

平成 31 年 4 月 18 日現在

機関番号：30109

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19246

研究課題名(和文)薬剤耐性遺伝子のレゼルボアとしての難培養細菌の役割解明

研究課題名(英文)The role of unculturable bacteria as sources of antibiotic resistance genes

研究代表者

臼井 優 (Usui, Masaru)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：60639540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：培養可能菌の生育により、生育が阻害される難培養細菌を標的とし、貧栄養培地を用いて、さまざまな環境(河川、湖、温泉、家畜排水等)から細菌の分離を試みた。結果、103種類の難培養細菌が分離され、そのうち29種類が新規微生物を発見することができた。29種類の新規微生物について、貧栄養培地を基礎とした薬剤感受性試験を実施したところ、セファロsporinやテトラサイクリンに対して耐性を示す株が多数存在した。この結果は、環境中の難培養細菌が、広く使用されている抗生物質に耐性を示すことがあることを示す。これらの細菌が、薬剤耐性菌のレゼルボアになっている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、29種類の新規微生物が同定できた。また、これらの株のいくつかは多数の抗生物質に対して耐性を示した。これまでのところ、これらの株から薬剤耐性遺伝子は見つかっていないが、今後の解析により、薬剤耐性遺伝子が見つかる可能性は高い。これらの結果により、環境中の難培養細菌が薬剤耐性遺伝子のレゼルボアとなっている可能性が示される。本研究は、環境中の実態を解明につながり、今後の薬剤耐性問題に対する対策につなげることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To isolate unculturable bacteria, we used the starved nutrient agar. Several environmental samples were applied to isolate unculturable bacteria. In results, 103 types of unculturable bacteria were isolated. Twenty-nine of the isolates were novel species. Some of these 29 strains were resistant to cephalosporins and tetracyclines. These result suggest that these unculturable bacteria were reservoir of antibiotic resistance.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：難培養細菌 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の出現及び拡散は国際的な公衆衛生上の問題となっており、2016年のG7伊勢志摩サミットでは、各国が協調してこの問題に取り込むことについて同意している。これを受けて、日本においても、one healthのコンセプトに基づいて、ヒト-動物-環境の間で拡散する耐性菌・耐性遺伝子の包括的な実態解明が早急に必要とされている。ヒトや動物の薬剤耐性菌・耐性遺伝子の実態把握には、これまで実験室内での培養が容易である指標細菌(大腸菌等)や病原細菌を用いた薬剤耐性割合について、国の機関を中心にモニタリングが実施されてきた。このような国内外の動きに先駆けて、我々は環境を対象として、環境中の指標細菌の耐性割合に加え、薬剤耐性遺伝子の定量による環境における耐性遺伝子の拡散についての実態把握を行ってきた。しかし、我々の調査において、環境中から指標細菌や病原細菌の耐性菌の分離を試みたところ、ヒトや動物で見つかる耐性遺伝子と同一の耐性遺伝子は高率かつ高濃度に見つかるものの、同一の耐性菌はほとんど見つけることができなかった。以上の結果より、環境中ではヒトや動物から分離される細菌とは異なる細菌が耐性遺伝子を保有しており、その細菌が環境中において耐性遺伝子のレゼルポアとして働いていることが示唆された。これまで指標として用いられてきた、培養可能菌は細菌全体の1%程度であることが知られており、環境中には培養することができない細菌(難培養細菌、培養不可能細菌)が多数(99%)存在している。そのため、耐性遺伝子の環境における真のレゼルポアは不明である。また、これまでに世界中で拡散している、耐性遺伝子の中には、起源が不明なものも多く、起源は環境中の難培養細菌である可能性が高い。

2. 研究の目的

近年、これまで培養することができなかった細菌を培養する技術としてiChipという画期的な方法が報告された。この技術は、in situにおいて環境そのものを培地として利用することで、難培養細菌の生育を可能にする。今回、環境中における耐性遺伝子のレゼルポアを明らかにすることを目的として、iChipや貧栄養培地を用いて、水圏、土壌、堆肥といった環境を対象として難培養細菌を分離し、難培養細菌が保有する耐性遺伝子を明らかにすることを計画し、実行した。今回の研究により、環境における耐性遺伝子のレゼルポアを明らかにすることで、耐性遺伝子の拡散防止、制御に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

環境サンプル(河川、湖、温泉、畜産排水等の10サンプル)について、iChipおよび貧栄養培地を用いて難培養細菌の分離を行った。貧栄養培地の分離の際には、10度、20度のインキュベーターで10日以上培養を行った。コロニーが認められた場合には、富栄養培地も合わせて、継代を行った。この際、富栄養培地で生育が認められたコロニーは解析対象から除外した。その後、対象となる菌株について、16SrRNAの配列解析を行い、既知の微生物のデータベースの配列と比較した。この際に相同性が97%以下であった場合、新規微生物とみなした。その後、分離された新規微生物について、薬剤感受性試験を実施した。その中で、複数の株に薬剤耐性を示した株についてDNA抽出を行い、次世代シーケンサーMinionによる全ゲノム解析を実施した。得られたデータについて、薬剤耐性遺伝子の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

iChipによる難培養細菌の分離は、既報の通り行ったが、難培養細菌を分離することはできな

かった。一方、貧栄養培地を用いた難培養細菌の分離については、236 株の難培養細菌が分離され、16SrRNA の解析により、そのうち 29 種類が新規微生物であった。場所による偏りは認められなかった。これら新規微生物の薬剤感受性については、いくつかの株が多剤耐性を示した。このことは、これら新規微生物が環境中の薬剤耐性遺伝子のレゼルポアとなっていることを示す。また、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析について、全ゲノム解析ができた株については、これまでのところ既知の薬剤耐性遺伝子を見つけることができていない。このことは、これら新規微生物は、現在使用されている抗生物質に対して、自然耐性を示す、または未知の耐性遺伝子を保有していることを示唆した。また、新規微生物のいくつかは次世代シーケンサーによる解析に十分な量の DNA を得ることができなかった。今後、これら新規微生物のゲノムについて、DNA 抽出法の改善による再解析およびさらなる配列解析を実施していく必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。