

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16228

研究課題名(和文)ワンヘルスアプローチで目指す薬剤耐性菌出現の原因究明と蔓延予防策の構築

研究課題名(英文) Association of drug-resistant bacteria between human and livestock based on a One Health approach

研究代表者

中野 章代(Nakano, Akiyo)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10707441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ワンヘルスアプローチに基づき、ヒト(市中、院内、畜産農家)と家畜(牛・豚)における薬剤耐性グラム陰性桿菌の分布状況とその関連性を明らかにし、薬剤耐性菌の制御と蔓延防止策を構築することを目的とした。それぞれの分野から第3世代セファロスポリン系薬耐性菌とコリスチン耐性菌を分離した。前者は共通の耐性遺伝子としてCTX-M<sup>-</sup>-ラクタマーゼを、後者はmcr-1を保有し、プラスミド上にコードされていた。しかし、菌株のゲノム型やプラスミド型などの特徴が各分野で大きく異なっていたため、分野間での耐性菌の関連性は認められなかった。また畜産農家と家畜間で特徴が同じ株が分離され一部関連が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワンヘルスアプローチに基づき日本のヒト・家畜における第3世代セファロスポリン系薬耐性菌とコリスチン耐性菌の分布状況とその関連性を明らかにした。コリスチン耐性菌については、国内で初めて市中にも分布していることが明らかとなった。臨床現場だけでなく、市中にこれらの耐性菌がすでに蔓延していることから、今後はそれを見越した上での感染対策を講じる必要がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the distribution of drug-resistant bacteria and relationship between human (community, hospital patient, and famer) and livestock (cow and pig) based on a One Health approach. Gram-negative bacteria resistant to 3rd-generation cephalosporin and colistin were isolated from human and livestock. These resistant genes, CTX-M<sup>-</sup>-lactamase or mcr-1, were common types between them, but the genome types and plasmid types were clearly different. In this study drug-resistant bacteria were not clearly associated between human (community and hospital patient) and livestock (cow and pig). Molecular analysis indicated the close relationship was detected between the CTX-M or mcr-1 producing E. coli isolated from the famer and livestock.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：薬剤耐性菌 ワンヘルス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の多剤耐性化と高度耐性化が年々進行し、世界的に問題となっている。医療現場はもちろん市中でも耐性菌が分離されるようになりその蔓延が危惧されている。申請者はこれまで特に臨床現場で問題となっている耐性菌の蔓延抑制を目的に研究を行ってきたが、耐性菌の根本的な制御のためには、耐性菌がどこから来てヒトに拡がっているのか明らかにする必要があり、その疑いが持たれている家畜由来株を中心に様々な分野を解析することとした。またコリスチン耐性菌が2015年に中国で初めて検出されたが、瞬く間に拡がり国内においても家畜から数株分離されたことが報告された。特効薬ともされるこれら抗菌薬に対する耐性菌の出現・蔓延は今世紀における社会衛生の危機であり、早急に原因追及とその蔓延防止に勤める必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、ワンヘルスアプローチとして注目されているヒト・家畜・食品・環境における薬剤耐性菌の分布状況とその関連性を明らかにし、薬剤耐性菌の制御と蔓延予防策の構築を目的とする。包括的に耐性菌の動向を把握することで、現在蔓延している耐性菌出現の原因を解明し、これから出現する可能性のある新たな耐性菌をいち早く監視することを可能にする。特に臨床現場で問題となっている第3世代セファロスポリン、キノロン、カルバペネム、アミノグリコシド、コリスチンなどに耐性を示すグラム陰性桿菌を対象に下記の課題に取り組む。

#### (1) ヒト、家畜、食品、環境における薬剤耐性菌の分布状況とその関連性の解明

ヒト（市中、患者、畜産農家）、家畜（牛、豚）、食品（野菜）、環境（野生動物として鹿）のどこにどのくらいの割合で存在しているのか明らかにする。分離された耐性菌の耐性遺伝子や抗原、耐性パターンなどの詳細を調べ、各領域の関連性を明らかにする。耐性プラスミドやゲノム型別などの共通点を把握することで耐性菌（耐性遺伝子）が伝播した可能性を検索し、耐性菌出現の流通経路を解明する。

#### (2) 今後問題となりうる耐性菌の検出とその性状解析

臨床検体から分離される可能性のあるカルバペネム耐性菌、アミノグリコシド超高度耐性菌、コリスチン耐性菌の監視および検出を行う。これらは市中における分離報告は極めて少ないが、出現・蔓延した場合は生命を脅かす大問題となりうるため、これに先駆けて監視する。もし検出された場合には、臨床分離株との関連性も明らかにする。

#### (3) 迅速診断法の開発

本邦で問題となっているカルバペネム耐性菌には、カルバペネマーゼ IMP-1 や IMP-6 が多く分離される状況であり、臨床現場では抗菌薬治療や疫学解析においてその分別が求められている。迅速に検出できる診断法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト、家畜、食品、環境における薬剤耐性菌の分布状況とその関連性の解明

- ①各分野から検体を収集する。
- ②各検体よりグラム陰性桿菌（大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクター）を分離培養し、質量分析装置（TOF-MS）もしくは16S rRNAのシーケンス解析により菌種同定を行う。
- ③分離株について、寒天平板希釈法による薬剤感受性試験を行い、どのような薬剤に対して耐性であるか確認する。
- ④検出された耐性菌の耐性遺伝子を遺伝子解析（PCR、DNA シークエンシング）により決定する。
- ⑤耐性菌株の型別をゲノム型別（7つの遺伝子タイピングによるMLST解析）ならびにO抗原型別により決定する。耐性プラスミドは、不和合性の型別を遺伝子解析（PCR）により決定する。
- ⑥耐性プラスミドの伝播能を明らかにするため、大腸菌 J53 株を受容菌として接合伝達試験を行い、その伝達頻度を算出する。

#### (2) 今後問題となりうる耐性菌の検出とその性状解析

臨床現場では大きな問題として扱われているが、本邦における市中からの分離報告がないカルバペネム耐性菌、アミノグリコシド超高度耐性菌、コリスチン耐性菌について監視、検出する。検出された株について、カルバペネム耐性菌は、その耐性遺伝子であるカルバペネマーゼ（IMP型、NDM型、KPC型など）を遺伝子解析（PCR、DNA シークエンシングなど）により決定する。アミノグリコシド超高度耐性菌については16S rRNAメチラーゼ（*rmtA*、*rmtB*、*armA*など）を遺伝子解析により明らかにする。コリスチン耐性菌については *mcr* 遺伝子を遺伝子解析（PCR、DNA シークエンシングなど）により明らかにする。

#### (3) 迅速診断法の開発

PCRによる迅速診断法を検討する。確立できた場合、収集した患者分離株を使用して感度・特異度を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト、家畜、食品、環境における薬剤耐性菌の分布状況とその関連性の解明

###### ①第3世代セファロスポリン系薬耐性菌

ヒト（市中、患者、畜産農家）、家畜（牛・豚）、食品（野菜）、環境（野生動物として鹿）から第3世代セファロスポリン系薬耐性グラム陰性桿菌を検出した。CTX-M産生大腸菌の分離頻度は、ヒト（市中）9.7%、ヒト（畜産農家）23.0%、家畜（牛）13.0%、家畜（豚）5.3%であった。食品と環境の検体は収集できた検体数が少なく、今後の検討が必要である。ヒト（患者）と家畜（牛・豚）から分離されたCTX-M産生大腸菌のゲノム型別を比較すると、図1の通り患者ではST131が多く、一方家畜のSTは様々であった。それぞれで共通するSTは極めて少ないことがわかった。またそれぞれの分離株が保有するプラスミドの型別を比較すると、図2の通り患者ではFIA, FIB, Fを持つものが多く、一方家畜ではFもしくはI1Iγを持つものが多いたことが明らかになった。患者、家畜どちらの分離株も接合伝達能を持つ株が多かった。

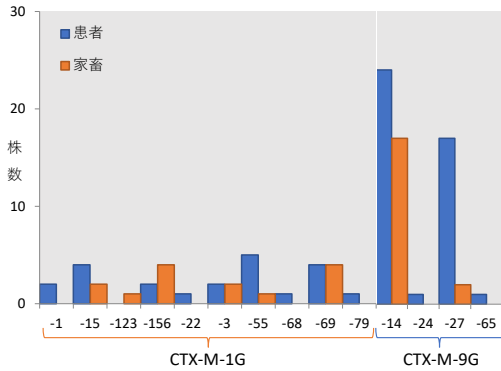


図1. 患者と家畜から分離されたCTX-M産生大腸菌のゲノム型別

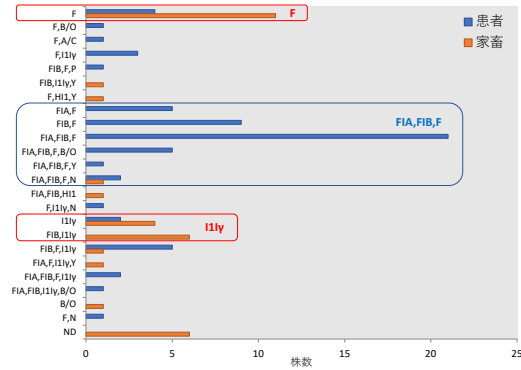


図2. 患者と家畜から分離されたCTX-M産生大腸菌のプラスミド型

###### ②コリスチン耐性大腸菌

ヒト（市中、畜産農家）、家畜（牛・豚）からコリスチン耐性大腸菌を検出した。いずれもプラスミド上に耐性遺伝子である *mcr-1* をコードしていた。分離頻度は、ヒト（市中）0.4%、ヒト（畜産農家）4.9%、家畜（牛）2.8%、家畜（豚）16.7%であった。表1の通り、一部同じ畜舎の牛の親子間や、家畜と畜産農家の間でゲノム型、プラスミド型ともに同じ株が分離され、パルスフィールドゲル電気泳動で比較してもバンドが同じであることがわかった。コリスチン耐性菌の接合伝達能はないものが多く、あっても頻度が低いため、水平伝播の可能性は少ない。以上のことから、一部家畜間、家畜と畜産農家間で日々の濃厚接触環境により菌の授受が行われている可能性が示唆された。

表1. 畜産農家と家畜から分離された*mcr-1*保有大腸菌の特徴

畜舎	対象	菌株No.	耐性遺伝子	ST	Inc	接合伝達頻度
A	子牛	TK5269	CTX-M-27	2929	ND	$1.0 \times 10^7$
		TK5273	-	5273	FIB, T, F	-
	親牛	TK5276	CTX-M-27	2929	ND	$4.2 \times 10^8$
		TK5277	-	7584	FIB, T, F	-
	農家	TK5278	CMY-2	1431	FIB, I1Iγ, F	-
		TK5282	CTX-M-27	2929	ND	$1.3 \times 10^6$
B	農家	TK5289	-	7584	FIB, T, F	-
		TK5359	CTX-M-156	10	P, F	-
C	子豚	TK5363	-	297	ND	$1.0 \times 10^6$
		TK3965	-	746	FIB, A/C, F	-
	農家	TK3981	-	746	FIB, A/C, F	-

##### (2) 今後問題となりうる耐性菌の検出とその性状解析

ヒト（患者）から分離した耐性菌において、本邦では初めての珍しい耐性菌を2例分離した。

###### ①多剤耐性大腸菌

アミノグリコシド耐性遺伝子とホスホマイシン耐性遺伝子を同じプラスミド上に保有するCTX-M-55産生大腸菌で、この3遺伝子を同時にコードする菌株は、これまで中国で多く散見されていたが本邦では初めてであった。さらにこの株は、キノロン耐性決定因子である *GyrA* において2箇所 (S83L/D87N)、*ParC* においても1箇所 (S80I) の変異があるキノロンにも耐性をもつ多剤耐性大腸菌であった (図3)。この株のプラスミド (pNR898) 上の耐性遺伝子周辺構造について解析を行ったところ、図4の通り、中国の豚で分離された株と同じであった。

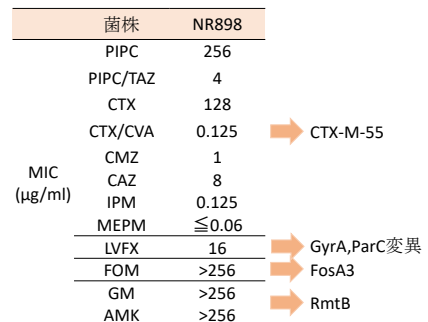


図3. 多剤耐性大腸菌NR898の薬剤感受性と耐性因子

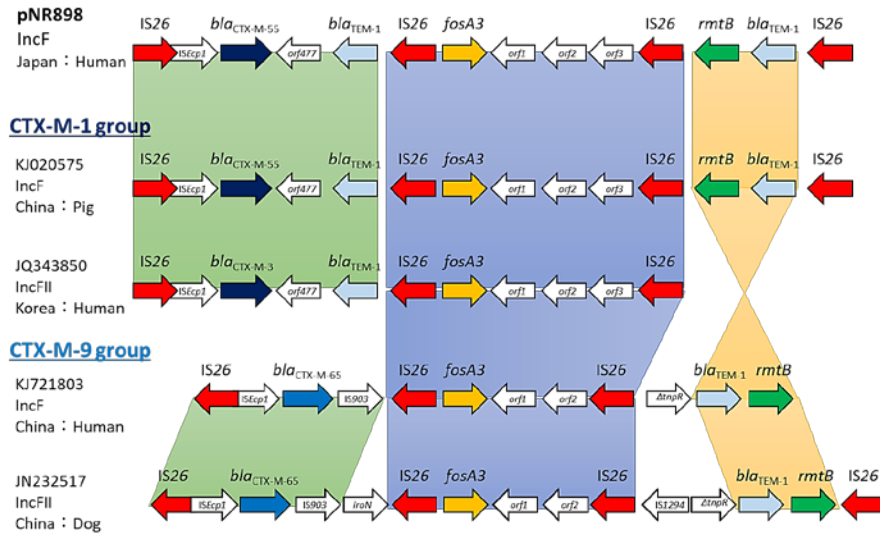


図4. 患者から分離された多剤耐性大腸菌の耐性遺伝子周辺構造

### ② Sed-1 産生 *Citrobacter sedlakii*

世界的にも非常に珍しいクラス A 型  $\beta$ -ラクタマーゼである Sed-1 を産生した株で本邦初の分離であった。菌種の同定も難しく、次世代シーケンスによる全ゲノム解析を行ったところ、染色体上に Sed-1 と、隣接して調節遺伝子である SedR をコードしていることがわかり、その酵素産生性についての誘導実験等により性状解析を行った。既知の手法であれば  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸 (CVA) で誘導能を確認できるはずであるが、表 2 の薬剤感受性からもわかるように CVA での誘導は見られず、他の視点からの解析が必要であることがわかった。

表2. Sed-1産生*Citrobacter sedlakii*の薬剤感受性

菌株	NR2807
	PIPC 256
	PIPC/TAZ 8
	CPDX 64
	CTX 16
MIC (μg/ml)	CTX/CVA 0.5
	CAZ 8
	CFPM 4
	CMZ 2
	AZT 64
	IPM 0.25
	MEPM $\leq 0.06$

### (3) 迅速診断法の開発

本邦で問題となっているカルバペネム系薬耐性菌には、カルバペネマーゼ IMP-1 や IMP-6 が多く分離される状況であり、臨床現場では抗菌薬治療や疫学解析においてその分別が求められていた。そこでこの 2 遺伝子の 1 塩基配列の違いを考慮して、簡便かつ迅速に識別できる Multiplex ARMS-PCR 法を開発した。収集したカルバペネマーゼ産生株 350 株を対象に本法を試したところ、IMP-1 と IMP-6 をいずれも容易に識別可能であり、特異度、感度ともに高かった (表 3)。シーケンス解析などを行うことなく、90 分で分別できることから、臨床現場で有効活用されることが期待された。

表3. カルバペネマーゼ産生株の特徴と ARMS-PCR 法結果

Species	Strains	Carbapenemase	MIC range (μg/ml)		Specific band (No. of strains)
			IPM	MEPM	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	IMP-1	0.25-1	0.125-0.5	120 bp (31)
<i>Enterobacter cloacae</i>	18	IMP-1	0.125-4	$\leq 0.06$ -4	120 bp (18)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	IMP-1	0.125-1	0.5-2	120 bp (9)
<i>Escherichia coli</i>	5	IMP-1	0.125-1	0.125-2	120 bp (5)
<i>Citrobacter freundii</i>	2	IMP-1	0.125-64	0.125-64	120 bp (2)
<i>Escherichia coli</i>	170	IMP-6	0.125	0.25	350 bp(170)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	87	IMP-6	$\leq 0.06$ -2	0.125-32	350 bp(87)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	IMP-6	$\leq 0.06$ -0.5	0.125-16	350 bp(1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	KPC	2-32	2-64	None
<i>Escherichia coli</i>	12	NDM	1-16	0.5-32	None
<i>Escherichia coli</i>	2	OXA-48 like	0.5-1	0.5	None
<i>Citrobacter freundii</i>	1	VIM	1	1	None

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 A Nakano, R Nakano, Y Suzuki, K Saito, K Kasahara, S Endo, H Yano	4. 巻 38
2. 論文標題 Rapid Identification of bla(IMP-1) and bla(IMP-6) by Multiplex Amplification Refractory Mutation System PCR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 378-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3343/alm.2018.38.4.378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Ryuichi, Nakano Akiyo, Abe Michiko, Nagano Noriyuki, Asahara Miwa, Furukawa Taiji, Ono Yasuo, Yano Hisakazu, Okamoto Ryoichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of <i>Proteus mirabilis</i> in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01291 ~ e01291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e01291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Yoshihiko, Nakano Ryuichi, Kasahara Kei, Mizuno Tomoki, Hirai Nobuyasu, Nakano Akiyo, Suzuki Yuki, Kakuta Naoki, Masui Takashi, Yano Hisakazu, Mikasa Keiichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of the inoculum size effects of antibiotics on IMP-6 $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae co-harboring plasmid-mediated quinolone resistance genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野章代、榎井貴史、中野竜一、鈴木由希、角田尚紀、田内絢子、堀内沙央里、矢野寿一
2. 発表標題 健康人の糞便より分離されたESBL産生大腸菌の遺伝学的解析
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、八木理子、遠藤謙太郎、山田友紀、鈴木由希、諏訪部章、矢野寿一
2. 発表標題 本邦で初めて分離されたクラスA型 -ラクタマーゼSed-1産生Citrobacter sedlakiiの性状解析
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野章代、榎井貴史、中野竜一、鈴木由希、角田尚紀、田内絢子、矢野寿一
2. 発表標題 健常人が保有する大腸菌におけるCTX-M産生株の遺伝学的背景の解明
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会 総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A Nakano, R Nakano, K Kasahara, Y Suzuki, S Ando, T Mizuno, K Mikasa, H Yano
2. 発表標題 Emergence of multidrug-resistant Escherichia coli strain harbouring blaCTX-M-55, rmtB, and fosA3-encoding plasmid isolated from a food poisoning patient in Japan.
3. 学会等名 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、笠原 敬、鈴木由希、斎藤恭一、安藤冴佳、水野友貴、三笠桂一、矢野寿一
2. 発表標題 海外渡航後食中毒患者より分離された多剤耐性大腸菌の分子遺伝学的解析
3. 学会等名 第29回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、鈴木由希、水野友貴、矢野寿一
2. 発表標題 本邦で健康人および畜産農家から初めて検出されたmcr保有大腸菌について
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、鈴木由希、角田梨紗子、角田尚紀、堀内沙央里、矢野寿一
2. 発表標題 家畜(牛・豚)と畜産農家から分離されたプラスミド性コロistin耐性遺伝子mcr保有大腸菌の解析
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、鈴木由希、角田梨紗子、堀内沙央里、角田尚紀、渡邊真子、斉藤 開、矢野寿一
2. 発表標題 Analysis of mcr-1 plasmid-mediated colistin resistant E. coli isolated from livestock in Japan.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤 開、中野章代、榊井貴史、中野竜一、渡邊真子、鈴木由希、角田尚紀、矢野寿一
2. 発表標題 Analysis of genetic background of CTX-M-producing Escherichia coli in healthy individuals in Japan.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----