

Polymerase Chain Reaction による *Staphylococcus aureus* のコアグララーゼ型別の検討

野々山 勝人
北里大学医学部小児科*

(平成 7 年 11 月 16 日受付・平成 7 年 11 月 28 日受理)

黄色ブドウ球菌の産生するコアグララーゼは、プロトロンビンと結合し血漿を凝固させる作用を有する。現在、コアグララーゼ型は抗血清を用いて 8 種類に分類される。我々はコアグララーゼ産生遺伝子の一部を増幅する primer を設計 (Primer-1,5'-TAGGCGCATTAGCAGTTG-3', Primer-2,3'-CTCTGGTTC-TAAGTTGTT-5') した。この Primer を用いて、PCR 法にて増幅した DNA を制限酵素 *Dra* I で切断した電気泳動パターンより、コアグララーゼ型別ができることを見つけた。今回、この方法を用いて臨床分離 *Staphylococcus aureus* 200 株について検討を行った。その結果 II, V, VII 型に泳動パターンの異なる亜型が存在することがわかった。しかし、これらの株も他のものとは泳動パターンが異なり、型別が可能であった。また、抗血清法による型別不能株の 14 株中 12 株が II 型の亜型であった。これらについては今後詳細な検討が必要であるが、抗血清法による型別不能株もこの方法を用いることにより型別可能であった。

Key words: コアグララーゼ, PCR 法, コアグララーゼ型別不能

黄色ブドウ球菌、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) は院内感染の主要な菌種として多くの話題となっている。これら MRSA をはじめ黄色ブドウ球菌の疫学調査マーカーの一つとしてコアグララーゼ型別がある。コアグララーゼは、分子量約 7 万の蛋白で、血漿中のプロトロンビンと結合してフィブリノーゲンに作用し、フィブリンを形成し動物の血漿を凝固させる作用がある¹⁾。コアグララーゼ型別は、菌の培養上清とコアグララーゼ型特異抗血清と正常ウサギ血漿を反応させ、凝固の有無を判定する方法により分類される。この抗原抗体の中和反応を用いた方法により現在は 8 種類に分類されている²⁾。しかし、この 8 種類の抗血清を用いた方法では、コアグララーゼ産生量が少なく判定困難な菌株や、2 種類以上の型特異抗血清で凝固せず判定不能な菌株も認められるなど、いくつかの問題が指摘される。そこで、我々は既知のコアグララーゼ I 型³⁾、II 型⁴⁾、III 型⁵⁾ の 3 つの DNA 塩基配列よりコアグララーゼ産生遺伝子の構造を検討し、その型特異的な部分を PCR 法を用いて増幅し、その DNA を制限酵素 *Dra* I で切断し、電気泳動されたパターン (以下 *Dra* I 切断パターンと略す) よりコアグララーゼ型別ができることを明らかにした (投稿中)。今回、この方法を用いて、菌株数を増やし検討した。また、抗血清法による型別不能株と *Dra* I 切断パターンとの関係について検討をした。

I. 材料と方法

(1) 使用菌株

S. aureus BB⁶⁾ を含むコアグララーゼ I ~ VIII 型に型別された株および型別不能の臨床分離 *S. aureus* 200 株

(うち MRSA 120 株) を用いた。

(2) 抗血清によるコアグララーゼ型別

被検菌株をブレインハートインフュージョンブイヨン (日水) で 37 °C で一夜培養し、培養上清を 9 本の試験管に 0.1 ml ずつ分注し、I ~ VIII 型までの抗コアグララーゼ血清 (デンカ生研) と対照として正常ウサギ血清 (デンカ生研) をそれぞれの試験管に 0.1 ml 加える。37 °C で 1 時間反応後、各試験管に希釈正常ウサギ血漿 (デンカ生研) を 0.2 ml 加え、37 °C で反応させ、1 ~ 48 時間まで適宜観察した。その結果、凝固またはフィブリン析出したものを陽性とし、I ~ VIII 型の 8 本中 1 本が陰性のものを、その菌のコアグララーゼ型と判定した。また、この方法により複数の試験管で凝固またはフィブリン析出しないものに関しては、被検菌株を前培養する段階で正常ウサギ血漿を 10 % 添加し、37 °C で一夜培養後、固まった培地をピペットで崩し、その液体部分を採取し上記方法で再度検査をした²⁾。

(3) DNA の抽出

DNA の抽出は被検菌株の懸濁液にリゾスタフィンを加え、溶菌後フェノール、クロロホルムによる抽出を行い、得られた DNA を template とした。

(4) プライマーの設計

コアグララーゼ I, II, III 型の産生遺伝子の塩基配列は、すでに報告されている³⁻⁵⁾。これらコアグララーゼ産生遺伝子は、C 末端側は各型共通の 27 アミノ酸の 5 ~ 8 回の繰り返し構造を持ち⁶⁾、N 末端側に各型共通のプロトロンビン binding site¹⁾ を持つ。この C 末端側の

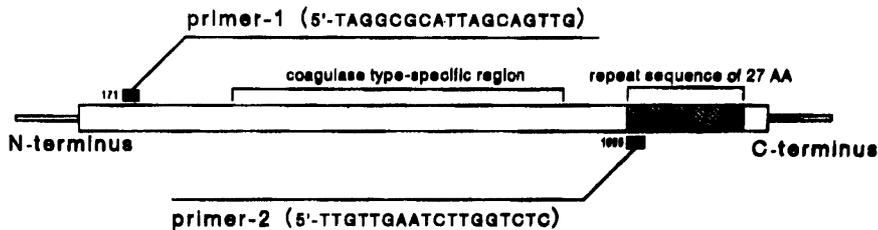


Fig. 1. The locations and sequences of the oligonucleotide primers for the *Staphylococcus aureus* coagulase gene.

The amino-acid sequences of coagulase from strains BB, 213 and 8325-4 showed homology in about 200 N-terminal sequences. The C-terminus of the protein is composed of five to eight homologous (but not identical) repeat units of 27 amino acid residues. The sequences of BB and 213 had 61.6% homology in specific region (from 250 to 750 nucleotides) of the coagulase gene, and BB and 8325-4 had 61.8% homology throughout the coagulase gene.

27 アミノ酸の繰り返し構造と N 末端側のプロトロンビン binding site の間の部分はコアグラーゼ I～III 型のそれぞれの菌株間で塩基配列に大きな違いが認められた。そこでこの部分を各コアグラーゼ産生遺伝子の型特異的部分と考え、この領域を含んだ部分を増幅できるように、C 末端のアミノ酸繰り返し構造の開始部分と N 末端のプロトロンビン binding site 内の各型共通部分に primer を設計した (Fig. 1)。

(5) PCR 法

市販の PCR 用キット (宝酒造) と、DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus Instrument) にて反応を行った。熱変性 94 °C で 1 分間、アニーリング 45 °C で 1 分間、伸長反応 72 °C で 2 分間を 1 サイクルとして 25 サイクル反応を行った。

(6) 制限酵素による DNA の切断と電気泳動

上記 primer を用いて、PCR 法により増幅された DNA を制限酵素 *Dra* I (宝酒造) を用いて切断し、2 % アガロースゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線下で観察した。

(7) ブドウ球菌の同定

N-ID テスト・SP-18 (日水製薬) を用いて、マニュアルに従って行った。

(8) サザンプロットハイブリダイゼーション

プロットングは VacuGene XL Vacuum Blotting System (Pharmacia) を用いて、マニュアルに従い、

アルカリトランスファー法により行った。プローブは *S. aureus* BB 株の PCR 増幅 DNA を制限酵素 *Hinc* II で切断した DNA の N 末側約 480 bp を用いた。プローブのラベルおよび検出は DIG DNA 標識および検出キット (ペーリンガー・マンハイム) を用いマニュアルに従って行った。ハイブリダイゼーションは Prehybridization Buffer (5 × SSC, 5 × Denhardt's 溶液, 1 % SDS, 50 μg/ml サケ変性精子 DNA) にラベルしたプローブを加え 65 °C で 12 時間行った。

II. 結 果

(1) 抗血清法によるコアグラーゼ型別

臨床分離 *S. aureus* 200 株について抗血清法を用いてコアグラーゼ型別を行った。その結果、MRSA 120 株中 119 株、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA) 80 株中 39 株の計 158 株が型別可能であった。しかし、残りの MRSA 1 株を含む 42 株は、48 時間経過しても対照を含めたすべての試験管で凝固が認められず型別不能であった。

続いて、これら抗血清法を用いて型別不能であった 42 株について、前培養の段階で正常ウサギ血漿を添加し、コアグラーゼの産生を誘導する方法を用いて検査した。その結果、通常の方法で型別不能であった 42 株中 MRSA 1 株を含む 28 株が型別可能であった (Table 1)。しかし、残りの 14 株は前培養の段階で培地は凝固

Table 1. Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* by the antisera method

Antisera method*	No. of Strains tested	Coagulase type								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	NT**
Non-induced	MSSA 80	3	5	6	4	6	2	8	5	41
	MRSA 120	5	42	15	27	3	0	23	4	1
Induced	MSSA 41	1	7	0	5	3	0	11	0	14
	MRSA 1	0	1	0	0	0	0	0	0	0

*Coagulase typing of *S. aureus* by antisera method was determined under two conditions. Non-induced and induced methods showed the cells incubated with and without rabbit plasma, respectively.

**NT is non-typable type

したが、抗血清と反応後、複数の試験管で凝固が認められないため型別不能であった。なお、これらの 14 株については *S. aureus* であることを確認した。

(2) 抗血清法によるコアグラゼ型別不能株の PCR 法による検討

前培養時に正常ウサギ血漿を添加し、コアグラゼの産生を誘導した抗血清法により型別不能であった 14 株について、Fig. 1 に示した primer を用いて、PCR 法によるコアグラゼ型別を行った。その結果 14 株すべてで約 1.5 kb の DNA が増幅された。この DNA を制限酵素 *Dra* I で切断し、電気泳動パターンを観察した。コアグラゼ型別不能であった 14 株のうち 2 株はコアグラゼ II 型の標準となる株と同一の *Dra* I 切断パターンを示し、コアグラゼ II 型と判定した。しかし、残りの 12 株はすべて同一の *Dra* I 切断パターンを示したが、これらはコアグラゼ I ~ VIII 型のそれぞれの標準となる株の *Dra* I 切断パターンとは異なり、新たな *Dra* I 切断パターンであった。

(3) PCR 法によるコアグラゼ型別の検討

抗血清法によりコアグラゼ型別不能の株のうちの 12 株が、標準となる株とは異なる泳動パターンを示したため、I ~ VIII 型のそれぞれの増幅された DNA の *Dra* I 切断パターンを再度確認するため、抗血清法およびコアグラゼ産生の誘導をかけた抗血清法で型別可能であった 186 株について PCR 法によるコアグラゼ型別を検討した。その結果、抗血清法で型別可能であった 186 株すべてで約 1.5 kb の DNA の増幅が認められた。これらの増幅された DNA を制限酵素 *Dra* I で切断し、その電気泳動パターンを、標準となる株の

それと比較した。

その結果、コアグラゼ I 型 9 株、II 型 51 株、III 型 21 株、IV 型 36 株、V 型 7 株、VI 型 2 株、VII 型 36 株、VIII 型 9 株であった。しかし、コアグラゼ II 型 4 株、V 型 5 株、VII 型 6 株の計 15 株が、標準となる株の *Dra* I 切断パターンとは異なる電気泳動パターンを示した。しかし、これら株の電気泳動パターンはコアグラゼ II、V、VII 型でそれぞれ異なっており、かつ他の標準株の *Dra* I 切断パターンと重複することはなく区別され、型別を推測することは可能であった。(Fig. 2)。これらの株をそれぞれコアグラゼ II、V、VII 型の亜型とした。なお、これらの 15 株については、抗血清法によるコアグラゼ型について再度確認した。また、これらの標準となる株と異なる *Dra* I 切断パターンを示す株について、*S. aureus* BB 株のコアグラゼ産生遺伝子の一部をプローブとした、サザンハイブリダイゼーションによって DNA の相同性を検討した。その結果、これらの株はそれぞれの DNA 間に高い相同性が認められた (Fig. 3 A, 3 B)。

さきほどの、抗血清法によりコアグラゼ型別不能株のうち、コアグラゼ I ~ VIII 型の *Dra* I 切断パターンと異なった 12 株は、すべてコアグラゼ II 型の亜型の *Dra* I 切断パターンと同一のものであった。以上の結果より、抗血清法で型別不能であった 14 株のコアグラゼ型は II 型 2 株と II 型の亜型 12 株と判定した (Table 2)。

III. 考 察

コアグラゼ型別は 1950 年 Rammelkamp ら⁷⁾ が抗原抗体の中和反応により 3 種類に分類したのが最初で

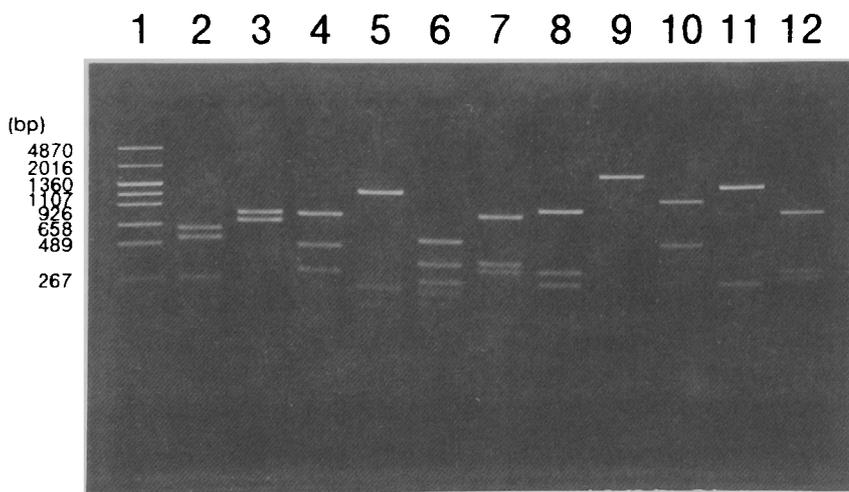


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of *Dra* I-digested DNA of the coagulase gene amplified by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus*. Lanes; 1, molecular size marker; 2, coagulase type I; 3, coagulase type II; 4, coagulase type II variant; 5, coagulase type III; 6, coagulase types IV; 7, coagulase type V; 8, coagulase type V variant; 9, coagulase type VI; 10, coagulase type VII; 11, coagulase type VII variant; 12, coagulase type VIII.

Table 2. Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* by PCR method

Typing by antisera	No. of strains tested	Coagulase type							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Typable	186	9	55 (4)	21	36	12 (5)	2	42 (6)	9
Untypable	14	0	14 (12)	0	0	0	0	0	0

() indicate the different cutting patterns of each coagulase type.

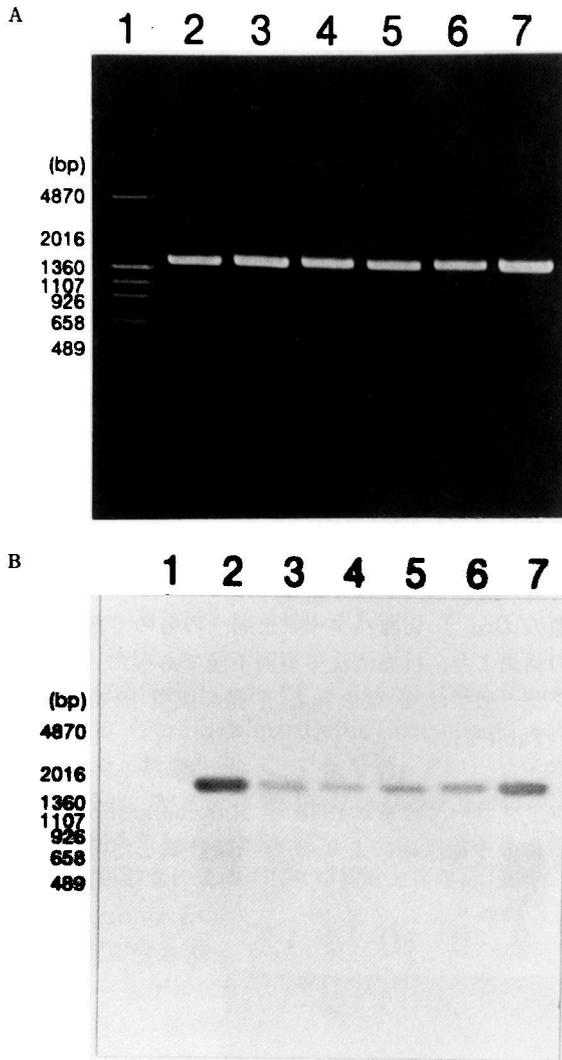


Fig. 3. Southern blot hybridization of the coagulase DNA amplified by polymerase chain reaction method in clinical isolate of *Staphylococcus aureus*.

Fig. 3 A shows agarose gel electrophoresis of amplified DNA. Lanes; 1, molecular size maker; 2, coagulase type II; 3, coagulase type II variant; 4, coagulase type V; 5, coagulase type V variant; 6, coagulase type VII; 7, coagulase type VII variant.

Fig. 3 B shows southern blot hybridization of amplified DNA. After electrophoresis, amplified DNA by PCR was southern blotted onto nylon filter and hybridized for 12 hours at 65°C with Dig-labeled *Hinc* II digested DNA at N-terminal region of coagulase gene in *S. aureus* BB strain. From lane 1 to 7 were corresponded to Fig. 3 A.

ある。その後、潮田らは 8 種類になることを報告し²⁾、各コアグラーゼに対応した抗血清を作った。この 8 種類の抗コアグラーゼ血清は、本邦で食中毒や院内感染の疫学調査の際に応用されている。しかし、MRSA に関してコアグラーゼ型を疫学調査に用いる場合、同一地域のコアグラーゼ型に偏りがある³⁾ため、コアグラーゼ型のみを疫学マーカーとして用いることは難しい。しかし、MRSA による院内感染を除けばコアグラーゼ型別はその型毎に薬剤耐性型が大きく異なることや、ファージ型別や薬剤耐性型等とは異なりファージの溶原化やプラスミドの伝達等による影響は受けないことから、重要な疫学マーカーのひとつと考えられる。ところが、現在用いられている抗血清を用いた方法はその手技が繁雑で、コアグラーゼ産生量が少ない株では型別が困難であることから、日常の検査に繁用されているわけではない。

本実験では、臨床分離 *S. aureus* 200 株について PCR 法によりコアグラーゼ産生遺伝子の増幅後、制限酵素 *Dra* I 切断し、その電気泳動パターンよりコアグラーゼ型別を行った。その結果、すべての株でコアグラーゼ型別が推測可能であった。したがってこの方法を用いることにより、抗血清の入手困難な地域、特に外国においてもコアグラーゼ型別が可能であり、疫学マーカーとして有用であると考えられた。さらに、産生量が少ない株に対しても PCR 法によるコアグラーゼ型別が可能であることから、コアグラーゼの産生量に左右されない利点があげられる。また、今回示したコアグラーゼ産生遺伝子個有の primer は黄色ブドウ球菌に特異的であることもすでに検討してあり、菌種の同定も可能であると考えられた。

一方、*Dra* I 切断パターンが標準となる菌株とは異なる菌株が、抗血清法により型別できた菌株および型別できなかった菌株のなかにそれぞれ認められた。しかし抗血清法によりコアグラーゼ型別できなかった菌株は、コアグラーゼ型別できた菌株と同一の *Dra* I 切断パターンを示したことから、やはり PCR 法によってコアグラーゼ型別の推測は可能であった。これら *Dra* I 切断パターンの異なる亜型の菌株はコアグラーゼ II 型 16 株 (MRSA 4 株を含む)、V 型 5 株 (すべて MSSA)、VII 型 6 株 (MRSA 2 株を含む) の 27 株に認められた。データには示さないが、これらの亜型株は標準株と異なる制限酵素切断地図を示したことから、これらのコアグラーゼ産生遺伝子はたがいに DNA レベ

ルでも異なるものと考えられた。

また、抗血清法でエアグララーゼ型別できなかった 14 株中 12 株が II 型の垂型パターンを示す株であった。これらの株はそれぞれ北海道内の異なる施設で分離された MSSA であることから、同一な株の蔓延と考えるより、元々ある程度の割合でコアグララーゼ II 型の垂型パターンを示す株が存在していることが考えられる。いずれにしても、抗血清法によるコアグララーゼ型別不能株の中に高頻度で垂型パターンを示す株が認められたことは、垂型パターンを示す株と抗血清法によるコアグララーゼ型別不能株との間に高い関連性があることが考えられた。しかし、これらの垂型パターンを示す菌株の中には抗血清法でコアグララーゼ型別可能な株もあることから、それら垂型パターンを示す菌株の産生するコアグララーゼは同一の血清型を示すものと免疫学的に交差反応を示すが、制限酵素による切断部位が異なるため、塩基配列のシフトによって一部のアミノ酸が異なった変異種か、あるいは抗血清法によってまったく型別できない株もあることから、コアグララーゼの活性そのものが低い変異種であることも考えられる。この点については、今後詳細な免疫学的な検討が必要であろう。現在、これらの菌株のコアグララーゼ DNA の解析を行っており、その結果から以上の点は判明するものと考えられる。

文 献

- 1) Kawabata S, Morita T, Miyata T, Iwanaga S, Igarashi H: Isolation and Characterization of

Staphylocoagulase Chymotryptic Fragment. *J Biol Chem* 261: 1427~1433, 1986

- 2) Ushioda H, Terayama T, Sakai S, Zen-Yoji H, Nishiwaki M, Hidano A: Coagulase Typing of *Staphylococcus aureus* and its Application in Routine Work. *Zbl Bakt Hyg I Abt Suppl* 10: 77, 1981
- 3) Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Kawabata S, Morita T, Igarashi H, Iwanaga S: Nucleotide Sequence of the Staphylocoagulase Gene: Its Unique COOH-Terminal 8 Tandem Repeats. *J Biochem* 102: 1177~1186, 1987
- 4) Kaida S, Miyata T, Yoshizawa Y, Igarashi H, Iwanaga S: Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. *Nucleic Acids Res* 17: 8871, 1989
- 5) Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley A J, Foster T J: The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Mol Microbiol* 4 (3): 393~404, 1990
- 6) Goh S, Byrne S K, Zhang J L, Chow A W: Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* on the Basis of Coagulase Gene Polymorphisms. *J Clin Microbiol* 30: 1642~1645, 1992
- 7) Rammelkamp C H, Hezebicks M M, Dingle J H: Specific Coagulases of *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 91: 295~300, 1950
- 8) 井田孝志, 野々山勝人, 長曾部紀子, 島内千恵子, 井上松久, 岡本了一: 近年分離された MRSA に関する全国的調査. *Jpn J Antibiot* 47: 585~594, 1994

Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction

Masato Nonoyama

Department of Pediatrics, Kitasato University School of Medicine,
1-15-1 Kitasato, Sagamihara, Kanagawa 228, Japan

Staphylocoagulase, an extracellular protein produced by staphylococci, specifically forms a complex with prothrombin. The staphylocoagulases are classified into eight serotypes based on the ability of antisera to cross-neutralize plasma clotting activity. We have developed a test based on the polymerase chain reaction (PCR) to detect the *Staphylococcus aureus* coagulase (*coa*) gene. The sequences of the oligonucleotide primers used in this assay were 5'-TAGGCGCATTAGCAGTTG-3' and 3'-CTCTGGTTCTAAGTTGTT-5'. We describe the coagulase typing of *S. aureus* based on the amplification and subsequent *Dra* I digestion of the PCR products of the coagulase gene. We determined the coagulase types of 200 clinical isolates of *S. aureus* by antisera and PCR methods. The results suggest that the PCR method of coagulase typing was useful for the untypable strains by antisera methods. We also found variants of coagulase types II, V and VI. The variants were isolated at high frequency among 12 of 14 untypable strains by antisera methods.