

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790551

研究課題名(和文) 耐性因子をターゲットとした薬剤耐性微生物の検出についての基礎的検討

研究課題名(英文) Basic investigation of detection targeted at resistant-factors of drug-resistant microorganisms

研究代表者

山田 景子(Keiko, Yamada)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00402561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に重要な薬剤耐性微生物を迅速に検出する方法の構築を目指し、ターゲットとした耐性因子は、1)メチシリン耐性黄色ブドウ球菌およびメチシリン耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌の耐性因子PBP2a、2)カルバペネム耐性細菌の産生するベータラクタマーゼIMP-1、3)タミフルおよびペラミビル耐性インフルエンザウイルスの変異ノイラミニダーゼ(H275Y)である。これらを認識する抗体を取得し、臨床分離微生物を用いて抗体が耐性型微生物に特異的に反応することを確認した。PBP2aに関してはイムノクロマトグラフィーを構築し、模擬検体を用いて検討したところ3時間以内に耐性菌を検出でき、臨床への応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to developed specific antibodies against resistant-factor for rapid detection of drug-resistant microorganisms. In this study, target molecules are key proteins of drug-resistance, 1) PBP2a of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and coagulase-negative staphylococci (MRCNS), 2) IMP-1 of carbapenem-resistant bacteria, and 3) oseltamivir- and peramivir-resistant type neuraminidase of influenza virus. I have prepared specific antibodies for them, and they showed the specificity with recombinant proteins and resistant/susceptible microorganisms. I constructed immunochromatography assay system using specific anti-PBP2a chicken IgY. It was revealed that it could detected MRSA and MRCNS directly from mimicked blood-cultured bottle in about 3 hours.

研究分野：病態検査学

キーワード：薬剤耐性 検出 抗体 感染症 検査 迅速

1. 研究開始当初の背景

感染症の根本的な治療は抗菌薬・抗ウイルス薬により行われる。しかしながら薬剤耐性の微生物による感染症であることも多い。適切な治療薬を速やかに選択するために、時間を要する感受性試験ではなく耐性因子をターゲットとした検出方法により迅速に検出する方法の構築を目指した。黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌は臨床現場で分離頻度が高く、耐性化率も高い。黄色ブドウ球菌のうち、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) は半数以上、その他のブドウ球菌のうちメチシリン耐性コアグラール陰性ブドウ球菌 (methicillin resistant coagulase negative staphylococci; MRCNS) は、80%程度である。カルバペネム系抗菌薬の耐性菌は増加傾向にあり、日本においてはその半数以上がメタロ-ラクタマーゼ IMP-1 産生型である。現在、感染症の原因微生物の薬剤感受性は細菌ならば分離培養とその後の感受性試験を経て報告されるので時間がかかる。本研究では、耐性微生物の耐性因子をターゲットとして検出する方法の検討を行う。薬剤耐性微生物が迅速に検出され、その耐性微生物に適切な治療薬が早期に選択されることが期待される。

2. 研究の目的

臨床で問題となる薬剤耐性微生物を迅速に検出するために、耐性因子をターゲットとした検出系の構築と、耐性微生物と感受性微生物を用いてその評価を行い、検出感度や特異性について検出にかかる時間などについて基礎的な検討を行うことを研究目的とする。

3. 研究の方法

本研究では分離頻度の高い MRSA と MRCNS、メタロ-ラクタマーゼ IMP-1 産生菌、タミフル耐性インフルエンザウイルスの検出の3つを柱にして平成24年度から平成26年度にわたり研究を行った。

(1)

MRSA および MRCNS の検出に関しては protein A による非特異反応を起こさずターゲットとしている耐性化因子 PBP2a にのみ反応するニトリ抗体を作成し、アフィニティクロマトグラフィーにより特異的抗体を精製し、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) およびイムノクロマトグラフィーを構築した。MRSA とメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 MSSA については簡易・迅速な菌体をアルカリ-中和処理することで抗原を可溶化し PBP2a の検出が可能であることを定量的に示した。MRSA の検出感度は ELISA では 1.0×10^6 colony forming unit (CFU) /well、イムノクロマトグラフィーでは 10^8 CFU であり、寒天平板上のコロニーから直接判定することも可能であった(図1)。以上の結果を論文として発表した(Yamada

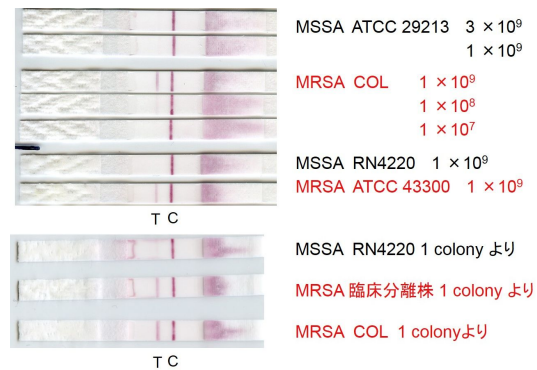


図1. イムノクロマトによるMRSAの検出

K. et al. Jpn J Infect Dis. 2013;66(2):103-8). MRCNSはMRSAと耐性因子PBP2aは同じであるため、同様に検出試験を行ったものの、MRSAと同じ検体処理方法ではMRCNSの中に偽陰性を示す株が存在することが明らかとなった。様々な菌種を含むMRCNSとオキサシリン感受性を示すCNS(MSCNS)を広く収集し検体処理方法についての検討を行ったところ、少しの手順を追加することでMRCNSも検出が可能となった。現時点の感度で応用可能な臨床検体として血液培養陽性検体を想定し、血液培養由来の様々な細菌を収集し模擬検体を作成し迅速検査手法であるイムノクロマトグラフィー法にて評価を行った。概ね良好な結果が得られたため、現在論文発表準備中である。

(2)

カルバペネムを含むベータラクタム系抗菌薬を不活化するメタロベータラクタマーゼは多くの型が報告されているが国内では60-80%がIMP-1型であり、抗IMP-1抗体を作製し評価を進めてきた。IMP-1は細菌の外膜と内膜の間隙にあるペリプラズムに存在するため抗原抽出方法として有機溶剤あるいは界面活性剤の検討などを行った。並行して、これまでに当研究室に保管されている多剤耐性緑膿菌臨床分離株294株についてメタロベータラクタマーゼ産生菌のピックアップおよびその型別を行いIMP-1の遺伝子の保有を調べたところ182株(61.9%)が陽性でありこれらの菌株を用いて検出評価を行う予定であった。しかしながら、国立国際医療研究センター切替らによるイムノクロマトの開発及びその応用の発表(Tomoe Kitao et al, J Microbiol Methods. 2011 87(3):330-7, Masayoshi Tojo et al, J Infect Chemother. 2014 20(9):586-8)を受け、計画を再考察することとなった。

(3)

薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出についてはタミフルおよびペラミビル耐性の原因となるインフルエンザノイラミニダーゼの変異か所(H274Y)を含む変異ペプチドを合成し抗原とした。マウスモノクローナル抗体の選択および腹水からのIgGの精製を行った。組換えノイラミニダーゼタンパク質を用いた検討では耐性型組換えノイラミニ

ダーゼとは反応し、感受性型（変異無し）組換えノイラミニダーゼとは反応せず、変異箇所を認識する抗体が取得できた。臨床分離された耐性型および感受性型ウイルス株を分与いただき、MDCK 培養細胞由来のウイルス株を用いて抗体の性能評価を行った。リアルタイム PCR によるウイルス抗原量の定量から、検出限界のウイルス量を評価し濃縮操作を経ることにより、得られた抗体は耐性型ウイルスのみと反応し、感受性型ウイルスには反応せず、耐性型ウイルス特異的に検出が可能であることを確認した（図2）。現在、論文発表の準備を進めている。



M: 分子量マーカー
 sample 1; 臨床株566 Aノ連型(H1N1)(A/Aichi/26/08)タミフル感受性株
 sample 2; 臨床株571 Aノ連型(H1N1)(A/Aichi/30/08)タミフル感受性株
 sample 3; 臨床株161 A 香港型(H3N2)(A/Aichi/161/09)
 sample 4; 臨床株135 Aノ連型(H1N1)(A/Aichi/173/09)タミフル耐性株(H274Y)
 sample 5; 臨床株387 Aノ連型(H1N1)(A/Aichi/209/09)タミフル耐性株(H274Y)
 sample 6; 実験株WSN A/WSN/1933(H1N1)
 sample 7; 実験株USSR A/USSR/90/77(H1N1)
 sample 8; 実験株PR A/PuertoRico/8/1934(Cambridge)(H1N1)
 sample 9; negative control (ウイルス感染なしの細胞培養上清)
 sample 10; 感受性型組換えNAタンパク質
 sample 11; 耐性型組換えNAタンパク質
 sample 12; 実験株PR 細胞培養液遠心後細胞pellet

図2. 耐性インフルエンザウイルスの検出

イムノクロマトグラフィーなどの簡易検査手法へ応用するためには、抗原となるノイラミニダーゼを補足するための抗体が必要であり、抗原となる組換えタンパク質発現系を再構築し、得られた組換えタンパク質を用いてノイラミニダーゼに対する抗体を収集したが、得られた抗体価は低く、ELISA 等での検出系の構築は今後へ引き続き課題である。

4. 研究成果

MRSA および MRCNS の検出に関しては耐性因子 PBP2a を標的とした検出系の構築を行い、模擬検体において有用性が示されたので、さらに試薬として改良を行い有用な技術の確立につなげたい。メタロ-ラクタマーゼ IMP-1 に関しては他研究者により優れた技術が先行して構築されたため、本研究方法による検出は中止し、IMP-1 以外のカルバペネマーゼも含めた網羅的な検出方法の開発に向けて検討を行う。タミフル耐性インフルエンザウイルスについては、変異箇所を認識する抗体は得られたので、今後は抗原分子補足抗体の取得を行い検出系の実用化に努めたい。

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 15 件)

1. Kasama T, Ikami M, Jin W, Yamada K, Kaji N, Atsumi Y, Mizutani M, Okamoto A, Namikawa T, Ohta M, Tokeshi M, Baba Y. Rapid, highly sensitive, and simultaneous detection of staphylococcal enterotoxins in milk by using immuno-pillar devices. *Analytical Methods*. in press, 2015. 査読あり
2. Kamiya C, Kimura K, Doyama Y, Miyazaki A, Morimoto M, Banno, H, Nagano N, Jin W, Wachino J, Yamada K, Arakawa Y. Ceftibuten-Containing Agar Plate for Detecting Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. in press, 2015. 査読あり
3. R. Yamada, K. Kimura, N. Nagano, Y. Nagano, S. Suzuki, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada K, Shibayama, Y. Arakawa. Comparative Analysis of Penicillin-Susceptible and Non-Susceptible Isolates in Group B Streptococci by Multilocus Sequence Typing. *Jpn J Infect Dis*, in press, 2015. 査読あり
4. Jin W, Wachino J, Kimura K, Yamada K, Arakawa Y. New Plasmid-Mediated Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase, AAC(6')-Ia_n, and Extended-Spectrum β-Lactamase, TLA-3, from *Serratia marcescens* Clinical Isolate. *J Antimicrob Chemother*. 2015, 70(5):1331-7. DOI: 10.1093/jac/dku537. 10.1093/jac/dku537 査読あり
5. R. Ito, Y. Shindo, D. Kobayashi, M. Ando, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada K, Kimura, T. Yagi, Y. Hasegawa, Y. Arakawa. Molecular Epidemiological Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Associated with Bacteremia among Patients with Pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2015 Mar;53(3):879-86. DOI: 10.1128/JCM.03067-14 査読あり
6. Suzuki T, Kimura K, Suzuki H, Banno H, Jin W, Wachino J, Yamada K, Arakawa Y. Have group A streptococci with reduced penicillin susceptibility emerged? *J Antimicrob Chemother*. 2015 Apr;70(4):1258-9. DOI: 10.1093/jac/dku492. 査読あり

7. Nagasaka Y, Kimura K, Yamada K, Wachino J, Jin W, Notake S, Yanagisawa H, Arakawa Y. Genetic Profiles of Fluoroquinolone-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* Among Cephalosporin-Resistant *K. pneumoniae*. *Microb Drug Resist*. 2015 Apr;21(2):224-33. DOI: 10.1089/mdr.2014.0150. 査読あり

8. Wachino J, Kimura K, Yamada K, Jin W, Arakawa Y. Evaluation of Disk Potentiation Test Using KB Disks Containing High Dosage Fosfomycin and Glucose-6-Phosphate to Detect the Production of Glutathione S-Transferase Responsible For Fosfomycin Resistance *J Clin Microbiol*. 52(10), 3827-3828 2014, DOI: 10.1128/JCM.01805-14. 査読あり

9. Nakamura G, Wachino J, Sato N, Kimura K, Yamada K, Jin W, Shibayama K, Yagi T, Kawamura K, Arakawa Y. Practical Agar-Based Disk Potentiation Test to Detect Fosfomycin-Non-Susceptible *Escherichia coli* Clinical Isolates Producing Glutathione S-Transferases *J Clin Microbiol*. 52(9), 3175-3179, 2014, DOI: 10.1128/JCM.01094-14. 査読あり

10. Asai K, Yamada K, Yagi T, Baba H, Kawamura I, Ohta M. Effect of incubation atmosphere on the production and composition of staphylococcal biofilms. *J Infect Chemother*. 2015; 21(1):55-61. DOI: 10.1016/j.jiac.2014.10.001. 査読あり

11. Okamoto A, Lee H, Yabutani M, Yamada K, Ohta M. Draft Genome Sequence of a *Legionella pneumophila* Serogroup 4 Strain Causing Legionellosis. *Genome Announc* 2(3) doi: 10.1128/genomeA.00602-14. 2014. 査読あり

12. Banno H, Kimura K, Tanaka Y, Kitanaka H, Jin W, Wachino JI, Yamada K, Shibayama K, Arakawa Y. Characterization of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small non-Beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2169-71. DOI: 10.1128/JCM.00226-14. 査読あり

13. Jin W, Yamada K, Ikami M, Kaji N, Tokeshi M, Atsumi Y, Mizutani M, Murai A, Okamoto A, Namikawa T, Baba Y, Ohta M. Application of IgY to sandwich

enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products. *J Microbiol Methods*. 2013 ;92(3):323-31. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.01.001. 査読あり

14. Yamada K, Jin W, Ohkura T, Murai A, Hayakawa R, Kinoshita K, Mizutani M, Okamoto A, Namikawa T, and Ohta M. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Specific Anti-PBP2a Chicken IgY Antibody. *Jpn J Infect Dis*, 66(2): 103-108, 2013 DOI: <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.66.103>. 査読あり

15. Takeno A, Okamoto A, Tori K, Oshima K, Hirakawa H, Toh H, Agata N, Yamada K, Ogasawara N, Hayashi T, Shimizu T, Kuhara S, Hattori M, Ohta M. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* NC7401, which produces high levels of the emetic toxin cereulide. *J Bacteriol*. 2012;194(17):4767-8. DOI: 10.1128/JB.01015-12. 査読あり

〔学会発表〕(計 19件)

1. 川辺佳苗, 山田景子, 金万春, 和知野純一, 木村幸司, 荒川宜親 Development of a rapid detection system of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci 第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 日-28 日、長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

2. 畑中公基, 山田景子, 武田 明, 木戸裕勝 佐川美恵, 吉川誠一, 小野伸高, 荒川宜親 骨髄炎患者から検出された Daptomycin 非感受性 *Staphylococcus capitis* subspecies urealyticus 株の検討 第 26 回日本臨床微生物学会総会学術集会、2015 年 1 月 31 日-2 月 1 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

3. 和知野純一, 木村幸司, 山田景子, 柴山恵吾, 八木哲也, 川村久美子, 荒川宜親 ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易識別法の開発 第 26 回日本臨床微生物学会総会学術集会、2015 年 1 月 31 日-2 月 1 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

4. 鈴木健史, 木村幸司, 鈴木寛, 坂野弘嗣, 金万春, 和知野純一, 山田景子, 荒川宜親 -ラクタム系抗菌薬低感受性 A 群 溶血性レンサ球菌は国内で出現したのか? 第 43 回薬剤耐性菌研究会 2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日、加賀観光ホテル (石川県・加賀市)

5. 中村元気、和知野純一、佐藤夏巳、木村幸司、山田景子、金万春、柴山恵吾、八木哲也、川村久美子、荒川宜親 ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易検出法の開発 第 43 回薬剤耐性菌研究会 2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日、加賀観光ホテル(石川県・加賀市)

6. 金万春、和知野純一、山田景子、木村幸司、荒川宜親 *Serratia marcescens* より発見された新規プラスミド媒介性アミノ配糖体アセチル化酵素の解析 第 51 回日本細菌学会中部支部総会 2014 年 10 月 17-18 日、北陸大学薬学部(石川県・金沢市)

7. 伊藤亮太、進藤有一郎、小林大介、安藤昌彦、金万春、和知野純一、山田景子、木村幸司、八木哲也、長谷川好規、荒川宜親

肺炎患者より検出された *Klebsiella pneumoniae* の分子疫学的解析 第 51 回日本細菌学会中部支部総会 2014 年 10 月 17-18 日、北陸大学薬学部(石川県・金沢市)

8. 山田景子、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 ニワトリ IgY 抗体を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA の検出 第 51 回日本細菌学会中部支部総会 2014 年 10 月 17-18 日、北陸大学薬学部(石川県・金沢市)

9. 山田景子、木村幸司、和知野純一、荒川宜親 黄色ブドウ球菌のアルベカシン耐性 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26-28 日 タワーホール船堀(東京都江戸川区)

10. 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親 非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(PRGBS)の解析 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26-28 日 タワーホール船堀(東京都江戸川区)

11. 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親 非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(PRGBS)の解析、第 25 回日本臨床微生物学会総会 2014 年 2 月 1-2 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

12. 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親 非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(PRGBS)の解析 第 50 回日本細菌学会中部支部総会 2013 年 10 月 18-19 日、ホテル竹島(愛知県・蒲郡市)

13. 北仲博光、和知野純一、山田景子、木村

幸司、荒川宜親 カルバペネム及び広域セフェム薬耐性腸内細菌科菌種におけるラクタマーゼの鑑別 第 50 回日本細菌学会中部支部総会 2013 年 10 月 18-19 日、ホテル竹島(愛知県・蒲郡市)

14. 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親 非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(PRGBS)の解析 第 42 回薬剤耐性菌研究会 2013 年 10 月 17-18 日 ホテルニューさがみや(静岡県熱海市)

15. 山田景子、金万春、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 黄色ブドウ球菌のダプトマイシン感受性 第 42 回薬剤耐性菌研究会 2013 年 10 月 17-18 日 ホテルニューさがみや(静岡県熱海市)

16. 横山覚、川村久美子、山田景子、荒川宜親 免疫蛍光抗体を用いたメタロベータラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の迅速検出 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18-20 日 幕張メッセ国際会議場(千葉県・千葉市)

17. 山田景子、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 抗 MRSA 薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学 第 24 回日本臨床微生物学会 2013 年 2 月 2-3 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

18. 山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 抗 MRSA 薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学 第 49 回日本細菌学会中部支部総会 2012 年 11 月 9-10 日 金沢大学医学部十全講堂(石川県・金沢市)

19. 山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 黄色ブドウ球菌の抗 MRSA 薬の感受性調査 第 41 回薬剤耐性菌研究会 2012 年 10 月 25-26 日 望川館 会議室(岐阜県・下呂市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 景子(Keiko Yamada)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 00402561