水圏環境の薬剤耐性菌・耐性遺伝子

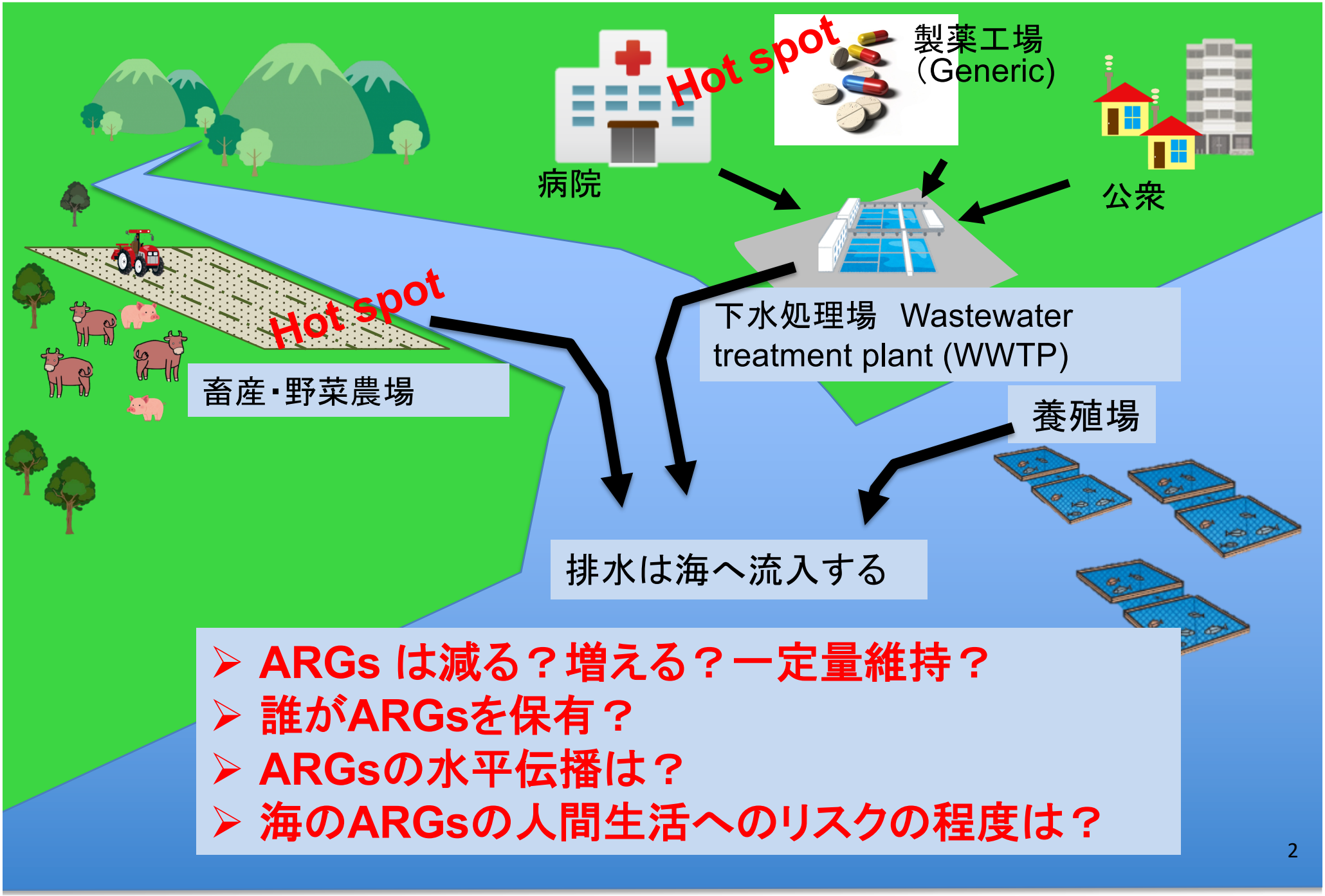
1. マダイ腸内、飼育水中でのテトラサイクリン耐性遺伝子の変遷
2. 環境条件と細菌群集変化、遺伝子伝播
3. 水圏環境の耐性遺伝子と人間との関わり

鈴木　聡
愛媛大学沿岸環境科学研究センター
(http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~mme/)

愛媛大学
EHIME UNIVERSITY

EHIME UNIVERSITY
CMES
CENTER FOR MARINE ENVIRONMENTAL STUDIES

Antibiotic Resistance Genes (ARGs)のシンク



- ARGs は減る？増える？一定量維持？
- 誰がARGsを保有？
- ARGsの水平伝播は？
- 海のARGsの人間生活へのリスクの程度は？

1. マダイ腸内、飼育水中でのテトラサイクリン耐性遺伝子の変遷（最近の研究結果）

養殖魚の疾病対策で抗生物質投与

- オキシテトラサイクリンなど
- エサに混ぜて撒く

↓

魚類腸内に薬剤耐性菌増加？

↓

糞で水の中に排出

↓

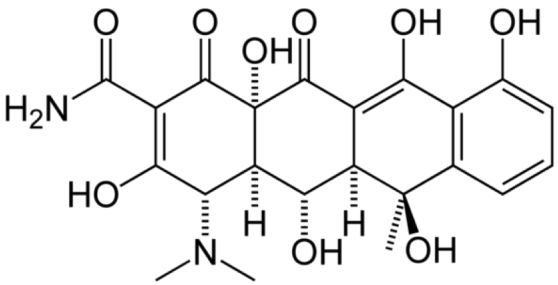
海水中に薬剤耐性菌・耐性遺伝子拡散？

- 海水中で維持される？
- 環境中の微生物群集に耐性伝播する？
- 周辺海域にも拡散？
- 薬剤投与をやめた後は？

テトラサイクリン耐性遺伝子

オキシテトラサイクリン（OTC）

水産養殖でよく使用されるテトラサイクリン系抗生物質
細菌のリボソーム30Sユニットに結合してタンパク質合成を阻害



テトラサイクリン耐性遺伝子

耐性機構3種類、耐性遺伝子は現在45種既知

Efflux (n = 30)	Ribosomal protection (n = 12)	Enzymatic (n = 3)	Unknown
tet(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E)	*tet*(M), *tet*(O), *tet*(S), *tet*(W), *tet*(32)	*tet*(X)†	*tet*(U)‡
tet(G), *tet*(H), *tet*(J), *tet*(V), *tet*(Y)	*tet*(Q), *tet*(T), *tet*(36)	*tet*(34)	
tet(Z), *tet*(30), *tet*(31), *tet*(33), *tet*(47)	*otr*(A), *tetB*(P)§, *tet*	*tet*(37)†	
tet(35)¶	*tet*(44)		
tet(39), *tet*(41)			
tet (K), *tet*(L), *tet*(38), *tet*(45)			
tetA(P), *tet*(40)			
otr(B), *otr*(C)			
*tcr*3			
tet(42)			
tet(43)			
*tet*AB(46)#			

薬剤排出

リボソーム保護

薬剤不活化酵素

† *tet*(X) and *tet*(37) are unrelated but both are NADP-requiring oxidoreductases: *tet*(34) similar to the xanthine-guanine phosphoribosyl transferase genes of *Vibrio cholera*.

‡ *tet*(U) has been sequenced but does not appear to be related to either efflux or ribosomal protection proteins (http://faculty.washington.edu/marilynr/).

§ *tetB*(P) is not found alone and *tetA*(P) and *tetB*(P) are counted as one operon.

¶ Not related to other *tet* efflux genes.

Two genes needed for resistance *tet*AB(46) (http://faculty.washington.edu/marilynr/).

Roberts & Schwarz (2016) J. Environ. Qual. 45:576-592

本研究の目的と概要

目的

OTC投与により　**魚類腸内に薬剤耐性菌・耐性遺伝子が増加するか？**

海水中への薬剤耐性菌・耐性遺伝子拡散につながるか？

本研究の概要

マダイに**オキシテトラサイクリン（OTC）**を投与して飼育

マダイ腸内・**飼育海水中**の

- **テトラサイクリン耐性遺伝子（*tet*遺伝子）群の濃度・組成**
- **微生物群集構造**

➢ OTC投与の前・直後・数週間後での変遷

➢ OTC投与　なし(Control)／あり(低，L))／あり(高，H)で比較

【方法】マダイOTC投与試験 飼育条件と実験区の設定

供試魚：マダイ（*Pagrus major*）体長15cm程度の若魚

飼育条件

飼育環境：1,000 L容樹脂製水槽、
エアレーションあり、14h明／10h暗

飼育水：濾過海水
（静岡県大井川港内護岸より揚水→ 砂濾過
→ PP糸製10μmおよび1μmフィルター濾過）
流水式（1分あたり約6 L）、換水率 約 8.6 回/日

給餌：1日1回 体重の2%

@いであ株式会社 環境創造研究所（静岡県焼津市）

OTC投与飼料

配合飼料に、水に溶かしたOTCを吸着させ、
表面を油脂でコーティング（OTC散逸防止）

非投与区飼料

低OTC区飼料

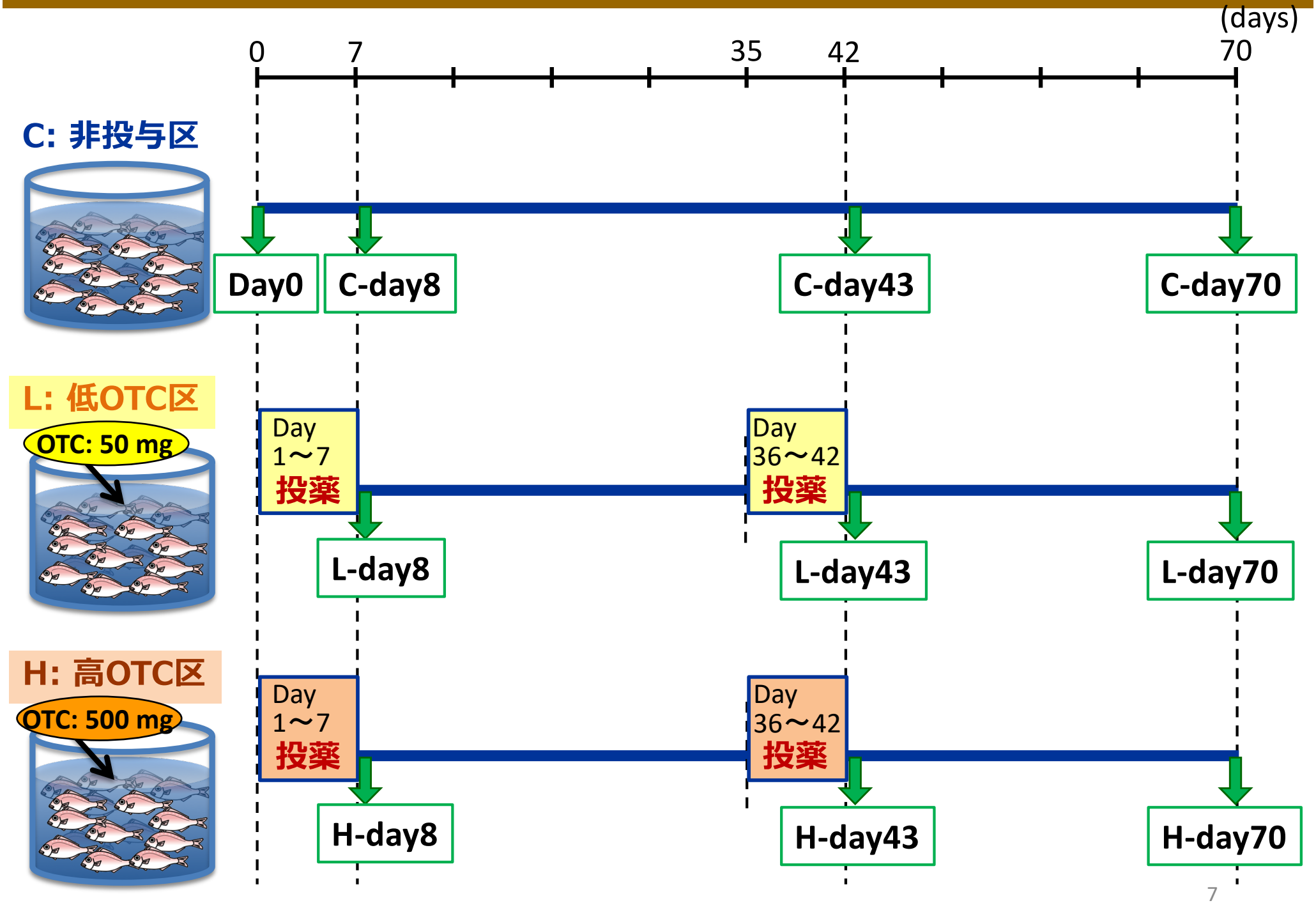
高OTC区飼料

実験区の設定　投与開始時魚体数は各区50匹

- C ● **非投与区**（OTCなし）
- L ● **低OTC区**（OTCとして 50 mg/魚体kg/日）←水産用OTC の通常の用法・用量
- H ● **高OTC区**（OTCとして 500 mg*/魚体kg/日）

*事前検討試験で、高OTC区飼料のOTC濃度測定値は理論値の35%

【方法】マダイOTC投与試験 タイムスケジュール



【方法】試料・測定項目

飼育海水（W）

40 mL
↓
孔径0.2μmのフィルター上に
微生物を濾過捕集

（各群 triplicate）

↓

DNA抽出

↓

マダイ腸内（G）

腸管摘出
（肛門側）

↓

腸内容物を採集　50~100 mg/個体

（各群 4～7個体）

↓

DNA抽出

↓

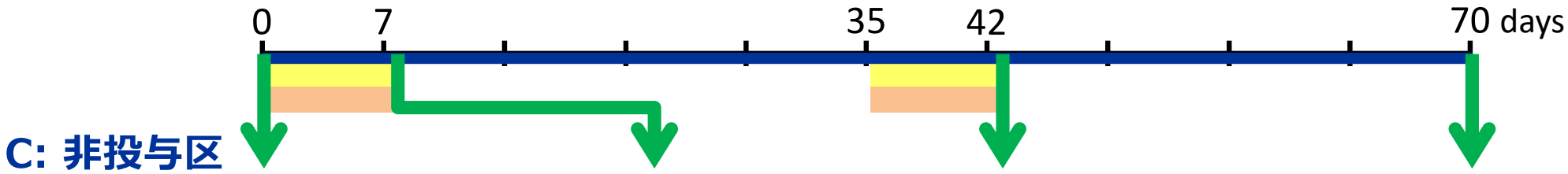
- **テトラサイクリン耐性遺伝子・16S rRNA遺伝子の定量（リアルタイムPCR）**
  - *tet*(B)
  - *tet*(C)
  - *tet*(E)
  - *tet*(M)
  - *tet*(S)
  - *tet*(W)
  - 16S rRNA gene

  tet(B)～*tet*(E)：薬剤排出
  tet(M)～*tet*(W)：リボソーム保護

  各コピー数定量後、
  16S rRNA遺伝子のコピー数で正規化

- **微生物群集構造解析（16S rRNA遺伝子V3-V4領域でのNGSメタゲノム解析）**

1．飼育水中の*tet*遺伝子群（結果）



Tet(M)と*tet*(B)は飼育水中に最初から検出され、8日目にやや増加した

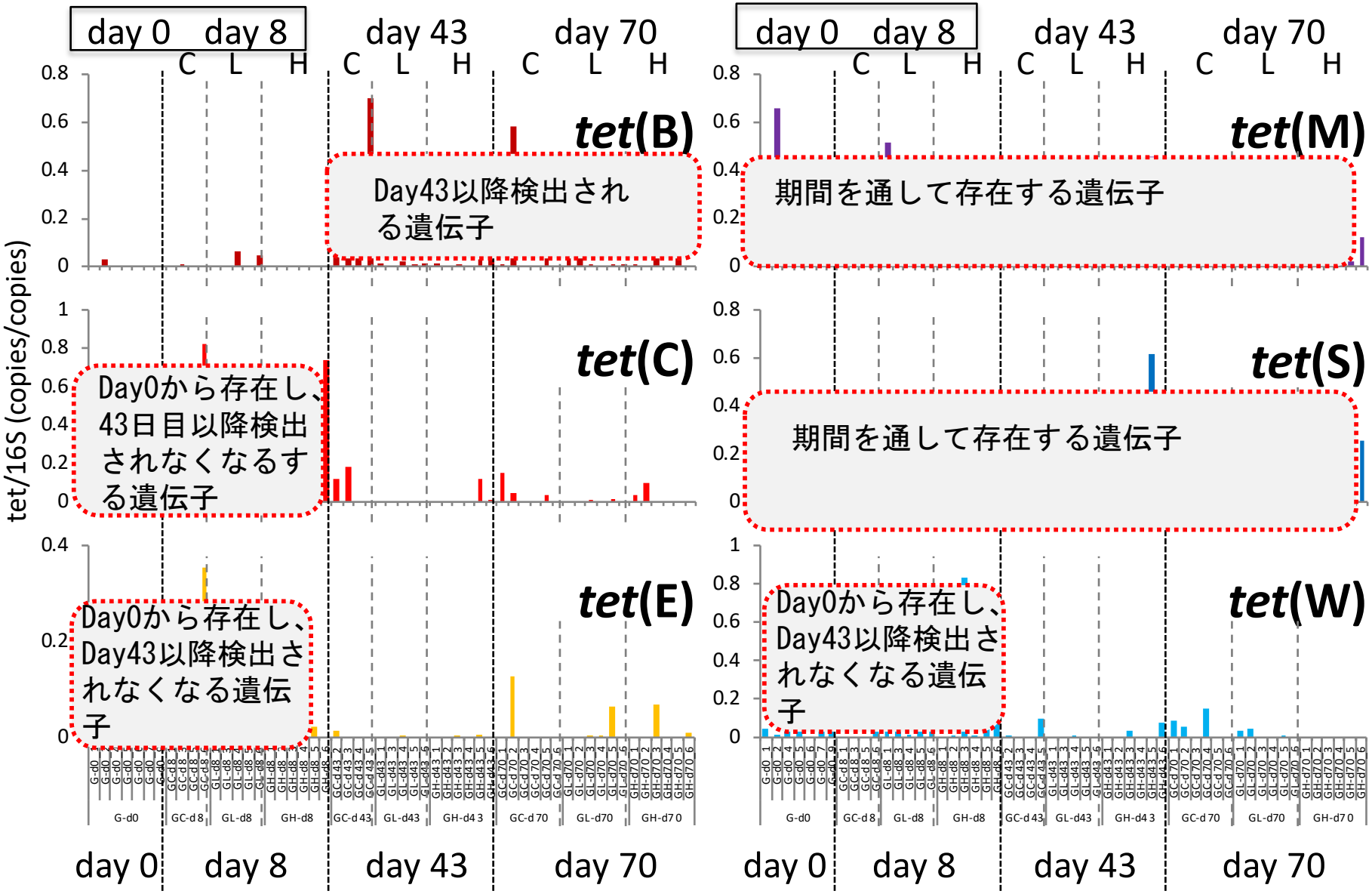
L: 低OTC区

H: 高OTC区

8日めでは、投与量濃度依存的に*tet*(M)、*tet*(B)量は多かった ⇨ 42日目、70日目には最初の状態まで減少した。

（未発表データ）

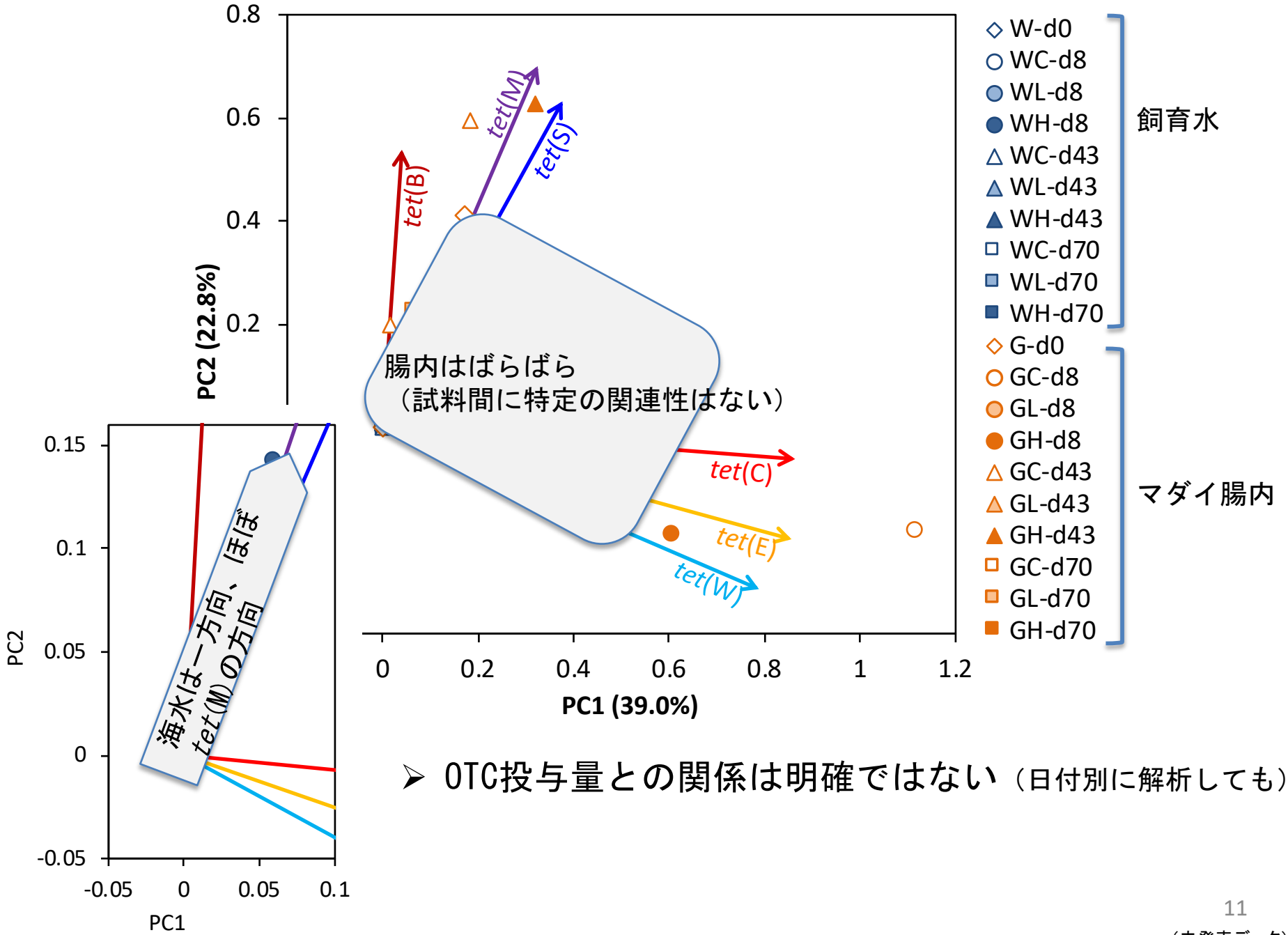
2-1. マダイ腸内の*tet*遺伝子群（遺伝子ごとの結果）



➢ 各遺伝子で、非投与(C)・低濃度投与(L)・高濃度投与(H)間では差がない

（未発表データ）

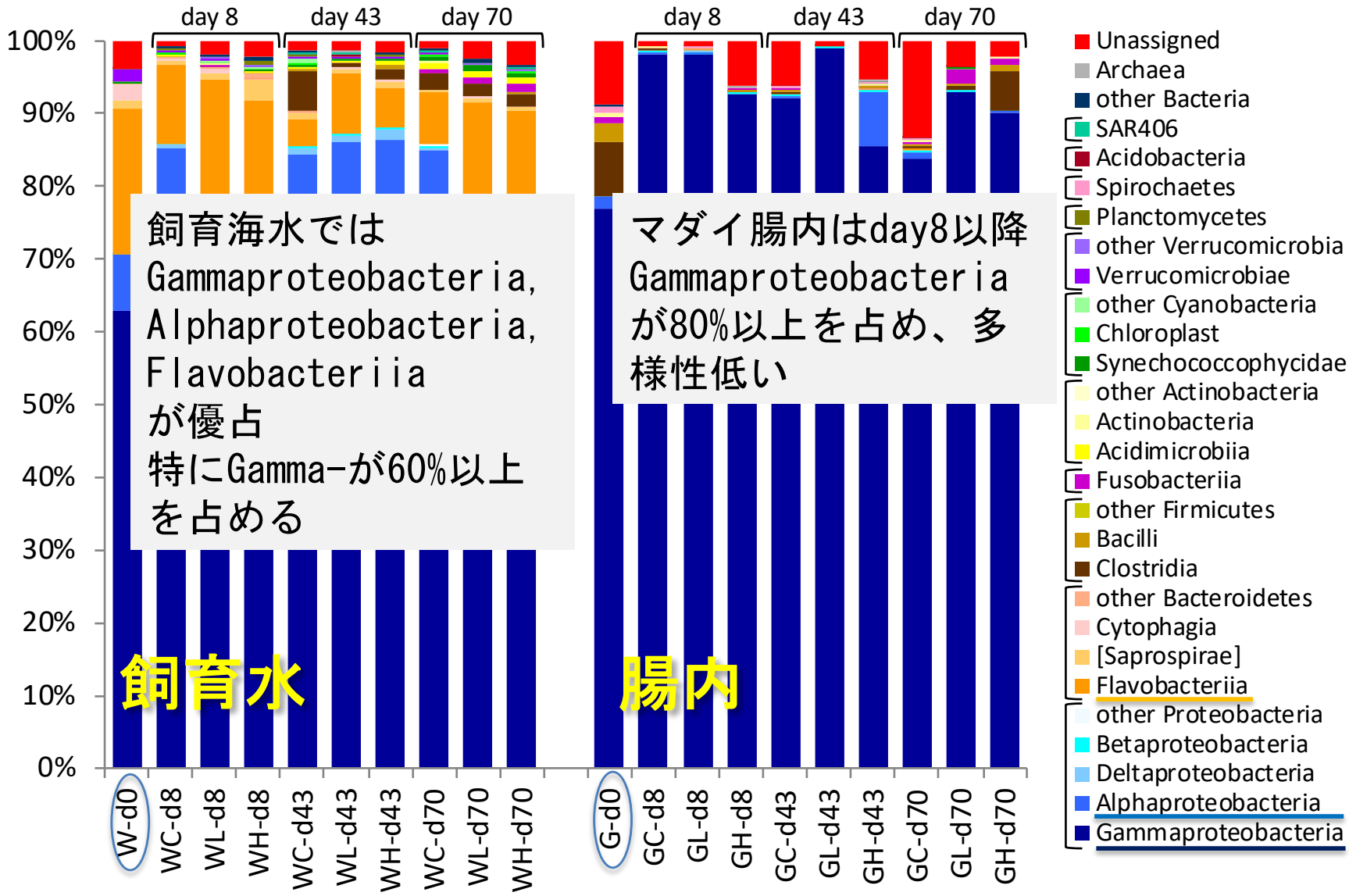
3. *tet*遺伝子組成による試料の位置づけ -主成分分析-



➢ OTC投与量との関係は明確ではない（日付別に解析しても）

（未発表データ）

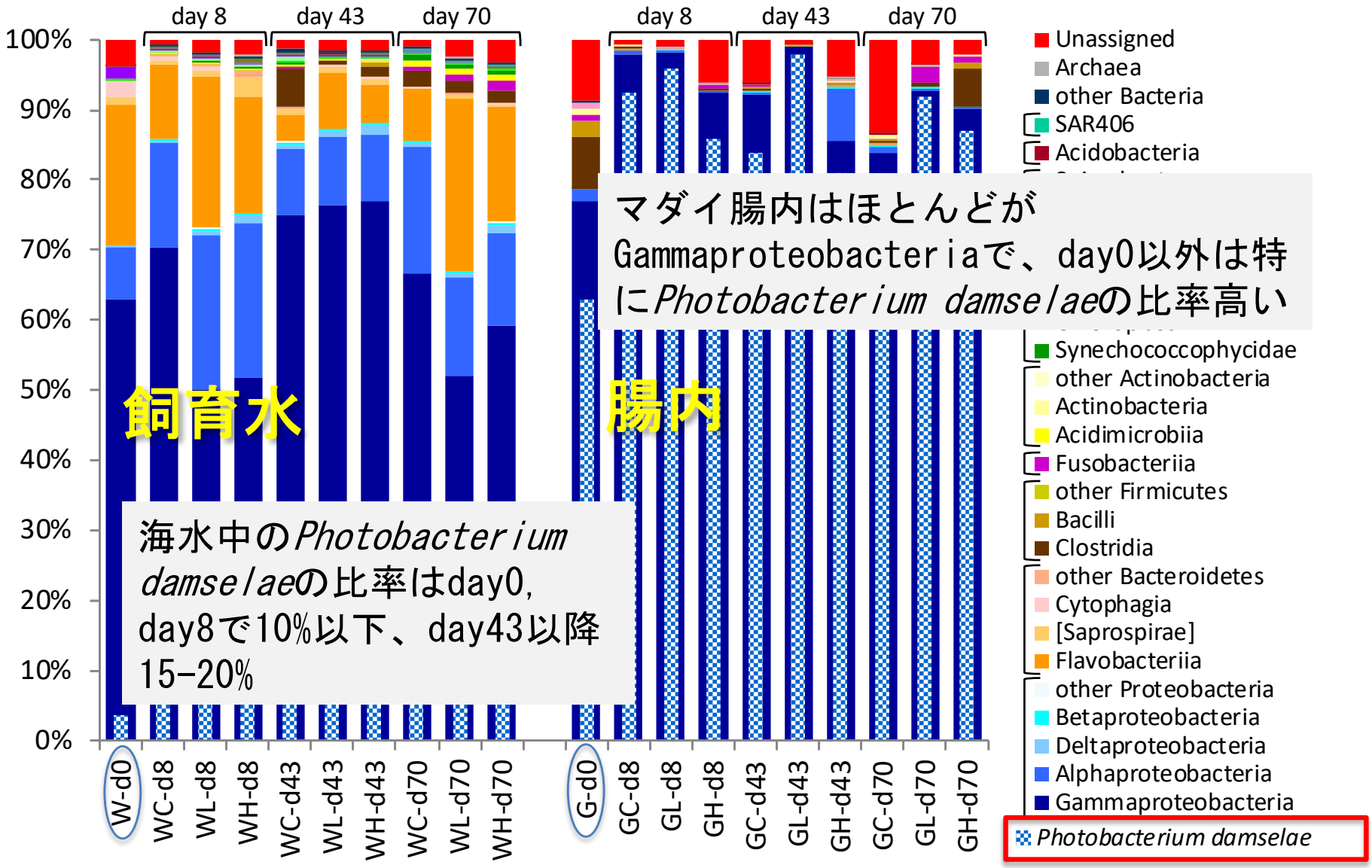
4．原核微生物群集-1



- 飼育海水中の群集は、天然海水中の微生物＋魚の糞由来微生物か

（未発表データ）

4．原核微生物群集-2



- day 43 以降で腸内の*tet*遺伝子パターンが変化したが、腸内細菌叢の変化とは一致しない。特定の菌ではなく、種々の菌種が*tet*を保有

（未発表データ）

マダイ腸内、飼育水中でのテトラサイクリン耐性遺伝子の変遷
まとめ

薬剤投与により、魚類腸内に耐性遺伝子が増えるか？

- *Tet* 4種では、非投与区と投与区（L，H）とで明確な差は見られず

薬剤投与により、魚類腸内の細菌叢が変わるか？

- ほとんど変化なし

薬剤投与により、海水中に耐性遺伝子が増えるか？

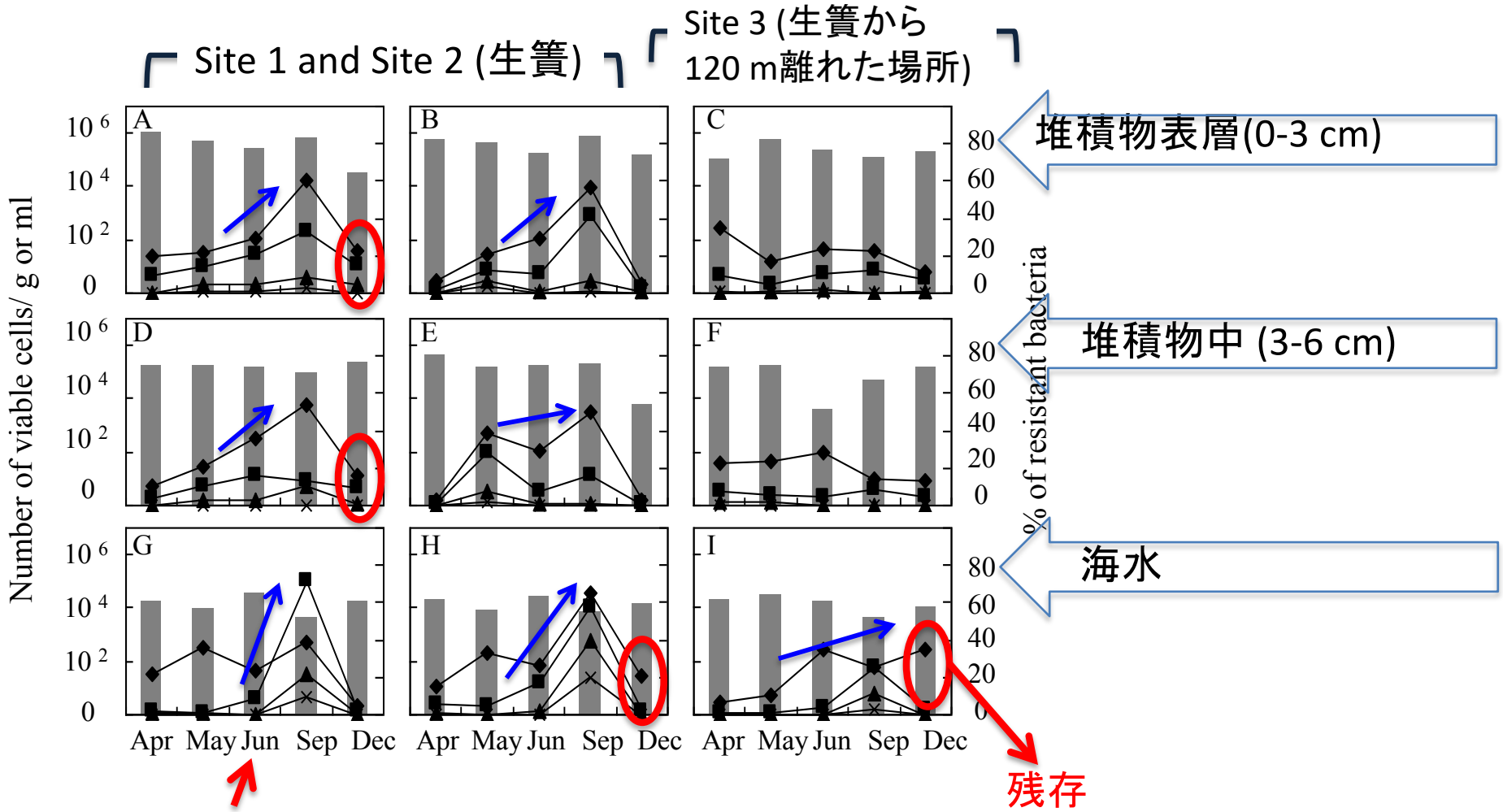
- 1回目投与直後の海水中では、*tet*(M)，*tet*(B)で、投与濃度依存的に高値
  - ⇨海水への直接的効果か、腸内を経た変化かは不明

海水への影響は、薬剤投与をやめた後も維持されるか？

- 投与後4週間経過後には、非投与・投与で差は見られず
  - ⇨影響は維持されてはいない　（次の項目で現場の結果を示す）

耐性遺伝子は、種々の伝達因子に担われており、それらが種々の細菌種に保有されているため、特定の傾向での変化が現れない可能性あり

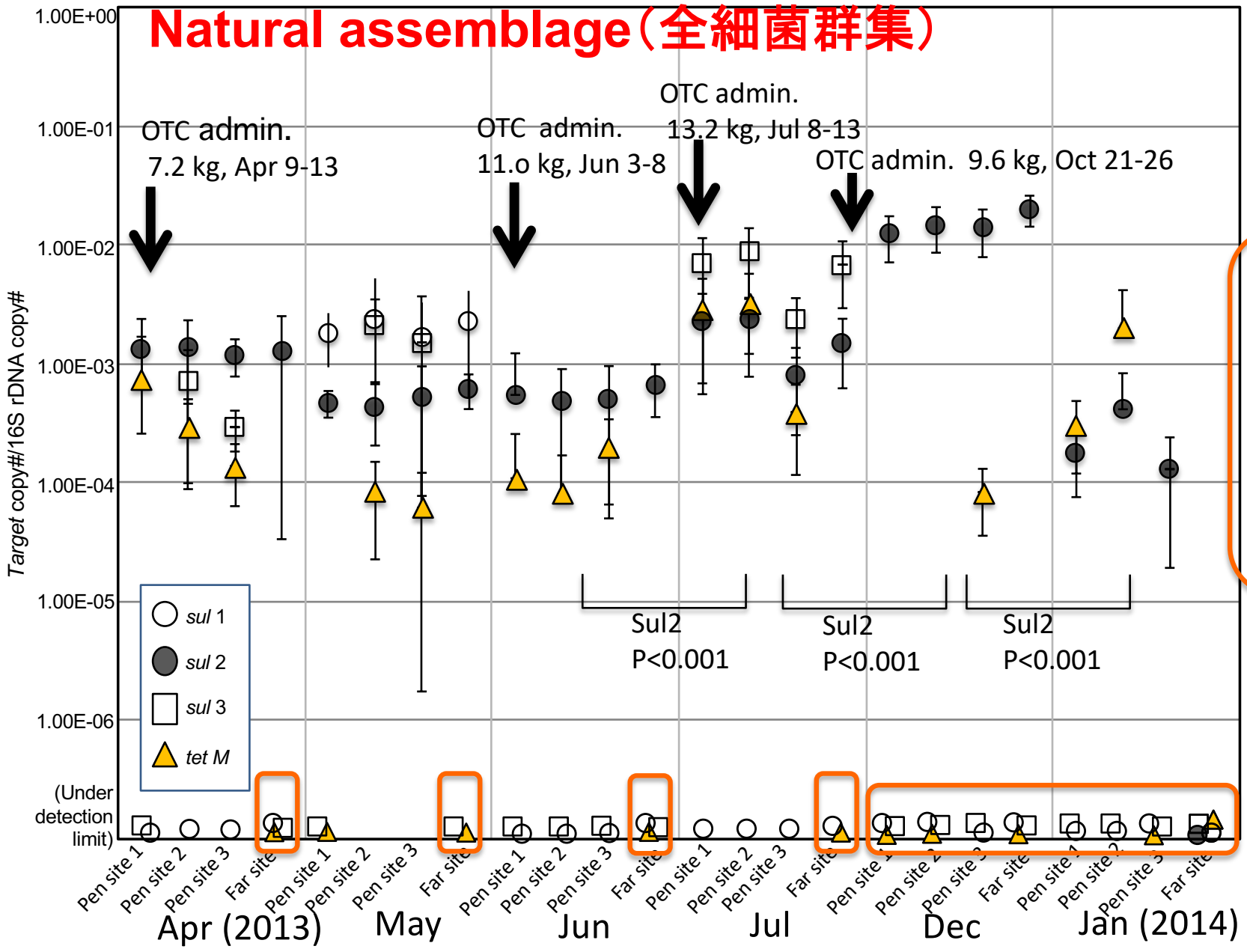
OTC耐性菌の環境残存（香川県瀬戸内海）



Nonaka L et al (2007) Microbes Env, 22, 355.

- 環境中には耐性菌が常在しており、薬剤投与後即座に増加する.
- 生簀から離れた場所では増加なし、または遅い.
  - ⇨ OTC耐性菌増加には薬剤投与が影響する.

養殖場海水中の耐性遺伝子量（愛媛県宇和海）



結果：

1．*sul2*は通年10^{-3}以上検出

2．*sul 1*と *sul3* はほとんど不検出

3．*Tet*(M)は通年で生簀近傍に存在

4．生簀遠隔サイトでは非検出

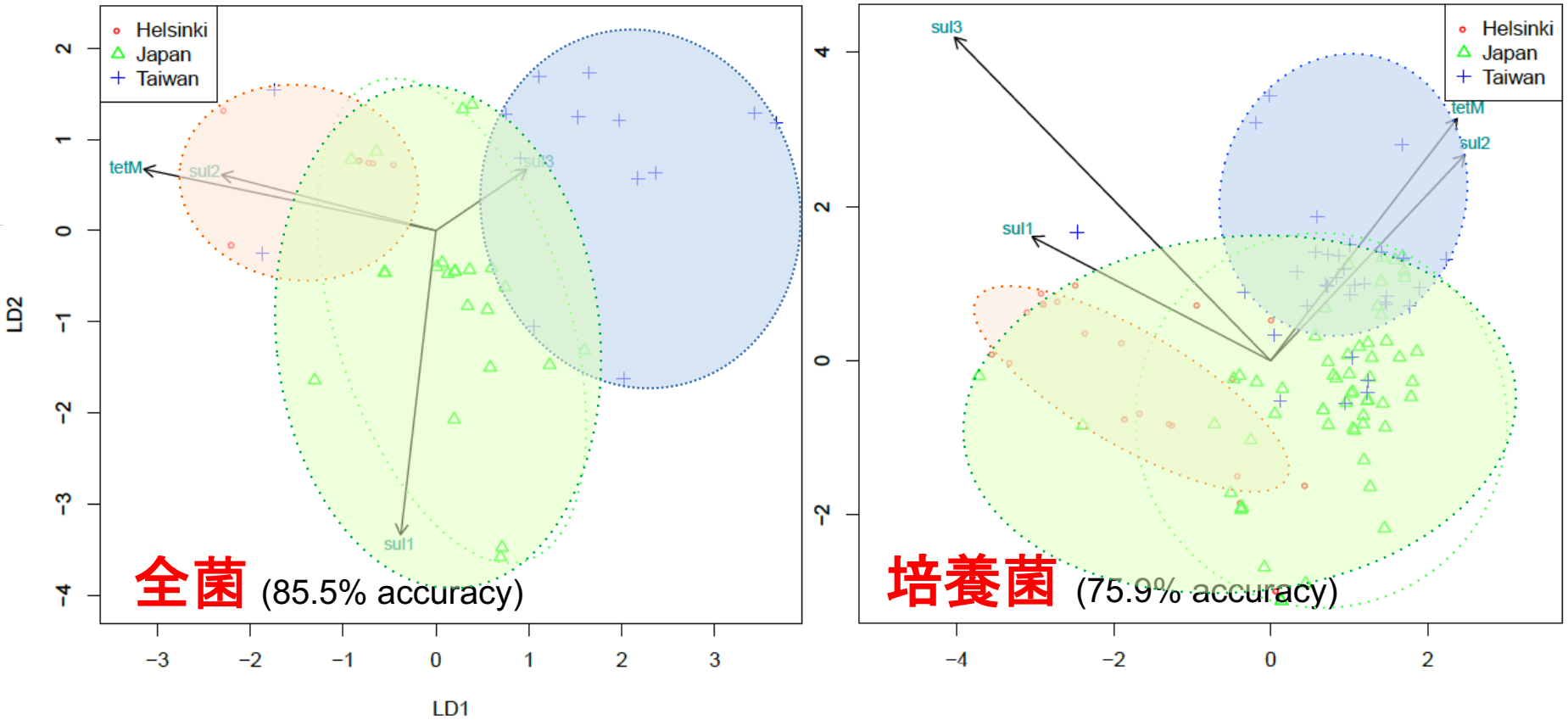
5．12，1月には非検出サイトあり

＊*sul2*は普遍的に存在

＊ARGsは通年で変化

未発表データ

３カ国の養殖場の判別分析　Discrimination profiling: Japan, Taiwan and Finland



主座標の正準相関分析Canonical analysis of principal coordinates by discriminant analysis
(*sul1, 2, 3* および *tet*(M)のコピー数に基づく)
⇒ “全細菌群集”と“培養細菌群集”両方において3カ国は別の集団を示した.
In both “natural assemblage” and “culturable bacteria”, different clustering was found among countries.

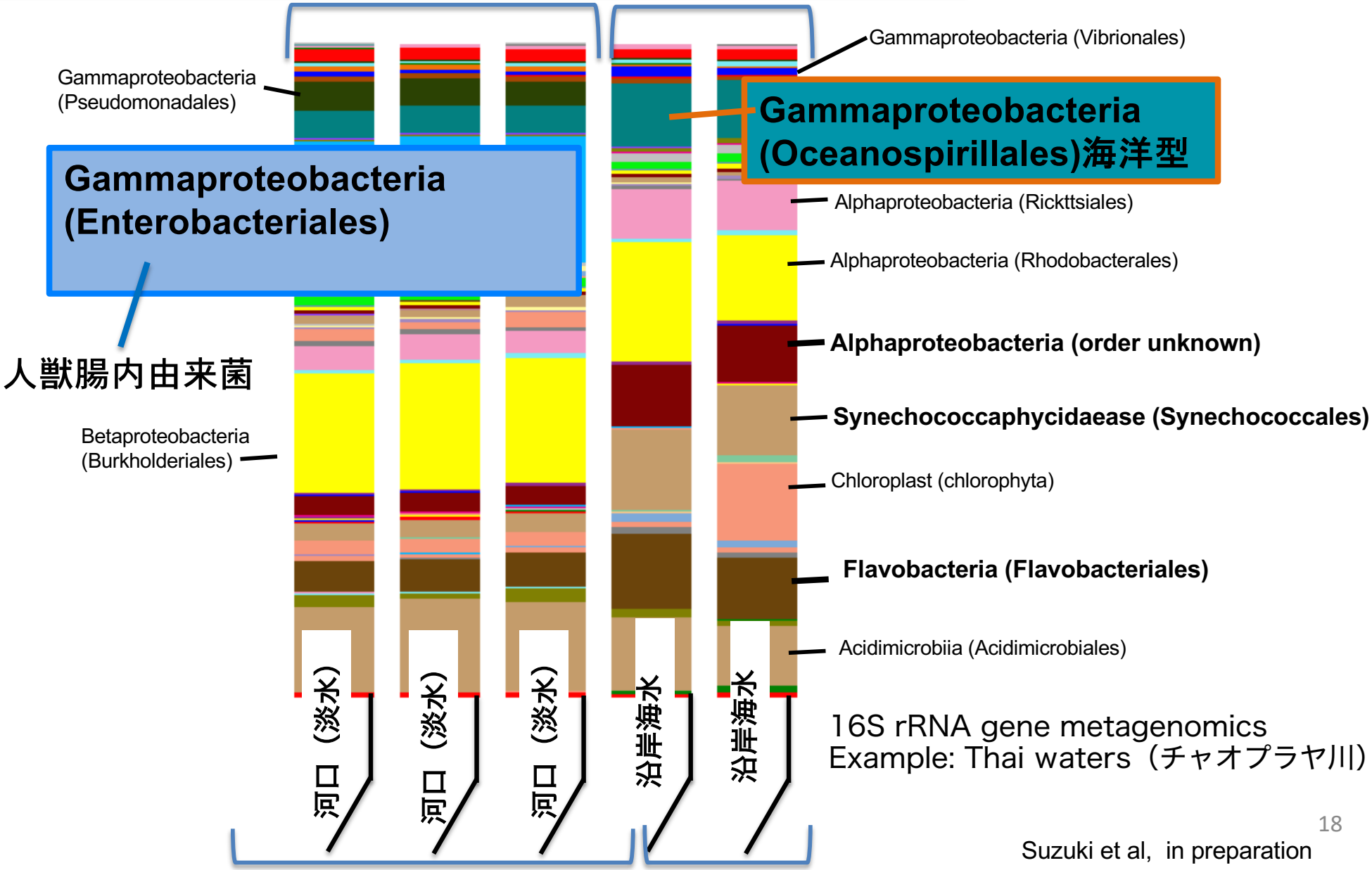
＊耐性遺伝子は国ごと(環境ごと)に特徴的. Non-culturable菌群の違いか？

Aquaculture sites in three countries show specific characters in the ARGs profile.

未発表データ

2. 環境条件と細菌群集、遺伝子伝播の変化

2-1. 淡水から海水へ：菌叢は大きく変化

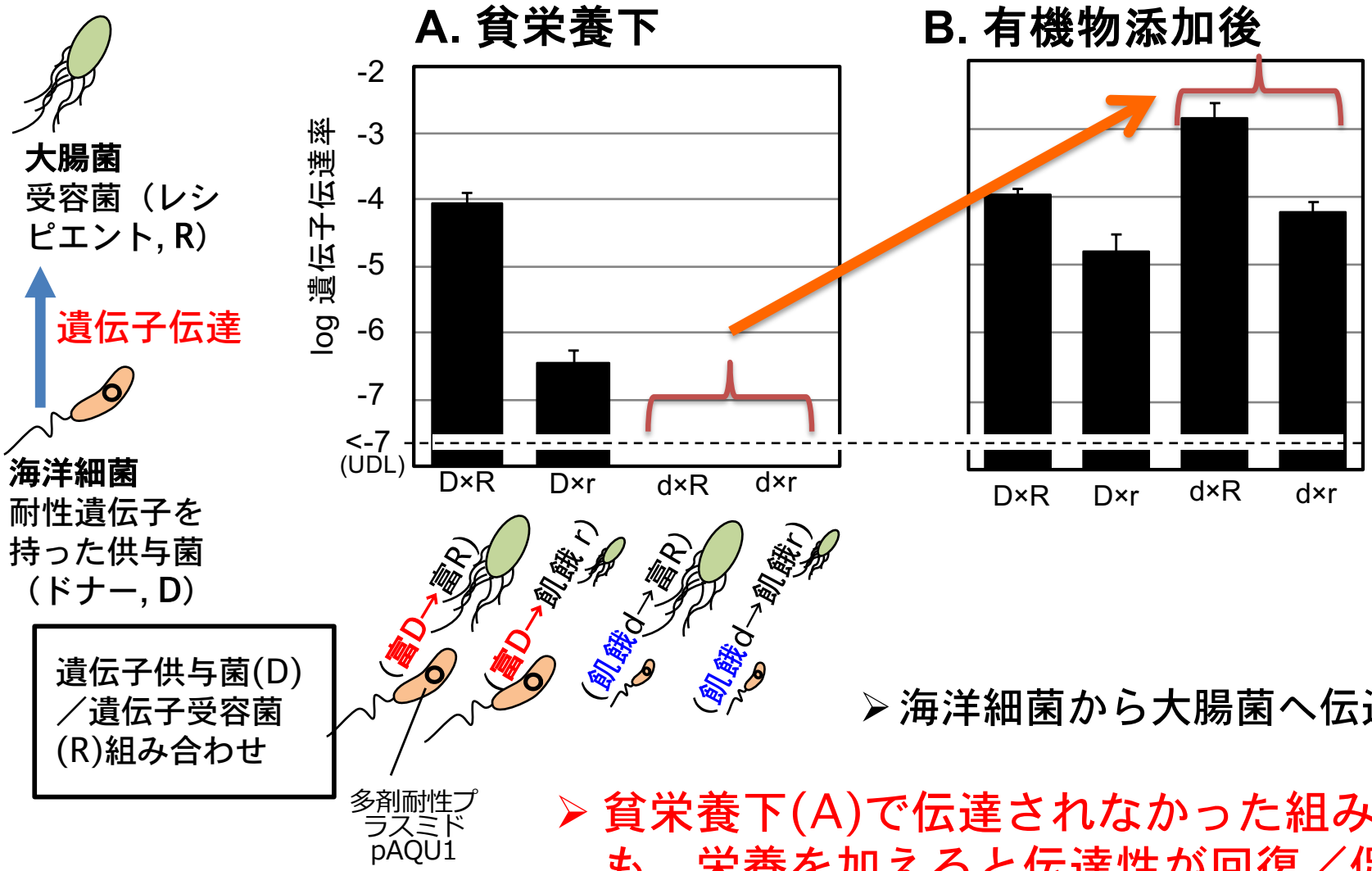


16S rRNA gene metagenomics
Example: Thai waters（チャオプラヤ川）

Suzuki et al, in preparation

2-2. 貧栄養環境での遺伝子水平伝達

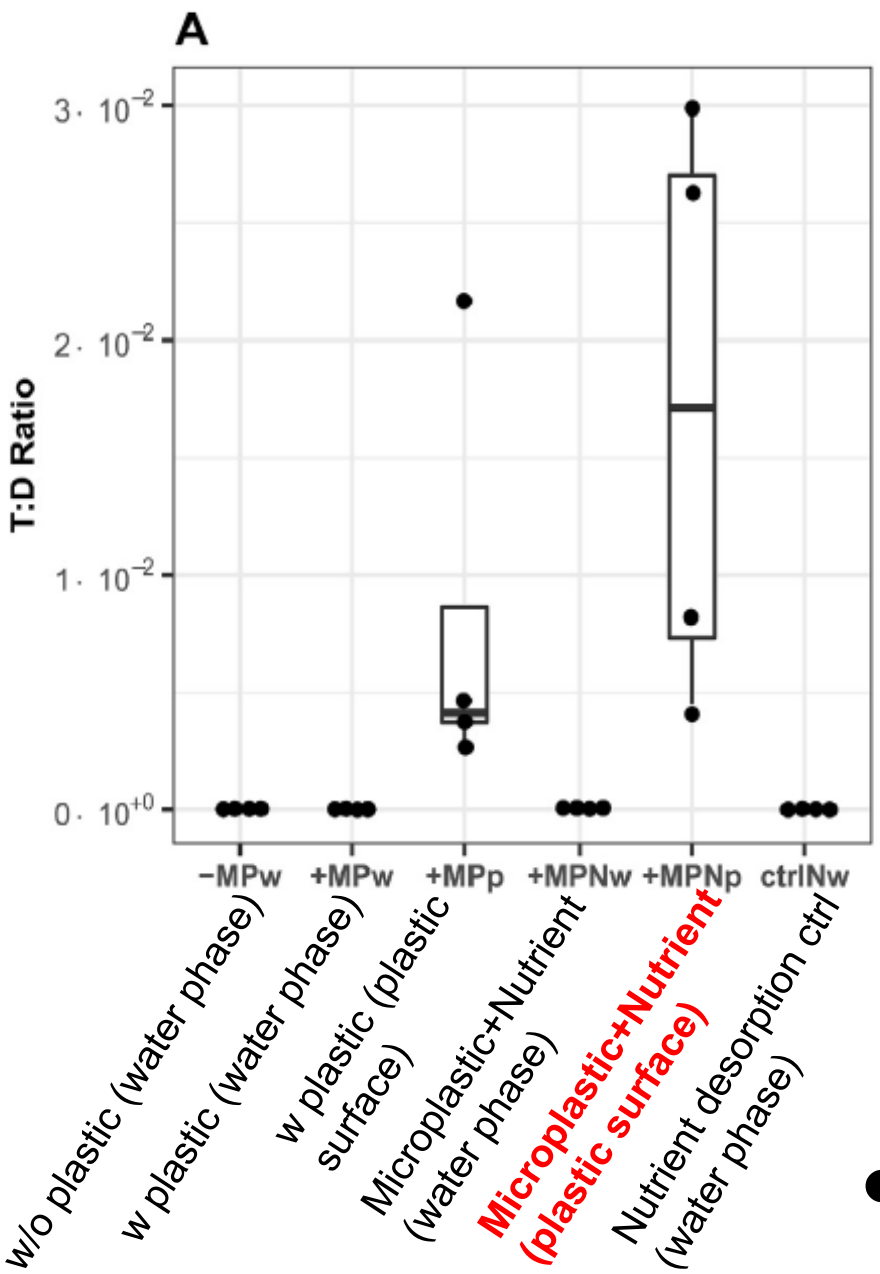
遺伝子水平伝達と有機物
（富栄養菌、飢餓菌）の（富栄養環境、貧栄養環境）での*tet*(M)伝達率

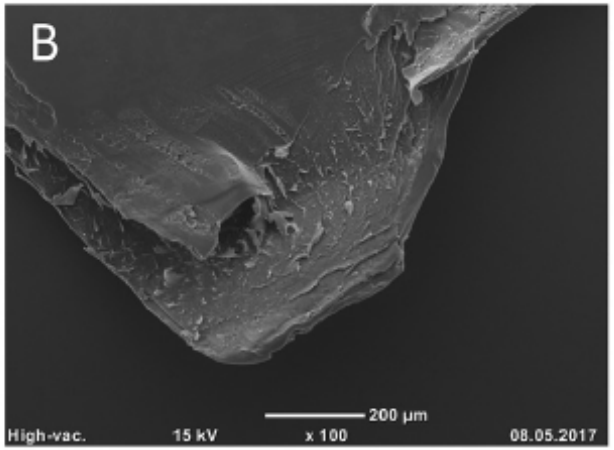


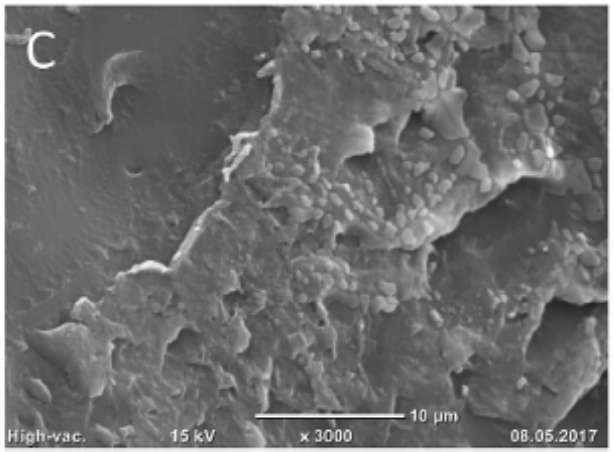
- 海洋細菌から大腸菌へ伝達する
- 貧栄養下(A)で伝達されなかった組み合わせでも、栄養を加えると伝達性が回復／促進(B)

Kohyama and Suzuki (in preparation)

最近報告例が出された





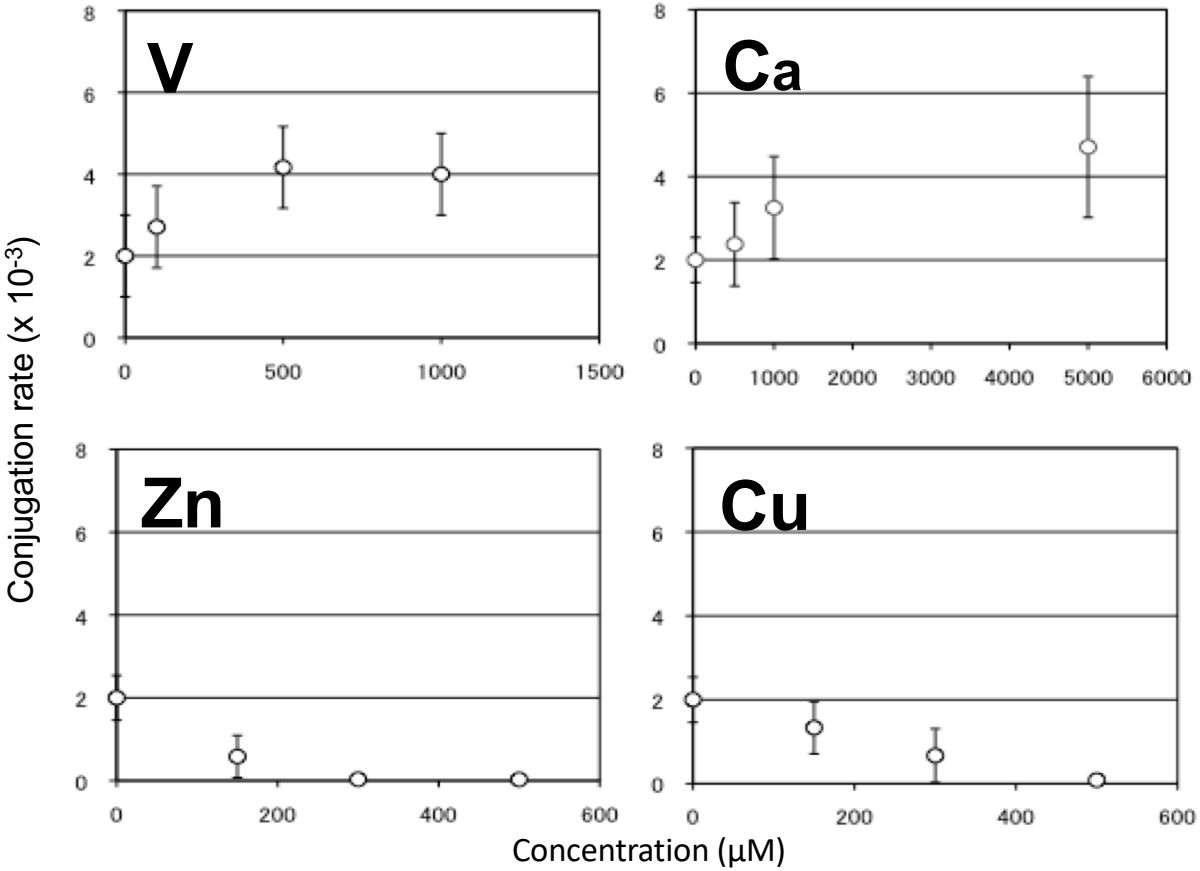


Arias-Andres, M. et al (2018) Environ. Int., 237, 253-261

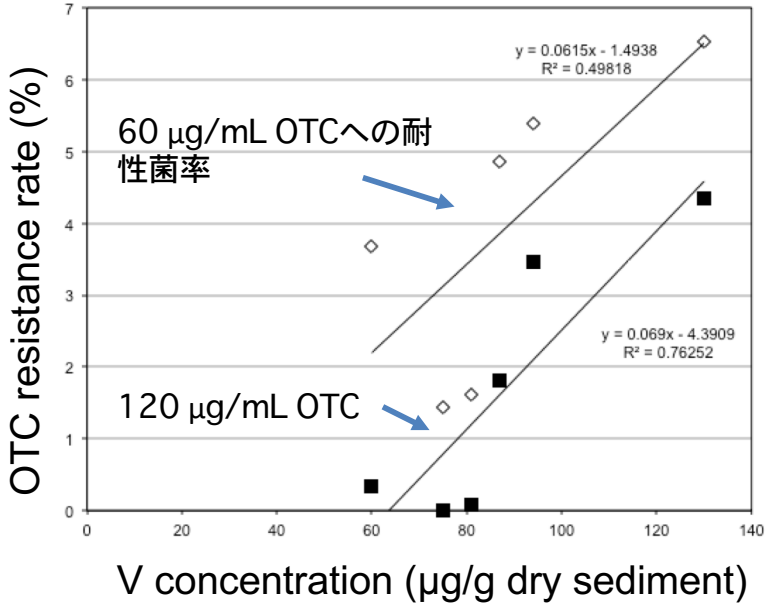
- 有機物存在下では、マイクロプラスチック表面での遺伝子伝達率が上昇する

2-3. 金属でも遺伝子伝播は促進される

***Photobacterium* と*E. coli* 間での実験的遺伝子伝達**



海洋堆積物中のバナジウム濃度とOTC耐性菌率
(東京湾から太平洋へのトランセクト)



Suzuki et al (2012) FEMS Microbiol Lett, 336, 52-56

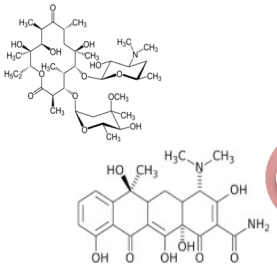
- 実験的に金属によっては遺伝子伝達を促進する効果がある
- 海洋堆積物中のV濃度とOTC耐性率に正の相関

⇨ 環境中には遺伝子伝播を促進する要因・因子がある

3. 水圏環境の耐性遺伝子と人間との関わり

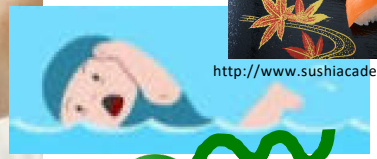
明らかにしてきたこと

- 水環境で耐性遺伝子は普遍的に存在
- 水圏の未培養菌が耐性遺伝子を保有
- 環境条件で遺伝子伝達変化

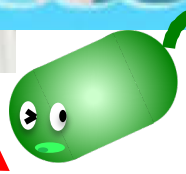


環境への流出
(抗菌剤、病原細菌)

臨床へ侵入



http://www.sushiacademy.co.jp/archives/12324



環境の耐性遺伝子へ暴露？

遺伝子残存・混合と伝播

- 病原細菌・腸内細菌と環境常在のyet-to-be cultured細菌の出会い
- 水圏環境（淡水・海水）＋金属, 有機物

Pruden et al (2013) Environ. Health Perspect., 121, 878-885.

Suzuki et al (2012) FEMS Microb. Lett., 336, 52-56.

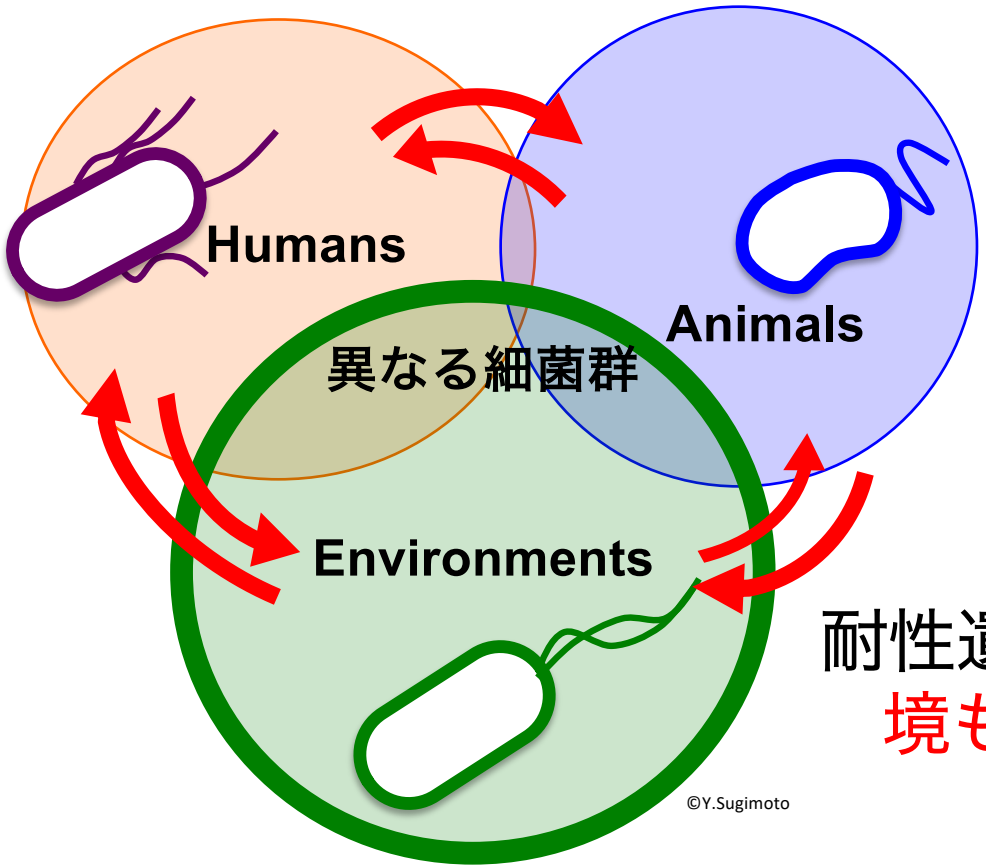
耐性遺伝子の残存

Tamminen et al (2011) Environ. Sci. Technol., 45, 386-391.

リスク低減策の例

- 過剰投与の防止法令（アクションプランに明記された）
- 下水処理技術の向上
- 遺伝子侵入を減らす衛生教育・啓蒙

まとめ：　耐性遺伝子は循環する

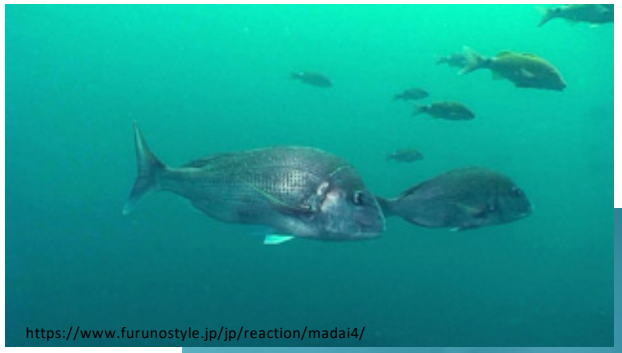


耐性遺伝子の循環では環境も重要なリザーバ？

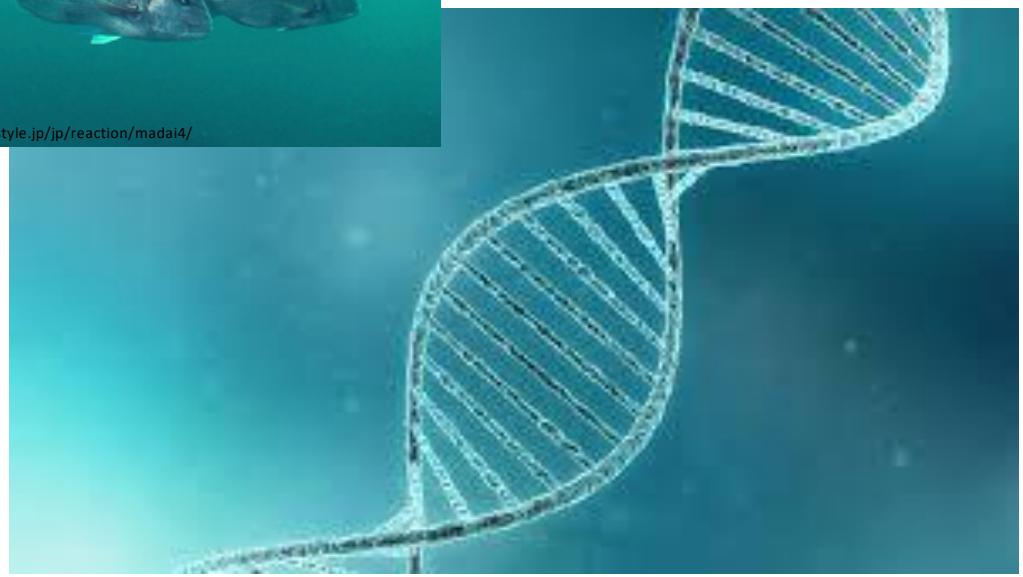
結論：海洋環境は単に人間環境由来耐性遺伝子のシンクの場としてだけではなく、変異・伝播・保存などリンクの場として機能している。

宇和海養殖マダイ腸内および海水中のレジストーム：予報

（Resistome in read seabream intestine and seawater: Preliminary study）



https://www.furunostyle.jp/jp/reaction/madai4/

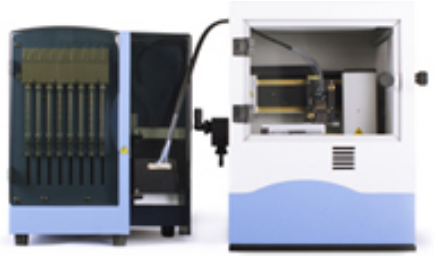


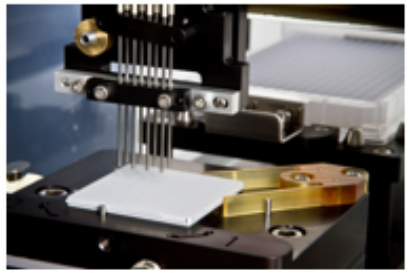
https://news.yahoo.co.jp/byline/yanagitaemmy/20180214-00081621/

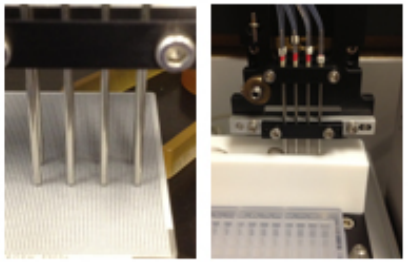
Q. 実際に、海水中や魚の腸内にはどんな耐性遺伝子があるのだろうか？
研究標的には何がよいか？

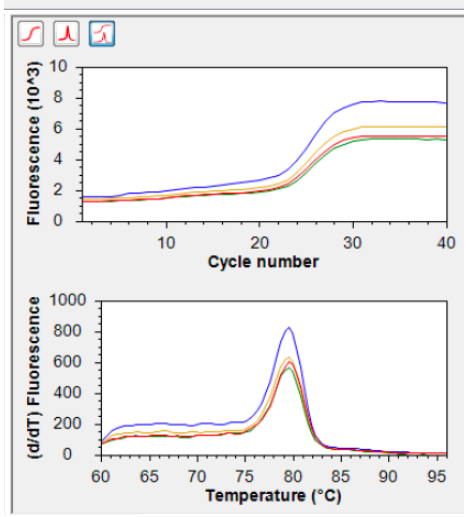
qPCR array法

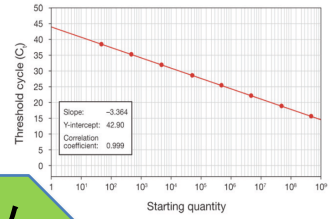
SmartChip qPCR (WaferGen Biosystem)











DNA試料精製

反応液調製

ナノ分注（試料）

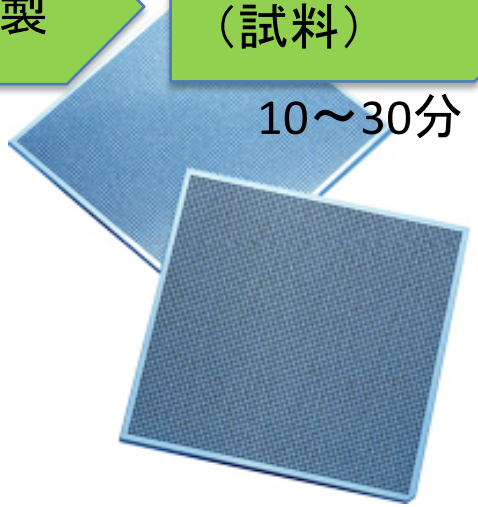
10～30分

ナノ分注（Primer/Probe）

10～30分

リアルタイムPCR

2時間



- 5184 reaction well (72x72, 100 nL/well)
- 検出限界は27サイクル

  $2^{-\Delta Ct}$, ΔCt= Ct detected gene – Ct 16S rRNA gene

Total genes (384) assayed : antibiotic resistance genes (ARGs), mobile genetic elements (MGEs) and others

Gene confers resistance to	Total gene number
Tetracycline	47
Sulfonamide	12
Trimethoprim	3
Aminoglycoside	34
Macrolide (MSBL)	53
Multidrug efflux	60
(Flor, Chlor, Am) phenicol	15
Beta lactam	65
Fluoroquinolone	1
Quinolone	2
Vancomycin	36
Total ARGs	**330**

MGEs	Total gene number
Transposase	10
Integrase	8
Plasmid incompatibility	5
Plasmid replication	5
Insertion sequence	10
Total MGEs	**37**

Others	Total gene number
16S rRNA	1
crAssphage	2
Colistin	4
Bacitracin	2
Streptothricin	1
Fosfomycin	2
Nisin	2
Nitroimidazole	1
Triclosan	1
Mercury	1
Total others	**17**

Five Red seabream raised at Ainan fish farm (Japan, 2018 Nov)

Sample name	Weight (gr)	Length (cm)	Sex	Note
Red Seabream 1	1 210	35	Female	Tumor in intestine, eggs
Red Seabream 2	1 030	32	Female	Tumor in intestine, eggs
Red Seabream 3	1 050	34	Male	
Red Seabream 4	940	30	Female	eggs
Red Seabream 5	1 050	34	Female	
Average (STD)	1 056 ±111	33 ±2		

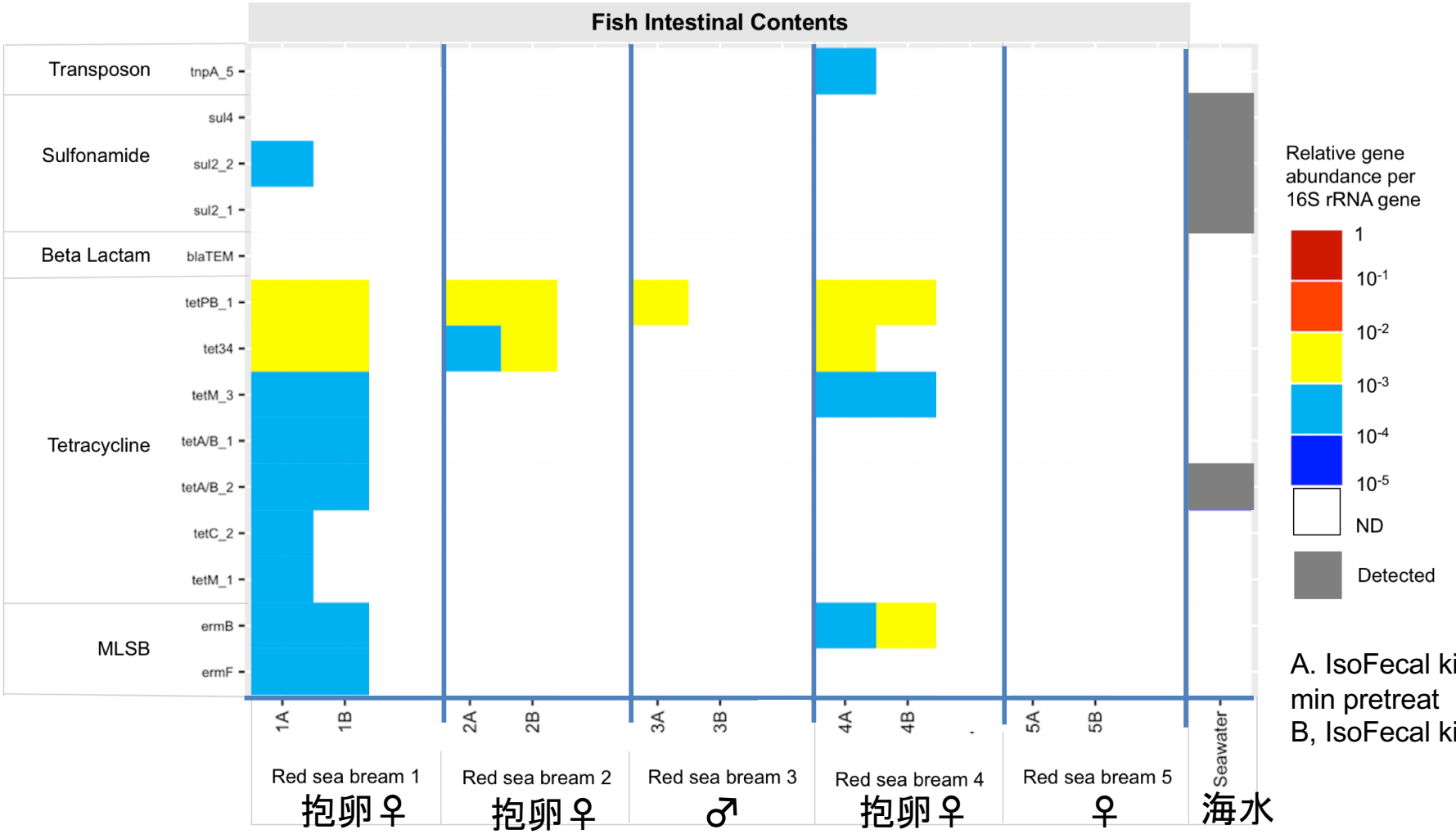
↓

DNA extraction by using IsoFecal kit (Nippon Gene)
with some modification（ここが重要！）

↓

Analysis in Resistomap Co. in Finland

結果：　養殖マダイ（5尾）の腸内レジストーム

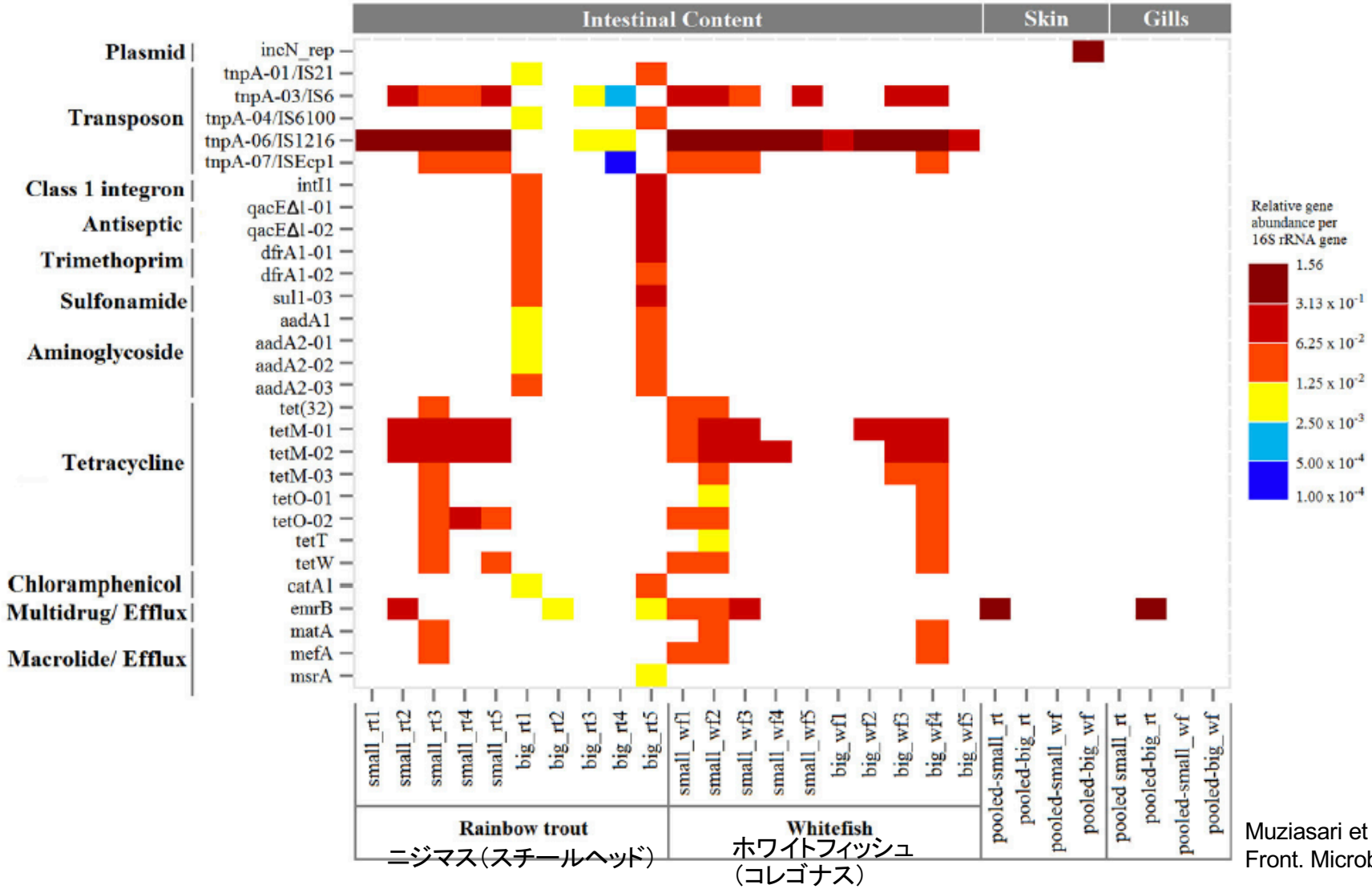


A. IsoFecal kit with 95˚C 20 min pretreat
B, IsoFecal kit

- 現在まで登録されている384遺伝子種を定量した。マダイからはARGs11種とトランスポゾン1種が検出された
- *tet*遺伝子は普遍的に分布（使用薬剤を反映）
- 課題：DNA抽出法で異なる結果　⇨ 適正法の確立

（未発表予備データ）

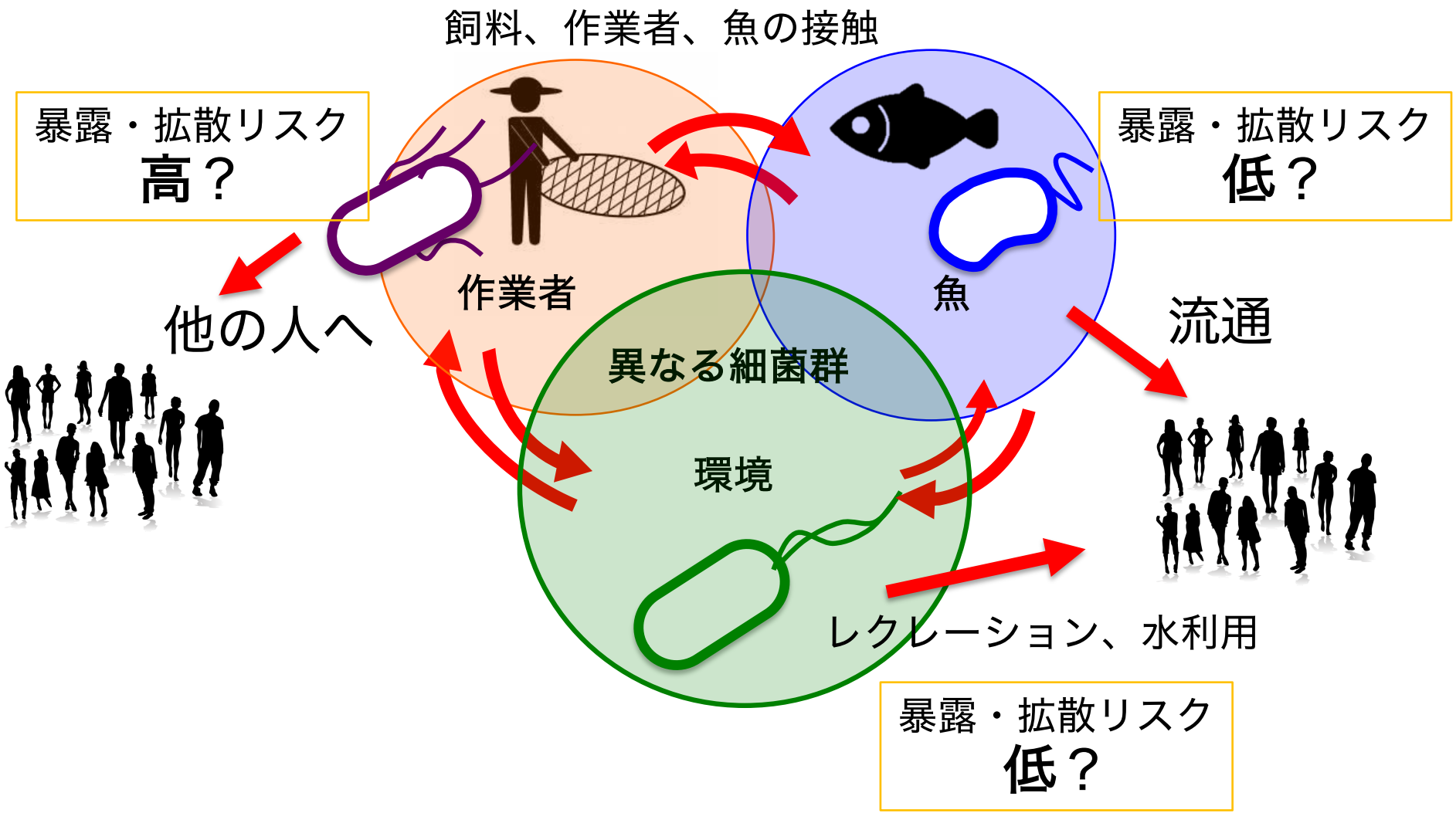
Cf. 同じ方法で行なった他種での結果



Muziasari et al (2017)
Front. Microbiol., 7, 2137

- フィンランドのニジマス(*Onchorhynchus mykiss*)とホワイトフィッシュ(*Coregonus lavaretus*)での結果では、28種のARGsが腸内から検出
- マダイ、ニジマス、ホワイトフィッシュいずれでも、個体差はあるが、薬剤使用歴とARGsには関連がある
- トランスポゾンでの伝達がもっとも疑われる

養殖を通したARGsリスク（妄想シナリオ by 鈴木 聡）



これまでの知見の整理と今後 （メモby 鈴木 聡）

- 魚の腸内細菌では、レジストーム多様性低い→ OK
- 海水中にはARGsが残存する → OK
- 人獣病原菌、腸内菌と海洋菌間での遺伝子伝播→ （？）実験ではOK
- 海水、魚からのARGsの養殖業作業者への遺伝子伝播→ （？）
- 作業者から他者への二次感染→ （？）

養殖生産から流通でのモニタリング

- 最も適切な標的は何か→ *intI*1では？（鈴木聡の予想）