

高感度 FISH 法と蛍光活性化セルソーティングを併用した 薬剤耐性菌の網羅的な検出技術の開発

新潟薬科大学 正会員 ○ 井口晃徳 山本凌太
堀紗織里 重松亨

1. はじめに

近年、途上国などでのヒトに対する抗生物質の過剰な使用、また畜産業では抗生物質の使用量に対する規制がないことから、自然環境中には抗生物質が広く拡散し、それにより抗生物質耐性遺伝子を保有する薬剤耐性菌が蔓延している。環境中の薬剤耐性菌の挙動を明らかにするため、これまで様々な方法で薬剤耐性菌の検出が行われてきたが、最も基礎的な方法としては、抗生物質を添加した寒天培地で培養することで薬剤耐性菌のみを選択的に増殖させ、検出を行う方法である。一方自然環境中の 99%の微生物は既存の培地や培養方法で培養することが極めて困難であることが知られており、従来法ではプラスミド DNA 等を介して薬剤耐性遺伝子を伝播する培養困難菌や未培養微生物の存在はほぼ無視されており、その動態は不明である。そこで本研究では、培養非依存的に環境中に生息する薬剤耐性遺伝子を有する微生物を網羅的に明らかにする方法として、高感度 FISH 法である CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *in situ* Hybridization) 法と蛍光活性化セルソーティング FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) を組み合わせた、薬剤耐性菌の検出技術の開発を行うこととした。本発表では、上記のコンセプトを実証するためのモデル実験として、大腸菌 *Escherichia coli* 細胞を用いて本実験の実現可能性の検証を行った。

2. 材料と方法

1) 使用菌株と培養方法

実験には抗生物質 Ampicillin の耐性遺伝子 (AmpR) と古細菌 (*Methanosarcina*) の 16S rRNA 遺伝子配列が挿入されているプラスミド DNA (pCR2-1TOPO) を保有する *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher, USA) と、プラスミド DNA を保有しない *E. coli* K12 株を用いた。LB 液体培地を用い、37°C, 110 rpm で 6 時間の本培養を行い、細菌細胞を回収した。

2) CARD-FISH 法と FACS

CARD-FISH 法には、HRP 標識オリゴヌクレオチドプローブは、真正細菌の 16S rRNA に特異的な EUB338-HRP、古細菌に特異的な ARC915-HRP、Ampicillin 耐性遺伝子 (AmpR) に特異的な AmpR506new-HRP を使用した。CARD-FISH 法におけるチラミドシグナル増幅は TSA Fluorescence Systems (Perkin Elmer, USA) を使用した。FACS による蛍光細胞の回収には、SH800S Cell Sorter (SONY, JAPAN) を使用した。次世代シーケンス解析は既往の方法 (井口ら, 土木学会論文集 G (環境), 2019) に準拠して行った。

3. 結果と考察

1) CARD-FISH 法によるプラスミド DNA を標的とした *E. coli* 細胞の検出

AmpR 遺伝子と古細菌由来の 16S rRNA 遺伝子が挿入されたプラスミド DNA を保有する *E. coli* 細胞に対して、AmpR506new-HRP および ARC915-HRP プローブによる CARD-FISH 法の適用を行った。結果、ホルムアミド濃度とプローブ剥離条件を最適化することにより、*E. coli* のプラスミド DNA を特異的に蛍光検出することが可能であった(図 1)。

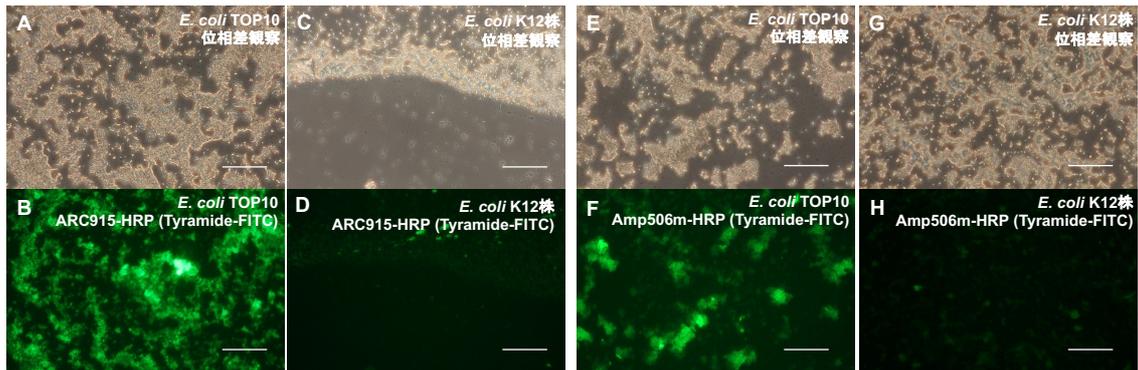


図 1. 液中 CARD-FISH 法の適用結果. A と B, C と D, E と F, G と H は同一視野での観察. Bar=50 μ m, 蛍光観察は露光時間を統一して撮影

2) CARD-FISH 法で蛍光検出した *E. coli* 細胞の FACS による回収の最適化

E. coli TOP10 および *E. coli* K12 株菌体をそれぞれ単独で CARD-FISH 法を適用し、FACS における蛍光細胞の検出・回収条件の最適化を行った。結果、プラスミド DNA を保有する *E. coli* TOP10 菌体から特異的回収に必要な蛍光シグナルを検出する条件を見出すことができた (図 2)。

4. まとめと今後の予定

薬剤耐性遺伝子を保有する *E. coli* に対し本実験を適用した結果、プラスミド DNA にコードされる薬剤耐性遺伝子の特異的検出および標的細胞回収のための実験条件の最適化を行うことができた。今後は実際の環境サンプルに対して本手法を適用し、実環境中の薬剤耐性遺伝子を網羅的に解析する。

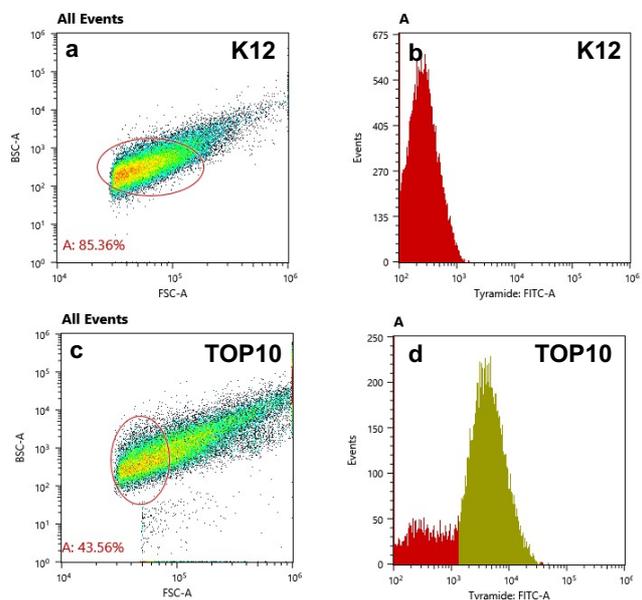


図 2. CARD-FISH 法 (ARC915-HRP) を適用した *E. coli* 細胞の FACS による検出結果. a と b (K12 株) および c と d (TOP10) は同一のサンプルを使用, a と b は前方散乱光 (FSC-A) と後方散乱光 (BSC-A) の関係, c と d は蛍光強度と検出イベント (細胞数) を示している。