

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

研究分担者 菅井 基行 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター長

研究要旨

WHOが進めている薬剤耐性サーベイランスGLASSに日本のデータを提出し、結果は各国のデータとともにWHOのホームページで公開された。国内のESBL産生菌のゲノム解析候補菌の選定と一部の解析を実施した。また下水からの大腸菌及びESBL産生大腸菌の選択的分離方について検討した。コリスチン耐性に関わる*mcr*遺伝子の全てのバリエントを同時に検出することが可能なmultiplex PCR法を新たに開発した。

A. 研究目的

ワンヘルスアプローチによる薬剤耐性サーベイランス体制構築を目的として、動物医薬品検査所ならびに地方衛生研究所と協力し、人由来細菌のサーベイランス JANIS、家畜由来細菌のサーベイランス JVARM、ならびに食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを抽出、集計、統合し解析して、継続的に相互のデータ比較を行う。大腸菌、腸球菌、サルモネラについて、JANIS、JVARMのデータ比較を行う。H30年度は2017年のデータ、H31年度は2018年のデータ、H32年度は2019年のデータを解析する。サルモネラについては食品由来細菌のデータについても比較する。薬剤耐性に関する国のサーベイランスデータを用いて、ワンヘルスアプローチをナショナルレベルのデータで進めるのがこの研究の特色である。結果を研究班に提供し、家畜、食品、人の中での薬剤耐性菌／遺伝子の伝播状況の総合的な理解に資する。

また、WHOは2015年から薬剤耐性のグローバルサーベイランス (GLASS) を開始し、各国にナショナルデータの提出を求めている。GLASSはまず人由来検体から始め、将来的に食品由来検体も加えることが検討されている。この研究では分担者四宮（地方衛生研究所）ならびに分担者大西（国立感染症研究所細菌第一部）の協力も得てGLASSに提出するための各菌種のデータを JANIS そ

他の調査から収集、集計する。GLASSはJANISが通常実施している集計とは異なる集計手法を指定しているため、通常のJANISの集計とは別途に集計を行い、GLASSが指定するファイル形式ファイルを作成し、GLASSに提出する。H30年度は2017年のデータを集計し、GLASSに提出する。

前年度までの成果からESBL産生腸内細菌科細菌株の分離率において家畜（鶏肉）由来では減少が見られるのに対し、ヒト由来ではむしろ増加傾向にあることが明らかとなった。この違いは何に起因するのかを明らかにするための基盤情報を整えるためにヒト由来代表株においてESBL遺伝子保有プラスミドを含むゲノム解析を行い（H30-31年）、経年的な分子疫学解析を行う（H31-32年）とともに家畜由来株の保有するプラスミドとの比較解析を行う（H31-32年）。またプラスミド性コリスチン耐性遺伝子*mcr*は現在*mcr-1*から*mcr-5*までのバリエントが存在するが、国内では*mcr-1*, *-3*, *-5*が検出されている。国内で収集された家畜由来または食肉由来*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性腸内細菌科細菌株において*mcr*遺伝子保有プラスミドを含むゲノム解析を行い（H30-31年）、プラスミドの比較解析を通して国内での*mcr*保有株の分子疫学を明らかにする（H32年）

B. 研究方法

大腸菌、腸球菌の薬剤耐性について、JANIS で集計されている入院患者全検体由来のデータと、JVARMで集計されている牛、豚、鶏由来のデータを比較し、情報をホームページ等で公開する。大腸菌、腸球菌、サルモネラについて、JANIS、JVARMのデータ比較を行う。JVARMのデータは分担者の川西、サルモネラは分担者の四宮より提供を受ける。JANISでは、各菌種とも数万株の規模のデータを集計する。JVARMならびにサルモネラでは数百株の規模のデータを集計する。H30年度は2017年のデータ、H31年度は2018年のデータ、H32年度は2019年のデータを解析する。サルモネラについては食品由来細菌のデータについても比較する。サーベイランス間で共通している薬剤や同系統の薬剤の耐性率を比較したデータを研究班に提示して、研究班内で人、家畜、食品の間で薬剤耐性菌／耐性遺伝子がどのように伝播しているのかを総合的に解析するための情報に資する。なお、一般公開する比較データについては農水省、厚労省と十分に協議し、一般国民や畜産など関係業界に情報が適切に伝わるように十分留意する。ホームページは国立国際医療研究センターが設置するワンヘルス Web ホームページを用い、掲載データは研究班で作成する。

WHOのグローバルサーベイランス(GLASS)については、これまでに作成した解析プログラムを用いて引き続きデータの集計を進める。H30年度は2017年のデータを集計し、GLASSが指定するデータ形式のファイルを作成して提出する。GLASSが求めるデータのうち、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌についてはJANISのデータベースから必要なデータを抽出する。サルモネラについては、分担者の四宮が全国の地方衛生研究所と協力して収集するデータを提供してもらおう。淋菌、赤痢菌については分担者の大西が収集するデータを提供してもらおう。それぞれの菌種で、数百から数万株のデータを集計する予定である。これらのデータをもとに、GLASSが指定するデータ形式のファイルを作成する。H31年度、H32年度も同様に2018年、2019年のデータを集

計し、GLASSに提出する。

腸内細菌科細菌におけるESBL産生株や*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性株は、地方衛生研究所、酪農学園大学、広島大学などの研究班の分担または関係機関と連携して収集する。連携研究機関では、主にディスク法による薬剤感受性試験の結果を指標に耐性菌株を収集し、ESBL遺伝子および*mcr*遺伝子の検出をmultiplex PCRにて検討する。ESBL産生性の確認は、ESBLの阻害薬であるクラブラン酸を用いたダブルディスク法、MCR産生性の確認は、MCRの阻害剤であるジピコリン酸を用いたダブルディスク法を用いてそれぞれ行う。感染研では、菌種同定の確認をMALDI Biotyper (Bruker社)、より詳細な薬剤感受性パターンの測定をMicroScan Walkaway (Beckman Coulter社)を用いてそれぞれ行う。細菌ゲノムの解析は短鎖型シーケンサーであるMiniSeq/MiSeq/HiSeq/NovaSeqシステム(Illumina社)にて行い、MLST (multilocus sequence typing) による菌株遺伝型の型別、ResFinderによる薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finderによる保有プラスミドの型別を行い、菌株のメタデータと組み合わせた分子疫学解析を行う。各耐性株の代表株を選別し、長鎖型シーケンサーであるMinION (Oxford Nanopore Technologies社)を併用して完全ゲノム配列を構築し、BLASTとACT (Artemis Comparison Tool)によるプラスミドの配列比較を行う。

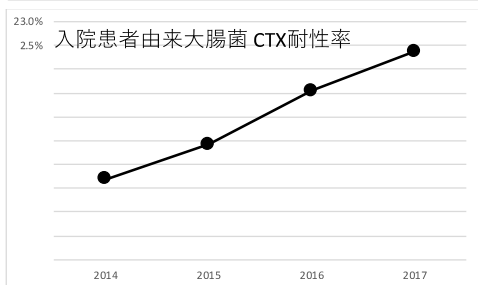
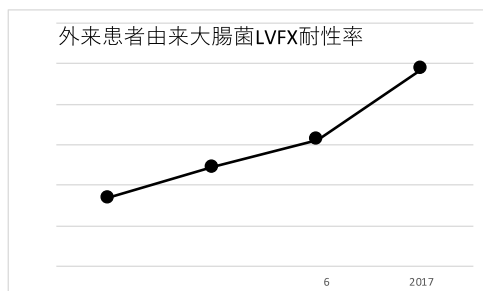
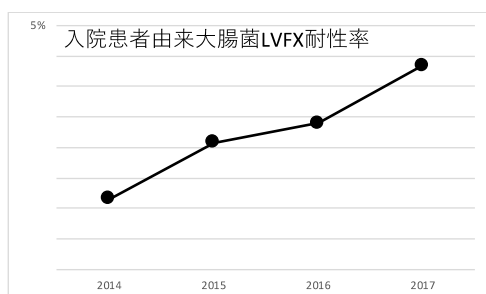
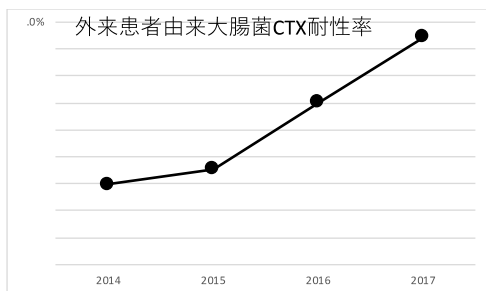
(倫理面への配慮)

## C. 研究結果

### 1. GLASSへの報告

WHOが進めているサーベイランスGLASSについては、JANISデータベースから2016年、2017年の血液由来大腸菌、*A. baumannii*、*K. pneumoniae*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、ならびに尿由来大腸菌、*K. pneumoniae*のデータを抽出し、集計した。各菌種とも数千から数万株のデータを集計しGLASS指定フォーマットのファイルを作成し、GLASSに提出した。淋

菌、赤痢菌については分担者大西から国立

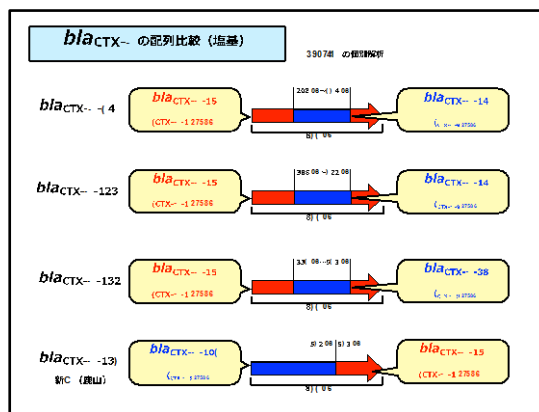


感染症研究所細菌第一部が持つ2017年のデータの提供を受けた。便由来サルモネラについては、分担者四宮より地方衛生研究所が集計した2016年、2017年分のデータの提供を受け、集計を行なった。地方衛生研究所では、独自のエクセルファイルでデータを管理しているため、データをGLASS指定フォーマットのファイルに変換するため、WHOが無償で配布している変換ツールBac Linkと集計ソフトWHONETを活用し作業で提出用ファイルを作成した。今回集計を行なったものの中では、特に大腸菌で近年耐性率の上昇が顕著だった(下図)。

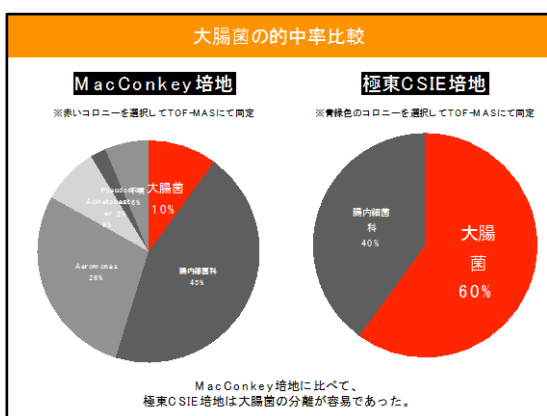
他の菌種では耐性率はほぼ横ばいまたはやや減少傾向にあった。GLASSは今後も各国にデータの提出を求める予定であり、さらに将来的にはGLASSの集計方式が薬剤耐性サーベイランスの世界標準となる可能性があるため、今後もデータの集計を継続する必要がある。なお、GLASSは各菌種において、各薬剤で試験を行う菌株数を同じにすることを前提としているが、JANISはもともと病院が測定しているデータを収集しているため薬剤ごとに測定菌株数が異なるという問題がある。この点についてGLASS責任者とオンライン会議を行い、技術協議を行った。JANIS側で、薬剤感受性試験を実施した株数が最大の薬剤の数を便宜的に分離株数と定義することにして、集計プログラムを作成した。2019年2月に公開されたGLASS reportに日本のデータも掲載された。(https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2017-2018/en/)

## 2. ESBL産生菌、mcr遺伝子保有コリスチン耐性菌の解析

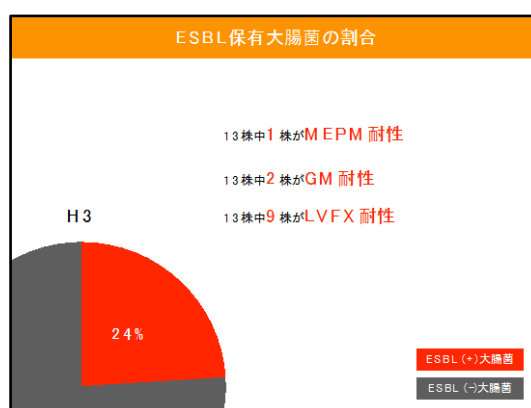
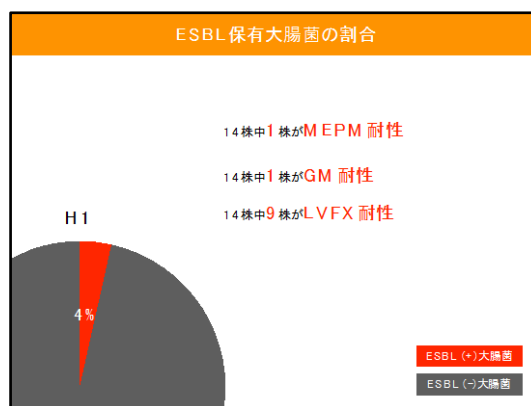
今までに収集済みの臨床分離ESBL陽性腸内細菌科細菌株の分子疫学的解析を目的にドラフトゲノム取得を行い、菌株(大腸菌、肺炎桿菌など)およびESBL遺伝子の型別を進め、プラスミドを含む完全ゲノム解析を行う菌株の選定を行った。この過程で、広島にて検出された新規CTX-M遺伝子をCTX-M-137と名付けた。これは、CDSの5'側配列がCTX-M-9グループで、3'側配列がCTX-M-1グループという、非常に特徴的な塩基配列を有していた。



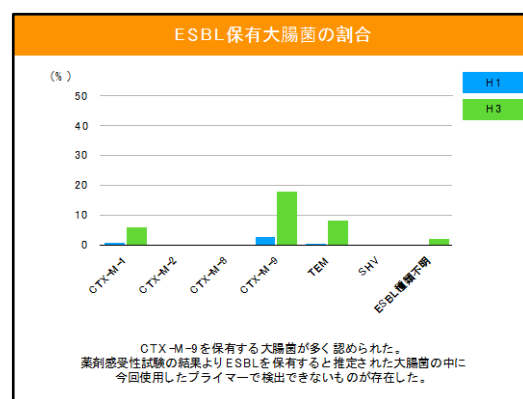
次年度から施行される WHO Tricycle Surveillance Project のための呼び検討を行った。下水中の薬剤耐性菌に着目し、環境由来の ESBL 産生大腸菌の調査をするための条件検討を実施した。広島市内の下水処理施設に許可を頂き、下水中の ESBL 産生大腸菌が大腸菌全体の中で占める割合を調査した。BTB 培地、MacConkey 培地、1  $\mu$ g/mL CTX 添加 MacConkey 培地、CHROMager ESBL 培地、CHROMager mSuperCARBA 培地、極東 CSIE 培地を使用し、どの組み合わせが最も効率的に割合を算出できるか条件検討を行った。その結果、環境から効率的に大腸菌のみを分離する培地として、MacConkey 培地よりも極東 CSIE 培地のほうが適していることが明らかになった（下図）。



このような条件検討をもとに算出された“ESBL 産生大腸菌が全大腸菌に占める割合”は、下水を採取した場所により 4~24% とかなりの差が認められることが判明した（下図）。これらの大腸菌は、ESBL を保有しつつアミノグリコシド系、キノロン系の薬剤にも耐性を示したため、今後さらに解析する必要が認められた。

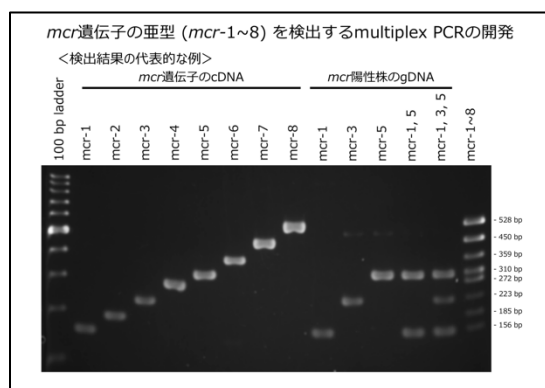


また、CTX-M-9 group の検出が多い場所が存在し、PCR での型別分類が不可能な ESBL の存在も認められた（下図）。



プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は、2018 年 4 月以降、*mcr-6* から *mcr-8* まで 3 種類の新たなバリエーションが報告された。また、既知の *mcr-1* から *mcr-5* に関しても、数多くの遺伝子多型が報告された。そのため、今年度は *mcr-1* から *mcr-8* まで全てのバリエーションを同時に検出することが可能な multiplex PCR 法を新たに開発した。ドラ

フトゲノム配列を解析済みの国内家畜分離コリスチン耐性大腸菌 86 株を同検出系を用いて解析した結果、*mcr-1*、*mcr-3*または*mcr-5*の単独陽性株、*mcr-1*および*mcr-5*の共陽性株、*mcr-1*、*mcr-3*および*mcr-5*の共陽性株を問題なく検出することが可能であり、今後有用な検査法と考えられた（下図）。



国内の分離株に加え、中国・華南農業大学との共同研究にて、中国の家畜分離腸内細菌科細菌300株超を同検出系を用いて解析した結果、大腸菌または肺炎桿菌にて、*mcr-1*または*mcr-3*の単独陽性株、*mcr-1*および*mcr-8*の共陽性株を検出した。

日本および中国の分離菌株において、複数の*mcr*遺伝子が同時に検出された菌株の代表的な6株に関して完全ゲノム配列を決定したところ、各々の*mcr*遺伝子は異なる種類のプラスミド上にコードされていた。またイムノクロマト法による MCR-1 検出キットの MCR ヴァリアントの検出能について評価した。現在、中国における薬剤耐性菌株の収集を継続している。

#### D. 考察

##### 1. GLASSへの報告

GLASSが求めるデータフォーマットでは、菌株のデータを入院外来別、年齢群別、性別、検体別に層別化している。一方、JANISでは通常入院患者のみを対象として、年齢、性別、検体を分けていない。GLASSの集計で、検体や入院外来別で薬剤耐性率に違いがあることが明らかになった。今後

JANISにおいてもGLASSに準じた集計を進めていく必要があると考えられる。他の研究班とも連携し、公開するデータの形式を検討していきたい。

##### 2. ESBL産生菌、*mcr*遺伝子保有コリスチン耐性菌の解析

国内ではこのような耐性大腸菌について、今後はESBLの型別分類を進めると共にプラスミドの全長配列解析を進め、さらに他の薬剤に対する耐性遺伝子の保有状況も調査する必要がある。また次年度はWHOが主導するTricycle Surveillanceに参加するため、ヒト、食品、動物由来のESBL陽性腸内細菌科細菌株が保有する薬剤耐性プラスミドの比較解析を行う。予備実験からは下水由来大腸菌の分離にはBTX培地などを使用し、効率の良い方法についてさらに検討する必要がある。2019年2月に新たな*mcr*バリエント (*mcr-9*) の存在が示唆された。そのため、今後、現在の*mcr-1*から*mcr-8*を標的としたmultiplex PCR法に*mcr-9*も標的に加え、改めて評価を行いたい。また、*mcr*遺伝子の全てのバリエントを同時に検出することが可能なmultiplex PCR法と完全ゲノム解析を駆使して、国内において環境および食品由来の*mcr*陽性コリスチン耐性菌株のゲノム疫学解析も併せて進めていきたい。

#### E. 結論

WHOが進めている薬剤耐性サーベイランスGLASSに日本のデータを提出した。GLASSが求めるデータを全て提出し、結果は各国のデータとともにWHOのホームページで公開された。

国内のESBL産生菌のゲノム解析候補菌の選定と一部の解析を実施した。また下水からの大腸菌及びESBL産生大腸菌の選択的分離方について検討した。*mcr*遺伝子の全てのバリエントを同時に検出することが可能なmultiplex PCR法を新たに開発した。複数の*mcr*遺伝子が同時に検出された菌株において、各々の*mcr*遺伝子は異なる種類のプラスミド上にコードされていた。

#### F. 健康危険情報

人由来の大腸菌の薬剤耐性率の上昇が顕著である。対策強化が急務である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Detection of *mcr-1* mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. Chiba N., Tanimoto, K., Hisatsune J., Sugai M., Shibayama K., Watanabe H. Tomita H. J. Glob. Antimicrob. Resist. 16:249-250, 2019.

##### 2. 学会発表

1. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan、口頭(英語)、柴山恵吾、第15回全国抗感染薬物臨床薬理学会、第3回全国細菌薬剤耐性監視大会、第2回北京大学医学感染症フォーラム(中国北京)、2018/6/3、国外
2. 新たな薬剤耐性菌の時代—忍び寄る脅威にどう立ち向かうか—、口頭、菅井基行、第64回中国地区公衆衛生学会 特別講演(広島)、2018/8/21、国内
3. JANIS から見たわが国の薬剤耐性菌の現状、口頭、柴山恵吾、第47回薬剤耐性菌研究会(松本)、2018/11/16、国内
4. 多剤耐性グラム陰性菌に有効な抗菌ポリマーの開発、口頭、成瀬 秀則、一久 和弘、井本 裕顕、平林 亜希、柴山 恵吾、鈴木 仁人、第47回薬剤耐性菌研究会(松本)、2018/11/16、国内
5. JANIS サーベイランスの概要、口頭、柴山恵吾、第31回日本外科感染症学会総会(大阪)、2018/11/29、国内
6. Current situation and challenges of

AMR in Japan, 口頭(英語), Motoyuki Sugai, Japan-China-Korea Forum, 2018/12/05

7. わが国の医療分野における AMR 対策の動向、口頭、菅井基行、第8回家畜感染症学会学術集会、2018/12/7、国内
8. わが国の薬剤耐性菌の動向 シンポジウム 感染症と臨床検査、口頭、菅井基行、第29回生物試料分析科学会年次学術集会 2019/2/10
9. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan、口頭(英語)、柴山恵吾、Tokyo AMR One-Health Conference(東京)、2019/2/20、国内
10. Recent trends in antimicrobial resistance in nosocomial pathogens in Japan, 口頭(英語), Motoyuki Sugai, Tokyo Amr One-Health Conference(東京)、2019/02/20、国内
11. Quiet threat, 口頭(英語), Motoyuki Sugai, U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program Acute Respiratory Infections Panel Meeting(ハノイ)、2019/3/1
12. わが国における AMR 対策と薬剤耐性菌サーベイランス、口頭、菅井基行、第139年会 日本薬学会、国内、2019/3/23  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし