

公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構
令和5年度水質保全研究助成
成果報告会

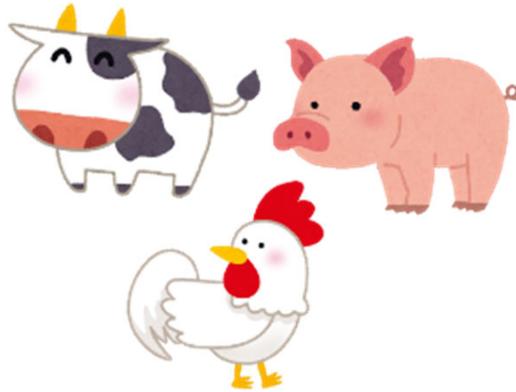
食物連鎖によるプランクトンおよび小型魚類への 抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子蓄積の検証

京都大学大学院医学研究科
人間健康科学系専攻
徳野 治

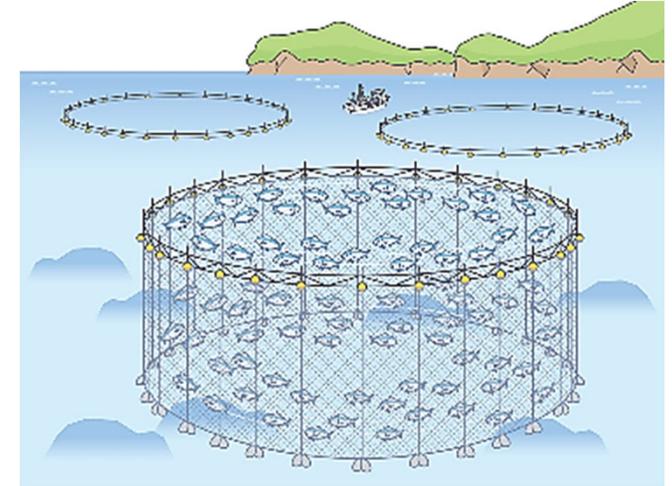
抗菌薬（抗生物質）を使う事業所



医療機関



獣医・畜産

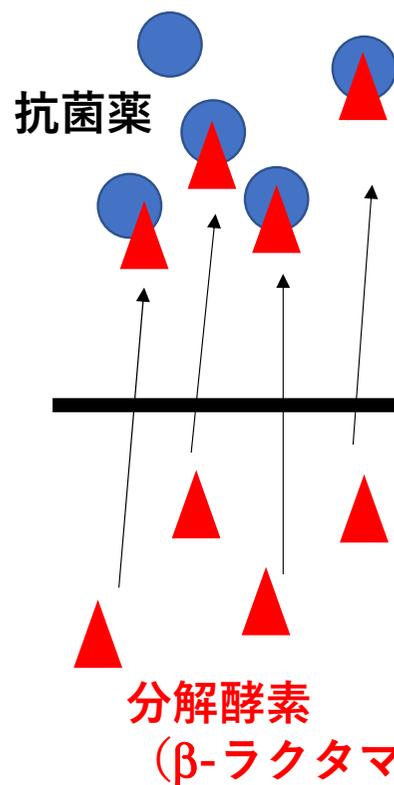


養殖水産

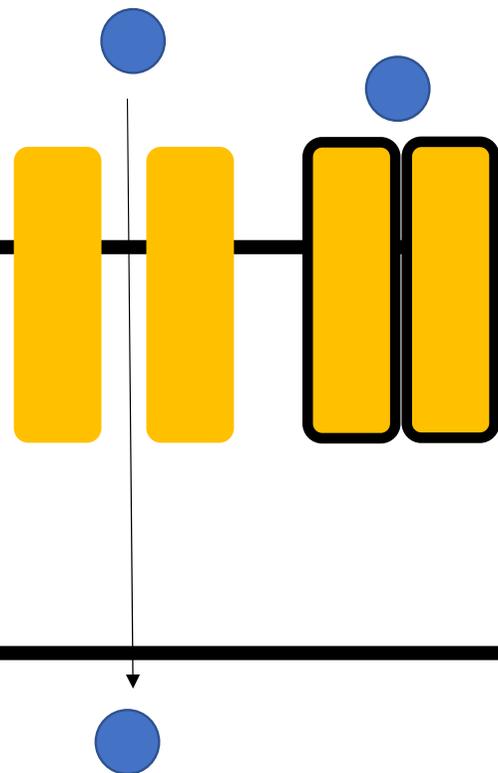
「耐性菌」が発生しやすい場所でもある

抗菌薬耐性機構の概要

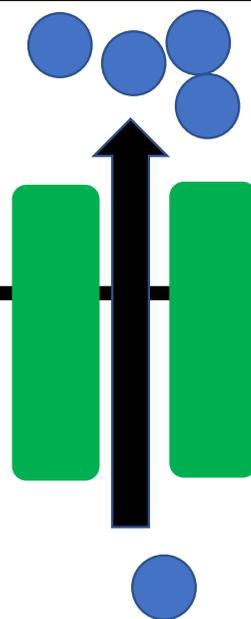
① 抗菌薬の不活化



② 透過孔の減少・変異

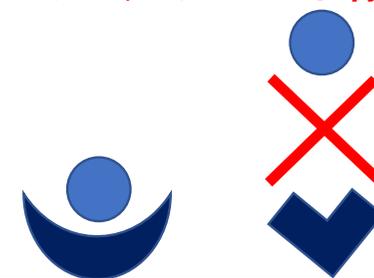


③ 抗菌薬の排出 (efflux機構)



④ DNA合成阻害 タンパク合成阻害

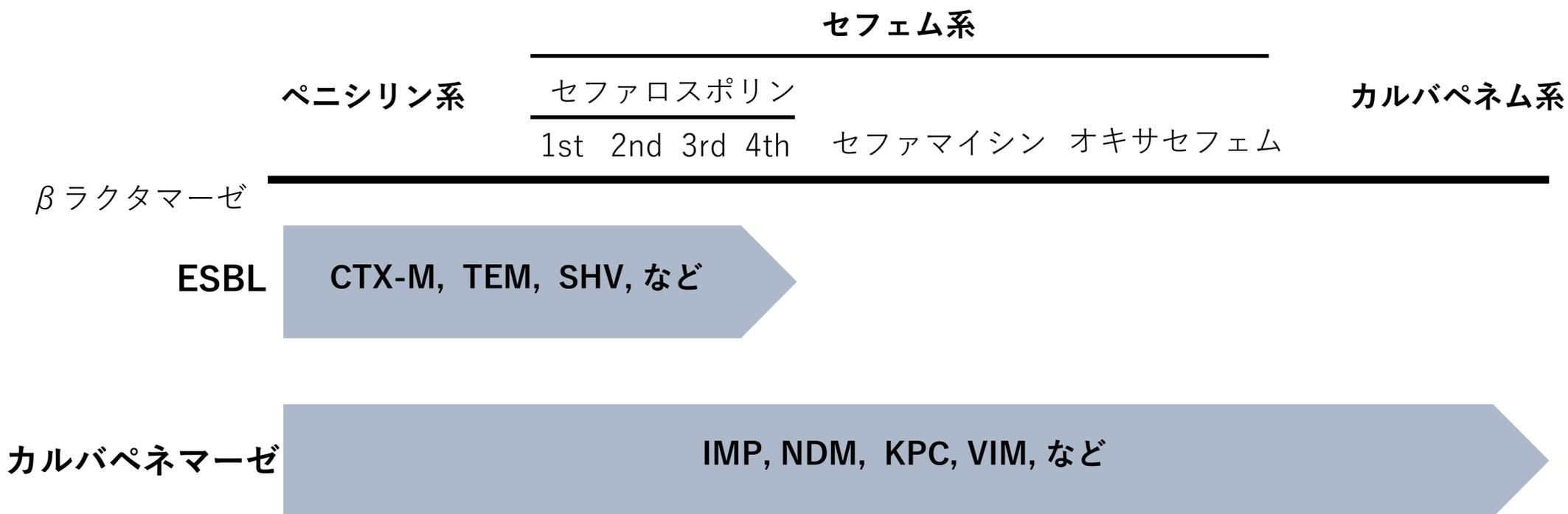
キノロン耐性
アミノグリコシド耐性



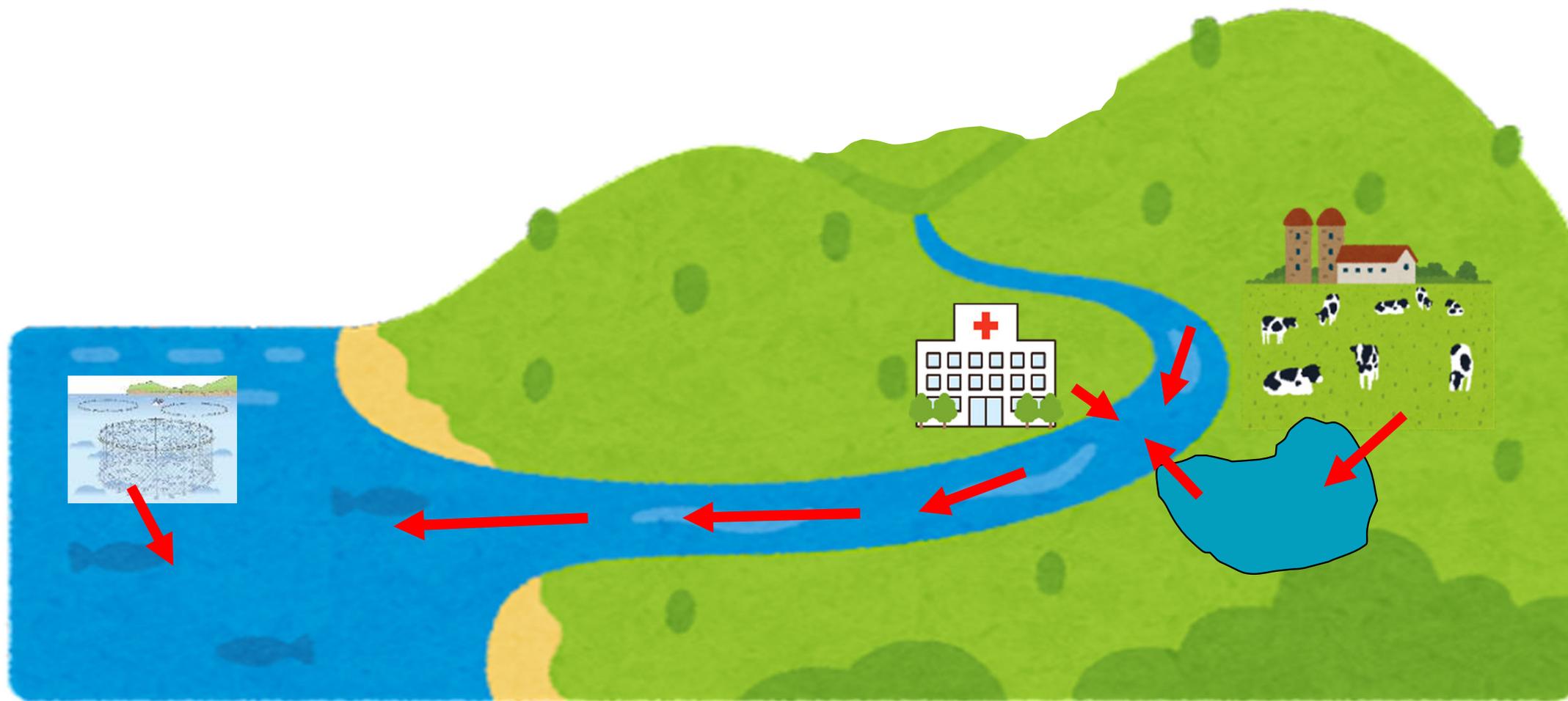
外膜

内膜

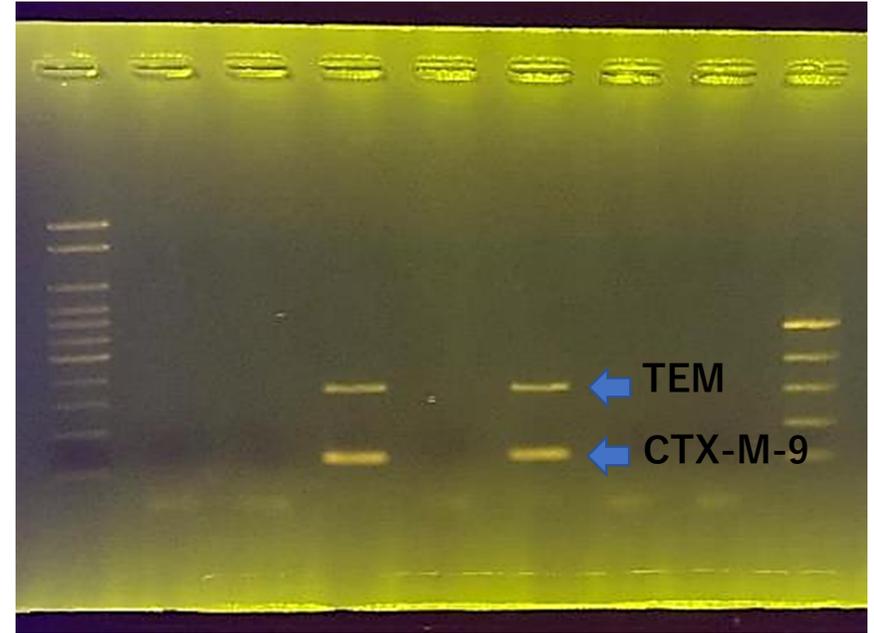
耐性菌が産生するβ-ラクタマーゼとその基質



水圏へ流出拡散する抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子



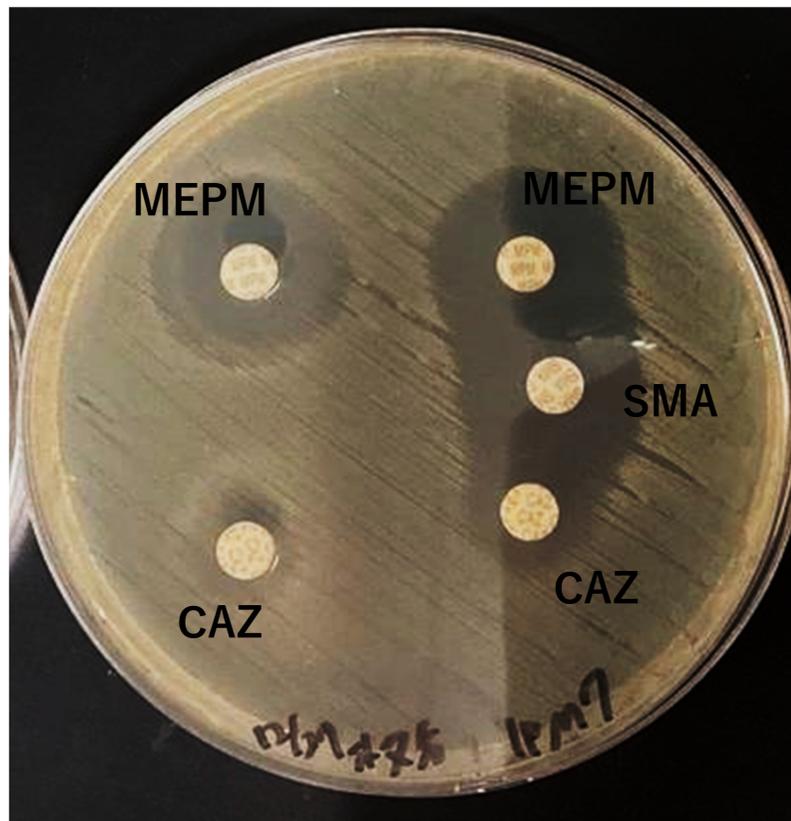
鴨川（荒神橋付近）



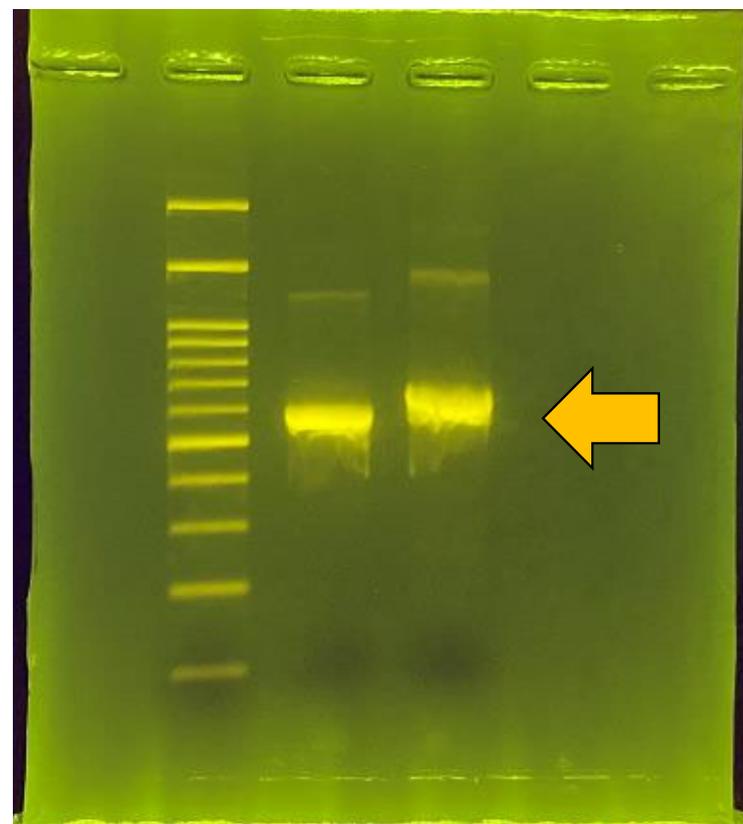
これまでに・・・

- ・ CTX-MとTEMをもつESBL産生大腸菌
- ・ ESBL産生肺炎桿菌
- ・ シプロフロキサシン（キノロン）耐性大腸菌

淀川中流（3 河川合流域）



メタロ-β-ラクタマーゼ産生

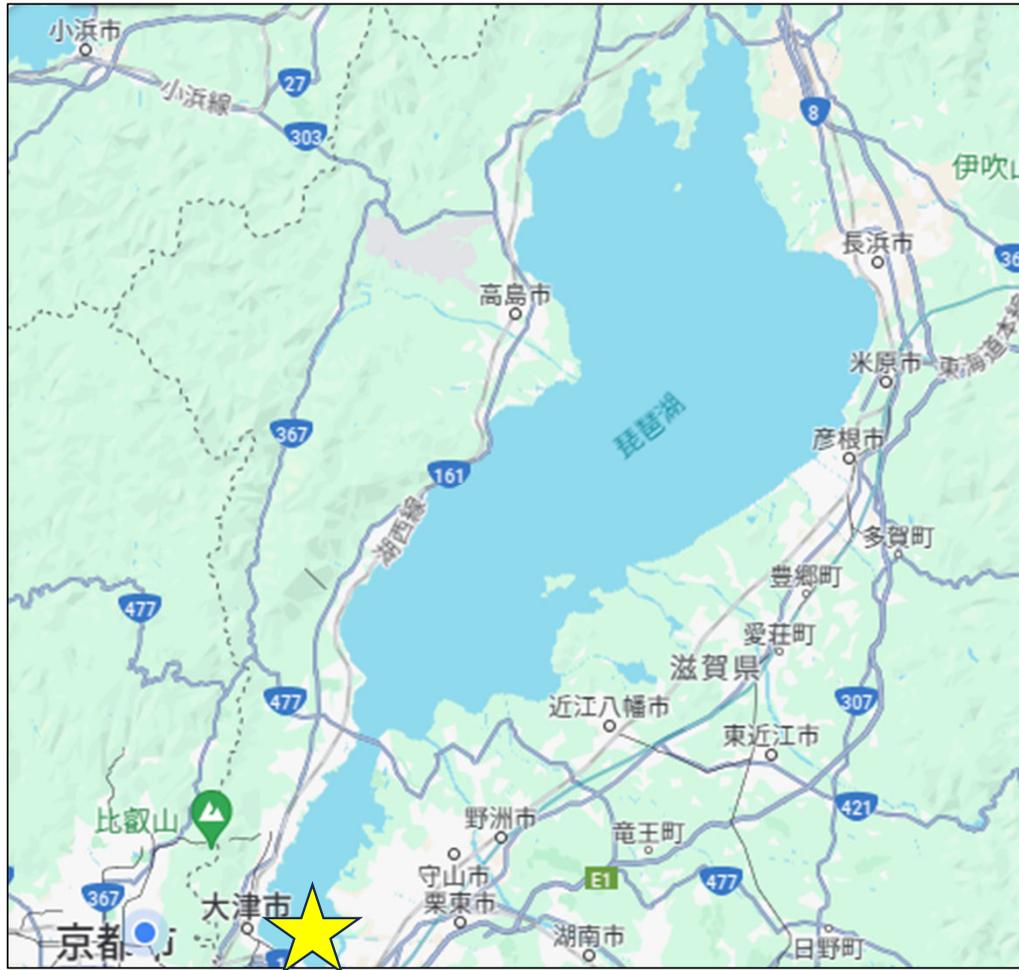


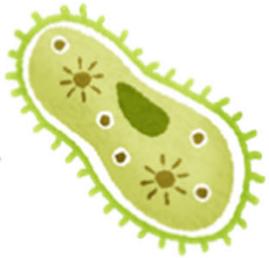
耐性遺伝子：IMP-7

菌種：*Acinetobacter sp.*

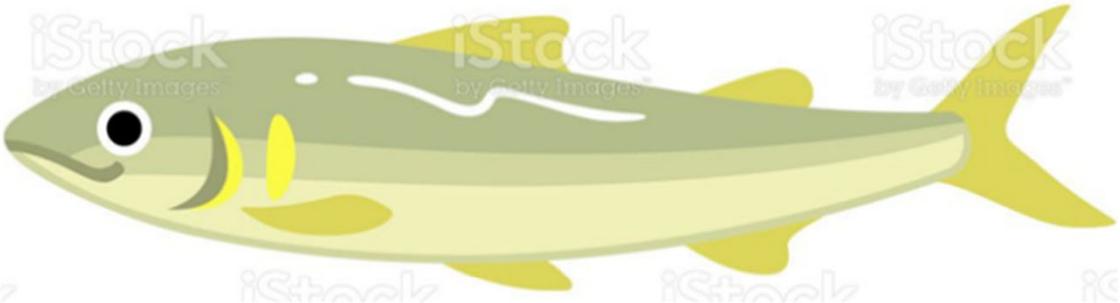
食物連鎖上の耐性遺伝子の流れ







プランクトン



魚類

方法



湖水試料

Glass fiber filter (平均孔径 $0.4\mu\text{m}$)でろ過

フィルター捕捉物よりDNAを抽出

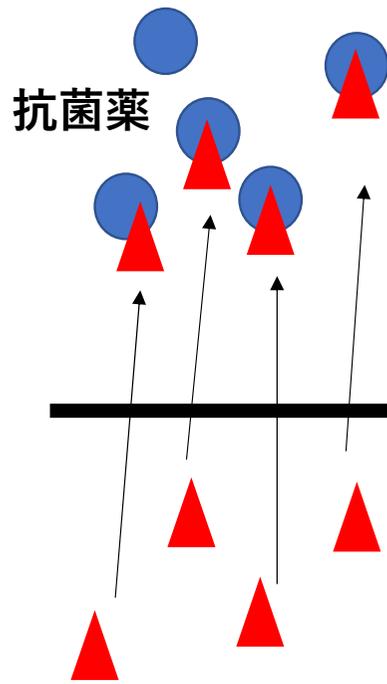
ろ液

membrane filter ($0.22\mu\text{m}$)でさらにろ過し、
超遠心 ($200,000g$ 、 90min)

沈渣を少量のPBSに浮遊→フロースルー画分

対象とした耐性遺伝子

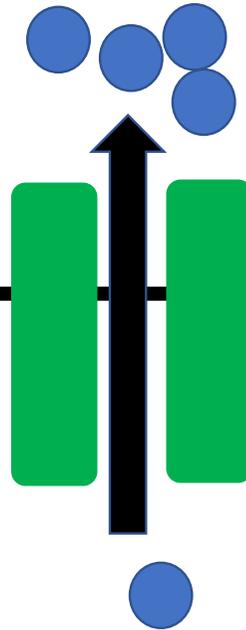
抗菌薬の不活化



β-ラクタマーゼ
(ESBL, カルバペネマーゼ)

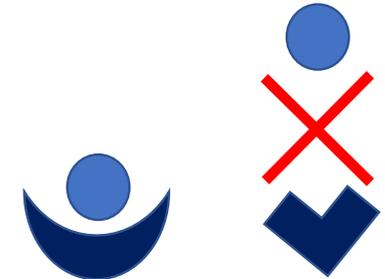
抗菌薬の排出

tet (A)
テトラサイクリン耐性



DNA合成阻害

sul1
サルファ剤耐性

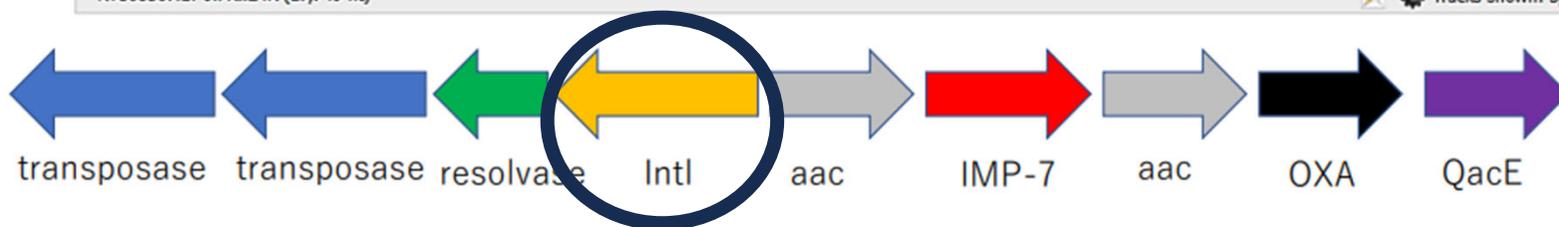
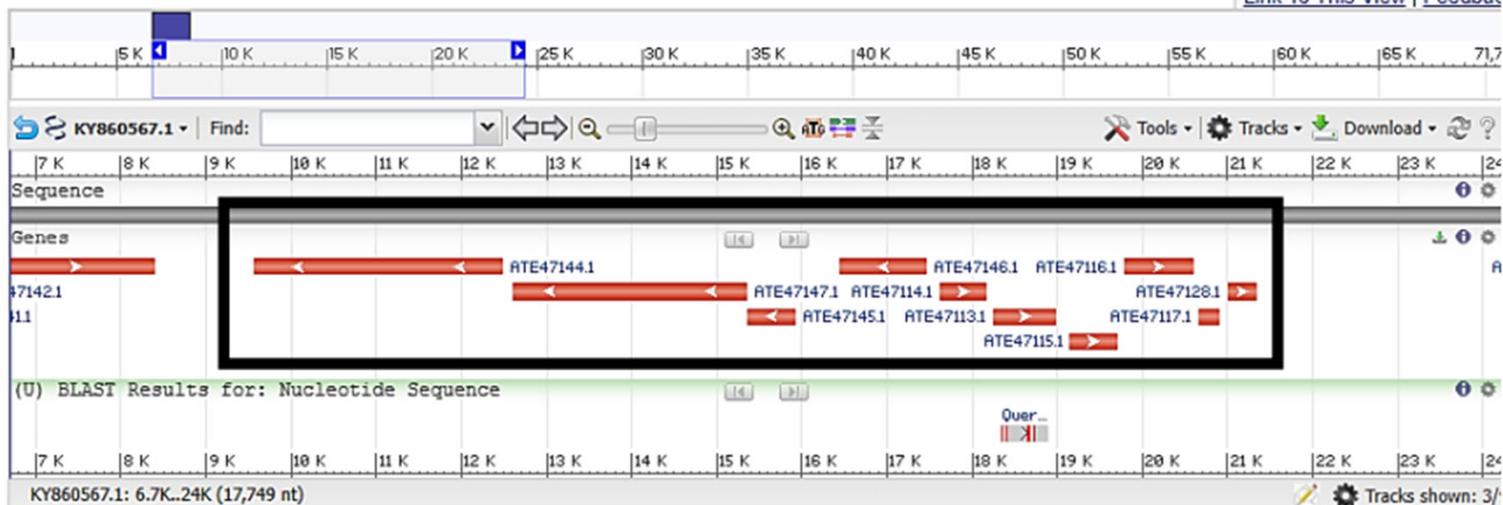


薬剤耐性インテグロン（トランスポゾン） —多剤耐性機構の集積と転移

GenBank: KY860567.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Link To This View](#) | [Feedback](#)



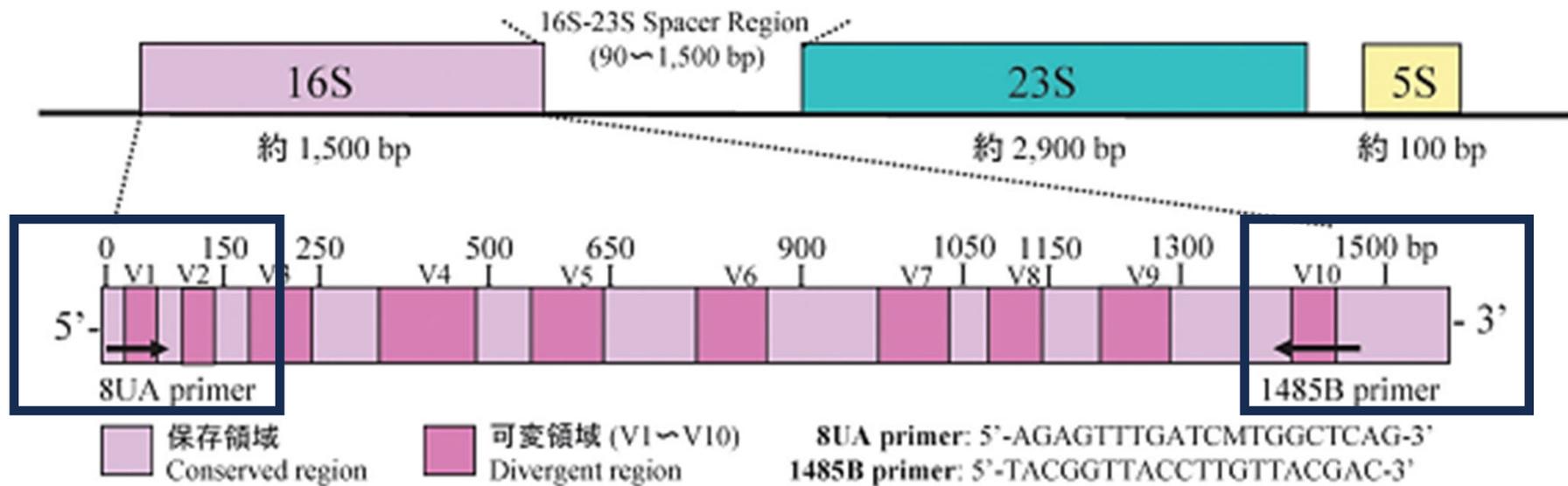
インテグラーゼ (Intl)

検出された耐性遺伝子

	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>

検出菌

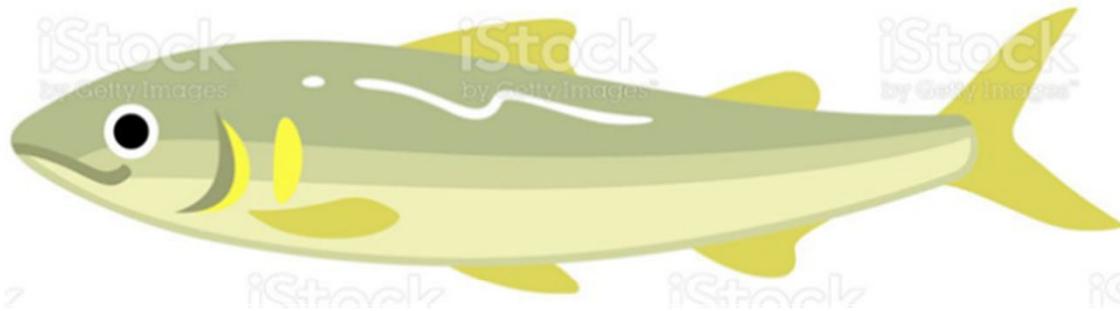
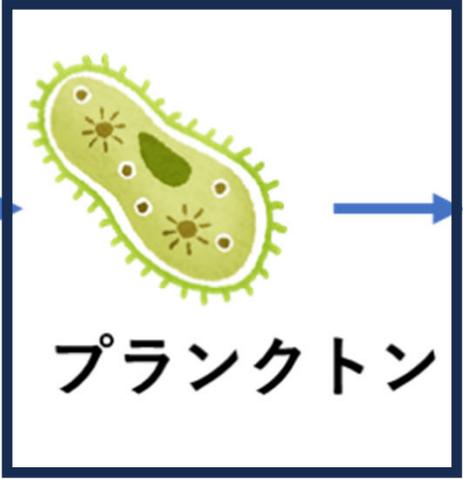
a. 細菌のリボソームRNAの構成と16S rRNAの配列



大楠清文 感染症診断における遺伝子解析技術の適応

PCR ⇒ 該当のバンド ⇒ 塩基配列解析 ⇒ BLAST

琵琶湖水（昨年10月）からは *Enterobacter sp.*



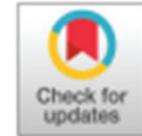
魚類



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Applied and Environmental
Microbiology®

PUBLIC AND ENVIRONMENTAL HEALTH MICROBIOLOGY



Linezolid Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sediment and Zooplankton in Two Italian Coastal Areas

Simona Fioriti,^a Sonia Nina Coccitto,^a Nicholas Cedraro,^b Serena Simoni,^b  Gianluca Morroni,^a  Andrea Brenciani,^a Gianmarco Mangiaterra,^b Carla Vignaroli,^b Luigi Vezzulli,^c  Francesca Biavasco,^b Eleonora Giovanetti^b

^aDepartment of Biomedical Sciences and Public Health, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy

^bDepartment of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy

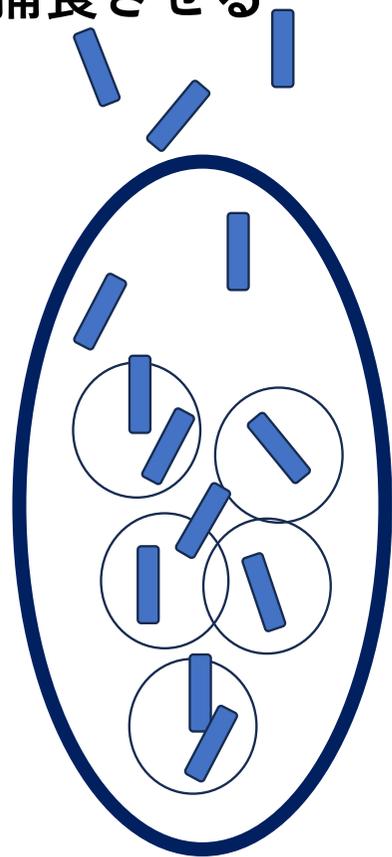
^cDISTAV, Department of Earth, Environment, and Life Sciences, University of Genoa, Genoa, Italy

Simona Fioriti, Sonia Nina Coccitto, and Nicholas Cedraro contributed equally to this work. Author order was determined based on the number of experiments performed.

プランクトン体内の薬剤耐性遺伝子を可視化できないか？

プランクトンでのFISH 捕食コントロールの作成

耐性菌を
捕食させる



市販のゾウリムシ

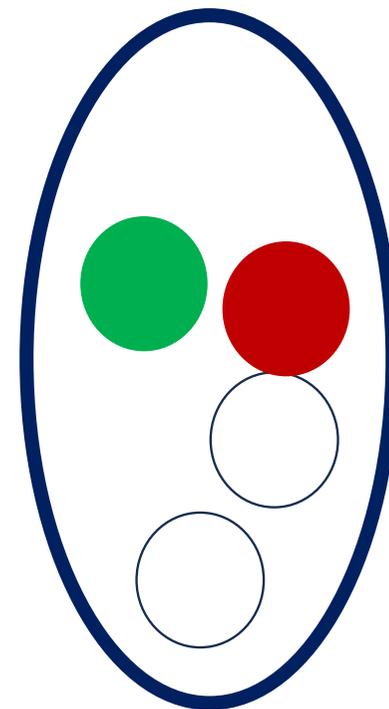


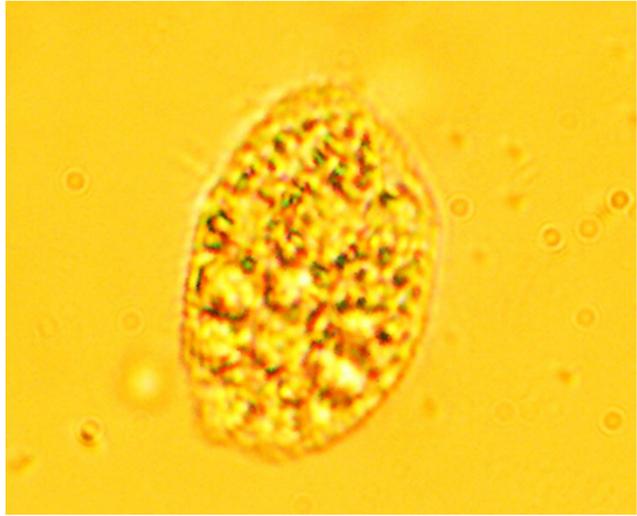
Fluorescent
in situ hybridization (FISH)

- FITC標識-耐性遺伝子プローブ
- TexasRed標識-16S rDNAプローブ

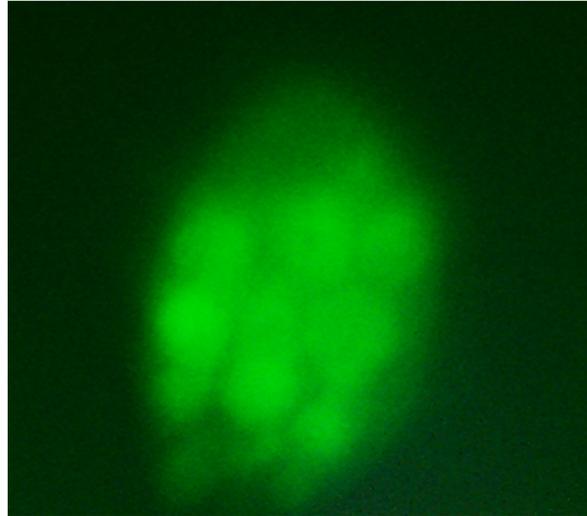


蛍光顕微鏡観察

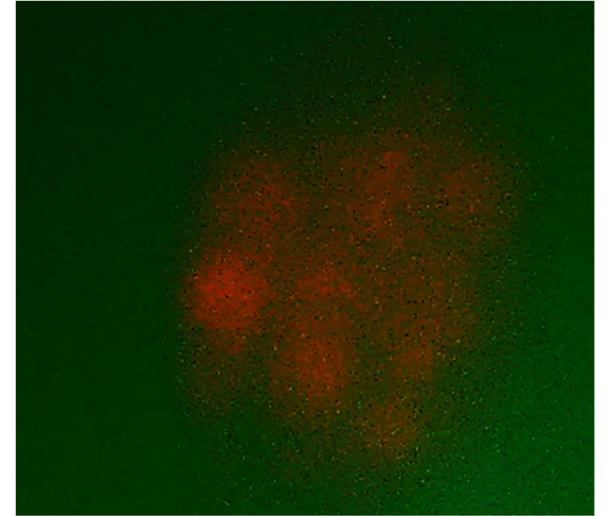




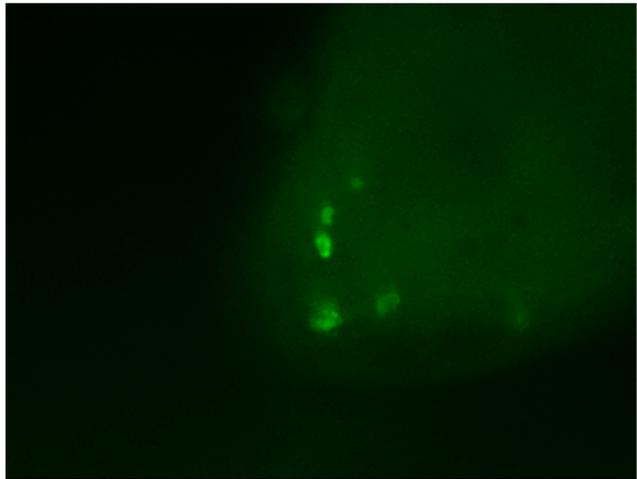
位相差像



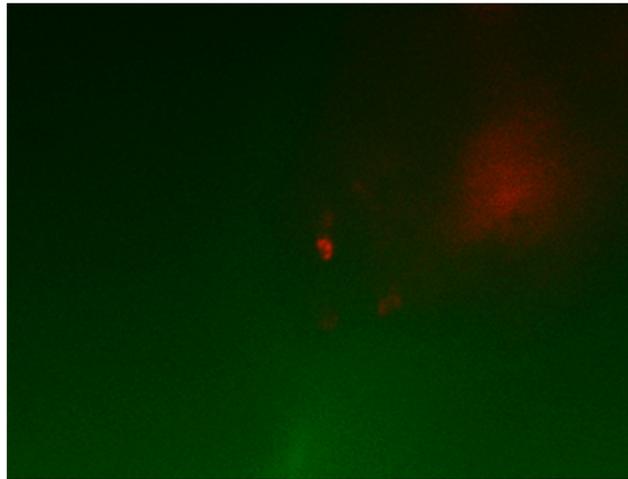
CTX-M-9



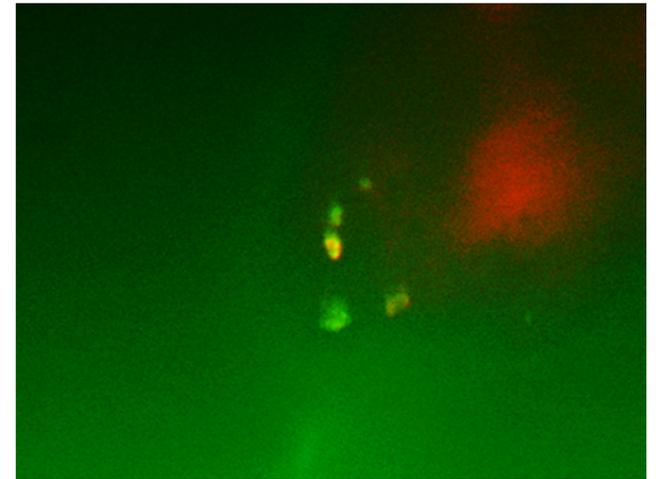
16S rDNA



IMP-1



16S rDNA



merge

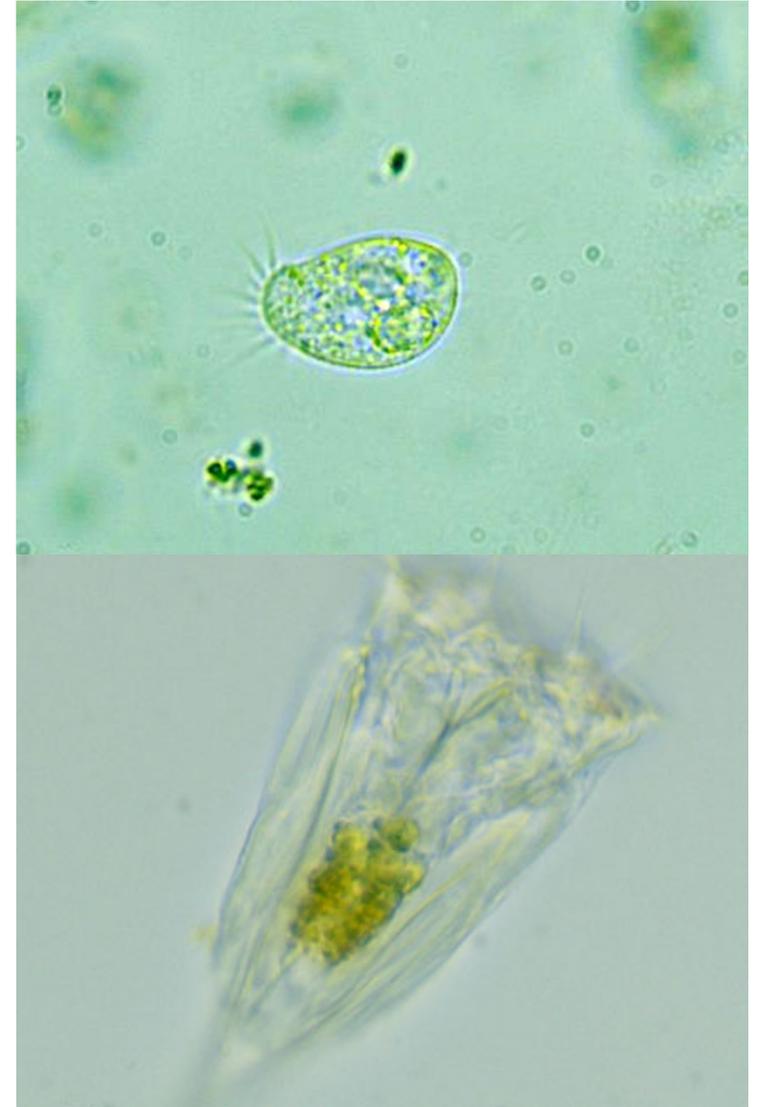
現地サンプリング



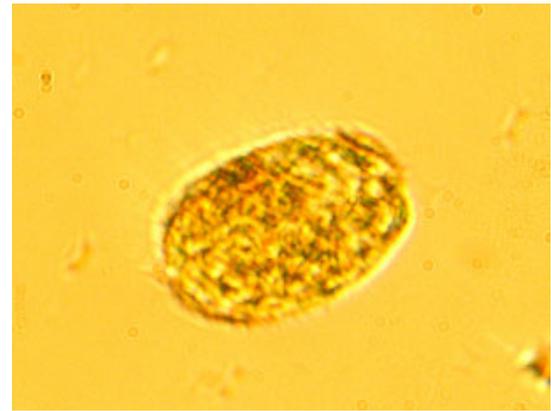
2 L採取



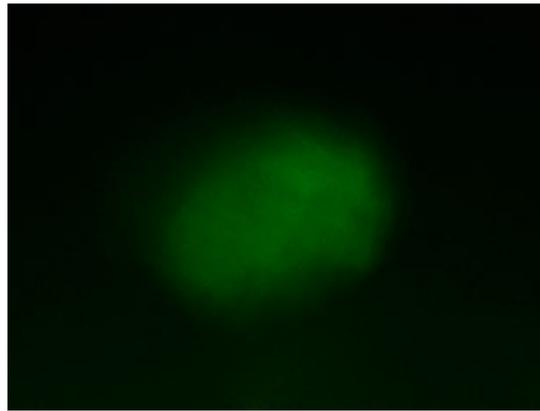
1 ~ 2 mLまで濃縮



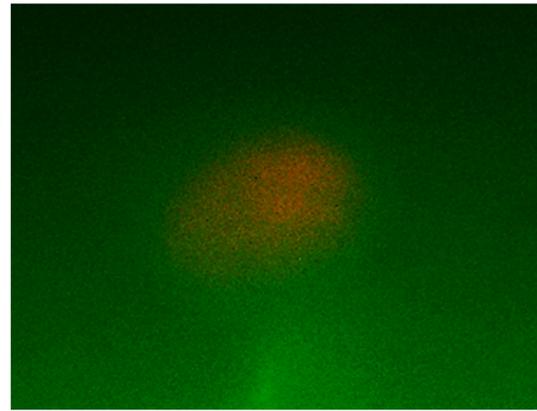
琵琶湖プランクトンにおけるFISH



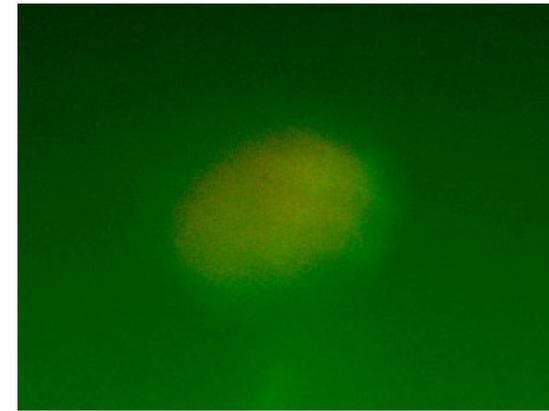
ゾウリムシのなかま？



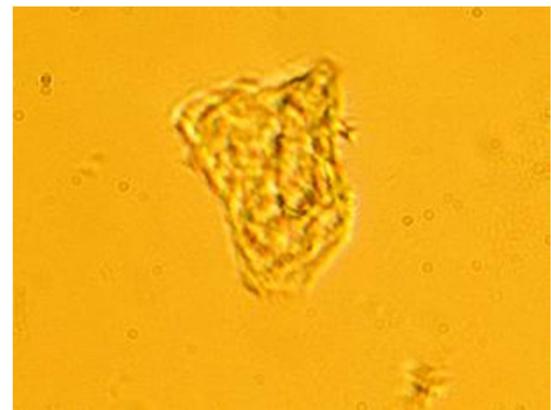
tet(A)



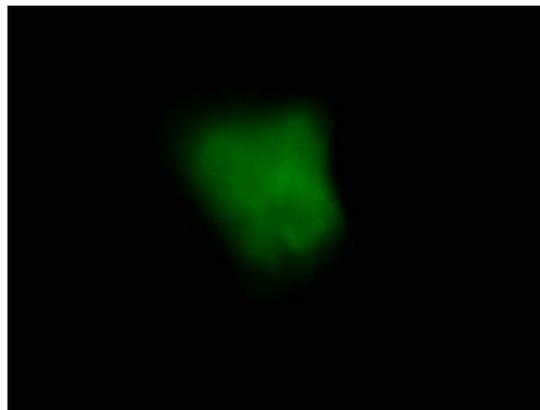
16S rDNA



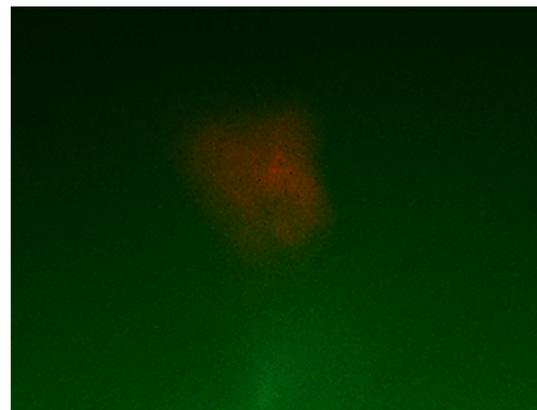
merge



ワムシのなかま？



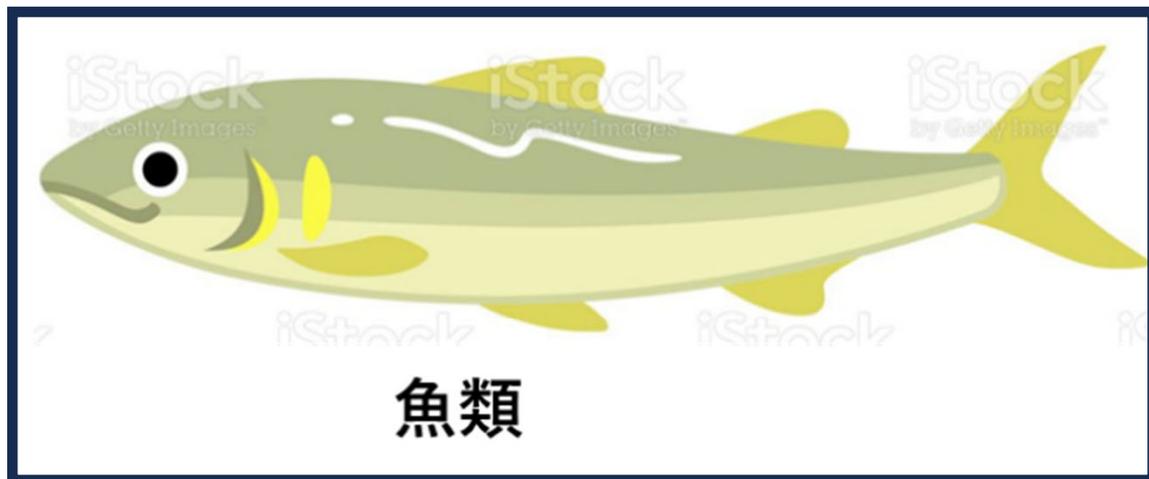
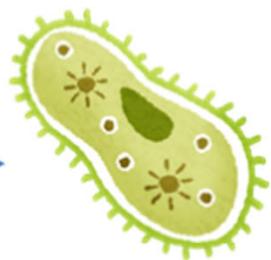
sul1



16S rDNA



merge



フィッシングによる魚類検体採取

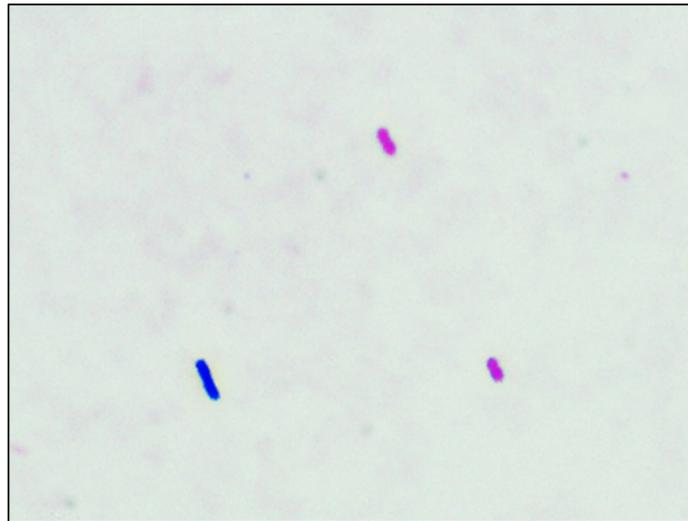


小鮎 体長10センチほど

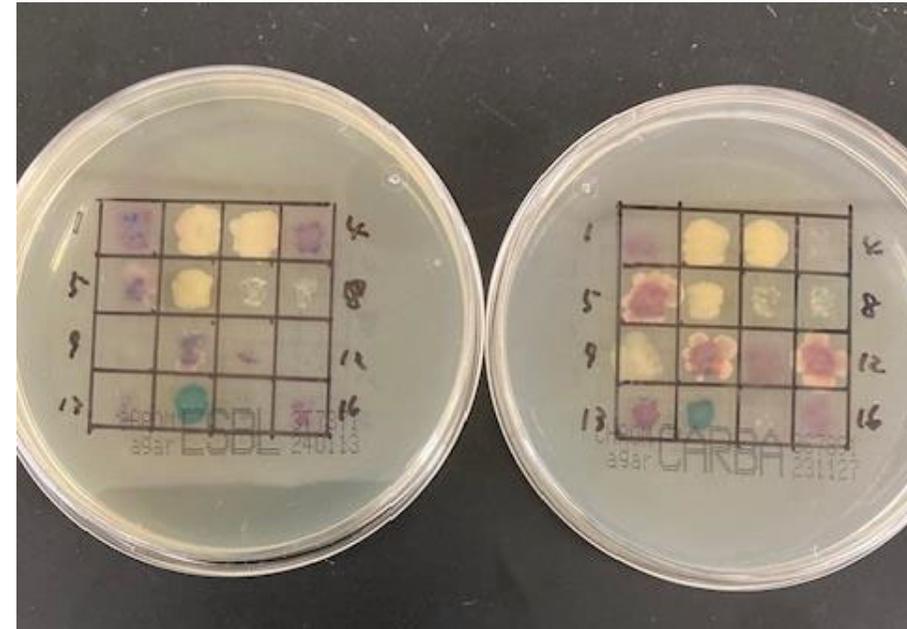
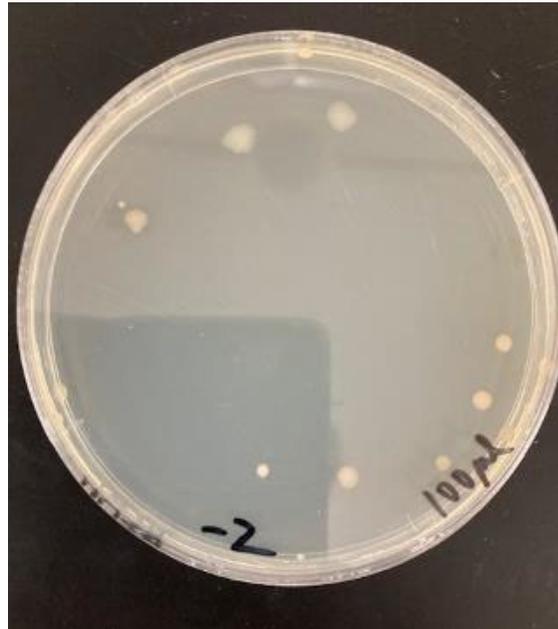


腸内容物を採取

菌種同定と耐性遺伝子検索



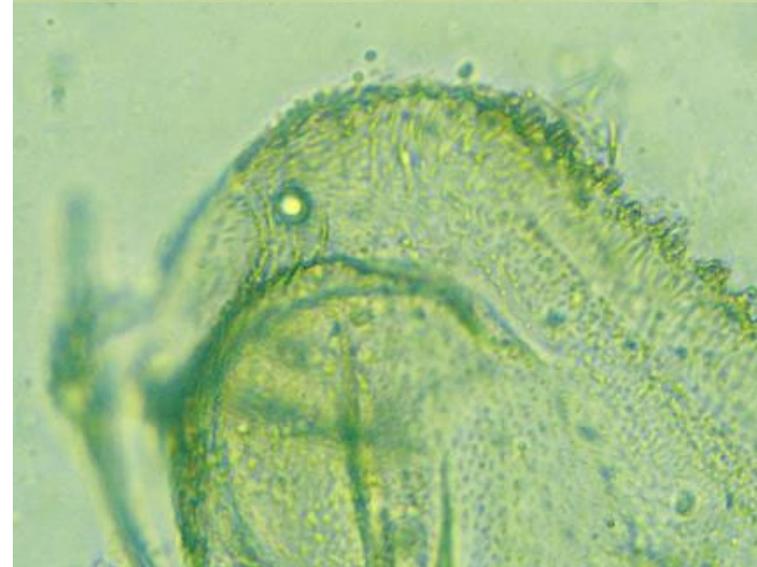
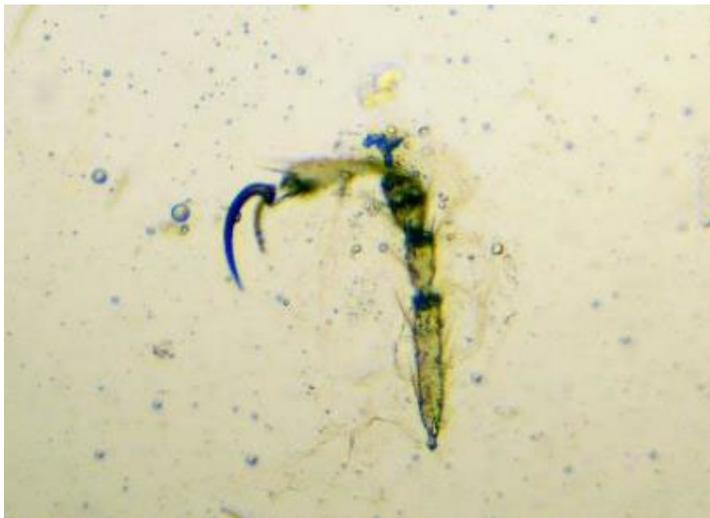
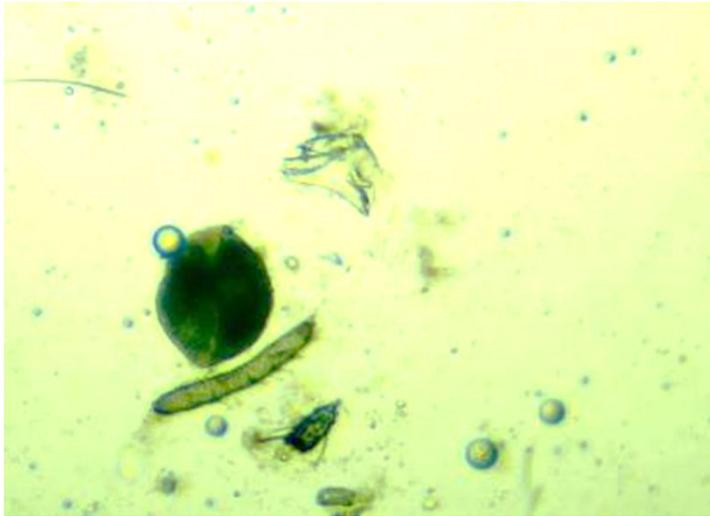
グラム染色 1,000倍



16S rDNA シーケンス
⇒ *Aeromonas hydrophila*

耐性遺伝子は今回検出できず

腸内容物において観察された プランクトン残渣



まとめと課題

- 湖水試料より各種抗菌薬耐性遺伝子が検出された
- フィルター捕捉物からは、Enterobacter sp. など
- プラクトンにおけるFISHによる抗菌薬耐性遺伝子の可視化
- 魚腸からは、淡水域でポピュラーなAeromonas sp.が検出された
- 魚腸から耐性遺伝子は検出できなかった ⇒ n数不足 蓋然性はある？
- 直ちに健康への影響を論じるものではないが、耐性菌や耐性遺伝子の人体内への侵入経路としての可能性

謝辞

本研究は、公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構の「令和5年度水質保全研究助成」を受け、行いました。

ここに記し、感謝の意を表します。