

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04647

研究課題名(和文) ベトナム農村における抗菌性物質残留実態と薬剤耐性菌の伝播機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the situation of antimicrobial residues and the transmission mechanism of antimicrobial resistant bacteria in rural Vietnam

研究代表者

平田 収正 (Hirata, Kazumasa)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30199062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌の蔓延が世界的な問題となっており、特に東南アジア諸国では市中健康人の保菌率が50%以上と極めて深刻である。本研究では、現地機関との連携により、ベトナム、ハノイ近郊農村地域の環境水および健康人から抗菌性物質および薬剤耐性遺伝子を解析・追跡調査を行うこと目的とした。抗菌性物質は以前、研究実施者が行った調査に比べ、検出率、検出濃度域が低下し、周辺住民の薬剤耐性菌に関する教育、啓蒙活動によって、不適切使用が抑制され、環境中抗菌性物質残留濃度が低下することが示唆された。しかしながら、ESBL産生菌、および薬剤耐性遺伝子は全てのサンプリング地点から検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により周辺住民の薬剤耐性菌に関する教育、啓蒙活動によって、不適正使用を抑制し、環境中抗菌性物質残留濃度を低下させることが可能であることを示唆した。しかし、環境中の薬剤耐性菌については、環境中抗菌性物質残留濃度と高い相関は見られず、検出されなくなるまでには、相当の対策と時間を要することが示唆された。また、不適正使用の抑制により、周辺住民の経済活動にどのような影響が現れたかを今後評価する必要もある。

研究成果の概要(英文)：The spread of drug-resistant bacteria has become a global problem, and particularly in Southeast Asian countries, the carrier rate of healthy people in the city is 50% or more, which is extremely serious. The purpose of this study was to analyze and follow up antimicrobial agents and drug resistance genes from environmental water and healthy people in rural areas near Hanoi, Vietnam. The detection rate and concentration range of antimicrobial agents have decreased compared to the research conducted by researchers. It might be due to suppression of inappropriate use by education and enlightenment activities on drug-resistant bacteria by local residents. However, ESBL-producing bacteria and drug resistance genes were detected at all sampling points.

研究分野：衛生薬学

キーワード：衛生薬学 薬剤耐性菌 抗菌性物質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の蔓延が世界的な問題となっており、特に東南アジア諸国では市中健常人の保菌率が50%以上と極めて深刻である。申請者はこれまで参画したプロジェクトで、ベトナム農村健常人の薬剤耐性菌保菌率が極めて高く、畜産・養殖で使用された抗菌性物質により環境中で発生・選抜された薬剤耐性菌が健常人に感染している可能性を示した。しかしながら、市中健常人の薬剤耐性菌感染経路および環境中の残留抗菌性物質が耐性菌発生を誘導する機構を明確にした研究は無い。

### 2. 研究の目的

本研究では、現地機関との連携により、ベトナム農村地域の環境水および健常人から抗菌性物質および薬剤耐性遺伝子を解析・追跡調査を行うことで、残留抗菌性物質の薬剤耐性誘導機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ベトナム、ハノイ国立栄養院 Le Hong Dung 氏、Nguyen Van Sy 氏の協力のもと、ベトナム、ハノイ近郊、バビ地区の農家、河川の環境水を採取し、解析を行った。残留抗菌性物質については固相カートリッジによる抽出、前処理を行った後、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)を用いた測定を行った。薬剤耐性菌、および遺伝子については環境水を直接、ESBL Chromoagar に塗布するとともに、メンブレンフィルターに回収し、収集した菌から DNA を抽出、PCR による薬剤耐性菌の有無を解析した。

### 4. 研究成果

研究実施者が以前、実施したハノイ市、バビ地区での解析ではフルメキン (100%、1.7 - 245 ng/L)、サルファメタジン (92%、6.3-6621 ng/L)、サルファメトキサゾール (84%、7.3 - 2017 ng/L)、サルファジアジン (56%、0.9 - 474 ng/L)、トリメトプリム (48%、0.8 - 78 ng/L)、セファレキシン (24%、0.4 - 24%)、ナリジクス酸 (20%、4.3 -17 ng/L)、オフロキサシン (16%、0.2 - 0.9 ng/L)、(いずれも検出率、検出範囲 (最小値 - 最大値))が検出されていた。(Harada (2018) *Yakugaku-Zasshi*, 138, 271- 275) 2017年に同地区でサンプリングを行い、残留抗菌性物質を測定したところ、サルファメタジン (94%、2.9 - 573 ng/L)、ナリジクス酸 (0.4 -26.5 ng/L)、フルメキン (75%、0.5 - 21 ng/L)、サルファメトキサゾール (69%、0.9 - 656 ng/L)、サルファジアジン (50%、0.8 -2.1 ng/L)、トリメトプリム (19%、3.3 - 70.5 ng/L)、(いずれも検出率、検出範囲(最小値-最大値) (いずれも検出率、検出範囲 (最小値-最大値))が検出された。セファレキシン、テトラサイクリン、オフロキサシンは検出されなかった。また、研究実施者が以前、報告したアンピシリンやアモキシシリンの分解物である2-ヒドロキシ-3-フェニルピラジン (Sy *et. al.* (2017) *Chemosphere*, 172, 355-362) についても検出されなかった。さらに2019年にサンプリングを行ったところ、サルファメタジン (72%、1.5 - 125 ng/L)、サルファメトキサゾール(68%、0.3 - 238 ng/L)、フルメキン (65%、1.0 - 15 ng/L)、トリメトプリム (10%、1.2 - 30 ng/L)が検出された。それ以外は検出されなかった。また、2-ヒドロキシ-3-フェニルピラジンに関しては、いずれのサンプリング地点からも検出されなかった。このように以前と比べ、同地区の環境水の残留抗菌性物質の検出される物質の種類は減り、検出率の低下し、残留濃度、残留濃度が大きく低下していた。また、年を経るごとに、低下している点の特徴であった。



図1. 現地での活動の様子

この原因は研究実施者が以前、参画していた地球規模課題対応国際技術協力事業 (SATREPS、山本容正研究代表、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)において、同地区において、実施した薬剤耐性菌に関する教育、啓蒙活動により、不適正使用が減少したことが考えられる。

一方、研究実施者が過去実施したベトナム、カントー市における養殖池や河川での解析結果(Nakayama *et. al.* (2017) *Environmental Pollution*, 222, 294-306)と比較したところ、ほぼ同様な結果が得られた。カントー市における養殖池や河川は、水量が極めて多く、流れも存在していたが、今回の解析対象地区のサンプリング地点は、家庭や小規模農家が保有する養殖池が多く、地区を流れる河川も水量が少なく、流れもほぼ存在していなかった。豊富な水量による希釈率、流れによる残留物の移動などを考慮すると、今回の解析対象地区のほうが、カントー市養殖池、河川に比べ、抗菌性物質の使用量や環境への放出量のはるかに少ないことが考えられた。しかし、一方で、環境中の抗菌性物質残留濃度としてはほぼ同等であることから、ある一時点で環境中の微生物あるいはその水を使用する周辺住民が、残留抗菌性物質から受ける影響、つまり環境影響に関しては、同等の影響力を及ぼしている可能性が考えられる。

環境水から薬剤耐性菌の一種である extended spectrum beta-lactamase (ESBL) 産生菌の検出を試みた。環境水を直接、ESBL chromoagar に塗布したところ、全ての試験水から菌の増殖が確認された。



図2. 環境水を ESBL chromoagar に塗布した結果

これらが、市中健常人が保菌する ESBL 産生大腸菌であるか否かの確認はできなかったが、今回の解析対象地区については環境水と周辺住民との距離が非常に近く、環境水を生活用水として使用しているため、環境中と周辺住民との間で菌、および遺伝子の伝播が頻繁に生じていることが推測された。

この環境試料からメンブレンフィルターにより集菌を行い、DNA を抽出、PCR による CTX-M-1, CTX-M-9 の検出を試みたところ、これも全ての試料から検出された。これらのサンプルはセファレキシムなどのセフェム系の抗菌性物質、および 2-ヒドロキシ-3-フェニルピラジンが残留していない箇所からも検出されたことから、抗菌性物質の使用量や環境中への放出量が減少し、残留抗菌性物質の濃度が低下しても、薬剤耐性菌が検出されなくなるまでには、相当の時間あるいは何らかの対策が必要であることが示唆された。

また、当初、本研究の目的とはしていなかったが、研究実施者がすでに確立していたろ紙を基盤としたサルファ剤の検出キット (Ujii *et. al.* (2018) *The Journal of Antibiotics*, 71, 1044-1047) を、現地に持ち込み、オンサイトでの環境水の測定を実施した。我々が確立した検出キットの感度では、前述の残留濃度は検出できないため、環境水の残留実態を本キットで解析することはできなかったが、サンプリングした環境水にサルファメトキサゾール、サルファメタジン、サルファジアジンの標準物質を添加し、ポジティブコントロールとして測定を実施したところ、正常に検出することに成功した。したがって、我々が確立したろ紙を基盤としたサルファ剤の検出キットを、サンプリング現場に持ち込み、実際に運用できる可能性を示すことができた。

研究実施期間中、LC/MS による残留抗菌性物質の解析は実施でき、経時的な残留実態の解析は行うことができた。一方で、当初予定していた市中健常人の保菌率、薬剤耐性遺伝子の解析については、現地での協力が得られず、詳細な解析は行えなかった。また、環境中の薬剤耐性遺伝子の定量的な解析も、現地の装置が使用できない状況で、解析が行えなかった。衛生環境の改善にはモニタリング体制の強化が必須であるが、そのためには機器メーカーのサポート、人材育成が欠かせない。そのモチベーションが高まるように本研究のような調査研究が継続的に実施されることが望まれる。

本研究により周辺住民の薬剤耐性菌に関する教育、啓蒙活動によって、不適正使用を抑制し、環境中抗菌性物質残留濃度を低下させることが可能であることを示唆した。しかし、環境中の薬剤耐性菌については、環境中抗菌性物質残留濃度と高い相関は見られず、検出されなくなるまでには、相当の対策と時間を要することが示唆された。また、不適正使用の抑制により、周辺住民の経済活動にどのような影響が現れたかを今後評価する必要もある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kazuo Harada   |
| 2. 発表標題<br>Antibiotic Residue in Environmental Water and Fresh Food in Vietnam                            |
| 3. 学会等名<br>79th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Abu Dhabi, 2019 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                        | 備考                     |
|-------|--|--|------------------------|
| 研究分担者 | 原田 和生<br><br>(Harada Kazuo)<br><br>(50397741)      | 大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)<br><br><br><br>(14401) |                        |
| 研究分担者 | 松浦 秀幸<br><br>(Matsuura Hideyuki)<br><br>(10596232) | 大阪大学・薬学研究科・助教<br><br><br><br>(14401)         | 2018年度より異動のため、分担から外れた。 |