

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21360

研究課題名(和文)ファージ由来吸着タンパクを用いたMRSA迅速診断方法の確立

研究課題名(英文)Development of MRSA rapid detection method using phage derived ligand protein

研究代表者

松井 秀仁(Matsui, Hidehito)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：80503797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリオファージの特異的吸着機構を応用することで、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する新たな迅速診断方法を確立することを目的とした。作製したバクテリオファージ由来吸着タンパクは、*S. aureus*特異的に反応し、その他の菌種と交差反応を示さないことが確認された。この吸着タンパクを用いて、ラテラルフローアッセイの原理を応用して、*S. aureus*検出系を構築した。*S. aureus*の臨床分離株を用いた評価試験では、我々が確立したPBP2'検出系の結果と本法の結果を組み合わせることによって、MRSA及びMSSAの鑑別が迅速かつ簡便に行うことが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Bacteriophages infect with a narrow range of host cells by binding on the specific cell-surface receptor. This high host-specificity is largely relies on the specific interaction of the ligand protein and the receptor molecule. This project aimed to develop a simple and rapid *Staphylococcus aureus* diagnosis test employing the phage ligand protein in the lateral flow assay. The ligand protein was expressed by the gene cloning technique and purified by the affinity chromatography. The test was able to detect 32 clinical isolates of *S. aureus* tested without exception and showed no cross reactivity with other microorganisms including 31 bacterial species and one strain of yeast so far tested. We previously developed a MRSA detection tool using a monoclonal antibody raised against PBP2' in the immunochromatography. The combination of the present method and the PBP2' detection tool enabled to distinguish MRSA and MSSA.

研究分野：感染症学

キーワード：MRSA ファージ 迅速診断

1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)は1961年にイギリスで分離され、その後、院内感染の主要な原因菌として世界中に拡散した。日本でも1980年代に急増し、臨床現場で混乱が引き起こされた。現在においても、日本やアメリカでは院内で分離される黄色ブドウ球菌の50%程度がMRSAである。MRSAのラクタム薬に対する耐性機序は、外来遺伝子群 Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) の獲得に起因する。このSCCmec内に存在する *mecA* 遺伝子の翻訳産物である Penicillin binding protein 2' (PBP2') はラクタム薬の障害を受けないため、MRSAにラクタム薬耐性をもたらす (Fig.1)。

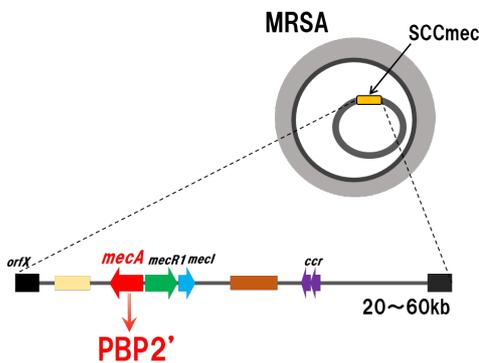


Fig.1. MRSA のラクタム耐性

現在、MRSAの検出に用いられている方法としては、オキサシリンやセフォキシチンなどのラクタム薬を用いた薬剤感受性を測定する方法や PBP2' のタンパク質を直接検出するラテックス凝集試験法、*mecA* 遺伝子を標的とした PCR 法などがある。しかし、これらの方法は、それぞれに検出感度、迅速性、簡便性等に問題点がある。特に血流感染などの侵襲性感染症の場合、MRSAの迅速な検出が求められているため、臨床現場で実用性のある迅速・簡便な検出系の確立が望まれている。

バクテリオファージ(ファージ)は、細菌を宿主とするウイルスである。ファージの増殖サイクルは、まず宿主細菌への特異的な吸着から始まる。続いて、ファージ核酸が細胞質内へと侵入し、複製が開始する。ファージ構成成分の作製、ファージ粒子の構築がなされ、その後宿主細菌を溶菌させてファージが放出される (Fig.2)。ファージは、標的となる宿主細菌に対して特異的に感染し、上記のサイクルで増殖を行う。この特異的な感染に寄与している機構として、菌体表層へのファージの吸着が重要である。ファージの尾部に存在するタンパクは、宿主細菌表層のレセプター分子を認識することで、特異的な感染を成立させている。そこで、このファージ由来吸着タンパクと宿主細菌表層レセプターの認識機構を応用することにより、新たな細菌検出

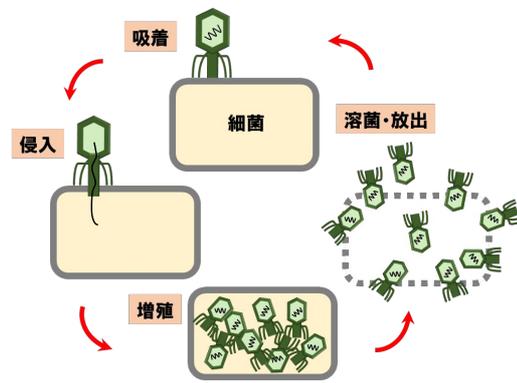


Fig.2. ファージの増殖サイクル

方法を確立することができる考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ファージの宿主細菌特異的認識機構に寄与する尾部の吸着タンパクを用いて、薬剤耐性菌として問題となっている MRSA に対する新たな迅速診断方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1). 吸着タンパクの調製

吸着タンパク遺伝子 *orf16* を導入した大腸菌を用いて、タンパク発現を誘導後、可溶性画分より rORF16(吸着タンパク)をアフィニティカラムで精製した。得られた精製画分は、SDS-PAGE で確認を行った。

(2). 吸着タンパクの活性及び特異性評価

不活化 *S. aureus* 菌体を固相化したプレートを作製し、ELISA 法にて、吸着タンパクの活性を評価した。また、同様の方法で、様々なグラム陽性菌、陰性菌、真菌を用いて、吸着タンパクの他菌種に対する交差反応性の評価を行った。

(3). 吸着タンパク結合粒子の作製

吸着タンパクを金コロイドナノ粒子に結合させ、ブロッキング処理を行った。遠心洗浄後、緩衝液中に懸濁し、吸着タンパク結合粒子を作製した。

(4). ラテラルフローアッセイ系の構築

ニトロセルロースメンブレン上に吸着タンパクを固相化し、続いてブロッキング及び安定化処理を行った。ラミネートシート上に作製したメンブレン及び吸収パッドを貼り付け、短冊状に切断することでテストストリップを作製した。ラテラルフローアッセイは、菌体処理液と吸着タンパク結合粒子を混和後、テストストリップ上に展開させて、目視にてラインの出現から結果の判定を行った。

(5). 臨床分離株を用いた評価試験

研究室保存の *S. aureus* 臨床分離株を用い

て、構築したアッセイ系の反応性を評価した。また、他菌種に対する交差反応性の評価を行った。

#### (6). 血液培養サンプルからの PBP2' 検出

全血を添加した血液培養ボトルに菌株を植菌し、一晚培養を行った。培養液をサンプルとして、Lysis sol と混合後遠心処理を行った。上清を除去後、抽出液を加えて懸濁後、中和液を添加した。得られたサンプル処理液を我々が確立した PBP2' 検出イムノクロマトに添加して試験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1). 吸着タンパクの調製

大腸菌を用いた発現系より、ファージ由来吸着タンパクを精製し、SDS-PAGE による解析を行った(Fig.3)。その結果、予想された約 75kDa の位置に主要なバンドが検出された。

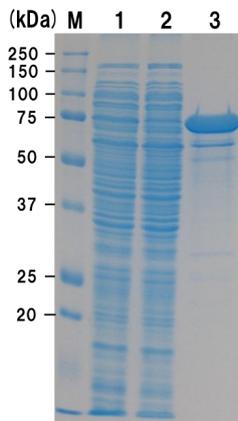


Fig.3. 吸着タンパクの調製

M: マーカー, 1: 可溶性画分, 2: カラムスルー, 3: 精製画分

#### (2). 吸着タンパクの活性及び特異性評価

作製した吸着タンパクの *S. aureus* 及び他菌種に対する反応性を評価した。試験に使用した *S. aureus* は、MSSA や MRSA、VISA、*mecC* 保有 MRSA など様々な耐性菌などを用いて評価した。その結果、試験を行ったすべての菌株と反応が確認され、菌株間での著しい反応性の違いは認められなかった(Fig.4)。

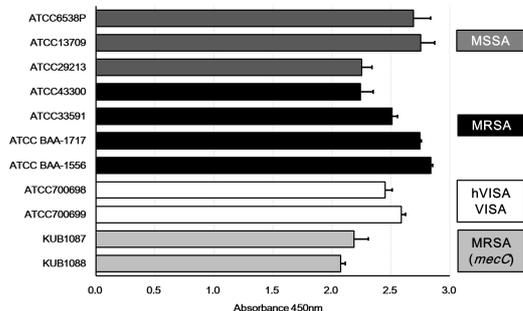


Fig.4. *S. aureus* に対する吸着タンパクの反応性

さらに他菌種に対する交差反応性について

評価を行った結果、同属の *Staphylococcus* 属 10 株に対しても反応は認められず、*S. aureus* 特異的に反応した(Fig.5a)。また、その他のグラム陽性菌 12 菌種、グラム陰性菌 9 菌種、真菌 1 菌種について評価を行ったが、いずれの菌種に対しても交差反応は示さずに、*S. aureus* 特異的であることが確認された(Fig.5b)。

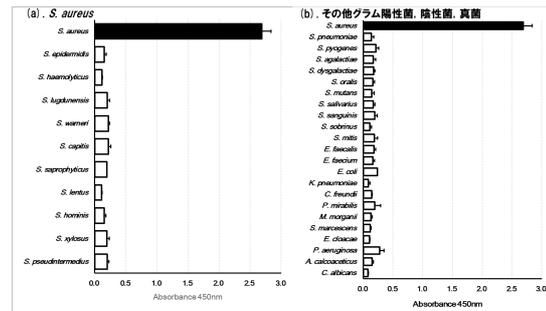


Fig.5. 吸着タンパクの他菌種に対する反応性

#### (3). ラテラルフローアッセイ系の構築

吸着タンパクを金コロイドに結合させ、検出用粒子を作製した。さらに、メンブレン上に固相化し、テストストリップを作製した。これらの部材を用いてラテラルフローアッセイ系を構築した。アッセイ系の反応性を評価する為、一晚培養した菌体をサンプルとして試験を行った。その結果、*S. aureus* では、コントロールライン及びテストライン上に赤色のラインが出現し陽性と判定した。一方、*S. epidermidis* では、コントロールライン上のみラインが出現し陰性と判定した(Fig.6)。さらに、20 種のお菌種を用いて、試験を行った結果すべて陰性を示し、本法は *S. aureus* 特異的な検出系であることが確認された。

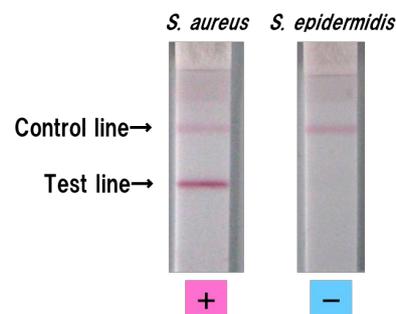


Fig.6. *S. aureus* 検出系の判定像

#### (4). 臨床分離株を用いた評価試験

32 株の *S. aureus* 臨床分離株を用いて、構築した *S. aureus* 検出ラテラルフローアッセイ系と、我々が確立した PBP2' 検出イムノクロマトによる MSSA、MRSA の判定を行った。対照法として、*femA* 及び *mecA* を標的とした PCR 法による判定を行った。その結果、5 株が MSSA、27 株が MRSA と判定され、PCR 法に

よる判定結果と完全に一致した。本法は、約 20 分で目視判定可能であり、

Table 1. 臨床分離株を用いた MSSA 及び MRSA の鑑別

		PCR法	
		MSSA	MRSA
		<i>femA</i> (+)	<i>femA</i> (+)
		<i>mecA</i> (-)	<i>mecA</i> (+)
<i>S. aureus</i> 検出系	+	5	27
(尾部吸着タンパク)	-	0	0
PBP2' 検出系	+	0	27
(モノクローナル抗体)	-	5	0
total		5	27

(5). 血液培養ボトルサンプルからの PBP2' の迅速検出

40 株の臨床分離 *S. aureus* を培養した血液培養ボトルサンプルからの PBP2' の迅速検出について検討を行った。その結果、24 サンプルで PBP2' 陽性と判定され、16 サンプルは陰性であった。これらの結果は、PCR 法による結果と一致した (Table 2a)。次に、Coagulase-negative staphylococci の臨床分離株 55 株を用いて、同様に試験を行った。PCR 法で陽性と判定された 36 サンプルのうち 33 サンプルが PBP2' 陽性と判定され、3 サンプルは陰性となった。PCR 法で陰性と判定された 19 サンプルについては、すべて PBP2' 陰性となった (Table 2b)。

Table 2. 血液培養サンプルからの PBP2' の検出

(a). <i>S. aureus</i>				
		PCR		合計
		MRSA	MSSA	
PBP2' 検出系	陽性	24	0	24
	陰性	0	16	16
合計		24	16	40
(b). Coagulase-negative staphylococci				
		PCR		合計
		MRCNS	MSCNS	
PBP2' 検出系	陽性	33	0	33
	陰性	3	19	22
合計		36	19	55

偽陰性を示した 3 つの血液培養サンプルについて、10 µg/mL CFX 含有培地と混合して 1 時間誘導培養を行った。その後、再度 PBP2' 検出について試験を行った結果、すべてのサンプルで陽性反応が確認された (Fig.7)。血液培養サンプルからの PBP2' 検出は、全工程を含めても 20 分で判定が可能であり迅速性及び簡便性にも優れていると考えられた。

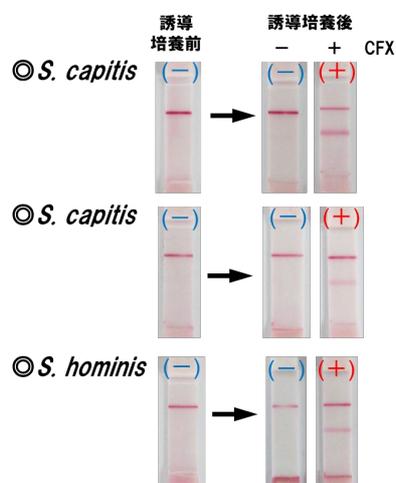


Fig. 7. 誘導培養サンプルからの PBP2' 検出

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

(1) 松井秀仁, 崔龍洙, 花木秀明. ファージ尾部タンパクを用いた黄色ブドウ球菌検出方法の開発. 第 63 回日本化学療法学会総会. 2015 年.

(2) 内山淳平, 松井秀仁, 阪口義彦, 花木秀明, 松崎茂展, 阪口雅弘. 細菌感染症における診断法と治療法の開発: バクテリオファージの利用. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 2015 年.

(3) 松井秀仁. MRSA 感染症と迅速診断方法の開発. 第 61 回防衛衛生学会 臨床検査技師研修会. 2016 年.

(4) 松井秀仁, 内山淳平, 津田愛美, 松崎茂展, 花木秀明. ファージを利用した細菌検出 ~ 黄色ブドウ球菌検出ファージクロマトの開発 ~. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年.

(5) 松井秀仁, 津田愛美, 花木秀明. イムノクロマト法を用いたメチシリン耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌の検出. 第 64 回日本化学療法学会総会. 2016 年.

(6) 松井秀仁, 津田愛美, 花木秀明. PBP2' イムノクロマトによる OS-MRSA の検出. 第 86 回日本感染症学会 西日本地方会学術集会 / 第 59 回日本感染症学会 中日本地方会学術集会 / 第 64 回日本化学療法学会 西日本支部総会. 2016 年.

(7) Hidehito Matsui, Jumpei Uchiyama, Megumi Tsuda, Shigenobu Matsuzaki, Taiji Nakae and Hideaki Hanaki. Development of a phage protein-mediated Staphylococcus aureus detection tool. The 116th General Meeting American Society of Microbiology

(ASM). 2016 年.

(8) **松井秀仁**, 津田愛美, 内山淳平, 花木秀明. ラテラルフローアッセイによる MRSA 検出方法の開発. MRSA フォーラム 2017. 2017 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 秀仁 (MATSUI HIDEHITO)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号: 80503797