

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

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

(ベトナム社会主義共和国)

平成 25 年度実施報告書

代表者：山本 容正

大阪大学グローバルコラボレーションセンター・招へい教授

<平成 23 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

近年世界を震撼させているスーパー（薬剤）耐性菌の出現は難治性の感染症を引き起こし、その背景には医療に限らず畜水産における抗菌剤の濫用が指摘されている。さらに、人および農水産物の世界的流通拡大に伴いこれらスーパー耐性菌の国境を越えた拡散は地球規模での対応を迫っている。本プロジェクトでは、耐性菌検出率が著しく増加しているベトナムにおいて薬剤耐性菌発生機構とそれが原因となる感染症の解析ならびに発生に関与する抗菌剤の実態を微生物学的、薬物学的さらには当該国の社会・経済的背景を基にした人類学・開発学的視点より研究解明し、これを基盤とした耐性菌モニタリングシステムの構築を行う。

そのため、ベトナムの5つの地域、北部首都ハノイ地区（国立栄養院）、紅河デルタ地区（タイビン医科大学）、中部海岸地区（ニャチャン・パスツール院）、南部ホーチミン地区（ホーチミン公衆衛生医療院、ビンダイエン卸売市場）、メコンデルタ地区（カントー大学）における協働研究を通して本プロジェクトを実施している。平成24年度は、当該地域における調査研究対象の絞り込みと当該地域拠点での1次解析実施のための環境整備を行った。プロジェクト2年目となる平成25年度は、これを受け、これら地域での検体収集を含む調査研究を実施した。得られた検体からは、耐性菌の検出とその性状の1次解析の実施、検体中の残留抗菌剤の検出、さらには地域住民を対象とした人類学的視点からの調査解析を行い、プロジェクト3年目に予定されている高次解析への基盤とした。その結果、調査対象地域住民の多くは（～60%）ESBL産生薬剤耐性菌を保菌しており、また、日常消費する生鮮食材、特に鶏肉からは当該耐性菌が極めて高率（～90%）に検出され、ESBL産生耐性菌の地域社会での蔓延が明らかになった。同一世帯構成員間での耐性菌伝播に関しても分離耐性菌の解析が進んでおり、平成26年度にはこれらを総括した一定の評価が期待される。

基礎的研究として、耐性遺伝子解析手法ならびに耐性菌蔓延の疫学的解析手法についてモデル研究を実施し、その成果を平成25年度に論文発表した。本手法は今後のベトナムにおける解析研究に大きく貢献するものである。地域住民の耐性菌保菌の機序解析に必要な実験動物（マウス）を用いた感染モデルの構築は、平成25年度にその作製に成功したため、平成26年度以降は、本モデルを用いた保菌状態の安定性に及ぼす諸因子の解析を行うことになる。また、食品検査体制における耐性菌モニタリングシステムの構築を行うべく各拠点で共通して使用する耐性菌分離とその性状解析のためのマニュアル（英語版、ベトナム語版）を作成した。モニタリングは3つの国立研究機関（国立栄養院、ホーチミン公衆衛生医療院、ニャチャン・パスツール院）が参加し平成26年度より開始する体制が整えられた。

2. 研究グループ別の実施内容

「大阪大学」グループ

① 研究のねらい：

本研究ではESBL産生耐性菌保菌者が著しく増加しているベトナムにおいてESBL産生菌選択誘導機構とそれが原因となる感染症の解析、発生に関与する抗菌剤の使用ならびに抗菌剤の残留実態を微生物学的、理化学的さらには社会・経済的背景を基にした人類学・開発学的視点より研究解明し、これを基盤とした食品検査体制における耐性菌モニタリングモデルの構築を行う。

② 研究実施方法：

代表機関として、研究機関間の進捗の調和を図りながら全体を統括し、以下の研究活動を実施。

活動 1-1: 食材生産と流過程における耐性菌・残留抗菌剤の多面的解析
活動 1-2: 地域における耐性菌分布、抗菌剤消費に関する多面的解析
活動 2-1: 感染症と域内健常保菌者との関連性微生物学的解析

活動 3-1:耐性菌ならびに残留抗菌剤モニタリングのための検査法の開発

活動 5-1:OJT による専門家の育成

活動 5-2:長期・短期研修の実施

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

サンプリング地域の選定とサンプリングの実施とその解析は当初計画に沿って行われたが、業務調整員の派遣がプロジェクト開始7カ月後となった事と、ベトナム側プロジェクト承認が当該年度内に下りなかった為、一部計画の実施(基幹病院からの臨床分離株収集のための手続きならびに耐性菌分離株の日本への搬送)が遅れた。供与機材のベトナム側への搬入は年度内にほぼ達成されたがそれを用いた解析研究は次年度へとずれ込んでいる。初年度に計画した2年目に備えた予備調査研究はほぼ達成されたため、2年目の計画に大幅な変更は無く、当初計画通りとした。

平成 25 年度

実施 2 年目となる平成 25 年度は、初年度の予備調査研究を踏まえ、各研究拠点(5 か所)からの検体収集とその 1 次解析を行った。特に、紅河デルタ地区(タイビン医科大学)では日本側機能グループ(微生物G、薬学G、人類学G)専門家の派遣日程集中化による相互連携の強化を図った。分離した耐性菌株はプロジェクト全体で既に数千株に上り、今後、高次解析のための対象菌株の絞り込みへと進める。高次解析拠点となる国立栄養院の研究ラボ(供与機材設置ラボ)の設置とその運用が平成 25 年度にスタートし、分離菌株を用いた研究がベトナム人研究参加者と協働して実施された。全体として当初計画通り(初年度はサンプリングのための調整、2年目はサンプリングと1次解析)の進捗となっている。ただ、ベトナム政府によるプロジェクト承認が平成 26 年 1 月とプロジェクト 2 年目の終わりの時期に下りたため、感染症患者から分離された臨床分離株を対象とした研究の実施と一部地域におけるヒト糞便検体の収集が平成 26 年度へずれ込んだ。

ベトナムでの調査研究を支援する薬剤耐性菌解析ならびに疫学解析に関する基礎研究は当初計画通り進んでおり、原著論文 2 報を平成 25 年度に発表した。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

- ・長期研修:2012年10月より参加研究機関(タイビン医科大学)より研究員1名を徳島大学大学院栄養生命科学研究科博士後期課程に受入(3年間の大学院での人材育成)。大学院専門教育(食を介した感染症)による高度技術移転を実施。
- ・短期研修:2012年9月ならびに2013年3月に計8名の研修生を受入、日本側研究機関で2~3週間技術研修(微生物学、薬学、食品検査)を実施。
- ・ショートコース・ワークショップ(タイビン医科大学)における技術研修(感染疫学)を実施(30名参加)。
- ・サイエンティフィックミーティングの開催(栄養院・ハノイ)による薬剤耐性調査研究に関する情報交換を実施。

平成 25 年度

- ・長期研修:2013年4月よりホーチミン公衆衛生医療院から研究員1名を大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻博士課程に受入(4年間の大学院での人材育成)。食品安全衛生に係る先端的研究能力の習得。
- ・長期研修:2013年10月よりカントー大学から研究員1名を大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程に受入(SATREPS 国費留学枠)。抗菌剤研究能力育成による技術移転。

- ・短期研修:2013年7月ならびに9月に計6名の研修生を受入、日本側研究機関で4~15週間技術研修(微生物学、薬学、食品検査)を実施。
 - ・ショートコース・ワークショップとしてベトナムにおいて疫学研修(2013年9月、ホーチミン公衆衛生医療院、16名参加)、PCR技術研修(2013年10月、国立栄養院、17名参加)を実施。
 - ・ベトナムにおけるサイエンティフィックミーティングの開催(2013年5月、ホーチミン公衆衛生医療院、45名参加)による薬剤耐性調査研究に関する情報交換を実施。
 - ・在留長期研修生を交えた SATREPS 研究会を本邦で3回(2013年7月徳島大19名参加、10月大阪府立大31名参加、2014年2月大阪大22名参加)開催し、長期研修生ならびに一部短期研修生と日本側研究者との討議を行った。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):
特記すべき事項は無い。

「大阪府立大学」グループ

① 研究のねらい:

近年明らかとなった住民の高い ESBL 産生耐性菌の保菌率には、それを起こさせる耐性菌選択誘導機構と同時にその保菌状態の安定性が大きく関与する。一旦耐性菌を保菌するとどの程度その状態が維持されるのか、さらには、それに及ぼす諸因子(抗菌剤に定期的に曝される必要が有るか、どのような抗菌剤が ESBL 耐性菌の保持に有効か等)の検討は保菌状態の安定性の解明に重要。本プロジェクトでは、これらの解析に実験動物(マウス)モデルを用いて検討を行う。

② 研究実施方法:

活動 4-1: マウスモデル作製

活動 4-2: マウスモデルを用いた保菌状態の安定性とそれに及ぼす因子解析

活動 5-1: OJT による専門家育成

活動 5-2: 長期・短期研修の実施

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

当初計画したマウスから ESBL 産生大腸菌(マウス由来株)の分離を試みたが成功しなかった。そのため、既存ヒト由来 ESBL(CTX-M)産生大腸菌70株(性状の詳細が確定している)から感染モデル最適株の選定実験を開始。実験モデル作製の為の ESBL 産生大腸菌株が選定されれば動物モデル作製へと移行。

平成 25 年度

平成 25 年度までに目標としていた ESBL 産生大腸菌のマウス感染モデルの構築に成功した。さらに、セフェム系薬の濃度依存的投与によりマウスへの定着期間が長くなることを確認した。特に、抗生物質の持続投与がマウスへの耐性菌の定着を高めるだけでなく、高度耐性化(高い MIC 値)にも寄与することが明らかになった。次年度では各種抗菌剤投与による定着性への影響や多剤耐性化を検討する。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

2013年4月より長期研修生(大学院博士課程入学)を受入。

平成 25 年度

2013年4月からホーチミン公衆衛生医療院研究員 1 名を大阪府立大学大学院生命環境科学研究

科獣医学専攻博士課程に受入、また短期研修生 6 名の研修プログラムの一部を担当し(そのうちの1名は17日間獣医国際防疫学教室で研修を受け)技術移転に努めた。ハノイで開催されたPCR技術研修に専門員1名を派遣し、ベトナムでの技術移転にも参画した。

- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):
特記すべき事項は無い。

「大阪府立公衆衛生研究所」グループ

- ① 研究のねらい:

畜水産分野における抗菌剤の濫用によって選択される薬剤耐性菌が、食品を介してヒトに伝播する可能性が指摘されており、食の安全の観点からも食材ならびにその流通過程における薬剤耐性菌の調査研究は極めて重要。大阪府立公衆衛生研究所は、食に関連する検査を業務としており、食材流通過程における耐性菌ならびに残留抗菌剤のモニタリングに精通している。本プロジェクトでは、ベトナムでの食材ならびにその流通過程における衛生上重要な細菌の耐性化ならびに残留抗菌剤の検出とそれに係るモニタリングシステムの構築を行う。

- ② 研究実施方法:

活動 1-1: 食材流通過程における耐性菌の微生物学的解析

活動 3-1: モニタリングマニュアルの作成と実効性の検証

活動 5-1: OJT による専門家の育成

活動 5-2: 短期研修(食品検査一般に関する研修)

- ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

当初計画に沿って卸売市場ならびに市中の小売店からの食品検体の収集とその解析を実施。一部食材から薬剤耐性菌が検出された。全体として計画通りとなっているが、分離菌株の詳細な解析が、プロジェクト承認が下りていないため、MTA が締結されておらず、菌株の日本での解析が行われていない。

平成 25 年度

プロジェクト2年目は、初年度にベトナム側との協働で設定された食品検体収集地区(南部ホーチミン地区、紅河デルタ地区)対象家畜処理場、市場ならびに小売店から5次にわたり微生物ならびに薬学(理化学)用検体の収集を行いその解析を実施した。食材中の耐性菌汚染状況ならびに残留抗菌剤の検出状況が明らかとなり(成果の一部は学会発表した)、相互関係ならびに継時的解析、さらには高次解析が今後の課題となる。全体として当初計画に沿った進捗状況である。2014年1月にプロジェクト承認が下りたため、MTA を一部研究機関(ホーチミン公衆衛生医療院)と締結した。次年度における菌株の日本での高次解析が予定されている。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

短期研修生 8 名を受入、食品検査に係る技術研修を実施。

平成 25 年度

短期研修生5名を受入、食品検査に係る技術研修を実施。

- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):
特記すべき事項は無い。

「琉球大学」グループ

- ① 琉球大学保健学研究科平井研究室は、病原細菌の表現型ならびに遺伝子型解析に関する優れた研究実績を有している。平井教授は、本研究プロジェクトにおいて平成 24 年度まで大阪大学で主要な研究分担者として、また、微生物 WG のリーダーとして活動しており、下記活動を引き続き分担する。(平成 25 年度より参加)
- ② 研究実施方法:
 - 活動 1-1:住民からの耐性菌分離とその微生物学的、遺伝子学的解析
 - 活動 1-2:地域における耐性菌分布、抗菌剤消費に関する多面的解析
 - 活動 2-1:臨床分離株の微生物学的、遺伝子学的解析
 - 活動 5-1:OJT による専門家の育成
- ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

当初計画に沿って、北部首都ハノイ地区、中部海岸地区、紅河デルタ地区におけるヒト由来検体収集とその一次解析を実施し、当該地域における住民の高い ESBL 産生大腸菌保菌を明らかにした。また、ハノイ地区住民の家族単位での耐性菌伝播に係る解析を実施し、その関連性の解明に当たった。国内におけるプロジェクト支援に係る基礎研究も順調に進展し、耐性遺伝子解析に関する成果の一部を論文投稿した。全体計画における進捗状況は当初予定通り進んだ。
- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

ハノイ国立栄養院における PCR 技術研修(17 名受講)を実施した。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):

特記すべき事項は無い。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 3 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 3 件)
- ③ 詳細情報
 - Hirai, I., Miyagi, K., Yamamoto, Y. Frequent and diverse chromosomal locations of blaCTX-M-14 transposition unit in CTX-M-14 type extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, submitted.
 - Luvsansharav, U. O., Hirai, I., Niki, M., Nakata, A., Yoshinaga, A., Yamamoto, A., Yamamoto, M., Toyoshima, H., Kawakami, F., Matsuura, N., Yamamoto, Y. Fecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nursing homes in the Kinki region of Japan. *Infect Drug*, 6:67-70, 2013.
 - Hirai, I., Fukui, N., Taguchi, M., Yamauchi, K., Nakamura, T., Okano, S., Yamamoto, Y. Detection of chromosomal bla_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates from the Kinki region of Japan. *Int J Antimicrob Agents*, 42:500-506, 2013.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、海外 0 件、特許出願した発明数 0 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1)「大阪大学」グループ(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)

① 研究者グループリーダー名:山本 容正(大阪大学グローバルコラボレーションセンター・招へい教授)

② 研究項目:

1. ESBL 産生耐性細菌発生に関与する抗菌剤の使用ならびに残留実態の解明
2. 保菌者 ESBL 産生耐性菌の感染発症への関与の解明
3. 食材流通過程における抗菌剤・薬剤耐性菌モニタリングシステム
4. 薬剤耐性菌検査を含む食品安全管理における専門家の育成

(2)「大阪府立大学」グループ(薬剤耐性細菌保菌状態の安定性とそれに及ぼす因子解析研究)

① 研究者グループリーダー名: 山崎 伸二 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科感染症制御学領域・教授)

② 研究項目:

1. ESBL 耐性菌の保菌状態の安定性とそれに及ぼす因子解析 『国内のみ』
2. 薬剤耐性菌検査を含む食品安全管理における専門家の育成

(3)「大阪府立公衆衛生研究所」グループ(食品管理における耐性菌検出とそのモニタリングシステムの開発)

① 研究者グループリーダー名: 久米田 裕子 (大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌課・課長)

② 研究項目:

1. 食材流通過程における抗菌剤・薬剤耐性菌モニタリングシステム
2. 薬剤耐性菌検査を含む食品安全管理における専門家の育成

(4)「琉球大学」グループ(保菌者 ESBL 産生耐性菌の感染発症への関与の解明)

① 研究者グループリーダー名: 平井 到 (琉球大学医学部教授)

② 研究項目:

1. 住民からの耐性菌分離とその微生物学的、遺伝子学的解析
2. 臨床分離株の微生物学的、遺伝子学的解析
3. 薬剤耐性菌の解析に係る専門家の育成

以上