

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790571

研究課題名(和文)チオールプローブを用いたアミノグリコシド耐性菌迅速検出法の開発

研究課題名(英文)Rapid identification of aminoglycoside resistant bacteria using thiol probe

研究代表者

安藤 公英(北尾公英)(Ando, Tomoe)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80462787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：近年、多剤耐性緑膿菌による院内感染が深刻化している。抗生剤療法が困難な多剤耐性菌の早期検出は当該分野における重要課題である。近年、臨床分離される多剤耐性緑膿菌の多くが、外来性アミノグリコシド修飾酵素を産生し、薬剤を不活化することでアミノグリコシド耐性を獲得していることが分かってきた。本研究では、アミノグリコシド修飾酵素が薬剤を不活化する際にチオールを生成することに着目し、チオールプローブを用いた発色法あるいは蛍光法によるアミノグリコシド耐性菌の迅速検出を試みた。

研究成果の概要(英文)：Emergence of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* is serious problem in the medical setting. Rapid detection system for such bacteria is urgently needed. Recently, epidemiological researches have revealed that most of MDR *P. aeruginosa* is producing aminoglycoside modifying enzyme to acquire aminoglycoside resistances. In this study, I focused on the mechanism of aminoglycoside modifying enzyme function and aimed to develop a rapid detection system for bacteria producing aminoglycoside modifying enzyme using thiol probe.

研究分野：境界医学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：薬剤耐性 迅速診断 アミノグリコシド

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性緑膿菌による院内感染が深刻化している。抗生剤療法が困難な多剤耐性菌の早期検出は当該分野における重要課題である。これまでの研究から、臨床分離される多剤耐性緑膿菌の多くが、外来性アミノグリコシド修飾酵素を産生し、薬剤を不活化することでアミノグリコシド耐性を獲得していることが明らかになった。

アミノグリコシドアセチル基転移酵素(AAC)は、薬剤修飾酵素の一つであり、アセチル CoA (アセチル基ドナー)とアミノグリコシド(レシピエント)の2基質を認識し、アセチル CoA のアセチル基をアミノグリコシドの側鎖アミノ基に転移修飾する。AAC は、アミノグリコシド側鎖アミノ基の修飾部位により4つのクラスに分類され、修飾部位に応じて、異なるアミノグリコシド耐性プロファイルを示す。この中で AAC(6')は、多剤耐性緑膿菌においてアミノグリコシド耐性を判別する上で最も重要な指標であり、現在までに、約30種類のアイソザイムが同定されている。

申請者は、これまでの研究過程で、多剤耐性緑膿菌のアミノグリコシド耐性の多くが AAC(6')Iae の産生に起因することを明らかにした。また、AAC(6')ファミリーの新規アイソザイム AAC(6')Iaf を多剤耐性緑膿菌臨床分離株において同定した。これらの研究成果を基に、抗 AAC(6')Iae 抗体を用いたイムノクロマト法によるアミノグリコシド耐性菌迅速検出法を開発した。AAC(6')Iae 産生菌は例外無くアミノグリコシド高度耐性を示したことから、イムノクロマト法による迅速検出は非常に有効であった。しかしながら、同検出法では抗体の特異性から AAC(6')Iae 非産生のアミノグリコシド耐性菌は検出できない。また、AAC(6')Iae 陰性を示す多剤耐性緑膿菌90株についてアミノグリコシド耐性機序を遺伝学的に解析した結果、80%にあたる72株が aac(6')Iae 以外の各種 aac(6')I 遺伝子を保有していることが分かった。これらの研究結果から、AAC(6')のアミノグリコシドアセチル化反応機序に基づく検出法が開発できれば、AAC(6')の亜型に依存せずにアミノグリコシド耐性菌を検出できるのではないかという発想に至った。

本研究では、AAC(6')がアセチル CoA とアミノグリコシドの2基質を認識し、アセチル CoA のアセチル基をアミノグリコシドの側鎖アミノ基に転移修飾する際、反応産物として SH 基を持つ CoA が生じることから、チオールプローブである DTNB (5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)) に着目した。DTNB は、チオール(SH 基)が存在すると DTNB 内 S-S 結合が解け、安定な TNB(5-thio-2-nitrobenzoic acid)を生成する。DTNB の吸収極大波長  $\lambda_{max}$  は 325 nm であるのに対し、TNB の  $\lambda_{max}$  は 412 nm である

ことから、チオール存在下で反応液は黄色に呈色する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、チオールプローブを用いた発色法によるアミノグリコシド耐性菌の迅速検出法を開発することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 本研究で用いた菌株と培地

至適条件の検討には、これまでに分子疫学で AAC(6') 酵素の産生が確認されている NCGM2.S1 株と NCGM798 株を AAC 産生株として、PAO1 株と ATCC27853 株をアミノグリコシド感受性 (AAC 非産生株) を使用した。いずれの株もプラスミドを保有していないことから、菌株は実験ごとに -80 ストックから抗生剤フリー寒天培地上に起こし、37 で培養したのち、LB 培地 (Millar) に植えることで一晚培養液を調整した。至適条件検討後、最終的に、AAC(6')Iae 陽性株 48 株、AAC(6')Ib 陽性株 45 株、AAC(6')Iaf 陽性株 2 株、およびアミノグリコシド (Amikacin) 感受性株 45 株を用いて示す多剤耐性緑膿菌 90 株についてチオールプローブを用いた発色法によるアミノグリコシド耐性菌検出系を評価した。

### (2) 菌体溶解液調整条件の検討

菌体溶解はこれまでに開発したイムノクロマト法における菌体溶液調整法を応用した。Tris 緩衝溶液あるいはリン酸緩衝溶液に、酵素の高次構造に大きな影響を与えない程度の6種イオン性界面活性剤 (Triton-X100、Triton-X405、Tween 20、Tween 80、Brij 35 および SDS) をそれぞれ加えた溶液を調製し、菌体溶解液とした。菌体溶解は、一晚培養した菌体 100  $\mu$ l と菌体溶解液 900  $\mu$ l を 1.5ml のエッペンチューブ内で混合・懸濁し調整した。

### (3) 反応条件の検討

Tris 緩衝溶液および各種菌体溶解液を基本としてアミカシン、アセチル CoA、およびチオールプローブ (DTNB) の混合液を作成したものを検出試薬として作製した。20  $\mu$ l の菌溶解液と 180  $\mu$ l の検出試薬を 96 well プレート上で混合した後、37 で 15 分間インキュベートし、412nm の波長でプレートリーダーを用いることにより黄色呈色反応を測定した。同時に目視による呈色反応の観察・記録も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 菌体溶解液調整条件の検討

分子を特異的に迅速検出するイムノクロマト法などでは、サンプル調整に界面活性剤が汎用されている。本研究においても界面活性

剤を用いて菌体溶解液の調整を試みた。菌体溶解には 1% Triton-X100、4% Triton-X405、1% Tween 20、1% Tween 80、4% Brij 35 および 0.1% SDS を用いた。上述に記載の方法で菌体溶解液を調整したのち、20  $\mu$ l の菌体溶解液と 180  $\mu$ l の検出試薬 (アミノグリコシド (Amikacin)、Acetyl-CoA、DTNB を含む) を 96 well プレート上で混合し、37 度で 15 分反応させた後、呈色反応を測定した結果、AAC 産生、非産生に関わらず全ての溶液で黄色の呈色反応を示した (図 1)。反応は全ての条件において 37 でのインキュベーション前から観察された。NCGM2.S1 株と NCGM798 に関しては、別の研究において開発されたイムノクロマト法があるため、同菌体溶解液を用いて AAC 検出を行った結果、すべての界面活性剤条件で陽性反応が検出された。この結果は、菌体が界面活性剤によって十分に溶解すなわち、酵素が溶液中に抽出されていることを示している。しかしながら、AAC 非産生株においても陽性の呈色反応が得られたことから、DTNB が TNB に分解される反応を、溶解液に含まれる界面活性剤が AAC 非依存的に促進している可能性が強く示唆された。低濃度の界面活性剤を用いて菌体溶液の調整を試みたが、イムノクロマト法を用いた抽出酵素の定量結果から、低濃度の界面活性剤では菌体溶解が不十分であることが分かった (データは示さない)。以上の結果から、界面活性剤を使用しない方法として、超音波破碎法による菌体溶解液の調整を行うことに決定した。

同時に、可視化による黄色呈色反応を認識可能な検出のボーダーラインを調べた結果、412 nm における吸光度が 0.3 以上であれば、目視で呈色反応を識別可能であることが分かった。

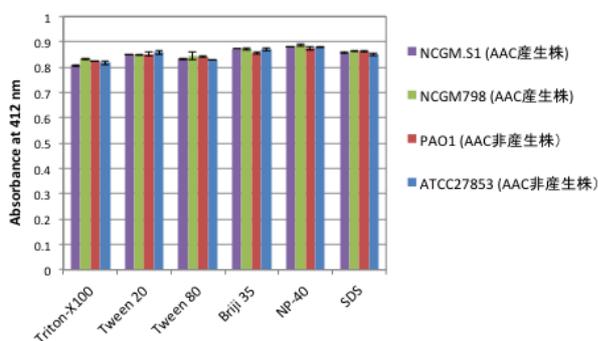


図 1 菌体溶解に用いる界面活性剤の選択

#### (2) DTNB 濃度が反応に与える影響

0.5 mM Amikacin、0.25 mM Acetyl-CoA を含むリン酸緩衝溶液に異なる濃度の DTNB を加え、検出試薬を調整した。超音波破碎によって調整した菌体溶解液 20  $\mu$ l と 180  $\mu$ l の検出試薬を混合し、37 度で 10 分インキュベートした後、呈色反応を検出した結果、AAC 産生株、AAC 非産生株共に、DTNB 濃度依存的に

412 nm の吸光度が上昇した (図 2)。0.25 mM 以上の DTNB を含む溶液においては、AAC 産生株と AAC 非産生株で 412 nm の吸光度に差が観察された。しかしながら、AAC 非産生株も吸光度が 0.4 以上であり、わずかに呈色反応を示した。

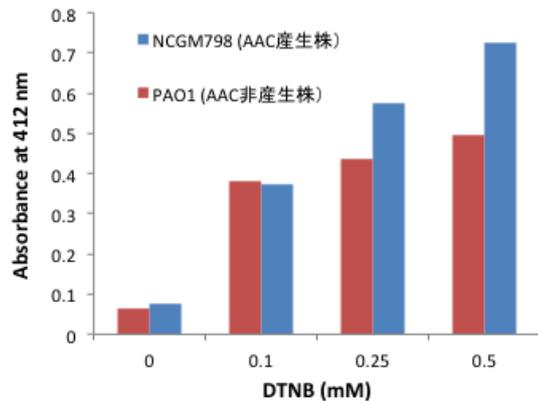


図 2 チオールプローブ (DTNB) 濃度の検討

#### (3) Acetyl-CoA 濃度が反応に与える影響

続いて、上述の実験において AAC 産生株と AAC 非産生株の間で最も差が見られた DTNB 濃度を固定し、異なる濃度の Acetyl-CoA を加え、検出試薬を調整し、同基質による反応への影響を観察した。超音波破碎によって調整した菌体溶解液 20  $\mu$ l と 180  $\mu$ l の検出試薬を混合し、37 度で 10 分インキュベートした後、呈色反応を検出した結果、DTNB と同様に、AAC 産生、非産生に関わらず、Acetyl-CoA 濃度依存的に 412 nm の吸光度が上昇した。吸光度の増加は、AAC 産生株が最も顕著であり、目視による呈色反応の差は、Acetyl-CoA の濃度が 0.5 から 1 mM の反応条件において最も差が見られた。

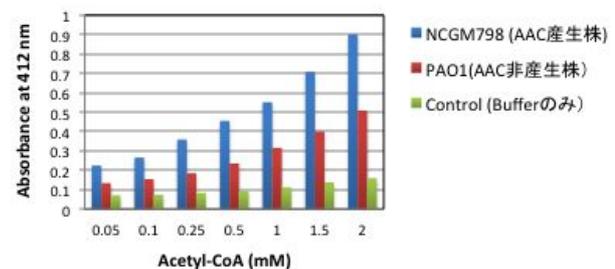


図 3 Acetyl-CoA 濃度の検討

#### (4) アミノグリコシド濃度が反応に与える影響

続いて、上述の実験において AAC 産生株と AAC 非産生株の間で最も差が見られた DTNB および Acetyl-CoA の濃度をそれぞれ 0.5 mM に固定し、異なる濃度の Acetyl-CoA を加え検出試薬を調整し、同基質による反応への影響を観

察した。超音波破碎によって調整した菌体溶解液 20  $\mu$ l と 180  $\mu$ l の検出試薬を混合し、37 で 10 分インキュベートした後、呈色反応を検出した結果、DTNB と Acetyl-CoA とは異なり、AAC 産生、AAC 非産生に関わらず、アミノグリコシドは 412 nm の吸光度に変化はなかった。

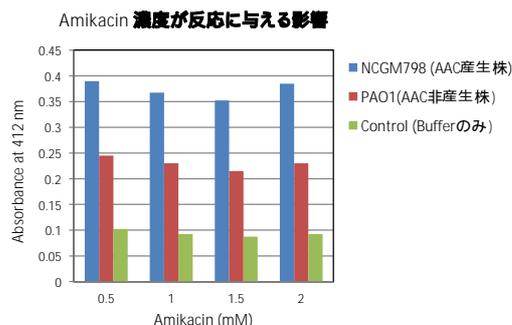


図4 アミノグリコシド濃度の検討

(5) 臨床分離株を対象とするチオールプローブを用いたアミノグリコシド耐性菌迅速検出法の評価

AAC(6')Iae 陽性株 48 株、AAC(6')Ib 陽性株 45 株、AAC(6')Iaf 陽性株 2 株、およびアミノグリコシド (Amikacin) 感受性株 45 株を用いて示す多剤耐性緑膿菌 90 株の菌体溶解液を超音波破碎によって調整し、至適化された DTNB、アミノグリコシド、および Acetyl-CoA を含む検出試薬で反応を観察した結果、各種 AAC (6') 陽性株で全て陽性を示す黄色の呈色反応を観察した。一方で、アミノグリコシド感受性株では、45 株中 32 株では陰性を示し、13 株は擬陽性を示した。得られた呈色反応が AAC(6') 特異的なものであるかを判断するために、6' 位側鎖にアミノ基を持たないパロモマイシン、Acetyl-CoA、および DTNB を含む検出試薬で上述の菌株を対象に、反応を観察した結果、95 株中 85 株の AAC (6') 陽性株で陽性が確認され、アミノグリコシド感受性株においても、10 株で陽性が確認された。以上の結果、チオールプローブを用いたアミノグリコシド検出法を確立するためには、検出試薬、菌体溶解液の組成、反応条件などを更に工夫・検討することが必要である。

## 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 2 件)

1.Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kitao T, Shimada K, Kirikae T.

Development of an immunochromatographic

assay for rapid detection of AAC(6')-Ib-producing *Pseudomonas aeruginosa*.

J Microbiol Methods.2012, 91(1):114-116.

2. Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.

Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan.

Int J Antimicrob Agents.2012,

39(6):518-521.

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

安藤公英 (ANDO, TOMOE)

国立国際医療研究センター・研究員

研究者番号：80462787