

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 「環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価」

研究分担者： 楠本 正博 農研機構動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域

研究要旨

本分担課題では、環境中の薬剤耐性が動物へ与える影響について評価することを目指し、農場環境水と家畜の間で伝達可能な耐性遺伝子および当該遺伝子を保有する細菌について解析する。

今年度は、養豚場の原尿槽（豚の排泄物や豚舎消毒後の廃水などを処理開始まで貯蔵するタンク）の水試料から分離した四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌 79 株より、四級アンモニウム耐性遺伝子（*qac*）とサルファ剤耐性遺伝子（*sul*）の両方を保有する菌株群から代表 13 株（コリネバクテリア属 4 株、ブルセラ属 3 株、フィロバクテリア属 1 株、アルカリゲネス属 1 株、コマモナス属 3 株、シュードモナス属 1 株）を選抜し、両耐性遺伝子の局在（染色体またはプラスミド）および伝達性を解析した。13 株のうちブルセラ属（菌種不明）の 2 株が 83.2 kb および 100.6 kb の *qac* および *sul* 陽性プラスミドを保有しており、特に 100.6 kb プラスミドでは一部の領域に薬剤耐性遺伝子が高度に集積されていたが、両ブルセラ属菌株から大腸菌への *qac* および *sul* 陽性プラスミドの伝達は確認できなかった。

以上のことから、農場での消毒剤の使用などにより環境（原尿槽）で選択された *qac* や *sul* を保有する耐性菌が農場内での循環を介して動物（豚）に影響を与えるリスクは低い、すなわち、これらの耐性遺伝子が他の菌に伝達し、新たに生じた耐性菌が問題となる可能性は低いと考えられる。

研究協力者：

村 雪乃	農研機構動物衛生研究部門	人獣共通感染症研究領域
渡部 真文	農研機構動物衛生研究部門	衛生管理研究領域
グルゲ・キールティ・シリ	農研機構動物衛生研究部門	衛生管理研究領域

A. 研究目的

近年では、ヒト（医療現場）や動物（畜産現場）の他に、国内外の河川や下水などの環境中からも薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルスの観点から環境の薬剤耐性（AMR）対策への関心が高まっている。抗菌剤の環境汚染による薬剤耐性菌の拡大とヒトへのリスクが懸念される中、現状では環境由来の薬剤耐性菌が生活環境へ循環し健康被害が認定された実例はなく、ヒトおよび動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。本研究班では医学、獣医学、薬学、環境化学、ゲノム微生物学、医療情報学の専門家が結集して、環

境がヒトおよび動物に与えるリスクの評価・推定、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立、環境水中の薬剤耐性菌および抗菌薬の実態に関するサーベイランスや文献レビューを行うことを目的としている。

このうち本分担課題では、環境中の薬剤耐性が動物へ与える影響について評価することを目指し、環境水（特に農場排水）と家畜の間で伝達可能な耐性遺伝子および当該遺伝子を保有する細菌について解析する。昨年度までに、農場環境（原尿槽および放流水）の特徴として、四級アンモニウムやスルホンアミド（サルファ剤）などの消毒剤成分に関連する耐性遺伝子が多いことを明らかにし、原尿

槽（豚の排泄物や豚舎消毒後の廃水などを処理開始まで貯蔵するタンク）の水試料から四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌を分離した。

今年度は、養豚場の原尿槽から分離された四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌がそれぞれ保有する *qac* および *sul* について、耐性プラスミド保有株の全ゲノム配列および本プラスミドの大腸菌への伝達性を解析し、農場環境中の薬剤耐性が家畜へ与えるリスクを評価した。

B. 研究方法

養豚場の原尿槽から収集した水試料より昨年度に分離した 79 株の四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌（図 1）について、四級アンモニウム耐性遺伝子（*qac*）およびサルファ剤耐性遺伝子（*sul*）の両方を保有する菌株群（図 1：*qac*+/*sul*+）から代表 13 株（コリネバクテリア属 4 株、ブルセラ属 3 株、フィロバクテリア属 1 株、アルカリゲネス属 1 株、コマモナス属 3 株、シュードモナス属 1 株）を選抜した。

選抜株について、S1 スクレアーゼを用いたパルスフィールドゲル電気泳動（S1-PFGE）を行い、*qacE* および *sul1* をそれぞれプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析により、両遺伝子の局在を確認した。

200 kb 以下の位置に *qacE* および *sul1* 陽性のバンドを確認できた菌株について、ロングリード型次世代シーケンサー（PacBio Sequel II：HiFi リード）を利用を用いた全ゲノム解析および Microbial Genome Assembly を用いた *de novo* アセンブリを行い、四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性プラスミドを同定した。本プラスミドが保有する他の耐性遺伝子については、ResFinder を用いて解析した。

上記の耐性プラスミドを保有する菌株について、大腸菌 C600 をレシピエントとしたフィルター法により、四級アンモニウム耐性およびサルファ剤耐性を指標としてプラスミド伝達試験を行った。

C. 研究結果

S1-PFGE およびサザンハイブリダイゼーション解析により、13 株のうちブルセラ属の 2 株（ChrSMX30-14 株と ChrBC6-2 株）において 80～100 kb 付近の位置に *qacE* および *sul1* 陽性のバンドを確認し、残りの 11 株では電気泳動ゲルのウェル付近（染色体に相当する位置）に陽性バンドを確認した。*qacE* および *sul1* 陽性株の全ゲノム解析および *de novo* アセンブリにより各コンティグは環状配列となり、ChrSMX30-14 株は 3 個（138.6 kb、102.2 kb、83.2 kb）、ChrBC6-2 株も 3 個（246.6 kb、111.0 kb、100.6 kb）のプラスミドを保有しており、両株ともに *qacE* および *sul1* は同一プラスミド上（ChrSMX30-14 株は 83.2 kb、ChrBC6-2 株は 100.6 kb）に存在していた（表 1）。

ChrSMX30-14 株の 83.2 kb プラスミド（図 2）と ChrBC6-2 株の 100.6 kb プラスミド（図 3）の遺伝子構造を比較すると、83.2 kb プラスミドにおける塩基番号 32,400～42,500、49,600～65,200、67,400～80,000 の 3 領域が 100.6 kb プラスミドと高い相同性（それぞれ 95%、98%、99%）を示したが、プラスミド全体の構造は類似していなかった。また、両プラスミドには *qacE* および *sul1* の他にも複数の薬剤耐性遺伝子があり（表 1、図 2、3）、特に 100.6 kb プラスミドの塩基番号 26,000～49,000 の領域には薬剤耐性遺伝子が高度に集積されていた（図 3）。

フィルター法によるプラスミド伝達試験の結果、ChrSMX30-14 および ChrBC6-2 両株から大腸菌 C600 への *qacE* および *sul1* 陽性プラスミドの伝達は確認できなかった（検出限界：伝達頻度 10^{-9} ）。

D. 考察

養豚場において、原尿槽には豚の排泄物のほか、豚舎の消毒に使用した消毒剤などが流入している。豚の排泄物（主に液体成分）は希釈されながら原尿槽に到達するが、昨年度までの検討から、原尿槽では豚の腸管内とは異なる選択圧の下で異なる（細菌の増殖が起こり）細菌叢を形成していると考えられる。放流水（廃水処理後）における耐性遺伝子の

総量は原尿槽（廃水処理前）に比べて著しく少ないことが明らかになっていることから、豚で選択された耐性菌（耐性遺伝子）の農場外環境への放出リスクは極めて低いと考えられるが、養豚環境中（特に菌または遺伝子濃度の高い原尿槽）で選択された耐性菌や耐性遺伝子が農場内での循環を介して動物（豚）に影響を与える可能性については慎重に検討する必要がある。

平成30～令和2年度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）「環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究」（研究代表：金森肇）では、原尿槽から収集した水試料の細菌叢で *Proteobacteria* 門の比率が最も高く、*Firmicutes* 門、*Actinobacteria* 門がそれに続くことを明らかにした。一方、昨年度までの検討では、原尿槽における主要な四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌は *Firmicutes* 門であり、*Proteobacteria* 門の耐性菌は大腸菌群選択培地を用いることで効率的に分離できるようになる程度の低含有量であることから、農場環境における消毒剤成分（四級アンモニウムやサルファ剤など）に関わる耐性菌として、大腸菌などの腸内細菌科細菌を含む *Proteobacteria* 門細菌は（存在量としては）それほど高リスクではない可能性がある。

耐性遺伝子の拡散の観点からは、昨年度までの検討から、原尿槽において四級アンモニウム耐性遺伝子 *qac* やサルファ剤耐性遺伝子 *sul* が *Proteobacteria* 門や *Actinobacteria* 門の細菌に偏在することが明らかになっている（図1）。今年度の検討の結果、原尿槽由来株のうち *qac* および *sul* 陽性プラスミドを保有する菌株はブルセラ属（*Proteobacteria* 門）の2株（共に菌種不明）のみであり、両株において *qac* および *sul* 陽性プラスミドの大腸菌への伝達性は確認できなかった。

以上のことから、農場での消毒剤の使用などにより環境（養豚場の原尿槽）で選択された *qac* や *sul* を保有する耐性菌が農場内での循環を介して動物（豚）に影響を与えるリスクは低い、すなわち、これらの耐性遺伝子が他の菌に伝達し、新たに生じた耐性菌が問題となる可能性は低いと考えられる。ただし、

原尿槽における四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌として量的に優勢な *Firmicutes* 門には、既知の伝達性耐性遺伝子によらない耐性メカニズムが存在する可能性があり、その動物へのリスクについては、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

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

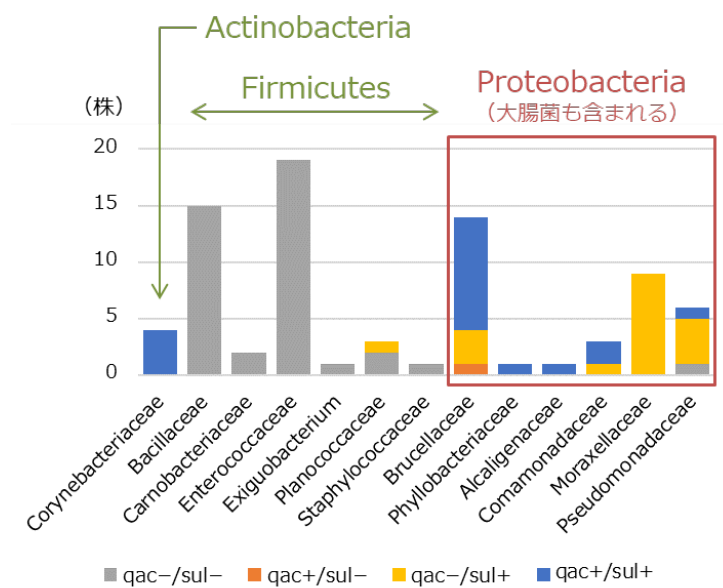


図 1 原尿槽から分離された四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性株における耐性遺伝子の分布

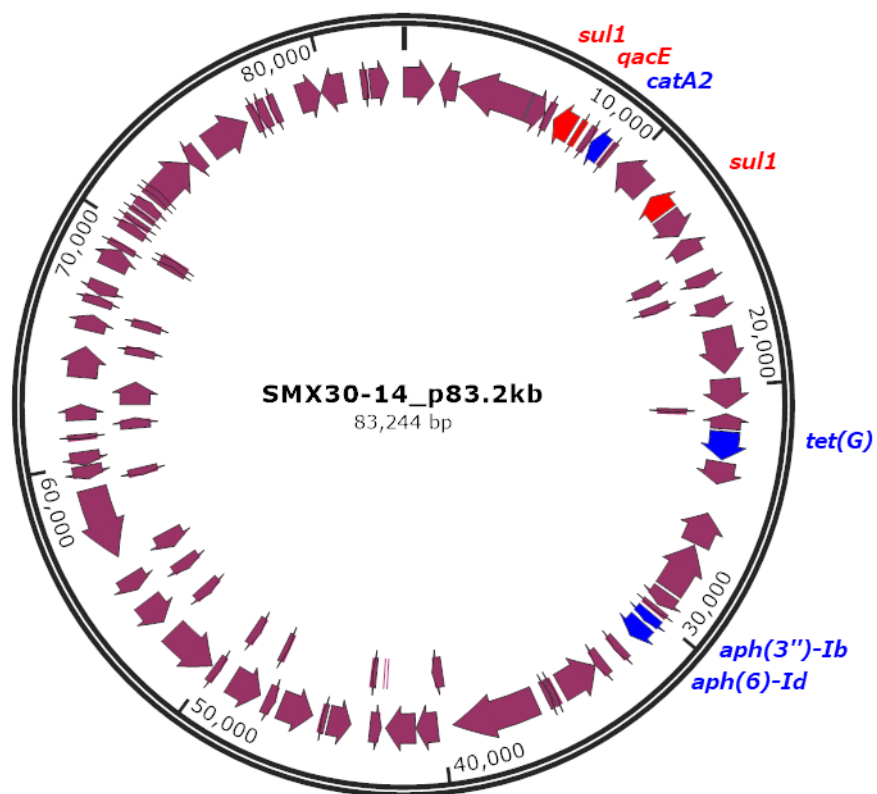


図 2 ChrSMX30-14 株の四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性プラスミド

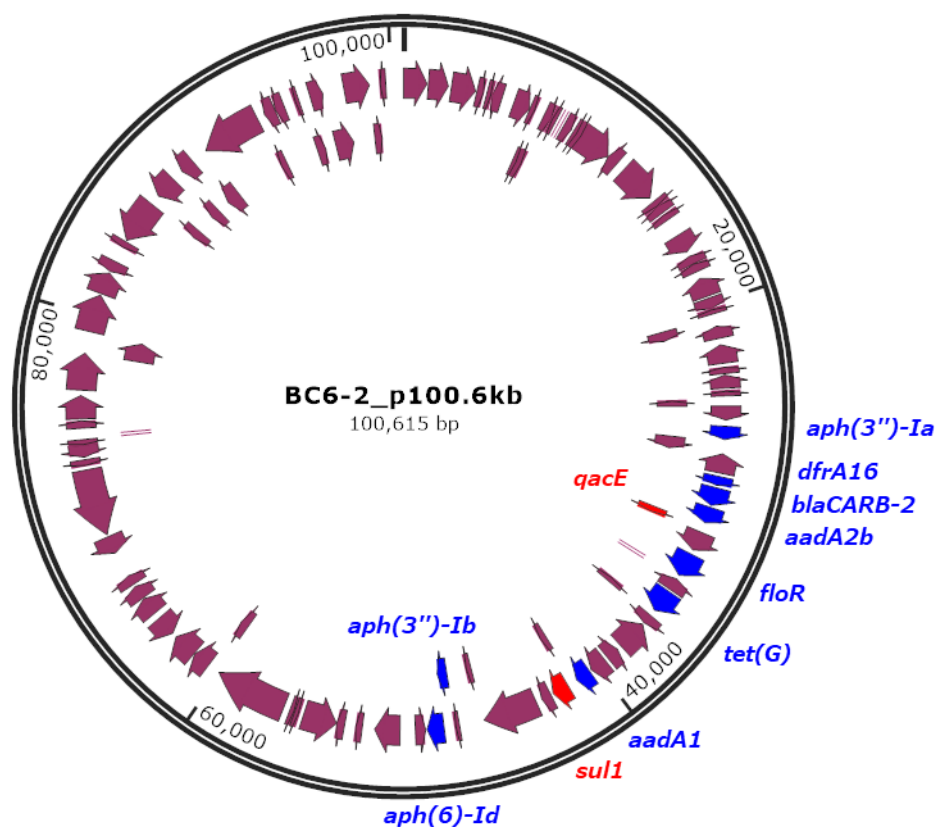


図3 ChrBC6-2株の四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性プラスミド

表1 四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性遺伝子を保有するプラスミドの概要

菌株名	細菌の分類	サイズ	<i>qac</i>	<i>sul</i>	他の耐性遺伝子
ChrSMX30-14	<i>Brucellaceae</i> (菌種不明)	83.2 kb	+	+	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>catA2</i> , <i>tet(G)</i>
ChrBC6-2	<i>Brucellaceae</i> (菌種不明)	100.6 kb	+	+	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i> , <i>blaCARB-2</i> , <i>floR</i> , <i>tet(G)</i> , <i>dfrA16</i>