

## チャオプラヤ川流域から分離された大腸菌からの テトラサイクリン耐性遺伝子の検出

山形大学大学院	学生会員	○小澤耕平
山形大学	正会員	渡部 徹 伊藤紘晃
東北大学大学院	正会員	真砂佳史
カセサート大学	非会員	Chiemchaisri Wilai
金沢大学	正会員	本多 了

### 1. はじめに

細菌感染症の予防・治療のために用いられる抗生物質は、医療目的だけでなく畜産、水産、農業でも用いられる。このような多岐にわたる薬剤使用にともなって、水環境中への薬剤耐性菌の広がりが懸念されている。特に、東南アジア諸国では、社会インフラ整備の遅れによって下水が十分な処理をされないまま水環境に放流されることが多いため、環境中において薬剤耐性菌が多く生存すると考えられる。また、処方箋がなくても薬局で抗生物質を購入できるため、不適切な薬剤の使用により患者体内で耐性菌が生まれ、それらが水環境に排出される危険性も大きい。畜産、水産、農業での抗生物質の過剰な使用もまた、薬剤耐性菌の発生源となりうる。チャオプラヤ川流域における抗生物質耐性大腸菌の存在について、本多ら(2011)はスルファメトキサゾール、テトラサイクリン、レボフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシンの5種の抗生物質を対象として抗生物質感受性試験を行った。分離された大腸菌のうち、56%が5種の抗生物質のいずれかに対して耐性を示し、38%がすべての抗生物質に耐性を示した。本研究では、比較的広範な用途で用いられる抗生物質テトラサイクリンを対象として、チャオプラヤ川の流域から分離された大腸菌について、耐性メカニズムと起源を推定するため、テトラサイクリン耐性に関わる既知の遺伝子群の検出を行った。

### 2. 方法

#### 2. 1 実験に用いた大腸菌分離株

我々の研究グループでは、2011年1月に、チャオプラヤ川およびその支流において河川水のサンプリングを行い、そのサンプルから選択培地による培養を経て大腸菌を分離した。分離された菌株に対して、KBディスクを用いた薬剤耐性試験を行い、テトラサイクリン耐性の判定を行った。調査地点、大腸菌の分離培養、薬剤耐性試験に関する詳細は、参考文献(本多ら, 2011)を参照されたい。本研究では、このときに分離された大腸菌株のうち、テトラサイクリン耐性、感受性を問わず計412株を分析に供した。

#### 2. 2 検出対象としたテトラサイクリン耐性遺伝子

テトラサイクリン耐性のメカニズムとして、これまでに、薬剤排出ポンプの合成、テトラサイクリンとリボソームの結合を阻害するタンパク質の合成、テトラサイクリン分解酵素の合成の3つが知られている。それぞれのメカニズムによる耐性に関与する遺伝子(耐性遺伝子)の存在も明らかになっている。本研究では、薬剤排出ポンプの合成に関わる遺伝子16種類、リボソーム結合阻害タンパク質の合成に関わる遺伝子8種類、テトラサイクリン分解酵素の合成に関わる遺伝子2種類の、計26種類の耐性遺伝子の検出を試みた。

#### 2. 3 耐性遺伝子の検出手法

上記の大腸菌の分離株から、QIAamp DNA Mini Kit をプロトコル通りに使用してDNAを抽出した。抽出したDNAについて、Integrated fluidic circuits (IFC) を用いて耐性遺伝子の有無を調べた。IFCは従来の96ウェルPCRプレートをを用いた手法に比べ、48×48あるいは96×96といった高密度の反応区画において極めて多数の定量PCRを一度に行える装置である。本研究においては48×48のIFCプレートをを用いた。48×48 IFCプレートにはプライマー準備用のウェルと遺伝子サンプル準備用のウェルがそれぞれ48ずつあり、ウェル内に添加した溶液はポンプによって48×48の高密度の反応区画に注入される。プライマー準備用のウェルには、2× Assay Loading Buffer 2.5μL, フォワードプライマー0.25μL, リバースプライマー0.25μL, ポリオウイルスの陽性対照となる合成DNA 0.25μL, スクレアーゼフリー水 1.75μLをそれぞれ用意した。フォワードとリバースのプライマーには、前述の26種の耐性遺伝子検出用として知られているプライマーセットを用いた。サンプル準備用のウェルには、Sso Fast Evagreen supermix(2x) 2.5μL, 20x DNA Binding Dye Loading Reagent 0.25μL, サンプ

キーワード: 大腸菌, テトラサイクリン, 薬剤耐性遺伝子, チャオプラヤ川, IFC

住所: 山形県鶴岡市若葉町1-23, Tel: 0235-28-2907, Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

ル DNA 2.25μL をそれぞれ用意した。サンプルとプライマーを流し、ハイスループット qPCR ダイナミックアレイ装置 (BioMark, Fluidigm) にセットし PCR を行った。PCR の反応条件は 98°C 2 分 (または 4 分) の後、熱変性 98°C 15 秒, アニーリング 53°C 30 秒, 伸長反応 68°C 30 秒 (または 40 秒) の 3 セットを 50 サイクルとした。増幅された遺伝子は, Evagreen を用いたインターカレーション法によって定量された。

2. 4 確定試験及びシーケンス解析

IFC の利点は上述の通り, 多数の定量 PCR を同時に行うことができる点にある。その一方で, 上記のインターカレーション法で定量する場合には, 非特異的な結合による増幅も検出してしまふ欠点がある。特に, 多種類のプライマーを用いる場合には, すべてのプライマーの至適温度を満たすような条件で PCR を行うことは難しいため, 非特異的な結合による擬陽性が生じる危険性がある。よって, IFC で陽性を示した菌株-耐性遺伝子の組み合わせについては, 通常の PCR と増幅産物の電気泳動によって耐性遺伝子の存在を確認し, シーケンス解析を行った。

3. 結果及び考察

本研究においては, 412 株に対して 26 種の耐性遺伝子の有無を調べるため, まず, IFC によるスクリーニングを行った後に, 通常の PCR と増幅産物の電気泳動とシーケンス解析による確定試験を行った(図 1)。412 株のうち 385 株は 1 個から 10 個のプライマーについて陽性であり, 27 株は全てのプライマーに対して陰性であった。さらに電気泳動とシーケンス解析による確定試験を行った結果, スクリーニングにおいて陽性であった 385 株のうち, 4 株について耐性遺伝子が確定され, 一方, 残りの 381 株については非特異的増幅が生じていたことが示された。ワン川の大腸菌で *tet(B)* が, チャオプラヤ川の大腸菌で *tet(B)* と *tet(D)* が検出された(図 2)。これらの耐性遺伝子は, 薬剤排出ポンプをコードしている。耐性株 213 株のうち, 209 株からは耐性遺伝子は検出されなかったが, それらの株については, IFC での温度条件が一部のプライマーの Tm 値から外れていたためと考えられる。そのため今後 IFC の温度条件とプライマーの選定について再度検討する必要がある。

4. まとめ

チャオプラヤ川流域から分離された大腸菌について, 耐性メカニズムと起源の推定を目的として, 耐性遺伝子群の検出を行った。今後, 本研究では対象としなかった耐性遺伝子や, 他の薬剤の耐性遺伝子についても同様の実験を行い, より深い考察を進める予定である。

謝辞: 本研究は, 科学研究費補助金「東南アジアの水環境における薬剤耐性菌の発生源と耐性獲得経路の推定」(課題 No. 24404017), および JSPS アジア研究教育拠点事業「アジアにおける都市水環境の保全・再生のための研究教育拠点」の支援を受けた。

参考文献: 本多, 渡部, 真砂他, 土木学会論文集 G (環境), 67, III\_173-III\_178, 2011

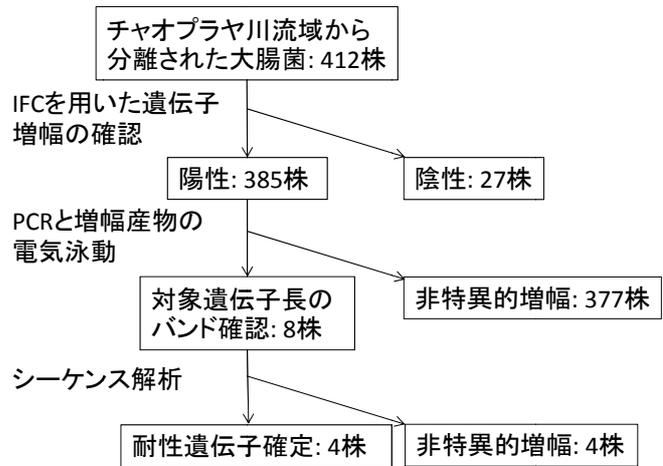


図 1. 実験のフローチャート

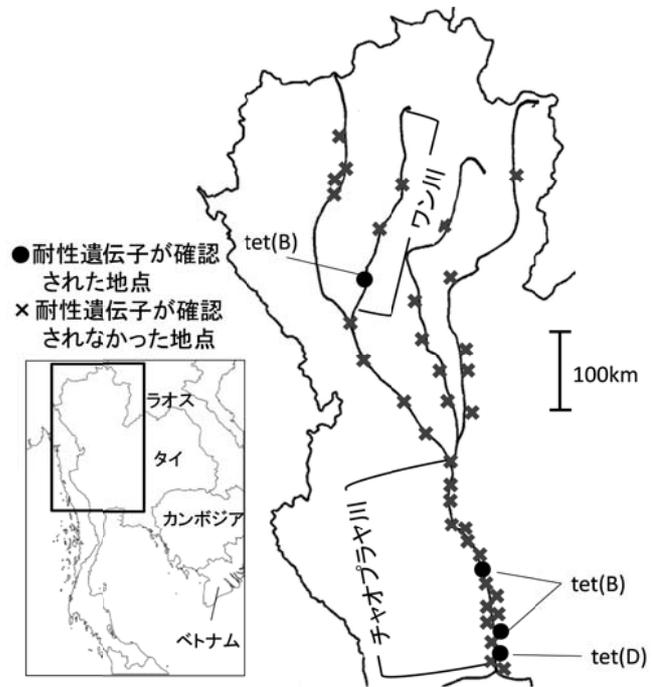


図 2. 河川水のサンプル採取地点とそこで検出された耐性遺伝子