

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850096

研究課題名(和文)電子スピン共鳴装置を利用した細菌の抗生物質耐性の解析

研究課題名(英文) Analysis of antibiotic resistance of bacteria by using electron spin resonance (ESR)

研究代表者

根井 大介 (Nei, Daisuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・その他部局等・主任研究員

研究者番号：70466001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細菌に抗生物質が作用した時のフリーラジカル挙動を明らかにするため、ESRの測定条件を検討した。スピントラッピング剤は大腸菌に対して殺菌的な効果は示さなかった。菌懸濁液にメナジオンおよびCYPMPOを加え、中心磁場3,524G、測定磁場範囲200G、マイクロ波強度6mWで測定した条件では最も高感度でESRスペクトルが得られた。抗生物質で処理した場合、薬剤耐性の有無はESRスペクトルのピーク強度に影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、信号が微弱であることから更なる検証が求められる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, an optimized condition of an electron spin resonance (ESR) measurement was examined in order to obtain the behavior of free radicals in bacteria after the bactericidal and/or bacteriostatic effects of antibiotics. The antibiotics used in the study did not affect the population of Escherichia coli, and any bactericidal effect was not observed. The ESR spectrum from bacterial suspension including CYPMPO as a spin-trapping reagent and menadione was obtained after the ESR measurements at the following condition: microwave power at 6 mW, center field at 3,524 G, sweep width at 200 G. The results suggested that the peak intensity was affected by antibiotics resistance, however, the signal intensities from bacterial suspensions were weak and further examination will be needed.

研究分野：食品微生物学

キーワード：ESR スピントラッピング 細菌 抗生物質

1. 研究開始当初の背景

抗生物質には数多くの種類が存在し、感染症の治療に有効なツールである。しかしながら、抗生物質の濫用を一因として、これらの薬剤に耐性を示す細菌が多く出現し、時として感染症の治療を困難にしている。2011年度にドイツを中心に猛威をふるった大腸菌 O104:H4 により 50 名近くの人命が失われているが、この細菌は幅広い抗生物質に耐性をもつ多剤耐性菌であることが知られている。抗生物質耐性菌は人類にとって現実的な脅威となりつつあり、科学的知見の早急な集積が様々な角度から必要である。抗生物質耐性に関する研究は遺伝子レベルで盛んに行われているが、メタボロームの一部として細菌体内のフリーラジカルの視点から抗生物質の作用および耐性について研究を行った例は非常に少ない。

抗生物質の種類によって細菌に対する作用機序は異なり、主なところでは、細胞壁合成阻害、タンパク質合成阻害、核酸合成阻害である。近年、このような作用とは別に、抗生物質の作用により細菌体内でフェントン反応を経由してヒドロキシルラジカルが生成されることが論じた研究論文が発表されており、その著者らはこのフリーラジカルは細菌の死滅に関与していると結論付けられている。しかしながら、抗生物質に耐性を持った細菌内でのフリーラジカル挙動等は不明であり、更なる検証が求められる。

本研究課題では、このような未知の疑問点を解明するにあたり、ESR を応用することを着目した。ESR はフリーラジカルの分析に有効であり、物質ごとに固有のスペクトル情報が得られ、汎用性と精密性を併せ持つ。フリーラジカル生成を一斉に捉える上で強力なツールである。

2. 研究の目的

フリーラジカルは短寿命であり分析は基本的に難しく、フリーラジカルを直接的に測定できる唯一の方法であるスピントラッピング法に着目した。この手法は、フリーラジカルをスピントラッピング剤により安定なラジカルを生じさせるものである。このような ESR-スピントラッピング法を利用すれば、抗生物質作用時のフリーラジカル生成を精度よく分析することが可能となると考えた。さらに、フリーラジカルを指標として、抗生物質耐性の有無を迅速に判定できる技術へ将来的に応用するための基礎知見の収集を試みた。

3. 研究の方法

(1) 細菌を対象とした ESR 測定条件の検討

ESR-スピントラッピング法を細菌体内のフリーラジカル解析に適用した例はなく、分析条件也未確立である。したがって、菌体内のフリーラジカルを捉えるのに最適な条件を明らかにすることを第一に行った。具体的

には、ESR の測定条件 (ESR 機器の磁場範囲、マイクロ波強度、磁場変調の測定パラメーター) について、細菌懸濁液を測定するのに最適な条件の探索を行った。また、スピントラッピング剤には多様な種類があるが、表 1 の候補の中から細菌の分析に適した試薬を検討した。これらの試薬がもつ性質 (フリーラジカルのアダクト能力等) は概ね既知であるが、試薬そのものが細菌にどのような影響を与えるかは未知であり、細菌の生存状態に関して調査するため、大腸菌の生菌数に及ぼす影響を調べた。また、懸濁液中の菌数がスペクトル強度に及ぼす影響についても検討した。

表 1 供試したスピントラッピング剤

スピントラッピング剤
5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)
N-tert-Buthyl- α -phenylnitron (PBN)
5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO)

(2) 抗生物質耐性の有無と ESR スペクトルの関係

本研究では作用機序が異なる抗生物質として、カナマイシン (細胞壁合成阻害)、アンピシリン (タンパク合成阻害) の 2 種類の抗生物質を使用した。対象とする細菌にはグラム陰性菌として大腸菌、グラム陽性菌として黄色ブドウ球菌を使用した。大腸菌と黄色ブドウ球菌のそれぞれについて、カナマイシンおよびアンピシリンに耐性をもった突然変異株を作成した。これらの細菌の懸濁液に適量の抗生物質を滴下し、スピントラッピング剤を加えたのち、これをサンプルとして ESR で解析することによりスペクトル情報を得た。このような耐性菌に抗生物質を作用させた場合のフリーラジカル挙動を検証した。また、抗生物質に感受性をもつ菌株についても同様の解析を行い、抗生物質に対する感受性の有無とフリーラジカル挙動の関連について比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) スピントラッピング剤が細菌の生存性に及ぼす影響

ESR-スピントラッピング法を細菌体内のフリーラジカル解析に適用した例は少なく、分析条件も確立されていない。そのため、菌体内のフリーラジカルを捉えるのに適した測定条件を検討した。大腸菌を TSB 培地で培養した後、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、生菌数を 4 log CFU/mL に調整し、これにスピントラッピング剤として、5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO)、5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)、N-tert-Buthyl- α -phenylnitron (PBN) を加え、2 時間静置した。その後、検出培地として TSB 培地を使用し、平板希釈法により大腸菌の生菌数を測定することにより、スピントラッピング剤が大腸菌の生存性に及ぼす影響を調べ

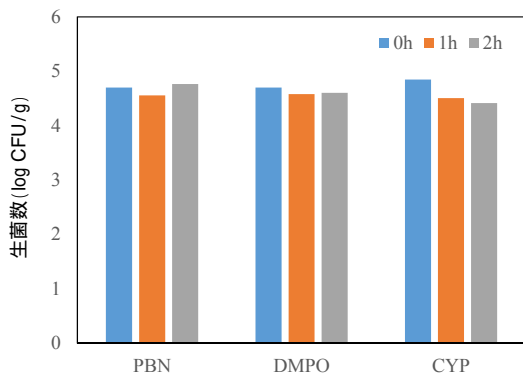


図1 スピントラッピング剤が大腸菌の生菌数におよぼす影響

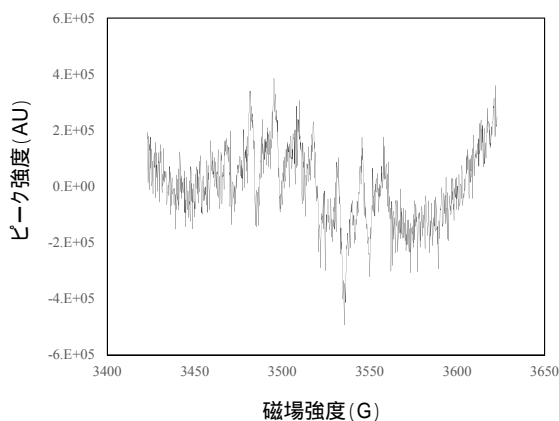


図2 大腸菌懸濁液のESRスペクトル

た。その結果、供試したいずれのスピントラッピング剤も大腸菌に対して死滅的な効果は示さず、生菌数に有意な変化は認められなかった(図1)。

(2) 菌懸濁液のESRスペクトル測定

生菌数を調整した大腸菌の菌懸濁液にスピントラッピング剤としてCYPMPOを濃度10mMとなるように加えて、経時的にESRスペクトルを観測した。ESR分光器にはEMX-plus(ブルカーバイオスピン)を使用した。種々の測定条件を検討した結果、中心磁場3,524G、測定磁場範囲200G、マイクロ波強度6mWで測定することに決定し、10回の測定を積算したものをESRスペクトルとして評価した。この条件がスペクトルを得るのに最も適していた。ESRスペクトルを測定した結果、大腸菌の懸濁液からは酸素系のラジカルに由来するピークが観測されたものの、得られるESRスペクトルの強度は非常に小さいことが判明した(図2)。また、大腸菌の菌数を3log CFU/mLおよび8log CFU/mLに2段階の濃度に調整してESRスペクトルを観測した結果、懸濁液中の菌数はESRスペクトルの濃度にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(3) 抗生物質耐性とESRスペクトルの関係

大腸菌および黄色ブドウ球菌に関して、カナマイシンおよびアンピシリンに耐性を持った突然変異株を分離した。作成した抗生物

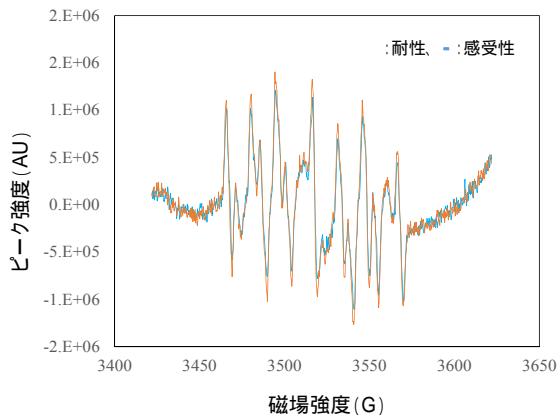


図3 大腸菌におけるアンピシリン耐性の有無とESRスペクトルの関係

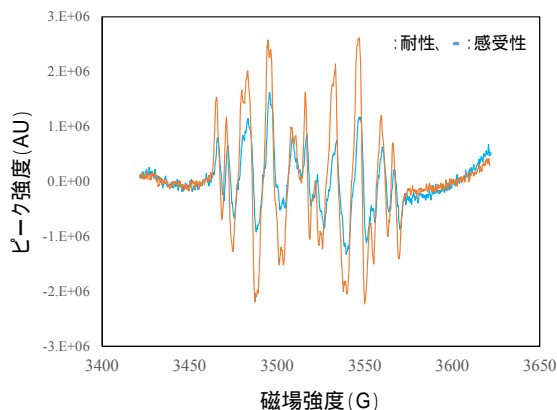


図4 黄色ブドウ球菌におけるアンピシリン耐性の有無とESRスペクトルの関係

質耐性株をTSA培地により37℃で24時間培養した後、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁し4log CFU/mLに調整した。この懸濁液にアンピシリンおよびカナマイシンを添加し、37℃で2時間静置した。その後、触媒として適量のメナジオンおよびスピントラッピング剤としてCYPMPOを20mMの濃度になるように加えて10分間反応させた。また、アンピシリンおよびカナマイシンに感受性の大腸菌および黄色ブドウ球菌の菌株についても同様の処理を行った。これらの菌懸濁液を対象として、ESRスペクトルを測定した。測定条件は上述と同様である。ESRスペクトルを測定した結果、大腸菌および黄色ブドウ球菌のいずれについても、酸素系のフリーラジカルに由来するピークが観測された。また、ピーク強度は抗生物質耐性に影響を受ける可能性が示唆され、抗生物質耐性の有無によりピーク強度に差が生じる傾向がうかがえた(図3、図4)。したがって、菌懸濁液に触媒としてメナジオンを添加し、ESR-スピントラッピング法を適用し、得られたスペクトルのピーク強度を比較することにより細菌の抗生物質耐性の有無を迅速に判別できる可能性がある。しかしながら、細菌由来のピークは非常に微小であったため、ノイズが混入している可能性を完全に排除することができないため、判別方法の確立に関しては更なる精査

が必要である。

(4) まとめ

細菌由来のフリーラジカルを観測するための ESR の測定条件を検討した。供試したスピントラッピング剤は大腸菌に対して殺菌的な効果は示さなかった。菌懸濁液にメナジオンおよび CYPMP0 を加え、中心磁場 3,524G、測定磁場範囲 200G、マイクロ波強度 6mW で測定することにより、ESR スペクトルが得られた。抗生物質で処理した場合、薬剤耐性の有無は ESR スペクトルのピーク強度に影響を及ぼす可能性があるが、信号が微弱であることから更なる検証が求められる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6．研究組織

(1)研究代表者

根井 大介 (NEI, Daisuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・食品加工流通研究領域・主任研究員

研究者番号：70466001