

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32717

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16657

研究課題名(和文) 臨床分離株から検出される家畜由来薬剤耐性遺伝子のモニタリングとその制御

研究課題名(英文) Surveillance of clinical isolates including antimicrobial resistant genes derived from livestock

研究代表者

蓮沼 裕也 (HASUNUMA, Yuya)

桐蔭横浜大学・医用工学部・講師

研究者番号：70643013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌は世界的な脅威となっている。特に、患者から分離される薬剤耐性菌の中には、家畜や環境から流入していると思われる薬剤耐性遺伝子がある。本研究では、家畜に用いられるフロルフェニコールに対する耐性遺伝子である floR に着目した。floR 検出率は、臨床分離、食肉由来および健康人由来 ESBL 産生大腸菌においてそれぞれ 1.5%、6.4%、および 2.9% であった。さらに、市販食肉由来株が保有するプラスミドは高い接合伝達能力を有した。加えて、floR と同時に保有していた qnr 遺伝子について保有率を調査した。ESBL 非産生および ESBL 産生大腸菌の保有率は、それぞれ 2% および 4% で、全て qnrS だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、家畜からヒトへ薬剤耐性菌が拡散したことを示唆する耐性遺伝子マーカーとして floR 遺伝子を提案することができたと考える。この成果は、ヒト環境における薬剤耐性遺伝子流入経路の一つを明らかにすることにつながり、新たな薬剤耐性菌拡散の分子生物学的背景をモニタリングできる可能性がある。このことは、薬剤耐性菌の拡散を制御するための新たな方法へと繋がると考えられ、さらには、将来的に薬剤耐性菌による感染症の減少、患者入院期間の短縮、医療費の削減にも貢献する。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial resistant bacteria is of global concern. In particular, the drug-resistant bacteria often include antimicrobial resistant genes, that are thought to origin from livestock and environment, among clinical isolates. In this study, we focused on floR gene, which is a resistance gene to florphenicol used in livestock. The prevalent rates of floR were 1.5%, 6.4%, and 2.9% in ESBL producing Escherichia coli from clinical isolates, retail meats and healthy humans, respectively. Furthermore, the plasmid possessed the isolates from retail meat had a potential of high frequency of transconjugation. In addition, the prevalent rate of the qnr gene, which was carried with floR in the strain, was investigated. The prevalence of qnr gene in non-ESBL and ESBL-producing E. coli was 2% and 4%, respectively, and qnrS were determined among all strain.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：ESBL産生菌 floR qnr AMR -ラクタマーゼ

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬耐性菌 (Antimicrobial resistance; AMR) 対策は WHO が提唱する「One world, One Health」のなかでより優先すべき事項の中の 1 つとして挙げられており、日本政府も国内で優先的に解決すべき問題点の 1 つとしている。医療機関において、薬剤耐性菌による院内感染症は平均在院日数の延長など医療経済を圧迫する要因の一つで、世界的にも新たな薬剤耐性菌の発生と拡散は多くの国で懸念となっている。現在、国内で頻りに分離されるようになってしまった CTX-M 型基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科は病院内の主要薬剤耐性菌の 1 つであるが、近年では市中でも拡散している。さらには、ブロイラーや市販国産および外国産鶏肉からも高頻度に分離されることから、「One Health」の観点において、食肉を通じた市中への ESBL 産生菌もしくはその薬剤耐性遺伝子の拡散の疑いは明らかにすべき大変興味深い課題である。これまで研究申請者は近隣の臨床検査センターと連携し、神奈川県内の病床数 300 床以下の中小規模病院から ESBL 産生 *E. coli* を 200 株ほど集め、その分子疫学的特徴について調べてきた (蓮沼ら、2018)。これらの医療施設から集めた ESBL 産生 *E. coli* 株の分子疫学は、大学病院など地域中枢病院よりも市中感染の原因菌株の特徴を含んでいると考えられ、多数の中小規模病院を対象にしたサーベイランスは、未だ中枢病院で拡散、顕在化していないいくつかの *bla*_{CTX-M} やその他の耐性遺伝子の存在を示唆した。さらに、それらの耐性遺伝子を保有する株を全ゲノム解析すると、いくつかの耐性遺伝子は家畜から分離される株が高頻度に保有するものが検出された (表 1)。この事象は、市中病院の患者から分離される薬剤耐性菌は家畜に由来する薬剤耐性遺伝子の拡散と水平伝播の可能性を推定できると考えられた。

特に、*bla*_{CTX-M-55} および *qnrS* 保有株において、同時に保有が認められた薬剤耐性遺伝子 *floR* がいくつかの株から検出された。

floR は家畜によく用いられているフロルフェニコールに対する耐性遺伝子である。*floR* の保有状況は家畜由来株からの報告しかなく、ヒト由来分離株から検出されるという報告に乏しく、ヒト分離株における保有率も明らかとなっていない。このように、ヒトに対して使用されない抗菌薬に対する薬剤耐性遺伝子が、ヒト臨床分離株からも検出されるものの、それらの疫学情報は現時点で非常に乏しい。

表 1 *qnr* 陽性株が保有する薬剤耐性遺伝子

株	Quinol.	Trim.	β-lactam	TCs	Sulph.	AGs	Phen.	Rifam.
1	<i>oqxA</i> <i>oqxB</i> <i>QnrS2</i>		<i>bla</i> _{CTX-M-55} <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>tet(A)</i>		<i>aac(6)/lb-cr</i>	<i>catB3-like</i> <i>floR-like</i>	<i>ARR-3</i>
2	<i>QnrS1</i>	<i>dfrA14-like</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1}			<i>aac(6)/lb-cr</i> <i>aac(3)-IIa-like</i>	<i>catB3-like</i>	
3	<i>QnrS1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>tet(A)</i> <i>tet(D)</i>	<i>sul1</i>			
4	<i>QnrS1</i>	<i>dfrA14-like</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14}					

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトから臨床分離される菌株において、薬剤耐性遺伝子が家畜由来株から水平伝播、拡散したことを示唆するいくつかのマーカー耐性遺伝子についてその保有率を明らかにすることである。これまで薬剤耐性菌の発見は、ヒト臨床において分離株が抗菌薬に耐性を示すことをきっかけとして解析がなされてきた。しかしながら、ヒト-家畜-環境が全て繋がっているという「One Health」の考え方において薬剤耐性遺伝子を保有する株が感染症を起こしている時点で、すでに食肉を含む家畜や環境から薬剤耐性遺伝子がヒト環境へ水平伝播していることになる。そこで本研究は、必ずしもヒトの臨床現場で治療に使う抗菌薬に対して問題にならない薬剤耐性遺伝子に着目した。さらに、対象とする菌株は市中を反映するように病床数 300 床以下の医療施設から分離される耐性菌および感受性菌とする。しかしながら、これらは全てヒトで問題となっている薬剤耐性遺伝子が家畜からも分離されていることを証明したにすぎず、これでは薬剤耐性遺伝子の拡散防止は望めない。本研究の目指すべき成果として、家畜からヒトへ薬剤耐性菌が拡散したことを示唆する耐性遺伝子マーカーを証明することにより、新たな薬剤耐性菌拡散の分子生物学的背景をモニタリングできる可能性があり、その制御方法へと繋げることを目指した。

3. 研究の方法

使用菌株は臨床分離および健康人由来 ESBL 産生 *E. coli* それぞれ 203 株、68 株、ならびに市販鶏肉由来広域セファロsporin 耐性 *E. coli* 計 78 株を用いた。*floR* 遺伝子の検出は自ら作製した primer を用いて、PCR にて行った。*floR* 陽性となった株は、Ion S5 (Thermo 社) による全ゲノムシーケンズ解析を行った。さらに、得られた塩基配列データは Center of Genome Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) の ResFinder にて薬剤耐性遺伝子を、MLST にて Sequence type を得ると同時に、PATRIC RAST (<https://www.patricbrc.org/>) を用

いて Annotation を行った。また、臨床分離された *floR* および *qnrS2* 保有 ESBL 産生 *E. coli* は国内初であると思われる、Ion S5 および PacBio (Pacific Biosciences 社) によりゲノム完全長配列を得た。一方で、*qnr* 遺伝子の保有率を明らかにするため、CPFX 感受性ならびに耐性を示す市中分離 *E. coli* 各 100 株から *qnr* 遺伝子を PCR にて検出した。

4. 研究成果

floR の検出率は、臨床分離、市販鶏肉由来および健康人由来 ESBL 産生 *E. coli* それぞれ 1.5% (3/203 株)、6.4% (5/78 株)、および 2.9% (2/68 株) であった (図 1)。さらに、由来に関わらず保有していた ESBL 遺伝子は、*bla*_{CTX-M-55} であった。また、市販食肉由来株 5 株中 4 株で接合伝達体が得られ、接合伝達効率は $1.28 \times 10^{-2} \sim 2.27 \times 10^{-4}$ であった。得られた接合伝達株はフェニコール系抗菌薬において、その供与株と同様の薬剤感受性パターンを示し、*floR* 遺伝子が検出された。鶏肉由来菌株における *floR* 遺伝子を載せた Plasmid の高い伝達能は、家畜からヒト環境への Plasmid を介した耐性遺伝子伝播の可能性が高いことを示唆している。また、*floR* 遺伝子を保有する、臨床分離株および市販鶏肉由来株から *bla*_{CTX-M-55} が検出されたことから、いくつかの薬剤耐性遺伝子は *floR* 遺伝子とともに伝播している可能性が考えられる。以上のことから、*floR* 遺伝子は家畜からヒト環境へ薬剤耐性遺伝子が拡散したことを示唆するマーカー遺伝子としての有用性が示された。*qnrS2* および *floR* を保有する臨床分離株は、Ion S5 system および PacBio sequencing により染色体遺伝子ならびに 1 本の Plasmid の完全長配列を決定した。*qnrS2*、*floR* および *bla*_{CTX-M-65} は染色体遺伝子に存在していることが確認され、21kb の薬剤耐性遺伝子カセットを形成していた。この菌株を用いた接合伝達試験においても、Plasmid の伝達を確認されなかった結果は、薬剤耐性遺伝子が染色体遺伝子上に存在しているという全ゲノム配列決定の結果を支持する。

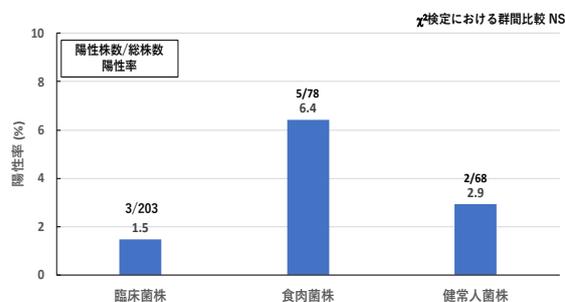


図 1 各由来における *floR* 遺伝子保有率

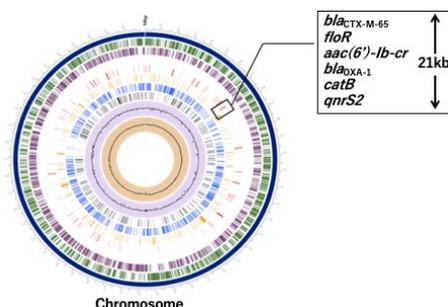


図 2 *qnrS2* 保有株の染色体遺伝子

NQs に感受性を示す ESBL 非産生および ESBL 産生 *E. coli* の *qnr* 遺伝子保有率は、それぞれ 2% (2/100 株) および 4% (4/100 株) だった。なお、保有していた遺伝子は全て *qnrS* だった。事前に衛生検査所 (臨床検査センター) から得られた情報を参考に菌株が分離された地域を見比べると、ESBL 非産生株は中国・四国地方から、ESBL 産生株は関東地方から分離された菌株だと判明した。日本国内でもわずかであるが *qnr* 遺伝子保有臨床分離株が ESBL 遺伝子保有の有無に関わらず確認され、年々増加傾向である NQs 耐性菌に *qnr* 遺伝子が影響している可能性がある。

今後の展望として、*floR* 遺伝子が家畜や環境から水平伝播してヒト環境に入り込んだことを強く示唆する証明を、これまでに分離されている菌株との比較ゲノム解析にて明らかにする。一方、*qnr* 遺伝子保有株については研究助成期間中に終えなかったため、他の保有耐性遺伝子や Sequence Type の決定など継続して明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 新国 駿、蓮沼 裕也、天野 紗希、B. エンフジン、徳岡 由一
2. 発表標題 神奈川県内中小規模病院から分離されたESBL産生大腸菌ST131のクレード分類
3. 学会等名 第68回日本医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 美里、蓮沼 裕也、徳岡 由一
2. 発表標題 市販鶏肉由来および神奈川県内臨床分離ESBL産生Escherichia coli におけるf1oR遺伝子の保有状況
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓮沼 裕也、徳岡 由一
2. 発表標題 神奈川県内で臨床分離されたqnrS遺伝子保有ESBL産生Escherichia coli株の分子生物学的特徴
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya HASUNUMA, Takuya TSUNODA, Satoshi KUGAWA, and Yoshikazu TOKUOKA
2. 発表標題 Whole genome analysis of Escherichia coli clinical strains using next-generation sequencing.
3. 学会等名 14th International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 希実、蓮沼 裕也、徳岡 由一
2. 発表標題 健常青年における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の保菌率推移と分子疫学的特徴
3. 学会等名 第40回 日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓮沼 裕也、新国 駿、徳岡由一
2. 発表標題 High-throughput sequencingによるAmpliseqを用いた β -lactamase遺伝子の網羅的解析
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 星野 隼也、蓮沼 裕也
2. 発表標題 神奈川県内で臨床分離された Cefmetazole 耐性 Escherichia coli の分子疫学的特徴
3. 学会等名 第69回日本医学検査学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林美里, 新国駿, 徳岡由一, 蓮沼裕也
2. 発表標題 floR遺伝子保有菌株の薬剤耐性接合伝達能および分子疫学的特徴
3. 学会等名 第4回日本ワンヘルスサイエンス学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野隼也, 新国駿, 徳岡由一, 蓮沼裕也
2. 発表標題 神奈川県内で臨床分離されたセフトラゾール耐性Escherichia coliの薬剤耐性伝達能評価
3. 学会等名 第4回日本ワンヘルスサイエンス学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shun NIKKUNI, Yuya HASUNUMA, and Yoshikazu TOKUOKA
2. 発表標題 Evaluation of the analysis for detection of the bla gene variants using multiplex Ampliseq
3. 学会等名 15th International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蓮沼裕也, 小林美里, 新国駿, 徳岡由一
2. 発表標題 f1oR遺伝子保有菌株の薬剤耐性接合伝達能および分子疫学的特徴
3. 学会等名 第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新国 駿, 蓮沼 裕也, 徳岡 由一
2. 発表標題 Ampliseqによるbla遺伝子の網羅的検出と低頻度バリエーション解析系の確立
3. 学会等名 第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷津大介, 蓮沼裕也, 新国駿, 徳岡由一
2. 発表標題 臨床分離されたEscherichia coliにおけるニューキノロン系抗菌薬耐性遺伝子qnr遺伝子保有率調査
3. 学会等名 第32回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

桐蔭横浜大学医用工学部 臨床微生物学研究室 http://www.cc.toin.ac.jp/sc/hasunuma/
--

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

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
---------	---------