

細菌の抗生物質耐性化に対する溶存態 DNA の影響

龍谷大学 正会員 ○越川博元, 村中医療器(株) 大谷藍子
西島製作所 滝さやか

1. はじめに

近年、河川を中心とした環境水中での薬剤の存在とその濃度が多く報告されている。なかでも抗生物質は病原性細菌などに対する対抗手段として重要であり、抗生物質耐性細菌の存在や抗生物質感受性細菌の耐性化は、微生物学的安全性の観点から重大な懸念をもたらす。しかし、河川水中の抗生物質濃度はおおむね数 100ng/L レベルであること、この濃度レベルは MIC と比較しても小さく、抗生物質感受性大腸菌である *E.coli* JM109 株のコロニー形成を阻害しないことを既に我々は報告¹⁾している。一方で、河川水中に最大 60mg/L の抗生物質存在下でもコロニーを形成する細菌が存在すること、研究に供した抗生物質のなかではレボフロキサシン(LVFX)耐性菌の存在がその抑制という点から問題があることを指摘した。また河川水には溶存態 DNA が存在すること、その発生源の約 60%が下水処理場放流水に由来するものであることを報告している。しかしながら、抗生物質耐性化に対する溶存態 DNA の役割については明確に示すことができていなかった。そこで本研究では、河川水から単離した LVFX 感受性細菌を溶存態 DNA とともに培養し、LVFX 感受性細菌の LVFX 耐性化に対する溶存態 DNA の役割について明らかにした。

2. 実験方法

河川水から LVFX 感受性細菌を単離し、溶存態 DNA 非存在下、および存在下における LVFX 感受性細菌の LVFX 耐性化について検討した。手順は次の通りである。

1)LVFX 感受性細菌の単離: 予め滅菌したポリエチレン製容器に採水した試料水 1mL を、カナマイシン(KM) 50μg/mL を含む m-TGE 寒天培地に植菌し、37℃で 24 時間倒置培養した。生育したコロニーをさらに LB 液体培地(KM 濃度 50μg/mL)に 1 個ずつ植菌して培養し、得られた菌体を KM 耐性細菌としてこれを保存した。またこれらの KM 耐性細菌培養液 30μL を LVFX50μg/mL を添加した LB 液体培地にそれぞれ植菌し、37℃で 24 時間、振とう培養した。このとき、生育したコロニーは LVFX 耐性・KM 耐性細菌、死滅したコロニーは LVFX 感受性・KM 耐性細菌と判断し、後者の LVFX 感受性細菌を以下の実験に供した。

2)LVFX 感受性細菌の耐性化実験: 前処理をした河川水を培地として、1)で得た LVFX 感受性細菌を 24℃ (河川水の年間平均温度) で振とう培養し、経時的にサンプリングした。サンプリングした菌液を滅菌水で適宜希釈し、これを LVFX 含有 (LVFX 濃度: 20μg/mL, 50μg/mL) LB 寒天培地に植菌し、37℃で 24 時間培養し、形成したコロニーは LVFX 耐性化細菌としてその数をカウントした。また同時に LVFX を含有しない LB 寒天培地に対しても同様の手順をおこない、全細菌数を求めた。この実験に用いた河川水の前処理方法は次の通りである。滅菌ポリエチレン製容器に採水した河川水を 0.2μm フィルターでろ過後、121℃・20 分間オートクレーブで加熱し、本実験に使用した。これらの処理は 0.2μm フィルターでろ過することによる細菌などの夾雑物の除去、オートクレーブでの加熱による河川水に由来する溶存態 DNA の分解をおこない、河川水という実環境に近い貧栄養下での耐性化を検討することを目的としたものである。また、添加した溶存態 DNA は CTAB を用いて濃縮・精製¹⁾したものであり、その濃度は実河川で検出されるレベルの 10μg/L に設定した。

3)キノロン耐性領域の変異: LVFX 耐性化が添加した溶存態 DNA に由来するものであるかどうかを明らかにするため、PCR を用いて *gyrA* 遺伝子を検出するとともに、サイクリングプローブ法により LVFX 耐性をもたらすキノロン耐性領域 (QRDR) を、LVFX 感受性細菌、LVFX 耐性化細菌、および溶存態 DNA とで比較を行った。キノロン耐性は、標的酵素である DNA ジャイレースおよび DNA トポイソメラーゼⅣの変異によるキノロン剤との親和性の低下により起こる。また、LVFX 耐性細菌は *gyrA* 遺伝子のコドン 83 位とコドン 87

キーワード レボフロキサシン, 溶存態 DNA, 抗生物質耐性, 抗生物質耐性化

連絡先 〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5 Tel:077-544-7102, Fax:077-544-7130

位のいずれか1箇所、あるいはその両方に点変異が入っていることが報告されている²⁾。本研究で使ったサイクリングプローブ法では QRDR の遺伝子点変異の違いによって検出される蛍光に違いが生じることから、特に LVFX 耐性化細菌と溶存態 DNA とに由来する QRDR の点変異を比較し、その耐性化が溶存態 DNA によってもたらされているのかを明らかにすることとした。

3. 結果と考察

得られた結果を、図1に示した。実験開始 ($t=0$) から $t=144(h)$ (6日目)までは、24時間毎にコロニー数を計測した。LVFX 感受性細菌のみを培養したところ、抗生物質 (LVFX) 非存在下ではコロニーの生育が見られたものの、LVFX 耐性化細菌の存在は見られなかったことから、植菌した細菌は LVFX 感受性であり、耐性化していなかった。その後、 $t=520(h)$ (21.6日後)に溶存態 DNA $10\mu\text{g/L}$ を添加したところ、 $t=568(h)$ 以降で LVFX 耐性化細菌の存在が確認された。溶存態 DNA 添加した場合でのみ LVFX 耐性化細菌の生育が確認されたことから、溶存態 DNA にコードされている LVFX 耐性遺伝子が伝播した可能性が高いと考えられた。そこで、PCR 法およびサイクリングプローブ法を用いて培養前の LVFX 感受性細菌と LVFX 耐性化細菌の遺伝子、および添加した溶存態 DNA について、LVFX 耐性をもたらず変異の有無について検討したところ、培養前の LVFX

感受性細菌には、変異が見られなかったのに対して $t=568(h)$ 以降に出現した LVFX 耐性化細菌には変異が検出された。さらにその変異は添加した溶存態 DNA と同じものであった (表1)。これらから LVFX 感受性細菌が溶存態 DNA に由来する LVFX 耐性遺伝子 (QRDR) を取り込んだことが示された。

4. まとめ

河川水中に菌体外 DNA として存在する溶存態 DNA は、貧栄養下における細菌の形質転換に関与していることがわかった。このことは、河川における溶存態 DNA の約 60% が下水処理場放流水由来であることを考慮すれば、下水処理場から放出された遺伝情報が下流域の細菌等の形質に影響を及ぼしているものと考えられる。

5. 参考文献

1)越川博元, 滝さやか, 井口彩, 小幡倫大, 田中宏明, 淀川水系における抗生物質, 溶存態 DNA の挙動と抗生物質耐性菌の特性, 水環境学会誌, Vol.31, No.11, 2008, 2)廣瀬健二, 伊藤健一郎, 渡邊治雄, サイクリングプローブ法を利用したチフス菌・パラチフス A 菌の *gyrA* 変異検出方法の開発, BIO VIEW No.49, 2008

謝辞: 本研究は「財団法人 三菱財団」, および「龍谷大学理工学学術研究助成基金」の助成を得て実施しました。謝して記します。

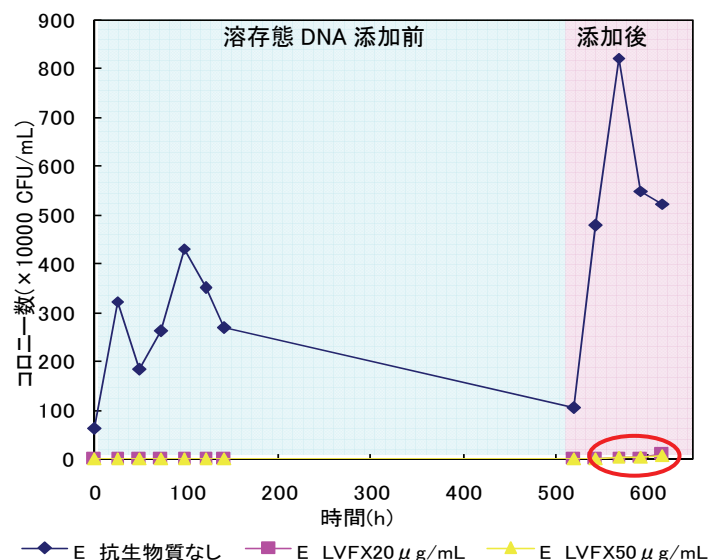


図1 溶存態 DNA の添加と LVFX 耐性化の経時変化

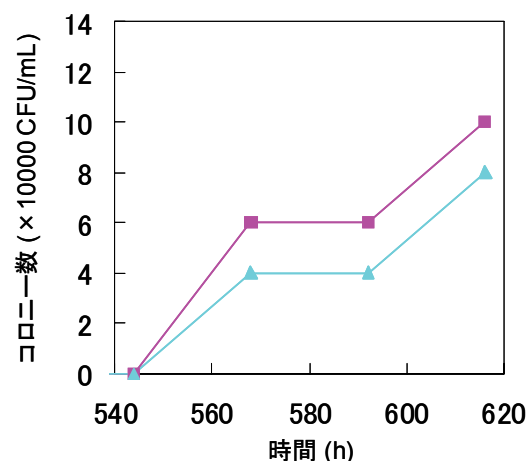


図2 $t=540(h)$ 以降の LVFX 耐性化細菌数

表1 QRDR の点変異パターン

位 置	LVFX 感受性細菌	溶存態DNA	LVFX 耐性化細菌
85位	×	×	×
87位	×	○	○