

氏 名 Yus Amira binti Yusaimi

学位の種類 博士（環境制御学）

学位記番号 博 甲第 10135 号

学位授与年月 令和 3 年 9 月 24 日

学位授与の要件 学位規則 第 4 条第 1 項該当（昭和 2 8 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）

審査組織 グローバル教育院

学位論文題目 Identification and Molecular Characterization of Multidrug-resistant
Escherichia coli Isolated from Aquatic Environment

（水環境から単離された多剤耐性大腸菌（*Escherichia coli*）の同定と
分子生物学特性解析）

	（職名）	（学位）	（氏名）
主査	筑波大学教授（グローバル教育院）	博士（工学）	辻 智也
副査	筑波大学准教授（グローバル教育院）	博士（工学）	原 啓文
副査	筑波大学教授	博士（農学）	鈴木 石根
副査	筑波大学教授	博士（理学）	内海 真生
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	中山 剛

論文の要旨

抗菌薬耐性は、細菌が抗生物質などにさらされた後、耐性を有することで生じる。多剤耐性(MDR)の中でもこの抗菌薬耐性菌の発生に対して公衆衛生上の懸念が高まっている。人間や家畜動物の治療や農業など、様々な用途での抗生物質の過剰使用が耐性菌の発生や抗生物質耐性遺伝子(ARGs)の増加を助長している。特に河川では、生活排水、病院からの排水、農業用水や農地からの表面流出など、様々な発生源からの残留抗生物質による汚染が発生しやすい。抗生物質使用と耐性菌の発生および持続の間には関係があるが、環境が耐性菌やその耐性遺伝子の拡散に寄与していることはあまり認識されていない。河川は、細菌を増殖させ ARGs を高頻度で伝播させる可能性があるが、異なる水温や流域特性を持つ河川で ARGs の分布を研究した例は少ない。ここで著者は、異なる気候区にあり水温や土地利用形態の異なるマレーシアおよび日本の河川を対象に、自然環境における ARGs 拡散要因の一つとして認識される大腸菌を対象に、多剤耐性株の割合や ARGs の分子生物学的特徴について研究を実施した。

第 1 章で著者は、抗生物質使用の現状、抗生物質の作用に抵抗する細菌のメカニズム、多剤耐性菌発生の問題点等を包括的に概説し、本研究の意義と目的を述べている。大腸菌選定の理由として、上述の理由の他、耐性メカニズムの多様性などから臨床的に最も重要な微生物であること、を指摘している。また、多剤耐性菌にも有効で他の抗生物質との交差耐性を形成しにくい殺菌性の抗生物質ホスホマイシンは、近年使用量が増加しつつあり、その耐性菌に関する環境中の調査研究の必要性にも言及している。

第 2 章で著者は、熱帯のマレーシア・クアラルンプール市内を流れる Gombak 川、温帯の茨城県北浦に流入する農業畜産地域を流れる巴川を対象に、平板培養法による大腸菌株検出と、抗生物質感受性試験とディスク

拡散試験による 15 種類の抗生物質に対する耐性大腸菌の割合とその特性について評価している。その結果、巴川では、春季に 40 株、夏季に 72 株の大腸菌を検出したが、これは Gombak 川での検出数(129 株)よりも少なかった。ここで 3 種類以上の抗生物質に耐性を示す MDR の割合は、Gombak 川で 90.7%、巴川で春季 22.5%、夏季 37.5%であった。抗生物質感受性試験の結果、Gombak 川単離株の方が巴川単離株と比較して 15 種類の抗生物質に対する MDR 特性が高かった。著者は、熱帯河川で耐性大腸菌が多く検出され MDR の頻度が高いのは、水温と廃水処理の現状から大腸菌密度が高いことが理由の一つと考えられ、一方で、温帯河川で耐性大腸菌の検出数や MDR の頻度が低いのは、他の潜在的な病原体の存在や人や動物に使用されている多くの抗生物質に対する個別耐性の可能性が考えられると考察している。

第 3 章で著者は、第 2 章で単離した MDR 大腸菌株を用い、寒天希釈法によるホスホマイシンの最小発育阻止濃度の測定、ディスク増強法と解釈的感受性試験によるホスホマイシン不活化酵素(FosA)活性の評価を行っている。その結果、Gombak 川単離 MDR 大腸菌株(GR2とGR3)がホスホマイシン耐性を示したが、他の Gombak 川単離株は感受性を示す株はあるが耐性は陰性であること、巴川単離株は感受性を有意に示す株も無いこと、GR2とGR3の耐性は FosA を介したものであることを確認した。試験した MDR 大腸菌の中で 2 株のみがホスホマイシン耐性であったことは、ホスホマイシンの大腸菌に対する高い感受性を示すものである。また、Gombak 川単離株のみ耐性を示したことは、熱帯水系で細菌がホスホマイシン耐性を獲得している証拠であり、憂慮すべき状況にあると考察している。

第 4 章で著者は、ホスホマイシン耐性の 2 株と感受性を示した 1 株のゲノム配列情報を次世代シーケンスにより取得した後、AMRFinder によるゲノム配列解析を行い ARGs の同定と抗生物質耐性決定因子の検証を行っている。その結果、GR2とGR3に複数の ARG が存在すること、FosA も確かに存在していることを確認した。以上の結果から著者は、熱帯の大腸菌群に複数の抗生物質耐性決定因子が存在し、河川が細菌群集間で拡散する ARGs の貯水池として機能する可能性があるかと考察している。

第 5 章で著者は、上記の研究成果を総合的に考察し、将来展望を述べている。すなわち、熱帯河川の安定した高水温環境は、細菌が増殖する長期的な機会を提供し、流入排水特性が MDR 大腸菌の分布に影響を及ぼす可能性を指摘している。また、熱帯での MDR 大腸菌の多数の検出は、東南アジア地域における病原性大腸菌による細菌感染症治療で標準的な抗生物質治療が有効でなくなることを警告するもので、抗生物質の適切な管理と処理が薬剤耐性微生物の問題に取り組むための可能な制御戦略であり、抗生物質耐性の環境拡散やヒトへの伝播抑制の予防策の早急な立案が求められることを指摘している。

審査の要旨

【批評】

本論文は、申請者が、環境中の多剤耐性を持つ細菌群集の特性について、細菌の増殖に重要な温度環境や流域特性の違い、ならびにコロニー計数など表現型のみ解析から一步進んでゲノム情報を活用した分子生物学的特性解析を ARGs 拡散要因の一つとして認識されている大腸菌(*E. coli*)を対象に実施したものである。水温の違いや流域特性が MDR 大腸菌数に影響を与えていること、表現型の解析とゲノム情報による分子遺伝学的解析を組み合わせることにより、潜在する抗生物質耐性遺伝子や決定因子の網羅的解析や予想が可能となること、などの新しい多くの知見を提供する極めて重要な研究である。また、本研究成果は、抗生物質の管理や使用および処理方法の適正化について極めて重要な知見を提供するものでもあり、微生物学、微生物生態学、環境衛生学などを融合させた学際的成果でもあり、学術的にも高く評価できる。

【最終試験の結果】

令和 3 年 6 月 17 日、専門委員会において、著者に論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、専門委員会委員全員が合格と判定した。

【結論】

上記の学位論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(環境制御学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。