

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。

国内のヒト由来ESBL産生菌のゲノム解析候補菌の選定とプラスミド・ゲノムシーケンス解析を実施した。また市場で出回っている食肉、野菜由来の薬剤耐性菌プラスミド・ゲノム シーケンス解析を実施した。コリスチン耐性に関わる*mcr*遺伝子の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。

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、人の間での薬剤耐性菌／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 その他の調査から収集、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。R1年度は2018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-R1年）、経年的な分子疫学解析を行う（R1-R2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-10*までのバリエーションが存在するが、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-R1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（R2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。令和元年度は2018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。また GLASS の求める検

査材料別の重複処理を行う機能を開発する。令和元年度、令和2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を測定する 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

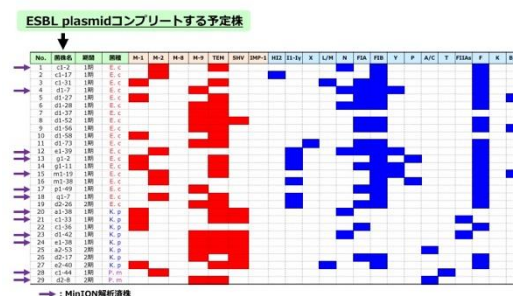
WHOが進めているサーベイランス GLASS については、JANIS データベースから 2016年、2017年の血液由来大腸菌、*A. baumannii*、*K. pneumoniae*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、ならびに尿由来大腸菌、*K. pneumoniae* のデータを抽出

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2018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2017年、2018年分のデータの提供をうけ、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BacLinkと集計ソフトWHONETを活用し提出用ファイルを作成した。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。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。GLASSの求める検査材料別の重複処理を行う機能を実装した集計プログラムを開発し、WHO GLASSへの集計データ提出を初めて、当初締切である7月中に終わることが出来た。また、その過程で、GLASSの重複処理とJANISの重複処理の違いを整理し、その違いによる薬剤耐性率の集計値のずれが軽微であることを示した論文を作成し、国際誌に投稿した。

## 2. ESBL産生菌、mcr遺伝子保有コリステン耐性菌の解析

広島県で2008.11月～2017.10月の10年間収集したヒト臨床分離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。29株を選択し、うち13株のゲノム解析を実施した。その結果、11のESBL plasmidの完全配列を取得した。次年度は引き続き解析を継続

### ESBL plasmid replicon typing strains

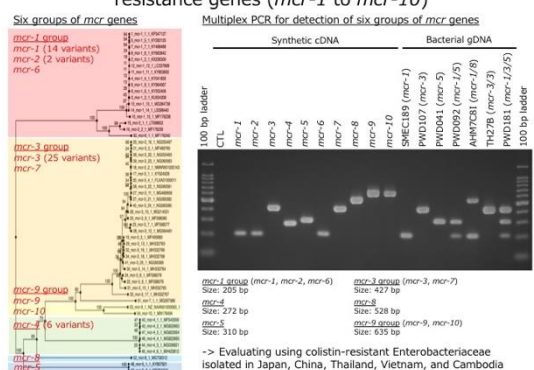


し、全株の完全配列取得を目指す。また市場で入手可能な肉・野菜由来の耐性菌のゲノム解析を行った。その結果、エジプト産牛肉より分離された*Enterobacter cloacae*より *bla<sub>TEM-1</sub>*, *mcr-9*を保有するプラスミドを得た。また国産野菜から分離された*Klebsiella pneumoniae*より *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>* 保有プラスミド、*bla<sub>CTX-M-14b</sub>* 保有プラスミドをえた。次年度から施行されるWHO Tricycle Surveillance 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4施設で採水し、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。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、およそ11%であった。ESBL産生大腸菌の98%はCTX-M型耐性遺伝子を保有し、ESBL産生大腸菌の19%がS T131であった。ESBL産生大腸菌42株のうち14%がアミノグリコシド耐性、57%がキノロン耐性を示し、3薬剤耐性菌は2%であった。今後さらに解析する必要が認められた。

### 4下水処理場下水中のESBL産生大腸菌



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-10*まで5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-10*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外分離コリスチン耐性大腸菌140株について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）。獲得性のポリミキシン耐性遺伝子 (*mcr-1*~*mcr-10*) の検出を行う新たなmultiplex PCR法の開発を行い、日本、中国、タイ、ベトナム、カンボジア由来のコリスチン耐性腸内細菌科細菌株から*mcr*陽性株の検出を行った。地方衛生研究所にmultiplex PCR法のプライマー配列およびPCR条件を情報共有し、陽性コントロール (*mcr-1*~*mcr-10*のDNA) の配布を行った。

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ヴァリエーション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

今後はさらにESBLプラスミドの全長配列解析を進め、それを元に分子疫学解析をする必要がある。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。今後、*mcr*遺伝子の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について予備検討した。*mcr*遺伝子の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。

## 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

なし

2. 学会発表

1. 世界と我が国の耐性菌疫学と JANIS の今後、口頭(日本語)、菅井基行、第 116 回日本内科学会シンポジウム、薬剤耐性への国家的アクションプラン(名古屋)、2019/4/26、国内
2. 厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)からみた評価と課題、口頭(日本語)、柴山恵吾、第 94 回日本感染症学会学術集会総会(東京)、2019/4
3. Strengthening AMR surveillance and AMR Bacterial Bank –Our efforts in AMR Research Center-、口頭、菅井基行、第 2 回 AMR シンポジウム(東京)、2019/5/27、国内
4. JANIS にみる薬剤耐性菌の推移、第 67 回日本化学療法学会総会(東京)、2019/5、国内
5. わが国の薬剤耐性菌対策、口頭、菅井基行、第 33 回抗酸菌セミナー(東京)、2019/6/28、国内
6. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan, 口頭(英語)、Keigo Shibayama, The 16th National Conference of Clinical Pharmacology on Anti-infective Agents, The fourth National Conference on Antimicrobial Resistance Surveillance, The third

Peking University anti infection Forum (Chengdu), 2019/5、国外

7. ナショナルサーベイランスからみた薬剤耐性菌の現状とこれから、口頭、菅井基行、第 3 回日本ワンヘルスサイエンス学会(東京)、2018/9/14、国内
8. Strengthen the National AMR Surveillance in Japan、口頭(英語)、菅井基行、BARDA Industry Day (Washington DC, USA)、2019/10/15、国外
9. 薬剤耐性研究センター 活動報告 2018-2019、口頭、菅井基行、厚生労働省 AMR 小委員会、2019/10/30
10. 最近の薬剤耐性菌状況について、口頭、菅井基行、平成 31 年 院内感染対策講習会、2019/11/22、国内
11. 最近の薬剤耐性菌状況について、口頭、菅井基行、令和元年度地域保健総合推進事業に係る地域レファレンスセンター連絡会議 2019/11/25、国内
12. 薬剤耐性菌バンク、口頭、菅井基行、第 31 回日本臨床微生物学会総会・学術集会(金沢)、2020/2/1、国内
13. National AMR Surveillance and AMR Bacterial Bank, 口頭, Motoyuki Sugai, 日本細菌学会総会(東京)、国際シンポジウム 2020/02/19、国内  
(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