



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the risk of emergence of tylosin-resistant <i>Paenibacillus</i> larvae in Japan [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	岡本, 真理子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7216号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93834
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mariko_Okamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：岡本 真理子

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on the risk of emergence of
tylosin-resistant *Paenibacillus larvae* in Japan

（日本におけるタイロシン耐性アメリカ腐蛆病菌の出現リスクの研究）

ミツバチは多くの農作物の花粉交配を担う農業に欠かせない生物資源である。蜂群を崩壊に導く蜂児の細菌性感染症として、*Paenibacillus larvae* (*P. larvae*) によるアメリカ腐蛆病 (AFB) と *Melissococcus plutonius* (*M. plutonius*) によるヨーロッパ腐蛆病が知られている。どちらも家畜伝染病予防法で家畜伝染病に指定されており、発症した蜂群は焼却処分する必要があるため、腐蛆病対策では発症予防が最も重要となる。AFB の制御には抗生物質が使用される場合があるが、AFB の治療にオキシテトラサイクリン (OTC)、タイロシン (TS)、リンコマイシンが使用される北米では、全ての薬剤に対して耐性 *P. larvae* が確認されている。また、一部の OTC 耐性化はテトラサイクリン耐性遺伝子を持ったプラスミドの獲得によるものであることが明らかとなっている。また、ハチミツ中に混入する *Bacillus* 属菌からも同じ耐性遺伝子が検出されていることから、*P. larvae* はハチミツに混入する菌から薬剤耐性遺伝子を受け取り、薬剤耐性化した可能性が示唆されている。

日本ではマクロライド系抗生物質の TS が唯一の承認 AFB 予防薬として使用されている。現時点で TS 耐性 *P. larvae* 株の分離は確認されていないが、今後、国内でも TS 耐性 *P. larvae* が出現する可能性がある。北米で分離された TS 耐性 *P. larvae* の薬剤耐性化メカニズムについては解明されていないが、OTC 耐性化で示唆されたように、*P. larvae* がハチミツ中の細菌からマクロライド耐性遺伝子を受け取り、TS 耐性化する可能性が考えられる。しかし、国産ハチミツに混入する薬剤耐性菌の実態は明らかになっておらず、日本における *P. larvae* の薬剤耐性化リスクは不明であった。そこで本研究では、国産ハチミツに潜むマクロライド耐性菌の存在とその菌が保有する耐性遺伝子による *P. larvae* への影響について調査した。また、ハチミツを用いた腐蛆病菌の TS 耐性化リスクの評価系の開発と、その評価系を用いた国産ハチミツの調査を行った。

第 I 章では、市販の国産ハチミツ 53 ロットから、TS 添加培地を用いて 57 菌種 209 株のハチミツ由来菌を分離した。ほとんどの株は国内で分離された *P. larvae* 株 (TS の最小発育阻止濃度 [MIC] : $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$) よりも低い TS 感受性を示した。TS 低感受性株から代表株を 50 株選択してゲノム解析を行ったところ、全ての株でマクロライド耐性遺伝子を 1 つ以上保有することが明らかとなった。検出された遺伝子のうち、*ermC*、*ermL-ermB*、*lsaB* 及び *oleC* はプラスミドや接合伝達する可動遺伝因子である integrative and conjugative elements 上に位置していたことから、国産ハチミツの中には *P. larvae* に水平伝播する可能性のあるマクロライド耐性遺伝子が存在することが明らかとなった。

これらの遺伝子による *P. larvae* の TS 耐性化の可能性を調べるため、第 II 章では、クローニングベクターを用いて各遺伝子の *P. larvae* 株への導入を試みた。その結果、元の *P. larvae* 株の TS の MIC は $0.25 \mu\text{g/ml}$ であったのに対し、*ermC* 及び *ermL-ermB* を導入した株では、MIC がそれぞれ $8 \mu\text{g/ml}$ 及び $1 \mu\text{g/ml}$ まで上昇した。特に *P. larvae* の TS 感受性に大きな影響を与えた *ermC* は小型の可動性プラスミド pJ18TS1mac 上に位置していたことから、*P. larvae* に水平伝播する可能性が最も高い遺伝子であることが示唆された。pJ18TS1mac を *P. larvae* 株へ人工的に導入したところ、TS に対する感受性が大幅に低下し、MIC が $16 \mu\text{g/ml}$ まで上昇した。先行研究において、日本で承認されている用量と同程度以上の TS を蜂群に与えても、幼虫体内 TS 濃度は $4 \mu\text{g/mL}$ 程度までしか上昇しないことが報告されている。従って、pJ18TS1mac を獲得した *P. larvae* は臨床的にも耐性を示すことが示唆された。また、pJ18TS1mac は TS による選択圧がない条件下でも *P. larvae* の集団内で長期にわたって維持されたことから、本プラスミドによって *P. larvae* が TS 耐性化した場合、TS の有効性を取り戻すことが困難になることが示唆された。

これまで、国内の蜂群における腐蛆病菌やマクロライド耐性遺伝子の蔓延状況について調査された報告は存在しない。また、調査に利用可能な検査法もなかったため、*P. larvae* の TS 耐性化リスクについて予測することは不可能であった。野外では *P. larvae* だけでなく *M. plutonius* も予防薬の影響を受ける可能性があることから、ミツバチの生息環境における薬剤耐性菌のリスク評価には両腐蛆病菌について調査する必要がある。腐蛆病菌は健康な蜂群のハチミツにも混入することが知られており、マクロライド耐性菌もハチミツに混入することから、腐蛆病菌の薬剤耐性化リスクを評価する上でハチミツは最適な材料である。そこで第 III 章では、腐蛆病症例から分離される全ての型の腐蛆病菌を一度に検出し、識別するマルチプレックス PCR を世界で初めて開発した。また、マクロライド耐性遺伝子 *ermC*、*ermB* を検出するリアルタイム PCR を構築した。さらに、ハチミツに混入する細菌からの DNA の抽出には、糞便中の抗酸菌を標的とした DNA 抽出キットであるヨーネスピン ver.2 及びヨーネ・ピュアスピンが最適であることを明らかにした。

これらの技術を用いて、第 IV 章では市販の国産ハチミツ 116 ロットにおける腐蛆病菌とマクロライド耐性遺伝子の混入率を調査した。その結果、94% のハチミツからいずれかの腐蛆病菌が検出され、34.5% のハチミツでは国内で分離される全ての型の腐蛆病菌が同時に検出された。また、91.4% のハチミツからマクロライド耐性遺伝子が検出された。これらの高い検出率は、国内の蜂群には広く腐蛆病菌及びマクロライド耐性菌が蔓延していることを示唆している。さらに、71.6% のハチミ

ツで *P. larvae* と *ermC* が同時に検出されたことから、国内の多くの蜂群では *P. larvae* と *ermC* を保有する菌が同時に存在し、TS 耐性 *P. larvae* が出現するリスクが高いことがわかった。そのような蜂群で予防薬を使用した場合、TS 耐性 *P. larvae* を選択し、蔓延させる可能性がある。

本研究より、国産ハチミツの中には *P. larvae* に予防薬耐性を与えるマクロライド耐性遺伝子を保有する菌が存在することが明らかとなった。また、国内の多くの蜂群において TS 耐性 *P. larvae* が発生する可能性が高い状況にあることが示唆されたため、唯一の AFB 予防薬である TS の有効性を維持するためには、より慎重な抗生物質の使用が求められる。本研究は、予防薬の有効性の維持による持続可能な AFB 対策の実践に資する知見と技術を提供するものであり、個々の蜂群や養蜂場に応じた予防薬の必要性和危険性を判断する指標を提供することで、適切な飼養衛生管理とさらなる養蜂技術の向上に貢献する研究であると考えられる。