

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659720

研究課題名(和文) 咽頭における薬剤耐性遺伝子プールの解明とその病原細菌耐性化との関連

研究課題名(英文) Analysis of commensal neisserial species as a genetic pool for drug resistant genes

研究代表者

大西 真(Ohnishi, Makoto)

国立感染症研究所・細菌第一部・部長

研究者番号：10233214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：非病原性で咽頭に常在する咽頭由来ナイセリア属菌のなかに、セフトリアキソン耐性菌が存在することを示した。淋菌のセフトリアキソン耐性株(H041)の耐性遺伝子penA(H041)との比較から、咽頭由来ナイセリア属菌の耐性遺伝子はpenA(H041)と類似していることを示した。また、共通に存在する特異的なアミノ酸配列が耐性に重要であることが示された。リアルタイムPCR法を用いたセフトリアキソン耐性遺伝子penA(H041)を特異的に検出するアッセイ系を確立した。セフトリアキソンによる淋菌治療後に非病原性ナイセリア属菌の耐性株が選択されるか検討したが、そのような現象は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：Various kinds of antimicrobial-resistant pathogens have emerged. In addition to pathogens causing nosocomial infections, pathogens for community-acquired infections also have developed their antimicrobial-resistance. In this project, we tried to understand the mode of emergence and acquisition of resistant gene. We analyzed total 107 commensal neisserial strains, which are speculated as a source of resistant genes for *N. gonorrhoeae*. We could detect ceftriaxone (CRO) resistant genes in the commensal strains. From the comparison of penA genes, newly identified penA from CRO-resistant commensal strains were similar (not identical) with penA (H041). Some unique amino acids observed in penA (H041) were shared with the CRO resistant strains. We designed real-time PCR assay system, which could detect penA (H041) specifically. We tried to detect CRO-resistant neisserial strains after CRO treatment for *N. gonorrhoeae*, but the resistant strains could not be emerged.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：6911

キーワード：淋菌 セフトリアキソン耐性 咽頭常在ナイセリア属菌

1. 研究開始当初の背景

環境中にその主な生息環境を持つ菌においては、抗生物質産生菌との土壌における共存/競争の結果、種々の耐性遺伝子が形成されてきたことが推測される。耐性遺伝子の一部は伝達性のプラスミドにより菌株間あるいは菌種を超えた拡散に繋がる。しかしながら、染色体性の耐性遺伝子は通常それぞれの菌株において形成され、耐性遺伝子が拡散する可能性は低いと考えられる。そのため、この場合は耐性菌株がクローナルに拡大することが耐性菌の広がりにつながる。

人体環境に適応してきた病原細菌は、組織特異性を獲得することで生息環境に適応した特殊化を果たしている。中でも他の細菌との競合を避けニッチを見いだした細菌種においては、他の細菌と出会う頻度が低く水平伝播による耐性遺伝子の獲得の機会が比較的少ないと考えられる。そのような菌種の一つとして、淋菌が挙げられる。薬剤耐性化も、個々のクローンにおける染色体性の耐性遺伝子形成によっておこると考えるのが一般的であった。

近年、多剤耐性淋菌の出現とその広がりが大きな問題となっている。多様な薬剤に対して淋菌は耐性を獲得してきたが、プラスミドによる伝播は稀で、染色体性の耐性遺伝子によるものが主である。しかしながら、自然形質転換能が著しく高い淋菌においては、染色体性であっても菌株間で薬剤耐性遺伝子の伝播がおこる可能性を申請者らは指摘した

2. 研究の目的

淋菌の染色体性耐性遺伝子は、どのように形成されているのか? BG Spratt により非病原性ナイセリア属菌から耐性を獲得している可能性が示唆された (Nature **332**, 173-176 1988)。しかしながら、その非病原性ナイセリア属菌の薬剤耐性に関する知見は、皆無である。本研究において明らかにする項目は以下の3点である。

A: 咽頭由来ナイセリア属菌に存在する薬剤耐性遺伝子のレパートリーを明らかにする。
B: 咽頭由来ナイセリア属菌の薬剤耐性遺伝子が淋菌において耐性化に関与するかを検証する

C: 淋菌感染症治療が咽頭由来ナイセリア属菌の耐性ポピュレーションを増大させるかを検討することとした。

3. 研究の方法

材料: H041 が分離された診療所において2010-2013年に分離された咽頭由来非病原性 *Neisseria* 属細菌 107 株と *N. meningitidis* 1 株を用いた。菌種同定は ID テスト・HN-20 ラピッド「ニスイ」を用いた生化学的同定と 16S rRNA 塩基配列解析結果に基づいた。また、ID テストで *N. subflava* と同定された菌株は、CTA 培地 (BD) での糖からの酸産生性で生物型の決定をした。 *N. subflava* bv. *perflava*

と同定した菌種のうち、黄色色素産生陽性株を *N. subflava* bv. *perflava*、黄色色素産生陰性株を *N. sicca* とした。

CTRX と CFIX の MIC が既知の 2010-2012 年に分離された淋菌 193 株を非病原性 *Neisseria* 属細菌との比較に用いた。

MIC 測定: 咽頭由来 *Neisseria* 属菌株の CTRX に対する MIC 値の測定を行った。MIC の測定は E テスト (シスメックス・バイオメリュー) を用いた。培地は 1% IsoVitaleX (BD) を含む GC 寒天培地 (BD) を用いた。

16S rRNA, *penA* の塩基配列決定: TE buffer に菌を懸濁させ、5 分間沸騰させた菌液を遠心分離。上清を滅菌蒸留水で 100 倍希釈したものを PCR のテンプレート DNA として使用した。16S rRNA の PCR 反応及び塩基配列決定は Bacterial 16S rDNA PCR Kit (TAKARA) を使用した。*penA* の PCR 反応では、菌種によって使用するプライマーを使い分けた。PCR は pre-heating 96 2 分後、96 10 秒、58 10 秒、72 2 分を 30 サイクル行った。

PCR 産物の精製には ExoSAP IT kit (GE Healthcare) を使用した。塩基配列決定には ABI BigDye Terminator cycle sequencing kit (version 3.1)、ABI 3130 sequencer を使用した。

分子系統樹作成: *N. gonorrhoeae* 5 株 (FA19, FA1090, FA6140, KM061, NG0401) *N. meningitidis* 4 株 (MC58, NM-alpha14, M04-240196, ATCC13091) *N. polysaccharea* (ATCC43768) 及び *Simonsiella muelleri* (ATCC29453) の 16S rRNA 及び *penA* 塩基配列は GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) より引用した。

16S rRNA の樹形図では、データベースより引用した菌株を含む *Neisseria* 属細菌 130 株と *Simonsiella muelleri* 1 株の 16S rRNA 塩基配列 (1085bp) を用いた。*penA* の樹形図では H041 を含む *Neisseria* 属細菌 40 株の *penA* 塩基配列と *Simonsiella muelleri* 1 株 (約 1749bp) を用いた。分子系統樹解析は MEGA version 5.05 を使用し近隣結合法を用いた。***penA* の塩基配列比較図作成:** 比較する 2 つの *penA* 塩基配列のアライメントは CLUSTALW を用いて行った。アライメントした配列は 50 bp ずつ区切り、その区画ごとの一致率を算出した。50bp の区画は隣の区画と 25bp ずつ重なるように連ならせた。

統計学的解析: PBP2 アミノ酸配列比較において、CTRX 耐性株群と感受性株群では配列に有意差の有無を Fisher's exact test を用いて統計学的処理を行った。p < 0.05 を統計的有意水準とした。

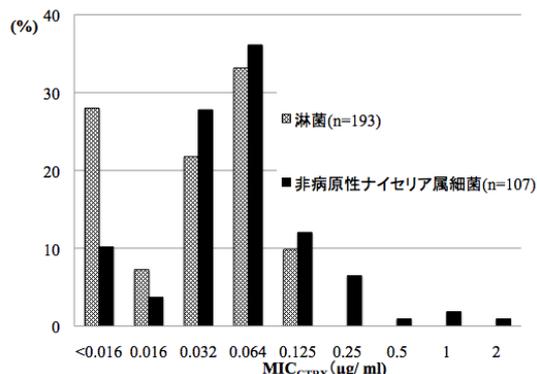
形質転換実験: 受容菌には *penAX* を保持する淋菌 (03-010; MIC_{CTRX} = 0.016 µg/ml) を用いた。供与 DNA に菌液 100 µL を混ぜ、37 の恒温槽で 5 時間保温した。保温後、受容菌の MIC の 4 倍の濃度の薬剤 (CTRX) を含んだ GC agar に塗抹し、37、CO₂ 下で一晩培養

した。生えてきたコロニーを同様の培地に single colony isolation し、薬剤を含まない GC agar を用いてさらに single colony isolation した。形質転換後、寒天平板希釈法を用いて形質転換体の CTRX に対する MIC 値を測定した。

4. 研究成果

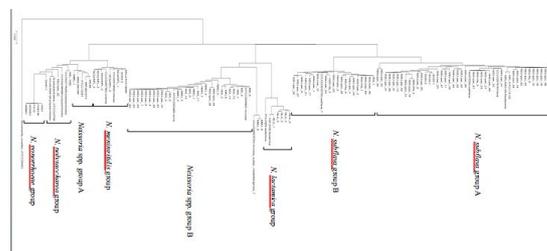
1. 非病原性 *Neisseria* 属細菌の CTRX に対する MIC 値

MIC 値の分布を 2010~2012 年に分離された淋菌 (193 株) の CTRX に対する MIC 値の分布と比較した (Fig. 1)。淋菌の MIC₅₀, MIC₉₀ はそれぞれ 0.032 μg/ml, 0.064 μg/ml だった。一方、非病原性 *Neisseria* 属細菌の MIC₅₀, MIC₉₀ はそれぞれ 0.064 μg/ml, 0.125 μg/ml となり、淋菌の MIC₅₀, MIC₉₀ よりも高かった。また、咽頭由来 *Neisseria* 属細菌には CTRX 耐性淋菌と判断される MIC 値 0.5 μg/ml 以上 (CLSI 基準) を示す菌株が 3 つの異なる菌種で 4 株 (*N. lactamica* NLA_1 株, *N. subflava* bv. *perflava* NSU-per_57 株, *N. subflava* bv. *subflava* SH43-1 株及び、*Neisseria* sp. SH43-3 株) 存在した。以下、この 4 株を CTRX 耐性株として検討を行った。



2. 分子系統樹解析

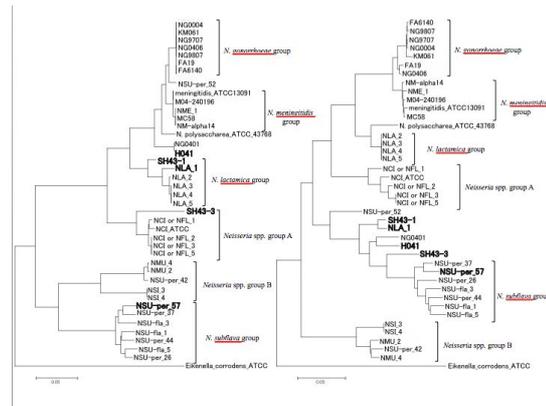
H041 を含む *Neisseria* 属細菌 40 株において 16S rRNA 塩基配列を用いた樹形図を作成した。



16S rRNA 塩基配列は細菌の分子系統を反映する。ATCC43768, SH43-1, NSU-per_52 を除く *Neisseria* 属細菌は 8 つのクラスターを形成した。*Neisseria* spp. group A に属す菌株は ID テストによる生化学的同定では *N. cinerea* と *N. flavescens* の分類が出来なかった。*Neisseria* spp. group B, *N. subflava* group A, *N. subflava* group B に属す菌株は生化学的同定による菌種名がクラスター内

で一致しなかった。

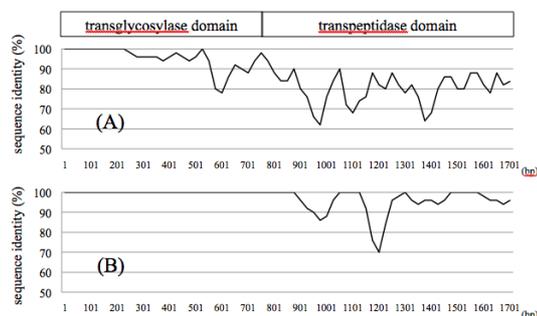
penA 塩基配列をトランスグリコシラーゼ領域に相当する範囲 (1~780 位) とトランスぺプチダーゼ領域に相当 (781~1749 位) に分け、それぞれの領域ごとに分子系統樹を作成した。



16S rRNA 系統樹における *N. subflava* group A 及び B はトランスグリコシラーゼ領域、トランスぺプチダーゼ領域において 1 つのクラスター (*N. subflava* group) となった。トランスグリコシラーゼ領域において、CTRX 耐性株 H041, SH43-1 と CFI 耐性株 NG0401 は 16S rRNA 分子系統樹で属したクラスターとは異なるクラスターに属し、その他の菌株は 16S rRNA 分子系統樹のクラスターと同一であった。トランスぺプチダーゼ領域では、CTRX 耐性株 H041, NLA_1, SH43-1, SH43-3 と CFI 耐性株 NG0401 は 16S rRNA 分子系統樹でのクラスターには属さず、*N. subflava* group の分岐に近い位置に集まった。CTRX 耐性株 NSU-per_57 だけは、トランスグリコシラーゼ領域、トランスぺプチダーゼ領域ともに *N. subflava* group に属した。

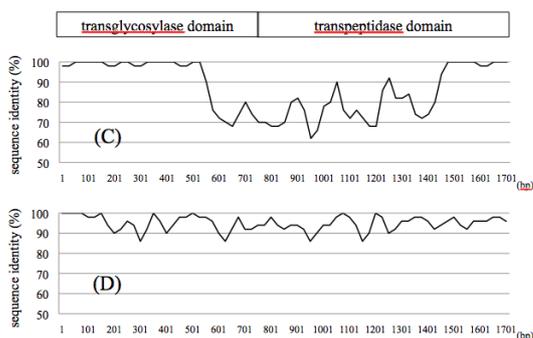
3. *penA* の塩基配列比較

淋菌における CFI 耐性株 (NG0401) と感受性株 (FA19) の *penA* 塩基配列比較を行った (A)。*penA* 塩基配列 1 ~ 550 位までの一致率は平均 98% を示した。一方、551~1749 位の一致率は平均 82% を示し、16S rRNA の塩基配列 (1085 bp) の一致率 (100%) と比較し低かった。次に、CTRX 耐性株 H041 と CFI 耐性株の *penA* 塩基配列比較を行った (B)。トランスグリコシラーゼ領域では一致率は



100%を示した。トランスペプチダーゼ領域では一致率の低い領域が存在した。

非病原性 *Neisseria* 属細菌 CTRX 耐性株の *penA* と、同一菌種で CTRX に対する MIC 値が低い株の *penA* を用いた塩基配列比較を行った。CTRX 耐性 *Neisseria* sp. (SH43-3) と感受性株 (NCI or NFL_1) の 16S rRNA 塩基配列一致率がほぼ 100% (1085 bp 中ミスマッチ 1 bp) に対して、*penA* 塩基配列一致率が低い領域が約 500~1500 位の間に存在した (C)。一方で CTRX 耐性 *N. subflava* bv. *perflava* (NSU-per_57) は同一菌種感受性株 (NSU-fla_5) との 16S rRNA 塩基配列一致率は 99.5%に対し、*penA* との一致率の平均は 94.9%を示した (D)。



4. アミノ酸配列比較

CTRX 耐性株 H041 株と感受性株の PBP2 アミノ酸配列比較解析から、H041 特異的で CTRX 耐性化に寄与している可能性のある H041 型 アミノ酸配列が 6ヶ所存在する。この 6ヶ所の PBP2 アミノ酸配列を非病原性 *Neisseria* 属細菌 CTRX 耐性株 4 株、CTRX 感受性株 30 株のアミノ酸配列で比較した (Table. 3)。この 6ヶ所アミノ酸配列のうち、非病原性 *Neisseria* 属細菌では 311 位のバリンと 483 位のセリン、485 位のイソロイシンが CTRX 耐性株有意に認められた (いずれも $p < 0.05$)。316 位のプロリンは CTRX 耐性株と感受性株ともに認められなかった。328 位のスレオニンは CTRX 耐性株有意に認められなかった ($p = 0.41$)。341 位のプロリンは CTRX 耐性株、感受性株ともに認められた。

5. 形質転換後の MIC 値測定

形質転換前と比較し、PBP2 に A311V / T316P / T483S / T485I, A311V / T316P / T483S の変異を含む形質転換体は CTRX に対する MIC 値が約 31 倍上昇した。A311V / T483S / T485I, A311V / T316P / T485I, A311V / T316P, A311V / T483S, の形質転換体は CTRX に対する MIC 値が約 15 倍上昇した。A311V / T485I, A311V の 2 種類の形質転換体は今回の実験では得ることが出来なかった。

Table 3 非病原性 *Neisseria* 属細菌における H041 特異的アミノ酸配列の有無

MIC _{CTRX}	311		316		328		341		483		485	
	V	not V	P	not P	T	not T	P	not P	S	not S	I	not I
MIC _{CTRX} ≥ 0.5 (4)	4	0	0	4	1	3	4	0	4	0	3	1
MIC _{CTRX} ≤ 0.032 (30)	0	30	0	30	3	27	30	0	0	30	1	29

PBP2 mutation pattern	MIC _{CTRX}
A311V / T316P / T483S / T485I	0.5
A311V / T483S / T485I	0.25
A311V / T316P / T483S	0.5
A311V / T316P / T485I	0.25
A311V / T483S	0.25
A311V / T485I	-
A311V / T316P	0.25
A311V	-
positive control (H041 <i>penA</i>)	1

その他

セフトリアキソン耐性遺伝子を検出するリアルタイム PCR 法を開発した。H041 型 *penA* では陽性反応が認められるが、非病原性 *Neisseria* 属細菌の耐性株では陰性結果に得られる H041 型 *penA* に特異的検出系となった。

咽頭淋菌感染症のセフトリアキソン治療後の咽頭検体から治療効果判定を実施した際に、同時に非病原性 *Neisseria* 属細菌の耐性株の増加を検討したが、そのような事実は見いだされなかった。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

CTRX 耐性非病原性 *Neisseria* 属細菌が保持する PBP2 モザイク構造の解析 道林美里、志牟田健、石原朋子、中山周一、保科眞二、齋藤良一、大西真 第 86 回日本細菌学会 2014 3 月 東京

Antimicrobial resistant *N. gonorrhoeae* and pharyngeal infection Makoto Ohnishi. 18th IUSTI Asia Pacific Conference. 2014 Nov, Thailand

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 真（ ）

研究者番号：

1 0 2 3 3 2 1 4

(2)研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

なし（ ）

研究者番号：