

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410164

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌の高確度検出を目指した抗体ナノ粒子プローブ - 反応熱分解分析法の高性能化

研究課題名(英文) Improvement of reactive pyrolysis GC/MS system for highly sensitive 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・教授

研究者番号：70273266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アタッチメント式抗体磁性ビーズプローブと反応熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析法を連結した新規分析手法を開発した。この方法により、特定の細菌を選択捕集し、得られた菌体中の脂肪酸成分を高感度に検出することに成功した。さらに、この手法を消毒薬耐性菌の分析に応用したところ、検出された脂肪酸成分の化学組成の違いに基づいて、消毒薬耐性をもつ大腸菌を迅速かつ簡便に検出することも可能になった。

研究成果の概要(英文)：A reactive pyrolysis GC/MS system combined with magnetic bead probe was newly developed. This technique realized 1) selective capture of a certain species of bacteria, and 2) fatty acid analysis of the species. Moreover, this method was applied to the analysis of fatty acid components in mutant-type *E. coli* with resistance to 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol (triclosan). Based on the pattern of the obtained chromatograms, the mutant colonies were clearly discriminated from the wild type ones reflecting their resistance to triclosan.

研究分野：分析化学

キーワード：消毒薬耐性菌

1. 研究開始当初の背景

医療分野では、薬剤耐性菌が引き起こす病院感染が大きな問題となっている。耐性菌の感染リスクを低減するためには、汚染された環境水や体液中に含まれる細菌の種類と耐性の有無を迅速に決定することが欠かせない。現在、耐性菌の識別には、遺伝子のシーケンス解析法が最も確度の高い方法として利用されているが、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などの問題点がある。そのため、病院内にて医療関係者が薬剤耐性の有無を容易に判定できる、迅速かつ簡便な判別法の登場が急務とされている。

こうした中で申請者らは、「抗体磁性ナノ粒子プローブ」による簡便な細菌捕集技術と反応熱分解ガスクロマトグラフィー（反応熱分解 GC）の連結技法を開発した。この方法により、様々な夾雑物や多種の細菌類が混在している実サンプルをそのまま測定に使用して、そこに存在する特定の細菌の細胞膜脂質の構造を詳細に解析することに成功した。さらに、得られた脂質脂肪酸の比率（化学組成）が薬剤耐性の有無を反映してかなりの程度変化することを見出し、その組成における違いを手掛かりに用いて、耐性作用の有無を迅速判別することに成功した。しかし、本手法では、以下に示すように汎用性と信頼性に関して大きな問題点が残されていた。

- ・対象となる細菌種の汎用性の問題：対象とする細菌種を変更したい場合には、その都度、磁性ナノ粒子と抗体間の化学結合反応から調製を始める必要があり、大変な手間がかかる。
- ・耐性判定の確実性の問題：開発したプローブでは、同じ菌種であれば、耐性菌と通常菌の双方を同時に捕集してしまう。そのため、同一菌種における耐性菌と通常菌が混在している試料系では、耐性の有無を一義的に判定できない。

こうした中で申請者は、1) 抗体磁性ナノ粒子にさらなる抗体を付加的に組み合わせることで高性能化すること、ならびに 2) データ解析の際にバイオインフォマティクスの手法を活用することにより、上記の問題点を解決することに着眼した。この高性能化によって、専門的な知識を持たない医療従事者であっても、細菌における薬剤耐性の有無をより高い確度でもって一義的に迅速解析することが初めて可能になると考え、本申請課題を立案するに至った。

2. 研究の目的

まず、「抗体磁性ナノ粒子プローブ - 反応熱分解 GC」計測システムにおける汎用性と確実性を大幅に向上させて、その高性能化を

はかる。まず、汎用性の問題については、基質となる抗体磁性プローブに対して、所望する細菌種に作用する抗体を簡便な操作で結合させて使用する、「アタッチメント式抗体ナノ粒子」の調製方法を確立する。

次に、信頼性向上については、統計的手法の一つである主成分分析法の活用をはかる。反応熱分解 GC 分析により得られる複雑な脂肪酸組成データを主成分分析法によりデータ解析して、耐性作用判定における客観性を高める。以上の高性能化を通じて、生体試料中における耐性菌の存在を、簡便な操作でもって一義的に迅速（20 分以内）決定できる実用的な計測法を開発する。

さらに、現状では、薬剤耐性作用がどのように発現するのか、その発現メカニズムには不明な点が多く残されている。そこで、一連の耐性菌の分析結果を基にして、耐性作用の発現に伴い、細胞膜脂質の構成成分の種類や化学組成がどのように変化したかを詳細に解析する。この解析結果から、細胞膜脂質の分子構造の観点から、薬剤耐性菌の耐性作用の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) 捕集対象となる細菌種の汎用性を高めた「アタッチメント式抗体ナノ粒子プローブ」の調製

基質となる抗体ナノ粒子に対して、実際に細菌に作用する抗体を結合させて用いる、アタッチメント式ナノ粒子プローブの調製法を開発する。まず、マウスなどの特定の動物由来の抗体に特異的に結合する基質抗体ナノ粒子を合成する。この基質プローブの作製方法としては、まず、磁性ナノ粒子に 4-メチルカテコールを反応させ、次に、その反応部位をアジド化した個所を起点として抗体を導入する方法を採用する。次に、マウスに任意の細菌種を作用させて作製した抗体を、抗体抗原反応を利用して基質粒子プローブに結合させる。この結合反応をスムーズかつ高効率に進行させるために、1) 基質プローブに対する抗体の導入率、2) 基質粒子プローブの粒径、および 3) 種々の反応条件（温度や時間）の最適化実験も実施する。この調製法を確立することによって、基質プローブに対して、任意の細菌に作用する抗体を簡便な操作で結合（アタッチメント）させるだけで、捕集対象となる細菌の種類を容易に変更することが可能になる。

(2) 主成分分析法を利用した脂肪酸成分データの統計解析

耐性判定の確度を高めるために、統計的手法の一つである主成分分析法によるデータ解析をはかる。まず、説明変量として利用する脂肪酸成分の選択を行う。次に、データ解析に先立つ数値の標準化方法や、実際の主成分分析に関する様々なパラメータの最適化

を図ることにより、一連の細菌試料を最も効率よく識別できる計算プロトコルを構築する。

(3) 実際の試料系への応用

開発した方法論を応用して、実際の薬剤耐性菌の検出を実施する。試料には、耐性菌を含む複数の細菌種の混合系を用いる。ここでは、特に、反応熱分解 GC における分離条件（カラム固定相の選択、分解能の向上等）の適正化を中心に実験を進める。さらに、本手法により得られる脂肪酸組成データを主成分分析によりデータ解析し、試料中の耐性菌の存在を一義的に決定する方法を構築する。

さらに、薬剤耐性菌における細胞膜脂肪酸の構造や存在比の情報と、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ックスの手法を活用して多変量解析する。この統計解析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造の観点から解明する。

4. 研究成果

(1) 「アタッチメント式抗体ナノ粒子」の調製方法の確立

まず、2 次抗体の添加量、調製温度や反応時間などのパラメーターに注目して、アタッチメント式抗体磁性ビーズプローブの調製方法の確立を試みた。ここでは、試料として寒天培地上で一晩培養した大腸菌を用いた。また、最適化の方法としては、まず、実際に調製した抗体磁性ビーズプローブを使って大腸菌を捕集した後、得られたプローブ-大腸菌複合体をリン脂質検出用の条件下で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) 測定した。その結果、得られた質量スペクトル上のリン脂質ピーク群の S/N 比や相対強度を手掛かりに用いて、各パラメータの最適化を行った。その結果、それらのパラメータを以下の様に設定したときに、大腸菌由来のリン脂質ピーク群の S/S は最も大きくなったことから、アタッチメント式抗体磁性ビーズを効率よく合成できていることが分かった。

気質となる抗体磁性ビーズの種類：
Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG
(Invitrogen 社)

2 次抗体の種類：E.coli anti-Rabbit 60-E13
(コスモ・バイオ社)

基質ビーズと 2 次抗体の体積比：1 対 5

反応温度：25

反応時間：30 分

以上のように決定した、抗体磁性ビーズの調製方法を図 1 に示す。

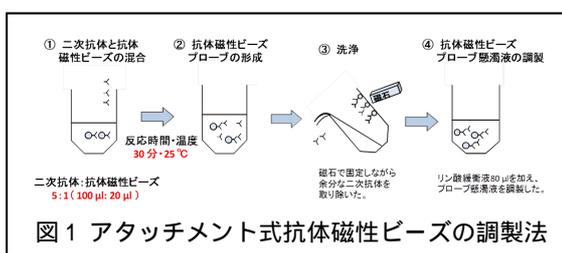


図 1 アタッチメント式抗体磁性ビーズの調製法

(2) 「アタッチメント式抗体ナノ粒子」により細菌捕集プロトコルの確立

開発した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、最適な捕集条件を決定することを試みた。ここでは、細菌試料には大腸菌を用い、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、吸着した大腸菌の検出には、リン脂質検出用の条件下での 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、最も効率的に大腸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 2 に示す。

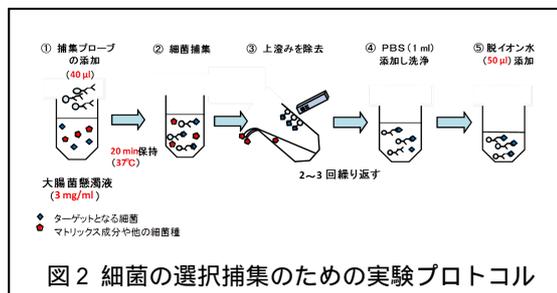


図 2 細菌の選択捕集のための実験プロトコル

そこで、次に、こうして磁性粒子上に捕集した大腸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、大腸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ーを検討した結果、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、それらの望ましくない異性化や熱分解を回避して、対応するメチル誘導体として高感度に検出できることを見出した。さらに、実際に大腸菌を選択捕集した抗体磁性ビーズを試料に用いて、TMAH 共存下での反応熱分解 GC 分析を行った。その結果、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 3 に示す。

この図に示すように、クロマトグラム上には炭素数が 12~19 までの一連の脂肪酸成分が対応するメチルエステルとしてはっきりと観測された。さらに、トータルイオンクロマトグラムと比べて、m/z 74 におけるマスクロマトグラムでは、マトリクス成分との分離がより向上していることも見て取れる。

このように、アタッチメント式抗体磁性ナノ粒子プローブを反応熱分解 GC/MS 法と組み合わせた新規計測システムを構築できた。さらに、この方法により、選択捕集した任意の細菌に含まれる脂肪酸成分を高感度に検出できることも確認できた。

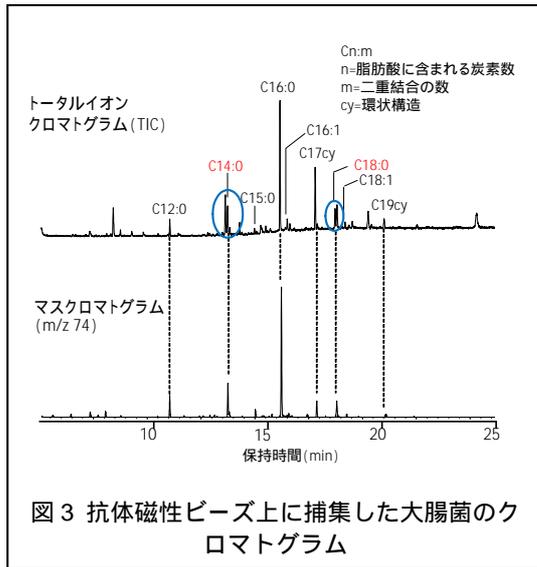


図3 抗体磁性ビーズ上に捕集した大腸菌のクロマトグラム

(3) 実サンプルからの特定細菌種の選択検出への応用

磁性ナノ粒子プローブと反応熱分解 GC/MS を連結した計測方法を発展的に応用して、実際の薬剤耐性菌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。ここでは細菌試料として、代表的な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。この薬剤耐性を備えた大腸菌（耐性株）と、通常の大腸菌（通常株）をそれぞれアタッチメント式抗体磁性ビーズで捕集し、回収したビーズ大腸菌の複合体試料を反応熱分解 GC/MS 測定した。その結果得られた通常菌と耐性株の典型的なクロマトグラムを図4に示す。この図に示すように、いずれの大腸菌試料についても、一連の脂肪酸成分が明瞭に観測された。しかしながら、それらのピークパターンは極めてよく類似していたため、次に、各脂肪酸ピークの面積比を算出し、それらの比較を行った。その結果、通常株と耐性株の間で、脂肪酸成分の面積比は全体的にはよく類似していたが、詳細にみると、パルミトレイン酸、シクロヘプタデカン酸やオレイン酸などの成分では、両者間で若干の差が見られた。従って、トリクロサン耐性を備えることによって、それらの脂肪酸成分の組成における変性が生じていることが示唆された。

(4) 主成分分析法を用いた薬剤耐性菌の識別の視覚化

前述した脂肪酸組成の変化に基づいて、耐性の有無を判別することも可能ではあるが、その差異が必ずしも大きくはないため、明瞭な識別には至らなかった。そこで、バイオインフォマティクスの分野において多変量解析法として活用されている主成分分析法を採用することとした。ここでは、クロマトグラム上に観測された 10 成分の脂肪酸の面積を説明変量に選択し、また、解析前の数値の標準化法としてオートスケリングを使用した。その結果、得られた主成分分析のプロット図を図5に示す。この図に示すように、それぞれの脂肪酸組成の違いを反映して、野生株および変異株をはっきり分類することができた。

以上のように、アタッチメント式抗体磁性ビーズプローブと反応熱分解 GC/MS の組合せにより、脂肪酸組成の違いを手掛かりにして、薬剤耐性菌を簡便に検出することが可能になった。

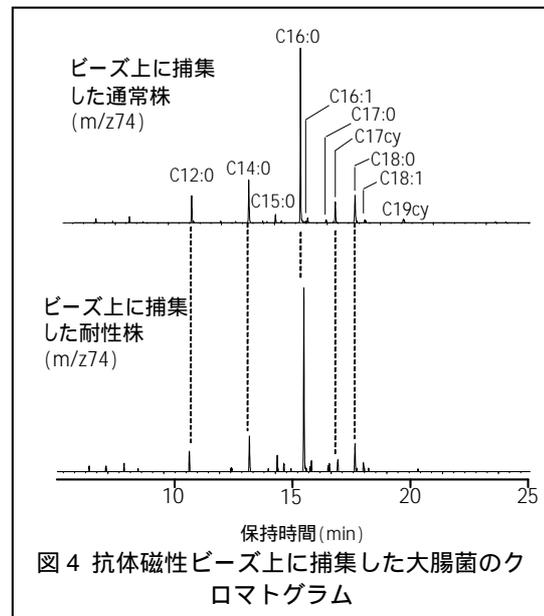


図4 抗体磁性ビーズ上に捕集した大腸菌のクロマトグラム

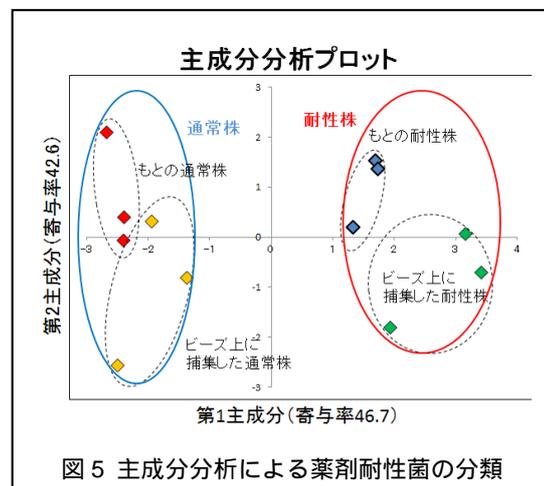


図5 主成分分析による薬剤耐性菌の分類

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 6 件)

石田康行, 反応熱分解ガスクロマトグラフィによる微生物中の脂肪酸成分の迅速組成分析, 中部大学生物機能開発研究所紀要, 2016, vol.16,45-50, 査読有.

U-Y. Youn, M-S. Shon, G-N. Kim, R. Katagiri, K. Harata, M. Kamegai, Y. Ishida, S-C. Lee, Antioxidant and anti-adipogenic activities of acorn shells, Food Science and Biotechnology, 2016, vol. 25, 1183-1187, 査読有.

S. Baidurah, P. Murugan, L. Joyyi, J. Fukuda, M. Yamada, K. Sudesh, Y. Ishida, Validation of Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography for Rapid and Direct Compositional Analysis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) in Whole Bacterial Cells, Journal of Chromatography A, 2016, vol. 1471, 186-191, 査読有.

Myung-Soo Shon, Si-Kyung Kim, Ji-Hye Song, Masayuki Kamegai, Byung-Yoon Cha, Yasuyuki Ishida, Seung-Cheol Lee, and Gyo-Nam Kim, Anti-oxidant and Anti-adipogenic Effects of Acorn (*Quercus acutissima* CARR.) Shell Extract through Regulation of Wnt Signaling in 3T3-L1 Cells, Food Science and Biotechnology, 2016, vol. 25, 875-882, 査読有.

Yasuyuki Ishida, Tetsuya Hirota, Shiho Sato, Masayuki Kamegai, Si-Kyung Kim, Song-Yi Park, Da-Hee Koo, Myung-Soo Shon, Gyo-Nam Kim, Hae-Ryong Park, Seung-Cheol Lee, Discriminative Analysis of Free and Esterified Gallic Acids in Acorn Shells by Thermochemolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the Presence of Organic Alkalis, J. Anal. Appl. Pyrolysis, 2015, vol. 116, 114-119, 査読有.

Siti Baidurah, Seiya Takada, Kazuki Shimizu, Yasuyuki Ishida, Tsuneo Yamane, Hajime Ohtani, Rapid and Direct Compositional Analysis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in Whole Bacterial Cells by Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography, Analytical Sciences, 2015, vol. 31, 79-83, 査読有.

[学会発表](計 13 件)

Siti Baidurah, Kumar Sudesh, Yasuyuki Ishida, Application of Reactive Pyrolysis-gas Chromatography to the Compositional Analysis of Biodegradable Copolyesters, AnalytiX 2017, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市), 2017年3月24日.

野々目美菜・古山容子・石田康行、細菌産生型の高性能ポリエステル反応熱分解 GC による生分解メカニズムの解明、「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第16回高山フォーラム、高山市図書館(岐阜県高山市), 2016年11月11日.

古山容子・野々目美菜・福田潤弥・山田雅也・石田康行・Siti Baidurah・Paramasivam Murugan, Kumar Sudesh, 反応熱分解 GC を利用した細菌生産型ポリエステル土壌分解メカニズムの解明、第21回高分子分析討論会、名古屋国際会議場白鳥ホール、2016年10月21日(愛知県名古屋市).

石田康行、有機アルカリ共存下での反応熱分解 GC/MS による生体試料の高感度な実用分析法の開発、第1回医用マススペクトル学会西部会、名古屋大学鶴舞キャンパス(愛知県名古屋市), 2016年7月23日.

石田康行・岩田由稀・前村佳那・近藤幸盛、反応熱分解 GC/MS を利用した冬虫夏草の成長に伴うコルジセピン含有量の変化の解析、日本分析化学会 第76回分析化学討論会、岐阜大学(岐阜県岐阜市), 2016年5月29日.

石田康行、反応熱分解分析法によるバイオマス試料の分子構造キャラクタリゼーション、第66回日本木材学会大会バイオマス変換研究会春季講演会、名古屋大学(愛知県名古屋市), 2016年3月29日.

石田康行、反応熱分解ガスクロマトグラフィによる生体中の脂肪酸成分の迅速分析、日本薬学会 東海支部 特別講演会、金城学院大学(愛知県名古屋市), 2016年1月8日.

石田康行、反応熱分解分析法による生体試料中の脂質成分のキャラクタリゼーション、第31回日本腐植物質学会講演会 IHSS 18th International Meeting in Kanazawa プレシジョン「Keystone for Future Earth: Diversity of Organic Matter in Environments」、名古屋大学野依記念学術交流館(愛知県名古屋市), 2015年11月19日.

石田康行・坂野 郁・岩田由稀・前村佳那・近藤幸盛、反応熱分解 GC/MS による高分子マ

トリックス中の難揮発性化合物の精密定量のための標準試料の調製-冬虫夏草中の抗生物質コルジセピンの定量を例に-、第20回高分子分析討論会、つくば国際会議場（茨城県つくば市）、2015年10月29日。

牧野朱里・岩間安奈・石田康行・川村久美子，抗体磁性ビーズプローブ/質量分析法による細胞膜脂質の精密解析に基づく消毒薬耐性菌の迅速検出，日本油化学会第54回年会，名城大学（愛知県名古屋市），2015年9月9日。

石田康行・太田彩恵・シティバイデューラー，反応熱分解ガスクロマトグラフィーによる細菌細胞中の脂肪酸分析における信頼性の評価，日本分析化学会第75回分析化学討論会，山梨大学甲府キャンパス（山梨県甲府市），2015年5月24日。

牧野朱里・奥石陵雅・石田康行，消毒薬耐性菌の迅速検出を指向したアタッチメント式抗体磁性ビーズプローブ-MALDI-MS法の開発，「分析中部・ゆめ21」若手交流会第14回高山フォーラム，高山市図書館（岐阜県高山市），2014年11月15日。

牧野朱里・鶴飼浩志・石田康行・川村久美子，薬剤耐性菌の迅速検出を目指したアタッチメント式抗体磁性ビーズプローブ/MALDI-MS法の開発，日本分析化学会第63回年会，広島大学（広島県東広島市），2014年9月17日。

〔図書〕(計 1 件)

石田康行，HPLC，GCの測定条件設定テクニックと解析事例集，技術情報協会，p685-690，2016年8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・教授
研究者番号：70273266

(2) 研究分担者

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

川村 久美子 (KAWAMURA, Kumiko)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30335054