



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_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏名 山本 詩織

審査担当者 主査 教授 浅野 行蔵  
副査 客員教授 鎌形 洋一  
副査 教授 生方 信  
副査 准教授 曾根 輝雄  
副査 主任研究員 北川 航 (独産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門)

## 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

本論文は、10章からなり、図14、表49、文献78を含む総頁数142の日本語論文である。別に参考論文5編が付されている。

近年では、薬剤耐性菌、特に多剤耐性菌の出現と流行が世界的に懸念されている。抗菌性物質は食用動物の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、この使用が耐性菌を増加させる。畜産現場で増加した耐性菌は、食肉や接触等を介してヒトへ伝播するリスクがあり、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。日本を含む世界各国では、耐性菌対策として薬剤耐性モニタリングシステムを確立しており、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細菌が対象である。牛では肉牛と乳牛が混同しており、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、ヒトへ直接感染する危険性がある。耐性獲得には可動性因子、特にプラスミドが関連しており、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た。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、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291頭の肉牛糞便を試料とし、*E. coli* 3,147株を分離した。薬剤耐性分布調査では平均44.4%が耐性を示し、3地区間の耐性率は有意な差が見られた。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。この耐性率と抗菌性物質の投与歴と比較したところ、実際に農場で使用している抗菌性物質に対して高い耐性を示した。3地区の耐性遺伝子では、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。従って、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。

## 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、さらに詳細に遺伝的特性を解析した。45株は5つの系統型に分類され、農場毎に特定の系統型を示す *E. coli* が存在した。耐性表現型およびプラスミドタイプはそれぞれ8および9パターンが見られ、系統型や農場と強く関連していた。耐性遺伝子型は、17種類の耐性遺伝子の組み合わせによって16パターンが存在し、農場と緩く関連していた。一方、複数の農場から分離した菌株が混在する系統型も見られ、一部の菌株が農場間で伝播していると考えられた。従って、農場毎に異なる系統型が存在し、耐性遺伝子を持つプラスミドの水平伝播によって多剤耐性化していると示唆された。

プラスミドは総計210個が同定され、サイズ、不和合性タイプおよび保有する耐性遺伝子の種類によって92種類に分けられた。210個中89個は不和合性タイプで、最多で9つの耐性遺伝子を含んだ。残りの121個は非不和合性タイプで、最多で6つの耐性遺伝子を含んだ。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。

## 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するため、多剤耐性20株中16株から91個のプラスミドを分離し、プラスミドライブラリーを作製した。各プラスミドは2~9つの耐性遺伝子をコードし、これらの耐性遺伝子が耐性表現型を発現していることを証明した。

## 4) ゲンタマイシン耐性遺伝子 *aac(3)-VIa* の解析

ゲンタマイシン耐性239株を調査したところ、*aacC2*、*aadB*および *aac(3)-VIa* が検出され、*aac(3)-VIa* は11剤耐性8株のみから検出された。*aac(3)-VIa* は *aacC2* と相同性が55%で一致し、*aac(3)-VIa* は *aacC2* の変異による発生ではないと考えられた。*aac(3)-VIa* は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、さらに上流および下流にはトランスポーゼースの存在も推測された。従って、*aac(3)-VIa* の水平伝播にクラス1インテグロンが関連していると示唆され、この周辺にトランスポゾンが挿入される可能性も考えられた。

今回の申請者の研究では、日本の肉牛生産牧場に存在する *E. coli* が独特の遺伝的特性を持つことを明らかにした。農場毎に異なる染色体系統型の *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、伝播に応じた種類の耐性遺伝子型を持つ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。以上の結果は、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。

よって、審査員一同は、山本詩織が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。