

平成 24-26 年度 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業

「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの高度化に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：伴侶動物から分離された薬剤耐性菌のヒトへの影響

研究分担者：田村 豊 酪農学園大学獣医学群獣医学類食品衛生学ユニット

研究協力者：白井 優 酪農学園大学獣医学群獣医学類食品衛生学ユニット

研究要旨

伴侶動物では人体用医薬品が汎用され、伴侶動物において出現した薬剤耐性菌がヒトへ伝播し、ヒトの健康へ影響することが懸念されている。しかし、日本における伴侶動物由来菌のヒトの健康への影響についての実態は明らかとなっていない。そこで今回、ネコ由来大腸菌の感受性調査、イヌ由来 *Clostridium difficile* の保有調査、イヌ由来大腸菌のプラスミド性高度アミノグリコシド耐性遺伝子保有調査、動物病院スタッフの MRSA 保有調査を行った。その結果、ネコはセファロスポリン耐性菌やフルオロキノロン耐性菌などを保有していること、イヌはヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となり得る *C. difficile* を保有しておりヒト由来株と相同性を示したこと、イヌ由来大腸菌の一部にはプラスミド性高度アミノグリコシド耐性を示す *rmtB* 遺伝子保有株が存在したこと、動物病院勤務の獣医師の 12% が MRSA を保菌していたことが明らかとなった。伴侶動物および伴侶動物に関わる獣医師が、ヒトの医療において重視される薬剤耐性菌を保有しており、伴侶動物とヒト間で伝播している危険性が示唆された。

A. 研究目的

近年、イヌやネコ等の伴侶動物はヒトと共通の場で生活し、ヒトとの接触頻度は極めて高い状況にある。一方、獣医学技術の進展や動物福祉への関心の高まりを背景として、伴侶動物に対してヒトと遜色のない獣医療が求められるよ

うになった。その結果、伴侶動物医療では人体用医薬品の使用が一般化しており、その使用に伴う薬剤耐性菌の出現が問題となっている。

しかし、伴侶動物及び伴侶動物に関わるヒトにおける薬剤耐性菌保有の実態については明らかになっていないことが多く、そのリスクを明

らかにするための研究が必要とされている。

そこで本研究では、イヌと比較して調査成績が少ないネコが保有する大腸菌の薬剤感受性調査、ヒト医療において抗菌薬関連下痢症の原因として問題となっている *Clostridium difficile* のイヌにおける保有状況及びヒト臨床由来株との比較、イヌ由来大腸菌のプラスミド性高度アミノグリコシド耐性株の実態調査、動物病院スタッフの MRSA 保菌調査を行った。

B. 研究方法

1. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

(1) 供試菌株

酪農学園大学附属動物病院および江別市内の8ヶ所の動物病院に来院したネコから直腸スワブを採取し、菌分離に供した。スワブはDHL寒天培地に直接塗布し、37℃24時間好気下で培養した。発育した赤色集落を純培養して菌株を得た後、生化学性状試験に基づいて大腸菌(*Escherichia coli*)と同定し、以降の実験に供した。

(2) 薬剤感受性試験

アモキシシリン(ABPC)、セファレキシン(CEX)、セフポドキシム(CPDX)、カナマイシン(KM)、オキシテトラサイクリン(OTC)、クロラムフェニコール(CP)、エンロフロキサシン(ERFX)の7薬剤について CLSI の方法に準拠した寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した

(3) CPDX 耐性株の性状解析

CPDX 耐性であった株を対象にDNAを抽出し、PCR法によるラクタム耐性遺伝子の検索に供した。検出された遺伝子は塩基配列を解析することでその亜型を決定した。また、これらの株については染色体性 AmpC 過剰産生によるラクタム耐性化の有無を調べるため、ampC プロモーター領域の塩基配列を解析し、点突然変異の有無を確認した

(4) 病原性解析

CPDX 耐性株について、O抗原血清型を血清凝集反応(病原大腸菌免疫血清「生研」、デンカ生検株式会社)により決定した。また、PCRにより系統発生分類を決定するとともに病原性遺伝子を検出した。

2. イヌ由来 *Clostridium difficile* 保有調査及びヒト感染症由来株との比較

(1) 供試菌株

動物病院来院犬及びセラピー犬合計204頭の糞便からクロストリジウム選択培地(CCMA-Ex培地)により *C. difficile* を分離した。一方、ヒト由来 *C. difficile* は、東京都の2病院の患者から分離された73株を供試した。

(2) 薬剤感受性試験

CLSI の方法に従い、ヒトの抗菌薬関連下痢症に対して使用されるバンコマイシン(VCM)及びメトロニダゾール(MNZ)、抗菌薬関連下痢症の原因となるクリンダマイシン(CLDM)、セ

フトリアキソン(CTRX)、エリスロマイシン(EM)、シプロフロキサシン(CPFX)に対する感受性を寒天平板希釈法により調べた。加えて、テトラサイクリン(TET)に対する薬剤感受性も寒天平板希釈法で調べた。

(3) トキシン産生性

PCR 法によりトキシン A(*tcdA*)、B(*tcdB*)、及びバイナリートキシン(*cdtA/B*)産生性について決定した。

(5) 疫学解析

リポタイピングを実施し、イヌ由来株とヒト由来株でリポタイプが一致した株についてさらに PFGE 解析を行った。

3 .16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

(1) 供試菌株

動物病院来院犬から分離されたイヌ由来大腸菌 212 株を供試した。

(2) 薬剤感受性試験

高度アミノグリコシド耐性株をスクリーニングするため、アミノグリコシド系 4 薬剤(ゲンタマイシン(GM)、アミカシン(AMK)、ネオマイシン(NEO)、アプラマイシン(APR))に対する薬剤感受性を CLSI の方法に従い寒天平板希釈法により測定した。また、16S-RMTase 陽性株については、微量液体希釈法により他の複数の種類の薬剤に対する感受性も決定した。

(3) 16S-RMTase 遺伝子の検出

rmtA, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA* 遺

伝子の保有について PCR により検索した。

(4) 接合伝達試験

16S-RMTase 陽性株について Broth-mating 法による接合伝達試験を行った。

4 .動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

(1) 供試菌株

3カ所の大学附属動物病院(酪農学園大学、岐阜大学、東京農工大学)の獣医師 50 名、動物看護師 15 名、事務職員 3 名の鼻腔スワブより MRSA を分離した。

(2) 疫学解析

アンケート調査(性別、職業、診療時の衛生管理等 37 項目)を行い、MRSA 分離結果をもとにした統計解析を行った。

C. 研究結果

D. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

(1) 菌分離及び薬剤感受性試験

9ヶ所の動物病院(A~J)から 92 検体のネコ直腸スワブを採集し、うち 70 検体(76.1%)から大腸菌を分離した。分離菌株のうち 19 株(27.1%)が 1 剤以上の抗菌薬耐性を示し、測定した 7 剤すべてに耐性をもつ株も 1 株存在していた。ABPC および OTC に対する耐性株はそれぞれ全体の 21.4%、15.7%とやや高い傾向を示したが、他の薬剤に対する耐性率はいずれも全体の 5~8%程度であった(表 1)。CPDX 耐

性株(6株、8.6%)やERFX耐性株(3株、4.3%)も確認された。また、施設ごとに耐性菌分離状況を比較した場合、検体数の多かった病院(A, B, H)で多種の耐性菌が検出される傾向にあるものの、その分離率には施設ごとの有意差は認められなかった。

(2) CPDX 耐性株の性状解析(表2)

第3世代セファロスポリン系抗菌薬であるCPDXに耐性を示した6株について、保有するラクタマーゼの検索を行なった(表2)。被検株のうち、セファロスポリン耐性に関わる因子としてESBLのCTX-M-14およびampC型ラクタマーゼのCMY-2保有株がそれぞれ1株ずつ(CFE5およびCFE3)確認された。また、うち2株(CFE7およびCFE9)については、ESBLやampC型ラクタマーゼは保有していなかったものの、染色体上のampCプロモーター領域の-32部分に変異(T to A)が生じていたことから、染色体性ampC過剰産生株であると考えられた。残り2株(CFE1およびCFE11)については、セファロスポリン耐性に関わる因子を特定することができなかった。

(3) 菌株の病原性試験(表2)

0抗原型別の結果、上記6株はいずれも使用した抗血清と凝集反応を示さなかった。病原性遺伝子に基づく系統発生分類では、系統Aが1株、系統B1が1株、系統B2が3株、系統Dが1株であった(表2)。病原性遺伝子として、全株がアドヘジンをコードする*fimA*, *fimH*遺伝子を保有していたのに加え、系統B2

の3株(CFE7、CFE9、CFE11)は毒素をコードする*hly*, *cnf*遺伝子を保有していた。

2. イヌ由来 *Clostridium difficile* 保有調査及びヒト感染症由来株との比較

(1) 菌分離とトキシン産生性

イヌ糞便204検体中62検体(30%)から68株が分離された。その内32株(47%)が*tcdA/tcdB*陽性で、36株が*tcdA/tcdB*陰性だった。CDT(*cdtA/cdtB*)を保有している株はなかった。

(2) 薬剤感受性

イヌ由来株とヒト臨床由来株の薬剤感受性試験の結果を表3に示す。全てのイヌ由来株とヒト臨床由来株はVCM、MNZに感受性であった。TETに対しては、イヌ由来株及びヒト臨床由来株の両方で耐性割合が低かった。イヌ由来株の薬剤耐性割合はCTRX及びEMで、ヒト臨床由来株の薬剤耐性割合よりも低い傾向を示した。

(3) 疫学解析

リボタイピングの結果、イヌ由来株は29の型に分類された(図1)。最も主要なリボタイプ(16株)は*tcdA/tcdB*陽性であった。4番目に主要なリボタイプ(4株)はヒト臨床由来株(3株)と同一のリボタイプを示した。これら同一のリボタイプの株についてPFGE解析を行ったところ、イヌ由来株のうち1株はヒト臨床由来株3株と同一のPFGE型を示した(図2)。

3 .16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

(1) 薬剤感受性試験

イヌ由来大腸菌 202 株の 4 種類のアミノグリコシド系薬剤に対する感受性試験を行ったところ、GM 及び AMK に耐性を示す株が 29 株、4 薬剤の全てに耐性を示す株が 6 株であった。

(2) 16S-RMTase 遺伝子保有状況

以上の 35 株のうち、2 株から *rmtB* 遺伝子が PCR により同定された(表 4)。 *rmtB* の内部配列についてシーケンス解析を行ったところ、ヒトから分離されている *rmtB* 遺伝子と同一の遺伝子配列であった。この 2 株は、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し(表 4)、 *bla_{TEM-1}* も保有していた。

(3) 16S-RMTase 保有株の性状

rmtB 遺伝子陽性株について、伝達試験を行ったところ、プラスミドの伝達が認められた(伝達頻度は 1.7×10^{-5} 及び 2.4×10^{-3})。トランスコンジュガントには GM、AMK 耐性が伝達した。

4 . 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

(1) MRSA の分離

MRSA は獣医師 50 名中 6 名(12.0%)から分離された。内訳は、酪農学園大学附属動物

病院 5.6%(1/18)、東京農工大学附属動物病院 17.6%(3/17)、岐阜大学附属動物病院 13.3%(2/15)だった。動物看護師及び事務職員からは分離されなかった

(2) 疫学解析

MRSA は獣医師からのみ分離されたため、獣医師 50 名の MRSA 保菌のリスク因子の解析を行った。MRSA 保菌者の 2 週間の診療頭数(平均 83.3 頭)は、陰性者(平均 40.3 頭)よりも有意に多かった($p=0.049$)。

E. 考察

1. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

CPDX 耐性や ERFX 耐性といった、抗菌活性の強い薬剤に対する耐性をもった大腸菌株が低率ながらも分離されたことから、ネコがこうした耐性菌を腸管細菌叢の一部として保菌していたことが確認された。

また、ABPC や OTC など古典的な抗菌薬に対する耐性株が比較的多かったことから、こうした抗菌薬に対する耐性菌がネコにおいても広く拡散していることが示された。一方で、全ての抗菌薬の耐性割合がイヌ分離菌株の約半分であった。このことは、イヌとネコにおける薬剤の使用状況または、ネコ分離菌株の特徴であることが考えられた。

さらに、それぞれの動物病院の間では耐性菌分離率に有意差が認められなかったことから、本研究におけるネコの耐性菌保菌率は特定の動

物病院の治療方針に影響されるものではなく、伴侶動物として飼われているネコ全体に当てはまるものだと考えられた。

ヒトの臨床現場で広がっているセファロスポリン耐性大腸菌の多くはCTX-M型ラクタマーゼを保有していることが報告されている。一方、今回の研究では分離されたCPDX耐性株が少なく(6株、8.6%)、ESBLであるCTX-M-14を保有していたのも1株だけであったことから、ネコにおいてESBL産生大腸菌は拡散していないものと考えられた。

また、被検株のうち2株ではセファロスポリン耐性に関わる因子を特定できなかったことから、検索の対象としなかった耐性化因子(minor ESBLなど)の存在があったのではないかと考えられた。

CPDX耐性株はいずれも血清型を特定できず、高病原性の大腸菌は存在しなかった。しかしながら系統発生分類の結果、腸管外病原性株が多いとされる系統B2や腸管内病原性株が多いとされる系統Dの株が検出された。また、系統B2の株は毒素遺伝子(*hly* および *cnf*)も保有していたことから、ネコが保菌しているCPDX耐性大腸菌がヒトに対してある程度の病原性を示すことが示唆された。

2. イヌ由来 *Clostridium difficile* 保有調査及びヒト感染症由来株との比較

日本で飼育されるイヌが、比較的高い割合でトキシンA及びBを産生する *C. difficile* を保

有していた。分離された菌株について、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる抗菌薬に耐性割合はヒト臨床由来株に比べて低い傾向であるものの、CLDM、CTRX、CPFYXに対して50%以上の株が耐性を示した。ブタ由来 *C. difficile* はTETに対して高い耐性割合を示すが、ブタでのTETの高い耐性割合は抗菌薬の使用実態を反映していると考えられている。以上のことから、イヌにおける3薬剤の高い耐性割合は、イヌへの抗菌薬の使用が一因と考えられる。

最も主要なリボタイプに分類された16株は全てトキシンAおよびBを保有していた。イヌにおいて広く拡散している株が、ヒトに伝播した場合にヒトに対して毒性を示す毒素を保有していたことから、イヌからヒトに伝播した際のリスクは高い。

また、イヌとヒトでリボタイプおよびPFGE型が同一の株が同定された。今回のイヌ由来株とヒト由来株の疫学的な関連は不明であるものの、イヌとヒトが近縁な *C. difficile* を保有し、イヌとヒトの間で伝播し得ることが明らかとなった。今後、疫学的な調査を含めたイヌ由来 *C. difficile* の調査がさらに必要であることが示された。

3 .16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

日本のイヌから分離された大腸菌において低率ではあるが、プラスミド性16S-RMTase(*rmtB*)が同定された。16S-RMTase保有株は他の耐性因

子と共存することが多く、問題となりやすい。今回分離された2株についても、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し、少なくとも bla_{TEM-1} 遺伝子を保有していた。また、これら耐性遺伝子は接合伝達した。以上のことから、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及びその耐性遺伝子の拡散には注意が必要であることが示唆された。

RGU-60 株について、NEO 及び APR に対する薬剤感受性は、トランスコンジュガントに伝達しなかった。RGU-60 株の NEO、APR 耐性は *rmtB* 遺伝子以外の因子が関係している可能性がある。また、高度アミノグリコシド耐性を示し、アミノ配糖体修飾酵素の作用による耐性では説明がつかない株も存在した。これらの株については新たな 16S-RMTase の存在の可能性も含めてさらなる研究が必要である。

4. 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

日本の伴侶動物に携わる獣医師の MRSA 保菌率は一般健康人および医療関係者に比べて高く、さらに海外の獣医師の保菌率(オーストラリア, 4.9%; デンマーク, 3%)に比べて、高い保菌率(12.0%)を示した。以上のことから、日本の伴侶動物獣医療に携わる獣医師のさらなる衛生管理に対する取り組み等が必要であると考えられた。

疫学解析の結果から、MRSA 保菌者は陰性者に比べ、診療頭数が有意に多かった。診療頭数が多いほど、MRSA を保菌する患畜と接触する確率が高まり、診療動物から獣医師へ MRSA が伝播し

たと考えられた。

E. 結論

本研究において、伴侶動物及び伴侶動物に関わるヒトの薬剤耐性菌の実態について、調査を行い、以下の成績が得られた。

1. 伴侶動物として飼育されているネコが、その腸管細菌叢の一部として、セファロスポリン耐性菌やフルオロキノロン耐性菌などの強力な耐性菌を保有しており、ヒトに対しての病原性が疑われる株も存在したことから、その拡散状況については今後も注視する必要がある。

2. 伴侶動物として飼育されているイヌからヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる可能性のある *C. difficile* が分離され、イヌとヒトの間での伝播の可能性が示された。イヌにおける *C. difficile* のヒトへの伝播リスク、制御法についてのさらなる研究が必要であることが示唆された。

3. イヌ由来大腸菌から低率ではあるが、プラスミド性 *rmtB* 遺伝子保有株が分離された。今後、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及びその耐性遺伝子の拡散について注意が必要であることが示唆された。

4. 日本の動物病院で勤務する獣医師の 12% で MRSA の保菌が認められたことから、獣医師の衛生管理に対する取り組み等が必要であることが示唆された。

伴侶動物とヒトの間での耐性菌及び耐性遺伝子の伝播の可能性は高い。今後、伴侶動物にお

いて出現・拡散する耐性菌及び耐性遺伝子のヒトへの伝播リスクについて、さらに明らかにしていく必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. Baba K, Ishihara K, Ozawa M, Usui M, Hiki M, Tamura Y, Asai T.: Prevalence and Mechanism of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Diseased Cattle, Swine and Chickens in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74, 561-565, 2012.
2. Sasaki Y, Usui M, Murakami M, Haruna M, Kojima A, Asai T, Yamada Y.: Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 isolates from beef cattle. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 117-121, 2012.
3. Usui M, Hiki M, Murakami K, Ozawa M, Nagai H, Asai T.: Evaluation of transferability of R-plasmid in bacteriocin-producing donors to bacteriocin-resistant recipients. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 252-255, 2012.
4. Asai T, Hiki M, Baba K, Usui M, Ishihara K, Tamura Y.: Presence of *Staphylococcus aureus* ST398 and ST9 in swine in Japan *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 551-552, 2012.
5. Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, Tamura Y, Fujii N.: Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strains isolated in Japan. *Chemotherapy*, 58, 52-59, 2012.
6. Kurosawa A, Imamura T, Tanaka K, Tamamura Y, Uchida I, Kobayashi A, Hata E, Kanno T, Akiba M, Yukawa S, Tamura Y.: Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. *Vet. Microbiol.* 160, 264-268, 2012.
7. Ishihara K, Takahashi R, Andoh M, Makita K, Kamiji S, Ueno H, Muramatsu Y, Tamura Y.: Effects of climatic elements on *Campylobacter*-contaminate chicken products in Japan. *Epidemiol. Infect.*, 140:991-996. 2012.
8. Asai T, Usui M, Hiki M, Kawanishi M, Nagai H, Sasaki Y.: *Clostridium difficile* Isolated from the Fecal

- Contents of Swine in Japan. *J Vet Med Sci.* 75: 539-541. 2013.
9. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. equal distribution H. M and U. M.: Diversity of plasmid replicons encoding the blaCMY-2 gene in broad spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10:243-249. 2013.
 10. Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T.: Effect of antimicrobial exposure on AcrAB expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis. *Front. Microbiol.* 4:53. 2013.
 11. Sato T, Okubo T, Usui M, Higuchi H, Tamura Y.: Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. *J Vet Med Sci.* 75: 1063-1065. 2013.
 12. Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The Role of Flies in Spreading the Extended-Spectrum Beta-lactamase Gene from Cattle. *Microbial Drug Resistance.* 19: 415-420. 2013
 13. Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y. : Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance determining region mutations. *Front. Microbiol.* 4:125. 2013.
 14. Ishihara K, Nakajima K, Kishimoto S, Atarashi F, Muramatsu Y, Hotta A, Ishii S, Takeda Y, Kikuchi M, Tamura Y.: Distribution of antimicrobial resistant lactic acid bacteria in natural cheese in Japan. *Microbiol. Immunol.* 57:684-691. 2013.
 15. Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y.: Genomic analysis of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emer.Infect.Dis.*, 19:823-824. 2013.
 16. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying blaCMY-2 from fecal samples of dogs in Japan. *J Med Microbiol.* 63:263-270. 2014.

17. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y.: Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand). *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 685-692. 2014
18. Usui M, Sakemi Y, Uchida I, Tamura Y. Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.*, 170: 438-441, 2014.
19. Usui M, Uchida I, Tamura Y.: Selection of macrolide-resistant *Campylobacter* in pigs treated with macrolides. *Vet. Rec.*, 175: 430, 2014.
20. Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y.: Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.*, 5: 513, 2014.
21. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying *bla_{CMY-2}* from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 63: 263-270, 2014.
22. Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y.: Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *J. Infect. Chemother.*, 20: 243-249. 2014.
23. Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyauchi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Isolation of *Escherichia coli* strains with AcrAB–TolC efflux pump-associated intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 937-945., 2014
24. Sato T, Okubo T, Usui M, Yokota SI, Izumiyama S, Tamura Y.: Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from

- dairy cattle in Japan. *PLOS One.*, 9: e96101, 2014.
25. Okubo T, Tosaka Y, Sato T, Usui M, Nakajima C, Suzuki Y, Imura S, Tamura Y.: Bacterial diversity in sea ice from Southern ocean and the Sea of Okhotsk. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2: 266-272, 2014.
26. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Epidemiological analysis of Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs for companion animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1627-1629, 2014.
27. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 58: 149-154, 2014.
28. Makita K, Inoshita K, Kayano T, Uenoyama K, Hagiwara K, Asakawa M, Ogawa K, Kawamura S, Noda J, Sera K, Sasaki H, Nakatani N, Higuchi H, Ishikawa N, Iwano H, Tamura Y.: Temporal changes in environmental health risks and socio-psychological status in areas affected by the 2011 tsunami in Ishinomaki, Japan. *Environment and Pollution*, 3:1-20, 2014.
29. Tsukamoto N, Ohkoshi Y, Okubo T, Sato T, Kuwahara O, Fujii N, Tamura Y, Yokota S.: High prevalence of cross-resistance to aminoglycosides in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Chemotherapy* 59:379-384, 2014.
30. Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh Tran Thi, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y.: Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1001-1008, 2014.
31. Muramatsu Y, Usaki N, Thongchai C, Kramontong I, Kriegsak P, Tamura Y. Seroepidemiological survey in Thailand of *Coxiella burnetii* infection in cattle and chicken and presence in ticks attached to dairy cattle. *SE Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.*, 45: 1167-1172, 2014
32. Harada K, Usui M, Asai T.: Application of enrofloxacin and orbifloxacin disks approved in Japan for susceptibility testing of representative veterinary

respiratory pathogens. *J. Vet. Med. Sci.*,
76: 1427-1430., 2014.

33. Hiki M, Usui M, Akiyama T,
Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S,
Sekiguchi H, Kojima A, Asai T.:
Phylogenetic Grouping,
Epidemiological Typing, Analysis of
Virulence Genes, and Antimicrobial
Susceptibility of *Escherichia coli*
Isolated from Healthy Broilers in
Japan. *Ir. Vet. J.*, 64: 14., 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。