

チャオプラヤ川流域から分離された大腸菌のテトラサイクリン耐性遺伝子

山形大学農学部 学生会員 ○小澤耕平
山形大学農学部 正会員 渡部徹, 伊藤紘晃, 梶原晶彦
東北大学大学院工学研究科 正会員 真砂佳史
カセサート大学工学部 非会員 Chiemchaisri Wilai
金沢大学理工研究域 正会員 本多了

1. はじめに

抗生物質は、細菌感染症の予防・治療のために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。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。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。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、タイの首都バンコクを流れるチャオプラヤ川の流域から分離された大腸菌について、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い、その出現パターンを明らかにすることを目的とする。

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306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①薬剤排出ポンプの合成、②リボソームと結合して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、③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、①薬剤排出ポンプの合成に関わる遺伝子16種類、②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、③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。具体的な耐性遺伝子の種類については、次ページの図2に示す通りである。

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、フォワードプライマー0.25μL、リバースプライマー0.25μL、ヌクレアーゼフリー水4.5μL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、サンプルDNA 1.25μL、滅菌超純水1μL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℃2分（または4分）の後、熱変性98℃15秒、アニーリング53℃30秒、伸長反応68℃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

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う欠点がある。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

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

については、通常の PCR によって耐性遺伝子の存在を確認した（ただし、本稿では確定試験の結果は示さず、IFC の結果にもとづいて考察を行う）。

3. 結果及び考察

IFC を用いて、306 株 26 プライマーからなる計 7,956 条件で遺伝子増幅の有無を調べた。その結果、306 株のうち 286 株は 1 つ以上のプライマーで陽性であり、20 株が検出した全てのプライマーに対して陰性であった。この結果を、テトラサイクリン耐性株と感受性株に分けて表 1 に示す。

テトラサイクリン耐性株のうち、2 株 (1.3%) についてはすべての耐性遺伝子で陰性であり、検出対象とした 26 種類以外の未知な耐性遺伝子を有することが分かった。また、感受性株からも高い割合で耐性遺伝子が検出された。確定試験でも陽性が認められれば、この結果は、耐性遺伝子を保有していても耐性を発現していない株の存在を示す。

次に、複数の耐性遺伝子に対して IFC 陽性であった株に注目した。図 1 に示すように、耐性株においては、単一のプライマーのみで増幅が見られたのは 34 株であるのに対して、半分以上の菌株が複数の耐性遺伝子を有していた。一方、感受性株については、1 つの耐性遺伝子のみが検出された株が最も多かったが (42%)、最大で 9 つのプライマーによる増幅が確認された株もあった。

26 種類の耐性遺伝子のうち、tet(H), tet(K), tet(L), tetA(P), tet(Z), tet39, tet(S), tet(T), tetB(P), tet(X), tet37 の 11 種類の遺伝子はいずれの菌株からも検出されなかった。その一方で、otrB は耐性株、感受性株の両方で検出率が高かった。ただし、otrB の検出に用いたリバースプライマーの Tm 値が 57℃と高いため、非特異的反応による擬陽性の可能性がある。耐性機構別に見ると、薬剤排出ポンプによって耐性を得ている株が多く (158 株)、一方、酵素によって耐性を得ている株は検出されなかった。耐性株と感受性株を比較すると、tet(A)および tet(M)の検出率が、耐性株で明らかに高かった。

最後に、大腸菌株を分離した地点別（チャオプラヤ川と、その上流に位置する支流）に、耐性遺伝子の出現パターンを比較した。チャオプラヤ川にはバンコク首都圏などの人口密集地域が位置し、患者由来の耐性菌が流入することが予想されるが、そこで出現する耐性遺伝子の種類については上流の支流と顕著な差はなかった。

4. まとめ

チャオプラヤ川流域から分離されたテトラサイクリン耐性大腸菌について、耐性遺伝子群の検出を行い、耐性メカニズムと耐性菌の起源の推定を試みた。ここに示す結果は、同流域で分離された大腸菌 409 株のうち 306 株にもとづく結果である。今後、残りの株について同様の分析を行うとともに、上記の確定試験の結果によって擬陽性の結果を排除することで、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

表 1. テトラサイクリン耐性遺伝子の検出結果

耐性遺伝子	耐性試験にもとづく分類	
	耐性菌	感受性菌
1 つ以上検出	158	128
1 つも検出されず	2	18

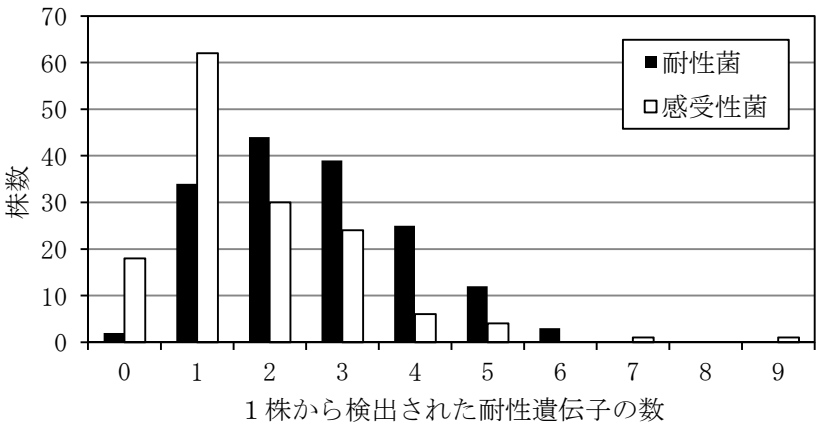


図 1. 1 株から検出されたテトラサイクリン耐性遺伝子の数の分布

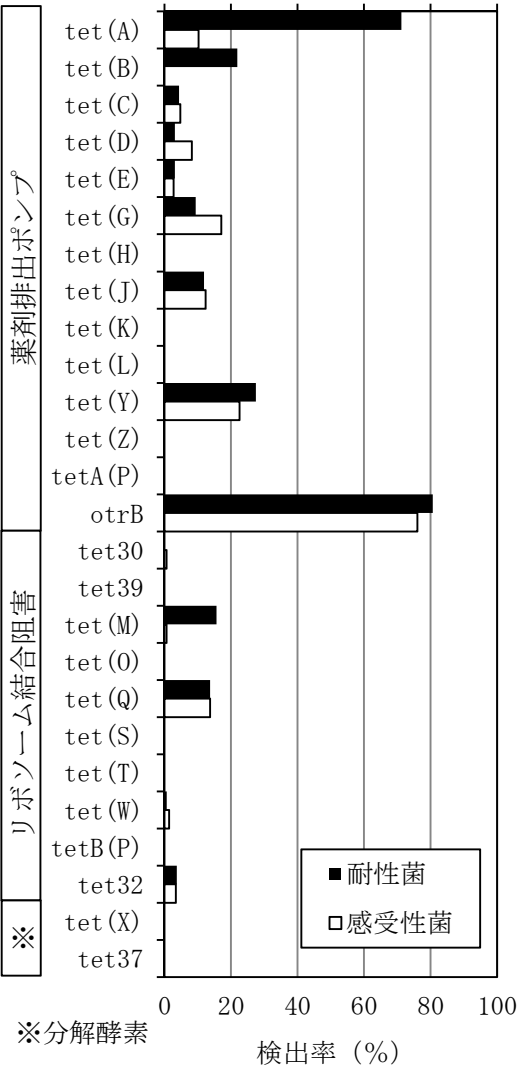


図 2. 耐性遺伝子別の検出率