

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659285

研究課題名(和文)新しい緑膿菌タイピング法の開発と臨床応用

研究課題名(英文)Development of novel genotyping method of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical application

研究代表者

飯沼 由嗣 (IINUMA, Yoshitsugu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90303627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：新たな緑膿菌のデジタル遺伝子タイピング法(緑膿菌 PCR-based ORF typing; POT法)の開発を行った。臨床分離株のORF(Open Reading Frame)保有状況から、10個のgenomic islet由来ORFおよび5個のgenomic island由来ORF、さらにメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)遺伝子および緑膿菌マーカー遺伝子も加えて、10および9-plexのmultiplex PCRで判定し、遺伝子の有無でコード化を行った。Genomic islet部分の遺伝子コード(POT1)はMLST型と関連し、PFGEとほぼ同程度の菌株識別能を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel digital genotyping method of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* PCR-based ORF typing method; POT typing method). According to the distribution of the ORF (Open reading frame) in the clinical isolates, 10 ORF originated from genomic islet and 5 ORF originated from genomic island to increase the discriminatory power were selected. Metallo-beta-lactamase (MBL) (IMP or VIM group) gene and *P. aeruginosa* marker gene were added for the typing, finally the primers were adapted for the 10 and 9-plex PCR. The PCR results were scored with a 1 or 0 according to the presence or absence of the amplicon of the selected genes in order of primer number, and the resulting binary code was transformed into decimal numbers, separating into two parts with 10 (genomic islet, POT1) and 9 (genomic island and MBL, POT2) figures. POT1 was shown to be related with Multilocus Sequence Typing (MLST) number, and the discriminatory power was equivalent to PFGE.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：緑膿菌 遺伝子タイピング PCR-based ORF typing法 MLST

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は環境中に普遍的に存在し、易感染性宿主における主要な病原菌である。近年多剤耐性緑膿菌 (MDRP) と呼ばれる全ての薬剤に耐性化した高度耐性菌による施設内アウトブレイクが多数報告され、その脅威は増している。アウトブレイク解析のためには菌の遺伝子タイピングが必要となるが、これまではパルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) がその標準法とされた。しかしながら、PFGE 法は、専用の高価な機材や高度なテクニックなどその実施は大学などの研究施設に限られていた。その他、菌の系統を調べるための Multi-locus sequence typing (MLST) 法などのデジタルタイピング法も開発されたが、同様に大きな手間とコストが必要であり、しかもその識別能は PFGE 法よりも劣ることが報告されている。共同研究者である鈴木匡弘らは、全ゲノムシーケンス検索をもとに、multiplex PCR 法をベースとしたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 法を開発し (PCR-based ORF typing; POT 法) 簡便な手技と判定法、PFGE 法に匹敵する高い識別能、優れた再現性、さらに MLST 解析と関連する系統解析も可能な技術として高く評価されている。緑膿菌においても同様のデジタルタイピング法の開発が必要と考えられた。

2. 研究の目的

(1) MRSA POT 法の開発技能を応用し、multiplex PCR 法をベースとしたデジタルタイピング法を開発する。PFGE に匹敵する高い識別能、優れた再現性、系統解析が可能であること、判定が容易であること、を開発目標とした。

(2) 開発した POT 法を用いて、臨床分離薬剤耐性緑膿菌の解析を行い、病原性や伝播性など院内感染を含めた病原菌としてリスク判定が可能か検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 緑膿菌 POT 法のための候補となる ORF の選定

全ゲノムシーケンスが判明している緑膿菌 3 株 [PA7(NC_009656)、PA14(NC_008463)、PA01(NC_002516)] のゲノム塩基配列を比較し、菌株により保有状況の異なる部分のデータから候補となる Open Reading Frame (ORF) を選別する。さらに、臨床分離株の ORF 保有状況から POT 法に利用できる ORF 候補を絞り込む。また、MDRP で問題となっている、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の有無についても判定できるようにする。また緑膿菌であることを判定できるように緑膿菌判定マーカーの候補となる遺

伝子を選定し、反応あるいは菌同定コントロールとすることとした。

(2) 他の遺伝子タイピング法との比較

パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法や Multilocus Sequence Typing (MLST) 法との比較を行い、ORF 選定の指標とする。

(3) ORF の選定、プライマー、反応条件の調整、遺伝子型のコード化

最終的に選定された ORF について、multiplex PCR による判定が可能となるように、primer の調整を行った。また、デジタルタイピング法として遺伝子型のコード化の方法を考案し、判定法の決定を行った。

(4) 臨床分離耐性緑膿菌の解析検討

緑膿菌 POT 法を用いて、臨床分離薬剤耐性緑膿菌の解析や PFGE 法、MLST 法との比較を行い、菌識別能、アウトブレイクや伝播力の判定能力などについて検討を行った。

4. 研究成果

(1) POT 法の候補となる ORF の選定

MBGD web site (<http://mbgd.nibb.ac.jp/>) 上で全ゲノムシーケンスが判明している緑膿菌 3 株の全ゲノム塩基配列を比較した。ファージのゲノム情報も合わせ ORF を選択し、高い識別能や系統解析も可能となるように、PFGE 型や MLST 型が判明している株を利用して ORF の絞り込みを行った。

POT 法の候補として選定された 100 個前後の ORF から、MLST 解析による clonal complex (CC) に相当する菌株識別能を發揮すると期待される genomic islet については ST 型の異なる株を指標として利用する ORF を絞り込んだ。また、同一 clonal complex 株内における菌株識別能を上げる効果が期待される genomic island 由来の ORF については同一 clonal complex (CC) 型の株を用いて ORF を選択した。

メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 遺伝子については、わが国で頻度の高い IMP 遺伝子と VIM 遺伝子グループが判定できるようにプライマー設計を行った。

緑膿菌判定マーカーについては MBGD web site 上で *Pseudomonas* 属菌のゲノムを比較、8 つの候補 ORF を選び、最終的に PA3609 (*potC*, polyamine transport protein PotC) を緑膿菌マーカーとして用いることとした。

(2) ORF の選定とプライマーの設計、反応条件の調整

上記の検討結果、最終的に 10 個の genomic

islet 由来 ORF を選定し、加えて菌株識別能を高めるために、5 個の genomic islet 由来 ORF を選択した。さらに、MBL 遺伝子 (IMP および VIM グループ) および緑膿菌マーカー遺伝子も加えて、multiplex PCR のための primer 設計を行った。各増幅 ORF の増幅効率、相互作用を考慮し、増副産物サイズが 506bp から 85bp となるようにプライマーを設計し、10 および 9-plex の 2 反応系とした (表 1)。なお、reaction mixture 2 における IMP 遺伝子の増幅プライマーは 2 組混合しているが、増幅サイズが同一であるため区別がつかない。従って reaction mixture 2 は 10 組の PCR primer を用いた multiplex PCR 反応だが、最大増副産物バンド数は 9 本 (9-plex) となっている。

(3) 遺伝子型のコード化

最終的に決定された検出 ORF のうちクローナリティ推定部分 (genomic islet 由来 ORF 10 個) と株レベルでの識別部分 (ファージ及び MBL 遺伝子) の保有パターンとに分けて遺伝子型番号を付与した。遺伝子型番号は genomic islet 1-10 (PCR 反応産物のサイズに従って整列) および genomic island 1-5 の有無を 1、0 に置き換え、デジタル化したものを 10 進法に変換し系統推定部分 (コード 1) と株レベルでの識別部分 (コード 2) として遺伝子型とした。前半の数値は MLST による clonal complex (CC) に相当する菌株識別能が期待され、後半の数値は菌株識別に有効と期待された (表 2)。

(4) 菌株識別能の評価：PFGE 法および MLST 法との比較 (図)

PFGE 法との比較では、PFGE 型の判明しているアウトブレイク由来株を含む 183 株の臨床分離緑膿菌の POT 型との比較を行った。その結果、POT 型では 76 遺伝子型に識別され、Simpson's index は 0.994 と非常に優れた結果となった。一方 PFGE 法では Homology 90% 以上を同一株と判定すると 110 遺伝子型、80% 以上で判定すると 68 遺伝子型に識別され、それぞれ Simpson's index は 0.999、0.992 となった。アウトブレイク由来株では、すべて同一 POT 型となったが、PFGE の homology では 80-90% となった。PFGE 法の高い識別能は、POT 法よりも詳細な菌株判定が可能と推定されるが、微細な遺伝子相違まで検出することがアウトブレイク株の判定を誤らせる可能性も示唆された。

MLST 解析との比較から POT 型の最初の数値 (POT1 値) と MLST 解析による clonal complex (CC) 型との相関が見られた。52 種類の POT1 値は CC 型との間に

1 : 1 の関係が見られた。一方 20 種類の POT1 値には複数の CC 型が含まれた。

(5) 臨床分離薬剤耐性緑膿菌における POT 解析

比較的耐性度の高い臨床分離緑膿菌 151 株の POT 解析を行った。POT 型は全 92 型検出され、多様性に富む遺伝子型の検出が可能であった。一方で、CC242 や CC235 の遺伝子背景を持つ流行性薬剤耐性緑膿菌クローンが、POT 法によって簡便に検出可能 (それぞれ POT 型 634-0 および 207-X) となることも明らかとなった。これらの POT 型を示す菌株は、伝播性が高くアウトブレイクを引き起こす可能性の高い danger strain と考えられ、より厳重な感染伝播予防策が必要となる。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) 松浦香里、馬場尚志、麻生都、森田恵美、金谷和美、河村佳江、飯沼由嗣、多剤耐性緑膿菌の検出におけるクローアガー-MDRP スクリーン培地の基礎検討、医学検査、Vol.63、No.2、2014、226-231。(査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

Suzuki M, Yamada K, Matsumoto M, Linuma Y, Development of a PCR-based molecular epidemiology method for *Pseudomonas aeruginosa*, International Union of Microbiological Societies Congress 2014, Montreal, Canada, July 27-August 1, 2014.

鈴木匡弘、早川恭江、山田和弘、松本昌門、皆川洋子、飯沼由嗣、臨床分離薬剤耐性緑膿菌の POT 法による分子疫学解析、第 87 回日本感染症学会学術講演会第 61 回日本化学療法学会総会 合同学会、横浜、2013 年 6 月 5 日-6 月 6 日

鈴木匡弘、山田和弘、細羽絵里子、長尾美紀、馬場尚志、飯沼由嗣、シンポジウム 緑膿菌マーカーの今昔 新しい Genotyping 法 - 緑膿菌の PCR-based ORF Typing 法の開発、第 47 回緑膿菌感染症研究会、札幌、2013 年 2 月 22 日-2 月 23 日

鈴木匡弘、山田和弘、細羽絵里子、長尾美紀、馬場尚志、飯沼由嗣、緑膿菌の PCR-based ORF Typing (POT) 法の開発と性能評価、第 24 回日本臨床微生物学会総会、横浜、2013 年 2 月 1 日-2 月 2 日
馬場尚志、飯沼由嗣、PCR-based open

reading frames typing 法によるカルバペ
ネム耐性緑膿菌の疫学的解析、第 59 回日
本臨床検査医学会学術集会、京都、2012
年 11 月 29 日-12 月 2 日.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

飯沼 由嗣 (IINUMA, Yoshitsugu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90303627

(2)研究分担者

馬場 尚志 (BABA, Hisashi)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60359750

鈴木 匡弘 (SUZUKI, Masahiro)

愛知県衛生研究所・生物学部・研究員

研究者番号：70446649

表 1 検出 ORF と PCR 増副産物

Reaction mixture 1			Reaction mixture 2		
	ORF name	bp		ORF name	bp
緑膿菌マーカー	PA3609	506	緑膿菌マーカー	PA3609	506
islet-1	PA7_0045	336	islet-6	PA3065	324
islet-2	PA14_27990	281	islet-7	PA4549	271
islet-3	PA7_1768	235	islet-8	PA5264	238
islet-4	PA1509	201	islet-9	PA14_46400	204
islet-5	PA7_3188	175	islet-10	PA14_10960	176
VIM group		151	island-4	PA7_2363	150
island-1	PA7_0104	126	island-5	D3p35	124
island-2	PLES_26051	103	IMP group		105
island-3	PA7_5342	85			

表 2 ORF 保有パターンから遺伝子型コードへの変換方法とコード化の例 (IMP 陽性多剤耐性緑膿菌) POT 法による菌コードは 207-25 と判定される。POT1 の値から菌の系統は多剤耐性クローンである CC235 と推定される。

Reaction mixture 1					
Marker		1			
islet-1	なし	0 ×	512 =	0	コード 1 - 1 genomic islet
islet-2	なし	0 ×	256 =	0	
islet-3	あり	1 ×	128 =	128	
islet-4	あり	1 ×	64 =	64	
islet-5	なし	0 ×	32 =	+ 0	
				192	
VIM group	なし	0 ×	64 =	0	コード 2 - 1 island + VIM
island -1	なし	0 ×	32 =	0	
island -2	あり	1 ×	16 =	16	
island -3	あり	1 ×	8 =	+ 8	
				24	
Reaction mixture 2					
Marker		1			
islet-6	なし	0 ×	0 =	0	コード 1 - 2 genomic islet
islet-7	あり	1 ×	8 =	8	
islet-8	あり	1 ×	4 =	4	
islet-9	あり	1 ×	2 =	2	
islet-10	あり	1 ×	1 =	+ 1	
				15	
island -4	なし	0 ×	4 =	0	コード 2 - 2 island + IMP
island -5	なし	0 ×	2 =	0	
IMP group	あり	1 ×	1 =	+ 1	
				1	
$\text{コード 1 (POT1)} = \text{コード 1 - 1} + \text{コード 1 - 2} = 207$ $\text{コード 2 (POT2)} = \text{コード 2 - 1} + \text{コード 2 - 2} = 25$					

