

大阪湾における薬剤耐性遺伝子の存在実態および その水平伝播に寄与する海洋プラスチック

京都大学大学院 地球環境学堂 研究員
李 文驕

1. はじめに

プラスチックごみ、排水由来の抗生物質や薬剤耐性菌などの新興汚染物質は海洋環境および生態系に悪影響を与えている。近年、プラスチックに関する高吸着性や長距離移動性などの研究が進み、新たな知見が創出されている。一方、海洋プラスチックは生物膜の形成により排水由来の薬剤耐性菌のキャリアとして、海洋環境中に拡散することが予想されているが、十分な調査研究がされず不明のままである。その課題を突破するには、排水の受け皿である大阪湾における海水および海洋プラスチック試料に着目し、総合的に薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic resistance genes, ARGs) の存在実態を調査する必要がある。また、遺伝子組み換えやリアルタイム PCR などの分子生物学的手法を用いて、可動遺伝因子 (Mobile genetic elements, MGEs) を定量することで、海洋プラスチックによる ARGs 水平伝播への寄与の解明も不可欠である。さらに、プラスチックは材質によって吸着特性が異なるため、薬剤耐性の拡散への促進効果にも差が生じると考えられる。本研究は、大阪湾の汽水域と海域における薬剤耐性遺伝子の存在実態の把握およびその水平伝播に寄与する海洋プラスチック試料を材質別で検討することを主目的とした。

2. 研究方法

2. 1 海水および海洋プラスチック試料の採取

2022 年 10 月 15 日および 2023 年 10 月 30 日に、大阪湾において広範囲で表層海水および海洋プラスチック試料を採取するため、高速船による現地調査を 2 回実施した。具体的に、大阪湾を 5 つに区分し、各区域において揚水ポンプより表層海水試料を採取した。同地点の海洋プラスチック試料については、目開き 300 μm のプラクトンネット二つを用い、船の左右に固定して低速 (10 km/時) の定速走行条件で 20 分間採取を行った。採取後、速やかに PBS バッファーよりネット中のプラスチックを洗い出して回収した。調査地点と様子を図 1 に示す。



調査地点 プラスチック試料の採取

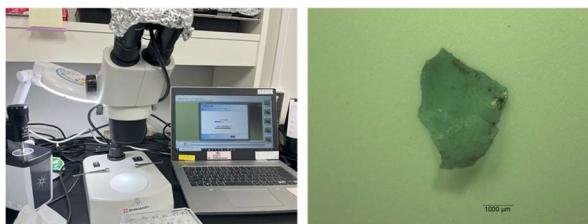
図 1 調査地点および様子

2. 2 海水およびプラスチック試料の前処理

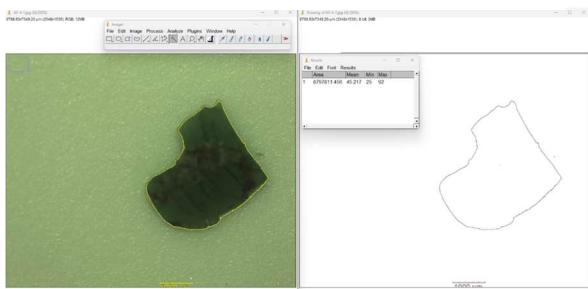
海水試料はろ過法 (0.2 μm オムニポアメンブレン、メルク) を用いてクリーンベンチ内でろ過を行った。DNA 抽出にろ紙を -20°C で冷凍保存した。プラスチック試料については、プラクトンネットから一粒ずつ取り出し、PBS バッファーを用いて超音波より表面の生物膜を剥離した。生物膜剥離済みのプラスチックに番号を振付け、材質判定までに室温で保管した。生物膜溶液を DNA 抽出のために -20°C で冷凍保存した。

2. 3 プラスチックの材質同定および面積の計算

プラスチック試料の成分の同定には FTIR-ATR (Cary630, Agilent) と共に Agilent Micro Lab FTIR ソフトウェアのライブラリを使用した。得られた試料の IR スペクトルをライブラリ中の IR スペクトルと比較して、ヒット率が最も高く、0.6 を超えるものを結果として採用した。プラスチック試料の画像撮影に実体顕微鏡 (BA210LED、島津理科製) とハロゲン三眼の専用デジタルカメラ (Moticam5) を用いた。撮影した画像を ImageJ に用いて面積を計測し、得られた面積の 2 倍を各プラスチック試料の表面積とした。プラスチック試料の観察および画像撮影の様子および面積計測方法を図 2 で示す。



カメラ付き実体顕微鏡によるプラスチックの画像撮影



ImageJ によるプラスチック表面積の計測

図 2 プラスチック試料の撮影および表面積計測

2. 4 DNA 抽出および対象遺伝子の定量

ろ過法より海水から捕集した細菌は NucleoSpin Soil (タカラバイオ) を用いて DNA 抽出を行った。プラスチック試料から剥離した生物膜溶液はプラスチックの材質同定結果に基づき、同定できた試料を混合し、NucleoSpin Water (タカラバイオ) を用いて生物膜を回収した。その後、海水試料と同じ手順で DNA を抽出・精製した (NucleoSpin Soil, タカラバイオ)。本研究では、テトラサイクリン耐性遺伝子 3 種 (*tet A*, *tet G*, *tet M*)、スルホンアミド耐性遺伝子 2 種 (*sul 1*, *sul 2*) と共に、ARGs 水平伝播ポテンシャルのマーカーとして代表的な MGEs のクラス 1 インテグロン-インテグラーゼ (*intl 1*)、全細菌数を表す 16S rDNA 遺伝子の全 7 種類の遺伝子を定量した。遺伝子の定量はインターカレーター法 (TB Green Premix Ex Taq, タカラバイオ) を用いてリアルタイム PCR 装置 (Thermal Cycler Real Time TP850, タカラバイオ) で分析を行った。ARGs & MGEs の検量線は、TA クローニング手法 (Mighty TA-cloning Kit, タカラバイオ) を用い、形質転換した対象遺伝子を持つ大腸菌 DNA を段階希釈したものを用いた。本研究では、「薬剤耐性遺伝子定量指標」を薬剤耐性を持たせた大腸菌 DNA に基づき計算した ARGs コピー数 (絶対存在量) とした。また、「水平伝播評価指標」を ARGs と 16S rDNA 遺伝子の比 (相対存在量)、MGEs (*intl 1*) コピー数 (絶対・相対存在量) と合わせて定義づけた。

3. 結果と考察

3. 1 大阪湾における薬剤耐性遺伝子の存在実態

大阪湾における 5 地点で 2022 年 (左) と 2023 年 (右) に採取した海水中のテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet A*, *tet G*, *tet M*) およびスルホンアミド耐性遺伝子 (*sul 1*, *sul 2*) の絶対存在量を図 3 に示す。同地点で 2 回採取した海水中 ARGs の絶対存在量は類似する結果が示された。汽水域である地点 A (淀川河口部) では、最も高い存在量を示し、塩分の高い地点 D (明石海峡大橋付近) および地点 E (関西空港付近海域) より $10^1 \sim 10^2$ も高かった。このような結果は、大量の ARGs が河川水や排水を通して大阪湾に流入したことを示唆している。また、対象とした ARGs の内、いずれの地点においても *tet A*, *sul 1* および *sul 2* のほうがより多く存在した。全体的に、海水中 ARGs 絶対存在量は汽水域から海域まで減少している傾向を示し

た。海水中の栄養塩や塩分濃度などの環境因子が微生物の成長に働きかけ、薬剤耐性菌の増殖を抑制した可能性があると考えられる。

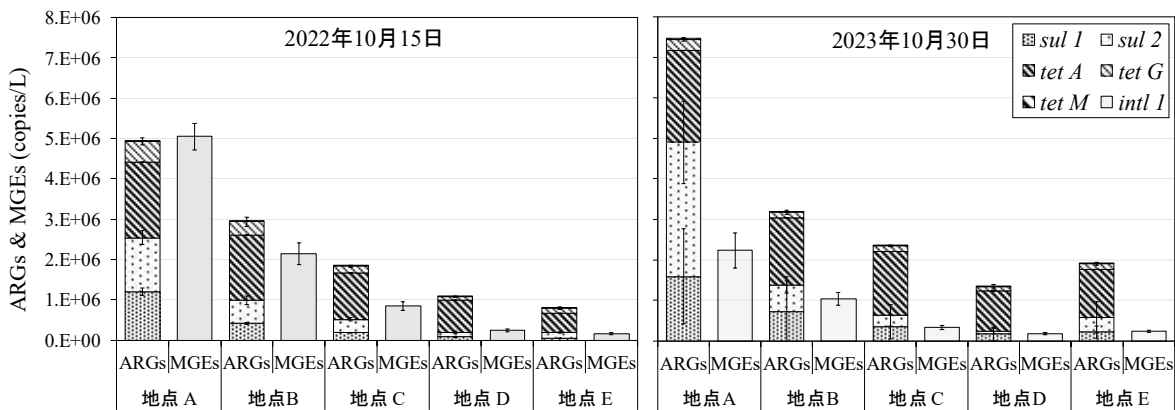


図 3 海水中 ARG および MGEs の絶対存在量(平均値±標準偏差; n = 3)

3. 2 薬剤耐性の水平伝播に寄与する海洋プラスチック

薬剤耐性の水平伝播ポテンシャルを表す指標の一つとして、2023 年の試料における 5 種 ARGs および 1 種 MGEs が 16S rDNA (全細菌数) との比(相対存在量)を 図 4 に示す。全体的に、各地点の海水においては ARGs 相対存在量の変化が見られず、ほぼ同程度の水平伝播ポテンシャルを有することが示唆された。それに反して、プラスチック生物膜における ARGs の相対存在量(特に *sul 2*) は地点 A と比べ、地点 D、E で高い値を示した。海水と比べて同地点のプラスチック生物膜中の ARGs が約 $10^1 \sim 10^3$ 倍高い相対存在量を示した。MGEs (*intl 1*) について、海水とプラスチックが河口部(地点 A) でほぼ同じ伝播ポテンシャルを持つ一方、地点 B、C、E ではプラスチックのほうが $10^1 \sim 10^2$ 倍も高い水平伝播ポテンシャルを有した。2022 年の試料も類似した結果(省略)を示したため、プラスチックが比較的に高い水平伝播ポテンシャルを有することが再度確認できた。以上の結果から、プラスチックは細菌のキャリアとして大阪湾に流入し、薬剤耐性の水平伝播に大きく寄与していることが明らかになった。

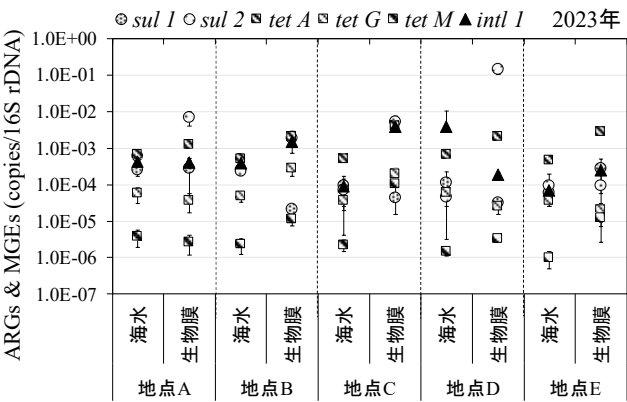


図 4 海水およびプラスチック生物膜中 ARGs & MGEs の相対存在量(平均値±標準偏差; n = 3)

3. 3 材質別プラスチックの存在量および薬剤耐性水平伝播への寄与率

FTIR-ATR を用いたプラスチック材質の同定結果を表 1 に示す。大阪湾における 300 μm 以上の海洋プラスチックの材質は主に PE (ポリエチレン)、PP (ポリプロピレン) とわずかの PS (ポリスチレン) であった。地点 C の海洋プラスチック存在量はほかの地点より多かったが、地点 E では最

表 1 各地点におけるプラスチックの材質別存在量				
	総個数	PE	PP	PS
地点 A	35	18	9	8
地点 B	68	46	17	5
地点 C	92	79	12	1
地点 D	31	21	10	0
地点 E	8	8	0	0

少の8個であった。地点Aと地点Dの材質別プラスチックにおける表面積ベースでのARGおよびMGEsの絶対(上)および相対(下)存在量を図4に示す。材質が異なるプラスチックのARGs絶対存在量はほぼ同程度で大幅な差が見られなかったが、PPプラスチックのほうがやや高い存在量を示した。PPプラスチックの高いARGs絶対存在量の原因を解明するにはさらなるの検討が必要である。本研究ではプラスチックの材質のみ観点から評価したが、プラスチックの表面の形状や形態の違いが生物膜の形成に影響を及ぼす可能性も考えられる。また、プラスチックの劣化度合などが表面の生物膜の形成や細菌の増殖

にも大きく左右する可能性がある。一方、地点Aと地点DのプラスチックにおけるARGsの水平伝播ポテンシャル(相対存在量)について、材質別での有意差が見られなかった。したがって、材質が異なるプラスチックは大阪湾における薬剤耐性の水平伝播にほぼ同程度に寄与していることが示唆された。

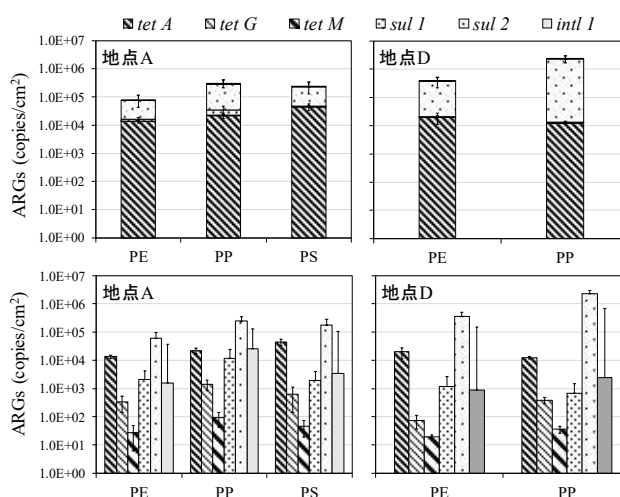


図5 地点Aと地点Dの材質別プラスチックにおけるARGs & MGEsの絶対・相対存在量(平均値±標準偏差; n = 3)

4. 結論

本研究は、大阪湾の汽水域と海域における薬剤耐性遺伝子(ARGs)の存在実態の把握およびその水平伝播に寄与する海洋プラスチック試料を材質別で検討することを主目的に、調査および定量分析を実施した。以下に、得られた主な知見を述べる。

- 大阪湾において、2022年および2023年で採取した5地点のすべての海水試料から、対象としたテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet A*, *tet G*, *tetM*)およびスルホンアミド耐性遺伝子(*sul 1*, *sul 2*)を検出した。地点A(淀川河口部)から中心部(地点E)にわたって、ARGsの絶対存在量が減少していた。
- 海水における薬剤耐性水平伝播ポテンシャルは河口部から中心部にわたって緩やかに低下した。一方、プラスチック試料は海水より比較的に高いARGs相対存在量を有することで薬剤耐性の水平伝播に大きく寄与するが明らかになった。海洋プラスチックのキャリア効果が確認できた。
- 5地点で採集したプラスチックの材質同定結果から、大阪湾に存在する300 μm 以上の海洋プラスチックの半分以上はPE(ポリエチレン)であることが明らかになった。PP(ポリプロピレン)およびPS(ポリスチレン)も検出された。
- PE, PP, PSの3種類のプラスチック試料から検出されたARGsおよびMGEsの絶対存在量には差異が見られた。3種のうち、PPプラスチック試料の対象遺伝子絶対存在量が最も高かった。一方、薬剤耐性水平伝播への寄与率を表すARGs相対存在量については、材質別プラスチック間に有意差が見られなかった。PPプラスチックのやや高いARGs絶対存在量は材質のみならず、プラスチックの形状や劣化による表面形態の変化も起因していると推測できる。

謝辞

本研究は、令和4年度および令和5年度「大阪湾圏域の海域環境再生・創造に関する研究助成制度」の助成を受けて実施した。関係各位に厚く御礼を申し上げます。