

# 福島 和子 論文内容の要旨

## 主 論 文

### Rapid Screening of Topoisomerase Gene Mutations by a Novel Melting Curve Analysis Method for Early Warning of Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Emergence

融解温度曲線分析法を用いたフルオロキノロン耐性肺炎球菌の迅速検出と耐性化ポテンシャルをもつ肺炎球菌の警告

福島和子、平潟洋一、菅原和行、柳原克紀、近藤 晃、河野 茂、上平 憲

Journal of Clinical Microbiology • 44 巻 12 号 4553-4558 2006 年  
[6 ページ]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学 専攻  
(主任指導教員：上平 憲 教授)

#### 緒 言

肺炎球菌は市中肺炎の主要な病原微生物である。β-ラクタム系抗菌薬に対する耐性化が広がるなかで、フルオロキノロン(以下 FQ)は肺炎球菌に対する治療薬として重要な役割を担っているが、近年FQ耐性肺炎球菌の分離率が上昇し世界的に問題となっている。

FQへの耐性化機構には、DNA複製に重要な役割を担うトポイソメラーゼ酵素を支配する *gyrA* 遺伝子と *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域(以下 QRDR)の点変異が深く関係する。

従来の薬剤感受性検査法は判定まで3日を要し、新たな検査法としてQRDR変異を標的とした核酸検査も報告されつつあるが、いずれも手技が煩雑で時間を要し、臨床検査として不十分である。そこで本研究において、*parC* 遺伝子と *gyrA* 遺伝子のQRDR変異を標的とし、融解温度曲線分析法を応用した迅速かつ簡便なFQ耐性肺炎球菌の検出法を開発し、その臨床的な意義を評価した。

#### 対象と方法

1. 菌株：レボフロキサシン(以下 LVX) 耐性肺炎球菌臨床分離株 22 株と LVX 感受性肺炎球菌臨床分離株 50 株の計 72 株を対象とした。

2. PCR-MCA 法：*gyrA* および *parC* 遺伝子の QRDR 領域を PCR で増幅し、それぞれの遺伝子の QRDR 変異領域 (*parC* 遺伝子の Ser79 と Asp83, *gyrA* 遺伝子の Ser81 と

Gly85; 合計 4 箇所) を標的とした特異プローブを用いて、融解温度特性に基づき QRDR 変異解析を行った (real-time PCR combined with melting curve analysis method: PCR-MCA 法)。

3. シークエンス法：上記 PCR による増幅産物の塩基配列をダイレクトシークエンス法にて解析し、野生標準株である *Streptococcus pneumoniae* strain R6 の塩基配列と比較した。

4. 薬剤感受性試験法：4 剤の FQ (LVX, シプロフロキサシン (以下 CIP), ガチフロキサシン (以下 GAT), モキシフロキサシン (以下 MXF)) について各菌株の薬剤感受性を液体希釈法で評価し、PCR-MCA 法による QRDR 変異解析結果と比較した。

## 結 果

PCR-MCA法にて、標的とした $parC$ 遺伝子と $gyrA$ 遺伝子の合計 4 箇所のQRDR変異を約1時間の行程で解析できた。本法でQRDR変異型を検出した25株全ての株でシークエンス法でもQRDR塩基変異が確認され、PCR-MCA法の変異型診断率は100%であった。問題点として、変異型で互いに融解温度の近接するパターンを認め、本法を用いた変位塩基の同定は困難と考えられた。

PCR-MCA法と従来の薬剤感受性試験法との対比では、LVX耐性株22株では全株にQRDR変異を検出し、その診断感度は100%であった。一方、LVX感受性株50株中3株に $parC$ 遺伝子変異が検出され、本法のLVX耐性肺炎球菌の診断特異度は94% (47/50)であったが、この3株はFQ耐性獲得様式を考慮すると将来的に耐性化するポテンシャルの高い株と考えられた。その他の3剤のFQについて、PCR-MCA法の診断感度と特異度はCIP耐性株で100%と100%、GAT耐性株で100%と92%、MXF耐性株で100%と82%であった。

## 考 察

本研究にて、肺炎球菌の FQ 耐性に深く関係するトポイソメラーゼ遺伝子の QRDR 変異を迅速かつ正確に検出する方法を確立した。

PCR-MCA 法による FQ 耐性株の診断特異度の相違は薬剤感受性試験法でとらえることが不可能であった第 1 段階の QRDR 変異を有する肺炎球菌株を検出している点にあった。

FQ 耐性獲得様式はまず  $parC$  遺伝子の遺伝子変異が起こり、さらに  $gyrA$  遺伝子変異が段階的に加わることにより耐性を獲得するとされる。実際、治療前に FQ 感受性であった肺炎球菌が治療中に FQ 耐性を獲得し治療が失敗に終わった報告が相次いでおり、FQ 感受性菌の中に耐性化ポテンシャルの高い群が存在することを示唆している。本法は FQ 耐性肺炎球菌の迅速診断のみならず、FQ 感受性菌に潜む QRDR の第 1 段階変異保有菌株を検出し耐性化ポテンシャルの高い菌を警告する手段としても有望であり、臨床において大きなインパクトを与えられられる。