



Mutations in the gyrA and parC genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa derived from urinary tract infections and thei...

松本, 穰

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5902

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005902>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Mutations in the *gyrA* and *parC* genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography

尿路感染症由来緑膿菌臨床株における高速液体クロマトグラフィー法によるフルオロキノロン系
抗菌薬耐性の迅速診断法確立への検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
外科系講座腎泌尿器科学分野
(指導教員：藤澤 正人教授)

松本 稔

尿路感染症由来緑膿菌臨床株における高速液体クロマトグラフィー法によるキノロン系抗菌薬耐性株の迅速診断法

背景

当院およびその関連施設では、尿路感染症の主たる原因菌の一つである緑膿菌においてキノロン系抗菌薬耐性の増加傾向を認めている。緑膿菌におけるキノロン系抗菌薬の耐性機構は多岐にわたるが、代表的なものとして標的分子である type II トポイソメラーゼ (DNA ジャイレース、トポイソメラーゼIV) の変異があげられる。DNA ジャイレースにコードされる *gyrA*、およびトポイソメラーゼIVにコードされる *parC* 上にキノロン耐性決定領域 (Quinolone resistance determining regions: QRDR) と呼ばれる領域があり、この狭い領域に局在している変異が主にキノロン系抗菌薬の耐性獲得に関与するといわれている。一般的には、*gyrA* が第一の標的酵素、*parC* が第二の標的酵素とされるが、いずれもキノロン系抗菌薬耐性に十分関与しているとされている。

目的

今回我々は、キノロン系抗菌薬耐性株を迅速に検出する方法として、高速液体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography: DHPLC) 法について従来の診断法と比較しながら検討した。

対象

2009 年 4 月より同年 11 月までに尿路感染症患者の尿中より分離された緑膿菌 114 株を対象とした。

方法

緑膿菌臨床株をカジトン培地 (栄研) にて培養した。米国の臨床検査標準協会 (CLSI) の基準に準じ、Mueller-Hinton agar を用いた寒天平板希釈法で最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。遺伝子の増幅および DNA 塩基配列の決定は Mounieimne らの方法に準じた。各菌株より DNAamp DNA Extraction Kit (QIAGEN) を用いて染色体 DNA を抽出した。抽出した染色体 DNA をテンプレートとし、*gyrA* には PSE1 (5'-gACggCCTgAAgCCggTgCAC-3') と PAGA2 (5'-ACgCTCgACCATCgACCATCgCTTCCA-3') を *ParC* には PAPC1 (5'-ATgAgCgAATCCCTCgATCTg-3') と PAPC5 (5'-TggCCCAgTTCgCTAgCAGCA-3') をプライマーとして QRDR を含む各領域を PCR 法にて増幅した。反応液には各プライマーのペア 200nM と TaKaRa Ex-Taq (宝酒造) 2.5U を添加した。PCR の反応条件は変性; 94℃, 1 分, アニーリング; 65℃, 1 分, 伸長反応; 72℃, 1 分, サイクル数; 25 とした。増幅された各遺伝子を精製し、Dye Terminator Premix (バイオテック) の手順書にしたがって塩基配列を決定した。塩基配列決定用のプライマーとして、*gyrA* には PSE1 および PAGA2, *parC* には PAPC1 および PAPC5 を用いた。DNA シークエンサーは ABI 社製 310 を用いた。感受性株である *P.aeruginosa* PAO1 株についても同様に塩基配列を決定し、この配列と比較し、アミノ酸置換を伴うものを変異とした。臨床株の PCR 産物と野生株の PCR 産物を等量混合し、ヘテロデュープレックス反応によりそれらを合成した。合成産物を WAVE システム (トランスジェノミック)

にて DHPLC 分析を行った。DHPLC 分析は少なくとも 3 回施行した。

結果

全 114 株中、gyrA では Thr83Ile、Asp87Asn、Asp87Tyr、parC では Ser87Leu、Ser87Trp、Glu91Arg の変異をそれぞれ認めた。gyrA の変異では Thy83Ile が 48 例、Asp87Asn が 9 例、Asp87Tyr が 3 例、parC では Ser87Leu が 12 例、Ser87Trp が 2 例、Glu91Arg が 6 例であった。gyrA と parC 両方に認めた変異株は 16 例であった。アミノ酸変異の個数とレボフロキサシン耐性の間に有意な相関を認めた。また変異株すべてにおいて DHPLC 法で検出できた。

考察

臨床分離緑膿菌 117 株を被験菌株として、キノロン系抗菌薬の標的分子である DNA gyrase および type II topoisomerase をコードする遺伝子上の QRDR における変異によるアミノ酸置換とキノロン系薬耐性との関係について検討した。117 株のうち、QRDR の変異によるアミノ酸置換が認められた株は 48 株 (42.1%) であり、この頻度は過去の報告とほぼ一致した。変異の認められた 48 株ではすべて gyrA に変異が認められ、parC のみに変異を認められる株は存在しなかった。過去の報告では、緑膿菌の DNA gyrase に対するキノロン系薬の阻害活性は topoisomerase IV に対する阻害活性に比べ強く、キノロン系抗菌薬の緑膿菌に対する一次作用点は DNA gyrase であるとされている。ただし、今回はすべての QRDR 変異について検討していないため、遺伝子変異とキノロン系抗菌薬耐性について今後更なる検討が必要と思われる。

緑膿菌の薬剤耐性機構には、上記の遺伝子変異以外に薬剤排出ポンプ機構の関与も知られている。今回の検討で、アミノ酸変異株でレボフロキサシンに対する感受性が大きく異なるものを認めたが、この排出機構の発現亢進が関与している可能性も考えられた。

DHPLC 法では、黄色ブドウ球菌や淋菌において、キノロン系抗菌薬耐性株の遺伝子変異を検出した報告がある。今回の緑膿菌での検討でも、キノロン系抗菌薬耐性株すべてを DHPLC 法によって検出可能であった。DHPLC 法は、迅速に変異株を検出できる診断方法である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2339号	氏 名	松本 穰
論文題目 Title of Dissertation	尿路感染症由来緑膿菌臨床株における高速液体クロマトグラフィー法によるフルオロキノロン系抗菌薬耐性の迅速診断法確立への検討 Mutation in the <i>gyrA</i> and <i>parC</i> genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography.		
審査委員 Examiner	主 査 平井みどり Chief Examiner 副 査 堀田 博 Vice-examiner 副 査 西 慎一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【発表要旨】

(背景) 尿路感染症の主たる原因菌の一つである緑膿菌においてキノロン系抗菌薬耐性の上昇傾向を認めている。キノロン系抗菌薬の耐性機構は、代表的なものとして標的分子である type II トポイソメラーゼ(DNA ジャイレース、トポイソメラーゼIV)の変異があげられる。DNA ジャイレースにコードされる *gyrA*, およびトポイソメラーゼIVにコードされる *parC* 上にキノロン耐性決定領域 (Quinolone resistance determining regions: QRDR) と呼ばれる領域があり、この狭い領域に局在したアミノ酸変異が主にキノロン系抗菌薬の耐性獲得に関与するといわれている。QRDR におけるアミノ酸変異をより迅速に診断できれば、抗菌薬耐性が短時間で把握され、すみやかに適切な治療が開始でき、かつ耐性菌の増加を抑制し得ると思われる。アミノ酸変異を迅速に診断する方法として、denaturing 高速液体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography : DHPLC) 法があるが、未だ臨床応用に至っていない。DHPLC とは温度調節ヘテロ二本鎖分析法の1つである。まず、変異を含む PCR 産物と野生型 DNA を混在させ、加熱してヘテロ二本鎖分子とホモ二本鎖分子とに再重合させる (Heteroduplex 反応)。次に、従来の HPLC (高速液体クロマトグラフィー) でそれらを分離し、1 つもしくは2 つ以上のピークを示すことを確認する。

(対象) 2009 年 4 月より 2010 年 11 月までに神戸大学附属病院およびその関連施設で尿路感染症患者から 104 cfu/mL 以上の菌数で分離された緑膿菌 114 株を対象とした。

(方法) 米国の臨床検査標準協会(CLSI)の基準に準じ、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。各菌株より染色体 DNA を抽出し、QRDR を含む各領域を PCR 法にて増幅した。増幅された各遺伝子を精製し、DNA シークエンスを行った。感受性株である *P.aeruginosa* PAO1 株についても同様に塩基配列を決定し、この配列と比較し、アミノ酸置換を伴うものを変異とした。臨床株の PCR 産物と野生株の PCR 産物を等量混合し、Heteroduplex 反応によりそれらを合成した。合成産物を WAVE システムにて DHPLC 分析を行った。

(結果) 全 114 株中、*gyrA* では Thr83Ile, Asp87Asn, Asp87Tyr, *parC* では Ser87Leu, Ser87Trp, Glu91Arg の変異をそれぞれ認めた。アミノ酸変異の個数とレボフロキサシン (LVFX) 耐性の間に有意な相関を認めた。DHPLC の分析では、LVFX 耐性株はすべて 2 個以上のピークを示した。*gyrA* では 2 または 3 個以上のピークを示し、*parC* ではすべて 3 個以上のピークを示した。

(考察) LVFX 耐性株では、すべて 2 個以上のピークを示した。*gyrA* のパターンが 3 個以上のピークを示せば、有意に LVFX 耐性株である可能性が高い *parC* のパターンが 3 個以上のピークを示せば、高率に (88%) LVFX 耐性株であると判定できる。(結語) 多変量解析にてアミノ酸変異の個数と LVFX 耐性との間に有意な相関を認めた。DHPLC 法は迅速に LVFX 耐性株を検出できる診断方法である可能性が示唆されたが、*gyrA* および *parC* のパターンの組み合わせにより、迅速かつ正確な耐性の診断が臨床応用できる事が今後において期待される。

本研究は、キノロン系抗菌薬耐性株を迅速に検出する方法として、DHPLC 法について従来の診断法と比較しながら検討し、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、申請者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。