

氏名(本籍)	比企基高(愛知県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第433号
学位授与年月日	平成28年12月19日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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 (Investigation into factors affecting the emergence of resistance to third generation cephalosporins among <i>Escherichia coli</i> isolates from livestock in Japan)
論文審査委員	(主査) 阪口雅弘 (副査) 田原口智士 加藤行男

論文内容の要旨

第3世代セファロスポリン(TGC)はヒト用のみならず牛および豚用の動物用医薬品としても承認され、使用されている。家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング(JVARM, Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)では、1999年から家畜におけるTGCに対する耐性状況のモニタリングを開始しており、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、TGCが承認されていない肉用鶏から分離された大腸菌において、TGCに対する耐性株が認められたことを報告した。そこで本研究は、(1)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い、(2)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、(3)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

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。

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。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。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 耐性株についてパルスフィールドゲル電気泳動を行った結果、69 株のうち 54 株はそれぞれ 80%以下の低い相同性を示した。また、 β -ラクタマーゼ遺伝子型別において、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。

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は特定の型が分布していたことが示唆された。

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

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 TGC の適応外使用の可能性、②農場よりも上流の孵卵場における TGC の適応外使用の可能性、③TGC 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 TGC 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ことから、本研究では、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。

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。78 株中 12 株で TGC であるセフトオフル (CTF) に対する耐性が認められたが、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。薬剤感受性では TGC 耐性株のアンピシリン (AMP)、セファゾリン (CFZ)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM) およびクロラムフェニコール (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。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、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。

以上より、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 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

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 TGC 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 TGC 耐性との関係を検討できるものと考えられた。そこで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。

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。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。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 *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、CTF 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。以上より、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 耐性率が主要な β -ラクタマーゼを維持したまま有意に減少したことは、農場の肉用鶏における β -ラクタマーゼ遺伝子の起源が孵卵場であることを示唆すると考えられた。

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、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 例についても示した研究である。

論文審査の結果の要旨

第 3 世代セファロスポリン (TGC) はヒト用医薬品、牛および豚用の動物用医薬品としても承認され、使用されている。家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング (JVARM, Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) では、1999 年から家畜における TGC に対する耐性状況のモニタリングを開始している。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、TGC が承認されていない肉用鶏から分離された大腸菌において、TGC

に対する耐性株が認められたことが報告されている。

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ることを目的とした。本研究は 3 つの章から構成されており、第 1 章として 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い、第 2 章として 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、第 3 章として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

これまで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。

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。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。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 耐性株についてパルスフィールドゲル電気泳動を行った結果、69 株のうち 54 株はそれぞれ 80% 以下の低い相同性を示した。また、 β -ラクタマーゼ遺伝子型別において、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。

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は特定の型が分布していたことが示唆された。

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

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、肉用鶏に対する承認のない TGC に対する耐性大腸菌の出現要因として、3 つの可能性が考えられた。1 として肉用鶏農場における TGC の適応外使用の可能性、2 として農場よりも上流の孵卵場における TGC の適応外使用の可能性、3 として 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 TGC 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 の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ことから、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。

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。78 株中 12 株で TGC であるセフトオフル (CTF) に対する耐性が認められたが、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。薬剤感受性では TGC 耐性株のアンピシリン (AMP)、セファゾリン (CFZ)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM) およびクロラムフェニコール (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。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、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。

以上より、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 3 章 孵卵場におけるセフトオフ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

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 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。

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。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。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 *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、CTF 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。

以上より、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 耐性率が主要な β -ラクタマーゼを維持したまま有意に減少したことは、農場の肉用鶏における β -ラクタマーゼ遺伝子の起源が孵卵場であることを示唆すると考えられた。

本研究により、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、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 例についても示した研究である。新しい知見を提供し、獣医学に貢献したと考えられる。このことから本研究は博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしい業績と判断した。