

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460681

研究課題名(和文) -ラクタマーゼ産生とクラス分類の同時判定を可能にする新規検出法の確立とその評価

研究課題名(英文) Development of a novel chromogenic method, Penta-well test, for rapid prediction of beta-lactamase classes produced in clinical Enterobacteriaceae isolates

研究代表者

川村 久美子 (Kawamura, Kumiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30335054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、-ラクタマーゼ産生性とクラス分類(A, B, C)の同時測定を可能にした新規検出法“Penta-well法”を構築した。

-ラクタマーゼ検出用のカットオフ値を0.48, クラスA, B, C検出用のそれを0.25, 0.4, 0.55と設定した時の感度と特異度は、クラスAで96.3%, 97.1%, クラスBでは97.4%, 100%、クラスCでは85.7%, 100%であった。さらに複数酵素同時産生株23株中21株(91.3%)の-ラクタマーゼを正確にクラス分類することができた。本法の臨床現場への導入は適切な抗菌薬治療および感染制御の向上に大きく貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel chromogenic method, Penta-well test, which enables the rapid detection and classification of β -lactamases in clinical Enterobacteriaceae isolates. This test is based on a combination of nitrocefin and three β -lactamase inhibitors specific to class A, B, and/or C, with nitrocefin hydrolysis by β -lactamases. When the cut-off value for each β -lactamase class was determined (0.25, 0.4, and 0.55 for class A, class B, and class C β -lactamase producers, respectively), the sensitivity and specificity of classification were 96.3% and 97.1% for class A, 97.4% and 100% for class B, and 85.7% and 100% for class C, respectively. Moreover, this method allowed accurate β -lactamase classification in 21 of 23 (91.3%) isolates producing plural class of β -lactamases. Thus, the Penta-well test can provide information that would be useful in the accurate detection and classification of β -lactamases produced by causative bacteria.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：グラム陰性桿菌 β -ラクタマーゼ 複数酵素同時産生菌 新規検出法 β -ラクタマーゼ産生性の確認
-ラクタマーゼのクラス分類

1. 研究開始当初の背景

-ラクタマーゼは -ラクタム系抗菌薬を不活化する酵素で、Ambler の分類では A, B, C, D の 4 つのクラスに分類される。現在、グラム陰性桿菌においては、これら -ラクタマーゼをコードする遺伝子の菌種間を越えた拡散と蔓延が大きな問題となっている。例えば、クラス B に属するメタロ- -ラクタマーゼ (MBL) では、耐性遺伝子集積構造であるインテグロン構造内にその遺伝子が存在することから、伝達性プラスミドを介した他菌種への伝達が頻繁に生じている。このようなプラスミド伝播による耐性菌蔓延の深刻さは、多くの医療現場で問題となっている多剤耐性緑膿菌や多剤耐性アシネトバクター属菌による病院感染事例で証明されている。

これら多剤耐性菌の広まりは、これまでは病院環境内に限局されていたが、近年、市中感染症の起因菌のなかにも多剤耐性菌が認められるようになってきており、なかでも、大腸菌やクレブシエラにおいては、多剤耐性化傾向が顕著である。このようにヒトの腸内細菌叢を形成する菌種における多剤耐性菌の増加は多剤耐性緑膿菌や多剤耐性アシネトバクター属菌による病院感染よりも、より深刻な問題となっている。その一例として、2011年ドイツで大規模なアウトブレイクを起こした腸管出血性大腸菌 O104:H4 がクラス A に属する基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ (ESBL) を産生する多剤耐性菌であったことは、医療関係者のみならず、社会に大きな衝撃を与えた。

このような薬剤耐性菌の拡散を防止するためには、迅速かつ正確な耐性菌の検出と日常的な検出状況の監視および定期的なサーベイランスの実施が必要であり、それを担う病院微生物検査室には一刻も早い検査結果の報告が期待されている。しかしながら、現在の微生物検査室では、薬剤感受性試験を実施し、その結果から -ラクタマーゼの産生性を疑い、その後確認検査を実施しているため、最終判定までに約3日を要しており、決して迅速とはいえない。さらに、近年、異なるクラスの -ラクタマーゼを複数産生する菌が増加しつつあるため、スクリーニング検査や確認試験をいくつか組み合わせてクラス分類を行なわざるを得ず、多くの時間と労力を要している。さらに、NDM-1 産生菌のように double disk synergy test や modified Hodge test など現行の検出法では対応できない事例も増加しつつあり、新たな迅速検出法の開発が必要になっている。

2. 研究の目的

医療現場においては、患者の救命の可能性を高めるために有効性が期待できる抗菌薬を正確に選択し、少しでも早く治療を開始する必要がある。さらに病院感染を防止するため、常に耐性菌情報を監視し、適切な感染対策を早期に実施することも求められている。一方、現行の検査法には、これらのニーズに応えられる迅速検査法はなく、加えて、近年の多剤耐性菌の増加とその多様化により、正確な検出ができない事例も増加しつつある。

本研究では、上記のニーズに応えるべく、日常検査業務における -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の正確な検出とその効率化に貢献する、新規迅速検出法「Penta-well法」を確立すること、さらに、その臨床的有用性を評価することを目的に研究を行なった。

具体的には、以下の2点について検討した。

(1) 1回の測定で短時間に単独もしくは複数クラスの -ラクタマーゼの産生性を確認できる検出法の構築および臨床分離株を用いた検証。

(2) 検査精度(感度および特異度)、コストパフォーマンスおよび省力化の面からの臨床的有用性の評価。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株の遺伝子型別の同定

収集した臨床分離株を対象に、その菌株が産生する -ラクタマーゼをクラス A, B, C の 3 種類に分類した(表1)。なお、現在クラス D -ラクタマーゼに対する阻害剤は存在しないため、本研究では OXA 型遺伝子を同定対象から除外した。

同定方法は特異的プライマーを用いた PCR にて各種 -ラクタマーゼ遺伝子の保有を検索し、増幅産物のシークエンスから遺伝子型を確認した。また、同時に double disk synergy test もしくは modified Hodge test などの表現型検出法も実施し、遺伝子が薬剤耐性の形質を発現していることを確認した。

表1. 主な -ラクタマーゼ

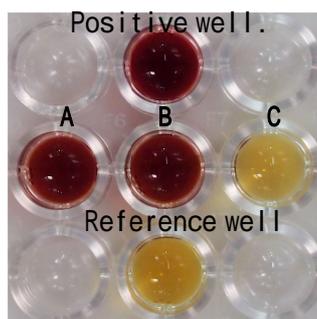
クラス	種類	遺伝子
A	基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ (ESBL)	CTX-M-, TEM-, SHV-
	カルバペネマーゼ	KPC-, GES- など
B	カルバペネマーゼ (MBL)	IMP-, VIM-, NDM- など
C	セファロスポリナ ーゼ	CMY-, DHA-, MOX- など

(2) ATCC 標準株を用いての bla_{IMP-1} , bla_{IMP-6} , bla_{VIM-1} , bla_{VIM-2} 遺伝子保有株の作成

クラス B β -ラクタマーゼ検出における阻害剤の濃度検討や再現性の検討に使用する IMP-1, IMP-6, VIM-1, VIM-2 産生菌を追加作成した。方法は各遺伝子を PCR で増幅後、プラスミドベクターに増幅産物をクローニングし、得られたプラスミドを大腸菌、クレブシエラ属菌などの ATCC 標準株にエレクトロポレーションで導入した。

(3) Penta-well法

【原理】本法は、クラス A β -ラクタマーゼがクラバン酸 (CVA), クラス B がジピコリン酸 (DPA), クラス C がアミノフェニルボロン酸 (APB) により特異的に阻害されることを利用して、これら 3 種類の酵素を分類する測定法であり、反応基質にはニトロセフィン (黄色) を用いた。具体的には、クラス A, B, C の各検出系 well に阻害剤を 2 種類ずつ添加し、基質のニトロセフィンが赤色に発色した場合、well には添加した阻害剤に阻害されないクラスの β -ラクタマーゼが存在していると判定するものである。なお、クラス D は特異的阻害剤がないため本法から除外した。図 1 にクラス A と B の 2 種類の β -ラクタマーゼを産生している菌の検出例を示す。



(図1の説明)

Positive well : 阻害剤を添加しないので、いずれの酵素も阻害されず赤色になる

Class A well: クラス A β -ラクタマーゼが DPA+APB に阻害されず赤色になる

Class B well: クラス B β -ラクタマーゼが CVA+APB に阻害されず赤色になる

Class C well: クラス A, C β -ラクタマーゼともに DPA+CVA に阻害され黄色になる

Reference well: 3 種類の阻害剤で全ての酵素が阻害され黄色になる

【測定方法】

サンプル調整: 被検菌を LB 寒天培地で 37 $^{\circ}$ C, 18-20 時間培養後, lysis buffer に吸光度 1.0 の濃度 (660nm) になるよう懸濁するこ

とで、粗酵素抽出液を作成した。この粗抽出液をボルテックスで 1 分間攪拌後, 13000rpm, 1 分間遠心, その上清を Penta-well 法のサンプルとした。

測定: 96 穴プレートを準備し, ニトロセフィンを 1 well あたり 20 μ g になるように 5 つの well に分注, さらにクラス A, B, C 検出用の well に阻害剤 CVA, DPA, APB のうち, 2 種類を組み合わせたものを添加した。上記調整のサンプルを各 well に 10 μ l ずつ添加し, 37 $^{\circ}$ C の孵卵器で 90 分反応させた後, 490nm で吸光度を測定した。

(4) 測定条件の最適化

各遺伝子保有の ATCC 株を用いて, 抽出液作成のための lysis buffer の種類 (1% Triton X-100 含有 PBS-lysis buffer, リゾチーム溶液), 菌液の濃度 (660nm における吸光度 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0), 基質と阻害剤の濃度, 反応時間 (60~120 分) などを検討し, 測定における最適条件を決定した。

(5) 各クラスの cut off 値の設定

測定条件を最適化したのち, 各クラスの陽性株と陰性株を用いて cut off 値を決定した。

(6) 同時再現性および日差再現性の検討

各クラスの β -ラクタマーゼ陽性株 5 株を用いて, Penta-well 法の同時再現性 (n=10) および日差再現性 (n=5) を検討した。

(7) Penta-well 法の感度および特異度の検討

β -ラクタマーゼ産生株 106 株および非産生株 10 株を用いて, クラス A, B, C および複数酵素産生菌における感度と特異度を検討した。

4. 研究成果

(1) 使用菌株の遺伝子型別

収集した臨床分離株の遺伝子型別を解析した結果, クラス A では ESBL 産生株 (CTX-M 遺伝子保有) 57 株, KPC 産生株 2 株, クラス B では MBL 産生株 (IMP-1, 6 および VIM-1, 2 遺伝子保有) 19 株, クラス C ではプラスミド性 AmpC 産生株 (CMY 遺伝子保有) 5 株の合計 83 株が対象酵素単独産生株として同定された。また, クラス A+B 産生株 15 株, クラス A+C 産生株 3 株, クラス A+B+C 産生株 5 株の合計 23 株が複数酵素同時産生株として同定された。

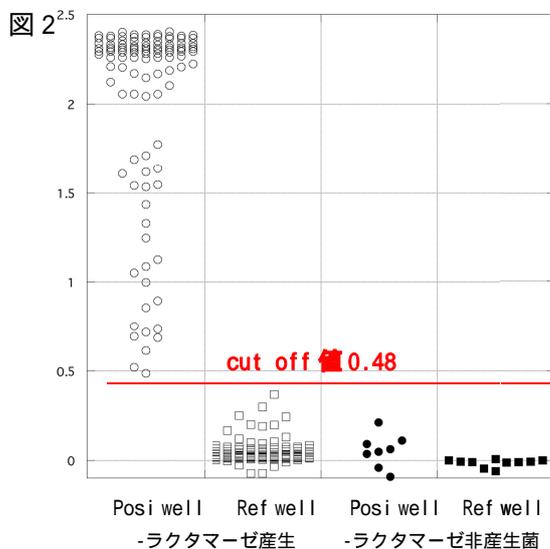
(2) 測定条件の最適化

抽出液作成のための buffer の種類としては,

1% Triton X-100 含有 PBS-lysis buffer の方が安定して酵素を抽出することができた。菌液の濃度を検討した結果、660nm で 1.0 の時が最も高い反応性を示した。基質ニトロセフィンを 1well あたり 20 μ g に固定し、阻害剤の濃度の検討した結果、CVA を 5mM、DPA を 50mM、APB を 90mM 各々使用することで、クラス B β -ラクタマーゼ検出における偽陽性を解消することができた。反応時間は 60~120 分まで安定した吸光度を得たので、中央間の 90 分を最適条件とした。

(3) cut off 値の設定

最適条件下にて、各クラスの陽性株と陰性株を用いて cut off 値を決定した。下記図 2 に示すように β -ラクタマーゼ産生性をみる Positive control well における cut off 値は 0.48 となった。



同様に各クラスの cut off 値を設定した結果、クラス A は 0.25、クラス B は 0.4、クラス C は 0.55 になった。なお、クラス A については、TEM-1 保有株を含めた場合と含めない場合で cut off 値が異なることがわかった。TEM-1 保有株も含めた場合の cut off 値は 0.09 であったが、クラス A の主な検出対象を ESBL 産生菌および KPC 産生菌とした場合の cut off 値は、それら菌株の吸光度分布により 0.25 となった。

(4) 同時再現性および日差再現性

上記の cut off 値における同時再現性 (n=10) および日差再現性 (n=5) は、0.94-1.83%、3.44-6.96% と、いずれのクラスも良好な再現性を示した。

(5) Penta-well 法の評価

単独酵素産生株 83 株、複数酵素同時産生株 23 株、 β -ラクタマーゼ非産生 10 株の合計 116 株を用いて、Penta-well 法の感度および特異度を検討した。始めに、クラス A 単独酵素産生株として、ESBL 産生菌および KPC 産生菌の分類が正確に出来るかを評価した。分類対象とした ESBL 産生菌では、CTX-M group 1, 2, 8, 9 遺伝子のいずれか 1 つを保有する *Escherichia coli* 42 株、*Klebsiella pneumoniae* 12 株、*K. oxytoca* 1 株、*Proteus mirabilis* 2 株の計 57 株を試験し、全てをクラス A β -ラクタマーゼ産生菌として正確に分類することができた。KPC 産生菌については、本酵素が CVA と APB に阻害されるため、クラス A とクラス C の両 well が陽性を示し、クラス A+C の 2 種類の β -ラクタマーゼを産生する菌との鑑別が必要であった。クラス B については、日本国内で検出されることが多い IMP-1 遺伝子保有株 *E. coli* 5 株、*K. pneumoniae* 6 株、*P. vulgaris* 1 株および VIM 遺伝子保有株 7 株を試験し、全てをクラス B に分類した。ただし、今回使用した IMP-1 遺伝子保有株は、TEM-1 や SHV-11 遺伝子 (分類対象である ESBL ではないが、クラス A に属する) も同時に保有しており、クラス A の cut off 値を 0.25 に設定しても、2 株が偽陽性となった。クラス C については、プラスミド性 AmpC 遺伝子である CMY-2, 8, 9 遺伝子を保有する 5 株を試験し、*E. coli* 4 株を正確に分類したが、CMY-9 遺伝子を保有する *K. pneumoniae* 1 株をクラス C β -ラクタマーゼ産生菌として分類することができなかった。

複数酵素産生菌においても各 well で明瞭な発色反応を得られることができた。クラス A+B 産生株 15 株 (*E. coli* 9 株、*K. pneumoniae* 6 株)、クラス A+C 産生株 3 株 (*K. pneumoniae* 3 株)、クラス A+B+C 産生株 5 株 (*E. coli* 3 株、*K. pneumoniae* 2 株) の合計 23 株を試験し、21 株を正確に分類することができた。複数酵素産生株のなかで、偽陰性となった 2 株はいずれもクラス A+B+C 産生株であり、2 株とも NDM-1 遺伝子を保有、うち 1 株は DHA-1 遺伝子も保有していた。NDM-1 型 β -ラクタマーゼ産生菌の well-B の吸光度は低く、他の β -ラクタマーゼに比べ反応性が弱いことが明らかになり、NDM-1 産生菌の分類が今度の検討課題となった。なお、今回収集した菌株の中には、クラス B+C の組み合わせは 1 株も認められなかったため、その検出精度は確認できなかった。最終的に複数酵素産生菌も含めた Penta-well 法の感度と特異度は、表 2

に示すようになり、いずれのクラスも良好な感度と特異度を得た。今後は検出対象とする遺伝子や菌種の範囲を広げて検討する必要がある。

表 2 . Penta-well 法の感度と特異度		
	感度 (%)	特異度 (%)
クラス A	96.3 (cut off 値 0.25)	97.1 (cut off 値 0.25)
クラス B	97.4	100
クラス C	85.7	100

(6) 結語

Penta-well 法は最低 2 日の検査時間を要するという従来の表現型試験の問題点を解消し、2 時間以内に単独酵素産生菌のみならず複数酵素同時産生菌においても正確な β -ラクタマーゼの検出とクラス分類が可能であった。さらに、従来の表現型試験は目視判定によるため判定者の経験や主観が判定を左右するという弱点も有していたが、Penta-well 法は吸光度測定と cut off 値の設定により、これらの弱点を解決した。

また、本検出法は発色基質を用いた比色法を用いた方法であるため、WalkerWay や Vitek のような自動分析機へ応用することも可能である。以上、本法の臨床現場への導入は適切な抗菌薬治療および感染制御の向上に大きく貢献するものと考えられる。なお、本研究の成果は *Diagn Microbiol Infect Dis.* 83 巻(1), 2015, 25-29 に報告した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

SATO Natsumi, KAWAMURA Kumiko, NAKANE Kunihiko, WACHINO Jun-ichi, ARAKAWA Yoshichika. First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microb Drug Resist.* 査読有, 19 巻(6), 2013, 477-482.

HATTORI Tatsuya, KAWAMURA Kumiko, ARAKAWA Yoshichika. Comparison of test methods for detecting metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria. *Jpn J Infect Dis.* 査読有, 66 巻(6), 2013, 512-518.

KAWAMURA Kumiko, GOTO Kensuke, NAKANE Kunihiko, ARAKAWA Yoshichika. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 査読有, 11 巻(2), 2014, 104-110.

NAKAMURA Genki, WACHINO Jun-ichi, YAGI Tetsuya, KAWAMURA Kumiko, ARAKAWA Yoshichika (他 5 名, 7 番目). Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomycin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases. *J Clin Microbiol.* 査読有, 52 巻(9), 2014, 3175-3179.

村 竜輝, 川村久美子, 荒川宜親. Modified Hodge test におけるエルタベネムディスクの有用性の評価および検査精度向上の試み. *日本臨床微生物学雑誌.* 査読有, 25 巻(1), 2014, 42-51.

GOTO Kensuke, KAWAMURA Kumiko, ARAKAWA Yoshichika. Contribution of QnrA, a plasmid-mediated quinolone resistance peptide, to survival of *Escherichia coli* exposed to a lethal ciprofloxacin concentration. *Jpn J Infect Dis.* 査読有, 68 巻(3), 2015, 196-202.

MURA Tatsuki, KAWAMURA Kumiko, WACHINO Jun-ichi, SHIBAYAMA Keigo, ARAKAWA Yoshichika. Development of a novel chromogenic method, Penta-well test, for rapid prediction of β -lactamase classes produced in clinical *Enterobacteriaceae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 査読有, 83 巻(1), 2015, 25-29.

NAKANE Kunihiko, KAWAMURA Kumiko, GOTO Kensuke, ARAKAWA Yoshichika. Long-term colonization by *bla*_{CTX-M}-harboring *Escherichia coli* in healthy Japanese people engaged in food handling. *Appl Environ Microbiol.* 査読有, 82 巻(6), 2016, 1818-1827.

〔学会発表〕(計 27 件)

村 竜輝, 川村久美子, 荒川宜親.
-lactamase 産生グラム陰性桿菌の迅速簡易検出法としての Penta-well 法の評価. 第 42 回薬剤耐性菌研究会, 2013, 10 月 17-18 日, 熱海市.

村 竜輝, 川村久美子, 荒川宜親.
-lactamase 産生グラム陰性桿菌の迅速簡易検出法としての Penta-well 法の評価. 第 25 回日本臨床微生物学会, 2014, 2 月 1-2 日, 名古屋市.

Mura Tatsuki, Kumiko Kawamura, Yoshichika Arakawa. A novel detection method for rapid detection and classification of -lactamase-producing Gram-negative bacteria. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014, 3 月 26-28 日, 東京都江戸川区.

村 竜輝, 林美智子, 法月千尋, 川村久美子, 荒川宜親. Modified Hodge test におけるエルタペネムディスクの有用性の評価および検査精度向上の試み. 第 43 回薬剤耐性菌研究会, 2014, 10 月 31 日-11 月 1 日, 加賀市.

村 竜輝, 川村久美子, 曾我珠美, 中西麻代, 荒川宜親. Modified Hodge test におけるエルタペネムディスクの有用性. 第 26 回日本臨床微生物学会, 2015, 1 月 31-2 月 1 日, 東京都新宿.

林美智子, 川村久美子, 中根邦彦, 荒川宜親. 健康人由来 ESBL 産生大腸菌の細菌学的特徴. 第 88 回日本細菌学会総会, 2015, 3 月 26-28 日, 岐阜県.

林美智子, 川村久美子, 松井真理, 鈴木里和, 柴山恵吾, 荒川宜親. わが国における 10 年間の *Acinetobacter* 属菌の変遷. 第 52 回日本細菌学会中部支部会, 2015, 10 月 22-23 日, 名古屋市.

法月千尋, 川村久美子, 藤崎桃子, 荒川宜親. 2 剤 3 剤耐性緑膿菌、*Acinetobacter* 属菌検出のためのスクリーニングプレートの構築. 第 26 回日本臨床微生物学会, 2016, 1 月 29-31 日, 仙台.

Michiko Hayashi, Kumiko Kawamura, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa. Efficacy of disinfectants against multidrug resistant isolates of *Acinetobacter* species. 第 89 回日本細菌学会総会, 2016, 3 月 23-25 日, 大阪.

〔図書〕(計 2 件)

川村久美子, 荒川宜親. 医学書院. 微生物検査イエローページ「腸内細菌科グラム陰性桿菌」2014, 58 巻 (11), 1294-1300.

川村久美子. 医歯薬ジャーナル. 化学療法の領域「グラム陰性菌における消毒薬抵抗性」2015, 31(7), 107-116.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 多剤耐性菌スクリーニング用プレート、多剤耐性菌の検出法、多剤耐性菌検出キット及び多剤耐性菌スクリーニング用液体培地
発明者: 荒川宜親, 川村久美子, 藤崎桃子
権利者: 名古屋大学, 栄研化学
種類: 特許
番号: 特許願 2015-183952 号
出願年月日: 平成 27 年 9 月 17 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村久美子 (KAWAMURA KUMIKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科 (保健)・准教授
研究者番号: 30335054

(2) 研究分担者

八木 哲也 (YAGI TETSUYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70333573

(3) 連携研究者

荒川宜親 (ARAKAWA YOSHICHIKA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10212622