

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00571

研究課題名(和文) 渡り鳥飛来にともなう細菌群集の越境移動に関する環境微生物学的研究

研究課題名(英文) Dissemination of Intestinal Microbiota by Migratory Birds across Geographical Borders

研究代表者

見坂 武彦 (Kenzaka, Takehiko)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：80397661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の越境移動に関する現状の把握は、健康・衛生の観点から重要な課題である。地球上の種々の細菌が渡り鳥とともに国境を越えて移動している可能性があるがその実態は明らかではない。本研究では、渡り鳥の糞に含まれる細菌群集を培養に依存せずに高速シーケンサーを用いて明らかにし、潜在的な病原細菌が長距離移動する実態を検証した。関西地区および北海道東部の沿岸部において、ツバメ科、カモ科、カモメ科の渡り鳥を主な対象として、糞に含まれる腸内細菌群集の16S rRNA遺伝子の配列を網羅的に解析し、鳥の種類による相違、他の生物との相違を明らかにした。また糞に含まれる多剤耐性菌について遺伝学的特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Understanding the transboundary movement of microorganisms is a significant public health issue. It is possible that large amounts of various bacteria existing on the earth's surface are spreading across borders through migratory birds, but their identities and rates of migration have yet to be elucidated. In this study we employed next-generation sequencing technology targeting the 16S rRNA gene for comprehensive clarification of the sampled bacterial communities associated movement with migratory birds. We collected the fecal samples of swallow, Eurasian wigeon, and seagull in western Japan and the coastal areas of eastern Hokkaido. Our studies revealed the differences in gut microbiota among the avian and other host species. The genetic characteristics of multidrug resistant bacteria contained in fecal samples were also clarified.

研究分野：環境微生物学

キーワード：渡り鳥 腸内細菌 鳥 抗生物質耐性菌

1. 研究開始当初の背景

微生物の越境移動に関する現状の把握は、健康・衛生上、また生態系保全の観点から重要な課題の一つである。近年東アジア地域では、鳥インフルエンザによる鳥類の大量死が散発的に発生しており、その感染源として、渡り鳥の糞に含まれるウイルスが強く疑われている。2014年には南極のペンギンのインフルエンザウイルスが糞口感染によって渡り鳥に伝播し、数千キロメートル以上離れた大陸のウマに感染した可能性が高いことが発表されている。その一方で、細菌に関しては、高病原性鳥インフルエンザのように組織的かつ定期的なサーベイランスや監視体制は十分にはない。パスツレラ菌が原因となる鳥コレラは、北米や欧州など世界各地で散発的に発生しており、その媒介者として渡り鳥が関与している。またヒトの治療に使用する抗菌薬に対して抵抗性を示す耐性菌が渡り鳥とともに、長距離を移動することが報告されている。

2. 研究の目的

渡り鳥の糞に含まれる細菌群集およびその遺伝子を培養に依存しない新手法で明らかにし、潜在的な病原細菌が日本と外国間を長距離移動する実態を明らかにする。渡り鳥とともに移動する細菌群集がヒトの健康に与えるリスクについて検証する。

3. 研究の方法

2015～2017年に、大阪大谷大学キャンパス内、大阪府北部・南部、琵琶湖周辺、和歌山県北部等の関西地区および北海道東部の沿岸地域にて渡り鳥の糞を採取した。

(1) 細菌数：糞に含まれる細菌の現存量をSYBR Green Iを用いた蛍光染色法により測定した。

(2) 細菌群集：次世代シーケンシング法を用いて、細菌の16S rRNA遺伝子のV4領域の塩基配列を網羅的に解読し、データベース上の遺伝子情報との相同性検索した。試料ごとの類似度を比較するために、分類学上の綱および科レベルで主成分分析を行った。

(3) 抗生物質耐性菌：抗生物質耐性を示す細菌を分離し同定した。特徴的な細菌について全ゲノム配列を解析した。

(4) これらの因子について、渡り鳥の日本滞在中の腸内細菌叢の変化、同一種の個体間での腸内細菌叢の違い、複数種間での腸内細菌叢の違いを検証した。

4. 研究成果

(1) ツバメおよびヒドリガモの試料では、細菌数は約 10^8 cells/gであった。

(2) ツバメの細菌群集構造

親鳥とヒナ鳥の主要な科

大学キャンパス内、大阪北部、大阪南部、和歌山県北部にて、春季にツバメの巣の下か

ら糞を採集した。次世代シーケンシング法を用いて、ツバメの親鳥、ヒナ鳥の腸内細菌群集を巢別に科レベルで解析した。大学キャンパス内20号館の巣における親鳥の腸内細菌群集ではEnterobacteriaceae科が多く、ヒナ鳥ではEnterococcaceae科が大半を占めており、上位4つの科が大半を占めていた。大学キャンパス内17号館の巣の親鳥ではAlcaligenaceae科が多く、ヒナ鳥ではEnterobacteriaceae科が大半を占めた。先の20号館の巣の近くにあるものの、親鳥の腸内細菌群集が大きく異なることがわかった。17号館の2015年の親鳥ではEnterobacteriaceae科が多く含まれており、ヒナ鳥ではMycoplasmataceae科が約8割を占めていた。また、17号館では2015年と2016年で同じ巣で営巣されていたが、年が異なることにより親鳥の腸内細菌群集が大きく異なることがわかった。和歌山県北部の巣の親鳥ではPseudomonadacea、Enterobacteriaceae科が多く、ヒナ鳥ではEnterobacteriaceae科が多く含まれていた。

各地域で採取した全ての親鳥とヒナ鳥の試料を比較した結果、親鳥ではPseudomonadaceae科が多く含まれており、ヒナ鳥ではEnterococcaceae、Mycoplasmataceae科が多く含まれていた。全細菌に対する存在割合が5%以上を占める主要な属としては、*Pseudomonas* 属、*Escherichia/Shigella* 属、*Enterobacter* 属、*Yersinia* 属、*Mycoplasma* 属、*Enterococcus* 属、*Achromobacter* 属が挙げられ、いずれもヒトへの病原性が報告されている種を含むものであった。

親鳥とヒナ鳥の多様性指数の比較

シーケンス解析の結果から、各サンプルの採取地域別に多様性指数(Shannon index)を求め、親鳥とヒナ鳥を比較した。その結果、親鳥と比べ、ヒナ鳥の多様性指数が低いことがわかった。

巢別の親鳥とヒナ鳥の主成分分析

得られたシーケンス結果をもとに各サンプルを巢別に主成分分析を行った。その結果、親鳥の科レベルでの腸内細菌群集は経時的に大きく変化し、孵化直前には、ヒナ鳥の腸内細菌群集と類似することがわかった。

地域別の親鳥とヒナ鳥の主成分分析

地域ごとに親鳥、ヒナ鳥の腸内細菌を比較した結果、地域ごとに親鳥、ヒナ鳥の腸内細菌群集に特徴は無く、同じ地域でも腸内細菌群集が大きく異なることがわかった。

(3) ヒドリガモの細菌群集構造

琵琶湖周辺および大阪府北部の安威川周辺にて、冬季の初め～春季にヒドリガモの糞を採取した。冬季の初めはシベリア方面から日本に飛来して間もない時期であり、その腸内細菌群集は外国での食性に影響を受けていると推定される。また冬の間日本で過ごした後の春季の試料では、日本での食性により影響を受けていると推定される。

分類学上の網レベルでの腸内細菌の平均構成は、琵琶湖、安威川の試料ともに春季の試料では、Gammaproteobacteria 網が半数近くを占め、Bacilli 網、Clostridia 網を合わせた3つの網が大部分を占めた。これに対し冬季の試料では、Clostridia 網が有意に高く、Bacilli 網と Gammaproteobacteria 網が有意に低かった ($p < 0.05$)。春季では低かった Erysipelotrichi 網、Epsilonproteobacteria 網、Bacteroidia 網が有意に高く ($p < 0.05$)。春季と冬季の試料で大きな違いが見られた。主成分分析の結果でも、春季の琵琶湖および安威川の試料は類似しており、冬季試料とは明瞭に異なることがわかった。

全細菌に対する存在割合が5%以上を占める主要な属としては、春季の試料ではヒトに病原性を示す種を含む *Erwinia* 属、*Pseudomonas* 属、*Paenibacillus* 属、*Bacillus* 属が多く含まれていた。これに対して秋季の試料では *Megamonas* 属、*Oscillospira* 属、*Coprococcus* 属、*Bacteroides* 属が多く、優占する属が異なっていた。これら4つの属は、いずれも偏性嫌気性で人や動物の腸内に常在しており、多糖類や炭水化物を低分子に分解して宿主にエネルギー源を供給するのに役立っているとされている。

(4) 種々の鳥の腸内細菌群集の比較

ヒドリガモならびにツバメの腸内細菌群集と、データベースに登録されている既知の留鳥および哺乳類の腸内細菌群集との類似度を、主成分分析により比較した結果を図に示す。渡り鳥では食した餌が個体ごとに異なる可能性が高いため、家禽類に比べると個体差が大きいと考えられるが、ペンギン科などの生物(図の○)に比べるとヒドリガモ(▽)、ツバメ(○)の個々の腸内細菌は相対的に類似していた。特に哺乳類である豚、肉牛、乳牛とは大きく異なることがわかった。昆虫食・草食・雑食・肉食などの食性によって、それぞれの腸内細菌群集が形成されていくためと考えられる。

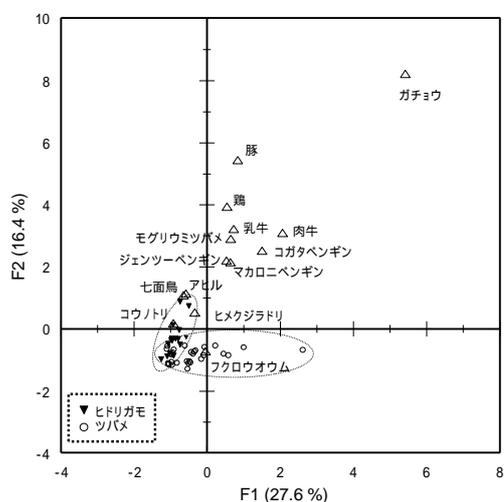


図 ツバメおよびヒドリガモと他の鳥類・動物の腸内細菌群集の類似度の比較。

(5) 抗生物質耐性菌

渡り鳥は、地球上の広範囲に抗生物質耐性菌を拡散させる可能性があることが知られている。本研究では、ツバメ、ヒドリガモ、セグロカモメの糞から以下の抗生物質耐性菌を分離し、次世代シーケンシング法を用いてそのゲノム配列の解析を行った。

Cellulosimicrobium sp.: ツバメの糞から、多剤耐性を示す *Cellulosimicrobium* sp. strain KWT-B を分離し、ゲノム配列を解読した。その結果、多剤排出ポンプ、多剤耐性輸送タンパク質、バンコマイシン耐性タンパク質、メタロベータラクタマーゼなど複数の耐性遺伝子を保有していることがわかり、これらが多剤耐性に関与していることが示唆された。

Serratia fonticola: ヒドリガモの糞から、基質拡張型 β -ラクタマーゼを産生する *Serratia fonticola* を分離し、ゲノム配列を解読した。その結果、クラスA、クラスCの β -ラクタマーゼ、多剤排出ポンプ、多剤耐性輸送タンパク質など複数の耐性遺伝子を保有していることがわかり、これらが多剤耐性に関与していることが示唆された。

Pseudomonas fluorescens: ヒドリガモの糞から、カルバペネム系抗菌薬に対して耐性を示す日和見感染菌 *Pseudomonas fluorescens* を分離し、ゲノム配列を解読した。その結果、メタロベータラクタマーゼ、クラスCの β -ラクタマーゼ、多剤排出ポンプ、多剤耐性輸送タンパク質など複数の耐性遺伝子を保有していることがわかり、これらが多剤耐性に関与していることが示唆された。

Stenotrophomonas pavanii: *Stenotrophomonas pavanii* はこれまで窒素固定細菌として植物から分離されているが、その生態や病原性はほとんど未知である。本研究ではヒドリガモの糞から、多剤耐性を示す *Stenotrophomonas pavanii* を分離し、ゲノム配列を解読した。その結果、クラスAの β -ラクタマーゼ、メタロベータラクタマーゼ、多剤排出ポンプの薬剤耐性遺伝子の他、溶血毒やシデロフォア、型および型分泌装置など他の日和見感染する *Stenotrophomonas* 属細菌がもつ病原因子を保有していることがわかり、ヒトに病原性を示す可能性が示された。

Escherichia coli: セグロカモメの糞から、コリスチンに対して MIC 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の耐性を示す *Escherichia coli* を分離し、ゲノム配列を解読した。コリスチンの作用点であるリポドAを修飾する耐性遺伝子 *mcr-1* を保有していることがわかった。これまでに *mcr-1* を有する大腸菌が人、豚、豚肉及び鶏肉で確認されており、今回新たに渡り鳥から見つかったことで、*mcr-1* 遺伝子が渡り鳥を介して広い範囲に拡散している可能性が考えられた。

(6) まとめ

渡り鳥の糞にはヒトへの病原性が報告さ

れている種を含む属が含まれていた。16S rRNA 遺伝子の一部を解析したため、病原性については他の遺伝子を今後調べる必要がある。本研究により細菌群集の全体像を把握することができたことから、今後は個々の属種に絞ることで、その病原性を含めたより詳細な研究につながると期待される。またカルバペネム系やペプチド系抗生物質に耐性を示す細菌の種類、ならびに耐性に関わる遺伝子について明らかにすることができ、これらが渡り鳥と共に長距離移動している可能性が示された。今後耐性菌の生残性や遺伝子の伝播に関する研究が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Takehiko Kenzaka, Madoka Yasui, Takashi Baba, Masao Nasu, Katsuji Tani, Positive Selection in F-Box Domain (lpp0233) Encoded in *Legionella pneumophila* Strains, *Biocontrol Science*, 査読有、23 巻、2018、in press.

Takehiko Kenzaka, Katsuji Tani, Draft Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas pavanii* BWK1, Isolated from *Mareca penelope* Feces, *Genome Announcements*, 査読有、6 巻、2018、e00187-18、DOI: 10.1128/genomeA.00187-18

Takehiko Kenzaka, Katsuji Tani, Draft Genome Sequence of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas fluorescens* Strain BWKM6, Isolated from Feces of *Mareca penelope*, *Genome Announcements*, 査読有、6 巻、2018、e00186-18、DOI: 10.1128/genomeA.00186-18

見坂 武彦, 藤光 隆司, 片岡 憲司, 谷 佳津治, 琵琶湖周辺に飛来するヒドリガモの腸内細菌の群集構造解析, *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 査読有、46 巻、2018、101-104

見坂 武彦, 片岡 憲司, 藤光 隆司, 谷 佳津治, 大阪周辺に飛来するツバメの腸内細菌の群集構造解析, *Yakugaku Zasshi*, 査読有、138 巻、2018、117-122
DOI:10.1248/yakushi.17-00148

見坂武彦, 渡り鳥を介したマイクロバイオームの長距離移動, *アグリバイオ*, 査読無、2 巻、2018、66-71

見坂武彦, 冬鳥の腸内細菌の公衆衛生学的意義, 月刊「細胞」, 査読無、49 巻、2017、734-737

見坂武彦, 渡り鳥とともに長距離移動する細菌群集, 月刊「細胞」, 査読無、49 巻、2017、563-567

Takehiko Kenzaka, Katsuji Tani, Draft Genome Sequence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Serratia fonticola* BWK15 Isolated from Feces of *Anas penelope*, *Genome Announcements*, 査読有、5 巻、2017、e01102-17、DOI: 10.1128/genomeA.01102-17

Takehiko Kenzaka, Ishimoto Yuina, Katsuji Tani, Draft Genome Sequence of Multidrug-Resistant *Cellulosimicrobium* sp. Strain KWT-B, Isolated from Feces of *Hirundo rustica*, *Genome Announcements*, 査読有、5 巻、2017、e00641-17、DOI: 10.1128/genomeA.00641-17

〔学会発表〕(計 6 件)

見坂 武彦他, 琵琶湖周辺に飛来するヒドリガモの腸内細菌の群集, 日本鳥学会 2017 年度大会、2017

Takehiko Kenzaka et al., Intestinal microbiota in migrating barn swallows in western Japan, *ASM Microbe* 2017、2017

見坂武彦他, ツバメ腸内細菌の群集構造解析, 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2016

見坂武彦他, ヒドリガモ腸内細菌の群集構造解析, 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2016

Takehiko Kenzaka et al., High frequency of mutator strains induced by phage ghost attachment. 6th Congress of European Microbiologists FEMS 2015、2015

見坂武彦他, アメーバ寄生に伴う寄生細菌のゲノム変異, 第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2015

〔図書〕(計 1 件)

Takehiko Kenzaka, Katsuji Tani, Public Health Implications of Intestinal Microbiota in Migratory Birds, *Metagenomics for Gut Microbes*. Ranjith Kumavath, IntechOpen, 2018、35-51.
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72456>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

見坂 武彦 (KENZAKA, Takehiko)
大阪大谷大学・薬学部・准教授
研究者番号：80397661

(2) 連携研究者

谷 佳津治 (TANI, Katsuji)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号：50217113

内井 喜美子 (UCHII, Kimiko)
大阪大谷大学・薬学部・助教
研究者番号：90469619

(3) 研究協力者

片岡 憲司 (KATAOKA, Kenji)

藤光 隆司 (FUJIMITSU, Takashi)

石本唯奈 (ISHIMOTO, Yuina)

細見峻司 (HOSOMI, Shunji)