

研究経過報告書

1. 研究課題名 鳥類糞便由来ヒト病原細菌・薬剤耐性菌の解析
2. 研究代表者氏名 田邊 瑞来
3. 研究発表

・論文

1. Sakaguchi K, **Tanabe M (共同筆頭著者)**, Takizawa S, Kasahara S, Denda T, Koide S, Hayashi W, Nagano Y, Nagano N. Zoonotic potential and antimicrobial resistance of *Escherichia* spp. in urban crows in Japan-first detection of *E. marmotae* and *E. ruyisiae*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. (in press). <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102040>.
2. Soga E, Sakaguchi K, Takizawa S, **Tanabe M**, Denda T, Koide S, Hayashi W, Kasahara S, Nagano Y, Nagano N. Emergence of *Vibrio cincinnatiensis*, a rare human pathogen, in urban crows. *Microbiol Spectr*. 2023 Feb 14;11(1):e0392522. doi: 10.1128/spectrum.03925-22.

上記2論文については、FundingまたはAcknowledgments sectionにMorinomiyako Medical Research Foundationから助成を受けた研究である旨記載している。

・学会発表

1. **Tanabe M**, Denda T, Nagano Y, Nagano N/ Zoonotic risk and antimicrobial resistance of *Escherichia* spp. from urban crows in Japan: occurrence of rare human pathogens, *E. marmotae* and *E. ruyisiae*/16th Molecular Epidemiology and Evolutional Genetic of Infectious Diseases Conference/2023/11【Poster presentation (予定)】
2. 瀧澤志野, 坂口かなえ, **田邊瑞来**, 伝田智宏, 林航, 小出将太, 曾我英司, 笠原里恵, 長野由紀子, 長野則之/市街地生息カラスの糞便由来 *Escherichia coli* の遺伝系統と病原因子遺伝子, 薬剤耐性遺伝子の保有実態/第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会/神奈川県/2023/2【口演】
3. 坂口かなえ, 瀧澤志野, 曾我英司, **田邊瑞来**, 伝田智宏, 小出将太, 林航, 笠原里恵, 長野由紀子, 長野則之/市街地生息カラスの糞便で初めて確認された人獣共通感染症希少病原細菌/第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会/神奈川県/2023/2【口演】
4. **田邊瑞来**, 伝田智宏, 坂口かなえ, 瀧澤志野, 林航, 小出将太, 曾我英司, 笠原里恵, 長野由紀子, 長野則之/市街地を行動範囲とするカラスの糞便由来ヒト希少感染症病原体の解析/第46回長野県臨床検査学会/Web開催/2022/12【口演】
5. 伝田智宏, **田邊瑞来**, 坂口かなえ, 瀧澤志野, 林航, 小出将太, 曾我英司, 笠原里恵, 長野由紀子, 長野則之/カラス糞便由来 *Escherichia coli* の遺伝系統と保有病原因子・耐性遺伝子/第46回長野県臨床検査学会/Web開催/2022/12【口演】
6. 瀧澤志野, 曾我英司, 坂口かなえ, **田邊瑞来**, 伝田智宏, 小出将太, 林航, 長野由紀子, 長野則之/市街地生息カラスにおける人獣共通感染症希少病原体 *Escherichia marmotae*, *E. ruyisiae*, *Vibrio cincinnatiensis* の出現/第51回薬剤耐性菌研究会/群馬/2022/11【口演】
7. 坂口かなえ, 瀧澤志野, 伝田智宏, **田邊瑞来**, 曾我英司, 小出将太, 林航, 長野由紀子, 長野則之/市街地生息カラス由来 *Escherichia coli* の薬剤耐性と人獣共通感染症の潜在的病原性の評価/第51回薬剤耐性菌研究会/群馬/2022/11【口演】
8. 坂口かなえ, 瀧澤志野, **田邊瑞来**, 伝田智宏, 林航, 小出将太, 曾我英司, 笠原里恵, 長野由紀子, 長野則之/カラス糞便由来 *Escherichia coli* の遺伝系統と薬剤耐性解析/第16回日本臨床検査学教育学会学術大会/埼玉県/2022/8【口演】
9. 瀧澤志野, 坂口かなえ, **田邊瑞来**, 伝田智宏, 林航, 小出将太, 曾我英司, 笠原里恵, 長野由紀子, 長野則之/市街地のカラス糞便から検出されたヒト希少感染症病原体の解析/第16回日本臨床検査学教育学会学術大会/埼玉県/2022/8【口演】

4. 研究実績

市街地生息カラスで初めて確認された人獣共通感染症希少病原体に関する研究

【目的】市街地に生息し、ヒトと生活行動圏を共有するカラスにおけるヒト病原菌や薬剤耐性菌の保有状況はほとんど知られていない。本研究ではカラスの糞便から検出された *Escherichia* spp. 及び *Vibrio* spp. の菌種確定とそれらの病原的意義について明らかにする。

【材料と方法】2021年11月～2022年3月に諏訪市街地の集団鳩にて採取した5個体の新鮮落下糞便から検出された *Escherichia* spp. 3株、*Vibrio* spp. 2株を対象とした。生化学性状試験（用手法・VITEK 2）、MALDI-TOF MSによる菌種の同定、全ゲノム解析による菌種の確認並びに病原因子遺伝子の探索等を実施した。

【結果と考察】*Escherichia* spp. 3株は VITEK 2 で 2株 (strains C10-1, C54) が *E. coli* (同定確率 99%)、1株 (strain C61-1) がインドール産生性と運動性の追加試験で *E. coli* と同定された。また、これら C10-1, C54, C61-1 の 3株は MALDI-TOF MS でも各々 score 2.09, 2.08, 2.33 で *E. coli* と同定された。しかしながら、phylogroup 解析で C10-1, C54 が cryptic clade V, C61-1 が cryptic clade III に分類されたことから、ゲノム配列に基づく dDDH 解析を行った。その結果、C10-1, C54 は *E. marmotae* HT073016 と各々 dDDH 94.8%, 94.7% の類似度を示し (菌種分類の threshold は 70% DDH)、さらに *E. marmotae* HT073016 に対し 99.37% の ANI 値が得られたことからこれら 2株は *E. marmotae* であることが確認された。一方、C61-1 は *E. ruysiae* C15-8 との間で dDDH 89.9%, ANI 値 98.85% を示したことから *E. ruysiae* であることが確認された。

E. marmotae C10-1 は O-nontypeable, H56, ST13063 (新規 ST)、*fimH160*, C54 は O-nontypeable, H56, ST5500, *fimH630*, *E. ruysiae* C61-1 は O13, H56, ST5345, *fimH613* と各々異なる遺伝系統であった。これら 3株はヒト病原性大腸菌の病原因子遺伝子を保有していた。すなわち、EAEC (腸管凝集性大腸菌) 耐熱性毒素 EAST1 遺伝子 *astA* を共有し、さらに C10-1 は EAEC が高頻度に保有する *aaic* を含む T6SS 遺伝子群から成る pathogenicity island 領域を保有していた。加えて 3株は *kpsMII* (K2 capsular antigen) 及び *papC* (P fimbriae) を保有し ExPEC (腸管外病原性大腸菌) に分類された。これら 3株の系統的位置を明らかにする目的で、NCBI データベースより取得した種々材料由来 *E. marmotae* 52株、*E. ruysiae* 12株の登録ゲノム配列を加えた全 67株のゲノム系統解析を実施した。本報の *E. marmotae* 2株はヒト臨床由来株とクラスターを形成したのが注目される。*E. ruysiae* については登録ゲノム数が少なくヒト由来株との関連性については不明であった。

E. marmotae は 2015年、*E. ruysiae* は 2021年に新規な菌種として報告された。*E. marmotae* については敗血症などのヒト侵襲性感染症事例、また、*E. ruysiae* については海外旅行者下痢症患者からの検出事例が報告されている。これらの菌種は臨床検査では *E. coli* と誤同定される可能性が高く、ヒト感染症における潜在的な広がりの実態を把握することが急務と考える。

Vibrio spp. 2株 (strains C6-3, C12-3) は TCBS 寒天培地で白糖分解性のコロニーとして確認され、好塩性試験で NaCl 0% で発育せず、3% で良好な発育を示した。VITEK 2 では C6-3 は同定不能、C12-3 は *V. fluvialis* (同定確率 95%) と同定された。*Vibrio* 属の菌種同定の目的で Manual of Clinical Microbiology に従い追加試験を実施した結果、2株共に *V. cincinnatiensis* と同定された。MALDI-TOF MS でも *V. cincinnatiensis* との同定結果が得られたが C6-3, C12-3 共に低 score (1.74, 1.79) を示し信頼性は低いものであった。ゲノム配列に基づく dDDH 解析を行った。その結果、C6-3, C12-3 は *Vibrio cincinnatiensis* DSM 19608 と各々 dDDH 93.9%, 94.8% の類似度を示し、さらに *V. cincinnatiensis* DSM 19608 に対し C6-3 が 99.36%, C12-3 が 99.41% の ANI 値が得られたことからこれら 2株は *V. cincinnatiensis* であることが確認された。

V. cincinnatiensis 2株はカルバペネム系薬を含めたβ-ラクタム系薬に低感受性 (C12-3) 又は耐性 (C6-3) を示したが、β-ラクタマーゼ産生性は認められなかった。2株は T2SS, T6SS や stress tolerance, quorum sensing 及び chemotaxis 関連遺伝子群などの病原因子遺伝子を保有していた。本菌については米国の髄膜炎患者やドイツの腸炎患者からの分離報告があるが、いずれも海水や海産物との関連性は認められていない。本報の *V. cincinnatiensis* も地理的に海洋と関連性のないカラスより検出されており、その獲得経路は不明である。

本研究で検出された 3菌種のカラスからの分離は世界で初めてである。これらの新規なヒト病原菌が、ヒトと生活圏を

共有するカラスの糞便より検出されたことは、人獣共通感染症の観点から公衆衛生上重要な問題を提起していると考えられる。

市街地生息カラスの糞便由来 *Escherichia coli* の遺伝系統と病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子の保有実態に関する研究

【目的】One health の観点から野鳥は人獣共通感染症病原体や薬剤耐性菌のリザーバーとしてそれらの伝播・拡散に関わる可能性がある。雑食性のカラスは野鳥の中でもヒト生活圏に近いにも関わらず、カラス由来 *Escherichia coli* の知見は国内外で未だ不十分である。本研究では市街地に生息するカラスの糞便由来 *E. coli* を対象に遺伝系統及び保有する病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子を探索した。

【材料と方法】2021年11月～2022年3月の夕刻に松本市・諏訪市の集団場でカラス65個体の新鮮落下糞便を採取した。*E. coli* の検出にはTBX寒天培地、クモアガー-mSuper CARBA/ESBL分画培地、コリスチン1 µg/mL含有TBX寒天培地を用いた。MALDI-TOF-MSにより*E. coli*と同定された菌株を対象に全ゲノム解析及びMIC測定を実施した。

【結果と考察】カラス65個体中27個体(41.5%)の糞便から推定*E. coli*34株が検出され、MALDI-TOF-MSで全株が*E. coli*と同定された。しかしながら、全ゲノム配列の類似度に基づくANI解析により31株が*E. coli*と確認された。*E. coli*パンゲノム中の全ORFの遺伝子アレールに基づくwgMLST及びゲノム配列間の距離に基づく相似度解析を行った結果、2つのアプローチで得られた遺伝系統のクラスターは一致し、phylogroup毎に分別されることが明らかとなった。*E. coli*のphylogroupはB1系統群が16株(51.6%)と大半を占めたが、それらのSTは新規ST13297を含め多様であった。一方、ヒトで病原性が高いとされるB2系統群が7株(22.6%)、D系統群が5株(16.1%)検出された。

*E. coli*31株は多くのヒト病原性大腸菌の病原因子遺伝子を保有していた。特にB2系統群の5株を含めた9株が*iutA* (aerobactin receptor), *kpsMII* (K2 capsular antigen), *papC* (P fimbriae)のいずれか2つ以上を保有しExPEC(腸管外病原性大腸菌)に分類された。また、B2系統群全7株が*chuA* (heme binding), *fyuA* (yersiniabactin receptor), *vat* (vacuolating toxin), *yfcV* (fimbrial subunit)のいずれか3つ以上を保有しUPEC(尿路病原性大腸菌)に分類された。さらにB2-O6:H5-ST83-*fimH21*の2株は他の遺伝系統と比較した場合、ヒトの尿路感染症・敗血症と関連するNTEC-1(細胞壊死因子産生性大腸菌)の病原性に重要な細胞毒性壊死因子遺伝子*cnf1* (cytotoxic necrotizing factor 1)や、多くの鳥類病原性大腸菌(APEC)関連病原遺伝子を保有する点で特徴的であった。また、ExPECのB2-O6:H1-ST73-*fimH30*の3株では重要な分泌毒素として細胞傷害性に関わるclass1 SPATE遺伝子*sat*及び腸管定着に関わるclass2 SPATE遺伝子*pic*の保有が認められた。*E. coli*31株19株で確認された*lpfA*はヒト、動物の上皮細胞への侵入能と関わる長極性線毛の遺伝子としてEAEC(腸管凝集性大腸菌)に認められている。

ヒト临床上重要な薬剤耐性菌としてプラスミド性コリスチン耐性遺伝子*mcr-1*保有*E. coli*3株、*bla*_{CTX-M-55} ESBL遺伝子保有*E. coli*1株が検出された。*mcr-1*保有*E. coli*B1-O88:H8-ST446-*fimH54*の3株におけるコリスチンのMICは8 µg/mLで、*E. coli*NEB10-beta形質転換株のコリスチンMICも4-8 µg/mLと耐性であった。*E. coli*3株が保有する*mcr-1*はIncI2プラスミド(全長60,727 bp)に担われていたが、これらのプラスミドの塩基配列はshufflon領域を除き99.99%以上の一致率を示した。さらにわれわれの先行研究で松本市下水処理場の流入下水から検出された*mcr-1*保有IncI2プラスミドの全塩基配列と高い配列類似性を示していたことが注目される。*bla*_{CTX-M-55}保有*E. coli*B1-O(non-typeable):H23-ST224-*fimH39*の1株は他系統の薬剤に対する耐性遺伝子*strA*, *strB*, *aadA5*, *sul2*, *dfrA17*, *tet(A)*も保有しており、GyrA(S83L, D87N)及びParC(S80I)のQRDRにもアミノ酸置換を有しキノロン系薬剤耐性であった。また*bla*_{TEM-1B}, *aph(3')-Ia*, *strA*, *strB*, *aadA5*, *sul1*, *sul2*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA14*, *tet(B)*などの薬剤耐性遺伝子保有株も複数の株で認められた。

本報はこれまでに知られていなかったカラス由来*E. coli*の遺伝系統について明らかにしたものである。さらには人獣共通感染症の観点からヒト病原因子遺伝子や薬剤耐性遺伝子の保有状況についても探索した。その結果、ヒト病原性大腸菌の存在が明らかとなった。さらにカラスからのプラスミド性コリスチン耐性遺伝子*mcr-1*保有*E. coli*の世界で初めての検出、ESBL産生*E. coli*の国内で初めての検出は公衆衛生上の重大な脅威となり得る。本研究の知見からカラスなど

の野鳥や野生動物における人獣共通感染症病原菌・薬剤耐性菌の継続的な調査・監視が急務であるとする。