

研究課題名：細菌バイオフィー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）、塩野由花（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ヒト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ーム（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。昨年度は、バイオフィルム中において薬剤耐性プラスミドの接合伝達頻度が上昇する要因として抗菌薬の暴露が影響しているかを明らかにするため、*in vitro* でバイオフィルム状態を作り、様々な抗菌薬を暴露し、バイオフィルム中における接合伝達頻度への影響を明らかにする研究を実施した。結果、抗菌薬の中でもフルオロキノロン系抗菌薬の暴露により、バイオフィルム中において、接合伝達頻度が上昇することが明らかとなった。そこで今年度は、環境中において抗菌薬以上に細菌が晒される機会の多い、消毒薬に着目し、消毒薬の暴露が接合伝達頻度に影響するかを解明すること、またそのメカニズムを解明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、接合伝達頻度を算出し、浮遊状態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

細菌の役割	菌株	由来	耐性遺伝子	耐性表現型
ドナー	TC7-1	牛糞便	blaCTX-M-2	ABPC, CEZ, CPDX
レシピエント	ML4909	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)

また、消毒薬暴露下における接合伝達頻度を算出するため、ドナーおよびレシピエントに対して、MIC 以下の濃度の消毒薬（クロルヘキシジン、ベンザルコニウム、ベンゼトニウム、ポピドンヨード、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム、トリクロサン、ジデシルジメチルアンモニウムクロリド）で4時間暴露した後に、混合培養し、伝達試験を行った。

次に、消毒薬暴露による接合伝達頻度上昇のメカニズムを解明するため、接合伝達頻度に関連があるとされる SOS 応答、ROS 応答が消毒薬暴露により起こるかを調べた。

消毒薬暴露と SOS 反応の関連の解明のため、Miller assay を実施した。すなわち、大腸菌 psulA\_lacZ 株を LB 液体培地中で OD=0.6 まで浸透培養をし、MIC 以下の消毒薬を暴露した（陽性対象として、オフロキサシンを暴露）。その

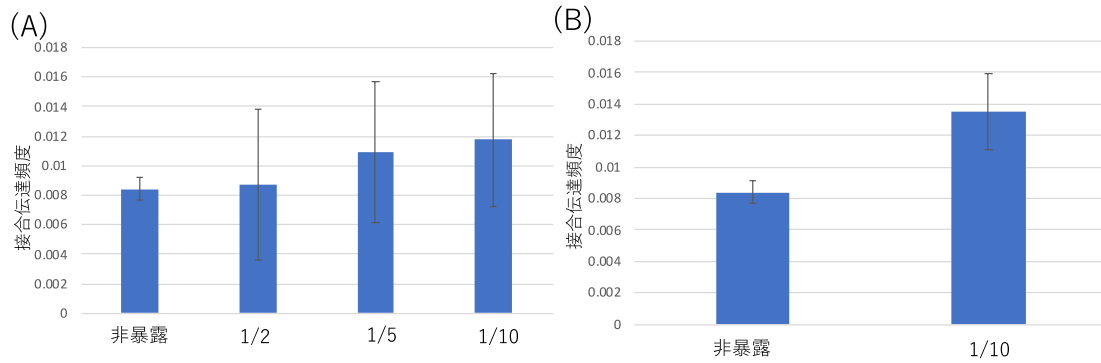
後、1.5 時間の震盪培養を行い、基質液を加えて、プレートリーダーにより OD 値を算出し、miller unit を算出することでガラクトシダーゼ活性を測定した。

ROS 反応の関連については、DCFDA/H2DCFDA-cellular ROS assay kit(abcam)を用いて、ドナーおよびレシピエントに対して、消毒薬暴露時の ROS 活性を推奨のプロトコールに従って測定した。また、ROS 阻害剤 (N-acetyl-L-cysteine, 100uM) 存在下での活性も測定した。

研究成果：

### **消毒薬暴露による接合伝達頻度の上昇**

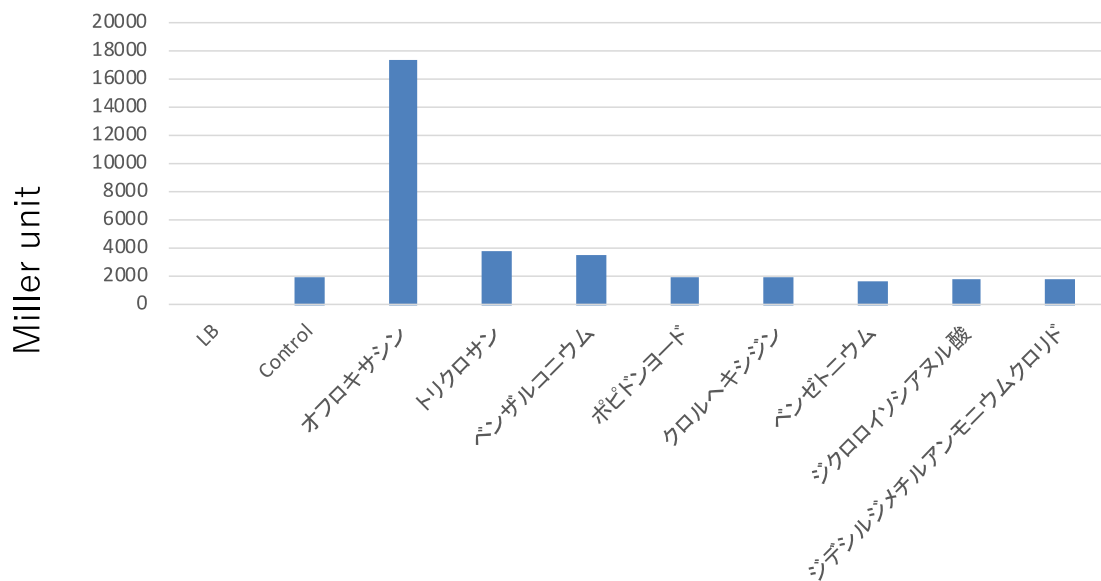
浮遊細胞においてトリクロサンおよびベンザルコニウムの MIC 以下の暴露により接合伝達頻度が上昇した。その他の消毒薬については、MIC 以下の暴露による接合伝達頻度への影響はなかった。



**図 1. 消毒薬暴露による接合伝達頻度の比較**(A)： MIC 以下のトリクロサン暴露時の ML4909 と TC7-1 を用いた浮遊細胞における接合伝達頻度.(B)： MIC 以下のベンザルコニウム暴露時の ML4909 と TC7-1 を用いた浮遊細胞における接合伝達頻度.

### 消毒薬暴露下における SOS 反応

SOS 反応は、MIC 以下のいずれの消毒薬の暴露によっても有意に上昇しなかった(図 2)。



## 図 2. 消毒薬暴露下における SOS 反応

オフロキサシン暴露は陽性対象

## 消毒薬暴露下における ROS 反応

ROS 反応は、MIC 以下のトリクロサン、ベンザルコニウム、ベンゼトニウムの暴露により、ドナーとレシピエントのいずれにおいても上昇した(図 3)。

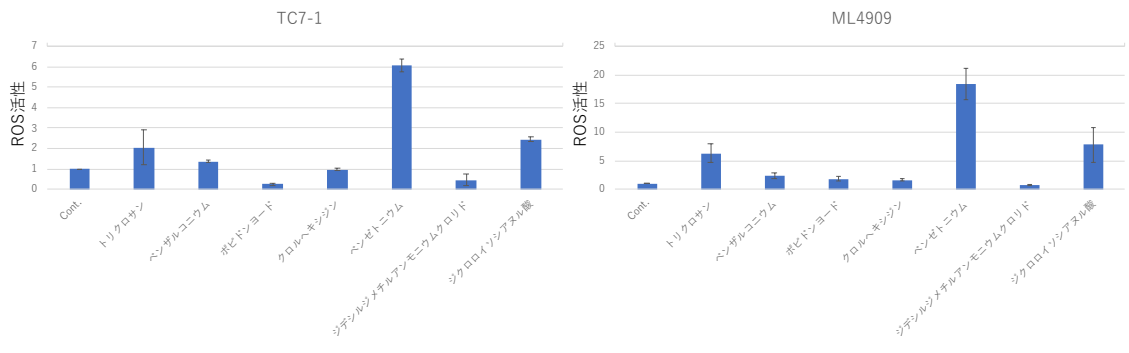


図 3. 消毒薬暴露下における ROS 反応

## ROS 阻害剤による消毒薬が引き起こす ROS 反応の阻害

トリクロサンが引き起こす ROS 反応は、ROS 阻害剤により阻害された (図 4)。一方、ベンザルコニウムおよびベンゼトニウムが引き起こす ROS 反応

は、ROS 阻害剤により明確な阻害は認められなかった。

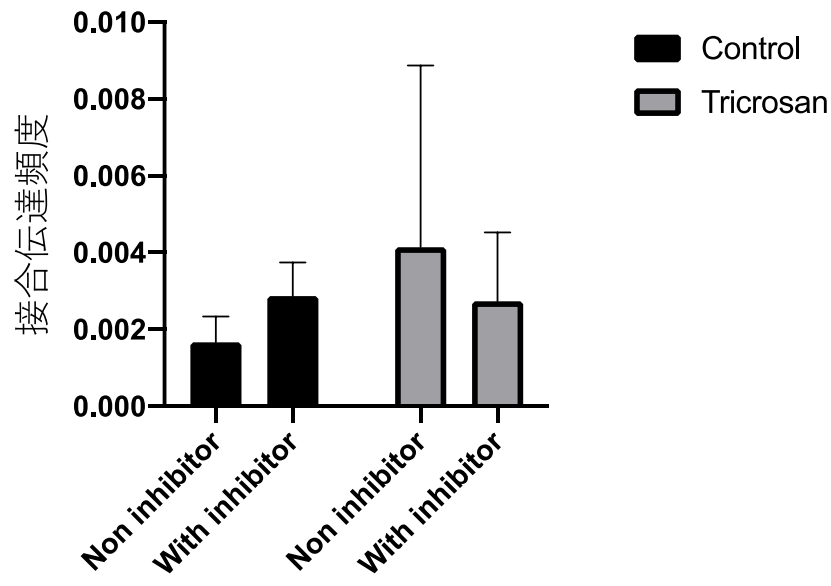


図 4. ROS 反応阻害剤存在下における ROS 反応

成果発表：

臼井優、 One Health の視点からの動物由来薬剤耐性菌の現状と展望、第 23

回臨床腸内微生物学会シンポジウム、大宮、2020 年 9 月

臼井優、One Health の視点からの動物由来薬剤耐性菌の現状、2021 年福岡県

One Health 国際フォーラム、2021 年 1 月



## 今後の問題点：

今年度の成果により、トリクロサンを含む一部の消毒薬の暴露は ROS 反応を介して、接合伝達頻度を上昇させていることが明らかとなった。昨年度の成果では、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とが示唆されている。以上のことから、接合伝達頻度は単一のメカニズムではなく SOS 反応および ROS、またそれ以外のメカニズムによって調整されていることが示唆される。今後は、この複雑な上昇メカニズムについて、遺伝子発現解析などで明らかにしていく必要がある。