

Broth Direct-PCR 法による MRSA 薬剤耐性遺伝子 *mecA* の迅速検出

片野秀樹^{*1,*5}・横山久美^{*2}・武井 泰^{*3}・築地真実^{*4}・松本秀明^{*1}

Broth Direct-PCR for Rapid Detection of Antibiotic Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA)

Hideki KATANO^{*1,*5}, Kumi YOKOYAMA^{*2}, Yasushi TAKEI^{*3},
Mami TSUKIJI^{*4} and Hideaki MATSUKI^{*1}

〈抄録〉

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: PCR) 法によってメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) の遺伝子検出を迅速、簡便に行う新たな方法として、DNA 抽出操作なしに培養後のブロスから菌体を直接反応液に添加する Broth direct-PCR (BD-PCR) 法を検討した。操作方法は、添加する菌量を反応液 50 μ l 当たり 10^{-1} ~ 10^{-3} に希釈した菌液 3 μ l を使用することによって再現性の良い結果が得られることを見出した。具体的には、培養後のブロスを 10^{-1} から 10^{-3} まで希釈した培養液各 3 μ l を PCR 反応液 (Taq ポリメラーゼおよび 2 種類のプライマー含有) に加え、94 $^{\circ}$ C・5 分 → (94 $^{\circ}$ C・30秒 → 55 $^{\circ}$ C・30秒 → 72 $^{\circ}$ C・60秒) を 1 サイクルとして 30 サイクルの条件で PCR を行った。その結果、MRSA 薬剤耐性遺伝子 *mecA* が BD-PCR 法によって迅速かつ簡便に再現性よく検出することを見出した。

Key words : ブロスダイレクト PCR 法、BD-PCR 法、METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)

I. はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) はペニシリン耐性黄色ブドウ球菌に有効な β -ラクタム剤であるメチシリンに耐性を獲得した黄色ブドウ球菌のことである。MRSA の病原性は常在菌である黄色ブドウ球菌と同等であり、健常者に感染しても症状は比較的軽微なことが

多い (平松、1992)。しかし、乳幼児、高齢者、免疫不全患者などに MRSA が感染すると MRSA 腸炎や敗血症などを引き起こして死に至る場合もある (清水、1992; 坂田、2001; 那須、1992)。したがって、MRSA が医療現場で蔓延すれば深刻な事態に陥ることから、院内感染において最も注意を払わなければならない細菌の一つである (加藤ほか、1996)。このため多くの医療現場では、MRSA の伝播を予防することが最優先となっており、予防手段の一つに迅速ポリメラーゼ連鎖反応

*1 東海大学健康科学部 (Tokai University School of Health Sciences)

*2 東京医療保健大学 (Tokyo Healthcare University)

*3 岐阜医療科学大学 (Gifu University of Medical Science)

*4 神奈川県立保健福祉大学 (Kanagawa Prefectural University of Human Service)

*5 ベネクス総合研究所 (Venex Reserch Institute)

(Polymerase Chain Reaction: PCR) 法によって MRSA のスクリーニングが実施されている (北川ほか、1992)。

従来から行われている PCR 法では、MRSA のコロニーから鋳型 DNA を抽出・精製して用いていた。しかし、この方法では DNA 調整に時間と手間が費やされていた。このため、DNA の検出を迅速、簡便に行う方法として DNA 抽出操作を省略し、滅菌爪楊枝を用いてコロニーを直接反応液に添加するコロニーダイレクト PCR (CD-PCR) 法が考案された (片井ほか、2004)。この方法は一般的に *E. coli* などのグラム陰性菌において用いられているが、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌では再現性が低いため、これまで不向きと報告されていた (土崎ほか、2000)。その後、Taq ポリメラーゼの代わりに高性能の DNA ポリメラーゼ (KOD-Plus-DNA Polymerase) を用いたコロニーダイレクト PCR 法によって、グラム陽性菌でも高い再現性が得られたと土崎らは報告している (土崎ほか、2000: Tsuchizaki et al. 2001、片井ほか、2004)。しかし、高性能の DNA ポリメラーゼは従来の Taq ポリメラーゼと比較すると高額で、操作方法も簡便ではない。

そこで、われわれは従来から用いている安価で簡便な

Taq ポリメラーゼを使用して、再現性の高い MRSA 薬剤耐性遺伝子 *mecA* の新しい迅速検出法を検討した。

II. 材料及び方法

〔供試菌〕

当研究室で継代培養され、薬剤感受性試験によってオキサシリンに対して耐性で、PCR 法によって MRSA 耐性遺伝子 *mecA* の増幅が認められた臨床分離株 MRSA を用いて検討した。

〔*mecA* の検出〕

供試菌である MRSA をハートインフュージョン寒天平板培地 (HI: 日水製薬) で分離培養、生育したコロニーを白金線で釣菌し、ハートインフュージョン液体培地 (HI プロス: Difco 社) 100ml に植菌、37°C、15~18時間好気的に培養後、この HI プロス (O.D. 値 = 0.907~0.977, A_{550}) を用いて MRSA 耐性遺伝子 *mecA* の確認を行った。以下に *mecA* 確認方法の詳細を示す (図 1)。*mecA* の増幅に用いたプライマーは、5'-GGTGGTTACAACGTTACAAG-3' と 5'-GCATTGTAGCTAGCCATTCC-3' である (TaKaRa)。Taq

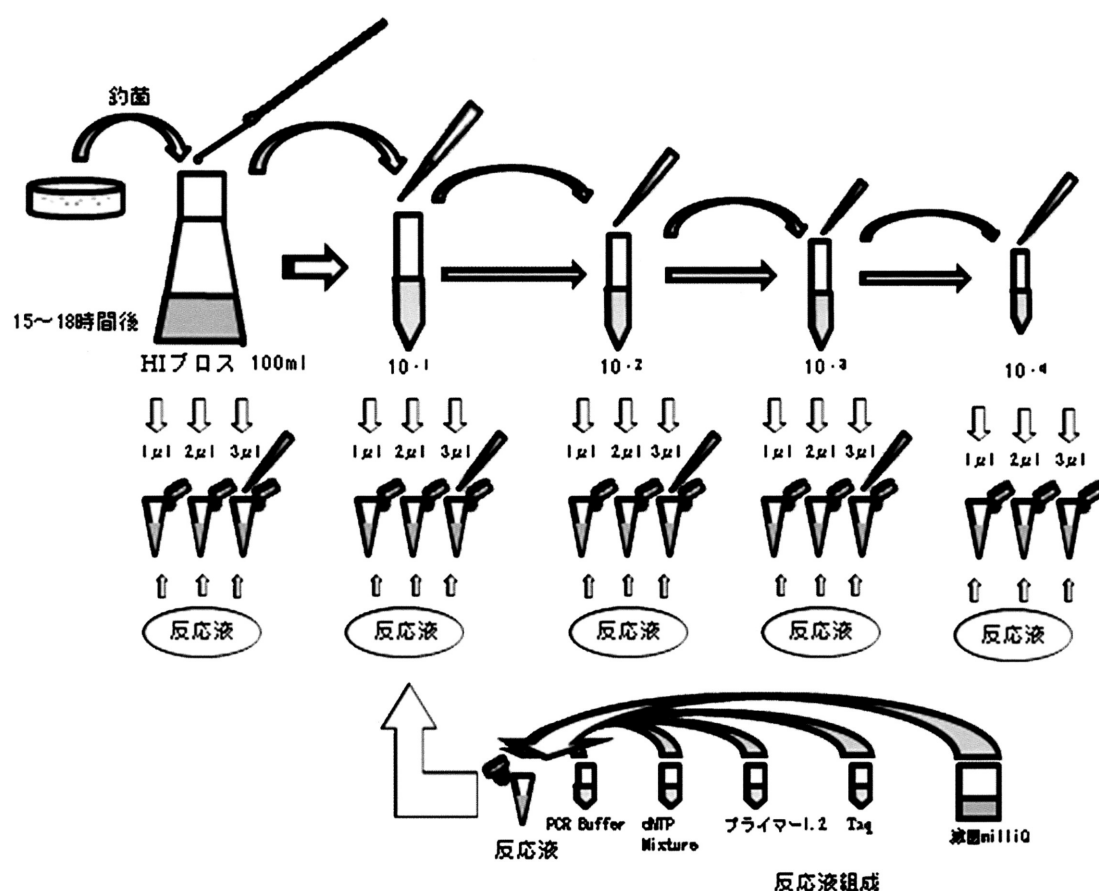


図1 プロスダイレクト法

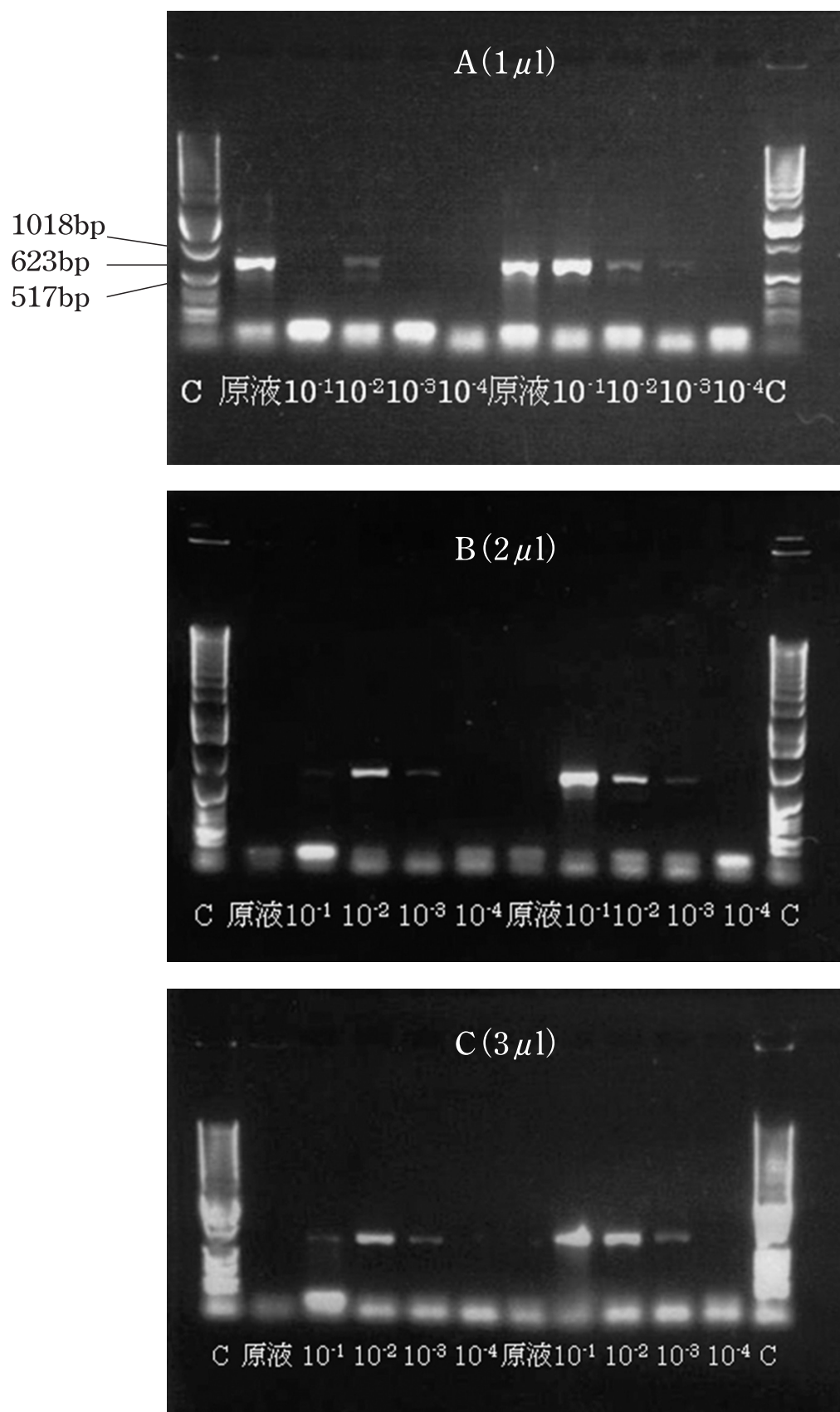


図2 異なった菌体量における BD-PCR 法による *mecA* の検出

C: 1Kb DNA ladder, bp: base pair

polymerase には TaKaRa Taq™ (TaKaRa) を使用し、PCR 反応液は 50 μ l で調整した (PCR Buffer 5 μ l、dNTP Mixture 4 μ l、2 種類のプライマー各 1 μ l (50pmol)、Taq™ 0.25 μ l、滅菌 milliQ 38.75 μ l)。PCR 反応には、培養後の HI プロス (1 ml) を滅菌 HI プロス (9 ml) を用いて 10^{-1} ~ 10^{-4} まで 10 倍階段希釈し、各々の希釈液 1 μ l、2 μ l、3 μ l を反応液に直接添加し、PCR 用サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2400 : PERKIN ELMER, USA) を用いて実施した。PCR の条件は、94°C、30 秒 (変性)、55°C、30 秒 (プライマー結合)、72°C、1 分 (伸展) を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。PCR 反応産物試料 5 μ l に loading buffer 1 μ l を加え、染色液ゲルスター (TaKaRa) 含有電気泳動用アガロースゲルのウェルに試料 5 μ l を添加して 20 分間泳動後、UV トランスイルミネーターを用いて写真撮影を行って 623bp の MRSA 耐性遺伝子 *mecA* を確認した (森脇、2003 ; 武井、2006)。

III. 結 果

1. 異なった菌体量における BD-PCR 法による *mecA* の検出

PCR 反応液へ添加する原液および各希釈液の菌体量を 1 μ l、2 μ l、3 μ l として PCR で実施した結果を各々図 2 A、図 2 B、図 2 C に示した。その結果、添加菌体量 1 μ l (図 2 A) における増幅バンドは、原液および各希釈液で認められたが、増幅バンド検出の再現性は不安定であった。添加菌体量 2 μ l (図 2 B) における増幅バンドは、原液では認められず、希釈液 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} で確認されたが、添加菌体量 1 μ l と同様に増幅バンド検出の再現性は不安定であった。添加菌体量 3 μ l (図 2 C) における増幅バンドは、原液では確認されず、希釈液 10^{-1} ・ 10^{-2} ・ 10^{-3} で検出され、いずれの希釈液でも再現性が安定していた。

2. 異なった菌体量における MRSA 耐性遺伝子 *mecA* の再現率

PCR 反応液へ添加する原液および各希釈液の菌体量

を 1 μ l、2 μ l、3 μ l として PCR で実施した後における MRSA 耐性遺伝子 *mecA* の再現率を表 1 に示した。その結果、添加菌体量 1 μ l における原液および各希釈液の再現率は 0~82% であった。添加菌体量 2 μ l における原液および各希釈液の再現率は 10^{-2} 希釈液で 100% であったが、原液および他の希釈液では 18~82% であった。添加菌体量 3 μ l における原液および各希釈液の再現率は希釈液 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} で 100% であったが、原液および希釈液 10^{-4} では 8% であった。

IV. 考 察

本研究では MRSA を対象に薬剤耐性遺伝子 *mecA* の PCR による検出の簡便化と迅速化を目的として、DNA 抽出操作なしに培養後のプロスから菌体を直接反応液に添加する BD-PCR 法を検討した。その結果、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} の希釈液 3 μ l を反応液に添加すると Taq ポリメラーゼを用いても再現性良く遺伝子の有無を迅速に検出することが、明らかになった。

菌体中には、PCR に阻害的な成分が含まれているため直接反応液に菌体を添加する方法では、PCR スタート時点の加熱により鋳型として必要量の DNA が溶出し、菌体成分が PCR を阻害することが報告されている (土崎ほか、2000)。従って、菌体成分を阻害しない程度の添加菌量が必要であると考えられる。

本実験では、添加量が 1 μ l、2 μ l と微量な場合には測定手技による誤差が発生しやすく、再現性が不安定であった。

一方、添加量 3 μ l の場合には、測定手技による添加量の誤差も少なくなり、高い再現性が得られた。このことから、添加量が微量な場合には、測定手技の誤差が発生しやすいことが考えられる。

また、原液や低濃度 (10^{-4}) の培養液 3 μ l を反応液へ添加した場合における *mecA* の再現率は、増幅バンドの出現が不安定であった。つまり、原液では、阻害的成分を持つ菌体量が多く存在したため PCR の反応に再現性が得られなかったと推測された。一方、低濃度では、PCR の反応に必要な菌体量が不足したためであると考え

表 1 異なった菌体量における MRSA 耐性遺伝子 *mecA* の再現率 (%)

添加量	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1 μ l	73	82	55	64	0
2 μ l	27	82	100	73	18
3 μ l	8	100	100	100	8

n = 11

えられた。この我々の成績は、土崎らの報告を裏付ける結果となった。

グラム陰性桿菌で常用されている CD-PCR 法においては、MRSA 薬剤耐性遺伝子 *mecA* の検出時に滅菌爪楊枝を用いてコロニーを直接採取する際に熟練を要することが報告されている（土崎ほか、2000）。

しかし、我々が用いた一定菌量（3 μ l）を添加する BD-PCR 法では、トレーニングを必要とせず、一定の菌量を安定的に添加することができることから、誰でもがより確実に再現性が得られる手軽で確実な PCR 法であることが今回の結果から明らかになった。

また、一般的に PCR 法では、DNA ポリメラーゼとして、Taq ポリメラーゼが用いられているが、CD-PCR 法によって MRSA の耐性遺伝子である *mecA* を検出するには Taq ポリメラーゼは不適当であると報告されている（土崎ほか、2000）。

しかしながら、我々の確立した、BD-PCR 法では、Taq ポリメラーゼを用いても、安定的に標的遺伝子である *mecA* を得ることができた。従って、高価で高性能な DNA ポリメラーゼを使うことなく安価で一般的な Taq ポリメラーゼでも確実に MRSA 耐性遺伝子である *mecA* を検出することができることが明らかになった。

以上のことから、我々の考案した迅速・簡便な BD-PCR 法を活用することによって、医療現場で蔓延している MRSA のスクリーニングに役立つことが期待できる。

さらにより迅速で簡便なスクリーニング用の BD-PCR 法の確立を現在検討中である。

謝 辞

本研究において、ご指導、ご高閲をいただきました東海大学健康科学部田爪正氣先生、東海大学伊勢原研究支援課上級技術員大木保氏に深謝いたします。

文 献

平松啓一（1992）：MRSA のバイオロジー（疫学）MRSA

の耐性の機序と遺伝的背景、日本内科学会雑誌、第81巻、第10号、pp1592-1598.

片井敦雄、中本博道、鈴木恭子、中田洋子、川口浩一、宮本一雄、永井勲（2004）：コロニーダイレクトによる MRSA 判定の PCR 法、環境感染、第19巻、第1号、p.160.

加藤美紀、志村等、長谷祐治（1996）：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に関する病棟内調査、臨床看護、第22巻、第1号、pp136-139.

北川雄光、上田政和、安藤暢敏、石引久弥、北島政樹、小林芳夫、荒井俊彦（1992）：MRSA 院内感染の対策 Nested PCR 法を用いた *mecA* 遺伝子検出による MRSA 感染症迅速診断法の検討、日本外科学会雑誌、第93巻、第9号、pp914-917.

森脇孝博（2003）：整形外科病棟入院患者および同医療従事者より分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* のゲノタイプング、感染症学雑誌、第77巻、第12号、pp1058-1066.

Naofumi Tsuchizaki, Masa Hamada and Kunimoto Hotta（2001）：Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity in *Streptomyces* of *kan* gene encoding a specific aminoglycoside-3-N-acetyltransferase, Actinomycetol, Vol 15, No 2, pp23-29.

那須勝（1992）：MRSA 対策の実際－MRSA の院内感染対策一、日本内科学会雑誌、第81巻、第10号、pp1657-1661.

坂田宏（2001）：小児科病棟に入院した児における入院時の鼻咽頭からの MRSA の検出状況－1992、1993年と1997、1998年の比較一、感染症学雑誌、第75巻、第1号、pp14-19.

清水喜八郎（1992）：MRSA 感染について、日本病院会雑誌、Vol. 39, No. 10, pp1599-1603.

武井泰、田爪正氣、松木秀明、豊田淑恵、石井美里、西野廣子、長谷川秀隆、横山久美、築地真実（2006）：NICU の環境中におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学的解析、東海大学健康科学部紀要、第12号、pp27-31.

土崎尚史、石川淳、堀田国元（2000）：コロニー PCR 法による MRSA および腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出、The Japanese Journal of Antibiotics、第53巻、第6号、pp422-429.

Abstract

We examined BROTH-DIRECT PCR that does not use the prepared template DNA but intact cells as the template DNA source for the rapid, simple and reproducible detection of antibiotic resistance genes in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

In practice, it was performed PCR in a condition of 30 cycles for 1 cycle (94°C, 30 sec. → 55°C, 30 sec. → 72°C, 60 sec.) following the first heating (94°C, 5min.) as well as a PCR reaction (Taq polymerase and two types of primer components) with for each 3μl culture medium which diluted broth after culture from 10⁻¹ to 10⁻³. This method was simple and easy, add that the result was in good amplification of the target *mecA* which was an MRSA drug tolerance gene.

In addition, this method was enough for reproducibility.

Key words: BROTH-DIRECT PCR, BD-PCR, METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)