

博士學位論文審査結果	
専攻名	生物資源科学専攻
氏名	貞弘 恵
学籍番号	D23G003
論文題目	家畜における薬剤耐性問題と抗菌剤削減を目指した腸内細菌の豚への利用法に関する研究
審査委員氏名	(主) 福島 淳 印 (副) 志村 洋一郎 村口 元 (学外) 押田 敏雄
研究概要及び審査概要	
<p>牛と豚を含む畜産領域における抗菌剤の使用と耐性菌、および豚の離乳期に頻発する下痢症の問題について、家畜の腸内細菌を対象に検討した研究である。牛で薬剤耐性サルモネラ感染症が発生した事例について、原因菌を解析し、その薬剤耐性遺伝子が染色体上にあるため安定して薬剤耐性を保持していることを明らかにした。また、豚において同様に問題になるサルモネラ感染症について、農場ごとの検出状況を調査し、その薬剤耐性を詳細に調査した。以上の研究からの示唆と、豚の飼育で大きな問題である感染性も含む離乳期の下痢症の対策を目的に、<i>Akkermansia muciniphila</i>を含む<i>Akkermansiaceae</i>の菌や、他の腸内細菌の腸内での動体を詳細に調べ、抗菌剤に頼らない豚下痢症対策への本菌の応用可能性の展望を示した。以上の研究内容について、令和6年2月16日の発表会において40分の発表があった。その際、学外審査委員と副審査委員2名、および参加者2名より質疑があり、適切にかつ丁寧に応答していた。その後別室において審査会を開催した。その場で、論文について、内容としては十分であり、質疑応答においても適切に回答し、他の要件も満たしていることから、全員一致で博士の学位授与に値するとの結論が得られた。</p>	
審査結果	
<input checked="" type="checkbox"/> 博士の学位を授与するに妥当と認定する。	
<input type="checkbox"/> 博士の学位を授与するに不十分である。	
<input checked="" type="checkbox"/> 以上の審査概要ならびに審査結果について審査委員全員の同意がある。	

氏名	さだひろ めぐみ 貞弘 恵
授与学位	博士(生物資源科学)
学位授与年月日	令和6年3月22日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項(注 課程博士:1、論文博士:2)
研究科専攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学位論文題目	家畜における薬剤耐性問題と抗菌剤削減を目指した腸内細菌の豚への利用法に関する研究
指導教員	教授 福島 淳
論文審査委員	主査 教授 福島 淳 副査 准教授 志村洋一郎、准教授 村口 元 学外 麻布大学 名誉教授 押田 敏雄

論文内容要旨

(研究科様式 博5)

1. 緒言

抗菌剤は動物の健康を守り、畜産物を安定生産するうえで重要な資材であり、畜産業において欠かせないものである。2019年の日本の抗菌剤販売量のうち、動物に使用される動物用医薬品と飼料添加物を合わせると全体の60%を占め、人体用の約2倍の抗菌剤が動物に使用されている。中でも豚への使用量が極めて多く、テトラサイクリンの多用が問題視されている。抗菌剤の使用は薬剤耐性菌が選択されるリスクが伴い、薬剤耐性率と抗菌剤使用量には相関が示されている。畜産業での抗菌剤多用は家畜体内で薬剤耐性菌の出現を促し、獣医療における抗菌剤の有効性を低下させるだけでなく、畜産物や環境を介して人へ伝播し、人医療における抗菌剤治療を困難にするリスクも懸念されている。畜産現場における薬剤耐性菌の出現を監視する必要がある。そこで、病畜および健康畜から分離されたサルモネラの薬剤耐性に関する性状について調査を実施した。

さらに現在、薬剤耐性菌対策として、畜産の生産現場における感染予防・管理により抗菌剤の使用機会を削減することが求められている。近年、人や家畜の健康維持には腸内細菌が深く関わっていることが明らかになってきた。その中で、腸管の健康に関わる細菌として *Akkermansia muciniphila* が注目されている。*A. muciniphila* はグラム陰性、嫌気性細菌で、腸管上皮細胞に近い粘液層に存在し、粘液の主成分であるムチンを分解する。そのムチン代謝の過程で産生される短鎖脂肪酸(酢酸およびプロピオン酸)が腸管上皮細胞のエネルギー源となり、杯細胞の密度を増加させ、ムチンの産生を亢進し、腸管粘液層を肥厚させることが示されている。腸管粘液層は、腸管

上皮を覆う非特異的バリアであるとともに、腸内細菌が生息する場を提供し、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられている。そこで、抗菌剤使用量削減を目指し、抗菌剤使用量が最も多い豚において *A. muciniphila* の機能を応用した離乳期の下痢症予防に取り組んだ。

2. 家畜由来サルモネラの薬剤耐性検証

(1) 牛サルモネラ症原因菌の性状解明

静岡県の酪農場で発生した成牛のサルモネラ症例から分離されたサルモネラの薬剤耐性に関する性状を調査した。

その結果、分離株は *Salmonella enterica* 血清型 4 : i : - であり (図 1-A、図 1-B)、ABPC、CEZに加え、第3、第4世代セフェム系のCTX、CFPM、CPRとCP、TCおよびGMにも耐性を示す多剤耐性菌であった(表1)。さらに基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{CTX-M-55} を染色体上に保有することが確認された(図2)。セフェム系抗菌剤は人医療において多用されている抗菌剤の一つであり、特に第3、4世代セフェムは小児サルモネラ症の主要な治療薬である。それらに耐性を示すサルモネラが家畜から分離されたことから、公衆衛生上、特段の注意を払う必要があると考えられた。

(2) 健康豚由来サルモネラの性状解明

2005～2006年に群馬県のと畜場に搬入された健康豚の盲腸内容物を用い、サルモネラの保菌調査およびサルモネラ陽性農場に対する追跡調査を実施し、分離株の血清型、薬剤耐性を比較した。

その結果、保菌調査では48農場中16農場(3.3%)、471頭中31頭(6.6%)からサルモネラが検出され(表2)、養豚場が広くサルモネラに汚染されていることが明らかとなった。サルモネラが検出された16農場のうち、14農場から5剤(ABPC、CP、DSM、OTC、SDMX)もしくは6剤(ABPC、CP、DSM、OTC、SDMX、NA)に耐性の *S. Typhimurium* が検出された(表3)。追跡調査でサルモネラが分離された5農場のうち4農場では、保菌調査と同じ耐性型の *S. Typhimurium* が再び分離され(表3)、農場内の常在化、豚への感染持続が推察された。さらにOTCを含む多剤耐性 *S. Typhimurium* に加え、新たにOTC単剤耐性 *S. Typhimurium* が複数農場で分離され(表3)、農場での薬剤使用により特定の株が選択された可能性が示唆された。

3. 豚離乳期の下痢症に関する検討

離乳後に下痢が発生する農場(下痢発生農場)と発生しない農場(対照農場)の哺乳豚(10～20日齢、n=11)、離乳豚(28～35日齢、n=6)、育成豚(42～60日齢、n=6)の3つの発育ステージで、肉眼的に正常な新鮮ふん便を採取し、ふん便中の *A. muciniphila* 検出率、有機酸濃度、ムチン濃度を比較した。

その結果、下痢発生農場では哺乳豚の *A. muciniphila* 検出率が63.6%で(表4)、*A. muciniphila* を保菌していない個体が存在し、全ての発育ステージでムチン濃度が

有意に低く（図3）、乳酸濃度が高い傾向を示した（表5）。

一方、対照農場では、すべての哺乳豚から *A. muciniphila* が検出され（表4）、哺乳豚の酪酸およびムチン濃度が有意に高かった（図3、表5）。マウスでは *A. muciniphila* によりムチン産生が亢進することが明らかとなっているが、豚においても同様の作用が示唆された。また、育成豚では全ての短鎖脂肪酸濃度が高い傾向を示し（表5）、ムチン濃度も有意に高くなった（図3）。以上の結果から、下痢発生農場と対照農場を比較すると、生後まもない哺乳豚の時期から腸管の状態が異なり、哺乳豚における *A. muciniphila* の存在は短鎖脂肪酸を介して腸管の健全性に寄与し、離乳豚の下痢症を防ぐ一つの要因となる可能性が示唆された。一方で *A. muciniphila* はムチン分解の過程で酢酸とプロピオン酸を産生するが酪酸は産生しない。対照農場の哺乳豚で酪酸濃度が高くなった要因は不明である。*A. muciniphila* と他の腸内細菌との相互作用や、下痢発生農場と対照農場で菌叢全体における *A. muciniphila* の占有率の違い等、更なる検討が必要である。

4. 豚離乳期の下痢症予防に関する検討

前章の結果を受け、前出のふん便材料を用いて、下痢発生農場と対照農場の各発育ステージの腸内細菌叢を次世代 DNA シーケンサーである MiSeq による 16S rRNA 遺伝子 V3~V4 領域のアンプリコン解析により比較し、両農場の菌叢の特徴や成長に伴う菌叢変化の違いを明らかにし、豚下痢症に関する *A. muciniphila* の機能について更なる検討を行った。

その結果、下痢発生農場では哺乳豚から育成豚にかけて一貫して乳酸産生菌が優位な菌叢であり、酪酸産生菌の占有率の増加は認められなかった（図4-A、図5-A、5-B）。また、哺乳豚における *Akkermansiaceae* の占有率は約 0.1% であった（図6）。腸管の乳酸蓄積は腸管上皮を刺激し生理的下痢を引き起こすとともに、pH の低下によりムチンの非酵素的分解が生じ、腸管の物理的バリアを低下させる要因にもなる。下痢発生農場では哺乳豚から生理的下痢および感染性下痢を生じやすい腸内環境にあると考えられた。

対して、対照農場では離乳前後で乳酸産生菌が優位な菌叢から、酪酸産生菌が優位な菌叢へと変化した（図4-B、図5-A、5-B）。さらに哺乳豚において *Akkermansiaceae* の占有率が約 1% であり（図6）、下痢発生農場と比較して高い傾向が認められた。*Akkermansiaceae* はムチン糖鎖分解に関連する一連の酵素を備えている。対照農場では、哺乳豚において、腸管に定着した *Akkermansiaceae* がムチンを分解して糖鎖を供給し、酪酸産生菌がそれらを利用して、効率的に短鎖脂肪酸産生が進んだ結果、杯細胞からのムチン分泌が促進し、より一層 *Akkermansiaceae* が増殖するという循環が継続していると考えられた。したがって、哺乳期に *A. muciniphila* を保菌し、ムチンを利用した短鎖脂肪酸産生を促すことが腸管の健全な発育につながり、腸管の物理的バリアが高まった状態で離乳を迎えることが離乳豚の下痢症予防となる可能性があると考えられた。哺乳子豚の腸内細菌叢は生後初期に接触した環境（母豚の膾や皮膚、腸管、母乳）に由来した菌叢によって形成される。母豚から子豚

への菌叢の伝播は離乳期の下痢症を予防する手段となることから、従来の病因に焦点を当てた抗菌剤を使用した下痢症対策ではなく、腸内細菌 *A. muciniphila* の機能を応用した宿主の腸管の健常化に取り組むことが、養豚現場における抗菌剤使用量削減に寄与すると考える。

[1] 厚生労働省薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会 (2021) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次書

[2] 農林水産省動物医薬品検査所 (2021) 令和3年動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報

[3] Asai T. et al. (2005) Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease* 58: 369-372.

[4] Shin J. et al. (2019) Elucidation of *Akkermansia muciniphila* probiotic traits driven by mucin depletion. *Frontiers in Microbiology* 10: article 1137.

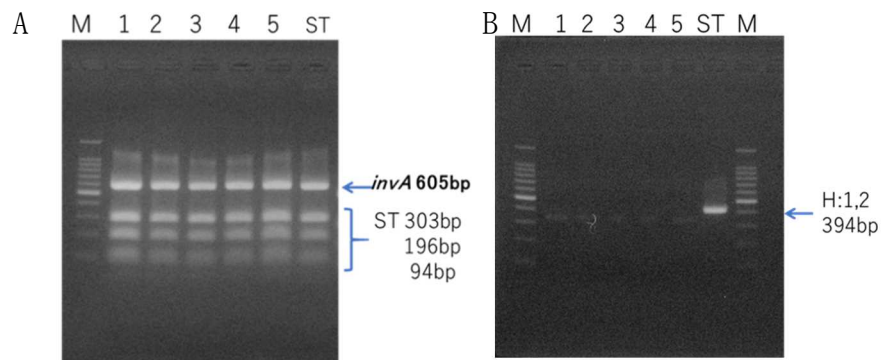


図1 サルモネラ血清型別 PCR 結果

A : *S. Typhimurium* 同定 PCR B : *fljB* (第2相 H 遺伝子) PCR

表1 薬剤感受性試験結果

	ABPC	CEZ	CFX	CTX	CAZ	CFPM	CPR	CP	TC	KM	GM	NA	CPFX
病性鑑定 牛由来株	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	R	S	I
同居牛 由来株	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	R	S	I

R:耐性、I:中間、S:感性

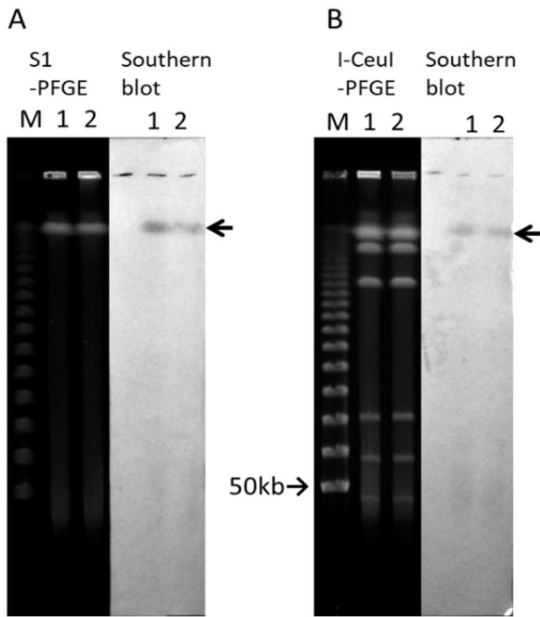


図2 β-ラクタマーゼ遺伝子のサザンブロット解析

A : S1ヌクレーアーゼ処理

B : I-Ceu I 処理

レーン1 : 病性鑑定牛分離株

レーン2 : 同居牛分離株

表2 サルモネラ保菌調査結果

農場	検査頭数	陽性頭数	検出率(%)	血清型
A	10	1	10.0	<i>S. Typhimurium</i>
B	10	1	10.0	<i>S. Typhimurium</i>
C	10	2	20.0	<i>S. Typhimurium</i>
D	9	2	22.2	<i>S. Typhimurium</i>
E	9	1	11.1	<i>S. Typhimurium</i>
F	10	2	20.0	<i>S. Typhimurium</i>
G	10	4	40.0	<i>S. Typhimurium, S.Give</i>
H	10	5	50.0	<i>S. Typhimurium, S.Give</i>
I	10	2	20.0	<i>S. Typhimurium, S.Give</i>
J	10	1	10.0	<i>S.Give</i>
K	10	3	30.0	<i>S.Typhimurium, S.Derby</i>
L	10	1	10.0	<i>S.Typhimurium, S.Derby</i>
M	10	2	20.0	<i>S.Typhimurium, S.Derby, S.Salinatis</i>
N	10	2	20.0	<i>S. Typhimurium</i>
O	9	1	11.1	<i>S. Typhimurium</i>
P	10	1	10.0	<i>S. Schwarzengrund</i>
他32農場	314	0	0	
計48農場	471	31	6.6	

表3 農場別分離サルモネラの血清型と薬剤耐性型

農場	保菌調査			追跡調査		
	血清型	耐性型	菌株数 個体数	血清型	耐性型	菌株数 個体数
A	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 1			
B	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 1	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	3 3
C	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2 2	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2 2
D	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2 2			
E	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 1			
F	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2 2	<i>S. Typhimurium</i>	(OTC)	4 4
G	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	3 3	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2 2
	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 } 1	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 } 1
	<i>S. Give</i>	(SDMX)	1 } 1	<i>S. Typhimurium</i>	(OTC)	1 } 1
H	<i>S. Give</i>	(SDMX)	4 4			
	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 } 1			
	<i>S. Give</i>	(SDMX)	1 } 1			
I	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 1			
	<i>S. Give</i>	(SDMX)	1 1			
J	<i>S. Give</i>	(SDMX)	1 1			
K	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2 2			
	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 } 1			
	<i>S. Derby</i>	(SDMX)	1 } 1			
L	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 } 1	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	3 3
	<i>S. Derby</i>	(OTC,SDMX)	1 } 1			
M	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 1			
	<i>S. Derby</i>	(SDMX)	1 } 1			
	<i>S. Salinatis</i>	(SDMX)	1 } 1			
N	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX,NA)	2 2	-	-	- -
O	<i>S. Typhimurium</i>	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1 1	-	-	- -
P	<i>S. Schwarzengrund</i>	(OTC,SDMX,NA)	1 1	-	-	- -
計			36 31			16 15

表 4 豚ふん便からの *A. muciniphila* 検出率

	哺乳期 (n=11)	離乳期 (n=6)	育成期 (n=6)
下痢発生農場	63.6%	66.7%	16.7%
対照農場	100%	33.3%	33.3%

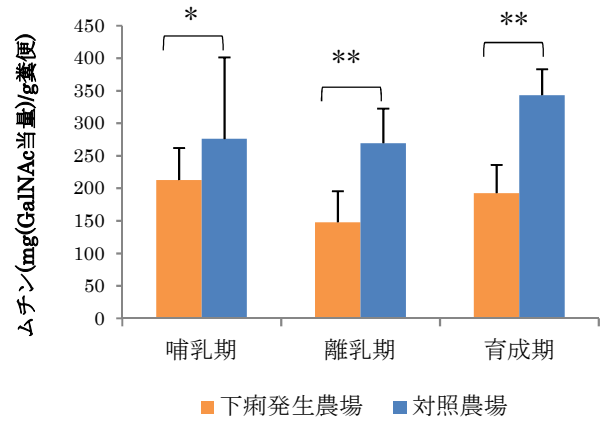


図 3 豚ふん便中ムチン濃度の比較

表 5 豚ふん便中の有機酸濃度の比較

有機酸 ($\mu\text{mol/g}$ of wet feces)	農場	哺乳豚 n=11	離乳豚 n=6	育成豚 n=6
乳酸	下痢発生	2.08 ± 1.51	3.99 ± 1.74	2.24 ± 1.43
	対照	0.57 ± 0.50	2.82 ± 1.51	0.85 ± 0.48
酪酸	下痢発生	1.95 ± 1.71	14.28 ± 13.17	23.13 ± 7.09
	対照	5.01 ± 1.36	11.77 ± 2.55	31.96 ± 7.24
酢酸	下痢発生	24.72 ± 8.19	49.36 ± 14.36	52.23 ± 6.44
	対照	17.99 ± 5.89	60.31 ± 10.47	99.74 ± 16.77
プロピオン酸	下痢発生	7.21 ± 2.88	20.04 ± 9.29	36.76 ± 5.84
	対照	11.66 ± 9.70	27.28 ± 8.07	44.25 ± 7.95

平均値 \pm 標準偏差 ; t 検定により、*は 5%水準、**は 1%水準で有意差があることを示す

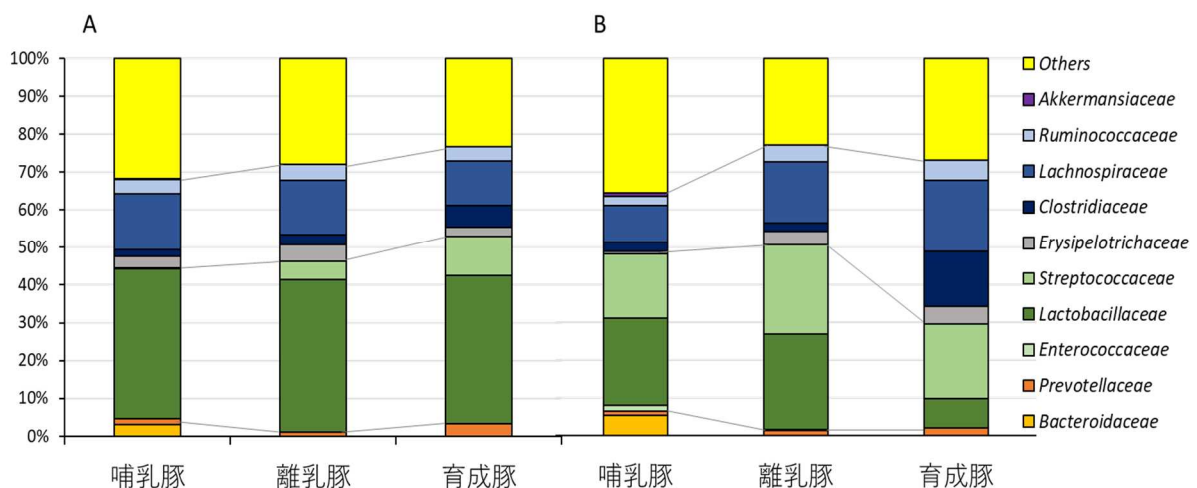


図 4 发育ステージごとの菌叢変化

A : 下痢発生農場 B : 対照農場

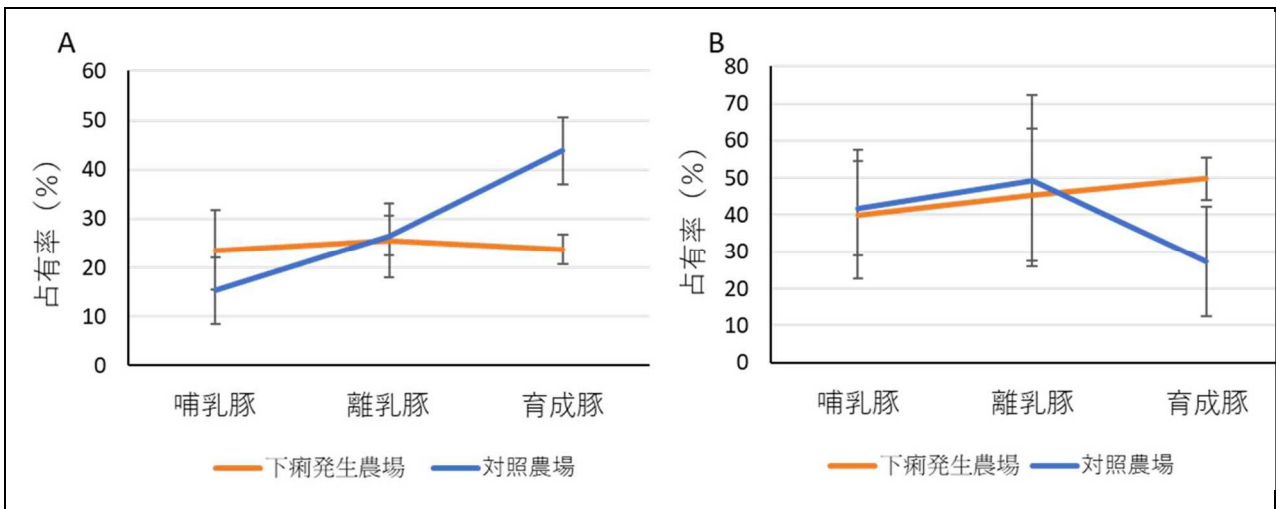


図5 酪酸産生菌 (A)、乳酸産生菌 (B) の発育ステージごとの占有率の変化
酪酸産生菌: *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*
乳酸産生菌: *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae* をそれぞれ選抜し比較

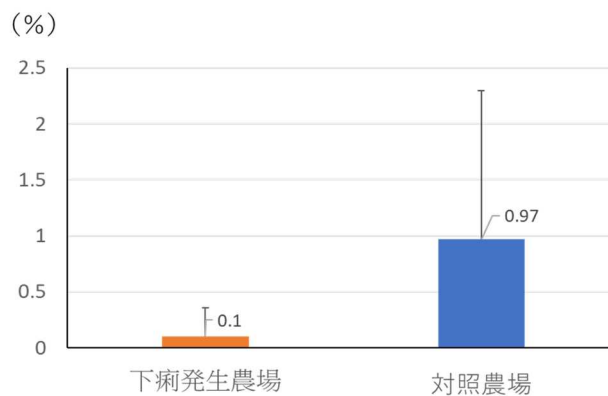


図6 哺乳豚における *Akkermansiaceae* 占有率

論文審査結果要旨

「家畜における薬剤耐性問題と抗菌剤削減を目指した腸内細菌の利用法に関する研究」というタイトルでの博士学位論文発表会は令和6年2月16日に開催された。会場には全審査委員4名に加え、多数の参加者が出席していた。発表時間は40分で、その後質疑応答の時間が取られた。学外審査委員からは内容が十分練られ、特に腸内細菌の今後の利用法に関する提言が加えられていることが評価できるとの発言があった。副査の2名からも、薬剤耐性菌の広がりの問題に関する事項などについての質問と議論があった。また会場からは、今回の研究の中で豚から検出された薬剤耐性菌はクローン的なものかという点に関する質問があり、発表者からはクローンである可能性が高いとの回答があった。さらに、豚の腸内細菌の菌叢解析において、次世代シーケンサを使った *Akkermansiaceae* と *A. muciniphila* の関係に関する質問があった。以上のような質問に対して、様々な背景を含めて適切に、かつ丁寧に回答を行っていた。

本発表会の後に主査、副査、外部審査委員4名で審査委員会を開催した。博士論文について、筆頭著者で3報の査読付き論文を既に専門雑誌で発表しており、それをまとめたものである。また、雑誌へ未投稿の菌叢解析に関する結果についても、近いうちに論文化する予定であるとのことであった。学会発表も複数回行っており、研究者として必要な知識と技術を体得したと考えている。

本論文の内容としては、薬剤耐性菌の分離とその性質の検討から、新しい研究技術である次世代DNAシーケンサを使用した菌叢解析の手法を取入れた分析までと広範囲な技術を使った研究を含んだものである。このように多方面から、畜産領域での薬剤使用の問題を解析してその解決策を提言しているということで、新規性が非常に高く、今後の畜産領域での問題解決につながる研究であると評価できるものである。

以上から、本論文は博士論文として申し分なく、博士後期の教育課程においても優秀な成績を納めていることから、博士の学位を授与するに妥当であることを、審査委員全員一致で結論した。

なお、審査の過程でタイトルを「家畜における薬剤耐性問題と抗菌剤削減を目指した腸内細菌の豚での利用法に関する研究」と、利用法の前に「豚への」を追加した方が良いとの意見が審査委員から出され、全員が同意したことから、タイトルを変更することとした。