

食用に供する野生動物及び乳用牛の衛生管理に関する研究

最首 信和

2016年3月

目次

緒論	…	1
1. わが国における公務員獣医師の職務	…	1
2. 食用に供する野生動物	…	2
3. 乳用牛の衛生管理と乳房炎	…	4
4. 本研究の目的	…	5
第1章 鳥取県内で狩猟捕獲されたイノシシの解体処理施設における衛生状況	…	7
1-1 目的	…	7
1-2 材料及び方法	…	7
1-2-1 処理施設の調査	…	7
1-2-2 施設における拭き取り検体の細菌学的検査	…	7
1-2-3 施設で処理されたイノシシ肉の細菌学的検査	…	8
1-2-4 イノシシの解体処理に関するアンケート調査	…	8
1-3 成績	…	8
1-4 考察	…	16
第2章 鳥取県内において狩猟捕獲されたイノシシの糞便および可食部筋肉から分離された大腸菌の薬剤感受性	…	18
2-1 目的	…	18
2-2 材料及び方法	…	18
2-2-1 イノシシ由来検体の採取	…	19

2-2-2	育成豚由来糞便の採取	…	19
2-2-3	大腸菌の分離・同定	…	19
2-2-4	薬剤感受性試験	…	19
2-2-5	薬剤耐性遺伝子の検索	…	20
2-2-6	接合伝達試験	…	20
2-3	成績	…	23
2-4	考察	…	27

第3章 乳房炎発症牛から分離された CTX-M 型 β ラクタマーゼ産生性

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	…	29
3-1	目的	…	29
3-2	材料及び方法	…	29
3-2-1	検体採取	…	29
3-2-2	<i>K. pneumoniae</i> の分離・同定	…	30
3-2-3	DNA 型別	…	30
3-2-4	薬剤感受性試験	…	30
3-2-5	ESBL 遺伝子の特定	…	31
3-2-6	プラスミドの解析	…	31
3-2-7	プラスミド接合伝達試験	…	31
3-3	成績	…	33
3-4	考察	…	36

第4章 乳房炎を発症した牛及び飼養環境の堆肥から分離された

	<i>Aerococcus viridans</i>	…	38
4-1	目的	…	38

4-2 材料及び方法	…	39
4-2-1 乳汁の採取	…	39
4-2-2 堆肥検体の採取	…	39
4-2-3 堆肥の温度及びpHの測定	…	39
4-2-4 <i>A. viridans</i> の分離・同定	…	39
4-2-5 薬剤感受性試験	…	40
4-2-6 DNA型別	…	40
4-2-7 高温・強アルカリ条件下における生存性	…	41
4-3 成績	…	41
4-4 考察	…	48
総括	…	50
謝辞	…	54
引用文献	…	55

緒 論

1. わが国における公務員獣医師の職務

獣医師の活動分野は広範にわたっており、地方自治体においては公務員として社会生活の維持に貢献している。すなわち、獣医学の知識及び技術を応用する獣医公衆衛生行政が行われており、行政機関として食肉衛生検査所、衛生環境研究所及び保健所等が設置されている。一方、家畜衛生行政を担当するのは主に畜産関係の担当課であり、畜産現場において家畜衛生を担当する機関として家畜保健衛生所や畜産試験場等が設置され、多くの獣医師が家畜防疫員として業務に従事している。わが国の公衆衛生行政及び家畜衛生行政を所管するのは、それぞれ厚生労働省及び農林水産省である。厚生労働省健康危機管理基本指針や獣医療を提供する体制の整備を図るための基本方針(農林水産省、平成 22 年)に基づき、食中毒や人の感染症など健康危機管理に関する体制の整備、さらに獣医療を提供する体制の整備が、国と都道府県の連携により進められている。近年、エボラ出血熱や中東呼吸器症候群(MERS)等、海外で人獣共通感染症が多発しており、国内侵入を防ぐ水際対策を獣医師が担っている。また、国内での高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)や口蹄疫の発生を通じ、加えて国際獣疫事務局(OIE)等が提唱する One World・One Health の考え方に基づいた畜産物の安定供給や食の安全性の向上など獣医師が果たすべき役割や責任が増大している。平成 23 年には家畜伝染病予防法が改正され、畜種ごとに新たに定めた飼養衛生管理基準を生産者が遵守することが義務付けられた。また一部の酪農、養豚及び採卵鶏農場等では、農場段階への危害要因分析・重要管理点(HACCP)方式を導入した飼養衛生管理の取り組みを進めており、家畜保健衛生所の獣医師等による指導が行われている。酪農における HACCP 方式では、生産過程において発生しうる危害を分析して重要管理点を設定し、乳の安全性を確保するために安全な原材料を導入し、

家畜の健康管理や搾乳等の衛生管理を行っている。

2. 食用に供する野生動物

鳥取県における農林業の課題として、野生動物の個体数増加とそれに伴う農林業被害が顕在化している。平成 27 年 5 月に公表された鳥取県第二種特定鳥獣(イノシシ)管理計画によると、イノシシによる農作物被害額は、平成 6 年度には年間 4,200 万円であったのに対し、平成 10 年度以降平成 17 年度まで概ね年間 1 億円を越え、平成 18 年度には年間 3,500 万円まで減少したものの、平成 20 年度以降徐々に増加傾向にある。このような被害に対処するため、鳥取県では従来 11 月 15 日から 2 月 15 日までであった狩猟期間を、平成 13 年度より 11 月 1 日から 2 月末日までと 1 カ月間延長し、個体数の調整を行っている。平成 6 年度における捕獲数は年間 1,217 頭であったのに対し、平成 10 年度には年間 2,000 頭を越え、平成 16 年度には 5,649 頭、平成 22 年度には 7,857 頭に達し年間捕獲目標数の 6,000 頭を超えたものの、被害額は増加しているのが実情である。狩猟や捕獲による対処を行うとしても、高齢化による狩猟者の減少や中山間地域における人口減少に伴う耕作放棄地の増加、温暖化による積雪量や積雪期間の減少等がイノシシやシカの個体数を増加させる要因と考えられている[上田ら, 2006; 竹鼻ら, 2004]。鳥取県では、耕作放棄地の整備や狩猟者の確保、有害鳥獣捕獲による個体数調整等を進める一方、地域資源の有効活用のため捕獲したイノシシやシカの獣肉利用促進を進めている。しかし、県内でイノシシ肉の生食を原因とする E 型肝炎ウイルスの感染による狩猟者の死亡事例も発生していることから[Matsuda *et al.*, 2003]、狩猟者に対する啓蒙が必要である。

狩猟で得た野生鳥獣の食肉(ジビエ)を利用する食文化は、ヨーロッパにおいて貴族の伝統料理として古くから発展してきた[神谷, 2014; 大泰司ら, 1998]。日本でも縄文時代からイノシシやシカ等の狩猟・肉食の文化があり[渡辺, 2007; 原田,

1993]、現在では11月から2月の狩猟期間を中心として、ジビエが市場にも流通している。

ところで、狩猟等により得られたイノシシやシカ等は、販売を目的としない場合には自宅等で狩猟者自らがその処理を行い、可食部を消費する。これに対し、牛、馬及び豚等の家畜はと畜場法に基づきと畜場で解体処理され、と畜検査で合格したものだけが市場に流通する。このように狩猟により捕獲されたイノシシやシカ等は、家畜とは異なり、と畜場における解体処理やと畜検査は行われず、イノシシやシカ等の肉を販売する場合、食品衛生法に基づき許可を取得した施設でと畜の解体処理を行う必要があるものの、食用に供するイノシシやシカ等の肉の取扱い及び衛生管理は各施設の衛生管理責任者に任されており、その実態はこれまで明らかではなかった。今後、イノシシやシカ等の肉の流通増加が予想されることから、衛生管理の実態を明らかにし、衛生的な取り扱いの徹底を図ることが必要である。

一般に、野生動物は抗菌薬の投与を受けないため、抗菌薬の選択圧により薬剤耐性菌を保菌し続けることは考え難い。ところが、イノシシを含め野生動物からの耐性菌の分離が海外を中心に報告されている[Schierack *et al.*, 2009; Literak *et al.*, 2010; Lessa *et al.*, 2011]。その原因の一つとして、野生動物と人や家畜との直接的又は間接的な接触[Guenther *et al.*, 2011]、あるいは野鳥の役割[Fischer *et al.*, 2013]が論じられている。日本国内では、ニホンカモシカが薬剤耐性大腸菌を保菌していることが報告されているが[Kinjo *et al.*, 1992]、イノシシにおいては分離された大腸菌がすべて薬剤感受性であったことの報告のみであり[Sasaki *et al.*, 2013]、十分なデータの蓄積はなされていない。鳥取県内において野生のイノシシが公道や人家の付近において発見されていること(鳥取県版鳥獣被害対策マニュアル)に鑑み、イノシシ由来の細菌における耐性菌の調査を実施する必要性が考えられる。

3. 乳用牛の衛生管理と乳房炎

農林水産統計(農林水産省、平成 27 年 6 月 30 日発表)によれば、わが国における乳用牛の飼養頭数は漸減傾向が継続しているが、酪農家1戸あたりの飼養頭数は、平成 23 年度以降、毎年 1~2 頭の増加を続けている。多頭飼育に伴う糞尿処理の問題から、戻し堆肥の敷料利用を導入する農家も見られる。乳牛の乳房炎は、細菌、ウイルス、真菌及び藻類等の感染によって起きる場合と、物理的化学的要因によって起きる場合とがある[Bradley *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2011]。感染性乳房炎では細菌による発生例がもっとも多く、感染様式により伝染性と環境性の 2 つに分けられる。伝染性乳房炎の原因菌は搾乳時に乳房の分房から分房へあるいは牛から牛へと伝播する。代表的なものとして黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) や無乳性レンサ球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマが挙げられる。一方、環境性乳房炎は牛の飼養環境、とくに糞尿に汚染された敷料が主な感染源となり、原因菌が乳頭内に侵入する。代表的なものとして大腸菌群 (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* 等) や *S. agalactiae* 以外の *Streptococcus* 属及び *Enterococcus* 属菌、*S. aureus* 以外の *Staphylococcus* 属菌が挙げられる。*Aerococcus* 属菌は非運動性、通性嫌気性あるいは微好気性のグラム陽性球菌で、環境中に存在すると考えられる菌である[Facklam *et al.*, 1995]。*A. viridans* はエビやロブスター等の甲殻類に病気を引き起こすほか[Battison *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2004]、人に心内膜炎や尿路感染等を引き起こす[Facklam *et al.*, 1995; Gopalachar *et al.*, 2004]。牛の乳房炎に対する病原性は議論の分かれるところであるが[Devriese *et al.*, 1999; Zadoks *et al.*, 2004]、乳房炎を発症した牛及び無症状の牛から本菌が分離されており[Spaková *et al.*, 2012]、その病原性について改めて検討する必要がある。

乳房炎の治療として、軽度の場合あるいは応急処置として頻回の搾乳や湿布が

行われる場合もあるが、抗菌薬の使用が一般的である。抗菌薬を用いた治療期間中は生乳出荷ができないこと、また一旦乳房炎に罹患した牛は治療後も再発することが多く、周囲への感染拡大を防止するために盲乳や淘汰の処置を行う場合もあることから経済的損失は大きい。わが国において牛の乳房炎の治療に認可されている抗菌薬の種類は限られているが、その使用量は多いため、耐性菌出現の選択圧と考えられる[Ohnishi *et al.*, 2013a]。基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBL) は、ペニシリンのみならず第 4 世代セフェムを含む多くの β ラクタム系薬を分解するので、本酵素を産生する細菌は β ラクタム系薬に対して耐性を示す。さらに ESBL をコードする遺伝子が、伝達性のプラスミド上に存在していることが報告されている[Gniadkowski *et al.*, 1998]。わが国では ESBL 産生性大腸菌が人[Kuroda *et al.*, 2012]あるいは伴侶動物[Harada *et al.*, 2012]の腸管外感染症例から分離されているが、乳房炎を発症した牛からの分離は Ohnishi らの報告のみである[Ohnishi *et al.*, 2013a]。しかし、乳牛の糞便調査の結果、わが国の酪農場には CTX-M-15, CTX-M-2 及び CTX-M-14 の 3 つのタイプの ESBL 産生性の腸内細菌科に属する菌が存在していることが明らかにされている[Ohnishi *et al.*, 2013b]。上述の通り、ESBL 遺伝子は伝達性プラスミドに存在している場合が多いため菌株間を移動すること、また ESBL 産生菌による感染症例の治療は困難であることから、ESBL 産生性の腸内細菌科の菌が乳房炎を起こす可能性に留意する必要がある。

4. 本研究の目的

著者は地方自治体の公務員獣医師として、食肉衛生検査所においてイノシン解体処理施設の衛生状態を把握するための調査を行う業務に従事したほか、家畜保健衛生所の業務において乳房炎を発症した牛の乳汁より ESBL 産生性 *K. pneumoniae* 及び *A. viridans* を分離した。本研究では、これらの事例を学術的観

点から検証するとともに、公衆衛生及び家畜衛生の向上に係る意義を探究することを目的とした。

第1章

鳥取県内で狩猟捕獲されたイノシシの解体処理施設における衛生状況

1-1 目的

鳥取県版鳥獣被害対策マニュアルによると、県内における野生動物による農作物被害額は年間約1億円となり、その約50%がイノシシ(*Sus scrofa*)によるものである。被害対策として、耕作放棄地の整備や狩猟者の確保、有害鳥獣捕獲による個体数コントロール等が行われている[竹鼻ら, 2004; 上田ら, 2006]。一方、イノシシ肉は以前から海外及び日本各地で食肉として商品化されている[神崎ら, 1997]。

イノシシを販売する場合、と畜場での解体処理やと畜検査は行われず、食品衛生法に基づき許可を取得した施設で解体処理を行うが、販売を目的としない場合には自宅で狩猟者自らがその処理を行うことが多い。このため、食用に供する野生動物の肉の取扱い及び衛生状態の実態はよく分かっていない。

そこで、施設内の衛生状態を知る目的で、と畜場の解体処理法の調査並びに処理に用いる器具及び処理されたイノシシ肉の細菌学的検査を行った。さらに自宅で解体処理する狩猟者に対し、イノシシの解体処理に関するアンケート調査を行った。

1-2 材料及び方法

1-2-1 処理施設の調査:イノシシの解体処理が行われる鳥取県内の 2 施設(A 及び B)において、処理手順を調査した。

1-2-2 施設における拭き取り検体の細菌学的検査:2008 年 12 月から 2009 年 3 月にかけて、両施設の作業台、まな板、作業員 1 名ないし 2 名が使用する解体処理及び部分肉加工処理工程に用いるナイフ及びビニール手袋の細菌学的検査を 2 回ずつ行った。球状に作製した綿製ガーゼ(10 cm × 10 cm)タンポンを用

いて、これらの表面 100 cm²(10 cm × 10 cm)を拭き取った。このタンポンに滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)10 ml を加え、スタマッカー(スタマッカー80T, オルガノ(株), 東京)用ポリエチレン袋に入れ、230 rpm、1 分間スタマッカー処理したものを 10 倍階段希釈して供試した。これら希釈液を標準寒天培地(AC プレート, 住友スリーエム(株), 東京)及び Violet Red Bile 寒天培地(EC プレート, 住友スリーエム(株), 東京)に塗抹し、35 °Cで 48 時間(AC プレート)及び 35 °Cで 24 時間(EC プレート)培養した。これらの培地に発育したコロニーを数え(colony forming unit : cfu)、拭き取り部位 1 cm² 当たりの一般細菌数及び大腸菌群数を算出した(検出限界は 3 cfu/cm²)。

1-2-3 施設で処理されたイノシシ肉の細菌学的検査:2008 年 12 月から 2009 年 3 月にかけて、施設 A の 7 頭 7 検体及び施設 B の 6 頭 6 検体のイノシシ臀部筋肉(もも肉)について、一般細菌数及び大腸菌群数を調べた。すなわち、もも肉 10 g に PBS 90 ml を加え、230 rpm、1 分間スタマッカー処理後の 10 倍階段希釈を施設の拭き取り検査時に用いたものと同一培地で培養し、1g 当たりの細菌数を算出した(検出限界は 250 cfu/g)。

両施設の器具及びもも肉における細菌数をマン・ホイットニーの U 検定により統計的に比較した。

1-2-4 イノシシの解体処理に関するアンケート調査:2008 年 11 月から 2009 年 3 月にかけて、イノシシ狩猟者 129 人を対象に、捕獲現場における内臓摘出の実施、と体の解体場所、解体処理方法、使用器具とその消毒法及び内臓の喫食に関する質問を記載した調査票を猟友会支部ごとに配布し回収した。

1-3 成績

施設 A に搬入されたイノシシのと体は、と畜場や食肉処理場における肥育豚に類似した手順で処理されていた(表 1)。すなわち、体表の汚れを水道水により洗い流した後、前肢切断、正中切開、胸骨切断、骨盤切断の前処理に続いて内臓を摘出した。と体を再度洗浄後、剥皮、トリミングによる残毛、ゴミ及び糞便等の除去を行い枝肉とした(図 1)。引き続き、枝肉を胸部で 2 分割したものをまな板に載せて脱骨し、整形は作業台で行い部分肉に加工された。施設 B に搬入したと体は、すでに捕獲現場で内臓が摘出されていた。枝肉は分割せずに作業台に乗せ、部分肉に加工された。両施設とも作業前にナイフ及び作業台、まな板(施設 A のみ)を、家庭用台所洗剤を用いてタワシで擦った後、水道水で十分に洗い流し、市販の 70%エタノールを噴霧した。両施設とも作業前に、70%エタノールを手袋に噴霧した。施設 A では解体処理の各工程において、前処理、内臓摘出、剥皮、トリミングの直前にナイフ及び手袋を水のみで洗浄後、70%エタノールをこれらに噴霧した。一方、施設 B では剥皮直前に 1 回、ナイフ及び手袋を水洗後、70%エタノールをこれらに噴霧した。部分肉加工処理の各工程では、施設 A 及び B の洗浄消毒回数は異なっていた(表 1)。両施設とも作業後にはナイフ及び作業台、まな板(施設 A)を作業前と同様に洗浄消毒した。また、施設 A では解体処理と部分肉加工処理の各工程に用いるナイフ及び手袋を使い分けていたが、施設 B では同一のものを使用した。

解体処理工程のナイフ及び手袋における一般細菌数 ($5.5 \times 10^0 \sim 5.8 \times 10^3$ cfu/cm²) 及び大腸菌群数(検出限界以下及び $4.3 \times 10^0 \sim 6.7 \times 10^1$ cfu/cm²) は、両施設とも有意な差を認めなかった。部分肉加工処理工程の作業中のナイフにおける一般細菌数は、施設 A ($5.0 \times 10^0 \sim 2.1 \times 10^1$ cfu/cm²) に比べ施設 B ($5.2 \times 10^1 \sim 9.9 \times 10^2$ cfu/cm²) で有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。大腸菌群数は、施設 A の検出限界以下に対し、施設 B では最大で 1.1×10^2 cfu/cm² であった。洗浄消毒後の一般細菌数は施設 A で最大 7.5×10^1 cfu/cm²、一方、施設 B で 3.7×10^2

cfu/cm² となった。施設 B での大腸菌群数は最大 1.0×10^2 cfu/cm² に留まり顕著な減少を認めなかった。手袋における一般細菌数は、施設 A ($1.4 \times 10^2 \sim 6.1 \times 10^2$ cfu/cm²) に比べ施設 B ($6.3 \times 10^2 \sim 6.6 \times 10^3$ cfu/cm²) で有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。施設 A の洗浄消毒後の手袋における一般細菌数は検出限界以下及び 8.0×10^1 cfu/cm²、大腸菌群数は検出限界以下であった。施設 A のまな板における大腸菌群数は、作業中及び洗浄消毒後とも検出限界以下であったが、一般細菌数は $6.1 \times 10^0 \sim 1.5 \times 10^2$ cfu/cm² で差を認めなかった。作業台における一般細菌数は、両施設ともに作業中 ($7.6 \times 10^0 \sim 1.3 \times 10^3$ cfu/cm²) に比べ洗浄消毒後 (施設 A: 検出限界以下、施設 B: 検出限界以下及び 2.4×10^2 cfu/cm²) に減少傾向を認めたものの、大腸菌群数は施設 B では最大 9.5×10^1 cfu/cm² であった (施設 A: 検出限界以下) (図 2)。

処理されたもも肉の一般細菌数は、施設 A ($5.8 \times 10^2 \sim 4.8 \times 10^3$ cfu/g) に比べ施設 B ($1.3 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^5$ cfu/g) で有意に ($P < 0.01$) 高い値を示した。大腸菌群数は、施設 A では調査した 7 検体すべてにおいて検出限界以下であったが、施設 B で処理された 6 検体のうち 2 検体で 3.8×10^4 及び 2.8×10^5 cfu/g と高い値を示した (図 3)。

イノシシの解体処理に関するアンケート調査では、調査した 129 名のうち、16 名 (12%) が施設で、113 名 (88%) が施設を利用せず自宅で解体処理を行っていた。施設を利用しない理由を回答した 25 名のうち、距離が遠いことを理由としてあげた人が 20 名と最も多く、手続きが面倒が 9 名、使用料がかかるが 6 名と続いた (複数回答)。自宅で解体処理を行う 113 名のうち、捕獲現場で内臓を摘出する人は 48 名 (42%)、摘出しない人は 65 名 (58%) であった。捕獲現場で内臓を摘出し食用に供する人は 27 名 (56%) で、このうち生食する人は 8 名 (17%) であった。捕獲現場で内臓を摘出せず食用に供する人は 31 名 (48%) で、このうち生食する人は 1 名 (2%) で、生食者の合計は 113 名中 9 名 (8%) となった。解体処理工程では軍

手を使用すると回答した人は 41 名 (36%)、ビニール手袋使用者は 34 名 (30%)、素手で行う人は 24 名 (21%) であった。部分肉処理加工でも軍手を使用する人は 28 名 (25%) で、ビニール手袋使用者は 36 名 (32%)、素手で行う人は 41 名 (36%) であった。また、器具を消毒する人は 23 名 (20%)、食道及び直腸を結紮する人は 14 名 (12%) に過ぎなかった。

表1 イノシシ解体処理施設における処理工程と使用具の消毒回数

工程	使用具	施設の消毒回数	
		A	B
作業前	作業台, まな板, ナイフ, 手袋	各1回	各1回 ^{b)}
解体処理 ^{a)}			
前処理	ナイフ, 手袋	各1回	(工程なし ^{c)})
内臓摘出 と体洗浄	ナイフ, 手袋	各1回	(工程なし ^{c)})
剥皮	ナイフ, 手袋	各1回	各1回
トリミング	ナイフ, 手袋	各1回	未実施
部分肉加工処理 ^{a)}			
脱骨	ナイフ, 手袋	各1回	各1回
整形	ナイフ, 手袋	各1回	未実施
冷凍保存			
作業後	作業台, まな板, ナイフ	各1回	各1回 ^{b)}

a) 解体処理及び部分肉加工処理において, 施設 A ではそれぞれ別のナイフ及び手袋を使用した, 施設 B では同一のものを使用した.

b) 施設 B ではまな板を使用しなかった.

c) 施設 B で解体されるイノシシは, 捕獲現場で内臓が摘出されていた.



図1 調査施設における剥皮（左）及び部分肉処理工程（右）。

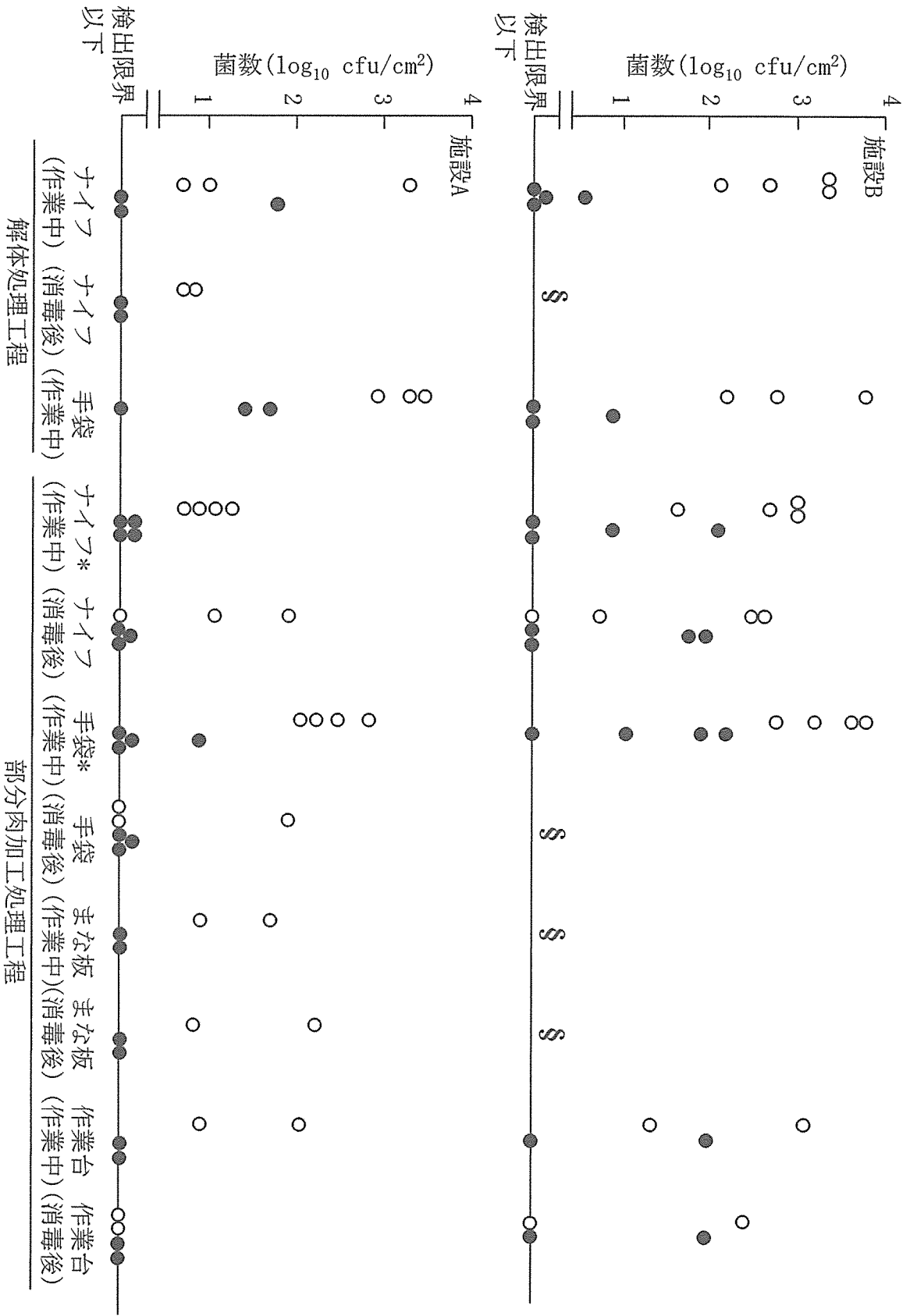


図2 施設A及びBのインジキと体処理工程における器具及び手袋の一般細菌数(○)及び大腸菌群(●).
 *,一般細菌数について施設間に有意差有り($p < 0.05$). §, 検体なし.

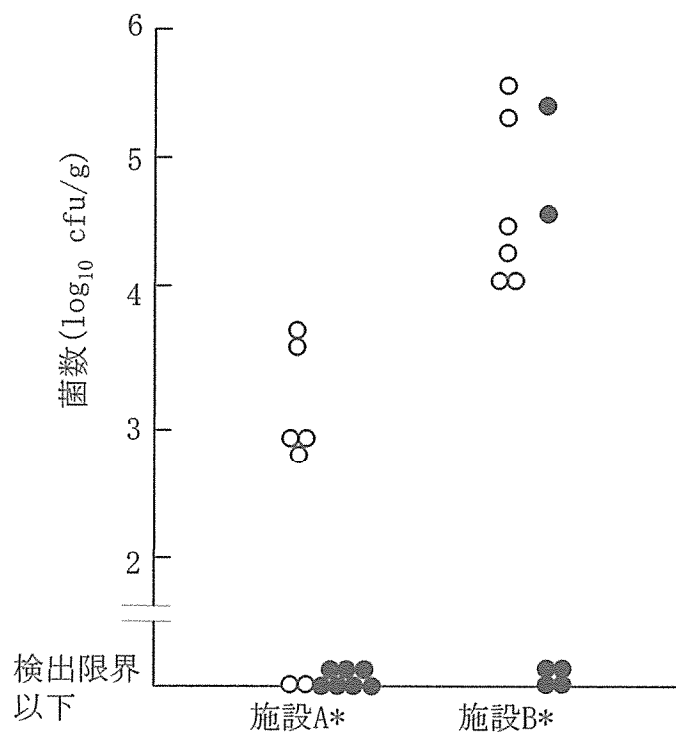


図3 施設A及びBにおいて処理されたイノシシ肉の一般細菌数(○)及び大腸菌群数(●).

*, 一般細菌数について施設間に有意差有り(p<0.01).

1-4 考察

施設 A では前処理や内臓摘出の際に器具の洗浄消毒を行っているにもかかわらず、剥皮作業中のナイフ及び手袋から検出された一般細菌数及び大腸菌群数は、施設 B と比べ有意な差が無かった。したがって、両施設とも剥皮作業中に枝肉を汚染した可能性がある。剥皮は体表や消化管内容物に存在する微生物による汚染が生じやすい工程であり、それに続くトリミングは汚染された枝肉を除去する工程である。よって、これらの作業に用いる器具の頻繁な洗浄消毒が重要である。石井らは、食肉処理施設における剥皮作業用ナイフ刃部(13 検体)の細菌検査を行ったところ、作業中に一般細菌が 10 検体で検出されていたが、洗浄及び熱湯消毒後には 5 検体に減少し、菌数は作業中の $3 \times 10^3 \sim 6 \times 10^5$ cfu/cm²(平均 1×10^5 cfu/cm²)に対し、消毒後は $4 \times 10^3 \sim 3 \times 10^5$ cfu/cm²(平均 7×10^4 cfu/cm²)であったことを報告している[石井ら, 1991]。一方、市販のイノシシ肉における生菌数は豚肉よりも少なく、その理由として流通形態の違い、特にイノシシ肉が長期間冷凍状態で保管され、その状態で輸送される点を挙げている[Naya *et al.*, 2003]。本調査施設のもも肉も整形後、冷凍保存されていた。

脱骨作業中のナイフ、手袋及び作業台の一般細菌数や大腸菌群数が、施設 A と比べ施設 B で高い傾向にあった。処理されたもも肉についても、施設 A に比べ施設 B で一般細菌数が高く、特に施設 B の 2 検体については大腸菌群数が高い値を示した。この要因として、施設 B では解体処理と部分肉加工処理に用いるナイフや手袋を使い分けていなかったこと、さらに器具の洗浄消毒回数が少なかったことが考えられる。また、両施設の部分肉加工処理に用いるナイフ、まな板及び作業台の細菌数は、洗浄消毒後に顕著な減少を認めなかった。この要因として、工程ごとの洗浄が水洗のみであったことが推測される。と畜場では、ナイフを 83 °C 以上の温湯に 3 秒以上浸漬することにより大腸菌が検出されなくなり[森田ら, 2001]、まな板及び作業台の洗浄に熱湯を用いることから、イノシシの処理施設においても熱湯

消毒設備の導入が必要である。

アンケート調査では、部分肉加工処理に軍手を使用する人が全体の 25%を占めた。軍手の洗浄消毒は困難であり、枝肉の微生物汚染につながるため、ビニール手袋に替えて使用する必要がある。と畜場では、頻繁に洗浄消毒が可能なビニール手袋を使用している[板屋ら, 1999]。また、内臓摘出に際し食道及び直腸の結紮工程は、消化管内容物による枝肉や施設設備の微生物汚染を防止するため、と畜場において1頭ごとに行われているが[石井ら, 1991; 藤田ら, 1999]、自宅で処理する人での実施は 12%に過ぎなかった。内臓を生食すると回答した人が、特に捕獲現場で内臓を摘出する人が多い傾向にあった。実際、イノシシの内臓生食者の中には劇症型 E 型肝炎発症者の報告[Matsuda *et al.*, 2003]があることから、狩猟者に対する積極的な情報提供が必要である。わが国における 2003 年の調査報告では腸管出血性大腸菌 O157 及びサルモネラは検出されていない[Naya *et al.*, 2003]が、欧州ではイノシシ糞便中に *Yersinia enterocolitica* や *Listeria monocytogenes* [Wacheck *et al.*, 2010]、Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [Sánchez *et al.*, 2010]及び *Salmonella* [Vieira-Pinto *et al.*, 2011]が検出されている。今回の調査では、施設を利用しない理由として施設までの距離が遠いとアンケートに回答した人が最も多かった。イノシシを処理する施設数自体が少ないことから、鳥取県では狩猟地域ごとに施設整備を進めている。

第2章

鳥取県内において狩猟捕獲されたイノシシの糞便および可食部筋肉から分離された大腸菌の薬剤感受性

2-1 目的

近年の野生動物における薬剤耐性菌の調査において、野生動物が直接あるいは間接的に人や家畜と接触することにより、あるいは、糞便で汚染された水等の環境要因を介して耐性菌を保菌していることが報告されている[Guenther *et al.*, 2011]。野生動物が薬剤耐性菌を保菌するその他のメカニズムとして、耐性遺伝子の水平伝達や自然耐性を示す菌の存在も示唆されている[Benavides *et al.*, 2012]。しかし、日本国内のイノシシにおける薬剤耐性菌に関する調査は限られており[Sasaki *et al.*, 2013]、十分なデータの蓄積はなされていない。

第 1 章では、狩猟で捕獲されたイノシシの解体処理施設における衛生管理の実態を明らかにする一貫として、当該施設において処理されたイノシシ肉の細菌学的検査を行った。その結果、大腸菌群が分離されたため、イノシシの糞便に由来する菌によって剥皮中に枝肉が汚染された可能性が示唆された。*Escherichia coli* (大腸菌)は哺乳類や鳥類の腸管に定着し、それゆえ自然環境中に遍在している。したがって、大腸菌の薬剤耐性、耐性遺伝子及び可動性因子を検討することにより、イノシシが保菌する薬剤耐性菌の由来や伝播を明らかにする一助となる可能性がある。

そこで、第 1 章において調査対象としたイノシシを含め、鳥取県内で捕獲されたイノシシの糞便由来大腸菌について薬剤感受性を調査した。また比較検討のため、県内育成豚から分離した大腸菌の薬剤感受性についても調査した。

2-2 材料及び方法

2-2-1 イノシシ由来検体の採取:2007年11月から2009年3月に、鳥取県内で捕獲されたイノシシ119頭を調査対象とした。このうち、2カ所の解体処理施設で処理を行った21頭から糞便11検体及び筋肉17検体を採取した。残りの98頭は、狩猟者により自宅又は捕獲現場で解体処理され、糞便94検体及び筋肉64検体を採取した。

2-2-2 育成豚由来糞便の採取:イノシシ由来株における薬剤感受性と比較する目的で、2011年9月から2013年9月にかけて、県内4農場(A-D)の育成豚14頭から糞便14検体を採取し、大腸菌の分離に供した。これらの豚には成長促進の目的で、A農場及びB農場ではコリスチン、C農場ではタイロシンがそれぞれ飼料添加物として給与されていた。またD農場では、豚大腸菌症の治療のため、サルファ剤及びトリメトプリムが投与されていた。

2-2-3 大腸菌の分離・同定:糞便1gに滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)9mlを加え、また筋肉10gにPBS90mlを加え、それぞれストマッカー用ポリエチレン袋に入れ、230rpmで1分間ストマッカーにより混合処理した懸濁液100µlをトリプトソーヤブイオン(TSB; Becton Dickinson, U.S.A)10mlに添加し、37℃で24時間増菌培養した。これを、DHL寒天培地(極東製薬, 東京)に一白金耳塗抹し、37℃で24時間培養した。1検体あたり3から5コロニーの大腸菌を疑う乳糖分解菌を釣菌し、アピ20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)を用いて菌種を同定した。1検体につき1株を無作為に選択し以下の実験に供した。

2-2-4 薬剤感受性試験:寒天平板希釈法により、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-M8のガイドライン[CLSI, 2010a]に従って、アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、セフチオフル(CTF)、ジヒドロストレプトマイ

シン(DSM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、アプラマイシン(APM)、ピコザマイシン(BCM)、コリスチン(CL)、クロラムフェニコール(CP)、オキシテトラサイクリン(OTC)、ナリジクス酸(NA)、エンロフロキサシン(ERFX)、トリメトプリム(TMP)の最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)を測定し、既報 [Ozaki *et al.*, 2011]に基づき耐性を判定した。精度管理には、*E. coli* ATCC 25922 株及び *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 株を用いた。

2-2-5 薬剤耐性遺伝子の検索:耐性株について、薬剤耐性遺伝子及びインテグラーゼ遺伝子の検索を表 2 に示したプライマーを用いて PCR 法により行った。

イノシシの糞便から分離された大腸菌 1 株がクラス 2 インテグラーゼ遺伝子 (*int2*) を保有していたため、表 2 のプライマーを用いてインテグロンの解析を行った。1.5 kb の PCR 増幅産物について、3130x1 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A)を用いて塩基配列の解析を行った。DNA Baser (Heracle Software; <http://www.dnabaser.com>) と Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を用い、GenBank のデータベースと比較した。

2-2-6 接合伝達試験:供与菌として、耐性遺伝子を保有していた糞便由来 2 株及び筋肉由来 2 株を供した。受容菌 (*E. coli* ML1410 株)及び供与菌をそれぞれハートインフュージョンブロス培地(HIB:日水製薬, 東京)を用いて 37 °Cで 24 時間培養後、各菌液 100 µLを新たな HIB 3 mlに添加し、再び 37 °Cで 24 時間培養した。混合培養液を、ABPC 50 µg/mL及び NA 25 µg/mL、KM 50 µg/mL 及び NA 25 µg/mL、CP 25 µg/mL及び NA 25 µg/mL、TMP 50 µg/mL及び NA 25 µg/mLを添加した DHL 寒天培地に塗布し、37 °Cで 24 時間培養後、発育したコロニーについて *Xba* I 切断後の染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気

泳動 (PFGE) パターンを解析し、*E. coli* ML1410 株の PFGE パターンが同一であった場合、トランスコンジュガントであると判断した。

表2 薬剤耐性遺伝子及びインテグラーゼの検索に用いたプライマー

耐性遺伝子等	プライマー (5' - 3')	引用文献
<i>bla</i> ^{TEM}	GCACGAGTGGGTTACATCGA GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	Carlson <i>et al.</i> , 1999
<i>bla</i> ^{SHV}	ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC	Yagi <i>et al.</i> , 2000
<i>strA</i>	CTTGGTGATAACGGCAATTC CCAATCGCAGATAGAAGGC	Gebreyes <i>et al.</i> , 2002
<i>strB</i>	ATCGTCAAGGGATTGAAACC GGATCGTAGAACATATTGGC	Gebreyes <i>et al.</i> , 2002
<i>aadA</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC AATGCCAGTCGGCAGCG	Madsen <i>et al.</i> , 2000
<i>cat1</i>	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	Maynard <i>et al.</i> , 2003
<i>cat2</i>	ACACTTTGCCCTTTATCGTC TGAAAGCCATCACATACTGC	Maynard <i>et al.</i> , 2003
<i>cat3</i>	TTCGCCGTGAGCATTTTG TCGGATGAGTATGGGCAAC	Maynard <i>et al.</i> , 2003
<i>floR</i>	CGCCGTCATTCCCTCACCTTC GATCACGGGCCACGCTGTGTC	Maynard <i>et al.</i> , 2003
<i>cmIA</i>	CCGCCACGGTGTGTTGTTATC CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	Keyes <i>et al.</i> , 2000
<i>tetA</i>	GCTACATCCTGCTTGCCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	Gebreyes <i>et al.</i> , 2002
<i>tetB</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	Ng <i>et al.</i> , 1999
<i>tetG</i>	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC AGCAACAGAATCGGGAACAC	Ng <i>et al.</i> , 1999
<i>sul1</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	Guerra <i>et al.</i> , 2001
<i>sul2</i>	TCAACATAACCTCGGACAGT GATGAAGTCAGCTCCACCT	Chu <i>et al.</i> , 2001
<i>dhfr1b</i>	AGACGTTGGAATCTATGGGC CACTATAACGTGACCGGTGAA	Poppe <i>et al.</i> , 2002
<i>dhfrX</i>	CAGAGCATTCGGTAATCAAG ACCGGTACATACATCAGC	Poppe <i>et al.</i> , 2002
<i>int1</i>	TCTCGGGTAACATCAAGG AGGAGATCCGAAGACCTC	Leverstein-Van Hall <i>et al.</i> , 2002
<i>int2</i>	GCAAACGCAAGCATTTCATTA ACGGATATGCGACAAAAAGG	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
GC1 ^{a)}	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	Barlow <i>et al.</i> , 2004
GC2 ^{a)}	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	White <i>et al.</i> , 2001

a) GC1, クラス1インテグロン遺伝子カセット領域; GC2, クラス2インテグロン遺伝子カセット領域.

2-3 成績

イノシシ糞便 105 検体のうち 89 検体から、また、筋肉 81 検体のうち 51 検体から大腸菌が分離された(表 3)。これらの株について薬剤感受性試験の結果、得られた MIC の範囲を表 4 に示した。糞便由来の 89 株のうち 3 株(3.4%)、筋肉由来の 51 株のうち 2 株(3.9%)が 1 薬剤以上に耐性であった(表 3)。

糞便由来の ABPC、DSM、OTC 及び TMP に耐性の 1 株において *bla*_{TEM}、*tetB* 及び *sul2* が PCR により検出された。加えて、*int2* 遺伝子が検出されたため、クラス 2 インテグロンの遺伝子カセットをシーケンシングにより解析したところ、*dfrA1*、*sat2* 及び *addA1* がこの順序で存在していることが判明した(表 3)。TMP を用いてトランスコンジュガントを選択した場合に、クラス 2 インテグロンの伝達を確認された。また、ABPC 及び OTC を用いた場合、*bla*_{TEM} 及び *tetB* が、それぞれ伝達された。

さらに糞便から分離された OTC 耐性の 1 株において *tetA* が検出され、本遺伝子の伝達を確認された。一方、筋肉から分離された 2 株においては、耐性の伝達は認められなかった。

4 農場の育成豚 14 頭から分離された 14 株の大腸菌のうち 13 株は、いずれかの薬剤に耐性を示し(表 5)、9 株(64%)は OTC 耐性であった。また、6 株(40%)以上が DSM、CP 及び NA の 3 剤に耐性であった(表 5)。

表3 イノシシ由来大腸菌の薬剤耐性パターン及び耐性遺伝子

検体種	検体数	菌株数	耐性菌株数 (耐性パターン)	耐性遺伝子
糞便	105	89	1 (OTC) ^{a)}	<i>tetA</i>
			1 (BCM)	
			1 (ABPC-DSM-OTC-TMP) ^{b)}	<i>bla_{TEM}, aadA1, sat2, tetB, sul2, dfrA1</i>
筋肉	81	51	1 (OTC)	<i>tetB</i>
			1 (ABPC-CEZ-DSM-CL-CP)	<i>aadA</i>

a) この株から検出された耐性遺伝子 *tetA* はレシピエントへ伝達された。

b) この株から検出されたすべての耐性遺伝子はレシピエントへ伝達された。またこの株はクラス2
インテグロン遺伝子及び *dfrA1-sat2-aadA1* のカセット配列を保有していた。

表4 イノシシ由来大腸菌142株におけるMIC50及びMIC90.

薬剤	MIC分布	MIC50 ^{a)}	MIC90 ^{a)}
ABPC	2-512	4	8
CEZ	1-128	2	4
CTF	0.25-1	0.5	1
DSM	2-256	4	8
KM	2-16	4	8
GM	1-8	2	2
APM	4-32	8	16
BCM	32->512	32	64
CL	0.5-64	1	2
CP	4-256	8	8
OTC	2-256	4	8
NA	2-16	4	4
ERFX	≤0.13	≤0.13	≤0.13
TMP	0.25-4	1	2

a) MIC50, 50%の菌株の発育を阻止した濃度(μg/ml);
 MIC90, 90%の菌株の発育を阻止した濃度(μg/ml).

表5 育成豚由来大腸菌におけるMICの分布並びにMIC50及びMIC90.

薬剤	MIC分布	MIC50 ^{a)}	MIC90 ^{a)}	耐性菌株数 ^{b)}			
				A農場 (n=4) ^{c)}	B農場 (n=4)	C農場 (n=4)	D農場 (n=2)
ABPC	1-256	2	16			1	
CEZ	1-2	1	2				
CTF	≤0.13-1	0.5	0.5				
DSM	4-512	8	256			4	2
KM	2-512	4	4			1	
GM	2-4	4	4				
APM	4-8	8	8				
BCM	16-32	32	32				
CL	0.5-4	1	4				
CP	8->512	16	>512			4	2
OTC	4-512	256	256	3	2	2	2
NA	4->512	4	>512		2	3	2
ERFX	≤0.13-16	≤0.13	2			2	
TMP	0.5->512	2	>512			3	2

a) MIC50, 50%の菌株の発育を阻止した濃度(μg/ml);

MIC90, 90%の菌株の発育を阻止した濃度(μg/ml).

b) いずれの薬剤にも感受性を示した株が1株存在した.

c) カッコ内の数字は、供試菌株数.

2-4 考察

今回の研究において、イノシシの糞便から分離された薬剤耐性大腸菌は 3 株 (3.4%) であった。日本におけるこれまでのイノシシ由来大腸菌の調査では、Sasaki ら [Sasaki *et al.*, 2013] が血清型 O26 の大腸菌分離を試みた結果、得られた 4 頭由来の 4 株がいずれも、βラクタム系薬、アミノグリコシド系薬、テトラサイクリン系薬、クロラムフェニコール、マクロライド系薬、コリスチン、キノロン系薬及びトリメトプリムに感受性であったという報告のみである。一方、ニホンカモシカの調査では、4.9% が薬剤耐性大腸菌を保有していることが報告されている [Kinjo *et al.*, 1992]。海外においては、ドイツ [Schierack *et al.*, 2009]、中央ヨーロッパ [Literak *et al.*, 2010]、ブラジル [Lessa *et al.*, 2011] のイノシシ糞便から分離された大腸菌について、薬剤耐性は 0% から 10% であったことが報告されている。

一方、今回の研究で、県内育成豚から分離された大腸菌 14 株中 13 株は 1 薬剤以上の耐性を認めた。このことから、イノシシ由来大腸菌と育成豚由来大腸菌は、薬剤耐性において明らかに異なることが示された。育成豚を飼養する上で、治療や飼料添加物として抗菌性物質が一般に用いられる。このたび TMP 耐性株が分離された 2 農場のうち D 農場では同薬剤を治療に用いていた。また、豚の飼料添加物としてアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリンが使用可能であることから、すべての農場で分離された OTC 耐性株の選択に何らかの役割を果たした可能性がある。

このたびイノシシから分離された耐性株において検出された耐性遺伝子の一部は、R プラスミド上に存在していると考えられた。また、クラス 2 インテグロンの遺伝子カセットにおいて検出された *dfxA1-sat2-addA1* 配列は、これまでに豚、犬及び人 [Cocchi *et al.*, 2007]、ブロイラー [van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007]、排水処理工場 [Moura *et al.*, 2007] から分離されたクラス 2 インテグロン保有大腸菌において検出されている。イノシシは人の生活域と接する機会が増えていることから

(鳥取県版鳥獣被害対策マニュアル)、このたび検出された遺伝子カセットが人や家畜が保菌する耐性菌に由来するものであった可能性が否定できない。捕獲されたニホンカモシカを飼養した結果、薬剤耐性大腸菌や R プラスミドを保有する大腸菌が分離されたため、野生動物からこのような大腸菌が分離されることは、人の活動に伴う環境の汚染の指標とみなしうる可能性が示唆されている [Kinjo *et al.*, 1992]。一方、空中浮遊菌による耐性遺伝子の拡散の可能性が示唆されている [Segawa *et al.*, 2013]。また、解体処理施設における作業者が使用するナイフや手袋が大腸菌群に汚染されていることから(第 1 章参照)、これらの菌、特に耐性株や耐性遺伝子の由来がイノシシ糞便以外である可能性も検討する必要がある。

このたびの調査において、頻度は低いもののイノシシは様々な耐性遺伝子を有する薬剤耐性大腸菌を保菌していたことが明らかとなった。また、一部の耐性遺伝子はインテグロンとともに R プラスミド上に存在し、伝達・拡散されたと報告されている [Schierack *et al.*, 2013; Mokracka *et al.*, 2012]。今後のモニタリングにおいて、このたびと同様の結果が得られた場合には、分離された大腸菌の遺伝的な背景を詳細に検討することによって、野生イノシシにおける薬剤耐性大腸菌の由来を明らかにすることが重要である。

第3章

乳房炎発症牛から分離された CTX-M 型 β ラクタマーゼ産生性 *Klebsiella pneumoniae*

3-1 目的

Klebsiella pneumoniae による牛の乳房炎は、泌乳量の著しい低下と高い死亡率を引き起こすことが特徴である[Gröhn *et al.*, 2004]。近年、欧州において基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBL) 産生性の *K. pneumoniae* が乳房炎を発症した牛から分離されている[Dahmen *et al.*, 2013; Locatelli *et al.*, 2010]。ESBL は第 1 世代及び第 2 世代セファロスポリンだけでなく、第 3 世代及び第 4 世代セファロスポリンを加水分解するので、ESBL を産生する菌は多くの種類の β ラクタム系薬に対して耐性を示す。さらに ESBL をコードする遺伝子が、伝達性のプラスミド上に存在していることがしばしば報告されている[Gniadkowski *et al.*, 1998]。家畜の飼養環境や腸管における ESBL 産生株が出現すると、本菌による感染症が発生した場合に治療を困難なものとし、家畜の生産性を低下させ、さらには食物を介して人へ伝播される可能性があることから、家畜衛生及び公衆衛生の脅威となり得る[Shiraki *et al.*, 2004]。

本研究においては、6 農場で乳房炎を発症した牛 20 頭から *K. pneumoniae* を分離し、そのうち 3 頭由来の 3 株が第 3 世代セファロスポリンであるセフチオフルに耐性を示したので詳細な解析を行った。

3-2 材料及び方法

3-2-1 検体採取: 2011 年 4 月から 9 月に、6 農場 (A, B, C, E, F 及び G) において乳房炎を発症した牛 20 頭から乳汁を採取した。すべての検体は、当該牛に抗生物質を投与する前に採取した。臨床症状として、乳房の熱感、硬結、腫脹、発

熱、食欲不振及び泌乳量低下を認めた。なお A 農場と C 農場は互いに 1.5 km 離れており、他の 4 農場とも 7 km 以上離れていた。

3-2-2 *K. pneumoniae* の分離・同定: 検体 100 μ l を DHL 寒天培地(極東製薬, 東京)に塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養後に、*Klebsiella* を疑う赤色コロニーを釣菌し、API 20E (bioMérieux, France) を用いて同定を行った。

3-2-3 DNA 型別: 分離された *K. pneumoniae* 20 株について、染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法 [Someya *et al.*, 2005] により型別を行った。培養した菌を低融点アガロースに包埋後、0.5 M EDTA に溶解した 1% N-lauroylsarcosine 加 1 mg/ml proteinase K を用いて溶菌処理後、制限酵素 *Xba*I (15 units/ μ l) を用いて 37 $^{\circ}$ C で一晩処理した。泳動には 1% Seakem Gold Agarose を用い、CHEF-DR II System (BIO-RAD) によって 6 V/cm、スイッチングタイム 0.5-50 秒の条件で、14 $^{\circ}$ C で 20.5 時間泳動した [Someya *et al.*, 2005]。供試株のバンドパターンが互いに 7 本以上異なる場合、遺伝的に関連性がないものと判断した [Tenover *et al.*, 1995]。

3-2-4 薬剤感受性試験: 寒天平板希釈法により、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-A8 のガイドライン [CLSI, 2010a] に従って、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトリオラム (CTF)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、ナリジク酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX) 及びトリメトプリム (TMP) の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、既報 [Ozaki *et al.*, 2011] に基づき耐性を判定した。CTF 耐性株について、ESBL 産生の有無を CLSI が推奨するディスク拡散法により検討した。精度管理には、*Escherichia coli*

ATCC 25922 株及び *K. pneumoniae* ATCC 700603 株を用いた。

3-2-5 ESBL 遺伝子の特定:ESBL 産生を認めた株について、PCR 法により ESBL 遺伝子である *bla*_{CTX-M} の検出を行った。使用したプライマーの塩基配列を表 6 に示した。

3-2-6 プラスミドの解析:ESBL 産生株からプラスミド DNA をキット(Qiagen, Germany)により抽出し、アガロースゲルで電気泳動を行った。サザンブロット解析のため、ESBL 産生株(*K. pneumoniae* A46 株:成績及び表 7 参照)の ESBL 遺伝子の PCR 増幅産物を DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit(Roche, U.S.A)で標識した。

3-2-7 プラスミド接合伝達試験:ESBL 産生株を供与菌、*E. coli* ML1410 株を受容菌として使用した[Someya *et al.*, 2005]。供与菌と受容菌をそれぞれ一晚培養した後、新たな培養液中で 37 °C で 6 時間共培養した。トランスコンジュガントは、ABPC 50 µg/ml 及び NA 25µg/ml を含む DHL 寒天培地で選択した。受容菌である *E. coli* ML1410 に伝達されたプラスミドの制限酵素断片パターン(restriction fragment length polymorphism, RFLP)を比較するため、プラスミド DNA を抽出し、制限酵素 *Dra*I 及び *Pst*I で処理した後、電気泳動を行った。加えて、大腸菌症のブロイラーから分離された *E. coli* D1633 株から抽出した *bla*_{CTX-M-2} を保有するプラスミドと比較を行った。また ESBL 産生株とトランスコンジュガントのプラスミドのレプリコンタイピング [Carattoli *et al.*, 2005] を行った。

表6 ESBL遺伝子の検出及び塩基配列の解析に使用したプライマー.

ESBL遺伝子 (CTX-Mグループ)	プライマー (5' - 3')	引用文献
CTX-M-1	GACGATGTCACTGGCTGAGC AGCCGCCGACGCTAATACA	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTX-M-2	GCGACCTGGTTAACTAACAATC CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTX-M-3	CGCTTTGCCATGTGCAGCACC GCTCAGTACGATCGAGCC	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTX-M-4	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG GTAAGCTGACGCAACGTCTG	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTX-M-5	ATGATGAGAAAAAGCGTAAGG TTAATAACCGTCGGTGAC	本研究

3-3 成績

乳房炎を発症した牛から分離された 20 株の *K. pneumoniae* は、PFGE パターンにおける 7 本以上のバンドの差異により 11 パターンに区別された(図 4(A))。B 農場の牛から分離された 11 株のうち 10 株が同一の PFGE パターンを示した。薬剤感受性試験の結果、ABPC 耐性及び DSM 耐性がそれぞれ分離株の 90% で認められ、すべての株は GM、CP、NA、ERFX 及び TMP に感受性であった(表 7)。3 株(A46, C22 及び C52)は CTF に耐性であり、*bla*_{CTX-M-2} 遺伝子を保有することが確認された。また *bla*_{CTX-M-2} 遺伝子は、分子量 50 kbp 以上のプラスミド上に存在することがサザンブロット解析で明らかとなった。接合伝達試験では、ESBL 産生性 3 株のうち A46 及び C52 の 2 株において R プラスミドの伝達性を認めた(表 7)。トランスコンジュガント 2 株から抽出したプラスミドの制限酵素 *Dra*I 及び *Pst*I 切断後の泳動パターンは互いに類似し、*E. coli* D1633 株から抽出した R プラスミドの切断パターンとは異なっていた(図 4(B))。A46 及び C52 に由来するトランスコンジュガント 2 株のプラスミドは、レプリコンタイプ IncT であることが明らかとなった。一方 C22 のプラスミドは、レプリコンタイプ IncFIC であった。

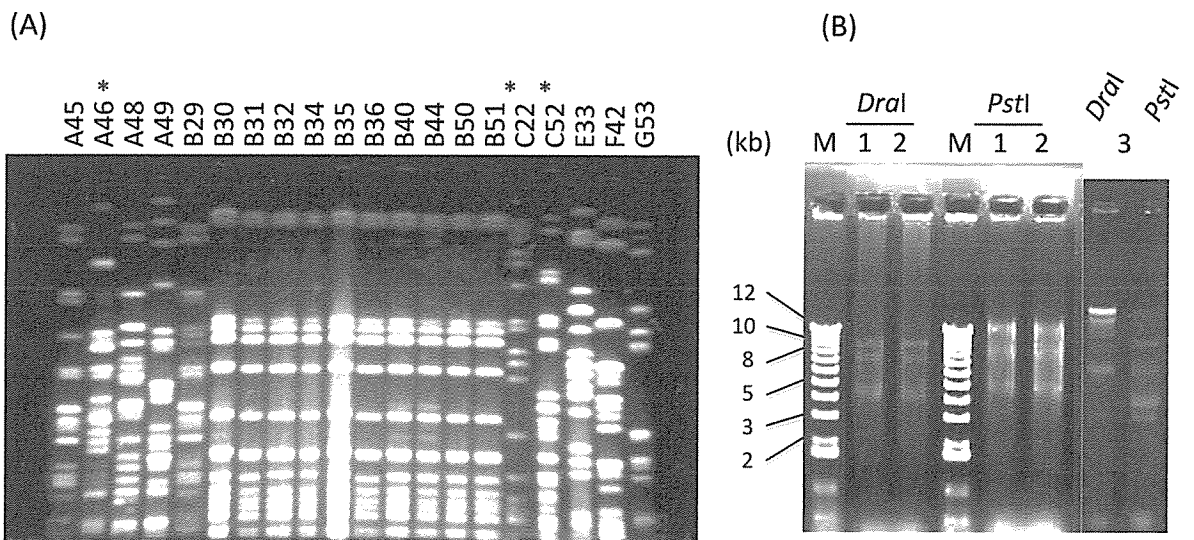


図4 (A) 乳房炎牛の乳汁由来*K. pneumoniae* 分離株の*Xba* I 切断後の染色体DNAのPFGEパターン. レーン上部の菌株番号は表7に準ずる. アスタリスクを付した菌株番号はESBL産生株を示す. (B) トランスコンジュガントから抽出した*bla*CTX-M-2遺伝子が存在するプラスミドの*Dra* I 及び*Pst* I 切断パターン. レーン1及び2は、それぞれ、*K. pneumoniae* A46株及びC52株由来で*E. coli* ML1410株に接合伝達されたプラスミド. レーン3は、大腸菌症の鶏から分離された*E. coli* D1633株由来のプラスミド.

表7 乳房炎を発症した牛の乳汁から分離された*K. pneumoniae* の性状

菌株番号 ^{a)}	分離日	MIC (µg/ml) ^{b)}							ESBL <i>bla</i> 遺伝子の伝達性
		ABPC	CEZ	CTF	DSM	KM	OTC		
A45	2011年8月9日	32 ^{c)}	4	0.25	2	2	0.25	n/a ^{d)}	n/a ^{d)}
A46	2011年8月17日	512	256	8	128	2	2	<i>bla</i> CTX-M-2	+
A48	2011年8月22日	32	1	0.5	128	2	2	n/a	n/a
A49	2011年8月22日	16	1	0.5	256	4	2	n/a	n/a
B29	2011年7月1日	16	4	0.5	128	2	2	n/a	n/a
B30	2011年7月5日	32	2	0.5	256	2	512	n/a	n/a
B31	2011年7月13日	32	1	0.5	256	2	>512	n/a	n/a
B32	2011年7月13日	32	1	0.5	256	2	>512	n/a	n/a
B34	2011年7月14日	32	2	0.5	256	2	>512	n/a	n/a
B35	2011年7月15日	32	1	0.5	256	2	>512	n/a	n/a
B36	2011年7月15日	32	1	0.5	256	2	>512	n/a	n/a
B40	2011年7月22日	32	1	0.5	256	2	>512	n/a	n/a
B44	2011年8月16日	32	2	0.5	128	2	512	n/a	n/a
B50	2011年9月15日	32	2	1	256	2	512	n/a	n/a
B51	2011年9月15日	32	2	1	256	2	512	n/a	n/a
C22	2011年4月21日	512	128	8	128	2	1	<i>bla</i> CTX-M-2	-
C52	2011年9月21日	>512	256	16	128	2	2	<i>bla</i> CTX-M-2	+
E33	2011年7月13日	32	256	1	64	2	2	n/a	n/a
F42	2011年7月26日	256	1	0.5	512	512	256	n/a	n/a
G53	2011年9月20日	32	1	0.5	2	2	2	n/a	n/a

a) 頭文字は農場名.

b) ABPC, アンプシリン; CEZ, セフトゾリン; CTF, セフトオフル; DSM, ジメチルストリプトマイシン; KM, カナマイシン; OTC, オキシテトラサイクリン

c) 太字で示したMIC値は耐性と判断された.

d) 該当せず.

3-4 考察

乳房炎を発症した A 農場及び C 農場の牛 3 頭から ESBL 産生性 *K. pneumoniae* が 3 株分離された。いずれの分離株も ESBL 遺伝子 (*bla_{CTX-M-2}*) を保有し、そのうち 2 株 (A46 及び C52) において本遺伝子が接合伝達性プラスミド上に存在することが確認された。これらの PFGE パターンは互いに異なっていたが、*bla_{CTX-M-2}* 遺伝子が存在するプラスミドの RFLP パターンは酷似し、レプリコンタイプは同一であった。以上の成績から、ESBL 遺伝子はプラスミドを介して、農場の他の細菌にも伝播・拡散する可能性が示唆された。

農場における聞き取りの結果、乳房炎治療で A 農場ではセファゾリンを 6 日間、セフトロフルを 9 日間投与し、C 農場ではセファゾリン、セフロキシム及びセファピリンをそれぞれ 3 日間投与していた。また、ESBL 産生性 *K. pneumoniae* に感染した 3 頭は回復しなかった。他の農場の治療に関する情報は確認できなかった。A 農場と C 農場の間で、牛、作業員及び獣医師の行き来はなく、飼料及びそれを供給する会社も異なっていた。しかし、A 農場と C 農場の距離は比較的近いことから、他の環境要因が *bla_{CTX-M-2}* 遺伝子を保有するプラスミドの伝達に関与した可能性が考えられる。乳房炎の原因となった腸内細菌科に属する ESBL 産生性の細菌において、ESBL 遺伝子、プラスミド及び菌株の分子遺伝学的多様性が低かったことがフランスで報告されている [Dahmen *et al.*, 2013]。日本では、異なる農場のプロイラーから分離された ESBL 産生性 *K. pneumoniae* 及び大腸菌において、*bla_{CTX-M-2}* 及び *bla_{CTX-M-14}* を保有する伝達性プラスミドが、これらの菌種間に拡散した可能性が示唆されている [Hammad *et al.*, 2008]。

今回の研究では B 農場の牛から分離された 11 株中 10 株が同一 PFGE パターンを示したため、同一菌株による感染が拡大したものと考えられた。米国のある農場で発生した *K. pneumoniae* による牛の乳房炎においては、分離株の Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法による DNA 型別の結果、すべてが同

一のタイプであったことから、同一菌株の伝播もしくは共通する感染源に暴露されたことによる集団感染であることが報告されている[Munoz *et al.*, 2007]。

スイスでは、*bla*_{CTX-M-14} を保有する大腸菌が乳房炎を発症した牛から分離されている[Geser *et al.*, 2012]。またエジプトでは、乳房炎の牛から分離された *Enterobacter* や *Klebsiella* において、*bla*_{SHV-12} や *bla*_{CTX-M-15} が検出されている[Ahmed *et al.*, 2011]。日本国内の家畜における ESBL 産生株に関するモニタリングの報告によると、*bla*_{SHV-60} を保有する *K. pneumoniae* が健康牛の乳汁から分離され[Hammad *et al.*, 2008]、*bla*_{CTX-M-2} を保有する大腸菌が、牛の糞便 396 検体のうち 3 検体 (1.5%) [Shiraki *et al.*, 2004] から、と殺後の枝肉表面検体の 0.7% (2/270) [Shiraki *et al.*, 2004] から、大腸菌症に罹患した動物の 2.8% (2/72) [Asai *et al.*, 2011] から、それぞれ分離されている。国内では、セフトオフルを含むセファロスポリン系薬剤が牛の治療に使用されている。牛における ESBL 産生株の出現とセフトオフル使用との関連性を検討するためにはデータの集積が必要であり[Hiroi *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2005; Shiraki *et al.*, 2004; Winokur *et al.*, 2001]、ESBL 産生株の農場への侵入に関わる要因や耐性に関与する遺伝子を明らかにするため、モニタリングを継続することが重要である。

第4章

乳房炎を発症した牛及び飼養環境の堆肥から分離された *Aerococcus viridans*

4-1 目的

乳房炎は主に細菌、ウイルス及び真菌の感染によって引き起こされる疾患で、乳腺の炎症、乳量や乳質の低下を主徴とする[Bradley *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2002]。*Aerococcus viridans*は非運動性、微好気性のグラム陽性球菌で[Facklam *et al.*, 1995]、乳房炎原因菌としての重要性は明らかではないが[Devriese *et al.*, 1999; Zadoks *et al.*, 2004]、乳房内に不顕性感染する細菌としてしばしば報告されている。また、乳頭上皮に *A. viridans* が存在し、乳房炎を引き起こす細菌を阻害する効果のあることが、乳頭上皮に存在する他の 10 種の細菌とともに報告されている[Woodward *et al.*, 1987]。しかしながら、スロバキアでは乳房炎の症状を呈する牛及び無症状の牛から *A. viridans* が分離され、その分離株の薬剤耐性はそれぞれ異なっていたが、染色体 DNA の遺伝学的な多様性は認められていない[Spaková *et al.*, 2012]。

堆肥を敷料に用いる飼養管理は、アメリカのミネソタ州ではじめて確立された[Barberg *et al.*, 2007]。日本ではこの方法に改良を加え、戻し堆肥として敷料に再利用している。

本研究においては、戻し堆肥を使用する農場において、乳房炎を発症した牛の乳汁及び飼養環境の敷料から *A. viridans* を分離した。敷料として使用した戻し堆肥が、乳房の炎症に関与した *A. viridans* の汚染源であった可能性を明らかにするため、分離された *A. viridans* についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による DNA 型別及び薬剤感受性試験を行い、さらに農場で使用した敷料を模した条件下における *A. viridans* の生存性を検討した。

4-2 材料及び方法

4-2-1 乳汁の採取:2011年11月から2013年3月に、A農場において乳房炎を発症した牛478頭から乳汁を採取し、原因菌の検査を行った。すべての検体は抗菌薬による治療前に採取した。臨床症状として、乳房の硬結、腫脹、乳汁の凝塊、発熱、食欲不振及び乳量減少を認めた。加えて2011年12月に、A農場から約11km離れたところに位置するB農場において、乳房炎を発症した牛2頭から乳汁2検体を採取した。

4-2-2 堆肥検体の採取:2013年1月の時点で、A農場では堆肥舎において、約2カ月かけて糞便及び敷料の堆肥化が行われていた。堆肥舎の堆肥(以下、堆肥)は、続いて堆積場に移され、おがくずと消石灰を最終濃度で3%となるように加えて混合した(以下、処理後堆肥)。処理後堆肥は、牛床の敷料に使用した(以下、敷料)。そこで2013年1月に、処理後堆肥4検体及び敷料3検体を採取した。

4-2-3 堆肥の温度及びpHの測定:2013年1月にA農場において、6検体の堆肥及び4検体の処理後堆肥について表面からの深さが20cmから100cmの箇所測定した。各4検体の堆肥及び処理後堆肥について、10gをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で10倍希釈し、pHメーター(Horiba)によりpHを測定した。

4-2-4 *A. viridans* の分離・同定:乳汁中の細菌を分離するため、乳汁100 μ lを羊血液寒天培地(日水製薬, 東京)、DHL寒天培地(極東製薬, 東京)及びマンニット食塩卵寒天培地(日水製薬, 東京)にそれぞれ塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。純培養状の発育を認めた平板から釣菌し、API20E、API20Staph及びAPI20Strep(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)により菌の同定を行った。*A. viridans*はAPI20Strepにより同定した後、16s rRNA領域を標的としたPCR法

により確定した[Grant *et al.*, 1992]。

堆肥検体からの菌分離は、以下の通り行った。処理後堆肥及び敷料をそれぞれ PBS で 10 倍希釈し、希釈後の検体 100 μ l を羊血液寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養し、*A. viridans* と思われるコロニーについて、上述の通り、菌の同定を行った。

4-2-5 薬剤感受性試験：ディスク拡散法により、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M31-A3 のガイドライン[CLSI, 2008]に従って実施した。薬剤は以下の通りである。薬剤名に続く括弧内にディスクあたりの含有量を示した。ペニシリン(10 単位)、アンピシリン(10 μ g)、アモキシシリン(25 μ g)、セファゾリン(30 μ g)、セフロキシム(30 μ g)、ストレプトマイシン(10 μ g)、ゲンタマイシン(10 μ g)、エリスロマイシン(15 μ g)、クリンダマイシン(2 μ g)、バンコマイシン(30 μ g)、シプロフロキサシン(5 μ g)、クロラムフェニコール(30 μ g)及びテトラサイクリン(30 μ g)。精度管理には、*Escherichia coli* ATCC 25922 株及び *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 株を用いた。発育阻止円の直径を測定し、既報[Martin *et al.*, 2007]及び CLSI M31-A3 の基準により判定した。セファゾリンとセフロキシムについては、*A. viridans* に適用可能な耐性限界値が存在しないため、CLSI M100-S20 において *S. aureus* に適用される値[CLSI, 2010b]を用いた。

4-2-6 DNA 型別：分離された 29 株の *A. viridans* について、染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法により行った。培養した菌を低融点アガロースに包埋後、リゾチーム処理し、0.25 M EDTA に溶解した 1% N-lauroylsarcosine 加 1 mg/ml proteinase K を用いて溶菌処理後、制限酵素 *Sma*I (10 units/ μ l) を用いて 30 $^{\circ}$ C で一晩処理した。泳動には 1% Seakem Gold Agarose を用い、CHEF-DR II System (BIO-RAD) によって、6 V/cm、スイッチン

グタイム 1・30 秒の条件で、14 °Cで 21 時間泳動した[Stebbing *et al.*, 2012]。供試株のバンドパターンが互いに 7 本以上異なる場合、遺伝的に関連性がないものと判断した[Tenover *et al.*, 1995]。

4-2-7 高温・強アルカリ条件下における生存性:乳房炎を発症した牛の乳汁から分離された 3 株の *A. viridans* (A 農場で 2012 年に分離された 2 株及び 2013 年に分離された 1 株)及び 2 株の *E. coli* (A 農場で 2012 年に分離)、並びに敷料から分離された 1 株の *A. viridans*(A 農場で 2013 年に分離)に加え、*A. viridans* ATCC 700406 株及び *E. coli* ATCC 25922 株を供試した。

マクファーランド 0.5 に調製した供試菌液 1 ml を、9 ml の PBS (pH7.0)又は 0.1 M *N*-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES)溶液(pH9.0)に添加した [Good *et al.*, 1966]。50 °Cの恒温水槽でインキュベートし、0 時間、3 時間、6 時間及び 24 時間後に 0.5mlを採取し、それぞれ 10 倍階段希釈した。希釈後の菌液をトリプトソーヤ寒天培地(日水製薬、東京)に 100 µlずつ塗抹し、37 °Cで 24 時間培養し、コロニーをカウントして 1 ml あたりのコロニー数を算出した。

4-3 成績

A 農場において乳房炎の症状を呈した牛 478 頭の乳汁のうち 136 頭から細菌を検出した。*E. coli* は 44 頭(32.8%)、*A. viridans* は 38 頭(28.3%)、*Streptococcus agalactiae* 以外の *Streptococcus* spp.が 33 頭(24.6%)、コアグラーゼ陰性の *Staphylococcus* が 15 頭(11.2%)、*Pseudomonas aeruginosa* が 2 頭(1.5%)、その他のグラム陰性桿菌が 4 頭(3.0%)であった。*A. viridans* は、11 月から 3 月の期間にのみ検出された(図 5)。

堆肥からの *A. viridans* の分離については、2013 年 1 月に 4 検体の処理後堆肥及び 3 検体の敷料から *A. viridans* が検出された。

A. viridans 代表株 29 株の薬剤感受性試験について、*Streptococcus* 属菌のブレイクポイントに従って判定したところ、26 株 (89.7%) がクリンダマイシンに耐性を示し (表 8)、そのうち 1 株はクロラムフェニコールにも耐性を示した。クリンダマイシンに感受性であった 3 株のうち 1 株はセフロキシムのみ耐性を示した。上記以外の薬剤に対しては、すべての供試株が感受性であった。

薬剤感受性試験を行った 29 株について PFGE 解析を実施した (図 6)。*Sma*I 切断パターンを、便宜上、小文字の a から l で示した。菌株間のバンド数の差異が 6 本以下の場合、遺伝的に関連性があると判断し [Tenover *et al.*, 1995]、同じパターン名の小文字で示した。2011 年 11 月から 2012 年 2 月に、A 農場の牛から分離された 14 株 (図 6、レーン 1-14) において、a から h の 8 パターンを確認した。そのうちパターン c が 3 株 (レーン 2, 8 及び 12)、f が 4 株 (レーン 6, 7, 13 及び 14)、g が 2 株 (レーン 9 及び 10) であった。2012 年 12 月から 2013 年 3 月に、A 農場の牛から分離された 6 株 (レーン 17-22) のうち 1 株 (レーン 21) はバンドの解析ができなかったが、その他の 5 株におけるパターンは、さきの 14 株とバンド数が 7 本以上異なっていた。また 6 株中 3 株 (レーン 17, 19 及び 22: パターン i) は、バンド数の差異が 7 本未満であり、互いに近縁な株と判断した。敷料から分離された 3 株のうち、2 株 (レーン 23 及び 25: パターン i) はバンド数の差異が 2 本のみであり、さらに牛から分離された 3 株 (レーン 17 及び 19, 22: パターン i) とともに近縁であった。処理後堆肥から分離された 2 株 (レーン 26 及び 27: パターン k) と他の 2 株 (レーン 28 及び 29: パターン i) も、それぞれ近縁な株であった。興味深いことに、乳汁、処理後堆肥及び敷料から分離された 4 株 (レーン 19, 25, 28 及び 29: パターン i) が同一 PFGE パターンであった。さらに乳汁及び処理後堆肥から分離された 3 株 (レーン 20, 26 及び 27: パターン k) についても互いに近縁な株であることが明らかとなった。

乳汁から分離された 3 株の *A. viridans* (図 6、レーン 6, 9 及び 19) と敷料から

分離された 1 株の *A. viridans*(レーン 23)を供試し、高温・強アルカリ条件下における生存性を確認した(図 7)。pH7.0 の条件下(図 7(A))において、これら4株とも接種時の生菌数に比べ、接種 3 時間後まで有意な差を認めなかった。一方、*A. viridans* ATCC700406 においては、接種 3 時間後に 3.0×10^2 cfu/ml 未満まで減少した。このたび分離された 4 株については、接種 6 時間後には 3.3×10^4 cfu/ml から 2.1×10^5 cfu/ml、接種 24 時間後には 3.0×10^2 cfu/ml 未満まで減少した。乳房炎牛から分離された 2 株の *E. coli* 及び *E. coli* ATCC25922 のうち、1 株の牛由来 *E. coli* は接種 3 時間後まで生存したが、接種 6 時間後には 3 株とも 3.0×10^2 cfu/ml 未満まで減少した。pH9.0 の条件下(図 7(B))において、上記4株の *A. viridans* は、接種 3 時間後に 3.2×10^3 cfu/ml から 1.2×10^4 cfu/ml、接種 6 時間後には 3.0×10^2 cfu/ml 未満まで減少した。*A. viridans* ATCC700406 及び *E. coli* ATCC25922 は、接種 3 時間後に 3.0×10^2 cfu/ml 未満まで減少した。

堆肥の温度は、表面からの深さ 20 cm の部位で 10 °C、深さ 100 cm の部位で 48 °Cであった。処理後堆肥の温度は表面からの深さ 20 cm の部位で 50 °C、深さ 100 cm の部位で 64 °Cであった。処理後堆肥の pH は、深さ 20 cm の部位で pH9.5、深さ 100 cm の部位で pH10.1 であった。敷料の pH は、pH7.5 から pH9.2 であった。

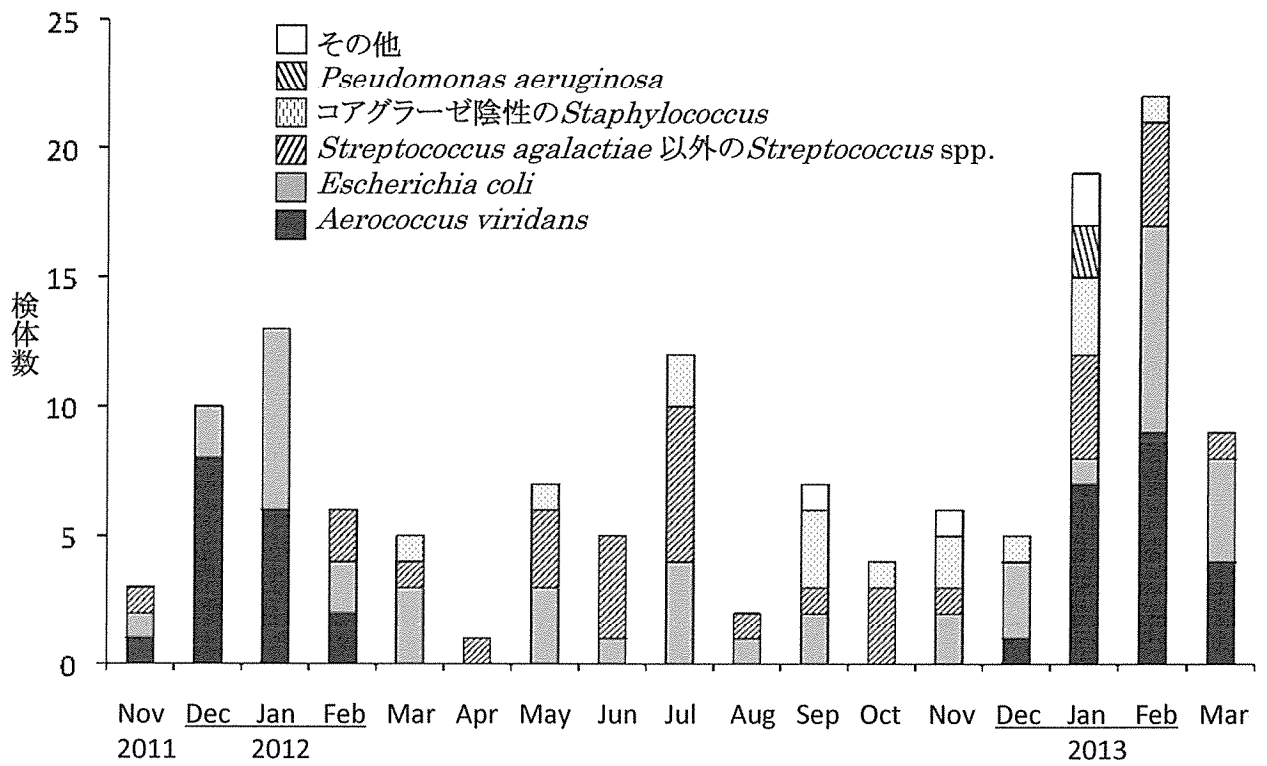


図5 乳房炎を発症した牛の乳汁より分離された菌種毎の月別検体数

表8 4. *vividans* 供試株のデンスク法による薬剤感受性試験において形成された阻止円の直径

薬剤	ゾレイク		各阻止円径を示した菌株数																																耐性株 (%)
	ポイント	<6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22	23-24	25-26	27-28	29-30	31-32	33-34																			
ペニシリン	14																																		0
アンピシリン	16																																		0
アモキシシリン-クラザラン	19																																		0
セフトキシム	14																																	0	
セフトキシム	14																																		3.4
ストレプトマイシン	11																																		0
テトラサイクリン	12																																		0
ゲンタマイシン	12																																		0
クロラムフェニコール	17																																		3.4
バンコマイシン	14																																		0
エリスロマイシン	13																																		0
クリンダマイシン	14																																		89.7
シフトロキサシン	15																																		0

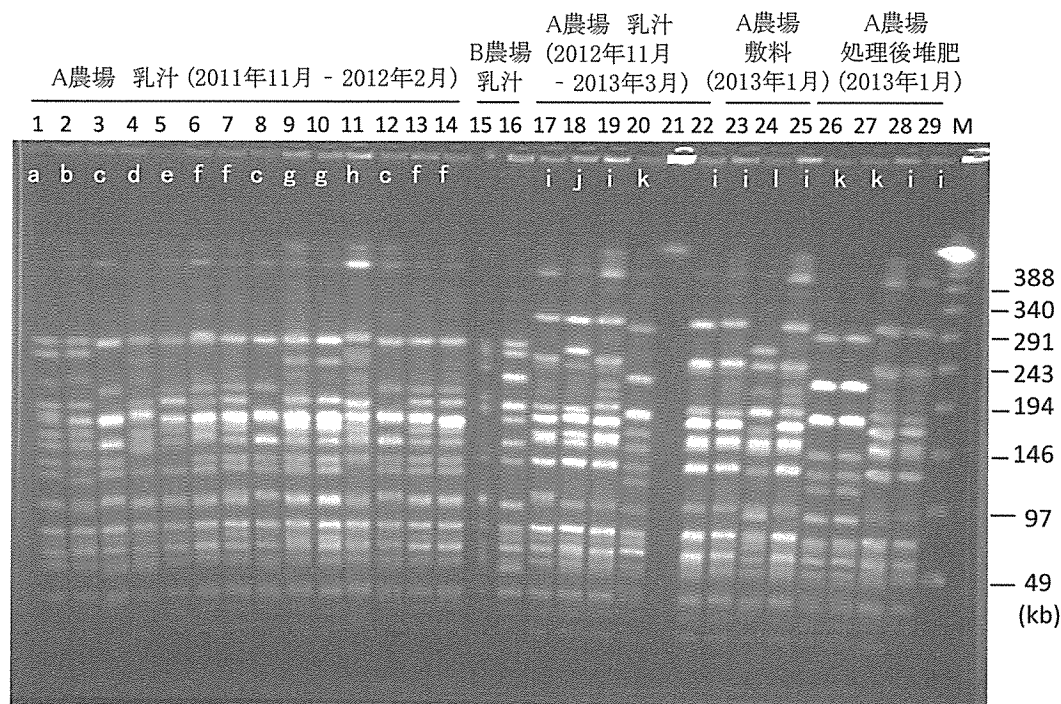


図6 *A. viridans* 代表株における *Sma* I 切断後の染色体DNAのPGFEパターン。

小文字a-l, PFGEパターンを示す(本文参照)。レーン: 1-14, 2011年11月から2012年2月までにA農場の14頭の乳汁から分離された株; 15-16, B農場の2頭乳汁から分離された株; 17-22, 2012年11月から2013年3月までにA農場の6頭の乳汁から分離された株; 23-25, 2013年1月にA農場の敷料から分離された株; 26-29, 2013年1月にA農場の処理後堆肥から分離された株; M, lambda ladder, 右側に分子サイズを示す。

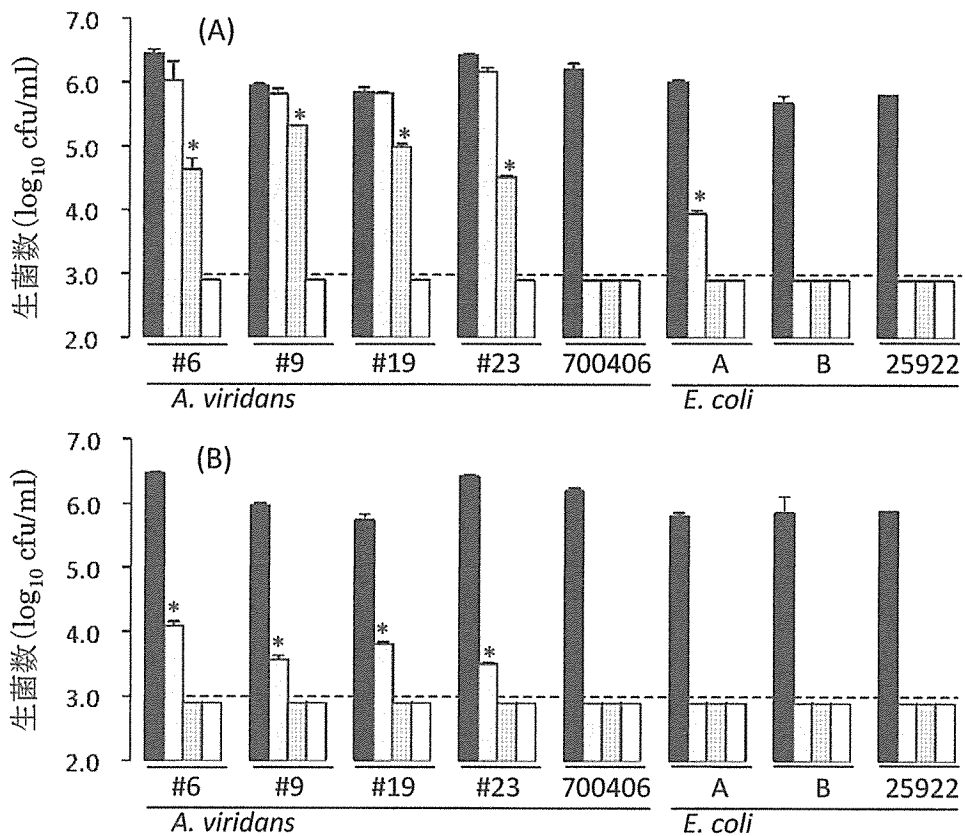


図7 *A. viridans* 又は *E. coli* を (A) PBS (pH 7) 及び (B) Good の緩衝液 (pH 9) にそれぞれ接種し 50°C でインキュベートした場合の生菌数の変化. 接種後 0 時間、3 時間、6 時間及び 24 時間における生菌数を、それぞれ、黒、灰色、格子及び白のヒストグラムで示した. #6、#9、#19 及び #23 は図 6 の *A. viridans* 菌株番号と一致する. *E. coli* 菌株 A 及び菌株 B は乳房炎を発症した牛の乳汁から分離された. 対照として *A. viridans* ATCC700406 及び *E. coli* ATCC 25922 を用いた. 点線は、検出限界以下 (3.0×10^2 cfu/ml). *, 0 時間の値に対し有意差あり (<0.05).

4-4 考察

これまでに、牛の乳房炎における *A. viridans* の病原体としての役割は明らかとなっていない [Devriese *et al.*, 1999; Zadoks *et al.*, 2004]。一方で、乳房炎を発症した牛から *A. viridans* が分離されたことも報告されている [Spaková *et al.*, 2012]。また、2011 年 2 月から 11 月にアメリカの 4 つの州に位置する 6 農場において調査したところ、分娩後 0 日から 6 日までの牛 1,091 頭の乳汁から、コアグラマーゼ陰性の *Staphylococcus* spp. が最も多く分離され、次いで *Aerococcus* spp. が分離されたことが報告されている [Arruda *et al.*, 2013]。

本研究では、乳房炎の症状を呈する牛 38 頭の乳汁から *A. viridans* が純培養状態で分離されたため、*A. viridans* が乳房炎と関係がある可能性が推察された。また乳房炎を発症した牛、処理後堆肥及び敷料から分離された *A. viridans* の PFGE パターンが一致したため、これらの株は互いに遺伝的に近縁であり、薬剤感受性パターンも一致したことから、処理後堆肥や敷料が感染源の一つと考えられた。今回分離された *A. viridans* は、クリンダマイシン以外の薬剤に対して概ね感受性であった。牛から分離された *A. viridans* の薬剤耐性に関する報告はきわめて限られている。1990 年及び 2012 年に、牛の乳房に感染した菌株においてストレプトマイシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン及び β ラクタム系薬剤に耐性を示したことが報告されている [Owens *et al.*, 1990; Spaková *et al.*, 2012]。人では、長期間の抗生物質の投薬により、選択圧によって出現したと考えられるペニシリン耐性 *A. viridans* の分離が報告されている [Swanson *et al.*, 1996; Uh *et al.*, 2002]。一方、本研究で分離された *A. viridans* の 89.7% はクリンダマイシンに耐性であった。しかし日本では、治療にも飼料添加剤としてもクリンダマイシンは使用されておらず、耐性株が分離された理由は明らかではない。

今回分離された *A. viridans* は、50 °C、アルカリ (pH 9.0) に曝露後 3 時間まで生存可能であった。本研究では高温条件下での発育に関する試験を行わなかった

が、これまでの報告によれば 45 °Cでの発育はできないものと考えられる[Facklam *et al.*, 1995]。したがって、今回の分離株は、これまで観察されてきた *A. viridans* とは異なる表現型を有する可能性が示唆された。また、*A. viridans* のアルカリ条件下での生存性に関する報告がないため、今回分離された *A. viridans* が pH9.0 のアルカリ条件下で生存可能であったという結果が、このたびの分離株に特異な性質であるかは明らかではない。

本研究では、冬期に乳房炎の症状を呈する多くの牛から *A. viridans* が分離された。堆肥舎の堆肥と処理後堆肥の温度を測定したところ 10 °Cから 64 °Cであり、良質な堆肥を作るため必要とされる温度に比べ低温であった。したがって、高温に対してある程度抵抗性を示す *A. viridans* が最適な堆肥化の条件ではない堆肥中で生存したため、牛に感染したものと考えられた。農場における堆肥処理に際し、衛生管理を改善していくことが重要であると考えられた。

総 括

本研究は、地方自治体の公務員獣医師として、業務を通じて経験及び対応した事例をさらに学術的観点から検証するとともに、公衆衛生及び家畜衛生の向上に係る意義を探究することを目的とした。

近年、野生のイノシシによる農作物被害が問題となっており、その被害対策として耕作放棄地の整備や狩猟者の確保、有害鳥獣捕獲による個体数調整等が行われている。捕獲されたイノシシは、食用として販売する場合には食肉処理施設で処理されるが、販売を目的とせずに狩猟者が食用とする場合には、狩猟者自らが自宅や捕獲現場で処理を行うことが多い。そこで第 1 章では、狩猟で捕獲されたイノシシの解体処理施設における衛生管理の実態を明らかにするため、鳥取県内 2 施設の解体処理法、処理器具及び処理肉の細菌学的調査を行った。加えて、狩猟者 129 名の衛生意識についてアンケート調査を実施した。その結果、処理法は一般と畜場と類似していた。使用器具の一般細菌数及び大腸菌群数は、消毒回数が多い施設で 10^2 cfu/cm² 以下であった。処理されたイノシシ肉の一般細菌数及び大腸菌群数は、消毒回数が少ない施設で 10^5 cfu/g に達した。これらの施設利用者はわずか 16 名 (12%) で、自宅で解体処理する者は 113 名 (88%) であった。このうち内臓生食者は 9 名 (8%) 存在した。したがって、狩猟者に対する人獣共通感染症に関する知識の普及と施設の衛生設備の充実が必要であると考えられた。

第 1 章で調査対象とした解体処理器具やイノシシ肉から分離された大腸菌群がイノシシの糞便に由来する可能性が示唆された。一方、野生動物における耐性菌の保菌とその要因に関する調査が近年報告されている。そこで第 2 章では、狩猟により捕獲したイノシシの糞便及び筋肉から大腸菌を分離し、薬剤耐性、耐性遺伝子及び可動性因子について検討を行った。

イノシシの糞便から分離された 89 株の大腸菌のうち 3 株 (3.4%) が、また、筋肉

由来の 51 株のうち 2 株 (3.9%) が 1 剤以上に耐性を示した。糞便由来の 1 株が保有する *bla*_{TEM}、*tetB* 及びクラス 2 インテグロンの遺伝子カセットに存在する *dfxA1*、*sat2* 及び *addA1* が R プラスミド上に位置して接合伝達された。さらに糞便由来の 1 株が保有する *tetA* も接合伝達された。耐性株の保菌状況を比較するために県内 4 農場の育成豚の糞便から大腸菌を分離したところ、14 株のうち 13 株が 1 薬剤以上に対し耐性を示し、治療に用いたトリメトプリムや飼料添加物に含まれると考えられるテトラサイクリン系薬に耐性を示した。このたび、イノシシ由来大腸菌においてさまざまな耐性遺伝子を保有する耐性菌が分離され、インテグロンに存在する遺伝子カセットは過去に人や家畜由来株においても報告があったことから、イノシシにおける薬剤耐性大腸菌及び耐性遺伝子の由来を明らかにすることが重要である。

本研究において実施したイノシシ解体処理施設における衛生状況調査に基づき、著者は県の業務として『鳥取県「イノシシ・シカ」解体処理衛生管理ガイドライン』を作成し、講習会等において衛生的な解体処理法の普及及び指導を行ってきた。現在までに県内に計 5 カ所の解体処理施設が設置され、各施設の衛生管理責任者の管理のもと動物が解体処理され、地域特産物としてイノシシ肉・シカ肉の販売促進が行われている。処理施設における衛生状況の指標とする目的で、器具や処理肉の細菌学的なモニタリングを継続することが望まれる。

第 3 章及び第 4 章では乳用牛において飼養衛生管理上大きな課題となっている乳房炎の事例を検討した。まず、第 3 章では、重度の泌乳量低下と高い死亡率を引き起こす *Klebsiella pneumoniae* による乳房炎発症事例のうち、2 農場の牛 3 頭から基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生性の *K. pneumoniae* が分離されたため、分離株の詳細な性状を検討した。これら 3 株はいずれも *bla*_{CTX-M-2} 遺伝子を保有し、異なる 2 農場の牛から分離された 2 株においては、本遺伝子が接合伝達性プラスミド上に存在することが確認された。これら 2 株の染色体 DNA の PFGE パターンは互いに異なっていたが、*bla*_{CTX-M-2} 遺伝子が存在するプラスミド

の制限酵素切断パターンは酷似し、レプリコンタイプは同一であった。以上の成績から、*bla*_{CTX-M-2} 遺伝子はプラスミドを介して、農場の他の細菌にも伝播・拡散する可能性が示唆された。ESBL 産生株の農場への侵入に関わる要因や耐性に関与する遺伝子を明らかにするため、モニタリングの継続が重要であると考えられた。ESBL 産生性 *K. pneumoniae* が乳用牛から分離された本研究の事例は、国内で Ohnishi ら[Ohnishi ら, 2013a]に次いで 2 報目であり、乳牛における抗菌性物質の使用実態に鑑み、今後の動向を注視する必要がある。

第 4 章では、乳房炎を発症した牛の乳汁から *Aerococcus viridans* が分離され、敷料と戻し堆肥からも同菌種が分離されたため、これらが感染源である可能性を検討する目的で分離菌株の詳細な性状を検討した。鳥取県内の 1 農場において、2011 年 11 月から 2013 年 3 月の期間に乳房炎を発症した 478 頭の牛のうち、冬期間に乳房炎を発症した牛の乳汁より 38 株の *A. viridans* が分離された。この農場では牛の糞尿を堆肥化し、おがくずと消石灰を混合した堆肥(処理後堆肥)を敷料として使用しており、処理後堆肥と牛床の敷料からも本菌種が分離された。堆肥舎及び堆積場の堆肥の温度を測定したところ、適正な堆肥化の過程で求められる温度に達していなかった。乳房炎牛の乳汁由来株、処理後堆肥由来株及び敷料由来株において、染色体 DNA の PFGE パターンが同一である株が認められた。PFGE パターンを解析した 29 株について 13 薬剤に対する感受性試験を行ったところ、26 株はクリンダマイシンに耐性、1 株はセフロキシムに耐性、その他の 2 株はすべてに感受性であった。乳汁から分離された 3 株及び処理後堆肥由来 1 株は、pH9.0 及び 50 °C に調製した緩衝液中において 3 時間生残した。以上の成績から、処理後堆肥及び敷料が感染源である可能性が示唆された。したがって、農場においては敷料の衛生管理を改善する必要があると考えられた。フリーバーン牛舎及びフリーストール牛舎により乳牛の飼養を行う大規模農場では、敷料に戻し堆肥を利用する場合が多い。本研究において分離された *A. viridans* が、適切に管理され

ていない堆肥中で、特に冬期に生残する可能性を見出すことにより、戻し堆肥を利用するにあたり管理上の重要なポイントを呈示した。

本研究において得られた知見は、食用に供する野生動物の衛生管理のガイドライン作成や解体処理施設を新たに整備したこと等、鳥取県における公衆衛生行政に係る施策の一部に反映された。また乳牛における乳房炎の原因菌の精査の重要性や、発生予防に係る新たな衛生管理の視点の指摘につながった。限られた人員の公務員獣医師が業務を遂行して獣医療を改善するためには、公衆衛生及び家畜衛生が協力し、いずれにも対応できる人材の育成が必要である。そのため、経験した事例や対応の学術的な検討と情報の共有が重要と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行や学位論文の執筆に多くのご支援とご指導を賜りました鳥取大学農学部獣医微生物学教室の村瀬敏之教授に深く感謝しております。また、研究を進める上で、ご助言をいただいた宮崎大学農学部産業動物衛生学教室の末吉益雄教授、鳥取大学農学部獣医衛生学教室の山口剛士教授、獣医公衆衛生学教室の伊藤壽啓教授、獣医微生物学教室の尾崎弘一准教授に心よりお礼申し上げます。

イノシシに関する調査をするにあたり、検体採取やアンケート調査にご協力いただいた鳥取県猟友会、鳥取市鹿野町総合支所、鳥取県各総合事務所生活安全課食品担当各位、また本調査にご理解とご協力いただいた鳥取県食肉衛生検査所の前所長 山中哲雄氏をはじめ職員の皆さまに心より感謝申し上げます。

乳房炎に関する調査をするにあたり、検体採取やその他の調査にご協力いただいた酪農家の皆さま、家畜診療獣医師の若竹修一氏、本調査にご理解とご協力いただいた鳥取県倉吉家畜保健衛生所の山里比呂志所長をはじめ職員の皆さまに心より感謝申し上げます。

最後に、本学での研究活動に理解を示し、サポートしてくれた妻と子どもたちに感謝します。

引用文献

- Ahmed, A. M. and Shimamoto, T. 2011. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiol. Immunol.* 55: 318-327.
- Arruda, A. G., Godden, S., Rapnicki, P., Gorden, P., Timms, L., Aly, S. S., Lehenbauer, T. W. and Champagne, J. 2013. Randomized noninferiority clinical trial evaluating 3 commercial dry cow mastitis preparations: I. quarter-level outcomes. *J. Dairy Sci.* 96: 4419-4435.
- Asai, T., Masani, K., Sato, C., Hiki, M., Usui, M., Baba, K., Ozawa, M., Harada, K., Aoki, H. and Sawada, T. 2011. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet. Scand.* 53: 52.
- Barberg, A. E., Endres, M. I., Salfer, J. A. and Reneau, J. K. 2007. Performance and welfare of dairy cows in an alternative housing system in Minnesota. *J. Dairy Sci.* 90: 1575-1583.
- Barlow, R. S., Pemberton, J. M., Desmarchelier, P. M. and Gobius, K. S. 2004. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 838-842.

- Battison, A. L., Cawthorn, R. J. and Horney, B. 2004. Response of American lobsters *Homarus americanus* to infection with a field isolate of *Aerococcus viridans* var. *homari* (gaffkemia): survival and haematology. *Dis. Aquat. Organ.* 61: 263-268.
- Benavides, J. A., Godreuil, S., Bodenham, R., Ratiarison, S., Devos, C., Petretto, M. O., Raymond, M. and Escobar-Páramo, P. 2012. No evidence for transmission of antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains from humans to wild western lowland gorillas in Lopé National Park, Gabon. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 4281-4287.
- Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164: 116-128.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. and Threlfall, E. J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods.* 63: 219-228.
- Carlson, S. A., Bolton, L. F., Briggs, C. E., Hurd, H. S., Sharma, V. K., Fedorka-Cray, P. J. and Jones, B. D. 1999. Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. *Mol Cell Probes.* 13: 213-222.
- Chu, C., Chiu, C. H., Wu, W. Y., Chu, C. H., Liu, T. P. and Ou, J. T. 2001. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of

Salmonella enterica serovar Choleraesuis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2299-2303.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard, 3rd ed. CLSI document M31-A3. Wayne, PA, U.S.A.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, eighth ed. (M07-A8). CLSI, Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA, USA.

Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M. and Piffaretti, J. C. 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50: 126-132.

Dahmen, S., Metayer, V., Gay, E., Madec, J. Y. and Haenni, M. 2013. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. *Vet. Microbiol.* 162: 793-799.

- Devriese, L. A., Hommez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P. and Haesebrouck, F. 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci, and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 70: 87–94.
- Facklam, R. and Elliott, J. A. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 479-495.
- Fischer, J., Schmoger, S., Jahn, S., Helmuth, R. and Guerra, B. 2013. NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 68: 2954-2956.
- 藤田雅弘. 1999. 食肉処理場における HACCP の構築. 獣畜新報. 52: 671-675.
- Gebreyes, W. A. and Altier, C. 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2813-2822.
- Geser, N., Stephan, R. and Hachler, H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC. Vet. Res.* 8: 21.

- Gniadkowski, M., Palucha, A., Grzesiowski, P. and Hryniewicz, W. 1998. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 3079-3085.
- Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. and Singh, R. M. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry.* 5: 467-477.
- Gopalachar, A., Akins, R. L., Davis, W. R. and Siddiqui, A. A. 2004. Urinary tract infection caused by *Aerococcus viridans*, a case report. *Med. Sci. Monit.* 10: 73-75.
- Grant, K. A., Dickinson, J. H., Collins, M. D. and Kroll, R. G. 1992. Rapid identification of *Aerococcus viridans* using the polymerase chain reaction and an oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol. Lett.* 95: 63-69.
- Gröhn, Y. T., Wilson, D. J., González, R. N., Hertl, J. A., Schulte, H., Bennett, G. and Schukken, Y. H. 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 3358-3374

Guenther, S., Ewers, C. and Wieler, L. H. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front. Microbiol.* 2: 246.

Guerra, B., Soto, S. M., Argüelles, J. M. and Mendoza, M. C. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1305-1308.

Hammad, A. M., Ahmed, A. M., Ishida, Y. and Shimamoto, T. 2008. First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 1269-1272.

Harada, K., Nakai, Y. and Kataoka, Y. 2012. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27 β -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. *Microbiol Immunol.* 56: 480-485.

原田信男. 1993. 歴史のなかの米と肉－食物と天皇・差別. 平凡社, 東京.

Hiroi, M., Yamazaki, F., Harada, T., Takahashi, N., Iida, N., Noda, Y., Yagi, M., Nishio, T., Kanda, T., Kawamori, F., Sugiyama, K., Masuda, T., Hara-Kudo, Y. and Ohashi, N. 2012. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 189-195.

石井宏志, 下田雅昭, 松本寿男, 遠間隆弘, 中林良雄, 亀田三男, 栗原貯. 1991. 対米輸出牛肉処理施設の衛生学的考察. 食品衛生研究. 41: 51-63.

板屋民子, 牧野美紀, 田中一彦, 伊藤 学, 福田健治. 1999. 作業用手袋を介してのと畜場枝肉の汚染. 日獣会誌. 52: 37-40.

神谷英生. 2014. 料理人のためのジビエガイドー上手な選び方と加工・料理. 柴田書店, 東京.

神崎伸夫, 大東・伊藤絵理子. 1997. 近・現代の日本におけるイノシシ猟及びイノシシ肉の商品化の変遷. 野生生物保護. 2: 169-183.

Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G. and Lee, M. D. 2000. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 421-424.

Kinjo, T., Minamoto, N., Sugiyama, M. and Sugiyama, Y. 1992. Comparison of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in wild and captive Japanese serows. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 821-827.

Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., Tamura, Y., Takahashi, T. and Yamaguchi, K. 2005. Extended-spectrum-beta-

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.

Kuroda, H., Yano, H., Hirakata, Y., Arai, K., Endo, S., Kanamori, H., Yamamoto, H., Ichimura, S., Ogawa, M., Shimojima, M., Komatsu, M., Jonai, T., Itagaki, S., Nonomiya, Y., Suwabe, A. and Kaku, M. 2012. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan: emergence of CTX-M-15-producing *E. coli* ST131. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74: 201-203.

Lessa, S., Paes, R., Santoro, P., Mauro, R. and Vieira-da-Motta, O. 2011. Identification and antimicrobial resistance of microflora colonizing feral pig (*Sus scrofa*) of Brazilian Pantanal. *Braz. J. Microbiol.* 42: 740-749.

Leverstein-Van Hall, M. A., Paauw, A., Box, A. T., Blok, H. E., Verhoef, J. and Fluit, A. C. 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3038-3040.

Lévesque, C., Piché, L., Larose, C. and Roy, P. H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 185-191.

- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F. M., Hasman, H. and Cizek, A. 2010. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* 108: 1702-1711.
- Locatelli, C., Scaccabarozzi, L., Pisoni, G. and Moroni, P. 2010. CTX-M1 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3822-3823.
- Madsen, L., Aarestrup, F. M. and Olsen, J. E. 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Vet. Microbiol.* 75: 73-82.
- Martín, V., Vela, A. I., Gilbert, M., Cebolla, J., Goyache, J., Domínguez, L. and Fernández -Garayzabal, J. F. 2007. Characterization of *Aerococcus viridans* isolates from swine clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3053-3057.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K. and Mishiro, S. 2003. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 188: 944.
- Maynard, C., Fairbrother, J. M., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R.

- C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S. and Harel, J. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3214-3221.
- Mokracka, J., Koczura, R., and Kaznowski, A. 2012. Transferable integrons of Gram-negative bacteria isolated from the gut of a wild boar in the buffer zone of a national park. *Ann. Microbiol.* 62: 877-880.
- 森田幸雄, 新井芳典, 嶋村真理, 鮫島昭子, 庄司和人, 清水静一, 天田貴昌, 久保雅敏, 中村良雄, 中嶋 隆. 2001. と畜処理におけるナイフの消毒時間の検討と HACCP システム導入食肉処理場の枝肉の衛生状態. 日獣会誌. 54: 387-390.
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R. and Correia, A. 2007. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 1243-1250.
- Munoz, M. A., Welcome, F. L., Schukken, Y. H. and Zadoks, R. N. 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3964-3971.
- Naya, Y., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and Shinagawa, M. 2003.

Bacteriological and genetic assessment of game meat from Japanese wild boars. *J. Agric. Food Chem.* 51: 345-349.

Ng, L. K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G. A. and Johnson, W. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 3018-3021.

Ohnishi, M., Okatani, A. T., Harada, K., Sawada, T., Marumo, K., Murakami, M., Sato, R., Esaki, H., Shimura, K., Kato, H., Uchida, N. and Takahashi, T. 2013a. Genetic characteristics of CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae involved in mastitis cases on Japanese dairy farms, 2007 to 2011. *J. Clin. Microbiol.* 51: 3117-3122.

Ohnishi, M., Okatani, A. T., Esaki, H., Harada, K., Sawada, T., Murakami, M., Marumo, K., Kato, Y., Sato, R., Shimura, K., Hatanaka, N. and Takahashi, T. 2013b. Herd prevalence of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M-type and CMY-2 β -lactamases among Japanese dairy farms. *J. Appl. Microbiol.* 115: 282-289.

大泰司紀之, 本間浩昭. 1998. エゾシカを食卓へ - ヨーロッパに学ぶシカ類の有効活用. 丸善プラネット, 東京.

Owens, W. E., Watts, J. L., Greene, B. B. and Ray, C. H. 1990. Minimum

- inhibitory concentrations and disk zone diameter for selected antibiotics against streptococci from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 73: 1225-1231.
- Ozaki, H., Esaki, H., Takemoto, K., Ikeda, A., Nakatani, Y., Someya, A., Hirayama, N. and Murase, T. 2011. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet. Microbiol.* 150: 132-139.
- Poppe, C., Ziebell, K., Martin, L. and Allen, K. 2002. Diversity in antimicrobial resistance and other characteristics among *Salmonella typhimurium* DT104 isolates. *Microb. Drug Resist.* 8: 107-122.
- Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Vidal, D., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Herrera-León, S., Echeita, A., Alonso, J. M. and Rey, J. 2010. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet. Microbiol.* 143: 420-423.
- Sasaki, Y., Goshima, T., Mori, T., Murakami, M., Haruna, M., Ito, K. and Yamada, Y. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10: 985-991.
- Schierack, P., Rödiger, S., Kuhl, C., Hiemann, R., Roggenbuck, D., Li, G.,

- Weinreich, J., Berger, E., Nolan, L. K., Nicholson, B., Römer, A., Frömmel, U., Wieler, L.H. and Schröder, C. 2013. Porcine *E. coli*: virulence-associated genes, resistance genes and adhesion and probiotic activity tested by a new screening method. *PLoS One*. 8: e59242.
- Schierack, P., Römer, A., Jores, J., Kaspar, H., Guenther, S., Filter, M., Eichberg, J. and Wieler, L. H. 2009. Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 695–702.
- Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K., Motoyama, H., Kohshima, S. and Ushida, K. 2013. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environ. Microbiol. Rep.* 5: 127-134.
- Sharma, N., Singh, N. K. and Bhadwal, M. S. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 24: 429-438.
- Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y. and Arakawa, Y. 2004. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 69-75.
- Someya, A., Otsuki, K. and Murase, T. 2005. Antimicrobial

susceptibilities of *Salmonella* isolates obtained from layer chicken houses on a commercial egg-producing farm in Japan, 1997 to 2002. *J. Food Prot.* 68: 2030-2034.

Spaková, T., Elecko, J., Vasil, M., Legáth, J., Pristas, P. and Javorský, P. 2012. Limited genetic diversity of *Aerococcus viridans* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis in Slovakia. *Pol. J. Vet. Sci.* 15: 329-335.

Stebbing, P. D., Pond, M. J., Peeler, E., Small, H. J., Greenwood, S. J. and Verner-Jeffreys, D. 2012. Limited prevalence of gaffkaemia (*Aerococcus viridans* var. *homari*) isolated from wild-caught European lobsters *Homarus gammarus* in England and Wales. *Dis. Aquat. Organ.* 100: 159-167.

Stewart, J. E., Arie, B. and Marks, L. J. 2004. Induced resistance to infection of lobsters *Homarus americanus* by *Aerococcus viridans* (var.) *homari*, the bacterium causing gaffkemia. *Dis. Aquat. Organ.* 62: 197-204.

Swanson, H., Cutts, E. and Lepow, M. 1996. Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia in a child receiving prophylaxis for sickle-cell disease. *Clin. Infect. Dis.* 22: 387-388.

竹鼻悦子, 神崎伸夫. 2004. 島根県のイノシシによる農作物被害, その対策の実

態と農業の展望. 野生生物保護. 9: 23-45.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.

上田剛平, 神崎伸夫. 2006. 島根県における新規狩猟者の実態とその意識. 野生生物保護. 10: 9-19.

Uh, Y., Son, J. S., Jang, I. H., Yoon, K. J. and Hong, S. K. 2002. Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* bacteremia associated with granulocytopenia. *J. Korean Med. Sci.* 17: 113-115.

van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K. and Mevius, D. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 746-750.

Vieira-Pinto, M., Morais, L., Caleja, C., Themudo, P., Torres, C., Igrejas, G., Poeta, P. and Martins, C. 2011. *Salmonella* sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 739-740.

Wacheck, S., Fredriksson-Ahomaa, M., König, M., Stolle, A. and Stephan, R. 2010. Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens.

Foodborne Pathog. Dis. 7: 307-312.

渡辺 実. 2007. 日本食生活史. 吉川弘文館, 東京.

Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. M. and Van Oirschot, J. T. 2002.

Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet. Microbiol.* 88: 27-45.

White, P. A., McIver, C. J. and Rawlinson, W. D. 2001. Integrons and gene

cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2658-2661.

Winokur, P. L., Vonstein, D. L., Hoffman, L. J., Uhlenhopp, E. K. and

Doern, G. V. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2716-2722.

Woodward, W. D., Besser, T. E., Ward, A. C. and Corbeil, L. B. 1987. *In*

vitro growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. *Can. J. Vet. Med.* 51: 27-31.

Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K. and Arakawa, Y. 2000.

A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 53-56.

Zadoks, R. N., González, R. N., Boor, K. J., and Schukken, Y. H. 2004.
Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial
counts in raw bulk tank milk. *J. Food Prot.* 67: 2644-2650.