

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「動物からの薬剤耐性菌の分離と解析」

研究分担者： 楠本 正博 農研機構動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域

研究要旨

本分担課題では、野生動物を含めた環境面から薬剤耐性菌対策にアプローチしている。今年度は国内の野生シカから分離された薬剤耐性菌の遺伝学的性状を明らかにすること、養豚場および周辺環境水の微生物群や薬剤耐性遺伝子群の組成を比較解析し、薬剤耐性の伝播における相互の影響を明らかにすることを目的とした。

昨年度までに野生シカの糞便 237 検体から分離した大腸菌 848 株のうち、同一クローンを除いた 5 株の薬剤耐性株についてゲノム解析を行い、MLST 遺伝型、薬剤耐性遺伝子、プラスミドレプリコン型、病原遺伝子などを検索した。それらの組み合わせから、野生シカ由来薬剤耐性大腸菌はヒト、動物、環境由来の薬剤耐性大腸菌と比較的類似した特徴を持つことが判明した。

養豚場内の豚の糞便、原尿槽（豚の排泄物や消毒剤などを処理開始まで貯蔵するタンク）、周辺環境水（放流水および放流水が流入する用水路の上流側と下流側）についてメタゲノム解析を行った。豚糞便と周辺環境水では細菌叢および耐性遺伝子の組成が大きく異なり、放流水（廃水処理後）の遺伝子量が原尿槽（廃水処理前）に比べて著しく少ないことから、豚で選択された耐性菌（耐性遺伝子）の環境放出リスクは極めて低いことが示された。また、原尿槽では消毒剤の成分が選択圧として働いたと考えられる、豚糞便とは異なる細菌叢が形成されていたことから、環境放出リスクとしては豚の腸管内で選択された耐性遺伝子より養豚環境中で選択された耐性遺伝子の方が重要であることが示唆された。

研究協力者：

玉村 雪乃
農研機構動物衛生研究部門
細菌・寄生虫研究領域

渡部 真文
農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域

上垣 隆一
農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域

グルゲ・キールティ・シリ
農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域

A. 研究目的

近年、医療機関や市中における薬剤耐性菌の蔓延に対し、人、動物、環境の健康保全を統一的に扱おうとするワンヘルスアプローチによる対策が望まれている。本研究班では医学、獣医学、環境化学、ゲノム微生物学の専門家が結集して環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査方法を確立することを目的としている。このうち本分担課題では野生動物や畜舎付近で採取した用水路の水の薬剤耐性菌および抗菌剤汚染の現状を明らかにするとともに、文献調査（系統的レビュー）によって環境由来の薬剤耐性菌に曝露されることの動物へのリスクや曝露に対する介入の有効性について一定の見解を得ることを目的としている。

畜産農場から環境中への薬剤耐性菌の汚染を考えた場合、汚水の放流は重要な排出経路

の一つと考えられており、その実態を把握することが求められている。また、近年、通常は薬剤耐性の選択が起こらないような極めて低濃度の抗菌剤の残留でも、環境中の微生物において薬剤耐性の選択や維持が起こる可能性が指摘されており、抗菌剤そのものの汚染実態や環境挙動を把握することが必要とされている。

今年度は 1) 国内の野生シカから分離された薬剤耐性菌の遺伝学的性状を明らかにすること、2) 養豚場および周辺環境水の微生物群や薬剤耐性遺伝子群の組成を比較解析し、薬剤耐性の伝播における相互の影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 野生シカ由来薬剤耐性大腸菌の遺伝学的解析

昨年度までに野生シカの糞便 237 検体から分離した大腸菌 848 株のうち、アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、テトラサイクリン (TC)、ST 合剤 (SXT)、セファゾリン (CEZ)、セフォタキシム (CTX)、セフォキシチン (CFX)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX) のいずれかに耐性を示す 9 株の O genotype (Og) を PCR により決定した。次に、分離元の糞便検体、Og、薬剤感受性プロファイルがすべて同一の株を除いた 5 株について、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行った。得られたドラフト配列を Center for Genomic Epidemiology (<http://genomicepidemiology.org/>) の公開ウェブツール (MLST、ResFinder、PlasmidFinder、VirulenceFinder) を用いて sequence type (ST)、薬剤耐性遺伝子、プラスミドレプリコン型、病原遺伝子をそれぞれ検索した。

2. 養豚場および周辺環境水のメタゲノム解析

昨年度に引き続き、同様の手法で養豚場 3 農場 (Ⅲ、Ⅶ、Ⅷ) の周辺環境水 (放流水および用水路水) を採取し、メタゲノム解析を行った。すなわち、養豚場の放流水が流入する用水路の上流側および下流側 (放流点から上

下約 3m の地点) で水試料を採取し、同時に養豚場からの放流水も採取した。採取した水試料は UV 照射およびメタノール洗浄したポリプロピレン容器に保存し、氷冷しながら研究室に持ち帰った。持ち帰った水試料は、ただちにメンブランフィルター (0.22 μ m、セルロースアセテート、Corning, NY, USA) を用いた吸引ろ過により浮遊粒子を捕集し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行った。薬剤耐性遺伝子量は、総シーケンスリード数を 100 万とした場合の各遺伝子のリード数 (RPM) または総シーケンスリード数を 100 万とし各遺伝子の長さを 1,000 塩基とした場合の各遺伝子のリード数 (RPKM) で表した。

今年度はさらに、昨年度より農場周辺環境水と同時に採材していた農場内の豚 (発育ステージごと: 母豚、分娩房母豚、哺乳豚、離乳豚、肥育前期豚、肥育後期豚) の糞便および原尿槽 (豚の排泄物や消毒剤などを処理開始まで貯蔵するタンク) の水試料についてもメタゲノム解析を行った。糞便からの DNA 抽出には NucleoSpin Soil (タカラバイオ) を使用し、原尿槽の水については農場周辺環境水と同様の処理を行った。

C. 研究結果

1. 野生シカ由来薬剤耐性大腸菌の遺伝学的解析

解析した 9 株の遺伝学的性状を、昨年度に検討した薬剤感受性試験結果と合わせて表 1 に示す。D1133、D1205、D1399、D1477、D2028 がゲノム解析を行った 5 株であり、他の 4 株は分離元の糞便検体 (B22) および各種性状が一致する D1399 と同一のクローンと判断した。野生シカ由来薬剤耐性大腸菌は *bla*_{TEM-1A}、*aadA2*、*strA*、*strB*、*tetA*、*tetB*、*floR*、*sul1*、*sul2*、*dfrA12* など、ヒトや動物に広く分布する薬剤耐性遺伝子を保有していた (表 1)。全 5 株に見られた IncF 型レプリコン (IncFIB、IncFII) もヒトや動物に広く分布しており、薬剤耐性遺伝子の伝達に関与することが知られている。また、ゲノム解析した 5 株の大腸菌には、30 種類の病原遺伝子が存在していた (表 1)。

2. 養豚場および周辺環境水のメタゲノム解析

豚の糞便 75 検体、原尿槽の水 14 検体、農場周辺環境水 34 検体について属レベルでの細菌叢解析を行い、RPM 単位でクラスター分析（ヒートマップ分析）した結果を図 1 に示す。豚糞便については検体を採取した農場や発育ステージが異なっても細菌叢の組成は同様であった。また、農場周辺環境水（放流水および用水路の上流側と下流側）の細菌叢組成は同様であり、これらは豚糞便や原尿槽の組成とは大きく異なっていた。原尿槽の細菌叢は農場により組成が異なるが、全体的に豚糞便に近い組成であった。

耐性遺伝子（RPKM 単位）について、細菌叢と同様にクラスター分析した結果を図 2 に示す。細菌叢と同様に、豚糞便については検体を採取した農場や発育ステージが異なっても耐性遺伝子の組成は同様であった。農場周辺環境水の耐性遺伝子組成は同様であり、これが豚糞便の組成と大きく異なることも細菌叢と同様であった。原尿槽の耐性遺伝子も全体的に豚糞便に近い組成であったが、中には豚糞便より農場周辺環境水に近い組成の遺伝子（*qac* や *sul* など）も認められた。なお、放流水（廃水処理後）の遺伝子（リード）量は、原尿槽（廃水処理前）に比べて著しく少なかった。

検体採取回数の多い農場Ⅲ（図 3）および農場Ⅶ（図 4）について耐性遺伝子の組成を詳細に比較したところ、豚糞便と水試料（原尿および放流水）で組成が大きく異なっており、両農場ともに水試料において四級アンモニウムおよびスルホンアミドに対する耐性遺伝子を多く含む点特徴的であった。なお、農場Ⅲは分娩から肥育までを同一の農場で一貫して行うが、農場Ⅶは分娩と離乳～肥育を異なる農場で実施する形態（ツーサイトシステム）のため、農場Ⅶには原尿と放流水が 2 検体ずつ存在する。

図 5 には、農場Ⅲおよび農場Ⅶにおける放流水、放流水が流入する用水路の下流側、用水路の上流側の主要な耐性遺伝子について、それぞれ含有量の多い順に示す。両農場ともに、用水路上流の組成が放流水および用水路下流と若干異なるものの基本的には採水地点

によらず同様の耐性遺伝子が含まれていた。

D. 考察

ゲノム解析した 5 株の野生シカ由来薬剤耐性大腸菌のうち、D1133 株はその病原遺伝子プロファイルより非定型（atypical）腸管病原性大腸菌（aEPEC）であることが示唆された。aEPEC では、ヒト、家畜、野生動物で遺伝的関連性の高いクローンが分離された報告がある。また、大腸菌における ST137、血清型 O145（遺伝型 Og145）、IncFIB の組み合わせはヒト臨床事例でも分離報告がある。さらに、血清型やプラスミドレプリコン型の情報は乏しいが、ST154、ST711、ST6488 も家畜や環境水から分離されている。ヒトや動物に広く分布する薬剤耐性遺伝子を保有することからも、野生シカ由来薬剤耐性菌はヒト、動物、環境由来の薬剤耐性大腸菌と比較的類似した特徴を持つことが示唆された。なお、上記 5 株の薬剤耐性大腸菌が分離された野生シカは、病院、農場、河川から 10km 以内の地点で捕獲されており、過去にヒトや家畜との何らかの接触があった可能性も考えられる。

昨年度までの研究により、養豚で使用した抗菌薬の環境放出リスクは一定程度存在することが示唆されている。一方、メタゲノム解析の結果、農場によらず豚糞便と周辺環境水で細菌叢および耐性遺伝子の組成が大きく異なることから、豚で選択された耐性菌（耐性遺伝子）の環境放出リスクは極めて低いと考えられる。また、放流水（廃水処理後）の遺伝子（リード）量が原尿槽（廃水処理前）に比べて著しく少ないことも、上記の考察を支持する。なお、図 1 において *Pseudomonas*、*Burkholderia*、*Streptomyces* が全検体にわたって検出されているが、これらは多菌種で構成され環境中に広く分布する細菌属であること、今回のメタゲノム解析の解像度では菌種までは同定できないことなどから、同一の菌種が農場および周辺環境水に存在するかの情報は本データからは得られていない。

原尿槽の水試料中に豚糞便より農場周辺環境水に近い組成の遺伝子（*qac* や *sul* など）も認められたことから、原尿槽において特異的な細菌叢が形成されている可能性が高い。*qac* や *sul* は消毒剤に含まれる四級アンモニウム

やスルホンアミドに対する耐性遺伝子であることから、豚の排泄物や消毒剤などが流入した原尿槽中で消毒剤の成分が選択圧となり、豚糞便とは異なる細菌叢が形成された可能性が示唆される。したがって、放流水を経由した耐性遺伝子の環境放出という観点からは、豚の腸管内で選択された耐性遺伝子より養豚環境中(汚水の流れ、原尿槽などの貯蔵施設、処理過程など)で選択された耐性遺伝子の方が重要と考えられる。

排水の接続水域では採水地点によらず同様の耐性遺伝子が含まれていたことから、用水路の上流側および下流側における耐性遺伝子の組成は、放流水の他に養豚場の環境(放流システムや外界とのアクセスなど)の影響も大きいことが示された。図5において各採水地点で含有量の多い *sul1*、*sul2*、*tetA*、*floR*などは野生シカから分離された薬剤耐性大腸菌でも確認されている。このことから、農場周辺環境水(特に用水路上流)の耐性遺伝子組成に野生動物が関与している可能性が考えられ、その動態には引き続き注意する必要がある。

E. 結論

国内の野生シカにおける薬剤耐性菌の分布率は極めて低く、家畜との薬剤耐性菌または耐性遺伝子の往来が常時行われる状況にはないと考えられる。しかし、野生シカ由来薬剤耐性菌には薬剤耐性遺伝子や遺伝学的性状の組み合わせにヒト由来株や家畜由来株との共通点も見られることから、ヒト、動物、環境における薬剤耐性の循環に野生シカが関与する可能性も残されており、野生動物の動態には引き続き注意する必要がある。

メタゲノム解析により養豚場の放流水経路での薬剤耐性遺伝子の放出が周辺の環境水に及ぼす影響を調査したところ、豚糞便と周辺環境水では細菌叢および耐性遺伝子の組成が大きく異なり、放流水(廃水処理後)の遺伝子量が原尿槽(廃水処理前)に比べて著しく少ないことから、豚で選択された耐性菌(耐性遺伝子)の環境放出リスクは極めて低いと考えられる。また、豚の排泄物や消毒剤などが流入した原尿槽中で消毒剤の成分が選択圧となり、豚糞便とは異なる細菌叢が形成された

可能性があることから、環境放出リスクとしては豚の腸管内で選択された耐性遺伝子より養豚環境中で選択された耐性遺伝子の方が重要と考えられる。さらに、農場からの放流水が流入する用水路の上流側からも野生シカ由来薬剤耐性大腸菌と同様の耐性遺伝子が検出されることから、ヒト、家畜、環境における薬剤耐性の循環を考える際には、引き続き野生動物の動態にも注意する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Tamamura-Andoh Y, Tanaka N, Sato K, Hashiguchi Y, Arai N, Watanabe-Yanai A, Akiba M, Kusumoto M. A survey of the antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from wild sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2021, 83(5) doi: 10.1292/jvms.21-0005.

その他発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表 1. 薬剤耐性大腸菌分離株の特性

Isolate No.	Sampling place	Sample No.	O-genotype ^{a)}	Sequence type ^{b)}	Resistance profile	Resistance gene ^{c)}	Plasmid replicon ^{d)}	MIC (µg/ml)							Virulence factor gene
								AMP	CFZ	CHL	STR	TET	SXT (TMP/SMX)		
D1133	Hokkaido	A40	Og145	ST137	AMP-CFZ-CHL-TET	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Inc.FIB, Inc.R	512	2	256	32	128	0.03/0.59	<i>astA</i> , <i>chuA</i> , <i>cif</i> , <i>eae</i> , <i>eflA</i> , <i>ehxA</i> , <i>espA</i> , <i>espB</i> , <i>espJ</i> , <i>etpD</i> , <i>gad</i> , <i>iha</i> , <i>iutA</i> , <i>neuC</i> , <i>nleA</i> , <i>nleB</i> , <i>nleC</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i> , <i>tir</i> , <i>traT</i>	
D1205	Hokkaido	A61	UT	ST6488	TET	<i>tetA</i>	Inc.FIB	4	2	8	4	64	0.13/2.38	<i>lpfA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	
D1399	Hokkaido	B22	Og120	ST711	TET-SXT	<i>sul1</i> , <i>dftrA12</i> , <i>tetA</i> , <i>aadA2</i>	Inc.FIB, Inc. FII, Inc.II	4	2	2	16	64	>16/304	<i>cib</i> , <i>iss</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	
D1400	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	8	64	>16/304		
D1401	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	16	64	>16/304		
D1402	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	16	64	>16/304		
D1403	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	16	64	>16/304		
D1477	Hokkaido	B57	Og142	ST154	STR-TET	<i>sul2</i> , <i>tetB</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Inc.FIB, Inc. FII	4	2	8	32	128	0.5/9.5	<i>astA</i> , <i>gad</i> , <i>hra</i> , <i>iss</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>papC</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	
D2028	Shikoku	H28-10	UT	NA	STR-TET	<i>tetA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Inc.FII	4	1	8	64	128	0.13/2.38	<i>chuA</i> , <i>gad</i> , <i>iss</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i> , <i>usp</i>	

^{a)}UT, untypable. ^{b)}NT, not tested; NA, not assigned. ^{c)}NT, not tested. ^{d)}NT, not tested; ND, not detected. AMP, ampicillin; CFZ, cefazolin; CHL, chloramphenicol; STR, streptomycin; TET, tetracycline; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim.

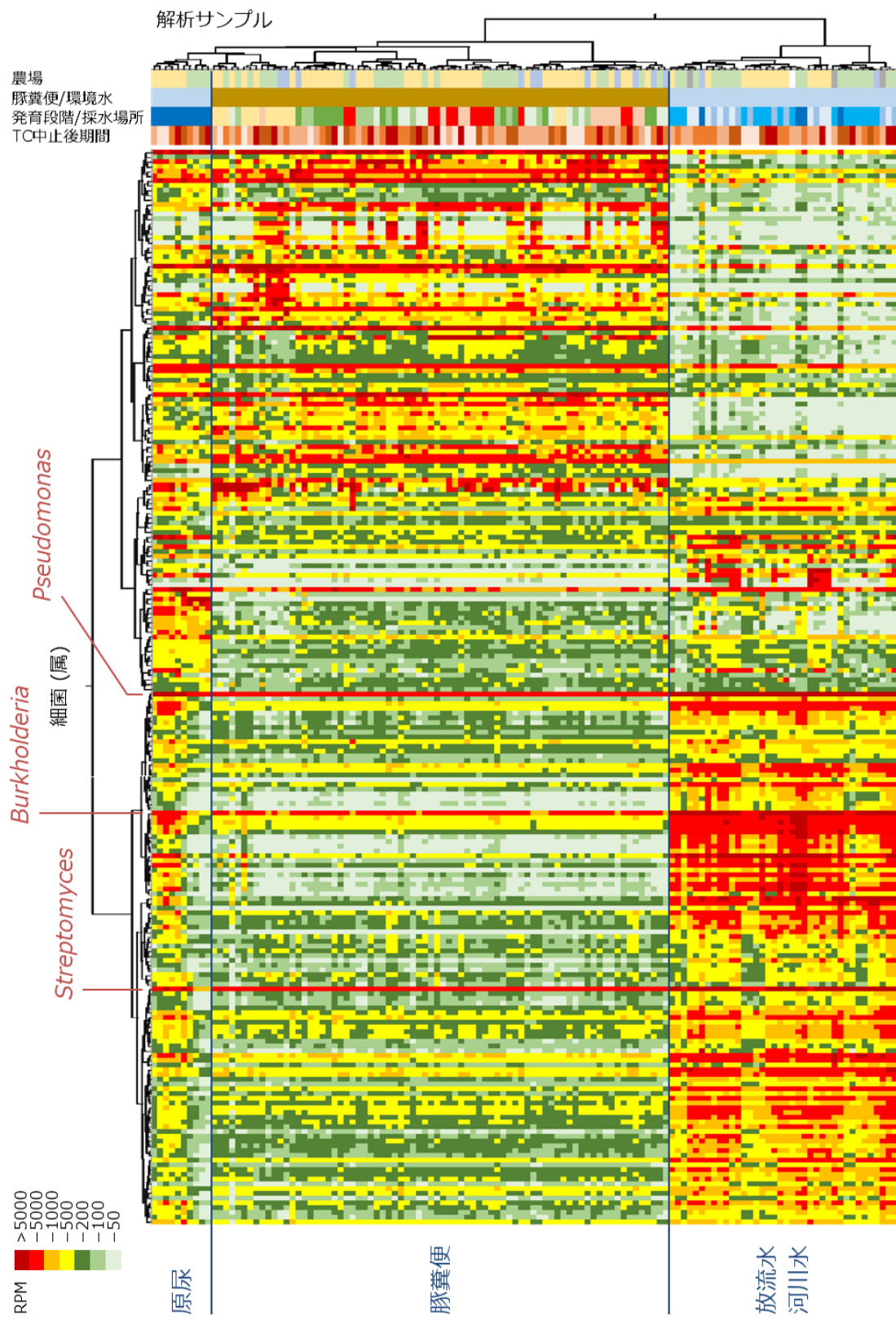


図1. メタゲノム解析サンプルにおける細菌叢の組成

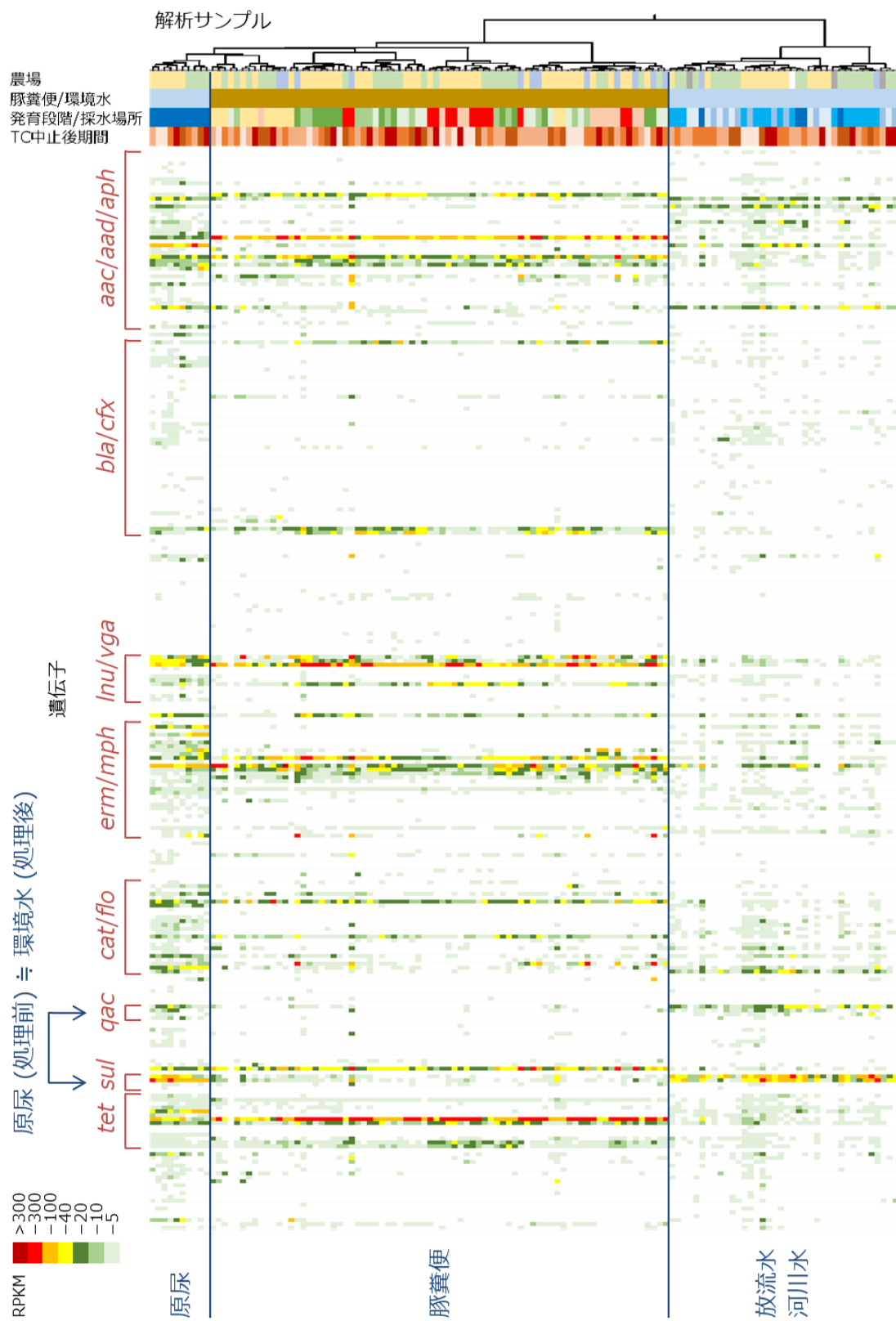


図 2. メタゲノム解析サンプルにおける耐性遺伝子の組成

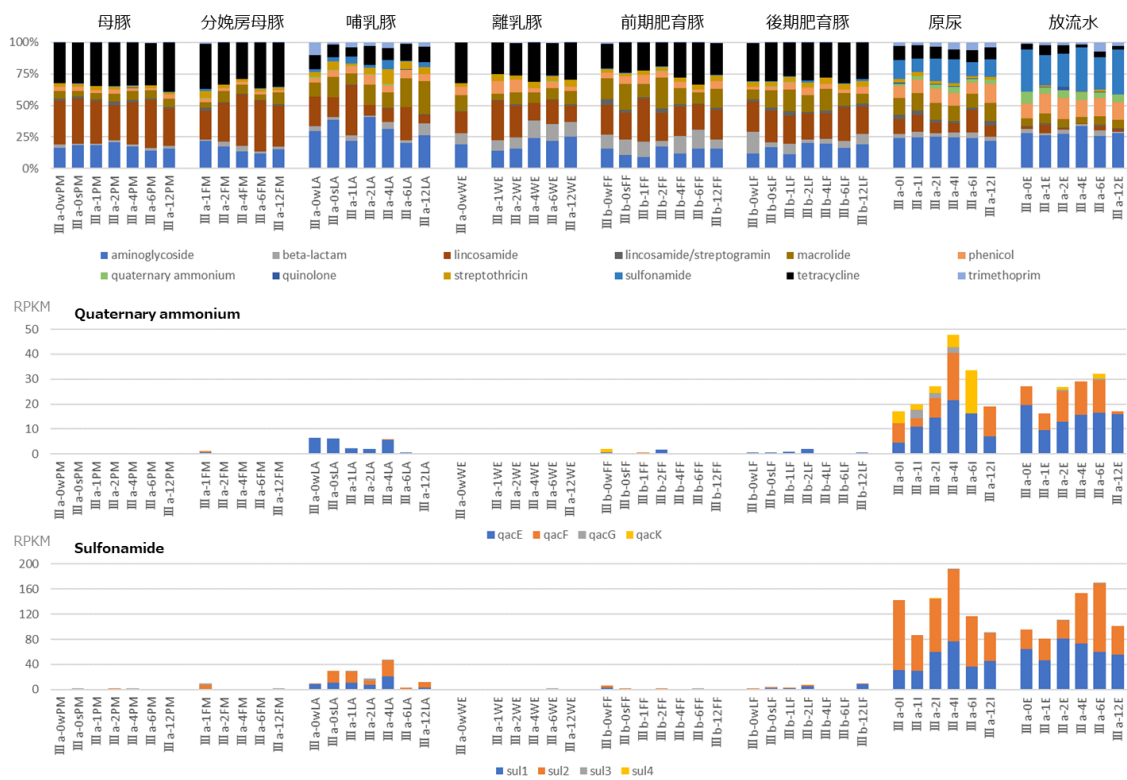


図 3. 農場Ⅲにおける耐性遺伝子の組成

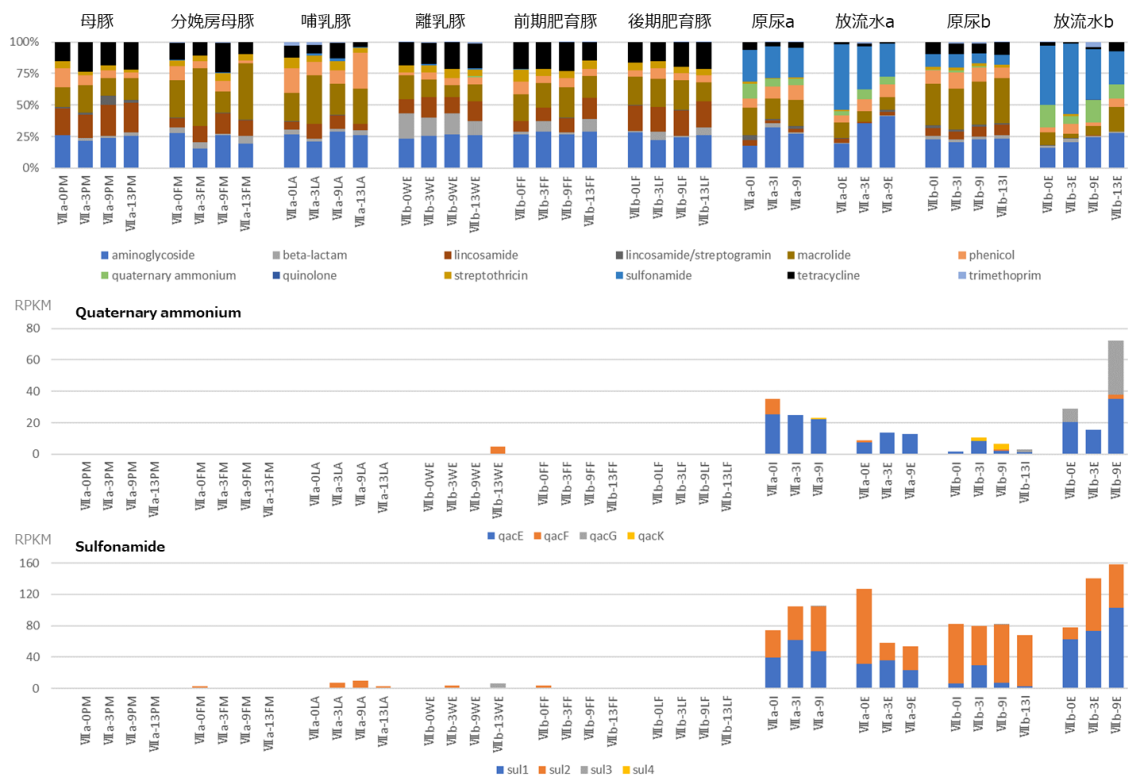


図 4. 農場VIIにおける耐性遺伝子の組成

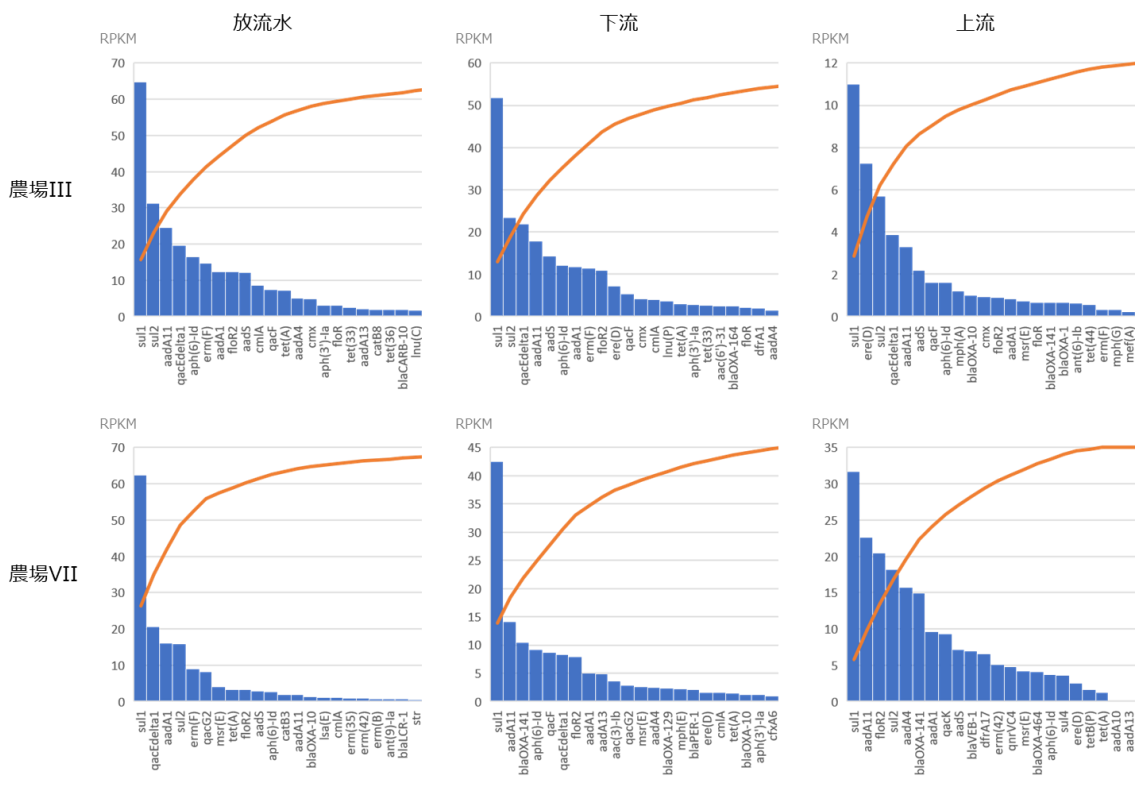


図 5. 農場IIIの接続水域における主要な耐性遺伝子