

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 亀山 光博

題 目 : Distribution of Extended-Spectrum Cephalosporin Resistant *Enterobacteriaceae*  
in Broiler Farms  
(ブロイラー農場における広域セファロスポリン耐性菌の分布)

## 論文要旨 :

広域セファロスポリン(ESC)は人及び獣医療において細菌感染症の治療によく用いられる抗菌剤である。1980年代に、ESCに耐性を示す腸内細菌(*Klebsiella* spp.や*Escherichia coli*など)が人、主に入院患者から分離されて以降、現在ではESC耐性菌は世界中に拡散している。また2000年以降、家畜特にブロイラーからのESC耐性菌の分離報告が増加し、耐性菌に汚染された鶏肉を介した人への感染を引き起こすだけでなく、病原細菌への耐性遺伝子受け渡しの可能性が懸念される等、公衆衛生上問題となっている。ESC耐性菌は種々のβ-ラクタマーゼ(基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)やAmpC型β-ラクタマーゼ等)を産生することが知られている。国内ではブロイラーへのセファロスポリンの使用は認められていないにもかかわらず、ブロイラー及び市販鶏肉からのESC耐性菌の分離頻度は高いとされている。

本研究では、国内ブロイラー農場においてESC耐性菌が流行する要因を解明することを目的とし、第1章では1養鶏場由来ブロイラーから分離されたESC耐性*Salmonella* *Infantis*の耐性メカニズムを明らかにし、第2章では4養鶏場由来ブロイラーにおけるESC耐性菌の分布とその産生β-ラクタマーゼの種類、及び分離株の4農場間での疫学的関連を明らかにした。

### 〈第1章〉

2010年1月に、A養鶏場由来ブロイラー30検体中10検体から分離された*S. Infantis* 10株を用い、薬剤感受性試験、Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)解析、ESBL確認試験、PCR・シークエンスによるβ-ラクタマーゼ遺伝子の特定、プラスミド抽出及び接合伝達試験を実施した。

薬剤感受性試験の結果、セフトキシム(CTX; 第3世代セファロスポリン)耐性株が4株、感受性株が6株であり、PFGE解析の結果、両者は同一由来株であると推定された。ESC耐性株はESBL産生性を示し、遺伝子解析の結果、CTX-M-14型ESBLをコードする $bla_{CTX-M-14}$ 遺伝子を保有していた。ESC耐性株は2種類(約140kb+95kb)、感受性株は1種類(約140kb)のプラスミドを保有していた。両プラスミドとも伝達性を有し、 $bla_{CTX-M-14}$ 遺伝子は約95kbのInc11プラス

ミド上にコードされていることが判明した。

A 養鶏場における ESC 耐性 *S. Infantis* の出現は、ESC 感受性株がこの *bla*<sub>CTX-M-14</sub> をコードした伝達性の *IncI1* プラスミドを獲得したことによるものと推察された。

## 〈第2章〉

2011年5～9月、A 養鶏場を含む4つの養鶏場由来ブロイラーの盲腸内容物41検体(10～11/養鶏場)を採取した。2種類の選択分離培地(4 μg/ml CTX 添加 DHL 及び 16 μg/ml セフトラジジム 添加 DHL)を用いて培養後、常法により菌種を同定した。分離株の ESBL 確認試験実施後、PCR・シーケンスにより産生 β-ラクタマーゼの種類を特定した。また CMY-2、CTX-M 産生株について、PFGE 解析を実施した。

ESC 耐性菌は4農場由来全検体から分離された。分離された163株の *E. coli* のうち、44%が ESBL 産生株と推定された。それらの産生 β-ラクタマーゼは AmpC β-ラクタマーゼである CMY-2 が最も多く(107株, 66%)、次いで ESBL である CTX-M-1(43株, 26%)、CTX-M-55(17株, 10%)、SHV-5(7株, 4%)、CTX-M-2(5株, 3%)であった。CMY-2 産生107株、CTX-M 産生65株の PFGE 解析の結果、それぞれ41、14クラスターに分類され、一部のクラスターには異なる農場由来株が含まれていた。

本調査の結果、4農場由来全検体(100%)から ESC 耐性菌が分離され、1999年～2002年に実施された家畜における薬剤耐性菌の全国調査では、セファゾリン(第1世代セファロスポリン)耐性 *E. coli* の検出率は2.7%であったことから、この10年間で ESC 耐性菌はブロイラー農場に急激に拡散した可能性がある。また、これまで国内ブロイラーからは CTX-M 型 ESBL が主に分離されるという報告が多かったが、本調査では分離された163株の *E. coli* のうち107株(66%)が CMY-2 型 AmpC β-ラクタマーゼを産生していた。米国や EU では CMY-2 型 AmpC β-ラクタマーゼの分離報告が増えており、国内でも同様に増加している可能性もある。PFGE 解析の結果、同一由来株が複数農場に存在することが判明し、農場間での交差汚染による ESC 耐性菌の蔓延が示唆された。

## 〈まとめ〉

本研究により、ブロイラー農場内で菌種間での耐性プラスミドの受け渡し、及び複数農場間での耐性菌の交差汚染が明らかになり、これがセファロスポリンの使用されないブロイラー農場での ESC 耐性菌の流行の一因であると考えられた。また農場内には様々な β-ラクタマーゼを産生する菌が存在し、中でも CMY-2 型 AmpC β-ラクタマーゼが CTX-M 型 ESBL と同様に主流であることが判明した。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	亀山 光博
審 査 委 員	主 査： 鹿児島大学 教授 中馬 猛久
	副 査： 山口大学 教授 岩田 祐之
	副 査： 山口大学 教授 度会 雅久
	副 査： 鹿児島大学 教授 帆保 誠二
	副 査： 鹿児島大学 准教授 小尾 岳士
題 目	Distribution of Extended-Spectrum Cephalosporin Resistant <i>Enterobacteriaceae</i> in Broiler Farms (ブロイラー農場における広域セファロスポリン耐性菌の分布)
審査結果の要旨： <p>広域セファロスポリン (ESC) は人及び獣医療において細菌感染症の治療によく用いられる抗菌剤である。1980年代に、ESCに耐性を示す腸内細菌 (<i>Klebsiella</i> spp. や <i>Escherichia coli</i>) が人、主に入院患者から分離されて以降、現在ではESC耐性菌は世界中に拡散している。また2000年以降、国内外において家畜特にブロイラーからのESC耐性菌の分離報告が増加し、耐性菌に汚染された鶏肉を介した人への感染を引き起こすだけでなく、<i>Salmonella</i> spp.や腸管出血性大腸菌等病原細菌への耐性遺伝子受け渡しの可能性が懸念される等、公衆衛生上問題となっている。国内ではブロイラーへのセファロスポリンの使用は認められていないにもかかわらず、ESC耐性菌がブロイラー間に蔓延した理由は不明のままであった。また、国内ブロイラーにおいては、基質特異性拡張型 B-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌の分離頻度が高いとされていたが、欧州等で流行している AmpC 型 B-ラクタマーゼ産生菌の分布については明らかにされていなかった。申請者は、ブロイラー農場から分離されたESC耐性 <i>Salmonella</i> Infantis の耐性メカニズムを解明するとともに、ブロイラー農場由来 ESC耐性大腸菌の産生 B-ラクタマーゼの種類を特定し、さらに分離株の農場間での疫学的関連を明らかにした。</p>	

第 1 章において、2010 年に A 農場由来ブロイラーの盲腸内容物 30 検体中 10 検体から分離された *S. Infantis* 10 株の薬剤感受性試験の結果、ESC の 1 種であるセフトキシム耐性株を 4 株認めた。ESC 耐性 *S. Infantis* 株は CTX-M-14 型 ESBL 産生株であることが判明した。ESC 耐性株と感受性株の疫学的関連を検証するため、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析を実施した結果、それらは同一由来株であることを確認した。また ESC 耐性株は 2 種類 (約 140kb+95kb)、感受性株は 1 種類 (約 140kb) のプラスミドを保持しており、接合伝達試験の結果、それらのプラスミドは伝達性を有することを証明した。さらに、接合伝達試験により得られた transconjugant の性状を詳細に解析し、CTX-M-14 型 ESBL をコードする *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 遺伝子は約 95kb の IncI1 プラスミド上にコードされていることを明らかにした。

第 2 章において、2011 年に A~D の 4 農場由来ブロイラーの盲腸内容物 41 検体(10~11 検体/農場)について、2 種類の選択分離培地 (4  $\mu$ g/ml セフトキシム添加 DHL 及び 16  $\mu$ g/ml セフトジジム添加 DHL) を用いて ESC 耐性菌のスクリーニングを実施した結果、4 農場由来の全個体が ESC 耐性菌を保菌していることを確認した。41 検体から分離された ESC 耐性 164 株のうち、163 株を *E. coli*、1 株を *Enterobacter cloacae* と同定した。また *E. coli* 163 株の産生する  $\beta$ -ラクタマーゼには、AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼである CMY-2 が最も多く (107 株, 66%)、次いで ESBL である CTX-M-1 (43 株, 26%)、CTX-M-55 (17 株, 10%)、SHV-5 (7 株, 4%)、CTX-M-2 (5 株, 3%) であることを特定した。さらに、分離株の PFGE 解析により、CMY-2 型 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生 107 株は 41 クラスタ、CTX-M 型 ESBL 産生株は 14 クラスタに分類され、一部のクラスタには異なる農場由来株が含まれることも確認した。

これらの研究成果は、国内ブロイラー農場内には様々な  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌が存在し、中でも欧州等で流行が認められる CMY-2 型 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼが CTX-M 型 ESBL と同様に主流であることを示した。さらにセファロスポリンの使用されない国内ブロイラー農場での ESC 耐性菌が蔓延する一因として、農場内で菌種間での ESC 耐性に関与する伝達性プラスミドの受け渡し、及び複数農場間での ESC 耐性菌の交差汚染が影響していることを証明し、今後の人及び家畜領域での薬剤耐性菌制御に向けた対策に関する基礎的知見を与えたものであり、学術的に高く評価される。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値があり優秀であることを認める。