

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22406015

研究課題名（和文） タイをモデルとする薬剤耐性菌蔓延機構の解明

研究課題名（英文） Study on spreading mechanisms of antibiotic-resistant bacteria in Thailand

研究代表者

山本 容正（YAMAMOTO YOSHIMASA）

大阪府立公衆衛生研究所・所長

研究者番号：20010100

研究成果の概要（和文）：

近年のヒトならびに水産家畜現場における抗菌剤使用の濫用は薬剤耐性菌の生態環境中における蔓延と薬剤耐性病原菌による感染症の増加をもたらした。これは感染症治療に対して選択可能な薬剤を大幅に制限することとなりこれへの対応は喫緊の課題となっている。特に近年世界で急激な増加傾向を示している基質特異性拡張型 β -lactamase (extended-spectrum β -lactamase, ESBL)の健常人における罹患率ならびに罹患に関与する危険因子に関しては不明な点が多くその解明が急がれている。そこで、本研究では、住民の転出入が少ないタイ農村部地区を対象として、健常住民の ESBL 産生腸内細菌罹患率ならびに当該耐性菌の菌型や耐性遺伝子型を解析し、加えて、耐性菌の罹患に関与する危険因子の検討を行った。その結果、対象とした、タイ北部のナン地区、中部のカンチャナブリ地区、南部のナコンシタマラート地区で、いずれも CTX-M 型の ESBL 産生腸内細菌の住民罹患率が、それぞれ 29.3%、50.6%、29.9%と極めて高かった。また、その耐性遺伝子型 (*bla*_{CTX-M}) が I 型、III 型、IV 型でそれぞれ 7.4%、0.2%、28.5%を示した。これら ESBL 産生腸内細菌の大部分は大腸菌であった。罹患に関与する因子解析では、年齢、性別、教育歴、食習慣、抗生物質使用について直接の因果関係は認められなかった。しかし、対象とした3つの地域間において最も高い罹患率を示した地域住民が、3つの地域の中で処方箋無しの抗生物質購入とその使用率が最も高く、両者の関連性が示唆された。

これらの結果から、タイにおける健常人住民の当該耐性菌罹患に地域間で若干の相異があるが、総じて高い比率（39.5%）で罹患していることが明らかとなった。加えて、この高い耐性菌罹患率に住民の抗生物質使用の濫用が要因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The prevalence of and risk factors associated with extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing bacteria have not been well studied in healthy individuals. The aim of this study was to determine this in healthy individuals. Stool samples and questionnaires obtained from participants from three provinces in Thailand were analyzed. The antimicrobial susceptibility of the isolates was assessed using phenotypic and genotypic methods. PCR analysis was performed to detect and group the *bla*_{CTX-M} genes. The prevalence of CTX-M-type ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in the three provinces was as follows: 29.3% in Nan, 29.9% in Nakhon Si Thammarat, and 50.6% in Kanchanaburi. Of these samples, 7.4%, 0.2%, and 28.5% isolates belonged to the *bla*_{CTX-M} gene groups I, III, and IV, respectively. *Escherichia coli* was the predominant *Enterobacteriaceae* producing CTX-M-type ESBLs. No statistically significant association was observed between the presence of ESBL-producing bacteria and gender, age, education, food habits, or antibiotic usage. However, the provinces that had the highest prevalence of ESBL-producing

Enterobacteriaceae also had the highest prevalence of use and purchase of antibiotics without a prescription. Thus, the study revealed that fecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* is very high in asymptomatic individuals in Thailand, with some variations between the provinces. The high prevalence may be linked to antibiotic abuse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医師薬学 A

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：ESBL 産生腸内細菌、タイ、健康人

1. 研究開始当初の背景

抗菌剤の使用により薬剤耐性菌が選択されることは良く知られているが、近年、特に水産家畜分野において選択される薬剤耐性菌が、食品を介してヒトに伝播し健康に影響を及ぼす可能性について、国内外の関心が高まっている。このような薬剤耐性菌の拡がりに対する懸念は、近年のヒトや物の国際流通の飛躍的増大に伴い、我が国のみならず近隣諸国での薬剤耐性菌の拡がりに対する関心の高さへと繋がっている。政府による規制が行われている我が国においても、抗菌剤の年間使用量は、ヒトの治療薬の約 520 トン（1998 年）に対し、2 倍以上（1290 トン、2001 年）もの抗菌剤が家畜や魚の生産過程で使用されている。一方、東南アジア諸国における抗菌剤、特に家畜等に対する使用量の実態は不明で、ヒトにおける使用規制も大多数において処方箋無しで購入が可能であることから、その濫用が懸念される。因みに、中国では年間抗生物質原料 18 万トンが国内で使用されており、国民一人当たりの年間消費量は約 138 g と米国の約 10 倍に相当している (www.epochtimes.jp)。使用規制が行われていると思われるスペインにおける 2006 年の報告では、養鶏業におけるその生態環境ならびに鶏自体のセファロスポリン耐性菌による汚染の飛躍的増加が抗菌剤の不適切な濫用に起因することが指摘されている (Lancet, 374:773, 2009, J. Antibio. Chemother., 58:211, 2006)。問題は、このような生態環境ならびに畜産品における薬剤耐性菌の拡がりヒトへの伝播にどのように関わってくるかについての具体的な実証

がなされておらず、多くが推測の積み重ねの域を出ていないことである。

有効な抗菌剤開発の歴史は、薬剤耐性との戦いの歴史とも言える。ペニシリンの開発とその後の急速なペニシリン分解酵素産生菌の蔓延、グラム陰性腸内細菌にも有効なペニシリン分解酵素耐性骨格を有する抗菌剤の開発とそれに対するプラスミッド性 β -lactamase 産生菌の勃発、これに対抗する第 3 世代セファロスポリン抗生剤の開発とこれをも危うくする基質特異性拡張型 β -lactamase (extended-spectrum β -lactamase, ESBL) の出現、さらには ESBL 産生菌に有効なカルバペネムの使用に対するカルバペネム分解 β -lactamase 産生菌の増加等、各種 β -lactamase 産生菌の出現が治療現場において最も繁用されているペニシリン系、セフェム系抗生剤の選択域を極端に狭めつつある。特に ESBL 産生菌は、その産生遺伝子が R プラスミッド上にコードされているため、同菌種間はもとより、腸内細菌科の異なる菌種間に伝達され、多菌種へと広がるのが指摘されている。即ち、非病原性大腸菌の ESBL 産生性（薬剤耐性）が病原性腸内細菌へ伝播することを意味しており、事実、その伝播が動物実験にて立証されている。また、その拡がり腸内細菌のみならず嫌気性細菌にも及び、その増加は治療上近年最も懸念されている (Clin. Microbiol. Rev., 18:657, 2005)。

感染症の起因菌として分離された患者由来腸内細菌における ESBL 産生薬剤耐性菌は本邦においては 6~14% と増加傾向にある (Clin. Microbiol. Infect. 14:159, 2008)。

アジアにおける CTX-M 型 (主要 ESBL 産生遺伝子型) ESBL 産生菌保菌者は約 10%と考
えられており、ヨーロッパに比べ極めて高い
検出率である。本邦においては、健康人糞便
からの ESBL 産生腸内細菌の検出率は約 6%
と約 10 年前の報告 (0.3%) に比べ、急激に
増加している。

2. 研究の目的

本研究では、アジアにおける高い
ESBL 産生腸内細菌罹患率の詳細な検討と、
それに影響する要因の解析を目的として、予
備研究で調査研究実績を有するタイを対象
国として実施した。タイの異なる生活環境を
有する地域 3 箇所を選定 (食住環境において
家畜主体もしくは海産物主体等の生活をする
住民の流動性の少ない山間地域、海岸地域
ならびに首都近郊地域) し、それぞれの地域
住民における ESBL 産生薬剤耐性腸内細菌
罹患率、検出耐性菌の遺伝子型解析を含めた
相互の関連性を検討し、何故高い ESBL 産生
薬剤耐性菌罹患率が健康人に起きているの
か、その機構を比較検討することにより明ら
かにする。

3. 研究の方法

異なる地域ならびに住環境を有する
タイの代表的な地方集落 3 箇所を選定し
(図 1 参照)、その住民の糞便から薬剤耐
性腸内細菌の検出解析調査を行った。
現地での作業：当該地域保健管理者 (通常、
地域拠点病院長) の協力のもと、当該地域住
民の本研究への参加者募集を地域保健師の
協力のもとに実施 (内容の告知とそれへの参
加協力を求めるパンフレットの当該地域で
の事前配布)。参加者からの検体収集ならび
に聞き取り調査場所は地域集会場を利用。聞
き取り調査は、インフォームドコンセントな
らびに問診 (生年月日、住所、性別、出生地、
居住期間、職業、食習慣含む飲酒、喫煙、病
歴、抗生剤服用経験等)。
対象者：対象者の除外規定は、過去 3 ヶ月間
の抗生物質服用歴。
薬剤耐性菌検出：セファタキシム (CTX) 2
μg/ml を含む McConkey 寒天平板培地に糞便
(採取 1 日以内) を直接塗撒し 37°C で 1 日培
養を行い、生じた集落を単離した。
薬剤感受性試験：単離された菌は、Clinical
and Laboratory Standards Institute (CLSI)
の方法に準拠したクラブラン酸を含む
double-disk 法により ESBL 産生性を解析し
た。
菌種同定：通常の API システムを含む生化学
的試験により菌種の同定を行った。
耐性遺伝子解析：薬剤耐性を示す菌株の浮遊
液の煮沸により細菌 DNA 抽出を行う。得られ
た DNA を鋳型とする各種耐性遺伝子特異プラ

イマーセット (TEM 型、SHV 型、CTX-M 型なら
びにその genotyping) を用いた PCR 法により
遺伝子解析を実施。他の耐性遺伝子解析
(B, C, D 型 β-lactamase) についても同様に実
施。解析の特異性は、PCR 産物のシーケ
ンス解析により確認を行った。
疫学解析：解析ソフト SPSS を用いて得られ
た成績の解析を行った。参加者からの聞き取
り調査により得られた質問票は、共同研究者
の所属するマヒドン大学のスタッフにより
英語への変換とエクセル入力を行い、これを
基礎データとした。

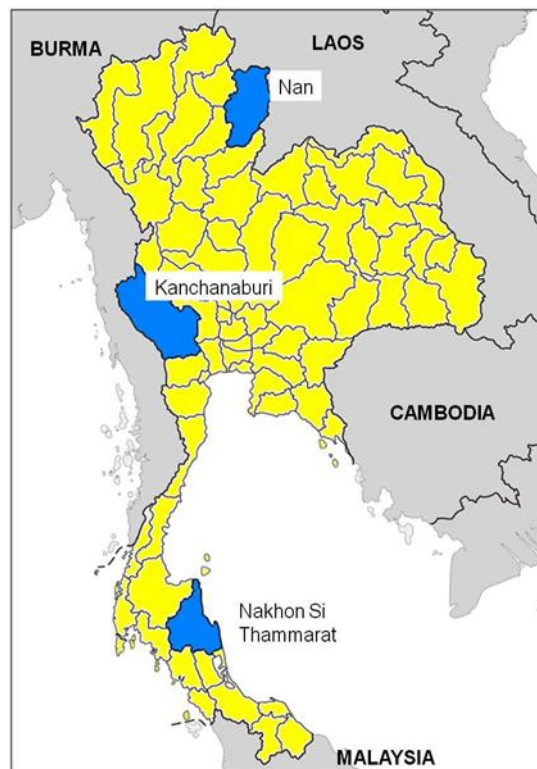


図 1. タイ調査対象地域

4. 研究成果

① 地域住民の ESBL 産生腸内細菌罹患とその 影響因子解析

タイ北部のナン地区、中部カンチャ
ナブリ地区ならびに南部ナコンシタマラ
ート地区の健康住民 445 名の糞便から ESBL 産
生腸内細菌の検出とその性状 (菌種、菌型、
耐性遺伝子型) 解析を実施した。合わせて、
参加住民の属性や生活関連情報の解析を実
施し、薬剤耐性菌保菌との関連性について
の検討を行った。参加住民の平均年齢は 54 才、
41% が男性、職業は農業 (72%)。住民から
分離された ESBL 産生腸内細菌は、ナン、
カンチャナブリ、ナコンシタマラート地区で
それぞれ、32.0%, 53.9%, 32.6% であつた (平
均 39.5%)。分離された ESBL 産生腸内細菌の
ほとんど (90.8%) は大腸菌で、耐性遺伝子
型は CTX-M 型 (92.6%) であつた。分離された

CTX-M の遺伝子型解析 (bla_{CTX-M}) では図 2 に示す如く、I 型、III 型、IV 型がそれぞれ 20.5%、0.6%、78.9%であった。

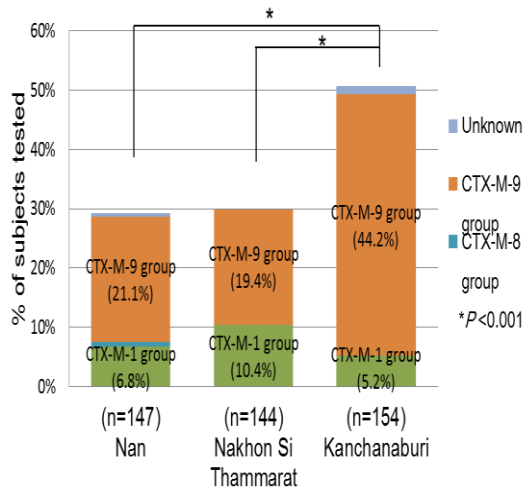


図 2. 分離された ESBL 産生菌の耐性遺伝子型割合

ESBL 産生腸内細菌罹患と保菌者の年齢、性別、教育歴、食習慣、抗生物質摂取との間に統計的因果関係は認められなかったが、対象とした 3 つの地域間で処方箋無しによる抗生物質購入とその使用に有意差が認められた。

これらの結果から、タイにおける健康人住民が地域間で若干の相異が有るが、高い比率 (39.5%) で ESBL 産生腸内細菌を保有していることが明らかとなった。加えて、この高い耐性菌罹患率に住民の抗生物質使用の濫用が要因となっている可能性が示唆された。

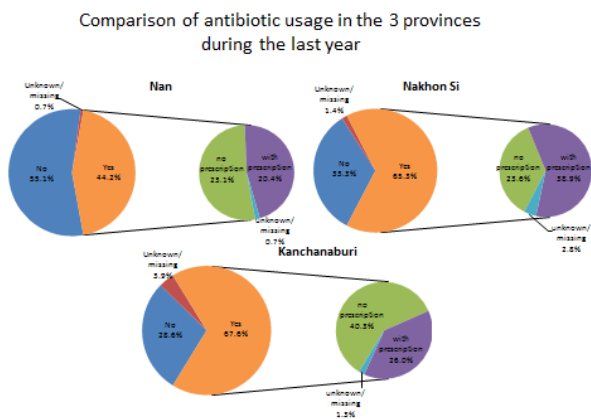


図 3. 対象地域住民の処方箋無し抗生物質使用

② 地域住民 ESBL 産生腸内細菌罹患の安定性

の検討

薬剤耐性菌を保有する健康住民がどの程度継続して当該耐性菌を保有し続けているか、また、それに抗生物質使用がどの程度影響要因として関与しているかを検討した。カンチャナブリ地区の同一村落を対象に、2008 年 11 月ならびに 2010 年 11 月、延べ 571 名の住民を対象として糞便中の ESBL 産生腸内細菌の検出同定を行った。2008 年時点では、

表 1. ESBL 産生菌罹患率の安定性

Year	Participants	ESBL phenotype	CTX-M gene	CTX-M group			
				CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9
2008	154	83 53.9%	78 50.6%	8 10.3%	0 0.0%	0 0.0%	68 87.2%
2010	417	289 69.3%	274 65.7%	106 38.7%	0 0.0%	2 0.7%	166 60.6%

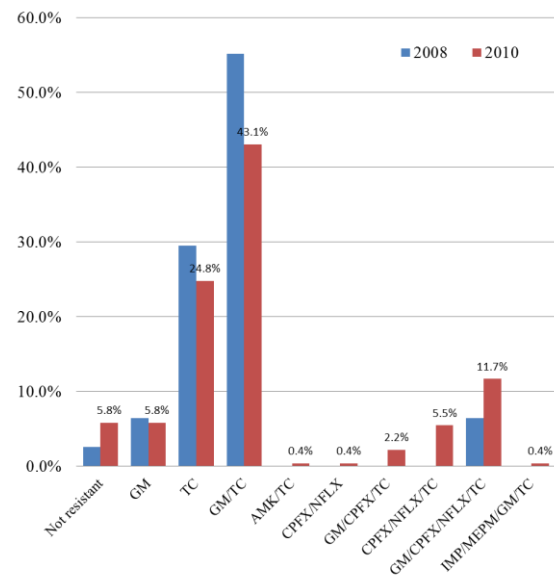


図 4. 分離された ESBL 産生菌の他の薬剤に対する耐性

調査住民の 50.6%が、2010 年では 65.7%が当該耐性菌を保有しており、高い住民罹患率は一過性では無く、継続しており、むしろ増加傾向に有ることが判明した。耐性菌保有に関連する要因として、抗生物質の過去 1 年間の服用歴が示された。

β ラクタム系抗生物質以外に対する耐性 (多剤耐性) も引き続き検出されており (図 4)、ESBL 産生に加え、多剤耐性化した腸内細菌の安定した保菌状態が当該地域で認められた。

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 2 件)

- ① Luvsansharav, U. O., Hirai, I. Nakata, A., Imura, K., Yamauchi, K., Niki, M., Komalamisra, C., Kusolsuk, T., Yamamoto, Y. Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in rural Thai communities. J. Antimicrobial Chemotherapy, 67, 1769-1774, 2012. 査読有
- ② Luvsansharav, U. O., Hirai, I., Niki, M., Sasaki, T., Makimoto, K., Komalamisra, C., Maipanich, W., Kusolsuk, T., Sa-nguankiat, S., Pubampen, S., Yamamoto, Y. Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in asymptomatic individuals in rural Thailand. J. Med. Microbiol., 60, 619-624, 2011. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山内 紘, 他、健常人由来 CTX-M 型 ESBL 産生菌株における ESBL 遺伝子の存在形態と地理的分布の関連性、日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日、千葉市
- ② Ulzii-Orshikh Luvsansharav, 他、A 2-year trend of CTX-M beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in asymptomatic Thai people、日本細菌学会総会、2012 年 3 月 28 日、長崎市
- ③ 山内紘, 他、タイ地域住民の CTX-M 型 ESBL 産生菌保菌率の検討、日本細菌学会関西支部総会、2011 年 11 月 19 日、大阪府堺市
- ④ Ulzii-Orshikh Luvsansharav, 他, Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in asymptomatic individuals in rural Thailand、International Union of Microbiological Societies、2011 年 9 月 9 日、札幌市
- ⑤ 山本容正、Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in asymptomatic

individuals、2010 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy、2010 年 9 月 13 日、ボストン (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 容正 (YAMAMOTO YOSHIMASA)
大阪府立公衆衛生研究所・所長
研究者番号：20010100

(2) 研究分担者

平井 到 (HIRAI ITARU)
大阪大学学内共同研究利用施設等・教授
研究者番号：00359994