

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成11年度博士課程 入学

氏名 丹羽 秀和

指導教官 伊藤 喜久治

論文題目 PCR-LiPA を用いた薬剤耐性 *Campylobacter jejuni* および *C. coli* 迅速検出法の開発と応用

Campylobacter jejuni および *C. coli* は、世界中で主要な食中毒細菌である。通常カンピロバクター感染症の治療にはマクロライド系やフルオロキノロン系の抗菌剤が使用される。1990年代以降これらの抗菌剤に対して耐性を示す *C. jejuni* および *C. coli* のヒトや家畜、家禽における分離率の上昇が報告されるようになってきた。

これまで薬剤耐性 *C. jejuni* および *C. coli* の検出は、ディスク拡散法や希釈法により行われていたが、近年培養による薬剤感受性試験に代わる新たな方法として、分子生物学的手法を用いた耐性株の検出が試みられている。PCR and line probe assay (PCR-LiPA) は、メンブラン上に平行線状に固定した複数のプローブとラベルプライマーを用いて増幅した PCR 産物をハイブリダイズさせることで、PCR 産物中の目的とした配列を特異的に検出する方法である。*C. jejuni* および *C. coli* のマクロライドやキノロンに対する主要な耐性機構は、23S rDNA や *gyrA* などのそれぞれの薬剤の標的部位をコードする遺伝子の特定塩基の点変異によって起こることが報告されている。本論文ではこれらの変異を特異的に検出することで薬剤耐性 *Campylobacter* の迅速診断を目的とし、PCR-LiPA を用いた迅速検出法の開発を行った。

第1章では、分離株 23 株、*C. jejuni* 81116 を親株として作出したマクロライド耐性実験室内変異株 (実験室内変異株) 6 株、参照株として *C. jejuni* 81116 および *C. coli* NCTC 11366^T の 2 株を用

いて、マクロライド耐性株検出のために、23S rDNA の変異を検出するプローブセットを設計し、PCR-LiPA の開発を行った。設計した 10 種のプローブの中で野生型 (wild type) の配列を示す WT、G2057T (*Escherichia coli* の 23S rDNA の 2057 番目に相当する塩基の G から T への変異を検出するプローブ)、A2058G、A2059G、A2059T はそれぞれに対して相補的な配列を持つ DNA 断片に特異的に結合した。他のプローブでは、わずかに非特異反応が認められたものの、これらの DNA のハイブリダイゼーション像は特異的であり、それぞれの変異型を識別することが十分に可能であった。また、野外株を用いた検討では、PCR-LiPA によって 23S rDNA の *C. jejuni* および *C. coli* それぞれマクロライド耐性株のみに A2059→G の変異が確認された。他の変異型は検出されず、感受性株では変異は検出されなかった。これらの検出の結果は、すべて direct sequencing による変異の解析の結果と一致し、変異の有無とマクロライドに対する耐性の有無も一致していたことから、PCR-LiPA を用いたマクロライド耐性株の検出が可能であることが示された。また、実験室内変異株を用いた検討では、これらの株において変異は確認されず、23S rDNA の点変異とは異なる他の耐性メカニズムの存在が示唆された。

第 2 章では、第 1 章で開発した PCR-LiPA を改良し、分離株 40 株と参照株 2 株を用いてマクロライドおよびキノロン系抗菌剤に対する耐性の同時検出を目的とした Macrolide and quinolone line probe assay (MQ-LiPA) の開発を行った。第 1 章で作成したプローブの中から特に重要であると思われる変異を検出する 3 つのプローブ (WT, A2058G, A2059G) を選択し、新たに設計した *C. jejuni* および *C. coli* キノロン耐性検出用のプローブを加えた 11 種のプローブを含む MQ-LiPA 用のプローブセットを構築した。それぞれのプローブは、相補的な塩基配列を持つ DNA 断片と特異的に結合し、*C. jejuni* および *C. coli* の 23S rDNA および *gyrA* の点変異を検出可能な特異性を有していることが確認された。野外株を用いた検討では、マクロライド耐性株では MQ-LiPA によって 23S rDNA の A2059→G の変異が検出され、マクロライドの 1 種であるエリスロマイシンに対する耐性の結果と一致していた。キノロン耐性株においても *gyrA* の 86 番目のコドンの Thr から Ile へ (Thr-86→Ile) の変異が検出され、1 株を除き MQ-LiPA による耐性株の判定は、キノロン系抗菌剤であるナリジクス酸やオフロキサシンに対する耐性と一致していた。例外となった 1 株も現在キノロン系抗菌薬の主流であるフルオロキノロンに属すオフロキサシンに耐性を示し、臨床耐性株として問題となる株と考えられた。よって、MQ-LiPA によるマクロライドおよびキノロン耐性株の検出が可能であることが示された。また、*C. jejuni*、*C. coli* それぞれに設計したキノロン耐性検出用のプローブは、それぞれの菌種に対し特異的であったため、MQ-LiPA の薬剤耐性株検出法としての利用だけでなく *C. jejuni*、*C. coli* 間の識別法としての可能性も示された。

第 3 章では、神奈川県で分離されたヒト由来株 193 株および鶏肉由来株 56 株を用いて MQ-LiPA の評価を行い、さらにそれらの株のナリジクス酸、オフロキサシン、エリスロマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、ゲンタマイシン、ホスホマイシンに対する薬剤感受性を検討した。MQ-LiPA によって変異が検出されキノロン耐性株と判定された 25 株は、薬剤感受性試験においても耐性と判定された。検出されたキノロン耐性株の変異は 24 株で Thr-86→Ile の変異が、1 株では Asp-90→Asn の変異が検出された。同様に MQ-LiPA によって 23S rDNA の A2059→G の変異が検出されマクロラ

イド耐性株と判定された6株は、薬剤感受性試験でもエリスロマイシンに耐性であった。37株で薬剤感受性試験ではエリスロマイシンに耐性となったが、MQ-LiPAでは変異が検出されず感受性と判定された。これらの耐性株のMICの分布は耐性基準値付近(8~16 μ g/ml)であり、エリスロマイシンに高度耐性を示した変異株のMICの分布(\geq 128 μ g/ml)とは明らかに異なっていた。7種の抗菌薬に対する薬剤感受性を1979-1990年と1990-2001年の2つの期間で比較した結果、1990年以前にはまったく検出されなかったナリジクス酸およびオフロキサシン耐性株が、1990年以降明らかに増加していた。エリスロマイシンでは、1990年以降著しい耐性率の減少が認められたが、それぞれの期間における分離株のMICの分布は、1990年以前に分離された6株の高度耐性株を除き大きな違いは認められなかった。テトラサイクリンでは1990年以降に耐性率は減少がみられたが、アンピシリン、ゲンタマイシン、ホスホマイシンでは大きな変化はみられなかった。ヒト由来株と鶏肉由来株との比較では、キノロン耐性率とアンピシリン耐性率では鶏肉由来株がヒト由来株よりも高く、逆にホスホマイシン耐性株は、ヒト由来株のみであった。テトラサイクリン、エリスロマイシンでは大きな違いはみられなかった。ゲンタマイシンに対しては全株感受性であった。

第4章では、MQ-LiPAの*C. jejuni*、*C. coli*間の識別能を、第3章で使用した株を用いてこれまでに報告されている*C. jejuni*特異的プライマーセットであるHIP、CLならびに*C. coli*特異的プライマーセットであるCCとともに、通常広く行われている生化学性状試験の馬尿酸分解試験による*C. jejuni*、*C. coli*識別能と比較検討した。ほぼすべての株で各分子生物学的識別法で同一の結果が得られたが、HIPにおいて1株で他と異なる結果が観察された。この株について精製度の高いDNA抽出法を用いPCRを行った結果、バンドが検出され、他の方法の結果と完全に一致した。馬尿酸分解試験で陰性となり*C. coli*と判定された株の中で6株がMQ-LiPA、HIP、CL、CCでは、*C. jejuni*となったが、この中の2株の16S rDNAの塩基配列の解析の結果、*C. jejuni*CCUG11284^Tとの99.2%の相同性を示し*C. jejuni*と推定され、これら6株はこれまでに報告されている馬尿酸分解陰性*C. jejuni*であると考えられた。以上により、MQ-LiPAは、他の分子生物学的識別法と同様に高精度に*C. jejuni*、*C. coli*を識別できることが示された。

本研究で開発したPCR-LiPAを用いた*C. jejuni*および*C. coli*の迅速マクロライドおよびキノロン耐性株検出法(MQ-LiPA)は、それぞれの耐性に関わる遺伝子変異を特異的に認識することで迅速に耐性株を検出することができた。また、MQ-LiPAに用いる2組のキノロン耐性検出用プローブセットの特異性から、*C. jejuni*と*C. coli*の高精度な識別ができ、様々な要因により結果が左右されやすい馬尿酸分解試験の代替法としての可能性が示された。

MQ-LiPAは現在の段階では分離株を対象とした薬剤耐性*Campylobacter*迅速検出法であるが、今後プライマーなどの改良により糞便などの臨床サンプルから直接薬剤耐性株を迅速に検出する手段としての活用が考えられ、薬剤耐性*Campylobacter*感染症に対する初期治療時の効果的な化学療法のための情報を提供する手段として期待される方法であると考えられる。