

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H04073

研究課題名(和文) ゲノム解析と数理解析を用いた動物の社会生活による薬剤耐性菌の環境汚染の解析

研究課題名(英文) Estimation of the environmental pollution with antimicrobial-resistant bacteria by human activities using genomic and mathematics analyses

研究代表者

浅井 鉄夫 (Asai, Tetsuo)

岐阜大学・大学院連合獣医学研究科・教授

研究者番号：10509764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人類から放出された薬剤耐性菌の伝播様式を解明し、環境中での薬剤耐性菌の拡散を制御し、環境に由来する薬剤耐性菌の人類への影響を低減することを目的に実施した。2013～2017年の野生動物由来保存株963株および2018～2021年に収集した野生動物由来894株における薬剤耐性菌の割合は低率で、年次変動は認められなかった。次に、野生動物が保有する薬剤耐性菌は捕獲地の地理情報解析により人の居住エリアとの関連性を示唆した。また、薬剤耐性菌の由来動物を推定するため、環境水中の環境DNA解析により畜産由来の可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人医療や動物医療分野での薬剤耐性モニタリングが実施されてきたが、国内の野生動物を対象に、統一した手法で薬剤耐性の発現状況を提供し、今後のモニタリングの方向性を示した。また、古典的な微生物学的手法(薬剤耐性菌の分離)と生態情報を利用した数理解析および環境DNA解析を融合することで自然環境における薬剤耐性菌の伝播・拡散様式の一端を明らかにした。本研究により、人間活動からの薬剤耐性菌の環境中での拡散を制御する必要があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the mode of transmission of antimicrobial-resistant bacteria released from human activities, control the spread of antimicrobial-resistant bacteria in the environment, and reduce the effects of environment-derived antimicrobial-resistant bacteria on humans. The prevalence of antimicrobial resistance in 963 wildlife-derived stocked strains from 2013 to 2017 and 894 wildlife-derived strains collected from 2018 to 2021 was low, and no change in proportion was observed. Next, we analyzed the geographic information of the captured sites of wild animals carrying antimicrobial-resistant bacteria, suggesting their relevance to human social activities. And animals of origin of antimicrobial-resistant bacteria were estimated by environmental DNA analysis in environmental water, suggesting that they may be derived from livestock.

研究分野：獣医学

キーワード：薬剤耐性 野生動物 環境DNA解析 地理情報解析 セファロスポリン耐性 キノロン耐性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年に世界保健機構(WHO)が示した薬剤耐性に関するグローバルアクションプランに基づき、2016年にわが国の「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン(2016-2020)」が策定された。その中で、One Health 理念を中心とした、ヒト、ペット、食品、畜水産、農業、野生動物を含む環境分野における薬剤耐性の実態を把握することが求められている。我が国では、ヒトと畜産分野の薬剤耐性菌の情報が蓄積され、2020年までに食品、ペットと水産分野における動向を監視することが計画されている。しかし、野生動物を含む環境分野における薬剤耐性の監視体制の構築には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、人類から放出された薬剤耐性菌の伝播様式を解明し、環境中での薬剤耐性菌の拡散を制御し、環境に由来する薬剤耐性菌の人類への影響を低減することを目的とする。本研究では、古典的な微生物学的手法(薬剤耐性菌の分離)と生態情報を利用した数理解析および環境DNA解析を融合することで自然環境における薬剤耐性菌の伝播・拡散様式を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1)野生動物における薬剤耐性菌の3拠点の調査

日本の北部(北海道~東北地方)、中央部(中部~近畿地方)および南部(九州地方)に生息する野生の哺乳類や鳥類などを対象に腸内細菌における薬剤耐性菌の地域的な実態を検討した。薬剤感受性試験は、国際的に標準化された微量液体希釈法で対象薬剤を統一して実施した。野生動物由来株は、狩猟、有害駆除および学術利用を目的に捕獲した動物から腸内容物を採取し、常法により細菌分離を実施した。これまで各研究機関で収集した野生動物由来菌についても薬剤感受性を調べ、年次推移についても検討した。

#### (2)環境汚染に関する人間活動の影響の解明

野生動物の捕獲箇所周辺の地理情報を利用して、(1)で得られた動物種別および耐性薬剤別に薬剤耐性菌の分布状況に与える人間活動の影響を解析した。地理情報は公表されている統計情報を利用した。研究開始時に5kmメッシュを利用することを考えていたが、調査薬剤に対する耐性大腸菌を保有する個体が少なかったため、捕獲地と人間活動の指標との距離を用いて解析した。

#### (3)環境中の薬剤耐性菌の循環様式の解明

捕獲地域の環境に生息する動物種の特定:薬剤耐性菌が分離された河川や河岸の水や土壌中の環境DNA解析により、薬剤耐性菌の汚染源および伝播者となる野生動物種を検討した。環境DNA解析で検出された動物種と薬剤耐性菌の保有する耐性遺伝子との関係を解析して、薬剤耐性菌の汚染もしくは保持に関係する動物種を推定した。当初、イノシシを想定し沼田場の土壌採材を想定したが、豚熱(家畜伝染病)のイノシシ感染が確認されたことにより、生息地への採材が困難になったため、河岸土壌へサンプルを変更した。

### 4. 研究成果

#### (1)野生動物における薬剤耐性菌の3拠点の調査

2013~2017年に日本各地で分離した野生哺乳類由来大腸菌の保存株(963株)および2018~2021年に野生哺乳類と鳥類から新たに分離した1278株における薬剤耐性菌の分布は低率で、過去の調査と類似するものであった。このことは、野生動物が抗菌薬に暴露する機会が少ないことと関連していると推察される。しかし、抗菌薬を含有する選択培地を用いた調査で、一部の野生動物からESBL産生菌等の第3世代セファロスポリン耐性やフルオロキノロン耐性菌を保有することが明らかとなり、人間の社会活動から放出された薬剤耐性菌の汚染が進行していることがうかがわれた。本研究で実施した野生動物由来株の薬剤感受性に関する成績は厚生労働省「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書2020および2021」に記載された。

#### 野生動物由来大腸菌保存株の薬剤感受性

2013~2017年に国内で野生哺乳類475頭から分離した大腸菌963株(シカ242頭525株、イノシシ112頭224株、小型哺乳類(ドブネズミ、クマネズミ、アカネズミ、ヒミズなど)113頭199株、アナグマ4頭10株、野生ウシ(トカラウシ)2頭3株、アマミノクロウサギ2頭2株)の薬剤感受性試験を実施した。シカとイノシシ由来株で8薬剤、小型哺乳類由来株で10薬剤に耐性を示した。シカ由来株では耐性菌が5.9%に認められ、テトラサイクリン(TET、4.4%)耐性が最も高く、コリスチン(CST、1.5%)、アンピシリン(AMP、0.8%)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(SXT、0.8%)の順であった。イノシシ由来株では8.0%に耐性が認められ、TET(4.0%)、AMP(3.6%)、クロラムフェニコール(CHL、1.8%)の順であった。小型哺乳類由来株では18.1%が耐性株で、AMPとTET(共に12.6%)で最も多く、SXT(11.6%)耐性が続いた。特に、小型哺乳類では、家畜関連施設由来株で10薬剤に対する耐性が認められ、

AMP、SXT、TET および ナリジクス酸(NAL)耐性が 10%以上に認められたが、都市部由来株では、2 薬剤 (TET と SXT) に対する耐性のみで、山間部由来株では調べた 12 薬剤に対する耐性は認められなかった。

#### 野生動物由来大腸菌分離株の薬剤感受性

2018～2021 年に収集した野生哺乳類 14 種 502 頭 (シカ 323 頭、ニホンザル 63 頭、ヌートリア 43 頭、ハクビシン 22 頭、イノシシ 18 頭 他 10 頭未満 9 種) 中 13 種 306 頭から大腸菌 886 株を分離した。また、野生鳥類 7 種 340 羽 (カワウ 223 羽、マガン 110 羽、他 5 種 7 羽) 中 5 種 167 羽から大腸菌 392 株を分離した。分離株の薬剤感受性を調べた結果、調査した薬剤に対する耐性は、哺乳類 13 種中 7 種 27 頭 (7.5%) 由来 42 株 (4.7%) および鳥類 7 種中 2 種 17 羽 (10.2%) 由来 21 株 (5.4%) に認められた。動物別では、シカ由来株では耐性菌が 4.5%、ニホンザル由来株で 12.8%に認められ、また、カワウ由来株で 8.6%、マガン由来株で 0.7%に認められた。薬剤別では、TET に対する耐性は 2.8%で最も高く、AMP 耐性 (1.7%)、CST 耐性 (1.0%) の順で、セファゾリン(CFZ)、カナマイシン(KAN)、NAL、シプロフロキサシン(CIP)、CHL および SXT に対する耐性割合は 1%未満であった。セフォタキシム(CTX)、メロペネム(MEM)、ゲンタマイシン(GEN)に対する耐性は認められなかった。

2018～2021 年に収集した野生哺乳類 14 種 422 頭 (シカは 323 頭中 243 頭のみ対象とした) の糞便から、セファロスポリン (CFZ、セファレキシン、または CTX) 含有 DHL 培地およびキノロン剤 (NAL) を用いて薬剤耐性大腸菌を分離した。第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌は、6 頭から分離された。内訳は、ニホンジカ 243 頭中 2 頭(0.8%)、キツネ 4 頭中 2 頭(50%)、アライグマ 2 頭中 1 頭(50%)、およびアナグマ 6 頭中 1 頭(16.7%)であった。5 頭から分離された大腸菌は CTX 型 ESBL (CTX-M-1, 27(2), 55(2))、キツネ 1 頭から分離された大腸菌は CMY-2 を産生した。一方、NAL 耐性大腸菌はシカ (10/243, 4.1%)、ニホンザル (6/63, 9.5%)、ハクビシン (2/22, 9.1%)、タヌキ (1/8, 12.5%)、キツネ (2/4, 50%)、アライグマ (1/2, 50%) から分離され、一部は CIP 耐性を示した。

#### 日本の北部の野生動物における薬剤耐性菌の調査

鳥類は広い範囲を移動し、中には国境を越えて群れで移動するものもあり、薬剤耐性菌を運んでいる可能性がある。渡り鳥の一種であるマガンは、毎年春と秋に北海道 (宮島沼) に飛来する。渡り鳥とその周辺環境における薬剤耐性菌の分布状況を明らかにするため、2019 年の春と秋に宮島沼でマガンの糞便 110 検体と宮島沼の水 18 検体を採取した。大腸菌は、抗菌薬 (CFZ、NAL) 添加または無添加の選択培地を用いて分離した。大腸菌は、抗菌薬無添加の培地からマガン糞便 56 検体 (51%) と水 5 検体 (28%) から分離され、抗菌薬添加培地からは、分離されなかった。マガンの糞便から分離された 1 株が  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬 (AMP および CFZ) に耐性を示したが、その他の分離株は試験したすべての抗菌薬に対して感受性を示した。また、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬耐性の 1 株は薬剤耐性遺伝子 *bla<sub>ACC</sub>* を保有しており、水平伝達により他の細菌へ耐性を付与する可能性が示された。以上の結果から、野生の渡り鳥およびその生活環境に分布する細菌の薬剤耐性率は低い、伝達可能な薬剤耐性遺伝子を保有した薬剤耐性菌を保有していることがあり、薬剤耐性を拡大させる可能性があることが示された。

今回、食肉処理施設において処理される野生シカを対象として、野生シカの糞便から大腸菌を分離し、性状解析を実施することで、野生動物における薬剤耐性モニタリングを試行した。2020～2021 年の春夏秋冬の 4 回、1 回あたり 20 検体 (合計 80 検体) のシカ糞便から大腸菌を分離し、薬剤感受性試験を実施した。73 検体から 106 株の大腸菌が分離された。AMP、CFZ、CHL に対して耐性を示す株が 1 株 (1%) 存在したが、その他の株は、試験したすべての薬剤に対して感受性を示した。また、最小発育阻止濃度の分布に季節性はなかった。以上より、野生動物の薬剤耐性モニタリングは、食肉処理施設を対象とすることで実施可能である。

#### 日本の中央部の野生動物における薬剤耐性菌の調査

大学内で捕獲したイタチから ESBL 産生大腸菌が分離されたことから、学内飼育動物における ESBL 産生大腸菌の分布を明らかにした。イタチ由来株と同じ ESBL (CTX-M-14) 産生大腸菌がイヌと肉用牛から分離されたことから、イタチと飼育動物間の耐性菌および耐性因子の伝播を明らかにするため、CTX-M-14 産生株のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) 解析、プラスミドの遺伝子解析を行った。CTX-M-14 産生株は飼育施設ごと一種類もしくは 2 種類の PFGE 型を示し、施設間では異なっていた。プラスミドの replicon 型は全て Inc11 で、CTX-M-14 以外の耐性遺伝子を保有しなかった。塩基配列を比較すると、2 領域に違いが認められたのみで、プラスミド伝播が学内飼育動物における ESBL 産生菌の蔓延に関与することが示唆された。

2016～2018 年に岐阜大学と岐阜公園で採取した昆虫 88 検体中 61 検体から分離した腸内細菌科細菌 168 株を用いて薬剤感受性を調べた結果、CST 耐性 (31 株) と KAN 耐性 (1 株) 以外に耐性菌は認められなかった。CST 耐性株にプラスミド性 CST 耐性遺伝子 (*mcr-1* ~ 10) 保有株は認められなかった。また、KAN 耐性を示した *Klebsiella oxytoca* は、MLST 型 ST344 で外来性カナマイシン耐性遺伝子 (*aph(3')*-Ia) を染色体上に保有していた。以上から、薬剤耐性菌の伝播に関して昆虫の役割は小さいことが示唆された。

2018～2019 年に群馬、岐阜、滋賀および大分で収集したカワウの糞便から分離した *Aeromonas*

属菌 198 株と *Escherichia* 属菌 194 株の薬剤感受性試験の結果、*Aeromonas* 属菌では CST 耐性 (8.6%)と NAL 耐性 (4%)、*Escherichia* 属菌では CST 耐性 (3.1%)と AMP 耐性(2.6%)と TET 耐性 (2.1%)が 2%以上で認められた。CST 耐性 *Aeromonas* 属菌 16 株のうち、6 株がコリスチン耐性遺伝子(*mcr-3*)を保有していた。その他、TET 耐性遺伝子は、*tet(E)*が *Aeromonas* 属菌、*tet(A)*が *Escherichia* 属菌で認められた。以上から、カワウ由来細菌が低率ではあるが外来性耐性遺伝子が関与する薬剤耐性を保有し、生息環境の汚染状況を反映することが推察された。

2018 年に奈良公園のニホンジカから抗菌薬 (NAL) 含有培地でキノロン耐性大腸菌を分離し、PFGE を用いて解析した。複数の個体が保有するキノロン耐性大腸菌において PFGE 型が同一のものが認められ、4 系統のキノロン耐性大腸菌が奈良公園内のニホンジカに拡散していることが示唆された。次に、奈良公園で 2019 年 4 月と 11 月、2020 年 1 月と 7 月におけるキノロン耐性大腸菌を抗菌薬(NAL)含有培地で調査した。キノロン耐性大腸菌の検出率には変動が認められ、保有率は 2019 年 4 月と 2020 年 7 月は 3% (1/40) ,11 月は 35% (14/40)であった。分離された NAL 耐性株数は 4 月と 7 月は 3 株ずつ、11 月は 32 株であり、そのうち CIP 耐性を示した株数は 4 月に 3 株、7 月は 1 株、11 月は 10 株であった。また、キノロン系耐性以外の耐性薬剤は、TET、KAN-TET、AMP-CFZ、AMP-TET、AMP-GEN-TET-SXT が確認された。以上、キノロン耐性大腸菌はシカ間伝播を起こす一方、シカ間から消失することから、シカでの定着期間は限定的である可能性も示唆された。

日本の南部の野生動物における薬剤耐性菌の調査  
野生動物が腸内に保有する薬剤耐性大腸菌を調査した。2014 年から 2021 年にかけて主に鹿児島・山口県で糞便サンプルを採集した。シカ、イノシシ、一部のアナグマは食用に解体される個体から、その他の野生動物 (アナグマ、ウサギ、ウマ、イタチ、アマミノクロウサギ、ウシ、ヤギ、ネズミ、クマ、タヌキ、ヌートリア)は新鮮糞便、ロードキルあるいは有害鳥獣駆除により捕獲され廃棄される個体から採材した。大腸菌は宿主域が広いのでいづれの動物種からも同等に分離できると予想したが、実際には大腸菌の分離率は異なり動物種により腸内細菌叢が異なると考えられた (表 1)。薬剤耐性菌は、シカ、イノシシ、アナグマからは調査期間中をとおして検出され、単剤耐性だけでなく多剤耐性 (2~3 薬剤耐性) もあり、シカでは 7 剤耐性も検出された。しかし、耐性菌保有率は、家畜に比べると低率であった。

2016 年に採材したアマミノクロウサギとウシ由来の耐性菌は単剤耐性のみであった。アマミノクロウサギは 2017 年と 2020 年に合計 150 個体相当を調査したが、耐性菌は得られなかった。これらの動物は野生動物保護地域に生息しており、地元住民の生活環境から離れていることが関係しているかもしれない。両地とも豊かな自然環境を楽しむ目的で観光客が訪れるため、人流による耐性菌の伝播モニタリングの対象として有用とも考えられる。

その他の動物種からは、薬剤耐性菌は得られなかったが、採材数が少なかったことや大腸菌の分離率が低かったことなどから、これらの動物種については検査方法の検討が必要である。

興味深いことに、特定の地域と動物において、薬剤耐性菌が検出される年度とされない年度があった。調査方法については変更せずに実施しているため、薬剤耐性菌が野生動物腸内あるいは環境中に滞在する期間が限定的である可能性が示された。同一個体から継続的に材料を採集することができれば検証できる可能性があるため、行動域調査に参画している野生動物を利用するなど、今後の研究課題として検討したい。

表 1 各種野生動物からの大腸菌分離状況

動物種	採材場所	大腸菌分離
シカ	山口県	+
	鹿児島県 北部	+
	鹿児島県 屋久島	+
イノシシ	山口県	+
	鹿児島県 本土全域	+
	栃木県 北部	+
アナグマ	鹿児島県 北部	+
	山口県	+
サル	鹿児島県 本土の大隈半島より	+
ヌートリア	山口県	-、*
タヌキ	鹿児島県 本土	+
ウシ	鹿児島県 トカラ列島	+
ヤギ	鹿児島県 トカラ列島、奄美大島	(+)**
ネズミ	鹿児島県 トカラ列島	+
アマミノクロウサギ	鹿児島県 奄美大島	+
ウマ	宮崎県	(+)**
イタチ	宮崎県	
クマ	秋田県	+

\*他の動物種と同じ方法では分離されなかった。

\*\*大腸菌は分離されたが、本調査では薬剤感受性試験はできなかった。

## (2)環境汚染に関する人間活動の影響の解明

環境中の薬剤耐性菌は医療や獣医療分野で使用する抗菌性物質によって出現・増加するため、人、ペットおよび家畜から様々な経路で放出されると予想される。そこで、野生動物が薬剤耐性菌を保有する状況について、野生動物の捕獲箇所周辺の地理情報との関係について解析した。解析には野生動物 (ニホンジカ 108 頭、ハクビシン 20 頭、イノシシ 15 頭、タヌキ 6 頭、シベリアイタチ 5 頭、ヒメネズミ 5 頭、アカネズミ 4 頭、キツネ 4 頭、アナグマ 3 頭、ニホンザル 3 頭、ネコ 2 頭、アライグマ 1 頭、テン 1 頭、合計 177 頭)の捕獲地の位置情報、耐性菌の有無、地理情報として環境省自然環境局生物多様性センターより取得した植生調査 (第 6-7 回) データおよび国土交通省国土数値情報より取得した河川データを用いた。解析は QGIS 3.10.13 および R version 4.0.3 で行った。まず、ヒトの活動エリアとして植生データ大区分のうちの「市街地等」<sub>1</sub>、「耕作地」<sub>1</sub>、「竹林」<sub>1</sub>、「牧草地・ゴルフ場・芝地」を、土地利用データのうちの「都市地域」および「農業地域」<sub>1</sub>、水域データのうちの「河川」をそれぞれ抽出し、さらにヒトの活動範囲として「市街地等」<sub>1</sub>、「耕作地」<sub>1</sub>、「竹林」<sub>1</sub>、「牧草地・ゴルフ場・芝地」を統合した「Human Activity」を設定した。解析方法として、各動物の捕獲地点と各エリアとの最近接距離を算出し耐性菌の有無との



相関について、一般化線形モデルを用いた単回帰分析を行った。ニホンジカ 18 頭、ハクビシン 3 頭、イノシシ 2 頭、ニホンザル 2 頭、キツネ 2 頭、タヌキ 1 頭、アナグマ 1 頭、アライグマ 1 頭、合計 177 頭中 30 頭から何らかの薬剤に対する耐性を持つ大腸菌が分離され、うち 11 頭からは NAL 耐性菌が分離された。耐性菌を保有する個体の捕獲地点（図 1）と各活動範囲との距離に有意な相関が認められなかったものの、NAL 耐性大腸菌については耐性菌を保有する個体は保有しない個体 비해「都市地域」および「牧草地・ゴルフ場・芝地」までの距離が有意に短いことが示された ( $p=0.0017$  および  $p=0.049$ )。「牧草地・ゴルフ場・芝地」については「牧草地」と「ゴルフ場・芝地」に分割した上で解析した結果、NAL 耐性大腸菌を保有する個体は保有しない個体 비해「牧草地」までの距離が有意に短いことが示された ( $p=0.0031$ )。牧草地にはニホンジカをはじめとして様々な野生動物が侵入することが報告されており、都市地域においても様々な野生動物の確認が報告されている。今後、これらの地域を中心に野生動物が耐性菌を獲得する可能性とヒトや愛玩動物、畜産動物などから環境が耐性菌で汚染される要因をより詳細に検討していく必要がある。

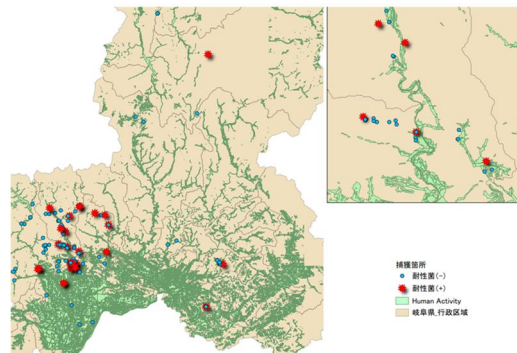


図 1 薬剤耐性菌を保有する野生動物の捕獲地

### (3) 環境中の薬剤耐性菌の循環様式の解明

自然環境において薬剤耐性菌が広範囲に拡散するには運搬者が必要となる。陸上では自由生活する野生動物や鳥類の他、水系では河川水やそこに生息する魚類が運搬者となりうる。野生動物における薬剤耐性菌の保菌状況を探るには、動物の直接採捕など労力が伴う。本研究では、水や土などの環境 DNA 分析と薬剤耐性菌の分離同定実験によって、保菌動物を推定する手法の確立を試みた。

まず、岐阜県を流れる河川を対象として、1 箇所の定点で月に 1 回の採水調査を行い、水サンプルから脊椎動物の環境 DNA を検出するとともに、ESBL 産生菌の分離を行った。その結果、哺乳類 16 種、魚類 43 種、鳥類 3 種、そして爬虫類 2 種の計 64 種の DNA が検出された。一方、薬剤耐性菌の分離実験では 3 種の菌種が特定され、ヒト、ペットまたは家畜由来の CTX-M 遺伝子型を有することが明らかとなった。これら 3 種と各検出種とのパーミュテーションテストを実行したピアソンの相関係数の結果により、各種耐性菌はニワトリ、ハタネズミ、カムルチー、アカザと有意な正の相関関係にあることが示された。ニワトリの DNA 検出と耐性菌の検出の間の相関については、調査地の河川上流に養鶏場があるため、その廃水中に耐性菌が含まれている可能性が考えられる。他の 3 種については、現時点ではその要因を特定することは困難であるが、本研究の結果から耐性菌と何らかの関連がある可能性があり、今後さらなる調査が必要となるだろう。

次に、琵琶湖全周の 21 地点で季節ごとに計 4 回の調査を実施し、採水に加えて、採水地点付近の陸上土壌の採集を行った。これらのサンプルから脊椎動物の DNA 検出および薬剤耐性遺伝子の検出を行うとともに、水サンプルについては ESBL 産生菌の分離を行った。環境 DNA 分析により、16 種の哺乳類と 26 種の鳥類の DNA が検出された。耐性遺伝子の環境 DNA 分析では CTX-M-1 型が計 11 地点から、CTX-M-2 型が計 5 地点から、CTX-M-9 型が計 16 地点から検出された。耐性菌の分離実験の結果、肺炎桿菌など 5 種の細菌から、7 つの薬剤耐性遺伝子が検出された。環境 DNA から検出された薬剤耐性遺伝子と生息種との共起分析の結果、CTX-M-1 型についてはマガモ属、パンの間に、CTX-M-9 型についてはヒドリガモ属、キンクロハジロ、オオパンとの間にそれぞれ正の共起がみられた。また、生息種と細菌の分離実験から検出された薬剤耐性遺伝子との共起分析の結果、肺炎桿菌の TEM 型および SHV 型とマガモ属の間に、肺炎桿菌の CTX-M-9 型とセキレイ属の間にそれぞれ正の共起がみられた（図 2）。これらのことは、カモ類などの鳥類が耐性菌のベクターとなっている可能性を示唆する。

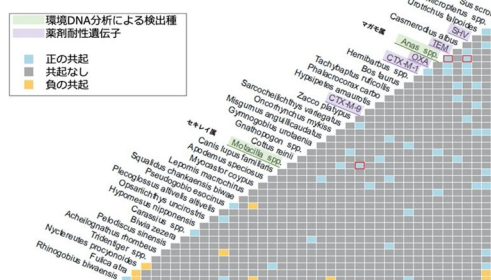


図 2 生息種と肺炎桿菌から検出された薬剤耐性遺伝子の共起分析の結果。肺炎桿菌の TEM 型および SHV 型とマガモ属の間に、肺炎桿菌の CTX-M-9 型とセキレイ属の間にそれぞれ正の共起がみられた

これらの結果、脊椎動物の環境 DNA 分析と薬剤耐性菌の分離実験あるいは環境 DNA 分析による耐性遺伝子の検出実験を組み合わせることで、耐性菌を保有する動物をラフに推定できることが明らかになった。今後はこのような技術によって推定した結果の検証が求められる。

最後に、本研究を実施するにあたり、科学研究費を交付いただいた日本学術振興会に対し厚くお礼を申し上げますとともに、野生動物の糞便収集および各種解析に協力いただいた関係者の方々および学生諸君に深謝する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Odoi Justice O., Yamamoto Miku, Sugiyama Michiyo, Asai Tetsuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolated from arthropods in Gifu City, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 136 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Akira, Usui Masaru, Ushiyama Katsumi, Shrestha Dipti, Hashimoto Nagisa, Sakata Masayuki K., Minamoto Toshifumi, Yoshida Osamu, Murakami Kanako, Tamura Yutaka, Asai Tetsuo	4. 巻 57
2. 論文標題 Prevalence of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli in Migratory Greater White-Fronted Geese ( <i>Anser albifrons</i> ) and their Habitat in Miyajimanuma, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Wildlife Diseases	6. 最初と最後の頁 954 ~ 958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7589/JWD-D-21-00006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 ODOI Justice Opare, SUGIYAMA Michiyo, KITAMURA Yuko, SUDO Akiko, OMATSU Tsutomu, ASAI Tetsuo	4. 巻 83
2. 論文標題 Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from Great Cormorants ( <i>Phalacrocorax carbo hanedae</i> ) in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1191 ~ 1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yossapol Montira, Yamamoto Miku, Sugiyama Michiyo, Odoi Justice Opare, Omatsu Tsutomu, Mizutani Tetsuya, Ohya Kenji, Asai Tetsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Association between the bla <sub>CTX-M-14</sub> -harboring Escherichia coli Isolated from Weasels and Domestic Animals Reared on a University Campus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 432 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10040432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aratani Tomoki, Koide Nanami, Hayami Kana, Sugiyama Michiyo, Minamoto Toshifumi, Asai Tetsuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Continuous prevalence of VEB 3 extended spectrum lactamase producing <i>Aeromonas hydrophila</i> in a local river in gifu city, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikushima Shiori, Torii Harumi, Asano Makoto, Suzuki Masatsugu, Asai Tetsuo	4. 巻 57
2. 論文標題 Clonal Spread of Quinolone-Resistant Escherichia coli among Sika Deer (Cervus nippon) Inhabiting an Urban City Park in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Wildlife Diseases	6. 最初と最後の頁 172 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7589/JWD-D-19-00005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Odoi Justice Opare, Ohya Kenji, Moribe Junji, Takashima Yasuhiro, Sawai Kotaro, Taguchi Kyoichiro, Fukushi Hideto, Wada Takayuki, Yoshida Shiomi, Asai Tetsuo	4. 巻 56
2. 論文標題 ISOLATION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA FROM WILDLIFE IN JAPAN	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Wildlife Diseases	6. 最初と最後の頁 851 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7589/2019-10-261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsunaga Nonoka, Suzuki Mariko, Andoh Masako, Ijiri Moe, Ishikawa Kemi, Obi Takeshi, Chuma Takehisa, Fujimoto Yoshikazu	4. 巻 66
2. 論文標題 Analysis of fecal samples from Amami rabbits (Pentalagus furnessi) indicates low levels of antimicrobial resistance in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Wildlife Research	6. 最初と最後の頁 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10344-020-01424-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 浅井 鉄夫	4. 巻 66
2. 論文標題 野生動物における耐性菌の保有状況	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Media	6. 最初と最後の頁 219 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 ASAI Tetsuo, USUI Masaru, SUGIYAMA Michiyo, IZUMI Kazuhiro, IKEDA Tomoyuki, ANDOH Masako	4. 巻 82
2. 論文標題 Antimicrobial susceptibility of <i>Escherichia coli</i> isolates obtained from wild mammals between 2013 and 2017 in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 345 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 浅井 鉄夫	4. 巻 43
2. 論文標題 野生動物に分布する薬剤耐性菌と環境への拡散	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 動物用抗菌剤研究会報	6. 最初と最後の頁 32 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小出 菜々美, 浅井 鉄夫
2. 発表標題 琵琶湖に流入する河川におけるESBL 産生大腸菌の調査
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 浅井 鉄夫
2. 発表標題 岐阜市における節足動物からの腸内細菌科細菌の分離と薬剤感受性
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Montira Yossapol、浅井 鉄夫、杉山 美千代
2. 発表標題 Transmission of a CTX-M-14/Incl1 plasmid from domestic animals to wild animals in the Gifu University, Japan
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田智行, クォンミョンヒョン, 安藤匡子
2. 発表標題 野生動物が保有する薬剤耐性大腸菌
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 速水花奈, 坂田雅之, 荒谷朋紀, 浅井鉄夫, 源利文
2. 発表標題 哺乳類環境DNAメタバーコーディング手法による薬剤耐性菌保菌動物の推定
3. 学会等名 第67回日本生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 生島 詩織, 鳥居 春己, 淺野 玄, 鈴木 正嗣, 浅井 鉄夫
2. 発表標題 奈良公園のシカ個体群内におけるキノロン耐性大腸菌のクローナル拡散
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小出菜々美、杉山美千代、村上光一、黒田誠、須藤明子、鈴木正嗣、浅井鉄夫
2. 発表標題 カワウから分離されたEscherichia coliおよびE. albertiiの薬剤感受性
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井鉄夫
2. 発表標題 野生動物に分布する薬剤耐性の現状と課題
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井 優
2. 発表標題 One Healthの視点からみた動物由来耐性菌の現状
3. 学会等名 福岡県One Health 国際フォーラム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井鉄夫
2. 発表標題 野生動物に分布する薬剤耐性菌
3. 学会等名 動物用抗菌剤研究会 第47回シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井鉄夫
2. 発表標題 野生動物に分布する薬剤耐性菌
3. 学会等名 第36回 日本環境感染学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田智行, Kwon MyoungHyun, 明石尚美, 安藤匡子
2. 発表標題 ヤクシカの大腸菌：食中毒起因因子と薬剤耐性について
3. 学会等名 第9回屋久島学ソサエティ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本清、坂田雅之、杉山美千代、浅井鉄夫、源利文
2. 発表標題 環境DNA分析を用いた薬剤耐性菌の保菌動物の探索
3. 学会等名 第69回日本生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井鉄夫
2. 発表標題 野生動物に分布する薬剤耐性菌の生態学
3. 学会等名 第69回日本生態学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安藤 匡子 (Andoh Masako)  (10466914)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授  (17701)	
研究分担者	源 利文 (Minamoto Toshifumi)  (50450656)	神戸大学・人間発達環境学研究科・准教授  (14501)	
研究分担者	森部 絢嗣 (Moribe Junji)  (50456620)	岐阜大学・社会システム経営学環・准教授  (13701)	
研究分担者	大松 勉 (Omatsu Tsutomu)  (60455392)	東京農工大学・農学部・准教授  (12605)	
研究分担者	臼井 優 (Usui Masaru)  (60639540)	酪農学園大学・獣医学群・准教授  (30109)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鈴木 正嗣  (Suzuki Masatsugu)  (90216440)	岐阜大学・応用生物科学部・教授    (13701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	須藤 明子  (Sudo Akiko)		
研究 協 力 者	森元 萌弥  (Morimoto Tomoya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関