

大阪湾沿岸を対象とした薬剤耐性細菌の分布と 大阪市内河川からの影響に関する研究

松井 一彰

近畿大学 理工学部 社会環境工学科 准教授

1. 研究の背景と目的

抗生物質を始めとする抗菌薬剤の使用量は年々増加している。日本国内にて2016年時点で使用されている抗菌薬剤の量は、ヒト（人間）用が591.0トン、畜産動物用が669.7トンであり、その他（水産生物用など）も含めると、一年間に1804.3トンが使用されている。抗菌薬剤は細菌感染症による死亡者の減少に多大な貢献をしてきたが、抗菌薬剤に対して耐性を獲得した薬剤耐性細菌の蔓延とそれに伴う感染症の拡大が、近年の世界的な問題となっている。そのような事態を懸念して、2015年5月の世界保健機関（WHO）の総会では、薬剤耐性に関する国際行動計画が採用された。それを受けて日本でも、2016年から2020年の5年間で「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」が推進されている。アクションプランでは、「薬剤耐性の動向調査や監視」の項目が掲げられ、薬剤耐性拡大予兆の的確な把握が目標に挙げられている（厚生労働省 2016）。しかし環境中における薬剤耐性細菌の分布や動態については、これまでほとんど明らかになっていない。

本申請研究では、大阪湾湾奥部を調査地として、薬剤耐性細菌と薬剤耐性遺伝子の分布と動態を解明することを目的とした。まず始めに、流通量の多い薬剤であるテトラサイクリンの耐性に関わる3種のテトラサイクリン耐性遺伝子（*tetA*, *tetB*, *tetM*）と、院内感染で問題視されるメチシリン耐性遺伝子（*mecA*）を特異的に定量するための手法を検討した。次に大阪湾湾奥部（24地点）、湾奥部から大阪市内河川にかけて（9地点）、大阪市内河川（6地点）を対象に、テトラサイクリンおよびメチシリン耐性遺伝子の定量とテトラサイクリン耐性細菌の計数をそれぞれ実施した。各地点における調査は4回から5回実施した。本発表では大阪湾湾奥部での調査結果を中心に報告したい。

2. 研究方法

大阪湾湾奥部の調査は、陸上からの採水が可能な24地点にて、2018年8月から11月にかけて数週間毎に計5回の調査を実施した。次に大阪市内を流れる河川から湾奥部への耐性細菌流入の可能性を探る目的で、大川から湾奥部までの陸上からの採水が可能な9地点にて計4回の調査を実施した。また大阪市内を流れる東横堀川と道頓堀川においても、陸上からの採水が可能な6地点を対象に2018年1月より毎月末に調査を実施した。岸よりロープをつけたバケツを用いて試料を採水し、保冷剤を入れたクーラーボックスにて実験室に持ち帰って分析に用いた。

抗生物質テトラサイクリンに耐性を示す生細菌数は、持ち帰った試料水10 mlに

含まれる細菌を孔径 0.2 μm のメンブランフィルター上に濾過捕捉し、フィルターを10 $\mu\text{g/ml}$ のテトラサイクリン (Wako) を含むマッコンキー寒天培地 (ダイゴ) 上に乗せて30 $^{\circ}\text{C}$ で培養を行い、48時間後に形成されたコロニーの数を求めた。薬剤耐性遺伝子の定量は、孔径 0.2 μm のメンブランフィルター上に濾過捕捉した試料水100 mlに含まれる細菌中のDNAを対象に実施した。濾過捕捉した細菌から、市販のDNA抽出キット (ISOIL for Beads Beating, ニッポンジーン) を用いてDNAを抽出し、DNA中の3種のテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA*, *tetB*, *tetM*) とメチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) を定量PCR法にて定量した。検出の対象とした各遺伝子のGenBankアクセッション番号と、定量PCRに使用したプライマーとプローブの塩基配列は以下の通りである。

表-1. 定量PCR法の対象とした薬剤耐性遺伝子のGenBankアクセッション番号

Target gene	Genebank accession number	Definition	gene size	References
<i>tetA</i>	X00006	<i>E.coli</i> plasmid RP1 tetracycline resistance (<i>tet</i>) determinants: resistance gene <i>tetA</i> .	1200 bp	Waters et al. (1983)
<i>tetB</i>	NG_048172	<i>Escherichia coli tet(B)</i> gene for tetracycline efflux MFS transporter Tet(B), complete CDS.	1206 bp	Khachatryan et al. (1983)
<i>tetM</i>	AY466395	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain PN34 TetM (<i>tetM</i>) gene, complete cds.	1920 bp	Del Grosso et al. (2004)
<i>mecA</i>	E09771	The base sequence of <i>mecA</i> DNA (<i>Staphylococcus aureus</i>)	2455 bp	Kono et al. (1995)

表-2. 定量PCRに使用したプライマーとプローブの配列

Target gene	Oligonucleotide	Composition	Product size	References
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F(Nolvak2013)	5'-TCAATTTCTGACGGGCTG-3'	91bp	Nolvak et al. (2013)
	<i>tetA</i> -R(Nolvak2013)	5'-GAAGCGAGCGGCTTGAGAG-3'		
	probe (<i>tetA</i> -2)	FAM-TCGCACAAAAGGCCGAAC-BHQ1		
<i>tetB</i>	<i>tetB</i> -F(Srinivasan2008)	5'-GAGACGGCAATCGAATTCGG-3'	228bp	Srinivasan et al. (2008)
	<i>tetB</i> -R(Srinivasan2008)	5'-TTTAGTGGCTATTCTTCTCTGCC-3'		
	probe (<i>tetB</i> -2)	Cy5-ACGGTGTGGGTGCAT-BHQ2		
<i>tetM</i>	<i>tetM</i> -F(Knapp2010)	5'-GGTTTCTCTTGATACITAAATCAATCR-3'	94bp	Knapp et al. (2010)
	<i>tetM</i> -R(Knapp2010)	5'-CCAACCATAYAATCCTTGTTCRC-3'		
	probe (<i>tetM</i> -2)	FAM-ATGCAGTTATGGARGGGATACGCTATGGY-BHQ1		
<i>mecA</i>	<i>mecA1</i> -FP(Volk2004)	5'-CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA-3'	92bp	Volkman et al. (2004)
	<i>mecA1</i> -RP(Volk2004)	5'-TGGTCTTCTGCATTCTCGGA-3'		
	probe (<i>mecA1</i>)	Cy5-AATGACGCTATGATCCCAATCTAAGTCCACA-BHQ2		

R=A,G; Y=C,T

3. 結果と考察

大阪湾湾奥部における薬剤耐性細菌と薬剤耐性遺伝子の分布状況： 検出される数や検出時期に違いはみられたものの、調査した24地点全てよりテトラサイクリン耐性細菌が検出された (図-1)。この結果より、大阪湾湾奥部の沿岸域には、培養可能なテトラサイクリン耐性細菌が遍在していることが示唆される。今回用いたマッコンキー寒天培地は、グラム陰性細菌でかつ大腸菌群が好む培地組成に調整されているため、テトラサイクリン耐性を持つ大腸菌群より複数種の細菌が検出された可能性が高い。

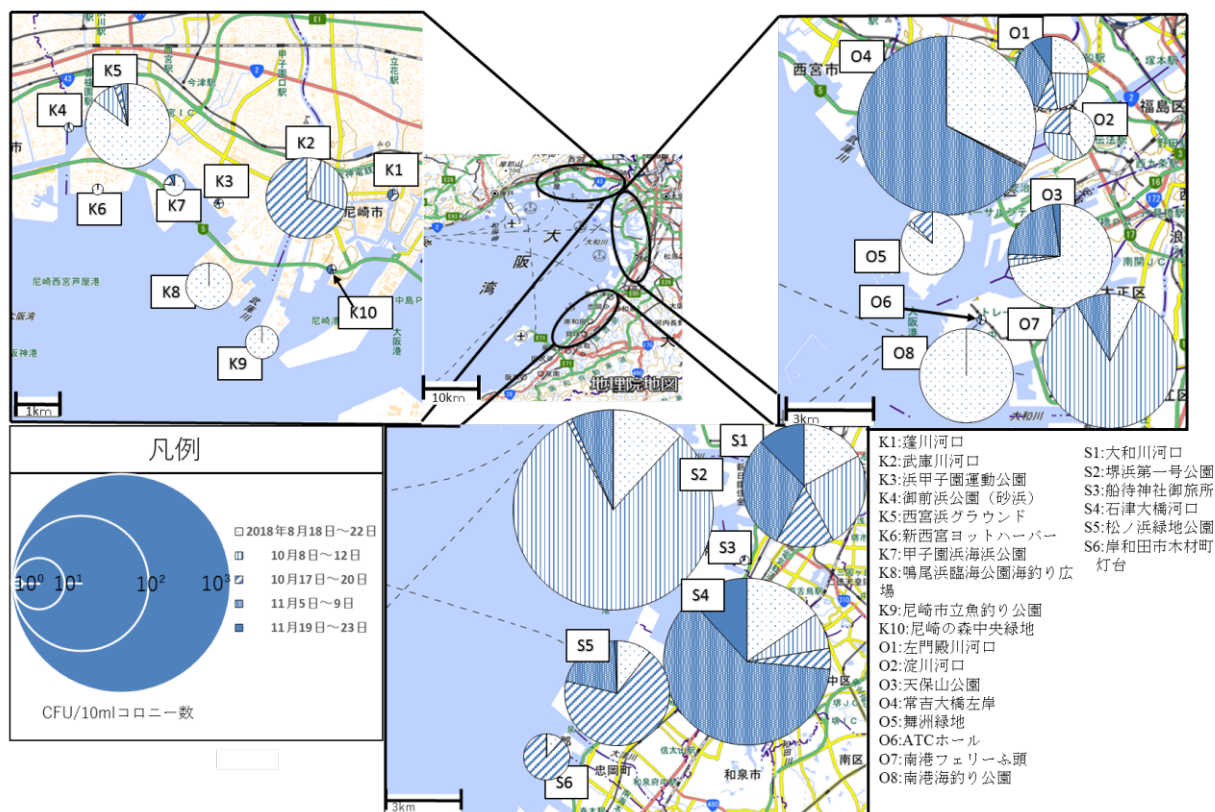
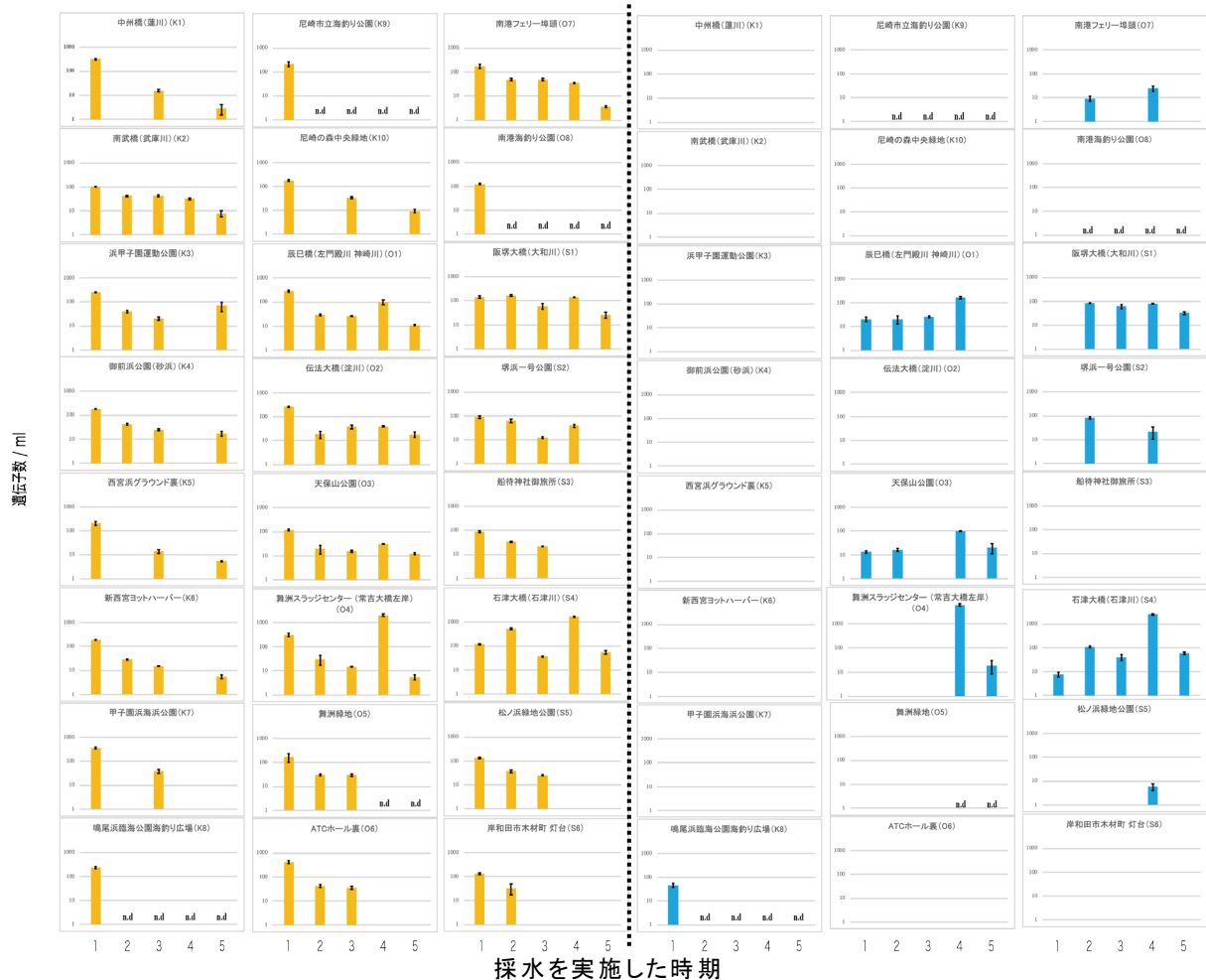


図-1. 大阪湾湾奥部の各調査地点より検出されたテトラサイクリン耐性細菌数と検出時期
 国土地理院の地理院地図 (<https://maps.gsi.go.jp/>) に採水地点を追記して掲載

テトラサイクリン耐性遺伝子 *tetA* および *tetB* 遺伝子は、今回調査した全ての地点より検出された。図-2(左)で示すように *tetA* 遺伝子を例にみると、大阪湾湾奥部に $10 \sim 1,000$ コピー / ml の量が遍在しており、図-1 で示したテトラサイクリン耐性細菌が広く湾奥部に分布している結果と整合性がみられた。蛍光顕微鏡を用いた直接観察によって計数した試料水中の細菌数が約 1×10^8 から 1×10^9 細胞/100ml だったことから、大阪湾湾奥部の沿岸域に生息する細菌群集中の 0.0001%程が、*tetA* や *tetB* 遺伝子を持つテトラサイクリン耐性細菌だと考えられる。一方、*tetM* 遺伝子は、辰巳橋、阪堺大橋、石津大橋のような河口域に設定した地点より多く検出され、海域からはほとんど検出されなかった(図-2(右))。

このように、等しくテトラサイクリンに耐性を示す細菌でも、細菌の生息域によって保持する遺伝子が異なる事が示唆された。*tetM* 遺伝子は、河川の細菌あるいは陸域に生息する細菌が持つ遺伝子であると推測される。また同時に調べたメチシリン耐性遺伝子 *mecA* についても、 $5 \sim 100$ コピー / 100ml の少数ではあるが、複数の調査地点にてその存在が確認された。ヒトの常在菌である黄色ブドウ球菌等における *mecA* 遺伝子の検出例は多いが、野外環境中での分布や動態についてはあまり分かっていない。検出された *mecA* を保持する細菌種や遺伝子の由来について明らかにすることが、今後必要になると思われる。



1-2018年8月18日~22日; 2-10月8日~12日; 3-10月17日~20日; 4-11月5日~9日; 5-11月9日~23日

図-2. 大阪湾湾奥部の各調査地点で検出された
テトラサイクリン耐性tetA遺伝子(左)とtetM遺伝子(右)の数

本年度の調査を通じて、大阪湾湾奥部には培養可能なテトラサイクリン耐性細菌が少数ながら広く分布していることがわかった。またこれらの耐性細菌が持つ耐性遺伝子は、*tetA* か *tetB* である可能性が示された。さらに陸域からも、*tetM* 遺伝子を持つテトラサイクリン耐性細菌が流れ込んでいる事が示唆された。しかし、流入した *tetM* 遺伝子を持つ細菌は、海域の微生物群集内に定着していない可能性が高かった。そして今回、メチシリン耐性 *mecA* 遺伝子を持つ細菌も、少数ながら大阪湾湾奥部に存在していることがわかった。これらの遺伝子は、大阪市内の都市河川からも検出されている。今後は *tetM* および *mecA* 遺伝子を中心に、その流入起源の絞り込みや、海洋中の細菌へ遺伝子が伝播する可能性についての検証が、大阪湾湾奥部の薬剤耐性細菌の動態を知る上で有効であると考えられる。

4. 参考資料

厚生労働省：薬剤耐性（AMR）対策について

<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html> (2019年2月確認)