

2018（平成30）年度 北陸大学特別研究助成金【 奨励・若手・女性・挑戦的 】成果報告書北 陸 大 学
学 長 殿

代表者	所属	医療保健学部	職位	助手	氏名	松村 隆弘
-----	----	--------	----	----	----	-------

研究課題名	薬剤耐性（AMR）菌を指標としたイノシシ保有の人獣共通感染症感染拡大リスク評価の検討
-------	--

交付額	800,000	円
-----	---------	---

研究成果の概要

人獣共通感染症の病原体を多く保有するイノシシがヒト居住域に侵入してきているかどうか評価方法が確立されていない。そこで市中感染によって蔓延する薬剤耐性菌を対象とし、野生のイノシシの薬剤耐性菌保有率から地域毎のイノシシのヒト居住域への侵入を評価した。対象は2019年度に捕獲された382頭のうち60頭の糞便を用いて薬剤耐性菌の検出を試み、遺伝子型を決定した。結果はキノロン耐性菌3株/3頭、AmpC産生菌1株/1頭、ESBL産生菌4株/2頭であり、AmpC産生株の遺伝子型はCIT、ESBL産生株は4株ともCTX-M-15に属することが明らかとなった。結果より市中感染の原因となるESBL産生遺伝子が検出されたことから、一部の地域ではイノシシがヒト居住域に侵入している可能性が示唆された。

研究目的 研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

近年、国内において野生動物の農作物被害やヒト居住域への侵入が各地域で発生しており、特にイノシシによる被害が石川県内でも2010年以降爆発的に増えていることが問題となっている。それに伴い、イノシシが持つ人獣共通感染症の感染リスクが高まることが懸念される。しかし、イノシシが病原体を多く保有しているにもかかわらず、石川県内での調査は実施されおらず、感染のリスク評価がされていないことが本研究の構想の経緯となった。

2016年に厚生労働省から提示されたAMRアクションプランにより動向調査が積極的に実施され、保菌状況が未知であった野生動物からもAMR菌が検出されるようになった。また、どのような経路で野生動物がヒト居住域に侵入し、AMR菌に汚染されているかは、一般的には河川からの検出率や食物の種類、家畜場の有無などで評価されている（Hosaka, Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health 2006）。しかし、個体での居住域の侵入の有無は定点ビデオカメラで捉えることは可能だが、捕獲した個体が居住域へ侵入しているかの評価は困難であり、新たな感染症拡散リスクの指標を見いだすことが望まれる。それ故、ヒト居住域に年々侵入が増えている害獣であるイノシシを対象とし、能登地区における野生イノシシの薬剤耐性菌保有個体の捕獲場所からエリア別にイノシシの侵入をモニタリングし、人獣共通感染症の感染拡大リスク評価に利用可能か検討する。

- ☐ 本研究では、以下の課題を解決し、目的を遂行する。
- 能登地区におけるイノシシの薬剤耐性菌保有率を算出
 - イノシシ捕獲マップを用いた地域特異性の評価
 - 薬剤耐性菌の保有状況からの病原体の感染拡大リスク評価法の確立

研究の方法

●薬剤耐性菌検出方法

検査対象は2018年4月～2019年3月に石川県能登地区のイノシシ食肉加工場で捕獲されたイノシシ382頭のうち60頭（雄：36頭、雌：24頭）の糞便を使用した。糞便の採取方法は解体時に腸管から直接採取した。薬剤耐性菌スクリーニング検査ではドリガルスキー培地に糞便を塗抹し、Cefazolin (CEZ)、Piperacillin (PIPC)、Meropenem (MEPM)、Ceftadizime (CAZ)、Cefotaxime (CTX)、Ciprofloxacin (CPFX)の薬剤ディスクを載せ、36℃/20時間培養し、判定をした。耐性菌疑いコロニーが検出された場合、グラム染色及び確認試験、BD BBLCRYSTAL E/NF同定検査試薬を用い、菌種を同定した。ESBL産生大腸菌及びAmpC産生大腸菌が検出された場合、ESBL遺伝子(TEM、SHV、CTX-M)、AmpCβラクタマーゼ遺伝子(MOX、CIT、DHA、ACC、EBC、FOX)をターゲットとしたPCRを実施し、増幅産物をサンガーシーケンス解析及びNJ法による系統樹解析にて遺伝子型を決定した。

●イノシシ捕獲マップの作成

一頭毎に捕獲場所を記録し、アプリケーション(Google Earth Pro)を用いて捕獲場所を記した。また、地域毎（宝達志水町、羽咋市、中能登町、七尾市、志賀町）の耐性菌検出率を示した。

●**薬剤耐性菌検査結果**：スクリーニング検査で陽性となった個体は39/60（陽性率65.0%）、全78株であった。同定検査にて大腸菌と同定された株は9株であり、薬剤耐性大腸菌保有個体は5頭、内キノロン耐性菌3株/3頭、AmpC産生菌1株/1頭、ESBL産生菌4株/2頭であった。残りの1株の大腸菌は確認試験にて中間耐性であった。カルバペネム耐性菌は検出されなかった。

●**遺伝子型検査結果**：NJ法による系統樹解析にてAmpC産生株の遺伝子型はCIT、ESBL産生株は4株ともCTX-M-15型に属することが明らかとなった。

●**各地域のイノシシ捕獲数と薬剤耐性大腸菌保有個体率**：各地域の捕獲数及び薬剤耐性大腸菌保有個体率を次に示す。宝達志水町（1/14頭、7.1%）、羽咋市（1/24頭、4.2%）、中能登町（0/5頭、0.0%）、七尾市（1/3頭、33.3%）、志賀町（2/14頭、14.3%）であった。またキノロン耐性菌は宝達志水町、羽咋市、志賀町で検出され、AmpC産生菌は七尾市、ESBL産生大腸菌は志賀町のみに検出された。

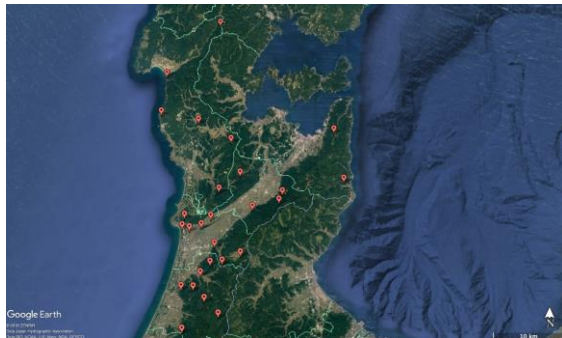


図1 イノシシ捕獲場所



図2 地域毎の薬剤耐性菌検出率

考察

●**スクリーニング検査の改善**：今回、スクリーニング検査において真の陽性率は11.5%（9/78株）のみとなり、69株は第1世代セフェム系のCEZに対して自然耐性を保有する *Enterobacter* sp. 及び *Citrobacter* sp.等のグラム陰性菌であった。また、CEZのみに耐性を示した株からAmpC産生やESBL産生菌株は検出されなかった。そのため今後、本検査を実施する際には、CEZを使用せずに効率よく検出可能であることが示された。これにより、検査費用の削減が望まれる。

●**近県におけるイノシシの薬剤耐性菌検出状況との相違**：本邦でのイノシシが保有する薬剤耐性大腸菌の疫学調査は少なく、岐阜県ではESBL産生菌保有検体が5/36検体、キノロン耐性菌保有検体が10/36検体¹⁾、富山県ではキノロン耐性菌保有検体が3/76検体²⁾との報告がある。今回の結果と比較すると今回得られたESBL遺伝子型は全てCTX-M-15型であり、岐阜県では他の遺伝子型が検出され、富山県では検出されていないことから、能登地方におけるイノシシが保有するESBL産生大腸菌は隣接している岐阜県や富山県由来でないことが考えられた。また、キノロン耐性菌については本研究において遺伝子型の決定を実施していないため比較検討はできなかった。今後、キノロン耐性遺伝子についても解析実施を検討する。

●**能登地域におけるESBL産生菌の分布について**：ESBL産生菌は志賀町でのみ検出され、有意差は認められなかったが、邑知潟平野によって山地が分断されているため、邑知潟平野より北部で蔓延している可能性が示唆された。また、CTX-M-15型は世界各国で優位に検出されており、市中感染の原因菌として検出されることも問題となっているため³⁾、今回捕獲されたイノシシはヒト居住域と交流している可能性が考えられた。しかし、石川県では臨床現場から検出されたESBL産生菌の遺伝子型は報告されておらず、臨床との比較はできなかった。

まとめ

今回、初めて石川県におけるイノシシが保有する薬剤耐性大腸菌について調査を実施した。そこで市中感染の原因となるESBL産生遺伝子が検出されたことから、一部の地域ではイノシシがヒト居住域に侵入している可能性が示唆された。しかし、養豚、養鶏、牧場との交流の可能性も考えられるため、付近の排水についての調査が今後の課題となる。

1) 浅井鉄夫, 他: 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランで注目される耐性菌-動物-, 臨床と微生物, 2017; 44, 303-308.

2) 木全恵子, 他: 富山県におけるイノシシの病原細菌及び薬剤耐性菌保有状況調査, 公益財団法人 大同生命厚生事業団 地域保険福祉研究助成報告, 2017; 59-63.

3) Pitout J D, et al: Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary health region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1281-6

主な発表論文等 論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい

第31回 臨床微生物学会総会・学術集会 演題登録予定

2020/1 発表予定