

生活環境中のテトラサイクリン耐性因子の調査

安川 洋生*

(2020年12月16日受付, 2021年1月28日受理)

1. 緒言

抗菌薬は、細菌の増殖を抑制する(静菌的作用)か、あるいは死滅させる(殺菌的作用)機能を有する化合物である。微生物が産生する抗菌性の化合物を抗生物質と呼ぶが、これも抗菌薬に含まれる。抗菌薬はその分子構造、及び作用機序に基づいて分類されている。例えば本稿で取り上げるテトラサイクリンはテトラサイクリン系抗菌薬に分類される薬剤の一つで、炭素の六員環が4つ繋がった構造を基本とし、細菌のリボソームに作用してタンパク質合成を阻害することにより細菌の増殖を抑制する。

抗菌薬は細菌感染症の治療に目覚ましい成果を上げたが、抗菌薬を使い始めて間もなくそれに対して耐性を示す細菌(薬剤耐性菌;以下 耐性菌とする)が出現した。耐性菌の耐性機構にはさまざまな種類があるが、本稿で述べるテトラサイクリン耐性に関しては、細菌内に入ったテトラサイクリンを積極的に菌体外に排出するポンプ機能を持ったタンパク質による耐性(*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tetA(P)*, 等)、テトラサイクリンからリボソームを保護するタンパク質による耐性(*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(Q)*, 等)、テトラサイクリンを修飾し不活化する酵素による耐性(*tet(X)*, 等)、が詳しく研究されている。

細菌が薬剤耐性を獲得する機構については詳しく研究され、耐性に必要なDNAを他の耐性菌から獲得する例や、細菌自体のDNAの変異により耐性を獲得する例が明らかにされている。細菌間のDNAの移動や、細菌のDNAの変異は頻繁に起きており、これらを繰り返すことで耐性度が上昇することも、複数種の抗菌薬に耐性を示す(多剤耐性)ようになることもある。

耐性菌が出現すると、それに対して新たな抗菌薬を開発し使用することになるが、その新薬に対しても耐性菌が出現するため、更に別の抗菌薬を開発して対応するという事態が繰り返されてきた。しかし今日では、耐性菌の出現に新たな抗菌薬の開発が追いつかない状況である。そのため、もはや抗菌薬が効かない(抗菌薬では治らない)という状況になりつつある。今日、世界で耐性菌に起因する死亡者の数は少なく見積もって70万人とされる(2013年の見積り; O'Neill, 2016)。インフルエンザによる年間の死亡者は推計で25

* 岩手大学教育学部

～50万人(厚労省新型インフルエンザ対策関連情報)、マラリアによる年間の死亡者は推定40万5000人(2018年の推定死亡者数;WHO 2019年世界マラリア報告書)であり、耐性菌は犠牲者の多いことが知られているこれらの感染症を上回る数の死亡者を出している。

耐性菌に起因する死亡者数は増加しており、このまま対策を怠ると2050年には世界で1000万人が耐性菌により死亡すると試算されている(O'Neill, 2016)。今日誰もが罹患する可能性のあるがんについては、2018年の死亡者が世界で960万人であり(国際がん研究機関IARCによる報告)、これに匹敵する犠牲者が出ると予測されている。耐性菌は社会に重大な影響を与える可能性が高く、危機感を持って捉えられている。

こうした危機的状況に対し、現在は世界各国で対策が執られている。その多くは当然ながら医療機関等における対策であるが、この問題の啓蒙を図るためには一般の人々の生活環境中における耐性菌の調査等を踏まえた対策の検討も必要であると思われる。

そこで、筆者は、岩手大学教育学部生の生活環境中の耐性菌の調査を行なった。調査の対象は、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、学生のアパート等の洗濯機の洗濯槽、とした。調査で使用した抗菌薬は、テトラサイクリン、アンピシリン、ストレプトマイシン、リファンピシン、とした。学部棟に設置されているハンドドライヤーの内の10台について調査したところ、5台において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(安川, 2020)。また、74名の学生のスマホ画面を調査したところ、3台において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(安川, 2021a)。洗濯槽については33台を調査したが、テトラサイクリンを含む培養液で微生物の増殖はみとめられなかった(安川, 2021b)。本稿ではテトラサイクリンを含む培養液で増殖した微生物のテトラサイクリン耐性因子についてあらためてPCRを行い、増幅したPCR産物を解析して決定した塩基配列を報告する。

2. 方法

10台のハンドドライヤー(HD1-HD10とする)と74台のスマホ(SP1-SP74とする)からサンプリングした微生物試料について、テトラサイクリンを含む培養液で増殖した微生物を回収し、DNA粗抽出液を調製してPCRを行った。プライマーは既報(Ng, *et al.*, 2001; Fan, *et al.*, 2007)を参考にTable 1に示す16セットとした。PCR産物が確認できた場合は、それらを精製し塩基配列を決定した。その際、二本鎖の一方のDNA鎖の塩基配列を決定するためにPCRプライマーのフォワードプライマーを用い、他方のDNA鎖の塩基配列を決定するためにリバースプライマーを用いた。

3. 結果と考察

調査したハンドドライヤーのうちの5台(HD1, HD4, HD5, HD7, 及びHD8)に由来する微生物のDNA粗抽出液を用いてPCRを行ったところ、テトラサイクリン排出タンパク質をコードする*tet(K)*の明瞭なPCR産物と、リボソーム保護タンパク質をコードする*tet(M)*の明瞭なPCR産物のみとめた。また、調査したスマホの3台(SP6, SP18, 及び

生活環境中のテトラサイクリン耐性因子の調査

SP34) に由来する微生物のDNA粗抽出液を用いてPCRを行ったところ、*tet(K)*の明瞭なPCR産物をみとめた。

これらのPCR産物を精製して塩基配列を決定した。シーケンサの特性上、PCR産物の両末端付近の塩基が正確に解読できなかったため、装置から出力された波形データを確認しながら判定可能な塩基を解読した。解読できた塩基配列はいずれもPCRに用いたプライマーの3'末端側を含んでいた。

*tet(K)*に由来すると推定されるPCR産物の塩基配列(解読できた鎖長は150～163b)について、既に報告されている*tet(K)*の塩基配列(GenBank S67449;全長1380bp)の該当する領域(169b)と比較した(Fig.1)。その結果、PCR産物の解読できた塩基配列はいずれも*tet(K)*と一致することが分かった。

*tet(M)*に由来すると推定されるPCR産物の塩基配列(解読できた鎖長は385bと387b)について、既に報告されている*tet(M)*の塩基配列(GenBank X90939;全長4419bp)の該当する領域(406b)と比較した(Fig.2)。その結果、PCR産物の解読できた塩基配列はいずれも*tet(M)*と一致することが分かった。

4. 結言

薬剤耐性対策の一つとして、耐性菌に関する正しい知識や抗菌薬の適切な使用方法を、より多くの人々に周知することが重要であると考えます。一方、健康な成人に対しては耐性菌が直ちに健康被害を及ぼすわけではないことも踏まえて、耐性菌の脅威ばかりを伝え不安を煽ることのないように注意する必要があります。耐性菌を正しく恐れ、適切に対処するために、生命科学を専攻する学生はもちろん、それ以外の学生も積極的に薬剤耐性について学ぶことが必要であろう。本稿に記載した調査結果が多くの学生の興味関心を引いて学ぶ契機となることを願う。

謝辞

本研究は科学研究費基盤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)の一部として、岩手大学技術部の岡田菜月氏、佐藤千瑛氏、福土祥代氏の協力により行われた。

参考文献等

- Fan,W., et al. (2007) *Molecular and Cellular Probes*, 21, pp245-256.
- Ng,L.K., et al. (2001) *Molecular and Cellular Probes*, 15, pp209-215.
- O'Neill,J. (2016) Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. London, England. Wellcome Trust, HM Government.
- 安川洋生 (2020) 岩手大学教育実践総合センター研究紀要, 19, pp111-114.
- 安川洋生 (2021a) 岩手大学教育実践・学校安全学研究開発センター研究紀要, in press
- 安川洋生 (2021b) 岩手大学教育実践・学校安全学研究開発センター研究紀要, in press

Table 1. Primers used in this study.

Gene	Sequence	Amplicon size (bp)	Accession No.	Gene	Sequence	Amplicon size (bp)	Accession No.
<i>tet(A)</i>	gctacatcctgcttgccttc catagatcgccgtgaagagg	210	X61367	<i>tet(K)</i>	tcgataggaacagcagta cagcagatcctactcctt	169	S67499
<i>tet(B)</i>	ttggttaggggcaagttttg gtaatgggccaataacaccg	659	J01830	<i>tet(L)</i>	tcgtagcggtgctgtcattc gtatcccaccaatgtagccg	267	U17153
<i>tet(C)</i>	cttgagagccttcaaccag atggtcgtcatctacctgcc	418	J01749	<i>tet(M)</i>	gtggacaaagggtacaacgag cggtaaagtctgtcacacac	406	X90939
<i>tet(D)</i>	aaaccattacggcattctg gaccggatacaccatccatc	787	L06798	<i>tet(O)</i>	aacttaggcattctggctcac tcccactgttccatatcgtca	515	Y07780
<i>tet(E)</i>	aaaccacatcctccatacgc aaatagggcacaaccgtcag	278	L06940	<i>tet(S)</i>	catagacaagccgttgacc atgtttttggaacgccagag	667	X92946
<i>tet(G)</i>	gctcgggtgatctctgctc agcaacagaatcggaacac	468	S52437	<i>tetA(P)</i>	cttgattgcggaagaagag atatgccatttaaccacgc	676	L20800
<i>tet(H)</i>	gtgatgtgactcccgtaaaaat ccagaaccgcaaaagacatacc	407	U00792	<i>tet(Q)</i>	ttatacttctccggcatcg atcggttcgagaatgtccac	904	X58717
<i>tet(J)</i>	acagactogccaatcattacggt gcaccacccaaaaaacgaaat	300	Af038993	<i>tet(X)</i>	ccaatgggtgtaaatattgctgat gtttcttcaacttccgtgtcggtaac	302	AAA27471

生活環境中のテトラサイクリン耐性因子の調査

<i>tet</i> (K)	187	TCGATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	246
HD1	1	GATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	58
HD4	1	CGATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	59
HD5	1	GATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	58
HD7	1	GATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	58
HD8	1	GATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	58
SP6	1	AGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	46
SP18	1	GATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	58
SP34	1	GATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAAATATAAAAAAATTGTTA	58
<i>tet</i> (K)	247	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	306
HD1	59	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	118
HD4	60	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	119
HD5	59	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	118
HD7	59	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	118
HD8	59	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	118
SP6	47	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	106
SP18	59	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	118
SP34	59	ATTATTGGTATTAGTTTGAGCCTGCTTGGTTCATTGATTGCTTTTATTGGTCACAATCAC	118
<i>tet</i> (K)	307	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAGGATCTGCTG	355
HD1	119	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAG	158
HD4	120	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAGGATC	163
HD5	119	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAGGATC	162
HD7	119	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAGGAT	161
HD8	119	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAGGATC	162
SP6	107	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAGGATC	150
SP18	119	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAGGAT	161
SP34	119	TTTTTTATTTTGATTTTTGGTAGGTTAGTACAAGGAGTAG	158

Fig.1. Sequence alignment of the part of *tet*(K) and PCR fragments.

<i>tet</i> (M)	106	GTGGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACA	165
HD7	1	TACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACA	48
HD8	1	GGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACA	50
<i>tet</i> (M)	166	ATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACG	225
HD7	49	ATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACG	108
HD8	51	ATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACG	110
<i>tet</i> (M)	226	CCAGGCATATGGATTCTTAGCAGAAGTATATCGTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCA	285
HD7	109	CCAGGCATATGGATTCTTAGCAGAAGTATATCGTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCA	168
HD8	111	CCAGGCATATGGATTCTTAGCAGAAGTATATCGTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCA	170
<i>tet</i> (M)	286	ATTCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACCTCGTATATTATTTTCATGCA	345
HD7	169	ATTCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACCTCGTATATTATTTTCATGCA	228
HD8	171	ATTCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACCTCGTATATTATTTTCATGCA	230
<i>tet</i> (M)	346	CTTAGGAAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATT	405
HD7	229	CTTAGGAAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATT	288
HD8	231	CTTAGGAAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATT	290
<i>tet</i> (M)	406	GATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAACTTTCTGCCGAAATTGTAATCAAA	465
HD7	289	GATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAACTTTCTGCCGAAATTGTAATCAAA	348
HD8	291	GATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAACTTTCTGCCGAAATTGTAATCAAA	350
<i>tet</i> (M)	466	CAGAAGGTAGAACTGTATCCTAATATGTGTGTGACGAACTTTACCG	511
HD7	349	CAGAAGGTAGAACTGTATCCTAATATGTGTGTGACGA	385
HD8	351	CAGAAGGTAGAACTGTATCCTAATATGTGTGTGACGA	387

Fig.2. Sequence alignment of the part of *tet*(M) and PCR fragments.