

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23615007

研究課題名(和文) 磁性ナノ粒子プローブ - 反応熱分解分析法による薬剤耐性菌の迅速検出法の開発

研究課題名(英文) Development of Reactive Pyrolysis-GC/MS Combined with Magnetic Bead Probes for Rapid Detection of Drug-Resistant Bacteria

研究代表者

石田 康行 (ISHIDA, Yasuyuki)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：70273266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：表面を抗体でもって修飾した磁性ナノ粒子プローブを、反応熱分解分析法に採り入れた新しい化学計測システムを開発した。このシステムの構築により、複雑な混合系から、ある特定の細菌種のみを選択捕集し、その細菌に含まれる細胞膜脂質を詳細に分析することを可能にした。さらに、得られたリン脂質プロファイルをバイオインフォマティクス手法の一つである主成分分析法によりデータ解析して、消毒薬に耐性を持つ大腸菌を迅速に検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A new analytical tool for bacteria samples was developed by combining reactive pyrolysis gas-chromatography/mass spectrometry with magnetic bead probes. By using this method, a certain species of bacteria can be selectively captured, and the structures of their lipid components were able to be analyzed in detail. Moreover, this technique was successfully applied to rapid detection of drug-resistant bacteria in various biological samples.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：安全環境計測法

キーワード：薬剤耐性菌 迅速検出 反応熱分解 抗体磁性ビーズ プローブ

1. 研究開始当初の背景

医療の分野では、消毒薬などの化学物質に耐性をもつ薬剤耐性菌に由来する院内感染が大きな問題となっている。これらの耐性菌を早期検出し、その感染リスクを回避するためには、対象となる細菌における耐性の有無を迅速かつ簡便に決定することが欠かせない。一般に、耐性作用の判別には遺伝子情報に基づいた個体識別法が利用されているが、その方法では 1) 長時間に渡る煩雑な試料前処理操作が必要であることや、2) 熟練を要する技術や専門的な知識がオペレーターに求められることが問題点として指摘されている。そのため、迅速性と簡便性を満たした、新しい検出法の登場が実用面およびコスト面の双方の見地から急務とされている。

こうした中で申請者は、有機アルカリ存在下での化学反応を加味した反応熱分解ガスクロマトグラフィー (GC) により、培養中のごく微量 (約 100 μg) の細菌コロニーをそのまま測定に供して、その細胞膜脂質を構成する脂肪酸成分を迅速検出することを可能にした。さらに、薬剤耐性菌の一部では、脂質合成タンパク質に関わる遺伝子情報にわずかな変異が生じることに注目し、消毒薬に耐性をもつ大腸菌の脂肪酸分析に当該手法を応用した。その結果、耐性の発現に伴い脂肪酸組成に変化がかなりの程度生じることを見出し、その組成の違いを手掛かりに用いて耐性作用の有無をはっきりと迅速決定することに成功した。しかしながら、遺伝子情報に基づいた現状の判別法と同様に、この実験でも純粋培養した細菌コロニーを試料に用いて、その耐性作用の判定を行っていた。従って、反応熱分解 GC においても、様々な夾雑物や複数の菌種が混在している飲料水や体液試料中に含まれる耐性菌を、それらの純粋培養処理を行うことなく直接的に検出することはできないのが現状である。

2. 研究の目的

上述した課題点を解決するために、申請者は、反応熱分解 GC の手法に、抗体修飾型の磁性ナノ粒子プローブによる簡便かつ選択的なオンライン細菌捕集プロセスを採り入れることに着目した。この磁性ナノ粒子プローブ - 反応熱分解 GC システムを新規開発することにより、様々な夾雑物や複数の細菌種を含む実試料をそのまま測定に供して、そこに存在する耐性菌を迅速かつ直接的に検出することが初めて可能になると考え、本研究を立案するに至った。

具体的には、まず、「磁性ナノ粒子プローブ - オンライン反応熱分解 GC」計測システムの開発を通じて、飲料水や血清などの実サンプルをそのままシステムに導入して、そこに含まれる細菌の薬剤耐性の有無を迅速決定できる実用法の構築を試みる。最初に、任意の細菌種に対する抗体を化学結合させた磁性ナノ粒子を新たに合成し、それにより試

料マトリックスから特定の菌種のみを簡便な操作でもって選択捕集する新規プローブを作製する。次に、ナノ粒子プローブに捕集した菌体中の脂肪酸成分を反応熱分解 GC によりオンライン分析するための簡便なサンプリング・濃縮方法を、当該プローブがもつ磁性作用を活用して考案する。このオンライン分析により得られる脂肪酸プロファイルを手掛かりに用いて、生体試料や水試料中の薬剤耐性菌を、煩雑な前処理操作を行わずに迅速検出できる実用的な手法を開発する。

さらに、現状では、薬剤耐性菌が如何にして耐性作用を持つに至るのか、その発現機構には不明な点が多く残されている。そこで、一連の薬剤耐性菌の分析結果を基にして、耐性作用の発現に伴い、細胞膜脂質中の脂肪酸成分がどのように変性したかを詳細に解析することも試みる。この結果を基にして、細胞膜脂質の脂肪酸組成やその構造の観点から、耐性菌の耐性発現メカニズムを初めて明らかにすることも期限内に目指す。

3. 研究の方法

(1) 磁性ナノ粒子プローブを採り入れた反応熱分解 GC 測定システムの構築

まず、熱分解法によって生成した磁性ナノ粒子を 4-メチルカテコールと反応させたのち、その部位をアジド化試薬によりアジド化する。ここを起点として、最終的に各種の抗体を導入することにより、任意の細菌種に対して特異的に作用する抗体修飾型の新規磁性ナノ粒子を合成する。なお、この合成実験では、すでに磁性ナノ粒子の精密合成に関わる科学研究費補助金研究 [基盤(C)] を進めており、ナノ粒子に様々な置換基を導入するための合成プロセスを開発している堤内 要准教授 (中部大学) と協力して実験を進める。

次に、プローブが磁性ナノ粒子であることを利用して、オンライン計測のための測定プロトコルを考案する。まず、様々な細菌種の混合系に当該プローブを導入し、抗体 - 細菌間の複合体形成を介して特定の菌種のみを選択的に捕獲する。この懸濁液を石英製の中空マイクロ試料ホルダー内に磁石をあてがいながら通液させることにより、ナノ粒子プローブをホルダー内壁に固着させる。この粒子プローブ上に水酸化テトラメチルアンモニウムなどの有機アルカリ試薬を滴下して、当該粒子内に十分に含浸させた後、このホルダーを反応熱分解 GC システムに導入して細菌細胞中の脂肪酸分析を行う。さらに、反応熱分解に関する諸条件 (有機アルカリ試薬の種類とその濃度、反応温度など) を細菌試料中の脂肪酸成分の検出効率が最大となるように適正化する。こうして、細菌混合系から所望する菌種のみを選択的にオンライン反応熱分解 GC 測定し、その菌体の脂肪酸成分の組成や分子構造を精密かつ迅速に解析できる方法論を構築する。

(2) 実サンプルからの薬剤耐性菌の直接検出への応用

初年度に開発した解析手法を応用して、飲料水や体液試料などの実サンプル中に存在する薬剤耐性菌の直接検出を実施する。ここでは、試料として、薬剤耐性菌を含む複数の菌種を人為的に添加した飲料水や血清などを用いる。まず、磁性ナノ粒子プローブ-反応熱分解 GC により、上記の試料から特定の菌種を迅速捕集し、その細菌の細胞膜脂質を構成する脂肪酸成分の組成や分子構造を詳細に解析する。こうして得られた脂肪酸情報における変性の有無を手掛かりに用いて、実サンプル中の耐性菌の存在を直接的に決定できる方法論を構築する。

(3) 耐性作用発現のメカニズム解明

耐性菌における脂肪酸プロファイルの情報と、その耐性作用の強さとの相関をコンピュータ支援されたバイオインフォマティクス的手法を活用して多変量解析する。この解析結果から、耐性作用の進行に伴う脂肪酸成分の組成や構成における変異の内容を精査する。こうした検討を多種類の菌種にわたって系統的に行うことにより、細菌における耐性作用の発現メカニズムを細胞膜脂質の構成の観点から解明する。なお、薬剤耐性菌の培養実験や解析結果の考察については、耐性菌の育成やその耐性作用の発現機構解明に関して長年の研究実績を有する川村久美子准教授（連携研究者、名古屋大学）と連携して行う。

4. 研究成果

(1) 磁性ナノ粒子プローブを採り入れた反応熱分解 GC 測定システムの構築

まず、磁性ナノ粒子プローブに任意の細菌種を選択的に採取するための、最適な吸着条件の決定を試みた。ここでは、細菌試料にはサルモネラ菌を用い、これを当該菌に対する抗体で表面修飾した微小な磁性粒子に吸着させることを試みた。また、吸着したサルモネラ菌の検出には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) を活用した。様々な条件下で吸着実験を行ったところ、吸着の際の温度および時間をそれぞれ 37 および 20 分に設定したときに、最も効率的にサルモネラ菌を磁性粒子表面上に捕集できることが分かった。こうして構築した、細菌の選択捕集のためのプロトコルを図 1 に示す。

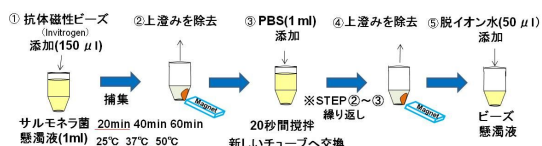


図 1 細菌の選択捕集のための実験プロトコル

そこで、次に、こうして磁性粒子上に捕集したサルモネラ菌を直接オンライン操作で反応熱分解ガスクロマトグラフ (反応熱分解 GC) 分析するためのプロトコル構築を試みた。まずは、サルモネラ菌そのものを試料に用いて、その高感度検出に最も適した化学反応場の構築を実施した。様々な反応試薬、その濃度、および反応温度などの各種パラメータを検討した結果、化学試薬として強有機アルカリの一種である水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) を使用し、その濃度を 25 w/w %, また反応温度を 400 に設定したときに、当該細菌を構成する細胞膜脂質中の脂肪酸成分を、それらの加水分解及びメチル化反応を介して高感度に検出できることを見出した。さらに、実際にサルモネラ菌を吸着させた磁性微粒子を試料に用いて、TMAH 共存下での反応熱分解 GC 分析を行った結果、当該細菌に特有の一連の脂肪酸成分を明瞭に検出することが可能になった。この方法によって得られた典型的なクロマトグラムを図 2 に示す。

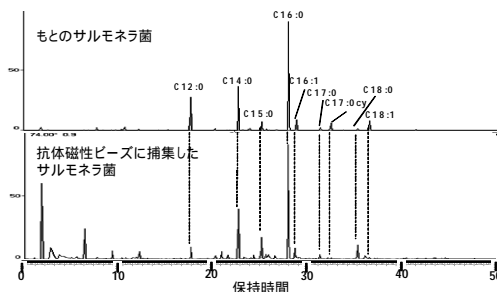


図 2 もとのサルモネラ菌と抗体磁性ビーズ上に捕集したサルモネラ菌のクロマトグラム

このように、磁性ナノ粒子プローブを反応熱分解分析法と組み合わせた新規計測システムを構築することができ、次年度からの実際の生体マトリックスを用いた応用研究を行う上で欠かせない、方法論を確立することができた。

(2) 実サンプルからの特定細菌種の選択検出への応用

開発した磁性ナノ粒子プローブと各種の質量分析法 (MS) を連結した計測方法を発展的に応用して、実際の生体試料あるいは細菌混合系から、任意の細菌種の細胞膜脂質成分を構造キャラクタリゼーションする一連の実験を行った。

まず、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 MS (MALDI-MS) を MS 装置に利用して、サルモネラ菌と大腸菌の混合系から、前者の細菌中の細胞膜脂質成分を選択的に解析する検討を行った。ここでは、サルモネラ菌に特異的に作用する抗体で表面修飾した磁性ビーズをプローブとして用いて、まずは当該混合系からビーズとサルモネラ菌の複合体を特異的に形成させた。この複合体を MALDI-MS により解析したところ、サルモネラ

菌を構成する各種リン脂質成分を高感度に検出でき、そのヘッドグループやアシル基などの分子構造を詳細に解明することが可能になった。

さらに、反応熱分解ガスクロマトグラフィ-MS(反応熱分解GC/MS)をMSとして用いて、複雑な試料マトリックス中に存在する細菌試料を選択分析する検討を行った。ここでは、大腸菌を豚の血液中に人為的に添加したものを生体試料のモデルとして用い、そこに含まれる大腸菌の細胞膜脂質を構成する脂肪酸成分を高感度かつ選択的に検出することを試みた。様々な反応試薬、その濃度、および反応温度などの各種パラメータを検討した結果、化学試薬として強有機アルカリの一種である水酸化テトラメチルアンモニウム(TMAH)を使用し、その濃度を25 w/w%、また反応温度を400に設定したときに、大腸菌に含有される脂肪酸成分を明瞭に検出することが可能になった。こうして得られた脂肪酸成分のピーク面積から、大腸菌の細胞膜を構成する脂肪酸成分の化学組成を、試料マトリックス成分に因る妨害を全く受けることなく、正確に解析することに成功した。

以上のように、磁性ナノ粒子プローブをMALDI-MSや反応熱分解分析法と組み合わせた計測システムを、実際の生体試料や複雑な細菌混合系に応用できることが実証できた。

(3) 薬剤耐性菌の迅速検出と耐性作用発現のメカニズム解明

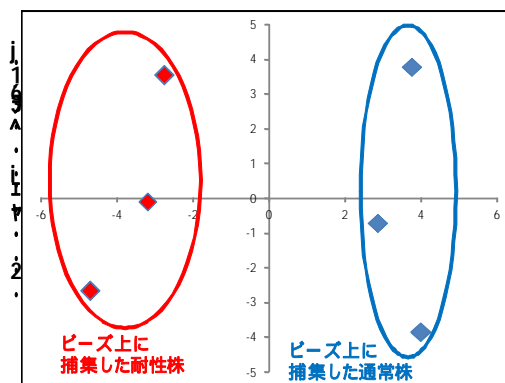
これまでに開発してきた磁性粒子プローブと各種の質量分析法(MS)を直結した計測システムを、細菌における薬剤耐性の有無の判別に応用する一連の実験を行った。

まず、MALDI-MSを用いて、薬剤耐性菌の迅速判別を試みた。ここでは、消毒薬の一種であるトリクロサンに対して耐性を有する大腸菌を試料に用いた。まず、大腸菌に特異的に作用する抗体で表面修飾した磁性ビーズをプローブとして用いて、当該細菌の懸濁液から、大腸菌の選択捕集を行った。次に、この大腸菌を捕集した磁性ビーズ試料をMALDI-MSにより解析したところ、大腸菌を構成する各種リン脂質成分を高感度に検出でき、さらにそれらの成分組成を基にして、大腸菌における薬剤耐性の有無を10分程度の短時間で判定することが可能になった。

さらに、反応熱分解GC/MSを用いて、薬剤耐性菌の簡便な判別分析を行った。ここでは、様々な反応試薬、その濃度、および反応温度などの各種パラメータを検討した結果、化学試薬として強有機アルカリの一種である水酸化テトラメチルアンモニウムを使用し、その濃度を25 wt%、また、反応温度を400に設定したときに、薬剤耐性大腸菌に含有される脂肪酸成分を明瞭に検出できることを見出した。さらに、得られた脂肪酸成分の化学組成が薬剤耐性の有無に応じて変化することが明らかになった。そこで、本手法によ

り得られた脂肪酸組成のデータを、バイオインフォマティクス法の一つである主成分分析法によりデータ解析したところ、薬剤耐性の有無を迅速に判別することができた。図4に、主成分分析による薬剤耐性の有無の判別結果を示す。

主成分分析プロット



第1主成分 (寄与率56.9)

図4 主成分分析による薬剤耐性菌の分類

以上のように、脂肪酸組成の違いを手掛かりにして、試料前処理操作を一切行わずに薬剤耐性菌を簡便に分類することが可能になった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

S. Baidurah, S. Takada, K. Shimizu, Y. Ishida, T. Yamane, H. Ohtani, Evaluation of biodegradation behavior of poly(butylene succinate-co-butylene adipate) with lowered crystallinity by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography, J. Anal. Appl. Pyrolysis, 2013, vol. 103, 73-77, 査読有.

石田康行・大谷 肇, 2012, 反応熱分解ガスクロマトグラフィーによる高分子および天然有機物の分析, ぶんせき, 2012, No. 9, 515-521, 査読有.

石田康行・尾川貴子・亀谷将之・加藤隆明・武田邦彦・大谷 肇, 反応熱分解ガスクロマトグラフィーによる伝統材料「油団」中の油脂成分の化学構造解析, 分析化学, 2012, vol. 61(10), 819-826, 査読有.

Y. Ishida, T. Honda, S. Mabuchi, O. Sueno, Validation of Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography Using a Vertical Microfurnace Pyrolyzer for the Compositional Analysis of Fatty Acid

Components in Microalgae, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, vol. 60, 4222-4226, 査読有.

S. Baidurah, S. Takada, K. Shimizu, K. Yasue, S. Arimoto, Y. Ishida, T. Yamane, H. Ohtani Evaluation of Biodegradability of Poly(Butylene Succinate-co-ButyleneAdipate) on the Basis of Copolymer Composition Determined by Thermally-Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography, Journal of Polymer Analysis and Characterization, vol. 17, 1-9, 2012, 査読有.

S. Y. Bircan, H. Kamoshita, R. Kanamori, Y. Ishida, K. Matsumoto, Y. Hasegawa, K. Kitagawa, Behavior of Heteroatom Compounds in Hydrothermal Gasification of Biowaste for Hydrogen Production, Applied Energy, vol. 88, 4874-4878, 2011, 査読有.

Y. Ishida, K. Ohsugi, K. Taniguchi, H. Ohtani, Rapid Determination of Terephthalic Acid in the Hydrothermal Decomposition Product of Poly(ethylene terephthalate) by Thermochemolysis-Gas Chromatography in the Presence of Tetramethylammonium Acetate, Analytical Sciences, Vol. 27, 1053-1056, 2011, 査読有.

〔学会発表〕(計 10 件)

牧野 朱里・石田康行、薬剤耐性菌の迅速検出を目指した改良型抗体プローブ-MALDI-MS 法の開発、「分析中部・ゆめ 21」若手交流会 第 13 回高山フォーラム、高山市図書館、2013 年 11 月 16-17 日.

日比拓真・小室優・高橋誠・石田康行・堤内要、N-ビニル-2-ピロリドン/メタクリル酸メチル/メタクリル酸三元共重合体被覆マグネタイトナノ粒子の表面修飾と機能解析、第 18 回高分子分析討論会、明治大学、2013 年 9 月 19-20 日.

鵜飼浩志・牧野朱里・石田康行、複合型の抗体磁性ビーズプローブを採り入れた反応熱分解 GC/MS による生体マトリックス中の細菌試料の選択的な検出、日本分析化学会第 62 年会、近畿大学、2013 年 9 月 10-12 日.

鵜飼浩志・石田康行、細菌脂質の選択検出のための複合型抗体磁性ビーズプローブ-MALDI-MS 法の開発、第 32 回分析化学中部夏期セミナー、休暇村能登千里浜コンベンションホール、2013 年 8 月 30-31 日.

杉浦貴明・佐藤綾香・高橋 誠・石田康行・堤内 要、糖質を用いた 4-メチルカテコール

被覆マグネタイト粒子の表面修飾と機能解析、第 17 回高分子分析討論会、名古屋市中小企業振興会館、2012 年 10 月 25-26 日.

鵜飼浩志・橋本明典・石田康行、抗体磁性ビーズを併用した MALDI-MS および反応熱分解 GC/MS による細菌構成成分の精密解析、第 17 回高分子分析討論会、名古屋市中小企業振興会館、2012 年 10 月 25-26 日。(審査員受賞).

鵜飼浩志・橋本明典・石田康行、抗体磁性ビーズによる選択捕集を併用したマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による細菌中のリン脂質の解析、日本分析化学会第 61 年会、金沢大学角間キャンパス、2012 年 9 月 19-21 日.

鵜飼浩志・石田康行、抗体磁性ビーズによる選択捕集を併用した質量分析法による細菌脂質の解析、「分析中部・ゆめ 21」若手交流会 第 11 回高山フォーラム、高山市図書館、2011 年 11 月 11-12 日.

橋本明典・石田康行、オンプローブ試料調製法を併用した MALDI-MS による薬剤耐性菌の迅速判別、第 30 回分析化学中部夏期セミナー、三重大学、2011 年 8 月 31 日 - 9 月 1 日。(支部長賞優秀賞受賞)

Y. Ishida, K. Ogimoto, T. Yokoi, A. Hashimoto, K. Kawamura, Complementary Analysis of Lipids in Drug-Resistant Bacteria by Reactive Pyrolysis-Gas Chromatography and MALDI-Mass Spectrometry, IUPAC International Congress for Analytical Sciences, 2011.5. 22-26, Kyoto.

〔図書〕(計 1 件)

石田康行、製品中に含まれる(超)微量成分・不純物の同定・定量ノウハウ, 第 8 章 菌・ウイルスの検出、同定, 第 2 節 マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による細菌種の迅速分類 - 細菌構成成分の測定、細菌の選択的な検出、細菌種の同定、技術情報協会, p685-690, 2014 年 2 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 康行 (ISHIDA, Yasuyuki)
中部大学・応用生物学部・准教授
研究者番号: 70273266

(2) 連携研究者

堤内 要 (TSUTSUMIUCHI, Kaname)
中部大学・応用生物学部・准教授
研究者番号: 50329851

川村 久美子 (KAWAMURA, Kumiko)

名古屋大学・医学部・准教授
研究者番号：30335054