



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Epidemiological Studies on CTX-M type Extended-Spectrum - Lactamase-Producing Bacteria in Domestic Animals(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	Montira, YOSSAPOL
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第544号
Issue Date	2019-09-20
Type	博士論文
Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/79043

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本 (国) 籍)	Montira YOSSIPOL (タイ王国)		
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 浅井 鉄 夫		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第544号		
学位授与年月日	令和元年9月20日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Epidemiological Studies on CTX-M type Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Bacteria in Domestic Animals (飼育動物における CTX-M 型 β -ラクタマーゼ産生菌 の疫学研究)		
審査委員	主査	岐阜大学	准教授 高島 康 弘
	副査	帯広畜産大学	教授 鈴木 宏 志
	副査	岩手大学	教授 寺 嶋 淳
	副査	東京農工大学	教授 水 谷 哲 也
	副査	岐阜大学	教授 浅 井 鉄 夫

学位論文の内容の要旨

薬剤耐性菌の制御は、公衆衛生と家畜衛生上の重要な課題である。医療上重要な広域スペクトルセファロsporinに対する耐性を示す基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の分布は世界中で深刻な問題となっている。プラスミド上に存在する ESBL 遺伝子は接合伝播するため、ESBL 産生菌の疫学解析にはプラスミドの不和合性による型別が利用されていたが、プラスミドの全ゲノム解析は有用な手法として広く利用されるようになった。本研究は、飼育動物に分布する薬剤耐性菌を制御することを目的に CTX-M 型 β -ラクタマーゼ産生菌及び耐性因子の解析を実施した。

第1章では、2016年1~6月に3か所の孵化場からコマーシャル農場へ導入した初生ビナの胎便がついた敷き紙66検体を収集し、セファロsporin耐性腸内細菌科細菌をセファレキシン加 Deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose (DHL) 寒天培地を用いて分離した。その結果、CTX-M-25 β -ラクタマーゼ *Klebsiella pneumoniae* (1検体) と *Enterobacter cloacae* (4検体) が分離された。1年後に、23鶏群から収集した糞便サンプルからセフトキシム加 DHL 寒天培地を用いて分離したところ、1検体から CTX-M-25 β -ラクタマーゼ産生大腸菌が分離された。プラスミドの全ゲノム解析を実施したところ、大腸菌の CTX-M-25 プラスミド (166.3kb の IncA/C 型) は、*K. pneumoniae* のプラスミド (166.3kb の IncA/C 型) と塩基配列が類似し、*E. cloacae* のプラスミド (218.2 と 250.9kb) と異なっていた。さらに、大腸菌と *K. pneumoniae* のプラスミド遺伝子を比較すると、IS element の挿入配列に違いが認められた。以上から、CTX-M-25 プラスミドは初生ビナの腸内細菌科細菌によって農場へ侵入し、その遺伝子が農場で維持されることが示された。

2015年に岐阜大学のキャンパスで捕獲された野生動物 (シベリアイタチ) から CTX-M-14

β -ラクタマーゼ産生大腸菌が分離されたことを踏まえて、第2章では、野生動物が保有する薬剤耐性菌の由来を明らかにするため、学内の飼育動物における第三世代セファロスポリン耐性菌の分布を調べ、耐性菌とプラスミドの解析を行った。TGC 耐性菌はセファレキシシン加 DHL 寒天培地とセフトキシム加 DHL 寒天培地を用いて分離し、薬剤感受性試験、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)、レプリコン型、 β -ラクタマーゼ型と次世代シーケンス解析を行った。その結果、CTX-M-14 β -ラクタマーゼと CMY-2 β -ラクタマーゼ産生大腸菌が糞便から分離された。飼育動物とイタチから分離された CTX-M-14 β -ラクタマーゼ産生大腸菌は、飼育施設ごとに7つの PFGE 型6クラスターに分類された。全ての CTX-M-14 プラスミドは IncI1 型であった。1つのプラスミドの大きさが 105.5kb であったが、残りのプラスミドの大きさは 98.9-99.3kb と類似した。リコンビネーション解析の結果、イタチが保有したプラスミドは飼育動物間で進化したプラスミドに由来することが示唆された。以上から、耐性菌の伝播は各飼育施設内の動物間において認められたが、飼育動物のプラスミドは野生動物へ伝播する可能性が示唆された。

本研究では、飼育動物において CTX-M 型 ESBL 産生腸内細菌科細菌が伝播及び分布する過程を明らかにし、飼育動物から環境(野生動物)へと薬剤耐性菌が拡散する可能性を示唆した。薬剤耐性菌が飼育動物へ侵入することを防止するためには導入動物の衛生管理及び薬剤耐性菌が環境への拡散を防止するためには動物の飼育エリアへの野生動物の侵入防止が重要と考えられた。この知見は、動物や環境において薬剤耐性菌を制御するための方針を改善することに役立つことが期待される。

審査結果の要旨

申請者の学位論文は、医療上重要な薬剤耐性菌の一つである CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生菌を対象に細菌学的及び分子疫学的に解析した結果を取りまとめて、薬剤耐性菌の伝播、定着及び拡散について述べられている。

第1章では、3か所の孵化場からコマーシャル農場へ導入した初生ビナの胎便がついた敷き紙を収集し、抗菌剤添加選択培地を用いてセファロスポリン耐性腸内細菌科細菌を検索した。その結果、CTX-M-25 産生 *Klebsiella pneumoniae* (1/66) と *Enterobacter cloacae* (4/66) が分離され、農場汚染の一因として導入鶏が関与することを示した。1年後に、23鶏群から収集した糞便サンプルから抗菌剤添加選択培地を用いて分離したところ、CTX-M-25 産生大腸菌を1検体から分離することができた。そこで、プラスミドを比較したところ、大腸菌の CTX-M-25 プラスミド(166.3kb の IncA/C 型)が *K. pneumoniae* のプラスミド(166.3kb の IncA/C 型)と類似することを示した。全ゲノム解析により、大腸菌と *K. pneumoniae* のプラスミド遺伝子では、ISelement の挿入配列に違いが認められるが、きわめて類似することを明らかにした。以上から、CTX-M 型 ESBL 産生菌による農場汚染の一因として導入鶏が関与すること、その遺伝子が農場で維持される上でプラスミドによる伝播が関与することが示された。

第2章では、大学キャンパスで野生動物(シベリアイタチ)から CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌が分離されたことから、学内で飼育する動物におけるセファロスポリン耐性大腸菌の分布を調査した結果、飼育動物には、CTX-M-14 と CMY-2 産生大腸菌が分布することを明らかにした。また、飼育動物から分離された CTX-M-14 産生大腸菌は、飼育施設ごとに異なる遺伝子型で、イタチ由来株と異なることを示した。しかし、保有プラスミドを全ゲノム解析したことで、CTX-M-14 産生大腸菌が類似した遺伝子構造のプラスミドを保有することが明らかとなった。以上から、CTX-M 型 ESBL 産生菌による施設内伝播と環境への拡散を示唆した。

CTX-M 型 ESBL 産生菌の飼育動物への伝播，飼育施設内での維持及び環境への拡散に関する情報は，CTX-M 型 ESBL 産生菌だけではなく種々の薬剤耐性菌の制御に重要な知見を提供しているものと考えられる。

以上について，審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があるものと認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : The occurrence of CTX-M-25-producing Enterobacteriaceae in day-old broiler chicks in Japan
著 者 名 : Yossapol, M., Sugiyama, M. and Asai, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 79(10) : 1644-1647, 2017

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Selection of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in the feces of healthy dogs after administration of first-generation cephalosporins
著 者 名 : Kimura, A., Yossapol, M., Shibata, A. and Asai, T.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
巻・号・頁・発行年 : 61(1) : 34-41, 2017
- 2) 題 目 : Phenotypic and genotypic analyses of antimicrobial resistant bacteria in livestock in Uganda
著 者 名 : Okubo, T., Yossapol, M., Maruyama, F., Wampande, E. M., Kakooza, S., Ohya, K., Tsuchida, S., Asai, T., Kabasa, J. D. and Ushida, K.
学術雑誌名 : Transboundary and Emerging Diseases
巻・号・頁・発行年 : 66(1) : 317-326, 2018
- 3) 題 目 : Effects of antimicrobial administration on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in broiler flocks
著 者 名 : Suzuki, K., Yossapol, M., Sugiyama, M. and Asai, T.
学術雑誌名 : Japanese Journal of Infectious Diseases
巻・号・頁・発行年 : 72(3) : 179-184, 2019