

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19405004

研究課題名（和文）インドシナ半島の養殖場における抗生物質汚染と薬剤耐性遺伝子の拡大

研究課題名（英文）Contamination status of antibiotics and spreading of drug-resistance genes in Indochina aquaculture environment

研究代表者 鈴木 聡 (SUZUKI SATORU)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：90196816

研究成果の概要（和文）：タイとベトナムの養殖場および周辺の畜産排水，都市排水における抗生物質汚染の実態を解明した．サルファ剤では家畜と人医療での使用薬剤種が異なり，汚染起源を推定するマーカーとなることを明らかにした．サルファ剤耐性遺伝子は畜産，都市排水で高頻度に検出され，同じ遺伝子が様々な環境に拡散している実態がわかった．また，サルファ剤耐性遺伝子の遺伝子型では欧州で知られている型とは異なる型が主要である特徴が明らかになった．

研究成果の概要（英文）：We monitored antibiotic contamination and found that sulfamethazine and sulfamethoxazole could be marker drugs to estimate contamination origin. Animal farm used mainly sulfamethazine. Sulfonamide resistance gene, sul, were detected frequently in animal farm, city canal and fish culture in this order. The genotype sul1 was the majority, which was different from Europe where sul2 is major. This study expanded very much the knowledge of antibiotic contamination and antibiotic resistance gene spreading in aquatic environments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：抗生物質，薬剤耐性菌，耐性遺伝子，養殖場，東南アジア

1. 研究開始当初の背景

近年発展途上国から先進国へ輸入される養

殖水産物から残留抗生物質が検出される事例が増加しており，食の安全確保の点から問

題視されている（中国から日本へ，朝日新聞平成15年10月3日；ベトナム，タイ，ミャンマーからEUへ，EU Press release; <http://europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/02/436&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>）．インドシナ半島の汽水域から沿岸にかけてのマングローブ林あるいは水田を利用した

エビ養殖場では安価な抗生物質（サルファ剤，キノロン系）の投与が行われているが，日本のよ

うに出荷前に休薬期間を設けていないため，前述のような薬剤の残留が起こる．無秩序な薬剤の使用は，同時に薬剤耐性菌の増加を促す．これまでにベトナムのエビ養殖場でのいくつかの薬剤の残留と耐性菌の出現率については，Leら（Mar Pollut Bull,2004; Sci Total Env, 2005）の報告があるが，この調査以外には報告はない．申請代表者らはこれまでに予備的調査で，タイのティラピア養殖ではベトナムとは異なる薬剤（オキシテトラサイクリン）が使われていることを確認しており，この魚種を大量に消費する地元民への影響，つまりヒトの腸内細菌・病原菌の耐性化ならびに魚を通しての耐性遺伝子の伝達が懸念される．さらに重要な点は，多種類の薬剤がインドシナ地域で使用されることによる多剤耐性菌の誘導と拡散が起こることである．このことはまだインドシナでは証明されていないが，申請代表者のこれまでの日本および韓国沿岸での研究（Kim et al, FEMS Microb Lett,2004）から考えても可能性は高く，本研究によって実態解明が期待された．東南アジアでの薬剤汚染と耐性菌の出現については，国際的学術論文で報告された例は上記のLeらのものだけであり，今後ベトナム，タイといった東南アジアでも養殖業の進んだ地域における実態把握と環境影響評価は重要課題である．

2. 研究の目的

申請代表者と分担者は，これまでに当該地域を対象にして都市化影響による重金属，内分泌攪乱物質などの化学汚染，および生態系への影響を研究してきており，その実績および現地事情を逐一観察した結果から，今回の薬剤汚染および薬剤耐性という新しい調査研究対象を選んだ．同時に，単なる耐性菌ではなく，各国での多種の薬剤の使用実態から多剤耐性の発生リスクへの発想に至った．本研究では，現地調査で現場の水，生物，底泥中の薬剤濃度を測定して汚染実態を解明し，同時に使用薬剤に対する耐性菌出現率を測定することで，汚染と耐性出現の相関を解明することを目的とする．また，採取したサンプル中から直接DNAを抽出し，培養できない

細菌群集も含めた現場環境の細菌叢と薬剤耐性遺伝子のリザーブ実態を把握する．つまり，耐性遺伝子が臨床から環境中細菌へ伝達されているかどうかを明らかにすることを目的としている．日本や欧米で分離される遺伝子との比較を行い，さらに，環境菌の耐性遺伝子からヒト腸内細菌への伝達効率を求め，環境間・国間およびヒトへの伝達のリスク評価を行う．

3. 研究の方法

現地での調査は代表者および分担者（高田）が共同で行い，博士論文テーマとしてベトナム地域を研究対象とする院生（Phon Hoa Thi Phuong），ならびに補助員として愛媛大および農工大の院生が同行する．現地で試料の速やかなる過濃縮および細菌培養が必要なので，ハノイ国立大学（現地協力者：Phan Huong Viet 教授）の研究室を使って実験を行う．タイにおいては，同様にコンケン大学（現地協力者：Allisara Reungsang 准教授）の研究室で実験を行う．現地で必要な機器はすでに備わっている．薬剤分析はLC-Ms/MsおよびHPLCで，遺伝子解析はPCR法およびシーケンス解析で行なう．また，微生物生態系多様性はDGGE法で行なう．

4. 研究成果

（1）ベトナムの畜産・水産・農業統合地域（VAC）では，サルファ剤が多く使用されており，特にサルファメタジンの環境濃度が高かった．水産養殖場の汚染は低かったが，市内運河と畜産排水には多種，かつ高濃度の薬剤汚染が認められた．サルファ剤の薬剤種を精査することで，汚染起源の推定が可能であった．水圏での耐性菌出現率は高く，sul 遺伝子では，欧州の畜産環境と異なり，sul1 がもっとも頻度高く検出された．耐性菌ではAcinetobacter 属が多く，全ての環境で主要であった．本属菌はヒトの日見感染菌として重要種であることから，VAC 環境は耐性をもつAcinetobacter のリザーブとして注視する必要があることを示した．

（2）タイとベトナムのキノロン系薬剤の汚染では，タイで高い汚染が検出された．薬剤使用量は両国の経済状態を反映した結果と推定される．一方で，キノロン耐性菌は，ベトナムの方で出現率が高く，濃度との相関は全くなかった．季節別調査では，乾季に耐性率が高かった．キノロン耐性遺伝子群では，既知の遺伝子検出率は低く，未知の耐性遺伝子の関与と他の化学物質との交差耐性が示唆された．

（3）インドシナとの比較のために，日本，フィリピン，フィンランドなどの養殖場での耐性遺伝子分布を行なったところ，テトラサイクリン耐性遺伝子はインドシナ半島より

は、フィンランド、日本で広く分布することが明らかになった。薬剤暴露が示唆されるが、同所に異なる遺伝子型の耐性遺伝子が検出される場合があることから、テトラサイクリン耐性遺伝子の起源は複数有り、薬剤汚染のない環境でも継続的にリザーブされている実態が明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. 題目：流入下水および下水処理水中の水溶性微量有機汚染物質および人為起源マーカ-の濃度 (査読有り) 著者：森本拓也、村松佑紀、竹下綾子、清水亜希子、村上道夫、高田秀重、

投稿先：用水と廃水

状態：採択済み印刷中

2. 題目：Fluoroquinolone (FQ) contamination does not correlate with occurrence of FQ-resistant bacteria in aquatic environments of Vietnam and Thailand. (査読有り)

著者：Takasu, H., Suzuki, S., Reungsang, A. and Viet, P. H.

投稿先：Microbes Environ., 26, 135-143.

状態：2011 年出版済み

3. 題目：Antibiotic contamination and antibiotic-resistant bacteria in animal farms, city canal and aquaculture environments of north Vietnam. (査読有り)

著者：Hoa, P.H.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D.H., Viet, P.H. and Suzuki, S.

投稿先：Sci. Total Environ., 409, 2894-2901.

状態：2011 年出版済み

4. 題目：Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. (査読有り)

著者：Tamminen, M., Karkman, A., Lohmus, A., Muziasari, W., Takasu, H., Wada, S., Suzuki, S. and Virta, M.

投稿先：Environ. Sci. Technol., 45, 386-391.

状態：2011 年出版済み

5. 題目：Differences of genetic diversity and antibiotics susceptibility of

Pseudomonas aeruginosa isolated from hospital, river and coastal seawater. (査読有り)

著者：Nonaka, L., Inubushi, A., Shinomiya, H., Murase, M. and Suzuki, S.

投稿先：Environ. Microbiol. Report, 2, 465-472

状態：2010 年出版済み

6. 題目：Transfer of the chromosomally encoded tetracycline resistance gene tet(M) from marine bacteria to *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. (査読有り)

著者：Neela, FA., Nonaka, L., Rahman, MH and Suzuki, S.

投稿先：World J. Microbiol. Biotechnol., 25, 1095-1101.

状態：2009 年出版済み

7. 題目：水環境における薬剤耐性菌の増殖する遺伝子リスク (査読有り)

著者：鈴木 聡

投稿先：用水と廃水, 50(7), 616-620.

状態：2008 年出版済み

8. 題目：Occurrence and diversity of tetracycline resistance gene tet(M) in enteric bacteria of Antarctic Adélie penguin. (査読有り)

著者：Rahman, H. M., Sakamoto, K. Q., Nonaka, L. and Suzuki, S.

投稿先：J. Antimicrob. Chemother. 62, 627-628.

状態：2008 年出版済み

9. 題目：Occurrence of two genotypes of tetracycline (TC) resistance gene tet(M) in the TC-resistant bacteria in marine sediments of Japan. (査読有り)

著者：Rahman, H.M., Nonaka, L., Tago, R. and Suzuki, S.

投稿先：Environ. Sci. Technol. 42, 5055-5061.

状態：2008 年出版済み

10. 題目：High occurrence rate of tetracycline (TC)-resistant bacteria and TC resistance genes relates to microbial diversity in sediment of Mekong river main waterway. (査読有り)

著者：Suzuki, S., Kobayashi, T., Suehiro, F., Tuyen, B.C. and Tana, T.S.

投稿先：Microbes Environ. 23, 149-152.

状態：2008 年出版済み

11. 題目：Detection of the *sul1*, *sul2*, and

sul3 genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. (査読有り)

著者: Hoa, P.T.P., Nonaka, L., Viet, P.H. and Suzuki, S.

投稿先: Sci. Total Environ., 405, 377-384.
状態: 2008 年出版済み

12. 題目: Distribution of tetracycline resistance gene, tet(M), in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan. (査読有り)

著者: Nonaka, L., Ikeno, K. and Suzuki, S.

投稿先: Microbes Environ., 22, 355-364.

状態: 2007 年出版済み

13. 題目: 水圏環境における薬剤耐性微生物のモニタリング (査読有り)

著者: 野中里佐, 鈴木 聡

投稿先: 日本水産学会誌, 73(2), 317-320.

状態: 2007 年出版済み

[学会発表] (計 28 件)

1. 清水亜希子、村田綾子、竹下綾子、村松佑紀、高田秀重、鈴木聡、中田典秀、真名垣聡、家畜排水由来抗生物質による熱帯アジア水域の汚染実態解明、第 19 回環境化学討論会 (名古屋; 2010 年 6 月 22 日)
2. Bong, C.W., Obayashi, Y. and Suzuki, S.: Proteolytic enzyme activities in cultured heterotrophic marine bacteria. 109th ASM General Meeting of American Society for Microbiology, Philadelphia, PA, USA, May, Abstract 543. (2009)
3. Wada, S. and Suzuki, S.: Zinc effect on bacterial mineralization process of dissolved organic matter in coastal seawater. The 41st International Liege Colloquium on Ocean Dynamics. Liege, Belgium, May, Abstract no page (only website). (2009)
4. 簡 梅芳・宮内啓介・林 高弘・鈴木聡・張 祖恩・遠藤銀朗: 水銀汚染環境における水銀分解遺伝子の分布-水銀汚染を生物による浄化技術の開発に向けて-. 環境バイオテクノロジー学会, 東京, 6 月, 要旨集 24. (2009)
5. Takasu, H., Suzuki, S., Reungsang, A. and Viet, P.H. : Contamination of fluoroquinolones (FQs) and

FQs-resistant bacteria in aquatic environments in southeast Asia, 3rd Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and Environment, Tours, France, June, Abstract 58. (2009)

6. Suzuki, S.: Drug-resistant bacteria in Asian aquatic environments. Interdisciplinary Symposium for Young Investigator, Biological responses to chemical contaminants: from molecular to community level, Aveiro, Portugal, September, Program & Abstract, 13. (2009)
7. Hoa, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Anh, D.H., Viet, P.H., Hien, P.T. and Suzuki, S.: Occurrence rates of sulfamethoxazole and erythromycin-resistant bacteria and drug concentrations in wastewater of integrated aquaculture-agriculture (VAC) sites in northern Vietnam. Interdisciplinary Symposium for Young Investigator, Biological responses to chemical contaminants: from molecular to community level, Aveiro, Portugal, September, Program & Abstract, 16. (2009)
8. Chien M-F., Lin, K-H., Chang, J-E., Huang, C-C., Endo, G. and Suzuki, S.: Distribution of mercury resistance determinants in highly mercury polluted area in Taiwan. Interdisciplinary Symposium for Young Investigator, Biological responses to chemical contaminants: from molecular to community level, Aveiro, Portugal, September, Program & Abstract, 34. (2009)
9. Chien, M-F., Nakamura, Y., Lin, K-H., Chang, J-E., and Suzuki, S.: The occurrence of oxytetracycline resistant bacteria from aquatic environment with mercury pollution. Interdisciplinary Symposium on Environmental Specimen Bank, Matsuyama, Japan, December, Program & Abstract, 58. (2009)
10. Sakai, H., Wada, S., Isobe, T., Takata, H., Sasaki, M., Suzuki, S.: Mutation in the Escherichia coli pqq1 gene results in abnormal colonization. Interdisciplinary Symposium on

- Environmental Specimen Bank, Matsuyama, Japan, December, Program & Abstract, 59. (2009)
11. Wada, S., Hirata, S. and Suzuki, S. : Inhibition of DOM decomposition in coastal environments by zinc input. Interdisciplinary Symposium on Environmental Specimen Bank, Matsuyama, Japan, December, Program & Abstract, 60. (2009)
 12. Takasu, H., Reungsang, A., Viet, P.H. and Suzuki, S. : Fluoroquinolone antibiotics (FQs)-resistant bacteria in aquatic environments in Thailand and Vietnam. Interdisciplinary Symposium on Environmental Specimen Bank, Matsuyama, Japan, December, Program & Abstract, 61. (2009)
 13. Hoa, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Anh, D.H., Viet, P.H., Suzuki, S. : Contamination by drugs and drug-resistant bacteria in aquatic environments of Red River Delta, Vietnam . 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME12, Cairns, Australia, August, Abstracts, 32. (2008)
 14. Bong, C. W., Obayashi, Y. and Suzuki, S. : Variability of enzyme activities in seawater and Marine Bacteria. 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME12, Cairns, Australia, August, Abstracts, 108. (2008)
 15. Fukushima, K., Dubey, S. K. and Suzuki, S. : Quantitative analysis of expression of tributyltin (TBT)-regulated genes in TBT-resistant *Pseudomonas aeruginosa* 25W. 12th International Symposium on Microbial Ecology ISME12, Cairns, Australia, August, Abstracts, 129. (2008)
 16. Bong, C. W., Obayashi, Y. and Suzuki S. : Changes of proteolytic activities in stored seawater and bacterial isolates. Interdisciplinary Symposium on Environmental Sciences -To Establish an Asian Network of Environmental Researchers, Matsuyama, Japan, November, Abstracts, 43. (2008)
 17. Bong, C. W., Obayashi, Y. and Suzuki S. : Changes of proteolytic enzymes activities and bacterial assemblage in stored seawater. 第24回日本微生物生態学会, 札幌, 11月, 要旨集, 70. (2008)
 18. Suzuki, S. : Occurrence of drug resistant bacteria and resistance genes in Asian aquatic environment -Focusing on tetracycline resistance. 2008 Taiwan-Japan Academic Forum for Marine Environmental Biology, Taipei, Taiwan, Dec, Programme & Abstracts, 3. (2008)
 19. Neela, F. A., Nonaka, L., Rahman, M. H. and Suzuki, S. : Transfer of chromosomal encoded tetracycline resistance gene tet (M) from marine bacteria to *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. 第23回日本微生物生態学会, 松山市, 9月, 要旨集, 46.
 20. Hoa, P. T. P., Suzuki, S., Nonaka, L. and Smalla, K. : Distribution of sul genes in bacterial isolates from VAC system, shrimp pond and canal water samples in Vietnam. 第23回日本微生物生態学会, 松山市, 9月, 要旨集, 70.
 21. Inubushi, A., Nonaka, L., Shinomiya, H., Asano, Y. and Suzuki, S. : Antibiotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal sea water. 第23回日本微生物生態学会, 松山市, 9月, 要旨集, 130.
 22. Omine, A., Reungsang, A. and Suzuki, S. : Occurrence rate of oxytetracycline (OTC)-resistant bacteria in sediment of aquaculture sites in Thailand and Laos, and the susceptibility of isolates to OTC. 第23回日本微生物生態学会, 松山市, 9月, 要旨集, 130.
 23. Nonaka, L., Kobayashi, T., Maruyama, F. and Suzuki, S. : Molecular evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria. 第23回日本微生物生態学会, 松山市, 9月, 要旨集, 134.
 24. Nonaka, L., Kobayashi, T., Maruyama,

- F. and Suzuki, S.: Molecular evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria. American Society for Microbiology. 107th General Meeting, Toronto, Canada, May, Program, 186.
25. Shinomiya, H., Nonaka, L., Khan, N. H., Kogure, K., Ishii, Y., Asano, Y. and Suzuki, S.: Differences in genotype, serotype and pathogenicity between clinical and marine isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. American Society for Microbiology Conferences, *Pseudomonas 2007*, Seattle, USA, August, Abstract, 94.
26. Hoa, P. T. P., Nonaka, L., Viet, P. H. and Suzuki, S.: Distribution of sul genes in sulfadiazine resistant bacterial in various water environments in northern Vietnam. 2nd Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and Environments (ARAE), Tours, France, December, Abstract, 2.
27. Neela, F. A., Nonaka, L., Rahman, H. M. and Suzuki, S.: Specific transfer of tet (M) gene conveyed on the chromosome of marine bacteria to *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. 2nd Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and Environments (ARAE), Tours, France, December, Abstract, 3.
28. Nonaka, L., Kobayashi, T., Maruyama, F. and Suzuki, S.: Molecular evidence for the evolutionary origin of ribosomal protection proteins mediating tetracycline resistance. 2nd Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and Environments (ARAE), Tours, France, December, Abstract, 4.
- pp. 200, (Suzuki, S., Suehiro, F. and Kobayashi, T. 2-2. Resistance of sediment bacteria to organotin and tetracycline. pp. 83-96)
3. 海洋生命系のダイナミクス第5巻, 海と生命-海の生命観をもとめて一. (2009) 東海大学出版会, 第24章, 海洋における遺伝子伝播, pp. 364-385.
4. 鈴木 聡 (2007) 分担
メコンと黄河-研究者の熱い思い-
竹内邦良・福嶋義宏 編著, 学報堂
pp. 135-141, メコン流域の発展と化学汚染.
6. 研究組織
(1) 研究代表者
鈴木 聡 (SUZUKI SATORU)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授
研究者番号: 90196816
- (2) 研究分担者
高田秀重 (TAKADA HIDEHIGE)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・教授
研究者番号: 70187970

[図書] (計4件)

1. 鈴木 聡 (2009) 編著 分子でよむ環境汚染, 東海大学出版会. pp. 252. (第6章 微生物による分子変換, pp. 159-187)
2. Suzuki, S. and Takada, H. (Eds) (2009) 編著 Chemical Pollution in Indochina, Tokai University Press,