

<令和元年度助成>

海外輸入された Ready-to-Eat 食品の薬剤耐性菌調査 ～カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に注目して～

萩谷 英大

(岡山大学学術研究院医歯薬学域 瀬戸内(まるがめ) 総合診療医学講座)

1. はじめに

薬剤耐性菌 (Antimicrobial Resistance, AMR) は世界的な規模で医療上および公衆衛生上の脅威となりつつある^{1,2)}。有効な対策が為されない場合、約30年後の2050年にはAMR関連死亡数は世界中で1,000万人以上に上ると試算されており、主要先進国首脳会議でもAMR問題が主要議題として取り上げられ、「世界経済・移民問題・テロ対策などと並ぶ世界的な課題として、AMR問題について各国が協調して取り組んでいく」ことが強調されている。中でも薬剤耐性菌時代におけるLast-Resortとしての位置づけであるカルバペネム系抗菌薬に耐性化したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, CRE) が、世界中の臨床現場に驚異的なスピードで拡散している。

CREは、患者臨床検体のみならず、東南アジアを

中心としたインフラ整備が不十分な地域では、環境水・食肉・野菜などからも広く検出されることが報告されている。さらに驚くべきことに、調理され食卓に準備された食事、すなわちReady-to-Eatな食品自体がCREに汚染されている環境も報告され、日常生活の中で食事摂取を通して潜在的にCREを保菌するリスクが広がっていることが推測される。海外から国内へのAMR持ち込みルートとして、患者・渡航者・動物など様々な媒体が考えられているが、我々は海外輸入され国内で一般流通しているReady-to-Eat食品に注目している。近年、国内では通常検出されないような海外型CREが渡航歴のない健常者から検出されるといった報告が相次いでおり、海外輸入食品、特に追加調理を要さないReady-to-Eat食品を媒介した潜在的なCRE保菌者が増加しているのではないかと考えている(図1)。

本研究では、小売・ネット通販されているReady-

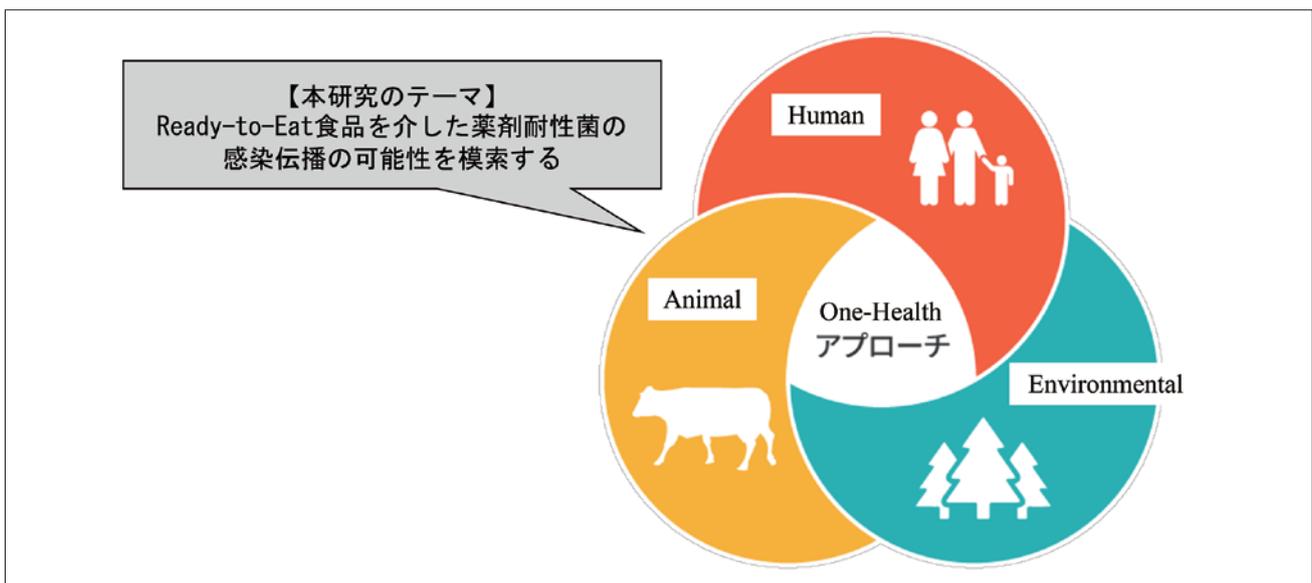


図1 One-Healthとしての薬剤耐性菌調査

to-Eat 食品を回収し、特殊選択培地でスクリーニングを行う。検出された CRE 株はゲノム解析を行い既存データベースと比較することで、薬剤耐性遺伝子のタイピング・ルーツなどを明らかにすることを目的とした。

2. 方法

【研究計画の概要】

① 対象とした食料サンプル

研究対象である Ready-to-Eat 食品は、小売販売・ネット販売の形で一般流通している海外輸入食料品とする。購入後に火を通して食すものは除外し、野菜・果物・加工食品などのうち入手したままの状態での摂取することを前提とした食品とした。

② 薬剤耐性菌のスクリーニング

本研究で対象とするのは、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) および基質拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科細菌とする。この両者を同時スクリーニングするために、メーカー市販の ESBL・CRE 選択培地を用いた (クロモアガー KPC/ESBL 分画培地、関東化学)。

③ 菌種・薬剤感受性・タイピング・薬剤耐性メカニズムの同定

上記手法により得られた薬剤耐性菌を疑う菌株については、菌種同定 (質量分析法)、薬剤感受性試験 (ドライプレート栄研、栄研化学)、さらに責任遺伝子を同定するためのシーケンス検査を行った。さらに、MinION (Oxford Nanopore Technologies) を用いてゲノム解析を行った。網羅的に薬剤耐性遺伝子を検出するために、得られたシーケンスデータを ResFinder database で解析した。

④ リスク分類

食品ごとの薬剤耐性菌保有リスクを算出するために、輸入元や食品の種類などのカテゴリー別に汚染率を算出した。

3. 結果

研究期間中に 153 サンプルの海外輸入商品を上述の耐性菌用スクリーニング培地で培養した。輸入元国はミャンマー 133 件、パキスタン 9 件、ベトナム 6 件、タイ 4 件、バングラディッシュ 1 件であった。図 2 に調査した食品サンプル写真の一例を提示する。CRE を疑うコロニーは 1 サンプル (ミャンマー由来) から得られたが、菌種同定の結果、感受性良好な *Vibrio* 属であった。また、ESBL 産生大腸菌および *Acinetobacter baumannii* を 1 株ずつ (いずれもミャンマー由来) から得られた。

スクリーニング対象とした食品からの CRE 検出はなかったが、今後の研究発展のために、研究期間中に対象外サンプルから検出された CRE 株に対してゲノムおよびプラスミド解析を実践した。MinION (Oxford Nanopore Technologies) を使用して得られたゲノム配列を *in silico* DNA-DNA hybridization 解析した結果、対象菌株は *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* と判明した。MLST タイピングの結果、米国で CRE として流行したことが報告されている ST171 と判明した³⁾。また、プラスミド解析の結果、5 種のプラスミドを搭載しており、IncFIB/IncFII/IncQ1 にはホスホマイシン (*fosA*)、アミノグリコシド系 (*aadA2*, *aph(3)-I a*, *aph(3)-I b*,



図2 スクリーニングした食品サンプルの一例

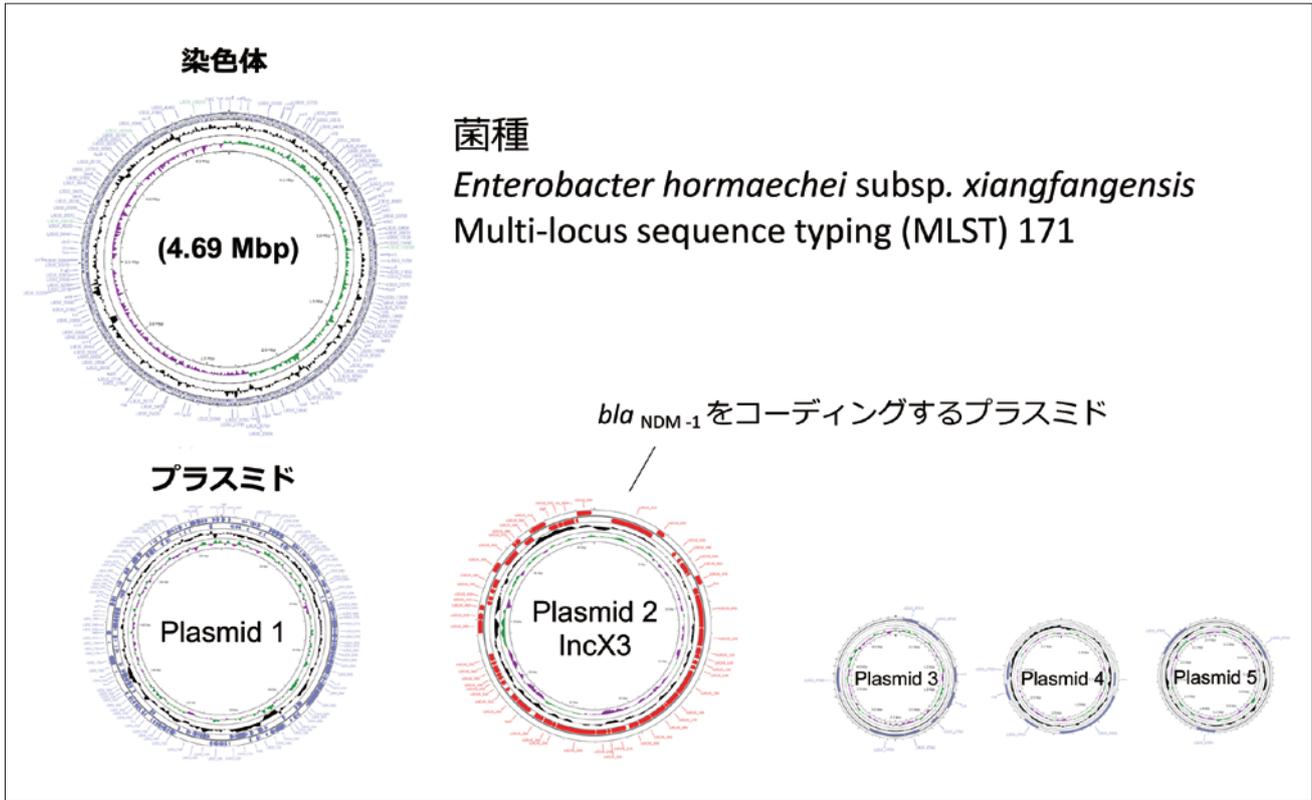


図3 NDM-1 陽性カルバペネム耐性腸内細菌科細菌のゲノム解析

aph(6)-I d, aac(3)-II d)、ニューキノロン系 (qnrS2)、ST 合剤 (sul1, sul2, dfrA12)、テトラサイクリン系 (tet(A))、βラクタム系 (bla_{TEM-1B} , bla_{ACT-16})、マクロライド系 (mph(A))、クロラムフェニコール系 (floR) と多種多様な薬剤耐性遺伝子を保有していることが分かった。また IncX3 タイプのプラスミドには bla_{NDM-1} がコーディングされており、本株はカルバ

ペネマーゼ産生腸内機細菌科細菌であるということが判明した (図3)。 bla_{NDM-1} 保有プラスミドを既存データベースのプラスミド情報と比較した結果、本 CRE 株は中国から報告されているプラスミドに多数類縁しており、特にミャンマーから報告されたプラスミドにはかなり近似していることが明らかとなった (図4)。



図4 プラスミド系統樹

4. 総括

本研究では、海外から輸入された食料品 (Ready-to-Eat Food) において ESBL 産生菌 / CRE は検出されなかった。しかし、国内に流入されてくる食品サンプルを網羅的にスクリーニングできたわけではなく、その可能性を否定するものではない。菌株の相同性解析・ルーツ探索をする上で、ゲノム・プラスミド解析は必須の技術的アプローチである。本研究過程において、CRE を対象とした詳細な解析手法を研究室内で構築できたことは今後の研究発展に大きく貢献するものである。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Chen HY, Jean SS, Lee YL, Lu MC, Ko WC, Liu PY, et al. Carbapenem-Resistant Enterobacterales in Long-Term Care Facilities: A Global and Narrative Review. *Front Cell Infect Microbiol* 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.601968>.
- 2) Jean SS, Harnod D HP. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12:823684. <https://doi.org/doi:10.3389/fcimb.2022.823684>.
- 3) Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Front Microbiol* 2019;10:44. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00044>.

Investigation of antimicrobial resistance in Ready-to-Eat foods imported from overseas -Focusing on carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*

Hideharu HAGIYA

*Department of General Medicine; Setouchi Division, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences*

Abstract

In this age of internationalization, we should be increasingly concerned about antimicrobial resistance, which has become a global pandemic. In this study, we aimed to screen for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) strains in ready-to-eat food samples imported from abroad. We tested 153 food samples (mainly imported from Myanmar) using a CRE screening culture plate. We isolated ESBL-producing *E. coli* and *Acinetobacter baumannii*; however, no CRE strains were isolated, at all. To develop a platform for a genome analysis approach in our laboratory, we applied a CRE strain isolated from another sample for MinION (Oxford Nanopore Technologies) assay. As a result of the genome analysis, we successfully identified the isolate as *Enterobacter hormaechei*, subsp. *xiangfangensis* and MLST 171, which was previously known as a pandemic strain in the United States. The isolate harbored a total of 5 plasmids. Among these, the IncFIB/IncFII/IncQ1 plasmid was positive for a variety of antimicrobial resistance genes, and the IncX3-type plasmid possessed *bla*_{NDM-1}, exerting the CRE profile. A phylogenetic tree analysis suggested that the IncX3-type plasmid had a sequence similar to those reported from China, especially those isolated in Myanmar. As globalization progresses, it is becoming increasingly necessary to be mindful of the spread of antimicrobial resistance in Japan.