

令和 5 年 4 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18742

研究課題名（和文）インテグロンを指標とした水環境中の薬剤耐性汚染の監視スキームの構築

研究課題名（英文）Establishment of monitoring scheme of antimicrobial resistance pollution in water environment by using integron as a marker gene

研究代表者

春日 郁朗（Kasuga, Ikuro）

東京大学・先端科学技術研究センター・准教授

研究者番号：20431794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：日本及びベトナムの水環境、下水試料からDNAを抽出し、クラス1インテグロンのインテグラーゼ(intI1)遺伝子を含む複数の薬剤耐性遺伝子や可動遺伝因子を標的としたハイスループット定量PCRを実施すると共に、インテグロン遺伝子カセットの構造をロングリードシーケンシングによって解析した。クラス1インテグロンは日越両国の試料に広く分布しており、その濃度と相関の高い薬剤耐性遺伝子も多く検出された。遺伝子カセットの中には、アミノグリコシド耐性遺伝子などが含まれていたが、その組成は両国で異なっており、クラス1インテグロンを介した薬剤耐性遺伝子の拡散の状況には差異があることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性遺伝子による水環境汚染は国際的な課題である。多様な薬剤耐性遺伝子を効率的に監視していくためには、薬剤耐性遺伝子汚染の監視指標を設定する必要がある。薬剤耐性遺伝子を遺伝子カセット中に取り込み、水平伝播にも関与しているクラス1インテグロンは指標の候補である。本研究により、クラス1インテグロンの量と組成を解析することにより、日本およびベトナムの水環境の薬剤耐性遺伝子汚染の状況を把握することに成功した。

研究成果の概要（英文）：DNA was extracted from water environment and sewage samples from Japan and Vietnam. High-throughput quantitative PCR was performed targeting antimicrobial resistance genes and mobile genetic factors, including integrase gene (intI1) of class 1 integrons. In addition, the structure of the class 1 integron gene cassette was analyzed by long-read sequencing. Class 1 integrons were widely distributed in both Japanese and Vietnamese samples. Many antimicrobial resistance genes were correlated with abundance of intI1. The gene cassettes contained antimicrobial resistance genes such as aminoglycoside resistance genes. Their composition differed between the two countries, suggesting that distribution patterns of antimicrobial resistance gene via class 1 integrons could be different in two countries.

研究分野：環境工学

キーワード：薬剤耐性遺伝子 インテグロン 水環境 下水

### 1. 研究開始当初の背景

抗生物質が効かない病原微生物の出現は、世界的にも喫緊の課題であり、2050年には薬剤耐性による死亡者が年間1000万人に達し、がんによる死亡者数を上回るという驚愕の予測がなされている (Jim O'Neill, 2014)。わが国でもヒト (JANIS) や動物 (JVARM) を対象とした体系的なサーベイランスは行われている。しかし、最終的な排出先である環境については、多様な薬剤耐性細菌の監視指標すら決まっておらず、対策は未着手のままである。そこで本研究では、水環境中における薬剤耐性汚染の包括的な指標として「インテグロン」に着目し、水環境の監視スキームを構築することに挑戦する。細菌DNAの遺伝子集積装置であるインテグロンは、薬剤耐性遺伝子 (Antimicrobial resistance gene: ARG) と密接に関わっている。インテグロンは、ARGなどの外部遺伝子を「遺伝子カセット」として自身の下流に取り込み、それらを発現することができる (図1)。しかし、わが国の水環境中におけるインテグロンの濃度レベルとARGとの関連や、遺伝子カセットに集積されたARGの種類・多様性 (遺伝子カセット構造) は明らかではない。

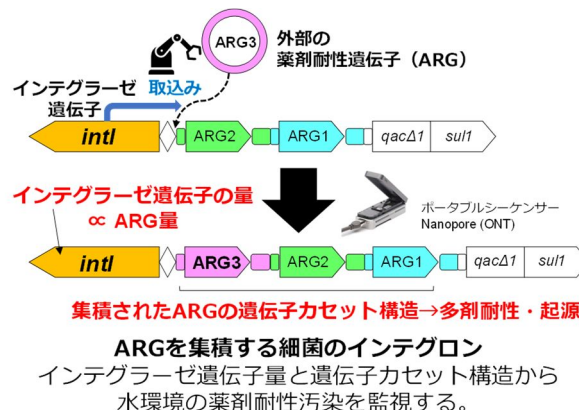


図1 インテグロンとARGとの関係

### 2. 研究の目的

本研究では、インテグロンをコードする遺伝子 (インテグラーゼ遺伝子) の量と、インテグロンが集積した遺伝子カセット構造という2つの情報に着目し、水環境中の薬剤耐性汚染のレベルと特徴を評価することを目指す。インテグラーゼ遺伝子のレベルとARGとの相関が確認できれば、インテグラーゼ遺伝子量という単一指標に基づいた薬剤耐性の監視レベルを提案できる可能性がある。また、遺伝子カセット構造 (ARGの種類や多様性) は、薬剤耐性細菌の多剤耐性や起源、薬剤による選択圧の履歴を反映するフィンガープリントであり、水環境中の薬剤耐性汚染のスナップショットを得ることができる。遺伝子カセット構造の解析にはポータブルシーケンサーであるNanoporeを活用し、公共用水域調査など水環境サーベイランスに実装可能な汎用プロトコルの確立を目指す。対象としては、薬剤耐性の状況が大きく異なる日本とベトナムの水環境を取り上げる。特に、ベトナムでは下水の90%が未処理のまま水環境に放出されており、薬剤耐性細菌による環境汚染がより深刻と推察される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 採水

関東地方の河川及び下水処理場の流入水、処理水、ベトナムの水環境 (河川、湖、地下水) 及び下水処理場の流入水を採取し、試料を孔径 0.22 μm のメンブレンでろ過してDNAを抽出した。

#### (2) ハイスループット定量PCR

抽出したDNAを鋳型として、ハイスループット定量PCRを実施した。ハイスループット定量PCRには、SmartChip Real-time PCR systemを用い、144種類のARGsや可動遺伝因子を対象とした測定を行った。得られた値は、全細菌の16S rRNA遺伝子コピー数で標準化した。

#### (3) インテグロン遺伝子構造の解析

クラス1インテグロンのインテグラーゼ遺伝子 (*intI*) を標的とした定量PCRを実施した。また、クラス1インテグロンの遺伝子カセット両端を標的としたPCRを行い、遺伝子カセットを増幅した。増幅したPCR産物を精製し、Nanoporeを用いたロングリードシーケンシングにより、配列解析を行った。ARGsの検出は、Resfinderを参照して行った。

### 4. 研究成果

ハイスループット定量PCRの結果、*intI1* 遺伝子は、日本及びベトナムともにすべての試料から検出された。このことは、クラス1インテグロンが水環境に広く分布していることを示している。*intI1* 遺伝子と他の遺伝子との関係性を評価したところ、*intI1* 遺伝子の相対濃度と有意な正の相関を示すARGや可動遺伝因子を抽出することができ、*intI1* 遺伝子をARGのモニタリング指標とすることの有用性が確認された。相関係数が高い遺伝子の中には、*sul1* や *qacEdelta1* などクラス1インテグロンの遺伝子カセットに入っている頻度が極めて高い遺伝子が含まれて

おり、相関解析の妥当性が明らかになった。特に相関係数が高い遺伝子としては、アミノグリコシド耐性遺伝子やトリメトプリム耐性遺伝子などが抽出された。これらの遺伝子は、クラス1インテグロン遺伝子カセットに含まれている報告例も多い(図2)。

クラス1インテグロンの遺伝子カセットを増幅した結果、様々な長さの遺伝子カセットが検出され、水環境や下水中のクラス1インテグロン遺伝子構造は多様であることが明らかになった。遺伝子カセット中に含まれているARGの個数は日本が1~3、ベトナムが1~4であり、多剤耐性との関連も示唆された。図3に日本の水環境試料における遺伝子カセット構造の組成を示す(Kasuga et al., 2022)。日本の試料では、*aadA1*、*aadA2*、*aac(6')-31*などのアミノグリコシド耐性遺伝子や、*bla<sub>GES24</sub>*などのβ-ラクタマーゼ遺伝子が主に検出された。*bla<sub>GES24</sub>*は、アミノ酸置換によりカルバペネムの分解活性を有していることが推察され、インテグロンを介した細菌群への拡散などのリスクについて注意を払う必要がある。日越の遺伝子カセット構造を比較すると、ベトナムの水環境では、*aadA1*、*aadA2*、*qacH*(多剤排出ポンプ)など日本の水環境と共通した遺伝子が観察された一方で、*dfrA1*(トリメトプリム耐性)、*catB8*(フェニコール耐性)、*bla<sub>CARB-2</sub>*(β-ラクタマーゼ)など、日本の水環境からは検出されない、または相対濃度が極めて低いARGが検出された。両国におけるクラス1インテグロン遺伝子カセットの組成解析からは、インテグロンを介したARGの拡散や伝播に差異があることが示唆された。

<引用文献>

- Jim O'Neill (2016) AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations Final report and recommendation.
- Kasuga, I., Nagasawa, K., Suzuki, M., Kurisu, F., and Furumai, H. (2022). High-Throughput Screening of Antimicrobial Resistance Genes and Their Association With Class 1 Integrons in Urban Rivers in Japan. *Frontiers in Environmental Science* 10. 825372. doi: 10.3389/fenvs.2022.825372.

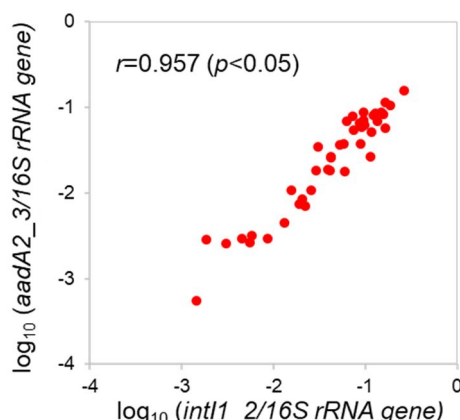


図2 ベトナムの水環境試料における *intI1* と *aadA2* (アミノグリコシド耐性遺伝子) との相関関係

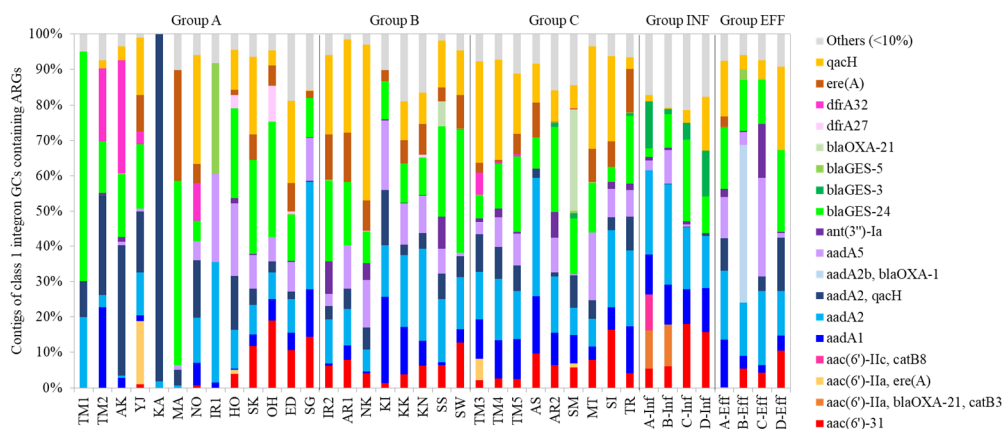


図3 日本の水環境試料におけるクラス1インテグロン遺伝子構造の組成 (Kasuga et al., 2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikuro Kasuga, Kyoka Nagasawa, Masato Suzuki, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai	4. 巻 10
2. 論文標題 High-Throughput Screening of Antimicrobial Resistance Genes and Their Association With Class 1 Integrons in Urban Rivers in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Environmental Science	6. 最初と最後の頁 825372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fenvs.2022.825372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Surveillance of antimicrobial resistance in water environment and wastewater in Vietnam
3. 学会等名 Resistomap Webinar Series -Monitoring ARGs in LMICs-（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Thi My Hanh Vu, Masato Suzuki, Taichiro Takemura, Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Association of antimicrobial resistance genes and class 1 integrons in urban sewage and water environment in Vietnam
3. 学会等名 6th International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春日郁朗
2. 発表標題 ベトナムにおける薬剤耐性菌のワンヘルスアプローチによるサーベイランス
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春日郁朗
2. 発表標題 水環境における薬剤耐性問題
3. 学会等名 東大水フォーラム公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長澤杏香，春日郁朗，栗栖太，古米弘明
2. 発表標題 Class 1インテグロンを指標とした都市河川における薬剤耐性遺伝子汚染の評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹村 太地郎  (Takemura Taichiro)  (60572899)	長崎大学・熱帯医学研究所・客員研究員   (17301)	
研究分担者	鈴木 仁人  (Suzuki Masato)  (70444073)	国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官   (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------