

## 21. 細菌感染症におけるナノメカニカルセンサを用いた 迅速薬剤感受性試験法の開発及び評価

○安楽 正輝 (地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)

### 【研究目的】

薬剤耐性菌の世界的な増加は、公衆衛生上大きな課題となっており、対策がなされない場合、2050年では年間で約1,000万人が薬剤耐性菌によって死亡するという予測がされている。細菌の薬剤耐性についての検査は、抗菌剤による生育阻止を観察するため、検査結果が出るまでに1日から数日の時間と熟練性が求められるため、多くのコストを要し、医療現場の大きな負担となっており、より迅速な検査方法の確立が望まれる。これらの課題を解決するために、最短、数十分で評価可能でありかつ簡便な薬剤感受性試験法の構築を目指した。そこで、細菌の分裂等の動態に伴い発生する微小な力に着目し、高感度なナノメカニカルセンサを用いることで検出することで、評価系を構築できるのではないかと考えた。本研究課題では評価系の構築に向けて立ち上げから概念実証までの足がかりとなる検証を行った。

### 【研究の必要性】

2016年にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)をはじめ、薬剤耐性菌の拡大を抑えるために薬剤耐性(AMR)対策アクションプランが策定された。その中でも新たな耐性菌の出現を抑えるために、抗菌薬の適性使用についての重要性がうたわれている。一方で、そのために必要な検査である薬剤感受性試験は最低でも1日以上を要し、結果として検査を行わず、広域な抗菌スペクトルを持つ第1次選択薬による経験的治療(empiric therapy)が行われていることも多い。現在、耐性菌が保有する耐性遺伝子の有無を遺伝子増幅法(PCR法)により、迅速に検出することで起炎菌の薬剤耐性を評価する方法が開発されているが、未知の遺伝子や薬剤耐性機構により耐性を示すことがあり、起炎菌の性状評価は必須となっている。そのため、科学的根拠に基づいた適切な抗菌薬を用いた治療を行うために、生菌を用いた薬剤耐性を短い時間でより正確な感受性試験法の開発が求められている。また、感染症治療のみならず、地域における新たな耐性菌の出現リスクを抑えるために、迅速な薬剤感受性試験はアクションプランにおいて目標とされている地域における薬剤耐性菌の発生状況等の把握に貢献できるものと考えられる。

## 【研究計画】

### 【1】 センサ素子表面への効率的な菌体成分の吸着法の確立

センサ素子表面は酸化シリコンの素材であり、そのままの状態では生きた細菌を吸着させることが困難である。また、既存の方法では、固定の手順で細菌を死滅させてしまい、細菌の分裂等の動態に伴い発生する微小な力を計測することができない。そこで、細菌が持つ負の電荷に着目し、細菌を効率よくセンサ素子の表面へ吸着させることができれば、細菌が生きたまま吸着させることが可能ではないかと考えた (図. 1)。そこで、正電荷をもつ各種ポリマーを用いて、吸着に最適な素材の検討をした。方法はセンサと同様の素材であるシリコン基盤を MSS と同様のサイズに加工し、シリンジポンプを用いて、ポリマーを基盤上に薄膜処理を施すことにより、吸着が可能か検証した。細菌は *E. coli* (ATCC 25922 株) をモデル菌として用いた。

### 【2】 吸着した細菌の活性および MSS を用いた動態評価

吸着した細菌がポリマーの成分によって生理活性を失ってしまった場合、動態に伴う微小な物理的な変化を観測することが難しい。そこで、吸着した細菌が生理活性を保ったまま生存しており、さらに抗菌薬によって生理活性を失うかを検討した。方法として、細菌の生理活性に伴い蛍光発色する試薬 (CFDA) を用いることで、基盤上に吸着させた生理活性を蛍光顕微鏡により評価した。

## 【実施内容・結果】

ポリマーで薄膜加工したシリコン基盤を、細菌の菌液の濃度を示すマックファーランドの値で 1.0 の濃度の菌液を 96 ウェルプレート内で浸潤させた。その結果、ポリエルリジンを用いた際に、細菌が効率よくシリコン基盤に吸着した。ポリマーの濃度を変えた場合においても吸着効率には大きな影響は見られず、少量 (低濃度) でも細菌はポリエルリジンを介してシリコン基盤に吸着した (図. 2)。

また、吸着した細菌について、活性を評価したところ、CFDA による蛍光発色が認められた。一方、カルバペネム系の抗菌薬であるメロペネムを加えたところ、蛍光が消失した (図. 3)。これらの結果から、ポリエルリジンを用いることで、細菌の生理活性を保ったまま、基盤上に吸着させることが可能となったと考えられる。現在、これらのモデルを用いて、MSS センサーチップに細菌を吸着させ、その動態を計測している (データ未掲載)。

## 【考察と今後の課題】

本研究の結果、細菌のもつ電荷に着目し、ポリマーを用いる事で MSS のセンサ素子に表面に効率よく菌体を吸着させることに成功した。また、吸着した細菌は生理活性を有しており、基盤上で増殖等の動態に伴う微小な力についても合わせて、有していると考えられる。今後、実際の測定データを得るにあたって、モデルを確立することができたと考えられる。また、これらの検証モデルの大きなメリットとして、ほぼ全ての細菌は負の電荷を有しており、今後、菌種によらない薬剤感受性の可能性を示した。

一方、MSS を用いた計測モデルについては基礎的な計測条件が複雑であり、MSS を用いた薬剤感受性試験の確立にむけて今後、多くのデータを蓄積させることが必要である。

**【経費使途明細】**

使 途	金 額
シリンジポンプ	86,108 円
薬剤感受性試験関連試薬	50,655 円
シリコン基盤	32,537 円
生理活性試験評価用試薬	
蛍光生理活性評価試薬	25,740 円
リアルタイム PCR 関連試薬	52,140 円
プラスチック消耗品	11,308 円
その他消耗品	41,512 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

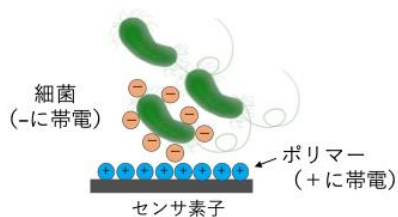


図1. 細菌の荷電の違いに着目したポリマーによる吸着モデル

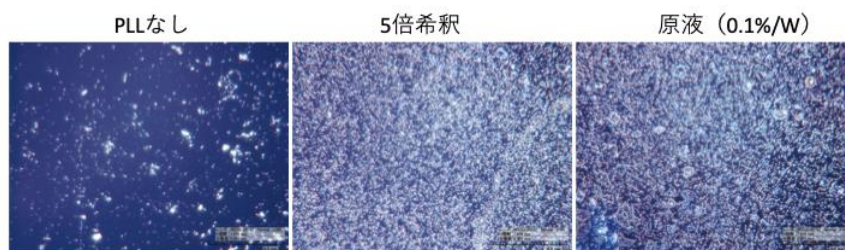


図2. ポリエルリジンを薄膜処理を施したシリコン基盤への大腸菌の吸着

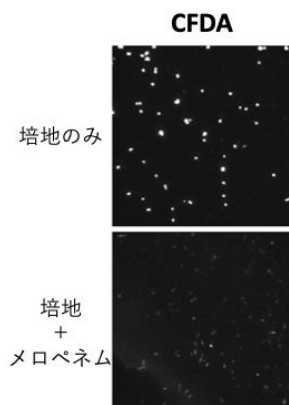


図3. 基盤上に吸着させたE.coliの生理活性 (白点が生存している細菌)