

家畜由来大腸菌における第3世代セファロスポリンに対する
薬剤感受性調査および分子遺伝学的解析に関する研究

比企 基高

目次

序論	1
第1章 2004年から2009年に農場の家畜から分離された大腸菌のTGCに対する薬剤感受性調査.....	6
第1節 緒言.....	6
第2節 材料および方法.....	8
2-1 供試菌株	8
2-2 薬剤感受性試験.....	8
2-3 TGC 耐性株のパルスフィールドゲル電気泳動	9
2-4 β -ラクタマーゼ遺伝子検出および同定.....	9
2-5 β -ラクタマーゼ遺伝子伝達試験	10
2-6 伝達株プラスミドの不和合性群型別.....	10
2-7 統計学的処理	11
第3節 実験結果	12
3-1 薬剤感受性試験.....	12
3-2 パルスフィールドゲル電気泳動.....	12
3-3 β -ラクタマーゼ遺伝子型別	13
3-4 β -ラクタマーゼ遺伝子の伝達試験および伝達株のプラスミドの不和合性群型別	13
第4節 考察.....	15
第5節 結語.....	17
第2章 農場の肉用鶏由来大腸菌におけるTGC耐性出現要因の検討	23
第1節 緒言.....	23
第2節 材料および方法.....	25
2-1 供試菌株	25
2-2 薬剤感受性試験.....	25
2-3 抗菌性物質使用歴調査	25
2-4 系統分類	25
2-5 病原関連遺伝子検出.....	26
2-6 マルチローカスシーケンシング	26
2-7 統計学的処理	26
第3節 実験結果	28
3-1 TGC 耐性株および感受性株間の薬剤感受性および系統分類の比較	28
3-2 TGC 耐性株および感受性株間の抗菌性物質使用歴の比較	28
3-3 TGC 耐性株および感受性株間の病原関連遺伝子保有率の比較	28

3-4 TGC 耐性株および感受性株間の ST の比較	29
第 4 節 考察.....	30
第 5 節 結語.....	32
第 3 章 孵卵場におけるセフトオフィルの自主的使用禁止が農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性に与える影響.....	41
第 1 節 緒言.....	41
第 2 節 材料および方法.....	43
2-1 供試菌株	43
2-2 薬剤感受性試験.....	43
2-3 β -ラクタマーゼ遺伝子検出および同定.....	43
2-4 β -ラクタマーゼ遺伝子伝達試験	44
2-5 伝達株プラスミドの不和合性群型別.....	44
2-6 統計学的処理	45
第 3 節 実験結果	46
3-1 薬剤感受性試験.....	46
3-2 β -ラクタマーゼ遺伝子型別	46
3-3 β -ラクタマーゼ遺伝子伝達試験および伝達株プラスミドの不和合性群型別 ...	47
第 4 節 考察.....	48
第 5 節 結語.....	51
結論	57
謝辞	59
参考文献	61

序論

1928年にイギリスのFlemingによってペニシリンが発見されて以来、1935年にサルファ剤、1944年にストレプトマイシン、1948年にセファロスポリンと次々に抗菌性物質が発見または開発された(1, 42)。その後クロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシンと続き、現代では抗菌性物質はヒトの医療分野のみならず、畜産、伴侶動物、水産および農業分野において広く利用されるようになった(4, 42)。しかしながら抗菌性物質の使用は同時に耐性菌を生じさせる。黄色ブドウ球菌を例に挙げると、当初、上述のペニシリンが黄色ブドウ球菌に対して有効であったが、1950年代にペニシリンを分解する酵素を産生することでペニシリンに耐性を示す黄色ブドウ球菌が分離され、さらにペニシリン耐性黄色ブドウ球菌に対して有効なメチシリンが1960年に開発されたが、その翌年の1961年にメチシリン耐性を示す黄色ブドウ球菌が分離されている(42)。

畜産分野において抗菌性物質は、疾病の治療を目的とした動物用抗菌剤と成長促進や飼料効率の改善のための抗菌性飼料添加物の2つの用途で使用されており、動物の健康を守り、また安全な食品の安定した生産を確保する上で重要な生産資材であるが、畜産分野で生じた耐性菌は畜産分野のみならず畜産物等を介してヒトへと伝播し、ヒトにおける感染症の治療に影響を及ぼす可能性が示唆されている。1969年にスワンレポートによって家畜への抗菌性物質の投与、特に治療用以下の濃度の投与はヒトおよび動物の健康保持に何らかの危険性があるとの結論が公表された(45, 50)。それ以降、世界保健機関(WHO, World Health Organization)、国際獣疫事務局(OIE, World Organization for Animal Health)および国際連合食糧農業機関(FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations)の主催する種々な国際会議の中で、食品媒介性病原菌の薬剤

耐性が動物とヒトとの間でどの程度発現・拡散してヒトの健康に対するリスクとなっているかが議論されるとともに、疫学的な知見を得るための国レベルでの耐性菌の動向調査の重要性や国際的なネットワークの構築等が強調されてきた(14, 35, 36, 46)。

我が国においては、畜産分野における抗菌性物質の使用に伴う問題に対して、動物用抗菌性物質を食用動物に適正に使用し、畜産食品の安全性を確保するために飼料安全法の改正(1975年)、薬事法(現在の医薬品、医療機器等の品質、有効性および安全性の確保等に関する法律)の改正(1979年)や「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」の制定(1980年)が行われた。薬剤耐性菌対策としては、デンマーク、アメリカ、スウェーデン等において国際的に比較可能な薬剤耐性モニタリング体制が構築されていたのに対し、我が国においては単年度の薬剤耐性調査が行われるのみで継続的な調査は行われていなかった。そこで、国際動向を背景として、畜産分野における耐性菌問題に対する抗菌性物質耐性調査を農林水産省の事業として、1999年度から「家畜由来細菌の抗菌性物質感受性調査」により実施することとし、その調査体制として全国の都道府県機関である約180ヶ所の家畜保健衛生所の多大なる協力の下、家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング(JVARM, Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)が構築された(21, 23, 24, 46)。

JVARMは大きく分けて1)食用動物(牛、豚、採卵鶏および肉用鶏)における抗菌剤使用量の調査、2)野外流行株の薬剤耐性調査および3)食品媒介性病原細菌・指標細菌の薬剤耐性調査の3つの調査から成っている。その中でも3)は1999年から新たに開始したもので、これまで家畜衛生分野で殆ど実施されていなかった健康動物由来の食品媒介性病原細菌と指標細菌を対象としたものである。対象菌種としては、食品媒介性病原菌としてサルモネラおよびカンピロバ

クター、指標細菌として大腸菌および腸球菌を選択し、年に1度、全国の家畜保健衛生所職員らが、各都道府県の農場の健康な家畜（牛、豚、採卵鶏および肉用鶏）から糞便を採材し、対象菌種を分離・同定後、薬剤感受性試験を実施している。また、同時に、家畜の所有者から抗菌性物質の使用履歴を聞き取ることで、どのような抗菌性物質が家畜に使用され、抗菌性物質の使用と薬剤耐性との関係があるのかについても調査することができる。薬剤感受性試験の際の測定薬剤は菌種ごとに決まっており、動物専用の抗菌性物質のみならず、ヒトにおいても重要な抗菌性物質についても対象とし、1999年から現在まで毎年継続的に薬剤感受性を把握してきている(21, 22, 46)。

我が国では飼料添加物又は動物用医薬品として使用される抗菌性物質によって選択される薬剤耐性菌について、食品を摂取することによって健康への悪影響が発生する可能性とその程度（リスク）の評価が食品安全委員会によって行われている。リスク評価は、特定されたハザードに対し、1) 発生の評価（抗菌性物質の使用の結果、対象家畜に耐性菌が選択される可能性）、2) 暴露の評価（ヒトが食品を介してハザードである細菌を摂取する可能性）および3) 影響の評価（薬剤耐性菌に暴露されたヒトの健康に有害な結果をもたらす可能性）の三つの評価が行われ、1) 、2) および3) の評価を統合して最終的なリスクの推定が行われる(51)。このうち、1) において JVARМ のモニタリングで得られた情報が用いられており、農場における薬剤耐性状況を踏まえたリスク評価が行われている。また3) においては、「食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについて（以下、抗菌性物質の重要度のランク付け）」が用いられている。これは動物用抗菌性物質に耐性化した薬剤耐性菌に食品を介してヒトが暴露されて感染症を発症した場合に治療薬はあるのか、また医療分野においてどの程度重要なのか等を考慮し、ヒト用抗菌性

物質を I:きわめて高度に重要、II: 高度に重要および III: 重要な 3 つにランク付けしたもので、決定されたランクを踏まえて評価が行われている(52)。この抗菌性物質の重要度のランク付けにおいて、動物用抗菌性物質としても承認がある第 3 世代セファロスポリン (TGC, Third Generation Cephalosporin) が最重要ランクのランク I に分類されている。

セファロスポリンは *Cephalosporium acremonium* が産生する抗生物質として Gluseppi Brotzu によって発見された(1)。第 1 世代のセファロスポリンとしてセファゾリン (CFZ, Cefazolin) などがある(44)。セファロスポリンは細菌の産生する β -lactamase によって不活化されるが、セファロスポリンの発見後改良が進められ、 β -lactamase に極めて安定でグラム陰性菌に強力な抗菌力を有するヒト用抗菌性物質として 1980 年代に第 3 世代セファロスポリンの臨床使用が開始された(53)。ヒト用抗菌性物質としては、セフォタキシム (CTX, Cefotaxime) が現在でも使用されている(37)。また、動物用医薬品としても 1996 年に TGC であるセフチオフル (CTF, Ceftiofur) が牛および豚を対象として承認され、その後、セフォベシンが犬および猫、セフポドキシムプロキシセチルが犬を対象として承認された。JVARM においても、1999 年からセフチオフルを対象薬剤として、家畜における TGC に対する耐性状況のモニタリングを開始している(25)。そのなかで、Kojima ら(25)は、1999 年から 2002 年に分離された家畜(牛、豚、採卵鶏および肉用鶏)由来の大腸菌のうち、肉用鶏由来の大腸菌において、頻度は低いものの、TGC に対する耐性株が認められたことを報告した。

そこで我々は、第 1 章において、Kojima らの調査以降の 2004 年から 2009 年に収集された家畜由来大腸菌における TGC 耐性大腸菌の推移を調べるとともに、耐性菌の分子遺伝学的解析を行った。第 2 章では TGC が承認されていない肉用鶏に TGC 耐性大腸菌が出現した要因を、農場における抗菌性物質使用歴および

TGC 耐性大腸菌に認められる特徴から調べた。第 3 章では、農場よりも上流の生産段階において 2012 年 3 月に生産者らによって自主的に実施された TGC 耐性に対する取り組みを踏まえ、取り組み前後 2 年における農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC に対する薬剤感受性の変動を調べ、農場以外の要因が農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性に与えた影響を調べた。

第1章 2004年から2009年に農場の家畜から分離された大腸菌のTGCに対する 薬剤感受性調査

第1節 緒言

家畜における第3世代セファロスポリン(TGC)耐性大腸菌の出現が国際的に公衆衛生上の問題となっている(26)。TGCは他国と同様、我が国では医療において非常に重要な抗菌性物質に位置づけられおり、食品安全委員会が発表した「食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについて」において最重要ランクのランクIに分類されている(17, 52)。Kojimaら(25)は1999年から2002年に肉用鶏から分離された大腸菌においてTGCに耐性を示す基質拡張型 β -ラクタマーゼまたはAmpC型 β -ラクタマーゼ産生株が認められたことを報告した。その結果、肉用鶏由来大腸菌のTGCに対する耐性率は1999年から2002年で2.2%、2000年から2003年では4.0%と頻度は低いものの漸増したことを報告した(24, 25)。Kojimaら(25)の報告以外にもTGC耐性菌は我が国の肉用鶏農場に広く存在していることが示されている(18, 38)。

グラム陰性菌においてTGC耐性はプラスミド性の β -ラクタマーゼおよびAmpC型 β -ラクタマーゼの産生が関与している(26)。プラスミド性の β -ラクタマーゼの場合、PCRまたはシーケンスにより、プラスミドおよびプラスミド上の β -ラクタマーゼの型別が行われる。プラスミドの型は不和合性群として型別され、腸内細菌科細菌においては、27型が報告されている(8)。プラスミドおよび β -ラクタマーゼの型別において、Carattoliら(8)はヒト由来大腸菌と家畜由来大腸菌で共通のプラスミドおよび共通の β -ラクタマーゼが認められたことを報告した。大腸菌におけるプラスミドの型別は畜産物を介した家畜からヒトへの耐性菌または耐性遺伝子の伝播を調べる際などで重要な情報となる。

そこで第一章では、Kojimaら(25)の報告以降の我が国における家畜由来TGC

耐性大腸菌の状況を明らかにするとともに、家畜に分布する TGC 耐性大腸菌の遺伝学的性状を調べるため、2004 年から 2009 年に家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング (JVARM) で分離された大腸菌について TGC に対する薬剤感受性調査を行い、TGC 耐性大腸菌については分子遺伝学的解析を行った。

第2節 材料および方法

2-1 供試菌株

2004年から2009年のそれぞれ7月から9月において47都道府県の全1903農場（各県、牛6農場、豚2農場、採卵鶏4農場および肉用鶏4農場以上の農場を対象）の健康家畜（牛、豚、採卵鶏および肉用鶏）から分離された計3,274株（牛由来1,095株、豚由来802株、採卵鶏由来699株および肉用鶏由来678株）の大腸菌を供試した。糞便検体は1農場1検体とし、デオキシコレート寒天培地（栄研化学株式会社、東京、日本）を用いて1検体から最大2株の大腸菌を分離した。同定はAPI20E（日本ビオメリュー、東京、日本）を用いて行った。

2-2 薬剤感受性試験

TGC のセフトオフル (CTF) の最小発育阻止濃度 (MIC、Minimum Inhibitory Concentration) を臨床検査標準協会 (CLSI、Clinical and Laboratory Standards Institute) の方法に準拠した寒天平板希釈法にて測定した。TGC 耐性株について、続いて各種薬剤（表1）：アンピシリン (AMP、Ampicillin)、セファゾリン (CFZ、Cefazolin)、オキシテトラサイクリン (OXY、Oxytetracycline)、ゲンタマイシン (GEN、Gentamicin)、カナマイシン (KAN、Kanamycin)、クロラムフェニコール (CHL、Chloramphenicol)、ナリジクス酸 (NAL、Nalidixic acid)、エンロフロキサシン (EFX、Enrofloxacin) およびトリメトプリム (TMP、Trimethoprim) の MIC を寒天平板希釈法にて測定した。精度管理株には、*Staphylococcus aureus* ATCC 29213、*Enterococcus faecalis* ATCC 29213、*Escherichia coli* ATCC 25922 および *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を用いた。各種薬剤の耐性限界値は Kojima ら (24) の報告と同一の値を用いた (表1)。

2-3 TGC 耐性株のパルスフィールドゲル電気泳動

2-2 の結果、TGC 耐性株については CDC PulseNet protocol に準拠したパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE、Pulse-Field Gel Electrophoresis) を行った。PFGE は大腸菌の全遺伝子を制限酵素によって切断し、その泳動パターンから株間の関係性をみる方法である。制限酵素には *Xba*I (TaKaRa) を用いた。電気泳動は CHEF-DR III System (Bio-Rad Laboratories) を用い、パルスタイム 2.2~63.8 秒、電圧 180 V/cm、19 時間の条件で行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射下で撮影した。DNA サイズマーカーは *Salmonella* Braenderup H9812 株を用いた。解析は PFGE の泳動像から Molecular Analyst Fingerprinting Plus version1.6 (Bio-Rad Laboratories) を用いて行い、類似係数 Dice、デンドログラム型 UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.0 %でデンドログラムを作成した。

2-4 β -ラクタマーゼ遺伝子検出および同定

(2-2 の結果、) TGC 耐性株については β -ラクタマーゼ遺伝子の検出および同定を行った。大腸菌の DNA は、普通寒天培地で培養した新鮮培養菌を生理食塩水に懸濁後 100°C、10 分でボイルし、ボイル後 14,000 rpm 5 分で遠心した上清を用いた。TEM および SHV 型 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出は Kojima ら (25) の報告しているプライマーを用いた PCR 法で行った。AmpC 型 β -ラクタマーゼ遺伝子 (ACC、FOX、MOX、CIT および EBC 型 β -ラクタマーゼ遺伝子) の検出は Dallenne ら (11) の Multiplex PCR 法および CTX-M 型 β -ラクタマーゼ遺伝子は Xu ら (49) の Multiplex PCR で行った。PCR の結果で陽性の大腸菌については続いて、Kojima ら (25)、Pitout ら (40) および Xu ら (49) の報告しているプライマーを用いてダイ

レクトシーケンスを行い、得られた塩基配列を BLAST program (National Center for Biotechnology Information) を用いて分析し、最終的な β -ラクタマーゼ型を同定した。

2-5 β -ラクタマーゼ遺伝子伝達試験

2-4 の結果、 β -ラクタマーゼ型が決定した株について、 β -ラクタマーゼ遺伝子の伝達試験を以下の Usui ら (47) の broth-mating method 法を用いて行った。まずドナー (CTF 耐性およびリファンピシン (RIF、Rifampicin) 感受性 *E. coli* 株) およびレシピエント (CTF 感受性および RIF 耐性の *E. coli* DH5 α) をそれぞれ LB ブロス (日本 BD、東京、日本) を用いて一夜培養し、培養後の菌液 20 μ l ずつを 160 μ l の LB ブロスに接種 (計 200 μ l) し、さらに一夜培養した。そして翌日、培養物を CFZ 32 mg/L および RIF 50 mg/L を添加したミュラーヒントン寒天培地 (日本 BD、東京、日本) に接種し、培養後発育した菌を伝達株とした。

2-6 伝達株プラスミドの不和合性群型別

2-5 の結果得られた伝達株の DNA を 2-4 で用いた方法で抽出後、プラスミドの型別である不和合性群型別 (IncHI1、IncHI2、IncI1、IncI γ 、IncI2、IncX、IncL/M、IncM、IncN、IncF1、IncFIme、IncW、IncFII、IncFIII、IncFIV、IncFV、IncFVI、IncY、IncP、IncA/C、IncC、IncT、IncJ、IncK、IncB および IncB/0) を Carattoli ら (9) が報告した Multiplex PCR 法を用いて行った。PCR の結果 IncI1 陽性の株 (332 bp) については、つづいて制限酵素 *Cvi*AI (ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン、東京、日本) を用いて処理し、二つのフラグメント (60 bp および 272 bp) に切断された株は IncI1 および切断されな

かった株は IncI γ とした。

2-7 統計学的処理

Kojima ら (24, 25) の報告の 1999 年から 2002 年分離株および 2000 年から 2003 年分離株の TGC 耐性率との比較は Fisher の直接確率検定を用いて行った。有意水準は $P=0.05$ (両側検定) とした。

第3節 実験結果

3-1 薬剤感受性試験

2004年から2009年に農場の家畜から分離された計3,274株の大腸菌(牛由来1,095株、豚由来802株、採卵鶏由来699株および肉用鶏由来678株)に対し薬剤感受性試験を実施したところ、TGC耐性が108株(3.3%)で認められた(図1)。畜種別では、牛由来株の2株(1.9%)、豚由来株の2株(1.9%)、採卵鶏由来株の15株(13.9%)および肉用鶏由来大腸菌の89株(82.4%)においてTGC耐性株が認められた。さらに、同一検体から分離された同一薬剤耐性遺伝子型および薬剤耐性型の2株は同一株として取扱い、最終的には69株(牛由来1株、豚由来1株、採卵鶏由来10株および肉用鶏由来57株)のTGC耐性株についてさらなる薬剤感受性試験を行った。

69株の薬剤感受性試験の結果を表2に畜種ごとに示した。69株のTGC耐性株はβ-ラクタム系抗菌性物質であるAMPおよび第1世代セファロスポリンのCFZに対して全ての株が耐性であった。β-ラクタム系抗菌性物質以外ではOXYに対する耐性が71.0%(49/69)で認められたが、他の薬剤に対する耐性率は50%未満であった。

3-2 パルスフィールドゲル電気泳動

TGC耐性69株に対してPFGEを行った結果を図2に示した。スメアとなり泳動像が得られなかった9株を除き最終的に60株の泳動像が得られた。得られた泳動像に対してDiceの計算法にて計算を行ったところ、80%(傍線部)以上の相同性が認められたのは肉用鶏由来の6株(No. 17C25, 17C34, 17C36, 19C93, 19C96および20C114)のみであり、残りの54株はそれぞれ80%以下の相同性を示した。80%以上の相同性が認められた6株についても2株間(17C34と17C36、17C25

と 20C114 および 19C93 と 19C96) で 80%以上の相同性が認められたのみであった。分離された家畜の種類、地域、分離年および同定されたβ-ラクタマーゼの株間の関係性は認められなかった。

3-3 β-ラクタマーゼ遺伝子型別

TGC 耐性 69 株のβ-ラクタマーゼ遺伝子型別の結果を表 2 に示した。69 株のうち 45 株 (65.2 %、肉用鶏由来 38 株、採卵鶏由来 6 株および豚由来 1 株) はセファロスポリナーゼの *bla*_{CMY-2} を保有していた (表 2)。TGC 耐性株が多く認められた肉用鶏に由来する TGC 耐性大腸菌においても *bla*_{CMY-2} が全体の 66.7 % (38/57) と主要なβ-ラクタマーゼ遺伝子として認められた (表 2)。*bla*_{CMY-2} 以外にも肉用鶏由来株において CTX-M 型のβ-ラクタマーゼ遺伝子である *bla*_{CTX-M-2}、*bla*_{CTX-M-14} および *bla*_{CTX-M-25}、SHV 型 β-ラクタマーゼ遺伝子である *bla*_{SHV-2}、*bla*_{SHV-2a}、*bla*_{SHV-5} および *bla*_{SHV-12}、採卵鶏由来株において *bla*_{CTX-M-1}、*bla*_{CTX-M-14} および *bla*_{SHV-12} および牛由来株において *bla*_{SHV-12} が認められた (表 2)。

3-4 β-ラクタマーゼ遺伝子の伝達試験および伝達株のプラスミドの不和合性群型別

主要なβ-ラクタマーゼ遺伝子として認められた *bla*_{CMY-2} 保有株 (肉用鶏由来) に対して行った伝達試験の結果を表 3 に示した。*bla*_{CMY-2} 保有の 38 株から 31 株 (81.6 %) の伝達株が得られた (No. 16-Ec-C-40, 17-Ec-C-03, 18-EC-C-9, 20-C-109, 21-C-3, 21-C-22 および 21-C-66 の 7 株から伝達株は得られなかった)。伝達株のプラスミドの不和合性群型別では、31 株中 29 株 (93.5 %) は 4 つの群、IncIγ (8 株、25.8 %)、IncA/C (8 株、25.8 %)、IncK (7 株、22.6 %) および IncI1 (6 株、19.4 %) に型別され、それら 4 群はいずれかの年度に偏ることなく、幅

広い年度において認められた。

第4節 考察

本研究において、我が国の家畜由来大腸菌の TGC 耐性率は、Kojima ら (25) の報告以降、増加傾向にあることが示された。また、CTF 耐性大腸菌の 82.4 % は肉用鶏由来であり、肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性率の比較では、本研究の 2004 年から 2009 年分離株の TGC 耐性率 13.0 % は、Kojima ら (24, 25) の報告の 1999 年から 2002 年分離株の TGC 耐性率 2.2 % および 2000 年から 2003 年の 4.0 % よりも有意に高く ($P < 0.01$)、肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性率の急激な上昇が示された。TGC 耐性大腸菌が分離された地域を見ると、分離地域に偏りは認められず、全国から幅広く分離されていた。そのため、TGC 耐性大腸菌は特定の地域に限定していたのではなく、全国に分布していたことが示された。また TGC 耐性大腸菌の PFGE の結果では、株間の遺伝学的相同性は低く遺伝学的に多様であることが示された。Hiroi ら (18) も異なる PFGE パターンの TGC 耐性大腸菌が複数の農場の肉用鶏から分離されたことを報告している。我が国では遺伝学的に近縁なサルモネラの伝播が肉用鶏において報告されているが (5)、本研究で分離された TGC 耐性大腸菌は、遺伝学的に近縁な株が全国に伝播していたのではなく、遺伝学的に多様な大腸菌がそれぞれで TGC 耐性を獲得したことが推察された。

大腸菌のセファロスポリン耐性はプラスミド性 β -ラクタマーゼ産生、染色体性 β -ラクタマーゼ産生および細胞外膜タンパク質の欠損に起因する (6)。そのうち、我が国における肉用鶏由来 TGC 耐性大腸菌はプラスミド性 β -ラクタマーゼの *bla*_{CMY-2} によって TGC 耐性に対して耐性を示したことが報告されている (24, 25)。今回分離された TGC 耐性大腸菌の β -ラクタマーゼ遺伝子型別の結果、2004 年から 2009 年に分離された TGC 耐性大腸菌が保有する β -ラクタマーゼもプラスミド性 β -ラクタマーゼである *bla*_{CMY-2} が優勢であった。 β -ラクタマーゼの種類は

これまで国際的に 900 種以上同定がされているが(7)、Kojima ら(25)の報告および本研究の結果、我が国の肉用鶏には1種類のβ-ラクタマーゼが継続的に認められたことが示された。また *bla*_{CMY-2} は肉用鶏のみならず、2003 年に採卵鶏由来大腸菌においても認められ(24)、今回、豚由来大腸菌においても保有が初めて確認された。

*bla*_{CMY-2} は上述の通りプラスミド性β-ラクタマーゼであるが、β-ラクタマーゼの種類と同様に、β-ラクタマーゼを媒介するプラスミドにも国際的に様々な種類の型が報告されている中で、Carattoli ら(8)はアメリカにおける *bla*_{CMY-2} をコードする主要なプラスミドは IncA/C であったことを報告した。一方、本研究で主に認められた *bla*_{CMY-2} を伝達させたところ、IncA/C 以外にも、国際的にヒトおよび動物から分離された腸内細菌科の細菌に認められている IncIγ、IncK および IncI1 のプラスミドが主要なプラスミドとして認められた(2, 3, 8, 16, 29, 41)。そのため、β-ラクタマーゼとしては *bla*_{CMY-2} が主要な遺伝子として認められたが、遺伝子をコードするプラスミドには多様性があることが示唆された。

以上より、我が国の家畜には特に肉用鶏に TGC 耐性大腸菌が多く認められ、TGC 耐性株間では遺伝学的多様性が認められる一方で、TGC に対する耐性遺伝子および耐性遺伝子を媒介するプラスミドは特定の型が分布していたことが示唆された。

第 5 節 結語

2004 年から 2009 年に分離された国内の家畜由来大腸菌 3274 株のうち TGC 耐性は 108 株で認められ、その 82.4 % (89/108) は肉用鶏由来であった。また肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性率は 1999 年から 2003 年に分離された株よりも有意に上昇した。TGC 耐性株に対して行った PFGE では、泳動像が得られた株のうち肉用鶏由来の 6 株を除いた 54 株はそれぞれ 80 % 以下の相同性を示し、TGC 耐性株は遺伝学的に多様であることが示された。今回認められた TGC 耐性株の 65.2 % はセファロスポリナーゼの *bla*_{CMY-2} を保有しており、さらに TGC 耐性株が多く認められた肉用鶏に由来する TGC 耐性大腸菌においても *bla*_{CMY-2} が主要なβ-ラクタマーゼとして認められた。*bla*_{CMY-2} を伝達させた伝達株プラスミドの不和合性群型は IncI γ 、IncA/C、IncK および IncII の 4 種類が主要な群型として認められた。

図 1. 株の選択方法フローチャート

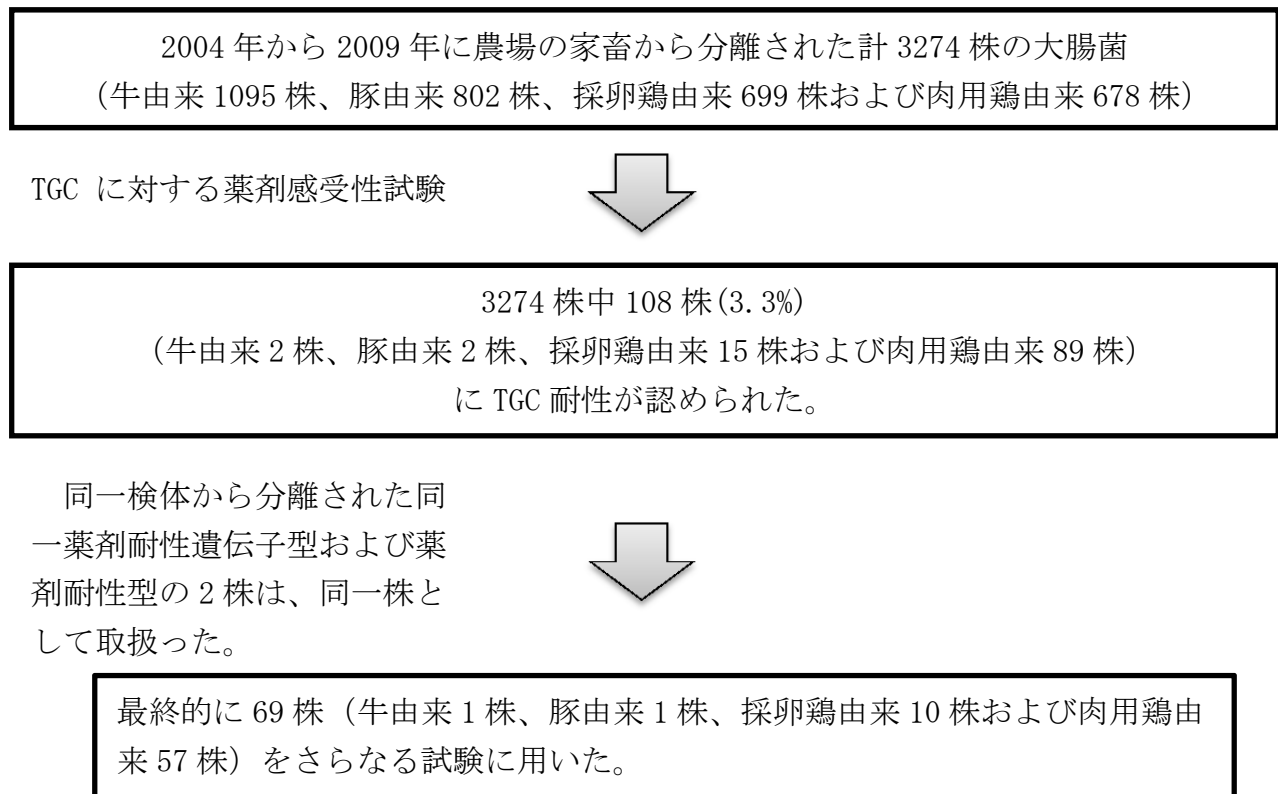


図 2. 日本における食用動物由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌のパルス
フィールドゲル電気泳動プロファイル

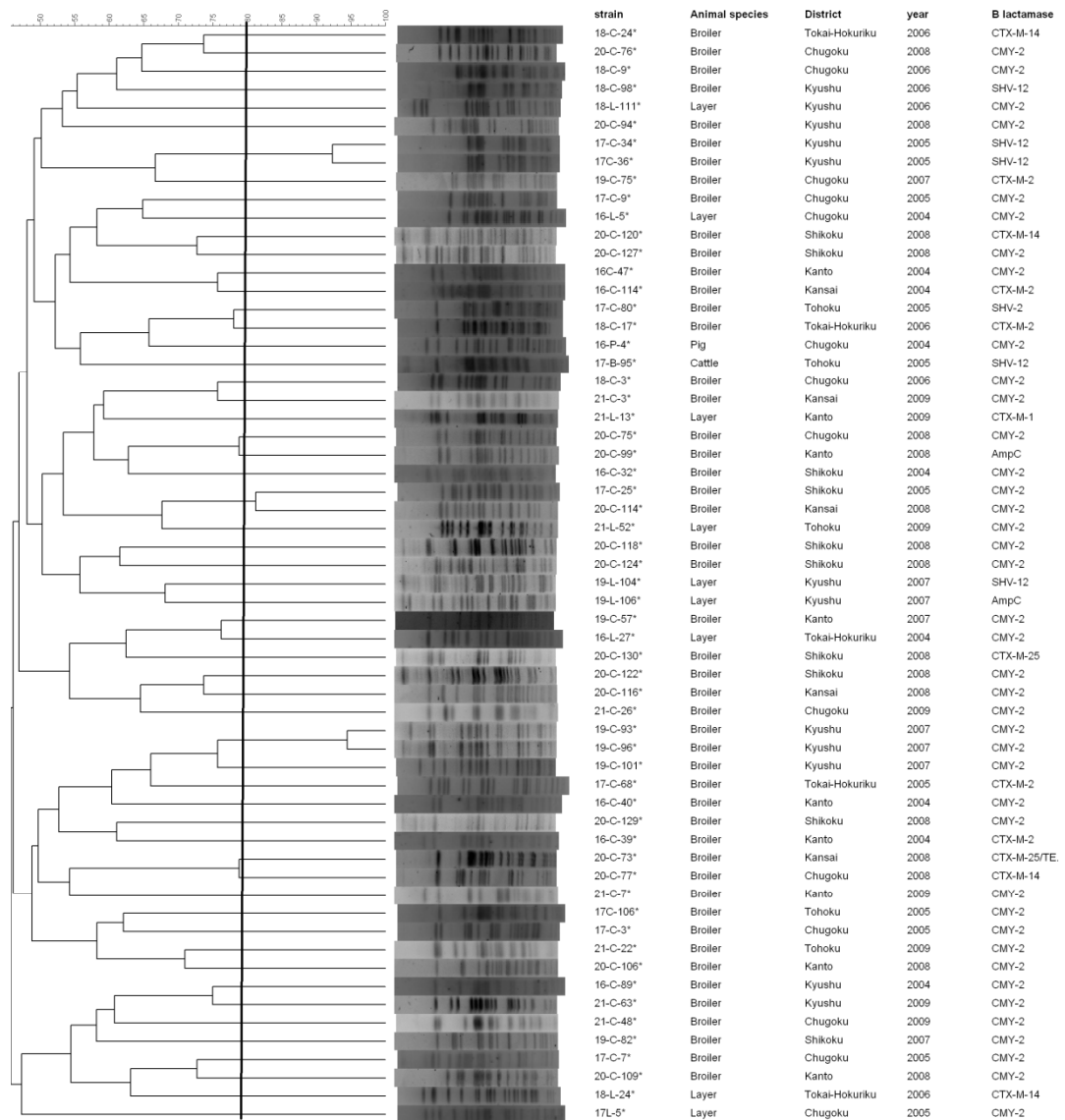


表 1. 本研究において薬剤感受性試験に用いた抗菌性物質の系統と名称

抗菌性物質の系統		抗菌性物質名	耐性限界値 (mg/L)
β-ラクタム系	ペニシリン系	アンピシリン (AMP*, ampicillin)	32
	セフェム系	セファゾリン (CFZ, cefazolin) (第 1 世代)	32
		セフチオフル (CTF, ceftiofur) (第 3 世代)	8
		セフォタキシム (CTX, cefotaxime) (第 3 世代)	4
テトラサイクリン系		オキシテトラサイクリン (OXY, oxytetracycline)	16
		テトラサイクリン (TET, tetracycline)	16
アミノグリコシド系		ゲンタマイシン (GEN, gentamicin)	16
		カナマイシン (KAN, kanamycin)	64
		ジヒドロストレプトマイシン (DSM, dihydrostreptomycin)	32
		ストレプトマイシン (STR, streptomycin)	32
クロラムフェニコール系		クロラムフェニコール (CHL, chloramphenicol)	32
キノロン系	オールドキノロン系	ナリジクス酸 (NAL, nalidixic acid)	32
	フルオロキノロン系	エンロフロキサシン (EFX, enrofloxacin)	2
		シプロフロキサシン (CIP, ciprofloxacin)	4
その他		コリスチン (CST, colistin)	16
		トリメトプリム (TMP, trimethoprim)	16

*薬剤の省略名は Antimicrobial Agents and Chemotherapy の Instructions to authors を参照した。

表 2. 食用動物由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌におけるβ-ラクタマーゼ型および薬剤耐性プロファイル

Animal species	No. of isolate	No. of isolates showing resistance to										β-Lactamase types
		β-lactam			Aminoglycoside		Tetracycline	Chloramphenicol	Quinolone		Other	
		CTF	AMP	CFZ	GEN	KAN	OXY	CHL	NAL	EFX	TMP	
Broiler chickens	38	38	38	38	4	7	23	13	17	5	13	CMY-2
	6	6	6	6			5	1	3		1	CTX-M-2
	2	2	2	2		2	2		1		1	CTX-M-14
	1	1	1	1		1	1	1			1	CTX-M-14/TEM-1
	1	1	1	1		1						CTX-M-25
	1	1	1	1		1	1					CTX-M-25/TEM-1
	5	5	5	5	1	1	5		4		3	SHV-12
	1	1	1	1			1					SHV-2
	1	1	1	1			1	1	1		1	SHV-5
	1	1	1	1		1						-88,-82,-18,-1,+58
Subtotal	57	57	57	57	5	14	39	16	26	5	20	
Layer chickens	6	6	6	6	1	3	5	4	5		2	CMY-2
	1	1	1	1			1				1	CTX-M-1
	1	1	1	1								CTX-M-14
	1	1	1	1			1				1	SHV-12
	1	1	1	1			1		1			-73,-28,+58
Subtotal	10	10	10	10	1	3	8	4	6		4	
Cattle	1	1	1	1			1				1	SHV-12
Subtotal	1	1	1	1			1				1	
Pigs	1	1	1	1	1	1	1	1				CMY-2
Subtotal	1	1	1	1	1	1	1	1				
Total	69	69	69	69	7	18	49	21	32	5	25	

CTF, ceftiofur; AMP, ampicillin; CFZ, cefazolin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; OXY, oxytetracycline; CHL, chloramphenicol; NAL, nalidixic acid; EFX, enrofloxacin; TMP, trimethoprim

表 3. 肉用鶏由来 *bla*_{CMY-2} 保有大腸菌から作出した 31 株の伝達株のレプリコン型

Parent strains		Transconjugants
Year	Strain	Inc group of transferred plasmid
2004	16-Ec-C-89	I γ
2005	17-Ec-C-07	I γ
2008	20-C-94	I γ
	20-C-114	I γ
	20-C-116	I γ
	20-C-127	I γ
	20-C-129	I γ , Frep
2009	21-C-48	I γ
2004	16-Ec-C-29	A/C
	16-Ec-C-32	A/C, FIB
2005	17-Ec-C-25	A/C, FIB
2007	19-C-82	A/C
2008	20-C-75	A/C, Frep
	20-C-122	A/C
	20-C-124	A/C
2009	21-C-7	A/C
2005	17-Ec-C-09	K
2006	18-Ec-C-3	K, N
2007	19-C-79	K
	19-C-57	K
2008	20-C-118	K
	20-C-106	K
2009	21-C-26	K
2004	16-Ec-C-47	I1
2005	17-Ec-C-106	I1, FIB, Frep
2007	19-C-93	I1
	19-C-96	I1
	19-C-101	I1
2009	21-C-63	I1
2008	20-C-76	Frep
2009	21-C-57	UT

第2章 農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性出現要因の検討

第1節 緒言

第1章の結果、肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性率は、2000 年代前半(1999 年から 2003 年)に比べ 2000 年代後半(2004 年から 2009 年)に有意に増加しており、また、TGC 耐性大腸菌の殆どが肉用鶏由来であることが示された。TGC は医療のみならず家畜分野においても使用されており、我が国では牛、豚、犬および猫に承認され使用されているが、肉用鶏に対する承認はない(54)。しかしながら承認されていない抗菌性物質であっても、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律に基づく医薬品及び再生医療等製品の使用の禁止に関する規定の適用を受けない場合を定める省令」(平成 15 年 6 月 30 日農林水産省令第 70 号)において、原則として獣医師であればその診療に係る対象動物の治療の目的で使用する事ができることと定められている(適応外使用)。

薬剤耐性菌は薬剤使用の選択圧によって選択されることから、TGC 耐性大腸菌の出現要因として、1) 肉用鶏農場における適応外使用の可能性が考えられた。一方、カナダにおいては、Dutil ら(13)が市販鶏肉から分離された大腸菌の TGC 耐性率の上昇が孵卵場における CTF の適応外使用によると報告しており、2) 農場よりも上流の孵卵場における CTF の適応外使用の可能性も考えられた。さらに、3) TGC 以外の薬剤の使用に起因する交差耐性または共耐性により、肉用鶏におけるセファロスポリン耐性大腸菌が選択された可能性が考えられた。このうち、2) 孵卵場における使用状況調査は、JVARM のモニタリング対象外であった。

そこで第2章では、農場の抗菌性物質使用歴調査を行うとともに、肉用鶏から分離された大腸菌に対し、TGC 以外の薬剤についても薬剤感受性試験および遺伝学的性状解析を行った。そして、TGC 耐性大腸菌および TGC 感受性大腸菌の

TGC 以外の薬剤に対する感受性および遺伝学的性状を比較し、TGC 耐性大腸菌に認められる特徴を調べた。

第2節 材料および方法

2-1 供試菌株

2009年の7月から9月において22都道府県の全53農場の肉用鶏から分離された計96株の大腸菌を供試した。検体は1農場1検体とし、デオキシコレート寒天培地（栄研化学株式会社、東京、日本）を用いて1検体から最大2株の大腸菌を分離した。同定はAPI20E（日本ビオメリュー、東京、日本）を用いて行った。

2-2 薬剤感受性試験

肉用鶏から分離された96株の大腸菌に対し、各種薬剤(AMP、CFZ、CTF、ジヒドロストレプトマイシン(DSM、Dihydrostreptomycin)、GEN、KAN、OXY、CHL、コリスチン(CST、Colistin)、NAL、エンロフロキサシン(EFX、Enrofloxacin)およびTMP)のMICをCLSIの方法に準拠した寒天平板希釈法にて測定した。

2-3 抗菌性物質使用歴調査

大腸菌が分離された肉用鶏に対して使用されていた抗菌性物質の系統（セフェム系（セファロスポリン系を含む）、ペニシリン系、アミノグリコシド系、テトラサイクリン系、マクロライド系、サルファ剤、フェニコール系、キノロン系、ポリペプチド系、ポリエーテル系、オルトソマイシン系およびその他）を、各都道府県家畜保健衛生所の職員が、家畜を所有する農家の方に聞き取ることで行った。

2-4 系統分類

大腸菌のDNAは、普通寒天培地で培養した新鮮培養菌を生理食塩水に懸濁後100℃10分でボイルし、ボイル後14,000 rpm 5分で遠心した上清を用いた。DNA

を抽出後、Clermont ら(10)が報告した multiplex PCR 法を用いて分子遺伝学的解析の 1 手法である系統分類を行った (図 3)。すなわち大腸菌の染色体上の 3 つの遺伝子 (*chuA*、*yjaA* および TspE4. C2) の保有の有無によって大腸菌を A 群 (*chuA*: - および TspE4. C2: -)、B1 群 (*chuA*: - および TspE4. C2: +)、B2 群 (*chuA*: + および *yjaA*: +) および D 群 (*chuA*: + および *yjaA*: -) に分類した。

2-5 病原関連遺伝子検出

大腸菌の病原関連遺伝子保有状況を調べるため、2-4 で抽出した DNA を用い、Delicato ら(12)、Johnson ら (20) および Moulin-Schouleur ら (30) が報告した PCR 法を用いて *iutA*: 鉄トランスポーター関連遺伝子、*iss*: 血清抵抗性遺伝子、*cvaC*: コリシン V プラスミド、*tsh*: 温度感受性赤血球凝集素遺伝子、*hlyF*: ヘモリジン、*iroN*: 鉄トランスポーター関連遺伝子および *ompT*: プロテアーゼを検出した。

2-6 マルチローカスシーケンスタイピング

2-4 で抽出した DNA を用い、分子遺伝学的解析の 1 手法であるマルチローカスシーケンスタイピング (MLST) を Wirth ら(48)が報告した方法を用いて実施した (図 4)。すなわち、ハウスキーピング遺伝子である *adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA* および *recA* を PCR で増幅後、ダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、それぞれの遺伝子の配列の差異をパターン化 (alleles) した後、7 つの alleles の組み合わせからシーケンスタイプ (ST) を決定した。

2-7 統計学的処理

TGC 耐性大腸菌および感受性大腸菌間の抗菌性物質使用率、薬剤耐性率、系統

群の割合および病原遺伝子保有率の比較はFisher の直接確率検定を用いて行った。有意水準は $P=0.05$ （両側検定）とした。

第3節 実験結果

3-1 TGC 耐性株および感受性株間の薬剤感受性および系統分類の比較

2009 年に肉用鶏から分離された大腸菌 96 株のうち、同一検体から分離された同一薬剤耐性型の 2 株は 1 株として取り扱い、最終的には 78 株についてさらなる解析を行った（図 5）。78 株中 12 株で TGC であるセフトフル（CTF）に対する耐性が認められた。78 株を TGC 耐性株（12 株）および感受性株（66 株）に分け、TGC 耐性株および感受性株の薬剤感受性および系統分類の結果を表 4 および 5 に示した。薬剤感受性では TGC 耐性株の AMP、CFZ、DSM および CHL の耐性率が TGC 感受性株よりも有意に高く、また他の薬剤についても有意差は認められないものの感受性株と比較して高い傾向が認められた（表 4）。系統分類では、TGC 耐性株では A 群、B1 群および D 群が均等な割合であり、B2 群は認められなかった。一方、TGC 感受性株では A 群が最も多く、次いで B1 群および D 群で B2 群は 1 株のみ認められた。TGC 耐性株および TGC 感受性株間で系統群の割合の比較において有意差は認められなかった。

3-2 TGC 耐性株および感受性株間の抗菌性物質使用歴の比較

それぞれの株が分離された鶏に使用されていた抗菌性物質を表 6 に示した。セフェム系抗菌性物質は TGC 耐性株が分離された鶏のみならず、いずれの鶏に対しても一切使用されていなかった。全体で使用が多かった系統は、ポリペプチド系（32 羽、41.0 %）、ポリエーテル系（30 羽、38.5 %）およびオルトソマイシン系（11 羽、14.1 %）抗菌性物質であった。

3-3 TGC 耐性株および感受性株間の病原関連遺伝子保有率の比較

TGC 耐性株および感受性株の病原関連遺伝子検出の結果を表 7 に示した。TGC

耐性株において、細菌の鉄獲得能に関連する遺伝子である *iutA* およびタンパク質分解酵素遺伝子である *ompT* 保有率の割合が TGC 感受性株よりも有意に高く、また *cvaC* 以外の他の病原関連遺伝子についても有意差は認められないものの感受性株と比較して高い傾向が認められた。

3-4 TGC 耐性株および感受性株間の ST の比較

TGC 耐性株および感受性株の MLST の結果を表 8 に示した。MLST を行うことによって、肉用鶏における大腸菌の遺伝学的多様性の有無を調べることができ、MLST を行った結果決定されるシーケンスタイプ(ST)の種類が多い程、遺伝学的多様性が有ることが示される。MLST の結果、TGC 耐性株は 12 種、TGC 感受性株は 38 種と多様な ST に型別された。また、TGC 耐性株の 12 株は全て異なる ST であった。

第4節 考察

本研究では肉用鶏における TGC 耐性株の出現要因として考えられる 1) 肉用鶏農場における TGC の適応外使用の可能性および 2) TGC 以外の薬剤の使用に起因する交差耐性または共耐性が関与した可能性について検討した。

まず 1) について検討するため大腸菌が分離された肉用鶏における抗菌性物質使用歴を調べたところ、TGC が含まれるセフェム系抗菌性物質についてはいずれの肉用鶏にも使用されていなかった。したがって本研究の薬剤感受性試験において 12 株の CTF 耐性株が認められたが、これらの出現に農場におけるセフェム系抗菌性物質の使用が要因となっていた可能性は低いと考えられた。

続いて 2) について検討するため、肉用鶏から分離された大腸菌を TGC 耐性株および感受性株に分け、両者間で薬剤感受性および遺伝学的性状の比較を行った。まず薬剤感受性の比較では TGC 耐性株の各種薬剤の耐性率は全体として感受性株よりも高い傾向にあり、特に AMP、CFZ、DSM および CHL の耐性率は感受性株よりも有意に高かった。このうち、AMP および CFZ は、CTF と同系統の薬剤かつ大腸菌に対する抗菌力が CTF よりも弱いため(43)、TGC 耐性株で高くなったと考えられた。一方 DSM および CHL については CTF と系統が異なる薬剤であるため、CTF と系統が異なる薬剤の使用によって TGC 耐性が選択される可能性が示唆されたが、DSM 耐性または CHL 耐性を保有する TGC 耐性株が分離された肉用鶏に対して DSM または CHL は投与されていなかった。

病原関連遺伝子保有率の比較において、TGC 耐性株は感受性株よりも病原関連遺伝子の保有率が全体として高い傾向にあり、*iutA* および *ompT* の保有率は有意に高かった。*iutA* は鉄獲得能に関与する遺伝子であり、この遺伝子を保有する大腸菌は鉄欠乏状況下で優位に鉄を獲得出来、*ompT* はタンパク質分解酵素の遺伝子である(12, 19, 30)。これらの遺伝子は健康な鶏由来大腸菌と鶏大腸菌症

由来大腸菌で比較した際に鶏大腸菌症由来大腸菌で保有率が有意に高いと報告された遺伝子であり(12, 19)、肉用鶏に対する病原性が高い株が TGC 耐性となっている現状が伺えた。

肉用鶏由来大腸菌に行った MLST の結果では、全 78 株において 46 種の ST が同定され、TGC 耐性株と感受性株ともに多様な ST に型別された。同定された ST の中には鶏大腸菌症由来大腸菌として報告された ST (ST10、69、93、101、117 および 155) が認められたが(28, 39)、それらは TGC 耐性株および感受性株のどちらにも含まれていた。そのため本研究で分離された TGC 耐性大腸菌は特定の ST に限局しておらず、遺伝学的に多様であったことが示唆された。また系統分類においても TGC 耐性株および感受性株ともに A、B1 および D 群が主に分類され、TGC 耐性大腸菌においては 3 群が均等に認められたことも遺伝学的多様性を示唆している。したがって本研究において、第 1 章の結果と同様 TGC 耐性株は遺伝学的に多様であり、遺伝学的に近縁な TGC 株が全国に伝播したのではないことが示唆された。

以上より、TGC 耐性大腸菌は第 1 章の結果と同様遺伝学的に多様であり、農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性は農場におけるセフェム系抗菌性物質の適応外使用および TGC 以外の薬剤の使用が要因である可能性は低いと考えられた。

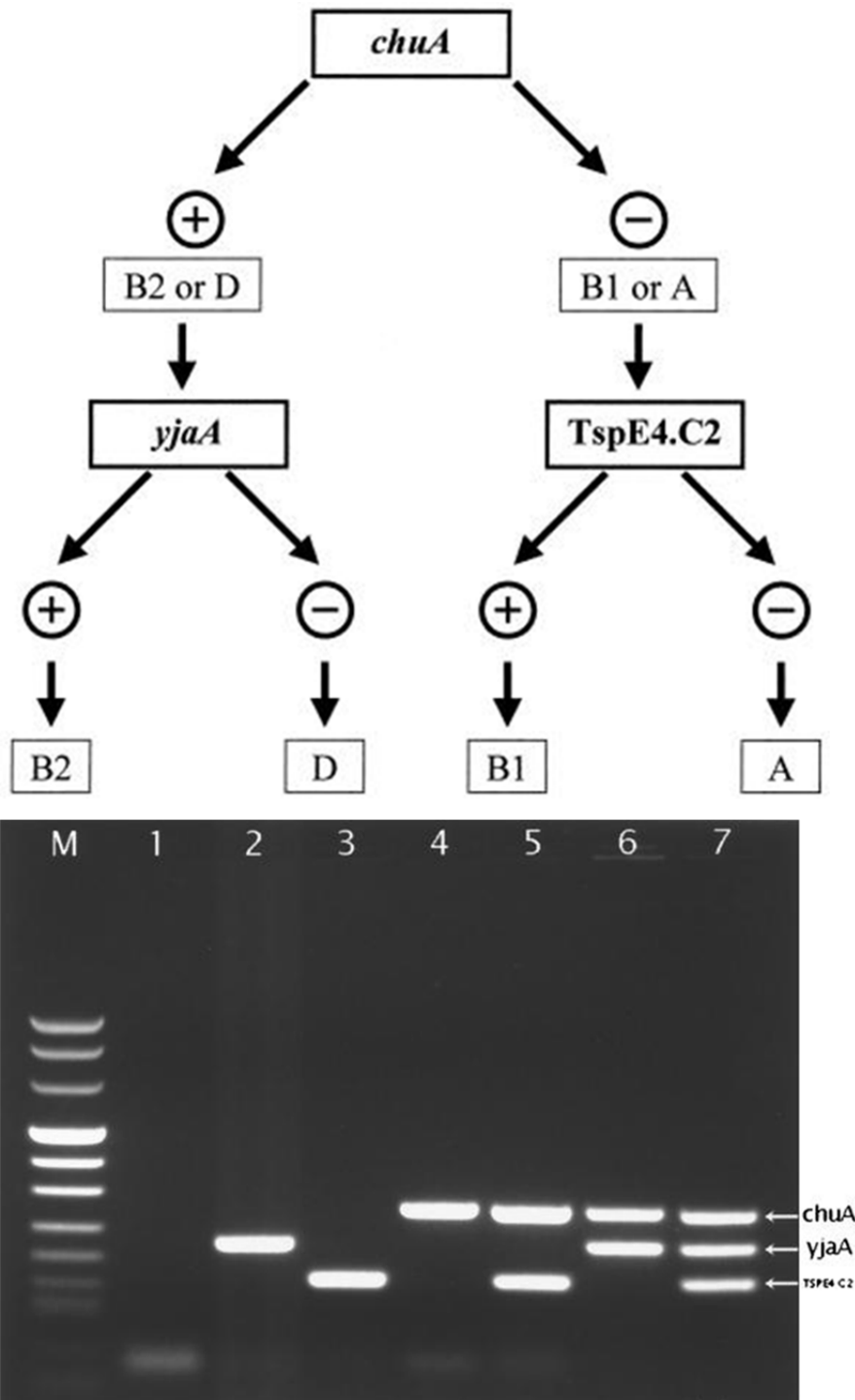
第5節 結語

農場における抗菌性物質の使用歴調査において、いずれの農家においても肉用鶏に対してセフェム系抗菌性物質を使用していないことが確認されたため、農場における適応外使用が TGC 耐性と関係している可能性は低いと考えられた。

肉用鶏における TGC 耐性株と感受性株間の比較から、TGC 耐性株は感受性株よりも AMP、CFZ、DSM および CHL の耐性率が高いことが示されたことから、他の薬剤の使用によって TGC 耐性株が選択される可能性が示唆されたが、DSM 耐性または CHL 耐性を保有する TGC 耐性株が分離された肉用鶏に対して DSM または CHL は投与されていなかった。

TGC 耐性株と感受性株に行った系統分類および MLST の結果から、TGC 耐性株および感受性株とも遺伝学的に多様であることが示された。

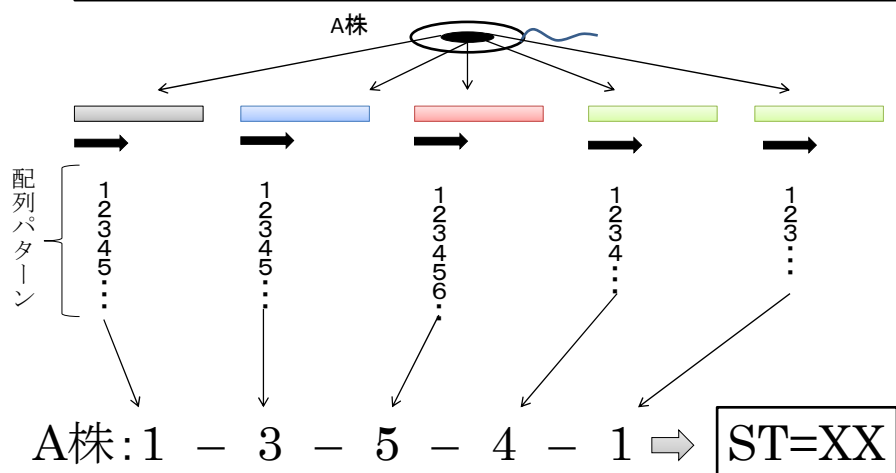
図 3. 系統分類手順



Appl Environ Microbiol. 2000 Oct; 66(10): 4555–4558. より引用
 レーン 1 および 2 は group A、レーン 3 は group B1、レーン 4 および 5 は group D、レーン 6 および 7 は group B2 と判定される。Lane M はマーカー。

図 4. マルチローカスシーケンスタイピング手順

- ① 細菌の複数の遺伝子の配列を各数百塩基ずつ読む
- ② それぞれの遺伝子の配列パターンの組み合わせでシーケンスタイプ (ST) が決定



モダンメディア 52 巻 7 号 2006:209-216 を改変

図 5. 株の選択方法フローチャート

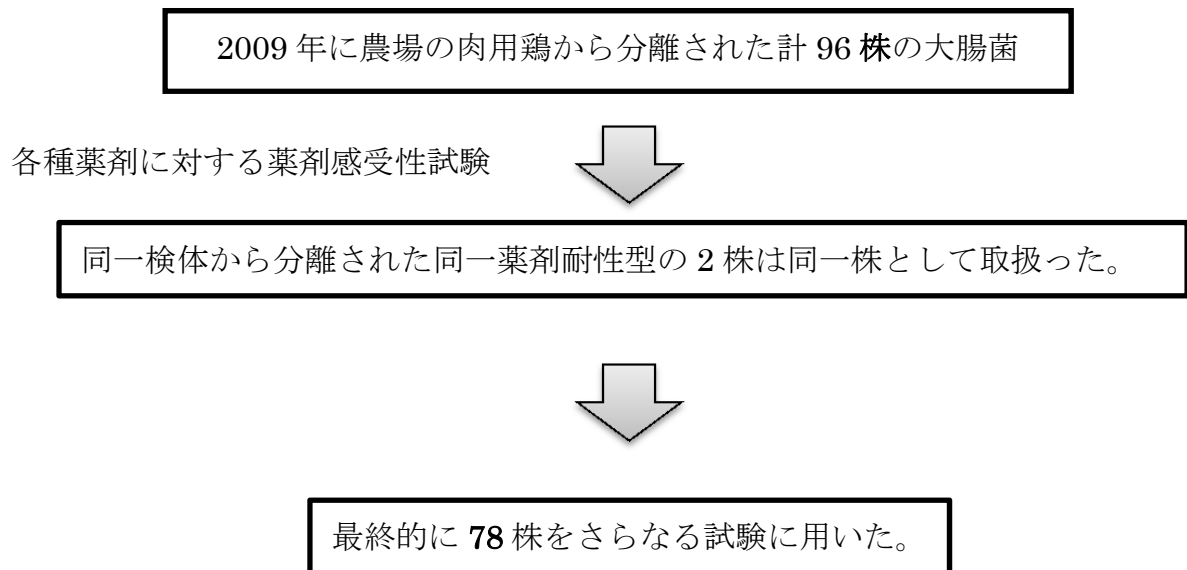


表 4. 肉用鶏から分離された第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌と感受性大腸菌間の薬剤耐性率の比較

Antimicrobial agent	No. (%) of positive strains	
	Third generation cephalosporin (TGC) resistant strains	Third generation cephalosporin susceptible strains
	(n=12)	(n=66)
CTF	12 (100)*	0 (0)
AMP	12 (100)*	22 (33.3)
CFZ	12 (100)*	2 (3.0)
DSM	8 (66.7)*	20 (30.3)
GEN	2 (16.7)	1 (1.5)
KAN	4 (33.3)	8 (12.1)
OXY	8 (66.7)	34 (51.5)
CHL	4 (33.3)*	6 (9.1)
CST	1 (8.3)	0 (0)
NAL	8 (66.7)	22 (33.3)
EFX	2 (16.7)	8 (12.1)
TMP	5 (41.7)	19 (28.8)

* 有意差 (P<0.05) が認められた

表 5. 肉用鶏から分離された第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌と感受性大腸菌間の系統分類の比較

Phylogroup (n)	No. (%) of positive strains	
	Third generation	Third generation
	cephalosporin resistant strains (n=12)	cephalosporin susceptible strains (n=66)
A	4 (33.3)	31 (47.0)
B1	4 (33.3)	24 (36.4)
B2	0	1 (1.5)
D	4 (33.3)	10 (15.2)

表 6. 肉用鶏から分離された第 3 世代セファロsporin耐性大腸菌と感受性大腸菌間の薬剤使用歴の比較

Antimicrobial agents use	No. (%) of positive strains		Total (n=78)
	Third generation cephalosporin-resistant strains (n=12)	Third generation cephalosporin-susceptible strains (n=66)	
Cephem	0	0	0
Penicillin	3 (25.0)	4 (6.1)	7 (9.0)
Aminoglycoside	3 (25.0)	2 (3.0)	5 (6.4)
Tetracycline	2 (16.7)	1 (1.5)	3 (3.8)
Sulpha	1 (8.3)	7 (10.6)	8 (10.3)
Phenicol	0	0	0
Quinolone	3 (25.0)	3 (4.5)	6 (7.7)
Polyether	3 (25.0)	27 (40.9)	30 (38.5)
Polypeptide	4 (33.3)	28 (42.4)	32 (41.0)
Orthosomycin	3 (25.0)	8 (12.1)	11 (14.1)
Other	1 (8.3)	13 (19.7)	14 (17.9)

表 7. 肉用鶏から分離された第 3 世代セファロsporin耐性大腸菌と感受性大腸菌間の病原関連遺伝子保有率の比較

Virulence-associated gene	No. (%) of positive strains	
	Third generation cephalosporin resistant strains (n=12)	Third generation cephalosporin susceptible strains (n=66)
<i>iutA</i>	8 (66.7) *	15 (22.7)
<i>iss</i>	4 (33.3)	12 (18.2)
<i>cvaC</i>	1 (8.3)	8 (12.1)
<i>Tsh</i>	2 (16.7)	3 (4.5)
<i>iroN</i>	4 (33.3)	15 (22.7)
<i>hlyF</i>	6 (50.0)	16 (24.2)
<i>ompT</i>	7 (58.3) *	16 (24.2)

*有意差 (P<0. 05) が認められた

表 8. 肉用鶏から分離された第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌と感受性大腸菌間のシーケンス型の比較

	Phylogroup (n)	Sequence type (ST) (n)
Third generation cephalosporin-resistant strains (n=12)	A (4)	10 (1), 93 (1), 2465 (1), ND (1)
	B1 (4)	156 (1), 295 (1), 1079 (1), 2476 (1)
	D (4)	57 (1), 117 (1), 2309 (1), 2477 (1)
Third generation cephalosporin-susceptible strains (n=66)	A (31)	10 (11), 48 (2), 752 (1), 1286 (2), 1421 (1), 1564 (1), 1630 (1), 2223 (2), 2461 (1), 2462 (1), 2463 (2), 2466 (2), 2469 (1), 2470 (1), 2471 (1), 2478 (1)
	B1 (24)	58 (1), 154 (1), 155 (9), 453 (2), 533 (1), 641 (1), 1079 (1), 1724 (1), 1730 (1), 1771 (1), 2464 (1), 2472 (1), 2473 (1), 2475 (1)
	B2 (1)	2474 (1)
	D (10)	69 (1), 117 (3), 196 (1), 297 (2), 350 (1), 420 (1), 457 (1)

ND: 型別不能

第3章 孵卵場におけるセフトオフィルの自主的使用禁止が農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性に与える影響

第1節 緒言

Kojima ら(24, 25)によって1999年から2001年に分離された家畜由来大腸菌における TGC 耐性が報告され、2000年から2003年に分離された肉用鶏由来大腸菌では4.0%において TGC 耐性が認められたことが報告された。さらに第1章の結果2004年から2009年では13.0%まで耐性率が上昇した。日本では牛、豚、犬および猫に対して TGC 製剤が承認され使用されているが、肉用鶏に対する TGC 製剤の承認はされていない(54)。実際に第2章の結果、農場での TGC 製剤の使用は認められなかった。また他の薬剤の使用によって TGC 耐性株が選択された可能性も低いと考えられた。その一方で、TGC 耐性大腸菌の出現要因の1つとして考えられた孵卵場における CTF の適応外使用の可能性については第2章で検討できなかった。さらに第1章の結果から大腸菌が TGC 耐性化するためにはプラスミド性耐性遺伝子を獲得する必要があると考えられたが、その起源は明らかにされていない。

JVARM における肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性率の著明な上昇というモニタリング成績を考慮し、2012年3月に生産者の協会から生産者に対して孵卵場における CTF の接種を中止するよう自主的な注意喚起がなされた。このため注意喚起の前後における農場の肉用鶏由来大腸菌の CTF 耐性の変動を調べることで、孵卵場における CTF の適応外使用と農場における肉用鶏由来大腸菌の CTF 耐性との関係を検討できるものと考えられた。

そこで第3章では、孵卵場における注意喚起の前後2年における肉用鶏由来大腸菌の TGC に対する薬剤感受性調査を行い、孵卵場での CTF 接種中止が農場における肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性に与える影響を調べた。また TGC 耐性大

腸菌の遺伝学的解析を行い、TGC 耐性株に生じた変動を調べることで TGC 耐性遺伝子の起源を検討した。

第2節 材料および方法

2-1 供試菌株

2010年から2013年のそれぞれ7月から9月において、全国の全362農場の肉用鶏の362糞便検体から分離された計693株の大腸菌を供した。全国は地理的に均等となるように2ブロックに分けて2年に1度、農場における肉用鶏から大腸菌の分離を行った。検体は1農場1検体とし、デオキシコレート寒天培地（栄研化学株式会社、東京、日本）を用いて1検体から最大2株の大腸菌を分離した。同定はAPI20E（バイオメリュー、東京、日本）を用いて行った。

2-2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験はAMP、CFZ、CTX、ストレプトマイシン（STR、Streptomycin）、GEN、KAN、TET、CHL、CST、NAL、CIPおよびTMPを対象に、CLSIの方法に準拠し、ドライプレート（栄研化学、東京、日本）を用いた微量液体希釈法にて行った。尚、動物用医薬品のCTFのドライプレートは市販されていないため、TGCの薬剤感受性についてはCTFと同系統の薬剤で交差耐性を示すCTXを用いて測定した。

2-3 β -ラクタマーゼ遺伝子検出および同定

2-2の結果、TGC耐性株については β -ラクタマーゼ遺伝子の検出および同定を行った。大腸菌のDNAは、普通寒天培地で培養した新鮮培養菌を生理食塩水に懸濁後100℃10分でボイルし、ボイル後14,000 rpm 5分で遠心した上清を用いた。TEMおよびSHV型 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出はKojimaら(25)の報告しているプライマーを用いたPCR法で行った。AmpC型 β -ラクタマーゼ遺伝子（ACC、FOX、MOX、CITおよびEBC型 β -ラクタマーゼ遺伝子）の検出はDallenneら(11)

の Multiplex PCR 法および CTX-M 型 β -ラクタマーゼ遺伝子は Xu ら (49) の Multiplex PCR で行った。PCR の結果で陽性の大腸菌については続いて、Kojima ら (25)、Pitoout ら (40) および Xu ら (49) の報告しているプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行い、得られた塩基配列を BLAST program (National Center for Biotechnology Information) を用いて分析し、最終的な β -ラクタマーゼ型を同定した。

2-4 β -ラクタマーゼ遺伝子伝達試験

2-3 の結果、 β -ラクタマーゼ型が決定した株について、 β -ラクタマーゼ遺伝子の伝達試験を以下の Usui ら (47) の broth-mating method 法を用いて行った。まずドナー (CTF 耐性および RIF 感受性 *E. coli* 株) およびレシピエント (CTF 感受性および RIF 耐性の *E. coli* DH5 α) をそれぞれ LB ブロス (日本 BD、東京、日本) を用いて一夜培養し、培養後の菌液 20 μ l ずつを 160 μ l の LB ブロスに接種 (計 200 μ l) し、さらに一夜培養した。そして翌日、培養物を CFZ 32 mg/L および RIF 50 mg/L を添加したミュラーヒントン寒天培地 (日本 BD、東京、日本) に接種し、培養後発育した菌を伝達株とした。

2-5 伝達株プラスミドの不和合性群型別

2-4 の結果得られた伝達株の DNA を 2-3 で用いた方法で抽出後、プラスミドの型別である不和合性群型別 (IncHI1、IncHI2、IncI1、IncI γ 、IncI2、IncX、IncL/M、IncM、IncN、IncF1、IncFIme、IncW、IncFII、IncFIII、IncFIV、IncFV、IncFVI、IncY、IncP、IncA/C、IncC、IncT、IncJ、IncK、IncB および IncB/0) を Carattoli ら (9) が報告した Multiplex PCR 法を用いて行った。PCR の結果 IncI1 陽性の株 (332 bp) については、つづいて制限酵素 *Cvi*AI (ニュー・イン

グラント・バイオラボ・ジャパン、東京、日本）を用いて処理し、二つのフラグメント（60 bp および 272 bp）に切断された株は IncI1、切断されなかった株は IncI γ とした。

2-6 統計学的処理

CTF の接種中止前後の薬剤耐性率および β -ラクタマーゼ遺伝子割合の変動の比較は Fisher の直接確率検定にて行い、 $P=0.05$ （両側検定）を有意水準とした。

第3節 実験結果

3-1 薬剤感受性試験

2010年から2013年に農場の肉用鶏から分離された計693株(2010年195株、2011年161株、2012年206株および2013年131株)の大腸菌に対し薬剤感受性試験を実施したところ、TGCに対する耐性が693株中84株(12.1%、2010年32株、2011年27株、2012年19株および2013年6株)で認められた(表9)。農場の肉用鶏由来大腸菌のCTFの接種中止前後のTGCの耐性率の変動は、2010年:16.4%(32/195)および2011年:16.8%(27/161)に対し、2012年:9.2%(19/206)および2013年:4.6%(6/131))であり、CTFの接種中止の前後で耐性率が有意に減少した(表9および図6)。セファロスポリン以外の薬剤では、CTF接種中止の前後でSTR(2011年:24.8%に対し2012年:37.9%および2013年:38.2%)、KAN(2010年:13.3%および2011年:14.3%に対し2012年:27.7%および2013年:24.4%)およびCHL(2010年:10.8%および2011年:9.3%に対し2012年:16.5%および2013年:22.1%)の耐性率が有意に上昇した(表9)。

続いてTGC耐性株における各種薬剤の耐性率は、STR(2010年:37.5%(12/32)に対し2013年:100%(6/6))およびKAN(2010年:25.0%(8/32)および2011年:22.2%(6/27)に対し2012年:42.1%(8/19)および2013年:83.3%(5/6))の耐性率が有意に上昇した(表10)。

3-2 β -ラクタマーゼ遺伝子型別

TGC耐性株の β -ラクタマーゼ遺伝子の保有状況を表11に示した。主要な β -ラクタマーゼ遺伝子としては、CTF接種中止の前後のいずれの年もプラスミド性のセファロスポリン耐性遺伝子である *bla*_{CMY-2} が優勢であり(2010年:62.5%(20/32)、2011年:81.5%(22/27)、2012年:57.9%(11/19)および2013年:

83.3 % (5/6))、84 株の TGC 耐性株のうち 58 株が *bla*_{CMY-2} を保有していた。*bla*_{CMY-2} 以外にも *bla*_{CTX-M} 等の耐性遺伝子が認められたが、セフトロフルの接種中止前後で耐性遺伝子保有割合の有意な変動は認められなかった。

3-3 β -ラクタマーゼ遺伝子伝達試験および伝達株プラスミドの不和合性群 型別

84 株の TGC 耐性大腸菌のうち、主要な β -ラクタマーゼとして認められた *bla*_{CMY-2} 保有の 58 株に対して行った伝達試験の結果を表 12 示した。58 株から 31 株 (53.4 %) の伝達株が得られた。伝達株のプラスミドの不和合性群型別では、IncK が 38.7 % (12/31) および IncI1 が 25.8 % (8/31) で主要な群として認められ、次いで IncA/C が 16.1 % (5/31)、IncI γ が 9.7 % (3/31) および IncB/0 が 6.5 % (2/31) で認められた。

第4節 考察

本研究は2012年3月に生産者の協会から生産者に対して行われたCTF接種中止の注意喚起前後で肉用鶏由来大腸菌のTGC耐性率の変動を調べ、そこから孵卵場におけるCTFの適応外使用と農場における肉用鶏由来大腸菌のTGC耐性との関係を検討した。その結果、注意喚起後1年という短期間で肉用鶏由来大腸菌におけるTGC耐性率が有意に減少したことを示した。孵卵場におけるCTFの使用は、アメリカ、カナダ、イギリスおよびオランダで報告されたが、それぞれの国において使用が禁止された(2, 13, 15, 27)。Dutilら(13)はカナダにおける市販鶏肉由来大腸菌のセファロスポリン耐性状況を調査しており、カナダにおける孵卵場でのCTFの使用によってTGC耐性率の上昇が認められたが、CTF使用禁止後1年で耐性率の減少が認められたことを報告している。同様にオランダにおいても食鳥処理場由来大腸菌のTGC耐性率がCTF使用禁止後1年で減少したと報告されている(27)。本研究を含めた3カ国におけるCTF使用禁止後1年での速やかな耐性率の減少は、生産段階の上流における抗菌性物質の使用制限が下流の生産段階における薬剤耐性に対する1つの効果的な手法であることも示すと同時に、生産段階が上流の孵卵場におけるCTF使用が下流の生産段階である農場、食鳥処理場および市場におけるTGC耐性に影響を及ぼすことを示唆している。

本研究では農場の肉用鶏におけるTGC耐性遺伝子の起源についても検討した。Kojimaら(24, 25)の報告および第1章の結果、我が国における肉用鶏由来セファロスポリン耐性大腸菌が保有する主要な β -ラクタマーゼは bla_{CMY-2} であることが示され、本研究において、2010年から2013年に分離されたセファロスポリン耐性大腸菌においても主要な β -ラクタマーゼは bla_{CMY-2} であることが示された。 bla_{CMY-2} 以外にも bla_{CTX-M} などの β -ラクタマーゼも認められたが、CTF使用禁止の

前後で有意差を伴う β -ラクタマーゼの種類の変動は認められなかった。CTF 使用禁止によって主要な β -ラクタマーゼを維持したまま農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性率が減少したことは、農場の肉用鶏における TGC 耐性遺伝子の起源が孵卵場であることを示唆しているかもしれない。

TGC 耐性を媒介するプラスミドの不和合性群型としては、国際的に様々な群が報告されている(8)。しかしながら、本研究において TGC 耐性大腸菌から作出した伝達株のプラスミドの不和合性群型別は、IncK、IncI1、IncA/C および IncI γ が主に認められ、これらは第 1 章でも認められた型であった。Agerso ら(2)は、デンマークおよびスウェーデンの農場において肉用鶏にセファロスポリンが全く使用されていないにもかかわらず IncK および IncI1 の *bla*_{CMY-2} を保有する大腸菌が分離され、その原因は他国でセファロスポリンの使用によって選択された耐性大腸菌を保有する原種鶏を他国から輸入したためだと考察している。第 1 章および本研究で認められた我が国の IncK、IncI1、IncA/C および IncI γ の *bla*_{CMY-2} が原種鶏の輸入とともに持ち込まれたかは現在のところ不明である。

本研究では TGC 以外にも様々な薬剤の感受性を調べた。CTF の使用禁止の前後で耐性率が有意に変動した薬剤は STR、KAN および CHL であり、このうち STR および KAN については TGC 耐性株においても有意差を伴う耐性率の上昇が認められた。この結果は CTF の使用禁止の前後で STR および KAN の選択圧が増加していることを示唆しており、実際に農林水産省動物医薬品検査所が公表している肉用鶏に対する STR (DSM も含む) および KAN の販売高 (有効成分) は 2010 年または 2011 年に対し 2012 年および 2013 年で増加していた (STR: 2011 年、2,717.0 kg に対し 2012 年、6,870.8 kg および 2013 年、5,994.6 kg および KAN: 2010 年、1,200.3 kg および 2011 年、2,033.5 kg に対し 2012 年、4,731.7 kg および 2013 年、3,823.9 kg) (31-34)。2013 年に認められた TGC 耐性株は STR および KAN に対して高率に耐性を

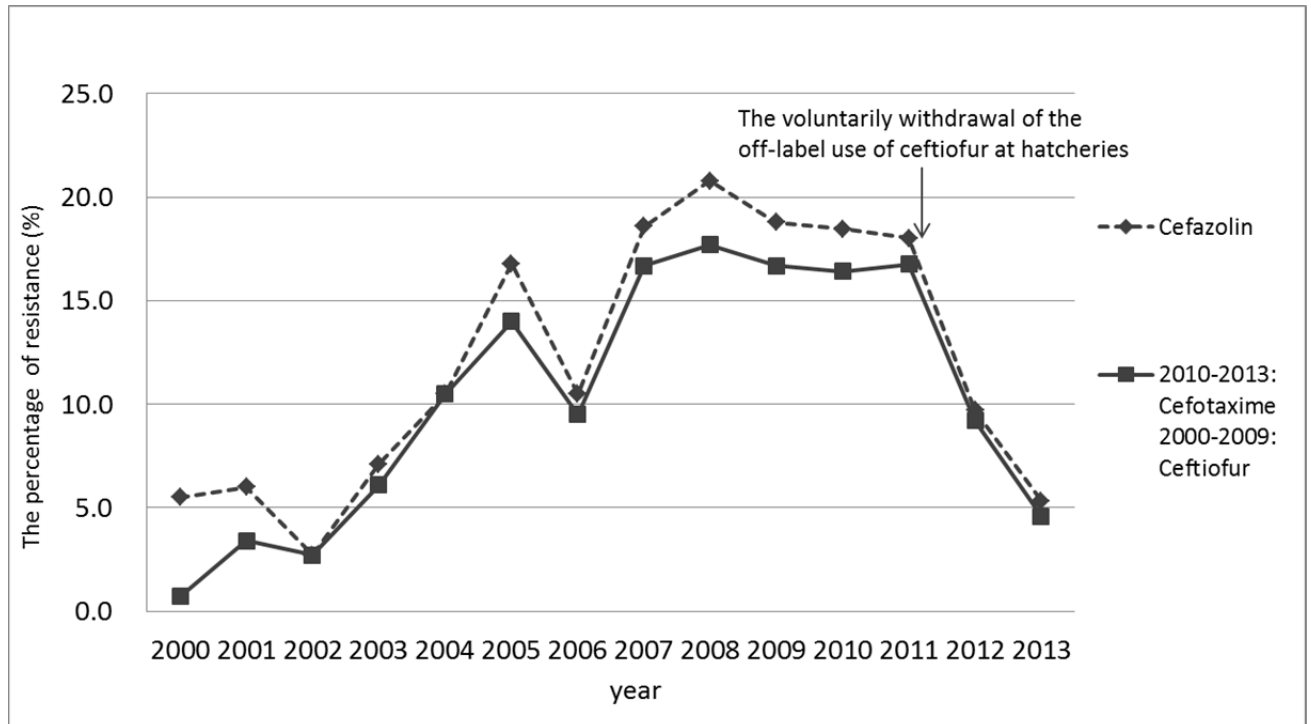
保有しているため、今後これらの薬剤の使用によってTGC耐性株が共選択される可能性があり、今後の動向に注視する必要がある。

第 5 節 結語

肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性率は、CTF 接種中止前の 2010 年および 2011 年と比較し、CTF 接種中止後の 2012 年および 2013 年で有意に減少した（2010 年：16.4 %および 2011 年：16.8 %に対し、2012 年：9.2 %および 2013 年：4.6 %）（ $P < 0.05$ ）ことから、農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性に孵卵場における CTF の適応外使用が大きく影響していたことが示唆された。

孵卵場における CTF 接種中止によって、農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性率は主要な TGC 耐性遺伝子である *bla_{CMY-2}* を維持したまま減少したことから、農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性遺伝子の起源は孵卵場であることが示唆された。

図 6. 2000 年から 2013 年の肉用鶏由来大腸菌におけるセファロスポリン耐性率



家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング (JVARM) から引用 (21, 22)

表 9. 2010 年から 2013 年に分離された肉用鶏由来大腸菌の各種薬剤に対する耐性率

Antibiotic (resistance breakpoint (mg/L))	2010 (n=195)	2011 (n=161)	2012 (n=206)	2013 (n=131)	Total (n=693)
CTX (4)	16.4 ^a	16.8 ^a	9.2 ^b	4.6 ^b	12.1
CFZ (32)	18.5 ^a	18.0 ^a	9.7 ^b	5.3 ^b	13.3
AMP (32)	42.1	42.9	55.8	47.3	47.3
STR (32)	NT	24.8 ^a	37.9 ^b	38.2 ^b	ND
GEN (16)	3.6	3.7	3.4	0.8	3.0
KAN (64)	13.3 ^a	14.3 ^a	27.7 ^b	24.4 ^b	19.9
TET (16)	56.4	47.2	58.3	61.8	55.8
NAL (32)	33.3	31.7	30.1	35.1	32.3
CIP (4)	3.6	3.7	7.8	7.6	5.6
CST (16)	0.5	0.6	0.5	0	0.4
CHL (32)	10.8 ^a	9.3 ^a	16.5	22.1 ^b	14.3
TMP (16)	NT	23.6	33	40.5	ND

^{a, b}a と b 間で有意差 (P<0.05)が認められた

NT: 試験非実施

ND: 計算不可

表 10. 2010 年から 2013 年に分離された肉用鶏由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌の各種薬剤に対する耐性率

Antibiotic (resistance breakpoint (mg/L))	2010 (n=32)	2011 (n=27)	2012 (n=19)	2013 (n=6)	Total (n=693)
CTX (4)	100	100	100	100	100
CFZ (32)	100	100	100	100	100
AMP (32)	100	100	100	100	100
STR (32)	37.5 ^a	51.9	52.6	100.0 ^b	50.0
GEN (16)	9.4	14.8	5.3	0	9.5
KAN (64)	25.0 ^a	22.2 ^a	42.1	83.3 ^b	32.1
TET (16)	68.8	66.7	78.9	100	72.6
NAL (32)	59.4 ^a	59.3 ^a	26.3 ^b	50	51.2
CIP (4)	15.6	11.1	0	33.3	11.9
CST (16)	3.1	0	0	0	1.2
CHL (32)	18.8	22.2	21.1	50	22.6
TMP (16)	NT	25.9	15.8	16.7	ND

^{a, b} a と b 間で有意差 (P<0.05)が認められた

NT: 試験非実施

ND: 計算不可

表 11. 2010 年から 2013 年に分離された肉用鶏由来第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌における β -ラクタマーゼ型別

year (n)	Rate of strains harboring <i>bla</i> _{CMY-2} (n) in TGC-resistant strains	β -lactamase (n) in TGC-resistant
2010 (32)	62.5% (20)	CMY-2 (13) CMY-2, TEM-1 (3) CMY-2, TEM-1, OXA-4 (2) CMY-2, CTX-M-25, TEM-1 (2) CTX-M-1 (3) CTX-M-2(4) CTX-M-2, TEM-1 (1) CTX-M-2, SHV-2. TEM-1 (1) CTX-M-15, TEM-1 (3)
2011 (27)	81.5% (22)	CMY-2 (16) CMY-2, TEM-1 (4) CMY-2, TEM-135 (2) CTX-M-1 (1) CTX-M-2 (1) CTX-M-2, TEM-1 (3)
2012 (19)	57.9% (11)	CMY-2 (8) CMY-2, TEM-1 (2) CMY-2, TEM-135 (1) CTX-M-1 (1) CTX-M-1,TEM-1 (2) CTX-M-2 (3) CTX-M-25 (1) TEM-1, SHV-12 (1)
2013 (6)	83.3% (5)	CMY-2 (4) CMY-2, TEM-1 (1) AmpC promoter mutation(1)
Total (84)	69.0% (58)	

表 12. 2010 年から 2013 年に分離された肉用鶏由来 *bla*_{CMY-2} 保有大腸菌 58 株から作出した 31 株の伝達株プラスミドのレプリコン型別

Year	n (%)	Replicon types of plasmids in 31 transconjugants (n)
2010	12 (38.7)	K (3)
2011		K (3)
2012		K, FIB (1)
2012		K, II (1)*
2012		K (4)
2013		K (1)
2010	8 (25.8)	II (4)
2011		II (2)
2011		II, FIB (1)
2012		II (1)
2012		K, II (1)*
2010	5 (16.1)	A/C, Frep (1)
2010		A/C (3)
2013		A/C, B/O (1) [#]
2011	3 (9.7)	I _γ (3)
2011	2 (6.5)	B/O (1)
2013		A/C, B/O (1) [#]
2012	1 (3.2)	UT (1)

※, # 同一株

UT: 型別不能

結論

本研究では我が国の家畜における TGC 耐性大腸菌の分布状況を明らかにし、農場の肉用鶏における TGC 耐性大腸菌の出現要因を調べた。

まず第 1 章では 2004 年から 2009 年に全国の農場の家畜から分離された大腸菌の TGC 耐性状況を調べ、TGC 耐性株について分子遺伝学的解析を行った。その結果、TGC 耐性大腸菌は家畜の中でも特に肉用鶏に多く、TGC 耐性大腸菌の 82.4 % は肉用鶏由来であることが示された。TGC 耐性株について行った PFGE の結果では、肉用鶏由来の 6 株を除いた 54 株はそれぞれ 80 % 以下の相同性を示し、株間の遺伝学的な関係性は認められなかった。また TGC 耐性大腸菌の耐性遺伝子の同定では、国際的に数多くの β -ラクタマーゼ遺伝子が報告されている中で TGC 耐性大腸菌の 67.7 % は *bla*_{CMY-2} を保有していることを示した。*bla*_{CMY-2} 保有株から作出した伝達株のプラスミドの不和合性群型別では、IncI γ (29.4%)、IncA/C (26.4%)、IncK (20.5%) および IncI1 (17.6%) の 4 群が主要な群として認められ、それら 4 群はいずれかの年度に偏ることなく、幅広い年度において認められた。これらの結果から、TGC 耐性大腸菌の耐性遺伝子は *bla*_{CMY-2} が主要な遺伝子として認められたが、株自身の遺伝子間の関連性は低く、遺伝学的に多様であると考えられた。

第 2 章では農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性出現の要因として考えられた 3 つの可能性：1) 肉用鶏農場における適応外使用の可能性、2) 孵卵場における適応外使用の可能性および 3) TGC 以外の薬剤の使用に起因する交差耐性または共耐性により TGC 耐性大腸菌が選択された可能性のうち、1) および 3) について検討すべく、農場の抗菌性物質使用歴調査を行うとともに、肉用鶏から分離された大腸菌に対し、TGC 以外の薬剤についても薬剤感受性試験を行った。そして、TGC 耐性大腸菌と TGC 感受性大腸菌の TGC 以外の薬剤に対する感受性を

比較し、TGC 以外の薬剤の使用と TGC 耐性との関係を調べた。その結果、1) については農場において TGC の適応外使用は認められなかったことから可能性は低いと考えられた。また 3) についても、他の薬剤に対する耐性を保有する TGC に対して、耐性の薬剤は使用されていなかったことから可能性は低いと考えられた。

第 3 章では第 2 章で検討できなかった 2) 孵卵場における CTF の適応外使用が肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性の要因となった可能性について、2012 年 3 月に生産者の協会からなされた孵卵場における CTF 接種中止の注意喚起の前後の農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性を調べることで検討した。その結果、CTF の接種中止後 1 年という短期間に農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性率が有意に減少していたことから、孵卵場における CTF の適応外使用が農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性に大きく影響していたことが示唆された。

以上の結果から、1) 我が国の家畜には特に肉用鶏において主に *bla*_{CMY-2} を保有する TGC 耐性大腸菌が分布しており、2) その要因としては農場の肉用鶏に対する TGC の適応外使用または TGC 以外の抗菌性物質の使用によって TGC 耐性株が選択された可能性は低く、3) 孵卵場における CTF の自主的な使用中止によって 1 年という短期間に CTF 耐性率が有意に減少したことから、孵卵場における CTF の適応外使用が農場の肉用鶏由来大腸菌の TGC 耐性に大きく影響していたことが示唆された。従って、本研究は我が国の家畜分野における TGC 耐性大腸菌の分布状況を明らかにするのみならず、農場の肉用鶏由来大腸菌における TGC 耐性出現の要因についても明らかにした。また同時に農場よりも生産段階が上流の孵卵場における薬剤耐性に対する取り組みが、農場における薬剤耐性を効果的に減弱させた 1 例についても示し、今後も末永く家畜分野において抗菌性物質を使い続けていく上で重要な研究であったと考える。

謝辞

本研究の遂行とまとめにあたり終始懇切な御指導御鞭撻を賜り、かつ本論文の校閲の労をとっていただいた麻布大学 阪口 雅弘教授、並びに岐阜大学大学院 浅井鉄夫教授に深甚の謝意を表します。

また、始終御指導と御激励を賜った農林水産省動物医薬品検査所 安全性検査第一領域 川西路子博士に心から感謝致します。

なお、本研究の遂行に当り御指導御便宜を賜った、酪農学園大学 臼井優博士、農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部長 濱本修一技官、同免疫・病理検査領域 木島まゆみ博士、同安全性検査第一領域 小池良治技官、小澤真名緒博士、食品安全委員会 秋山哲男博士、テンプスタッフ 阿保均技官をはじめ、先輩および同僚諸氏、JVARMにおいて菌株を分離・提供頂きました全国の家畜保健衛生所の皆様に深謝致します。

本論文は以下に示す報告を主体にしてまとめたものである。

基礎となる学術論文

- (1) Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*_{CMY-2} gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. Foodborne Pathog Dis. 2013;10:243-9. Final publication is available from Mary Ann Liebert, Inc., publishers <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1306>
- (2) Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H, Kojima A, Asai T. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. Ir Vet J. 2014;67:14.
- (3) Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T. Decreased resistance to broad-spectrum cephalosporin in *Escherichia coli* from healthy broilers at farms in Japan after voluntary withdrawal of ceftiofur. Foodborne Pathog Dis. 2015;12:639-43. Final publication is available from Mary Ann Liebert, Inc., publishers <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2015.1960>

参考文献

1. Abraham, E. P. A brief history of the discovery of the penicillins and cephalosporins. *Chemotherapy* 33:1-5. 1985.
2. Agerso, Y., J. D. Jensen, H. Hasman, and K. Pedersen. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis* 11:740-746. 2014.
3. Antunes, P., T. M. Coque, and L. Peixe. Emergence of an IncIy plasmid encoding CMY-2 β -lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing β -lactamase *Salmonella* Typhimurium multidrug-resistant clone. *J Antimicrob Chemother* 65:2097-2100. 2010.
4. Asai, T. Antimicrobial usage and resistant bacteria in food-producing animals. *Ann, Rep, Natl. Vet. Lab. No.* 42:1-8. 2005.
5. Asai, T., K. Murakami, M. Ozawa, R. Koike, and H. Ishikawa. Relationships between multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Jpn J Infect Dis* 62:198-200. 2009.
6. Batchelor, M., E. J. Threlfall, and E. Liebana. Cephalosporin resistance among animal-associated Enterobacteria: a current perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3:403-417. 2005.
7. Bush, K., and G. A. Jacoby. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969-976. 2010.
8. Carattoli, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2227-2238. 2009.
9. Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63:219-228. 2005.
10. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555-4558. 2000.
11. Dallenne, C., A. Da Costa, D. Decre, C. Favier, and G. Arlet. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 65:490-495. 2010.
12. Delicato, E. R., B. G. de Brito, L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* 94:97-103. 2003.
13. Dutil, L., R. Irwin, R. Finley, L. K. Ng, B. Avery, P. Boerlin, A. M. Bourgault, L. Cole, D. Daignault, A. Desruisseau, W. Demczuk, L. Hoang, G. B. Horsman, J. Ismail, F. Jamieson,

- A. Maki, A. Pacagnella, and D. R. Pillai. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis* 16:48-54. 2010.
14. Epizooties, O. I. d. Proceeding of European Scientific Conference. The use of antibiotics in animals ensuring the protection of public health. Office International des Epizooties, Paris, France. 1999.
 15. FDA. Food and Drug Administration. Final rule. New animal drugs: cephalosporin drugs: extralabel animal drug use, order of prohibition. *Fed Regist* 73:38110-3. 2008.
 16. Folster, J. P., G. Pecic, A. McCullough, R. Rickert, and J. M. Whichard. Characterization of *bla_{CMY}*-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. *Foodborne Pathog Dis* 8:1289-1294. 2011.
 17. Harada, K., and T. Asai. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J Biomed Biotechnol* 2010:180682. 2010.
 18. Hiroi, M., F. Yamazaki, T. Harada, N. Takahashi, N. Iida, Y. Noda, M. Yagi, T. Nishio, T. Kanda, F. Kawamori, K. Sugiyama, T. Masuda, Y. Hara-Kudo, and N. Ohashi. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci* 74:189-195. 2012.
 19. Johnson, T. J., Y. Wannemuehler, C. Doetkott, S. J. Johnson, S. C. Rosenberger, and L. K. Nolan. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol* 46:3987-3996. 2008.
 20. Johnson, T. J., Y. Wannemuehler, S. J. Johnson, A. L. Stell, C. Doetkott, J. R. Johnson, K. S. Kim, L. Spanjaard, and L. K. Nolan. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 74:7043-7050. 2008.
 21. JVARM. Report of Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System -2000 to 2007- http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/index.html. 2009.
 22. JVARM. Report of Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System -2008 to 2011- http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/index.html. 2013.
 23. Kijima-Tanaka, M., K. Ishihara, A. Morioka, A. Kojima, T. Ohzono, K. Ogikubo, T. Takahashi, and Y. Tamura. A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. *J Antimicrob Chemother* 51:447-451. 2003.
 24. Kojima, A., T. Asai, K. Ishihara, A. Morioka, K. Akimoto, Y. Sugimoto, T. Sato, Y. Tamura, and T. Takahashi. National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan. *J Vet Med Sci* 71:1301-1308.

- 2009.
25. Kojima, A., Y. Ishii, K. Ishihara, H. Esaki, T. Asai, C. Oda, Y. Tamura, T. Takahashi, and K. Yamaguchi. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3533-3537. 2005.
 26. Li, X. Z., M. Mehrotra, S. Ghimire, and L. Adewoye. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol* 121:197-214. 2007.
 27. MARAN. Monitoring Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands. Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2013
http://www.wageningenur.nl/upload_mm/1/a/1/0704c512-5b42-4cef-8c1b-60e9e3fb2a62_NethMap-MARAN2014.pdf. 2014.
 28. Martinez-Medina, M., J. Garcia-Gil, N. Barnich, L. H. Wieler, and C. Ewers. Adherent-invasive *Escherichia coli* phenotype displayed by intestinal pathogenic *E. coli* strains from cats, dogs, and swine. *Appl Environ Microbiol* 77:5813-5817. 2011.
 29. Mataseje, L. F., J. Xiao, S. Kost, L. K. Ng, K. Dore, and M. R. Mulvey. Characterization of Canadian cefoxitin-resistant non-typhoidal *Salmonella* isolates, 2005-06. *J Antimicrob Chemother* 64:723-730. 2009.
 30. Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, S. Laurent, A. Bree, S. Mignon-Grasteau, P. Germon, D. Rasschaert, and C. Schouler. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 45:3366-3376. 2007.
 31. NVAL. National Veterinary Assay Laboratory. Sales amounts and sales volumes (active substance) of antibiotics, synthetic antibacterials, antihelmintics and antiprotozoals
<http://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/>. 2010.
 32. NVAL. National Veterinary Assay Laboratory. Sales amounts and sales volumes (active substance) of antibiotics, synthetic antibacterials, antihelmintics and antiprotozoals
<http://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/>. 2011.
 33. NVAL. National Veterinary Assay Laboratory. Sales amounts and sales volumes (active substance) of antibiotics, synthetic antibacterials, antihelmintics and antiprotozoals
<http://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/>. 2012.
 34. NVAL. National Veterinary Assay Laboratory. sales amounts and sales volumes (active substance) of antibiotics, synthetic antibacterials, antihelmintics and antiprotozoals
<http://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/>. 2013.
 35. Organization, W. H. Report of W.H.O. meeting. Use of quinolones in food animals and

- potential impact of human health. Geneva, Switzerland, 2 to 5 June 1998. 1998.
36. Organization., W. H. Report of W.H.O. meeting. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. Berlin, Germany, 13 to 17 October 1997. 1997.
 37. Ortega, M., A. Soriano, F. Marco, M. Almela, J. A. Martinez, L. Morata, N. Cobos-Trigueros, C. de la Calle, and J. Mensa. Risk factors for the isolation of a third generation cephalosporin resistant strain in patients with community-acquired *Enterobacteriaceae* bacteraemia. *J Infect.* 2015.
 38. Ozaki, H., H. Esaki, K. Takemoto, A. Ikeda, Y. Nakatani, A. Someya, N. Hirayama, and T. Murase. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet Microbiol* 150:132-139. 2011.
 39. Ozawa, M., K. Baba, and T. Asai. Molecular typing of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strains in Japan by using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Med Sci* 72:1517-1520. 2010.
 40. Pitout, J. D., A. Hossain, and N. D. Hanson. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 42:5715-5721. 2004.
 41. Poole, T. L., T. S. Edrington, D. M. Brichta-Harhay, A. Carattoli, R. C. Anderson, and D. J. Nisbet. Conjugative transferability of the A/C plasmids from *Salmonella enterica* isolates that possess or lack *blacMY* in the A/C plasmid backbone. *Foodborne Pathog Dis* 6:1185-1194. 2009.
 42. Saga T, Y. K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ* 52:103-108. 2009.
 43. Salmon, S. A., J. L. Watts, C. A. Case, L. J. Hoffman, H. C. Wegener, and R. J. Yancey, Jr. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. *J Clin Microbiol* 33:2435-2444. 1995.
 44. Stryjewski, M. E., L. A. Szczech, D. K. Benjamin, Jr., J. K. Inrig, Z. A. Kanafani, J. J. Engemann, V. H. Chu, M. J. Joyce, L. B. Reller, G. R. Corey, and V. G. Fowler, Jr. Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 44:190-196. 2007.
 45. Swann, M. Report of Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. HM Stationery Office, London. 1969.
 46. Takahashi, T., T. Asai, A. Kojima, K. Harada, K. Ishihara, A. Morioka, M. Kijima, and Y. Tamura. Present situation of national surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from farm animals in Japan and correspondence to the issue. *J.J.A. Inf. D.*

- 80:185-195. 2006.
47. Usui, M., M. Hiki, K. Murakami, M. Ozawa, H. Nagai, and T. Asai. Evaluation of transferability of R-plasmid in bacteriocin-producing donors to bacteriocin-resistant recipients. *Jpn J Infect Dis* 65:252-255. 2012.
48. Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman, and M. Achtman. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60:1136-1151. 2006.
49. Xu, L., V. Ensor, S. Gossain, K. Nye, and P. Hawkey. Rapid and simple detection of *bla*_{CTX-M} genes by multiplex PCR assay. *J Med Microbiol* 54:1183-1187. 2005.
50. 寺門誠致. 英国における家畜用抗生物質の使用とその問題点 Swann Report (1969). 動物用抗菌剤研究会報 35:39-92. 2013.
51. 食品安全委員会. 家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針 <http://www.fsc.go.jp>. 2004.
52. 食品安全委員会. 食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについて <http://www.fsc.go.jp>. 2006.
53. 石井良和. 基質特異性拡張型 b ラクタマーゼ(ESBL)産生菌. モダンメディア 53:98-104. 2007.
54. 浅井鉄夫. 鶏における薬剤耐性菌の現状. 鶏の研究 85:14-17. 2010.