

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12272

研究課題名（和文）食物連鎖を介した海鳥における抗菌薬耐性菌の蓄積・拡散動態

研究課題名（英文）Accumulation and spread dynamics of antimicrobial-resistant bacteria in seabirds through food web

研究代表者

見坂 武彦（Takehiko, Kenzaka）

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：80397661

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）：超並列DNA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、北海道の繁殖地における海鳥（オオセグロカモメおよびウミネコ）の腸内、被食者となる栄養段階の異なる生物、ならびに海水の耐性菌・遺伝子を網羅的に調べ、耐性菌の食物連鎖を介した濃縮メカニズムを検証した。動物プランクトン、海洋生物、海水では、コリスチン耐性大腸菌およびコリスチン耐性遺伝子mcr-1は検出未満であったが、ウミネコ、オオセグロカモメでは、それぞれ平均20%、35%の割合で保有していることが明らかとなった。食した餌生物は時期や年で変動し、特定の餌が増加因子となり、mcr-1が生物濃縮されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

渡り性のカモメであるオオセグロカモメとウミネコでは、特定の餌生物を摂取することで、コリスチン耐性菌や耐性遺伝子が腸内に濃縮され、繁殖期には20-35%の割合で耐性遺伝子を保有していることが明らかとなった。カモメは繁殖期に採餌行動で数十km、渡り期には千km以上移動し、糞とともに耐性菌や耐性遺伝子を海水中に放出する。本研究により、食物連鎖を介した耐性菌の濃縮・移動の実態の一部が明らかになり、地理的に離れた地域で類似の耐性菌が発見される要因として、渡り性のカモメが重要であることが示された。本研究は、環境中に潜む抗菌薬耐性菌が地球規模で蔓延する機構の解明に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Using a combination of metagenomic methods with high-throughput DNA sequencers and cultivation techniques, I comprehensively examined the presence of resistant bacteria and genes in the intestines of seabirds (Slaty-backed Gulls and Black-tailed Gulls), prey organisms at different trophic levels, and seawater at the breeding sites in Hokkaido. This was done to verify the concentration mechanisms of resistant bacteria through food web. Colistin-resistant *Escherichia coli* and the colistin-resistant gene mcr-1 were not detected in zooplankton, marine organisms, or seawater. However, they were found in 20% and 35% of Black-tailed Gulls and Slaty-backed Gulls, respectively. The diet consumed varied by season and year, and specific diet organisms were identified as increasing factors for the biomagnification of mcr-1.

研究分野：分子生態学

キーワード：抗菌薬耐性 海鳥 カモメ 生物濃縮 コリスチン 大腸菌 渡り鳥

## 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おり、日本全体では、毎年数百万羽以上の渡り鳥が飛来していると推定される。コリスチンは多剤耐性グラム陰性菌感染症の切り札とされているが、近年コリスチンに対する耐性菌が世界各地の野生動物、家畜、カモメ、ヒトなどから分離され、耐性率が増加傾向にある。また、冬季に日本に飛来するカモ科の渡り鳥の糞には種々のカルバペネム耐性グラム陰性菌が、カモメ科の渡り鳥の糞にはコリスチン耐性大腸菌が含まれていることが示されている。海洋の抗菌薬耐性菌および耐性遺伝子が食物連鎖によって高次捕食者である海鳥の腸管内に濃縮された上で、渡り鳥とともに長距離移動し、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。

重金属や脂溶性化学物質、放射性物質については、食物連鎖における環境内動態の研究が進む一方で、抗菌薬耐性菌およびその遺伝子の、生態系ピラミッドの栄養段階を超えた生物間移動や濃縮過程については、未解明のままである。通性嫌気性の大腸菌や大腸菌群は環境適応力が高く、種々の魚介類の体内や動物プランクトンに付着して生存できるため、食物連鎖を介して高次捕食者となる海鳥の腸内に定着する可能性がある。また、渡り鳥が介在して拡散・移動する耐性菌の群集構造については、定量的な知見が蓄積されていない。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、公衆衛生上の重要問題として捉え、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。環境微生物学分野では、方法論の進展により培養に依存せず、網羅的に生物の遺伝学的構造を解析することが可能となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーなどを用いたメタゲノム解析法と選択培地を用いた培養法を併用し、海水、海洋の動物プランクトン、海洋生物、海鳥腸内の耐性菌の現存量、種類、遺伝子型などの群集構造について、繁殖地域における経時的变化を明らかにする。また、次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング法を用いて鳥の腸内容物(糞)に含まれる真核生物(餌)の経時的变化を調べることで、生態系ピラミッドの栄養段階が異なる生物と耐性菌との量的関連を解析する。これにより、海鳥が介在する水環境中の耐性菌および耐性遺伝子の濃縮機構の研究を発展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料

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、2022年5月、7月、9月に天売島にて採取したもの、ならびに2022年5月、7月、9月に稚内、2022年6月、8月、10月に厚岸にて採取したものを解析した。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、2022年5月、7月に天売島にて採取したものを解析した。5月は抱卵期、6-7月は育雛期となる。各時期について10-30の糞試料のデータを平均化した。糞試料と同時に、周辺の海水、動物プランクトン、二枚貝を採取した。

#### (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。2<sup>nd</sup>PCRにて試料識別のためのタグ配列を付加した。

#### (3) 餌の組成

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300bpの領域をPCR増幅した。2<sup>nd</sup>PCR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250bp×2のシーケンシングを行った。DADA2パッケージおよび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状を調べた。

#### (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。代表的な菌株はコリスチン耐性遺伝子の全長の塩基配列を決定した。

#### (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頻度を求めた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 動物プランクトン、二枚貝、海水

コリスチン耐性菌および耐性遺伝子の濃度が低いことから、ろ過による濃縮ならびに大腸菌の選択培地（コリスチンを添加したマッコンキー培地、ECブルー培地）を用いた増菌培養を試みた。いずれの方法でもコリスチン耐性大腸菌およびコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* は検出限界未満であった。

##### (2) オオセグロカモメ

細菌群集：2018～2022年のオオセグロカモメ腸内の主要な細菌の属として *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違い、年度による明確な違いは属レベルでは見られなかった。

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が、平均で35%のオオセグロカモメが *mcr-1* を保有していることがわかった。稚内、厚岸のオオセグロカモメについても天売島と同程度の割合で、*mcr-1* を保有していることがわかった。*mcr-2～9* は検出されなかった。

コリスチン耐性菌：コリスチン耐性大腸菌数は時期による変動を示した。2018～2019年と比較すると、2020～2022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。

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。

相関分析：*mcr-1* 陽性率と、ゴミム、ウトウ、カイアシは正の相関がみられた。特定の餌が *mcr-1* を増加させる因子となることがわかった。

##### (3) ウミネコ

細菌群集：2018～2022年のウミネコ腸内の主要な細菌の属として *Catellibacterium* 属、*Escherichia-Shigella* 属が安定して存在し、特に *Catellibacterium* 属は2020年7月から約30%は存在した。

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、平均20%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2022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：*mcr-1* 陽性率と、クダマキガイ、ゲンゴロウでは正の相関がみられた。特定の餌が *mcr-1* を増加させる因子となることがわかった。

##### (4) 遺伝子型と遺伝子伝達

カモメの糞から分離したコリスチン耐性大腸菌株について調べたところ、約80%が *mcr-1* を有しており、*mcr-2～9* は検出されなかった。塩基配列を解析したところ、いずれも *mcr-1.1* であり多様性は低かった。またコリスチンのMICが高い30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。

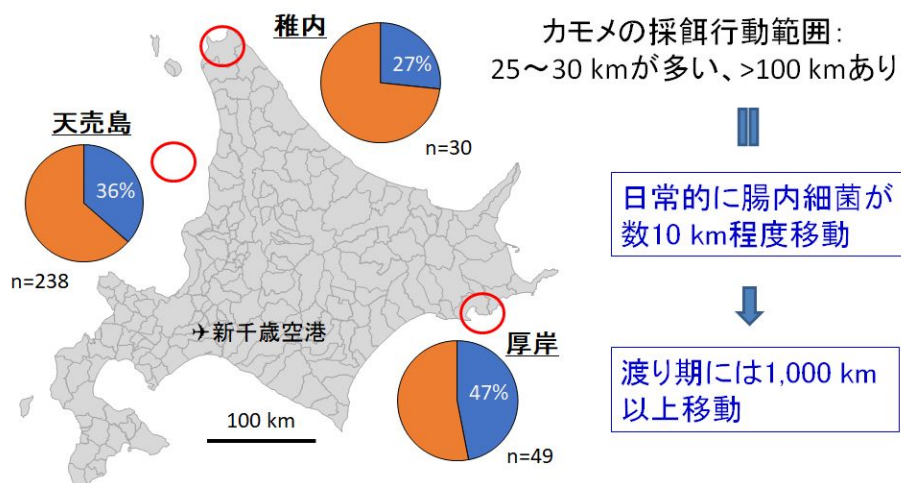


図 オオセグロカモメの糞の *mcr-1* 陽性率

(5) まとめ

特定の餌生物を摂取することで、コリスチン耐性菌や耐性遺伝子が高次捕食者であるオオセグロカモメ、ウミネコの腸内に濃縮されることがわかった。繁殖期を通じて、オオセグロカモメの約 35%、ウミネコの約 20% が耐性遺伝子を保有していることが明らかとなった。腸内細菌群集や餌の種類は経時変化を示し、特定の餌がコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* の陽性率に影響を与えることがわかった。本研究は、アジア地域で繁殖するカモメが *mcr-1* を保有していることを初めて明らかにした。オオセグロカモメは繁殖期の採餌行動で 30 km ほどの距離を移動するとの報告があり、日常的にコリスチン耐性遺伝子や耐性菌を拡散していると考えられる。また、過去のオオセグロカモメ、ウミネコの行動調査では、北海道で繁殖後、能登半島、九州、沖縄、小笠原諸島、フィリピンなど千 km 以上（最大で約 4 千 km）離れた地域に渡ることが示されていることから、これらの地域にコリスチン耐性菌および耐性遺伝子が移動していることが示唆された。本研究は、海鳥がコリスチン耐性菌を拡散するベクターとして重要であることを示し、地理的に離れた地域で類似の耐性菌が発見される機構や耐性菌の世界的な拡散機構の理解につながる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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, Sayaka Nishiguchi, Souko Nishikawa	4. 巻 13
2. 論文標題 16S rRNA Amplicon Sequencing of Intestinal Microbiota in Eurasian Wigeon around Osaka, Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcement	6. 最初と最後の頁 e0025924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00259-24	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 見坂武彦	4. 巻 7
2. 論文標題 渡り鳥を介した薬剤耐性菌の長距離移動	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 78-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoe Mai, Esaki Seiji, Ikejiri Masahiro, Ito Takuya, Nagai Katsuhito, Hatsuda Yasutoshi, Hirokawa Yoshimi, Yasuhara Tomohisa, Kenzaka Takehiko, Nishinaka Toru	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of Different Attitudes toward Face-to-Face and Online Classes on Learning Outcomes in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacy	6. 最初と最後の頁 16~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmacy11010016	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 見坂武彦, 奥田絢帆, 木寺夏麗, 岩田紗矢香, 横山愛楽
2. 発表標題 北海道で繁殖するオオセグロカモメ腸内に含まれる細菌群集、餌、コリスチン耐性大腸菌の変動
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 見坂武彦, 岩田紗矢香, 奥田絢帆, 木寺夏麗, 樋池渚, 小野雄大, 横山愛楽, 上田翔太
2. 発表標題 北海道で繁殖するオオセグロカモメ腸内の細菌群集、エサ、コリスチン耐性菌の変動
3. 学会等名 日本鳥学会2023年度年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 見坂武彦
2. 発表標題 渡り鳥を介した抗菌薬耐性菌の長距離移動
3. 学会等名 摂南大学第8回融合科学研究所講演会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 上田 翔太、鶴田 悠斗、中村 優花、見坂 武彦
2. 発表標題 北海道で繁殖するカモメ腸内に含まれる細菌群集、餌、コリスチン耐性大腸菌の変動
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田 翔太、鶴田 悠斗、中村 優花、見坂 武彦
2. 発表標題 繁殖期のオオセグロカモメ腸内に含まれる細菌群集、餌、コリスチン耐性大腸菌の変動
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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