HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the risk of emergence of tylosin-resistant Paenibacillus 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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：岡本　真理子

審査委員

主査	教授	迫田　義博
副査	教授	中島　千絵
副査	准教授	佐藤　豊孝
副査	准教授	磯田　典和

学位論文題名

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）

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）が知られている。AFB の治療に抗生物質が使用される海外では薬剤耐性 *P. larvae* の出現が問題になっており、*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。日本では発症蜂群は焼却処分するため、治療に抗生物質は使われないが、予防目的でマクロライド系抗生物質のタイロシン（TS）が唯一承認され、使用されている。日本では TS 耐性 *P. larvae* 株の分離は確認されていないが、今後、国内でもハチミツ中の細菌が原因となり *P. larvae* が 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や蜂群における *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、その菌が持つ耐性遺伝子による *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、TS 添加培地を用いて市販の国産ハチミツ 53 ロットから 209 株の菌を分離した。多く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]：≤ 0.25 μg/ml）よりも低い TS 感受性を示した。TS 低感受性菌のゲノム解析の結果、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 上にマクロライド耐性遺伝子（*ermC*、*ermL-ermB*、*lsaB* 及び *oleC*）が見つかり、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。

上記遺伝子による *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を *P. larvae* 株へ導入した。結果、*ermC* および *ermL-ermB* を導入した株では、TS の MIC がそれぞれ 8 μg/ml 及び 1 μg/ml まで上昇した。最も TS 耐性化に寄与した *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 の MIC が 16 µg/ml まで上昇し、臨床的にも耐性を示すことが示唆された。また、pJ18TS1mac は *P. larvae* の集団内で長期にわたり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と予想された。

ハチミツを用いた *P. larvae* の TS 耐性化リスク評価系を構築するため、第 III 章では、国内で分離される全ての型の腐蛆病菌を一度に識別するマルチプレックス PCR と、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 を開発した。ハチミツに混入する細菌からの DNA 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、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* を持つ菌が同時に存在し、TS 耐性 *P. larvae* が発生するリスクが高いことがわかった。

本研究より、国産ハチミツの中には *P. larvae* に TS 耐性を与えるマクロライド耐性遺伝子を持つ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* が出現する可能性が高いことが示唆されたため、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と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。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 岡本 真理子 氏 が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。