



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	山本, 詩織
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11392号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56096
Type	doctoral thesis
File Information	Shiori_Yamamoto_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

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、医療現場における感染症の治療効果を低下させるため、ヒト医療、動物医療、公衆衛生および食品衛生において問題となっている。薬剤耐性菌は日和見感染症との関連が多く報告されており、特に病院における院内感染が問題視されている。複数の薬剤に耐性を示す多剤耐性菌も出現・増加しており、近年では、治療において効果的かつ広く用いられる第四世代セファロsporin系、カルバペネム系、フルオロキノロン系およびアミノグリコシド系に対して耐性を示す多剤耐性菌も検出され、世界的に問題となった。

薬剤耐性の獲得は抗菌性物質の使用量と深く関連しており、抗菌性物質の使用によって耐性菌が出現・増加することが危惧されている。抗菌性物質は、多くの動物に対する感染症治療に使用されると共に、食用動物の疾病予防や成長促進等を目的として、飼料や飲水に添加して使用されている。畜産現場で増加した耐性菌は、食用動物、環境およびヒトとの接触を介して、ヒトへと伝播する。そのため、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厳しく規制されている。しかし、医療施設および市中における耐性菌は年々増加し、急速に広まっているのが現状である。

1969 年に Swann により、食用動物の領域での抗菌性物質使用によって薬剤耐性菌が発生・増加し、ヒトの健康へ影響を及ぼすことを指摘された。これを契機に、世界各国では食用動物への抗菌性物質の使用について議論が行われてきた。現在、WHO によって、食用動物における抗菌性物質の慎重使用が提案されており、先進諸国では薬剤耐性モニタリングシステムが確立されている。EU 諸国では 2009 年に食用動物への治療以外の抗菌性物質の使用を禁止し、FDA でも 2010 年に食用動物の飼料や飲水への抗菌性物質添加量を減らす指針案を発表した。日本でも、1999 年より薬剤耐性モニタリングシステム JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) による調査が開始されている。JVARM では、食用動物において、指標細菌である *E. coli* および *Enterococcus* と病原性細菌である *Salmonella* および *Campylobacter* を対象とした薬剤耐性菌のモニタリングが行われている。調査の対象動物は、牛、豚、肉用鶏および採卵鶏であるが、牛では肉用牛と乳用牛が混同して調査されているため、牛の種類別の詳細な調査報告は乏しい。

全世界的に薬剤耐性菌のモニタリングおよび抗菌性物質使用の制限をしているにも関わら

ず、現在でも使用禁止の抗菌性物質に対する耐性菌が食用動物由来菌より分離されている。この薬剤耐性の獲得には、可動性遺伝因子上に位置している薬剤耐性遺伝子が菌から菌へ伝達していることが一つの要因であると考えられる。特にプラスミドは耐性遺伝子の伝播において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、日本の肉牛に関する詳細なデータが乏しいことに着目し、肉牛生産牧場から分離した *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、以下の項目別に研究を進め、肉牛生産牧場に拡散している *E. coli* が保持する薬剤耐性、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3地区である北海道、中部および九州で飼育されている総計291頭の肉牛から収集した糞便を試料として用い、*E. coli* 3,147株を分離した。これらの *E. coli* における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く、薬剤耐性菌の増加傾向が示唆された。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ていた。

各農場における薬剤耐性パターンおよび分離株の系統型の類似性は高く一致し、農場内の異なる菌株間において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強く示唆された。これは、食物や飲水のような農場環境を介して、牛から牛へと間接的に伝播している可能性が考えられる。中部および九州由来株の系統型が類似していたことから、市場において育成牛が異なる地域へ移動させられることで、耐性菌や耐性遺伝子も共に拡散していると考えられた。

耐性遺伝子は3地域で共通して *bla*TEM, *strA*, *strB*, *aphA1*, *aphAI-IAB* および *catI* が多く見られ、3地区間の耐性遺伝子の保有状況を比較したところ、北海道および中部の分離株では多様な耐性遺伝子が見られたのに対して、九州の分離株では類似した耐性遺伝子を保有する傾向が見られた。各地区間ではDSM, GM, CP およびTMPに対する耐性遺伝子の種類に有意な差が見られたことから、日本中に拡散している耐性遺伝子は多様であることが示唆された。

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

肉牛糞便から分離した耐性 *E. coli* のうち、多剤耐性 45 株 (9 剤または 11 剤耐性) を選択して、肉牛生産牧場に存在している遺伝的特性を解析した。45 株の系統型は、5 つのグループと 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、各農場において独特な宿主 *E. coli* が拡散していることが推測された。これは、宿主 *E. coli* の由来が農場毎に限定して存在しており、他の地区への拡散は少ないことが考えられた。一方、複数の牧場由来分離株が混在する系統型も見られた。このことから、同一の宿主 *E. coli* 由来の一部の分離株が、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では、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 種類の耐性遺伝子型が得られた。耐性表現型のパターンに対して、耐性遺伝子型は多様であった。耐性表現型は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 株の耐性表現型と耐性遺伝子型が一致し、16 株は不一致であった。これは、遺伝子が不活性であること、耐性発現に必要な部位が欠損していること、未知の耐性遺伝子もしくは新規遺伝子が拡散していること等が推測された。耐性遺伝子では、同一の抗菌性物質に対する耐性遺伝子が 2 種類以上存在しているものも見られた。これまでの研究では、*tetA* および *tetB* が同一プラスミド上で共存できないと報告されていたが、本研究ではこれらの遺伝子は共存していた。調べた限り、同一プラスミド上に *tetA* および *tetB* が存在する例はなく、希少な検出例となった。

保有するプラスミドを調べたところ、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って 92 種類に分けられた。各菌株が保有するプラスミドタイプは、分離された農場による特性が反映されていた。しかし、異なる系統型であるにも関わらず、類似するプラスミドセットを保有する分離株が見られた。一部のプラスミドセットが他の系統型へ伝播している可能性が考えられ、多様性を示したプラスミドが宿主細菌間において伝達していることが推測された。210 個中 89 個は不和合性プラスミドであり、最多で 9 つの耐性遺伝子を含んでいた。これまで、不和合性プラスミドに関する研究が多く、不和合性プラスミドが耐性遺伝子と関連しているかもしれないと報告されている。一方、210 個中 121 個の非不和合性プラスミドでも、最多で 6 つの耐性遺伝子が見られた。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、畜産農場において 9 剤以上に耐性を示す 45 株では、多様な遺伝的特性を示す

ことがわかった。従って、宿主細菌の拡散は農場毎に限定されているが、耐性遺伝子およびプラスミドの多様性が多剤耐性菌の遺伝的多様性を誘引し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 20 株からプラスミドを分離し、そのプラスミドの塩基配列を決定することで、耐性遺伝子や可動性遺伝因子の関連性を解析した。

20 株中 16 株より分離した総計 91 個のプラスミドを、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ていた。プラスミドを *E. coli* DH10B へ形質転換することで、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。これらの結果より、プラスミド上にはまとまった遺伝子配列が存在しており、多剤耐性クラスターとなって、農場間を水平伝播していることが予測される。

4) ゲンタマイシン耐性遺伝子 *aac(3)-VIa* の解析

E. coli における薬剤耐性分布調査より、GM 耐性を示したにも関わらず、耐性遺伝子が検出できない分離株が見られた。これらの分離株を対象として 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、*E. coli* から *aac(3)-VIa* が検出される例は極めて珍しかった。*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、同様の酵素を産生する *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。従って、*aac(3)-VIa* は本来、肉牛生産牧場に存在する細菌に含まれ、過去の研究報告で *aac(3)-VIa* が全てプラスミド上に見られていたことから、この配列を含む遺伝子クラスターがプラスミドへ取り込まれることで、広域へ拡散したことが推測された。

aac(3)-VIa の周辺配列を解析したところ、下流領域に *intI1* が位置しており、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ー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。もし複数の耐性遺伝子がコードされているトランスポゾンが挿入されたなら、*aac(3)-VIa* を含む周辺配列が多剤耐性遺伝子クラスターとなり、多剤耐性を発現するかもしれない。

以上の結果より, 11 剤耐性株は染色体上に *aac(3)-VIa* をコードし, その周辺配列には *intI1* が位置しており, さらにトランスポーゼースの存在も推測された. 従って, 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.

本博士論文より, 日本の肉牛生産牧場では薬剤耐性菌による汚染が進行しており, 農場毎に遺伝的多様性が存在することが明らかとなった. その中でも, 多剤耐性菌は耐性遺伝子やプラスミドの多様性によって多様な遺伝的特性を示しており, プラスミド上にコードされている耐性遺伝子によって多剤耐性表現型を誘導・発現していた. GM 耐性遺伝子である *aac(3)-VIa* では, インテグロンによる水平伝播することが示唆され, トランスポゾンによってさらなる耐性獲得も推測された. 現時点で肉牛生産牧場では多様な遺伝的特性が存在しており, これらの耐性伝播によって, 今後さらに肉牛生産牧場における遺伝的背景が多様化していくことが示唆された.