

リアルタイム PCR 法を用いた河川水中からの薬剤耐性遺伝子の検出

Detection of environmental antibiotic-resistant genes by real-time PCR

成川 雄翔

指導教員 浦瀬 太郎, 後藤 早希

東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 水環境工学研究室

キーワード：リアルタイム PCR, 薬剤耐性菌, 大腸菌

1. 緒言

現在、環境基準項目の大腸菌(健康関連微生物指標として大腸菌群より 2022 年度に移行)のモニタリング方法として寒天培地などを用いた培養法が採用されている。新型コロナウイルス感染症の下水疫学調査の経験から、より迅速かつ感染性のない測定方法として、遺伝子による環境モニタリング方法の有用性が認められてきた。

環境モニタリングでは、大腸菌の有無ではなく、定量性が大切であり、PCR 反応の途中で増幅産物の有無を確認できるリアルタイム PCR 法により、定量モニタリングが可能になることが期待される。また、最近、抗生物質の利かない大腸菌の存在が問題となっており、環境中の抗生物質耐性大腸菌を簡便に定量モニタリングする方法の確立が求められている。

本研究では、合流式下水道の吐き口となっている河川水を対象に、大腸菌数、大腸菌群数の指標となる遺伝子(*ybbW*, *rpIP*)、日本で多く確認されている基質拡張型 β ラクタマーゼ遺伝子 (CTX-M-1, CTX-M9) のリアルタイム PCR 法による定量を試み、釣菌株でのこれらの遺伝子の有無および、環境水からのこれらの遺伝子の検出を試みた。

2. 方法

2. 1. 試料水の採水

試料水は鶴見川の河川水から 2023 年 9 月 25 日に採水した。採水には、オートクレーブ滅菌(以下

121°C、15 分)をしたねじ口瓶を使用した。

2. 2. プレートによる計数法

滅菌済みのメンブレンフィルター(孔径 0.45 μ m)をろ過器にセットし、試料水(1~10 mL)を吸引ろ過し、試料水中の大腸菌を集菌した。その後、メンブレンフィルターごと大腸菌培養用培地 (CHROMagar ECC) で 37°C、24 時間培養し、青および赤に着色したコロニー数を計数した。

2. 3. DNA 抽出、精製

滅菌済みステリベクスフィルター(孔径 0.22 μ m)と滅菌済みシリンジを用いて試料水 600 mL を加圧ろ過し、試料水中の細胞性 DNA をフィルターで捕捉した。その後、環境 DNA 測定マニュアル(環境 DNA 学会, 2020)にしたがい、溶出液をステリベクスフィルターに充填し、56°C、20 分加温後、DNA を 2 mL チューブに回収した。DNeasy Blood and Tissue kit により回収 DNA をカラム精製した。

2. 4. リアルタイム PCR による分析

鋳型 DNA、PCR 反応酵素(THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, 東洋紡)、プライマーを混合し、リアルタイム PCR 装置(Takara Thermal Cycler Dice)を用いて増幅曲線、解離曲線を測定した。大腸菌、大腸菌群、セフトキシム耐性遺伝子の検出に用いたプライマーを表 1 に示す。また、各遺伝子測定のリアルタイム PCR の反応条件を表 2 に示す。

表 1 遺伝子検出に用いたプライマー

対象	標的遺伝子	プライマー名	配列 (5'-3')	文献
大腸菌 指標遺伝子	<i>ybbW</i>	<i>ybbW</i> 401F	TGATTGGCAAATCTGGCCG	1)
		<i>ybbW</i> 611R	GAAATCGCCCAAATCGCCAT	
腸内細菌目 指標遺伝子	<i>rpIP</i>	<i>rpIP</i> 1F	ATGTTACAACCAAAGCGTACA	2)
		<i>rpIP</i> 185R	TTACCYTGACGCTTAAGTGC	
基質拡張型 βラクタマーゼ 遺伝子	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M-1-F	GCGATGTGCAAGCACCAGTAA	3)
		CTX-M-1-R	TGAGAAATCAGCTTATTCAT	
	CTX-M-9-F	CCAATGTGCAGTACCAGTAA		
	CTX-M-9-R	TGGCAATCAATTTGTTTCAT		

表 2 リアルタイム PCR の反応条件

プライマー	反応条件
<i>ybbW</i> 401F	初期変性95°C-1分 (95°C-15秒, 65°C-20秒, 72°C-30秒) × 45サイクル
<i>ybbW</i> 611R	
<i>rpIP</i> 1F	初期変性95°C-1分 (95°C-15秒, 60°C-15秒, 72°C-30秒) × 45サイクル
<i>rpIP</i> 185R	
CTX-M-1-F	初期変性95°C-1分 (95°C-10秒, 55°C-20秒, 72°C-20秒) × 45サイクル
CTX-M-1-R	
CTX-M-9-F	初期変性95°C-1分 (95°C-10秒, 55°C-20秒, 72°C-20秒) × 45サイクル
CTX-M-9-R	

3. 結果

3. 1. 大腸菌、大腸菌群数の計数結果

培養法による計数結果は大腸菌数 4.1 CFU/mL、大腸菌群数 39.5 CFU/mL となり、セフトキシムを 1 μg/mL 含有する培地で計測した CTX 耐性菌数は 0.89 CFU/mL であった。使用した試料水には、測定対象となる大腸菌や耐性大腸菌が存在した。

3. 2. 単離株における各遺伝子の存在量

単離株における *ybbW* の Ct 値と *rpIP* の Ct 値の関係を図 1 に示す。*ybbW* 遺伝子と *rpIP* 遺伝子は共にゲノム DNA 上に存在するため、Ct 値は同じ値になり、1:1 直線状に結果が集まると予想されたが、一部 *ybbW*、*rpIP* のいずれかの Ct 値が検出できない株があった。

3. 3. 環境水中からの各遺伝子の検出

環境水中からの各遺伝子の検出結果を図 2 に示す。CTX-M-9 以外のプライマーでは、ブランク試験での当該遺伝子の検出がなかった。一方、150 mL の試料から抽出をした場合、全てのプライマーで Ct 値が出ていることから、環境水中の当該遺伝子の検出ができたと言える。また、*ybbW*、*rpIP*、CTX-M-1 において、試料水量が増えるにつれて Ct 値が小さくなったことから、大小関係は正しく検出で

きたが、試料量と Ct の関係から求めた増幅効率は、低いものとなった。PCR 反応を妨害する環境中の成分があった、または、高容量試料からの DNA 抽出効率が低下したことが考えられた。

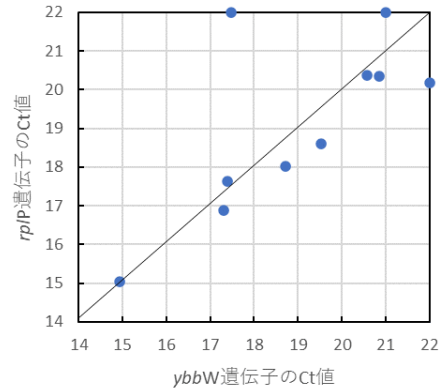


図 1 *ybbW* 遺伝子と *rpIP* 遺伝子の関係

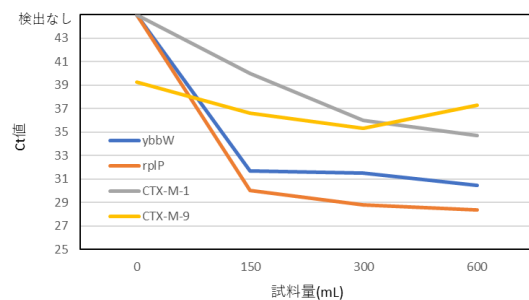


図 2 環境水中からの各遺伝子検出結果

4. 結論と今後の展望

リアルタイム PCR 法によって環境水中から、大腸菌数、大腸菌群数の指標となる遺伝子 (*ybbW*, *rpIP*)、基質拡張型 βラクタマーゼ遺伝子 (CTX-M-1, CTX-M-9) の検出に成功した。単離株の PCR において、大腸菌が持つはずの *ybbW*, *rpIP* 遺伝子が検出できない株があることがわかった。

5. 参考文献

- 1) David I. Walker *et al.* *Water Research* 126 101-110 (2017)
- 2) Hajime Takahashi *et al.* *International Journal of Food Microbiology* 246 92-97 (2017)
- 3) Thierry Naas *et al.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 1, 223-230 (2007)