

研究課題名

水環境中から回収した細胞外薬剤耐性遺伝子の活性評価

共同研究者

佐野大輔 (代表、東北大学大学院環境科学研究科)
Mohan Amarasiri (分担、北里大学医療衛生学部)
小沼千紘 (分担、東北大学大学院環境科学研究科)
鈴木聡 (分担、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

研究目的

1980年代以降、幅広い抗菌薬の使用による薬剤耐性菌 (antibiotic resistant bacteria: ARB) の増加が人類の脅威となっており, ARB に起因する死者数は 2050 年には今日の糖尿病と癌による死者数を大きく上回ると推定されている. 抗菌薬の使用量が多い病院や畜産農場, 養殖場からの排水には抗菌薬のほか ARB や薬剤耐性遺伝子 (antibiotic resistance genes: ARGs) が多く含まれるため, 水環境中からは ARB 及び ARGs の検出が数多く報告されている. 人間はレクリエーション水に接触するほか, 飲料水や食用の魚, 二枚貝を摂取することで体内に ARGs を取り込んでいると考えられている.

同一種もしくは異種間において, 世代交代を経ずに遺伝子が授受される現象を「遺伝子の水平伝播」と呼び, ARB の出現は細菌間での遺伝子水平伝播によることが大きいと報告されている. 水環境においては, 主に岩石表面などに形成されたバイオフィームが ARGs 伝播の場となっていると考えられているが, その証拠は多くない. もし水環境が ARGs 伝播の場となっているのであれば, ARB 及び ARGs は下水処理により適切に除去されなければならない. しかしながら, ARGs の水環境中における具体的な挙動や伝播効率については具体的に解明されていないのが現状である. そこで本研究では, 薬剤感受性細菌が水環境中で薬剤耐性を獲得する方法の1つとして, 供与菌から性線毛によって ARGs を取り込む接合伝達に着目し, 水環境条件下における ARGs の接合伝達効率の評価を試みた.

研究内容

供与菌として、養殖場由来の海洋細菌である *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* 04Ya311 株を使用した。本株はテトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(M)*, *tet(B)* の他, *blaCARB-9*, *floR*, *mph(A)*, *mef(A)*, *sul2*, の計 7 種の ARGs をコードした多剤耐性プラスミド pAQU1 を保有し、また、45°C では増殖しないことが分かっている。受容菌として、大腸菌 TOP10 株と、下水から単離した 4 菌株を使用した。下水由来単離株は、宮城県内で採取した未処理下水から単離した菌株は、薬剤感受性試験によりテトラサイクリンに対する最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration : MIC 値）を測定した結果、テトラサイクリン感受性であることが確認され 且つ 45°C で生育可能な株である。

手順

供与菌と受容菌について各懸濁培地の吸光度 (Optical Density: OD600) を測定し、あらかじめ菌数の割合を一定に調整したうえで、それらを混合させた菌液に対し孔径 22 μm のフィルターを用いて吸引ろ過を実施した。同時に、ろ過前懸濁培地中の各生菌数を平板希釈法により計測した。吸引ろ過後、水環境中のバイオフィーム環境を想定し、フィルターを LB 寒天培地上に 25°C、18 時間で放置した。その後、フィルター上の細菌を 1mL の PBS 溶液中に懸濁させ、段階希釈後に LB 寒天培地とテトラサイクリンを含んだ LB 寒天培地それぞれに 100 μL ずつ塗抹し、45°C で一晩静置培養しコロニー数を計測した。この際、前者では受容菌がコロニーを形成し、後者では受容菌が pAQU1 プラスミドを受け取りできた接合体のみがコロニーを形成する。

接合伝達効率の評価

接合伝達効率は一般的に定義されておらず、論文によって異なる。今回は、水環境条件下における環境細菌の受容体としての能力を評価するため、接合伝達効率は以下の通りとした。

接合伝達効率 (%) = 接合体コロニー数 × 100 / 受容体コロニー数

研究成果

Photobacterium damsela subsp. *damsela* 04Ya311 株と大腸菌株及び下水由来単離株を使用して 25°C, 18 時間 フィルターメイティングによる接合実験を 3 回行った結果, 全ての受容菌において pAQU1 プラスミドの伝播が確認され, 環境中の未知の薬剤感受性細菌が ARG の接合伝達の受容菌となりうる事が確認された. また, 各受容菌における接合伝達効率の平均値は $4.8 \times 10^{-3} \sim 1.9 \times 10^1$ % となり, 接合伝達効率は各受容菌株に大きく依存していた.

使用した受容菌と接合体の計 10 株に対し, 10 種類の抗菌薬について薬剤感受性試験を実施し, MIC 値を測定した. 全ての菌株において, テトラサイクリン, アンピシリン, クロラムフェニコールの 3 種の抗菌薬に対し, 接合実験後の MIC 値の増加が確認された. テトラサイクリンとアンピシリンについては, 「E-TEST®_性能・判定基準・精度管理基準一覧」において耐性と判断されるレベルに到達していた. 本研究で ARGs として用いた pAQU1 プラスミドにはアンピシリンとクロラムフェニコールに対する ARGs がコードされていない. テトラサイクリン耐性遺伝子が宿主のアンピシリンとクロラムフェニコール 2 種類の抗菌薬の耐性獲得に関与した可能性が考えられるが, 詳細は今後確認する必要がある.

成果発表

水環境条件下における薬剤耐性遺伝子の接合伝達効率に関する研究

森山桃子、Mohan Amarasiri、鈴木聡、佐野大輔

第 55 回日本水環境学会年会

オンライン

Amarasiri, M., Sano D. and Suzuki, S. (2020) Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance

genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 50 (19), 2016-2059
<https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>

今後の問題点

水環境中のバイオフィルムにおける接合効率を評価するために、菌体密度、温度、塩濃度等、様々な環境条件下における接合効率を評価する必要がある。