

資料

Polymerase chain reaction法による
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌mecA遺伝子の検出

榎 美代子 門田 達尚 海佐 裕幸

Detection of the mecA Gene in Methicillin - Resistant
Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction

MIYOKO SAKAKI, TATSUHISA MONDEN, HIROYUKI UMISA

(Received Oct. 12, 1993)

はじめに

細菌感染症対策は化学療法の発達に負うところが多い反面、薬剤耐性菌の出現による難治性が問題となっている[1]. なかでもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(略称MRSA)は、1980年頃から院内感染の主要な起因菌の一つとして注目されてきた[1,2]. 現在、高度な医療技術の発達にともない免疫不全、高齢及び術後など感染しやすい患者が増加し、また菌の多剤耐

性、高度耐性化が進み治療は困難になってきており、早期に迅速な診断が望まれている。

これまでに本菌の耐性獲得機構については、ペニシリン結合蛋白(PBP)のPBP2'と呼ばれる新たな細胞壁合成酵素の産生によること、その本態が染色体上のmecA遺伝子によって支配されていることが明らかにされている[3].

今回mecA遺伝子を迅速に検出してMRSAを同定する目的でPolymerase chain reaction(PCR)法を試

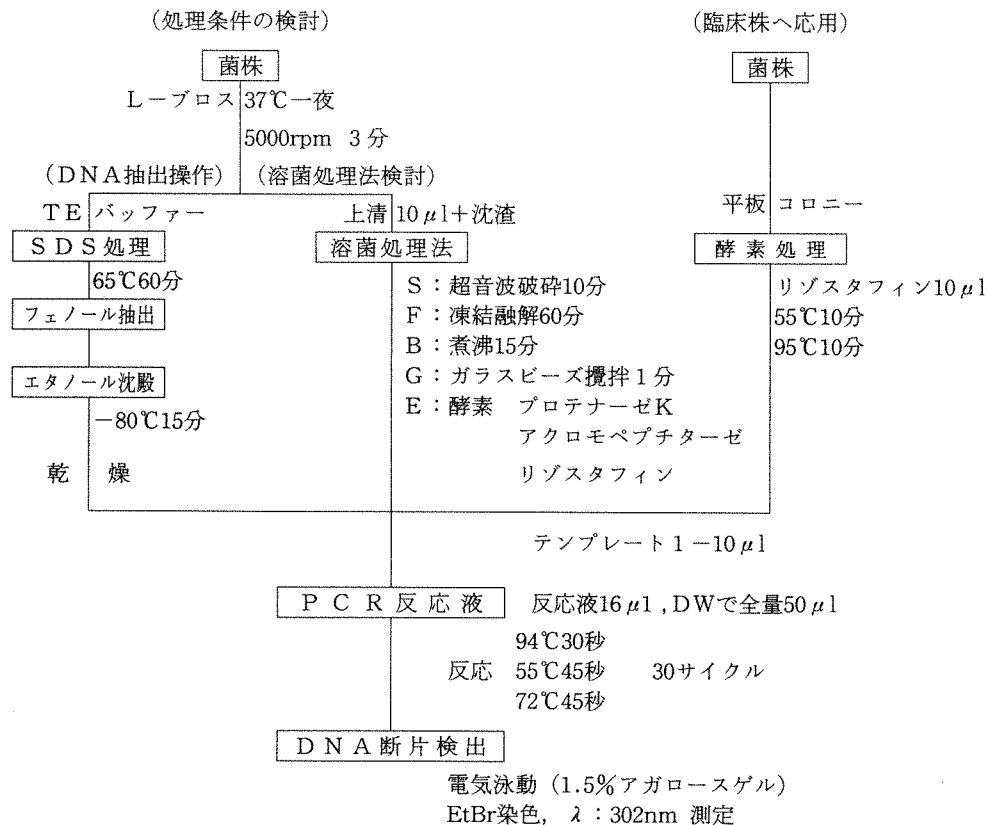


図1 実験方法及び検査のフローシート

み、被検菌の溶菌方法についても検討を加えたので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

1992年11月から1993年2月に分離された臨床材料由来のMRSA 15株と、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA) 6株及びコアグラウゼ陰性ブドウ球菌(CNS)である *S. epidermidis* 5株について血液寒天培地(自家製)、MRSA スクリーン培地(BBL製)及びOPA培地(BBL製)[4]で再分離を行い試験に供した。

2. 方法

図1に示すとおり、被検菌のMRSAとMSSAの各1株を用いてプライマーの選定及び溶菌方法の検討を行った。それらの成績をもとにし、臨床分離株について *mecA* 遺伝子の検出を試みた。

2-1. プライマーの選定

被検菌2株はL-プロスで37℃一夜培養し、それぞれの1mlと0.1mlを遠心し沈渣をTEバッファー[5]にとかしSDS処理(20%液, 65℃60分間)、フェノール抽出、エタノール沈殿のDNA抽出操作を行い鋳型(抽出DNAを50 μ lに溶かしその4 μ lを使用)とした。プライマーはSongら[6]の報告した *mecA* 遺伝子の領域から、20塩基前後の3対(増幅断片サイズ150bp[7], 285bp[8,9], 610bp[10])をベックス社へ受託合成し、PCR反応液中に100pmolになるように濃度を調整した。DNA増幅装置(アステックP-700)を用いて、変性(94℃, 30秒)、アニーリング(55℃, 45秒)、伸長(72℃, 45秒)のサイクルを30回繰り返した。増幅されたDNA断片は、アガロースゲル電気泳動後、EtBr染色しトランスイルミネーターで確認した。

2-2. 溶菌方法の検討

前記同様に被検菌を培養、遠心し上清10 μ lに沈渣を懸濁させ、その1 μ lずつを以下の溶菌方法の検討にあてた。超音波破砕法(タイテックP-30, 10分)、凍結融解法(-80℃と60℃各10分, 3回)、煮沸法(15分)、ガラスビーズ攪拌法(極東製ディスパースチューブ, 1分)及び3種類の酵素をもちいて酵素処理法を行った。即ち、プロテナーゼK(和光製)0.1mg/ml(終濃度以下同じ)は55℃60分で反応させ、アクロモペプチターゼ(和光製粗精製品:100unit, 1000unit, Solution I[5]で溶解)とリゾスタフィン(シグマ製:1mg/ml, 0.2mg/ml, TEバッファーで溶

解)は55℃10分で反応させた後、全ての酵素液について95℃10分加熱した。鋳型には遠心上清を使用した。増幅断片サイズ285bpのプライマー対と一部610bp域プライマー対を使用し、*mecA* 遺伝子の検出を行った。

2-3. 臨床分離株の *mecA* 遺伝子検出

被検菌全てについて平板コロニーをリゾスタフィン(1mg/ml)10 μ lに懸濁し55℃10分、その後95℃10分加熱し、前記と同様に処理して *mecA* 遺伝子の検出を行った。

結果

1. プライマーの選定

MRSA株増幅断片の電気泳動像(図2)にはそれぞれのプライマーに応じて目的サイズのDNA断片を認めた。増幅量は、鋳型DNAの量を十分の一に減じても差は認められなかった。しかし、150bp断片は他の二つのプライマーに比べて少ない増幅量であったこと、285bpと610bp断片は、PCRの反応条件を報告[8,10]より短時間に設定したが十分に増幅されたことから、溶菌方法の検討は後二者のプライマーを選んだ。MSSA株は図示していないがいずれからもDNA断片は認められなかった。

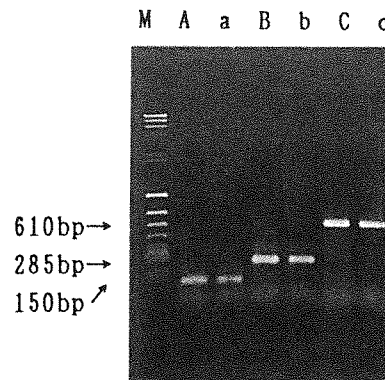


図2 プライマー検討の電気泳動像

M: マーカー λ DNA-HindIII/ ϕ X-174DNA-HincII Digest
A: *mecA*150bp B: *mecA*285bp C: *mecA*610bp
a, b, c: テンプレート量1/10

2. 溶菌方法の検討

酵素処理法以外の溶菌方法については、図3に示すように超音波破砕法、凍結融解法では2種類のプライマーとも明瞭にDNA断片が検出された。しかし煮沸法、ガラスビーズ攪拌法では285bp断片のみがわずかに検出されたため、以下プライマーは285bp増幅対を用いた。

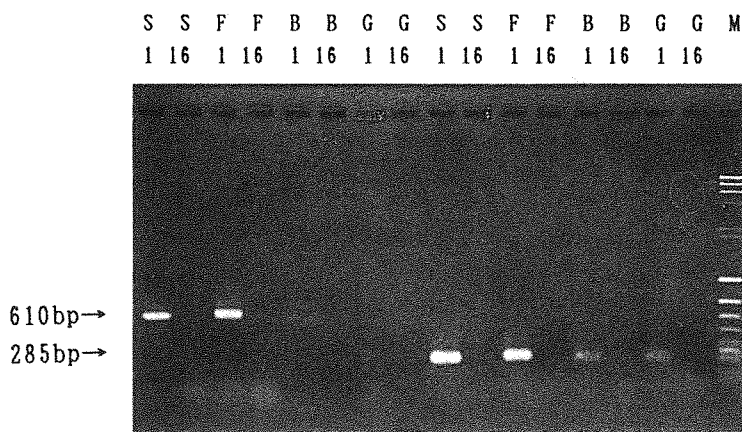


図3 溶菌方法検討の電気泳動像-1

M: マーカー λ DNA-HidIII/ ϕ X-174DNA-HincII Digest
 S: 超音波破碎10分 F: -80℃=60℃各10分を3回
 B: 煮沸15分 G: ガラスビーズ攪拌1分
 1: MRSA株 16: MSSA株

株については3株が *mecA* 遺伝子を有し、残り2株には認められなかった(図6)。

M BL E1 E2 E3 E4 E5 e1 e2 e3 e4 e5

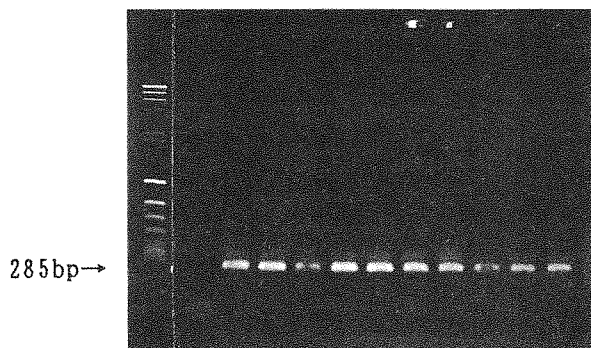


図4 溶菌方法検討の電気泳動像-2

M: マーカー λ DNA-HidIII/ ϕ X-174DNA-HincII Digest
 E1: プロテナーゼK処理 E2: アクロモペプチターゼ100u.
 E3: アクロモペプチターゼ1000u.
 E4: リゾスタフィン1mg/ml E5: リゾスタフィン0.2mg/ml
 BL: 試薬ブランク
 大文字は遠心上清 e: 沈渣を含む

酵素処理法は、鋳型に遠心上清、沈渣のいずれを用いてもDNA断片が検出された(図4)。このことから溶菌方法については、所要時間、操作の簡便性から酵素処理法が有効であった。なかでもリゾスタフィン処理は使用した0.2mg/ml-1mg/mlの濃度範囲では操作性が良好であった。本法はDNA抽出操作に比べ操作が簡単で、操作時間も約4時間に短縮することができた。

3. 臨床分離株の*mecA*遺伝子検出

臨床材料由来のMRSA 15株はすべて *mecA* 遺伝子を有することが確認されたが(図5)、MSSA株についてはすべて陰性であった。また、*S. epidermidis* 5

考 察

溶菌方法については、コレラ菌や下痢原性大腸菌の場合は煮沸法で対応してきたが[11,12]、今回の被検菌はグラム陽性菌で強固なペプチドグリカン層を有していることから、これまでDNA抽出操作を用いる報告(所要6[13],7[14]時間)が多かった。また、煮沸法による報告[15]もみられるが、今回の結果から確実な方法とは言い難かった。また、超音波破碎法、ガラスビーズ攪拌法については菌が飛散する危険性があり、凍結融解法は長時間を必要とした。これらに比べ酵素処理法は最も簡便であり、鋳型に沈渣を用いてもDNA断片が明瞭に検出されたことから、平板コロニーを溶菌し、そのまま鋳型として使用できる事が明らかとなった。また、リゾスタフィン処理はアクロモペプチターゼ処理に比べて今回の濃度域では溶液が澄明になることから使い易く、溶液を凍結後再使用しても支障はなかった。これらのことから今回の酵素処理法は、従来のDNA抽出操作よりも操作性にすぐれ、時間的にも短縮することができた。さらに迅速性を求めるならば、臨床材料から直接検出する方法が考えられるが、*mecA* 遺伝子が *S. epidermidis* から検出されたように他のCNSにも存在することから、同時に菌の分離同定が必要であると思われる。

MRSAは一般的には薬剤感受性によって判定されているが、薬剤の種類、培地のpHや塩濃度、培養温度等の条件に左右され易く測定に48時間を要す[4]。

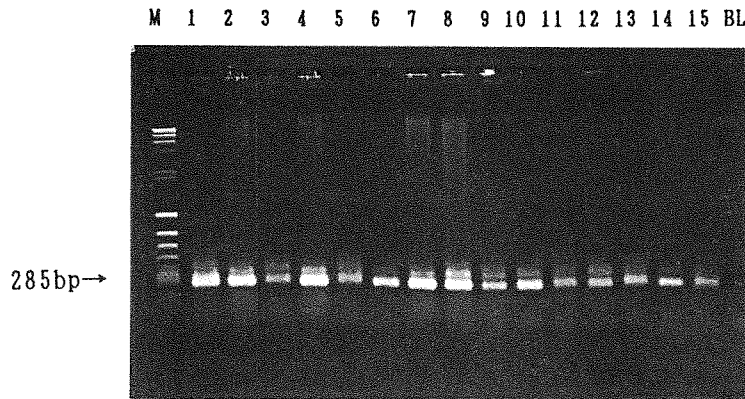


図5 臨床株のmecA遺伝子増幅断片像-1

M: マーカー λ DNA-HidIII/ ϕ X-174DNA-HincII Digest
1-15: 被検菌番号 (MRSA)
BL: 試薬ブランク

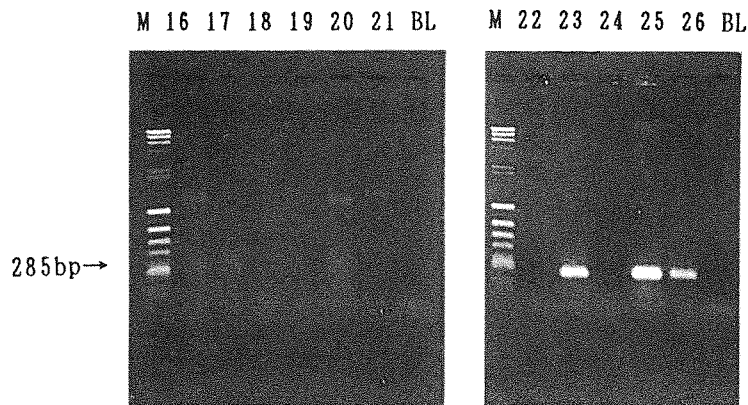


図6 臨床株のmecA遺伝子増幅断片像-2

M: マーカー λ DNA-HidIII/ ϕ X-174DNA-HincII Digest
16-21: 被検菌番号 (MRSA)
22-26: 被検菌番号 (*S. epidermidis*)

一方、今回前処理を簡便化したPCR法は黄色ブドウ球菌からMRSAを特異的に短時間で検出できることから、今後は日常検査に取入れていきたい。

結 語

MRSAを迅速に同定するためにPCR法を試み、おもに溶菌方法について検討を加えた。溶菌方法は、超音波破碎法、凍結融解法、煮沸法、ガラスビーズ攪拌法及び酵素法として、プロテナーゼK処理、アクロモペプチターゼ処理、リゾスタフィン処理について検討した。その結果平板コロニーをリゾスタフィン10 μ l (濃度0.2mg/ml-1mg/ml, TEバッファーで溶解)

で55 $^{\circ}$ C10分、続いて95 $^{\circ}$ C10分加熱する方法が最も簡便であった。PCRの反応条件を短縮しても目的DNA断片は十分増幅され全工程約4時間でmecA遺伝子の検出が可能となった。

臨床材料由来の被検菌はMRSA 15株と*S. epidermidis* 3株がmecA遺伝子を有することが確認され、MSSA 6株と*S. epidermidis* 2株については陰性であった。

謝 辞

菌株を供与していただいた県立広島病院の関係各位に深謝致します。

引用文献

- 1) 紺野昌俊 (1993) : なぜいまMRSAか. 医学のあゆみ, 166, 229-233.
- 2) 島田 肇 (1986) : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), 日本臨床, 44, 2112-2121.
- 3) Matsuhashi, M., M. D. Song, F. Ishino, M. Wachi, M. Doi, M. Inoue, K. Ubukata, N. Yamashita, and M. Konno (1986) : Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., 167, 975-980.
- 4) 林 智恵子, 菅原和行, 賀来満夫 (1993) : MRSA スクリーニング培地とその使用法, 検査と技術, 21, 393-399.
- 5) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1989) : Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 6) Song, M. D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino, and M. Matsuhashi (1987) : Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion, FEBS Lett., 221, 167-171.
- 7) Ubukata, K., S. Nakagami, A. Nitta, A. Yamane, S. Kawakami, M. Sugiura, and M. Konno (1992) : Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant *staphylococci* by enzymatic detection polymerase chain reaction products, J. Clin. Microbiol., 30, 1728-1733.
- 8) 生方公子 (1993) : PCRによる*mecA* 遺伝子の検策, 医学のあゆみ, 166, 311-314.
- 9) 平松啓一 (1992) : *mecA* 遺伝子の検出とMRSA, 臨床と微生物, 19, 291-296.
- 10) 小林一寛, 吉永哲夫 (1992) : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 診断用PCR法, 臨床と微生物, 19, 655-657.
- 11) 小林一寛 (1991) : 下痢起病性細菌診断のためのPCR法, 防菌防黴誌, 19, 285-294.
- 12) 榊 美代子, 香川倫明, 山根博文, 加藤和博, 濱中宏範, 松田昌之, 渊上浩美 (1992) : PCR法による井戸水の下痢原性大腸菌の毒素等検査について, 広島県獣医学会雑誌, 7, 61-65.
- 13) 東山康仁, 古賀宏延, 河野 茂, 前崎繁文, 賀来満夫, 原 耕平 (1993) : Polymerase chain reaction法による咽頭ぬぐい液からのメチシリン耐性ブドウ球菌 *mecA* 遺伝子の検出, 感染症誌, 67, 12-16.
- 14) 岡本了一, 大久保豊司, 井上松久 (1991) : PCR法によるMRSA迅速診断法, *Modern Physician*, 11, 1421-1425.
- 15) 山下啓子, 香川昌平 (1992) : 非放射性プローブを用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出と同定, 医学のあゆみ, 162, 535-539.

