

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590754

研究課題名(和文) 環境内の薬剤耐性菌拡散メカニズムにおけるハエと家ネズミの役割

研究課題名(英文) The role of flies and mice in spreading of antimicrobial resistant bacteria in environments

研究代表者

田村 豊 (TAMURA, Yutaka)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50382487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：耐性菌・耐性遺伝子有家畜・環境・医療での拡散において衛生昆虫であるイエバエや衛生動物であるネズミが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。特にハエは農場内において家畜から耐性菌・耐性遺伝子を受け取り、さらに広域に飛翔し移動することで農場間での耐性菌・耐性遺伝子の伝播を起こすことが分かった。さらに、イエバエは発育環を通して耐性菌・耐性遺伝子を維持することから耐性菌・耐性遺伝子のレゼルポアとなっている可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In this project, we clarified the role of flies and mice in the spreading of antimicrobial resistant bacteria and antimicrobial resistance genes among livestock, human clinical settings, and environments. Especially in flies, they were received the antimicrobial resistant bacteria and antimicrobial resistance genes from livestock in a farm. And then they moved to other farms. Therefore, flies may be involved not only in spreading clones of antimicrobial resistant bacteria within a farm but also in the widespread dissemination of plasmids with antimicrobial resistance genes between farms. In addition, flies contain the antimicrobial resistant bacteria and antimicrobial resistance genes throughout their life.

研究分野：獣医学

キーワード：耐性菌 拡散 ハエ ネズミ プラスミド

1. 研究開始当初の背景

医療および獣医療における抗菌薬の適正使用だけでは効果的な薬剤耐性菌(耐性菌)対策となっていない。耐性菌は、例外なく地球上に出現しており数年以内に地球規模での蔓延に至る。しかし、環境での耐性菌拡散のメカニズムは十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、国の違いに関わらず環境に普遍的に生息するハエと家ネズミから医療で問題視される耐性菌を分離し、保有する耐性機構を解明することにより、地域環境の耐性菌拡散におけるハエと家ネズミの役割を明らかにして、伝播経路の遮断という新たな戦略から効果的な耐性菌対策を構築することを目的とする

3. 研究の方法

乳牛の畜舎環境から牛糞便 93 検体と牛舎内ハエ(イエバエ 91 検体、オオイエバエ 68 検体及びサシバエ 72 検体)を採材し大腸菌の分離を行った。その後、分離された大腸菌について微量液体希釈法による 13 薬剤の薬剤感受性試験を行った。

全国 21 都道府県で捕獲されたクマネズミ 195 検体、ドブネズミ 67 検体、不明 64 検体の糞便、計 326 検体から大腸菌の分離を行い、分離された大腸菌について薬剤感受性試験を行った。

セファロスポリン耐性大腸菌 4 株をドナー株、リファンピシン耐性大腸菌をレシピエント株として、*in vitro* 及び *in vivo* での接合伝達試験を行った。*in vitro* は、通常の broth mating 法で行った。*in vivo* は、実験室内で飼育しているイエバエを使用し、ドナー及びレシピエントを飲ませた後にホモジェナイズし選択培地に接種することで接合伝達頻度を算出した。

豚農場 4 ヶ所、牛農場 3 ヶ所において、原則 1 ヶ所あたり糞便 10 検体、ハエ 20 検体を採取した。豚糞便 40 検体、牛糞便 30 検体、ハエ 130 検体(イエバエ:74、キンバエ:31、サシバエ:6、その他:19)から大腸菌を分離した。

ハエの産卵による次世代への薬剤耐性菌・耐性遺伝子の伝達、変態に伴う薬剤耐性菌・耐性遺伝子の变化を明らかにするために、以下の実験を行った。実験室内で飼育しているイエバエの成虫に薬剤耐性大腸菌を投与し、各ステージ(卵、ウジ、蛹、成虫)において継時的にサンプルを回収し、表面消毒後

に、薬剤耐性大腸菌分離と DNA 抽出による耐性遺伝子の検出を行った。

日本各地で捕獲されたドブネズミ 97 検体及び北海道の無人島で捕獲されたドブネズミ 94 検体の糞便、計 191 検体から腸球菌の分離を行い、分離された腸球菌について薬剤感受性試験を行った。

4. 研究成果

牛糞便、イエバエ、オオイエバエでそれぞれ 74、64、54 株の大腸菌が分離され、いずれの由来株においてもテトラサイクリンに対する耐性菌出現率が最も高かった(36~50%)。サシバエからは大腸菌が分離されなかった。第 3 世代セファロスポリン系薬剤に対して耐性を示したのは、牛糞便、イエバエ、オオイエバエ由来株でそれぞれ 6, 20, 8 株であった。このうち、22 株は 6 薬剤に耐性を示す多剤耐性株であった。これらの結果より、畜舎において牛およびハエが広く薬剤耐性菌を保有しており、ヒト医療で重要とされる第 3 世代セファロスポリン耐性菌も存在することが明らかとなった。

34 検体(10.4%)から大腸菌が分離された。薬剤感受性試験の結果、テトラサイクリン耐性株(12 株)が最も多く認められた。また、バンコマイシン添加培地の使用により、バンコマイシン耐性腸球菌の分離を試みたがバンコマイシン耐性腸球菌は分離できなかった。これらの結果より、イエネズミから大腸菌を分離することが可能であり、比較的低い割合で薬剤耐性菌を保有していることが明らかとなった。

in vitro において、ドナー株全てでセファロスポリン耐性遺伝子が 10^{-2} ~ 10^{-8} の頻度で伝達した。*in vivo* において、*in vitro* での伝達頻度が 10^{-2} だった株は、 10^{-5} の頻度で伝達した。*in vitro* の伝達頻度が 10^{-5} より低い 3 株は、伝達を確認できなかった。多様な菌が混在しているハエ腸管内においてもセファロスポリン耐性遺伝子が水平伝達したことから、ハエ腸管内において薬剤耐性遺伝子が水平伝達することが明らかとなった。

豚糞便 18/40 検体(45%)から 41 株、牛糞便 23/30 検体(77%)から 37 株、豚農場のハエ 27/80 検体(34%)から 27 株、牛農場のハエ 18/50 検体(36%)から 18 株の大腸菌が分離された。テトラサイクリンに耐性を示した株の割合は、豚糞便、牛糞便、豚農場のハエ、牛農場のハエでそれぞれ 83, 22, 89, 28%であった。農場におけるハエ由来大腸菌のテトラサイクリン耐性割合は、牛農場由来大腸菌に比

べて豚農場由来大腸菌の方が高く、その耐性割合は家畜糞便由来株での耐性割合と類似していた。以上のことは、ハエが家畜糞便から耐性菌を伝播していることを示した。

薬剤耐性大腸菌を投与したハエの卵、ウジ、蛹、成虫の全てから発育、変態に伴い減少するものの薬剤耐性大腸菌及び耐性遺伝子が検出された。イエバエは、次世代まで薬剤耐性菌及び耐性遺伝子を保持することから、薬剤耐性菌及び耐性遺伝子の伝播・拡散を防止するには成虫だけでなくハエの発生を防ぐことが重要であることが示された。

計 132 株の腸球菌が分離された。薬剤感受性試験の結果、耐性株の分離数は本土ドブネズミ由来株で無人島ドブネズミ由来株に比べて高い傾向にあった。無人島のドブネズミ由来腸球菌からはエリスロマイシン耐性株が分離されなかったが、本土ドブネズミ由来株からは 3 株のエリスロマイシン耐性株が分離され、これらはテトラサイクリンに対しても耐性を示した。以上の結果より、ドブネズミは薬剤耐性腸球菌を保有すること、人為的影響が薬剤耐性菌の選択圧になっていることが示唆された。

以上の研究成果より薬剤耐性菌及び耐性遺伝子の伝播においてハエ及びネズミが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。ハエは、農場において家畜から耐性菌耐性遺伝子を受け取る。その後、ハエは広域に飛翔、移動し農場間で耐性菌・耐性遺伝子を拡散させる。加えて、ハエはその生活間を通して耐性菌・耐性遺伝子を維持することから、耐性菌・耐性遺伝子のレゼルボアとしても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後、耐性菌や耐性遺伝子の出現・拡散を防ぐためには、医療や家畜での抗菌性物質の適正使用が重要であることはもちろんであるが、ハエやネズミを介した環境を介した拡散にも注意が必要である。具体的には、衛生昆虫や衛生動物を農場及び市中において防除することが重要であると考えられる。

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 2 件)

Masaru Usui, Takahiro Shirakawa, Akira Fukuda, and Yutaka Tamura. The Role of Flies in Disseminating Plasmids with Antimicrobial Resistance Genes Between Farms. *Microb. Drug Resistance*.

査読有 2015. In press.

Masaru Usui, Tomohiro Iwasa, Akira Fukuda, Toyotaka Sato, Torahiko Okubo, and Yutaka Tamura. The Role of Flies in Spreading the Extended-Spectrum Beta-lactamase Gene from Cattle. *Microb. Drug Resistance*. 査読有 2013. 19. 415-420. 10.1089/mdr.2012.0251.

[学会発表](計 7 件)

白川崇大、福田昭、大久保寅彦、白井優、田村豊. 農場由来耐性菌ベクターとしてのハエの役割. 第157回日本獣医学会. 2014年9月9日. 北海道札幌市

福田昭、白井優、大久保寅彦、田村豊. 薬剤耐性大腸菌はイエバエの発育環で維持される. 第81回日本細菌学会北海道支部会. 2014年8月29日. 北海道札幌市

大久保寅彦、白井優、田村豊. ドブネズミ由来Enterococcus faecalisの遺伝子的特徴について-市街地と無人島の比較. 第87回日本細菌学会. 2014年3月28日. 東京都

福田昭、白井優、大久保寅彦、田村豊. 薬剤耐性遺伝子はイエバエ腸管内で接合伝達する. 第87回日本細菌学会. 2014年3月28日. 東京都

福田昭、白井優、大久保寅彦、田村豊. 薬剤耐性遺伝子はイエバエ腸管内で接合伝達する. 第156回日本獣医学会. 2013年9月21日. 岐阜県岐阜市

吉沢創太、大久保寅彦、佐藤豊孝、白井優、田中和之、石塚真由美、田村豊. イエネズミ糞便由来大腸菌の薬剤耐性調査. 第154回日本獣医学会. 2012年9月15日. 岩手県盛岡市

白井優、岩佐友寛、佐藤豊孝、大久保寅彦、田村豊. 薬剤耐性大腸菌の畜舎内伝播におけるハエの役割. 第154回日本獣医学会. 2012年9月15日. 岩手県盛岡市

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 豊 (TAMURA, Yutaka)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号:

50382487

(2)研究分担者

臼井 優 (USUI, Masaru)

酪農学園大学・獣医学群・講師

研究者番号：

60639540