

2020年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	抗生物質が腸内における細菌間プラスミド伝達に与える影響の解明
キーワード	①腸内細菌、②プラスミド、③抗生物質

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	オオタ ナオミ 太田 奈保美	所属等	岡山理科大学 獣医学部 助教
プロフィール	帯広畜産大学畜産学部獣医学科を卒業後、米国カンザス州立大学大学院で修士号を取得し、テキサス A&M 大学大学院で家畜における薬剤耐性菌の疫学研究で博士号を取得しました。2019年より現職に着任しました。博士課程での疫学研究を通して、薬剤耐性菌が農場や家畜種、細菌種を超えて拡大していく仕組みに興味を持ちました。今後の薬剤耐性菌対策に貢献できるような研究を進めていく所存です。		

1. 研究の概要

薬剤耐性菌の拡大はヒトや動物そして環境が複雑に絡み合うことから様々な観点で対応する必要がある。薬剤耐性菌は細菌が薬剤耐性遺伝子を保有することによって耐性能力を獲得する。この耐性遺伝子は細菌の染色体と個別に細菌内に存在するプラスミド上に乗っていることが多く、プラスミドは細菌間で受け渡しされることが分かっている。これまでの研究で、水圏や土壌環境においてプラスミドの接合伝達の仕組みを明らかにする研究は行われているが、腸内環境については未だ不明なことが多い。例えば、炎症状態の腸内においてはサルモネラ属菌から大腸菌へのプラスミドの伝達が促進されることが分かっているが、そこに抗生物質の投与がどのように関連するかは分かっていない。また、*in vitro*の実験では抗生物質が接合伝達に影響するか結論に達していない。各研究における実験条件や使用している細菌および抗生物質が異なることから、結論を出すことができていないと言える。

本研究では人の医療において重要な位置づけを持つ第3世代セファロスポリンに対する耐性遺伝子を保有した腸内細菌が、抗生物質の存在下でのプラスミド伝達頻度の変化を明らかにすることを目的に研究を行った。

2. 研究の動機、目的

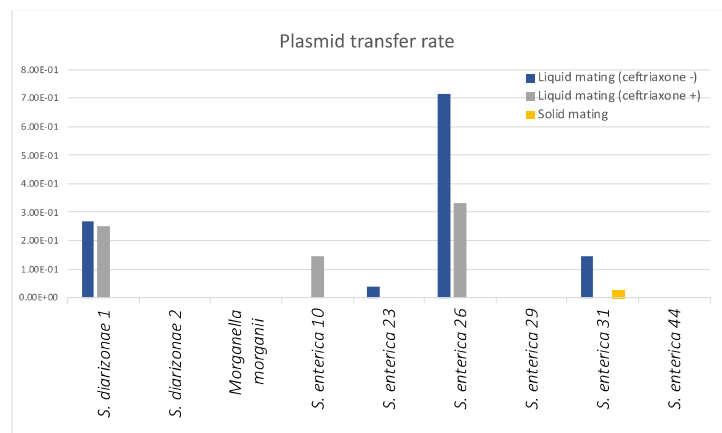
申請者は米国において肉牛を肥育するフィードロットにおいて2種類の抗生物質の投与順序に介入することで、薬剤耐性菌を減らす介入疫学研究に従事していた。肉牛からのサルモネラ属菌の検出率が70%に近い農場において、176頭の牛に抗生物質を投与後26日間のサルモネラ属菌のポピュレーションの変化を定量し、細菌の全ゲノム解析によって追跡した。全期間で合計566株のサルモネラを分離し、全ての株の全ゲノム解析からこれらの株は6つの血清型 (*S. Reading*, *S. Mbandaka*, *S. Give*, *S. Kentucky*, *S. Anatum*, *S. Montevideo*) から構成されていることが明らかになった。しかし、6血清型の中で *S. Reading* のみがセファマイシン耐性 *bla*_{CMY-2} 遺伝子を持つ *IncC* プラスミドを保有していたが、他の血清型からは検出されなかった。そこで、申請者は同種の細菌にも関わらずプラスミドの接合伝達が行われていないことに疑問を持った。薬剤耐性菌の拡大に警鐘が鳴る中、同種の細菌同士であってもプラスミドの伝達が必ずしも起きているわけではない。一方で、異なる細菌種同士でプラスミドを伝達し合うこともある。では、プラスミドの接合伝達は何をきっかけとして起こるのか、そして動物への抗生物質がそのきっかけとなり得るのかを明らかにしたいと思った。

3. 研究の結果

本研究ではまずβ-ラクタム系抗生物質耐性遺伝子(*bla*_{CTX-M14})を保有するドナーとなる大腸菌を市販の鶏肉から分離した。β-ラクタム耐性遺伝子を保有した大腸菌はショートリードによる次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析の結果、*bla*_{CTX-M14}、*bla*_{TEM-1}、*tet(A)*、*sul2*、*dfrA5*など様々な抗生物質に対する薬剤耐性遺伝子を保有していた。さらに、4種類のプラスミドIncB/O/K/Z、IncFIB、IncFII、IncQ1を保有していることが解析によって明らかになった。一方これらの耐性遺伝子がどのプラスミド上に乗っているかはこの全ゲノム解析のみでは明らかにすることができなかった。また、様々な血清型のサルモネラ属菌並びに腸内細菌を鶏肉や牛の小腸などの食肉および乳牛と蛇の糞便から分離した。Vitek2を用いた薬剤感受性検査によってβ-ラクタム耐性ではないことを確認した細菌をプラスミドのレシピエントとして使用した。サルモネラ属菌は2株の*Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*と6株のO4群、O7群、O13群の*Salmonella enterica* subsp. *enterica*、そして牛の糞便から分離された腸内細菌である*Morganella morganii*をレシピエントの細菌とした。

ドナーの大腸菌からレシピエントの細菌へのプラスミドの伝達はセファロスポリン感受性であるレシピエントの細菌群がセファロスポリンを含んだ培地上で生育可能となることで確認し、ドナーとレシピエントの細菌はDHL培地上でのコロニーの色の違いで区別した。レシピエントの細菌9株中5株(*S. diarizonae* 1、*S. enterica* 10、*S. enterica* 23、*S. enterica* 26、*S. enterica* 31)でセファロスポリン耐性となり、プラスミドの伝達を確認できた(図参照)。また、抗生物質の存在が接合伝達に与える影響を確認するため、液体培地(Liquid mating)中に第3世代セファロスポリンのセフトリアキソンをレシピエントの細菌を殺さない濃度で加えたところ、

プラスミドの伝達は3株で確認された(図灰色棒)。そのうち2株ではプラスミドの伝達頻度は抗生物質を加えていない群と比較して低かったが、1株のサルモネラ属菌(*S. enterica* 10)では抗生物質を加えた培地のみで接合伝達を確認された。また、寒天培地上(Solid mating)での接合伝達は液体培地中での伝達よりも頻度が低く、1株のみで確認された(図黄色棒)。これら接合伝達が起こった5つの細菌群の全てがVitek2でテストした



薬剤に感受性がある細菌だった一方、接合伝達の起きなかった細菌群はセファロスポリン以外のいくつかの薬剤に耐性を持っていたことから、プラスミドの接合伝達には細菌の薬剤感受性と何らかの関連性がある可能性が示唆された。

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究からいくつかの興味深い薬剤耐性遺伝子を保有した細菌を様々なサンプルから分離することができた。また、プラスミドの細菌間での接合伝達を確認することができた。抗生物質を加えることで、接合伝達の頻度が高くなることは確認できなかった一方で、抗生物質が存在することで接合伝達が起こる細菌も確認できた。同じニッチに存在する腸内細菌間でこれらの違いが見られる興味深い結果となった。これからの展望として、細菌間での違いが何に起因するのかをゲノム解析や培養環境の違いからさらに進めることで明らかにしていく。今回は本研究に適した薬剤耐性菌を入手するところから研究を開始したため、予定していた動物の生体を用いた研究まで進めることはできなかった。しかし、今回の結果は今後の研究への道筋を得る有意義なものとなった。将来的にはより自然環境に近い牛などの家畜の糞便からサンプルを収集し、プラスミドの細菌間での伝達を解明していきたい。

5. 社会（寄付者）に対するメッセージ

薬剤耐性菌の問題は新型コロナウイルス禍にある現在、影を潜めているように見えますが、肺炎による二次感染の予防のために抗生物質を使用することも多く、アフターコロナの薬剤耐性菌の動向に注視する必要があると予想されます。今回の研究は主に食肉や糞便などから分離された大腸菌、サルモネラ属菌そして腸内細菌を用いて進められましたが、プラスミドの伝達による薬剤耐性菌の拡大は様々な環境下で起きるものと考えられます。

本研究へのご支援をいただいたことは、研究者としてこれからの研究の方向性を決めるための重要な機会となりました。小さな研究成果ですが、実験の結果を真摯に受け止めて進んで参りたいと思います。採択を決定して下さった日本私立学校振興・共済事業団の皆様並びにご寄付をいただいた関係者の皆様に心より感謝申し上げますと同時に今後も若手・女性研究者へのご支援をいただきますようお願い申し上げます。

