

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790537

研究課題名（和文） フルオロキノロン系薬耐性菌の迅速検出法の開発

研究課題名（英文） Rapid assay for detecting *gyrA* and *parC* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae*

研究代表者

中野竜一（NAKANO RYUICHI）

財団法人神奈川科学技術アカデミー・重点研究室光触媒グループ・常勤研究員

研究者番号：80433712

研究成果の概要（和文）：本研究では、感染症治療で問題となっているフルオロキノロン系薬（FQ）耐性菌の実態を把握し、また FQ 耐性菌を迅速に診断する方法を開発した。FQ 耐性の要因となる *gyrA* と *parC* の変異の有無を、開発した PCR-RFLP 法によって検出することができ、FQ 耐性と感受性を迅速に診断することができた。安価でかつ迅速に行うことができるため、検査室などで活用され迅速診断法の一助になることが期待された。

研究成果の概要（英文）：Fluoroquinolone (FQ) resistance among *Enterobacteriaceae* species has been reported increasingly. It occurs primarily through mutation in the Quinolone Resistance-Determining Region (QRDR) of the DNA gyrase (*gyrA*) and topoisomerase IV (*parC*). I designed the mismatch PCR-RFLP to detect common mutations in QRDR of *gyrA* and *parC*. Developed mismatch PCR-RFLP successfully detected the mutations of *gyrA* and *parC* genes of *Enterobacteriaceae* clinical isolates with reduced susceptibility to FQs. This method offers an inexpensive, rapid, and easier alternative for detection of point mutations in FQ resistance in *Enterobacteriaceae*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：薬剤耐性菌、QRDR、PCR-RFLP 法、グラム陰性菌

## 1. 研究開始当初の背景

フルオロキノロン系薬（FQ）は、グラム陽性菌から陰性菌までをカバーする強い抗菌力と良好な組織移行性を示すことから各種感染症に対する治療用抗菌薬として幅広く使用されている。しかし、使用頻度、使用量の増加に伴い臨床現場で FQ 耐性菌が急速に増加しており、難治化や重症感染症を引き起

こし問題になっている。実際の臨床現場では、起原因菌の同定と薬剤感受性試験の結果が出るまでに 2～4 日を要するため、迅速診断を行うことができず、経験的に抗菌薬を投与しているのが現状である。このため、不適切な抗菌薬使用を続けることで、耐性菌を作り出したり、蔓延させたりする原因になっていると考えられている。

## 2. 研究の目的

耐性菌や院内感染の対策の一環として、抗菌薬の不要な投与を防ぐ必要があり、そのためには迅速に薬剤感受性試験の情報を得ることが極めて重要となる。

そこで本研究では、FQ 耐性菌の迅速検出法を確立し、適切な感染症治療法を目指す。また、臨床分離株における FQ 耐性菌の検出状況の把握、耐性遺伝子の動向を解析する。臨床現場に耐性菌の出現状況やその特性などについて情報を還元することで、耐性菌蔓延の防止や対策を講じることができ、臨床に貢献することができる。

## 3. 研究の方法

FQ 耐性菌の実態を把握するため臨床分離株を収集し、薬剤感受性試験及び耐性遺伝子 *gyrA* と *parC* のキノロン耐性決定領域

(Quinolone Resistance-Determining Region ; QRDR) の変異について明らかにした。得られた遺伝子配列を比較して、*gyrA* と *parC* それぞれに特異的なプライマーを製作することで、PCR-RFLP 法による QRDR の遺伝子変異迅速検出法の開発を試みた。検出法の結果と FQ 感受性の結果を比較してその相関性を検討し、迅速診断法としての可能性を検討した。

### (1) FQ の薬剤感受性試験測定

① 対象となる菌種は各種感染症より分離される次のグラム陰性桿菌とした。*Escherichia coli* (大腸菌), *Enterobacter cloacae* (エンテロバクター), *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌), *Proteus mirabilis* (プロテウス) の 4 菌種。これらの標準株(感受性株)として ATCC (American Type Culture Collection) 株を用い、臨床分離株として、関東の医療施設より分与していただいた株 (FQ 感受性株、耐性株) を用いた (表 1)。

② 薬剤感受性試験を Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) が定める抗菌薬感受性試験微量液体希釈法に従って測定し、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。薬剤はレボフロキサシン (LVFX) を用いた。

(2) FQ 耐性遺伝子 *gyrA* と *parC* の DNA 塩基配列の決定

① 対象とする菌種はグラム陰性桿菌 (腸内細菌科) のうち相同性の高い次の 4 菌種とした。大腸菌、エンテロバクター、肺炎桿菌、*Salmonella* spp. (サルモネラ)。各菌種より抽出したゲノム DNA を用いて *gyrA* と *parC* の QRDR を PCR にて増幅し、DNA シークエンサー ABI310 にて塩基配列を解読した。PCR は

Hot-StarTaq DNA polymerase (Qiagen) にてマニュアルに従い行った。この時使用した PCR プライマーは次の通りである。*gyrA* については *gyrA* F 5' -CCAGATGTHCGHGATGG-3' (H=A, C, or T) と *gyrA* R

5' -ACGAAATCAACSGTYTCTTTTC-3' (S=C or G, Y= C or T) を用いた。*parC* については *parC* F 5' -TTGCCWTTTATYGGKGATGG-3' (W= A or T, K= G or T) と *parC* R

5' -CGCGCWGGCAGCATTTTGG-3' を用いた。  
② DNA 塩基配列の詳細については DNA 解析ソフト DNASTAR を用いて解析した。菌種別に *GyrA* と *ParC* の QRDR のデータを構築して、比較検討した。

③ 耐性度別の点変異の有無を明らかにすることで、FQ 耐性化の段階的変異の詳細を明らかにした。

### (3) FQ 耐性菌迅速検出法の開発

① 各菌種の *gyrA* と *parC* の QRDR それぞれについて、DNASTAR を用いてアライメントを取った。これら QRDR を増幅できるよう上流と下流に PCR プライマーを製作した。このとき相同性の高い腸内細菌科 4 菌種について、同時に検出できるように共通配列を検索して設計した。

② QRDR とプライマーとの間に制限酵素認識部位を作る mismatch PCR-RFLP 法にて FQ 感受性菌と耐性菌を区別させるようにした。

③ *GyrA* と *ParC* の QRDR それぞれ 2 箇所 (*GyrA*83, 87 と *ParC*80, 84) に対し、制限酵素を組み合わせることで変異を検出できるように設計した。(図 1)

④ 薬剤感受性と本法の結果が相関することを確認した。

## 4. 研究成果

### (1) FQ 耐性菌の疫学調査

本研究では関東の医療施設 7 施設 (各 300 床以上) の協力のもと、FQ 耐性菌の疫学調査を行った。大腸菌、エンテロバクター、肺炎桿菌、プロテウス菌について調査したところ、いずれの施設においても高い耐性率を示していたことが判った。特にプロテウスについては 2000 年以降徐々にその耐性率は上昇していることが判った。尿路感染症で重要なこの菌の耐性率が上昇していることは、抗菌薬の使用による耐性化や耐性菌選択による拡散などが生じていると推測された。耐性菌による難治化などが生じる可能性が大いにあり、今後もその動向を注視しその対策を講じる必要が求められる。

(2) FQ 感受性試験と FQ 耐性遺伝子 *gyrA* と *parC* の DNA 塩基配列

標準菌株 (ATCC 株) と臨床分離株の LVFX に

対する薬剤感受性試験を行い、また *gyrA* と *parC* の QRDR の DNA 塩基配列を明らかにした (表 1)。LVFX 感受性菌は標準株の QRDR と翻訳されるアミノ酸が同じであるのに対し、耐性菌では GyrA83, 87 もしくは ParC80, 84 のいずれかに 1~4 残基の変異が認められた。耐性菌ではいずれも GyrA83 に変異が確認された。また、いずれの菌種においても GyrA と ParC の QRDR に変異が蓄積することで FQ が高度耐性化していることが明らかになった。

表 1. 各菌種の FQ 感受性試験と QRDR のアミノ酸変異

Species	strains	LVFX (μg/ml)	GyrA		ParC	
			83	87	80	84
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>E. cloacae</i>	FM 6719	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>E. cloacae</i>	FM 9158	4	<b>TAC (Tyr)</b>	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>E. cloacae</i>	FM 2047	16	<b>ATC (Ile)</b>	GAC (Asp)	<b>ATC (Ile)</b>	GAA (Glu)
<i>E. cloacae</i>	FM 5058	64	<b>ATC (Ile)</b>	GAC (Asp)	<b>ATC (Ile)</b>	GAA (Glu)
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	<0.06	TCG (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>E. coli</i>	QR14	4	<b>TTG (Leu)</b>	GAC (Asp)	<b>AGA (Arg)</b>	GAA (Glu)
<i>E. coli</i>	QR5	32	<b>TTG (Leu)</b>	<b>AAC (Asn)</b>	<b>ATC (Ile)</b>	GAA (Glu)
<i>E. coli</i>	QR203	32	<b>TTG (Leu)</b>	<b>AAC (Asn)</b>	AGC (Ser)	<b>AAA (Lys)</b>
<i>E. coli</i>	QR206	64	<b>TTG (Leu)</b>	<b>TAC (Tyr)</b>	<b>CGC (Arg)</b>	<b>GTA (Val)</b>
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>K. pneumoniae</i>	FM 6319	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>K. pneumoniae</i>	HKP4	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>K. pneumoniae</i>	TKP1	64	<b>ATT (Ile)</b>	GAC (Asp)	<b>ATC (Ile)</b>	GAA (Glu)
<i>K. pneumoniae</i>	FKP1	64	<b>ATC (Ile)</b>	GAC (Asp)	<b>ATC (Ile)</b>	GAA (Glu)
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC 14028	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC 13076	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>Salmonella</i> spp.	FM 5573	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>Salmonella</i> spp.	FM 6847	<0.06	TCC (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)
<i>Salmonella</i> spp.	MS1	0.5	TCC (Ser)	<b>TAC (Tyr)</b>	AGC (Ser)	GAA (Glu)

(3) FQ 耐性菌の迅速検出法の開発

① ミスマッチ PCR のプライマー作製

DNA 解析ソフト DNASTAR を用いて各菌種の塩基配列の相同性を確認し、各菌種の *gyrA* と *parC* の QRDR の DNA 塩基配列をそれぞれ図 1 に示した。*gyrA* の QRDR である Ser-83 と Asp-87 を含む領域を増幅できるようにプライマーを設定した。詳細は *gyrA* については

Ser-83 の上流約 110bp に Forward primer を設定し、Reverse primer は Asp-87 のすぐ下流に設定した。これらのプライマーにて DNA を増幅すると 152bp の断片になることが想定された。

*parC* についても同様に QRDR である Ser-80 と Glu-84 を含む領域を増幅できるようにした。詳細は Ser-80 の上流約 60bp に Forward primer を設定し、Reverse primer は Glu-84 のすぐ下流に設定した。これらのプライマーにて DNA を増幅すると 97bp の断片になることが想定された。

PCR による DNA 断片増幅は次の条件で行った。PCR 反応酵素は Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) を用い、Veriti サーマルサイクラー (アプライドバイオシステムズ) にて温度設定した。PCR の反応条件はそれぞれ次の通りにした。*gyrA* の反応条件は 94°C 2 分、(94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒) 30 サイクルとした。*parC* の反応条件は 94°C 2 分、(94°C 30 秒、52°C 30 秒、72°C 30 秒) 30 サイクルとした。いずれの菌種に対してもこの条件下にて、*gyrA* と *parC* を PCR にて増幅することができた。また非特異バンドは検出されず、プライマーと反応条件ともに最適なものであることが判った。

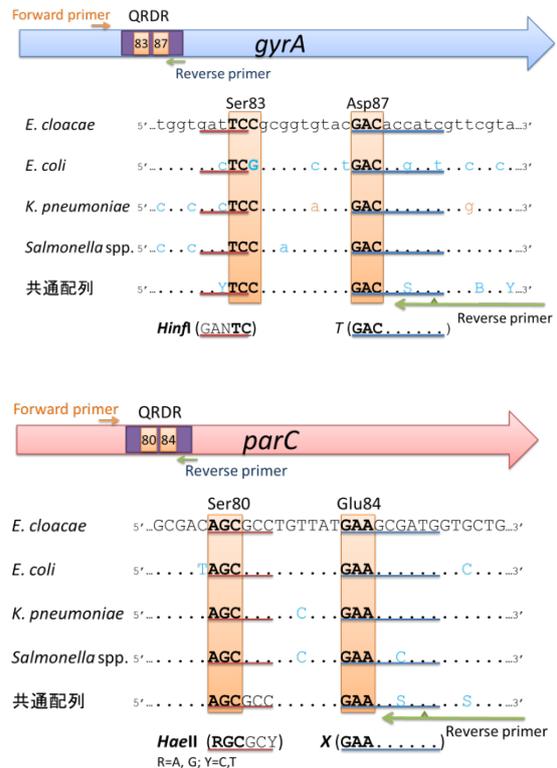


図 1. *gyrA* と *parC* の QRDR の DNA 塩基配列

② ミスマッチ PCR-RFLP 法

*gyrA* と *parC* ともに PCR にて得られた産物を制限酵素で切断した。*gyrA* については GyrA83Ser を認識する制限酵素として *HinfI*

(Takara) を用いた。GyrA87Asp を認識する制限酵素として *Tth111I* (Takara) を用いた。*parC* については ParC80Ser を認識する制限酵素として *HaeII* (Takara) を用いた。ParC84Glu を認識する制限酵素としては *XmnI* (Promega) を用いた。*Tth111I* は 65°C で、それ以外の制限酵素は 37°C で 1 時間反応させた。反応後それぞれを低分子の核酸を分離することができる Metaphor agarose 4.0% (Takara) を用いて電気泳動にて確認した。泳動条件は 100V で 40 分とした。この結果いずれの菌種においても同様の結果が得られた。

これらの結果のうち *E. coli* の *gyrA* について図 2 に、*parC* について図 3 に示した。GyrA について感受性株 (ATCC8739) はフルオロキノロン系薬に感受性の野生株で GyrA83, 87 の DNA 塩基配列が変異していないものを示す。NC は制限酵素処理していないものを、83 は *HinfI* で、87 は *Tth111I* で制限酵素反応させたものである。この結果、図 2 に示されるように、感受性株の *gyrA* はいずれも制限酵素で切断され、PCR 産物のサイズが小さくなっているのが判る。一方、耐性株 (QR206) については制限酵素で切断されずサイズが変わっていない。耐性株については認識部位が変異しているため、制限酵素で認識されず切断されなかったものと思われた。

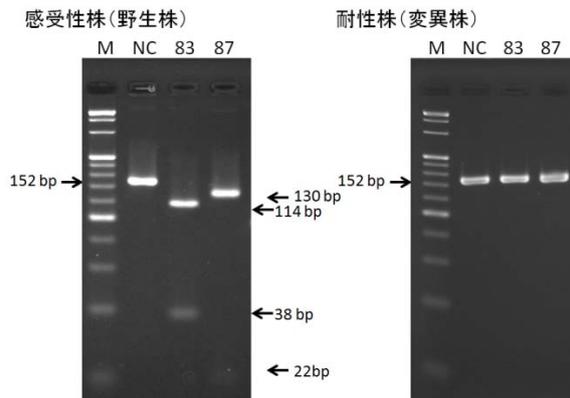


図 2. 大腸菌の *gyrA* の QRDR を PCR-RFLP 法にて切断した結果

ParC についても同様に感受性株 (ATCC8739) と耐性株 (QR206) に対して、ParC80, 84 をそれぞれ制限酵素処理した。NC は制限酵素処理していないものを、80 は *HaeII* で、84 は *XmnI* で制限酵素反応させたものである。この結果、図 3 に示されるように、感受性株の *parC* はいずれも制限酵素で切断され、PCR 産物のサイズが小さくなっているのが判る。一方、耐性株については制限酵素で切断されずサイズが変わっていない。耐性株については認識部位が変異しているため、制限酵素で認識されず切断されなかったものと思われた。

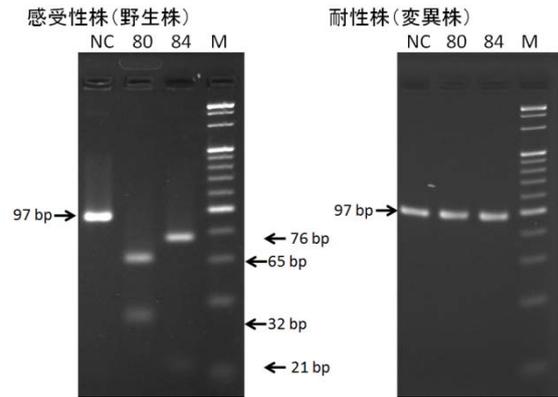


図 3. 大腸菌の *parC* の QRDR を PCR-RFLP 法にて切断した結果

これらのことより表 1 の対象菌株に対して本法を試したところ、いずれも *gyrA* 及び *parC* の QRDR の遺伝子変異を判別することができた。表 2 には、大腸菌について FQ 感受性試験と QRDR の DNA 塩基配列の結果と、本法の結果をまとめて示してある。本研究にて PCR-RFLP 法を応用して、耐性遺伝子の変異箇所の検出を試みたところ、いずれにおいても GyrA と ParC の変異と相関性のある良好な結果が得られた。このことは本法によって、FQ に対する迅速診断法として有効であると考えられた。GyrA と ParC の QRDR の変異の蓄積は FQ の耐性化と相関していることから (表 1)、本法によって変異の場所と数を判定することによって、FQ の耐性度を予測することが可能になると推察された。

表 2. 大腸菌の FQ 感受性試験、QRDR の DNA 塩基配列と PCR-RFLP 法の結果

Strains	MIC LVFX (µg/ml)	アミノ酸変異箇所				PCR-RFLP 法*			
		GyrA		ParC		<i>gyrA</i>		<i>parC</i>	
		83	87	80	84	<i>HinfI</i>	<i>T</i>	<i>HaeII</i>	<i>X</i>
ATCC 8739	<0.06	TCG (Ser)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GAA (Glu)	+	+	+	+
QR16	0.5	TTG (Leu)	-	-	-	-	+	+	+
QR291	0.25	-	GGC (Gly)	AGA (Arg)	-	+	-	-	+
QR14	4	TTG (Leu)	-	AGA (Arg)	-	-	+	-	+
QR203	32	TTG (Leu)	AAC (Asn)	-	AAA (Lys)	-	-	+	-
QR5	32	TTG (Leu)	AAC (Asn)	ATC (Ile)	-	-	-	-	+
QR206	64	TTG (Leu)	TAC (Tyr)	AGA (Arg)	GTA (Val)	-	-	-	-

\* *T, Tth111I; X, XmnI*

本法は、腸内細菌科の共通配列から混合プライマーを作製することができたため、菌種を問わず網羅的に検出可能となるという利点がある。また、制限酵素を用いることでコードンの3塩基いずれの変異に対しても検出可能であり、GyrA, ParCのQRDR4箇所いずれの変異も同時に検出することができるこれまでにない新たな方法である。

本研究の成果はさらに多くの他菌種についても応用できる可能性が高く、今後の新しい臨床検査法として重要な位置づけとなることが期待できる。今後は各医療施設で採取した臨床材料を用いて、本法が応用できる条件について検証する予定である。また迅速検出法として、本法以外の方法についても検討する予定である。高解像度融解曲線分析 (High Resolution Melting: HRM 法) は、DNAの一塩基の違いを見出せるPCRによる検出法であり、これまでウイルスの同定やSNPs (一塩基多型) の解析などに利用されている。この原理を応用することで、さらに早く変異の有無を検出することができると考えられ、その実用性について検証したい。

本研究で開発されたPCR-RFLP法によるFQ耐性菌の迅速検出法は、安価であり、迅速であり、診断が容易であるという利点があるため、臨床検査の現場で応用されることを期待したい。またこれにより、不要な抗菌薬の使用による耐性菌の出現を抑え、適切な抗菌薬による治療が推進されることが願われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 中野竜一、中野章代、長野則之、阿部美知子、岡本了一「ミスマッチPCR-RFLP法によるフルオロキノロン系薬感受性診断の開発」第22回日本臨床微生物学会総会 2011年1月
- ② 中野竜一、長野則之、阿部美知子、岡本了一「フルオロキノロン系薬耐性菌のミスマッチPCR-RFLP法による迅速検出法」第57回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 2010年10月

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：フルオロキノロン系薬剤耐性菌の検出方法及びそのためのプライマー

発明者：中野竜一、岡本了一

権利者：同上

種類：発明

番号：2010-235602

出願年月日：2010年10月20日  
国内外の別：国内

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 中野 竜一 (NAKANO RYUICHI)  
財団法人神奈川科学技術アカデミー・重点研究室光触媒グループ・研究員  
研究者番号：80433712

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

阿部 美知子 (ABE MICHIKO)

北里大学・医療衛生学部臨床化学・講師

岡本 了一 (OKAMOTO RYOICHI)

北里大学・医学部微生物学・講師