

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10433

研究課題名（和文）野菜、野生動物における薬剤耐性菌の実態解明ならびにヒトへの伝播リスク評価

研究課題名（英文）Association of drug-resistant bacteria between human and vegetable or wild deer based on a One Health approach

研究代表者

中野 章代（Nakano, Akiyo）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10707441

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では薬剤耐性菌がヒトへ伝播する経路として考えられる、野菜および野生動物に着目し、それぞれから分離される薬剤耐性菌の実態解明ならびにその特徴について解析した。その結果、第3世代セファロsporin系薬（3GC）耐性菌を市販の野菜と生息地域の異なる野生鹿から分離した。これらの耐性菌の多くは、CTX-M型 β -ラクタマーゼ遺伝子を保有していた。野生鹿の分離頻度は、生息地域により異なっていた。ゲノムタイプも地域ごとに異なり、ヒトから分離されるタイプとも異なっていた。これらのことから、地域特異的に3GC耐性大腸菌が分布している可能性が示唆されたが、ヒトとの関連性は低いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワンヘルスアプローチに基づきヒトへの伝達経路として考えられる野菜と野生動物における薬剤耐性菌の分布状況を明らかにした。さらに野生鹿において薬剤耐性大腸菌を分離したがそのタイプはヒト由来大腸菌と異なることを明らかにした。餌やりなどでヒトとの交流が盛んな観光地で生息する野生鹿でさえ、ヒトとは異なるタイプの耐性菌を保有しており、ヒトと野生動物の薬剤耐性菌の関連性は低いことが示唆された。これは今後の観光地における感染対策を講じる上でも重要な指標となる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the prevalence of drug-resistant bacteria and relationship between human and vegetable or wild animal based on a One Health approach. Gram-negative bacteria resistant to 3rd-generation cephalosporin (3GC) were isolated from vegetables and wild deer in different habitats. Most of these resistant bacteria had CTX-M β -lactamase genes. Prevalence of wild deer differed by habiting regions. Genomic types also differed from habiting regions and from types isolated from humans. This study was suggested that 3GC resistance bacteria from wild deer have a region-specific genome type and were not clearly associated between human and wild deer.

研究分野：微生物感染症

キーワード：薬剤耐性菌 腸内細菌科 野菜 野生動物

1. 研究開始当初の背景

医療現場において、第3世代セファロスポリン系薬(3GC)は感染症の治療薬として多用されている抗菌薬の1つであるが、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生による3GC耐性菌が世界中で増加し問題となっている。これらは主にCTX-M型酵素を産生し、国や地域によってその流行タイプが異なる特徴がある。医療現場のみならず健康人や動物、環境からも検出されることから、これらを包括的に捉えたワンヘルスアプローチの概念に基づいた対策を取ることが求められている。申請者は前年度科研費(若手(B)17K16228)において、食肉を介して家畜からヒトに耐性菌が伝播する可能性を想定し、家畜(牛・豚)とヒト(患者、健康者)から分離される3GC耐性菌の分布状況や関連性、その耐性機構を解析したが、双方の遺伝学的背景に明らかな関連性が認められなかった(Nakano et al. 2018, ECCMID)。

食肉以外に口にするものとして野菜があげられ、これまでの報告では中国や中南米など医療現場におけるESBL産生菌の分離頻度が高い地域で野菜からも高い割合で分離されている(AEM 2015, 81:3115)。これらの地域では市中や環境においても同様にESBL産生菌が多く分離されている。さらには世界中の医療現場で蔓延しているCTX-M-15産生大腸菌ST131クローンが野菜から分離されたという報告もある。また興味深いことに、ベジタリアン(菜食主義者)においては、それ以外と比較して2倍以上ESBL産生菌の保菌率が高いという報告がある(RIVM Rapport, 2017-0150)。しかし、本邦においては野菜のESBL産生腸内細菌目を調査した報告は少なく、新たな解析が求められている。野生動物については、愛玩動物や家畜に比べ報告例が少なく、野鳥や猪の一部でヒトとの親和性が疑われるESBL産生菌の出現も報告されているため、ヒトとの関連性が想定される。

2. 研究の目的

本邦における野菜と野生動物に注目し、それぞれから分離される薬剤耐性菌の実態解明ならびにヒトとの関連性を明らかにすることを目的に次の研究課題に取り組む。

(1) 野菜、栽培環境(堆肥、農業用水、土壌など)における薬剤耐性菌の実態解明

野菜における3GC耐性菌の分布状況ならびに遺伝学的特徴を明らかにする。さらにESBL産生菌が確認された野菜について、栽培過程で使用する堆肥、農業用水、畑の土などの栽培環境を検体として野菜分離株との相同性を解明する。

(2) 野生動物(鹿)とその生息環境(河川水、土壌など)における薬剤耐性菌の実態解明

3カ所の生息地の異なる野生鹿ならびにその生息環境にある河川水やたまり水、土壌などを対象とし、3GC耐性菌の分布状況ならびに遺伝学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各分野から検体を収集した。

(2) 各検体よりグラム陰性桿菌(大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクター)を分離培養し、質量分析装置(TOF-MS)もしくは16S rRNAのシーケンス解析により菌種同定を行った。

(3) 分離株について、寒天平板希釈法による薬剤感受性試験を行い、どのような薬剤に対して耐性であるか確認した。

(4) 検出された耐性菌の耐性遺伝子を遺伝子解析(PCR, DNAシーケンシング)により決定した。

(5) 耐性菌株の型別をゲノム型別(7つの遺伝子タイピングによるMLST解析)ならびにパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析により決定した。耐性プラスミドは、不和合性の型別をPCRにより決定した。

(6) 耐性プラスミドの伝播能を明らかにするため、大腸菌J53株を受容菌として接合伝達試験を行い、その伝達頻度を算出した。

4. 研究成果

(1) 野菜、栽培環境(堆肥、農業用水、土壌など)における薬剤耐性菌の実態解明

分離頻度は低いものの、市販の野菜から3GC耐性菌が分離された。そのうち多くはエンテロバクター属であったが、ESBL型遺伝子は検出されなかった。3GC耐性肺炎桿菌はゲノムタイプがヒト臨床分離株のゲノムタイプと同じであったため、今後更なる検体収集と解析が必要である。3GC耐性大腸菌は分離されなかった。なお、野菜の栽培環境として土壌や水から分離したエンテロバクター属と肺炎桿菌には薬剤に耐性を示す株はなかった。

(2) 野生動物(鹿)とその生息環境(河川水、土壌など)における薬剤耐性菌の実態解明

北海道阿寒湖周辺、奈良公園内、広島県宮島内に生息する野生鹿の糞便から、1検体1株の大腸菌を分離した。それぞれの菌株の薬剤感受性結果を図1に示した。ペニシリン系薬のアンピシリン（ABPC）に対する耐性率は全ての生息地域で高い傾向であった。第3世代セファロスポリン系薬のセフポドキシム（CPDX）に対する耐性率は奈良公園で、テトラサイクリン系薬のテトラサイクリン（TC）に対する耐性率は阿寒湖で高い傾向にあった。カルバペネム系薬のイミペネム（IMP）、キノロン系薬のレボフロキサシン（LVFX）、ホスホマイシン系薬のホスホマイシン（FOM）に対しては、どの地域も低い傾向であった。ヒト由来株の3GC耐性大腸菌はキノロン系薬に対する耐性率が高い傾向にあることから、ヒト由来株と鹿由来株では異なる特徴が明らかとなった。

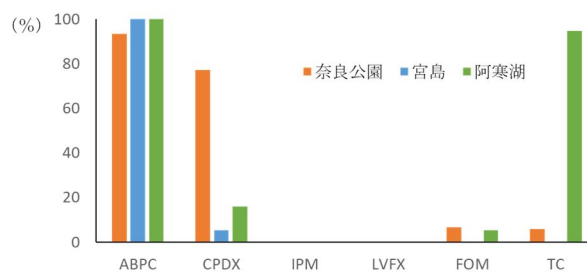


図1 野生鹿から分離された大腸菌の各薬剤における耐性率

各大腸菌が保有していた耐性遺伝子を表1に示した。奈良公園ではCPDXに耐性を示した全ての株がESBL遺伝子を保有しており、その多くがCTX-M-15であった。宮島、阿寒湖においてはESBL遺伝子を保有する株は少ない傾向であった。

表1 野生鹿から分離された大腸菌の3GC耐性遺伝子

耐性遺伝子	奈良公園	宮島	阿寒湖
ESBL	80 (76.2%)	0 (0%)	2 (10.5%)
CTX-M-1G			
CTX-M-1			1
CTX-M-15	67		1
CTX-M-55	2		
CTX-M-8/25G			
CTX-M-8	1		
CTX-M-9G			
CTX-M-14	10		
pAmpC	0 (0%)	1 (5.3%)	1 (5.3%)
CMY-2		1	1
なし	25 (23.8%)	18 (94.7%)	16 (84.2%)

奈良公園の野生鹿から分離されたESBL遺伝子保有大腸菌のプラスミド（Inc）型別を図2に示した。CTX-M-15遺伝子を保有する大腸菌のプラスミドはほとんどが不定であった。またCTX-M-14遺伝子を保有する大腸菌はほとんどがIncI1-Iであった。CTX-M型遺伝子が染色体あるいはどのプラスミド上にコードされているのか、今後次世代シーケンズ解析により更なる解析が必要である。

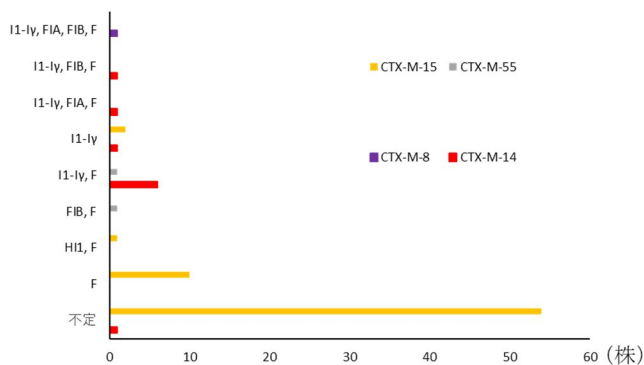


図2 奈良公園の野生鹿から分離されたESBLのプラスミド型別

各生息地域の鹿から分離された大腸菌のゲノム型別（ST）は、生息地域ごとに異なる傾向であった（図3）。ヒト由来株のESBL型遺伝子保有大腸菌は特にST131が多いとされるが、鹿からは1株も検出されなかった。奈良公園では、CTX-M-15遺伝子保有大腸菌ST3580が優位を占めていた。これらは全てPFGE解析のバンドパターンも同じであった。今後は、鹿との接触が考えられる奈良公園の近隣住民由来株やその周辺の医療機関から分離されたESBL産生菌の遺伝学的特徴を明らかにし、さらなるヒトとの関連性を解明する必要がある。

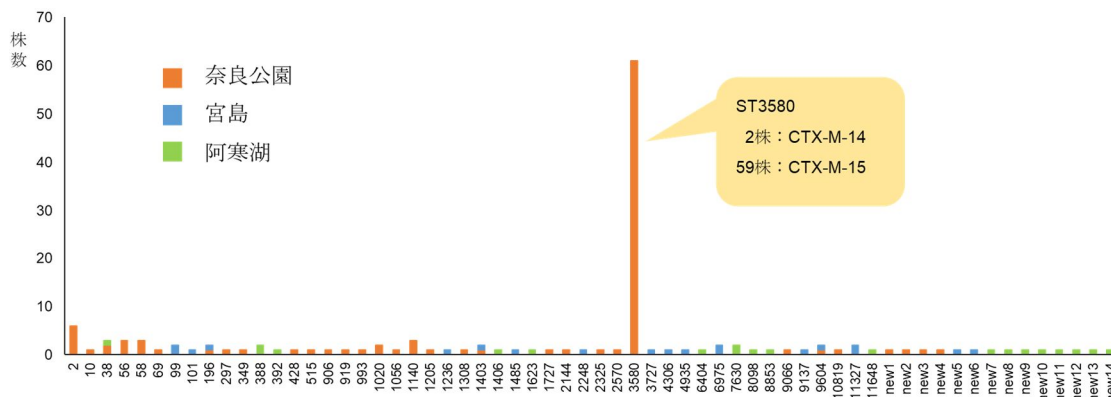


図3 野生鹿から分離された大腸菌のゲノム型別

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 Nakano A, Nakano R, Nishisouzu R, Suzuki Y, Horiuchi S, Kikuchi-Ueda T, Ubagai T, Ono Y, Yano H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Prevalence and Relatedness of mcr-1-Mediated Colistin-Resistant Escherichia coli Isolated From Livestock and Farmers in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 664931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.664931. eCollection 2021	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 Nakano A, Nakano R, Nishisouzu R, Hikosaka K, Suzuki Y, Kamoshida G, Tansho-Nagakawa S, Endo S, Kasahara K, Ono Y, Yano H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Genetic relatedness of third-generation cephalosporin-resistant Escherichia coli among livestock, farmers, and patients in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 One Health	6. 最初と最後の頁 100524 - 100524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.onehlt.2023.100524	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、鈴木由希、堀内沙央里、渡邊真子、山口晃一、野村泰充、斉藤開、岸莉央、矢野寿一
2. 発表標題 野生鹿から分離された大腸菌の薬剤耐性状況と分子遺伝学的解析
3. 学会等名 第92回日本感染症学会西日本地方学術集会、第65回日本感染症学会中日本地方学術集会、第70回日本化学療法学会西日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakano A, Nakano R, Watanabe M, Suzuki Y, Horiuchi S, Saito K, Kishi R, Yano H.
2. 発表標題 Predominance of CTX-M-15 β -lactamase-producing Escherichia coli isolated from wild deer inhabiting a tourist area in Japan.
3. 学会等名 32nd International Congress of Antimicrobial Chemotherapy (ICC) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、渡邊真子、鈴木由希、堀内沙央里、斉藤開、岸莉央、野村泰充、北川大輔、矢野寿一
2. 発表標題 奈良公園に生息する野生の鹿から分離した第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の特徴
3. 学会等名 第33回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野章代、中野竜一、鈴木由希、堀内沙央里、斉藤開、渡邊真子、岸莉央、矢野寿一
2. 発表標題 本邦の家畜、畜産農家、健康人から分離したコリスチン耐性遺伝子mcr-1保有大腸菌の遺伝学的特徴とその関連性について
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第69回日本化学療法学会西日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野章代、渡邊真子、中野竜一、鈴木由希、堀内沙央里、斉藤 開、矢野寿一
2. 発表標題 観光地の鹿が保有する耐性菌の保有状況ならびにその特徴について
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会、第69回日本化学療法学会総会 合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野章代、渡邊真子、中野竜一、鈴木由希、堀内沙央里、角田尚紀、斉藤開、矢野寿一
2. 発表標題 観光地の鹿が保有する第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の特徴
3. 学会等名 第90回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第63回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第68回日本化学療法学会西日本支部総会 合同開催
4. 発表年 2020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	矢野 寿一 (Yano Hisakazu) (20374944)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究 分担者	中野 竜一 (Nakano Ryuichi) (80433712)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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
---------	---------