

学位論文審査の結果の要旨

氏名	金受珍
審査委員	主査 北村 真一 副査 佐藤 成一 副査 鈴木 聡
論文名	Occurrence and diversity of tetracycline resistance gene, <i>tet(M)</i> , in Korean coastal seawater
審査結果の要旨(2,000字以内)	<p>近年、抗生物質耐性菌 (antibiotic resistant bacteria, ARB) および耐性遺伝子 (antibiotic resistance genes, ARGs) の分布拡大と死亡者数増加が国際的にも問題になっており、本年6月のG8会議の科学大臣提言でもトッププライオリティに挙げられ、国際共同研究の必要性がアピールされた。欧米では加速的に研究が進められているが、日本を含むアジア諸国での研究はまだ院内感染のみに焦点が当てられ、環境汚染物質としての認識は低く、研究者人口も少ない。自然環境と人間環境間の ARGs 移動は新しい環境問題である。</p> <p>これまで、ARGs は高濃度の抗生物質使用によって選択的に形成されることは知られてきたが、最近になって、極低濃度の抗生物質が遺伝子変異の固定化と遺伝子の水平伝播を促進し、ARGs の環境への残存性が高まる事が明らかになってきた。環境での ARB と ARGs の分布を知る事は環境からの ARGs リスクを評価する上で重要であると考えられている。</p> <p>本研究は、韓国南岸の、Yeosu(KYS)、Geoje(KGJ)およびWando(KWD)の3地点の沿岸海水中における ARB と ARGs の分布と遺伝的多様性を調べたものである。抗生物質のうち、世界的にも畜産・水産での使用量の多いオキシテトラサイクリン (OTC) の現場海水中の濃度を測定したところ、ほとんどの調査地点で2010年、2011年ともに検出限界以下 (0.1 µg/L) であった。海水中での濃度はリアルタイムでの汚染を示すことから、韓国南岸では OTC 汚染は低いと考えられた。OTC 耐性菌率は2010年で0-0.35%、2011年で0-10.6%であり、年による有為差はなかった。地点別では KWD で高い傾向があり、ARB の由来が陸地からの流入も含め、多様である可能性が示唆された。3地点では KWD で耐性率が高い傾向がみられた。</p> <p>OTC 耐性遺伝子は現在まで40種以上が知られている。本研究では、その中で遺伝子の進化、分布、多様性の情報の多い <i>tet(M)</i> に焦点をあて、海水中の細菌が保有する <i>tet(M)</i> の量と遺伝的多様性を、非培養法および培養法で調べた。まず、現場海水中から直接抽出した DNA から <i>tet(M)</i> を PCR で検出、定量した。3地点いずれからも <i>tet(M)</i> は検出され、海水細菌群集</p>

中には、*tet(M)*は量的変化するもののいずれの地点でも存在することが分かった。培養法で OTC 耐性菌を分離したところ、70 株の *tet(M)* 保有株が得られ、すべて由来は KWD 地点であった。培養可能な菌では *tet(M)* は偏在することが示唆された。

tet(M) の遺伝的多様性を塩基配列で調べたところ、KWD の *tet(M)* はすべての群集および分離株間で 99% 以上の相同性を示し、日本の養殖場由来 *tet(M)* と同じ遺伝子であった。KWD の *tet(M)* は養殖環境由来であることが示唆された。一方、KGJ の群集 *tet(M)* 間の相同性では 91.7% と低いものがあった。また、ヒトの腸球菌由来の伝達性因子に由来する *tet(M)* と相同性の高いものが含まれていたことから、*tet(M)* のヒト環境からの流入が疑われた。地域によって存在する遺伝子ゲノタイプが異なる事が明らかになり、KWD と KGJ では *tet(M)* の由来がことなるために多様度に差異があることが考えられた。

分離培養された *tet(M)* 保有菌の分類群を 16S rRNA 遺伝子で調べたところ、すべて *Vibrio* または *Photobacterium* 属であり、類縁のガンマプロテオバクテリアに限られていることが分かった。これらの結果から、海水中の細菌群集では *tet(M)* は普遍的に存在するものの、培養可能菌ではガンマプロテオバクテリアが培養法によって選択されていることが明らかになった。

本研究を通して得られた知見から、これまで明らかにされていなかった韓国沿岸海水中での OTC 濃度、耐性菌率、耐性遺伝子の多様性および耐性遺伝子保有菌の特徴が明らかにされた。これらはすべて初めて得られた知見であり、本研究は微生物生態学、公衆衛生学の分野における国際的情報を拡大した。薬剤耐性菌と耐性遺伝子の環境実態と遺伝的特徴の解明は、微生物生態学的に評価されるだけでなく、環境科学的にも評価できるものである。

以上のような研究内容の評価により、審査委員全員一致して本学位論文が、博士（理学）を授与するに値する論文であると判定した。