

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	家畜とヒトとの間における薬剤耐性菌の循環に関する分子疫学および時空間比較ゲノム解析 (課題番号：1504) (研究期間：平成27年度～平成28年度)
主任研究者名	研究者名：荒川 宜親 所属機関：国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科

家畜とヒトとの間の薬剤耐性遺伝子の伝達様式を解明するために、本研究ではゲノム解析で新たに得られた100を超えるプラスミドゲノムデータとともに公開されているゲノムデータベースに登録されたゲノム情報とを用いて、時空間ゲノム比較解析を行った。

その結果、CTX-M-8の遺伝子を仲介するIncI1プラスミドは、最初にニワトリで出現し、小売の鶏肉を介してヒトに伝達された可能性が示唆された。2016年に日本の長野県で購入した鶏肉検体から検出されたコリスチン耐性大腸菌に保持されたmcr-1媒介性IncI2プラスミドは、かなり以前に日本国外で最初に出現した可能性があるプラスミドが日本への侵入後にゲノム構造が徐々に変化し、日本国内に広がりつつある可能性が示唆された。

様々な抗菌剤耐性遺伝子を媒介するプラスミドのゲノム構造は非常に多様化しており、複雑になってきているため、抗菌剤の耐性遺伝子と家畜およびヒトから回収されたプラスミドの関連性に関するより効果的な遺伝子解析のために、新しい解析アルゴリズムを作成する必要がある。いずれにせよ、我々は、最初、南アメリカで鶏において出現し、現在、鶏肉を通して世界中に広がりつつあると考えられるCTX-M-8遺伝子を担うIncI1プラスミドの遺伝的関連性を明らかにすることができた。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	家畜とヒトとの間における薬剤耐性菌の循環に関する分子疫学および時空間比較ゲノム解析 (研究期間：平成27年度～平成28年度)
主任研究者名	所属：国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科 氏名：荒川 宜親（研究課題番号：1504）

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間 平成27年度～平成28年度

2 研究目的

抗菌薬が医療環境とともに畜水産環境で使用されるようになった結果、それらの環境で様々な薬剤耐性菌が出現し、現実的かつ深刻な問題となりつつある。薬剤耐性菌が広がる主因は、ヒトが使用する抗菌薬であり、薬剤耐性菌問題は、これまで医療環境や畜産環境等、抗菌薬が多用されるしばしば問題となってきた。我が国においては、医療環境や畜産（特に鶏、豚、牛等家畜）環境の薬剤耐性菌の動向は、厚生労働省の院内感染対策サーベイランス（JANIS）や農林水産省の動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）注意深くモニタリングされ、その動向が監視されてきた。

しかし、2000年以降、抗菌薬に直接的に暴露されることがない健常者からも薬剤耐性菌が分離されるケースが報告され始め、この事実は、薬剤耐性菌の拡散が、抗菌薬が使用される環境下のみならず、市中環境にまで及んでいる可能性を示唆している。

抗菌薬の暴露歴のない健常人から分離される薬剤耐性菌の主たる由来は、食品であろうと推測されている。特に、鶏などの家畜およびその肉製品の汚染は直接的な原因として指摘されている。さらに、健常人が食肉等を介して薬剤耐性菌を腸内などに保有し、病気になった際に医療環境に持ち込むことも想定されるため、家畜由来の薬剤耐性菌と医療環境由来の薬剤耐性菌との遺伝学的関連性が近年注目されている。このように、家畜に由来する畜産食品を介したヒトとの薬剤耐性菌の循環の経緯は容易に想像がつくが、その伝播経路については未だ科学的根拠に基づき、十分に検証されているとは言えないのが実際である。そこで本研究では、家畜（鶏、豚、牛等）から分離した特定の薬剤耐性菌と、ヒト（健常人、病院環境）から分離した薬剤耐性菌について次世代シーケンサー(NGS)を用いて網羅的なゲノム比較解析を行い、得られたプラスミドのゲノム情報について、公開されているデータベース上のゲノム情報も加えて「系統ネットワーク」解析法などを用いた比較ゲノム解析を実施し、家畜とヒト間を循環する薬剤耐性菌の動態を、分子、遺伝子のレベルで時間的、空間的に解明することを目的として研究を実施した。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
検体収集	1) 家畜の腸内容物の収集	鈴木匡弘（愛知県衛生研究所）
	2) 小売り肉の収集	川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科）
薬剤耐性菌の選択分離・同定	1) 薬剤耐性菌の選択分離	川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科） 鈴木匡弘（愛知県衛生研究所）
	2) 菌種同定	長野則之（信州大学大学院医学系研究科） 荒川宜親（名古屋大学大学院医学研究科）
薬剤感受性試験	1) β -ラクタム薬の最小発育阻止濃度測定	荒川宜親（名古屋大学大学院医学研究科）
	2) アミノグリコシド、キノロン系薬の最小発育阻止濃度測定	川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科）
	3) その他の抗菌薬の最小発育阻止濃度測定	長野則之（信州大学大学院医学系研究科）
薬剤耐性遺伝子の型別	1) β -ラクタム系、アミノグリコシド系、キノロン系に薬剤耐性を付与する遺伝子の型別	荒川宜親（名古屋大学大学院医学研究科）
	2) その他の抗菌薬に対する薬剤耐性遺伝子の型別	長野則之（信州大学大学院医学系研究科）
薬剤耐性遺伝子の比較ゲノム解析	薬剤耐性遺伝子及び伝達性プラスミドの比較ゲノム解析	荒川宜親、川村久美子（名古屋大学大学院医学研究科） 鈴木匡弘（愛知県衛生研究所） 長野則之（信州大学大学院医学系研究科）

研究協力者として、以下の者が、本研究に参加した。

皆川洋子	（愛知県衛生研究所 所長）
木村幸司	（名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学・耐性菌制御学 准教授）
和知野 純一	（同 上 講師）
山田景子	（同 上 助教）
長野由紀子	（同 上 客員研究員）
法月千尋、林 謙吾、大野宏枝、吉田真歩	（同 上 修士課程）
加藤 愛、鈴木めい	（名古屋大学医学部 保健学科 4年）
大崎裕介、齋藤さとみ、小坂駿介、林 航、谷口 唯	（信州大学大学院医学系研究科 修士課程）
三浦義明、竹内 仁、柴田篤志、佐久間一紀、竹内政行、佐藤幹雄	（愛知県食品衛生検査所）

4 倫理面への配慮について

本研究では、ヒト臨床材料、診療情報、個人情報、ヒトゲノム情報などは一切扱わず、市中のマーケットで市販されている鶏肉や豚肉などの食肉および屠殺後のブタの腸内用物や牛の糞便から分離された薬剤耐性菌株を対象として細菌学的、遺伝学的な解析を実施するため、研究倫理面で審査の対象とする内容は含まれないと判断された。

II 研究内容及び成果等

主に初年度の成果

(1) 研究項目名：検体収集

1) 個別課題名：家畜の腸内容物の収集

(研究担当者名：鈴木匡弘(愛知県衛生研究所))

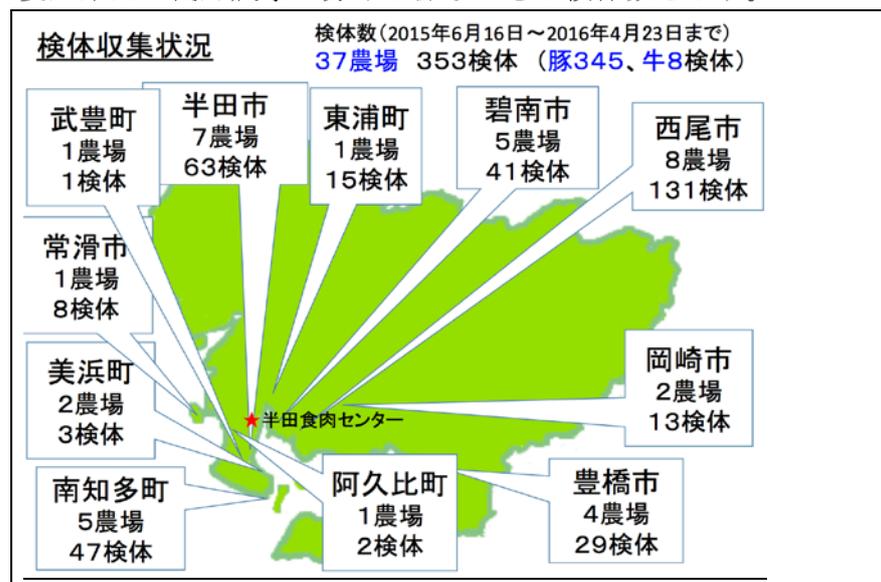
研究内容・方法：

愛知県衛生研究所(皆川洋子所長)の協力を得て、愛知県食品衛生検査所半田駐在(以下、半田駐在)検査室に対して豚の腸内用物(糞便)の採材について協力依頼を行い検体収集を開始した。また、愛知県内の15箇所の牛飼育農家に牛糞の提供を依頼した。さらに、信州大学の長野則之(研究分担者)を通じて長野県食肉公社にも豚の腸内用物の採取と提供について協力依頼を行った。

研究成果：

その結果、愛知県内の農場で飼育されていた豚については、半田食肉センターに隣接する半田駐在検査室の協力を得て愛知県内の10市の30農場に由来する総数345頭の豚の腸内用物(糞便)を採材することができた。また、牛については、最終的に15軒の牛飼育農家より41頭の牛由来の51検体(糞)を採取できた。さらに、長野県食肉公社の協力を得て長野県内の1農場で採取した10頭の豚より腸内用物(糞便)を採材することができた。

以下に、愛知県内の養豚農家の分布と採取できた検体数を示す。



考察および今後の課題：

研究目的で養鶏場において鶏の腸内用物を採取するにあたっては、養鶏場の安全管理、衛生管理などの理由からか協力を得ることが難しく、今後、この種の調査研究をする場合には、養鶏場を所管する省庁の行政ルートを介した事前の依頼と同意取得等が重要と考えられた。一方、屠畜や解体施設内には、食材の衛生管理上の規制により部外者が立ち入ることはできないため、豚腸内用物の採材については、愛知県衛生研究所を通じて依頼をし、屠殺後のブタ個体より腸内用物の採取を実施して頂くなど、本研究は、食肉センターや食肉公社の職員の方々の多大のご協力を得て実施された。

1) 個別課題名：小売り肉の収集

(研究担当者名：川村久美子 (名古屋大学大学院医学研究科))

研究内容・方法：

愛知県衛生研究所鈴木室長と信州大学の長野教授の協力と連携により愛知県内および長野県内のスーパーマーケットなどでパック詰めのおよび冷凍の鶏肉および豚肉を可食部位および国産（産地）、外国産などを考慮しつつ購入した。

研究成果：

愛知県内で、12店舗で鶏肉を46パック（ささみ9、ナンコツ2、むね肉8、むね挽肉1、もも14、もも挽肉3、血肝5、手羽先1、手羽中2、挽肉1）、長野県内では16軒の小売店から鶏肉150パック（もも37、むね肉24、もも挽肉6、むね挽肉13、ささみ11、手羽31、レバー8、皮9、はらみ1、軟骨9、セセリ1、卵巣1、鶏ガラ1）および長野県内の9軒の小売店からブタ肉を50パック購入し本研究に用いた。長野県の鶏肉150パックの内訳は、国産139パック、ブラジル産10パック、米国産1パックであった。

愛知県で購入した46パックの鶏肉の生産地の内分けは、以下のようであった。

部位	生産地（購入したパック数）
もも	愛知(2)、徳島(3)、宮崎(3)、三重(1)、佐賀(1)、ブラジル(4)
もも挽肉	愛知(3)
ささみ	愛知(5)、徳島(1)、三重(1)、岐阜(1)、佐賀(1)
むね	愛知(2)、佐賀(1)、徳島(1)、宮崎(2)、鹿児島(1)、北海道(1)
むね挽肉	佐賀(1)
挽肉	愛知(1)
血肝	愛知(1)、静岡(1)、三重(1)、岐阜(1)、宮崎(1)
手羽	愛知(1)、三重(1)、鹿児島(1)
ナンコツ	愛知(1)、タイ(1)

ただし、長野県内で購入した鶏肉の生産地については「国産」のみの表示が多く、一部に、宮崎や鹿児島、徳島などの生産地の表示がみられたが、多くは、生産地の都道府県名は不明であった。

考察および今後の課題：

鶏肉の産地については、国産と輸入とを確認して購入できたが、農場名等を市販品から遡及することは困難であった。国産の鶏肉については、食品の安心・安全の向上の観点から、それらのトレーサビリティが確保できるよう、コード化された生産農場や食肉処理場等の情報を、小売品のラベルに記載するなど、今後、状況に応じて検討する必要がある。

研究項目名：薬剤耐性菌の選択分離・同定

1) 個別課題名：薬剤耐性菌の選択分離

(研究担当者名：川村久美子(所属機関名：名古屋大学)、鈴木匡弘(所属機関名：愛知県衛生研究所))

研究内容・方法：

長野則之(信州大学)らとの密接な連携により、市販鶏肉やブタの腸内内容物、牛糞便より、薬剤耐性菌を分離した。耐性菌の分離は、各グループで共通の方法を採用し実施した。具体的には、鶏肉については、肉塊を滅菌したハサミで細かく切り分け、その約 10g をブリアント・グリーン乳糖胆汁イオン(BGLG)液体培地(日水製薬株式会社)約 100ml に加え、35℃で 24 時間前培養した。その後、セフトキシム(CTX)を 1 µg/ml 添加した 2 枚のマッコンキー寒天培地に、培養液をそれぞれ 10µl および 100µl 塗抹し 35℃で 24 時間保温した。翌日、寒天培地に生育したコロニーを白金耳で 5 コロニー釣菌し、数 ml のミュラーヒントン液体培地に懸濁した後、滅菌綿棒を用いて、ミュラーヒントン寒天プレートに様に塗抹し、プレート毎に、CTX と CTX にクラブラン酸(CVA)を添加した 2 種類の薬剤感受性試験用の disk をそれぞれ 1 枚ずつ置き、さらに 35℃で 24 時間培養した後、2 つの disk の周囲の発育阻止円の大きさの差の有無を観察し、ESBL 産生菌か否かを推定した。

ブタ腸内容物や牛糞検体からの ESBL 産生疑い株の分離は、検体約 0.1g を、CTX(1 µg/ml)を含むマッコンキー寒天培地に白金耳や綿棒を用いて直接塗抹し 35℃で 1 夜培養し、翌日発育が認められた場合、それぞれのサンプルから 5 コロニー選択し、DHL 培地にて純培養してそれ以後の研究に使用した。

以下に、薬剤耐性菌の分離・同定手順を簡単に示す。



研究成果：

愛知県内の30軒の養豚農家に由来する345件のブタ腸内容物のうち8軒の養豚農家に由来する16件の腸内容物検体より、ESBL型等が異なる22株のESBL産生疑い株が分離された。また、最終的に、愛知県内の15軒の牛農家で採取した51検体の牛糞うちの14検体より、ESBL産生疑い株が分離された。(後に1件は、CMY-2産生株と判明)

さらに、愛知県内の12店舗で購入した鶏肉46検体のうち、35検体(76.1%)からCTXを含むMH寒天培地に生育しESBL産生が疑われる菌が分離された。その内訳は、国産は41検体、海外産は5検体であり、ESBL産生疑い菌の分離状況は、国産で30/41(73.2%)、海外産で5/5(100%)であった。後の詳しい解析により35検体中の15検体(15/46検体：32.6%)からESBL産生株が分離された。

また、信州大学の長野らの協力により長野県内の16軒の小売店で購入した市販鶏肉150パックからは、59パック(39.3%)でESBL産生株が疑われる大腸菌が分離され、同一パック(検体)より2種類以上の異なるCTX-M型ESBLが重複して分離された場合を含め、総数で70株のESBL産生疑い株が分離された。

以下、長野県内で購入された市販鶏肉の部位別件数と最終的にESBL産生株と判定された菌株が分離された59パック(検体)のデータを示す。

鶏肉部位	検体総数	ESBL陽性検体数(陽性率)	原産国	検体数
もも肉	37	12(32.4)	日本	7
			ブラジル	5
むね肉	24	15(62.5)	日本	15
もも挽肉	6	2(33.3)	日本	2
むね挽肉	13	3(23.1)	日本	3
ささみ	11	3(27.3)	日本	3
			ブラジル	1
手羽	31	11(35.5)	日本	10
			ブラジル	1
レバー	8	4(50)	日本	4
皮	9	4(44.4)	日本	4
はらみ	1	1(100)	日本	1
軟骨	7	3(42.9)	日本	1
			ブラジル	2
せせり	1	1(100)	日本	1
卵巣	1	0(0)	日本	0
鶏ガラ	1	0(0)	日本	0
計	150	59(39.3)		

長野県内で購入した鶏肉の中で、10パック(検体)以上調べた部位でESBL産生疑い株の分離頻度が高い部位としては、むね肉(15/24パック:62.5%)、手羽(11/31パック:35.5%)、もも肉(12/37パック:32.4%)、ささみ(3/11パック:27.3%)、むね挽肉(3/13パック:23.1%)であった。他方、10パック以下しか検査できなかった部位でのESBL産生疑い株の分離頻度は、レバー(4/8パック:50%)、皮(4/9パック:44.4%)、軟骨(3/7パック:42.9%)の順であ

った。ESBL産生菌が疑われたCTX耐性大腸菌が分離された59パック(検体)の内訳は、国産51、ブラジル8、米国0であり、国産鶏肉でのESBL産生疑い株の分離率は、51/139(36.7%)となったのに対し、ブラジル産肉では8/10(80.0%)とかなり高い傾向が見られた。

一方、長野県内の9軒の小売店で購入した50検体のブタ肉からは、ESBL産生が疑われる株は検出されなかった。

考察および今後の課題：

市販鶏肉からのESBL産生株の分離率は、愛知県では平均で32.6%であり、長野県では、36.7%であり、地域により分離率に微妙な差が見られたが、海外産では、ブラジル産では愛知と長野でともに高い分離率を示した。海外産は、一般小売りでは出回りにくく、多くは、業務用として外食産業で消費されていると考えられるが、国産品からもESBL産生株が分離されるのは、国内の養鶏場でも実際にESBL産生菌が広がっている可能性に加え、流通過程や加工工程での外国産からの汚染の可能性もあり、その鑑別には、ESBLの遺伝型の正確な判定とともにESBLの遺伝子を媒介するプラスミドの詳しい比較解析が有用と思われる。

2) 個別課題名：菌種同定

(研究担当者名：長野則之(所属機関名：信州大学)、荒川宜親(名古屋大学))

研究内容・方法：

名古屋大学の川村久美子の研究グループと愛知県衛生研究所の鈴木らと共同で、食肉および家畜の腸内容物や糞便から分離されたESBL産生疑い菌について、生化学的性状に基づいた通常の菌種の同定法とともに、質量分析装置(MS)を用いた同定法を併用して、菌種の同定を実施した。

研究成果：

CTXを含むマッコンキー寒天培地にコロニーを形成した菌株の中から、合計で141株(愛知ブタ腸内容物22/345、愛知牛糞14株/51検体、愛知県内購入鶏肉35株/46検体、長野県内購入鶏肉70株(含む重複分離)/150検体、長野豚ブタ腸内容物0/10、長野ブタ肉0/50)のESBLを産生する可能性のある大腸菌を同定し、その後の詳しい遺伝子解析に使用した。

考察および今後の課題：

詳しい解析により後にESBL産生株と確定した株の分離頻度は、前記したように愛知県では国産と海外産を併せた平均で32.6%、長野県では39.3%であったが、この結果は、文献的にも既に報告されているように、鶏の腸管内におけるESBL産生株の高い保菌率と食鳥処理段階のチラー槽などでの汚染が反映していると考えられている。一方、愛知のブタの腸内容物からのESBL産生疑い株の分離頻度は、16/345頭(4.6%)であったが、長野県のブタ10頭の検体では、

ESBL 産生疑い株は分離されず、また長野県内で購入された豚肉 50 検体からも、ESBL 産生疑い株は分離されておらず、これには、屠殺から解体工程全般における衛生管理状況の違いが反映している可能性が考えられる。

研究項目名：薬剤感受性試験

- 1) 個別課題名：β-ラクタム薬の最小発育阻止濃度測定
(研究担当者名：荒川宜親 (所属機関名：名古屋大学))

研究内容・方法：

研究分担者である川村久美子、長野則之、鈴木匡宏らの研究グループと共同で、ESBL の産生が疑われる分離株について、米国 CLSI が推奨する方法により、β-ラクタム薬の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

研究成果：

ESBL の産生が疑われる株であるため、ペニシリン系や第三世代セファロスポリン系に対しては、全般的に耐性を示したが、カルバペネム系に対しては、耐性株は存在しなかった。

以下に、愛知県内で採取した豚腸内用物より分離された 22 株の ESBL 産生株に対する各種抗菌薬の MIC を示す。

No.	CTX	CAZ	CTF	CFX	IPM	GM	AMK	APM	KM	TC	FOM	NA	CPFX	CP	FFC	TMP	SMX	NTF	CL	
11	128	16	32	8	0.25	64	2	4	4	128	0.5	128	≤0.25	256	128	≤0.25	256<	8	0.13	
15	128	16	256<	8	0.25	128	1	4	8	128	256<	8	≤0.25	64	128	256<	256<	4	0.13	
25	1	128	16	256<	4	0.25	1	2	4	4	2	2	8	≤0.25	4	4	0.5	64	8	0.13
	2	64	8	128	4	≤0.25	1	2	4	4	64	2	8	≤0.25	8	4	0.5	64	8	0.13
41	256	16	256<	8	0.25	128	2	4	8	128	256<	8	≤0.25	128	64	256<	256<	4	0.09	
62	1	64	8	32	4	0.25	1	2	4	2	32	2	8	≤0.25	4	4	0.5	64	8	0.13
	4	128	8	32	4	≤0.25	1	2	4	4	0.5	1	8	≤0.25	4	4	≤0.25	64	16	0.13
71	32	2	128	8	0.25	128	2	4	256<	256	2	256<	32	256	256<	256<	256<	8	0.13	
73	1	64	8	32	4	0.25	1	2	4	2	32	1	8	≤0.25	8	4	0.5	64	8	0.09
	2	128	16	256<	4	≤0.25	1	2	4	4	0.5	2	16	≤0.25	4	4	0.5	64	8	0.09
79	32	2	64	2	0.25	256	4	8	256<	256	2	256<	32	256<	128	256<	256<	8	0.13	
105	64	8	128	2	0.25	64	4	4	8	128	0.5	128	≤0.25	256	128	≤0.25	256<	8	0.09	
117	1	64	8	256<	2	0.25	1	2	4	4	0.5	0.5	4	≤0.25	4	4	≤0.25	64	8	0.09
	2	32	16	32	2	≤0.25	1	2	4	4	64	2	16	≤0.25	8	4	≤0.25	64	8	0.09
128	4	256	32	256<	2	0.25	1	2	4	256<	32	1	256<	8	256<	64	256<	256<	8	0.09
	128	16	2	16	4	0.25	1	2	4	4	64	0.5	16	≤0.25	4	4	0.5	256<	4	0.13
137	32	8	128	8	0.25	64	2	4	8	128	0.5	128	≤0.25	128	128	256<	256<	4	0.09	
153	32	16	128	8	0.25	64	2	4	8	128	0.5	128	≤0.25	128	256<	≤0.25	256<	4	0.13	
308	1	256<	16	256<	8	≤0.25	0.5	0.5	4	4	0.5	0.5	4	≤0.25	4	4	≤0.25	32	16	0.13
	3	256	8	256<	4	≤0.25	0.5	0.5	4	4	0.5	0.5	1	≤0.25	4	2	≤0.25	32	16	0.09
312	256	32	256	16	≤0.25	128	1	8	8	128	0.5	128	≤0.25	128	128	≤0.25	256<	16	0.09	
346	128	16	256	8	≤0.25	64	0.5	8	8	64	0.5	128	≤0.25	128	128	≤0.25	256<	16	0.09	

CTX:cefotaxime、CAZ:ceftazidime、CTF:ceftiofur、CFX:cefoxitin、IPM:imipenem、GM:gentamycin、AMK:amikacin、APM:apramycin、KM:kanamycin、TC:tetracycline、FOM:fosfomicin、NA:nalidixic acid、CPFX:ciprofloxacin、CP:chloramphenicol、FFC:Florfenicol、NTF:nitrofurantoin、TMP:trimethoprim、SMX:sulfamethoxazole、CL:colistin

考察及び今後の課題：

ヒト由来の ESBL 産生株では、フルオロキノロン系にも同時に耐性を示す株が多いが、家畜や食品由来の ESBL 産生株では、キノロン耐性株は多かったもののフルオロキノロン系に耐性を示す株は少なく、ヒト分離株との関連性に

ついて比較検討する上で参考となる。また、セファマイシンに耐性を獲得した株も、愛知県の牛糞分離株で、1株確認された。なお、今回の調査では、カルバペネム耐性大腸菌は確認されなかったが、家畜に対しては現時点ではカルバペネムは承認されていないものの、海外からの報告を考慮すると、国内でも今後、家畜でカルバペネムに耐性を獲得した腸内細菌科細菌(CRE)の出現も懸念されるため、国内の家畜分離の腸内細菌科細菌に於いても CRE のモニタリングを検討する時期に来ている。

- 2) 個別課題名：アミノグリコシド、キノロン系薬の最小発育阻止濃度測定
(研究担当者名：川村久美子(所属機関名：名古屋大学))

研究内容・方法：

研究代表者である荒川宜親および研究分担者である、長野則之、鈴木匡宏らの研究グループと共同で、ESBLの産生が疑われる分離株について、米国 CLSI が推奨する方法により、アミノグリコシド、キノロン系薬の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

研究成果：

ESBLの産生が疑われる株のため、上述したように広範囲のβ-ラクタム系薬に対して、全般的に耐性を示す株が多かったが、アミノグリコシド系に対しては、概して感受性が保たれており、愛知県のブタ腸内容物由来の22株のCTX耐性株では、10株(45.5%)がゲンタマイシンに耐性と判定されたものの、カナマイシン耐性株は3株(13.6%)確認されたのみで、ヒト用のアミカシンや家畜用のアプラマイシンに耐性を示す株は分離されなかった。また、中国等で家畜からしばしば分離されている16S rRNAメチル基転位酵素(RmtBやArmA、NpmAなど)を産生すると思われる広範囲アミノグリコシド高度耐性株は、今回の調査では、MIC値を見た範囲では確認されなかった。しかし、愛知のブタ分離株の中では、シプロフロキサシン耐性株が3株(13.6%)認められた。

考察及び今後の課題：

家畜では、国内外でアミノグリコシド系の抗菌薬が、動物用医薬品とともに一部の畜種では飼料添加物としても認可されていることから、各種のアミノグリコシドに耐性を獲得したESBL産生大腸菌等の分離報告が海外でも多くみられるため、国内でも、引き続き今後の動向に注意する必要がある。

- 3) 個別課題名：その他の抗菌薬の最小発育阻止濃度測定
(研究担当者名：長野則之(所属機関名：信州大学))

研究内容・方法：

研究代表者である荒川宜親および研究分担者である川村久美子の研究グループと共同で、ESBLの産生が疑われる分離株について、米国 CLSI が推奨する方法により、各種の抗菌薬に対する薬剤感受性試験を実施するとともに、コリスチン(CL)含有diskを用いてスクリーニング検査を実施し、発育阻止円が小さく「耐性」と判定された株については、CLSIの推奨する微量液体希釈法に

より CL の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

研究成果：

愛知県内でブタ腸内容物から分離された ESBL 産生が疑われる株では、家畜で以前よく用いられていたテトラサイクリン系やフェニコール系に耐性を獲得した株が 5 割～7 割程度の率で認められた。また、海外で ESBL 産生菌による尿路感染症の治療薬として近年再注目されつつあるホスホマイシンに耐性を獲得した株も 2 株(9.1%)確認された。さらに、長野県内の市販鶏肉（国産）より分離された CTX 耐性ととも CL にも耐性を示した大腸菌 1 株に対し、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を実施した結果、分離株に対する CL の MIC は 8 µg/ml と再確認された。

考察及び今後の課題：

国内では、既に東京都の調査で MCR-1 を産生する CL 耐性大腸菌が数株、市販鶏肉などから分離されているが、今回人口密度の少ない長野県でも類似の性状を示す株が市販食肉から分離されたという事実から、この種のコリスチン株が付着した鶏肉等が、既に、全国的に広く流通している可能性が示唆されるため、実体調査が必要と考えられる。また、中国では、ホスホマイシン耐性を獲得した ESBL 産生大腸菌等の分離報告が近年増加傾向にあるため、国内でも、ホスホマイシン耐性を獲得した ESBL 産生大腸菌について今後の動向に注意する必要がある。

以下、主として 2 年目以降の成果

研究項目名：薬剤耐性遺伝子の型別

- 1) 個別課題名：β-ラクタム系、アミノグリコシド系、キノロン系に薬剤耐性を付与する遺伝子の型別

(研究担当者名：荒川宜親（所属機関名：名古屋大学）)

研究内容・方法：

PCR 法と DNA のシーケンス解析法とを組み合わせ、各種の β-ラクタマーゼの遺伝子、アミノグリコシド耐性遺伝子、プラスミド媒介性のキノロン耐性遺伝子等の検出を試みた。

研究成果：

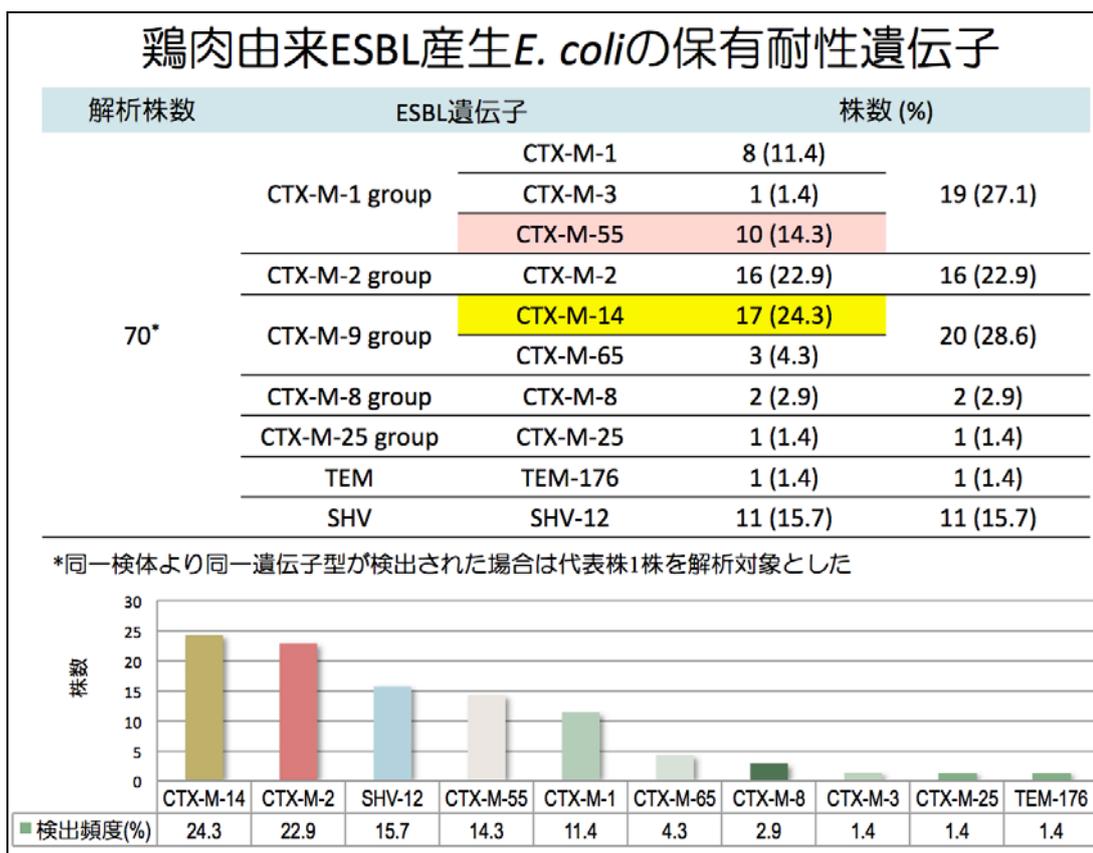
以下に、長野県内で市販鶏肉から分離された ESBL 産生株の、国産と海外産との内訳および ESBL 産生株の陽性率を示す。

最終的に 70 株の ESBL 産生株が、59 パック(検体)より分離され、その後の詳しい解析に使用された。

生産地	検体数	ESBL陽性検体数	陽性率(%)
国産	139	51	36.7
ブラジル産	10	8	80.0
アメリカ産	1	0	0
総数	150	59	39.3

また、長野県で 59 パックの鶏肉について、1 パックから複数のタイプの ESBL 産生大腸菌が分離された場合も含め、総数 70 株の ESBL 産生株について、分担研究者の長野や川村、鈴木の研究グループとの共同で解析した結果、以下の表に示すように ESBL の型別の分布が明らかとなった。

例えば、長野県の市販鶏肉から分離された 70 株に由来する ESBL で多い型は、CTX-M-14 で 17 株、CTX-M-55 が 10 株と多くを占めていたが、ヒトで多く分離される CTX-M-27 は確認されなかった。



また、愛知県内の鶏肉由来 ESBL 産生株(15 株)では、CTX-M-1 グループ産生株が 1 株(6.7%)、CTX-M-2 グループ産生株が 12 株(80%)、CTX-M-9 グループ産生株が 2 株(13.3%)であった。さらに、愛知県内の牛糞由来 ESBL 産生株(2 農家由来 13 株)では、CTX-M-9 グループ産生株が、13 株(100%)となり、その他、CMY-2 産生株が 1 株確認された。

一方、愛知県内のブタ腸内容物由来の 22 株の ESBL 産生株の内訳は、CTX-M-1 グループに属する CTX-M-3 産生株が 2 株(9.1%)、CTX-M-15 産生株が 12 株(54.5%)、CTX-M-55 産生株が 6 株(27.3%)であり、CTX-M-9 グループに属する CTX-M-14 産生株が 2 株(9.1%)であった。なお、CTX-M-55 を産生する大腸菌 6 株は、MLST 解析により全て ST117 と判定されたが、他の CTX-M-型においては、特定の ST 型との関連性ははっきりしなかった。また、ヒトで

多く分離される国際流行型の B1-ST131-O25b と判定される大腸菌は、豚の腸内容分離株では、確認されなかった。

以下に愛知県内の豚腸内容物から分離された 22 株の ESBL 産生大腸菌の生物学的および遺伝的特性を示す。

No.	農場	地域	ST	STcomplex	phylo group	Inc type	CTX-M gp	CTX-M typing	TEM
11	K	岡崎	117	None	F	N	CTX-M-1	CTX-M-55	+
15	O	半田	38	ST38 Cplx	D	F	CTX-M-1	CTX-M-3	+
25	1 2	A 南知多	4684	None	B1		CTX-M-1	CTX-M-15	-
			1706	None	B1		CTX-M-1	CTX-M-15	
41	O	半田	38	ST38 Cplx	D	F	CTX-M-1	CTX-M-3	+
62	1 4	A 南知多	1706	None	B1		CTX-M-1	CTX-M-15	-
			10	ST10 Cplx	A		CTX-M-1	CTX-M-15	
71	S	碧南	354	ST354 Cplx	F		CTX-M-9	CTX-M-14	+
73	1 2	A 南知多	1706	None	B1		CTX-M-1	CTX-M-15	-
			4684	None	B1		CTX-M-1	CTX-M-15	
79	S	碧南	354	ST354 Cplx	F		CTX-M-9	CTX-M-14	+
105	AF	岡崎	117	None	F	N	CTX-M-1	CTX-M-55	-
117	1 2 4	A 南知多	155	ST155 Cplx	B1		CTX-M-1	CTX-M-15	-
			1706	None	B1		CTX-M-1	CTX-M-15	-
			744	None	A		CTX-M-1	CTX-M-15	+
128	X	西尾	167	ST10 Cplx	A	I1	CTX-M-1	CTX-M-15	+
137	K	岡崎	117	None	F	N	CTX-M-1	CTX-M-55	-
153	AL	阿久比	117	None	F	N	CTX-M-1	CTX-M-55	-
308	1 3	D 碧南	38	None	D		CTX-M-1	CTX-M-15	-
			10	ST10 Cplx	A		CTX-M-1	CTX-M-15	-
312	S	碧南	117	None	F	N	CTX-M-1	CTX-M-55	-
346	S	碧南	117	None	F	N	CTX-M-1	CTX-M-55	-

考察及び今後の課題：

ヒト由来の ESBL のタイプとしては、CTX-M-15 が多いが、今回の、食肉および家畜由来株では、CTX-M-15 産生株は、愛知県では、鶏肉で確認されたものの、長野県での調査では確認されず、地域によって市販鶏肉に付着する大腸菌が産生する ESBL の型がかなり異なるという事実が判明した。

一方、ヒトでも分離されることが多い CTX-M-14 を含む CTX-M-9 グループ ESBL 産生株は、鶏肉やブタ腸内容物、牛糞からも多数分離された。この結果は、ヒトで分離される CTX-M-9 グループ ESBL 産生株と家畜等で分離されるそれらとの密接な関連性を示唆している。

- 2) 個別課題名：その他の抗菌薬に対する薬剤耐性遺伝子の型別
(研究担当者名：長野則之 (所属機関名：信州大学))

研究内容・方法：

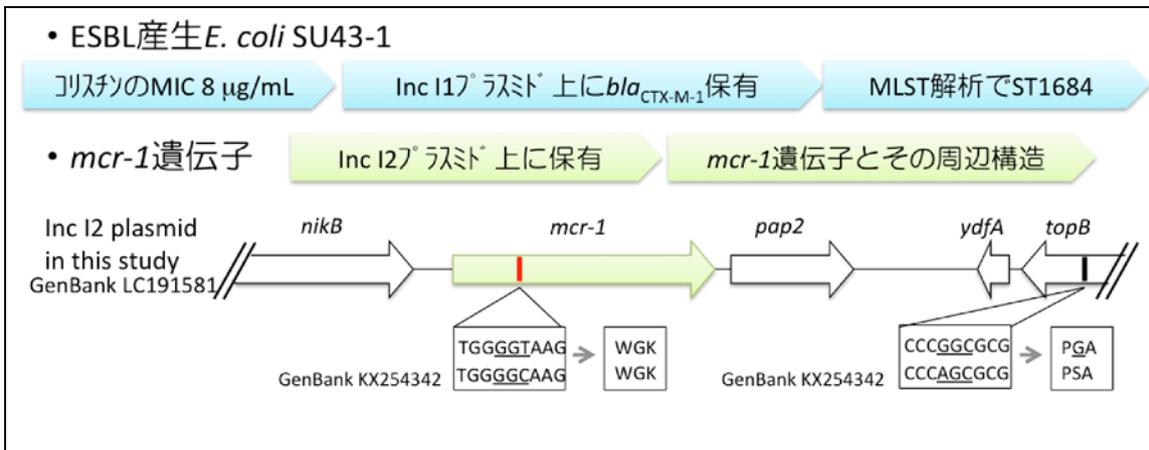
国内で下痢患者から分離されたマクロライド高度耐性カンピロバクター・ジ

エジユニおよび長野県で市販鶏肉から分離された ESBL 産生コリスチンに耐性を獲得した分離株について、カンピロバクターのゲノムおよびコリスチン耐性を媒介するプラスミドの解析を実施した。

研究成果：

マクロライドに高度耐性を獲得したカンピロバクター・ジェジュニについて、荒川のグループでゲノム解析した結果、これまでに報告の無い、新しい塩基配列の置換(A2074T)を 23S rRNA 内に獲得した株であることが確認された(成果論文 iii)。

また、長野県内の市販鶏肉（国産）より分離された CTX とともにコリスチン耐性を獲得した大腸菌の 1 株について、遺伝子レベルで詳しい解析を実施した結果、2015 年より国際的に大きな関心事となっている plasmid 媒介性の *mcr-1* 遺伝子 (LPS の lipidA のリン酸基にホスホエタノールアミンを転位する酵素[MCR-1]の遺伝子) を保有している株であることが確認された。そこで、*mcr-1* を媒介するプラスミドのゲノム解析を実施した結果、これまでに中国などで報告されている、IncI2 型の伝達性プラスミドにより *mcr-1* が媒介されているものの、その上流に存在することが多い、IS*Apl1* が存在せずまた *mcr-1* の構造遺伝子の中にアミノ酸配列に影響しない点変異が入っている、中国から報告された遺伝子と異なるものであることが明らかとなった(成果論文 ii)。以下に、長野県で市販鶏肉から検出された *mcr-1* 遺伝子の周辺構造を示す。



考察及び今後の課題：

国内では、東京都の調査で MCR-1 を産生する CL 耐性大腸菌が数株、市販鶏肉などで分離されているが、今回人口密度の少ない長野県でも市販食肉からプラスミド媒介性に MCR-1 を産生する大腸菌が分離されたと言う事実から、この種の MCR-1 産生株が付着した鶏肉等が、既に、全国的に広く流通している可能性が示唆されるため、積極的な実態調査を実施するとともに、その発生源についての調査を併せて実施し、国内に於ける更なる蔓延を防止する対策を講じるべき時期に来ていると思われる。

研究項目名：薬剤耐性遺伝子の比較ゲノム解析

1) 個別課題名：薬剤耐性遺伝子及び伝達性プラスミドの比較ゲノム解析

(研究担当者名：荒川宜親、川村久美子(所属機関名：名古屋大学)、鈴木匡弘(所属機関名：愛知県衛生研究所)、長野則之(所属機関名：信州大学))

a. 検体から分離された耐性菌の性状解析

i) 薬剤耐性プラスミドの性状解析とゲノム解析用プラスミドの選定

研究内容・方法：

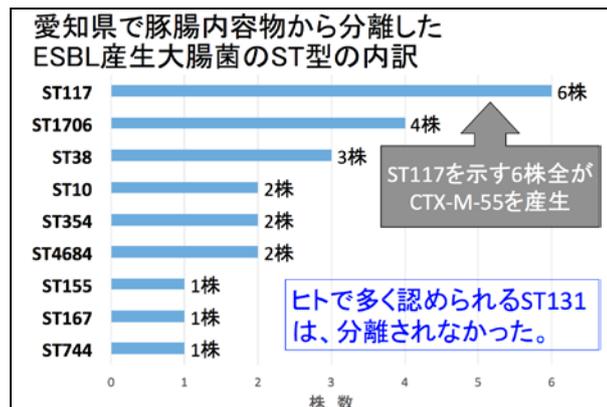
名古屋大学の荒川宜親および川村久美子、信州大学の長野則之と連携し、愛知県内および長野県内の食肉センター等で採材した豚や牛の腸内用物および市販鶏肉等より分離された、第三世代セファロスポリン耐性大腸菌について、MLST解析を実施しそれらのST(塩基配列型=遺伝系統型)型の決定とともにそれらの株が保有する薬剤耐性プラスミドを解析し、個々の伝達性の薬剤耐性プラスミドが媒介しているESBLの遺伝子型別やプラスミドのInc型別などを、PCR解析および塩基配列などにより決定した。

それと並行して、ヒトにおいてこれまでに文献報告されているESBL遺伝子を担うプラスミドに関する情報や、荒川の研究グループがこれまでに得ているヒト由来のESBL産生株のプラスミド情報、さらに、公開されているゲノムデータベースに登録されているESBL遺伝子を媒介しているプラスミドなどの情報を総合的に比較検討した。

研究結果：

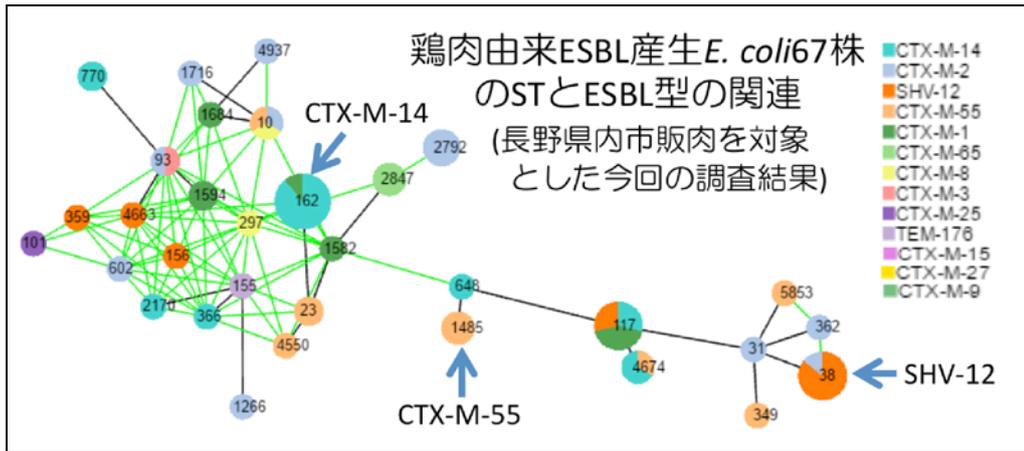
今回の研究で、家畜や食肉などから分離したESBL産生菌のSTはヒト分離株とかなり異なっており、ヒトで多い*E. coli* ST131は、豚からは分離されなかった。

以下に、愛知県内で豚腸内容物より分離された22株のESBL産生大腸菌のST型を示す。



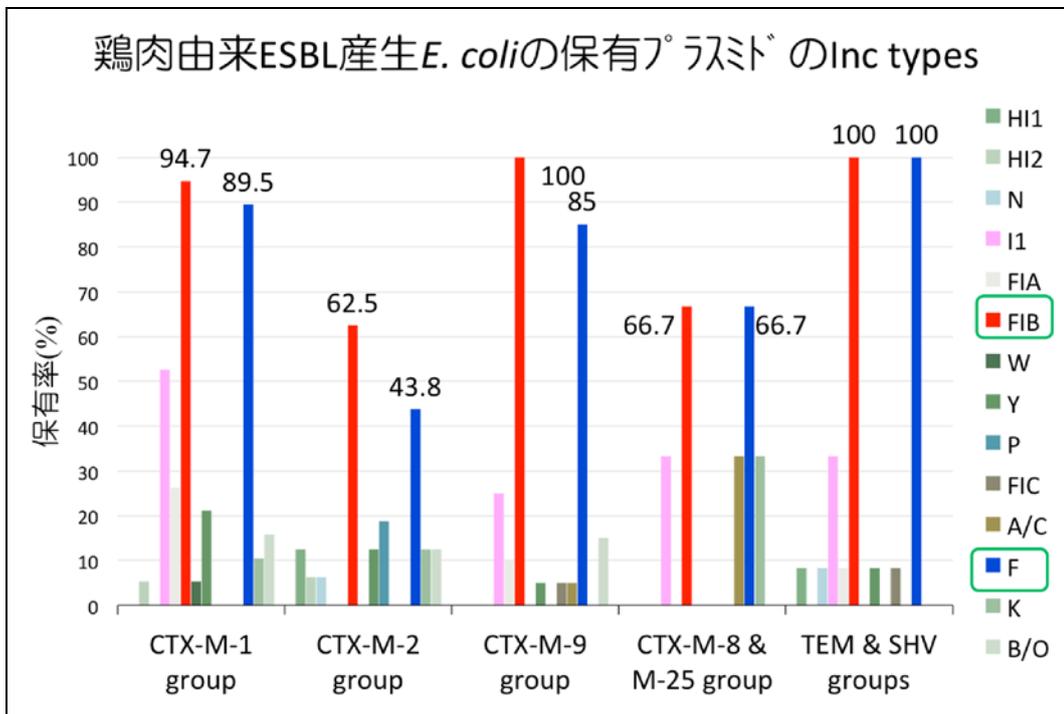
以下は、長野県内で市販鶏肉から分離されたESBL大腸菌のST型とESBL型の分布と関連を示した図である。

同様にヒトで多いST131は長野県の市販鶏肉からは分離されなかった。



それぞれのタイプに属する薬剤耐性伝達性プラスミドとしてIncI型を69個、IncF型を25個、その他としてIncFIB/FIC/N型、IncN/FIB型、IncK型、また不明（U型：Un typable）の、総計109個のESBLを媒介する薬剤耐性プラスミドが、ゲノム解析用プラスミドとして選定され、塩基配列の決定とゲノム比較解析に使用された。結果として各々のSBL産生株が保有する伝達性プラスミドの情報とヒト由来株の情報との間に関連性が示唆されたESBL遺伝子(*bla*_{CTX-M-8}など)とプラスミドのInc型(IncIやIncFなど)とのセットをプラスミドの系統解析用に選定した。

以下に、長野県で市販鶏肉から分離されたESBLを媒介するプラスミドのInc型の分布を示す。



考察及び今後の課題：

Kluyvera 属菌の染色体上に存在する CTX-M 型 ESBL の起源となった遺伝子が初期の段階で特定の Inc 型のプラスミド上に転移し、様々な大腸菌株に伝

達、拡散してゆく過程で現在のような多様性が生じたと考えられている。しかし、その過程でかなりの時間が経過したせいか、プラスミドや CTX-M 型 ESBL 遺伝子の周辺領域の構造等に大きな多様性が出現しているため、CTX-M 型 ESBL 遺伝子の変遷や伝達経路を推定したり、特定するためには、菌株の MLST 解析や CTX-M 型 ESBL 遺伝子の比較のみでは、それぞれのプラスミドや CTX-M 型 ESBL 遺伝子の関連性についてはある程度は推定できるものの、家畜とヒトとの間での ESBL 遺伝子の拡散や伝播の方向性について、断定することは難しく、そのためには、比較するプラスミドや ESBL 遺伝子などの対象を選別し絞り込んで、比較解析を実施することが重要である。

b. 薬剤耐性遺伝子の比較ゲノム解析

i) 薬剤耐性遺伝子及び伝達性プラスミドの比較ゲノム解析

研究内容・方法：

名古屋大学の荒川宜親及び川村久美子、愛知県衛生研究所の鈴木匡弘が連携し、家畜や食肉およびヒトで共通的に検出されることが多く、それらの間の遺伝的関連性を解明するための比較解析に用いることに有用と判断された、CTX-M型ESBLの遺伝子を媒介する合計109個のプラスミドのゲノム解析を実施した。特に、家畜や食肉、ヒトで共通にある程度の件数検出されるIncI1型プラスミドに着目し、今回の研究で新たにゲノム解析を実施した69個のプラスミドのうち61個の情報に加え、さらに、公開されているゲノムデータベース上に登録されている60個の計121個のIncI1型プラスミド情報を活用し「系統ネットワーク」解析法などを用いて比較ゲノム解析を実施した。その際、ESBL遺伝子を媒介しないIncI1型プラスミドも含めて遺伝子配列や*orf*の順序等に基づく構造比較を実施した。

また、長野県で市販鶏肉から分離されたMCR-1を産生するコリスチン耐性大腸菌株が保有する *mcr-1* 遺伝子を媒介する伝達性プラスミドについて、全塩基配列を決定し、中国など海外で報告されている他の *mcr-1* 媒介プラスミドと比較解析を実施した。

以下に、ゲノム解析の手順について、簡潔に示す。

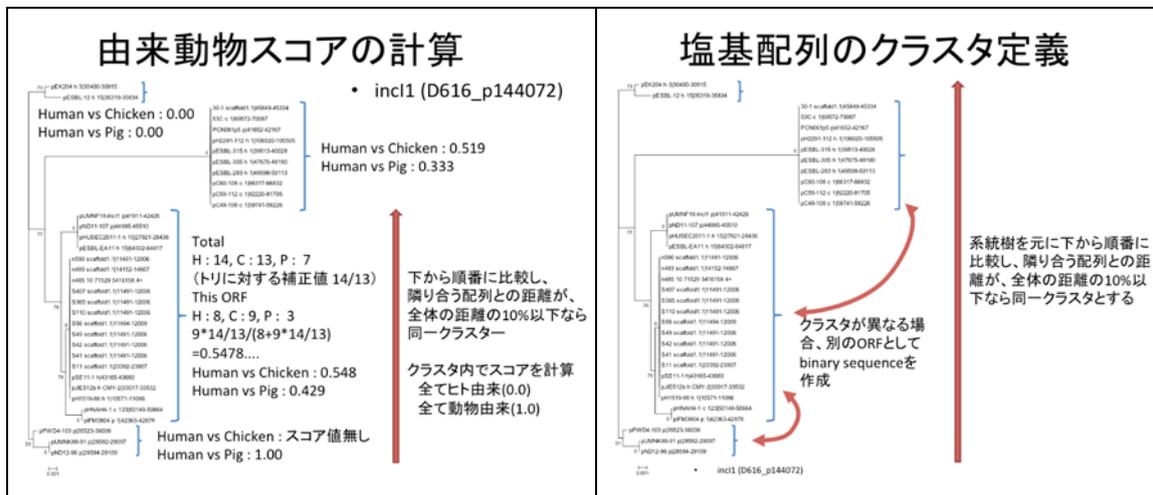
<p>次世代シーケンサーを用いたゲノム解析の方法</p> <p>①糞便検体から分離したESBL産生菌のプラスミド抽出(Kado変法)</p> <p>②E.coli DH10Bへプラスミド導入、形質転換体作製</p> <p>③形質転換体からプラスミド抽出</p> <p>④プラスミド溶液をPFGE</p> <p>⑤ゲル抽出によるプラスミド精製</p> <p>⑥蛍光定量法にて濃度確認</p> <p>⑦DNAサンプルの調製</p> <p>⑧最終サンプルの確認</p> <p>⑨シーケンス</p> <p>⑩解析(愛知県衛生研究所)</p>	<p>Nextera XT DNA Sample Prep Kit +Nextera Index Kit</p> <p>サンプル断片長(Agilent 2100 パイオアナライザ) サンプル定量(Qubit)</p> <p>Miseq Reagent Kit Nano v2(500 cycle) 250bp×2(500 Mb)</p> <p>Qubit 蛍光光度計</p>
---	---

以下に、プラスミドの比較ゲノム解析に使用したプラスミドの一覧を示す。

NGS解析に使用したプラスミドのタイプと数

動物種	Plasmid type	株数	動物種	Plasmid type	株数
ヒト	Incl1	33	牛	Incl1	3
	InclF	18		解析できず	1
	InclK	1	犬	Incl1	1
	UT	6		解析できず	1
	解析できず	2	合計		109
鶏	Incl1	27			
	Incl2	1			
	InclF	5			
	解析できず	1			
豚	Incl1	2			
	InclF	2			
	InclFIB/FIC/N	1			
	InclN/FIB	2			
	解析できず	2			

得られた塩基配列を用いたプラスミドの「系統ネットワーク」解析に必要な「由来動物スコア」の計算方法とクラスタ定義の方法の概略について図示する。

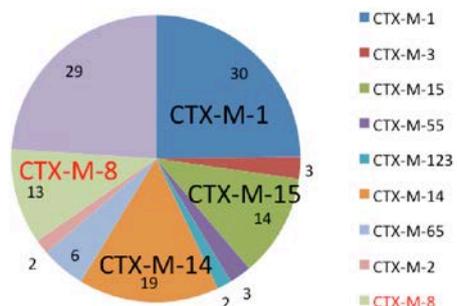
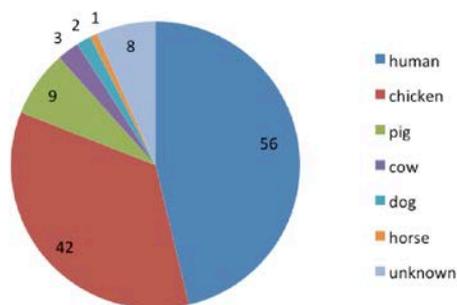


研究結果：

ゲノム解析のため今回の研究で独自にゲノム解析を実施した、CTX-M型ESBLの遺伝子を媒介する合計109個のプラスミドの内分けは、InclIが69個、InclFが25個、残りはFIB/FIC/N、N/FIB、K、また不明(UT)であった。データベース上のゲノム情報と合わせて以下に示す121個のInclIプラスミドを用いて比較ゲノム解析を実施した。

IncI1 plasmid (n=121)

CTX-M-1	30	human	7 (2)
		chicken	18 (10)
		pig	2
		cow	2 (1)
		unknown	1
CTX-M-3	3	human	2 (1)
		chicken	1 (1)
CTX-M-15	14	human	9 (6)
		chicken	3 (3)
		Pig	1 (1)
		horse	1
CTX-M-55	3	human	3 (2)
CTX-M-123	2	chicken	1
		animal	1
CTX-M-14	19	human	13 (12)
		chicken	4 (4)
		pig	1
		unknown	1
CTX-M-65	6	human	5 (1)
		chicken	1
CTX-M-2	2	human	1 (1)
		chicken	1 (1)
CTX-M-8	13	human	4 (4)
		chicken	8 (8)
		dog	1 (1)
		unknown	1
Others	29	human	12 (2)
		chicken	5
		pig	6
		cow	1
		unknown	5



ヒト由来とニワトリ由来の比較が可能なデータが揃った

その結果、ヒトと家畜由来のIncI1プラスミドとの間に構造上かなりの多様性が認められたが、*bla*_{CTX-M-8}を媒介するIncI1型プラスミドについては、鶏または鶏肉由来の*bla*_{CTX-M-8}媒介性IncI1プラスミドとヒト由来の*bla*_{CTX-M-8}媒介性IncI1プラスミドとの間に高い類似性が確認され、両者の密接な関連性が示唆された。また、同様の「系統ネットワーク」解析法による比較解析によりCTX-M-1型ESBL遺伝子(*bla*_{CTX-M-1})を媒介するIncI1型プラスミドも、クローナリティーが高くヒトと鶏肉由来プラスミドとの間で高い関連性が示唆された。以下に、データベース上に登録されているプラスミドデータも総合的に比較した結果の概要を示す。

Incl1とIncFプラスミドのESBL型との関連性と遺伝的特性

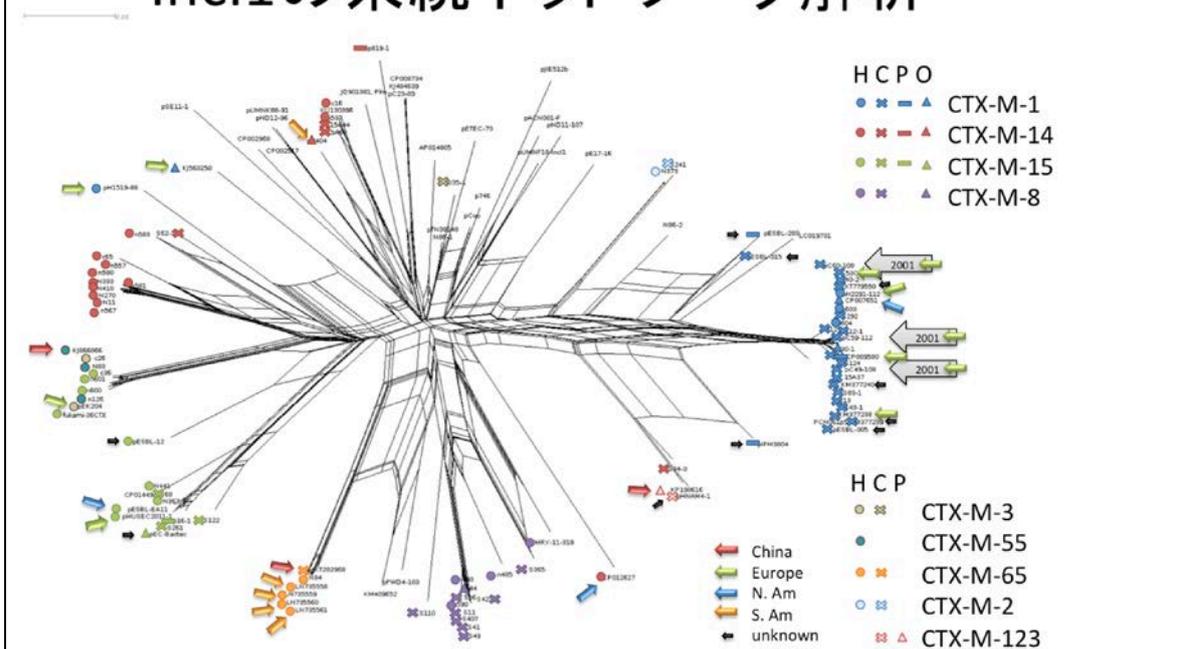
	CTX-M-1	CTX-M-15	CTX-M-14	CTX-M-27	CTX-M-8
Incl1	clonal chicken and human	clonal human	dual clone human and chicken	Not found	clonal chicken and human
IncF	rare	multi clone human	clonal human	clonal human	Not found

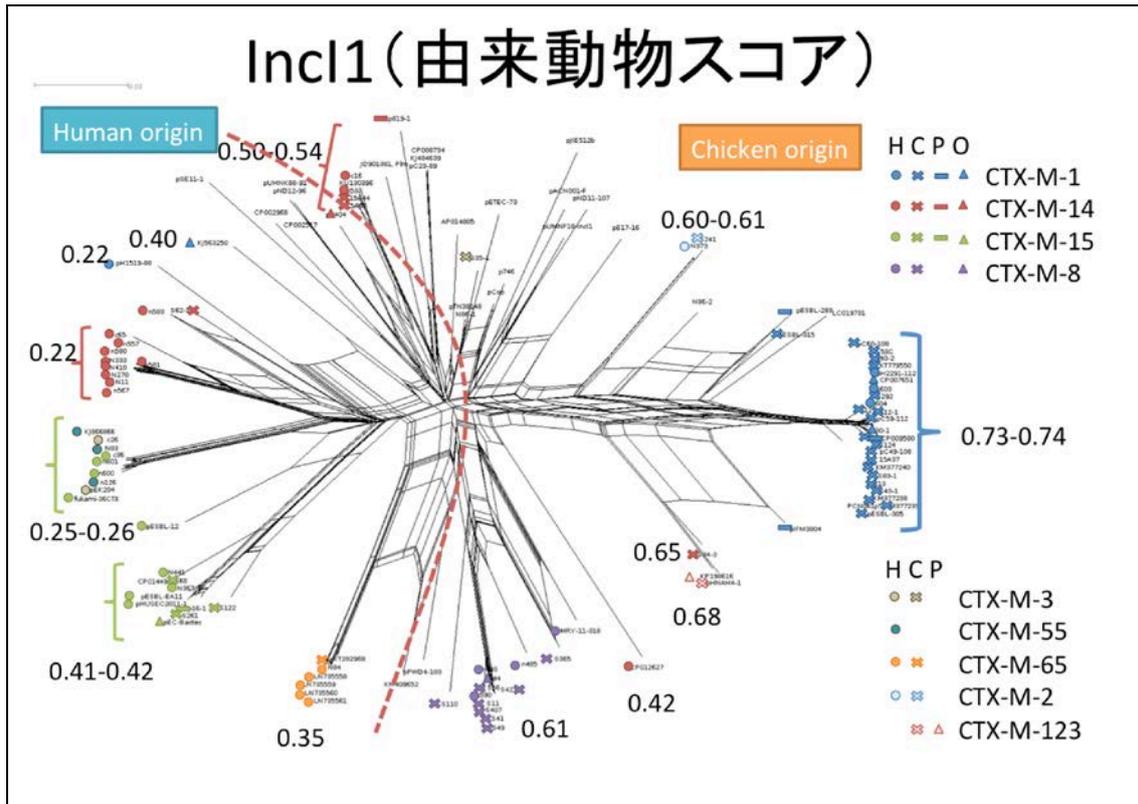
以下が示唆された

- 多くのCTX-Mプラスミドはクローナルに拡散
- ヒト-動物間の伝播の指標についてはさらなる検討が必要
- CTX-M遺伝子を取り込みやすいプラスミドが存在
- IncFプラスミドは組み替えを起こしやすい

以下に、ヒト(H)、鶏肉(C)、豚(P)、その他(O)から分離されたIncI1型プラスミドのネットワーク解析結果を図示する。

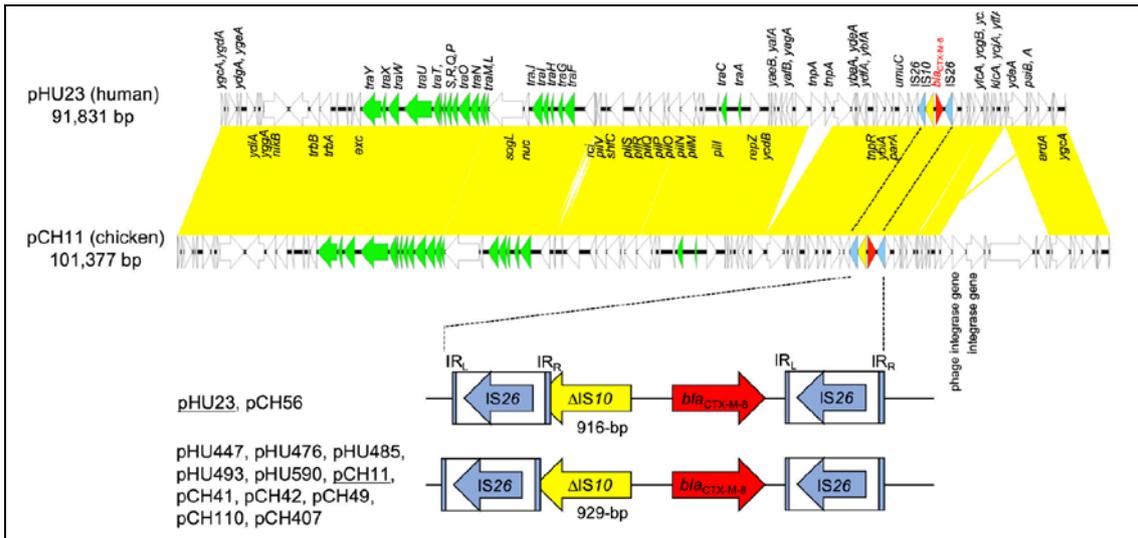
Incl1の系統ネットワーク解析





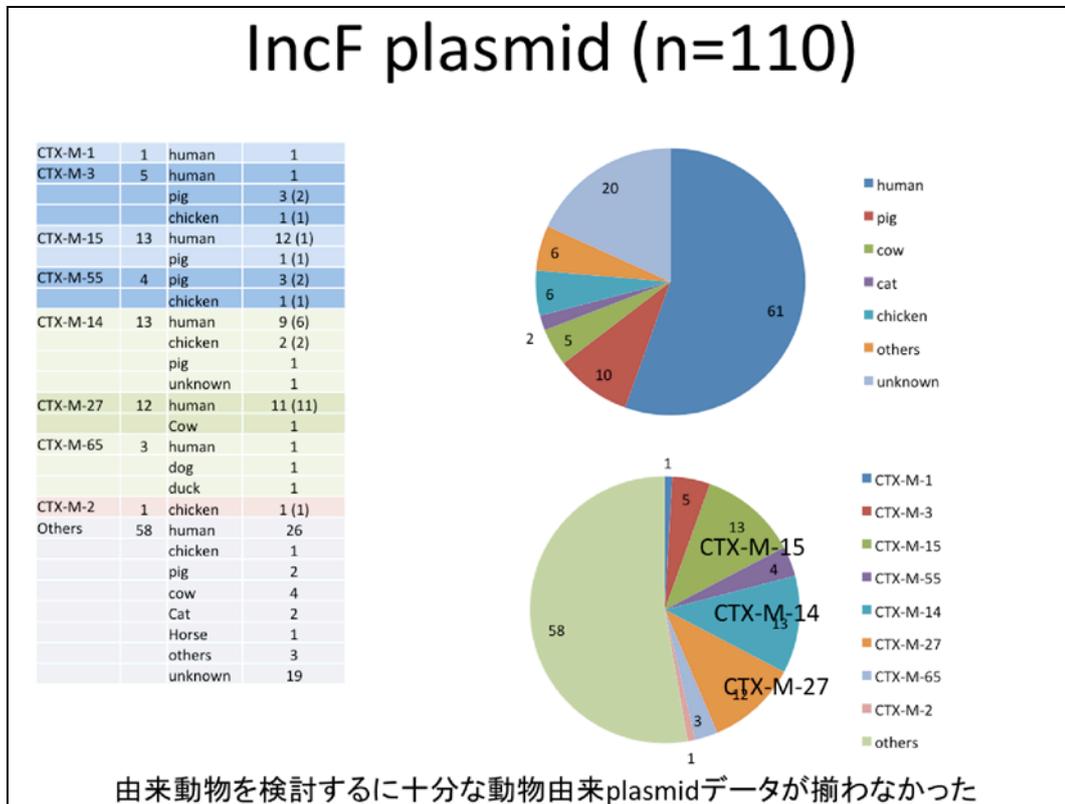
さらに、国内のヒト（6個）および市販鶏肉（7個）に由来する、合計、13個の CTX-M-8を媒介するIncI1プラスミドに着目し、それらの比較ゲノム解析を実施した結果、挿入配列(IS10)の上流に挿入されたIS26の位置が微妙に異なる2種類が存在することが明らかとなった。

比較ゲノム解析に用いた国内のヒト由来の6個のCTX-M-8/IncI1プラスミドを保有していた6株は、いずれも2010年に愛知県岡崎市で食品を取り扱う業務に従事する健常者より個別に分離された株であり、一方、市販鶏肉から得られた7個のCTX-M-8/IncI1プラスミドは、いずれも2010年に愛知県内で市販されていたブラジル産の市販鶏肉から分離された大腸菌から得られたプラスミドであった。ヒトおよび市販の海外産鶏肉とから分離されたCTX-M-8型ESBLの産生に参与する伝達性のIncI1プラスミドが、由来がヒトと鶏肉と異なるにもかかわらず、構造的に極めて類似していたという事実は、CTX-M-8/IncI1のような特定の伝達性プラスミドが、ブラジルという日本からすると地球の裏側にある国から、地理的（空間的）に数万キロ離れた地域へ鶏肉に付着した大腸菌によって運搬され、最終的にヒトの腸内に到達している可能性を強く示唆するものである。（成果論文 i）以下に、その比較図を示す。

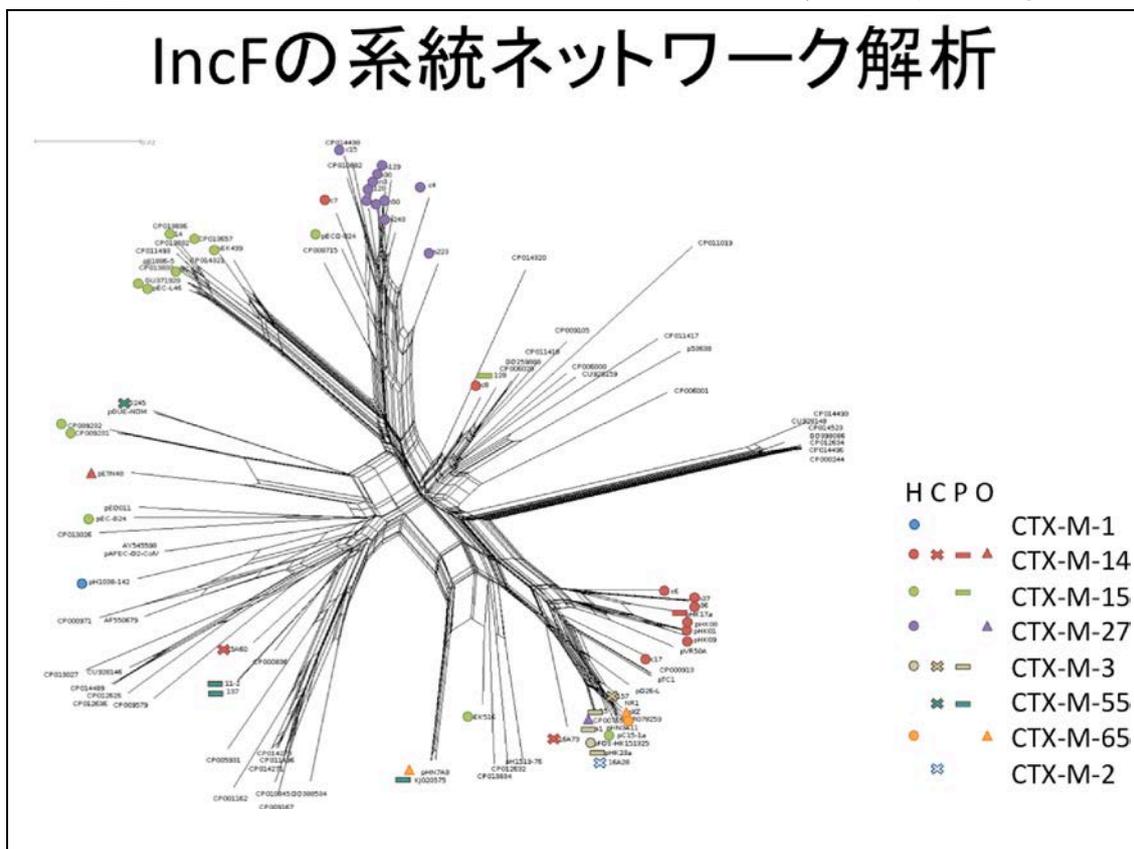


しかし、種々のCTX-M型ESBLを媒介するIncFプラスミドについては、データベースに登録されている家畜由来のプラスミドのデータが少なく、また組み換えが起きやすいことが示唆され、構造的にかなりの多様性が観察された。したがってESBL遺伝子を媒介しているIncFプラスミドについては、プラスミドの全体的な構造比較からは、家畜・食肉由来株とヒト由来株とで、相互の関連性やESBL遺伝子の伝播の方向性を示唆する所見や根拠は得られなかった。

以下に、プラスミドの比較ゲノム解析に用いた110個のCTX-M型ESBLの遺伝子を担うIncFプラスミドのリストを示す。

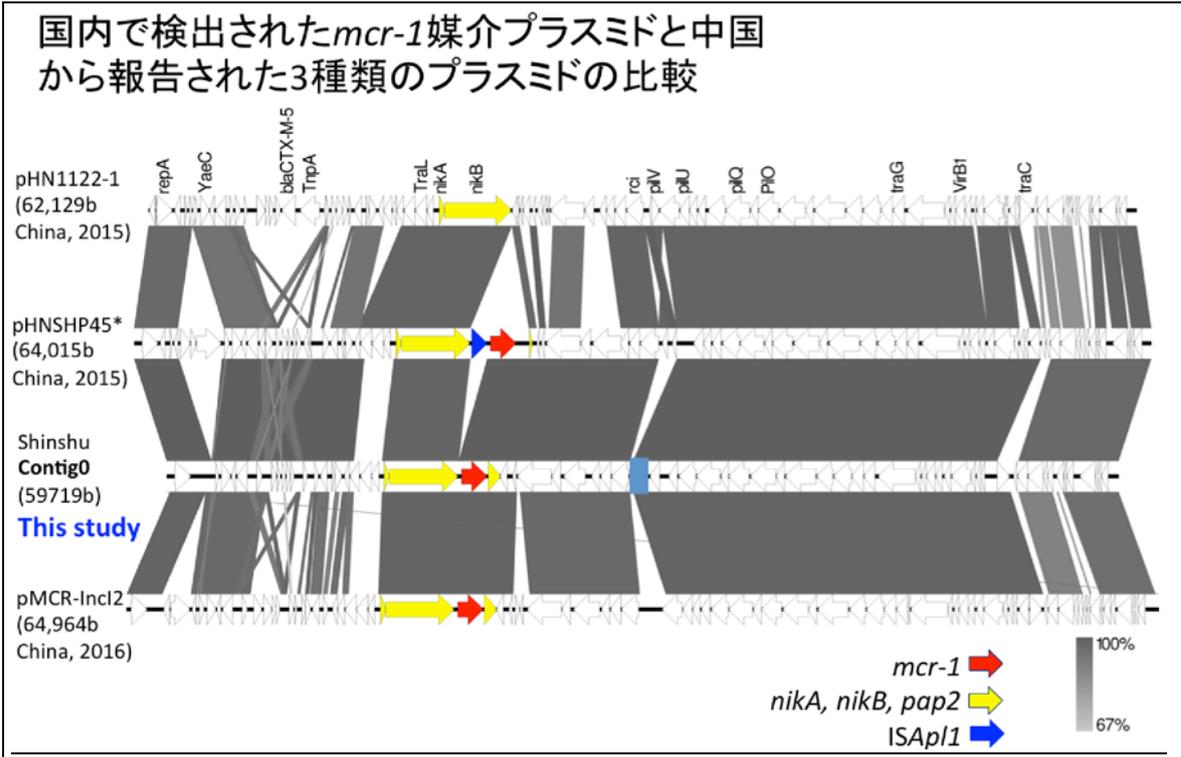


以下に、ヒト(H)、鶏肉(C)、豚(P)、その他(O)から分離された110個のIncF型プラスミドのゲノムデータを用いたネットワーク解析の結果を示す。



一方、長野県で分離されたコリスチン耐性のプラスミドのゲノム解析の結果、プラスミドのInc型はIncI2であったが、*mcr-1*遺伝子上流には、IncI2プラスミドで一般的に見られる挿入配列 (*ISApI1*) は存在せず、下流域には、他の *mcr-1* 遺伝子と同じように *pap2* 遺伝子が存在していた。*mcr-1* 遺伝子の周囲の構造とともに、プラスミド全体の構造は、これまでに中国で家畜や鶏肉、ヒト臨床検体から報告されている一群の *mcr-1* 媒介プラスミドとは、完全には一致しなかったものの、プラスミドを構成する各種の遺伝子 (*orf*) の配列順序や組み合わせの観点からは、かなりの共通性が見られたことから、今回、国内で市販鶏肉由来の *mcr-1* 媒介プラスミドの遠い起源は、中国等で報告されているプラスミドと共通であることが示唆された。

以下に、国内で市販鶏肉から分離されたコリスチン耐性大腸菌が保有していたプラスミド (下から2つめ) と中国から報告された3つの *mcr-1* 媒介性プラスミドの構造を比較した図を示す。



考察及び今後の課題：

薬剤耐性菌にはすでに様々な種類が出現しており、プラスミドを介して、ヒトと家畜との間を、食品を介して伝播していることが示唆されているが、CTX-M-型ESBLの遺伝子に関しては、既にかかなりの多様性が生じていることから、今から遡ってESBL遺伝子の伝播の起源や経路、方向性を確定することは、難しく、唯一、CTX-M-8の遺伝子を媒介するIncI1プラスミドについては、ヒトと家畜、食品分離株について比較解析が可能であり、その結果では、CTX-M-8の遺伝子を媒介するIncI1プラスミドは、鶏に由来し食品を介してヒトに伝達した可能性が示唆された。

一方、国内で市販鶏肉から検出された*mcr-1*媒介プラスミドの解析からは、海外で報告された同等のプラスミドとは、構造的にやや異なっていることから、遠い起源は共通であるものの、中国等で報告がされているコリスチン耐性株が最近、直接国内に侵入したということより、MCR-1産生株が、過去のいずれかの時期に何らかのルートで国内に伝来し、その後、国内で菌株間や宿主間をMCR-1産生株が伝播する過程で、一定の変化を遂げつつ今日に至っているという可能性が示唆された。そこで、国内で分離されたMCR-1産生株の関連性を比較するため、国内の他の地域で食肉や患者から分離された複数の*mcr-1*媒介性プラスミドのゲノム比較解析を進める価値がある。

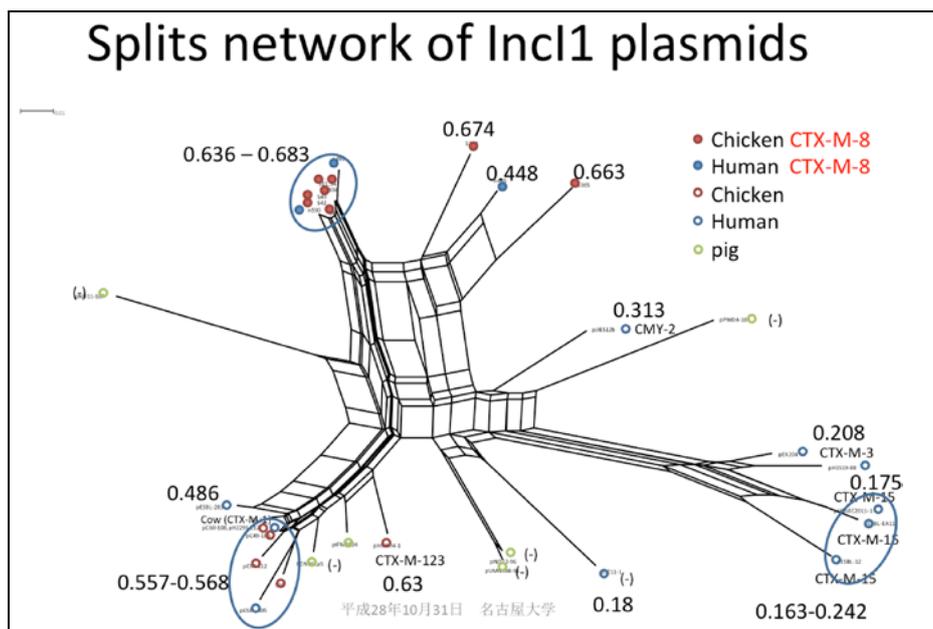
(2) 研究全体の成果、考察及び結論

研究全体の成果：

薬剤耐性遺伝子の伝達の経路、伝達方向などを推定するため、複数の種類

の耐性決定因子の中から、ゲノムレベルのデータが公開データベースから入手しやすい ESBL 産生大腸菌の保有するプラスミドに焦点を当てて独自に 100 個以上の ESBL 遺伝子媒介性プラスミドのゲノムデータを得て、比較解析を実施した。その結果、出現してから相当の時間が経過していると考えられる、IncF プラスミドにより媒介されていることが多く、1980 年代に出現したと考えられる CTX-M-1 グループに属する CTX-M-15 や CTX-M-55 などの ESBL については、既にゲノムデータベース上でもプラスミドの構造面で大きな多様性が生じており、それらの起源や伝播の方向性を示唆するような解析結果を得ることが難しいことが確認された。しかし、出現してから比較的歴史が浅く、1997 年に南米地域（特にブラジル）で最初にヒト臨床検体（術創と血液）から分離された *Citrobacter amalonaticus* と *Enterobacter aerogenes* で最初に確認された CTX-M-8 型 ESBL の遺伝子を担うプラスミドについては、家畜によく用いられてきたストレプトマイシンやテトラサイクリンに耐性を与える遺伝子を同時に媒介することが多いと報告されており、さらに、鶏や家畜等から分離されることが多い大腸菌株に保有される傾向がある IncI1 型プラスミド（古くは、R64 などと呼ばれていた薬剤耐性プラスミドもその後 IncI1 に分類されている。）により媒介されていることが多いという事実とともに、CTX-M-8 の遺伝子が遺伝的背景の異なった大腸菌株の間で比較的、安定的に媒介されているということが、今回のプラスミドと CTX-M 型 ESBL 遺伝子の比較解析で明らかとなった。そこで、鶏肉とヒトと由来の異なる多数の CTX-M-8 の遺伝子を担う IncI1 プラスミドについて集中的に比較解析した結果、CTX-M-8 遺伝子を媒介する IncI1 プラスミドについては、未だデータベース上には登録がないものの、我々の解析では、CTX-M-8 は鶏に由来し、食肉を介して地球を半周して各地域でヒトに伝播している可能性が示唆された。しかし、ヒトで多く分離される CTX-M-27 (CTX-M-9 グループ) は今回の調査で家畜や食肉からは分離されなかった。

以下に、今回解析した CTX-M-8 型 ESBL を媒介する IncI1 型プラスミドの一部のデータとともに、データベース上から抽出したデータも加味したネットワーク解析を実施した中間結果を示す。



さらに、最初 1992 年に報告された CTX-M-1 グループ ESBL である MEN-1(CTX-M-1)やその変種であり、現在世界各地に伝播拡散しつつある CTX-M-15 の遺伝子を媒介することが多い IncI1 プラスミドについては、プラスミドの構造比較から CTX-M-8 の遺伝子を担う IncI1 型プラスミドと遺伝的にやや離れた関係にあるものの、CTX-M-8 を媒介するプラスミドと同様に別のクローンを形成していることが今回の研究で示唆された。

一方、国内で市販鶏肉から分離されたコリスチン耐性大腸菌の保有する *mcr-1* 媒介性プラスミドの全体構造を決定し、中国などから報告されているプラスミドと比較した結果、若干の構造上での相違が認められ、おそらく、海外から何らかのルートでかなり過去に国内に伝来した後に、複数の菌株や宿主の間を伝播する過程で、徐々に変化を獲得したことが示唆された。国内では、既に、東京都や動物衛生研究所も市販の鶏肉や患畜由来の MCR-1 産生株を多数分離していることから、これらの保有する *mcr-1* 媒介性プラスミドの比較解析をすることで、それらの遺伝的関連性や伝播の経路や様式を推定する根拠が得られると考えられる。

考察及び結論：

ESBL を産生する大腸菌の保有する伝達性プラスミドについて、今回、新たに解析した家畜分離株、食品分離株とともに、荒川らがこれまでに解析したヒト臨床分離株の情報、さらにゲノムデータベース上に登録されている多数の CTX-M 型 ESBL を媒介する伝達性プラスミドや CTX-M-55 など、家畜(食肉)とヒトとで共通に検出される特定の ESBL 遺伝子についても塩基配列レベルから *orf* 等の順番などのレベルで比較解析を行った。しかし、初期の段階で、*Kluyvera* 属菌の染色体上に存在する ESBL の起源の遺伝子が特定の Inc 型のプラスミド上に転移した後、様々な大腸菌株に伝達、拡散してゆく過程でかなりの時間が経過しており、その構造等に多様性が出現し、一般的な比較ゲノム

解析によりそれぞれの関連性についてはある程度のことは推定できるものの、家畜とヒトとの間での ESBL 遺伝子の拡散や伝播の方向性については、断定することが難しく、CTX-M-8 の遺伝子を媒介する IncI1 プラスミド保有株以外の ESBL 遺伝子やプラスミドの由来や伝播経路の推定には、新たな解析手法やアルゴリズムの構築が必要となっている。

以下に、今回の ESBL 産生大腸菌の保有するプラスミドについて、データベース上に登録された過去の情報も加味した比較ゲノム解析を実施した結果明らかになった点を列挙する。

1. CTX-M 遺伝子を取り込みやすいプラスミドが存在し、多くの CTX-M 型 ESBL の遺伝子を媒介するプラスミドは、CTX-M-型毎にクローナルに拡散している傾向が見られた。特に、CTX-M-8 や CTX-M-1 グループを担う IncI1 プラスミドにその傾向が強い。
2. ヒトで多い CTX-M-15 を担う IncI1 プラスミドは、ヒトで多く検出され、データベースに登録された情報からも家畜からは稀にしか検出されないことから、ヒトの臨床現場で出現した可能性が示唆される。
3. ヒトで報告のある CTX-M-14 を担う IncI1 プラスミドは、ヒトと家畜/食肉双方で検出され、その起源や伝播の方向性ははっきりしない。
4. ヒトで報告のある CTX-M-27 を担う IncI1 プラスミドは、データベース上も家畜や食品からは稀であり、ヒトで出現した可能性が高い。
5. 薬剤耐性遺伝子を媒介することが多い IncF プラスミドは、組み替えを起こしやすいため、多様性がみられ、それらの間の遺伝的関連性を明らかにすることは可能であるが、家畜とヒトとの間での伝播の方向性を解析するのは現時点では難しい。
6. 薬剤耐性遺伝子のヒトと動物との間の伝播を評価する手法や指標については、菌株レベルではなく、プラスミドおよび転移性遺伝因子 (mobile genetic element) レベルで詳細な比較が可能な、新しい解析アルゴリズムの作成と評価指標など、さらなる検討が必要

また、今回の研究の過程で長野県内の市販鶏肉から *mcr-1* 保有大腸菌が分離され、そのプラスミドの構造も確定され、海外のプラスミドとの若干の類似性も認められているが、全体的な構造を比較した場合、最近、海外から国内に伝来した株というより、かなり以前に、国内に侵入し、その後、独自にゲノム構造の変化を遂げた株である可能性が考えられた。そこで、既に、東京都も市販食肉から *mcr-1* 保有大腸菌を数株分離しており、さらに動物衛生研究所も浮腫病のブタから過去に分離された大腸菌からも *mcr-1* 保有株を多数分離しているということから、*mcr-1* 保有大腸菌が既に国内の広い地域に広く分布し始めている可能性もあり、国内分離株の遺伝的特徴を把握し伝播経路などを推定し、さらなる拡散防止対策を講じるためにも、全国的な規模での実態調査が必要な時期に至っていると考えられる。

今回の研究成果については、以下のような活用方法が考えられる。

1. 今回の調査で、国内で市販されている鶏肉については、かなりの頻度で ESBL 産生大腸菌により汚染されていることが再確認されたため、食鳥処理の工程の衛生管理の改善や技術的向上の必要性を説明する際の根拠として利用可能と考えられる。
2. 今回解析した、109 個の ESBL の遺伝子と 1 個の MCR-1 の遺伝子を媒介する合計 110 個のプラスミドの塩基配列データは、DDBJ などの公開されているゲノムデータベースや国立感染症研究所の病原体ゲノムデータベースなどに登録し、今後、国内で家畜や食肉等から分離された菌株の保有する同様のプラスミドの比較解析をする際に対照などとして活用する。
3. 国内で市販されている生産地不明の鶏肉よりセファロスポリン耐性大腸菌が分離された際に、プラスミドデータを詳しく解析することで、国産の鶏肉等で報告がほとんどない CTX-M-8 遺伝子などを媒介する IncI1 のプラスミドを保有していることが判明すれば、海外産である可能性が示唆されるなど、プラスミドのデータは鶏肉等の産地を推定するための指標として利用可能。
4. 今回の研究で家畜や食肉等から分離された菌株については、当方の研究課題と重ならない限り、それを必要とする研究者等に提供し、必要に応じて共同研究などとして、さらなる詳しい解析に活用されることも想定している。
5. プラスミドの比較ゲノム解析に用いた系統ネットワーク解析ツールは、さらなる改良を加えた後、プラスミド解析に活用できるように希望者に提供する。
6. 今回のデータをもとに、家畜や食品から分離された薬剤耐性株のゲノムデータ（特に、プラスミドや転移性遺伝因子）について日常的に解析し、同時にゲノムデータの蓄積と管理を担当するための組織（部署）の設置と機能の充実の必要性について、リスク管理機関に提言するための根拠として活用可能と考えられる。

III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
 - i. Norizuki C, Wachino JI, Suzuki M, Kawamura K, Nagano N, Kimura K, Arakawa Y. Specific *bla*_{CTX-M-8/IncI1} plasmid transfer among genetically diverse *Escherichia coli* across humans and chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Apr 10. pii: AAC.00663-17, in press.
 - ii. Ohsaki Y, Hayashi W, Saito S, Osaka S, Taniguchi Y, Koide S, Kawamura K, Nagano Y, Arakawa Y, Nagano N. First detection of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* gene from retail domestic chicken meat in Japan. *Jap. Journal of Infectious Diseases*, 2017, in press.
 - iii. Ohno H, Wachino J, Saito R, Jin W, Yamada K, Kimura K, Arakawa Y. A Highly Macrolide-Resistant *Campylobacter jejuni* Strain with Rare

A2074T Mutations in 23S rRNA Genes. Antimicrob Agents Chemother.
2016 Mar 25;60(4):2580-1.

2 本研究を基にした学会発表の実績

i.大崎裕介、齋藤さとみ、小坂駿介、鈴木匡弘、長野由紀子、長野則之、荒川宜親

市販食肉における基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli*の検出と分子生物学的解析

第45回 薬剤耐性菌研究会、広島県宮島、平成28年10月21日～22日

ii. 法月千尋、川村久美子、林謙吾、和知野純一、鈴木匡弘、荒川宜親.

国産豚腸内容物から分離された CTX-M-型基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学解析

第45回 薬剤耐性菌研究会、広島県宮島、平成28年10月21日～22日

iii.大崎裕介、齋藤さとみ、小坂駿介、鈴木匡弘、長野由紀子、長野則之、荒川宜親

市販食肉における基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli*の検出と分子生物学的解析

第28回 日本臨床微生物学会総会・学術集会、長崎市、平成28年1月20日～22日

3 特許及び特許出願の数と概要

なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 家畜、健常者、医療環境等から分離された、薬剤耐性菌の薬剤感受性プロファイルならびに保有する耐性遺伝子などの種類や型別等を比較解析する。	5	本研究では、家畜、健常者、医療環境等から分離された多数の薬剤耐性菌株について薬剤感受性プロファイルならびに保有する耐性遺伝子などの種類や型別等を比較解析することで、CTX-M-8型ESBLの遺伝子を媒介するIncI1型プラスミドを、比較ゲノム解析用の対象とすることが適切であると最終的に選定することができた。また、国内の市販鶏肉から分離され

		<p>た ESBL 産生大腸菌についてコリスチンに対する耐性を測定し、国際的に問題となっているコリスチン耐性(MIC, 8μg/ml)大腸菌株を1株発見し、詳しい比較解析を実施することができた。</p>
<p>(2) 分離した薬剤耐性菌が有する特定の薬剤耐性遺伝子やそれを担う転移因子の構造などを解明し、薬剤耐性遺伝子の関連性について比較解析する。</p>	5	<p>本研究では、様々な薬剤耐性決定因子の中からヒトと家畜とで共通に分離されている遺伝子に着目し、それらを担うプラスミドについても、家畜とヒトとで共通に検出されやすい IncI1 型を選定して「系統ネットワーク」解析法などを用いて比較ゲノム解析を実施することができ、CTX-M-8 型 ESBL を媒介するプラスミドの起源を推定することができた。</p> <p>また、本研究の過程で、長野県の市販鶏肉から分離されたコリスチン耐性大腸菌の保有する <i>mcr-1</i> 媒介性プラスミドについてもゲノム解析を実施し、海外データと照合、比較解析し、海外で報告されている <i>mcr-1</i> 媒介性プラスミドとは若干異なっている点を確認することができた。</p>
<p>(3) 薬剤耐性菌のドラフトゲノムを多数決定して比較ゲノム解析を行い、家畜とヒト間における薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子の循環や伝播の様態を遺伝学的な観点から解明する。</p>	5	<p>本研究では、最終的に、合計109個のプラスミドについて新たにゲノム解析を実施し、その内分けは、IncI1が69個、IncFが25個、残りはFIB/FIC/N、N/FIB、K、また不明(UT)であった。そこで、今回新規にゲノムの比較解析に適切と判断された69個のIncI1プラスミドのうち61個の情報を選び、そこに公開ゲノムデータベース上に登録されている60個のデータを加え、総計121個のIncI1型プラスミド情報を比較解析した。さらに、家畜とヒトから共通に分離されることが多くゲノム解析に使用できるデータも多いCTX-M-8型ESBL遺伝子を選定し、家畜、食肉、ヒト由来プラスミドとの間での構造上の比較解析を実施することができた。その結果、CTX-M-8型ESBL遺伝子を媒介するIncI1型プラスミドは鶏に起源を發し、食肉を介してヒト</p>

		<p>に伝播している可能性を示唆するデータを得ることができた。</p> <p>一方、長野県で市販鶏肉から分離されたコリスチン耐性大腸菌が保有する <i>mcr-1</i> 媒介性プラスミドのゲノム情報を、海外で報告されている <i>mcr-1</i> 媒介性プラスミドのデータと比較した結果、今回の株は、海外の耐性株が、近い過去に直接国内に持ち込まれたものではない可能性を示唆する所見を得ることができた。</p>
--	--	--

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	<p>研究期間が2年間と短かったにもかかわらず、期待より多めの成果を得ることができ、目標を概ね達成できた。今回の研究期間中に十分解析できなかった分離株やゲノムデータについては、今後も継続して分析を続行し、順次学術論文にまとめて報告することにより、さらに達成度を向上させる計画である。</p>
(2) 研究成果の有用性	5	<p>今回の研究で得られた成果は、今後、ESBL 産生菌等の薬剤耐性菌のヒトと家畜との間での伝播経路や伝播様式について解析をする上で多くの示唆を与えるものであり、特に、<i>mcr-1</i> 媒介性プラスミドの解析結果は、国内で <i>mcr-1</i> 媒介性プラスミド保有大腸菌の独自の進化が進行している可能性を示唆しており、食品衛生や公衆衛生の向上のために示唆を与える有用なものと考えられる。</p>
<p>総合コメント</p> <p>現在種々の薬剤耐性菌の家畜とヒト間での伝播が指摘され、国際的に大きな関心事となっている。今回は、CTX-M-8 の遺伝子を媒介する IncI1 型プラスミドと、<i>mcr-1</i> を媒介する IncI2 型プラスミドを中心に比較解析したが、今後、家畜とヒトの双方で使用されることが多い、ホスホマイシン、マクロライド、アミノグリコシド、フルオロキノロン等に対する耐性付与に關与するプラスミド媒介性の薬剤耐性決定因子についても注目しつつ、今回実施したような、ゲノムレベルの比較解析を</p>		

継続的に行っていく必要がある。

なお、本研究は、2年の期間で実施されたが、解析すべき検体数やデータ量の多さなどからみて、3年計画で実施するのが適切と考えられる。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。