

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：84407

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659103

研究課題名（和文） 本邦健康人における薬剤耐性腸内細菌蔓延の実態解明

研究課題名（英文） Study of the widespread of drug-resistant *Enterobacteriaceae* among healthy people in Japan

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）：

近年の薬剤耐性病原菌による感染症の増加は、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それへの対応は感染制御における喫緊の課題となっている。そこで本研究では、基盤となる健康人の耐性菌保菌状態の解析を行った。その結果、285名の健康成人糞便中、18名(6.3%)からESBL(extended-spectrum β -lactamase)産生腸内細菌が検出された。分離されたESBL産生菌の84%は特定遺伝子型(CTX-M)を示し、そのほとんどは大腸菌であった。このような結果は、約10年前の報告(0.3%)と比べ、本邦における健康人耐性菌保菌者が急激に増加していることを示している。

研究成果の概要（英文）：

Multidrug-resistant pathogens that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) have spread rapidly worldwide causing treatment failure and hindering infection control efforts. In the present study, we investigated the prevalence of the fecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* among healthy adults in Japan. We found the prevalence of ESBL producers to be 6.3% by phenotypic identification, and 84% of them possessed the *bla*_{CTX-M} gene. Among the CTX-M ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, the majority of them was *Escherichia coli*. The findings suggest that the fecal carriage of ESBL producers by healthy people is rapidly increasing from the previous report that showed approximately 0.3% prevalence 10 years ago, in Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・医療社会学

キーワード：薬剤耐性菌、腸内細菌、健康人、日本

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。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 (Lancet, 374:773, 2009)。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、国境を越えた蔓延に対しても持たれており、公衆衛生政策上も重要な課題といえる。抗菌剤の使用に関しては、政府による規制が行われている我が国においても、その年間使用量は、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。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)。このような観点から、家畜生態環境ならびに畜産品における薬剤耐性菌の調査研究は今まで多く行われているが、ヒトへの影響に関する具体的な検証がなされてこなかった。即ち、一般健常人の薬剤耐性菌保有状況、特に腸管内細菌に関してはほとんど調査研究されていない。

薬剤耐性の中でもペニシリン系、セフェム系抗生物質を広く分解する基質特異性拡張型 β -lactamase(extended-spectrum β -lactamase, ESBL)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、多菌種へと広がる事が知られている。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、その拡がりには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)。これに関して最近我々が行ったタイの農村部に居住する健常人を対象とした CTX-M 型 ESBL 産生薬剤耐性腸内細菌保有率の調査研究で、極めて高い 58.2% もの健常人に耐性菌が蔓延していることが明らかとなった (J. Infect. Chemother., 65:666-668, 2010)。このような健常人における高い ESBL 産生薬剤耐性腸内細菌保有率が特定国のみか本邦においても起きているのか否か、またその蔓延にどのような生活因子が関連しているのか不明であり、早急な調査が公衆衛生対策上必要である。

2. 研究の目的

本邦における一般健常人糞便中の ESBL 産生薬剤耐性腸内細菌の拡がりを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、対象とする一般健常人の糞便からの ESBL 産生薬剤耐性腸内細菌の検出とその性状解析、質問表による生活因子解析、近隣医療施設における臨床分離腸内細菌株の薬剤耐性パターン解析、さらには薬剤耐性菌の型解析による相互の関連性解析を実施した。

対象者ならびに検体：対象者は成人健常人ならびに比較対象として介護老人健康保健施設入居者も含めた。対象者には、文書によるインフォームド・コンセントを得て協力依頼をした。対象者の除外規定は、過去 3 ヶ月間の抗生物質服用歴。429 名からの糞便検体を収集し微生物学的解析を実施した。

質問表：参加者からは質問表で、性別、生年月日、出生地、家族構成、現住所、過去 5 年間の居住地、職業、食習慣 (含む飲酒)、喫煙、病歴、過去 5 年間の抗生剤服用経験 (種類と期間) 等に関する調査を行った。

薬剤耐性腸内細菌検出：セファタキシム (CTX) 2 μ g/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 抽出を行った。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した。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。

検出薬剤耐性菌株間の関連性：健常者より検出された薬剤耐性菌ならびに病院保存臨床分離株の菌型解析は、Phylogenetic group 分類と、7 つの遺伝子の MLST (multi locus sequence type) 解析により行った。

疫学解析：解析ソフト SPSS を用いて得られた微生物学解析結果成績ならびに疫学成績の多変量解析を行った。

4. 研究成果

対象とした健常成人 285 名のうち 18 名 (6.3%) から ESBL 産生腸内細菌が検出された。分離された耐性菌のうち、83% から CTX-M 遺伝子が検出された。また、分離された ESBL 産生腸内細菌の 91% が大腸菌であった。CTX-M-遺伝子型分類では、Group II が 33% と Group IV が 41% であった。また、 β -lactam

系抗菌剤以外ではテトラサイクリン系抗菌剤に対して耐性を示すものが46%と最も多かった。

健康人から分離されたESBL産生株の菌種、菌型、耐性遺伝子型解析を検討した結果、表1に示すように、多様な系統の菌株であることが明らかとなった。臨床分離株では菌株間で系統的な差異が少ないのに比し、健康人保有ESBL産生菌は多様であることを示している。

表1 分離ESBL産生株の型解析

菌株名	菌種	CTX-M 遺伝子型	<i>E. coli</i> Phylogenetic group	<i>E. coli</i> ST	他の薬剤に対する耐性
J-1	<i>E. coli</i>	CTX-M-14	B2	95	
J-2	<i>E. coli</i>	CTX-M-2	D	1835	
J-3	<i>E. coli</i>	CTX-M-14	D	38	TC
J-4	<i>E. coli</i>	CTX-M-2	D	68	TC
J-5	<i>E. coli</i>	CTX-M-14	-	-	TC
J-6	<i>E. coli</i>	CTX-M-2	B1	162	
J-7	その他の腸内細菌	CTX-M-14	A	46	GM/CPFX/NFLX/TC
J-8	<i>E. coli</i>	CTX-M-14	D	38	TC
J-9	<i>E. coli</i>	CTX-M-8	A	10	TC
J-10	<i>E. coli</i>	CTX-M-8	B2	131	
J-11	<i>E. coli</i>	CTX-M-2	D	69	
J-12	<i>E. coli</i>	CTX-M-15	D	38	
J-13	その他の腸内細菌	CTX-M-3	-	-	

一方、比較対象として行った介護老人保健施設入所者糞便中におけるESBL産生腸内細菌の検出では、144名のうち37名(25.7%)から検出され、そのうち33株(22.9%=33/144)はCTX-M遺伝子を有していた。また、そのほとんど(93.9%)は大腸菌であった。CTX-M-遺伝子型分類ではGroup Iが30%、Group IVが69%を示し、一般健康人の遺伝子型と大きく異なった。他の抗菌剤に対する耐性も、キノロン系に対する耐性が全分離ESBL産生耐性菌で認められ、これも一般健康人から分離されたESBL産生耐性菌と異なる耐性パターンを示した。これらの結果から、施設内において、ESBL産生菌を保持している人の割合が一般健康人の保菌率(約6%)より有意に高いことが判明した。これは、一般人に比し施設入所者の抗菌剤の使用頻度の多さによるものであることが示唆された。また、耐性遺伝子型解析から、市中保持者の耐性遺伝子型と施設入所者のそれは異なり、施設入所者のそれは、臨床分離株の遺伝子型と類似することが判明した。

ESBL産生菌保菌者の当該耐性菌が保菌者の感染にどの程度関与するのか、言い換えるとESBL産生菌保菌者の感染へのリスク評価を検討した。検討した21名のESBL産生菌保菌者のうち、9名が尿路感染症を起こし、その44%が自身が保菌するESBL産生菌により感染を起こしたことが遺伝子型解析等によ

り立証された。

これら研究成果は、健康人間で近年ESBL産生腸内細菌の保菌率が本邦において急激に増加している事実を示しており、それへの対策は喫緊の課題であることが確認された。特に、介護老人保健施設での保菌率の増加は、抗菌剤の使用実績や入院歴とも関連することが示唆され、加えて、保菌者の耐性菌が感染症を起こす要因として立証されたことより、ESBL産生菌に対する調査研究はその蔓延とそれによる感染を防止する上でも極めて重要であることが示された。

研究成果の一部は論文として複数の国際誌ならびに国内紙(査読有)で発表した。

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3件)

- ① 仁木真理恵、平井到、山本容正、医療系学生における基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生腸内細菌保持率、環境感染誌、26、2011、154-156、査読有
- ② Niki, M., Hirai, I., Yoshinaga, A., Ulzii-Orshikh, L., Nakata, A., Yamamoto, A., Yamamoto, M., Yamamoto, Y. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the feces of carriers contribute substantially to urinary tract infections in these patients. *Infection*, 39, 467-471, 2011. 査読有
- ③ Luvsansharav, U. O., Hirai, I., Niki, M., Nakata, A., Yoshinaga, A., Moriyama, T., Yamamoto, Y. Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among healthy adult people in Japan. *J. Infect. Chemother.*, 60, 619-624, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- ① 福井直希、他、Inverse PCR RFLPを用いた *Escherichia coli* O25:H4-ST131, Phylogroup B2, CTX-M-15 臨床分離株のプラスミド解析、日本細菌学会関西支部総会、2011年11月19日、大阪府堺市
- ② 吉永亜耶、他、日本におけるPhylogroup B2、ST131に属するCTX-M型ESBL産生大腸菌の検出、第63回日本細菌学会関西支部総会、2010年11月20日、関西医科大学附属枚方病院講堂、枚方市

- ③ 仁木真理恵、他、近畿圏介護老人保健施設入所者の基質特異性拡張型 β -lactamase 産生菌出現率の検討、2010年11月20日、関西医科大学附属枚方病院講堂、枚方市
- ④ 仁木真理恵、他、介護老人保健施設入所者のESBL産生菌保菌について、第50回近畿医学検査学会、2010年12月11日、奈良県文化会館、奈良市
- ⑤ 中田有理沙、他、日本の健常人におけるESBL産生菌の保菌率、第50回近畿医学検査学会、2010年12月11日、奈良県文化会館、奈良市
- ⑥ 仁木真理恵、他、介護老人保健施設入所者におけるESBL産生菌の検出、第26回日本環境感染学会総会、2011年2月18日、パシフィコ横浜、横浜市

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・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00359994

山本 眞由美 (YAMAMOTO MAYUMI)
岐阜大学・保健管理センター・教授
研究者番号：40313879