

京都大学	博士 (工学)	氏名	YU TANG
論文題目	The occurrence and dissemination potential of antibiotic resistance in water environments (水環境における薬剤耐性の存在実態と拡散の可能性)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、下水の抗生物質耐性サーベイランスならびに共有遺伝子プールの調査を行い、現状の水環境における抗生物質耐性菌(ARB)の存在実態把握と、異なる水環境における抗生物質耐性遺伝子(ARGs)の移動の可能性評価を試みるとともに、細菌の接合に関する実験を実施し、ARGsの水平伝播の頻度と効率について調査・検討したものであって、7章からなっている。</p> <p>第1章は序論であり、研究の背景や目的、本論文の構成について述べている。</p> <p>第2章は文献考察であり、抗生物質耐性の伝播機序や頻度についての既往研究を纏めている。またDNA修復システムであるSOS反応と薬剤耐性伝播の関係についても纏め、関連の有無に関する諸説を示すとともに、更なる研究進展の必要性を論じている。</p> <p>第3章は、都市域でのARB分布状況の実態把握の調査結果について纏めている。A市内の多地点でのマンホールで下水を採取し、分布状況をモニタリングするとともに、地理情報システムを用いて採水地点と土地利用形態の関連を考察した。さらに、基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生大腸菌(ESBL-EC)およびCPEの全ゲノム配列解析(WGS)による、ARG保有特性についても調査した。ESBL-ECはすべてのマンホール地点で検出され、市中でESBL-ECが蔓延している実態を明らかにし、都市域におけるARB、ARGsの人の健康へのリスクの存在を示すとともに、<i>Bla<sub>NDM</sub></i>の流行状況から、海外からの旅行者起因によるARBやARGsの発生や分布が示唆されることを考察している。</p> <p>第4章では、大腸菌のプラスミドを介した接合に及ぼす、単独の抗生物質、混合抗生物質群および実排水の影響について論じている。培地、回転速度、親細胞の生理状態に関する因子を調整することにより、接合実験モデルを提案し、最適化した。またこの実験モデルを用いて接合頻度を測定した。その結果、レボフロキサシンは128μg/Lの時に接合頻度を27.0倍に高める一方で、スルファメトキサゾール(0.32-512μg/L)およびテトラサイクリン(0.32-320μg/L)では明らかな接合促進や阻害効果は認められなかった。3種類の抗生物質(レボフロキサシン、スルファメトキサゾール、テトラサイクリン)の混合物は、各々単独で投与する場合と比較して、接合を誘導する程度が低く、相加・相乗作用は認められなかった。下水一次処理水抽出物には、接合に対する明らかな促進作用や阻害作用は認められないことを報告している。</p> <p>第5章では、新規の接合試験を提案し、接合効率の新しい計算方法を提案している。LB培地では、液体中での接合頻度は固体上での接合頻度の約1.5倍となった。レボフロキサシンを32~256μg/Lの濃度で曝露した場合、液相中接合頻度から、レボフロキサシンは接合プロセスを阻害した。従来の接合の算出方法では、トランスコンジュガントのスクリーニング段階でトランスコンジュガントを生成するため、液相中での接合を過大評価する可能性があった。固相体表面で生成するトランスコンジュガントを考慮し、従来の研究で得られた接合プロセスに対する、抗生物質などによる刺激影響を見直す必要があることを主張している。</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	YU TANG
<p>第6章では、異なる水環境において採取された大腸菌間に共通する遺伝子を同定することにより、薬剤耐性伝播の実態について調査、考察した結果を示している。琵琶湖周辺の河川、琵琶湖、実下水処理場からの二次処理水という3つの異なる地点より分離された、非選択的培地で培養された大腸菌(NS-EC)と薬剤耐性大腸菌(AS-EC)の比較ゲノム解析を行い考察した。下水二次処理水から採取されたNS-ECの共有遺伝子の割合は0.71%であり、河川から分離されたNS-EC(0.24%)および琵琶湖から分離されたNS-EC(0.28%)よりも高かった。AS-ECデータセットでも同様の傾向がみられ、下水二次処理水から分離されたAS-ECの共有遺伝子の割合は2.41%であり、河川(1.74%)や琵琶湖(1.36%)のそれよりも高かった。このことは、河川や琵琶湖よりも下水処理施設において、細菌の水平伝播の強度が高い可能性を示唆した。NS-ECデータセットでは、異なる水環境で共有遺伝子プールの機能差が観察された。河川からの分離株の共有遺伝子は主に細胞内輸送に関連するタンパク質をコードし、琵琶湖からの分離株の共有遺伝子は主にアミノ酸代謝に関連するタンパク質をコードしていた。下水二次処理水からの分離株の共有遺伝子は、河川や湖沼でも見られる細胞プロセスや代謝を含む様々なタンパク質をコードしていたが、特に情報の保存や処理に関わるタンパク質をコードする遺伝子が共有されていた。一方で、異なる水環境から分離されたAS-ECデータセットでは、明らかな機能差は観察されなかった。3つの水環境から単離されたAS-ECにおいて、細胞プロセス、代謝、情報保存・処理に関わるタンパク質をコードする共有遺伝子をすべて同定した。NS-ECとAS-ECの共有遺伝子プールを比較すると、AS-ECの共有遺伝子プールにおけるARGの増加に伴い、トランスポゾン、プラスミドおよびその他の水平伝播関連機構をコードする遺伝子が有意に増加した。このことは、ARGが大腸菌ゲノムの水平伝播関連遺伝子と同居している可能性を示しており、水平伝播を介してARGが移動する可能性を示唆した。</p> <p>第7章は結論であり、本論文で得られた成果について要約するとともに今後の展望について述べている。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、下水の抗生物質耐性サーベイランスならびに共有遺伝子プールの調査を行い、現状の水環境における抗生物質耐性菌(ARB)の存在実態把握と、異なる水環境における抗生物質耐性遺伝子(ARGs)の移動の可能性評価を試みるとともに、細菌の接合に関する実験を実施し、ARGsの水平伝播の頻度と効率について調査・考察したものである。得られた主な成果は以下のとおりである。

1) 住宅地のマンホール地点の下水中大腸菌濃度は、工業地帯におけるそれよりも高かった。大腸菌の多さは、都市部の土地利用形態と関連しており、人口密度が重要な影響因子となっている可能性が考えられた。基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生大腸菌(ESBL-EC)はすべてのマンホールで検出され、市中感染リスクがあることが示された。カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)も下水から同定され、最も多く検出されたカルバペネマーゼ遺伝子は、*bla*<sub>GES-24</sub>(58.3%、7/12)、次いで *bla*<sub>GES-4</sub>(33.3%、4/12)、*bla*<sub>NDM-5</sub>(8.3%、1/12)であった。この結果は、日本で *bla*<sub>CTX-M-27</sub> および *bla*<sub>GES-24</sub> が高頻度に検出されるという先行研究と一致しており、日本の臨床現場における ESBL-EC 感染症および CPE 感染症に対する経験的抗菌薬療法の選択に重要な示唆を与えるものであった。

2) 抗生物質が接合に及ぼす影響は抗生物質クラスによって異なっていた。レボフロキサシンは 128μg/L で接合の頻度が 27 倍に増大したが、スルファメトキサゾールおよびテトラサイクリン(0.32~320μg/L)では明らかな促進・阻害効果は認められなかった。また低濃度の抗生物質が複数種混合された場合、接合作用への相加的あるいは相乗的な促進作用が想定されたが、そのような作用は認められなかった。固相抽出された下水中成分にも、接合促進効果はないことを明らかにした。

3) 下水二次処理水から単離された大腸菌には、河川や琵琶湖から単離された大腸菌に比べ、共有される遺伝子の相対存在量が高かった。下水処理場においては、河川や湖沼に比べ細菌間の距離が近く、かつ抗生物質などの選択圧が強いことが要因となり、細菌間の遺伝子水平伝播の頻度が高くなる可能性を示した。

本論文は、ARBの存在実態把握と、異なる水環境におけるARGsの移動の可能性評価を試みるとともに、ARGsの水平伝播の頻度と効率を明らかにし、またそのためのより適切な試験方法を提案したものであり、今後の薬剤耐性リスクの管理手法や制御技術の発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21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公表したものとすることを認める。