.00097*	0.00066-0.0013
3	0.0016*	0.00057-0.0027
4	0.0012*	0.0011-0.0014

*：定量限界未満・検出限界以上 (< 0.002 mg/kg ≥ 0.0004 mg/kg)

考察

LC-MS/MS による測定では、すべての被験試料から残留基準以下・定量限界以上のセファゾリンが検出された。また、すべての対照試料からも検出限界以上のセファゾリンが検出され、1 サンプル (B コントロールのサンプル番号 1) から定量限界を上回る値が観察された。試験者間による結果の差もほとんどなく、質量分析計 2 回の測定でもほぼ同じ結果であったことから、値の信頼性は高いと考えられる。現時点で対照試料からセファゾリンが検出された原因は不明である。なお、値は残留基準以下であることから、法的及び食品安全の観点から問題はないと見られる。他の対照試料中のセファゾリン濃度は定量限界未満であった。

一方、ICG では測定した 6 試料中 5 試料が陽性と判定され、β - ラクタム系の何らかの抗生物質の存在が示唆された。LC-MS/MS による定性結果から、ICG に反応した物質がセファゾリンであったことはほぼ間違いないと考えられる。本キットのセファゾリンの検出感度は示されていないが、ペニシリン G の場合で「検出レベル」は「4 ppb」とされている (使用説明書より)。このため、陽性と判断された検体について、必ずしも残留基準を超える濃度の残留を示唆するものではなく、色調の目視判断によるキットであることから、4 ppb 以下でも陽性と判断されるとはあるものと考察され、LC-MS/MS による結果と矛盾はないと考えられる。

A 社によると、問題となった製剤のロットは、それ以前のロットから基剤の銘柄を変更し、製剤性状の変更を行った製剤であったとのことであった。このような承認範囲内での製剤処方変更は時

折発生する事例であるが、製剤処方変更にあたっては元の製剤との関係において、残留関連を含む生物学的同等性が担保されるべきであり、後発医薬品については先発製剤との生物学的同等性も維持されなくてはならない。この観点において本件の測定結果は全試料の残留濃度が残留基準以下であり、製剤処方変更前の比較データがないことから、その高低についての考察は困難であるが、ICGの成績が示すように、酪農現場で行われる簡易測定等では以前のロットを投与した場合とは異なる薬物動態挙動を示した可能性は考えられる。

動物用医薬品の承認審査制度において、生産物中への動物用医薬品成分の残留を担保する考え方は、ポジティブリスト制度のそれと同様に残留基準を指標とした、食品を介した人の健康に対する安全性を評価指標として用いている。一方、生産現場では必ずしも畜水産物の取引に際して厚生労働省の公定法による測定をもって残留基準に照らした判断が行われているわけではなく、今回用いたICGのような簡易測定など、半定量的な判断も行われているようである（木口 2012）。これはあくまで商取引の条件として行われているものであり、法定基準あるいは食品衛生行政による規制等とは必ずしも関連しないが、法規制を上回る取引要件が実態として存在する場合、製剤処方を検討する際には、承認要件はもとより、それら現場の実態を考慮する必要があるのではないかと考察される。

引用文献

- 木口隆生（2012）生乳の抗生物質検査の世界動向 乳業技術 62, 52-61,
- 厚生労働省（2005）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について（平成 17 年 1 月 24 日 食安発第 0124001 号）（別添）第 3 章 セファゾリン、セファピリン、セファレキシム、セファロニウム、セフォペラゾン及びセフロキシム試験法（畜水産物）
- 齋藤勝宏、芳賀猛、近貞美津子、佐藤秀保、大川愛絵（2017）乳房炎が酪農経営、生乳・乳製品供給に及ぼす影響 畜産の情報 2017.1 54-64.
- 動物用医薬品等データベース http://www.nval.go.jp/asp/asp_dbDR_idx.asp
- 農林水産省動物医薬品検査所（2000）動物医薬品検査所長通知 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて（平成 12 年 3 月 31 日 12 動薬 A 第 418 号 別添 2 の 11 生物学的同等性ガイドライン

[プロジェクト研究終了報告]

動物用幹細胞製品の品質管理手法等に関する研究

能田 健¹、佐藤耕太¹、中島奈緒¹、荻野智絵¹、大石弘司¹、新井克彦²

(受付：平成 30 年 7 月 31 日、受理：平成 30 年 10 月 23 日)

1 動物医薬品検査所再生医療・バイオテクノロジー医薬品チーム

2 東京農工大学農学部付属硬蛋白質利用研究施設

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

Studies on the Quality Control of Stem Cell Product for Veterinary Use

Ken NODA¹, Kota SATO¹, Nao NAKAJIMA¹, Tomoe OGINO¹, Koji OISHI¹, Katsuhiko ARAI¹

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan

(Received: 31th Jul 2018; Accepted: 23th Oct 2018)

1 Regenerative and Biotech-Medicine Team, National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries;

2 Scleroprotein and Leather Research Institute, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

Summary

In this research project, we primarily explored methodologies for the quality control of stem cell product for veterinary use, and secondarily the way to establish technical basis and social foundations required for the proper supply and prudent use of such products.

For the quality control of mesenchymal stem cell (MSC) products, we developed monoclonal antibodies specific to CD90 and CD105 cell surface antigen in canine and equine cells. As for the gene expression marker, CD73 and CXCR4 were suggested to be quality markers for canine MSCs. For the quality control of iPS cells, we developed a methodology to quantitatively analyze the expression of undifferentiation markers employing a high content analytical apparatus.

We also collected relating information including legislation, administration, guidance and technical attributes for the regenerative medicinal products; occasionally delivered the information package to encourage appropriate understanding the regulatory aspects and the needs for the pre-competitive collaboration by the stake holders in veterinary field. This activity greatly contributed to the foundation of Consortium for the Advancement of Animal Regenerative Medicine (CARM) in Japan.

要旨

本プロジェクトでは、動物用幹細胞製品の品質評価手法を開発するとともに、適切な供給及び健

全な使用の推進に必要とされる技術的及び社会的基盤の整備を試みた。

間葉系幹細胞（MSC）の品質管理ツールとして、CD90 及び 105 に特異的なモノクローナル抗体を取得した。また、遺伝子マーカーとして、CD73 及び CXCR4 が MSC の高品質マーカーであることを示唆する結果を得た。iPS 細胞については、その培養技術を導入するとともに、未分化マーカーの発現を指標とした品質管理手法を開発した。

再生医療等製品に関する品質製造管理手法、関係医法令・ガイドライン等に関する情報を収集・整理し、関係者に広く伝達した。この中で、動物再生医療の技術基盤整備に必要な連携に関する提言を行うとともに、関係者のネットワークを構築し動物再生医療推進協議会（CARM）の設立に貢献した。

1. 背景及び要請

近年、幹細胞を用いた医療の実現に向けて、iPS 細胞等及び間葉系幹細胞等を利用した治療法及び製品の研究開発が急速に進んでいる。獣医療分野においても再生医療製品の基礎研究、臨床応用、製品開発等が大学から企業まで広く行われており [Hatoya ら 2006; 岡田 2008; 横山と横関 2013; Volk&Theoret 2013; Barrett 2016; Markoski 2016]、動物用再生医療等製品に関する承認相談等が増加傾向にある。

医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（以下「薬機等法」とする。）に導入された再生医療等製品の条件及び期限付き承認制度に対する期待は大きく、製品開発の機運がいっそう高まっている。規制サイドには、再生医療に関する最新の科学的知見をいち早く社会に届けるよう、適切な評価とともに開発指針の作成等が期待されている [能田 2014; 能田 2015]。

幹細胞を用いた組織・臓器の作出技術が日々進捗し、医薬分野での様々な応用が予想される。このような状況に対応するためには、先行するヒト幹細胞製品の品質管理及び幹細胞技術を用いた諸情報を把握するとともに、当所における試験・検査経験を蓄積することにより、幹細胞あるいは幹細胞由来細胞加工製品等の申請資料を十分理解し適切な審査等を行う能力の育成が求められる。

2. 目的

本プロジェクトでは、動物用幹細胞製品の承認審査及び検査体制等の構築に向け、当該製品の品質を評価するための手法について検討する。

承認相談及び取去検査等への対応能力涵養のため、幹細胞製品の品質管理手法等に関する技術を開発する。具体的には、製品の開発が進む間葉系幹細胞（MSC）の細胞表面分子マーカーに特異的なモノクローナル抗体（MAb）及び遺伝子マーカーの開発を行う。

人及び動物の再生医療の動向について広く情報収集を行い、動物用幹細胞製品の健全な開発・供給に対する諸課題を明らかにするとともに、その解決に向け産官学連携の下で技術基盤を確立するための体制を整備する。

3. 研究結果

1) 幹細胞の品質管理用ツールの作製

ヒトの間葉系幹細胞の最小要件として、プラスチックシャーレへの接着性、骨/軟骨/脂肪細胞への分化能に加え CD90、CD105、CD73 等の発現が挙げられている [Bourin ら 2013]。動物 MSC でも同様の条件が適用可能か否かは明らかにされていない。現状では、動物細胞の研究にもヒト CD 抗原検出の抗体が流用されているため、抗原構造の種間差による実験上の制限がある。この問題を解

消するため、動物用抗体の作製を試みた。

(1) 抗 CD90MAb の作製

犬及び馬の CD90 の共通配列を持つペプチドで免疫したマウスより作成した 12 のハイブリドーマクローンより、IgG クローンを得た。犬 MSC を当該 MAb を用いて細胞免疫化学染色 (ICC) をおこなったところ、紡錘形の細胞質に沿って細かい点状の染色像が得られた (図 1 A)。CD90 は細胞表面に GPI アンカーを介して発現するタンパク質である。市販のヒト由来 MSC 及び市販抗体を用いた ICC でも、同様に細胞質に沿って点状の染色像が得られたことから、本 MAb は犬 MSC 上の CD90 に結合していることが示唆された。次に CD90 を恒常的に発現している MME201 (犬の乳腺筋上皮細胞、mammary gland myoepithelial cell) を染色した。図 1 B に示したように、犬 MSC と同様に紡錘形の細胞質に沿って細かい点線状の染色像が得られた。さらに、馬組織における MAb の反応性を免疫組織化学的に検索したところ、主な MSC 供給元の骨髄組織では、MSC と考えられる単核細胞が散在性に確認された (図 1 C)。腎皮質では、ボーマン嚢を裏打ちする間葉系細胞が強い陽性を示した (図 1 D)。

以上の結果から、本 MAb は犬及び馬の CD90 を特異的に認識することが示唆された。今後、複数個体由来の MSC 及び犬組織に対する結合性の確認を実施するとともに、MSC 製品の品質管理にどのような形で利用できるかを検討する。

(2) 抗 CD105MAb の作製

CD105 を免疫したマウスの脾臓から作成されたハイブリドーマの上清を用いてペプチド ELISA およびイヌ MSC プレート法によりハイブリドーマの抗体産生の有無を確認した。ELISA については吸光度を確認し、細胞プレートについては蛍光強度および染色像から評価した。その結果、両者に反応した 70 クローンを CD105 MAb 産生ハイブリドーマ候補として選択した。そのうち細胞に良好に反応した 6 つの親クローン由来のサブクローンを 2 次スクリーニングに供試し、22 個に候補を絞った。選択したサブクローンのリクローニングを進め、免疫に用いた抗原ペプチドに強く反応する 2 つの IgG 産生クローンを得た。これらは免疫に用いた別配列のペプチドにそれぞれ特異的に反応した。また、いずれも犬脂肪由来 MSC に対し、陽性反応を示した (図 2)。

(3) 新規 CD マーカー及び遺伝子発現マーカーの探索

モノクローナル抗体を準備中のマーカーに加えて、動物 MSC の品質管理に応用可能なマーカーの設定を目的に、犬脂肪組織由来 MSC を用いて定量 PCR によるマーカー遺伝子の探索を実施した。6 頭の健康な成犬より腹部皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ消化法により MSC を含む血管間質細胞画分を分離した後、プラスチック容器に接着培養し MSC 細胞を得た。さらに、これらの細胞を継代培養し、殆ど増殖が停止する 9 代目まで継代した。このうち 1 代目 (P1) および長期培養により品質が低下していると考えられる 9 代目 (P9) の試料を用いて各種動物 MSC で高発現するとされるマーカー遺伝子について定量 PCR により発現量を比較した。CD105 の遺伝子発現レベルは変化が見られなかったものの、CD73 および CD90 は継代とともに有意に低下した。さらに、MSC の炎症組織への遊走 (ホーミング) に関与するとされる CXCR4 はより顕著な低下を示し、共受容体である CXCR7 およびそのリガンドである CXCL12 の発現量もまた低下した (図 3 A)。一方、CD29、CD44、CD166、インテグリン α (ITGA) 遺伝子および細胞老化マーカーである p16 INK4a ならびに p21 CIP1 遺伝子の発現が継代に伴い上昇した (図 3 B)。これらの遺伝子の発現レベルが MSC の細胞老

化に伴う品質低下の指標となることが示唆された。

次に、継代に伴い発現の低下した MSC マーカー候補遺伝子について、継代過程における遺伝子発現動態をより詳細に解析したところ、CD73 が継代数および細胞分裂回数（PDL: Population doubling level）の増加に伴い漸減する傾向を示したのに対して、CD90 遺伝子の発現は、P3-P7 で一過性に上昇した後、最終的に P9 で低下したことから（図 3 C）、CD90 遺伝子の発現レベルを継代早期の品質と関連づけるのは困難であると考えられた。また、CXCR4 はより急速な低下を示したのに対し CXCR7 も CD90 と同様に一過性の上昇を示したことから（図 3 D）、CXCR4 遺伝子の発現レベルは犬 MSC の品質マーカーとしてより有用であることが示唆された一方、CXCR7 は継代早期の高品質 MSC マーカーとしては使用できないものと考えられた。

以上の結果より、CD73 に加え CXCR4 遺伝子の発現レベルは継代早期の MSC の品質マーカーとして有用であり、高品質 MSC の指標となる一方、CD90 および CXCR7 遺伝子は継代後期の MSC の品質マーカーとしてのみ有用であり、細胞老化マーカーと同様の発現傾向を示す CD29、CD44、CD166、ITGA 遺伝子とともに長期継代マーカーとして利用できることが示唆された。

（4）iPS 細胞の品質管理手法に関する技術開発

ア ヒト iPS 細胞培養を用いた未分化細胞の定量的解析

iPS 細胞の培養技術を当所へ導入し、細胞マーカーの定量的解析による品質評価手法の開発を試みた。

細胞製品の安定した生産を行うために、原材料となる iPS 細胞段階でのセルバンク化が一般に行われる。最終製品の品質はセルバンクの品質に大きく影響されるため、未分化状態の均一な細胞であることを確認しつつ、健全な細胞ストックを作成することが必要となる。iPS 細胞はコロニーとして維持継代するため、コロニー群として品質を管理することになる。同一培養中でもコロニー毎にサイズや分化の程度がそれぞれ異なるため、培養単位全体を網羅的かつ定量的に解析する手法が求められる。近年、蛍光顕微鏡の数百視野を自動撮影し、マーカーの発現比率を測定できる細胞解析装置が普及し始めている。このような装置を使った網羅的細胞解析手法の確立を試みた。

京都大学 iPS 細胞研究所において、健康人由来歯髄細胞から導入樹立されたヒト iPS 細胞 HPS0077 株の観察に適したフィルム型 24 穴プレートにフィーダー細胞（SL10 細胞）を播種し、24 時間後に HPS0077 株を追加播種した。48 時間静置後、毎日培地交換を行うとともに iPS 細胞のコロニー形態等を観察した。

培養 3 日目より、縦 1 列（4 ウエル）を 2 日間隔で固定し、iPS 細胞に発現する未分化マーカー（Oct4 及び Sox2）の免疫染色及び DAPI による DNA 染色を行った。

図 4 A に経時観察結果を示した。上 2 段を抗 Sox2 抗体、下 2 段を抗 Oct4 抗体で染色した。次にこれを CQ-1 細胞解析装置（横河電機）により撮影及びコロニー認識を行い（図 4 B）、各コロニーの面積と未分化マーカーの陽性率を計算しプロットした（図 4 C）。培養日数の経過に伴い、よりサイズの大きなコロニーが出現した（直径 2mm のコロニーの面積は約 3mm²）。Sox2 陽性率は時間経過に伴って上昇傾向を示し 3mm² 以上のコロニーの陽性率は day9 においても 90% であった。これに対し、Oct4 陽性率はばらつきが大きく、day9 での 3mm² 以上のコロニーのほとんどが陽性率 50% 前後であった。未分化マーカーの発現率を細胞の健全性の指標とすると、9 日間の培養により HPS0077 株の品質が劣化したと考えられた。

以上の結果より、未分化マーカーの発現率を定量的に解析することで、細胞群の品質管理指標となることが示唆された。今後 iPS 細胞の継代を繰り返して同様のパターンが現れることを確認する

こと及びその他の iPS 細胞株で同様の解析を行うことで、品質管理指標としての有用性を検証する。

2) 動物再生医療に関する動向調査と社会実装へ向けた基盤整備

本研究では、実施期間全般を通して関係者と広く接触し、人および動物再生医療界の動向を調査した。調査結果を基に、動物再生医療の社会実装に向けた課題を整理するとともに、課題解決の基盤となる産学官連携のあり方をデザイン・提言した。

(1) 動物再生医療の社会実装に向けた課題

iPS 細胞をはじめとする幹細胞技術の進展により、既存療法では治療が叶わなかった疾病の対策が期待されている。薬機等法の改正による実用化促進の気運も高まり、一部ではこの期待を利用して非科学的な医療が展開され問題となっている。獣医療分野でも同様の問題が生じる可能性がある。

これを防ぐための最も重要な要因は、動物再生医療を支える科学的・社会的基盤を整備することである。しかしながら、人分野に比べ基盤技術の整備が遅れていることは否めない。第一に、研究開発の指標とすべき品質管理手法の開発が遅れており、具体的に使用すべき抗体や遺伝子マーカーの供給が不十分である。

診療実態把握のための取り組みも開始されておらず、野放図な動物再生医療が行われたとしても、これを見つけることが極めて困難である。このような状態が放置されれば、動物再生医療に対する社会的信用の失墜につながり、ひいては製品の開発停滞と実用化の遅延という悪循環に陥るであろう。

これらを未然に防ぐためには、産学官の関係者が強固に連携し、技術的・社会的な基盤整備を行うとともに、周辺領域の活性化を促す事が求められる。

(2) 課題の解決に向けた取り組み

本研究では、上記の課題解決に向けた提言をとりまとめ、様々な機会を通して社会に発信した(図5)。まず、研究プロジェクトにより品質管理ツール(抗体、遺伝子マーカー)を自ら開発しその必要性について発信し、業界及び学会の意識向上を促した。次に、産学連携の仕組みをデザインし関係方面に働きかけることで、動物再生医療推進協議会(CARM)の発足をサポートした。人の相同団体である FIRM が企業のみで構成されているのに対して、CARM には、企業(動物薬、試薬、機器、保険)に加え、学術団体が複数参加しており、動物再生医療に関する社会的コンセンサス形成のためのより強固なプラットフォームが形成された[動物再生医療推進協議会(2015)]。これは、基盤技術の標準化やガイドライン作成を行う際の意見集約に適した構成である。さらに、動物再生医療行政のカウンターパート機能として、CARM 内に具体的な技術要件を検討し、政策提言を行うための検討部会が立ち上げられた。

CARM は、補助事業の枠組みを活用し、その中核メンバーである動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会とともに、「動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業」の実施主体となり、関連指針案の作成を行った[動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会 2015]。指針案作成の段階で、緊密な意見交換を行う事ができたため、規制側の考え方を広く動物再生委医療関係者と共有することができた。開発企業に対しても透明性が高まり、当所で実施中の承認申請前チーム相談と併せて、製品開発が強く刺激されている。

CARM のメンバーである日本獣医再生医療学会が主体となり再生獣医療行為のガイドラインが策定された[日本獣医再生医療学会 2017]。また、一般の獣医師が行う再生医療行為の実態把握の仕組

みを、CARM が担うことが 2018 年 5 月の CARM 第 4 回総会において決定された。これらの取り組みは、動物再生医療の社会的な信頼を維持強化するために重要な役割を果たすことは明らかである。

動物薬の国際調和活動（VICH）において、細胞加工製品を含むバイオ医薬品を実用化するための枠組み作りが我が国主導で進んでいる。まず、人用製剤でも未だ国際的なコンセンサスが形成されていない生物薬品の分類について提言し、国際的な合意が形成された。次に、安全性評価の国際ガイドライン作成に向けた提言を行っている。これらの取り組みは、再生医療等製品の社会実装の基礎となり、世界的な標準化を日本が先導するための重要なステップとなるであろう。

4. 考察

1) 内容・特徴

本研究は、幹細胞の基礎研究と動物再生医療の社会実装の両者を横断的に実施するユニークな取り組みである。すなわち、自然科学と行政的取組みの両者を包含することにより、動物再生医療が社会的に受容・活用されるための環境を整えるものである。

2) 業務等への活用

研究の遂行により、細胞の取扱いやマーカー開発の経験が蓄積され、細胞加工製品の開発に関する相談・助言能力が養われた。また、審査及び検査体制を構築し、申請製品を迅速に世の中に送り出す体制が整った。

これらを所内業務に活用することに加え、我が国における動物再生医療の健全な普及に貢献した。本研究で開発した品質管理ツール等を、CARM を通して業界と共有することにより、関連技術の標準化を促した。

3) 研究達成度

品質管理手法に関する検討のうち、MAb の作製に関してはほぼ目標を達成し、遺伝子マーカー探索及び iPS 細胞の品質管理手法については当初の計画以上の結果を得た。MSC の品質管理ツールとして、CD90 及び 105 に特異的な MAb を取得した。また、遺伝子マーカーについては、CD73 及び CXCR4 が MSC の高品質マーカーであることを示唆する結果を得た。iPS 細胞の培養技術を京都大学より導入し、定量的なマーカー発現解析による品質管理手法を開発した。

動物再生医療に関する動向調査と社会実装へ向けた基盤整備に関しては、当初の計画をはるかに上回る成果をあげた。業界及びアカデミアを包含した専門団体である CARM の設立に寄与し、動物再生医療標準化推進のプラットフォームとなるよう誘導した。製品開発ガイドラインの作成に深くコミットするとともに、診療ガイドラインの作成及び診療実態把握のための体制構築に貢献した。以上のように、本研究は十分な成果をあげ、設定した目標を達成したと評価できる。

4) 研究推進上の問題点と対策

当初、ヒト iPS 細胞を用いて開発した品質評価手法を動物 iPS 細胞に応用する予定であった。しかしながら、動物幹細胞の開発状況を綿密に調査したところ、未だ動物 iPS 細胞の確立は目処が立っていないことが判明した。動物 iPS 細胞は、人のそれと必ずしもタイプが一致するとは限らないことから、評価系開発は動物 iPS 細胞の開発動向を注視し、ある程度の進展が見込まれた段階で実施することが適切であると考えられた。

5) 今後の研究展開

本研究の研究成果を基に、動物幹細胞の品質、安全性及び有効性を評価するための研究を継続課題として設定する。細胞活性の測定法を確立し、効能と関連する細胞活性及び分子マーカーを明らかにする。各種マーカーと臨床的有用性との比較・評価システムを開発し、これらの研究で得られた知見及び技術を、CARMを通じて開発メーカーと共有し、我が国の動物用再生医療等製品の標準化を推進する。

5. 研究成果の公表

(シンポジウム等)

- 1) 能田健、再生医療等製品の獣医療応用に向けて - 法的位置づけと技術的課題 -、動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会 2014 年秋シンポジウム基調講演、平成 26 年 9 月 11、北海道大学高等教育推進機構（札幌市）
- 2) 能田健、再生医療等製品の法的位置づけと獣医療応用への課題、平成 26 年 11 月 14 日、第 35 回動物臨床医学会記念年次大会、グランキューブ大阪（大阪）
- 3) 能田健、再生医療等製品の法的位置づけと獣医療応用への技術的課題、第一回アニマル FIRM 総会セミナー、平成 27 年 4 月 23 日、(一財)生物安全研究所（相模原市）
- 4) 能田健、動物用再生医療等製品の品質管理について - 関連法令の技術的解釈と前競争的課題 -、動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会 2014 年秋シンポジウム、平成 27 年 9 月 9 日、北里大学（十和田市）
- 5) 荻野智絵、能田健、再生医療等製品の獣医療応用に向けて - 法的位置づけと品質確保における課題 -、第 2 回獣医生命科学会、平成 27 年 11 月 7 日、日本獣医生命科学大学（東京）
- 6) 中島奈緒、能田健、再生医療等製品の实用化に向けて - 関連法令の技術的解釈と品質管理における前競争的課題 -、動物医薬品協同組合冬期研修会、平成 28 年 3 月 4 日、薬業健保会館（東京）
- 7) 能田健、獣医領域での再生医療等製品の实用化に向けた現状と課題 - 製造者の責務と前競争的共同研究の必要性 -、日本獣医学会第 159 回学術集会、司宰機関企画（再生医療シンポジウム：医獣連携および基礎から臨床応用への再生医療の実践モデル）、平成 28 年 9 月 8 日、日本大学（藤沢市）
- 8) 能田健、動物再生医療のレギュレーションと産官学連携 - 特性に合ったレギュレーションとプレ・コンペティティブ共同研究の必要性 -、医工学フォーラム 2016 年度特別学術講演会、平成 29 年 2 月 8 日、京都市リサーチパーク（京都市）
- 9) 中島奈緒、薬事の視点から獣医再生医療におけるガイドラインに期待すること、日本獣医再生医療学会 第 12 回年次大会、平成 29 年 2 月 12 日、名古屋プライムセントラルタワー（名古屋市）
- 10) 佐藤耕太、獣医領域における再生医療等製品の法的位置付けとその实用化に向けた課題、第 16 回日本再生医療学会総会 シンポジウム、平成 29 年 3 月 8 日、仙台国際センター（仙台市）
- 11) 能田健、日本養豚開業獣医師協会（JASV）動薬検見学会、獣医領域での再生医療等製品实用化への課題、2016 年 12 月 2 日、動物医薬品検査所（東京）
- 12) 能田健、日本獣医師会第 18 回学術・教育・研究委員会（獣医学術部会常設委員会）、動物再生医療の法的位置づけと实用化に向けた課題 - 製造者の責務とプレ・コンペティティブ共同研究の必要性 -、平成 29 年 2 月 13 日、公益社団法人日本獣医師会（東京青山）
- 13) 能田健、獣医再生医療のレギュレーションと産官学連携の進展 - プレ・コンペティティブ共同研究と基礎研究者への期待 -、第 160 回日本獣医学会学術集会、平成 29 年 9 月 14 日、鹿児島大学（鹿児島）

- 14) 佐藤耕太、動物再生医療の法的位置付けとその実用化に向けた課題、第17回日本再生医療学会総会 シンポジウム、平成30年3月21日、パシフィコ横浜（横浜市）
- 15) 佐藤耕太、犬脂肪組織由来間葉系幹細胞（MSC）の品質管理：サイトカインおよび薬物反応性を指標とした新たなMSC品質マーカー、動物再生医療推進協議会理事会、平成30年1月29日、オフィス東京（東京）
- 16) 能田健、農林水産省、動物用再生医療等製品の現状と産学官連携、レギュラトリーサイエンス行政・研究連絡会議、平成29年12月22日、農林水産省（東京）
- 17) 相原尚之、東京都平成29年度動物用医薬品販売管理者講習会、再生医療等製品の現状とその法令規制について、平成30年2月2日、国立オリンピック記念青少年総合センター（東京）

（学会発表等）

- 18) 中島奈緒、新井克彦、荻野智絵、佐藤耕太、大石弘司、能田健、動物間葉系幹細胞の品質管理に用いるマーカー候補分子に対するモノクローナル抗体スクリーニング法の開発①、第159回日本獣医学会学術集会、平成28年9月6日、日本大学（藤沢市）
- 19) 荻野智絵、新井克彦、中島奈緒、佐藤耕太、大石弘司、能田健、動物間葉系幹細胞の品質管理に用いるマーカー候補分子に対するモノクローナル抗体スクリーニング法の開発②、第159回日本獣医学会学術集会、平成28年9月6日、日本大学（藤沢市）
- 20) 佐藤耕太、中島奈緒、荻野智絵、大石弘司、新井克彦、能田健、犬脂肪組織由来間葉系幹細胞の品質管理に応用可能な遺伝子マーカーの探索、第160回日本獣医学会学術集会、平成29年9月14日、鹿児島大学（鹿児島）
- 21) 桂川ゆきの、笹尾貴文、中島奈緒、荻野智絵、佐藤耕太、能田健、笠嶋快周、新井克彦、間葉系幹細胞マーカーCD90（Thy-1）のウマ組織における発現分布、第30回日本ウマ科学会学術集会、平成29年11月27日、国際ファッションセンター（東京）
- 22) 佐藤耕太、中島奈緒、荻野智絵、大石弘司、新井克彦、能田健、犬脂肪組織由来間葉系幹細胞の品質管理に応用可能な遺伝子マーカーの探索、平成29年度獣医師会獣医学術学会年次大会（大分）、平成30年2月11日、別府国際コンベンションセンター（別府市）

（公刊書）

- 23) 能田健、再生医療等製品の獣医療応用に向けて－法的位置づけと技術的課題－、動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会ニュースレター No.10, p5-7, 2014年12月号
- 24) 能田健、動物用再生医療等製品の品質管理について－関連法令の技術的解釈と前競争的課題－：特集「再生獣医療法の進展を目指して－日本が牽引する新分野－」、動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会ニュースレター No.12, p11-12, 2015年12月号

（講義等）

- 25) 能田健、再生医療等製品－法的位置づけと幹細胞技術の利用－、国分寺第一中学校職場体験、平成25年11月6日、動物医薬品検査所（東京）
- 26) 能田健、再生医療等製品の法的位置づけと幹細胞技術の利用－獣医療への応用を考える－、東京農工大獣医学科学生研修講義、平成26年7月16日、動物医薬品検査所（東京）
- 27) 能田健、再生医療等製品の法的位置づけと幹細胞技術の利用－獣医療への応用を考える－、岐阜大学連合獣医学研究科大学院セミナー、平成26年2月27日、東京農工大学（東京）
- 28) 能田健、再生医療等製品の獣医療応用－法的位置づけと技術的課題－、獣医学生インターンシップ講義、平成26年8月29日、動物医薬品検査所（東京）

- 29) 能田健、動物用医薬品の最新の話：再生医療等製品の法的位置づけと獣医療応用への技術的課題、VP キャンプ：獣医学生インターンシッププログラム、平成 27 年 8 月 28 日、動物医薬品検査所（東京）
- 30) 能田健 VP キャンプ 2016、獣医領域での再生医療等製品の实用化に向けた現状と課題 —製造者の責務と前競争的共同研究の必要性—、平成 28 年 8 月 31 日、動物医薬品検査所（東京）
- 31) 能田健、VP キャンプ 2017、動物再生医療のレギュレーションと産学官連携の進展 —レギュラトリーサイエンスとプレ・コンペティティブ共同研究の必要性—、平成 29 年 8 月 30 日、動物医薬品検査所（東京）

6. 謝辞

本プロジェクトの遂行にあたり、種々のサポートをいただきました、動物医薬品検査所山本前所長、小原所長はじめ研究推進委員会メンバーの皆様には深謝いたします。免疫組織学的検索に用いた馬組織をご提供いただきました、J R A 総合研究所の笠嶋博士に感謝いたします。動物再生医療に関する情報提供等をいただきました動物再生医療推進協議会会員及び事務局の皆様、細胞の定量解析に関する技術的サポートをいただきました横河電機株式会社ライフサイエンス事業部の皆様、共同研究締結等の際にサポートをいただきました企画連絡室企画調整課職員の皆様に感謝いたします。

7. 引用文献等

- Barrett, G.J. (2016). A set of grand challenge for veterinary regenerative medicine. *Frontiers in Veterinary Science* 3, doi: 10.3389/fvets.2016.00020, (4 pages).
- Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl H., Rubin J.P., Yoshimura K. & Gimble J.M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15, 641–648.
- Hatoya S., Torii, R., Kondo. Y., Okuno, T., Kobayash, K., Wijewardana, A.V., Kawate, N., Tamada, H., Sawada, T., Kumagai, D., Sugiura, K., & Inaba, T. (2006) Isolation and Characterization of Embryonic Stem-Like Cells From Canine Blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* 73, 298–305.
- Markoski, M.M. (2016) Advances in the use of stem cells in veterinary medicine: from basic research to clinical practice. *Scientifica*, Article ID 4516920; doi: 10.1155/2016/4516920, (12 pages). doi: 10.1155/2016/4516920
- Volk, S.W. & Theoret, C. (2013) Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regeneration* 21, 382-394.
- 日本獣医再生医療学会（2018）犬及び猫における再生医療及び細胞療法の安全性確保に関する指針．
- 能田健（2014）再生医療等製品の獣医療応用に向けて－法的位置づけと技術的課題－．動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会ニュースレター 10, 5-7.
- 能田健（2015）動物用再生医療等製品の品質管理について－関連法令の技術的解釈と前競争的課題－：特集「再生獣医療法の進展を目指して－日本が牽引する新分野－」．動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会ニュースレター 12, 11-12.
- 岡田邦彦（2008）獣医再生医療ファーストステップ；第 4 回「安価に獣医再生医療を実現するために～がん免疫療法および骨髄幹細胞療法の実現に向けて～」．CAP 12, 28-33.

動物再生医療推進協議会 Consortium for Advancement of Animal Regenerative Medicine (CARM) ホームページ. 参照日: 2018年7月27日, 参照先: <http://animalcarm.jp/>

動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会 (2015) 動物細胞加工製品 (同種由来・自己由来) の品質及び安全性確保に関する指針 (素案) 及び解説書 (素案). 平成27年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業報告書 p7-68. 参照日: 2018年7月28日, 参照先: <http://www.jsavbr.jp/data/1466487819.pdf>

横山篤司、横関健昭 (2013) 躍進する間葉系幹細胞療法; 第3回 動物病院でのMSC療法の運用. J-Vet 12月号, 62-78.

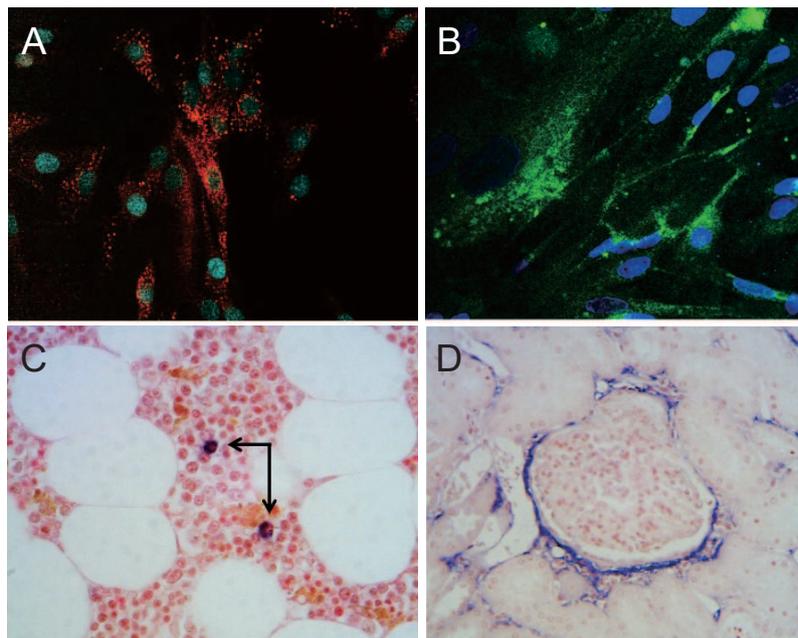


Fig.1 Immunostaining of canine cells and horse tissues with Anti-CD90 MAb(IgG)
A, Immunocytochemistry of canine mesenchymal stem cells;
B, Immunocytochemistry of MME2 cell (canine mammary gland myoepithelial cell); C and D, Immunohistochemistry of horse bone marrow and kidney, respectively.

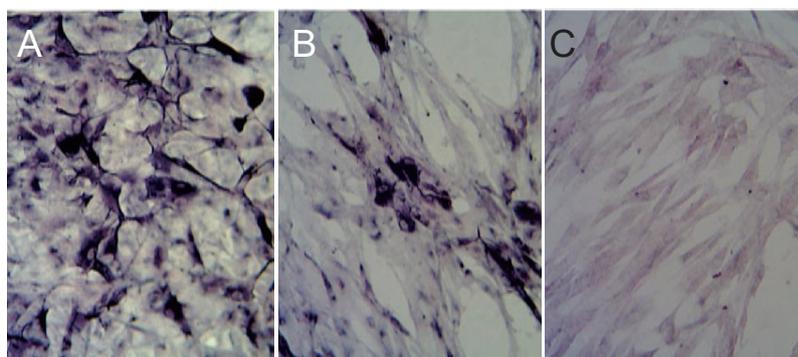


Fig. 2 Immunocytochemistry of canine mesenchymal stem cells with Anti-CD105 MAb(IgG)
A and B, immunostaining with anti-CD105 MAbs from different clones; C, staining without first antibody.

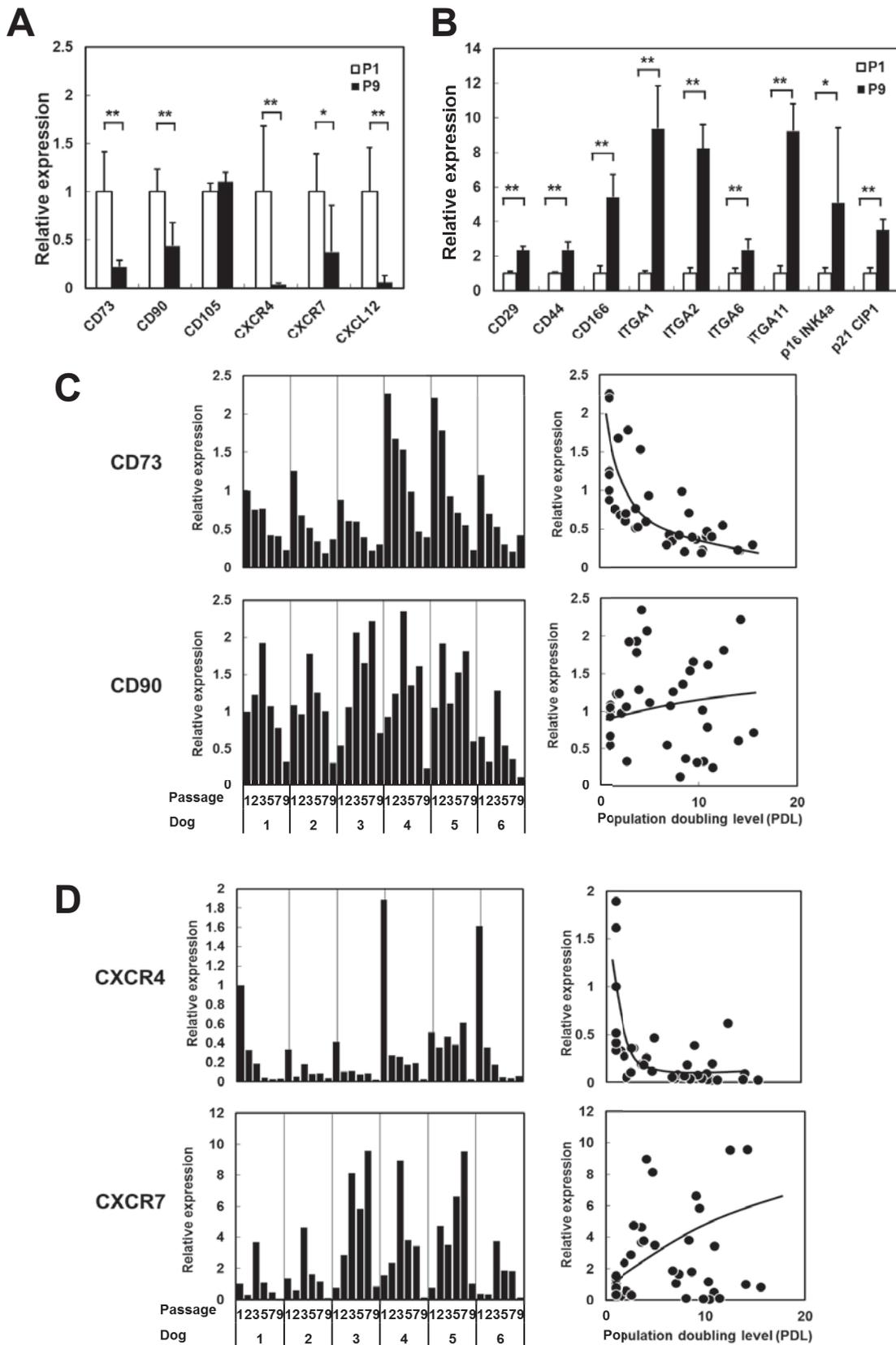


Fig. 3 Marker gene expression analysis of canine mesenchymal stem cells (MSCs) along with the culture passage
 A and B, comparisons of gene expressions between passage 1 and 9; C and D, gene expression analysis of culture passages (1 to 9) and population doubling level of MSCs for 6 animals.

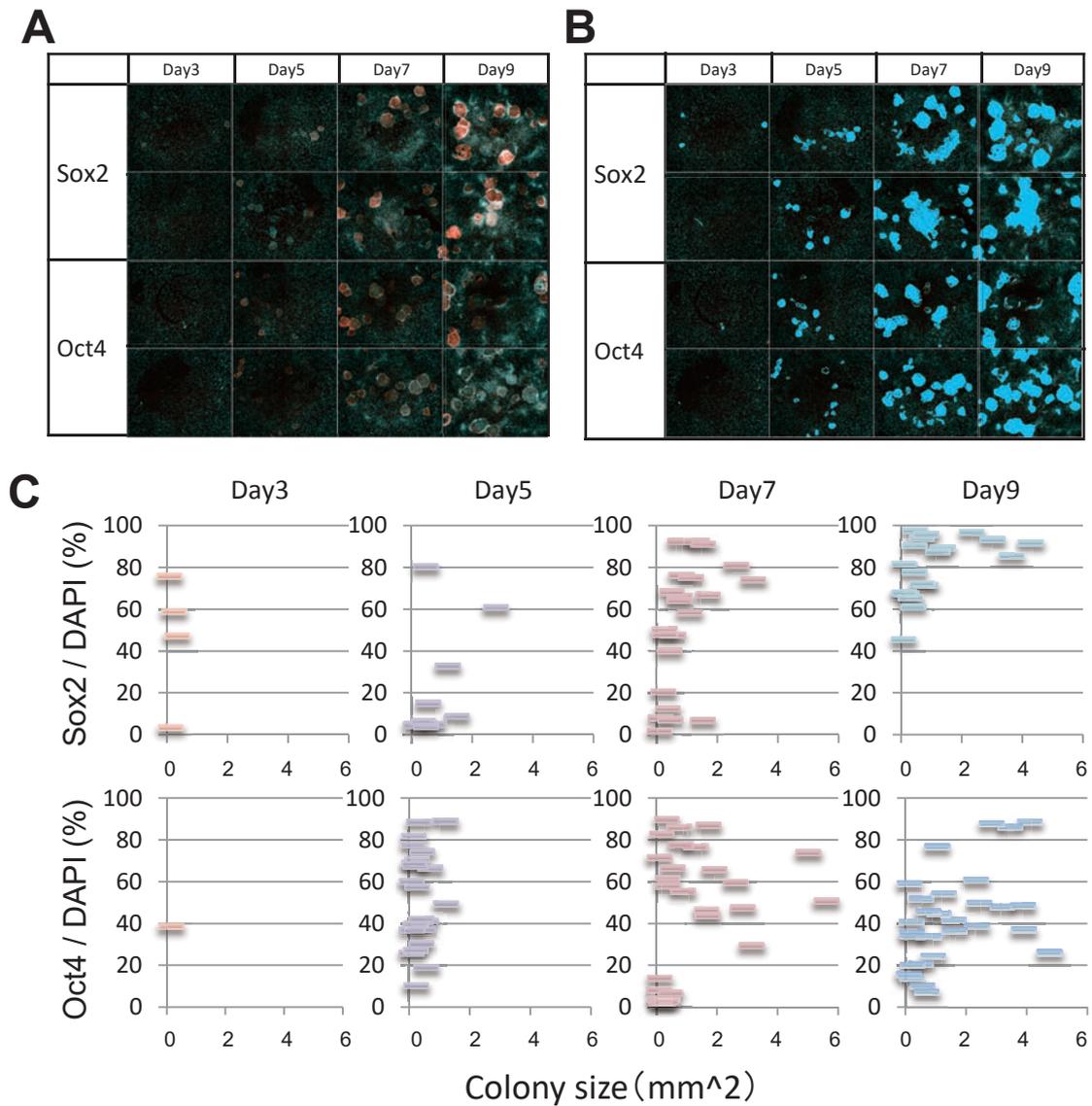
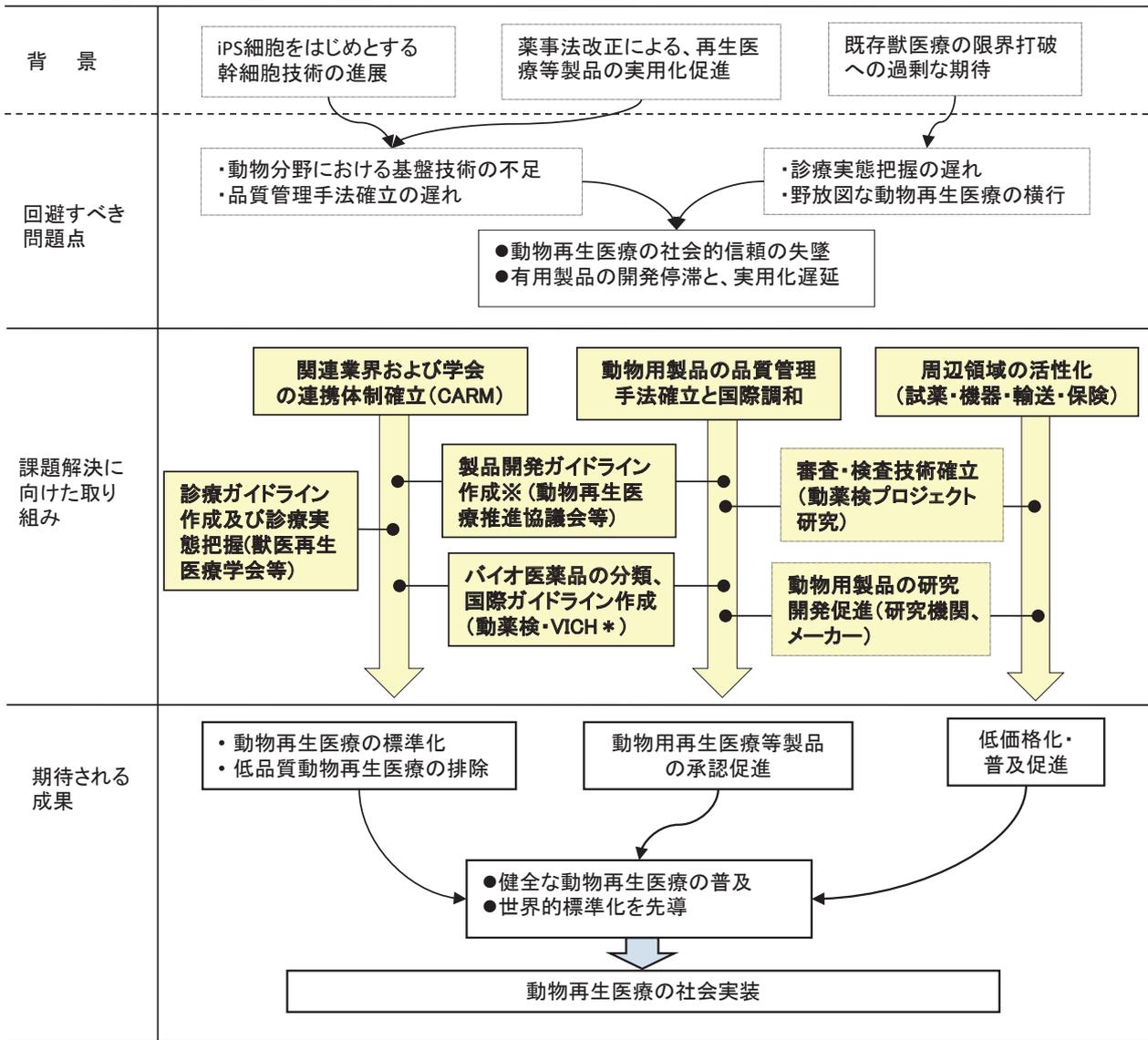


Fig. 4 A quantitative analysis of iPS cell for its undifferentiated-marker expression with a progressive cell proliferation and colony formation
 A, iPS cell cultures were fixed at day 3, 5, 7 or 9 after the passage, subsequently stained with DAPI (blue) and either anti-Sox2 or anti-Oct4 antibody (red); B, each iPSC cell were digitally recognized by high content cell analyzer (Yokogawa CQ-1) and further counted for their expression in Sox2 or Oct4; C, iPSC colonies were plotted for their size versus Sox2 or Oct4 expression ratio in the colony.



※動物用再生医療等製品の安全生性試験等開発事業(農水省補助事業)
 * 動物薬の国際調和活動(International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products)

図5 動物再生医療の基盤整備と社会実装への課題と取り組み

[プロジェクト研究終了報告書]

動物用医薬品の環境影響評価法の確立

遠藤裕子、吉村治郎、江口 郁、小形智子、高橋敏雄、小島明美、石原加奈子¹

(受付：平成 30 年 7 月 31 日、受理：平成 30 年 10 月 15 日)

1：現 東京農工大学

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

Development of approach for environmental evaluation for veterinary medicinal products in Japan

Yuuko S. ENDOH, Haruo YOSHIMURA, Kaoru EGUCHI, Tomoko OGATA,
Toshio TAKAHASHI, Akemi KOJIMA, and Kanako ISHIHARA (Recent affiliation)¹

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,

1-15-1, Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan

(Received: 31th Jul 2018; Accepted: 15th Oct 2018)

1; Tokyo University of Agriculture and Technology

Abstract

For the implementation of Guidelines 6 & 38 developed by International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) we examined the calculation method of predicted environmental concentration (PEC) of veterinary medicinal products (VMPs), and also examined several environmental effect studies. We studied environmental effects of antimicrobials, ecto- and endo-parasiticides, and disinfectants approved in Japan, and discussed about the environmental impacts of these compounds considering their physical/chemical properties on the database on the website.

要旨

動物用医薬品（VMP）の承認審査資料の調和に関する国際協力（VICH）の環境影響評価ガイドライン（GL6 及び GL38）に沿った動物用医薬品の環境影響評価を日本において実施するために、日本に適した環境中予測濃度（PEC）の算出法及び生物を用いた環境影響試験法について検討した。既承認の抗菌剤、内部／外部寄生虫駆除剤及び殺菌消毒剤の試験を行い、得られた試験成績とウェブサイト上の物理化学的性質に関するデータベース情報を考慮し、動物用医薬品の環境影響について考察した。

緒言

医薬品の多くは生理活性を有する化学物質であり、使用後は環境中に放出されている。1980年代以降、欧米の環境中から医薬品成分が検出されたという多くの報告があり、2003年には、EU地域の環境中の医薬品に関する会合（ENVIRPHARMA）（Garricら2003）が開催され、水環境及び陸環境中に多くの医薬品が広く存在することが示された。環境中に放出された医薬品濃度の削減は困難であることから、医薬品の承認前にリスクを評価し、必要に応じたりスク削減／回避措置を講じることにより有害な影響を未然に防ぐことが重要である。このような考え方にに基づき、動物用医薬品（VMP）の承認審査資料の調和に関する国際協力（International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, VICH）によって2000年（VICH2000）に第I相（GL6）の、2004年（VICH2004）に第II相（GL38）の環境影響評価ガイドライン（VICHGL）が作成制定された。

本報告は、上記のVICHGLを日本で適用するため、日本における実施方法についての検討を行うとともに、検討した手法に基づき、既承認のVMPの環境影響評価を試みたプロジェクト研究（1998年度-2004年度）の概要をまとめたものである。

なお、本プロジェクトの成果を踏まえ、日本では、日本動物用医薬品協会の自主基準（日本動物用医薬品協会2012）及び動物医薬品検査所のVICHガイドライン解説書（農林水産省動物医薬品検査所2012）が発出され、新動物用医薬品の製造販売承認申請資料作成に用いられている。人用医薬品においては、厚生労働省が2016年に新医薬品開発における環境影響評価に関するガイダンス（厚生労働省2016）により、環境影響評価に関する考え方を示している。

目的

本報告の目的は、日本に適した動物用医薬品の環境影響評価法の確立及びその方法を用いた動物用医薬品の評価である。

研究成果の概要

1. 環境影響評価の全体像

化学物質の環境影響評価においては、評価対象物質の代表的生物種に対する毒性試験成績から求める予測無影響濃度（PNEC）と評価対象物質の生産量・環境中放出量の調査結果から求める環境中予測濃度（PEC）の比であるリスク比（ $RQ: PEC/PNEC$ ）より評価するのが一般的である。 $RQ < 1$ であれば使用のリスクは許容でき、 $RQ \geq 1$ であればリスク管理が必要とされている。

VICHGLもこの考え方に基づいており、その全体像は図1のとおりである。VICHGLは、VMP（生物学的製剤を除く。）の環境（家畜飼育施設・水産養殖施設を除く。）中の生物に対する影響を評価の対象としている。VICHGLは、EU、米国及び日本の政府と動物用医薬品業界が合意したものであるが、欧米と日本では、VMPの使用対象動物の飼育方法、糞尿処理法及び環境生物種に相違があるため、PECの具体的な算出方法、試験生物種等については明確に規定していない。そのため日本でVICHGLを適用するためには、これらを明確に示す必要があった。

2. 動物用医薬品の環境放出経路とPECの推定（第I相）（GL6）

日本におけるPEC算出の前提となる動物用医薬品の環境放出経路を検討し、図2の経路を作成した。また、GL6の引用文献（Spaepenら1997）の考え方にに基づき、対象動物に使用したVMPの全量が

糞尿に排泄されると仮定し、「PECの初期値 (PEC-initial) = 対象動物への VMP の使用量 / VMP を使用した対象動物由来の糞尿が導入される環境中の土壌量又は水量」とし、その計算に必要なパラメータを定めた。得られた方法により計算したところ、VMP を 1mg/kg の用量で飼育している全ての動物に 1 日投与した場合には、牛、豚、鶏のいずれの場合も VMP の予測堆肥中濃度 (PECcomp) は 2mg/kg 以下、予測土壌中濃度 (PECsoil) は 0.01mg/kg 以下となった。

3. 物理化学的試験・環境影響試験・環境運命試験 (第Ⅱ相) (GL38)

VICHGL においては、第Ⅰ相において評価が終了しなかった場合には、第Ⅱ相の A 段階の試験を実施することになる (図 1 参照)。第Ⅱ相の試験項目を図 3 に示す。

既承認の VMP の有効成分について、図 3 の試験項目に関する情報を web 上のデータベースから入手するとともに、基本的な試験を実施した。収集した情報及び試験成績を表 1 に示す。データの由来又は試験法は以下のとおり。

(1) 物理化学的性質

- 1) 水溶解度、n- オクタノール / 水分配係数 (logKow)、蒸気圧、水中解離定数 (pKa) : SRC PhysProp Database (<http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>) を利用
VICHGL では、OECD の試験法ガイドライン (OECDGL) を用いることを推奨

(2) 環境中運命

- 1) 堆肥・土壌への吸着試験 : OECDGL106 準拠
- 2) 水中分解試験 : 温度・光照射条件を変えて VMP の水溶液を保存し、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により定量

(3) 環境中生物に対する影響

- 1) 魚類の急性毒性試験 : OECDGL203 準拠
被験生物種 : ヒメダカ (*Oryzias latipes* var.)
- 2) 藻類の生長阻害試験 : OECDGL201 準拠
被験生物種 : 緑藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata* (旧名 *Selenastrum capricornutum*) 及び *Chlorella vulgaris*)
一部の試験は ALGALTOXKIT F (MicroBioTests Inc.) キットを使用
- 3) ミジンコの急性遊泳阻害試験 : OECDGL202 準拠
被験生物種 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
DAPHTOXKIT F™ MAGNA (MicroBioTests Inc.) キットを使用
- 4) ワムシの急性毒性試験 :
被験生物種 : ツボワムシ (*Brachionus calyciflorus*)
ROTOXKIT F (MicroBioTests Inc.) キットを使用
- 5) 活性汚泥の呼吸阻害試験 : OECDGL209 準拠
動物医薬品検査所の活性汚泥を使用
- 6) 堆肥の生成に対する影響試験 :
堆肥化装置 (かぐやひめ) (富士平工業株式会社) を使用
- 7) ミミズの急性毒性試験 : OECDGL207 のろ紙接触試験準拠
被験生物種 : シマミミズ (*Eisenia foetida*)
- 8) フタホシコオロギの孵化に対する影響試験 : 本研究で開発

薬液を染みこませたろ紙上に、産卵 24 時間以内のフタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) の卵を配置し、27℃で保存し、孵化率を測定

9) 土壌呼吸に対する影響試験：生物呼吸測定装置を用いて堆肥の呼吸を測定

(4) 環境影響に関する考察

表 1 において、成分ごとに毒性が強く認められた値をグレーで示した。

水系環境においては、化学物質の分類及び表示に関する世界調和システム (GHS) の短期間 (急性) 水生環境有害性の急性 1 の区分を指標とすると、抗菌剤は藻類に、抗寄生虫剤はミジンコ・魚類に対して、殺菌消毒剤はミジンコに対して有害な物質があることが認められた。また、殺菌消毒剤及び抗寄生虫剤は、ミジンコと同様の栄養段階にある動物プランクトンに分類されるツボウムシに対して有害な物質があることが認められた。陸上環境については、殺虫剤にコオロギに対する毒性が認められた。

成果

1. 農林水産省動物医薬品検査所 (2012 年 1 月) 動物用医薬品の環境影響評価ガイドライン解説書
2. Kaoru Eguchi, H Nagase, Manao Ozawa, Yuuko S. Endoh, Kisako Goto, K. Miyamoto, Haruo Yoshimura (2004). Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, 57(11), 1733-1738.
3. Haruo Yoshimura, Yuuko S. Endoh (2005). Acute toxicity to freshwater organisms of antiparasitic drugs for veterinary use. *Environ. Toxicol.*, 20(1), 60-66.
4. Haruo Yoshimura, Yuuko S. Endoh, Kazuki Harada (2005). *Gryllus bimaculatus*: A possible bioindicator organism for detection of chemical pollutants in terrestrial systems. *Ecological Indicators*, 5(3), 181-188.

謝辞

本プロジェクト研究の実施に当たり、ご協力いただいた元動物医薬品検査所職員村田奈々恵氏、下田澄子氏、生方恵子氏、原田和記氏、及び関係者各位に深謝します。

引用文献

- 日本動物用医薬品協会 (2012 年 1 月) 動物用医薬品の環境影響評価ガイドラインの自主基準
農林水産省動物医薬品検査所 (2012 年 1 月) 動物用医薬品の環境影響評価ガイドライン解説書
厚生労働省 (2016) 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長通知 薬生審査発 0330 第 1 号 「新医薬品開発における環境影響評価に関するガイダンス」について”平成 28 年 3 月 30 日
- Garric, J., Tilghman, A. & Cogoluegnes, A. (2003) ENVIRPHARMA final report.
- Spaepen, K. R. I., Van Leemput, L. J. J., Wislocki, P. G. & Verscheren, C. (1997) A uniform procedure to estimate the predicted environmental concentration of the residues of veterinary medicines in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1977-1982.
- VICH (2000) VICH GL6: Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products (VMPs) - Phase I
- VICH (2004) VICH GL38: Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products Phase II Guidance.

図1. VICH-EIA ガイドライン：全体像

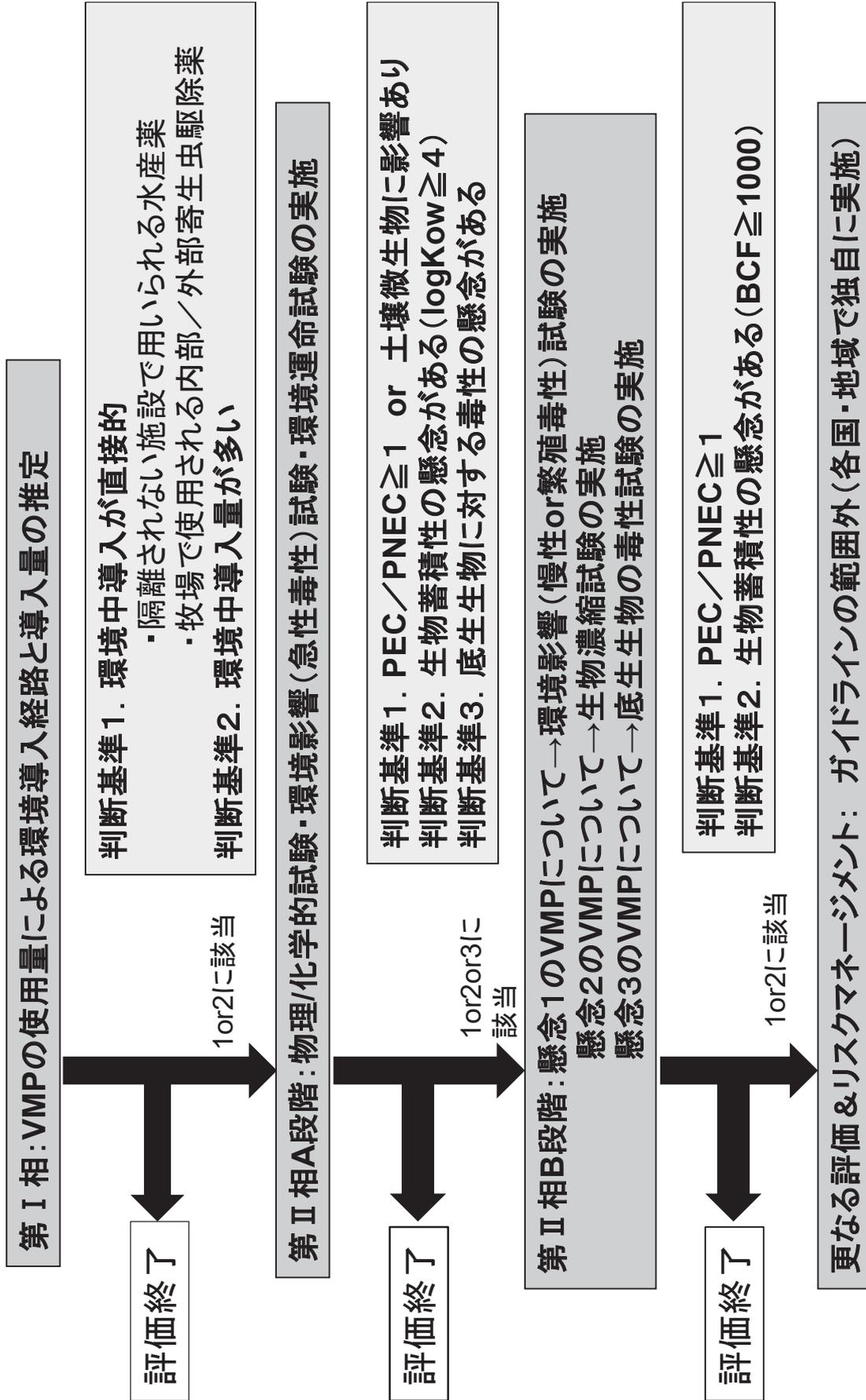


図2. VMP の環境放出経路

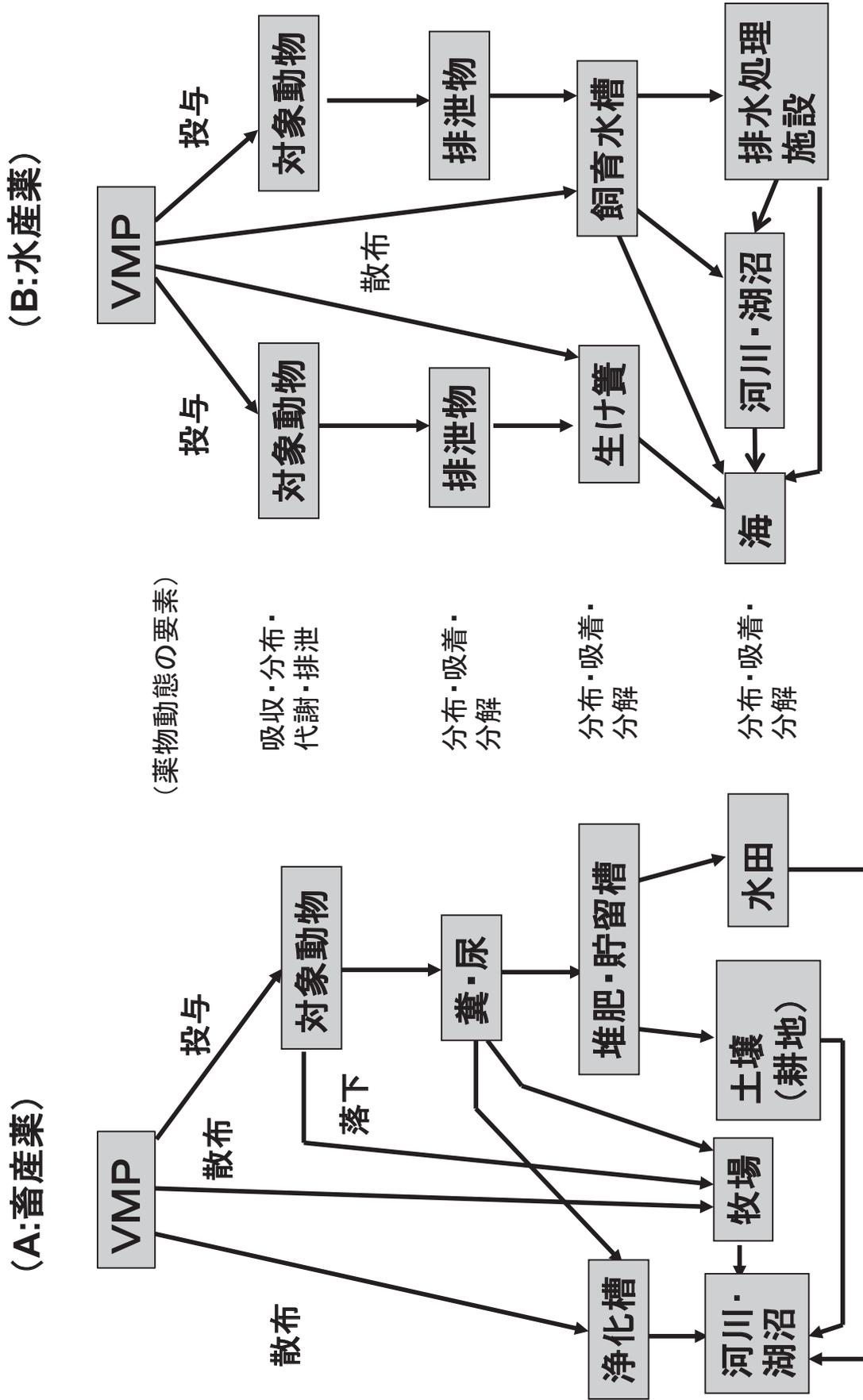


図3. VICH-EIA ガイドライン 第II相の試験項目

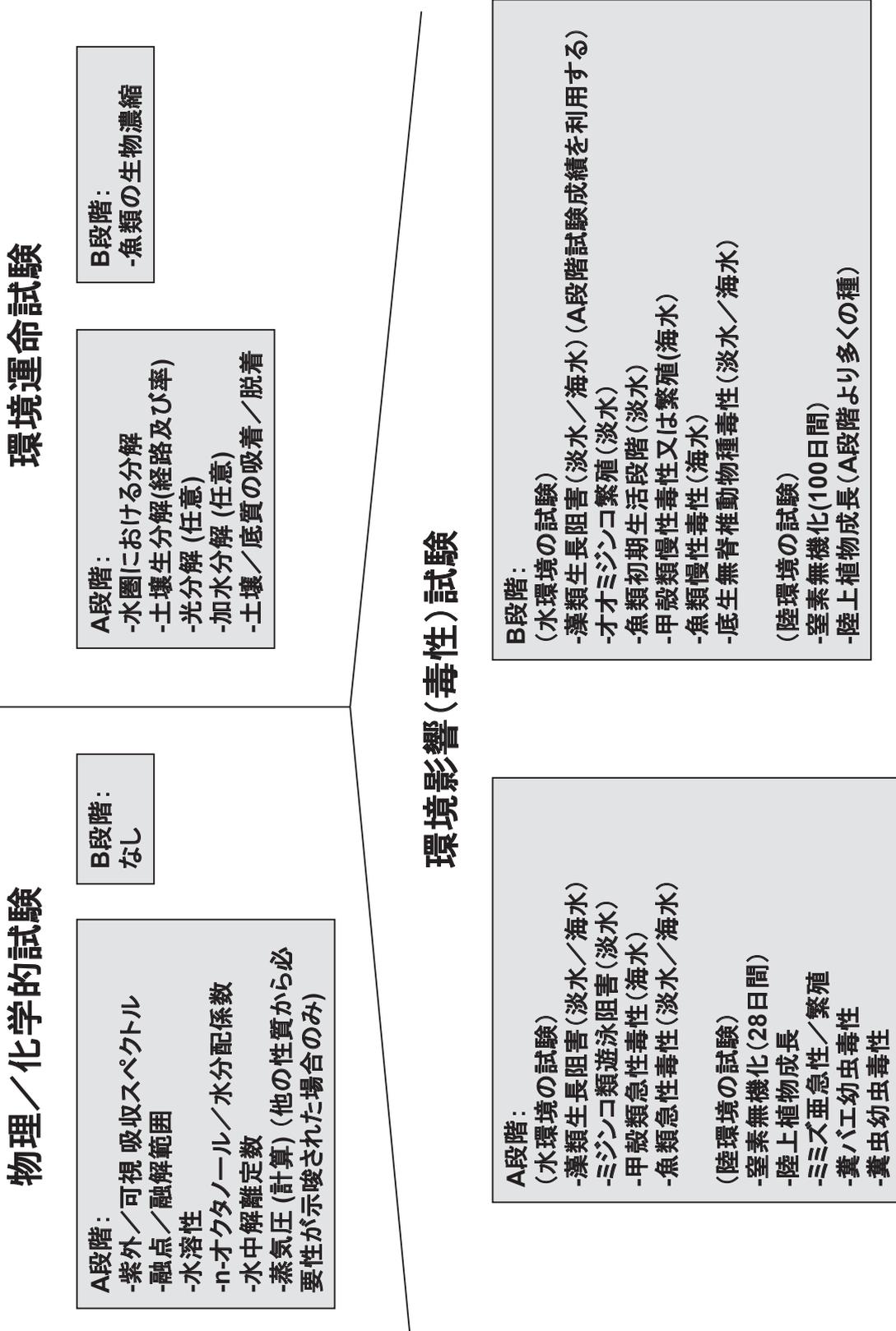


表 1. 成績のまとめ

化合物分類	化合物名	水溶解度 文献 mg/L	logKow MDL QSAR	logKow KowWin	logKow 文献値	解離定数 文献値	Kd値 文献値 L/kg	Kd値 堆肥実測値	メダカLC ₅₀ OECD203 mg/L	ミンコEC ₅₀ mg/L	藻類EC ₅₀ (2) mg/L	フナLC ₅₀ mg/L	ミズLC ₅₀ mg/L	コホキEC ₅₀ mg/L
抗菌剤	アピロリン(ナトリウム塩)	10100	-1.49	1.45					>100	>1000	>1000	>1000	>63000	
	ロキサロキシ	1.437	2.73	2.48	8.88				>100	>200	0.037	>200		
	オキソリドン(塩酸塩)	313	-0.27	-2.87	3.27	420~1030(Kd)			>100	>200	0.34	>100	27594	
	オキソリドン	3.2	2.19	1.7	0.68	6.9			>100	>200		>400	>63000	
	タイロシ(酒石酸塩)		4.34	1.05	3.5	8.3~128(Kd)			>100	>200	0.41	>400		
	スルファジニジン		-0.17	-0.34		723.3			>100	238.93	2.3	>800		15579
	スルファジニジン(ナトリウム塩)	343	0.85	1.17		6			>100	1.22	1.5	>400		7749
	スルファキニリン		0.83	0.48					>100	116.3	>1000	>400		
	スルファモキサジン(ナトリウム塩)		0.48	0.2		24.4			>100	>200	8.9	>400		
	セファリン(ナトリウム塩)		-1.15	-2.19					>100	10		>400		
	チアゾニコール		-0.65	-0.31					>100	334.4	0.11	>200	>63000	
	リゾホキシジン		-2.05	-7.51					>600 (1)	227	274.1(k)	403	28517	>10000
	ジヒドロトリスチン(硫酸塩)		2.96	2.17					17.62	0.00026	>100(k)	37.43	879	6.6
	アプロピム(塩酸塩)				0.51			16(Koc)	>100	0.24	0.31	80	226	>1000
	トリクロルホス		400	1.26	0.73	7.12				5.56	5.21	5.1	15.03	
ニトトロリム	4	6.57	5.91		4.82	10.51	2801.3		1.6	0.2	1.36			
ヒチアル		121.3	1.76	2.41	7.34				37.34	64	11.97(k)	98.94	228	
プロモエノホス							2060.5						1190	
ロキシニリン(塩酸塩)			4.01	4.36									258	
シクロロゲン		1.59	3.94	3.82	4.15	2.52							10741	
フェトリン													9.2	
フェトリン													20746	
アリスリ					4.73								3094	
モソニル													低毒性のため算出不能	
ヒドロニルキサイド*	14.3				4.75								381	
ヒペラジン					-1.17	4.19	40500(Koc)					182.74	低毒性のため算出不能	
ヒリアロキシン					5.6								18380	
スチオン(クエトロチオン)													>10000 (1)	
トラメチン													240	
モキシゲチン													>1000	
ベルメチン					-3.05								>3160	
POAG+POPE (3)													>1000 (1)	
ポリアルキルポリメチルグリシン塩酸塩										0.655		1.177	0.009	
カルバアルデヒド*										1.479		0.8126		
塩化シチルシチルアミンモニウム			-0.09	-0.18						5.888	3.943(k)	2.258		
塩化ベンザルモニウム			1.24							0.145		0.8294		
ジクロロイソシアヌレートナトリウム										0.099		0.5042		
										0.197		0.3193		
*: 暫定値														
(1) NOEC														
(2) 2種の藻類 (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 又は <i>Chlorella vulgaris</i>) より得られたEC ₅₀ 値の小さい方の値														
(3) ポリアルキルポリメチルグリシン(POAG)及びポリメチルアミングリシン(PPEG)の混合物														
(k) キットによる藻類 (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) の値														

[プロジェクト研究終了報告]

家畜衛生分野における薬剤耐性菌の実態調査及び疫学研究
(平成 26 ~ 29 年度)

木島まゆみ、川西路子、内山万利子、比企基高、白川崇大、
小島明美、濱本修一、遠藤裕子、小澤真名緒、小池良治

(受付：平成 30 年 8 月 9 日、受理：平成 30 年 10 月 3 日)

[FINAL REPORT OF THE PROJECT STUDY]

**An epidemiological study of antimicrobial resistance in bacteria isolated in
bacteria isolated from domestic animals in Japan
(JVARM activities in fiscal years 2014-2017)**

Mayumi KIJIMA, Michiko KAWANISHI, Mariko UCHIYAMA, Mototaka HIKI, Takahiro SHIRAKAWA,
Akemi KOJIMA, Shuichi HAMAMOTO, Yuuko S. ENDOH, Manao OZAWA, Ryoji KOIKE

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan
(Received: 9th Aug 2018; Accepted: 3rd Oct 2018)*

Abstract

During the fiscal years 2014 to 2017, we conducted the following studies under Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (JVARM) in accordance with Japanese National Action Plan on Antimicrobial Resistance (AMR); 1) AMR monitoring from slaughter houses was launch in 2014, and the monitoring of healthy animals in farm was ended up in 2017, 2) expanded the monitoring in diseased animals, 3) established a monitoring system for diseased companion animals, 4) enhanced collaboration with human sector, 5) performed analysis on AMR genes, including whole genome analysis. These findings are of great importance for controlling the antimicrobial-resistant bacteria in animals, and would facilitate the outcome indices for the National Action Plan.

要旨

動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) として、平成 26 年度から 29 年度に実施した成績を取りまとめるとともに、「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020」に基づいて以下の取り組みを行った。1) 健康家畜由来の薬剤耐性菌モニタリングに関して、平成 24 年度から「と畜場・食鳥処理場由来」のモニタリングを開始し、「農場」モニタリングからの移行を図るとともに、2) 病畜由来の薬剤耐性菌モニタリングの充実、及び、3) 病気の愛玩動物由来の薬剤耐性菌モニタリング体制の構築を行った。また、4) ヒト医療分野との統合的ワンヘルス動向調査に向けた検討、5) 次世

代シーケンサーによる全ゲノム解析の開始等を行った。これらの成績は、薬剤耐性菌の制御を行う上で重要な知見と考えられるとともに、アクションプランの成果指標の推進に寄与するものと考えられた。

緒言

本報告は、平成 26 年度から平成 29 年度までの 4 年間に実施したプロジェクト研究「家畜衛生分野における薬剤耐性菌の実態調査及び疫学研究」について、その成果をまとめたものである。

目的

動物医薬品検査所（動薬検）では、家畜衛生分野における薬剤耐性菌に対するリスク管理対応の一環として、プロジェクト研究という枠組みの中で、動物由来薬剤耐性菌モニタリング（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System：JVARM）¹を実施している。

本プロジェクト研究の目的は、国内において分離される動物由来細菌等の薬剤感受性、動物用抗菌剤の販売量などを継続的に調査・研究することにより、①動物用抗菌剤の慎重使用を喚起してその有効性を確保すること、②動物への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌又は耐性遺伝子が食品等を介して、又は接触等により人へ伝播し、人の細菌感染症の治療を困難にする危険性を評価するための基礎資料を作成することにある。

また、平成 28 年 4 月に、我が国における薬剤耐性菌対策の行動計画である「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン 2016-2020」²（以下、「アクションプラン」）が取りまとめられ、その中で、本調査成績は、畜産分野における全国の薬剤耐性モニタリング成績として評価されるとともに、一層の体制強化及び動向調査の充実を図ることが求められた。このため、平成 28 年以降は、本プロジェクト研究の中で、アクションプランの目標に従った取り組みを実施した。

研究成果の概要

1. 薬剤耐性菌の動向調査・監視体制の確立及び強化

(1) 健康家畜（と畜場及び食鳥処理場）由来の薬剤耐性菌モニタリング

食品安全委員会による食品健康影響評価³において、疫学的評価・検証に耐え得る包括的な薬剤耐性菌のモニタリング体制の構築の必要性が指摘されたことを踏まえ、平成 24 年度から、と畜場及び食鳥処理場における薬剤耐性菌のモニタリングを開始した。本プロジェクトでは、平成 24～27 年度に分離された大腸菌（牛由来 1,126 株、豚由来 511 株、鶏由来 655 株）、カンピロバクター・ジェジュニ（牛由来 514 株、鶏由来 303 株）、カンピロバクター・コリ（牛由来 128 株、豚由来 393 株）及びサルモネラ属菌（鶏由来 463 株）について、農林水産省の委託事業において実施された薬剤感受性試験の確認及び取りまとめ作業を行い、動薬検ホームページに公表した。鶏由来のサルモネラ属菌においては、24 年度以降、カナマイシン（KM）及びスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（ST）に対する耐性率が増加し、アンピシリン（ABPC）の耐性率が減少する傾向が認められたものの、大腸菌及びカンピロバクター属菌については、平成 24 年度以降、明らかな耐性率の増減は認められなかった（図 1）。（<http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/h27kouhyou170926.pdf>）

(2) 健康家畜（農場）由来の薬剤耐性菌モニタリング

全国の農場で飼育されている健康な家畜（肥育牛、肥育豚、ブロイラー及び採卵鶏）由来の薬剤耐性菌モニタリングについては、平成 11 年度から継続して実施してきたが、平成 28 年度から、前

述の「健康家畜（と畜場・食鳥処理場）由来のモニタリング」に全面移行することとなった。このため、本プロジェクトでは、平成 25 年度から 27 年度までに農林水産省の交付金事業により全国の都道府県において実施された薬剤感受性試験の成績について、確認及び取りまとめ作業を行い、動薬検ホームページに公表した。（http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-3.html）

また、「健康家畜（と畜場・食鳥処理場）由来の薬剤耐性菌モニタリングへの移行」に際し、と畜場・食鳥処理場の健康家畜由来株と農場の健康家畜由来株との薬剤感受性の比較を行ったところ、概ね、同様の傾向があることが伺えた（小池ら、158 回日本獣医学会、2015）。なお、農場の健康家畜由来株の薬剤耐性菌モニタリングの成績は、アクションプラン策定の際の基礎資料として使用され、畜水産分野における成果指標の設定根拠とされた。

（3）病気動物由来の薬剤耐性菌モニタリング（その 1）

平成 28 年度から、農林水産省の交付金事業による病性鑑定由来細菌（サルモネラ及びブドウ球菌）の薬剤耐性菌モニタリングを開始した。菌株の分離・同定は都府県で実施し、分離株の薬剤感受性は、臨床検査標準協会（CLSI）に準拠して、①都府県においてディスク拡散法による阻止円直径を測定するとともに、②動薬検において微量液体希釈法による最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。また、黄色ブドウ球菌については、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）かの確認を行うとともに、MRSA については、マルチローカス・シークエンスタイピング（MLST）を実施した。

サルモネラについては、29 都府県から 126 株（牛由来 70 株、及び豚由来 56 株）を収集した。血清型は、牛由来株では、Typhimurium（40.0%）、O4:i:-（21.4%）、Infantis（14.3%）が多く、豚由来株では Typhimurium（39.3%）、O4:i:-（25.0%）、Choleraesuis（12.5%）が多かった。微量液体希釈法における供試株の耐性率は、テトラサイクリン（TC；50.0%）、ABPC（46.0%）で高かったものの、シプロフロキサシン（CPFEX）、セフトキシム（CTX）及びコリスチン（CL）に対しては、3% 未満であった。

黄色ブドウ球菌については、35 都府県から 213 株（牛由来 141 株、豚由来 45 株及び鶏由来 27 株）を収集した。このうち 31 株（牛由来 3 株及び豚由来 28 株）は鼻腔スワブ由来であった。耐性率は ABPC（21.6%）、TC（16.4%）、エリスロマイシン（EM；12.7%）の順に高く、畜種別では豚由来株における耐性率が高かった。また、213 株中 2 株（牛・豚由来各 1 株）が MRSA で、MLST 型は、牛由来株は ST81、豚由来株は ST398 であった（内山ら、第 160 回日本獣医学会、2017）。

また、微量液体希釈法とディスク拡散法による耐性率を比較したところ、セファゾリン（CEZ）を除き、いずれの菌種においても両試験法の成績は概ね一致しており、ディスク拡散法による耐性判定が有効であることが示唆された（小澤ら、平成 29 年度日本獣医師会獣医学術年次大会、2018）。

（4）病気動物由来の薬剤耐性菌モニタリング（その 2）

全国の家畜保健衛生所において病性鑑定等の際に分離された大腸菌（平成 25～28 年度）、パストレラ・ムルトシダ（平成 28 年度）、アクチノバシラス・プルロニューモニエ（平成 28 年度）、豚丹毒菌（平成 28 年度）、マンヘミア・ヘモリチカ（平成 26～27 年度）、クレブシエラ（平成 27 年度）及びヘモフィルス・パラスイス（平成 27 年度）、並びに平成 25～27 年度に分離されたサルモネラ及び黄色ブドウ球菌について、「動物用医薬品の事故防止・被害対応業務による野外流行株の検査」として、菌株を収集し、微量液体希釈法により MIC を測定し、耐性率の動向を調査した。（http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-2.html）

このうち、比較的多くの菌株を経時的に収集することができた大腸菌及び牛由来のマンヘミア・ヘモリチカについて、薬剤耐性率の推移を図 2 及び図 3 に示した。病気動物由来の大腸菌の耐性率（図 2）

は、健康な家畜由来の大腸菌の耐性率(図 1)に比べると高い傾向があり、特に、TC や ABPC に対する耐性率が高かった。一方、マンヘミア・ヘモリチカにおいては、これらの 2 薬剤を含めて、概ね、感受性が維持されていた(木島ら、平成 29 年度日本獣医師会獣医学術年次大会、2018)。これらの病気動物由来の薬剤感受性成績は、獣医療における抗菌剤の選択に寄与すると考えている。

(5) 愛玩(伴侶)動物由来薬剤耐性菌のモニタリング体制の確立

アクションプランにおいて、「愛玩動物における薬剤耐性に関する動向調査・監視体制の確立」が取り組み課題とされたことから、平成 28 年度に動薬検に「愛玩動物薬剤耐性(AMR)調査に関するワーキンググループ」を設置し、モニタリング体制の検討を行うとともに、犬の臨床由来株(大腸菌 101 株及びブドウ球菌属菌 105 株)を収集して事前調査を実施した(川西ら、第 160 回日本獣医学会、2017)。

また、平成 29 年度に、農林水産省の委託事業において、病気の犬・猫由来の大腸菌、コアグラウゼ陽性ブドウ球菌属菌、*Enterococcus* 属菌、*Klebsiella* 属菌 *Enterobacter* 属菌及び *Acinetobacter* 属菌を地域や動物病院に偏りがないように収集し、CLSI に準拠した微量液体希釈法により薬剤感受性試験を実施した。本プロジェクトにおいては、菌株の収集支援等を行った。今後、成績を取りまとめて動薬検ホームページに掲載する予定である。

2. ヒト医療分野との統合的ワンヘルス動向調査に向けた検討(厚生労働省科学研究費補助金による共同研究)

本項目については、厚生労働省科学研究費補助金による共同研究の成績であるが、アクションプランに基づいた動物分野の対応として実施した内容であることから、本プロジェクトの関連成績として、概要を紹介する(3.(1)も同様)。

JVARM と院内感染対策サーベイランス(JANIS)の連携について、主に①大腸菌及びサルモネラ属菌のアンチバイオグラム作成(川西ら、第 158 回日本獣医学会、2015)、②JVARM と JANIS の同系統の薬剤の MIC の比較(比企ら、第 158 回日本獣医学会、2015、小澤ら、第 159 回日本獣医学会、2016)、③コリスチンの感受性試験法の比較(内山ら、第 159 回日本獣医学会、2016)、及び④食鳥処理場及びと畜場の健康家畜から分離された大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*～*mcr-5*)の保有状況について確認した。このうち、中国で最初に報告のあった *mcr-1* の成績については、JVARM の過去の収集株に遡って保有状況を確認して論文として公表した(Kawanishi ら 2016)。

3. 薬剤耐性菌の発生・伝播等に関する検討

(1) 平成 29 年度に国立研究開発法人日本医療研究開発機構の競争的研究資金を用いた共同研究の中で、プロイラー由来のセファロsporin 耐性大腸菌の全ゲノム成績を利用した分子疫学的解析を行った。供試株のシーケンスタイプは異なるものの、*bla*_{CMY-2} のみが存在する IncII 又は IncB/O/K/Z 型プラスミドを保有する株が、国内に広く分布していた可能性等が示唆された(白川ら、第 160 回日本獣医学会、2017)。

(2) 共耐性の遺伝的メカニズムの検討として、TC 耐性大腸菌の耐性伝達試験及びトランスコンジュガントのシーケンス解析を行ったところ、TC 及び CP 耐性遺伝子が同一のプラスミドにのって伝達され、それにより共選択されている可能性が示唆された(小澤ら、第 160 回日本獣医学会、2017)。

(3) コリスチン耐性のサルモネラ属菌について、コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*～*mcr-5*)の保有状

況について確認した。平成 20 年度以降に分離された牛及び豚由来のサルモネラにおいて、*mcr-1* 及び *mcr-3* が検出されたが、検出頻度は低かった。

- (4) 「食用動物由来薬剤耐性菌の定量的食品健康影響評価モデルの確立」のため、JVARM の成績の集計、フルオロキノロン耐性に関わるジャイレース遺伝子 (*gyrA*) の塩基配列の確認及びフルオロキノロン耐性株の鶏腸内における定着性の確認を行った。

4. アクションプランに基づいたその他の取り組み

- (1) 薬剤耐性に関する国際協力の推進；平成 28 年度及び 29 年度に、OIE のコラボレーティングセンターとして、アジアの獣医療分野の政府機関担当者を対象とした短期研修会を実施した。また、平成 28 年度は、医療分野と連携したセミナーを、平成 29 年度は、食品安全分野・OIE 事務局と連携した 2 つのセミナー及びグループワークを実施し、グループ毎の提案を取りまとめた。また、G20 専門家会合、国際機関（コーデックス、国際連合食料農業機関 (FAO)、国際獣疫事務局 (OIE) 他) の活動に参加し、意見等を提出するとともに、韓国、ブルネイ他において日本における薬剤耐性対策・JVARM に関する講演や意見交換を行った。
- (2) 薬剤耐性に対する検査手法の標準化及び広報活動；国内の関係者（家畜保健衛生所、水産試験場及び動物検疫所）向けの研修会（計 11 回）を実施し、検査手法の標準化や意見交換を行った。また、普及誌への投稿、講演会、農林水産省の委託事業による研修 DVD の作成協力等により、積極的に普及啓発活動を行った。

まとめ

2016 年 4 月にアクションプランが取りまとめられ、1) 普及啓発・教育、2) 動向調査・監視、3) 感染予防・管理、4) 抗微生物剤の適正使用、5) 研究開発・創薬、6) 国際協力という 6 つの分野において実施すべき内容が設定された。また、2020 年までに達成すべき成果指標と進捗状況の評価が実施されることとなった。この中で、当所は、畜水産分野の薬剤耐性菌対策の中心的役割を担うこととされ、多くの課題への対応が求められた。

本プロジェクト期間においては、JVARM の基本となるモニタリングとして 1) と畜場・食鳥処理場由来の健康家畜由来の薬剤耐性菌モニタリングを開始し、農場の健康家畜由来の薬剤耐性菌モニタリングからの移行を図るとともに、2) 病気動物由来の薬剤耐性菌モニタリングの充実、及び、3) 病気の愛玩動物由来の薬剤耐性菌モニタリング体制の構築を行った。また、4) ヒト医療分野との統合的ワンヘルス動向調査に向けた検討、5) 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析の開始、6) 共耐性の遺伝的メカニズムの検討や 7) コリスチン耐性遺伝子の調査等を行った。

特に、病気の愛玩動物由来細菌のモニタリング体制の構築及び次世代シーケンサーによる全ゲノム解析の開始は、アクションプランに基づいた先進的な取り組みと考える。

一方、2020 年に向けて、健康な愛玩動物由来のモニタリング体制の構築、ゲノムデータベースの創設、及びアクションプランの成果指標である「大腸菌の TC 耐性率を 2014 年の 45.2% から 2020 年に 33% 以下に低下させる」という大きな課題が課されている。このため、来年度から、アクションプラン課題達成及びその後のフォローアップに向けた新規プロジェクト（フェーズ 5）により、体制を強化しつつ継続的な対応を行う予定である。

学術雑誌への投稿

1. Hiki, M., Usui, M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T. (2014) Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary Journal*. 67, 14.
2. Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T. (2015) Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli* from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. *Foodborne Pathog Dis*. 12, 639-43.
3. Ozawa M, Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Asai T, Hamamoto H. (2016) Molecular Typing of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Isolated from Broilers in Japan Using Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis*. 13, 1-7.
4. Makita M, Goto M, Ozawa M, Kawanishi M, Koike M, Asai T, Tamura Y. (2016) Multivariable Analysis of the Association Between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan. *Microb Drug res*. 22, 28-39.
5. Suzuki, S., Ohnishi, M., Kawanishi, M., Akiba, M., Kuroda, M. (2016) Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis*. 16, 284-5.
6. 小澤真名緒. 家畜由来細菌における薬剤耐性菌の疫学. (2015) *J. Vet. Epidemiol.* 19, 91-95.
7. Kawanishi, M., H. Abo, M. Ozawa, M. Uchiyama, T. Shirakawa, S. Suzuki, A. Shima, A. Yamashita, T. Sekizuka, K. Kato, M. Kuroda, R. Koike, and M. Kijima. (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.
8. Ohishi, T., Aoki, K., Ishii, Y., Usui, M., Tamura, Y., Kawanishi, M., Ohnishi, K., and Tateda, K. (2017) Molecular epidemiological analysis of human- and chicken-derived isolates of *Campylobacter jejuni* in Japan using next-generation sequencing. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 23, 165-172
9. Hiki, M., Shimizu, Y., Kawanishi, M., Ozawa, M., Abo, H., Kojima, A., Koike, R., Suzuki, S., Asai, T., Hamamoto S. (2017) Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third-generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29, 716-72.
10. 川西路子 (2016) JVARM (動物由来薬剤耐性菌モニタリング) の取り組み. *日本豚病研究会会報* 68, 12-18.
11. 小澤真名緒 (2016) 豚由来薬剤耐性菌の疫学. *日本豚病研究会報* 68, 19-23.
12. 木島まゆみ (2016) 薬剤耐性に関する国際動向の紹介. *日本獣医師会雑誌* 69, 499-504.
13. 内山万利子 (2016) 慎重使用のガイドライン. *日本獣医師会雑誌* 69, 568-572.
14. 小澤真名緒 (2016) 薬剤耐性機構. *日本獣医師会雑誌* 69, 713-717.
15. 川西路子 (2016) 日本の畜産現場における動物用抗菌性物質製剤の使用と薬剤耐性の現状. *養豚界* 11月号
16. 川西路子 (2017) 動物由来細菌薬剤感受性調査 (JVARM) の概要と薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランへの対応. *日本獣医師会雑誌* 70, 14-17.
17. 川西路子 (2017) 動物用抗菌性物質製剤のリスク管理. *獣医師会雑誌* 70, 139-141.
18. 松田真理, Nigel C. L. Kwan, 川西路子, 小池良治, 杉浦勝明 (2017) 日本における家畜バイオ

マス重量あたりの抗菌剤使用量の評価－細井らの方法と EU の方法による評価結果の比較－．家畜衛生学雑誌 42, 191-197.

19. Sekizuka, T., Kawanishi, M., Ohnishi, M., Shima, A., Kato, K., Yamashita, A., Matsui, M., Suzuki, S. & Kuroda, M. (2017) Elucidation of quantitative structural diversity of remarkable rearrangement regions, shufflons, in IncI2 plasmids. *Scientific Reports* 7: 928.
20. 木島まゆみ (2017) 日本及び欧州における薬剤耐性対策状況－動向調査から普及啓発まで－．家畜衛生学雑誌 43, 93-96.
21. 木島まゆみ (2017) 愛玩 (伴侶) 動物における薬剤耐性モニタリング．日本獣医師会雑誌 70, 412-416.
22. 小澤真名緒 (2017) 動物用抗菌剤の各論 (その 1) ペニシリン系抗生物質．日本獣医師会雑誌 70, 488-491.
23. 白川崇大 (2017) 動物用抗菌剤の各論 (その 2) セファロsporin系抗生物質．日本獣医師会雑誌 70, 562-565.
24. 内山万利子 (2017) 動物用抗菌剤の各論 (その 3) アミノグリコシド系抗生物質．日本獣医師会雑誌 70, 626-629.
25. 川西路子 (2017) 動物用抗菌剤の各論 (その 4) ペプチド系抗生物質．日本獣医師会雑誌 70, 707-710.
26. 木島まゆみ (2017) 動物用抗菌剤の各論 (その 5) マクロライド系及びリンコマイシン系抗生物質．日本獣医師会雑誌 70, 772-776.
27. 木島まゆみ (2018) 豚における薬剤耐性菌の動向 - 国内及び海外における取り組み -. 日本豚病研究会報 71, 4-9.
28. 内山万利子 (2018) 動物用抗菌剤の各論 (その 6) テトラサイクリン系抗生物質．日本獣医師会雑誌 71, 10-14.
29. 小澤真名緒 (2018) 動物用抗菌剤の各論 (その 7) その他の抗生物質．日本獣医師会雑誌 71, 74-76.
30. 白川崇大 (2018) 動物用抗菌剤の各論 (その 8) フェニコール系抗菌剤．日本獣医師会雑誌 71, 112-116.
31. 小澤真名緒 (2018) 米国食品医薬品局 (FDA) における抗菌剤使用規制．畜産技術 3, 31-34.

謝辞

本プロジェクト研究の実施に当たり、多大な尽力を頂いた全国の家畜保健衛生所他の関係者各位に深謝します。

引用文献

1. 動物医薬品検査所ホームページ：家畜分野での薬剤耐性菌のモニタリング
2. 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議 (2016) 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020.
3. 食品安全委員会：牛及び豚に使用するフルオロキノロン系抗菌性物質製剤に係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価 (2010年3月)

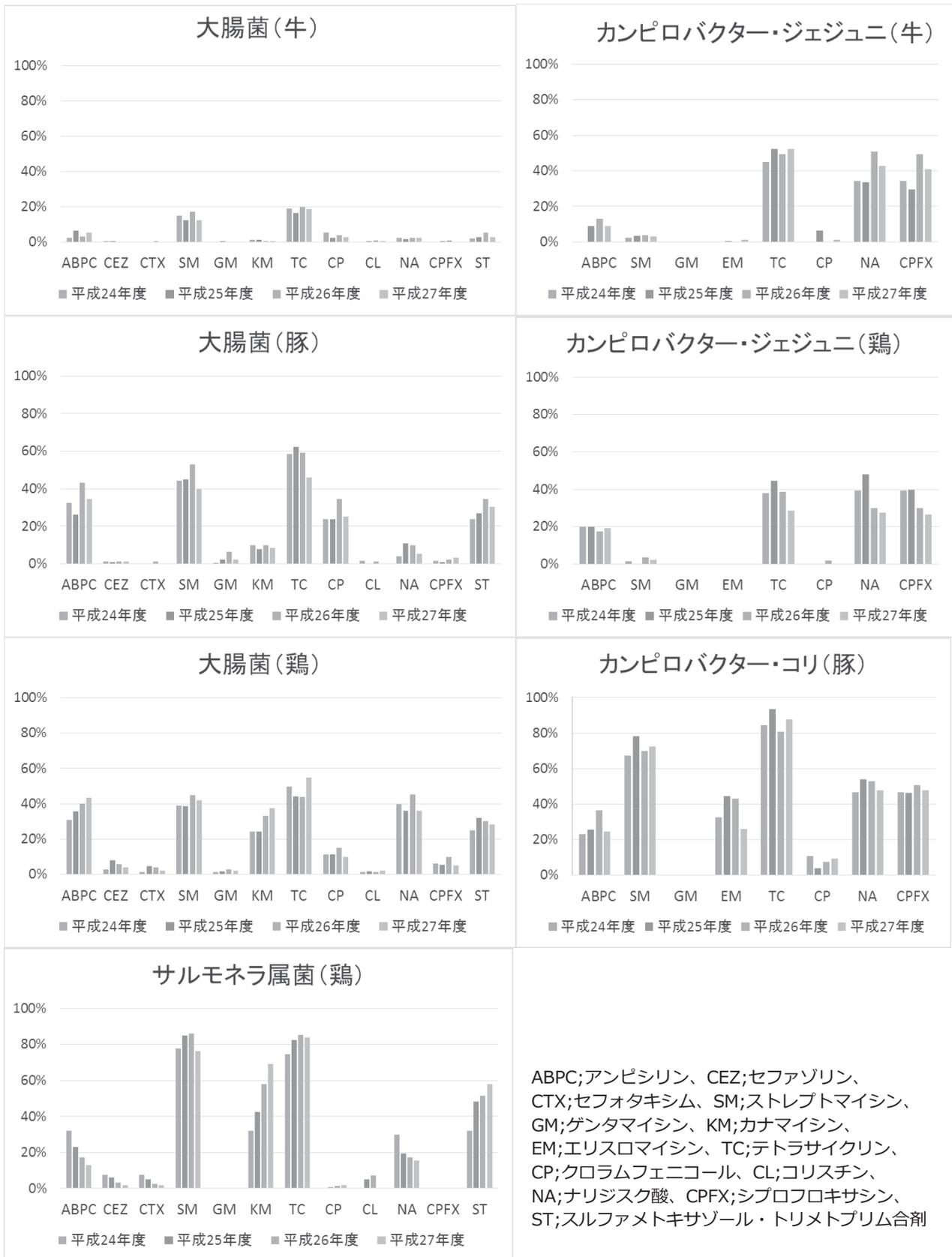
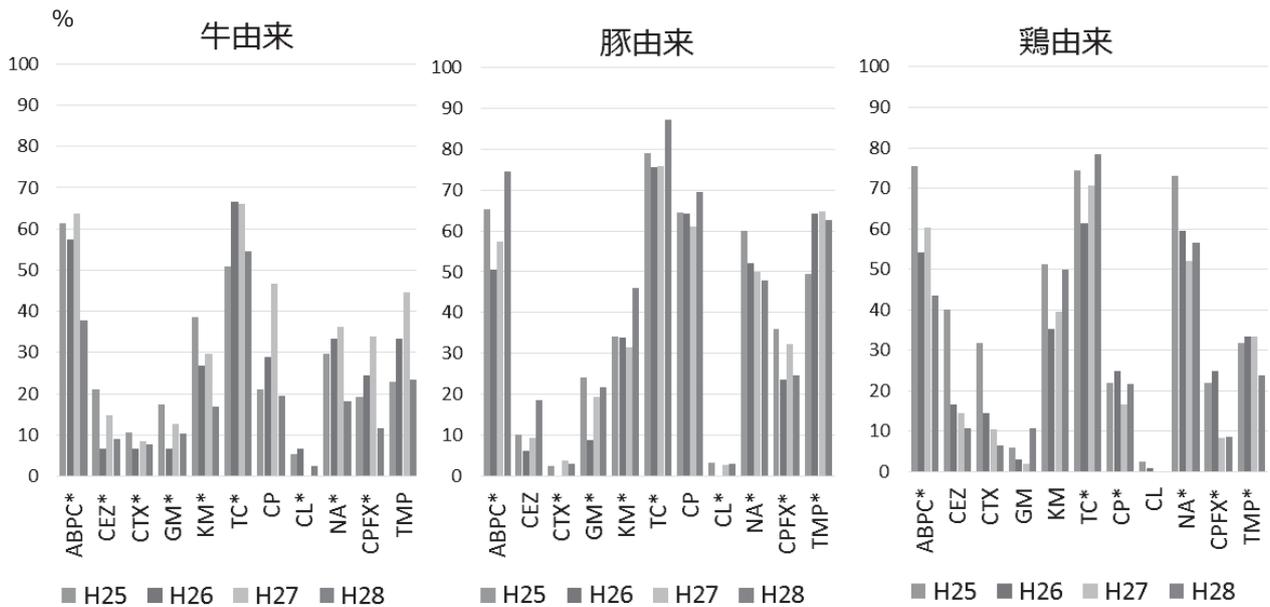
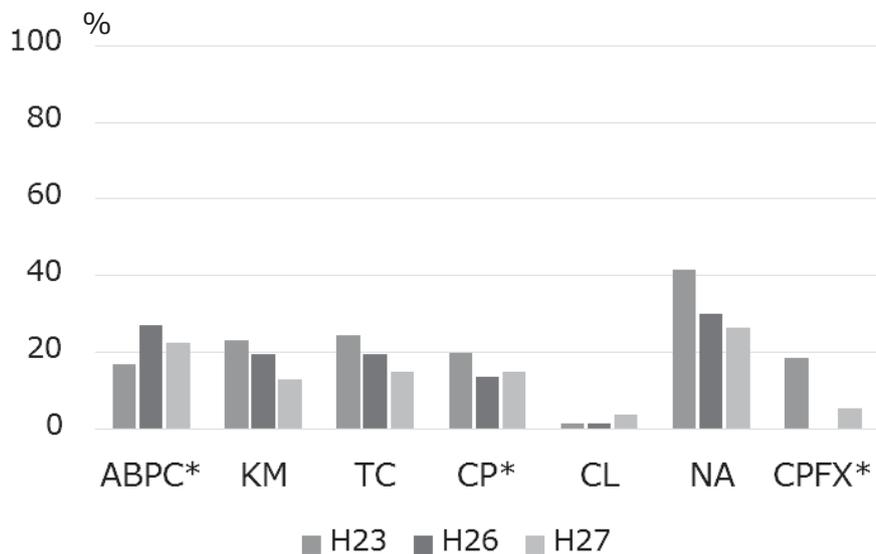


図1. 健康家畜(と畜場・食鳥処理場)由来株の薬剤耐性率の推移



ABPC ; アンピシリン(ブレイクポイント(BP):32)、CEZ ; セファゾリン(BP:32)、CTX ; セフトキシム(BP:4)、GM ; ゲンタマイシン(BP:16)、KM ; カナマイシン(BP:64)、TC ; テトラサイクリン(BP:16)、CP ; クロラムフェニコール(BP:32)、CL ; コリスチン(BP:16)、NA ; ナリジクス酸(BP:32)、CFX ; シプロフロキサシン(BP:4)、TMP ; トリメトプリム (BP:16)
 *印 ; 同系統の抗菌薬が大腸菌に対する効能を有しているもの。

図2. 病気動物由来大腸菌の薬剤耐性率の推移



ABPC ; アンピシリン(ブレイクポイント(BP):2)、KM ; カナマイシン(BP:128)、TC ; テトラサイクリン(BP:8)、CP ; クロラムフェニコール(BP:8)、CL ; コリスチン(BP:4)、NA ; ナリジクス酸(BP:16)、CFX ; シプロフロキサシン(BP:2)
 *印 ; 同系統の抗菌薬がマンヘミアに対する効能を有しているもの。

図3. 病気の牛由来マンヘミア・ヘモリチカの薬剤耐性率の推移

IncI2 プラスミドに存在する高度組換え領域 shufflon の定量的構造多様性の解明

関塚 剛史¹, 川西 路子², 大西 守², 島 綾香³, 加藤 健吾¹, 山下 明史¹, 松井 真理³, 鈴木 里和³

IncI1 および I2 プラスミドには、高頻度に組換えが生じる領域、shufflon が存在する。Shufflon は、部位特異的組換え酵素 Rci により、線毛構成成分の PilV タンパクをコードする rci 遺伝子を含む segment の組換えを生じさせる。これにより、異なる型の PilV が形成され、リポポリサッカライドの異なる糖鎖への結合特異性が変化し、IncI 系プラスミドは多種の腸内細菌科細菌に接合伝達される。Shufflon 領域は、高頻度な組換えを分離クローン中で生じるため、配列決定が非常に困難な領域である。本研究では、*mcr-1* 保有 IncI2 プラスミドを有する 3 株のコリスチン耐性大腸菌の全ゲノム配列を一分子シーケンサー (PacBio RSII) およびショートリードシーケンサー (Illumina MiSeq) を用いて決定した。解析の結果、ロングリードの解読が可能な PacBio データのみでは、shufflon 領域でミスアセンブルを生じていたが、ロングおよびショートリードを共に用いた精査により、shufflon 領域のミスアセンブルが解消された。得られた 3 者の IncI2 プラスミドは、高度に保存されていたが、shufflon 中の segment の個数が異なっていた。また、各 IncI2 プラスミドの全 shufflon の定量的構造多様性解析を行った結果、IncI2 プラスミドはシングルコピーのプラスミドであったが、shufflon 構造の存在比率には顕著な不均一性が認められた。本研究により、完全長配列を取得する際、shufflon のみならず、高頻度に組換えが生じる領域は、ロングおよびショートリードを用いた確認が必須であることが示唆された。更に、PilV の構造多様性は、分離クローン集団内における、プラスミド水平伝達の表現形質の不均一性と密接に相関することが示唆された。

(Science report 2017 19:7(1):928.)

-
- 1 国立感染症研究所・病原体ゲノムセンター
 - 2 大西獣医微生物ラボラトリー
 - 3 国立感染症研究所・細菌第二部

家畜暴露レベルを指標とした日本の動物用抗菌剤使用量の算出

松田真理¹, 磯村れん¹, Nigel C. L. Kwan¹, 川西路子, 小澤真名緒, 木島まゆみ, 杉浦勝明¹

家畜への抗菌剤の使用は、薬剤耐性菌が選択される原因となる。このため、耐性菌の選択圧を測定できる指標を用いた抗菌薬使用量モニタリングが重要である。家畜の抗菌剤使用量の評価において用量を反映する方法の一つに Defined Course Dose (DCD) を用いる方法があり、今回我々は DCD をベースとした家畜の抗菌剤暴露レベル (Animal Level of Exposure for Antimicrobials: ALEA) を用いて日本の家畜の抗菌剤使用量の解析を行った。各抗菌剤の投与対象動物および投与経路ごとに承認された用量に基づいて DCD を設定し、2005 年～2015 年の有効成分販売重量と家畜バイオマス重量

からその家畜の中で抗菌剤に暴露された割合（ALEA）を算出した。ALEAでも有効成分重量でもテトラサイクリン系が最も多かったが、その次は有効成分重量ではサルファ剤であったが、ALEAではペニシリン系となった。またALEAではサルファ剤とトリメトプリム（オルメトプリムを含む）が近い暴露レベルを示すなど、他の指標（バイオマス当たりの有効成分販売重量など）に比べ、実際に投与されている状況をより反映していると考えられた。

（家畜衛生学雑誌 2018年43巻4号）

1 東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻国際動物資源科学研究室