

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06435

研究課題名(和文) 渡り鳥を介した抗生物質耐性菌の拡散メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of dissemination of antibiotic resistant bacteria via migratory birds

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いたメタゲノム手法と培養法を併用して、渡り鳥の糞に含まれるコリスチン耐性菌、一般細菌群集組成、食した餌の種類の経時的变化を調べ、コリスチン耐性菌の群集構造と食性との関連を解析した。冬季に大阪府北部に飛来したヒドリガモでは、日本に飛来した12月から3月の間に耐性大腸菌群および耐性遺伝子mcr-1が経時的に減少した。特定の植物の摂取と耐性菌数が負の相関を示した。また、夏季に北海道で繁殖し冬季に本州以南に飛来するオオセグロカモメとウミネコでは、少なくとも育雛期にはコリスチン耐性大腸菌群およびmcr-1を保有している個体が存在した。特定の餌の摂取と耐性菌数が正の相関を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コリスチンは多剤耐性グラム陰性菌に対して有効な抗菌薬であり、その耐性菌の環境内動態は健康・衛生上の観点から重要である。北日本で繁殖するオオセグロカモメは、繁殖中にコリスチン耐性菌が腸内で濃縮されことから、渡りとともに南方に長距離移動している可能性がある。またシベリア地方から飛来するカモは耐性菌が腸内に濃縮した状態で日本に飛来していると考えられる。本研究により渡り鳥集団の移動に伴って、コリスチン耐性菌・耐性遺伝子が拡散していることが示唆されるとともに、特定の餌の摂取が腸内の耐性菌量の増減に影響していると推測できる。餌の成分を詳細に分析することで耐性菌の抑制対策につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using a metagenomic approach with a next-generation sequencer in combination with culture methods, temporal changes in colistin-resistant bacteria, general bacterial community composition, and diet in the feces of migratory birds were examined and analyzed the relationship between colistin-resistant bacterial community structure and diet. In European widgeon flying to northern Osaka Prefecture, abundance of resistant colistin-resistant coliforms and the resistant gene mcr-1 decreased over time between December and March while wintering. The number of resistant bacteria was negatively correlated with the ingestion of specific plants. In Slaty-backed seagull and Black-tailed gull which breed in Hokkaido in the summer, colistin-resistant E. coli and mcr-1 were detected during the raising period every year. The number of resistant bacteria was positively correlated with the intake of specific diets.

研究分野：環境微生物学

キーワード：渡り鳥 抗生物質耐性菌 コリスチン カモ カモメ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

東アジア・オーストラリア地域フライウェイには、毎年5千万羽以上の渡り鳥の移動が確認されている。日本全体では、毎年数百万羽以上のレベルで渡り鳥が飛来していると推定される。2006年以降、第三世代セフェム系抗生物質などを分解し、臨床上問題となる基質特異性拡張型-ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌が種々の野生の鳥と哺乳動物から見つかるとともに、超広域抗菌スペクトルを示すカルバペネム系抗生物質に対する耐性菌、さらにその耐性菌に有効なコリスチンに対する耐性菌が徐々に世界各地で動物からも分離されている。野鳥の群れの中では糞などを介して短期間のうちに耐性菌が拡散されることが推定される。

環境中の抗生物質耐性菌および耐性遺伝子が採餌行動などによって鳥の腸管内に濃縮・定着されるとともに、渡り鳥とともに短時間のうちに越境移動し、繁殖地や越冬地などの生息環境にそれらを拡散している可能性がある。抗生物質耐性菌および耐性遺伝子の地球規模での拡散や長距離移動は、検疫では対処できない越境問題として捉え、その機構を解明した上で、ヒトの健康、ならびに畜産業、水産業に与える影響を考えていく必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、臨床上重要な抗生物質に対する耐性菌およびその遺伝子が渡り鳥の飛来にともなって拡散・移動する実態を、主に分子微生物生態学的手法を用いて調査研究する。糞に含まれる耐性菌の現存量、種類、遺伝子型を、選択培養法や次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析法を用いて明らかにする。糞に含まれる餌(食した生物や植物に由来する真核生物遺伝子)を次世代シーケンサーで網羅的に解析することで、その食性を調べ、採餌行動などを通じた耐性菌・耐性遺伝子の腸管内への濃縮と定着、日本滞在中の変化を明らかにする。また耐性遺伝子の他の細菌に対する伝達性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 試料採取：ヒドリガモの糞の試料は、2017年12月～2019年4月にかけて大阪府北部の河川敷にて採取を行った。オオセグロカモメの糞試料は、2018年6月、2019年5月、7月、9月、2020年7月、10月、2021年5月、7月、9月に天売島にて採取した。5月は抱卵期、6-7月は育雛期、9-10月は渡り期となる。ウミネコの糞試料は、2018年6月、2019年5月、7月、2020年7月、2021年5月、7月に天売島にて採取した。5月は抱卵期、6-7月は育雛期となる。

(2) 細菌群集組成：真正細菌の16S rRNA 遺伝子のV4領域をPCR増幅した。2ndPCRにて試料識別のためのタグ配列を付加した。

(3) 餌の組成：ヒドリガモの糞試料の場合は *rbcL* 遺伝子、カモメの糞試料の場合は真核生物のミトコンドリア COI 遺伝子の約300 bpの領域をPCR増幅した。2ndPCRにて試料識別のためのタグ配列を付加した。

(4) シーケンシング：MiSeq(イルミナ社)により250 bp×2のシーケンシングを行った。DADA2パッケージングおよびBLAST+にて塩基配列を解析した。

(5) コリスチン耐性菌数：コリスチンを含むECC培地およびクモアガーCOL-APSE培地を用いてコリスチン耐性大腸菌および大腸菌群数を求めた。また同培地にて耐性菌を分離して性質を調べた。

(6) コリスチン耐性遺伝子型：*mcr-1~9*についてPCR法またはリアルタイムPCR法により糞および分離株に含まれる遺伝子型を検討した。

(7) 遺伝子伝達性：分離したコリスチン耐性大腸菌について、近縁のシトロバクター属菌にコリスチン耐性遺伝子が接合伝達されるか検討した。

4. 研究成果

(1) ヒドリガモ：

細菌群集：シーケンス解析の結果から細菌群集組成について月ごとに平均値を求めた日本に飛来した12月から3月の間に、*Pseudomonas* 属、*Megamonas* 属が減少し、*Bacteroides* 属が増加した。

コリスチン耐性菌：コリスチン耐性の大腸菌群は経時的に減少した。

コリスチン耐性遺伝子：リアルタイムPCR法によるコリスチン耐性遺伝子の検出率を調べたこと、12月から3月にかけて *mcr-1* 遺伝子の陽性率は経時的に減少した。*mcr-2* と *mcr-3* については経時的な変化は見られず、いずれの月のサンプルにおいても *mcr-1* の陽性率が一番高かった。

餌：シーケンス解析の結果から餌とする植物について、月ごとに平均値を求めた。12月から3月にかけてアキノキリンソウ、ノガリヤス、ツツリ、オーク、ハギ、バラは有意に減少した。シャジクソウを食べる割合が有意に増加し、3月では50%以上を占めていた。シャジクソウの開花時

期は5~8月であることから、春に近づくにつれて増えていることがわかった。日本に飛来して間もない12月に個体間のばらつきが最も大きく、3月にかけて小さくなることがわかった。
相関分析：餌とコリスチン耐性大腸菌数および大腸菌群数との相関関係を調べた。大腸菌ではキク科イヌハコ属とマメ科トリフォーリウム属に正の相関があった。大腸菌群と負の相関があった植物にはマメ科とキク科が多かった。また、大腸菌群と相関関係があった餌の約半数をイネ科の植物が占めていた。春になるにつれてシャジクソウを食べる割合が有意に増加し、シャジクソウと耐性大腸菌群数には負の相関があった。大腸菌群と相関関係があった植物は大腸菌に比べて多く、餌とコリスチン耐性菌数の関係が示唆された。特定の植物にコリスチン耐性大腸菌を減少させる因子があることがわかった。

(2) オオセグロカモメ：

細菌群集：主要な細菌として *Escherichia-Shigella* 属、*Catellibacterium* 属、*Psychrobacter* 属、属名不明の *Enterobacteriaceae* がほぼ毎回検出され、抱卵期、育雛期、渡り期における明確な属レベルでの違いは見られなかった。

餌：抱卵期、育雛期、渡り期における明確な違いはなかったが、経年的な大きな違いがみられた。2018年6月~2020年7月はコリスチン耐性大腸菌数と正の相関をもつ餌を食べており、2020年10月~2021年9月はコリスチン耐性大腸菌数と負の相関をもつ餌を食べている傾向にあることが分かった。*Harpalus* (ゴモクムシ) 条虫である *Taenia* (テニア) などが個体間の餌のばらつきに影響を与えていることがわかった。

コリスチン耐性遺伝子：*mcr-1* 遺伝子の陽性率は時期による変動を示した。また、少なくとも育雛期(6~7月)には *mcr-1* 遺伝子が存在していることがわかった。

コリスチン耐性菌数：時期によってコリスチン耐性大腸菌数に変動があった。2018~2019年と比較すると、2020~2021年はコリスチン耐性大腸菌数が減少傾向にあることがわかった。コリスチン耐性大腸菌群数においても時期による変動があり、少なくとも育雛期(6~7月)にはコリスチン耐性大腸菌群が存在していることがわかった。

相関分析：コリスチン耐性大腸菌数と、*Pseudocalanus* は正の相関、*Larus*、*Pugettia*、*Zamium* は負の相関があり、餌とコリスチン耐性大腸菌数の関係が示唆された。

特定の餌にコリスチン耐性大腸菌を増加させる因子があることがわかった。

(3) ウミネコ：

細菌群集：*Catellibacterium* 属、*Escherichia/Shigella* 属は安定して存在し、特に *Catellibacterium* 属は2020年7月から安定して約30%は存在していた

コリスチン耐性遺伝子：5月は *mcr-1* 陽性率が比較的高く、天売島で繁殖するにつれて7月は *mcr-1* 陽性率が低くなった。 *mcr-1* 陽性率は時期によって変動するものの、一定の割合で存在していた。

コリスチン耐性菌：時期によってコリスチン耐性大腸菌数に変動があり、2018年から2019年と比較すると、2020年から2021年はコリスチン耐性大腸菌数が減少していることがわかった。

餌：2018年6月~2019年7月は餌の種類が多く、2020年以降は餌に偏りがあった。特に抱卵期である5月に個体間の餌のばらつきが多かった。

相関分析：コリスチン耐性大腸菌はジフィロボトリウム属、ハルゼミ属と正の相関があり、カラスヨトウ属、カミキリムシ科とは負の相関があった。2018年6月~2019年7月は正の相関をもつ餌を食べている傾向があった。2020年7月から負の相関のある餌を食べていることが、コリスチン耐性大腸菌数を減らしていると考えられる。特定の餌にコリスチン耐性大腸菌を増加させる因子があることが示唆された。

(4) 遺伝子伝達：カモメの糞から分離したコリスチン耐性大腸菌約100株について調べたところ、大部分が *mcr-1* を有しており、*mcr-2~9* は検出されなかった。またコリスチンのMICが高い20株についてはすべて接合伝達能を有していることがわかった。

(5) まとめ：

渡り鳥の腸内に含まれるコリスチン耐性菌数および耐性遺伝子量は経時変化を示した。餌の種類も経時変化を示し、特定の餌がコリスチン耐性の現存量に影響を与えることが示唆された。日本滞在直後の時期にコリスチン耐性菌および耐性遺伝子が検出されたことから、渡り鳥の移動とともに耐性菌も移動していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takehiko Kenzaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Genome Sequence of Colistin-Resistant <i>Escherichia coli</i> CLR8, Isolated from the Feces of <i>Larus argentatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc.	6. 最初と最後の頁 e00533-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00533-20	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 Kenzaka T, Yasui M, Baba T, Nasu M, Tani K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Positive selection in F-Box domain (Ipp0233) encoded in <i>Legionella pneumophila</i> strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biocontrol Sci.	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4265/bio.23.53.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kenzaka T, Takahashi Y, Kurata R, Yamanaka R, Uchii K, Tani K.
2. 発表標題 Investigation of simulated microgravity effects on conjugation process in gram-negative bacteria.
3. 学会等名 Joint Symposium 32nd ISTS & 9th NSAT,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenzaka T, Kishino E, Horikawa K, Tani K.
2. 発表標題 Intestinal microbiota and colistin-resistant <i>Escherichia coli</i> in migrating Eurasian wigeon of western Japan
3. 学会等名 ISME17（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenzaka T, Nishiguchi S, Nishikawa S.
2. 発表標題 Succession of Intestinal Microbiota, Diet, and Colistin-resistant Escherichia coli in Migrating Slaty-Backed Gull during Breeding Season
3. 学会等名 World Microbe Forum (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Wael Hozzein	4. 発行年 2020年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 162
3. 書名 METAGENOMICS - BASICS, METHODS AND APPLICATIONS	

〔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
研究協力者	西川 翔子 (Nishikawa Syouko)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	
研究協力者	西口 沙弥佳 (Nishiguchi Sayaka)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	
研究協力者	竹橋 春香 (Takehashi Haruka)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	

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
研究協力者	辻田 早紀 (Tsujiita Saki)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	
研究協力者	岸野 笑美 (Kishino Emi)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	
研究協力者	堀川 貴世 (Horikawa Kiyo)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	
研究協力者	秋山 菜南美 (Akiyama Nanami)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	
研究協力者	岩本 久美 (Iwamoto Kumi)	大阪大谷大学・薬学部・大学生 (34414)	

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