

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06096

研究課題名(和文) ヤンバルクイナ及びその生息環境における薬剤耐性大腸菌分布実態

研究課題名(英文) Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in fecal and environmental samples from areas inhabited by the endangered *Gallirallus okinawae*

研究代表者

炭山 大輔 (SUMIYAMA, Daisuke)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：40565339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県北部に位置するヤンバル地域に生息する希少種ヤンバルクイナおよびその生息環境試料(土・水)における薬剤耐性大腸菌(AMR大腸菌)保有率を、人間の生活(畜産農場周辺)地域(LA)と森林地域(FA)で比較検討した。その結果、AMR大腸菌保有率は、ヤンバルクイナおよび生息環境試料の両者ともにFAよりLAにおいて有意に高く、多剤耐性の保有率も高いことが明らかになった。さらにAMR大腸菌の遺伝子型解析により、LAから採取された土壌とヤンバルクイナ糞便の遺伝子型が一致した。これらのことから、LAではよりAMR大腸菌による環境汚染が進んでおり、本種がその運搬者になってしまうリスクが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、沖縄県北部ヤンバル地域にのみ生息する希少鳥類ヤンバルクイナの糞便および本種の生息環境試料(土や水)を対象に、人間生活からの環境汚染の影響が考えられる薬剤耐性大腸菌を指標として、畜産農家付近地域と森林地域とで保有率の比較を行った。本研究結果から、畜産農家付近の本種糞便および環境試料における薬剤耐性大腸菌保有率は森林地域より有意に高く、さらに多剤耐性検出も高いことが明らかになった。検出された大腸菌の遺伝子型解析結果から土試料と本種糞便との遺伝子型の一致も見られ、人間生活からの薬剤耐性菌漏洩が希少種への感染に及び、さらにそれらが運搬者となって森林へ拡散してしまうリスクを提唱した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the prevalence of *Escherichia coli* and its antimicrobial resistance (AMR), as well as the distribution and genotype of *E. coli* in fecal of *Gallirallus okinawae* (Okinawa rail) and environmental soil and water samples from the its habitat area. The habitat of Okinawa rail was divided into a livestock farm area (LA) near human settlements and a forest area (FA) as a non-human living environment. In the result, the prevalence of antimicrobial-resistant *E. coli* in both of samples was more prevalent in the LA than FA. Furthermore, pulsed-field gel electrophoresis analysis revealed a similar genetic pattern of *E. coli* prevalence between fecal sample and soil sample of Okinawa rail in the LA. This suggests that there is the environmental pollution of AMR from livestock farm and the Okinawa rail may become a carrier of antimicrobial-resistant *E. coli* in the Yambaru region of Okinawa.

研究分野：保全生物学

キーワード：薬剤耐性菌 環境汚染 ヤンバルクイナ 大腸菌 希少種保全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、環境破壊や生息地の減少により、野生動物と家畜、または野生動物とヒトとの接触機会は増加し、農業被害やヒトが襲われるといった様々な問題が生じている。その一つに、薬剤耐性菌 (antimicrobial resistance: AMR) の相互伝播があげられる。世界保健機構 (WHO) は、本菌が医療部門のみならず、国境を越えて経済部門にも大きな影響を与えていると警告しており、AMR の監視と制御が国際的な責務となっている。これら AMR は食肉や伴侶動物、さらには河川水や土壌などからも検出され、公衆衛生上、もしくは環境汚染リスクの観点で問題視されている。このような薬剤耐性菌の保有状況は、希少種の保護保全、そして野生への再導入計画においても注視されている。野生動物における AMR の分布および影響を把握する上では主に対象動物が感染 (保有) している大腸菌の薬剤耐性を指標とした調査が行われている。国外では、オグロイワラビー (*Petrogale penicillata*) の糞便からストレプトマイシン、スペクチノマイシンおよびトリメトプリムに対する耐性遺伝子を持つ大腸菌が検出された例や、スペインオオヤマネコ (*Lynx pardinus*) の糞便からの拡張型ラクタマーゼ産生菌およびセフォタキシム耐性大腸菌の検出例などが報告されており、保護飼育環境下で薬剤耐性菌に感染し、再導入後に自然環境中へ耐性菌を拡散させるリスクや、再導入後に自然環境から個体が感染し、拡大させてしまうリスクなどが懸念されている。しかしながら日本国内で保護繁殖されている、もしくは繁殖後野生復帰されている希少動物種において、上記のような調査研究がなされた報告は多くはない。

2. 研究の目的

沖縄島の希少固有種であるヤンバルクイナ (*Gallirallus okinawae*) は「山原 (ヤンバル)」と呼ばれる常緑照葉樹林帯に生息している無飛翔性鳥類であり、生息地の開発や、ノネコや野犬などによる捕食被害により個体数の減少が懸念されていたが、近年、林縁部に建設された畜産農場団地内への出現率が増加している。AMR の多くは、医療現場で発生するものであると思われるが、国内で使用されている抗生物質の多くは医療現場ではなく、農業、畜産業そして漁業で消費されている。これら農業、畜産業、漁業で使用した抗生物質の一部は土壌や河川、海洋に流出し、薬剤耐性菌産生の大きなリスクになると言われている。前述のように本種は畜産農場団地周辺を好んで生息するようになり、ヒト生活圏を発生源とする AMR に暴露されている可能性がある。

これまで我々の研究では、ヤンバル地域の畜産農場近隣に生息するヤンバルクイナ糞便からの薬剤耐性大腸菌を検出している。さらに、比較して低率ではあるが、人里離れた山林内に生息するヤンバルクイナ糞便からも同様に薬剤耐性大腸菌を検出した。これは、畜産農場およびヒト生息環境から排出された AMR が何らかの形で本種に感染し、さらに本種が運搬者 (キャリア) となって AMR を拡散していることを示唆していると思われる。しかし、本種生息環境における土壌・環境水・また生息地を同じくするそのほかの野生動物や本種が餌とするミミズなどの AMR 保有状況に関しては全く明らかにされていない。そこで本研究課題では、大腸菌を指標菌としてヤンバルクイナおよびその生息環境における AMR の分布実態を明らかにし、国立公園にも指定された「ヤンバル」地域の AMR による環境汚染を評価することで、希少種である本種を含めた生態系保全に役立てること目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、大きく以下3点の研究を行った。

(1) ヤンバルクイナ糞便における大腸菌保有率およびその薬剤耐性

ヤンバル地区を、ヒト生活環境 (畜産農場所在地域) (Livestock farm area : LA) と、ヒト生活の影響の少ない森林地域 (Forest area : FA) に分け、試料採取を行った。ヤンバルクイナ糞便に関しては、事前に国道沿いのアスファルト上にあるものを採取し、持参した水道水でアスファルトを洗浄、翌日新たに発見された糞便を試料として使用した。持ち帰った糞便の一部から DNA を抽出し、ヤンバルクイナ特異的に作成した種同定用プライマーを用いて PCR 法にて種同定を行い、ヤンバルクイナとして確定した試料を材料とした。糞便は大腸菌専用培地 (マッコンキー寒天培地、日水製薬株式会社、東京) にて培養し、TSI 寒天培地 (日水製薬株式会社)、LIM 寒天培地 (日水製薬株式会社) による生化学性状等の確認の後、同定キット (EB-20、日水製薬株式会社) を用いて菌種同定を行った。大腸菌陽性と確認後、薬剤感受性テストを行った。薬剤感受性テストは CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) の基準に則り、ディスク法 (Kirby-Bauer 法) を用いて 17 種の抗生物質ディスクを対象に実施した。LA、FA 間における大腸菌保有率の比較はカイ 2 乗検定を用いて、95% の信頼区間で行った。

(2) 環境試料 (土壌および水) における大腸菌保有率およびその薬剤耐性

前述したヤンバルクイナ生息地域 (FA および LA) において、土壌および水試料を採取した。土壌は表面部を避け、1 試料につき 20g 採取した。土壌 20g を 40ml の滅菌水に混合、攪拌し、室温にて 1 時間静置させた後、上清 20ml を採取し、80ml の滅菌水に混合して試料とした。水試料は小さな水たまりや用水路から採取した。水試料は、1 試料につき 20ml 採取した。これに 80ml の滅菌水を混合して試料とした。土壌試料、水試料ともに大腸菌専用培地にて培養し、同定キットにて菌種同定の後、薬剤感受性テストを行った。手法は全て前述と同様である。

(3) パルスフィールドゲル電気泳動による大腸菌の遺伝子型比較解析

ヤンバルクイナ糞便および環境試料から釣菌された大腸菌を制限酵素 (*Xba*I) で処理し、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて、泳動パターンによる遺伝子型 (DNA フィンガープリント法) の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヤンバルクイナ糞便における大腸菌保有率およびその薬剤耐性

沖縄県ヤンバル地域において、59 検体の鳥類糞便の採取を行った (図 1)。ヤンバルクイナのミトコンドリア ATP6 遺伝子の種特異的部分領域で設計したプライマーを用いた PCR およびシーケンシングにより、59 検体中 48 検体の糞便がヤンバルクイナ由来であり、大腸菌検査に供した。48 検体の内訳としては、LA (ヒト・畜産環境) から 22 検体、FA (森林環境) から 26 検体であった。大腸菌の保有率は全体で 65% (31/48) であり、そのうち 45% (14/31) が何らかの抗生物質に対して耐性を示した。地域別では、LA で 73% (16/22) が大腸菌陽性であり、そのうち 69% (11/16) が薬剤耐性を示した。一方、FA では、58% (15/26) が大腸菌陽性であり、そのうち 20% (3/15) が薬剤耐性を示した。各抗生物質に対する耐性率は表 1 に示した。

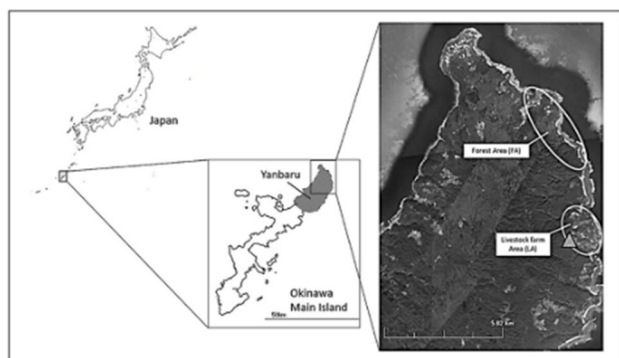


図1. 沖縄県ヤンバル地域および本研究課題におけるサンプリング地点
図の三角形は畜産農場所在地。

	LA	FA
Antimicrobial	No. of detected/total sample (%)	No. of detected/total sample (%)
OTC	9/11 (81.8)	3/3 (100)
CET	5/11 (45.5)	1/3 (33.3)
ABPC	4/11 (36.4)	0/3 (0)
ST	4/11 (36.4)	1/3 (33.3)
PIPC	3/11 (27.3)	0/3 (0)
NA	2/11 (18.2)	1/3 (33.3)
OFLX	2/11 (18.2)	1/3 (33.3)
CP	2/11 (18.2)	2/3 (66.7)
KM	1/11 (9.1)	0/3 (0)

表1: 各抗生物質における耐性率
LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, OTC: オキシテトラサイクリン,
CET: セファロチン, ABPC: アンピシリン, ST: ST合剤, PIPC: ビベラシリン,
NA: ナルジクス酸, OFLX: オフロキサシン, CP: クロラムフェニコール,
KM: カナマイシン

LA で採取した本種糞便における大腸菌陽性率および薬剤耐性率は FA に比べ有意に高く、畜産農家を含むヒト生活環境の影響により薬剤耐性菌の出現率に差が出ていることが示唆された。薬剤に対する耐性度合を評価する MIC (Minimum Inhibitory Concentration: 最小発育阻止濃度) を測定した結果、FA で採取された薬剤耐性菌では 25 μ g/ml を超える高濃度の薬剤に対する抵抗性は示されなかった。しかしながら、LA で採取された試料においては、OTC、CET、ABPC、PIPC、NA、CP、KM と多くの薬剤において 256 μ g/ml を超える高濃度の耐性が見られた (表 2)。さらに 1 つの検体で複数の薬剤に対して耐性を示す (多剤耐性) についても、FA で採取された試料では、OTC-CP、OTC-CET の 2 剤耐性が各 1 株、OTC-NA-OFLX-CP-ST の 5 剤耐性が 1 株のみ検出されたが、LA においては、2 剤耐性 1 株、5 剤耐性が 2 株、6 剤耐性が 1 株、8 剤耐性が 1 株と明らかに多剤耐性を示す株が多いことが明らかになった (表 3)。

Antimicrobial	Sampling area	MIC (μ g/ml)							
		1	8	16	32	64	96	128	\geq 256
OTC	FA	1				1		1	
	LA							2	7
CET	FA				1				
	LA	1	1	1			1		1
ABPC	FA								
	LA								4
ST	FA				1				
	LA				4				
PIPC	FA				2				
	LA								1
NA	FA								1
	LA								2
OFLX	FA				1				
	LA				2				
CP	FA								2
	LA								2
KM	FA								
	LA								1

表2: 各抗生物質に対するMIC値
LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, OTC: オキシテトラサイクリン,
CET: セファロチン, ABPC: アンピシリン, ST: ST合剤, PIPC: ビベラシリン,
NA: ナルジクス酸, OFLX: オフロキサシン, CP: クロラムフェニコール, KM: カナマイシン

Sampling area	Resistance pattern	Resistance antimicrobial	No. of detected samples
LA	Single-drug resistance	OTC	4
		CET	2
	Multi-drug resistance	OTC-ST	1
FA	Multi-drug resistance	ABPC-PIPC-KM-OTC-CET	1
		ABPC-PIPC-OTC-ST-CET	1
		ABPC-OTC-NA-OFLX-CP-ST	1
		ABPC-PIPC-OTC-NA-OFLX-CP-ST-CET	1
		OTC-CP	1
		OTC-CET	1
		OTC-NA-OFLX-CP-ST	1

表3: サンプリング地点ごとの多剤耐性
LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, OTC: オキシテトラサイクリン,
CET: セファロチン, ABPC: アンピシリン, ST: ST合剤, PIPC: ビベラシリン, NA: ナルジクス酸,
OFLX: オフロキサシン, CP: クロラムフェニコール, KM: カナマイシン

本種における薬剤耐性大腸菌の保有率は、全体で 29.1% であり、過去に報告のあるキジ (*Phasianus versicolor*) における保有率 12.5% やコジュケイ (*Bambusicola thoracicus*) における保有率 15.8% と比較しても高率であり、本種が生息域全体において薬剤耐性大腸菌に汚染されている可能性が示唆された (文献 1, 2)。さらに FA に比べ LA において高率に検出されたことから、

畜産業における疾病管理(予防)や成長目的で与えられている抗生物質もしくは動物の体内で出現した薬剤耐性大腸菌の暴露による環境汚染の影響が考えられた。

(2) 環境試料(土壌および水)における大腸菌保有率およびその薬剤耐性

前述のヤンバルクイナ生息地域における環境試料(土壌および水)を採取し、大腸菌保有率およびその薬剤耐性について調査した。LAでは、土壌21検体、水18検体、FAでは、土壌33検体、水14検体を供した。環境試料全体では、30.9%(25/81)が大腸菌を保有しており、そのうち52.0%(13/25)が何らかの薬剤に対し耐性を示した。地域別では、LAの土壌試料で33.3%(7/21)、水試料で46.2%(6/13)、合計では38.2%(13/34)が大腸菌陽性であり、そのうち、土壌試料で100%(7/7)、水試料で66.7%(4/6)、合計では84.6%(11/13)が何らかの薬剤に対し耐性を示した。対照的にFAでは、土壌試料で21.2%(7/33)、水試料で35.7%(5/14)、合計で25.5%(12/47)が大腸菌陽性であり、そのうち、土壌試料で28.6%(2/7)、水試料で0%(0/5)、合計で16.7%(2/12)が何らかの薬剤に対し耐性を示した(表4)。

Sampling Area	<i>E. coli</i>			AMR		
	Soil	Water	Sub Total (%)	Soil	Water	Sub Total (%)
LA	33.3 (7/21)	46.2 (6/13)	38.2 (13/34)	100 (7/7)	66.7 (4/6)	84.6 (11/13)
FA	21.2 (7/33)	35.7 (5/14)	25.5 (12/47)	28.6 (2/7)	0 (0/5)	16.7 (2/12)
Total			30.9 (25/81)			52.0 (13/25)

表4: サンプルング地点ごとの環境試料における大腸菌保有および薬剤耐性率

LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, AMR: 薬剤耐性率, Soil: 土壌試料, Water: 水試料

以上の結果から、ヤンバルクイナの糞便同様、環境試料(土壌、水双方とも)の大腸菌保有率および薬剤耐性率ともにFAよりもLAにおいて有意に高く、ヒト生活環境による汚染の影響が示唆された。また各抗生物質に対する耐性については表5に示した。

Antimicrobial Drug	Sampling area					
	LA			FA		
	Soil	Water	Prevalence (%)	Soil	Water	Prevalence
OTC	85.7 (6/7)	75.0 (3/4)	81.8 (9/11)	50.0 (1/2)	-	50.0 (1/2)
ST	42.6 (3/7)	50.0 (2/4)	45.5 (5/11)	0 (0/2)	-	0 (0/2)
CP	42.6 (3/7)	25.0 (1/4)	36.4 (4/11)	50.0 (1/2)	-	50.0 (1/2)
CET	28.6 (2/7)	50.0 (2/4)	36.4 (4/11)	50.0 (1/2)	-	50.0 (1/2)
ABPC	0 (0/7)	75.0 (3/4)	27.3 (3/11)	50.0 (1/2)	-	50.0 (1/2)
PIPC	0 (0/7)	75.0 (3/4)	27.3 (3/11)	50.0 (1/2)	-	50.0 (1/2)
KM	0 (0/7)	50.0 (2/4)	18.2 (2/11)	0 (0/2)	-	0 (0/2)
OFLX	0 (0/7)	25.0 (1/4)	9.1 (1/11)	0 (0/2)	-	0 (0/2)
NA	0 (0/7)	25.0 (1/4)	9.1 (1/11)			

表5: 各抗生物質における耐性率

LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, OTC: オキシテトラサイクリン, CET: セファロチン, ABPC: アンピシリン, ST: ST合剤, PIPC: ピペラシリン, NA: ナルジクス酸, OFLX: オフロキサシン, CP: クロラムフェニコール, KM: カナマイシン

耐性を示した抗生物質の種類はヤンバルクイナの糞便から検出されたものと同であった。また耐性の検出率は有意にLAで高く、特にLAで採取した水試料に関しては複数の抗生物質に対して耐性を示していることが明らかになった。さらにMIC値を測定した結果を表6に示した。

Antimicrobial	Sampling area	Sample	MIC (μg/ml)						
			1	8	16	32	64	128	≥256
OTC	LA	Soil						2	4
		Water					1	1	1
	FA	Soil						1	
ST	LA	Soil				3			
		Water				2			
CP	LA	Soil							3
		Water							1
CET	FA	Soil							1
		Water	1	1					
ABPC	LA	Soil							3
		Water							1
PIPC	FA	Soil							1
		Water			2				
KM	LA	Soil			1				
		Water			1				
OFLX	LA	Water					1		
NA	LA	Water						1	

表6: 各抗生物質に対するMIC値

LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, Soil: 土試料, Water: 水試料, OTC: オキシテトラサイクリン, CET: セファロチン, ABPC: アンピシリン, ST: ST合剤, PIPC: ピペラシリン, NA: ナルジクス酸, OFLX: オフロキサシン, CP: クロラムフェニコール, KM: カナマイシン

MIC 値においても、OTC、CP、CET、ABPC、PIPC、KM、NA に対し、LA で採取された環境試料から 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という非常に高い数値の耐性が見られた。さらに多剤耐性についても、FA で採取された試料では、土試料において、3 剤耐性 2 株、4 剤耐性が 1 株、水試料については、6 剤耐性、5 剤耐性、4 剤耐性、3 剤耐性が各 1 株検出されたのに対して、FA の環境試料においては、土試料で 4 剤耐性が 1 株検出されたのみであり、水試料からは多剤耐性株は検出されなかった。これらの結果からも、LA の環境が耐性菌により汚染されていることが明らかになった (表 7)。

Sampling area	Sample	MDR patterns	Prevalence
LA	Soil	OTC, ST, CP, CET	14.3 (1/7)
		OTC, ST, CP	28.6 (2/7)
	Water	OTC, ST, ABPC, PIPC, OFLX, NA	25.0 (1/4)
		OTC, ST, CP, CET, KM	25.0 (1/4)
		OTC, ABPC, PIPC, KM	25.0 (1/4)
		CET, ABPC, PIPC	25.0 (1/4)
FA	Soil	OTC, CP, ABPC, PIPC	50.0 (1/2)

表7: サンプリング地点ごとの多剤耐性

LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, OTC: オキシテトラサイクリン, CET: セファロチン, ABPC: アンピシリン, ST: ST合剤, PIPC: ピペラシリン, NA: ナルジクス酸, OFLX: オフロキサシン, CP: クロラムフェニコール, KM: カナマイシン

(3) パルスフィールドゲル電気泳動による大腸菌の遺伝子型比較解析

ヤンバルクイナ糞便および環境試料から単離された大腸菌の遺伝子型解析をパルスフィールドゲル電気泳動を用いて、比較解析した結果、3つの同一パターンが見られた。そのうち1パターンが、LA で採取されたヤンバルクイナ糞便と、FA で採取された土試料から単離された大腸菌のパターンが同一であった。このことから、LA において薬剤耐性大腸菌に感染(保有)したヤンバルクイナが運搬者となり、FA(森林)に拡散してしまっている可能性を示唆していると考えた(図2)。

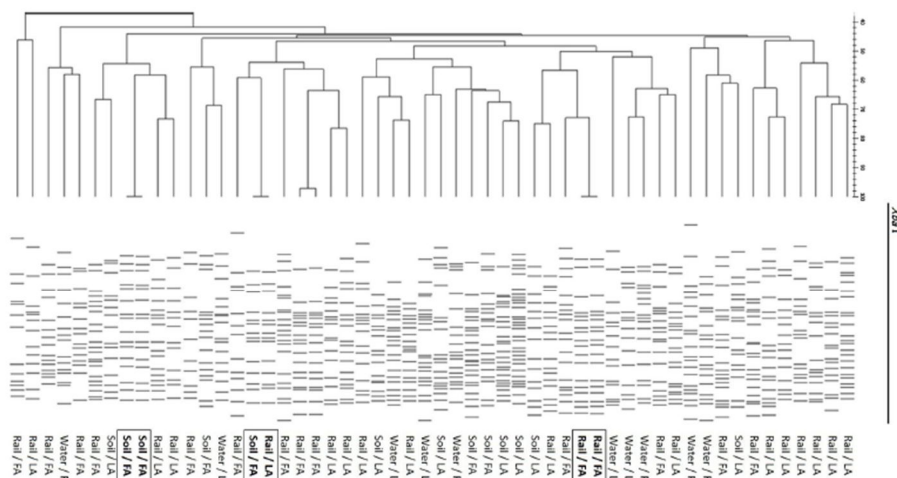


図2: 単離された大腸菌のPFGE泳動パターン解析

LA: ヒト・畜産環境, FA: 森林環境, Rail: ヤンバルクイナ糞便試料由来, Soil: 土試料由来, Water: 水試料由来

【参考文献】

1. Kanai H., Hashimoto H. and Mitsuhashi S. 1981. Drug-resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from wild birds (Japanese tree sparrows, Green pheasants and Bamboo partridges). *Japanese Poultry Science*, 18: 234–239. <https://doi.org/10.2141/jpsa.18.234>
2. Nakamura M., Yoshimura H. and Koeda T. 1982. Drug resistance and R plasmids of *Escherichia coli* strains isolated from six species of wild birds. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 44: 465–471. <https://doi.org/10.1292/jvms1.939.4>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sawako Ishibashi, Daisuke Sumiyama, Tomoko Kanazawa, Koichi Murata	4. 巻 5
2. 論文標題 Prevalence of antimicrobial resistant Escherichia coli in endangered Okinawa rail (Gallirallus okinawae) inhabiting areas around a livestock farm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 563-568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.194	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	安齋 寛 (ANZAI Hiroshi) (70168029)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	

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