



## Use of a three-dimensional microarray system for detection of levofloxacin resistance and the mecA gene in *Staphylococcus aureus*

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長岡, 智紀 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/322">http://hdl.handle.net/10271/322</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 421号	学位授与年月日	平成18年 2月15日
氏名	長岡智紀		
論文題目	Use of a three-dimensional microarray system for detection of levofloxacin resistance and the mecA gene in <i>Staphylococcus aureus</i> (三次元マイクロアレイシステムを用いた黄色ブドウ球菌におけるレボフロキサシン耐性と mecA 遺伝子の検出)		

博士(医学) 長岡智紀

## 論文題目

Use of a three-dimensional microarray system for detection of levofloxacin resistance and the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus*

(三次元マイクロアレイシステムを用いた黄色ブドウ球菌におけるレボフロキサシン耐性と*mecA*遺伝子の検出)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

敗血症の原因菌となる黄色ブドウ球菌は、抗菌薬耐性を有するため、抗菌薬による効果的な治療を困難にしている。現在、抗菌薬耐性の検査法としては、感受性試験が用いられているが、最終的な検査結果が得られるまでに2-3日を要する。また近年では、遺伝子による抗菌薬耐性の検査法も用いられてきているが、いずれも操作が煩雑であり、臨床検査室での運用には限界がある。我々はこれらの問題を解決し、臨床検査室での運用に期待できる、三次元マイクロアレイシステム(PAMマイクロアレイ)による多項目遺伝子解析法を開発した。この三次元マイクロアレイは、ユニークなフィルター状の透過型基板を用いることでプローブDNAの固相化面積を数百倍に増加し、サンプル溶液の液駆動を可能とし、ハイブリダイゼーションを短時間に行える。また、ハイブリダイゼーションを自動的・連続的に観察できるため、各項目に対して最適条件下の観察が可能となった。このPAMマイクロアレイの遺伝子突然変異解析法を黄色ブドウ球菌におけるレボフロキサシン耐性と*mecA*遺伝子の検出に応用し、その有効性を評価した。

[材料ならびに方法]

24株のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌と3株のメチシリン感受性黄色ブドウ球菌由来のゲノミックDNAを鋳型として、マルチプレックスPCRにてDNAジャイレース遺伝子、DNAトポイソメラーゼIV遺伝子及び*mecA*遺伝子の3つの蛍光標識増幅断片を得た。レボフロキサシン耐性は、DNAジャイレース及びDNAトポイソメラーゼIV遺伝子上にあるキノロン耐性決定領域の点突然変異の解析により判定できる。そこで、18種類の遺伝子型決定のために各標的配列に対する野生型の配列と、一つ以上の変異型の配列を持つプローブDNAを設計した。また、メチシリン耐性は*mecA*遺伝子の存在によって決定されるため、*mecA*遺伝子の一部の配列を持つプローブDNAを設計した。これらのプローブDNAをマイクロアレイ上に固相化した後、マルチプレックスPCRの増幅断片を、マイクロアレイ上で50℃、6×standard saline phosphate EDTA(SSPE)存在下で同時にハイブリダイズさせ、3×、1×、0.5×、0.05×SSPEの順に連続的に後洗浄を行い、各5段階での蛍光検出を行った。点突然変異の解析は、シーケンシング・バイ・ハイブリダイゼーション法で、各同一標的配列プローブ間で最もシグナル強度の高いプローブ配列を完全一致配列と判定した。また、*mecA*遺伝子の存在確認は、リバーズ・ドット・プロット・ハイブリダイゼーション法で、*mecA*遺伝子検出用プローブの蛍光シグナル強度が露光時間0.2秒の時に3000以上であるものを陽性として判定した。

[結果]

分離株でのPAMマイクロアレイによるキノロン耐性決定領域の点突然変異の遺伝子型は、5段階のSSPE

濃度のうち6×と0.5×の2段階のハイブリダイゼーション条件のみで判定でき、18種類の点突然変異の判定結果は従来法のDNA塩基配列決定法と完全に一致した。また、*mecA*遺伝子の検出結果も従来のPCRの判定結果と完全に一致した。ハイブリダイゼーション時間は8分で終了し、その後の2段階での後洗浄による測定とデータ解析を合わせても合計25分程度と非常に短時間で終了した。

#### 〔考察〕

PAMマイクロアレイを用いた、黄色ブドウ球菌のレボフロキサシン耐性と*mecA*遺伝子の遺伝子突然変異同時検査法は、迅速で簡便、特異的と考えられた。また、このマイクロアレイの最大の特徴である、一枚のマイクロアレイ上で各標的DNAとプローブDNAに対して最適なハイブリダイゼーション条件で観察できることは、ハイブリダイゼーション条件の最適化に有利であり、データの再現性を高めていると考えられた。この検査法はPCRによる標的DNAの増幅に2時間程度かかるため、さらに簡便かつ短時間に行うためには、その他の遺伝子増幅法もしくは、増幅を用いない方法が将来的に必要であろう。

#### 〔結論〕

我々の開発したPAMマイクロアレイによる黄色ブドウ球菌のレボフロキサシン耐性と*mecA*遺伝子の遺伝子突然変異同時検査法は、迅速性、特異性、簡便性、再現性に優れた方法であり、この技術が将来的に臨床検査室で応用される可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

起因菌の薬剤耐性に関する情報は、治療薬の選択に極めて重要であることは論をまたない。現在行われている薬剤感受性試験では結果が得られるまでに2-3日を要する。そこで、遺伝子による抗菌薬耐性検査が種々試みられているが、いずれも操作が煩雑であり、臨床検査室での運用には限界がある。これらの問題を解決するために、申請者らは、現実に臨床検査室レベルでも運用可能な三次元マイクロアレイシステム(PAMマイクロアレイ)による多項目遺伝子解析法を開発した。本研究ではこのPAMマイクロアレイを用いて、黄色ブドウ球菌におけるレボフロキサシン耐性に関与する突然変異遺伝子とメチシリン耐性に関与する*mecA*遺伝子の検出を行い、その有効性を検討した。

方法と得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) サンプル調整：黄色ブドウ球菌(ほとんどはメチシリン耐性)からDNAを抽出し、マルチプレックスPCRを行い、レボフロキサシン耐性に関与するDNAジャイレース遺伝子、DNAトポイソメラーゼIV遺伝子とメチシリン耐性の責任遺伝子である*mecA*遺伝子の3つの蛍光標識PCR産物を同時に得た。
- (2) プローブの設計：DNAジャイレースおよびDNAトポイソメラーゼIV遺伝子上にあるキノロン耐性決定領域の既に報告されている点突然変異と野生型を検出するプローブをセンス、アンチセンス合わせて36作製した。また、*mecA*遺伝子に対するプローブも作製した。
- (3) PMAマイクロアレイ法：PAMはフィルター状の透過基板であるため、プローブの固相化面積を数百倍に増加し、サンプル溶液を圧によって透過させることが可能である。これに上記プローブを固相化後、PCR産物を添加、50℃、6×standard saline phosphate EDTA (SSPE)でハイブリダイズさせ、5段階の濃度のSSPEで後洗浄を行い、蛍光検出を行った。これらの操作のために、マイクロアレイ検出装置(FD10、オリンパス)を開発した。

