

薬剤耐性菌に関する教育に向けて～スマホ画面から検出される耐性因子の調査～

Research in the antibiotic resistant bacteria on smartphones for education of the antimicrobial resistance

○安川洋生^{*1}, 岡田菜月^{*2}, 福士祥代^{*2}, 八重樫理称^{*1}

Hiro YASUKAWA^{*1}, Natsuki OKADA^{*2}, Sachiyo FUKUSHI^{*2}, Riho YAEGASHI^{*1}

^{*1} 岩手大学教育学部, ^{*2} 岩手大学技術部

^{*1} Faculty of Education, Iwate University, ^{*2} Division of Technical Support, Iwate University

【要約】 薬剤耐性菌対策は喫緊の課題であり、解決に向けて教育と啓蒙に取り組むべきとされるが、アンケート調査の結果から岩手大学教育学部生の多くはこれに関連する知識を持っていないことが分かった。現状と取り組むべき課題を認識させるために、岩手大学教育学部生のスマートフォン画面の薬剤耐性因子の調査を行った。37 台のスマートフォン画面からサンプリングし、抗菌薬（アンピシリン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、リファンピシンのいずれか）を含む培養液で培養した結果、14 台（38%）について微生物の増殖がみとめられた。これらの微生物を回収し、DNA を解析したところ、薬剤耐性因子である *bla_{ACT}*, *bla_{FOX}*, *tet(K)* が検出された。この結果は薬剤耐性菌が身近に存在していることを示しており、教育学部生が現状を把握し、薬剤耐性菌対策の重要性を理解する契機になると考える。

【要約】 薬剤耐性菌, スマートフォン

I. 緒言

今日では多くの抗菌薬に対して耐性菌が存在する一方で、新たな抗菌薬の開発件数は減少している。そのため耐性菌による感染症の重症化と死亡者の増加が、国際社会の解決すべき緊急かつ重要な課題となっている。

こうした現状を受けて 2015 年の WHO 総会では、薬剤耐性に関する国際行動計画が採択された。同年、日本では厚生労働省内に「薬剤耐性（AMR）タスクフォース」が設置され、2016 年から 2020 年の 5 年計画で「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」に取り組むことが決まった。このプランの中では戦略としての具体的な取り組みの一つとして「中学生と高校生に対する感染症対策及び医薬品を正しく使用することの必要性に関する教育の推進」を挙げている。これを実施するにあたり、学校教員と、教員を志す教育学部生には適切に生徒を指導できるように「薬剤耐性菌・薬剤耐性因子」や「感染症対策及び医薬品を正しく使用すること」に関する正しい知識と認識を持つことが望まれる。

教育学部生が薬剤耐性菌についてどの程度認識しているのかを知るために、岩手大学教育学部の講義

の一つにおいて受講生（総数 150 名）を対象にアンケート調査を実施した（2018–2019 年度）。受講生に「薬剤耐性菌という言葉聞いたことがありますか？」と質問したところ「はい」と回答した学生は 23 名（15.3%）であった。また、全学教養科目の講義において受講生（総数 102 名、そのうち教育学生は 42 名）を対象にアンケート調査を実施した（2019 年度）。受講生に「処方されたお薬は指示通りに最後まで飲みますか？」と質問したところ、教育学部生（回答数 39）の 19 名（48.7%）は「回復したら飲むのをやめる」との回答であった。このように教育学部生の知識は不十分であることが分かった。

そこで教育学部生に対する教育の一環として、薬剤耐性菌が医療機関にのみ存在するのではなく、生活環境中にも存在することを認識させることから始めた。生活環境中のさまざまな場所に薬剤耐性菌が存在することを学生に知ってもらうために、学生のスマートフォン（以下、スマホ）、学部棟内のハンドドライヤー、家庭の洗濯機、について調査を行なった。これらの調査では抗菌薬としてアンピシリン（細菌の細胞壁合成を阻害する薬剤）、テトラサイクリン（細菌のタンパク質合成を阻害する薬剤）、

ストレプトマイシン（細菌のタンパク質合成を阻害する薬剤）、リファンピシン（細菌の RNA 合成を阻害する薬剤）を用いた。いずれも長年にわたり使用されており、耐性を示す細菌が広くみとめられることが知られている抗菌薬である。調査結果のうちハンドドライヤーに関しては一部を報告済みである（八重樫，他，2019；安川，2020）。本稿ではスマホを対象とした調査について、現在までの結果を報告する。

なお、本研究は科学研究経費基盤 C（一般）「生活環境中における薬剤耐性菌の調査と解析」（課題番号 18K022350001）により行われた。

II. 材料と方法

1. サンプルングと培養

岩手大学教育学部生を対象に実施した。学生には調査の意義を伝え、次に、スマホ画面から耐性菌を含む微生物が検出されるであろうことと、それらの微生物が直ちに健康被害を及ぼすものではないことを説明した。学生の理解を得た後、次の手順に従ってサンプルングし培養した。

- (1) 滅菌綿棒を学生に渡しスマホ画面を拭き取らせた。
- (2) 綿棒を回収し、付着した微生物を SCD 培養液に懸濁し、終夜培養した。
- (3) 滅菌済みの 5 本の三角フラスコに SCD 培養液を 10mL ずつ入れ、そこに(2)で培養した試料を 10 μ L ずつ添加した。
- (4) 5 本中の 4 本にはアンピシリン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、またはリファンピシンのいずれかを添加した（いずれも終濃度 12.5 μ g/mL）。1 本については対照として抗菌薬を加えなかった。
- (5) すべての三角フラスコを振盪培養した後、培養結果を記録し、増殖のみとめられた試料について遠心分離により微生物を回収した。

2. DNA 試料の調製

上記の培養によりアンピシリンを含む培養液で増殖がみとめられた試料と、テトラサイクリンを含む培養液で増殖がみとめられた試料について、微生物試料をカネカ簡易 DNA 抽出キット version 2（カネ

カ）を用いて溶解し DNA 溶液を調製した。この DNA 溶液の一部を滅菌イオン交換水にて $10^3 \sim 10^4$ 倍に希釈し PCR に供した。

3. DNA の解析

TaKaRa Bacterial 16S rDNA PCR Kit（Takara Bio）を用いて、細菌に特異的な 16S rDNA の検出を行った。反応条件はメーカーのプロトコルに準じた。

アンピシリンを含む培養液で増殖がみとめられた試料について、シカジーニウス AmpC 遺伝子型検出キット（関東化学）を用いて、AmpC 型 β -ラクタマーゼの遺伝子ファミリー（*bla*_{ACT}, *bla*_{FOX}, *bla*_{CIT}, *bla*_{MOX}, *bla*_{ACC}, *bla*_{HA}）の検出を行った。反応はメーカーの推奨する条件に準じて行った。

テトラサイクリンを含む培養液で増殖がみとめられた試料について、KOD One PCR Master Mix（TOYOBO）を用いて *tet* 遺伝子（*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(H), *tet*(J), *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O), *tet*(S), *tet*(P), *tet*(Q), *tet*(X)）の検出を行った。*tet*(X) の検出には下記の塩基配列のプライマーを使用し、その他については文献に記載のプライマーを使用した（Ng, *et al.*, 2001; Fan, *et al.*, 2007）。反応条件はこれらの論文に準じた。

5' -CCAATGGGTGTAAATATTGCTGAT

5' -GTTTCTTCAACTTCGTCGCGTAAC

III. 結果と考察

1. 耐性を示す微生物の検出

培養結果（微生物の増殖の有無）を表 1 に示す。表中ではアンピシリンを ABPC、テトラサイクリンを TC、ストレプトマイシンを SM、リファンピシンを RFP と表記した。「-」は抗菌薬を含まないことを示し、「+」は微生物の増殖がみとめられたことを示す。

調査した 37 台のスマホの内の 14 台（38%）については抗菌薬を含む培養液で微生物の増殖がみとめられた。これらのうち、アンピシリンを含む培養液で増殖がみとめられた試料と、テトラサイクリンを含む培養液で増殖がみとめられた試料については微生物を回収して DNA 解析に供した。

13 台（35%）については抗菌薬を含まない培養液では微生物の増殖がみとめられたが、抗菌薬を含む培養液では増殖がみとめられなかった。しかしそれ

表 1. 培養結果

No.	抗菌薬 (12.5 μ g/mL)				
	-	ABPC	TC	SM	RFP
1	+				+
2	+	+		+	
3	+			+	
4	+				
5	+				
6	+	+	+	+	
7					
8	+	+			
9	+				
10					
11					
12					
13					
14	+				
15	+			+	+
16					
17					
18	+		+	+	
19					
20	+				
21					
22	+			+	
23					
24	+	+		+	
25	+			+	
26	+	+			
27	+				
28	+				
29	+			+	
30	+				
31	+				
32	+				
33	+				
34	+		+	+	
35	+				
36	+	+			
37	+				

をもって直ちに「薬剤耐性菌がいなかった」とは判断できない。薬剤耐性菌が存在していたにもかかわらず、本調査で用いた培養液組成や培養条件（培養温度や培養時間、等）が増殖に適していなかったの

かもしれない。この点も踏まえ、今後は培養を経ずに採取した試料から直接 DNA を抽出し（必要に応じて全ゲノム増幅をしてから）PCR を行い薬剤耐性因子の解析を行うことも検討している。培養によるバイアスを排することで新たな知見が得られるかもしれない。

10 台 (27%) のスマホについては抗菌薬を含まない培養液でも微生物の増殖がみとめられなかった。実際にスマホ画面に微生物が存在しなかった可能性を排除はしないが、微生物が存在していたにもかかわらず、本調査で用いた培養液の組成や培養条件が増殖に適していなかった可能性や、スマホ画面のふき取り操作が適切ではなかった可能性もある。今後の調査法について検討が必要であると考え。

2. 薬剤耐性因子の解析

6 台のスマホについてはアンピシリンを含む培養液で微生物の増殖がみとめられた。微生物を回収して DNA 溶液を調製し PCR に供したところ複数の試料から *bla_{ACT}* と *bla_{FOX}* が検出された。一方、反応産物が検出されない試料もあり、これについては本調査で用いた検査キットが対象としない薬剤耐性因子を有していると考えられる。

3 台のスマホについてはテトラサイクリンを含む培養液で微生物の増殖がみとめられた。PCR の結果、いずれから *tet(K)* が検出された。

IV. 結言

本調査により、私たちの身近に薬剤耐性菌が存在することが示された。ただし、これらの細菌が必ずしも直ちに健康被害を及ぼすものではない。この点も含めて、耐性菌対策の一環として薬剤耐性菌に関する正しい知識をより多くの人々に周知することが重要であると考え。そうした普及・啓発活動を推進する場として教育現場を活用し、薬剤耐性菌を拡大させないという意識を生徒、保護者、教職員で共有することが有効であると考え。

参考文献等

Ng, L.-K., *et al.* (2001) : Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, vol15,

pp209-215.

Fan, W., *et al.* (2007) : Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Probes*, vol21, pp245-256.

八重樫理称, 他 (2019) : 薬剤耐性菌に関する教育に向けて-ハンドドライヤーの送風から検出される薬剤耐性菌の調査. *日本科学教育学会研究会研究報告*. vol34, pp23-26.

安川洋生 (2020) : 薬剤耐性菌に関する教育に向けたハンドドライヤーの送風中の耐性菌の調査. *岩手大学教育学部附属教育実践総合センター研究紀要*. 印刷中

薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン. National Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2016-2020. 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚 (平成 28 年 4 月 5 日) .

補足

- (1) 培養結果について, 「+」は培養液中に微生物の増殖がみとめられたことを示すが, その培養液に含まれる微生物は 1 種類とは限らず複数種であることが想定される.
- (2) 薬剤耐性菌は 1 種の抗菌薬に耐性を示す細菌も複数の抗菌薬に耐性を示す細菌も存在する. そのため, 例えば試料 No. 2 では, アンピシリンを含

む培養液で増殖した細菌とストレプトマイシンを含む培養液で増殖した細菌が別の細菌である可能性もあるが, アンピシリンとストレプトマイシンの両方に耐性を示す同一の細菌が含まれる可能性もある.

- (3) アンピシリンを含む β -ラクタム系抗菌薬に対する重要な耐性機構の一つは β -ラクタマーゼ (加水分解酵素の一種) による不活化 (薬剤の β -ラクタム構造の分解) である. 今日, β -ラクタマーゼはその構造の違いからクラス A~D の 4 種類に分類されている. クラス A, クラス C, クラス D の β -ラクタマーゼは活性中心にセリン残基を配置しているためセリン- β -ラクタマーゼと呼ばれる. クラス B の β -ラクタマーゼは活性中心に Zn^{2+} を配置しておりメタロ- β -ラクタマーゼと呼ばれる. 本調査はこれらのうちクラス C に属する AmpC 型 β -ラクタマーゼについて検出を行った.
- (4) テトラサイクリン耐性機構には, 菌体内からのテトラサイクリンの排出 (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(H), *tet*(J), *tet*(K), *tet*(L), *tetA*(P), 等), 細菌のリボソームの保護 (*tet*(M), *tet*(O), *tet*(S), *tet*(Q), 等), 及び修飾による薬剤の不活化 (*tet*(X), 等) が知られている.