別紙

研究課題名：細菌バイオフィルム中における薬剤耐性プラスミド伝達頻度上昇要因の解明

共同研究者名：臼井優（酪農学園大学）、岡村真吾（酪農学園大学）、鈴木聡（愛媛大学）

研究目的：

近年、薬剤耐性菌の出現・拡散が国際的な問題となっている。その中で、ヒト医療だけでなく獣医療や環境を含めた包括的な取り組み（ワンヘルスアプローチ）が重要であることが示されている。薬剤耐性菌の急激な拡散には、薬剤耐性プラスミドの接合伝達が大きく関わっている。接合伝達は菌と菌の間でプラスミドの受け渡しが行われることであり、感受性株が薬剤耐性プラスミドを受け取ることで耐性化する現象である。接合伝達は、菌種を超えた伝達も起こり、環境中の薬剤耐性プラスミドが人の医療で問題となる細菌へ移ることもある。通常、実

験室内(in vitro)で細菌は浮遊状態（液体培地）で扱われることが多いが、腸内や様々な環境において細菌はバイオフィルム（代表的なものとして水回りのぬめりなど）を作り存在するため、バイオフィルム中での性状の評価は重要である。一般的に、バイオフィルム中では接合伝達頻度が上昇するが、その要因として菌と菌が密接に隣り合う状況であることが示唆されている。しかし、腸内に存在するバイオフィルムは治療のための抗菌薬の暴露を受けるし、水圏環境に存在するバイオフィルム形成菌は医療や畜産排水に含まれる抗菌薬の影響を受けることが想定されるが、それらの接合伝達頻度へ与える影響は不明である。そこで、バイオフィルム中において接合伝達頻度を上昇させる要因を明らかにするため、バイオフィルム中での接合伝達頻度上昇要因を明らかにすることを目的として試験を行った。

研究内容：

薬剤耐性プラスミド保有菌をドナー（渡し手）として、実験室内におけるレシピエント（受け手）を用意し、in vitro において混合培養しバイオフィルムを作出させ、接合伝達頻度を算出し、浮遊状態とバイオフィルム中での接合伝達頻度を

比較した。以下の表 1 に示す大腸菌株を用いた。

表 1.　供試菌株

目的	菌株	由来	耐性遺伝子	耐性表現型
ドナー	TC13-1	牛糞便	blaCTX-M-14	ABPC, CEZ, CPDX
	TC7-1	牛糞便	blaCTX-M-2	ABPC, CEZ, CPDX
レシピエント	ML4909	実験室	-	RIF
	MG1655	実験室	-	RIF

ABPC:アンピシリン、CEZ:セファゾリン、CPDX:セフポドキシム、RIF:リファンピシン

浮遊細胞における接合伝達試験は LB broth を用いた broth mating 法により行った。すなわち、ドナーとレシピエントを 1：1 の割合で混合し、37°Cで 24 時間振盪培養した後、選択培地である抗菌薬添加 TSA 寒天培地に接種し、37°Cで 24 時間培養した。選択培地は、ドナー選択用培地（CEZ 30μg/ml)、レシピエント選択用培地（RIF 30μg/ml）と Transconjugant 選択用培地（CEZ 30μg/ml と RIF 30μg/ml）を使用した。選択培地に認められたドナー株、レシピエント株と Transconjugant 株の CFU/ml をそれぞれ計測し、以下の式を用いて接合伝達頻度を算出した。

接合伝達頻度 ＝ Transconjugant（CFU/ml）/レシピエント（CFU/ml）

バイオフィルム中での接合伝達試験は、レシピエントの OD_{600} 値を 0.05 に調

整し、100μl のレシピエント菌液を 96 well U Bottom Plate に分注し、37°Cで 48 時間培養しレシピエントにバイオフィルムを形成させた（24 時間時点で、プレートを 100μl の LB Broth で 2 回洗浄し、100μl の LB Broth を再度分注した）。プレートを 100μl の LB Broth で 2 回洗浄し、OD_{600}=1.0 に調整したドナー菌液をレシピエント株が形成したバイオフィルム中に分注後、37°Cで 24 時間培養した。その後、プレートを生理食塩水で 2 回洗浄後、100μl の生理食塩水を加え激しくピペッティングしバイオフィルムを剥がし取った。その懸濁液について、浮遊細胞で使用したものと同一の抗菌薬添加 TSA 寒天培地に播種し、37°Cで 24 時間培養し、出現したコロニーをカウントし接合伝達頻度を算出した。

また、抗菌薬暴露下における接合伝達頻度を算出するため、ドナーを 1/8MIC 濃度の抗菌薬（オフロキサシン、ゲンタマイシン、CEZ、RIF）で２４時間暴露した後に、8,000g で 10 分遠心分離し上清を捨て、LB Broth で 2 回洗浄した後の懸濁液を伝達試験に用いた。

研究成果：

浮遊細胞とバイオフィルム中における薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度

浮遊細胞とバイオフィルム中における薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度を図 1 に示す。ドナー株に着目して接合伝達頻度を比較すると、TC13-1 をドナー株とした場合、TC7-1 をドナー株とした場合に比べて、バイオフィルム中における接合伝達頻度は、いずれの組み合わせも高い値を示した（図 1)。TC13-1 をドナー株とした場合、いずれのレシピエント株との組み合わせにおいても、バイオフィルム中における接合伝達頻度は、浮遊細胞に比べて有意に高い値を示した（図 1A)。TC7-1 をドナー株とした場合、MG1655 をレシピエント株とすると、バイオフィルム中における接合伝達頻度は、浮遊細胞に比べて高い値を示したが、ML4909 をレシピエント株とすると、浮遊細胞の方がバイオフィルム中に比べて有意に高い接合伝達頻度を示した（図 1B)。

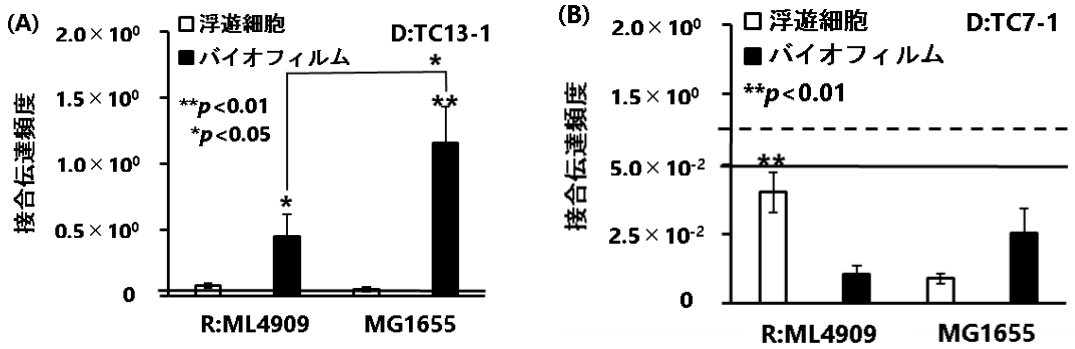
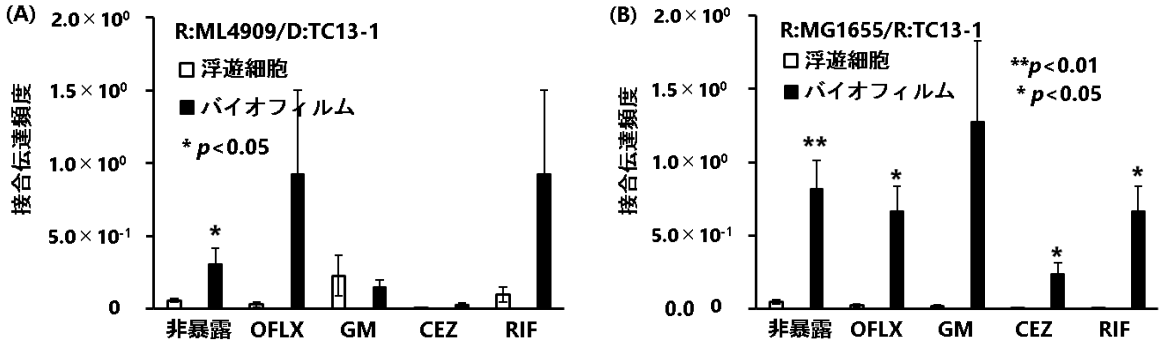


図 1. 浮遊細胞とバイオフィルム中における薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度の比較(A)：ML4909、MG1655 と TC13-1 を用いた浮遊細胞とバイオフィルム中における接合伝達頻度.(B)：

ML4909、MG1655 と TC7-1 を用いた浮遊細胞とバイオフィルム中における接合伝達頻度

抗菌薬暴露下における浮遊細胞とバイオフィルム中での薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度

1/8MIC 濃度の抗菌薬暴露下および非暴露下における、浮遊細胞もしくはバイオフィルム中の薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度を図 2 に示す。1/8MIC 濃度の抗菌薬を暴露した場合、浮遊細胞よりもバイオフィルム中において、薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度は有意に上昇（図 2B）、もしくは上昇傾向が維持される組み合わせが認められた（図 2A、C と D）。この傾向は、特に 1/8MIC 濃度のオフロキサシンを暴露した際に強く認められた。



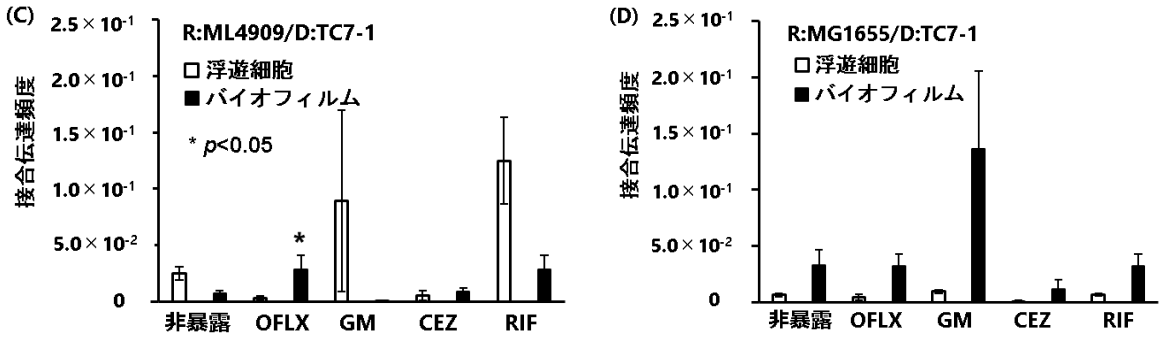


図 2.　抗菌薬暴露下における浮遊細胞とバイオフィルム中での薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度の比較(A)：ML4909 と TC13-1 を用いた、1/8MIC 濃度の抗菌薬暴露下における接合伝達頻度.(B)： MG1655 と TC13-1 を用いた、1/8MIC 濃度の抗菌薬暴露下における接合伝達頻度.(C)：ML4909 と TC7-1 を用いた、1/8MIC 濃度の抗菌薬暴露下における接合伝達頻度.(D) MG1655 と TC7-1 を用いた 1/8MIC 濃度の抗菌薬暴露下における接合伝達頻度.

成果発表：

岡村真吾、臼井優、田村豊、大腸菌での薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度にバイオフィルムや抗菌薬暴露が及ぼす影響、第 92 回日本細菌学会、札幌、2019 年 4 月

岡村真吾、臼井優、田村豊、大腸菌での薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度にバイオフィルムや抗菌薬暴露が及ぼす影響、第 85 回日本細菌学会北海道支部会、江別、2019 年 8 月

臼井優、獣医療における薬剤耐性問題の実態とその対策、第２２回水環境学会

シンポジウム、札幌、2019 年 9 月

臼井優、One Health Approach to antibiotic resistance in Japan、2019 年日仏セミナー、2019 年 11 月

今後の問題点：

今年度の成果により、バイオフィルム及び抗菌薬が接合伝達頻度に及ぼす影響が明らかとなった。今回、細菌の SOS 反応を誘起することが知られているバイオフィルム状態や、フルオロキノロン 系抗菌薬であるオフロキサシンの暴露により接合伝達頻度が上昇したことから、SOS 反応が接合伝達頻度を上昇させている可能性ある。このメカニズムについては、今回の実験では、検証を行うことができていないので、SOS 反応と接合伝達頻度の関係については、遺伝子発現解析などで明らかにしていく必要がある。また、環境中で抗菌薬以上に細菌が晒される機会の多い、消毒薬についても、消毒薬の暴露がバイオフィルム中における接合伝達頻度に影響するかを今後は解明していく必要がある。