

| | |
|----------|------------------------------|
| 氏名 | よねだ かずひこ 米 田 一 彦 |
| 学位の種類 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 甲第512号 |
| 学位授与年月日 | 平成17年 3月11日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題目 | 定量的PCR法を用いた緑膿菌の薬剤排出ポンプ発現量の測定 |
| 学位論文審査委員 | (主査) 清水英治 (副査) 田中吉紀 井上幸次 |

学位論文の内容の要旨

緑膿菌の抗菌薬耐性機構は、①透過経路の減少・消失、②不活化酵素 (β -ラクタマーゼ等) の産生、③作用標的分子 (DNA ジャイレース、ペニシリン結合蛋白質等) の変異および④能動的排出 (薬剤排出蛋白質) の4つのカテゴリーに分けることができる。これらのうち薬剤排出蛋白質による耐性機構は、広域交叉耐性を示すことで注目されている。緑膿菌の薬剤排出システムによる耐性メカニズムを検討するうえでは、薬剤排出ポンプ発現量の測定が必要である。従来、薬剤排出ポンプ発現量は Western blotting 法で測定されてきた。しかしこの方法は手技が繁雑で、時間を要し、特異抗体も一般には市販されていないという問題がある。一方、近年発達してきた定量的PCR法は、標的とする messenger RNA (mRNA) 発現量を正確に、再現性をもって、広範囲の濃度にわたって測定することが可能である。そこで我々は MexAB-OprM と MexXY-OprM の2種類の排出ポンプを対象として、mRNA 発現量から蛋白発現量を推定することが可能であるかを検討する目的で、Western blotting 法で測定した蛋白発現量と、定量的PCR法で測定した mRNA 発現量が相関するか否かの研究を行った。

方 法

本研究で用いた緑膿菌株の臨床分離株は、鳥取大学医学部附属病院および京都薬科大学から分与を受け保存されていたものから無作為に選択した。生菌数の測定は定量白金耳法で行った。最小発育阻止濃度 (MIC) 測定を、日本化学療法学会標準法の寒天平板希釈法にて行った。標準株である PAO1 の塩基配列の一部を含んだプラスミドは、pGEM-T Easy Vector Systems を用いて作成した。遺伝子の定量のために、260 nm の波長を測定し、コピー数を計算して求めた。RNA 抽出後、cDNA 合成を行った。定量的PCRには LightCycler を用いた。遺伝子発現量の定量のために、標準曲線用のプラスミド DNA の10倍希釈系列を作成し、対応するプライマーを加え、同

時に定量的 PCR を行った。LightCycler ソフトウェアで標準曲線から遺伝子発現量を求めた。

結 果

1. Real-time PCR 法を用いた緑膿菌の薬剤排出ポンプ発現量測定法の評価を行った。*mexB* 遺伝子を標的として、Real-time PCR 法の感度と特異度を評価した。コントロールプラスミドの 10 倍希釈系列を作成し、*mexB* を標的とした Real-time PCR を行った。コントロールプラスミドの濃度 (Log 値) に対して、閾値レベル (Crossing line) と対数直線領域の交点 (Crossing point) をプロットし、検量線を算出し、標準曲線を描いた。その結果、広い範囲にわたって直線性を示し、Real-time PCR 法の感度が優れていることが確認できた。さらに融解曲線の分析では、全てのプラスミドは濃度に関係なく融解温度は一定であり、Real-time PCR 法の特異度が高いことが確認できた。*mexY* 遺伝子に対しても上記と同様に Real-time PCR 法を行い、感度と特異度が優れていることが確認できた。
2. Western blotting 法で測定した MexB および MexY の蛋白発現量と、Real-time PCR 法で測定した mRNA 発現量との相関を実験株で調べた。その結果、両者の発現パターンは同じ傾向を示すことが確認された。
3. 臨床分離株における MexB および MexY の蛋白発現量と mRNA 発現量との相関関係を調べた。その結果、両者の発現量は良好な相関関係を認めることが示された。
4. mRNA 発現量から推定される薬剤排出ポンプ発現量と薬剤感受性との関係性を評価する目的で、MexB および MexY の蛋白発現量もしくは mRNA 発現量と、薬剤感受性とを比較した。その結果、MexAB-OprM および MexXY-OprM ポンプの発現は抗菌薬耐性にある程度寄与することが示唆された。

考 察

緑膿菌の薬剤排出ポンプ発現量を定量的 PCR 法で測定する方法を考案し、Real-time PCR 法で測定した mRNA 発現量と Western blotting 法で測定した蛋白発現量との相関関係を検討した。Real-time PCR 法は、再現性が良く、広範囲の濃度差にわたって正確に遺伝子量を定量可能であった。定量的 PCR 法により求めた mRNA 発現量は、蛋白発現量と良好な相関関係を示した。この定量的 PCR 法を用いた方法は、Western blotting 法に代わって、緑膿菌の薬剤排出ポンプ発現量を測定する有用な方法となり得ると考えられる。

結 論

定量的 PCR 法は、薬剤排出ポンプ発現量を測定する新しい方法となる可能性があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、緑膿菌の薬剤排出ポンプ発現量を定量的 PCR 法で測定する方法を確立し、定量的 PCR 法で測定した mRNA 発現量と、Western blotting 法で測定した蛋白発現量との相関関係を検討したものである。その結果、本研究で確立された定量的 PCR 法は、再現性があり、広範囲の濃度差にわたって正確に mRNA 発現量を測定することが可能であった。さらに、定量的 PCR 法により求めた mRNA 発現量は、蛋白発現量と良好な相関関係を示した。よって、この定量的 PCR 法を用いた方法は、Western blotting 法に代わって、緑膿菌の薬剤排出ポンプ発現量を測定する有用な方法となり得ると考えられた。

本論文の内容は、緑膿菌の薬剤耐性機構の解明に大きく寄与するものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。