

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01687

研究課題名(和文) ベトナムにおけるコロistin耐性細菌蔓延実態の分子疫学的調査研究

研究課題名(英文) Molecular epidemiology study of the colistin-resistant bacteria dissemination in Vietnam

研究代表者

山本 容正 (Yamamoto, Yoshimasa)

岐阜大学・高等研究院・招へい教員

研究者番号：20010100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナムで蔓延しているコロistin耐性細菌の実態を分子疫学的に解明し、さらなる拡大への公衆衛生学的対応に資する基盤的成績を得る事を目的に研究を実施した。その結果、対象地域コミュニティ住民の70%が伝達性耐性遺伝子mcrを持つコロistin耐性大腸菌を保有し、さらに当該住民の飼育家畜のほぼ全例(95%)からもmcr陽性コロistin耐性大腸菌が検出され、コロistin耐性菌の蔓延が深刻な状況であることが明らかとなった。当該耐性菌のゲノム解析を行った結果、36%の耐性菌で伝達性mcrが染色体上に取り込まれていることやそのトランスポゾン解析から、当該地域でコロistin耐性菌蔓延の安定化が進んでいる事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でベトナムの地方農村コミュニティでコロistin耐性菌の蔓延が住民ならびに飼育家畜で深刻な状況にあることが判明した。加えてこのような状況が一時的では無く慢性化する可能性が分離菌のゲノム解析から明らかとなった。同様な状況は比較研究として行ったエクアドルの地方コミュニティでも認められた事から、程度の差は有るが途上国に共通する事象と考えられ、早急な耐性菌蔓延対策が求められる。

研究成果の概要(英文)：The study was conducted with the aim of elucidating the actual condition of colistin-resistant bacteria dissemination in Vietnam from a molecular epidemiological point of view and obtaining basic data that are necessary for making public health measures to further expansion of colistin-resistant bacteria.

It was clarified by the study that 70% of the community residents in the target area were infected with colistin-resistant *Escherichia coli* (COR-EC) possessing the mobile resistance gene mcr. In addition, almost all domestic livestock (95%) in the community were contaminated with mcr-positive COR-EC. From these results, it was obvious that the epidemic in the community of the target area was serious. As a result of genome analysis of the colistin-resistant isolates, 36% of the isolates had the mobile mcr incorporated on the chromosome, and the mcr transposon structure analysis showed that the dissemination of colistin-resistant bacteria was being stabilized in the community.

研究分野：微生物学

キーワード：薬剤耐性菌 コミュニティ コロistin耐性 伝達性耐性遺伝子

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 (AMR) の増加は、感染の効果的治療や予防を難しくしている。特に、スーパー耐性菌と称される高度多剤耐性菌は、アメリカ疾病管理予防センター (CDC) に「悪夢の細菌 nightmare bacteria」と呼ばれ、その発生と蔓延防止に向け世界保健機構 (WHO) を始めとする多くの機関が取り組みを強化している。このような状況下、2015 年 11 月に Lancet でプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* が初めて報告され、世界に衝撃を与えた。*mcr-1* は、高度多剤耐性菌に対する「最後の切り札」となるはずのコリスチンに対する伝達性のあるプラスミド上の耐性遺伝子であるため本遺伝子の伝播が容易で、結果として本遺伝子を有する耐性菌の蔓延が起き、「緊急に対処しなければ抗生物質の限界が来る」状況を現実的なものにするからである。このような状況を受け、日本でも緊急に家畜由来の大腸菌 9,308 株を検査し *mcr-1* の拡がり調べられた結果、2 株が見出された (Lancet Infectious Diseases, 2016)。欧米諸国からの報告も合わせると、既に本遺伝子を有する菌が世界的に広まりつつあることが判明した。研究代表者らは 2012 年よりベトナムを対象とした多剤耐性細菌の市中蔓延状況を微生物学的、薬学的ならびに人類学的観点より地球規模課題事業 SATREPS (AMED/JICA 委託事業) の一環として調査研究を行ってきた。特に基質特異性拡張型ラクタマーゼ (ESBL) 産生細菌の拡散機序に焦点を合わせ研究を行ってきた。最終年度となる 2016 年前半に、対象国ベトナムのタイビン省における抗菌剤使用に関する実地調査から、当該地域の畜産現場で使用される抗菌剤の約 5 割がコリスチンならびにその合剤である実態が判明した。多くの研究から畜水産領域における抗菌剤の濫用は、耐性菌の発生と蔓延に大きくかかわっていると考えられている。事実、我々のベトナムにおける調査研究では、多種の残留抗菌剤が 10% 以上の食品 (肉、魚) で見つかり、このような成績は畜水産現場で抗菌剤使用が適切になされていないことを示している。さらに、これら食品の 5 割以上から ESBL 産生多剤耐性菌が見出されている。このような状況下、コリスチンの想像以上の現地における使用実態から、コリスチン耐性菌の蔓延が疑われたため、緊急予備調査を行った。その結果、調べた ESBL 産生大腸菌 230 株中 35 株から *mcr-1* が見出され、このうち接合伝達試験を行った 6 株中 3 株で *mcr-1* の伝達が確認された。ESBL 産生大腸菌の当該地域における健常人保菌率は 61%、食品からは 54.5% の極めて高い頻度で検出されており、加えて、今回の予備調査では、その内の約 15% から *mcr-1* が見出された結果は、事態の深刻さを示している。

2. 研究の目的

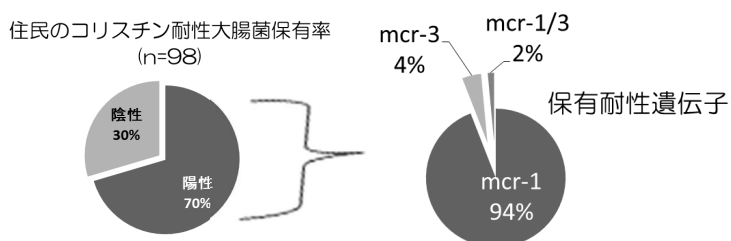
本研究では、ベトナム・タイビン地区におけるコリスチン耐性細菌蔓延実態の解明を、分子疫学的手法を用いて行うと同時にコリスチン耐性遺伝子の多様性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、ベトナム・タイビン地区における食品検体、畜産現場検体、健常人糞便からのコリスチン耐性菌の検出と耐性分離株を収集
分離菌株の薬剤感受性、株間の相同性、耐性プラスミド解析
分離株ゲノムシーケンス解析
を実施した。

4. 研究成果

ベトナムの調査対象地域の 41 家族 98 名の住民糞便検査を行った結果、その 70.4% もの住民が mobile 耐性遺伝子 *mcr* を持つコリスチン耐性大腸菌を保有している事が判明した (図参照)。また、当該住民が飼育している家畜 (n=72) のほぼ全例に相当する 95.8% から *mcr* 陽性コリスチン耐性大腸菌が検出された (表参照)。このような極めて高いコリスチン耐性菌の検出結果は、当該調査地域が高度にコリスチン耐性菌で汚染されていることを示しており、今後の耐性菌蔓延対策が喫緊の課題である。

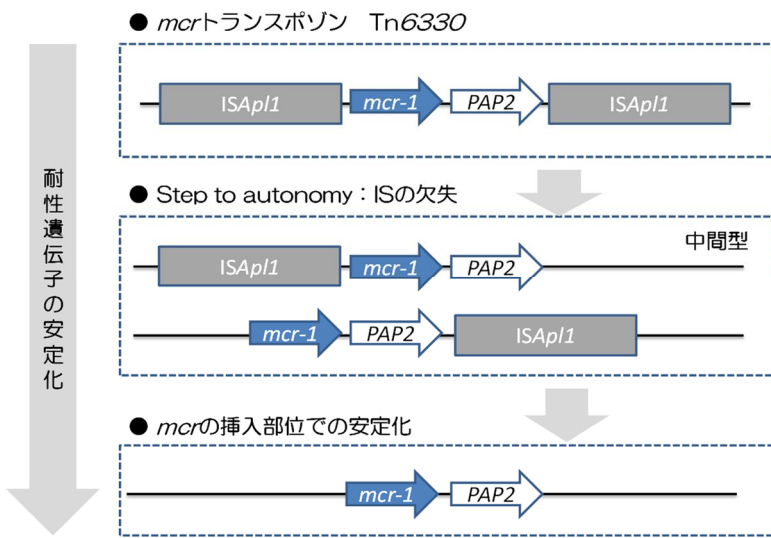


コリスチン耐性分離株のゲノム解析から、豚より *mcr-3* を有する IncFII プラスミド保有大腸菌が分離された。本 *mcr-3* 遺伝子は、近年新たに見出されたコリスチン耐性遺伝子の 1 つで、ベトナムにおけるコリスチン耐性の多様性を示すものである。

家庭内飼育家畜糞便検体からのコリスチン耐性大腸菌の検出

| 参加世帯数 | 検査家畜数 | 家畜 | |
|--------------|----------------------------|---------------|---------------|
| | | 鶏 | 豚 |
| 41 | 72 | 36 | 36 |
| コリスチン耐性大腸菌 | 69/72 ^a (95.8%) | 35/36 (97.2%) | 34/36 (94.4%) |
| <i>mcr-1</i> | 68/72 (94.4%) | 35 | 33 |
| <i>mcr-3</i> | 1/72 (1.4%) | 0 | 1 |

^a陽正数/検査数



分離された耐性菌のゲノム解析より、*mcr* 周辺遺伝子構造の菌株間での比較解析を行った結果、一定の構造パターン (ISAp1-*mcr*-PAP2-ISAp1) がプラスミドと染色体の双方に見出された。また、これら耐性遺伝子トランスポゾンユニットの一部が欠落した構造も一部分離株のプラスミドに散見されたため、耐性遺伝子の伝播と保持にどのように関わってくるか、蔓延機序との関連からも今後さらなる解析が必要である。

住民由来コリスチン耐性大腸菌分離株における *mcr* の存在場所

| 参加住民 | <i>mcr-1</i> (+) 大腸菌 | 検査した <i>mcr-1</i> (+) 大腸菌株 | <i>mcr-1</i> の場所 | | |
|------|----------------------|----------------------------|------------------|------------|-----------|
| | | | プラスミドのみ | 染色体のみ | プラスミド/染色体 |
| 98 | 60 | 57 | 36 (63.2%) | 20 (35.0%) | 1 (1.8%) |

¹ Three isolates were excluded due to the difficulty for analysis.

当該地域住民の糞便検体解析で *mcr-1* もしくは *mcr-3* を保有するコリスチン耐性大腸菌が検出され、さらにその内の 36% が伝達性耐性遺伝子 *mcr-1* を染色体上に取り込んでいる事が判明した (表参照)。一方、ベトナムと地

理的社会的背景の大きく異なるエクアドル地域コミュニティより分離されたコリスチン耐性株の菌性状、遺伝子性状をベトナムのそれと比較解析した結果、エクアドルでは 47% の家畜 (豚、鶏) からコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* を保有するコリスチン耐性大腸菌が検出され、検出された耐性菌の 67% は 3 剤以上の抗菌剤に耐性を示す多剤耐性であった。検出されたコリスチン耐性遺伝子は *mcr-1* のみで他のコリスチン耐性遺伝子は検出されなかった。このような研究成果は、ベトナムで認められたコリスチン耐性菌蔓延はエクアドルでも罹患率は若干低いと同様の耐性遺伝子を保有する菌による蔓延が起きている事を示しており、世界規模で当該耐性菌が広がっている事が明らかとなった。

これら研究成果はいずれも国際誌に論文発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 8件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Nakayama, T., Kumeda, Y., Kawahara, R., Yamaguchi, T., Yamamoto, Y. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Carriage of colistin-resistant, extended-spectrum beta-lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> harboring the <i>mcr-1</i> resistance gene after short-term international travel to Vietnam | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Infect Drug Resist | 6. 最初と最後の頁 391-395 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IDR.S153178 | 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 Yamasaki, S., Le, T. D., Vien, M. Q., Van Dang, C., Yamamoto, Y. | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> and residual antimicrobials in the environment in Vietnam | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Anim Health Res Rev | 6. 最初と最後の頁 128-135 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S1466252317000160 | 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 Yamaguchi, T., Kawahara, R., Harada, K., Teruya, S., Nakayama, T., Motooka, D., Nakamura, S., Nguyen, P. D., Kumeda, Y., Van Dang, C., Hirata, K., Yamamoto, Y. | 4. 巻 365 |
| 2. 論文標題 The presence of colistin resistance gene <i>mcr-1</i> and <i>-3</i> in ESBL producing <i>Escherichia coli</i> isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 FEMS Microbiol Lett | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fny100 | 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 |
| 1. 著者名 Yamamoto, Y., Kawahara, R., Fujiya, Y., Sasaki, T., Hirai, I., Khong, D. T., Nguyen, T. N., Nguyen, B. X. | 4. 巻 74 |
| 2. 論文標題 Wide dissemination of colistin-resistant <i>Escherichia coli</i> with the mobile resistance gene <i>mcr</i> in healthy residents in Vietnam | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Antimicrob Chemother | 6. 最初と最後の頁 523-524 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jac/dky435 | 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 Yamamoto, Y., Calvopina, M., Izurieta, R., Villacres, I., Kawahara, R., Sasaki, M., Yamamoto, M. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Colistin-resistant Escherichia coli with mcr genes in the livestock of rural small-scale farms in Ecuador | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 BMC Res Notes | 6. 最初と最後の頁 121 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-019-4144-0 | 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 |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Kawahara Ryuji, Fujiya Yoshihiro, Yamaguchi Takahiro, Khong Diep Thi, Nguyen Thang Nam, Tran Hoa Thi, Yamamoto Yoshimasa | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Most Domestic Livestock Possess Colistin-Resistant Commensal Escherichia coli Harboring mcr in a Rural Community in Vietnam | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy | 6. 最初と最後の頁 1~2 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00594-19 | 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 |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kawahara Ryuji, Khong Diep Thi, Le Ha Viet, Phan Quang Ngoc, Nguyen Thang Nam, Yamaguchi Takahiro, Kumeda Yuko, Yamamoto Yoshimasa | 4. 巻 Volume 12 |
| 2. 論文標題 <p>Prevalence Of mcr-1 Among Cefotaxime-Resistant Commensal Escherichia coli In Residents Of Vietnam</p> | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance | 6. 最初と最後の頁 3317 ~ 3325 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S224545 | 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 |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Nakayama Tatsuya, Kumeda Yuko, Kawahara Ryuji, Yamamoto Yoshimasa | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Quantification and long-term carriage study of human extended-spectrum/AmpC -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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Mohsin Mashkoor, Tanaka Kaori, Kawahara Ryuji, Kondo Shinji, Noguchi Hideki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Khong Diep Thi, Nguyen Thang Nam, Hoang Trong Nang, Yamamoto Yoshimasa | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Whole-genome sequencing and comparative analysis of the genomes of Bacteroides thetaiotaomicron and Escherichia coli isolated from a healthy resident in Vietnam | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance | 6. 最初と最後の頁 65 ~ 67 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.02.034 | 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 |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Takahiro, Kawahara Ryuji, Hamamoto Kouta, Hirai Itaru, Khong Diep Thi, Nguyen Thang Nam, Tran Hoa Thi, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Yamamoto Yoshimasa | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 High Prevalence of Colistin-Resistant Escherichia coli with Chromosomally Carried mcr-1 in Healthy Residents in Vietnam | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 mSphere | 6. 最初と最後の頁 e00117 ~ e00120 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00117-20 | 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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yamaguchi, T., et al. |
| 2. 発表標題 ベトナムの豚肉から分離したmcr-3を有するコロスチン耐性大腸菌の解析 |
| 3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Y. Yamamoto, R. Kawahara, Y. Fujiya, T. Sasaki, I. Hirai, D. T. Khong, T. N. Nguyen |
| 2. 発表標題 Extremely High Prevalence of Colistin-Resistant Escherichia coli with mcr in Healthy Residents in Vietnam |
| 3. 学会等名 ASM Microb 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018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ペー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 第116回日本食品衛生学会学術講演会 |
| 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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 河原 隆二 (Kawahara Ryuji) (10332454) | 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) | |
| 研究分担者 | 田中 香お里 (Tanaka Kaori) (20242729) | 岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授 (13701) | |
| 研究分担者 | 朝野 和典 (Tomono Kazunori) (40202204) | 大阪大学・医学系研究科・教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 中村 昇太 (Nakamura Shota) (90432434) | 大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤) (14401) | |

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 | | | |
|---------|---------------|--|--|--|
| ベトナム | タイピン医科薬科大学 | | | |
| エクアドル | アメリカ大学 (UDLA) | | | |
| 米国 | 南フロリダ大学 | | | |