

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25257402

研究課題名(和文)人為・自然攪乱された熱帯アジアの水環境における抗生物質汚染と薬剤耐性遺伝子の動態

研究課題名(英文) Contamination status of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in tropical Asian aquatic environments with artificial and natural disturbance

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯アジアでは、下水や洪水により水環境が攪乱され、種々の起源の抗菌剤、薬剤耐性菌が流入する。本調査研究は、水畜産統合農業環境、市内河川、海水の汚染実態を解明した。薬剤汚染では、都市部と農村ともにサルファ剤が優占し、市内排水と家畜排水両方に由来した。畜産排水では、セファロスポリン耐性大腸菌が多く検出され、耐性菌はハエが広域に運んでいると示唆された。薬剤耐性遺伝子は、培養できない細菌に特定のサルファ剤耐性遺伝子が保有されていた。タイの特徴として、耐性遺伝子は畜産・下水では高濃度だが、海では極めて低濃度だった。本研究で、タイでの薬剤・細菌・遺伝子の環境動態の特徴を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Tropical Asian environments receive various origin effluents, which contain antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs). This study found that sulfonamides are abundant in veterinary and human discharges in Bangkok and rural areas. Cephalosporin resistant E. coli was highly abundant in animal effluent, and fly should be a vector of the bacteria. Yet-to-be cultured bacteria possess specific ARG of sulfonamide. This study could reveal specific characters of ARGs and antibiotic contamination in Thailand aquatic environments.

研究分野：環境微生物学

キーワード：抗生物質 薬剤耐性菌 薬剤汚染 水圏 熱帯アジア 環境攪乱

1. 研究開始当初の背景

【背景】国内外において、薬剤耐性の研究は医学・獣医学分野で病原菌を対象として多くの研究がある。また、臨床以外では、下水処理工学分野で、水環境での耐性遺伝子の動態研究が欧米では過去 10 年ほどで報告されてきた (Baquero et al, 2008)。近年になって直接環境から耐性遺伝子を定量する方法が確立され、研究代表者(鈴木)とフィンランドの共同研究者は養殖場環境で初めて耐性遺伝子の長期残存を定量的に証明した (Tamminen et al, 2011)。本研究は、頻繁に洪水被害を受けるタイのチャオプラヤ川をはじめとする都市水域から沿岸にかけての水環境において、抗生物質濃度を実測しつつ、同じ試料で耐性遺伝子と耐性菌を定量する環境化学と微生物学の学際的研究である。当グループは過去 10 年間インドシナ半島をはじめとする熱帯アジア諸国で化学汚染と耐性菌調査を行ってきた経緯があり(例: Suzuki & Takada, 2009)、この経験を本研究では抗生物質耐性遺伝子の定量的モニタリングに活かす。これができるのは鈴木と分担者(高田)のグループが世界でも唯一であろう(例: Hoa et al, 2011)本研究は近年問題化している NDM-1 をはじめとする広域ベータラクタム系薬剤耐性遺伝子定量に長けた分担者(田村)を加え、タイを主要フィールドとした研究から耐性遺伝子の環境間移動・拡散の実態解明を目指す国際共同研究と位置づけられる。

【動機】鈴木は過去 10 年間、アジアを中心に、環境での抗生物質汚染と耐性菌の分布を調査してきた。その過程で、同じ耐性遺伝子が地理的に離れた地点や異なる環境から検出されることを見いだした(鈴木、科研基盤 B(海外)19405004, 平成 19~22)。最近、海外旅行が耐性遺伝子を運ぶ、という論文が出されるなど (Peirano et al, 2011)、国際的着眼点の研究者が出始めている。さらに、近年、抗生物質が環境水中で希釈・分解されても、低濃度化した抗生物質が耐性菌選択に働くという重要なコンセプトが出された (Andersson & Hughes, 2011)。これまで微生物に影響がないと思われていた低濃度こそが重要な選択圧となるのである。2009 年に鈴木はフィリピンで台風後の洪水時に予備調査を行い、耐性遺伝子 (*su11-3*) の陸水から海水へ至る際のユニークな動態を見いだした。このような背景から、水圏の攪乱後における耐性遺伝子の動態研究を着想した。科研基盤 B (平成 19~22) では、遺伝子の分布をインドシナ半島の養殖場を中心に明らかにしたが、本研究では、さらに深化させ、洪水等の物理的攪乱と汚水排出等の化学的攪乱を受ける水圏で、細菌群集が混合されて選択圧を受けた時の状況を研究する。耐性遺伝子がどのように環境に残存するか? 他菌種への伝播はどうなるのか? また、それは地域固有現象か? 一般的現象か? という疑問に答えることを最終目標とする。世界的な拡大が懸念される広域ベータラクタム耐性遺伝子も含めてモニタリングを行なう。微量の耐性遺伝子と抗生物質両方を定量する動態研究として本研究が企画

された。

2. 研究の目的

本研究はタイを主要なフィールドとして、サルファ剤、テトラサイクリン(TC)系、キノロン系、広域ベータラクタム系の耐性菌と耐性遺伝子の分布・環境残存等の実態を解明することを目的とし、遺伝子の拡散動態を推定する。同時に薬剤汚染の実態を解明し、タイと他のアジア諸国を比較考察する。

3. 研究の方法

【抗生物質定量】試料を現地で一次濃縮処理をし、オアシス®に吸着させて日本へ運搬する。抗菌剤定性・定量は LC-MS/MS で行った。

【微生物分析】薬剤耐性菌発生率は培養法で行い、大腸菌は選択培地で定量した。培養可能菌から精製する全 DNA を解析することで、耐性遺伝子保有状況を把握できた。細菌群集は 16S rRNA 遺伝子を標的とするメタゲノム解析を行った。

【遺伝子定量】世界的に自然界で優占するサルファ剤および TC 系の耐性遺伝子を、定量 PCR で測定した。方法はすでに鈴木らが確立したものである (Suzuki et al., 2014)。

4. 研究成果

【抗菌剤濃度】タイの水試料の抗菌剤濃度は約 1ng-100µg/L と幅広い濃度で検出され (図 1)、都市域の試料より畜産排水は 1-3 桁高い濃度となった。家畜の治療薬や飼料添加物・成長促進剤として抗菌剤が大量に使用されていることが示唆された。他のアジア諸国と比較すると、マレーシアの養殖場試料では、Ciprofloxacin や Enrofloxacin が高濃度で検出された。中でも養殖エビに含まれる Enrofloxacin の濃度は Maximum Residue Limit (MRL) である 100µg/kg を超えていた。加えて、タイの水域における抗生物質濃度と、腸内細菌が *tet* 遺伝子を有する割合との間に

有意な関係が認められ、アジアの水域は抗生物質と薬剤耐性遺伝子が比例して発生・残存していることが示唆された。以上の結果から、家畜の糞便

が抗生物質と薬剤耐性遺伝子のホットスポットと考えられたため、計画外であるが、堆肥も分析に供した。

結果として、堆肥全試料から抗生物質が検出された。最高値では豚由来堆肥でおおよそ 6µg/g、牛由来堆肥で 30ng/g、鶏由来堆肥で

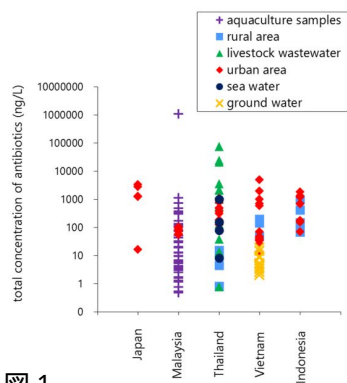


図 1.

600ng/gであった。豚・牛由来堆肥ではTC系抗生物質が優占し、鶏由来堆肥ではキノロン系抗生物質が支配的であった。加えて堆肥中細菌群集の *tet(A)* 遺伝子量とTC濃度の間に有意な相関関係があった。この結果から堆肥化のプロセスを経ても耐性遺伝子と抗生物質は残存し続け、堆肥の施肥を介して環境中に拡散される恐れがあることが明らかになった。アジアにおける畜産由来の抗生物質汚染は深刻であり、キノロン系抗生物質を含む汚染実態の継続的な把握と共に、抗生物質の家畜に対する慎重使用が求められている。

【耐性菌分布】 バンコク市内と南部トラン県の河川水や農場排水からDHL培地とクロモカルト培地を用いてエロモナス属菌、大腸菌を分離した。分離菌株の多くがTC耐性遺伝子(*tetA,B,C,E,M*のいずれか)やサルファ剤耐性遺伝子(*sul1,2,3*)を保有していた。セフトロスポリン耐性エロモナス属菌からは、*blaCTX-M-1*が検出された。セフトロスポリン耐性大腸菌からは *blaCTX-M-1* の他に、*blaCTX-M-9*, *blaCMY-2* が検出された。農場および市中のハエからは第3世代セフトロスポリン系薬剤であるセフトキシムに耐性を示す菌が分離された。既知の耐性遺伝子とともに、新しい遺伝子群もすでに広汎な腸内細菌と淡水細菌に広がり、ハエがベクターとして働いていることが示唆された。新たに、水圏ではエロモナス属がモニタリングに適した細菌群であることも分かった。

【耐性遺伝子】 まず、バンコク周辺水圏での細菌叢を見ると、淡水域では腸内細菌科が多いが、海水域に入るとこれが極めて低率になり、代わってアルファプロテオグループとシアノバクテリアが優占した。このような群集組成の中では、サルファ剤耐性遺伝子 *sul1*, *sul2* が 10~100細胞に1コピー(16S rRNA 遺伝子数で正規化)の高濃度で検出された。これまで検出例の少ない *sul3* も 10000細胞に1コピー以上検出された。この結果は都市河川、農村地帯両方で共通だった。一方、培養菌ではチャオプラヤ川で高濃度に *sul1*, *sul2* が保有されていたが、郊外河川では殆ど検出されなかった。これは、人間・家畜の糞便由来の細菌が *sul1*, *sul2* を有し、人為影響の少ない自然環境中の未知の細菌群集が *sul3* を保有することを示唆する。加えて、海水試料では殆ど耐性遺伝子は定量限界以下であった。この結果から、タイの特徴としては、人・家畜由来耐性遺伝子は自然群集にはあまり拡散しておらず、流入する細菌が耐性遺伝子を保有していることが示唆された。環境へ流出した耐性遺伝子が人へ暴露リスクを持つかが、今後の課題である。

本研究では、タイ水圏での抗菌剤・耐性遺伝子の動態特性を濃度測定によって初めて明らかにした。

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14件)

1. Bien, T.L.T., Thao, N.V., Kitamura, S-I., Obayashi, Y. and Suzuki, S. (2017) Release and constancy of an antibiotic resistance gene in seawater under grazing stress by ciliates and heterotrophic nanoflagellates. *Microbes Environ.*, (印刷中)(査読有り)
2. Sugimoto, Y., Suzuki, S., Nonaka, L., Boonla, C., Sukpanyatham, N., Chou, H-Y. and Wu, J-H. (2017) The novel *mef(C)-mph(G)* macrolide resistance genes are conveyed in the environment on various vectors. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* (印刷中)(査読有り)
3. Usui, M., Tagaki, C., Fukuda, A., Okubo, T., Boonla, C., Suzuki, S., Seki, K., Takada, H. and Tamura, Y. (2016) Use of *Aeromonas* spp. as general indicators of antimicrobial susceptibility among bacteria in aquatic environments in Thailand. *Front. Microbiol.*, 7, article 710, doi: 10.3389/fmicb.2016.00710 (査読有り)
4. Bien, T.L.T., Sato-Takabe, Y., Ogo, M., Usui, M. and Suzuki, S. (2015) Persistence of multi-drug resistance plasmids in sterile water under very low concentrations of tetracycline. *Microbes Environ.*, 30, 339-343, doi:10.1264/j sme2.ME15122 (査読有り)
5. Suzuki, S., Ogo, M., Koike, T., Takada, H. and Newman, B. (2015) Sulfonamide and tetracycline resistance genes in total- and culturable-bacterial assemblages in South African aquatic environments. *Front. Microbiol.*, 6, 796, doi: 10.3389/fmicb.2015.00796 (査読有り)
6. Nonaka, L., Maruyama, F., Suzuki, S. and Masuda, M. (2015) Novel macrolide resistance genes, *mef(C)* and *mph(G)*, carried by plasmids from *Vibrio* and *Photobacterium* isolated from sediment and seawater of a coastal aquaculture site. *Lett. Appl. Microbiol.*, 61, 1-6, doi:10.1111/lam.12414 (Editor's Choice) (査読有り)
7. Segura, P.A., Takada, H.(他11名)(2015) Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: impact of income inequality between countries. *Environ. Int.*, 80: 89-97, doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.001 (査読有り)

8. 鈴木 聡 (2014) [総説]水圏環境は薬剤耐性遺伝子のシンクかソースか? *動物用抗菌剤研究会報*, 36, 8-14. (査読有り)
9. Nonaka, L., Maruyama, F.(他8人), Suzuki, S. (9番目) (2014) Various pAQU plasmids possibly contribute to disseminate tetracycline resistance gene *tet(M)* among marine bacterial community. *Front. Microbiol.*, 5, article 152, doi: 10.3389/fmicb.2014.00152 (査読有り)
10. Muziasari, W.I., Managaki, S. (他8人), Suzuki, S. (7番目) (2014) Sulphonamide and trimethoprim resistance genes persist in sediments at Baltic Sea aquaculture farms but are not detected in the surrounding environment. *PLOS ONE*, 9, e92702, doi:10.1371/journal.pone.0092702(査読有り)
11. Pruden, A., Larson, D.G.J. (他11名), Suzuki, S. (8番目) (2013) [review] Management options for reducing release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.*, doi:10.1289/ehp.1206446. (査読有り)
12. Suzuki, S., Ogo, M., Miller, T.W., Shimizu, A., Takada, H. and Siringan, M.A. (2013) Who possesses drug resistance genes in the aquatic environment? : sulfamethoxazole (SMX) resistance genes among the bacterial community in water environment of Metro-Manila, Philippines. *Front. Microbiol.*, 4, 102, doi:10.3389/fmicb.2013.00102.(査読有り)
13. Suga, N., Ogo, M. and Suzuki, S. (2013) Risk assessment of oxytetracycline in water phase to major sediment bacterial community: a water-sediment microcosm study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 36, 142-148. doi:10.1016/j.etap.2013.03.013 (査読有り)
14. Shimizu, A., Takada, H.(他17名), Suzuki, S. (10番目) (2013) Ubiquitous occurrence of sulfonamides in tropical Asian waters. *Sci. Total Environ.*, 452-453, 108-115. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.027 (査読有り)
- [学会発表](計21件)
1. 鈴木 聡: 人獣医療と水圏環境間での薬剤耐性遺伝子動態. 第32回日本環境感染症学会総会・学術集会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), 2017年2月24日(招待講演)
2. Suzuki, S.: Are humans accelerating the development of antibiotic resistance in the environment? 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME16), Roundtable Discussion, Montreal (Canada), 2016年8月22日(企画・講演)
3. Bien, T.L.T., Ngo, V.T., Kitamura, S-I., Obayashi, Y. and Suzuki, S.: Formation and stability of extracellular antibiotic resistance plasmid pool in seawater under existence of ciliate and heterotrophic nanoflagella. 第31回日本微生物生態学会, 横須賀市文化会館(神奈川県・横須賀市), 2016年10月24日
4. 杉本侑大, 野中里佐, 鈴木 聡: 新規マクロライド耐性遺伝子 *mef(C)* および *mph(G)* を担う遺伝因子とその伝達性. 第31回日本微生物生態学会, 横須賀市文化会館(神奈川県・横須賀市), 2016年10月24日
5. 香山 義明, 鈴木 聡: 飢餓状態の菌および貧栄養環境での遺伝子水平伝達. 第31回日本微生物生態学会, 横須賀市文化会館(神奈川県・横須賀市), 2016年10月24日
6. Usui, M., Okubo, T., Fukuda, A., Boonla, C., Takada, H., Suzuki, S. and Tamura, Y., Antimicrobial-resistant bacteria and resistance genes from aquatic environment in Thailand, and a potential courier "fly", 3rd International Congress on Pathogenic at the Human-Animal Interface, Chiang Mai, (Thailand), 2015年8月7日
7. 田垣智衣, 臼井 優, 福田 昭, 高田秀重, 鈴木 聡, 田村 豊: 熱帯アジアの水圏環境に存在する薬剤耐性菌と残留抗菌薬濃度の関係. 第158回日本獣医学会, 北里大学獣医学部(青森県・十和田市), 2015年9月7日
8. 福田 昭, 臼井 優, 田垣智衣, 高田秀重, 鈴木 聡, 田村 豊: タイの農場とヒトの生活環境での薬剤耐性菌及び薬剤耐性遺伝子伝播におけるハエの役割. 第158回日本獣医学会, 北里大学獣医学部(青森県・十和田市), 2015年9月7日
9. 鈴木 聡, 高田秀重: 水圏環境における抗菌薬汚染と薬剤耐性遺伝子の動態. 第63回日本化学療法学会, 京王プラザホテル(東京都・新宿区), 2015年6月4日(招待講演)
10. 野中里佐, 丸山史人, 矢野大和, 大西勇輝, 広瀬 侑, 鈴木 聡, 増田道明: 養殖場由来

Vibrio sp.が保有する伝達性多剤耐性プラスミドの受容菌染色体への取り込み機構. 環境微生物系学会合同大会, 浜松アクトシティコンgresセンター(静岡県・浜松市), 2014年10月23日

11. 臼井 優, 大久保寅彦, 福田 昭, 高田秀重, 鈴木 聡, 田村 豊: 水圏環境からの薬剤耐性遺伝子伝播における八工の役割. 環境微生物系学会合同大会, 浜松アクトシティコンgresセンター(静岡県・浜松市), 2014年10月23日

12. 大久保寅彦, 臼井 優, 鈴木 聡, 高田秀重, 田村 豊: バンコク周辺の水圏環境における薬剤耐性菌とその耐性遺伝子の解析. 環境微生物系学会合同大会, 浜松アクトシティコンgresセンター(静岡県・浜松市), 2014年10月23日

13. 鈴木 聡: 養殖場環境における抗菌剤耐性遺伝子(ARGs)の分布: 水圏でARGsを保有する菌はなにものか? 抗感染薬開発フォーラム第9回セミナー, 慶応大学薬学部(東京都・港区), 2014年10月25日(招待講演)

14. Suzuki, S.: The aquaculture environment: the focus on sulfonamide and tetracycline resistance genes. 3rd International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals, Amsterdam (The Netherland), 2014年9月29日(招待講演)

15. Suzuki, S.: Who is possessing ARGs in freshwater and coastal sea? 15th International Symposium on Microbial Ecology (ISME15), Seoul (Korea), 2014年8月25日(企画・講演)

16. 鈴木 聡: 水圏環境は薬剤耐性遺伝子のシンクかソースか? 第41回動物用抗菌剤研究会シンポジウム, 日本獣医畜産大学(東京都・武蔵境市), 2014年4月26日(招待講演)

17. Suzuki, S., Ogo, M., Muziasari, W., Koike, T. and Virta, M.: Antibiotic resistance genes in the water column of aquaculture sites in the Baltic Sea. The Canadian Society of Microbiologists 63rd Annual Conference, Ottawa (Canada), 2013年6月16日(招待講演)

18. Suzuki, S. and Nonaka, L.: Diverse mechanisms of antibiotic resistance gene transfer in aquaculture. The Canadian Society of Microbiologists 63rd Annual Conference, Ottawa (Canada), 2013年6月17日

19. 大西勇輝, 野中里佐, 鈴木 聡: 沿岸養殖場

環境には多様な遺伝子水平伝達因子が混在する. 第29回日本微生物生態学会大会, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市), 2013年11月22日

20. Nonaka, L., Maruyama, F., Suzuki, S., Masuda, M.: Novel macrolide resistance operon, *mef(C)-mph(G)*, carried by plasmids isolated from *Vibrio* and *Photobacterium* species from an aquaculture site. 第29回日本微生物生態学会大会, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市), 2013年11月22日

21. 鈴木 聡, 小郷みつ子, 小池達也, 高田秀重, Newman, B.: 南アフリカ(ダーバン)の河川, 下水処理場におけるサルファ剤耐性遺伝子の定量. 日本細菌学会中国四国支部大会, 広島国際大学薬学部(広島県・呉市), 2013年10月12日

[図書](計3件)

1. Wondwossen A.G., Thomas W., Gregory H., Walid A., Usui, M. and Suzuki, S. (2017) [著書] Chapter 4. Spread of antibiotic resistance in food animal production systems. 3rd Edition, Foodborne Diseases (Ed. Woods, C.), Elsevier, (印刷中)

2. Suzuki, S., Pruden, A., Virta, M., Zhang, T., eds. (2017) [編著書] Antibiotic Resistance in Aquatic Systems. Frontiers Media, Lausanne, doi: 10.3389/978-2-88945-131-9

3. Suzuki, S. (2017) [著書] Chapter 5, Asian waters as hot spots of antibiotic resistance genes. Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments and Long-Term Effect (Eds. S Mirete and M López Pérez), Nova Science Publishers, Inc. (ISBN:978-1-53611-818-6)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

1. 朝日新聞科学欄（全国版）2015年9月17日
（木）、「移動する耐性菌注視 -野外環境から
生活圏に入る恐れ-」（鈴木と臼井のコメント
を掲載）

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 Hideshige)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：70187970

田村 豊 (TAMURA Yutaka)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50382487

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

臼井 優 (USUI Masaru)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：60639540

Chanchai Boonla

タイ, チュラロンコン大学・生化学科・教授

Nop Sukpanyatham

タイ, Quality Vet Product, Inc.・社長