

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 吉澤 頌樹

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 家畜糞便中の薬剤耐性菌・耐性遺伝子に対する堆肥化の影響に関する研究

審査委員

主査 准教授 臼井 優（食品衛生学）

副査 教授 樋口 豪紀（獣医衛生学）

副査 教授 蒔田 浩平（獣医疫学）

学位論文要旨

家畜糞便中の薬剤耐性菌・耐性遺伝子に対する堆肥化の影響に関する研究

酪農学園大学大学院獣医学研究科

吉澤頌樹

抗菌薬は、細菌感染症に対する治療のためにヒト医療分野や獣医療分野、畜産分野などにおいて広く使用されている。さらに、畜産分野においては治療目的だけでなく、成長促進や飼料効率の改善のためにも使用されており、抗菌薬の過剰使用は薬剤耐性菌の選択圧となる上に、薬剤耐性遺伝子の伝播や獲得を促進させる。日本における抗菌薬使用量の約50%は畜産分野が占めており、世界的にも家畜由来の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の出現は大きな問題となっている。また、家畜由来の薬剤耐性菌/耐性遺伝子は、食品や環境などを介してヒトに伝播し、ヒトの細菌感染症に対する治療効果が十分に得られなくなる可能性があることから、公衆衛生上大きな問題となっている。家畜の糞尿には、薬剤耐性菌/耐性遺伝子が含まれており、家畜糞尿を原料とする堆肥は家畜から環境への家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子の伝播経路のひとつとして挙げられる。したがって、家畜の糞尿中に含まれる薬剤耐性菌/耐性遺伝子を、家畜糞尿処理過程において死滅/除去させることが必要である。米国の環境保護庁（United States Environmental Protection Agency ; EPA）は、家畜糞尿を堆肥化する際に堆肥温度を55°C以上、かつ3日間以上持続させることで、病原微生物の死滅が保証されると提言しているが、薬剤耐性菌/耐性遺伝子も死滅/除去させることができるかは、科学的なデータを基に検証する必要がある。過去の報告において、実験的堆肥化による薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に関する調査がされているが、各報告によって堆肥化に用いる資材や堆肥化条件が様々であり、結果が異なっている。したがって、堆肥化による薬剤耐性菌/耐性遺伝子への影響については、様々な条件下における情報が必要とされている。しかし、日本で一般的に行われている好氣的堆肥化過程において、薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に関する調査を行った報告はない。したがって、本研究では、好氣的堆肥化が薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与える影響の解明を試みた。

第I章では、テトラサイクリン（TC）耐性 *Escherichia coli* (*E. coli*) は、豚糞便中

において 55°C で 1 日、37°C で 10 日、25°C で 30 日、4°C で 100 日の培養により検出限界 (50 CFU/g) 以下まで減少することを明らかにした。環境由来菌として用いた *Pseudomonas aeruginosa* は、豚糞便中において 55°C で 1 日、37°C で 30 日、25°C で 100 日の培養により検出限界 (50 CFU/g) 以下まで減少し、4°C で 100 日以上生存することを明らかにした。TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) は、豚糞便中において 55°C で 5 日、37°C で 25 日の培養により有意に減少し、25°C、4°C で 100 日間の培養により減少することを明らかにした。

第 II 章では、豚糞便を資材とした小型堆肥化実験装置による実験的好氣的堆肥化試験において、TC 耐性 *E. coli* は、6 日目に堆肥温度が 55°C に到達したことに伴い、7 日目に検出限界 (50 CFU/g) 以下になることを明らかにした。*tetA* 遺伝子は、4 日目の堆肥温度上昇に伴い、5 日目に有意に減少することを明らかにした。

第 III 章では、日本の野外家畜糞便由来完熟堆肥において、オキシテトラサイクリン (OTC) 耐性菌は 54.5% 検出 (豚由来 4/7 サンプル、牛由来 2/4 サンプル)、*tetA* 遺伝子は 100% 検出 (豚由来 7/7 サンプル、牛由来 4/4 サンプル) されることを明らかにした。また、TC 系抗菌薬は 100% 検出 (豚由来 29/29 サンプル、牛由来 4/4 サンプル) され、豚糞便由来堆肥サンプルの残留 TC 系抗菌薬濃度は牛糞便由来堆肥サンプルよりも有意に高値を示すことを明らかにした。さらに、野外家畜糞便由来完熟堆肥中の *tetA* 遺伝子コピー数及び残留 TC 系抗菌薬濃度間には有意な正の相関が認められることを明らかにした。

第 IV 章では、家畜糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子量を減少させる方法として、豚飼料中への飼料添加物としてのコリスチン (CST) 添加中止が豚糞便由来 *E. coli* のプラスミド性 CST 耐性遺伝子保有率及び CST 耐性率に与える影響の解明を試みた。飼料中に CST が添加されていた豚舎において、CST 添加中止により *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* 分離率及び CST 耐性率が約 6 か月で減少することを明らかにした。

以上の研究から、好氣的堆肥化による堆肥温度の上昇が家畜糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与える影響及び養豚農場における飼料中への抗菌薬添加中止が糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与える影響を解析することで、家畜糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の低減に必要な条件の一部が解明された。得られた研究成果は、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子が堆肥を介して環境中に拡散することを防ぐための重要な知見になり得るものと期待される。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

家畜由来の薬剤耐性菌 (ARB) 及び耐性遺伝子 (ARGs) は、食品や環境などを介してヒトに伝播する可能性があり、公衆衛生上大きな問題となっている。家畜の糞尿には ARB/ARGs が含まれており、家畜から環境への伝播経路のひとつとして挙げられる。本学位論文では、好氣的堆肥化が家畜糞便中の ARB/ARGs の消長に与える影響を解析することで、家畜糞便由来堆肥が家畜由来 ARB/ARGs の環境への拡散源となりうることを明らかにした。また、養豚場における飼料中への抗菌薬添加中止が糞便中の ARB/ARGs の消長に与える影響を解析することで、抗菌薬の使用中止が家畜糞便中の ARB/ARGs の低減に有効であることを明らかにした。

研究の背景と目的

抗菌薬は、細菌感染症に対する治療のために広く使用されている。しかし、畜産分野においては治療目的だけでなく、成長促進や飼料効率の改善のためにも使用されており、抗菌薬の過剰使用は ARB の選択圧となる上に、ARGs の伝播や獲得を促進させる。日本における抗菌薬使用量の約 50% は畜産分野が占めており、世界的にも家畜由来の ARB/ARGs の出現は大きな問題となっている。家畜由来の ARB/ARGs は、食品や環境などを介してヒトに伝播し、ヒトの細菌感染症に対する治療効果が十分に得られなくなる可能性があることから、公衆衛生上大きな問題となっている。家畜の糞尿には ARB/ARGs が含まれており、家畜糞尿を原料とする堆肥は、家畜から環境への家畜由来 ARB/ARGs の伝播経路のひとつとして挙げられる。したがって、家畜の糞尿中に含まれる ARB/ARGs を、家畜糞尿処理過程において死滅/除去させることが必要である。本研究では、日本で一般的に家畜糞尿処理方法として用いられている好氣的堆肥化が、ARB/ARGs の消長に与える影響を明らかにするために、実験室内培養試験、小型堆肥化実験装置を用いた実験的好氣的堆肥化試験、野外サンプルからの ARB 分離試験及び ARGs 検出試験を実施した。また、家畜糞便中の ARB/ARGs を減少させる方法として、豚飼料中への飼料添加物としてのコリスチン (CST) 添加中止が豚糞便由来大腸菌のプラスミド性 CST 耐性遺伝子保有率及び CST 耐性率に与える影響を明らかにするために、プラスミド性 CST 耐性遺伝子保有大腸菌分離試験及び CST 感受性試験を実施した。

研究の成果

日本で一般的に行われている好氣的堆肥化過程における ARB/ARGs の消長を科学的に検証し、家畜糞便由来堆肥が家畜由来 ARB/ARGs の環境への拡散源となりうることを明らかにした研究は今回が初めてである。本研究は、好氣的堆肥化が家畜糞便中の ARB/ARGs を減少させるが、完全に死滅/除去することは困難であることを示唆した。また、家畜糞便中の ARB/ARGs を減少させるための対策として、家畜への抗菌薬の投与中止が糞便中の ARB/ARGs の低減に有効な方法であることを示唆した。今後は、家畜糞便中の ARB/ARGs をより効果的に減少または完全に死滅/除去させるための方法について、さらなる知見の蓄積が必要である。

研究の評価

本研究は、薬剤耐性菌対策として具体的な手法が求められる中、畜産環境における薬剤耐性菌実態と対策の情報を提供し、今後の対策の方向性を示す重要なものとなった。また、ヒトへの伝播リスクが懸念されるコリスチン添加が豚由来細菌の耐性率に及ぼす影響も解明した。研究の妥当性も客観的に担保されており、新規性があり、科学及び獣医学の発展に寄与する内容となっている。

学位論文の一部を公表した論文

(雑誌名、巻号、頁、発行年 を記載)

1) Antibiotics (Basel). 9, 76. 2020. Yoshizawa N, Usui M, Fukuda A, Asai T, Higuchi H, Okamoto E, Seki K, Takada H, Tamura Y. Manure compost is a potential source of tetracycline-resistant *Escherichia coli* and tetracycline resistance genes in Japanese farms.

以上のことから、吉澤 頌樹 氏は、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2022 年 12 月 14 日

審査委員

主査 准教授 臼井 優
副査 教授 樋口 豪紀
副査 教授 蒔田 浩平