

遊離塩素処理による細胞外薬剤耐性遺伝子活性の減衰効率評価

東北大学工学部建築社会環境工学科 学生会員 ○小沼 千紘
東北大学大学院工学研究科 非会員 モハン アマラシリ
東北大学大学院工学研究科 学生会員 門屋 俊祐
東北大学大学院環境科学研究科 正会員 佐野 大輔

1. はじめに

薬剤耐性細菌 (antibiotic resistance bacteria: ARB) による感染症が世界的に拡大している。薬剤耐性に起因する全世界での死亡者は 2050 年には年間約 1000 万人に上り、現在のがんによる全世界での死亡者数を上回ると予想されている¹⁾。2015 年 5 月の世界保健機構 (World Health Organization: WHO) の総会では、薬剤耐性問題に対するグローバルアクションプラン (Global Action Plan: GAP) が採択され、加盟各国に対し自国の行動計画を策定することが要請された。日本では、関係省庁・関係機関等がワンヘルス・アプローチの視野に立ち、協働して集中的に取り組むべき対策として 2016 年 4 月に AMR 対策アクションプランが策定された。2017 年 10 月 18 日には「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2017 (以下薬剤耐性ワンヘルス報告書)」が公開されている。

この薬剤耐性ワンヘルス報告書は、薬剤耐性に関わる国内の現状を網羅的にまとめた画期的な報告書であるが、その結語では、薬剤感受性試験、及び検出対象となる薬剤・薬剤耐性遺伝子 (antibiotic resistance gene: ARG)・微生物種の統一を図ると同時に、環境や食品といった ARB の移動・拡散に寄与する媒体における汚染実態の調査が現状では十分でないとしている。特に、水環境中の ARB・ARG の挙動や、それらがもたらすヒト健康へのリスクに関しては、ほとんど解明されていないのが現状である。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 つに、細胞外薬剤耐性遺伝子を外界から取り込む自然形質転換がある。水環境中には細胞外 DNA

の存在が指摘されており、その量は河川・海洋の水圏では 0.2-88 ng/ μ L とされている²⁾。また、細菌の中には細胞外 DNA を取り込みやすい自然形質転換能を持った細菌も存在する³⁾。大腸菌も環境条件によっては形質転換しやすいコンピテントな状態になることも報告されている⁴⁾。細胞外 ARG は別の細菌に取り込まれ、新たな薬剤耐性細菌の発生に寄与する可能性があると言える。

そこで本研究では、細胞外 ARG の活性に着目し、細菌の形質転換試験を応用することで、消毒剤 (遊離塩素) による細胞外 ARG 減衰効率を評価することを試みた。以下にその内容を報告する。

2. 研究方法

細胞外 ARG の受容体のモデルとして大腸菌のコンピテントセル、ARG のプラスミドのモデルとして pUC19 を使用した。

2.1 遊離塩素処理における CT 値の算出

細胞外薬剤耐性遺伝子に与えるストレスとしては下水、上水やプール、家庭用消毒剤などに広く使用されている次亜塩素酸ナトリウム溶液を使用した。0, 1, 10, 100 ppm での残留塩素の 0, 1, 2, 4, 10 分での時間変化は図 1 の通りである。ただし、残留塩素の測定器の上限が 2 ppm であるため、10 ppm, 100 ppm の CT 値の測定には MilliQ 水で 100 倍希釈した次亜塩素酸溶液を測定した。

キーワード：細胞外薬剤耐性遺伝子、遊離塩素、形質転換、大腸菌

連絡先：〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6

東北大学工学部建築・社会環境工学科 環境水質工学研究室 TEL: 022-795-3584

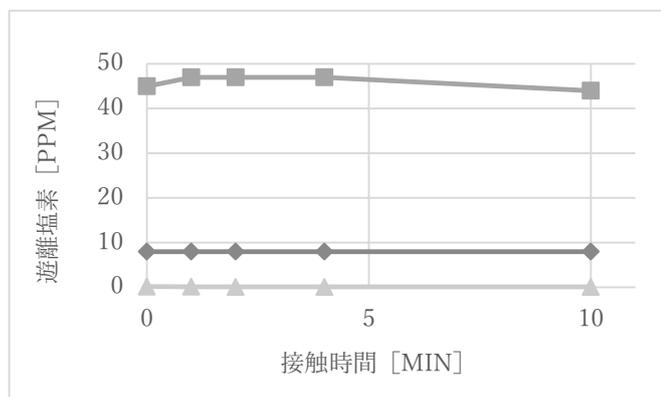


図1. 細胞外 ARG との接触時間中における遊離塩素濃度

2.2 遊離塩素処理

100 μL の pUC19 (51.72 ng/ μL 、約 1.68×10^{10} copies/ μL) を 9.9ml MilliQ 水で 100 倍希釈し、9 ml の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1ml 加え、トータルで 1000 倍希釈して消毒した。0, 1, 2, 4, 10 分で、1 μL の 1% チオ硫酸ナトリウム水溶液が入った 1.5 ml チューブに 1ml とり、中和した。また、陰性対照として次亜塩素酸ナトリウム溶液ではなく MilliQ 水を用いての実験を行った。

2.3 形質転換

消毒後は時間をあけずに形質転換実験を行った。コンピテントセル 25 μL に 1 μL の pUC19 液を加え氷上で 30 分間静置。42°C、30 秒間のヒートショックを与えた。直ちに室温に予熱した SOC 培地を 150 μL 加え、37°C、225 rpm で 1 時間インキュベートした。培養液は、LB 寒天培地には 10, 100, 1000, 10000 倍希釈したものを、抗生物質入り LB 寒天培地には 1, 10 倍希釈したものをそれぞれ 20 μL ずつ、37°C で 18 時間培養した。希釈はすべて LB 培地で行った。抗生物質はアンピシリン (Amp) を終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とするよう液体寒天培地に添加した。

3. 結果及び考察

初期遊離塩素濃度 10, 100 ppm で処理を行うことにより、形質転換効率はゼロまで低下した。それに対し、初期遊離塩素濃度 1.0 ppm で pUC19 を処理した際の形質転換効率は $6.0 \times 10^{-4} \sim 5.7 \times 10^{-6}$ であった (図 2)。これらの結果から、遊離塩素による細胞外 ARG 減衰速度定数を算出することで、

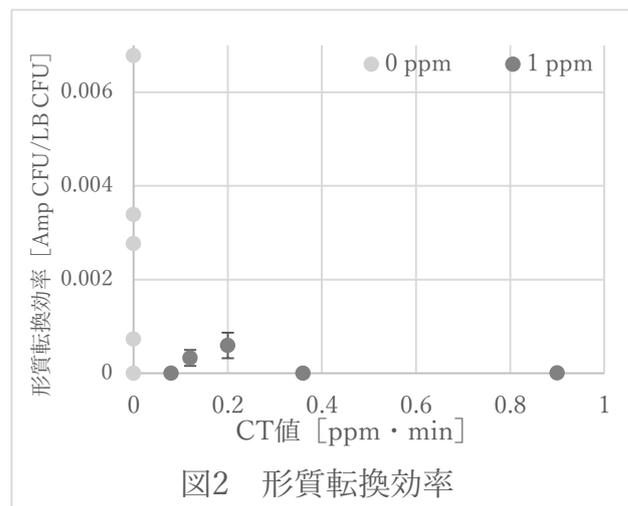


図2. 遊離塩素消毒後の細胞外 ARG の形質転換効率

必要な減衰効率を得るために必要な CT 値を算出することができる状況に今後するべきであると言える。

結論

本研究では、ARG 活性を評価することが可能な実験系を構築した。初期遊離塩素濃度 1.0 ppm での処理を施した場合、形質転換効率は 10^{-6} 程度まで低下した。

参考文献

- (1) AMR Review Paper – Tackling a crisis for the health and wealth of nations Chaired by Jim O’Neill December 2014
- (2) 丸山 史人, 谷 佳津治, 那須 正夫 (2004) 自然生態系における細胞外 DNA の動態と遺伝子伝播
- (3) M G Lorenz and W Wackernagel. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.
- (4) Baur, B., K. Hanselmann, W. Schlimme, and B. Jenni. 1996. Genetic transformation in freshwater: Escherichia coli is able to develop natural competence. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3673–3678.