

氏名(本(国)籍)	重村 洋明(岐阜県)		
推薦教員氏名	岐阜大学 教授 猪島 康雄		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博乙第175号		
学位授与年月日	令和4年3月14日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2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	養鶏産業とヒトにおける広域スペクトラムセファロスポリン耐性サルモネラの汚染実態および伝播に関する研究		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	猪島 康雄
	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	古谷 哲也
	副査	岐阜大学 教授	浅井 鉄夫

学位論文の内容の要旨

世界保健機関は、ヒトの重篤な細菌感染の治療に使用し、ヒト以外からヒトに感染する可能性のある細菌による感染症の治療に使用するような抗菌剤を、医療上の最重要抗菌剤と位置付けており、第3世代セファロスポリン等の広域スペクトラムセファロスポリン(ESC)を、最重要抗菌剤の1つに挙げている。そのため、ESC耐性菌の制御は、公衆衛生上重要な課題となっている。特に、小児のサルモネラ症の治療には、ESCが選択されるため、ESC耐性サルモネラの出現、拡散はサルモネラ症の治療において大きな弊害となる。本研究は、ESC耐性サルモネラの汚染状況およびESC耐性を付与する β -ラクタマーゼ遺伝子(*bla*遺伝子)の拡散に関する因子を明らかにすることを目的とした。

第一章では、市販鶏肉におけるESC耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため、2011年から2015年に福岡県の市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株について、ESC耐性株を検索し、23.6%(25/106株)がESC耐性株であったことを明らかにした。また、養鶏業界におけるセフトオフルの適応外使用とESC耐性株との関係を明らかにするため、各年のサルモネラ分離菌株に占めるESC耐性株の割合の年次推移を過去の調査結果と比較した。これにより、2004年の0%(0/13株)から2011年の45.5%(10/22株)まで増加したが、2012年以降減少し、2015年には10.5%(2/19株)となったことを示した。この割合の減少は、*bla*_{CMY-2}を保持するレプリコンタイプ不明プラスミド保有サルモネラの減少に起因するものであった。また、ESC耐性株の割合の推移は、2012年3月の国内養鶏業界におけるセフトオフルの使用自粛と関連していることを示唆した。

第二章では、日本国内の採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン(LB-EPチェーン)におけるESC耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため、2014年を除く2009年から2016年における国内のLB-EPチェーンで分離されたサルモネラ菌株について、ESC耐性株を検索し、分離株の6.7%(15/224株)がESC耐性株であったことを明らかにした。また、

同一の採卵鶏生産チェーンの育雛場や卵殻に由来する *Salmonella enterica* serovar Ohio が *bla*_{CMY-2} を含む複数の薬剤耐性遺伝子、ISEcp1 および IS26 を保持する IncA/C₂ 型プラスミドを保有していた。さらに、これら IncA/C₂ 型プラスミドの一部または全体（あるいは広範囲）を染色体に組込んだ *S. Ohio* に加え、*bla*_{CTX-M-14} 保持プラスミドの一部を染色体に組込んだ *S. Cerro* が確認された。これらサルモネラにおいて、染色体への組込みによる *bla* 遺伝子には ISEcp1 が、また *bla* 遺伝子を含む複数の薬剤耐性遺伝子の獲得に IS26 が関与していた。このことから、*bla* 遺伝子を含む薬剤耐性遺伝子の拡散には、プラスミドだけでなく、プラスミド上に存在する ISEcp1 や IS26 による転移も関与していることが示唆された。

第三章では、日本国内の食品従事者のサルモネラ保菌率および ESC 耐性サルモネラの保菌状況を明らかにするため、2017 年の飲食店の調理従事者・給仕者、食品加工者等の食品従事者のサルモネラの保菌率を調査し、サルモネラ分離株について、ESC 耐性株を検索した。日本国内の食品従事者の 0.11% (164/145,220 検体) が、サルモネラを保有していることを明らかにした。また、食品従事者から分離された 158 株について調査したところ、4.4% (7/158 株) が ESC 耐性株であったことを明らかにした。また、*bla*_{CTX-M} がプラスミド間およびプラスミドと染色体間を ISEcp1 によって転移し、サルモネラの染色体または保有するプラスミド上に *bla*_{CTX-M} が存在していたことを示した。食品従事者は *bla*_{CTX-M} を保有するサルモネラを他のヒトへ伝播させ、さらに、サルモネラはプラスミドを介して *bla* 遺伝子を他の細菌に水平伝播する可能性を示唆した。サルモネラに感染したヒトが数日から数か月間サルモネラを排出するため、食品従事者は薬剤耐性サルモネラおよび薬剤耐性因子のレゼルボアとなり得ることを示唆した。

本研究で、鶏肉、鶏卵生産に関連する採卵鶏生産環境および食品従事者に ESC 耐性サルモネラの分布状況を明らかにした。また、*bla* 遺伝子の拡散に関わるプラスミドや IS を同定し、それらが *bla* 遺伝子を保有する ESC 耐性サルモネラの出現・拡散に関与していることを示唆した。本研究により得られた知見は、ESC 耐性サルモネラの出現および拡散に関する基礎情報を提供し、今後の食品、環境、ヒトにおける ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査の比較検討や *bla* 遺伝子の拡散機序の解明のための重要な情報となる。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、鶏肉、鶏卵および採卵鶏生産環境、食品従事者から分離したサルモネラ菌株について、広域スペクトラムセファロスポリン (ESC) 耐性株の探索、全ゲノム解析を行い、ESC 耐性サルモネラの汚染実態を明らかにし、ESC 耐性を付与する β-ラクタマーゼ遺伝子 (*bla* 遺伝子) の拡散にプラスミドや挿入配列 (IS) が関与していることを強く示唆した。

第一章では、市販鶏肉における ESC 耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため、2011 年から 2015 年に福岡県の市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株について、ESC 耐性株を探索し、23.6% (25/106 株) が ESC 耐性株であったことを明らかにした。その結果、福岡県の市販鶏肉由来分離株に占める ESC 耐性株の割合が、2012 年以降に減少したことを明らかにし、この現象が国内養鶏業界におけるセフトオフルの使用自粛と関連があることを示唆した。また、ESC 耐性株が保有するプラスミドをゲノム解析して、レプリコンタイプや薬剤耐性遺伝子の分布から、*S. Manhattan* は *bla*_{TEM-52} を有する IncX1 型プラスミドと親和性が高く、残存しやすい可能性を示唆した。

第二章では、日本国内の採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン (LB-EP チェーン) における ESC 耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため、2014 年を除く 2009 年から 2016 年における国内の LB-EP チェーンで分離されたサルモネラ菌株について、ESC 耐性株を探索した。これにより、分離株の 6.7% (15/224 株) が ESC 耐性株であり、国内の一部の

LB-EP チェーンに ESC 耐性サルモネラが存在することを明らかにした。また、*bla* 遺伝子を含む複数の薬剤耐性遺伝子、*ISEcp1* および *IS26* を保持する IncA/C₂ 型プラスミドが同一の採卵鶏生産チェーンの育雛場や卵殻に由来するサルモネラ菌株から確認された。採卵鶏生産チェーンの上流部で ESC 耐性サルモネラに感染した雛が、下流部で ESC 耐性サルモネラを拡散する可能性が示唆された。さらに、プラスミド上の *ISEcp1* または *IS26* が染色体上に *bla* 遺伝子を組込んだサルモネラの出現に参与することを明らかにし、*bla* 遺伝子を染色体に保有したサルモネラが採卵鶏生産チェーンに残存している可能性を示唆した。

第三章では、日本国内の食品従事者のサルモネラ保菌率および ESC 耐性サルモネラの保菌状況を明らかにするため、2017 年の飲食店の調理従事者・給仕者、食品加工者等の食品従事者のサルモネラの保菌率を調査し、サルモネラ分離株について、ESC 耐性株を探索した。その結果、日本国内の食品従事者の 0.11% (164/145,220 検体) がサルモネラを保菌しており、食品従事者から分離されたサルモネラ菌株のうち 4.4% (7/158 株) が ESC 耐性サルモネラであった。また、*bla* 遺伝子がプラスミド間およびプラスミドと染色体間を *ISEcp1* により転移することで、ESC 耐性サルモネラの出現に参与することを示した。食品従事者は、薬剤耐性サルモネラおよび薬剤耐性遺伝子のレゼルボアとなり得ると考察している。

本研究では、近年問題となっている ESC 耐性サルモネラの市販鶏肉、鶏卵生産環境、ヒトにおける汚染実態および *bla* 遺伝子の拡散に関する知見が得られた。本研究により得られた知見は、ESC 耐性サルモネラの出現および拡散に関する基礎情報を提供し、今後の食品、環境、ヒトにおける ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査の比較検討や *bla* 遺伝子の拡散機序の解明に役立つことが期待される。

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と認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry
著 者 名 : Shigemura, H., Matsui, M., Sekizuka, T., Onozuka, D., Noda, T., Yamashita, A., Kuroda, M., Suzuki, S., Kimura, H., Fujimoto, S., Oishi, K., Sera, N., Inoshima, Y. and Murakami, K.
学術雑誌名 : International Journal of Food Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 274 : 45-51, 2018
- 2) 題 目 : Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan
著 者 名 : Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y. and Murakami, K.
学術雑誌名 : Applied and Environmental Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 86 (13) : e00072-20, 2020
- 3) 題 目 : Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*_{CMY-2}-carrying IncA/C₂ plasmid chromosomally integrated by *ISEcp1* or *IS26* in layer breeding chains

in Japan

著者名 : Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y.,
Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka,
T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y. and Murakami, K.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 83 (9) : 1345-1355, 2021

既発表学術論文

1) 題 目 : Cell infectivity in relation to bovine leukemia virus gp51 and p24
in bovine milk exosomes

著者名 : Yamada, T., Shigemura, H., Ishiguro, N. and Inoshima, Y.

学術雑誌名 : PLoS One

巻・号・頁・発行年 : 8 (10) : e77359, 2013

2) 題 目 : Role of Thr218 in the light-driven anion pump halorhodopsin from
Natronomonas pharaonis

著者名 : Shibasaki, K., Shigemura, H., Kikukawa, T., Kamiya, M., Aizawa, T.,
Kawano, K., Kamo, N. and Demura, M.

学術雑誌名 : Biochemistry

巻・号・頁・発行年 : 52 (51) : 9257-9268, 2013

3) 題 目 : Up-regulation of MUC2 mucin expression by serum amyloid A3 protein
in mouse colonic epithelial cells

著者名 : Shigemura, H., Ishiguro, N. and Inoshima, Y.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 76 (7) : 985-991, 2014

4) 題 目 : Reduction in the prevalence of AmpC β -lactamase CMY-2 in *Salmonella*
from chicken meat following cessation of the use of ceftiofur in
Japan

著者名 : Kataoka, Y., Murakami, K., Torii, Y., Kimura, H., Maeda-Mitani, E.,
Shigemura, H., Fujimoto, S. and Murakami, S.

学術雑誌名 : Journal of Global Antimicrobial Resistance

巻・号・頁・発行年 : 10 : 10-11, 2017

5) 題 目 : Isolation of *Salmonella enterica* serovar Agona strains and their
similarities to strains derived from a clone caused a serovar shift
in broilers

著者名 : Yokoyama, E., Torii, Y., Shigemura, H., Ishige, T., Yanagimoto, K.,
Uematsu, K., Ando, N. and Murakami, S.

学術雑誌名 : Journal of Infection and Chemotherapy

巻・号・頁・発行年 : 25 (1) : 71-74, 2019

6) 題 目 : Genetic characteristics of emerging *Salmonella enterica* serovar
Agona strains isolated from humans in the prior period to occurrence

of the serovar shift in broilers

著者名 : Torii, Y., Yokoyama, E., Seki, M., Shigemura, H., Ishige, T., Yanagimoto, K., Uematsu, K., Ando, N., Fujimaki, T. and Murakami, S.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 81 (8) : 1117-1120, 2019

- 7) 題 目 : Contrasting results from two commercial kits testing for the presence of *Clostridium perfringens* enterotoxin in feces from norovirus-infected human patients

著者名 : Ishioka, T., Aihara, Y., Carle, Y., Shigemura, H., Kubomura, A., Motoya, T., Nakamoto, A., Nakamura, A., Fujimoto, S., Hirai, S., Oishi, K., Nagaoka, H., Kimura, H. and Murakami, K.

学術雑誌名 : Clinical Laboratory

巻・号・頁・発行年 : 66 (5) : 929-936, 2020

- 8) 題 目 : Coinfection with human norovirus and *Escherichia coli* O25:H4 harboring two chromosomal *bla*_{CTX-M-14} genes in a foodborne norovirus outbreak in Shizuoka Prefecture, Japan

著者名 : Nagaoka, H., Hirai, S., Morinushi, H., Mizumoto, S., Suzuki, K., Shigemura, H., Takahashi, N., Suzuki, F., Mochizuki, M., Asanuma, M., Maehata, T., Ogawa, A., Ohkoshi, K., Sekizuka, T., Ishioka, T., Suzuki, S., Kimura, H., Kuroda, M., Suzuki, M., Murakami, K. and Kanda, T.

学術雑誌名 : Journal of Food Protection

巻・号・頁・発行年 : 83 (9) : 1584-1591, 2020