



|                        |   |
|------------------------|---|
| Title                  | 肉牛糞便から分離した薬剤耐性大腸菌の遺伝的多様性とその特性解析 [論文内容及び審査の要旨]   |
| Author(s)              | 山本, 詩織  |
| Citation               | 北海道大学. 博士(農学) 甲第11392号  |
| Issue Date             | 2014-03-25  |
| Doc URL                | <a href="http://hdl.handle.net/2115/56095">http://hdl.handle.net/2115/56095</a>   |
| Rights(URL)            | <a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                   | theses (doctoral - abstract and summary of review)  |
| Additional Information | There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.  |
| File Information       | Shiori_Yamamoto_abstract.pdf (論文内容の要旨)  |



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (農学)

氏名 山本 詩織

## 学位論文題名

肉牛糞便から分離した薬剤耐性大腸菌の遺伝的多様性とその特性解析

薬剤耐性菌は、医療現場等において年々増加しており、さらに複数の薬剤に耐性を示す多剤耐性菌も出現しているため、世界的に問題視されている。抗菌性物質は食用動物における感染症治療や疾病予防、成長促進等を目的として使用されている。抗菌性物質の使用によって、薬剤耐性菌が増加することが知られている。畜産現場で増加した耐性菌は、食用動物やヒトとの接触を介して伝播するリスクがあるため、抗菌性物質の使用は薬事法、飼料安全法および農薬取締法によって規制されている。

薬剤耐性菌対策として、世界各国で薬剤耐性モニタリングシステムが確立されており、日本でも 1999 年から開始された。これは、食用動物 (牛, 豚, 肉用鶏および採卵鶏) における、*E. coli* を含む指標細菌および病原性細菌が対象である。牛では肉牛と乳牛が混同されているため、種類別の詳細な調査報告は乏しい。肉牛では、耐性菌に汚染された牛肉が食卓に上がることで、耐性菌がヒトへ直接感染する危険性がある。薬剤耐性の獲得には、可動性遺伝因子による薬剤耐性遺伝子の伝播が関連している。特にプラスミドは最も重要な因子であり、近年では不和合性プラスミドと多剤耐性の関連性を説く研究報告が増えている。

本研究では、日本の肉牛由来の耐性菌に関する詳細なデータが乏しいことに着目し、肉牛から分離した *E. coli* が持つ薬剤耐性情報を詳細に調査した。牧場における遺伝的多様性とその耐性拡散様式を明らかにすることを目的とし、肉牛生産牧場に存在している *E. coli* が保持する薬剤耐性表現型、耐性遺伝子およびプラスミドの関連性を解析した。

### 1) 薬剤耐性菌の分布状況と分子疫学的解析

日本の肉牛生産牧場として代表的な北海道、中部および九州から収集した総計 291 頭の肉牛糞便を試料として用い、*E. coli* 3,147 株を分離した。薬剤耐性分布状況を調査したところ、44.4%が耐性を示し、北海道では 39.8%、中部では 54.4%、九州では 44.2%であった。これらの耐性率は、過去の国内外における研究報告よりも高かった。3 地区間の耐性率では、有意な差が見られた。抗菌性物質の投与歴と比較したところ、実際に農場において使用されている抗菌性物質に対して高い耐性を示した。各農場における薬剤耐性パターンおよび *E. coli* の系統型の類似性は高く一致し、農場内の異なる菌株間で可動性遺伝因子による遺伝子の水平伝播が起こっている可能性が示唆された。中部および九州由来株の系統型が類似しており、市場において牛が地域を移動させられることで、耐性菌や耐性遺伝子も共に伝播していると考えられた。3 地域の耐性遺伝子では、一部の遺伝子は共通して見られたが、保有する耐性遺伝子の種類では地区間で有意な差が見られた。以上より、日本の肉牛由来 *E. coli* 分離株は諸外国の研究報告よりも高い耐性率を示し、耐性率および耐性遺伝子が地区毎に異なる特性を持つことがわかった。従って、薬剤耐性菌による汚染および耐性遺伝子の多様性が、日本国内において増加・拡散していることが示唆された。

### 2) 多剤耐性菌が保有するプラスミドの分布とその解析

9 剤以上の多剤耐性 45 株を用いて、肉牛生産牧場に存在する遺伝的特性を解析した。45 株は、5 つの系統型と 2 つのサブグループに分類され、各農場と密接な関連性が見られた。地区間において系統型の多様性が見られ、各農場では独特な系統型を持つ *E. coli* が存在していると推測された。一方、複数の牧場由来株が混在する系統型も見られ、一部の分離株が農

場間で伝播していることが示唆された。耐性表現型および耐性遺伝子型を調べたところ、8種類の耐性表現型に対して、17種類の耐性遺伝子の組み合わせによる16グループの耐性遺伝子型が存在した。耐性表現型は *E. coli* の系統型と関連性が見られたが、耐性遺伝子型は多様な系統型に分散されていた。29株において耐性表現型と耐性遺伝子型が一致したが、16株は不一致であった。同一の抗菌性物質に対する耐性遺伝子が2種類以上存在する株も見られ、*tetA* および *tetB* が同一プラスミド上で共存していた。プラスミドは総計210個 (2~774 kb) が同定され、サイズ、不和合性タイプおよび耐性遺伝子の存在により92種類に分けられた。各菌株のプラスミドタイプは、分離された農場で個別の特徴があった。しかし、異なる *E. coli* の系統型間で、類似するプラスミドセットを保有する分離株も見られた。一部のプラスミドセットが他の系統型へ伝播していることが考えられ、宿主細菌間において伝達していると推測された。210個中89個は最多で9つの耐性遺伝子を含む不和合性タイプであり、121個は最多で6つの耐性遺伝子を含む非不和合性タイプであった。従って、耐性遺伝子と不和合性または非不和合性タイプの関連性が、耐性遺伝子の拡散や耐性化のルーツを把握するために重要である可能性が考えられた。以上より、畜産農場における多剤耐性菌は多様な遺伝的特性を示し、これは耐性遺伝子およびプラスミドの多様性によって誘引されていることが示唆された。

### 3) 多剤耐性プラスミドの塩基配列解析

多剤耐性に関するプラスミドの塩基配列を決定し、耐性遺伝子や可動性遺伝因子の関連性を解析するため、多剤耐性20株中16株より総計91個のプラスミドを分離し、プラスミドライブラリーとして保存した。各プラスミドには2~9つの耐性遺伝子がコードされ、これらの耐性遺伝子が耐性表現型を誘導・発現していることが判明した。現在、これらのプラスミドDNAを精製しており、今後、次世代シーケンサーによって解析を行う予定である。

### 4) ゲンタマイシン耐性遺伝子 *aac(3)-VIa* の解析

ゲンタマイシン (GM) 耐性239株を対象としてGM耐性遺伝子を調査したところ、*aacC2*、*aadB* および *aac(3)-VIa* が検出された。*aacC2* および *aadB* は主要なGM耐性遺伝子として知られているが、*aac(3)-VIa* の検出はこれまで少なかった。*aac(3)-VIa* は11剤耐性8株のみから検出され、多剤耐性との関連性も推測された。*aac(3)-VIa* は *aacC2* と55%で一致し、*aac(3)-VIa* は *aacC2* の変異により発生したわけではないと考えられた。*aac(3)-VIa* は全て染色体上に位置しており、プラスミド以外からの検出は本研究が初めてであった。*aac(3)-VIa* の周辺配列では、下流領域に *intI1* が位置し、本研究で決定した周辺配列のさらに上流および下流にはトランスポゼースの存在も推測された。クラス1インテグロンが *aac(3)-VIa* の水平伝播に関連していることが示唆され、この周辺配列にトランスポゾンが挿入される可能性も考えられた。以上より、本来、肉牛生産牧場に存在する細菌が *aac(3)-VIa* を保有しており、この遺伝子を含む配列がインテグロンによってプラスミドへ組み込まれることで、畜産農場から広域へと伝播・拡散していることが示唆された。

本研究では、日本の肉牛生産牧場に存在する *E. coli* が多様な遺伝的特性を持つことを明らかにした。農場毎に異なる系統型の *E. coli* が存在していたが、プラスミドによる耐性遺伝子の水平伝播によって多種類の耐性株が存在していると推測された。*aac(3)-VIa* では初めて染色体上から検出され、可動性因子によって移動したと推定した。本研究の結果は、多様な遺伝子型の耐性菌汚染に対するリスク管理に有用であると期待される。