

途上国の水環境に分布する薬剤耐性菌：テトラサイクリン耐性大腸菌を例に

山形大学大学院農学研究科 ○小澤耕平
山形大学農学部 伊藤紘晃
金沢大学理工研究域 本多了
山形大学農学部 渡部徹

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、農業でも使用されている。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流出する危険性がある。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、不適切な抗生物質の使用によって患者の体内で薬剤耐性菌が発生し、それらが水環境へ排出される危険性も大きい。畜産、水産、農業においても抗生物質の使用に気が使われておらず、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使用される抗生物質テトラサイクリンを対象として、タイ王国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遺伝子を調べ、発展途上国の水環境における薬剤耐性菌の分布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、そのサンプルから大腸菌を分離した。分離した大腸菌に対して、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への耐性、感受性を問わず計389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15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25種類の耐性遺伝子の検出を試みた。

2. 3 テトラサイクリン耐性遺伝子の検出および解析

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。一度に96サンプルしか処理できない従来の手法に比べ、IFCは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。検出された耐性遺伝子については、遺伝子の配列を読み解析をおこなった。

3. 結果及び考察

本研究で使用された大腸菌株 389 株中 132 株からテトラサイクリン耐性遺伝子が検出された(図 1)。耐性遺伝子を持っているが、耐性を示さない株も存在した。これは菌が薬剤耐性の機構を停止させていたと考えられる。検出された耐性遺伝子は 4 種類のみであった。各遺伝子が検出された地点を図 2 に示す。*tet(A)*、

tet(B)、*tet(D)*は薬剤排出ポンプに関

わる遺伝子で、*tet(M)*は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に関わる遺伝子だった。分解酵素の合成に関わる遺伝子は検出されなかった。*tet(A)*、*tet(B)*のように遺伝子が広く分布しているということは、薬剤耐性菌もまた広く分布しているということである。*tet(D)*、*tet(M)*は首都バンコクが位置するチャオプラヤ川の下流に集中している。このことからこの 2 つのテトラサイクリン耐性遺伝子はバンコク付近が発生源の可能性はある。

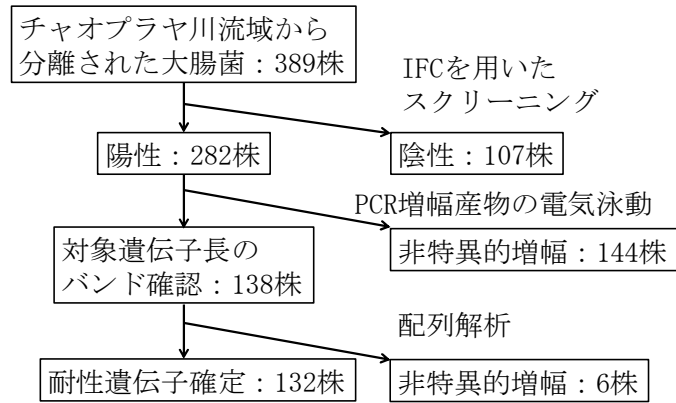


図 1. 実験のフローチャート

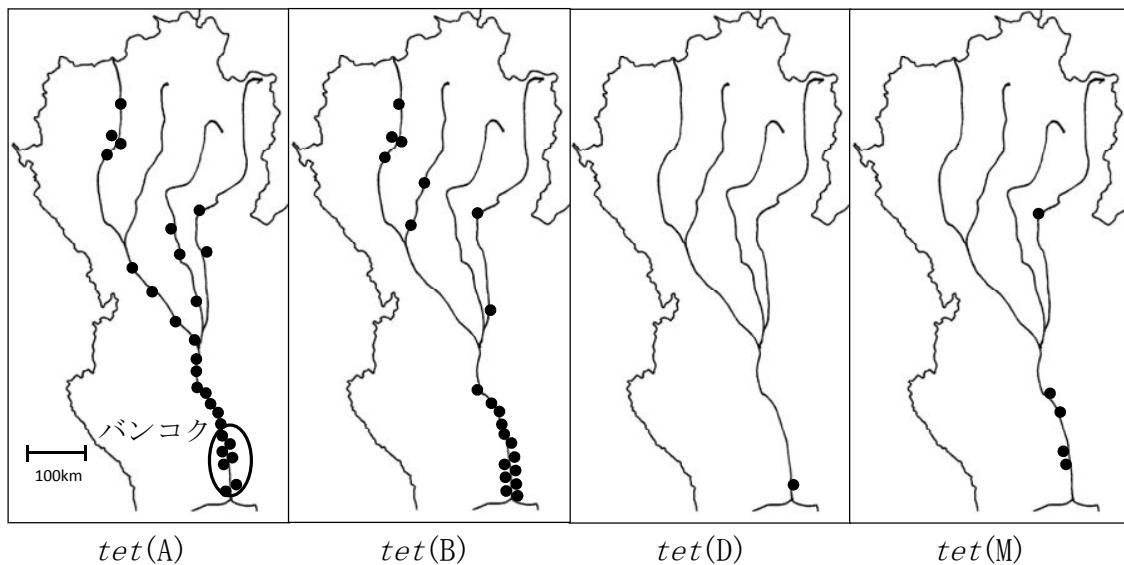


図 2. 各遺伝子が検出された地点

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、テトラサイクリン耐性遺伝子の検出と解析を行い、耐性メカニズムと起源の推定を試みた。今後は、他の抗生物質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。今回示したデータは、抗生物質の不適切な使用が指摘されているタイ王国での薬剤耐性菌の分布である。日本では抗生物質が計画的に使用されていることから、これほど広範囲に耐性菌が分布してはいないと予想しているが、その点も今後明らかにしていきたい。

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