

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670210

研究課題名(和文) 八工腸管細菌叢の解析と薬剤耐性菌の共生機構

研究課題名(英文) Comparative analysis of bacterial community and antibiotic-resistant strains in the digestive tract of the housefly

研究代表者

丹治 保典 (Tanji, Yasunori)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：00282848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では八工腸管内の細菌叢変化および抗生物質耐性菌の消長を培養法ならびに遺伝子学的手法を用いて解析した。八工の幼虫・蛹・成虫いずれの成長過程においても八工の腸管内には多様な抗生物質に対する耐性菌が存在し、公衆衛生の面から様々な問題が危惧された。次世代シーケンサーにより八工腸管内菌叢の解析を実施した。細菌叢は八工の成長過程毎に一変し、世代間における細菌叢も全く異なっていた。アンピシリンやカナマイシン耐性菌濃度は数百万菌体/g-腸管であった。産仔のために投与した豚レバーに存在する菌叢とそれを摂食した八工の腸管を構成する菌叢はまったく異なっていた。

研究成果の概要(英文)：Domestic insects have been implicated in the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance determinants. Houseflies are the most commonly occurring groups of synanthropic flies. Because of their developmental habitat, the mode of feeding by regurgitation, frequent fecal deposition, high dispersal ability, close contact with humans, and free movement between food animals and human residences, these flies are potential vectors of bacteria originating from animal manure and other decaying organic matter. The housefly has been demonstrated to harbor a considerable number of antibiotic-resistant bacteria. In this study, we monitored the whole bacterial community by a culture-independent method. Our results provide us with a better understanding of the interaction between synanthropic flies and the antibiotic-resistant bacteria that they harbor.

研究分野：環境生物工学

キーワード：イエバエ 多剤耐性菌 菌叢解析

1. 研究開始当初の背景

(1) ナミニクバエ

ナミニクバエ (*Sarcophaga similis*) は日本国内に広く分布するハエの種である。同様に国内で多く見られる近縁種のセンチクバエ (*Sarcophaga peregrina*) が熱帯から亜寒帯にかけて広く分布をしている一方で、ナミニクバエは旧北区に分布している。ニクバエは卵胎生の産仔方法をとることが知られている。これは子供を卵の形で産卵するのではなく、母親の胎内で孵化させてから蛆虫の形で産仔をする。これはイエバエやクロバエなどには見られない。

(2) ハエの種同定

ハエの種を同定することは、研究の面からも法医学の面からも重要である。ハエは主に腐敗した死肉などに産卵・産仔をするが、種によって好む腐敗の程度が異なる。よって死体に寄生している蛆虫の種を調べることで、死亡推定日時が逆算的に求められる。ハエの種の同定には、ハエ細胞内ミトコンドリアのシトクロムオキシダーゼ遺伝子サブユニットと塩基配列を基にした方法を用いた。ミトコンドリア DNA 用いて同定を行う利点として3つ挙げられる。1つ目は、ミトコンドリア DNA は塩基置換の生じる速度が速く、比較的短い進化的時間の中で生じた DNA の変異を効率よく測ることができる点である。2つ目は、ミトコンドリア DNA は母性遺伝であるがゆえに、父親の遺伝子の影響を受けず系統関係が復元しやすい点である。そして最後はミトコンドリア DNA の copy 数が 1,000 以上あり、抽出と増幅が容易である点である。

(3) ハエの腸内細菌叢

ハエは衛生昆虫として良く知られている。例えば、腸管出血性大腸菌 O157 の感染拡大にはイエバエが関与しており、それは主に足などに菌体が付着して輸送される伝播であるとされている一方で、腸管内にも当該細菌を保持し得ることが過去の研究で明らかになっている。また、ツェツェバエ (*Glossina palpalis*) がアフリカ睡眠病 (Human African trypanosomiasis) の原因となる寄生原虫トリパノソーマの媒介昆虫であることが良く知られているが、Enterobacter 属の腸内細菌がその感染拡大効率を3倍にまで引き上げており、疫学的にハエの腸内細菌叢は重大な要素をもつ。

ニクバエ腸内細菌叢については過去の報告として、蛆虫と成虫は共に腸管内は Firmicutes 門と Proteobacteria 門が大半を占めている。その中でも優占率が高い細菌種としては、蛆虫では Proteus 属と Providencia 属、成虫では Citrobacter 属、Bacillus 属であり、いずれも日和見感染の病原菌である。また、ハエ体内中の細菌が存在する場所は腸管だけではなく、唾液腺にも存在しており、そこには腸管内同様に多くの病原性細菌が含まれている。

(4) 抗生物質耐性菌

より早期の感染症治療のために抗生物質は今まで大量に使用されてきたが、それと同時に抗生物質耐性菌の存在が問題視されている。感染症患者に抗生物質を投与する際は耐性菌の出現を抑制するために十分量投与する必要があるが、投与された抗生物質は部分的にしか患者体内で分解されず、排泄物として排出され下水処理場や河川における抗生物質耐性菌の発生に寄与している。また、ヒトだけではなく家畜の感染症治療にも抗生物質が用いられるため、家畜の糞便中にも残留抗生物質または抗生物質耐性菌が存在している。家畜の糞便が堆肥として圃場に散布されることにより土壤中の抗生物質耐性菌数が上昇すると考えられている。

抗生物質耐性菌の発生機構は幾つかある。細菌の遺伝子配列に変異が生じ抗生物質耐性を獲得することも考えられるが、遺伝子が水平伝播してそれが染色体に組み込まれて抗生物質耐性を獲得することも多い。例えば、Tetracycline 耐性遺伝子や Erythromycin 耐性遺伝子は CTnDOT と呼ばれるモジュールに組み込まれており、接合型トランスポゾンとして細菌から細菌へ伝播する。

2. 研究の目的

先行研究でハエ腸管内に多くの抗生物質耐性菌が存在していることを明らかにした。その中で、蛆虫が保持していた *Proteus mirabilis* の中には Ampicillin に対する MIC (minimal inhibitory concentration) が 2024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を超えて非常に耐性能が高い株が存在していることが判明した。また別の報告では、ハエ腸管内において耐性遺伝子の水平伝播が生じうることを実証した研究もなされており、衛生昆虫としてのハエの重大さがますます増してきている。

ハエ腸管内では抗生物質の生成は確認されていないものの、抗菌ペプチドである Defensin の生成がなされていることが過去の研究から明らかになっており、外部から細菌が侵入するとそれに応じて Defensin の発現量が増える。このように腸内細菌の存在に競争が存在することが証明されている。前述したように、様々なリスクを背負ったハエ腸内細菌の消長を調べるため、ハエ腸内細菌の世代間比較を行い、世代ごとの腸内細菌叢の違いを調べた。そして病原菌媒介性が最も高い成虫における抗生物質耐性菌の消長を調べた。

3. 研究の方法

(1) 環境からのハエサンプリング

東京工業大学すずかけ台キャンパスにおいて捕獲したハエを本研究に用いた。プラスチックケースに約 10g の生鶏肉を入れた捕獲器を製作し、3日間屋外に放置した。3日後、蛆虫が鶏肉に産み付けられているのを確認して回収した。

(2) ハエの飼育方法

プラスチックカップに約 40 g の豚レバーを入れ、その上にオートクレーブで滅菌処理を施したピートモスをカップの 8 分目まで重層した蛆虫飼育ケースを作製し、その中に捕獲した蛆虫 50 匹を投入した。この際、蛆虫の脱走を防ぐために、飼育ケースにペーパータオル 2 枚を被せ、ゴムバンドで固定した。5 日間 25 °C 条件下で放置すると蛆虫の蛹化が確認できるため、個体を滅菌処理したピートモスを入れた蛹飼育ケースに移動し、羽化を待つ。洗濯ネット (60 cm×60 cm) の中にプラスチック棚を逆さに入れて成虫飼育ケージを作製した。成虫飼育ケースの中には給水器として 50 mL プラスチックボトルにペーパータオルを繊維方向に沿って差し込んで入口のところで球を作ったものと、エサとして角砂糖とスキムミルクを投与した。蛹飼育ケースごとこの成虫飼育ケージの中に入れて羽化を待った。

羽化後は 2 日毎に給水器の水とペーパータオルを交換した。羽化後 10 日ほど経ったら、10 g の豚レバーをケージに投入するとハエは産仔をした。産仔が確認でき次第、豚レバーを回収して新たに蛆虫飼育ケースを作製した。

(3) ハエの同定

ハエの種を同定するために、ミトコンドリア中のシトクロムオキシダーゼサブユニット (CO₁, 約 300 bp) と (CO₂, 約 630 bp) の遺伝子を対象にした配列解析を行った。DNA 抽出

50 mL プラスチックボトルに 2 mL の酢酸エチルを浸み込ませたキムワイプを入れ、それを捕獲器としてハエ成虫をケージより 5 個体サンプリングした。ハエ頭部より DNA 抽出を以下の手順で行った。

- ・1.5 mL マイクロチューブに 1 個体分のハエ頭部を入れ、100 μL の Buffer A を加えマイクロ乳棒を用いてホモジナイズした。

- ・65 °C で 30 分間静置した。

- ・200 μL の LiCl/CH₃COOK solution を加え転倒混和した。

- ・氷上に 10 分間静置。

- ・20,000×g、室温で 15 分間遠心分離をした。

- ・上清を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、150 μL のイソプロパノール、1 μL のグリコーゲンを加えて転倒混和した。

- ・20,000×g、室温で 15 分間遠心分離をした。

- ・上清を除き、400 μL の 70 % エタノールを加えて転倒混和した。

- ・20,000×g、室温で 15 分間遠心分離をした。

- ・上清を除き、沈殿を風乾した後に 50 μL の TE に溶解した。

(4) PCR ならびに遺伝子配列解析

目的配列を PCR で増幅し配列解析を行った。CO₁ に対してはプライマーとして CO1_mtDNA_F ならびに CO1_mtDNA_R を、CO₂ に対しては C2-J-3138_F ならびに TK-N-3775_R を用いた。増幅した目的配列をシーケンシング解析により決定し、NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLAST 検索を行い、既知種の中から相同性の高い種を検索した。

Oligonucleotide primers used for PCR

Primer Sequences (5'→3') Target

Amplicon size [bp]

CO1_mtDNA_F

CTGCTACTTTATGAGCTTTAGG

CO 304

CO1_mtDNA_R

CATTTCAAGTTGTGTAAGCATC

C2-J-3138_F

AGAGCCTCTCCTTTAATAGAACA

CO 637

TK-N-3775_R

GAGACCATTACTTGCTTTTCAGTC

ATC

(5) 生育段階間、世代間の菌叢比較

サンプリング

継代飼育の 3 世代目の蛆虫、蛹、成虫をそれぞれ 3 個体ずつサンプリングし、その後継である 4 世代目の蛆虫、蛹、成虫をサンプリングした。サンプリングした各 3 個体は 50 mL の遠沈管に混合し、PBS (phosphate buffered saline) 0.1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液の順で 15 秒間ボルテックスすることによって固体表面を洗浄した。その後 PBS で 2 回すすいだ。

(6) DNA 抽出

蛆虫は個体全体から、蛹は外殻を除いたものから、成虫は腹部から取り出した腸管のみから DNA 抽出を行った。それぞれサンプルを 1.5 mL マイクロチューブに入れ、1000 μL の PBS を加えマクロ乳棒を用いてホモジナイズし懸濁液を調製した。抽出方法を下記に示す。

- ・懸濁液 600 μL を 1.5 mL マクロチューブに入れ、20,000×g、5 分間、室温で遠心分離をして上清を除いた。

- ・沈殿に 600 μL の CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) buffer を加えた。

- ・10 μL の Lysozyme solution (10 mg/mL) を加え、55 °C で 30 分間インキュベートした。

- ・40 μL の Achromopeptidase solution (0.2 mg/mL) を加え、37 °C で 60 分間インキュベートした。

- ・50 μL の Protease K solution (1 mg/mL) を加え、55 °C で 30 分間インキュベートした。

- ・50 μL の 25 % SDS solution を加え、65 °C で 60 分間インキュベートした。

- ・750 μL の PCIA (Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol = 25:24:1) を加え、全量を 2 mL スクリューチューブ (直径 0.1 mm の菌体破砕用ガラスビーズをあらかじめ 1 g 入れておいた) に移した。

- ・6.0 m/s、30 秒間のビーズビーティングを 2

回行った。

・20,000×g、5分間、4 で遠心分離をし、上清 400 μL を新しい 1.5 μL マイクロチューブに移した。

・400 μL の CIAA(Chloroform : Isoamyl Alcohol = 24:1) を加え Voltex した。

・20,000×g、5分間、4 で遠心分離をし、上清 300 μL を新しい 1.5 μL マイクロチューブに移した。

・30 μL の 3 M 酢酸ナトリウム、180 μL のイソプロパノール、1.5 μL のグリコーゲンを加えて転倒混和し、-20 下に2時間静置した。

・20,000×g、10分間、4 で遠心分離をし、上清を取り除き、1 mL の 70 %エタノールを加えた。

・20,000×g、5分間、4 で遠心分離をし、上清を取り除き、沈殿を風乾した。

・沈殿を 50 μL の TE に溶解した。

(7) 細菌叢解析

得られた抽出サンプルを用いて次世代シーケンサー (Roche/454) による菌叢解析を行った。まず解析する抽出サンプルをプレートにして、Pyrosequencing 用のプライマーを用いて PCR 反応を行った。用いたプライマーは以下の通りである。

A-27F-MID

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG*****AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

B-519R

5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGGWATTACCGCGGCKGCTG-3'

27F を含む Forward プライマーは下線で示した A アダプターと*****で示した 10 塩基からなる MID (Multiplex Identifier: インデックスタグ) 配列が付いている。この MID 配列は解析するサンプルによって異なる配列を持つ。Reverse プライマーには 519R に下線部の B アダプターが付いている。A、B アダプターは Pyrosequencing のエマルジョン PCR を行うために必要な配列である。また、MID 配列はシーケンスを行う際に各サンプルを識別するための配列である。PCR 産物はフェノール・クロロホルム処理し、約 3.5 ng の各サンプル DNA を同一の 1.5 mL マイクロチューブに混合した。(株)北海道システム・サイエンスに解析を依頼し、得られたデータを MacQIIME ver.1.8.0 (<http://www.wernerlab.org/software/macqiime>) により解析した。

97 %以上の相同性をもつ配列を 1 つの OTU (operational taxonomic unit) としてクラスタリングし、RDP classifier を用いて菌種の帰属を行った。また、希薄化曲線の算出を行った。この希薄化曲線では Observed species (検出された全 OTU) の数と Chao1 による推定全細菌数がグラフとして得られる。

また、サンプルそれぞれの細菌叢の違いを

UniFrac 解析により評価も行った。得られた塩基配列をもとに系統樹を作成し、各サンプル間の細菌叢の違いを数値化し、Unifrac distance matrix を作成した。

(8) 細菌数の定量

定量 PCR(StepONE™ real-time PCR system, Applied Biosystems) を用いて 16S rRNA 遺伝子を定量することにより、抽出サンプル中の細菌数の推定を行った。定量 PCR の方法として SYBR® green 法を用いた。検量線を作成するため、DNA テンプレートとして *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC13699) の培養液からの DNA 抽出物を用いた。

(9) 冬眠環境下における蛹細菌叢の変化

冬眠環境下を再現するために、蛹飼育ケースに蛹を 25 匹入れ 4 条件下に放置した。4 下に放置する直前、4 日後、8 日後、24 日後、34 日後、48 日後と経時的に蛹を 3 個体ずつサンプリングした。また、48 日間 4 下に放置した蛹飼育ケースを、25 下の成虫飼育ケージに入れ羽化を待った(約7日間)。羽化から 2 日後、成虫 3 個体をサンプリングした。

4 . 研究成果

(1) ハエの同定

ハエ 5 個体 (Fly-1、Fly-2、Fly-3、Fly-4、Fly-5) それぞれにおいて CO と CO を PCR で増幅した結果、すべてのサンプルにおいて目的配列が増幅した。BLAST 検索の結果、全ての配列において *Sarcophaga similis* (和名：ナミニクバエ) と高い相同性 (全て 99 %) を示した。したがって本研究で用いているハエをナミニクバエであると判断した。

(2) 生育段階間、世代間の菌叢比較

すべて属 (genus) の分類で表し、いずれのサンプルにおいても 1.0 %未満の優占率であった菌種については Others に属するものとした。Read 数は 3 世代目の成虫が 85 と低く、その他については 500 以上の read 数が得られた。生育段階ならびに世代ごとに優占種となる細菌は大きく異なり、総じて Firmicutes 門 (グラム陽性菌) ならびに Proteobacteria 門 (グラム陰性菌) が細菌叢のほとんどを占めていた。人間などの哺乳類の腸内細菌叢に多く見られる Bacteroides 門で 1.0 %以上を占めた種は Myroides 属のみであった。3 世代目の蛆虫は、Vagococcus 属が 39.2 %、Kurithia 属が 38.3 %と優占率が高く、次に Proteus 属の 10.5 %という結果になった。3 世代目の蛹は Providencia 属が 54.2 %と過半数を占め、15.1 %を Proteus 属が占めた。3 世代目の成虫は Acinetobacter 属が 36.4 %、Lysobacter 属が 34.3 % を占め、次点で未帰属の Gammaproteobacteria 綱の細菌が 20.2 %であった。4 世代目の蛆虫において、3 世代目の成虫で 1 %以上存在していた菌種は Lysobacter 属のみであり、Proteus 属が過半数を占める結果になった。次に Vagococcus 属が

15.5 %、Lactococcus 属が 10.1 %であった。4 世代目の蛹では Acinetobacter 属が 34.4 %、Providencia 属が 33.6 %となった。4 世代目の成虫では Serratia 属が 63.8 %と大きい割合を占めた。UniFrac 解析の結果、生育段階ごとに特徴的な傾向は無く、世代ごとでも相関性は低いことがわかった。また定量 PCR の結果、両世代の蛆虫と蛹において 16S rRNA gene は 1 個体あたり 107~108 copies と一定だった。一方で 3 世代目の成虫においては 1 個体あたり 105 copies、4 世代目の成虫においては 1 個体あたり 106 copies となり、両世代において成虫では 1 個体あたりの細菌数が減少する結果となった。

(3) 細菌叢の解析

48 日間の 4 下保存は細菌叢に大きな影響を与えなかった。Providencia 属、Proteus 属、Vagococcus 属が優占種となり、定量 PCR の結果から 16S rRNA gene は約 10^7 copies / fly でほぼ一定であった。一方で、成虫の細菌叢は大きく異なると共に、16S rRNA gene は約 106 copies / fly と減少した。成虫においては read 数が 10 と非常に少ない結果となった。UniFrac 解析の結果からも蛹は保存期間が長くなっても、細菌叢の相同性が高い一方で、成虫の細菌叢との相同性は低かった。

生育段階ごと、世代ごとに大きく細菌叢が異なった原因としては、生育環境の違いが指摘できる。ハエは完全変態の昆虫あり、成長過程ごとに好む環境が異なる。蛆虫の段階では栄養が豊富な場所を好み、蛹では一切の摂食行動を行わない。また成虫では必要に応じて糖分やタンパク質、水分を補給する。このような生育環境の違いにより、たとえ細菌の垂直伝播が生じたとしても優占種が異なる結果になったと考えられる。

親ハエから子への腸内細菌垂直伝播に関する知見は未だに無いが、ショウジョウバエに関しては卵の中には細菌は存在せず、卵の表面には母親の糞便由来の細菌が存在しているという報告がある。ナミクバエは卵胎生であるため産仔のシステムが異なるが、母親由来の腸内細菌の垂直伝播が生じている可能性がある。また、本実験はハエのサンプリングをそれぞれ 3 個体のみしか行っており、個体差の影響が懸念されることから、サンプル数を増やすなど実験系の改善の余地がある。それぞれの生育段階において存在比は大きく異なったものの、特徴的に存在している菌種もあった。昆虫が特定の細菌を選択的に保持しているという報告が既になされており、例えばホソカメムシ (Riptortus clavatus) は Burkholderia 属の細菌を垂直伝播ではなく環境中から選択的に獲得し、腸内において共生系を構築している。本実験系の蛆虫と蛹においては、尿路感染症の原因菌も含む菌種であり、疫学的に問題視されている細菌種である Proteus 属が常在した。このことから、ナミクバエの蛆虫と蛹は選択的に Proteus 属を獲得し、お互いに何らかの利益を

もたらす相互関係を維持していると考えられる 4 世代目の成虫では Serratia 属が過半数を占めた。Serratia 属は日本国内においては 2000 年前後に院内感染として流行し、複数人の死者をもたらした病原菌を含む菌種である。このような疫学的に危険な菌体を成虫は保持する可能性があることが示唆された。

冬眠期間を再現した 48 日間の観察では顕著な細菌叢の変化は確認されなかった。この理由としては死菌の存在が影響していることが考えられる。蛹は外殻に包まれた閉鎖的な環境であり、また低温環境下にあることから他の細菌の大幅な増殖も抑制されている。このようなことから、死菌も計測してしまっていると考えられる。

48 日後、羽化した成虫において菌叢は大きく異なった。Read 数が少ないことによる影響は否定できないが、定量 PCR の結果からも菌体数が大きく減少し、細菌叢に変化があったことは明らかである。この原因として、蛹期間の変態に伴う腸内細菌の取捨選択が考えられる。つまり、成虫が蛹外殻内で形成されている際に、成虫腸管に取り込まれる細菌が限られるということである。イエバエの蛹の観察の結果、蛹外殻内の固体表面に多くの菌体が存在し、蛹の腸管中にはごくわずかしが菌体が存在しないという報告がある。このようなシステムによって、羽化後数日間の成虫腸管中細菌数は非常に少なく、蛹からの細菌の持越しが少なく細菌叢が大きく異なることが考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

T. Wei, K. Miyanaga, Y. Tanji. Persistence of antibiotic-resistant and -sensitive Proteus mirabilis strains in the digestive tract of the housefly (*Musca domestica*) and green bottle flies (*Calliphoridae*) Appl. Microbiol. Biotechnol., 98(19), 8357-8366 (2014)、査読有り、DOI 10.1007/s00253-014-5846-9

T. Wei, R. Ishida, K. Miyanaga, Y. Tanji. Seasonal variations in bacterial communities and antibiotic-resistant strains associated with green bottle flies (*Diptera: Calliphoridae*) Appl. Microbiol. Biotechnol., 98(9), 4197-4208(2014)、査読有り、DOI 10.1007/s00253-013-5498-1

[学会発表](計 2 件)

鈴木駿太, 宮永一彦, 丹治保典, ハエ腸管内抗生物質耐性菌の消長、第 17 回化学工学会学生発表会、2015 年 3 月 7 日、八戸高専 (青森県八戸市)

T. Wei, R. Ishida, K. Miyanaga, Y. Tanji,

Analysis of bacterial community and antibiotic resistant strains in the housefly (*Musca domestica*), ASA general meeting, May 18-21 2013, Denver Colorado USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.biochemeng.bio.titech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹治 保典 (Yasunori TANJI)

東京工業大学大学院 生命理工学研究科
生物プロセス専攻 教授

研究者番号：00282848

(2)研究分担者

宮永 一彦 (Kazuhiko MIYANAGA)

東京工業大学大学院 生命理工学研究科
生物プロセス専攻 助教

研究者番号：40323810

(3)連携研究者

なし