

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0168

研究課題名（和文）ベトナム南部における食中毒原因菌の薬剤耐性化に関する調査研究

研究課題名（英文）Study on the prevalence of antibiotic resistance in foodborne bacterial pathogens in southern Vietnam

研究代表者

中山 達哉（Nakayama, Tatsuya）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・准教授

研究者番号：80552158

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ベトナム産鶏肉及び魚から薬剤耐性大腸菌及びサルモネラを分離し薬剤耐性について調べた結果、鶏肉から分離したAmpC/ESBL産生大腸菌の多くがCTX-M-55遺伝子を保有し、コリスチン耐性大腸菌の多くがmcr-1遺伝子を保有していたことが明らかとなった。サルモネラは鶏肉の約7割から分離され、その多くはESBL産生を示していた。また、食用河川魚では、AmpC/ESBL産生及びコリスチン耐性大腸菌と薬剤耐性サルモネラが分離された。その中で、サルモネラと大腸菌で相同性が高い薬剤耐性プラスミドを保有していることが判明し、食品内で食中毒菌であるサルモネラが薬剤耐性を獲得している実態が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

輸入食品の安全性は輸出国の食品衛生レベルに依存する部分が多く、また、将来、薬剤耐性菌による死者数増加が懸念されていることから、薬剤耐性問題は喫緊の課題である。そこで、本研究では、ヒト薬剤耐性菌保菌に直結する食品に着目し、ベトナム食品を汚染する大腸菌及び食中毒菌の薬剤耐性化を調べた。その結果、日本よりも高頻度に耐性菌による汚染が進んでいることが判明し、大腸菌と食中毒菌であるサルモネラにおいて、共通した薬剤耐性プラスミドを保有していることが判明した。本結果から、ベトナム食品において、薬剤耐性化は食中毒菌まで拡散していることが判明したことから、今後、食品レベルでの耐性菌制御方法の確立が必要である。

研究成果の概要（英文）：Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* were isolated from chicken and fish from Vietnam. The results showed that most of the AmpC/ESBL-producing *E. coli* isolated from chicken harboured the CTX-M-55 gene and most of the colistin-resistant *E. coli* harboured the mcr-1 gene. *Salmonella* were isolated from 70% of chicken, many of which showed ESBL production. AmpC/ESBL-producing and colistin-resistant *E. coli* and antibiotic-resistant *Salmonella* were also isolated from edible river fish. It was found that *Salmonella* and *E. coli* possessed highly homologous antibiotic-resistant plasmids, indicating that the foodborne pathogen *Salmonella* acquired antibiotic resistance in food products.

研究分野：食品微生物学

キーワード：ESBL産生大腸菌 ESBL産生サルモネラ mcr保有コリスチン耐性大腸菌 mcr保有コリスチン耐性サルモネラ プラスミド性薬剤耐性菌 CTX-M-55 mcr-1 NDM-1

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は以前参画した、ベトナムにおける薬剤耐性菌に関する国際共同プロジェクト(SATREPS)を通して、ベトナムでは行政による食品検査システムが確立されておらず、また、保健所等において食品衛生を指導する食品衛生監視員もいない。さらに食中毒統計等もなく、どのような食中毒が起きているのか情報が無いのが現状である。このような状態から、近年ベトナムからの輸入食品は増加しているが、ベトナムの食品における安全性はまだ不確かである。

我々は、SATREPS では指標菌としてプラスミド性薬剤耐性菌の一つである ESBL 産生大腸菌を研究対象としたが、ベトナムでは食品における食中毒菌の検出状況すら明らかとされておらず、ましてや食中毒菌に関する薬剤耐性化に関しては、一切の情報が無い状態である。

2. 研究の目的

ベトナムにおける食品から、食中毒原因菌である *Campylobacter*、*Salmonella*、*Listeria*、*Vibrio* を分離し、性状・遺伝子解析を行い薬剤耐性を明確にすること。さらに同一食品から薬剤耐性 (ESBL、AmpC、コリスチン耐性) 大腸菌、薬剤耐性食中毒原因菌を分離しプラスミド比較することで食品内での種間の伝播状況を明確にすることとする。

3. 研究の方法

(1) 食品から食中毒原因菌の分離・同定を行う

日本へ輸出食品として扱われている食品のうち、食中毒原因菌や薬剤耐性菌の汚染率が高い鶏肉、魚介類、野菜を対象とし、検体から増菌培養法により菌分離を行う。鶏肉からは *Campylobacter*、*Salmonella*、*Listeria*、魚介類からは *Vibrio*、*Salmonella* を選択寒天培地にてそれぞれ 3 コロニー釣菌し分離同定する。また食品から同様に ESBL (AmpC 型を含む) 産生及びコリスチン耐性大腸菌を分離する。分離株は生化学試験及び 16S rRNA のシーケンス解析により菌種を同定する。これらの結果から食中毒原因菌、薬剤耐性大腸菌の割合を食品中での菌種の割合及び検出率において明確にする。

(2) 食中毒原因菌の性状・遺伝子解析及び薬剤感受性試験を行う

分離同定後、血清型を判別し大腸菌は phylogenetic group を決定する。食中毒菌は MLST を用い分子系統解析を行う。また全ての分離株は CLSI の方法に準拠し薬剤感受性ディスク試験を行う。ディスク試験から ESBL 産生、AmpC 型ラクタマーゼ産生が判断された分離株はそれぞれの薬剤耐性遺伝子 (CTX-M、CMY-2 等) の同定を行う。また、コリスチン耐性株には *mcr* 遺伝子の検出同定を行う。これらの結果より、日本及び海外で分離される食中毒原因菌と比較解析を行い、ベトナムにおける食中毒原因菌の特徴を明らかにする。

(3) 伝達性プラスミド解析

同一食品から分離された食中毒原因菌及び薬剤耐性大腸菌において、特に第 3 世代セファロスポリン、カルバペネム及びコリスチンで類似した薬剤耐性パターンを示し、さらに同じ薬剤耐性遺伝子 (CTX-M や CMY-2、*mcr-1* 等) を保持している場合、次世代シーケンサーによるプラスミド解析を行い、薬剤耐性遺伝子がコードされているプラスミドを同定する。本結果から食品を介して薬剤耐性遺伝子の拡散に寄与しているプラスミドを明確にする。

4. 研究成果

(1) *Campylobacter* 及び *Listeria* の検出状況

本研究期間を通して、ベトナム産鶏肉及び魚から食中毒菌と腸内細菌科菌群の検出を行った。鶏肉から *Campylobacter* 及び *Listeria* の分離を行ったが、鶏肉から両菌を分離することはできなかった。*Campylobacter* に関しては、現地共同研究員から、分離した経験がないと言っていたが、*Campylobacter* の培養は微好気培養のために、専門の技術が必要とすることから、分離法の詳細な検証が必要であると感じた。また、*Listeria* に関しては *Listeria* 分離法で通常成育しないセレウス菌が多く分離されたことから、ベトナムにおいて、薬剤耐性セレウス菌汚染が鶏肉に広がっていることが推測された。

(2) ベトナム産鶏肉由来プラスミド性薬剤耐性菌

鶏肉 60 検体からプラスミド性薬剤耐性大腸菌、腸内細菌科菌群、*Salmonella* の分離を行った。ESBL 産生遺伝子である CTX-M 遺伝子は CTX-M-55 及び CTX-M-65 が分離菌から多く検出された。また、コリスチン耐性菌からは、多くが *mcr-1* 遺伝子を保有していることが明らかとなった。*Salmonella* は現在解析中ではあるが、7 割以上の鶏肉から *Salmonella* が分離されたことから、鶏肉の *Salmonella* 汚染は非常に高い。

(3) ベトナム産食用河川魚由来プラスミド性薬剤耐性菌

食用河川魚 80 から 100 検体において、プラスミド性耐性大腸菌、腸内細菌科菌群、*Salmonella*、*Vibrio*、*Aeromonas* の分離を行った。ESBL 産生遺伝子の主要遺伝子は CTX-M-55 で、コリスチン耐性遺伝子は全て *mcr-1* であった。また、鶏肉から検出されなかったが、魚からはカルバペネム耐性遺伝子 *NDM-1* を大腸菌、腸内細菌科菌群、*Vibrio*、*Aeromonas* から検出した。同一食用魚から分離されたカルバペネム耐性大腸菌と *Citrobacter* の全ゲノム解析を行った結果、両株で *NDM-1* をコードする 137kbp の IncA/C2 型プラスミドを保有していることが判明した。加えて、同一食用魚からコリスチン耐性大腸菌と *Salmonella* が分離されたことからゲノム解析を行った。ゲノム解析の結果、両株で *mcr-1.1* と CTX-M-55 コードする相同性が高い約 250kbp の IncHI2 プラスミドを保有していることが判明した。

(4) 輸入水産食品由来プラスミド性薬剤耐性菌

大阪府及び神奈川県の小売店で販売されている輸入水産食品におけるプラスミド性薬剤耐性菌の汚染実態を調べた。その結果、カルバペネム耐性、ESBL 産生菌が分離された。その中でも、ベトナム産輸入エビからは、カルバペネム耐性 *Enterobacter cloacae* が分離された。全ゲノム解析を行った結果、*NDM-1* 遺伝子をコードする 162kbp の IncC 型プラスミドを保有していることが明らかとなった。この IncC 型プラスミドは伝達試験によって、大腸菌や *Klebsiella* に伝達することが判明したことから、カルバペネム耐性拡散に寄与しているプラスミドであると考えられた。また、検体の違うベトナム産輸入エビから、*Vibrio vulnificus* が分離され、ESBL 産生を示した。ESBL 産生 *V. vulnificus* の報告は世界でも初である。本株は CTX-M-55 とキノロン耐性遺伝子 *qnrS* をコードする約 320kbp プラスミドを保有しており、同検体から同時に分離された *V. alginolyticus* もこの約 320kbp プラスミドと相同性の高いプラスミドを保有していたことから本プラスミドが *Vibrio* 内で水平伝播している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakayama Tatsuya, Yamaguchi Takahiro, Jinnai Michio, Yamamoto Shiori, Li Hien Thi, Ngo Phong Thanh, Tran Doan Nguyen Minh, Nguyen Oanh Thi Hoang, Hoang Phuong Hoai, Do Nguyen Phuc, Van Dang Chinh, Kumeda Yuko, Hase Atsushi	4. 巻 78
2. 論文標題 Untargeted Phylogenetic Group III of Multi-drug-Resistant <i>Bacillus cereus</i> Isolated Using Fraser Medium from Retail Chickens in Ho Chi Minh City	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 3115 ~ 3123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-021-02562-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakayama Tatsuya, Hoa Tran Thi Tuyet, Huyen Hong Mong, Yamaguchi Takahiro, Jinnai Michio, Minh Doan Tran Nguyen, Hoang Oanh Nguyen, Thi Hien Le, Thanh Phong Ngo, Hoang Hoai Phuong, Nguyen Do Phuc, Van Chinh Dang, Kumeda Yuko, Hase Atsushi	4. 巻 133
2. 論文標題 Isolation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae harbouring NDM-1, 4, 5, OXA48 and KPC from river fish in Vietnam	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Control	6. 最初と最後の頁 108594 ~ 108594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodcont.2021.108594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakayama Tatsuya, Le Thi Hien, Thanh Phong Ngo, Minh Doan Tran Nguyen, Hoang Oanh Nguyen, Hoai Phuong Hoang, Yamaguchi Takahiro, Jinnai Michio, Do Phuc Nguyen, Van Chinh Dang, Kumeda Yuko, Hase Atsushi	4. 巻 204
2. 論文標題 Abundance of colistin-resistant <i>Escherichia coli</i> harbouring <i>mcr-1</i> and extended-spectrum β -lactamase-producing <i>E. coli</i> co-harbours blaCTX-M-55 or -65 with blaTEM isolates from chicken meat in Vietnam	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-021-02746-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 中山達哉	4. 巻 37
2. 論文標題 ベトナムの食品から分離される薬剤生菌についてー食品からヒトへのつながりを考えるー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本食品微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 91-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5803/jsfm.37.91	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中山達哉、山口貴弘、陳内理生、河原隆二、朝倉宏、久米田裕子、長谷篤	4. 巻 38
2. 論文標題 輸入水産食品におけるプラスミド伝播が推定されるセフェム系およびカルバペネム系プラスミド性薬剤耐性菌の汚染状況	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本食品微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T.T.T. Hoa, T. Nakayama, H.M. Huyen, K. Harada, A. Hinenoya, N.T. Phuong, Y. Yamamoto	4. 巻 71
2. 論文標題 Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli harbouring sul and mcr-1 genes isolates from fish gut contents in the Mekong Delta, Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 78-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.13222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tatsuya Nakayama, Yuko Kumedac, Ryuji Kawaharad, Yoshimasa Yamamoto	4. 巻 21
2. 論文標題 Quantification and long-term carriage study of human extended-spectrum/AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli after international travel to Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 229-234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2019.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiori Yamamoto, Tatsuya Nakayama, Hiroshi Asakura	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CRB139-1, Isolated from Poultry Meat in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00075-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00075-20	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 該当する

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中山達哉
2. 発表標題 ベトナム産鶏肉におけるFraser培地から分離された <i>Bacillus cereus</i> の分子疫学的解析
3. 学会等名 日本食品微生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山達哉
2. 発表標題 輸入水産食品から分離された薬剤耐性腸内細菌科菌群 のゲノム解析に関する研究
3. 学会等名 日本食品衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山達哉
2. 発表標題 途上国においてESBL産生大腸菌はAmpC型 ラクタマーゼ産生菌の耐性誘導の手助けをする
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山達哉、久米田裕子、河原隆二、山本容正
2. 発表標題 ベトナムにおける料理を汚染している基質特異性拡張型 ラクタマーゼ産生菌及びヒト腸内細菌叢への影響に関する研究
3. 学会等名 日本食品衛生学会、第116回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama T, Hoa TTT, Harada K
2. 発表標題 Low bacterial diversity and the presence of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in a river containing wastewater from backyard aquacultures in the Mekong Delta, Vietnam
3. 学会等名 8th Congress of European Microbiologists (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	大谷 詩織 (山本) (Otani Shirori) (40795291)	国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・任期付研究員 (82601)	
研究分担者	陳内 理生 (Jnnai Michio) (70622752)	神奈川県衛生研究所・微生物部・主任研究員 (82714)	
研究分担者	山口 貴弘 (Yamaguchi Takahiro) (80553635)	地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員 (84407)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------