The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	食肉の抗菌性物質および多剤耐性菌の汚染実態と薬剤耐性遺伝子の解析
Author(s)	山口, 貴弘
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69523
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　山口　貴弘　）	
論文題名	食肉の抗菌性物質および多剤耐性菌の汚染実態と薬剤耐性遺伝子の解析

論文内容の要旨

アレキサンダー・フレミングによるペニシリンの発見以降、様々な抗菌性物質が開発され、細菌感染症による死亡率は激減した。しかし、一方で抗菌性物質が効かない「薬剤耐性菌」が次々に発生・蔓延し、細菌感染症の難治化を引き起こしている。特に、ベトナムをはじめとした東南アジア諸国は市中健常人の薬剤耐性菌保菌率が先進諸国に比べ著しく高く、難治性感染症流行のリスクも高まっている。この原因の一つとして、畜産、養殖など食料生産現場における抗菌性物質の不適切使用が挙げられているが、その真偽を科学的に検証した例は乏しい。このような背景のもと、ベトナムの食品生産・流通過程における抗菌性物質使用が薬剤耐性菌発生・蔓延にどのように、どの程度関与しているのか解明することを目的に、地球規模課題対応国際技術協力事業（SATREPS）「薬剤耐性細菌発生機構の解明と食品管理における耐性菌モニタリングシステムの開発」が2011年に開始された。申請者は当該研究プロジェクトに参画し、ベトナム国内流通生鮮食品の抗菌性物質残留実態調査を実施した。さらにその成果を踏まえ、食肉由来薬剤耐性菌の性状、および薬剤耐性遺伝子の配列について解析を行った。本博士論文はそれらの成果をまとめたものである。

抗菌性残留実態調査は、2012年から2015年にかけて、タイビン、ニャチャン、ホーチミン、カントーの4都市の屠畜場、卸売市場、スーパーマーケット、食肉小売店で流通、販売されていた生鮮食品(牛肉、豚肉、鶏肉、鶏卵、魚、エビ、合計1,397検体)を購入し、申請者が独自に確立した液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いて実施した。その結果、12%の検体で何らかの抗菌性物質が検出された。これは日本（2008年～2012年大阪府：0.08%）やEU（2012年：0.12～0.2%)と比較して極めて高い値であった。検出頻度が高かった抗菌性物質はサルファ剤、キノロン剤、およびチルミコシンであり、食材によって検出される薬剤の種類は異なっていた。サルファメタジンやキノロン剤はベトナムでも最大残留濃度(MRL)が設定されているが、その値を超過する検体も数多く見られた。また、世界的に産卵鶏に対しては、鶏卵への残留を考慮し、肉用鶏とは異なる薬剤、方法で使用されているが、本調査結果では、鶏肉と鶏卵で残留抗菌性物質の種類がほぼ同一であったことから、ベトナムでは産卵鶏に対しても肉用鶏と同様の抗菌性物質使用が常態化している可能性が考えられた。以上の結果から、ベトナムでは、家畜、養殖魚介類に対する抗菌性物質の使用規制が整備されつつあるものの、規制が遵守されず、先進諸国と比較し、非常に高い割合で抗菌性物質が残留した食品が流通している実態が浮き彫りとなった。

続いて、残留抗菌性物質が同一食品に付着した薬剤耐性菌に及ぼす影響について検証を試みた。残留抗菌性物質実態調査に用いた食肉検体から第三世代セファロスポリナーゼ産生（ESBL/AmpC産生）大腸菌を分離し、各種抗菌性物質に対する耐性試験を行った。分離源食肉中の抗菌性物質残留の有無で群分けし、分離株総数に対する耐性株数の割合(耐性率)を各々算出し、比較したところ、キノロン剤が検出された食肉からの分離株は、キノロン剤非検出食肉からの分離株に比べ、シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸、およびホスホマイシンに対する耐性率が有意に高かった。同様にサルファ剤が検出された食肉からの分離株は、サルファ剤非検出食肉からの分離株に比べ、CPFXの耐性率が有意に高かった。次に、食肉から分離したAmpC産生大腸菌株を用い、各種抗菌性物質存在下でのセフォタキシム薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドの水平伝達頻度を評価した。その結果、CPFX、およびテトラサイクリン(TC)存在下において、抗菌性物質非存在時と比べ水平伝達頻度の上昇が見られた。ただし、CPFXは50 pg/mL、TCは1 ng/mLで処理した場合に、頻度が最大（3.5倍および4.2倍）となり、それ以上の濃度では低下した。これは菌に対する薬剤の毒性がプラスミド水平伝達促進効果を上回ったことによるものと推察される。以上の結果は、食肉中に残留する抗菌性物質が、当該化合物とは異なるタイプの抗菌性物質に対する耐性を誘導し、それに寄与する耐性遺伝子の水平伝播をも

促進する可能性を示しており、特定の抗菌性物質の規制を強化しても、薬剤耐性菌対策には無意味であることを示唆している。

最後に食肉に付着したコリスチン耐性菌の解析を行った。実態調査対象食肉検体から分離したESBL/AmpC産生大腸菌のコリスチンに対する耐性を調べたところ、24%(83株/342株)が耐性を示した。これらコリスチン耐性菌が保有するコリスチン耐性遺伝子型を解析したところ、80株、および3株が*mcr-1*、*mcr-3*をそれぞれ保有していた。ESBL/AmpC遺伝子型別解析したところ、$bla_{CTX-M-14}$および$bla_{CTX-M-55}$の保有株が他の型に比べ、コリスチン耐性遺伝子保有率が高かった。世界の地域ごとの$bla_{CTX-M-14}$および$bla_{CTX-M-55}$の検出率は、ヨーロッパでは低く、中国、東南アジアで高い傾向があり、また、*mcr*遺伝子についても同様の傾向がみられる。さらに*mcr*遺伝子と$bla_{CTX-M-55}$を同時に有する耐性菌がヨーロッパやアメリカで検出されている。本研究においても*mcr*遺伝子と$bla_{CTX-M-14}$および$bla_{CTX-M-55}$が共存する株が高頻度で検出したことから、これらの薬剤耐性遺伝子は同様の経路で世界中に拡散している可能性が推定された。さらに、*mcr-3*を有する2株（E155、E769）のプラスミド全配列を次世代シーケンサーで解読した。その結果、*mcr-3*を含めその周辺の遺伝子配列が、世界で初めて分離された*mcr-3*保有株のプラスミド(GenBank accession No.KY924928）と、E769についてはほぼ完全に一致し、E155株においても2つの挿入配列以外でほぼ完全に一致した。このことから、本研究で分離された*mcr-3*は中国から何らかの経路で持ち込まれた可能性が示唆された。

以上のように本研究は、抗菌性物質が残留した食肉・魚介類や鶏卵が多く流通しているベトナムの実態を明らかにした。また、残留抗菌性物質がその食品に付着している薬剤耐性菌の多剤耐性化や耐性遺伝子の水平伝播を促している可能性を示唆した。さらに、第三世代セファロスポリナーゼとコリスチンの両方に耐性を持つ菌がベトナムで拡散している実態を明らかにし、その由来が中国である可能性を示唆した。これらの知見は、畜産・養殖における抗菌性物質使用の規制について、当該国ではより一層の強化が必要であることのみならず、ある特定薬剤の規制のみでは対策が不十分であること、さらには国境を越えた地域あるいは全世界での統一的な規制が必要であることを示している。今後、これらの点を踏まえた行政的対応が講じられることを期待したい。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（山口　貴弘）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	平田　收正
	副 査	教授	西野　邦彦
	副 査	教授	高木　達也

論文審査の結果の要旨

本研究においては、ベトナムにおける食品中の残留抗菌性物質実態について調査を行なった。また、本調査に基づいた薬剤耐性に関与するプラスミド水平伝達に関する検討、さらにはベトナムの食肉から分離した大腸菌が保有するプラスミド性コリスチン耐性遺伝子*mcr-3*の遺伝子解析を行なった。

まず、ベトナムにおける食品中の残留抗菌性物質の実態調査では、流通する食肉や魚介類はスルファメサジンをはじめとしたサルファ剤やキノロン系抗菌性物質、チルミコシン等のマクロライド系抗菌性物質が高頻度で残留していることを明らかにした。また、スルファクロジンは、近年日本での使用実績はなく、中国で製造されたものが、ベトナムで使用され流通していることが判明した。さらに、鶏卵の抗菌性物質残留実態も明らかにし、多くの国で禁止されている採卵期での抗菌性物質の使用が疑われた。

ベトナム国内で流通する食肉及び魚介類の耐性菌汚染実態調査の結果、高頻度でESBL/AmpC産生大腸菌が検出され、これによりベトナムの食品は抗菌性物質とともに耐性菌による汚染が深刻であることを明らかにした。さらに、残留抗菌性物質分析を行った食肉および魚介類から分離した耐性菌の感受性試験結果と残留抗菌性物質の検出の有無での相関を確認したところ、シプロフロキサシン耐性については残留抗菌性物質との関与が示唆され、た。シプロフロキサシンを添加したプラスミド水平伝達試験においてプラスミドの水平伝達が促進される可能性を示した。しかし、ESBL/AmpC産生大腸菌と食品中の残留抗菌性物質の因果関係を明らかにすることはできなかった。

ベトナムの食品から分離したESBL産生菌から高頻度でコリスチン耐性大腸菌が分離され、このうち豚肉由来株が*mcr*-3を保有有することを明らかにした。これにより、初めて中国で報告された*mcr-3*の配列と類似しており、中国で発生した*mcr-3*を有するコリスチン耐性菌もしくはプラスミドの水平伝達を介して、ベトナムをはじめ東南アジアに拡散し、世界各国に拡散している可能性を示した。

以上の研究により、今後ベトナムを始め、東南アジア等の発展途上国において使用される抗菌性物質について、食肉の残留抗菌性物質分析と耐性菌研究を進めていくことによって、食品を介した耐性菌の発生・拡散を抑制できる可能性が示された。

新規知見が得られており、学術的も高く評価できることから、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。