

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：82101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20611

研究課題名（和文）都市・森林景観スケールにおけるニホンジカの薬剤耐性菌拡散様式の解明

研究課題名（英文）Study on dissemination patterns of antimicrobial-resistant *E. coli* in sika deer in urban-forest landscape

研究代表者

生島 詩織 (IKUSHIMA, Shiori)

国立研究開発法人国立環境研究所・福島地域協働研究拠点・研究員

研究者番号：80967224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：奈良公園、奈良公園近隣山系、国立公園大台ヶ原に生息するシカを対象に、薬剤耐性菌の分布および個体群内外での伝播、耐性菌の遺伝子解析を行った。CTX-M産生大腸菌やキノロン耐性大腸菌は奈良公園と近隣山系のシカに分布しており、奈良公園のシカでは個体間でクローナルに伝播していた。一方で、奈良公園と奈良公園近隣山系のシカの間では、耐性菌の伝播は認められなかった。奈良公園での分離株にはST117、38、58などのパンデミック系統が含まれていた。また、奈良公園のシカで保有率が高かった系統は、腸管外病原性大腸菌、尿路病原性大腸菌、鶏病原性大腸菌など、公衆衛生への影響が懸念される系統であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、山間部から都市部に近づくにつれてシカの薬剤耐性菌の保有率が高くなること、個体群内での伝播が生じることを明らかにした。この結果は、自然環境での薬剤耐性菌の拡散防止を検討する上で、野生動物においては人間社会とかがわりが大きいことが予想される個体群を中心にモニタリングやマネジメントを実施する必要性を示している。また、奈良公園のシカからは医療や獣医療で重要な抗菌薬に耐性の病原性大腸菌が複数系統分離されたことから、観光客等に対するシカとの適切な距離の保ち方や衛生管理の行い方についての普及啓発の重要性を示した。

研究成果の概要（英文）：We aimed to study prevalence and transmission patterns of CTX-M producing and quinolone-resistant *E. coli* in deer inhabiting Nara Park, neighboring mountain area of Nara Park, Mt. Odaigahara. The resistant isolates were further examined for WGS analysis. CTX-M producing and quinolone-resistant *E. coli* were prevalent in deer in Nara Park and neighboring mountain area of Nara Park. Some lineages were clonally transmitted among deer in Nara Park, whereas transmission between populations were not observed. CTX-M and quinolone-resistant *E. coli* derived from Nara Park deer include pandemic lineages, such as ST117, 38, and 58. Furthermore, epidemic lineages in Nara Park deer were categorized into extraintestinal pathogenic *E. coli*, uropathogenic *E. coli*, and avian pathogenic *E. coli*. These results showed potential risk of transmitting pathogenic AMR bacteria to human by contact between human and deer.

研究分野：野生動物医学

キーワード：薬剤耐性菌 キノロン耐性 CTX-M産生 大腸菌 伝播 シカ 野生動物 WGS解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌に起因する感染症は、医療や獣医療における国際的脅威である。近年、とりわけ人の生活環境の近くに生息する野生動物が臨床的に重要な薬剤耐性菌を保有することが明らかとなり、人間社会から自然環境へ、または汚染の少ない人間社会への伝播者として機能することが懸念されている。奈良公園に生息するニホンジカ(以下、シカ)は観光客による餌付け、ゴミの誤飲、交通事故など、人の影響を大きく受けており、感染症管理の観点からも人-シカ間伝播が懸念される個体群である。以前の調査で、奈良公園のシカはキノロン耐性大腸菌(QREC)を高率に保有していること、その一因として複数の耐性菌クローンが個体間伝播していることを明らかにした。奈良公園のシカは奈良公園から連続する山系への移動や山系個体群との接触がある可能性が指摘されている。これらの状況を鑑みると、公園外の個体群へ耐性菌を伝播する可能性が危惧される。

### 2. 研究の目的

本研究は、QRECとCTX-M産生大腸菌(CTXE)を指標に、奈良公園と奈良公園から連続する山系のシカ個体群内外での保有状況および伝播様式を明らかにすることを目的とする。奈良公園の事例を一例とし、都市部に生息する野生動物による自然環境への耐性菌の拡散の状況を考察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 調査地および菌分離

奈良公園(N=144)、奈良公園近隣山系(奈良市山間部)(N=23)、国立公園大台ヶ原(N=30)に生息するシカから直腸糞を採取し、DHL培地、ナリジクス酸添加DHL培地(50µg/mL)、セファレキシム添加DHL培地(50µg/mL)を用い大腸菌様コロニーを分離した。分離株はPCRにて大腸菌であることを確認した。

#### (2) 薬剤感受性試験およびPFGE解析

アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、メロペネム、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、クロラムフェニコール、コリスチン、トリメトプリム・スルファメトキサゾールに対し、微量液体気釈法による薬剤感受性試験を実施した。ブレイクポイントは、CLSIの基準を参照した。キノロン系薬剤(ナリジクス酸またはシプロフロキサシン)およびセフォタキシムに耐性を示した株について、PFGE解析を行った。

#### (3) WGS解析

各パルスタイプについて原則1株ずつ(異なる耐性プロファイルを示した場合はそれらすべて)WGS解析を行った。得られたシーケンスデータを用い、Center for Genomic Epidemiologyが提供しているResFinder 4.1、VirulenceFinder 2.0、MLST 2.0、SeroTypeFinder 2.0、FimTyper 1.0、PlasmidFinder 2.1によりそれぞれ薬剤耐性遺伝子、病原遺伝子、MLST型、血清型、fimH型、プラスミドInc型を決定した。また、奈良公園シカ個体群内で蔓延していた3つのパルスタイプについては、cgMLSTおよびcgSNPに基づく系統解析を実施した。プラスミドのInc型が決定できなかった株については、Mauveによるリファレンス株との配列比較後、genoPlotRを用い、-ラクタマーゼ遺伝子のゲノム上の位置を視覚化した。

### 4. 研究成果

#### (1) 各個体群における薬剤耐性菌の保有状況

抗菌薬添加培地を用いた場合、QRECおよびCTXEの保有率は、それぞれ奈良公園で11.1%と24.3%、奈良公園近隣山系で4.3%と17.4%であり、大台ヶ原では両者とも分離されなかった。抗菌薬非添加培地を用いた場合、奈良公園のシカの1.4%からCTXEが分離された。

#### (2) PFGE法による系統解析

奈良公園ではQREC、CTXEともに個体間で共通のパルスタイプが同定された(図1、2)。すなわち、個体間伝播していることが明らかとなった。一方で奈良公園近隣山系個体群では、個体間で共通のパルスタイプは同定されず、個体間伝播の証拠は得られなかった。また、奈良公園個体群と奈良公園近隣山系個体群間でも、共通のパルスタイプは見つからなかった。以上の結果から、シカの生息密度が高い奈良公園では、想定されるルートとして、個体同士の接触や共通の汚染源の利用等により耐性菌が伝播するが、山間部に生息するシカの生活様式では耐性菌は容易に伝播する訳ではない可能性が考えられた。一方、本研究における奈良公園近隣山系個体群は奈良公園個体群よりも調査対象エリアが広く、またサンプリングした個体数も少ないことから、このようなサンプリングによるバイアスが伝播の検出、不検出に関与している可能性もある。

奈良公園のシカのCTXEは9のパルスタイプに分類され、これらのうち3つのパルスタイプは

複数の抗菌薬（カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、クロラムフェニコール、トリメトプリム・スルファメトキサゾール）に耐性を示す多剤耐性菌であった。近隣山系のシカの CTXE も、セフェム系以外の 4 系統の薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。奈良公園のシカの QREC は 8 つのパルソタイプに分類され、6 つのパルソタイプはキノロン系以外の抗菌薬に耐性を示した（アンピシリン、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、トリメトプリム・スルファメトキサゾール）が、近隣山系の QREC はキノロン系以外の抗菌薬には感受性であった。

### (3) 奈良公園のシカから分離された QREC および CTXE の全ゲノム解析

CTXE の ST 型としては、ST38 や ST58、QREC の ST 型としては ST117 など、パンデミック系統が複数同定された。CTXE からは 8 カテゴリー・23 種の薬剤耐性遺伝子が、QREC からは 3 カテゴリー・3 種の薬剤耐性遺伝子が検出された。奈良公園のシカが保有する CTXE の  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子は、CTX-M-1 グループ（CTX-M-15 および CTX-M-55）、CTX-M-9 グループ（CTX-M-14）であった。一方、奈良公園近隣山系のシカからは CTX-M-1 グループ（CTX-M-64）のみが同定された。このうち、13 の薬剤耐性遺伝子は WHO の基準に基づき整理したリストでハイリスクに分類されているものであった。病原遺伝子については、CTXE で 43 種、QREC で 42 種検出された。病原遺伝子を基にパソタイプを分類すると、CTXE、QREC とともに腸管外病原性大腸菌、尿路病原性大腸菌、鶏病原性大腸菌に該当する株が存在した。以上の結果から、臨床的に重要な薬剤耐性遺伝子や病原遺伝子を保有する大腸菌が、奈良公園のシカ個体群で拡散していることが示された。

### (4) cgSNP に基づく系統解析

cgMLST に基づく系統解析で奈良公園の株が含まれたクラスターを対象に、cgSNP 解析を行った。奈良公園のシカから分離された CTXE である ST3580 株は、アジア、アフリカ、北アメリカ、中央アメリカのトリ、ヒト、食品、水系から分離された同系統株と近縁であった。特筆すべきこととして、大津市の下水処理場から同時期に分離された ST3580 と近縁関係にあった。下水から分離される薬剤耐性菌は、人での流行を反映しているとの報告があることから、奈良公園近隣地域において、シカと人との間の伝播経路が存在する可能性が考えられた。QREC である ST117 株および ST162 株については、国内の人や鶏から分離された同系統株と最も近縁であった。以上の結果から、詳細な経路は不明であるが、奈良公園のシカと、国内の人や動物との間で薬剤耐性菌の伝播経路が存在している可能性が考えられた。

### (5) $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の存在位置解析

解析したすべての株において、transposase である IS1380 family によって  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子や *qnr* 遺伝子、およびその周辺領域は染色体に組み込まれていることが明らかとなった。過去に同様の組み込み構造が発見された ST3580 株は高い増殖率を示すことが報告されている。一方、本研究のような野外においてこの組み込みと環境中での生存やシカ個体群内での伝播の関係性は不明であり、その検証は今後の課題である。

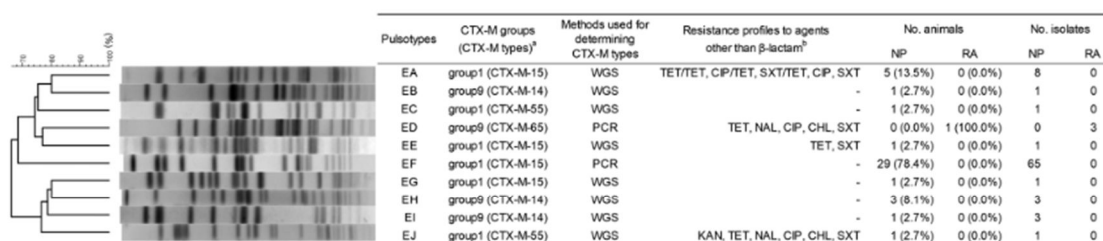
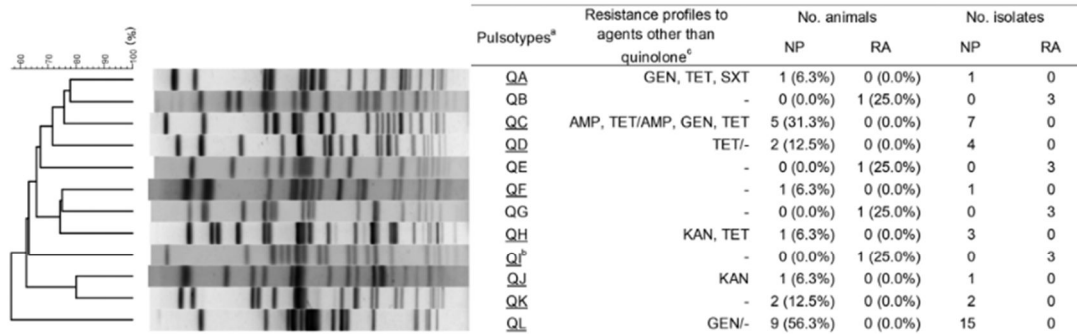


Fig. 1. A dendrogram for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles (pulsotypes) of CTX-M-producing *Escherichia coli* from 37 and 1 sika deer (*Cervus nippon*) inhabiting Nara Park (NP) and rural areas neighboring NP (RA), respectively. The pulsotypes, CTX-M groups (CTX-M types), resistance profiles to agents other than  $\beta$ -lactam, the number of animals, and the number of isolates on right-hand side correspond to each bar image on the left-hand side. <sup>a</sup> CTX-M types were identified in one isolate per pulsotype. <sup>b</sup> In EA, there were one, one, three, and three isolates resistant to TET, TET-CIP, TET-SXT, and TET-CIP-SXT, respectively. KAN, kanamycin; TET, tetracycline; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; and SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim.

図 1. 奈良公園および奈良公園近隣山系のシカから分離された CTX-M 産生大腸菌の PFGE 解析 (Ikushima et al. 2023. J Vet Med Sci 85(9):937-941)



**Fig. 2.** A dendrogram for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles (pulsotypes) of quinolone-resistant *Escherichia coli* from 16 and 4 sika deer (*Cervus nippon*) inhabiting Nara Park (NP) and rural areas neighboring NP (RA), respectively. The pulsotypes, resistance profiles to agents other than quinolone, the number of animals, and the number of isolates on right-hand side correspond to each bar image on the left-hand side. <sup>a</sup> Underlined pulsotypes were resistant to ciprofloxacin (CIP). <sup>b</sup> Two of three isolates showed resistance to CIP. <sup>c</sup> One isolate of QC, QD, and QL had additional resistance to GEN, TET, and GEN. AMP, ampicillin; GEN, gentamycin; KAN, kanamycin; TET, tetracycline; and SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim.

**図 2.** 奈良公園および奈良公園近隣山系のシカから分離されたキノロン耐性大腸菌の PFGE 解析 ( Ikushima et al. 2023. J Vet Med Sci 85(9):937-941 )

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikushima S, Torii H, Sugiyama M, Asai T	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of quinolone-resistant and extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> derived from sika deer populations of the Nara Prefecture, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 937-941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.23-0069	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 生島詩織
2. 発表標題 シカの間を伝播する薬剤耐性菌：その広がり方と人の健康への影響
3. 学会等名 日本生態学会東北地区第68回大会
4. 発表年 2023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
---------	---------