

食物連鎖によるプランクトンおよび小型魚類への 抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子蓄積の検証

京都大学大学院医学研究科
人間健康科学系専攻
准教授 徳野 治

1. 背景と目的

抗菌薬耐性菌や耐性遺伝子 (antibiotic resistant bacteria and resistance genes : ARBG) が発生しやすい事業場として、陸上では医療機関や畜産農場、水圏では養殖場がよく知られている。ここで発生した ARBG は湖沼や河川そして海洋へ拡散する。本申請者による先行研究 (2021 年度水質保全研究助成) でも京都市内や大阪府内河川から基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌を検出している。近年国内外から、河川・湖沼・海洋など自然環境における ARBG の検出報告が相次いでおり、ARBG による環境汚染は世界的に深刻な問題となりつつある。

水圏に流出した後の ARBG の動態は不明な部分が多い。しかし最近、海洋沿岸域に棲息する動物プランクトンからリネゾリド耐性腸球菌を検出したという報告¹⁾があった。本申請者の知るかぎり、プランクトンと ARBG を関連づけた先行研究は稀少であるが、このことから食物連鎖によりプランクトンを餌とする小型魚類に ARBG が蓄積されている可能性は十分考えられた。

琵琶湖産の小型魚類は滋賀県特産品として人々に親しまれている。いわゆる湖魚料理のうち、小型魚類を生そのまま喫食することは実際にはあまりないと思われるが、喫食法や調理法が不適切な場合はヒト体内への ARBG 侵入可能性は考えられる。

本研究の目的は、湖水生態系の食物連鎖による ARBG の水平伝播の可能性 (図 1) を検証することである。

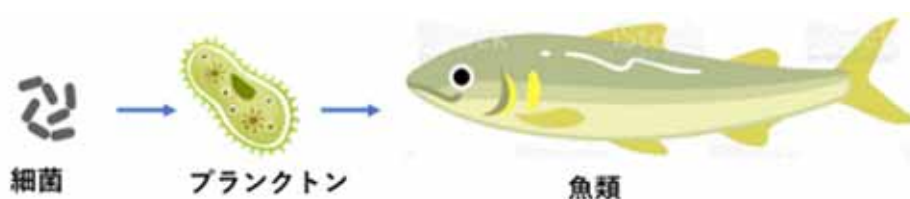


図 1 食物連鎖を介した抗菌薬耐性遺伝子水平伝播

琵琶湖の中でもとりわけ河川の流入域、水再生センター近くの湖水を試料とし、湖水生態系の下位に位置するプランクトンにおける ARBG の存在実態を明らかにする。さらにプランクトンを餌とする琵琶湖産小型魚類の消化管内に ARBG が潜んでいるかどうかを検討した。

2. 方法

2-1 現地試料採取

所要時間を考慮し、京都市近隣の琵琶湖南湖に位置する、大津市由美浜の大津市水再生センター付近（図2星印）をサンプリング地点とした。

ここでオートクレーブ滅菌した1,000 mL 採水瓶を用いて、合計4~6 L を採取した。この水試料はのちに生物 DNA 抽出に供するものとした。



図2 サンプリング地点

これとは別に、表層水に浮遊するプランクトンの採取にあたってはプランクトンネットで捕集、もしくは浅瀬では1,000 mL 採水瓶を用いて合計2 L を採取した。

採取したこれらの試料はクーラーボックスに入れて速やかに研究室へ持ち帰り、ただちに実験に供した。

2-2 ろ過とDNA抽出

持ち帰った湖水試料を、孔径0.4 μm グラスファイバーフィルターでろ過し、フィルター捕捉物からDNA抽出キットNucleoSpin eDNA Water（マッハライナーゲル-タカラバイオ）を用いて、環境DNA（eDNA）を抽出した。このeDNAには細菌のDNAも当然含まれると予想された。

フィルターを通り抜けた水にはバクテリオファージや膜小胞が多く存在しており、ここにも耐性遺伝子が存在することが示唆されている（当研究室所見）。そこでろ過液をさらに0.22 μm フィルターでろ過し、そのろ液を200,000 Gで90分超遠心し、沈渣をごく少量のPBSに溶解し、これをフロースルー画分とした。フロースルー画分からは“エタ沈メイト”（ニッポンジーン）を用いてDNAを抽出し、のちのPCRの鋳型とした。

2-3 菌種同定と耐性遺伝子の検索

eDNAに含まれる細菌遺伝子について16S rDNA配列解析による菌種同定（図3）、および耐性遺伝子の個別PCRによる検索を行った（図4）。フロースルー画分についても同様に耐性遺伝子の個別PCR検索を行った。

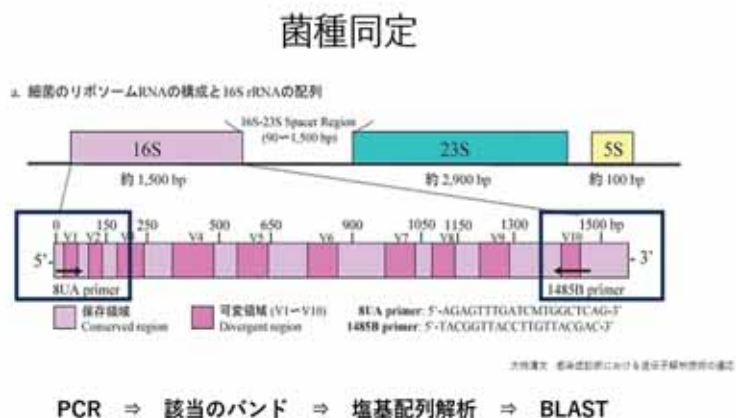


図3 16S rDNA配列による菌種同定

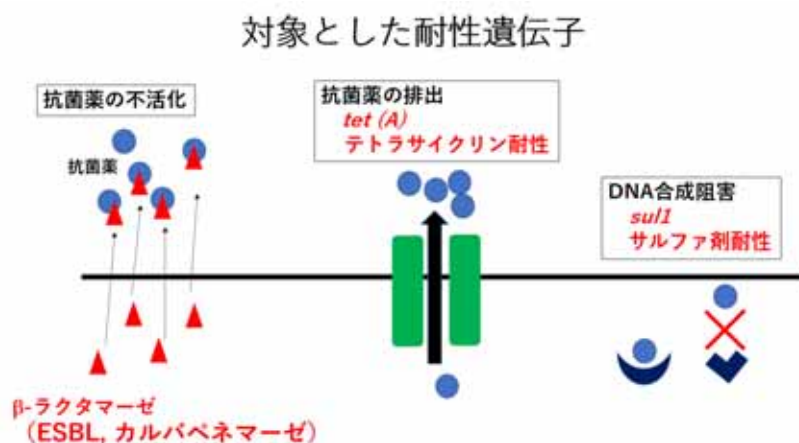


図4 本研究で検出対象とした抗菌薬耐性遺伝子

2-4 プランクトン体内の耐性菌・耐性遺伝子 *in situ* hybridization

2-4-1 耐性菌捕食コントロール体の作成

抗菌薬耐性とプランクトンを関連付けた先行研究は少ない。プランクトン体内に取り込まれた耐性菌や耐性遺伝子を可視的に検出することを目的とし、まず耐性菌捕食コントロール体の作成と蛍光観察を試みた（図5）。

観賞魚用の餌として市販されているゾウリムシ (*Paramecium sp.*) を入手し、数日ほど飢餓的に飼育したのち、研究室で継代している各種耐性菌を適量添加し、これを摂食させた。30分後遠心分離して濃縮後、3.6%パラホルムアルデヒドにて4℃一夜固定した。洗浄後、30%ホルムアミド・0.1M MOPS・0.1M NaCl に浮遊させ、Proteinase K を5μg/mL、そして上記2-4と同じ耐性遺伝子のFITC標識プローブおよびTexas Red 標識16SrDNAプローブを400pmol ずつ加え、42℃で18時間から20時間回転攪拌しながらハイブリダイゼーションを行った。洗浄後0.1M MOPS・0.1M NaCl に浮遊させ、位相差および蛍光顕微鏡で観察した。



図5 プランクトンにおける Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

2-4-2 琵琶湖水プランクトンにおける耐性菌・耐性遺伝子

琵琶湖水を採水瓶で2L採取し、ただちに研究室へ持ち帰った。遠心分離(1,500G)と上清除去を繰り返し、プランクトン画分として2mL程度まで濃縮し、パラホルムアルデヒドで固定後、上記と同様の方法にてFISHを試みた。

2-5 琵琶湖産小型魚類中の耐性菌・耐性遺伝子

小型魚類として琵琶湖産の小鮎を選定した。湖水やプランクトン中の耐性菌や耐性遺伝子との関連性をもたせるため、湖水やプランクトンの採集とほぼ同じ地点での採取として、フィッシング（釣り）による魚類の捕獲を試みた。捕獲できた個体はクーラーボックスに入れて直ちに研究室へ持ち帰り、腸内容物の採取を行った（図6）。



図6 フィッシングによる小型魚採取

腸内容物は生理食塩水に浮遊させて10倍階段希釈後、各希釈液0.1mLを増菌用平板培地に播種し36℃培養した。発生したコロニーをランダムにピックアップし、クロモアガーESBL生培地およびクロモアガー-mSuper CARBA生培地（栄研化学）に塗布し、36℃で培養後、発色コロニーについて16S rDNA配列による菌種同定と各耐性遺伝子の検出を試みた。また、腸内容物の直接鏡検を行い、プランクトン残渣の有無も検査した。

3. 結果と考察

3-1 水試料における耐性遺伝子

eDNA画分（フィルター捕捉物）ならびにフロースルー画分で検出された耐性遺伝子を図7に示す。

	2月	5月	7月	10月
フィルター捕捉物	IMP	IMP, OXA, VIM, <i>tet(A), sul1, intl</i>	IMP, OXA, VIM, <i>tet(A), sul1, intl</i>	<i>tet(A), sul1, intl</i>
フロースルー	IMP, NDM, SHV <i>tet(A), sul1, intl</i>	VIM, <i>tet(A), sul1, intl</i>	VIM, intl	IMP, <i>tet(A), sul1</i>

図7 水試料で検出された耐性遺伝子

フィルター捕捉物、フロースルー画分のいずれかにも必ず検出されたものとして、まず IMP がある。カルバペネマーゼ遺伝子の世界分布には地域差がみられるが、IMP は日本国内の臨床でも検出頻度が高い²⁾ことも、今回の裏付けとなっている可能性が考えられた。ほか、VIM や NDM といった国内の臨床では検出頻度が比較的低いものも今回の検討では確認された。このような頻度の低いものがなぜ自然界の水環境で検出されるかについては様々な示唆はあるものの不明な部分が多く、その伝播・拡散機構の解析が待たれる。

テトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(A)*、サルファ剤耐性遺伝子 *sul1* も本研究での毎回のサンプリングで確認された。テトラサイクリン耐性遺伝子 *tet* は他の様々な水圏生態系でも確認されている³⁾。現在ヒトの臨床においてはテトラサイクリン系、サルファ剤ともに、 β -ラクタム系抗菌薬が使用できる状況下では第一選択薬となることは少ない。ただしサルファ剤はかつてヒト臨床で頻繁に使われていた時代があった。またテトラサイクリン系、サルファ剤ともに動物用または水産用医薬品としての需要は大きい^{3, 4)}。したがってこれらの耐性遺伝子が様々な環境から頻繁に検出される理由として、細菌どうしの接合やバクテリオファージを介した形質導入など細菌間の高頻度な遺伝子水平伝播が起こっている可能性に加え、とくにサルファ剤のような過去に大量に使用されていた抗菌薬やその耐性遺伝子が分解されることなく、水中の“溶存態有機物”として永く残存している可能性も考えられた。

さらに、インテグラーゼ遺伝子 *int1* も本研究で高頻度に検出された。薬剤耐性遺伝子はトランスポゾンやインテグロンと関連することも多く³⁾、インテグラーゼの発現により水圏環境での薬剤耐性インテグロンの形成が進んでいる可能性も考えられた。

3-2 プランクトン体内の抗菌薬耐性遺伝子

3-2-1 捕食後 FISH 陽性コントロール

市販ゾウリムシの耐性菌捕食後の FISH 陽性コントロールについて、図 8 に示す。

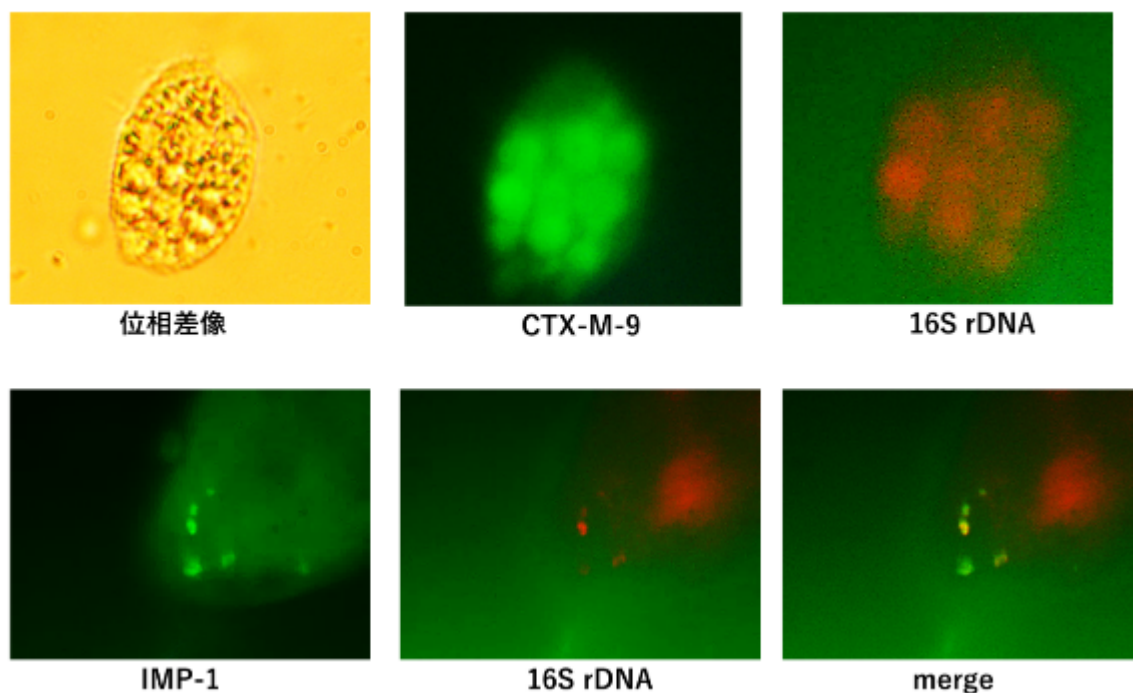


図 8 耐性菌捕食後のゾウリムシにおける耐性遺伝子 FISH

CTX-M-9 (ESBL) 遺伝子保有大腸菌をゾウリムシ培養中に添加し、CTX-M-9 配列プローブでFISHを試みたところ(図8上段)、食胞(体内の丸いもの)において緑(FITC)と赤(Texas Red)の蓄積がみられたことから、CTX-M-9 (ESBL) 遺伝子保有大腸菌の捕食が起こったことを確認できた。図8下段も同様に、細胞質においてもIMP-1と16S rDNAとの共局在を確認した。今回は特に赤の波長については画面上強調の大きい画像となっている。輝度の高い蛍光色素の選択など技術的課題は残るが、一応は、ゾウリムシによる耐性菌(耐性遺伝子)取り込み後のFISH陽性コントロールの確立が可能となった。

3-2-2 琵琶湖プランクトンにおける耐性遺伝子の検索

実際の琵琶湖のプランクトン体内における耐性遺伝子の検出に着手した。まず、採取した琵琶湖水において実際に生体として観察された動物プランクトンを図9に示す。

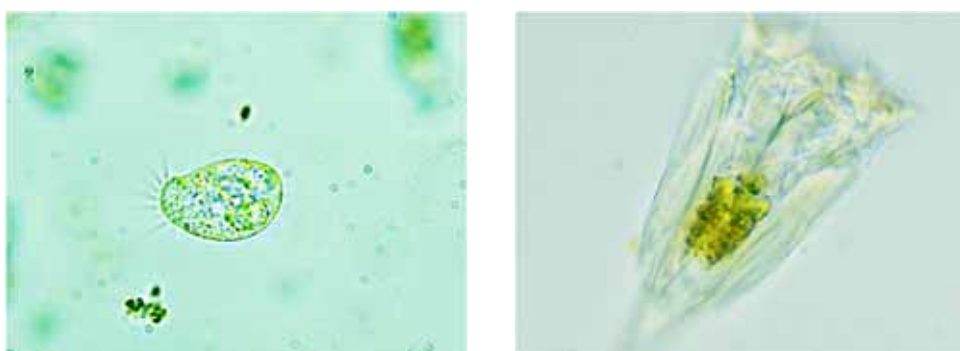


図9 琵琶湖の動物プランクトン 左:(原生動物) 右:ワムシのなかま

図9の左はゾウリムシのなかま、右はワムシのなかまと考えられたが詳細な同定には力量不足であった。ただし、このようなプランクトンが活発に遊泳していることを目視確認したことから、次のステップへ進むことにした。3-2-1の陽性コントロールと同様の方法により各種耐性遺伝子プローブによるFISHを試みたところ、今回は *tet(A)* と *sul1* の存在を示唆できた(図10)。

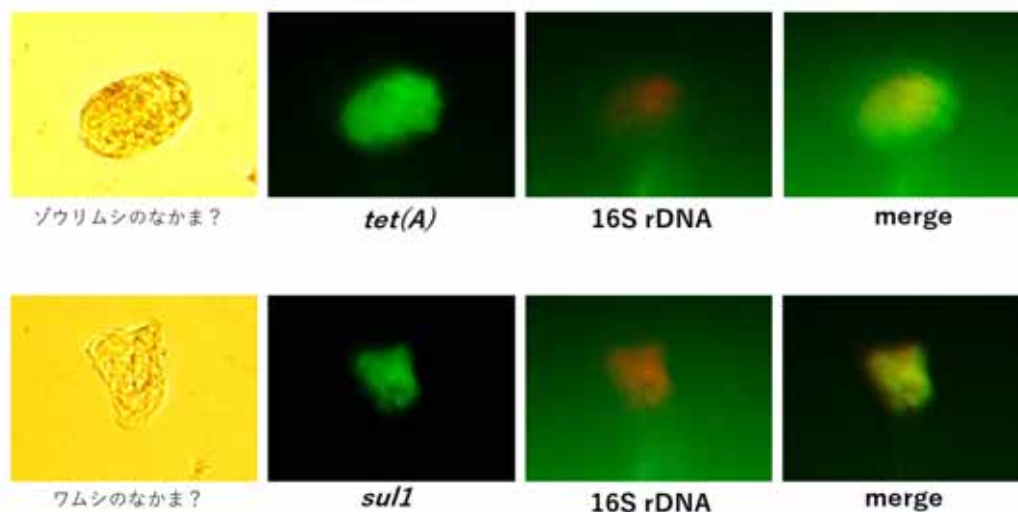


図10 琵琶湖のプランクトンにおける耐性遺伝子 FISH

3-1と同様、*tet(A)*と*sulI*の存在は示唆されたが、実際には全てのプランクトンにおいて特異的な蛍光を検出したわけではなかった。また今回はESBLやカルバペネマーゼといったβ-ラクタマーゼ遺伝子については明らかな体内局在は確認できなかった。プランクトンFISHの方法改善も当然検討の余地があるのは前述のとおりである。

一方で、推測の域ではあるが、3-1の水試料でもフィルター濾過や超遠心分離といった濃縮作業を経ての検出であったことも考慮すると、これら耐性遺伝子の実際の湖水中濃度は非常にごく微量であり、かつプランクトン体内に取り込まれたとしても、その後体内で蓄積されることなく分解されてしまう可能性も考えられ、プランクトンでの耐性遺伝子の検出にはバラつきが出てくる可能性も十分考えられた。このあたりの検証にはサンプリング回数を増やしての継続的な検討が不可欠である。

3-3 魚腸内容物における耐性菌・耐性遺伝子

本検討では由美浜近くで捕獲（釣れた）小鮎を対象とした。魚腸内容物のグラム染色ではグラム陰性菌、グラム陽性菌が観察された。増菌培養と、特殊酵素基質培地（クロモアガー培地）における選択培養を経て遺伝子解析を試みたところ、淡水や汽水域に普通に生息する*Aeromonas hydrophila*が検出されたが、対象とする耐性遺伝子は検出されなかった。

ただ、魚腸内容物を低倍率で直接鏡検したところ、ミジンコのなかまと思われるものの残渣が確認された（図11）。本研究において実際に琵琶湖プランクトンで耐性遺伝子が検出されたことから、魚腸内のプランクトン残渣において耐性遺伝子が検出される蓋然性は高いと考えている。

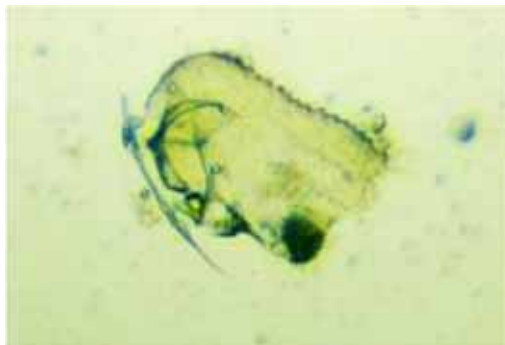


図11 魚腸内容物で見つかったミジンコと思われるものの残渣

このような動物プランクトン残渣におけるFISHの適用や、全ゲノム解析の併用など、今後の詳細かつ継続的な研究の継承を期待したい。

本研究課題では、水中の溶存態有機物としての耐性遺伝子から始まり、プランクトンそして小型魚類へ至る食物連鎖の中での遺伝子水平伝播の可能性を検討した。事情により今回は精力的な検討ができなかったが、もし今後、プランクトンや魚類での耐性遺伝子の存在実態が明らかになってきた場合、次の疑問として、耐性遺伝子は食物連鎖の過程で「生物濃縮」されるのだろうか？ 種々の化学物質の生物濃縮のような「濃縮係数」まで算出できるようになる可能性はあるのか、ヒトの健康への何らかのリスクを客観的に評価できるようになるのか、今後更なる研究の継承を期待する。

4. 謝辞

本研究課題は、令和5年度 公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構「水質保全研究助成」により行いました。また本課題の遂行にあたり、大学院研究の一端として実験に取り組んだ田岸 裕貴氏と竹田 翔梧氏（京都大学大学院医学研究科人間健康科学系 修士課程）の協力がありました。

ここに記して厚く御礼申し上げます。

5. 参考文献

- 1) S Fioriti et al. Linezolid Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sediment and Zooplankton in Two Italian Coastal Areas. *Applied Environmental Microbiol.* 2021; 87(9)
- 2) 鹿山 鎮雄, 他. 薬剤耐性菌の基礎知識「ESBL およびカルバペネマーゼ産生菌」*Chemical Times* 2016; (1), 3-9.
- 3) 野中 理佐, 他. 水圏環境における薬剤耐性微生物のモニタリング. *日本水産学会誌* 2007; 73 (2), 317-320.
- 4) 川西 路子. 動物用抗菌剤の各論（その9）サルファ剤. *日本獣医学会雑誌* 2018; 71, 166-169.