

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19255

研究課題名(和文)世界的なESBL産生菌の拡散に寄与している抗菌薬は何か？

研究課題名(英文)The investigation of effects by antibiotics on spread of ESBL-producing bacteria worldwide.

研究代表者

山口 貴弘 (Yamaguchi, Takahiro)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・研究員

研究者番号：80553635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナムの食肉および魚介類から分離したESBL/AmpC産生大腸菌を用いて、プラスミド水平伝達における抗菌薬の影響について研究を行った。研究の結果、テトラサイクリンおよびシプロフロキサシンにおいては、一定濃度を水平伝達時に添加することにより、水平伝達株のコロニー数が増加した。また、これらのESBL/AmpC産生大腸菌261株のコリスチン耐性遺伝子に関する研究を行ったところ、62株でプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を有し、一部のプラスミドは水平伝達により伝播することを明らかにした。また、mcr遺伝子を有するプラスミドについて遺伝子解析を行いその詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of antibiotics on horizontal plasmid transduction using ESBL/AmpC producing E. coli were isolated from meats and fish and shellfish in Vietnam. As a result of the study, it was shown that the number of colonies of the transconjugants can be increased by adding a certain concentration at the time of conjugation in tetracycline and ciprofloxacin. Next, studies on the colistin resistance gene of ESBL / AmpC producing E. coli 261 strains revealed that 62 strains have plasmid harboring mcr-1 or mcr-3 and that plasmids are propagated by horizontal transmission. In addition, genetic analysis was performed on the plasmid having the mcr gene and its details were clarified.

研究分野：微生物学

キーワード：プラスミド 耐性菌 コリスチン耐性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

抗菌薬は細菌感染症の治療および畜水産物の生産性向上・安定供給に欠かすことのできない薬剤である。しかし近年、多種多様な薬剤耐性菌が出現し、細菌感染症の難治化や耐性菌によるアウトブレイクが多数報告されている。薬剤耐性菌の中でも特に問題となっているのが、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) を産生菌、さらにカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すカルバペネム耐性腸内細菌科細菌である。これらの耐性菌の多くは、耐性遺伝子が組み込まれたプラスミドが伝達されることにより、他の菌へと耐性を広げる。このようなプラスミドを介した薬剤耐性の伝播は、他の耐性に比べて拡散速度が早いことに加え、菌種を超えて生じることがある。

申請者らは科学技術振興機構 (JST) と国際協力機構 (JICA) が共同で実施している、地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) 「薬剤耐性細菌発生機構の解明と食品管理における耐性菌モニタリングシステムの開発」に参加し、ベトナムで流通する食肉、魚介類中の残留抗菌薬分析および同一試料から分離された細菌についての薬剤感受性試験や遺伝子解析を行ってきた。日本や欧米諸国における食肉中残留抗菌薬の検出率は 1% 以下であるのに対し、ベトナムでは 10% 以上と高い結果であった。一般的に、耐性菌の発生には、対応する抗菌薬が関与すると考えられており、実際に申請者らが行ったベトナムの調査では、キノロン系抗菌薬耐性菌はキノロン系抗菌薬が残留する食品からの検出率が優位に高いことを確認している。一方で、第三世代セファロスポリナーゼ産生大腸菌については、多数の食品から 60~70% の高い検出率で検出されたものの、当該食品にはセフェム系抗菌薬の残留は認められず、サルファ剤やキノロン系抗菌薬だけが高頻度に検出された。この結果は、これまでに考えられてきた「抗菌薬の使用により、それに対応する抗菌薬の耐性菌が発生・拡散する」という考えと矛盾している。このことから申請者は、第三世代セファロスポリナーゼ産生菌の増加は、セフェム系抗菌薬の使用ではなく、サルファ剤やキノロン系といった直接関係のない抗菌薬が要因ではないか、というアイデアを持つに至った。特に、ESBL 産生菌の発生と拡散にはプラスミド伝達が大きな役割を果たしていることから、「サルファ剤やキノロン系抗菌薬がプラスミド伝達を促進する」ことが大きな要因となっているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) 抗菌薬のプラスミド水平伝達への影響評価

第三世代セファロスポリナーゼ産生菌と感受性菌の接合試験を行い、食品や環境中からの検出実績のあるキノロン系抗菌薬やテト

ラサイクリン系抗菌薬の暴露が、プラスミド伝達に与える影響について評価する系を確立し、ESBL 産生菌のプラスミド伝達を促進する抗菌薬およびその濃度を探索する。

### (2) プラスミド性コリスチン耐性菌の検出と耐性遺伝子の解析

多剤耐性菌治療の「切り札」とされているコリスチンではあるが、に対する新たなプラスミド性コリスチン耐性遺伝子が 2016 年に初めて報告され、多剤耐性菌治療への影響が懸念されている。ベトナムの食肉および魚介類から分離した第三世代セファロスポリナーゼ産生大腸菌 261 株についてコリスチン感受性試験を行い、ベトナムの食品中のコリスチン耐性の実態を明らかにする。その結果、耐性遺伝子 (*mcr* 遺伝子) が検出された場合には遺伝子解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗菌薬のプラスミド水平伝達への影響評価

#### 1-a. 菌株

ドナー株にベトナムの食肉から分離した、プラスミド上に  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子のひとつである CMY-2 遺伝子を有する第三世代セファロスポリナーゼ産生大腸菌株 E362、レシピエント株にリファンピシン耐性大腸菌 C600 を用いて実験を行った。

#### 1-b. プラスミド水平伝達実験

ドナーおよびレシピエント株を LB broth に摂取し、36 で一晩培養する。各培養液 1 mL と LB broth 4 mL を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に測りとり、36 湯浴で 2 時間、140 rpm で振盪培養し、対数期の菌液を OD<sub>600</sub>=0.6-0.8 に調整した。次に、あらかじめ一定濃度に調製した抗菌性物質 (シプロフロキサシン、ナリジクス酸およびテトラサイクリン) を添加し調製した LB broth 0.8 mL を 1.5 mL チューブにとり、ドナーおよびレシピエント培養液を 0.1 mL 加え、36 湯浴で 2 時間、140 rpm で振盪培養した。その後、培養液を 1000、10000、100000 倍に希釈し、プラスミド水平伝達株のみを選択するために、1  $\mu$ g/mL セフォタキシム、100  $\mu$ g/mL リファンピシン含有 LB agar に 100  $\mu$ L 塗布し、36、22 $\pm$ 2 時間培養後、コロニー数を計測し、CFU/mL を算出した。

### (2) プラスミド性コリスチン耐性菌の検出と耐性遺伝子の解析

#### 2-a. 菌株

ベトナムの食肉および魚介類から分離した第三世代セファロスポリナーゼ産生大腸菌 261 株を用いた。

#### 2-b. コリスチン感受性試験

平板希釈法を用いて、コリスチン濃度は 0 から 8  $\mu$ g/mL に調製した溶液を添加した LB agar を用いた。菌液はマクファーランド

No. 0.5 の濃度に調製した菌液を使用した。培養は 36、22±2 時間培養後、コロニー形成の有無により最大発育阻止濃度 MIC (µg/mL) を算出した。コリスチン耐性の基準は CLSI の基準に準じて 2 µg/mL 以上を耐性とした。

#### 2-c. *mcr* 遺伝子スクリーニング PCR

QIAGEN Multiplex PCR (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、*mcr* 遺伝子のスクリーニング PCR を行なった。DNA テンプレートは、Tris-EDTA 緩衝液 TE で 95 10 分間煮沸し作成した。*mcr-1,2,4,5* のプライマー配列は既報を参照し、*mcr-3* のプライマー配列は下記の通りである<sup>1-4</sup>。

MCR3-759F; 5'-TGGTGAAACCGCTCGTGGTA-3'  
MCR3-1495R; 5'-ACACCTGCATAGGAACACGG-3'

PCR 条件は下記の通り実施した。

95 5 min  
95 30 sec、58 90 sec、72 30 sec  
×33 サイクル  
68 10 min

PCR 産物は、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて、試薬に DNA-1000 Reagent Kit (Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用し、オンチップの標準操作手順により泳動し PCR 産物を確認した。

#### 2-d. *mcr* の保有するプラスミドの水平伝達実験

ドナーに *mcr* 検出コリスチン耐性大腸菌 (E155、E769)、レシピエントに C600 を用いた。LB broth に摂取し、36 で一晩培養する。各培養液 1 mL と LB broth 4 mL を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に測りとり、36、140 rpm 水浴で 2 時間培養し対数期に増殖した菌液を OD600=0.6-0.8 に調整した。各菌液 0.1 mL を LB broth 0.8 mL に加え、36、140 rpm、2 時間水浴で震盪培養を行なった後、100、1000、10000 倍に希釈した菌液 100 µL を 1 µg/mL コリスチン、100 µg/mL リファンピシン含有 LB agar に塗布し、36、22±2 時間培養後、形成したコロニーを水平伝達株 (Co155、Co769) とした。

#### 2-e. 次世代シーケンスによるゲノム配列解析

大阪大学微生物病研究所附属遺伝子情報実験センターの協力を得て行なった。トランスコンジュガントのプラスミド短リードシーケンシングは、Illumina MiSeq desktop sequencer (Illumina Inc., CA, USA) を用いて行なった。E155 および E769 のホールゲノムシーケンスには PacBio RS II (Pacific Biosciences, CA, USA) を用いて、*mcr-3* を有するプラスミドによる 2 株の全ゲノム配列決定を行なった。PacBio 配列データは、SMRTPipe v1.85 の HGAP 3.0 を使用して *de*

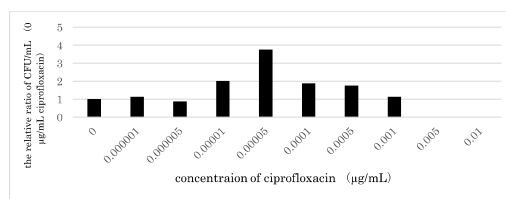
*novo* で構築し得られたデータを使用した。薬剤耐性遺伝子およびレプリコンタイピングは、ResFinder 2.1、PlasmidFinder 1.3 (<http://www.genomicepidemiology.org>) を用いた。アノテーションは、Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) (<http://www.migap.org>) を用いて行なった。Easyfig 2.1 および BRIG を用いてプラスミドの遺伝子マップを作成した。

#### 4. 研究成果

(1) シプロフロキサシン存在下でのプラスミド水平伝達実験の結果、 $1.0 \times 10^{-6}$  µg/mL から  $0.5 \times 10^{-5}$  µg/mL までは水平伝達株数に影響は見られなかったが、 $0.5 \times 10^{-4}$  µg/mL の濃度で処理した時に最大値になり、無添加時と比較して 3.5 倍以上のコロニー数となった (Figure 1)。また、 $0.5 \times 10^{-2}$  µg/mL 以上ではシプロフロキサシンによるレシピエント株が影響を受け、水平伝達株の発生が見られなかったと推測された。またテトラサイクリンにおいても同様に  $1.0 \times 10^{-3}$  µg/mL で処理した場合に最大 (4.2 倍) となったが、ナリジクス酸では処理濃度の変化によるプラスミド伝達株の生成について明確な違いはみられなかった。この結果から、本実験で用いたプラスミド伝達実験系では、一定濃度のシプロフロキサシンおよびテトラサイクリン存在下ではプラスミド水平伝達が促進される傾向が示唆された。

プラスミド水平伝播の頻度は、周辺に存在する抗菌性物質の種類と存在量以外にも、様々な環境要因の影響を受けることが考えられるため、実際の食肉表面において、残留抗菌性物質が、プラスミド水平伝達を誘導していることを証明するためにはさらなる検証が必要と考えられ、今後研究を継続する必要があると考えられた。

a.



b.

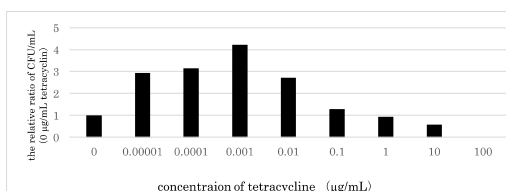


Figure 1. Correlation between plasmid horizontal transmission and ciprofloxacin concentration (a: ciprofloxacin, b: tetracycline)

(2) ベトナムの食品から分離した 261 株のコリスチン感受性試験、及びコリスチン遺伝子スクリーニング PCR を行なった。コリスチン感受性試験の結果、261 株のうち 62 株 (24%) がコリスチン耐性を示した。そのうち 60 株から *mcr-1* を検出したが、その大部分が鶏肉由来の ESBL 産生大腸菌であった。*mcr-2, 4, 5* は検出されず、*mcr-3* は豚肉由来の ESBL 産生大腸菌 2 株から検出された。

*mcr-3* を有するプラスミドについて次世代シーケンスによる遺伝子解析の結果から、本研究で分離した 2 株プラスミド (pVE155 および pVE769) のレプリコンタイプは IncFII であることが判明した (Figure 2)。

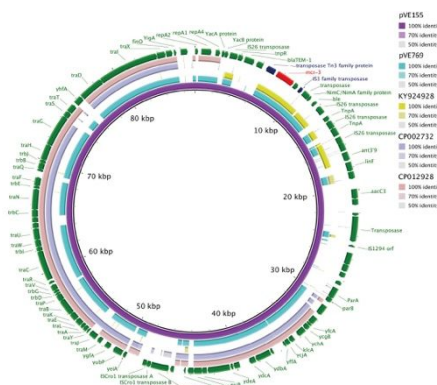


Figure 2. BRIG analysis of the *mcr-3*-carrying plasmids pVE769 and pVE155 in *E. coli* isolates from pork. Three plasmid sequences, KY924928, CP002732 and CP012928, were employed to compare with pVE769 and pVE155; KY924928: *mcr-3* harboring plasmid in *E. coli* isolated from pig faeces in China; CP002732 and CP012928: plasmid complete sequences indicated high homology with pVE769 and pVE155 using blastn program against GenBank database. Each plasmids were detected in *Salmonella enterica* from human and *E. coli* from pig faeces, respectively.

これは既報のプラスミド (GenBank accession No. KY924928) のレプリコンタイプ (IncHI2) とは異なることが明らかとなった<sup>5</sup>。本研究で分離したプラスミドの基幹部分が類似しているプラスミドについて BLAST 検索を行なった結果、ヒトから分離したサルモネラや豚糞便中から分離された大腸菌が保有するプラスミド (GenBank accession No. CP012928, CP002732) と類似することが明らかとなった。また pVE155 には *mcr-3* の他に  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子 TEM-1 およびアミノグリコシド耐性遺伝子 (*ant3'9* および *aacC3*) が、pVE769 にはマクロライド耐性遺伝子 *mphA* およびエリスロマイシン *ermB* を有していた。さらに *mcr-3* 遺伝子周辺の遺伝子

構造について、比較した結果を Figure 3 に示した。

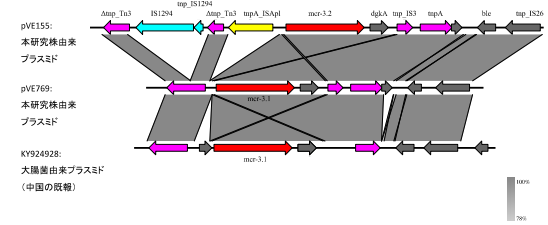


Figure 3. Comparison of the genetic environments of the *mcr-3* gene in three plasmids, pVE769, pVE155 (this study), and KY924928 (Yin *et al.* 2017).

既報と同様にトランスポーズ Tn3 を有することが確認できた<sup>5</sup>。一方で pVE769 では既報にはないインサージョンシーケンス (IS) を有することが判明した<sup>5</sup>。また *mcr-3.1* とは 1 塩基異なる *mcr-3.2* であることが判明した。*mcr-1* は IS*Apl1* を有することが多く、IS による拡散している可能性があることから<sup>6,7</sup>、同様に *mcr-3* もトランスポゾン等のモバイルジーンエレメントにより拡散していく可能性が示唆された。また、既報の *mcr-3* 周辺遺伝子構造が類似しており、中国とベトナムは地理的・文化的にも近いことから、国境を超えて、*mcr-3* を有する大腸菌もしくはそのプラスミドが拡散しつつあることが示唆された。

#### 参照

- [1] Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;**16**:161-8.
- [2] Xavier BB, Lammens C, Ruhai R *et al.* Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 2016;**21**:161.
- [3] Carattoli A, Villa L, Feudi C *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill* 2017;**22**:30589.
- [4] Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA *et al.* Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar

Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother* 2017;**72**:3317-3324.

- [5] Yin W, Li H, Shen Y *et al.* Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio* 2017a;**8**:e00543-17-6.
- [6] Matamoros S, van Hattem, J M, Arcilla M S *et al.* Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep* 2017;**7**(1):15364.
- [7] Snesrud E, Ong A C, Corey B *et al.* Analysis of Serial Isolates of *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* Reveals a Highly Active IS *Apl1* Transposon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017;**61**(5);e00056-17-10.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yamaguchi, T., Kawahara, R., Harada, K., Teruya, S., Nakayama, T., Motooka, D., Nakamura, S., Nguyen, D, P., Kumeda, Y., Dang, V, C., Hirata, K., Yamamoto, Y. (2018). The Presence of Colistin resistance gene *mcr-1* and *-3* in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam. *FEMS Microbiology Letters*. Volume365, Issue11.

〔学会発表〕(計2件)

- ・ 山口貴弘、河原隆二、照屋志帆乃、原田和生、元岡大祐、中村昇太、中山達哉、Nguyen Do Phuc、Dang Van Chinh、久米田裕子、山本容正、平田收正、ベトナムの豚肉から分離した *mcr-3* を有するコリスチン耐性大腸菌の解析、第91回 日本細菌学会総会、福岡(2018)
- ・ 山口貴弘、河原隆二、原田和生、Nguyen Do Phuc、Dang Van Chinh、久米田裕子、山本容正、平田收正、ベトナム・ホーチミンの食品から分離したコリスチン耐性大腸菌の解析、第90回 日本細菌学会総会、宮城(2017)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山口 貴弘 (YAMAGUCHI, Takahiro)  
地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所  
微生物部細菌課・主任研究員  
研究者番号：80553635

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )