

| | | | |
|---------|-------------------------------|--------|------|
| 氏名(本籍) | こ ばし ゆ り (東京都) | | |
| 学位の種類 | 博 士 (農 学) | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 4340 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 19 年 3 月 23 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審査研究科 | 生命環境科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | 抗生物質耐性遺伝子の農業環境における分布と拡散に関する研究 | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 内山裕夫 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 工学博士 | 松村正利 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 宮崎均 |
| 副査 | 筑波大学助教授 | 博士(学術) | 中島敏明 |

論文の内容の要旨

抗生物質は、様々な細菌性感染症に有効な薬剤としてヒト用医薬品、動物用医薬品、水産医薬品、家畜飼料添加物として汎用されている。しかし近年、医療現場のみならず畜産や水産の現場でも抗生物質耐性細菌が出現し、問題となっている。抗生物質耐性菌の研究は、医療分野では進んでいるが、農業環境での研究はあまりにも少ない。本研究では、家畜由来の抗生物質耐性菌や耐性遺伝子が家畜排泄物を介して、環境中にもどのように分布し、どのようなメカニズムで遺伝子が拡散しているのかを解明することを目的とした。

まず、バックグラウンド調査のために、様々な環境の 14 箇所、30 サンプルの家畜ふん、堆肥、土壌を採取し、作用機構の異なる 6 種類の抗生物質を用いて、抗生物質耐性細菌の分布実態を調査した。その結果、抗生物質添加の飼料によって家畜ふん中の抗生物質耐性細菌数が増加し、家畜ふん由来堆肥とそれを施用した土壌中の抗生物質耐性細菌数が増加することが示された。

次いで、豚ふん、豚ふん堆肥、堆肥無施用土壌および森林土壌から分離した各抗生物質耐性菌 240 株の多剤耐性を検討した結果、豚ふんでは分離菌株の多くが高度多剤耐性菌であること、また、用いた 6 種類の抗生物質のうち森林土壌以外から分離したテトラサイクリン耐性菌株の全てが少なくとも 6 剤耐性であることが明らかになった。このことから、家畜飼料への抗生物質添加が多剤耐性細菌の出現を加速しているものと推定された。

さらに、高度多剤耐性を示したテトラサイクリン耐性菌の分類学的多様性を 16S rRNA 遺伝子系統解析により検討した。分離 350 株のテトラサイクリン耐性細菌のうち家畜ふん分離株は 11 細菌属に、家畜ふん堆肥分離株は 9 細菌属、土壌分離株は 15 細菌属に分類された。特に、自然環境土壌中のテトラサイクリン耐性細菌には、極めて高い多様性が認められた。

また、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet* 遺伝子) の多様性についても検討した。従来の *tet* 遺伝子に関する研究は実験微生物や病原菌に限定されており、一般細菌は対象外であった。しかし上記の結果から、テトラサイクリン耐性細菌が多様性に富んでいることが判明したため、予想外に多くの細菌が *tet* 遺伝子の宿主となり得る可能性が予測された。この為、家畜ふん、家畜ふん堆肥、農業土壌および森林土壌という広い環境中のテトラサイクリン耐性細菌を対象として *tet* 遺伝子の多様性を調査した。その結果、新規 *tet* 遺伝子

保持菌として13細菌属が判明し、さらにこれまで *tet* 遺伝子保持菌として報告されていたもののうち、新たな *tet* 遺伝子タイプの保持菌が多いことも明らかとなった。また、*tet* (B)、*tet* (M) および *tet* (W) は様々な分離源に跨って検出されており、ホスト菌種が多いことも特徴であり、耐性遺伝子拡散の一旦を担っている可能性が高いことが示唆された。また、*tet* (A)、*tet* (C)、*tet* (H) は家畜ふん、*tet* (G)、*otr* (A) は土壤に偏在していたことから、これらの遺伝子の増減が遺伝子拡散の指標になる可能性が高いことが推察された。

以上の結果から抗生物質耐性菌対策の必要性が浮き彫りになった為、抗生物質の代替効果が期待され注目されているプロバイオティクス飼料である発酵リキッドフィーディング飼料に着目し、本飼料の給与による耐性菌割合への影響を検討した。その結果、母豚に投与されていたテトラサイクリン系抗生物質に対し、子豚分離大腸菌は100%の耐性を持っていたが、抗生物質使用を中止し、かつ発酵リキッドフィーディングを行うことによって、耐性割合が22%～58%程度にまで減少することが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

既に、抗生物質の多用による抗生物質耐性菌の出現は医療環境において深刻な問題となっているが、近年、食の安全性を求める声が社会的に高まっている一方、農業環境における抗生物質の多用と耐性菌出現の関連性を解明する研究報告は極めて乏しい。本論文の著者は、このような社会的現状を的確に捉え、それに対する明快な回答を得る為に、家畜由来の抗生物質耐性菌や耐性遺伝子が、家畜排泄物を介して環境中にどのように分布し、どのようなメカニズムで遺伝子が拡散しているのか、検討した。その結果、以下の重要な科学的知見を得ている。①抗生物質添加飼料の使用によって家畜ふん中の抗生物質耐性細菌数が増加し、家畜ふん由来堆肥とそれを施用した土壤中の抗生物質耐性細菌数も増加する。②家畜飼料への抗生物質添加が多剤耐性細菌の出現を加速している。③テトラサイクリン耐性細菌には、極めて高い多様性が認められた。④テトラサイクリン耐性遺伝子の多様性と分布から耐性遺伝子の環境中での拡散の可能性が推測できた。

以上のように、5年間にわたる地道な努力によって得られた膨大なデータから、家畜に使用される抗生物質の量と種類が耐性菌の増減に関係する多くの知見が明らかにされた。また、抗生物質耐性菌や耐性遺伝子のリスク評価には、実験室内での詳細な遺伝子解析と並行して、長期間、広範囲にわたる耐性菌出現状況と抗生物質使用状況に関する統計情報が不可欠であることも明確に示され、今後の同様な研究に対する指針を示し得た。

以上の結果は、農業環境における抗生物質耐性菌の挙動解明に貢献をすると共に、畜産現場における抗生物質の多用に対して重要な警鐘を鳴らし、農業環境の保全の分野からも高く評価出来る。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。