

Rapid identification and strain discrimination of pathogenic microorganisms based on polymorphisms in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer regions

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/17594">http://hdl.handle.net/2297/17594</a>

## 【研究紹介】

## スパーサー領域の多様性を利用した病原微生物の迅速同定と菌株の識別

## Rapid identification and strain discrimination of pathogenic microorganisms based on polymorphisms in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer regions

金沢大学医薬保健研究域保健学系病態検査学

藤田 信 一

## はじめに

私は医学部を卒業後旧第三内科に入局した。当時は眼部第一教授の指導の下に骨髄移植の準備が進められていた。移植に伴う感染症に対処するために微生物を扱うスタッフが必要ということで、感染症グループに配属され臨床微生物学と感染症学の基礎を教わった。1978年に金沢大学附属病院検査部に移ったが、当時は迅速な原因菌の分離と同定が求められていて、耐性菌が問題になることはなかった。しかし、国外では1961年にmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、1967年にペニシリン耐性肺炎球菌、1983年にextended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) 産生肺炎桿菌、1986年にバンコマイシン耐性腸球菌、さらに1988年にメタロ  $\beta$ -lactamase産生緑膿菌が出現している。米国では2002年にバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症も報告された。以上の耐性菌による感染症は大部分が感染症法の5類感染症に指定されている。しかも、これらの耐性菌が分離されることが希でなくなったため、菌種同定と薬剤感受性試験の迅速な対応が求められている。

約10年前からPCRとマイクロチップ電気泳動による病原微生物の迅速同定に関する研究を開始した。原核生物の16S, 23S, 5Sに挟まれた領域はrRNA遺伝子とともにribosomal RNA (*rrn*) オペロンを構成し、コピー数や塩基配列が異なる。*S. aureus* では9種類の*rrn* オペロンの塩基配列が明らかにされており、このうちの2種類には16S-23Sスパーサー領域にtRNA<sup>lys</sup>とtRNA<sup>arg</sup>、3種類にはtRNA<sup>lys</sup>遺伝子が存在する<sup>2)</sup>。このinternal transcribed spacer領域 (ITS領域、スパーサー領域) の多様性を利用して菌種同定や菌株の識別を行う試みが1990年頃から報告されるようになった。Jensenら<sup>3)</sup>はスパーサー領域をPCR法にて増幅し、そのPCR産物のゲル電気泳動パターンから菌種同定がある程度可能であることを報告している。私たちは約5bpの高い識別能を備えたマイクロチップ電気泳動装置による泳動パターン解析が、ブドウ球菌の菌種同定および*S. aureus*の菌株識別に有用であることを報告した<sup>4)</sup>。現在、すでに構築した菌種同定用データベースの精度向上に努めながら、陽性血液培養ボトル、血管内カテーテルなどへの臨床応用を試みている。

## 1. 菌種同定用データベースの構築

金沢大学病院検査部で分離された臨床分離株と菌株保存施設から分与された菌株を対象に、細菌では16S rDNAと23S rDNA、真菌では18S rDNAと28S rDNAに挟まれたITS領域<sup>5)</sup>をPCR法にて増幅し (ITS-PCR)、その増幅産物の泳動パターンをデータベースソフトのファイルメーカープロを利用してデータベースを構築した。これまで細菌と真菌の157菌種の1,466株について1,352パターンを登録し、臨床材料から分離されるほぼすべての菌種をカバーしている。菌種同定 (一部の菌では属レベル) までの時間は寒天培地上の分離菌で約1時間であり、世界で最

も迅速な同定法である。さらに、1菌種同定に要する費用は約450円、2菌種の場合は1菌種あたり約280円となり、簡易同定キットの約50-75%の費用ですむ。

## 2. MRSAのITS-PCRパターン (ITSP) と毒素産生性

金沢大学附属病院において1980年から2008年までに各種の臨床材料から分離されたMRSA554株とMSSA283株を対象にITSP, staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec*タイプ、毒素産生性を調べた。毒素産生性は、被検菌をbrain heart infusion brothに接種後、35℃で42~48時間培養した上清液を対象にラテックス凝集法 (デンカ生研) により、enterotoxin A, B, C, D (SEA, SEB, SEC, SED), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), exfoliative toxin A, B (ETA, ETB)を検出した。ITSPはMRSAで31種類存在し、菌株の識別にも有用であることが明らかになった。このうちタイプ22が全体の約55%、ついでタイプ19が約13%、タイプ14が約7%を占めていた。

1980年代に分離されたMRSAはITSP22 (10株, SCC*mec* II a)のSECとTSST-1産生株と、ITSP34 (14株, SCC*mec* IV a)のSEA産生株の2種類のみであったが、1990年代には新たにSCC*mec*タイプのI, II b, IV b, 2000年代にはタイプVのSCC*mec*が加わった。市中獲得型MRSAとして注目されているSCC*mec*タイプIVのMRSAは1980年代初めにすでに出現していたが、このタイプのMRSAは今日では分離されなくなった。その後SCC*mec*タイプIV bのMRSAが1990年代中頃に出現してSEB, ETAなどの毒素産生遺伝子を獲得していったと思われる (図1)。なお、Panton-Valentine Leukocidin (PVL) 遺伝子陽性MRSA株はこれまで分離されていない。

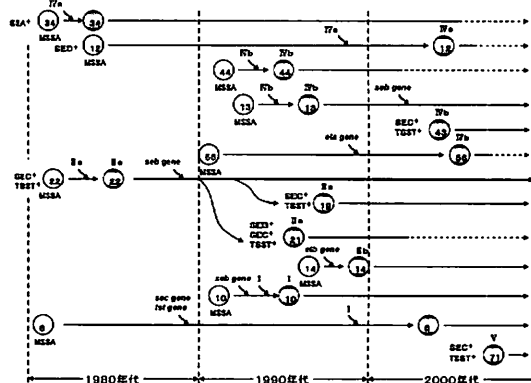


図1. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の進化過程 (推定)。

MSSAがメチシリン耐性遺伝領域 (SCC*mec*) や毒素遺伝子を獲得していった過程を示す。ローマ数字はSCC*mec*タイプ、アラビア数字はスパーサー領域のPCR泳動パターンを示す。

毒素産生性とITSPとの間に一定の関連性がみとめられた。例えば、SEAを産生するMRSAはITSPタイプの34、SEDはタイプ12、ETAはITSPタイプ56、68、ETBはタイプ14にのみ観察された。新潟大学の山本教授から分与されたPVL陽性のMRSA株(NN1)のITSPは新規のタイプ73であった。興味深いことに、2007年に膿瘍から分離されたPVL遺伝子陽性のMSSAもITSP73であった。以上の成績は、特定のDNA型の*S. aureus*が特定の毒素産生遺伝子を獲得しながら進化し続けていることを示している。今後、methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA)のITSP検索によりMRSAの進化の過程がより明確にされるものと期待される。菌株によるITSPの多様性は*Clostridium difficile*においても顕著にみられることから、*C. difficile*のITSPとトキシンAおよびトキシンBとの関係についても検討している。

### 3. ESBL産生菌とその耐性責任遺伝子の解析

1980年代に出現したESBL産生菌はアジアやラテンアメリカを中心に激増している。2007年のわが国の全国集計では*Escherichia coli*の約8.7%がESBL産生菌であったと報告されている。ESBLsには、TEM型、SHV型、CTX-M型、OXA型の4種類があり、わが国ではCTX-M型が高頻度に分離される。金沢大学附属病院検査部で2007年から2年間に分離されたESBL産生菌57株の検討では、CTX-M9型が43株、M2型が4株、M1型が7株、M型不明が3株であった。菌株別では、*E. coli*49株中44株がM9型、2株がM2型、3株が不明、*Klebsiella pneumoniae*の4株と*K. oxytoca*の2株はすべてM1型、*Proteus mirabilis*の2株は1株がM1型、1株がM2型であった。以上の結果から、多種のCTX-Mタイプ遺伝子(*bla*<sub>CTX-M</sub>)がわが国に浸淫していることが明確となった。

CTX-MタイプのESBLsはこれまで約40種類報告されており、すべての*bla*<sub>CTX-M</sub>をPCRで検出するためには多くのプライマーを準備しなければならない。大部分の*bla*<sub>CTX-M</sub>を検出できる新規のプライマーを作成してPCRを行った結果、CTX-MタイプのすべてのESBL産生菌で陽性を示した。図2にMRSAのITSPと*mecA*遺伝子(左)、および*E. coli*のITSPと*bla*<sub>CTX-M</sub>遺伝子(右)をマイクロチップ電気泳動装置により同時に検出した結果を示す。このように菌種同定と耐性遺伝子の同時検出により迅速で適正な抗菌薬の使用が期待される。

### 4. ITSP-PCRの臨床応用

陽性血液培養ボトルからDNAを抽出してITS-PCRを行ったところ、約85%の検体で種レベル、約10%の検体で属レベルの同定が可能であった。これらの成績を基に、金沢大学附属病院検査部では2008年からルーチン検査として陽性血液培養を対象に

ITS-PCRを実施し、原因菌の迅速報告を行っている。現在血管内カテーテル培養についてカテ抜去当日の報告ができるように検討している。

おわりに

世界的に増加している耐性菌が感染症治療の脅威となっている。特に、MRSA感染症は罹患率や死亡率の増加傾向が報告されている。このような状況を考慮して、米国Clinical Laboratory Standard Instituteはバンコマイシンの感性領域を4から2 $\mu$ g/mLに下げるとともに、2009年にはバンコマイシンの感受性試験をディスク法ではなく最小発育阻止濃度の測定で行うことを勧告している。一方、セフェム系薬耐性菌はESBLs以外にもAmpC型セファロスポリナーゼの過剰産生やIMP-1型メタロ $\beta$ -lactamaseによっても獲得されることから、その $\beta$ -lactamase遺伝子の同定を含む分子疫学的解析が耐性菌の拡大防止のためにも重要である。私たちの研究が耐性菌感染症の早期治癒に少しでも貢献できれば幸いである。

### 文 献

- 1) Jensen MA, Webster JA, Straus N: Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction - amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *J Clin Microbiol* 59: 945-952, 1993.
- 2) Gurtler V, Stanisich VA: New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol* 142:3-16, 1996.
- 3) Fujita S, Senda Y, Iwagami T et al: Rapid identification of staphylococcal strains from positive-testing blood culture bottles by internal transcribed spacer PCR followed by microchip gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 43:1149-1157, 2005.
- 4) Fujita S: Internal transcribed spacer (ITS)-PCR identification of MRSA. *MRSA protocols. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 391: 51-58, 2007.
- 5) Fujita S, Senda Y, Nakaguchi S et al: Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 39: 3617-3622, 2001.
- 6) Xu L, Ensor V, Gossain S et al: Rapid and simple detection of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes by multiplex PCR assay. *J Med Microbiol* 54: 1183-1187, 2005.

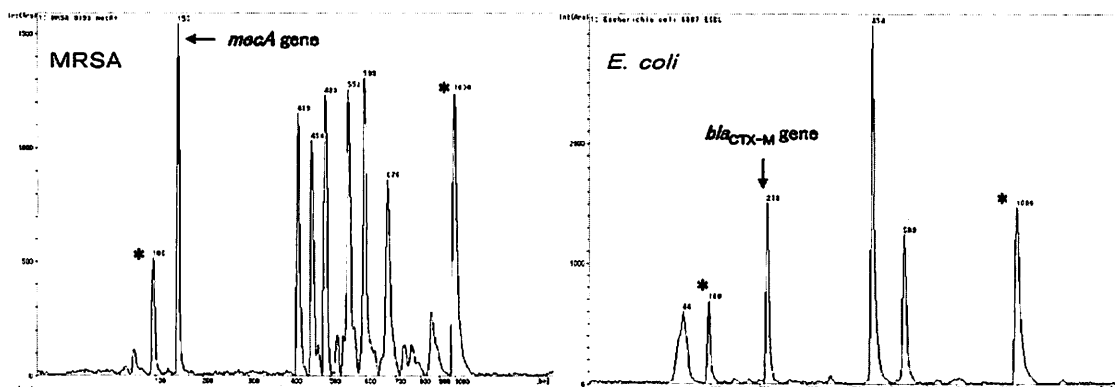


図2. マイクロチップ電気泳動法による耐性遺伝子の検出とスペーサー領域PCR泳動パターン。細菌のスペーサー領域は16S rRNA, tRNA, 23S rRNA, 5S RNAとともにオペロンを形成している。泳動パターン13のMRSAでは6種類(左図)、*E. coli*では2種類(右図)のオペロンがみられる。星印はDNAサイズマーカー(100 bp, 1,000bp)を示す。