

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 岩 根 泰 蔵

本論文は、「都市河川におけるβ-ラクタム剤耐性大腸菌の分布とその耐性遺伝子の伝達」と題し、多摩川流域をフィールドとして野生の大腸菌株における抗生物質耐性について、特にプラスミド伝達性の耐性遺伝子に着目して、水環境中で耐性菌の分布や挙動を解明し、また細菌種を越えた耐性遺伝子の伝達がどの程度起きうるのかを定量的に評価し、それによる水環境を媒介してのヒトへの健康リスクはどの程度なのか定量的に評価した研究である。

本論文は7章より成る。第1章は「序論」である。研究の背景を述べた後、本研究の目的と論文の構成を示している。

第2章「文献レビュー」では、腸内細菌科の細菌と大腸菌や、薬剤耐性について特にβ-ラクタム剤耐性について詳述し、既往の薬剤耐性菌分布調査の結果をまとめて総覧を作成している。また、プラスミド伝達やその伝達率モデルに関する情報をまとめている。

第3章は「耐性菌数および耐性菌割合に関する分布調査」の結果をまとめたものである。羽村堰より下流の多摩川中流域では、下水処理場放流水の流入に伴って全大腸菌数が大きく増加した。しかし、ABPC耐性大腸菌割合に有意な増加は認められなかった。流域の下水処理場においても同程度の耐性菌割合が観察された。上流域の単独処理浄化槽を対象とした調査では、塩素接触による処理効率と共に、ABPC耐性大腸菌割合にも世帯間の大きなばらつきが観察された。さらに全国6地域の下水処理場を対象とした調査では、流入下水中の全大腸菌数に地域ごとの有意な差が認められたものの、ABPC耐性大腸菌割合には有意な差が認められなかった。また、処理過程を通じた耐性菌割合の有意な変動は認められなかった。以上より、多摩川流域のABPC耐性大腸菌割合は、全国的に見て特異なものではないと結論している。また、流入下水中の第3世代セフェム剤セフトキシム (CTX) 耐性大腸菌割合はABPC耐性菌割合に比べて少なかった。

第4章は「個々の耐性株に対する各種検査」の結果をまとめたものである。ABPC耐性大腸菌246株について、微量液体希釈法の薬剤感受性試験・アシドメトリー法による酵素β-ラクタマーゼの検出・PCR増幅法によるTEM型遺伝子保有検査を適用した結果、222株(90.2%)がTEM型原型遺伝子を持っていた。TEM型遺伝子保有割合に地域ごとの有意差は認められなかった。次に、TEM型遺伝子を保有すると判定された198株のうち185株(93.4%)について伝達性が確認された。以上より、水環境単離のABPC耐性大腸菌株の $90.2\% \times 93.4\% = 84.2\%$ が伝達性TEM型耐性遺伝子を持つと算出された。TEM型遺伝子を保有すると判定された222株のABPC耐性大腸菌および多摩川河川水単離ABPC非耐性大腸菌30株の計252株について、β-ラクタム剤以外の抗生物質に対する薬剤感受性試験を適用した結果、TEM型遺伝子をコードする遺伝因子とミノサイクリン(MINO)耐性と関連づけられた。さらに、同じ252株について細菌種同定用プレートを用いた炭素基質利用能の試験を行った結果、TEM型遺伝子は宿主となる大腸菌の炭素基質利用能を選ばないことが明らかになった。CTX耐性大腸菌24株について、薬剤感受性試験と酵素β-ラクタマーゼの分類を適用した結果、これらの株の耐性機序は染色体性β-ラクタマーゼAmpC型の過剰産生によるものであると判定された。なお、多摩川河川水および多摩川流域下水処理場から単離したABPC耐性大腸菌60株に対して、O血清型試験を適用した結果、どの単離株にも病原性の疑いが認められなかった。

第5章は「耐性遺伝子の伝達率測定実験」の結果をまとめたものである。耐性伝達率測定実

験では、多摩川河川水より単離した伝達性 ABPC 耐性 TEM 型遺伝子を持つ大腸菌 8 株を供与菌に用いて、様々な条件下での伝達率を測定した。特に本研究では、動的な伝達率モデルを用いて、接合伝達によって生じる伝達株数が菌体濃度および時間に比例するものとして、伝達率 α (単位は $1/(\text{CFU}/\text{mL})/\text{day}$) を算出した。温度条件は $37^{\circ}\text{C} \cdot 26^{\circ}\text{C} \cdot 15^{\circ}\text{C} \cdot 4^{\circ}\text{C}$ の 4 条件を設定した。菌体を混合させた液体には LB 培地あるいは多摩川河川水を用い、4 日間無振とう状態で実験を行った。大腸菌株 *E.coli* ATCC25841 を受容菌とした実験では、温度が高いほど伝達率が高く、河川水中では LB 培地中に比べて伝達率が低かった。 $37^{\circ}\text{C} \cdot \text{LB}$ 培地条件で観察された伝達率の最高値は $\log \alpha = -8.8$ であった。また、河川環境を模擬した $26^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C} \cdot$ 河川水条件においても河川単離耐性菌の耐性遺伝子が伝達することが確かめられた。また、河川水単離 8 株の間には伝達率に有意な差が認められ、伝達率の高い 4 株と低い 4 株に分けることができた。この差の原因を明らかにするために、河川水単離株の各耐性プラスミドを持った ATCC25841 株 8 株を供与菌、ATCC25841 株のナリジクス酸 (NA) 耐性変異株を受容菌に用いて同様の実験を行った。その結果、河川水単離株の間には供与菌としての伝達能力に差があることが示された。さらに、伝達率の高い 4 株と低い 4 株が持つプラスミドの差、例えば遺伝子制御の違いによる伝達機能発現の違いが、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 26^{\circ}\text{C}$ 条件下において伝達率の差として現れていた。受容菌に多摩川河川水単離大腸菌株を用いた実験でも TEM 型耐性遺伝子の伝達が観察された。ただし、河川水単離株は ATCC25841 株に比べて受容菌としての能力が劣っていた。また、プラスミドの違いがもたらす供与菌ごとの伝達率の差は、受容菌との組み合わせに関係せずに現れた。この時、河川模擬条件における最高の伝達率は $\log \alpha = -15.1$ であった。さらに、受容菌にサルモネラ菌株 *S.typhimurium* WG45 を用いた実験では、大腸菌が受容菌の場合に比べて伝達率が低下したものの、菌種を越えて伝達が起きることが確かめられた。この時、河川模擬条件における最高の伝達率は $\log \alpha = -15.2$ であった。

また、ATCC25841 株を受容菌に用い、振とう状態にて伝達率を測定した結果、多くの条件下では振とうによる伝達率の有意な上昇も低下も認められなかった。さらに、フィルター上に菌体を捕捉した固着状態にて伝達率を測定した結果、全ての条件において、液体中の無振とう状態に比べて伝達率の有意な増加が認められた。河川水の 26°C 条件では $\log \alpha$ が平均で 1.9 増加した。この理由としては、濃縮効果と細菌の自由な移動が制限される固定効果が挙げられる。

第 6 章は「都市河川を通じた耐性遺伝子の伝達可能性」を評価したものである。多摩川中流域において、野生の大腸菌間で TEM 型遺伝子の伝達が起こる確率は、河川水中で $2.0 \times 10^{-2} \text{CFU}/\text{day}$ 、底質内で $1.2 \times 10^{-2} \text{CFU}/\text{day}$ と算出された。さらに、大腸菌からサルモネラ菌への TEM 型遺伝子の伝達確率は、河川水中では $3.9 \times 10^{-7} \text{CFU}/\text{day}$ 、底質内では $2.4 \times 10^{-7} \text{CFU}/\text{day}$ と算出された。サルモネラ菌濃度が少ないと考えられる多摩川の現況では、大腸菌からサルモネラ菌への伝達が起こる可能性は小さいとすることができる。しかし今後は、未処理下水などによる汚染を受けている水域や、浄水処理が不十分な国および地域、あるいは熱帯地域などを対象とした、耐性菌の分布調査や耐性遺伝子の伝達可能性の評価に関する研究が求められる。

第 7 章は「結論」である。

以上要するに、本論文は、多摩川流域をフィールドとして、都市河川における β -ラクタム剤耐性大腸菌の分布を明らかに、その河川環境において TEM 型耐性遺伝子の伝達が起こり得ることを定量的に示したものであり、さらに水環境を媒介しての TEM 型耐性遺伝子の伝達という事象によるヒトへの健康リスク評価を初めて試み貴重な基礎情報を提供している。従って、本論文により得られた知見は都市環境工学の学術の進展に大きく貢献するものである。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。