

ガスプラズマによる薬剤耐性菌と CAT 蛋白質の不活化

Inactivation of drug-resistant bacteria and CAT by plasma

岡山理科大学¹, 佐賀大学² ◦作道 章一¹, 三沢 達也²

Okayama Univ. Sci.¹, Saga Univ.², ◦Akikazu Sakudo¹, Tatsuya Misawa²

E-mail: akikazusakudo@gmail.com

近年、細菌の薬剤耐性化が世界的問題となっている。薬剤耐性化により、細菌は抗生物質に対する抵抗性を獲得する。このため、薬剤に頼らない形での殺菌技術が必要とされている。最近、私たちは物理的殺菌技術として近年注目されているプラズマを用いて、薬剤耐性菌と非耐性菌のプラズマ感受性が同等であることを明らかにした（作道章一他, 2018年 第79回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋）。一方、プラズマによる殺菌メカニズムには未だ不明な部分が多い。そこで、本研究ではプラズマによる殺菌メカニズムの一端を明らかにする目的で、プラズマ処理によりもたらされる菌の蛋白質の生化学変化を調べた。

大腸菌 DH5 α にアンピシリン耐性遺伝子と Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子を持つプラスミドである

pPRO-EX-HT-CAT をトランスフォーメーションし、アンピシリン含有 LB 寒天培地で一晚セレクション後、コロニーをピックアップした。そのコロニーを LB 液体培地に懸濁し、アンピシリン含有 LB 液体培地および非含有 LB 液体培地中で 24 時間培養した。それらから回収した大腸菌に対して大気圧プラズマトーチを用いた処理(1 min)を行った。その結果、プラズマ処理によりいずれの大腸菌も生菌数が低下した。一方、アンピシリン含有培養と非含有培養の間で有意な生菌数の違いは見ら

れなかった。さらに、ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) を用いて、CAT を定量した結果、プラズマ処理によりいずれの大腸菌でも CAT 量が減少し、pPRO-EX-HT-CAT をトランスフォーメーション・セレクションした DH5 α をアンピシリン非含有 LB 液体培地で培養したものはガスプラズマ処理前(0min)の CAT 量は 0.3961 ± 0.0182 ng/ml (0min) であったのに対し、1min のプラズマ処理により 0.0344 ± 0.0004 ng/ml へと、有意に CAT 量が減少した。また、pPRO-EX-HT-CAT をトランスフォーメーション・セレクションした大腸菌をアンピシリン含有 LB 液体培地で培養したものについても 3147.7302 ± 224.9762 ng/ml (0min) と 0.0325 ± 0.0001 ng/ml (1min) であり、いずれの時間においても 0min と比較して有意な CAT の減少が観察された。さらに、CAT アッセイでもプラズマ処理によりいずれの大腸菌の CAT 活性も低下することが分かった。

本研究により、プラズマ処理に伴い、経時的に CAT 量が減少し、活性が低下することが明らかとなった。薬剤耐性菌と非耐性菌が同様なプラズマ感受性を示したのは双方の菌体蛋白質に同様に作用したためと考えられる。しかし、蛋白質以外にもどのような菌体構成成分に変化を誘導するのかについて解析することがプラズマ殺菌の分子機構の明確化に不可欠である。