

実験動物マウスおよびラットにおける薬剤耐性菌

山中仁木

信州大学基盤研究支援センター

動物実験支援部門

要 約

薬剤耐性菌による人類への健康被害を危惧し世界保健機関による“One Health”の考えの下、国内では畜産動物やペットなどの伴侶動物、あるいは環境における薬剤耐性菌モニタリング調査が行われている。一方、実験動物における薬剤耐性菌の検出について報告は数少ない。実験動物生産業者において、特にマウスおよびラットへの抗生剤の使用は現在ないと思われるが、飼養者や実験者は病原体排除や実験処置のために抗生剤を頻繁に使用している。抗生剤の使用は選択圧となり、各個体において薬剤耐性菌が優勢化し、細菌間で耐性遺伝子が移行し拡大も起こりうる。もちろん、耐性菌のヒトや環境への移行も可能性として考慮する必要がある。実験動物においては、生体反応に影響し実験精度を大きく左右することも想定しておかなければならない。これまでの報告では、実験用マウスおよびラットにおいて薬剤耐性菌は少なからず検出されている。実験動物における薬剤耐性菌の存在とその影響について、今一度認識しておく必要があるのではないだろうか。

1. はじめに

薬剤耐性菌の蔓延による人類の健康被害に対する危機感から世界保健機関（WHO）より「Global Action Plan on Antimicrobial Resistance」が示された。日本ではこれを受けて「薬剤耐性対策アクションプラン（2016–2020）」を策定し“One Health”を基本概念として、現在ヒト・動物・環境における薬剤耐性菌の出現についてモニタリング調査が進められ結果が公表されている。動物では食用となる畜産動物や伴侶動物における調査である。実験動物として利用される霊長類やブタなどの畜産動物では、疾病治療や実験処置後の抗生剤投与など処置後に存命させる場合が多く、薬剤耐性菌の動向は比較的食用の畜産動物や伴侶動物の調査結果に近いのではないかと想像する。

実験動物生産業者のほとんどは、販売するマウスおよびラットについて微生物検査項目を設定し、それら病原体が存在しない Specific Pathogen Free (SPF) と保証している。また、生産業者においてマウスおよびラットへの抗生剤の近年の使用歴は無いと思われる。一方、それらの動物を入手した後、飼養者あるいは研究者により、微生物排除あるいは研究のために抗生剤が投与されている。その際、薬剤耐性菌の優勢化あるいは新たな出現、他系統や他動物種への水平伝播について注意する必要はないだろうか。多くの疫学的調査結果は、家畜や伴侶動物と濃厚に

接触する飼育者や獣医師で同様の薬剤耐性菌が検出され、動物間および動物-ヒト間で直接薬剤耐性菌が移行していることを示唆している [1]。

著者らは、各生産業者から搬入直後の各系統マウスから低度バンコマイシン耐性腸球菌を分離し、その分離菌の一部はバンコマイシン以外の抗生剤にも耐性を示す多剤耐性であることを報告してきた [2, 3]。さて、この薬剤耐性菌はどこから実験動物マウスに入りこんだのだろうか。これらの多剤耐性腸球菌が一部系統マウスに生息することで、実験データの精度に影響は出ないのだろうか。飼養者あるいは実験者への耐性菌の移行はないのだろうか。本稿では、実験動物、特にマウスやラットにおける薬剤耐性菌の存在とそこから考えられることを述べ、読者には薬剤耐性菌が実験動物に存在することの影響について、改めて考える機会にさせていただければと思う。

2. 薬剤耐性菌の出現メカニズムと耐性機構

細菌がある抗生剤に対し耐性となるメカニズムは大きく二つあり、遺伝子の変異と耐性遺伝子の水平伝播である。

遺伝子変異による耐性の例として、キノロン系薬剤耐性菌におけるトポイソメラーゼの1種であるDNA ジャイレースやトポイソメラーゼ IV の各サブユニット分子 GyrA と GyrB または ParC と ParE のア

ミノ酸変異がある。本来キノロン系薬剤は菌の DNA 複製時に重要な働きをするトポイソメラーゼに結合し菌の DNA 複製を阻害する。これらのトポイソメラーゼアミノ酸配列の内、キノロン耐性決定領域 (QRDR) と呼ばれる領域にアミノ酸変異が起こると、キノロン系薬剤が結合できず DNA 複製は阻害されないため菌は耐性となる。更に、抗生剤の使用が選択圧となり耐性菌が優勢化し多重の変異を誘導することで高度耐性菌が出現することにもなる [1]。

水平伝播は、トランスポゾンなどによる耐性遺伝子の移動や接合による耐性遺伝子を有するプラスミドの移動が菌種あるいは菌属間で起こる。高度バンコマイシン耐性を示す耐性遺伝子 *vanA* やカルバペネムを含む多くの β ラクタム剤を不活化する酵素をコードするニューデリー・メタロ β ラクタマーゼ-1 (NDM-1) もプラスミドの移行により拡大すると考えられている。また、多くの薬剤耐性遺伝子がトランスポゾン関連領域に含まれていることが報告されている。薬剤耐性機構として、アミノ酸変異による抗生剤の無効化や薬剤不活化酵素の産生の他に、抗生剤結合を阻害する因子の産生、膜透過性の低下、薬剤排出ポンプによる薬剤感受性の低下などが挙げられ、これらをコードする耐性遺伝子もトランスポゾンやプラスミドを介して移動することがわかっている。

薬剤耐性となった菌は、保有するヒトや動物から直接ヒト-ヒト、動物-動物、ヒト-動物間で、間接的には環境や食品を介して拡大する。

3. 薬剤耐性菌の検出状況

実験用マウスおよびラットにおける薬剤耐性菌の検出について、報告は多くはない。

国内飼養実験動物からの薬剤耐性菌の検出については、PubMed 検索で 1970 年代から見つけることができる。1980 年前島らは、8 つの飼育コロニーにある各系統のマウス (延べ 9 系統) あるいはラット (延べ 4 系統) の新鮮糞から分離した *Enterococcus faecium* や *E. faecalis* の他、大腸菌、*Staphylococcus epidermidis* の一部で、マクロライド系、テトラサイクリンあるいはスルファジメトキシに耐性を示すことを報告している。また、同研究グループで 1984 年の下田らの報告では、収集範囲を広げ 9 研究機関と 11 生産業者から得たマウスやラットで同様の菌種を分離しそれらの薬剤耐性について調べている。その結果、半数の飼育コロニーから同様の薬剤耐性菌の他、ストレプトマイシンなどのアミノグリコシド系耐性菌も検出している。これらの報告では、一部飼育コロニーに抗生剤の使用歴があり、抗生剤使用と多剤耐性菌の検出に相関があると述べられている。また、これらの耐性菌の由来について、ヒトや動物からの移行ではないかと推測している [4, 5]。その他、

花木らは本学会総会発表にて、実験用マウスからメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出を試みたものの検出されず、抗生剤使用歴がないことが結果に反映していると考察している。また同時に、ヒトから移行する可能性を考慮し、げっ歯類コロニーにおける薬剤耐性菌について監視の必要性を説いている (第 58 回日本実験動物学会総会)。

海外では、デンマークや韓国の研究グループにより抗生剤投与歴のない実験用マウスおよびラット飼育コロニーから薬剤耐性菌の検出が報告されている。デンマークのグループは、複数の飼育コロニーから黄色ブドウ球菌・大腸菌・パスツレラ (*P. pneumotropica*) を分離し、それらの一部で β ラクタム系、マクロライド系、アミノグリコシド系、テトラサイクリン系、キノロン系あるいはクロラムフェニコール他への耐性菌の検出を報告し、韓国では、ICR 系マウスおよび Sprague Dawley 系ラットから分離した各菌種の内、*Acinetobacter baumannii* がセファゾリンやセフォキシチンに、*E. faecalis* がオキサシリンなどの β ラクタム系に対して耐性であることを報告している [6, 7]。これらの耐性菌の由来について明らかではないが、デンマークのグループは、ヒトや家畜と実験動物との間で薬剤耐性菌出現の相関は見られないとしながらも、実験動物飼養者や器具類を介してヒトからの移行の可能性について言及している。また、プラスミド等を介した耐性遺伝子の細菌間移行の可能性についても考察している。

4. 国内販売マウスから分離したバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)

著者らは、実験用マウスの新鮮糞からバンコマイシンを含む選択培地を用いてある細菌の分離培養を試みていたところ、意図しない多数の球菌の増殖を観察した。そこで、国内の実験動物生産業者 4 社から販売されている BALB/c-nude や NOD/SCID など免疫不全系統を含む延べ 21 系統のマウスからバンコマイシン添加培地を用いてこの球菌の分離同定を試みた。その結果、バンコマイシン耐性球菌は 19 系統から分離され、これらは耐性遺伝子 *vanC1* あるいは *vanC2/3* をそれぞれ染色体に保有する自然耐性の腸球菌 *E. gallinarum* と *E. casseliflavus* であることが分かり、最小発育阻止濃度 (MIC) が 12 $\mu\text{g/ml}$ 以下の低度耐性であった。ここで興味深かったのは、異なる生産業者販売の免疫不全と野生型近交系の 2 系統でこれら VRE が検出されなかったことである。因みに、複数回実施して同様の結果であった [2]。つまり、腸球菌 2 種の有無のみの指標ではあるが、同じ生産業者販売のマウス系統間で腸内細菌叢が異なる、ということが分かった。

更に、分離した VRE で他の抗生剤に対する感受性について調べると、1 または 2 分離菌でエリスロマ

イシシ, テトラサイクリン, ニューキノロン系薬剤(シプロフロキサシン, ノルフロキサシン)に耐性を示し, その内の1分離菌ではエリスロマイシンとニューキノロン系薬剤に耐性を示す多剤耐性であった。これら分離菌におけるエリスロマイシンやニューキノロン系薬剤に対する耐性機構は明らかにはできなかったが, テトラサイクリンに耐性(MIC: 48あるいは64 µg/ml)を示した分離菌からは *tet(O)* 耐性遺伝子(抗生剤のリボソームへの結合を阻害する因子をコード)が検出された。検出された *tet(O)* 耐性遺伝子が細菌間で伝達されたかは不明である。これらのバンコマイシン以外の抗生剤に対する耐性菌の検出には, 4生産業者間あるいは各マウス系統間に統一性はなかった[3]。

5. 実験動物における耐性菌の存在の影響

生産業者において販売する実験用マウスおよびラットに抗生剤を使用することは近年は無いと考えられる。しかし, 各研究機関の動物実験施設では多くの遺伝子改変系統が維持され, それらの系統でSPF項目に該当する病原体の感染が明らかになった場合に止む無く使用することがある。その他, 実験処置として, タンパク発現制御を目的とした Tet-on/off システムではテトラサイクリン系抗生剤であるドキシサイクリンの投与, 最近では腸管内などの常在細菌叢の生体への影響に関する研究のためマウス等への抗生剤の投与実験が行われている。抗生剤の使用によって, 常在細菌叢が乱れるいわゆる“dysbiosis”が起き, その影響で免疫反応など生理的反応に変化を及ぼす。また, 一部の薬剤耐性菌が優勢になることで日和見感染症を引き起こすことも指摘されている[8-10]。当然のことながら, 後天的に耐性能を獲得した細菌の出現に注意することも重要であるが, 前述の *E. gallinarum* など低濃度であれば一部の抗生剤に対し自然耐性を示す菌種が存在することも頭に入れておく必要がある。それらの耐性菌が, 抗生剤使用による選択圧で優勢化し dysbiosis を起こすのである。また, 実験精度(再現性)の確保の観点から, 抗生剤投与歴のある系統を用いる実験には, コントロール群の選択設定に気を付ける必要性が考えられる。

マウスおよびラットにおける薬剤耐性菌がヒトや環境に影響を及ぼすことについて報告した論文は知る限り無いように思われる。しかし, 飼養者や実験実施者, あるいは実験器具類を介してヒトや環境に移行する可能性については, 前述の通り考えられる。

6. 最後に

近年の腸内細菌叢の生体への影響に関する研究では, 腸内細菌叢の様相の違い, あるいは各菌種の存

在が宿主の生理反応に大きく影響していることが明らかになっている。マウス腸管粘膜において segmented filamentous bacteria (SFB) の存在により IL-17 および IL-22 産生ヘルパー T (Th17) 細胞が分化誘導されることを報告した論文では, タコニック社とジャクソン研究所由来の各 C57BL/6 系マウスで腸管内の SFB 生息の有無に違いがあり, その違いから Th17 細胞数に大きな差があったことが示されている[11]。各業者販売の同系統間あるいは各系統間で腸内細菌叢あるいは薬剤耐性菌の有無の相違が考えられ, 抗生剤使用により SFB の有無による Th17 細胞数の相違と同様の実験精度への影響が十分に起こり得ると考えておくべきではないだろうか。改めて, 実験動物における薬剤耐性菌の存在, そして抗生剤使用による新たな耐性菌の出現拡大は, 畜産動物や伴侶動物の場合と同様に実験動物の健康や公衆衛生を脅かし, 実験精度にも大きく影響することを認識しなければならない。

参考文献

1. Vidovic N, Vidovic S. Antimicrobial resistance and food animals: Influence of livestock environment on the emergence and dissemination of antimicrobial resistance. *Antibiotics*. 2020; 9: E52.
2. Yamanaka H, Takagi T, Ohsawa M, Yamamoto N, Kubo N, Takemoto T, et al. Identification and characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* species frequently isolated from laboratory mice. *Exp Anim*. 2014; 63: 297-304.
3. Yamanaka H, Kadomatsu R, Takagi T, Ohsawa M, Yamamoto N, Kubo N, et al. Antimicrobial resistance profiles of vancomycin-resistant *Enterococcus* species isolated from laboratory mice. *J Vet Sci*. 2019; 20(2): e13
4. Maejima K, Urano T, Tamura H, Terakado N. Drug resistance of organisms isolated from feces of laboratory mice and rats. *Exp Anim*. 1980; 29: 71-75.
5. Shimoda K, Maejima K, Urano T. Drug resistance in *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from laboratory animals. *Exp Anim*. 1984; 33: 351-355.
6. Goo JS, Jang MK, Shim SB, Jee SW, Lee SH, Bae CJ, et al. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria isolated from laboratory animals. *Lab Anim Res*. 2012; 28: 141-145.
7. Hansen AK, Velschow S. Antibiotic resistance in bacterial isolates from laboratory animal colonies naïve to antibiotic treatment. *Lab Anim*. 2000; 34: 413-422.
8. Brandl K, Plitas G, Mihu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, et al. Vancomycin-resistant enterococci

- exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*. 2008; 455: 804–807.
9. Soares FS, Amaral FC, Silva NLC, Valente MR, Santos LKR, Yamashiro LH, et al. Antibiotic-induced pathobiont dissemination accelerates mortality in severe experimental pancreatitis. *Front Immunol*. 2017; 8: 1890.
 10. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. 2010; 120: 4332–4341.
 11. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009; 139: 485–498.