

京都大学	博士（工学）	氏名	PHAM MINH NGOC
論文題目	Assessment of the removal efficiency of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and antibiotic-resistance genes (ARGs) from cattle manure via the composting method (堆肥化法による牛糞からの抗生物質耐性菌・耐性遺伝子の除去効率の評価)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、畜産廃棄物の中でも含水率が比較的低い牛糞を対象として、堆肥化過程における抗生物質耐性菌(ARB)および耐性遺伝子(ARGs)の挙動に及ぼす環境因子(含水率ならびに温度)の影響を評価したものである。環境因子の影響評価に加えて、ARB の低減手法の提示、ならびに堆肥化肥料を用いた野菜栽培における人への健康リスクについて評価したもので、6 章から構成されている。 第 1 章では、本研究の背景として、抗生物質耐性リスクについて述べている。抗生物質などの薬剤の大量使用が、ARB や ARGs が環境中においても増加し、将来的には人に対する重大な健康リスクになりうることを論述し、家畜糞尿ならびにその堆肥化製品における ARB や ARGs の存在状況ならびに堆肥化過程における挙動把握の必要性についてまとめ、本研究の目的および本論文の構成について説明している。 第 2 章では、抗生物質生産に関する統計的見解および家畜排泄物中の ARB と ARGs の除去に関する既往の知見を整理し、除去機構解明と除去効率についてまとめている。抗生物質生産や家畜排泄物中の ARGs の組成、存在量をまとめ、家畜排泄物からの ARB の除去技術についても集約している。例えば嫌気性法等では、ARB や ARGs の除去率を上げるために膜分離法等の併用が検討されるが、システムが複雑になることがある。一方、堆肥化法は高い温度を発生させることができ、単独で除去駆除効率を高めることができる。堆肥化法は簡易な手法により ARB や ARGs を除去・低減できる特徴があり、その有用性を示し、研究対象とする意義を強調している。 第 3 章では、牛糞の堆肥化過程に及ぼす含水率の影響評価について、実験的検討を行い論じている。含水率が高いほど大腸菌の除去は促進されるが、抗生物質耐性大腸菌の除去速度は、含水率が 40% から 80% の範囲においてより高くなることを、除去速度定数を用いて定量化し評価している。一方で、14 日間の堆肥化における ARGs(<i>int1</i> 遺伝子, <i>ampC</i> 遺伝子, <i>sul1</i> 遺伝子, <i>sul2</i> 遺伝子, <i>tetA</i> 遺伝子)の除去率は、ARB の結果とは異なり、含水率の増加に対して単調に変化するものではなく、また ARGs の種類により影響傾向は異なることを明らかにしている。特に含水率が 50% 以上の条件では <i>ampC</i> 遺伝子は増加するケースがあり、85% 以上の高含水率条件では、堆肥化処理後に最大 8% 増加する結果が観察された。一方、高含水率条件において、通気を行わず嫌気性条件下とした場合では、通気を行った条件と比較して、<i>ampC</i> 遺伝子のほか、<i>tetA</i> 遺伝子、<i>sul1</i> 遺伝子、<i>int1</i> 遺伝子については、除去が有意に促進されることが示され、溶存酸素と併せた影響があることを明らかにしている。14 日間では最大 20% 程度の ARGs の除去がみられる結果となった。 第 4 章では、堆肥化過程における ARB や ARGs の除去に及ぼす温度の影響について評価している。90℃以上の高温条件を 2-3 日間維持した堆肥化過程では、ARB の除去効率が 6.0-8.0 log に達することを確かめている。ARGs も同様に、90℃以上の高温条件下に数日間置かれると、6.0-8.0 log 以上除去されることを確認している。			

京都大学	博士（工学）	氏名	PHAM MINH NGOC
また 90℃以上の高温条件に 7-10 日間暴露されると ARB の再増殖を抑制でき、ARGs の再増加を抑制できることも示している。その上で、ARB や ARGs の除去には、最初の加熱段階で 50℃から 65℃の間の温度を 3-5 日間維持し、その後徐々に 90℃まで上昇させることを提案している。比較的操作しやすい低温度段階を含む条件において、ARGs を処理し ARB の再増殖を抑制することも可能であることを示し、温度管理による ARB と ARGs の制御が効果的になることを明らかにしている。 第 5 章では、堆肥化後に農作物栽培時の肥料として施用する際の、抗生物質耐性に関するリスク評価を試みている。堆肥化は、牛糞を肥料として農耕地に用いる際に、抗生物質耐性による健康リスクを低減させる有効な方法であることを、実地調査結果に基づき明らかにしている。特に、夏季に堆肥化物を更に加温処理する場合に薬剤耐性をより低減できることを明らかにしている。また実施用施設における ARB や耐性遺伝子の調査から、イミペネムやゲンタマイシン、レボフロキサシンなどの抗生物質に対する耐性菌が栽培作物(トマト)から検出されることを具体的事例として示し、潜在的なリスクの抑制には堆肥化過程の最適化に加えて、食品衛生対応も必要であることを主張している。 第 6 章は結論であり、本研究での主な結果が総括され、今後の課題や展望が示されている。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、畜産廃棄物の中でも、牛糞を対象として、堆肥化過程における抗生物質耐性菌(ARB)および耐性遺伝子(ARGs)の挙動に及ぼす環境因子(湿度ならびに温度)の影響を調査し、抗生物質耐性の低減手法の提示ならびに牛糞堆肥を用いた野菜栽培におけるリスク評価を行ったものである。得られた主な成果は以下のとおりである。

- 1) 堆肥化時における含水率の効果について検討し、含水率が 40%から 80%の範囲内においては、ARB の除去が促進されことを見出した。一方で、ARGs の除去特性は、ARB の挙動とは異なり、含水率が上昇するに伴う明確な除去傾向が見出せるものではないことを実験的に示している。ARGs の種類により除去効率は異なるものの、14 日間、55℃の条件において最大 20%程度の除去率がみられることを示した。55℃かつ嫌気的な環境条件下で、ARGs の除去が促進されることも明らかにし、ARB ならびに ARGs の除去に対する含水率の影響を定量化した。
- 2) 堆肥化過程において ARB および ARGs の低減に及ぼす温度の影響は大きく、90℃以上の高温を維持したシステムでは、ARGs 除去率が 6.0~8.0 log に達することを明らかにし、堆肥の冷却期間後の ARGs の再増殖を抑えるためには、高温段階で少なくとも 7-10 日間、90℃以上の温度を維持することが重要となることを示した。その上で、運転管理の観点から、最初の加熱段階で 50℃から 65℃の間の温度を 3-5 日間維持し、その後徐々に 90℃まで上昇させる操作方法を提案している。容易な操作で、ARGs を処理し、これらの遺伝子を持つ細菌の再増殖を抑制するのに有効であること証明した。
- 3) 牛糞を直接肥料利用する場合と比較して、堆肥化処理により ARGs が 5.0 log 低減することを、農地の土壌調査から明らかにし、抗生物質耐性リスク低減には、堆肥化が有効な処理方法であることを実施用施設における調査から示している。一方で、イミペネムやゲンタマイシン、レボフロキサシンなどの抗生物質に対する耐性菌が栽培作物(トマト)から検出されることを具体的事例として示し、潜在的なリスクの抑制には堆肥化過程の最適化に加えて、食品衛生対応も必要であることも提言している。

本論文は、牛糞の堆肥化過程における薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子の環境因子(含水率、温度)の影響を明らかにするものであり、牛糞の薬剤耐性リスクを低減させ、堆肥化物をより安全に農耕地利用していく上での堆肥化手法、ならびに堆肥化物の活用進展に大きく貢献すると考えられ、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 6 年 2 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。