

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08966

研究課題名(和文) 抗体磁性ナノ粒子と質量分析法の連結によるカルバペネム耐性菌迅速検査システムの構築

研究課題名(英文) Development of a rapid assay for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using magnetic beads and MALDI-TOF MS

研究代表者

川村 久美子 (KAWAMURA, KUMIKO)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：30335054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：4種類(IMP型、VIM型、NDM型、KPC型)のカルバペネマーゼを産生する大腸菌および肺炎桿菌を対象とした。抗体磁性ナノビーズ(Dynabeads M-280)による捕集系では、捕集前に1% Triton X-100と10mM 塩化カルシウムによる前処理を追加することで捕集の精度を高めることができた。検出系ではマトリックス試薬に  $\alpha$ -CHCAを用いて条件を最適化することで、主ピーク $m/z$ :3000-11000に菌体そのものと同じ質量スペクトルを得た。さらに、臨床分離株45株を用いた解析では、44株を正確に検出同定することができた。以上のように本研究で新しい耐性菌迅速検査システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果の学術的意義は、カルバペネマーゼの種類や亜型、また対象菌種に左右されることなくカルバペネマーゼ産生菌を検出できることである。さらに検出系のMALDI-TOF MSはランニングコストが安価で、処理能力が高いことから、すでに多くの検査室で汎用されており、今回提案した抗体磁性ナノビーズによる菌の捕集と連結させることも容易である。抗体磁性ナノビーズによる菌の捕集は特別なスキルを必要としない簡便な方法であるため、導入による検査室への負担はない。菌種同定の際に薬剤耐性菌情報を得ることができれば、治療効果の向上に貢献するという社会的意義を果たすのみならず、経費節減や業務量の軽減にもつながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) are important etiological agents associated with significant mortality rates mostly in critical wards. We developed the identification and the carbapenemase-production detection assay using magnetic beads and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The additional pretreatments of test samples using 10 mM CaCl<sub>2</sub> (left on ice for 30 min) and 1% TritonX-100 (incubation for 15 min at 37 °C) improved the sensitivity and accuracy of collection by magnetic beads. We found 97.8% (44/45 isolates) agreement between the carbapenemase-producing profile generated by MALDI TOF MS and that obtained using conventional methods. MALDI-TOF MS is a promising, rapid and economical method for the detection of CPE that could be successfully introduced into the routine diagnostic workflow of clinical microbiology laboratories.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：腸内細菌科菌種 カルバペネマーゼ産生菌 マトリックス支援レーザー脱イオン化質量分析法 磁性ナノ粒子 特異抗体 耐性菌迅速検査システム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性桿菌においては、β-ラクタム系抗菌薬に耐性を示す腸内細菌科細菌の拡散と蔓延が大きな社会問題となっている。なかでも、抗菌薬治療の切り札的存在であるカルバペネム系抗菌薬に耐性を獲得した腸内細菌科細菌(**Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae, CRE**)の増加が問題視されている。このカルバペネム耐性腸内細菌科細菌は、欧米ではカルバペネマーゼである **KPC** を産生する肺炎桿菌が主流で、多くは薬剤感受性試験でカルバペネムに「耐性」と判定されるため **CRE** と呼ばれている。一方、欧州では **NDM-1** や **OXA-48** など様々なカルバペネマーゼが混在しており、なかにはカルバペネムに「耐性」と判定されない株も散見されることから、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(**Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, CPE**)と呼ばれることが多い。

この **CRE/CPE** とよばれる薬剤耐性菌の問題点としては、耐性を付与する遺伝子が伝達性プラスミド上に存在し、そのプラスミドの伝播により、同じ菌種内でも遺伝的に系統が異なる菌株に伝播したり、さらには菌種を越えて遺伝子が伝播する事例がしばしば発生することである。さらに、**CRE/CPE** はカルバペネム系抗菌薬のみならず、アミノ配糖体やフルオロキノロン系薬にも同時に耐性を獲得している株も多く、既存の抗菌薬の中に有効性を期待できるものがほとんどないという場合が多い。従って、本菌による敗血症を発症した場合、死亡率が上昇する可能性が高く、米国や欧州からは最大で半数の患者が死亡するとの報告もある。

以上の理由から、血流感染などの重篤な細菌感染症においては、起因菌が **CRE/CPE** であるかを同定することは臨床で極めて重要であり、細菌検査室には検査の正確性と迅速性が要求される。しかしながら、**CRE/CPE** 産生菌は、産生されるカルバペネマーゼの種類が多様であり、それらの長が微妙に異なるため、検出方法が複数存在し、日常検査を複雑にしている。現在、細菌検査室では、複数の感受性ディスクや阻害剤を組み合わせた培養法が汎用されている。この培養法は手技が簡便で安価な方法ではあるが、判定までに最低でも **3** 日の時間を要し、時に特異性に問題がある場合もある。**PCR** 法による遺伝子の検出は特異性が高く、迅速な方法ではあるが、高価な機器と特殊な技術を要することから、日常検査としては未だ普及していない。近年の細菌検査室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-TOF MS**)が普及し、菌種同定に要する時間を従来の **2** 日から数分へと飛躍的に短縮させたが、耐性菌検出における活用は未だ研究レベルであり、実用化には至っていない。このような現状があるものの、医療現場では **CRE/CPE** の感染者数が年々急増する傾向にあり、本菌の迅速かつ特異的な新規検出法の開発が強く望まれていた。

## 2. 研究の目的

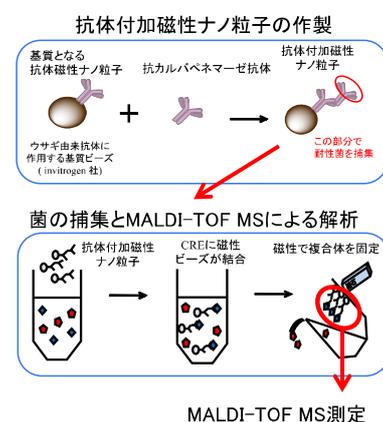
本研究では、日常検査における薬剤耐性菌検出の迅速化を目指し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(**MALDI-TOF MS**)による菌種同定と薬剤耐性菌(**CRE/CPE**)の検出を同時に行なうことができる「耐性菌迅速検査システム」を構築することを目的としている。

本検査システムでは、はじめに抗カルバペネマーゼ抗体を付加した抗体磁性ナノビーズを用いて **CRE/CPE** の捕集を行なう。この抗体磁性ナノビーズによる細菌捕集技術(約 **30** 分)は、様々な細菌が混在する試料から特定の細菌を迅速かつ特異的に検出する。検出系の **MALDI-TOF MS** は、正確かつ迅速(約 **2** 分/検体)な細菌同定検査法として、すでに多くの検査室に普及しつつある。そこで、本研究では、抗体磁性ナノビーズによる菌の捕集系と **MALDI-TOF MS** による解析系を連結させた「耐性菌迅速検査システム」の構築を目的とする(左図)。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用菌株の遺伝子型別

収集した臨床分離株を対象に、その菌株が産生するカルバペネマーゼ遺伝子の型別をおこ



なった。本研究ではIMP型、VIM型、NDM型、KPC型の4種類の遺伝子を対象とした。方法は特異的プライマーを用いたPCRにて各種カルバペネマーゼ遺伝子を増幅し、得られた増幅産物のシーケンスから型別をおこなった。

## (2) 陽性コントロール株の作成

ATCC 標準株に *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub> 遺伝子を導入し、陽性コントロール株を作成した。方法は各遺伝子を PCR で増幅後、増幅産物をプラスミドベクターにクローニングした。得られたプラスミドを ATCC 標準株大腸菌 25922 にエレクトロポレーションにて導入し、メロペネムを含む LB 寒天培地に発育したコロニーを選択した。選択した菌株については、阻害剤を用いた **double disk synergy test** もしくは **modified Hodge test** などの表現型試験を実施し、発現形質を確認した。

## (3) 菌体からのカルバペネマーゼ分泌の確認

IMP-1 型カルバペネマーゼ産生大腸菌の陽性コントロール株を用いて、**Carbapenem Inactivation Method (CIM) (PLoS ONE 10(3):e0123690)**を実施した。判定の解釈としては、ディスクの周囲に阻止円が生じない場合には、ディスクのイミペネムが IMP-1 型カルバペネマーゼにより不活化された、すなわち菌体からカルバペネマーゼが分泌されていると考えた。

## (4) 抗カルバペネマーゼ抗体を付加した抗体磁性ナノ粒子による菌の捕集

菌を捕集する抗体磁性ナノビーズとして、**Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (Invitrogen)**を使用した。捕集方法はエッペンドルフチューブに一夜培養液 1.4ml をとり、遠心し、得られた細菌試料にリン酸緩衝生理食塩水(以下 PBS) 900 $\mu$ l、脱イオン水 100 $\mu$ l、抗体磁性ビーズ 40 $\mu$ l を加え、37 で 20 分間振とうしながら菌の捕集をおこなった。その後、磁石を用いてビーズを固定し上清を取り除いたのち、新たに PBS 1ml を添加しボルテックスで攪拌し磁性ビーズを拡散させた。この PBS による洗浄作業を 2 回おこなった後、40 $\mu$ l の脱イオン水に再懸濁することで測定用試料とした。

## (5) 菌捕集の有無の確認

常法に従い、ウェスタンブロットティングをおこなった後、免疫染色を実施し、抗カルバペネマーゼ抗体と抗体磁性ナノビーズが CRE/CPE を捕集しているか否かを確認した。

## (6) 菌種同定用試料のタンパク質抽出

一夜培養した菌を 1 白金耳量かき取り、脱イオン水 300 $\mu$ l に懸濁し、エタノール 900 $\mu$ l を加えて攪拌した。その後、12000rpm にて 3 分間遠心し、上清を取り除いた。チューブ中の菌沈渣に 70%のギ酸とアセトニトリル 50 $\mu$ l を加えて 3 分間放置後、12000rpm にて 3 分間遠心し、沈殿物を取り除いた上清を試料とした。

## (6) 検出系 MALDI-TOF MS による測定

マトリックス試薬として  $\alpha$ -CHCA を用いた。マトリックス試薬の調整は、始めにエッペンドルフチューブに  $\alpha$ -CHCA を 5mg 正確に計りとり、0.25%のトリフルオロ酢酸を含む水とアセトニトリルの混液 (1:1) 1ml にて溶解した。測定は MALDI-TOF MS の試料プレートに測定用試料 1 $\mu$ l を滴下し乾燥させた後、その上からマトリックス試薬 1 $\mu$ l を滴下し乾燥させ測定した。MALDI-TOF MSTOF/TOF5800 (Sciex) の操作方法は、定められた方法に従った。

## 4. 研究成果

### (I) 使用菌株の遺伝子型別

研究期間中、新たに収集した臨床分離株 125 株の中から、カルバペネマーゼ産生菌を検索し、それらの遺伝子型別を解析した。結果、IMP-1 産生大腸菌 12 株、IMP-6 産生肺炎桿菌 10 株、KPC-3 産生肺炎桿菌 2 株、NDM-1 産生大腸菌 2 株の合計 26 株が CRE/CPE として同定された。既に所持している菌株 19 株 (IMP-1 産生大腸菌 10 株、IMP-6 産生大腸菌 7 株およ



がIMP型カルバペネマーゼを産生していることを証明できた。

(V) 抗体磁性ナノ粒子による菌の捕集とMALDI-TOF MSによる解析からなる「耐性菌迅速検査システム」による臨床分離株の測定

IMP-1産生大腸菌 22株、IMP-6産生大腸菌 7株、IMP-6産生肺炎桿菌 10株、VIM-1産生大腸菌 1株、VIM-2産生大腸菌 1株、KPC-3産生肺炎桿菌 2株、NDM-1産生大腸菌 2株の合計 45株を本耐性菌迅速検査システムにより解析した。IMP-1産生大腸菌 22株とIMP-6産生大腸菌 7株はIMP産生大腸菌として、IMP-6産生肺炎桿菌 10株はIMP産生肺炎桿菌として、正確に検出することができた。VIM-1およびVIM-2産生大腸菌、KPC-3産生肺炎桿菌も正確に検出することができたが、NDM-1産生大腸菌 2株のうち、1株は検出不能であった。

この検出不能であった1株の最小発育阻止濃度は感性範囲にあり、阻害剤を用いたdouble disk synergy testにおける表現型も弱かったことから、カルバペネマーゼの産生量が少ない株である可能性が考えられた。CRE/CPEの中でも、NDM型産生菌は最も検出し難いタイプであり、本検査システムによる検出が期待されたが、今後改良の余地を残す結果となった。今後は、カルバペネマーゼの産生量が少ない菌株でも正確に検出できるよう条件を検討する必要がある。

## 結論

本研究で菌種同定と薬剤耐性菌(CRE/CPE)の検出を同時に行なうことができる「耐性菌迅速検査システム」を構築することができた。本法は日常の耐性菌検査の迅速化に貢献するとともに、治癒率の向上ならびに死亡率の減少にも大きく寄与するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)以下、主な論文を記す

Hayashi W, Ohsaki Y, Taniguchi Y, Koike S, Kawamura K, Suzuki M, Kimura K, Wachino JI, Nagano Y, Arakawa Y, Nagano N. High prevalence of blaCTX-M-14 among genetically diverse *Escherichia coli* recovered from retail raw chicken meat portions in Japan. *Int J Food Microbiol.* 2; 284: 98-104. 2018. 【査読有り】

Kawamura K, Hayashi K, Matsuo N, Kitaoka K, Kimura K, Wachino JI, Kondo T, Iinuma Y, Murakami N, Fujimoto S, Arakawa Y. Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* B2-O25-ST131 H30R among residents in nonacute care facilities in Japan. *Microb Drug Resist.* doi: 10.1089/mdr.2018.0068. 2018. 【査読有り】

Norizuki C, Kawamura K, Wachino J, Suzuki M, Nagano N, Kondo T, Arakawa Y. Detection of *Escherichia coli* producing CTX-M-1-group extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from pigs in Aichi prefecture, Japan, between 2015 and 2016. *Jpn J Infect Dis.* 71: 33-38. 2018. 【査読有り】

Kawamura K, Nagano N, Suzuki M, Wachino J, Kimura K, Arakawa Y. ESBL-producing *Escherichia coli* and its rapid rise among healthy people. *Food Safety Review* 5(4): 122-150. 2017. 【査読有り】

Norizuki C, Wachino J, Suzuki M, Kawamura K, Nagano N, Kimura K, Arakawa Y. Specific blaCTX-M-8/IncI1 plasmid transfer among genetically diverse *Escherichia coli* across humans and chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(6), pii:e00663-17. doi:10.1128/AAC.00663-17. 2017. 【査読有り】

Kawamura K, Sugahara T, Matsuo N, Hayashi K, Norizuki C, Tamai K, Kondo T, Arakawa Y. Spread of CTX-type extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of epidemic clone B2-O25-ST131 among dogs and cats in Japan. *Microb Drug Resist.* 23(8): 1059-1066. 2017. 【査読有り】

[学会発表](計22件)以下、主な発表を記す

川村久美子、藤本修平、村上啓雄、飯沼由嗣、荒川宜親. 高齢者介護施設入所者等から分離された基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ(CTX-M-27)産生大腸菌が保有するプラスミ

ドの網羅的解析. 第 93 回日本感染症学会総会 学術講演会. 2019 年 04 月 04 日 ~ 2019 年 04 月 06 日. 名古屋

法月千尋、和知野純一、鈴木匡弘、荒川宜親、川村久美子. 国産豚腸内容物から分離された **CTX-M** 型基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学解析. 第 29 回日本臨床微生物学会総会 学術集会. 2018 年 02 月 09 日 ~ 2018 年 02 月 11 日. 岐阜

林 謙吾、川村久美子、北岡一樹、木村幸司、和知野純一、飯沼由嗣、村上啓雄、藤本修平、荒川宜親. 在宅医療患者および介護施設入所者等における基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率と分子疫学解析. 第 46 回 薬剤耐性菌研究会. 2017 年 11 月 10 日 ~ 2017 年 11 月 11 日. 群馬

川村久美子. ヒト、家畜、食品等より分離された **ESBL** 産生菌の分子疫学的特徴. 第 54 回 日本細菌学会中部支部総会. 2017 年 10 月 13 日 ~ 2017 年 10 月 14 日. 名古屋

法月千尋、和知野純一、鈴木匡弘、川村久美子、荒川宜親. 健常人および鶏肉間における **CTX-M-8 ESBL** 遺伝子の水平伝播は **IncI1/ST113** により媒介される. 第 54 回 日本細菌学会中部支部総会. 2017 年 10 月 13 日 ~ 2017 年 10 月 14 日. 名古屋

林謙吾, 法月千尋, 玉井清子, 荒川宜親, 川村久美子. 国内のペットにおける大腸菌 **B2-O25-ST131 CTX-M** 型基質拡張型 -ラクタマーゼ産生株の拡散. 第 28 回 日本臨床微生物学会総会 学術集会. 2017 年 01 月 20 日 ~ 2017 年 01 月 22 日. 長崎

法月千尋、川村久美子、和知野純一、鈴木匡弘、荒川宜親. 国産豚から分離された **CTX-M**-型基質拡張型 -ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学解析. 第 45 回薬剤耐性菌研究会. 2016 年 10 月 21 日 ~ 2016 年 10 月 22 日. 広島

〔図書〕(計 1 件)

川村久美子、荒川宜親. **ESBL(基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ)産生菌の国内外の現状と問題点. 感染と抗菌薬 20(2):91-97.2017.**

〔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: なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 石田康行

ローマ字氏名: **ISHIDA YASUYUKI**

所属研究機関名: 中部大学

部局名: 応用生物学部

職名: 教授

研究者番号: **70273266**