

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08770

研究課題名(和文) 野生動物の食性の違いを利用した薬剤耐性の環境汚染経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of environmental pollution route of antimicrobial resistance from the wild animals using difference in their feeding habits

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌による自然環境の汚染を制御することは重要な課題である。食性の異なる野生動物における薬剤耐性菌の保有状況を調べたところ、イノシシ(雑食)とカワウ(魚食)動物から第3世代セファロスポリン耐性大腸菌やキノロン耐性大腸菌が分離されたが、草食の野生動物(シカ)から分離されなかった。このことから、野生動物における薬剤耐性菌の分布に食性が影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is an important problem to control the pollution of the natural environments with antimicrobial-resistant (AMR) bacteria. We examined the prevalence of AMR bacteria in the wild animal with different feeding habits. The third generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and quinolone-resistant *E. coli* were found in wild boars (Carnivore) and great cormorants (Piscivore), but not in deer (Herbivore). Thus, our results suggested that prevalence of AMR bacteria was associated with the feeding habit of wild animals.

研究分野：動物感染症制御学

キーワード：薬剤耐性 野生動物 シカ イノシシ カワウ

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬剤耐性菌は、WHO を中心とした「One health」の理念においても、人類の健康を脅かす深刻な問題の1つとして挙げられている。特に、医療以外での抗菌性物質の使用に伴う耐性菌の増加が注目され、国内外で食用動物における薬剤耐性菌の制御に向けてリスク分析(リスク評価に基づくリスク管理)が実施されている。特に、医療と畜産分野における薬剤耐性菌の分布は、国家レベル(厚生労働省と農林水産省)の調査システムなどにより実態把握が進められてきた。

(2) 人類は、薬剤耐性菌や耐性因子を自然環境に放出して、人間社会と密接な生活環境の動物へ薬剤耐性菌を伝播してきた。人類の社会活動に付随した環境中への薬剤耐性菌の放出は、医療、獣医療の外に農薬としての抗菌性物質の使用に起因することが考えられる。野生動物が薬剤耐性菌および耐性因子を獲得する経路は、人類が環境中の薬剤耐性を獲得する経路にもなりうる。

(3) 近年、シカやイノシシなどの野生動物が、人の生活環境へ侵入することにより、物理的及び経済的な危害を引き起こしている。また、カワウは、各地で巨大な繁殖集団(コロニー)を形成して環境破壊や漁業被害を引き起こしてきたが、近年、都市部の池や河川にコロニーを形成することが問題となっている。シカ、イノシシ、カワウは、それぞれ草食、雑食、魚食という、独特な食性であるが、生息場所により農作物や放流魚を食料とする。これら食性の異なる動物種が保有する薬剤耐性菌の分布や耐性機構を解析することで、自然界への薬剤耐性の拡散ルートを特定する情報を得ることが期待できる。

2. 研究の目的

人類の生活から自然環境へ放出された薬剤耐性菌や耐性因子は、食物連鎖により野生動物の腸管内で蓄積・維持される。本研究の目的は、薬剤耐性菌の拡散防止策を構築するため、生物選択の視点から食性の異なる野生動物における薬剤耐性菌の汚染状況を解析して、野生動物が薬剤耐性菌および耐性因子を獲得するルートを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 食性の異なる野生動物における薬剤耐性菌の分布

食性の異なる野生動物の腸内容物(糞便) 82 検体を収集した。内訳は、雑食動物としてイノシシ 36 頭(捕獲地: 岐阜県内)、野生小型げっ歯類(ハタネズミ、ヒメネズミ及びヒミズ) 7 頭(長野県)及びツキノワグマ 1 頭(岐阜県)の計 44 頭、草食動物としてシカ 11 頭(岐阜県)及び魚食動物としてカワウ 27 羽(滋賀県、岐阜県)である。

対象とした薬剤耐性菌は、国内の野生動物から分離報告がほとんどなく、かつ、医療と獣医療分野以外で使用されないフルオロキ

ノロン(FQ)及び第3世代セファロスポリン(ESC)耐性とした。キノロン耐性菌とセファロスポリン耐性菌を分離するため、分離培地としてナリジクス酸(25mg/L)またはセファレキシン(25mg/L)含有 DHL 寒天培地を用いた。大腸菌は、市販の同定キット(Api20E、ピオメリュー社)を用いて同定した。分離株は、使用時まで -80 で保存した。

(2) 薬剤耐性菌の性状解析

薬剤感受性試験は、臨床検査標準協会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)のガイドラインに準拠した微量液体希釈法で実施した。 β ラクタマ-ゼ遺伝子は、PCR法により増幅後、塩基配列を決定し、データベースを用いて同定した。

FQ 耐性を含むキノロン耐性菌は、DNA ジャイレースの GyrA 及びトポイソメラーゼの PcrC のキノロン耐性決定領域(QRDR)の変異を PCR 法で増幅後、ダイレクトシーケンシングして確認した。

また、同一地域で分離された耐性菌について関連性を明らかにするため、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)により遺伝子型別を実施した。

一部の株は、次世代シーケンサー(MiSeq システム、イルミナ)を用いて全ゲノムシーケンシングを行い、国立感染症研究所のデータベース(GenEpid-J)で解析した。

(3) 野生動物の胃内容物の分析

耐性菌が分離されたイノシシ及びカワウの2種類を対象に胃内容物を調べた。

カワウは、胃内容中の消化物から魚骨を選出し、形状から魚種を特定した。

(4) 生息環境の調査

薬剤耐性大腸菌が分離されたイノシシが捕獲された山林(岐阜市)で、昆虫(ムカデ、ヤスデ等9匹)や水飲み場のたまり水(2サンプル)における耐性菌を調査した。一方、薬剤耐性菌の検出頻度が高かったカワウの生息場所の周辺河川で水(10サンプル)及び生息するアユ9匹における耐性菌を調査した。

4. 研究成果

(1) 野生動物における薬剤耐性菌の分布

ESC 耐性大腸菌は 6 検体(7.3%)から、FQ 耐性を含むキノロン耐性大腸菌は 14 検体(17.1%)から分離された。動物別では、セファロスポリン耐性大腸菌はイノシシの 13.9%(5/36)とカワウの 3.7%(1/27)、また、キノロン耐性大腸菌はイノシシの 27.8%(10/36)とカワウの 14.8%(4/27)から分離された。その他の動物から分離されなかった。

イノシシ及びカワウから分離された ESC 耐性菌(CTX MIC \geq 4mg/L)の β ラクタマ-ゼ遺伝子を調べたところ、イノシシ由来4株中1株(EC-C-92)で *bla*_{CMY-2} が、1株(EC-NA-20)で *bla*_{CTX-M-14}/*bla*_{TEM-1} が検出された。残りの 2

株からは検出されなかった。また、カワウ由来株は1株 (NA-23) が *bla*_{CMY-2} と残り1株 (NA-31) が *bla*_{CTX-M-14} を保有していた (表1)。セファロスポリンは医療及び獣医療以外で使用されない抗生物質で、検出された耐性遺伝子は医療及び獣医療で分離される ESC 耐性菌において比較的報告の多い β ラクタマーゼ遺伝子である。

表1 セファロスポリン耐性大腸菌の遺伝子型、薬剤耐性型及び耐性遺伝子

| 動物種 | Strain No. | Animal No. | Resistance pattern | Resistance gene |
|------|------------|------------|---------------------------------|--|
| イノシシ | Ec-C-1 | WB_KNK-19 | AMP-CEZ-CTX-TET | <i>tet(A)</i> |
| | Ec-C-8 | WB_KNK-21 | AMP-CEZ-CTX-TET | <i>tet(A)</i> |
| | Ec-C-92 | WB_GAF | AMP-CEZ-CTX | <i>bla</i> _{CMY-2} |
| | Ec-NA-20 | WB_KNK31 | AMP-CEZ-CTX-GEN-NAL-CIP-SXT | <i>aac(3)-IIId</i> , <i>aadA5</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>dfrA17</i> , <i>mph(A)</i> , <i>sul1</i> |
| カワウ | NA-23 | G_GC-11 | AMP-CEZ-CTX-TET-NAL-CIP-CHL-SXT | <i>aadA5</i> , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>catA1</i> , <i>dfrA17</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i> |
| | CEX-37 | G_GC-15 | AMP-CEZ | <i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>mph(A)</i> |
| | NA-31 | G_GC-15 | AMP-CEZ-CTX-NAL-SXT | <i>aadA5</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>dfrA17</i> , <i>mph(A)</i> , <i>sul1</i> |

FQ 耐性 (CIP MIC ≥ 2mg/L) を示したイノシシ由来3株とカワウ由来2株は *GyrA* の QRDR に一か所以上の変異と *ParC* の QRDR に変異が認められた (表2)。したがって、野生動物の体内で出現したのではなく、野生動物がフルオロキノロン耐性大腸菌を獲得したと考えられる。

表2 フルオロキノロン耐性大腸菌の QRDR における変異

| 動物種 | 株 No. | Animal No. | <i>GyrA</i> | | <i>ParC</i> | | MIC (mg/L) | |
|------|----------|------------|-------------|-------|-------------|-------|------------|-----|
| | | | 83Ser | 87Asp | 80Ser | 84Glu | NAL | CIP |
| イノシシ | Ec-NA-48 | WB_KNK41 | Leu | Asn | Ile | WT | >128 | >4 |
| | Ec-NA-4 | WB_KNK23 | Leu | Asn | Ile | Val | >128 | >4 |
| | Ec-NA-20 | WB_KNK31 | Leu | WT | Ile | WT | >128 | 2 |
| カワウ | NA-25 | G_GC-13 | Leu | Asn | Ile | WT | >128 | >4 |
| | NA-32 | G_GC-15 | Leu | Asn | Ile | WT | >128 | >4 |

キノロン耐性又は ESC 耐性を示した株のうち、PFGE で異なる個体に由来し同一のバンドパターンを示した3事例の6株を含めて、イノシシ8頭由来9株及びカワウ3羽由来5株の計14株を対象に全ゲノム解析を実施した。野生動物由来14株中8株が複数の薬剤耐性遺伝子を保有していた。確認された耐性遺伝子は、8株で *aadA5*, *bla*_{TEM-1B} 及び *dfrA17*、6株で *mph(A)*、5株で *aac(3)-IIId*, *strA*, *strB* 及び *sul1*、4株で *tet(A)*、3株で *bla*_{CTX-M-14} 及び *sul2*、2株で *aph(3')-Ia*, *bla*_{CMY-2} 及び *mcr-1*、1株で *catA1* 及び *tet(B)* の16種類であった。これらの耐性遺伝子には、医療や獣医療で報告されているものが含まれた。

このように、野生動物における ESC 耐性菌及び FQ 耐性菌の分布は食性の違いが影響し、それら耐性菌は医療や獣医療など人間生活に由来することが示唆された。

(2) 野生動物の餌資源

イノシシの胃内容物の主体は、草類であった。一部、昆虫の残骸、ビニルなど人工物が認められた。

滋賀県 (琵琶湖) で捕獲されたカワウ19羽の胃内容物は、アユ、ハス、スギモロコの順で、アユが63%を占めた。一方、岐阜県 (岩屋ダム) で捕獲されたカワウ8羽の胃内容は、ウグイ、アユ、カワムツの順で、ウグイが50%

を占めた (表3)。捕獲地域によりカワウの捕食魚種構成に違いが見られた。

表3 カワウの胃内容物の主な魚種

| 岐阜・岩屋ダム (n=8) | | 滋賀・琵琶湖 (n=19) | |
|---------------|--------|---------------|--------|
| 魚種 | 割合 (%) | 魚種 | 割合 (%) |
| ウグイ | 50 | アユ | 62.9 |
| アユ | 25 | ハス | 19 |
| カワムツ | 10.7 | スギモロコ | 6.9 |
| アブラハヤ | 7.1 | ビワヒガイ | 4.3 |
| | | オイカワ | 2.6 |

(3) 生息環境中の薬剤耐性菌の分布

全ゲノム解析の結果、異なる個体から同一の遺伝子型を示す株が分離された。同一のバンドパターンを示した3事例のうち、イノシシ1事例とカワウ1事例由来株は、血清型、MLST、病原関連遺伝子型及び薬剤耐性遺伝子型が一致したが、残りのイノシシ由来1事例の株では、病原関連遺伝子 (*gad*) の有無に違いが認められた。同一遺伝子型を示したカワウ由来 FQ 耐性2株 (NA-25 及び NA-32) は、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) を保有していた。このように、生息地域内に個体伝播の経路が存在することが示唆された。そこで、生息地域における環境調査を実施した。

薬剤耐性大腸菌が分離されたイノシシが捕獲された岐阜市の山林で昆虫や水飲み場のたまり水から耐性菌の分離を試みた。第一世代セファロスポリンに自然耐性を示す *Enterobacter* と *Serratia* が分離され、ナリジクス酸含有 DHL 培地では耐性菌は分離されなかった。

カワウの捕獲地域に関して、耐性菌は全て岐阜県で捕獲した個体から分離された。そこで、生息地の馬瀬川及び和良川水系を5か所で河川水と川底の土砂10サンプル中9検体からキノロン耐性菌 (*Aeromonas*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*) が分離され、生息環境水系にキノロン耐性菌が存在することが明らかとなった。また、アユ9検体の糞便から、セファロスポリン耐性大腸菌及びキノロン耐性大腸菌は分離されなかった。このように、野生動物の生息環境から目的とする耐性菌を分離することはできなかった。しかし、キノロン剤に対する耐性菌が分離されたことは、キノロン剤と交差する薬剤による環境汚染の可能性が示された。

【まとめ】

今回の研究で、雑食のイノシシ及び魚食のカワウにおいて、ESBL や AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子以外に、グラム陰性桿菌に対する重要な抗菌薬として位置づけられるコリスチン耐性に関与する *mcr-1* 遺伝子を保有する大腸菌が分布することを明らかにした。また、分離した大腸菌のフルオロキノロン耐性は、染色体上のキノロン剤の標的酵素をコードする遺伝子変異であることを明らかにした。以上、自然界に放出された薬剤耐性菌及び薬

剤耐性因子は、肉食（魚食）・雑食の野生動物に保菌され、排泄されることで生息環境を汚染すること、また自由生活する野生動物によって拡散していることが示唆された。

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 3 件)

浅井鉄夫 One Health の視点から見た耐性菌の問題点 最新医学 査読なし 72 : 528~533, 2017

浅井鉄夫 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランで注目される耐性菌-動物-臨床と微生物 査読なし 44: 303~308, 2017

浅井鉄夫 One Health と薬剤耐性 ALL about SWINE 査読なし 51:24~26, 2017.

〔学会発表〕(計 5 件)

浅井鉄夫、國永尚稔、森元 萌弥、吉田智幸、杉山美千代、須藤明子、鈴木正嗣
カワウから分離された薬剤耐性菌の耐性機序について 第 160 回日本獣医学会学術集会（鹿児島） 2017

浅井鉄夫 獣医療域における薬剤耐性菌の監視と制御 国公立大学附属病院感染対策協議会 平成 29 年度 感染管理担当者 ブロック別研修会(東海・北陸地区) 2017

浅井鉄夫 畜水産・獣医療等における調査と監視 学会等名第 32 回日本環境感染学会総会・学術集会（兵庫） 2017

浅井鉄夫、杉山美千代、鈴木香澄、森元 萌弥、森部絢嗣、鈴木正嗣 食性の異なる野生動物における第 3 世代セファロsporin 耐性腸内細菌の分布 第 159 回日本獣医学会学術集会（神奈川） 2016

浅井鉄夫 動物由来 ESBL 産生菌の現状と人へのリスク 動物用抗菌剤研究会・四学会合同事業セミナー（東京） 2016

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅井鉄夫 (ASAI, Testuo)

岐阜大学・大学院連合獣医学研究科・教授
研究者番号：10509764

(2)研究分担者

鈴木正嗣 (SUZUKI, Masatsugu)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90216440

森元萌弥 (MORIMOTO, Tomoya) (平成 28 年度)

岐阜大学・応用生物科学部・特任助教

研究者番号：50768348

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

須藤明子 (SUDO, Akiko)

株式会社イーグレット・オフィス

森元萌弥 (MORIMOTO, Tomoya)

岐阜大学・応用生物科学部・技術補助員(平成 27 年度)

NPO 法人ワイルド ライフ・サービス・ジャパン (平成 29 年度)