

# 黄色ブドウ球菌ペニシリン結合蛋白質2' (PBP2')の簡易迅速検出

## Rapid and Simple Detection of Penicillin Binding Protein 2' in *Staphylococcus aureus*

まつ い ひで ひと はな き ひで あき  
松 井 秀 仁 : 花 木 秀 明  
Hidehito MATSUI Hideaki HANAKI

### はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* : MRSA) は、 $\beta$ -ラクタム薬に対して耐性を獲得した黄色ブドウ球菌を示すが、臨床分離株の多くはその他の様々な系統の薬剤に対しても耐性を獲得した多剤耐性菌である。近年では、流行クローンの変化に伴い医療関連感染のみならず、市中感染の増加が問題となっている。この MRSA の検出方法としては、従来より薬剤感受性試験による鑑別が用いられてきたが、抗原検査や遺伝子検査による検出方法も臨床で使用されるようになってきている。2022 年 6 月に新たに MRSA の耐性の本質であるペニシリン結合タンパク質 2' (Penicillin Binding Protein 2' : PBP2') を特異的なモノクローナル抗体を用いて、イムノクロマト法により簡便に検出する体外診断薬が新規に保険適用された。本稿では、MRSA の鑑別における、PBP2' 検出の意義と注意点について概説する。

### I. 黄色ブドウ球菌の薬剤耐性化

黄色ブドウ球菌は通性嫌気性のグラム陽性球菌で、ヒトの皮膚や粘膜上、腸管内などに常在しており、健常者においては約 30% の割合で鼻腔検体から分離されてくる<sup>1)</sup>。健常者に対して重篤な感染症を引き起こすことは稀であるが、皮膚の軟部組織に感染して化膿性の炎症を引き起こしたり、エンテロトキシンなどの毒素により食中毒を引き起こしたりすることがある。また、医療施設では、免疫力の低下

した患者や術後の患者において、バリア機構が破綻して血流内に菌が侵入すると、骨髄炎や髄膜炎、心内膜炎など様々な重症感染症を引き起こすことが知られている。この黄色ブドウ球菌に対する抗菌薬の開発と薬剤耐性化の歴史を見てみると、Alexander Fleming により発見された  $\beta$ -ラクタム薬であるペニシリンが、1940 年代には工業的に量産可能となり広く使用されはじめると、ペニシリン分解酵素であるペニシリナーゼを産生する黄色ブドウ球菌が増加し始めた。そこでペニシリン耐性黄色ブドウ球菌に対抗すべく、ペニシリンを半合成的に誘導体化したメチシリンが 1960 年に開発された。しかし、翌年にはメチシリンに対して薬剤耐性を示す MRSA がイギリスで発見されたことが報告されている<sup>2)</sup>。その後、MRSA は医療関連感染を引き起こす主要な薬剤耐性菌として、世界中に蔓延していった。1990 年代後半に入ると、アメリカにおいて壊死性肺炎や敗血症による小児感染死亡例が報告されるなど、MRSA の重篤な市中感染例の報告が相次ぐようになった<sup>3)</sup>。これら市中感染型 MRSA (Community-associated MRSA : CA-MRSA) は、従来の医療関連型 MRSA (Healthcare-associated MRSA : HA-MRSA) とは異なり、白血球溶解毒素である Pantone-Valentine leucocidin (PVL) を産生している株が多く、重症化への関連が考えられている。国内においては、これまで HA-MRSA と CA-MRSA は異なるクローンとして分布していたが、近年、CA-MRSA で認められていたクローンの院内感染例における分離率が上昇してきている<sup>4)</sup>。また、これまで国内では PVL 陽性 MRSA の分離率は低かったが、経年的に増加してきていることが報告されている<sup>5,6)</sup>。

## II. PBP2'による薬剤耐性機構

黄色ブドウ球菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカンは、N-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸の2種の糖が交互に $\beta$ -1,4結合を繰り返した直鎖構造に、N-アセチルムラミン酸と結合しているペプチド鎖が架橋結合を形成することで網目状の強固な構造を形成している。このペプチドグ

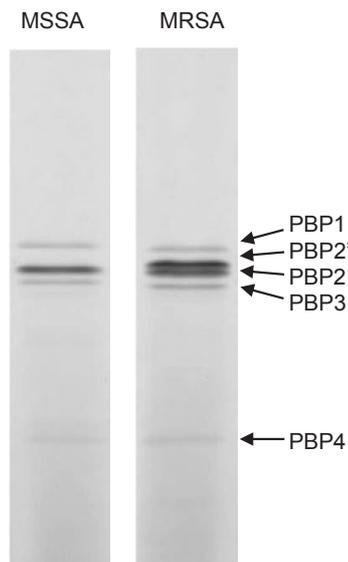


図1 MSSA および MRSA におけるペニシリン結合タンパク質

MSSA および MRSA から抽出した膜タンパク質画分と蛍光標識されたペニシリン (BOCILLIN™ FL Penicillin) を反応後、電気泳動により分離し蛍光画像解析装置にてペニシリン結合タンパク質を検出した。

リカンの合成を担っている酵素が、ペニシリン結合タンパク質 (PBPs) であり、メチシリン感性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* : MSSA) では PBP1 ~ 4 の4種類を有している (図1)。 $\beta$ -ラクタム薬は、PBPのトランスペプチダーゼ活性ドメインに不可逆的に結合することで、ペプチドグリカンの合成を阻害して抗菌活性を示す。しかし、MRSA では図1に示したように、約76 kDaのPBP2'と呼ばれる新たなタンパク質を発現している。このPBP2'は、 $\beta$ -ラクタム薬に対する親和性が低いことから、本酵素が有するトランスペプチダーゼ活性は阻害されず、細胞壁の合成が継続することでMRSAは薬剤耐性を示す。このPBP2'をコードする遺伝子が *mecA* であり、SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) といわれる可動性遺伝子複合体内に含まれている。MRSAは、染色体環状DNA上の特定の領域にSCC*mec*が挿入されることで、薬剤耐性を獲得したと考えられている (図2)。さらにSCC*mec*上には、マクロライドやアミノグリコシドに対する耐性遺伝子が存在していることが多く、様々な薬剤に対する耐性獲得にも寄与している。

## III. MRSA検出方法

MRSAの検出方法としては、薬剤感受性による鑑別、*mecA* 遺伝子の検出、PBP2'の検出が挙げられる。薬剤感受性試験では、オキサシリンの最小発育阻止

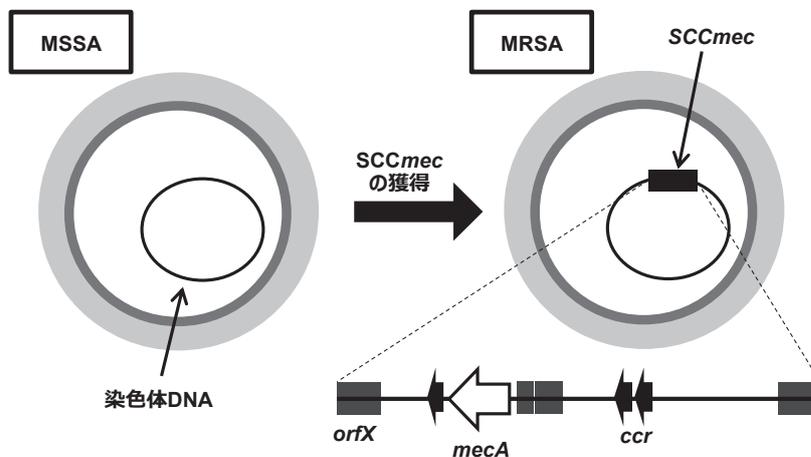


図2 MRSAにおけるSCC*mec*の獲得による薬剤耐性化

MRSAは可動性遺伝子複合体のSCC*mec*を環状染色体DNA上に獲得することで薬剤耐性する。SCC*mec*上には*mecA*遺伝子が含まれている。

濃度 (Minimum inhibitory concentration : MIC) が  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上、あるいはセフォキシチンの MIC が  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示す黄色ブドウ球菌を MRSA と判定するが、結果が得られるには純培養された菌体を用いて、そこから1日の時間を要する。そのため、抗菌薬の適正使用や感染制御の観点からも、より迅速で、簡便に検出する方法が必要とされている。そこで、PCR法により *mecA* 遺伝子を迅速に検出可能な、全自動解析装置が承認されており、30分から60分ほどで判定が可能である。全自動遺伝子解析装置である Xpert MRSA/SA BC の検査精度を多施設で評価した報告によると、感度は 98.1% (range 87.5%-100%)、特異度は 99.6% (range 98.3%-100%) であった<sup>7)</sup>。GENE CUBE においては、263 検体の血液培養陽性ボトル検体を用いた評価試験において、感度および特異度はともに 100%を示した<sup>8)</sup>。これらの方法は、血液培養陽性ボトルや分離コロニーからの検出が可能であり、高い検査精度を有するとともに、操作も簡便化されている。しかしながら、専用機器を必要とするなどの問題点もある。PBP2' の検出方法としては、これまでラテックス凝集反応を原理と

した体外診断薬が、分離コロニーを対象とした検出方法として使用されてきた。そして、新たにイムノクロマト法を原理とし、血液培養陽性ボトルと寒天培地上のコロニーから直接 PBP2' を検出可能な体外診断薬が 2022 年 6 月に新規保険適用された。

このイムノクロマトによる PBP2' 検出方法は、マウスで作製された 2 種の抗 PBP2' モノクローナル抗体を用いて、金コロイドを検出粒子として構成されている。血液培養陽性ボトルを検体とする場合は、培養液  $250 \mu\text{L}$  と前処理液  $125 \mu\text{L}$  を混合することで、赤血球などの血球成分を溶解し、遠心分離により菌体を回収する。得られた菌体の沈渣をアルカリ性の抽出液 A で懸濁して抗原を抽出後、抽出液 B で中和した液をサンプルとして、イムノクロマトテストプレートに滴下し、15分でラインの出現を目視で判定可能である (図 3)。そのため、遠心分離機以外は特に機器は必要とせず、抗原抽出も室温で実施可能である。前処理時間を含めて、総検査時間としては 30 分ほどと考えられる。コロニーからの検出においては、抗原抽出操作からの実施となるため、より短時間で実施可能である。他菌種に対する交差

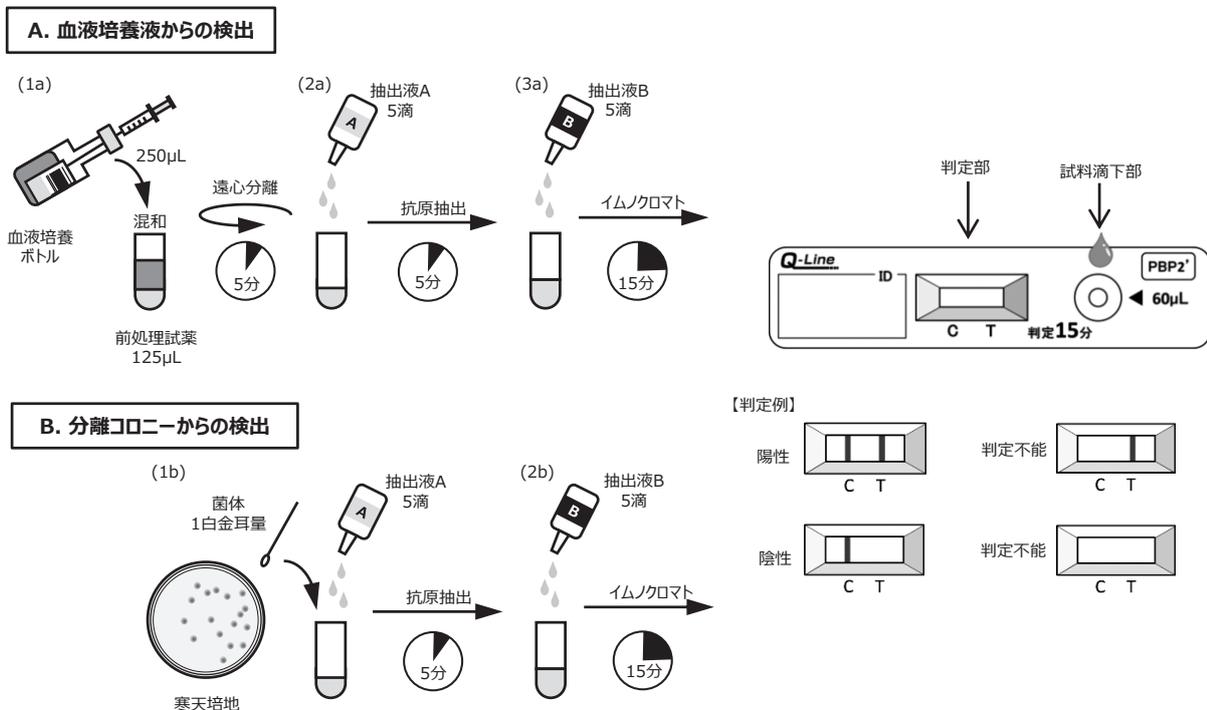


図 3 PBP2' 検出イムノクロマトの操作方法と判定

- A.** 血液培養液からの検出:血液培養液  $250 \mu\text{L}$  と前処理液  $125 \mu\text{L}$  を混合し遠心する (1a)。得られた沈渣に抽出液 A を 5 滴加えて、抗原抽出する (2a)。抽出液 B を 5 滴加え中和後 (3a)、サンプルを  $60 \mu\text{L}$  テストデバイスに滴下し、15 分後に判定する。
- B.** 分離コロニーからの検出:抽出液 A を 5 滴を加えたチューブに 1 白金耳量の菌体懸濁し抗原抽出する (1b)。抽出液 B を 5 滴加え中和後 (2b)、サンプルを  $60 \mu\text{L}$  テストデバイスに滴下し、15 分後に判定する。

表 1 PBP2' 検出イムノクロマトと薬剤感受性試験結果の相関性

(a)分離コロニー					(b)血液培養ボトル				
		薬剤感受性試験		合計			薬剤感受性試験		合計
		耐性	感性				耐性	感性	
PBP2' イムノクロマト	陽性	55	0	55	PBP2' イムノクロマト	陽性	54	0	54
	陰性	0	54	54		陰性	1	54	55
	合計	55	54	109		合計	55	54	109

(文献11)より転載)

反応性については、 $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL の高濃度サンプルにおいても反応は認められないが<sup>9)</sup>、MRSA と同じ *mecA* 遺伝子を保有するメチシリン耐性コアグラージェ陰性ブドウ球菌 (Methicillin-resistance coagulase-negative Staphylococci : MRCNS) に対しては、陽性反応を示すことが予想される。MRCNS には、様々な菌種が含まれていること、また  $\beta$ -ラクタム薬に対する耐性度の幅も広いこと、PBP2' の発現量は菌株間で異なることと考えられる。そのため、MRCNS に対しては、どれぐらいの反応性を有しているか、今後の評価による確認が必要であると考えられる。MRSA においても、菌株間の PBP2' 発現量は異なり、MRSA ATCC43330 と MRSA 92-1191 株では 60 倍異なることを我々は確認している<sup>10)</sup>。薬剤感受性試験を対照法とした、109 株のコロニーからのイムノクロマト法による検出結果は、感度および特異度ともに 100% であり (表 1a)<sup>11)</sup>、109 検体の血液培養ボトルからの検出結果は、感度 98.2%、特異度 100% を示している (表 1b)<sup>11)</sup>。イムノクロマト法は、特別な機器を必要とせず、簡便および迅速に検査可能であることなどの利点があり、検査方法の新たな選択肢の一つになると考えられる。

#### IV. PBP2' の迅速検出と臨床への影響

黄色ブドウ球菌感染症において、菌血症は依然として約 30% と高い死亡率を示すことから<sup>12)</sup>、迅速に診断を行い、適切な抗菌薬の投与を実施する必要がある。抗 MRSA 薬として国内では、グリコペプチド系のバンコマイシンとテイコプラニン、アミノグリコシド系のアルベカシン、オキサゾリジノン系のリネゾリドとテジゾリド、環状リポペプチド系のダプトマイシンが承認されている。MRSA 菌血症に対しては、ダプトマイシンあるいはバンコマイシン

が第一選択薬としてガイドラインで推奨されているが<sup>13)</sup>、臨床での豊富な使用経験や薬価の差などからバンコマイシンが使用されることが多い。しかし、MSSA に対するバンコマイシンの殺菌効果は *in vitro* において  $\beta$ -ラクタム薬に比べて低く<sup>14)</sup>、臨床効果についてもセファゾリンなどの  $\beta$ -ラクタム薬の方が優れていることが報告されている<sup>15, 16)</sup>。そのため、黄色ブドウ球菌菌血症の場合、MRSA あるいは MSSA の鑑別を迅速に実施し、適した抗菌薬の選択を行うことが重要である。そのためにも、従来の薬剤感受性試験より迅速に検出可能な、*mecA* 遺伝子検査や PBP2' 抗原検査をそれぞれの特徴を生かして用いることで MRSA 感染症の診断補助に有効な手段になると考えられる。

#### おわりに

薬剤耐性菌の代表格ともいえる MRSA は、 $\beta$ -ラクタム薬はじめ様々な薬剤に対しても耐性を獲得し、発見から 60 年以上経過した現在においても変化を続けている。抗 MRSA 薬に対して耐性を示す株も認められることから、今後も適切な感染制御を実施していく必要がある。MRSA をはじめとした薬剤耐性菌の蔓延は、今後さらに重要な問題として我々は直面することが予測されていることから、薬剤耐性菌の出現を遅らせ、抑制するためにも、適切に抗菌薬を使用していく必要がある。そのためにも原因菌を簡便かつ迅速に検出する方法の開発がさらに進展していくことが期待される。

#### 文 献

- 1) Young BC, Votintseva AA, Foster D, Godwin H, Miller RR, Anson LW, et al. Multi-site and nasal swabbing for carriage of *Staphylococcus aureus*: what does a single

- nose swab predict? *J Hosp Infect.* 2017; **96**(3): 232-237.
- 2) Eriksen KR. ["Celbenin"-resistant staphylococci]. *Ugeskr Laeger.* 1961; **123**: 384-386.
  - 3) Centers for Disease C, Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999; **48**(32): 707-710.
  - 4) Osaka S, Okuzumi K, Koide S, Tamai K, Sato T, Tanimoto K, et al. Genetic shifts in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clones and toxin gene profiles in Japan: comparative analysis among pre-epidemic, epidemic and post-epidemic phases. *J Med Microbiol.* 2018; **67**(3): 392-399.
  - 5) Takadama S, Nakaminami H, Sato A, Shoshi M, Fujii T, Noguchi N. Dissemination of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in multiple hospitals in Tokyo, Japan. *Clin Microbiol Infect.* 2018; **24**(11): 1211 e1- e7.
  - 6) Yamaguchi T, Nakamura I, Sato T, Ono D, Sato A, Sonoda S, et al. Changes in the Genotypic Characteristics of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Collected in 244 Medical Facilities in Japan between 2010 and 2018: a Nationwide Surveillance. *Microbiol Spectr.* 2022; **10**(4): e0227221.
  - 7) Buchan BW, Allen S, Burnham CA, McElvania TeKippe E, Davis T, Levi M, et al. Comparison of the next-generation Xpert MRSA/SA BC assay and the GeneOhm StaphSR assay to routine culture for identification of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in positive-blood-culture broths. *J Clin Microbiol.* 2015; **53**(3): 804-809.
  - 8) Hida Y, Uemura K, Sugimoto H, Kawashima Y, Koyanagi N, Notake S, et al. Evaluation of performance of the GENECUBE assay for rapid molecular identification of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in positive blood culture medium. *PLoS One.* 2019; **14**(7): e0219819.
  - 9) 松井秀仁, 花木秀明. MRSAのPBP2'を血液培養液から検出可能な「Qライン極東PBP2'」のキットの評価. *医学と薬学.* 2020; **77**(10): 1459-1466.
  - 10) Matsui H, Hanaki H, Inoue M, Akama H, Nakae T, Sunakawa K, et al. Development of an immunochromatographic strip for simple detection of penicillin-binding protein 2'. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; **18**(2): 248-253.
  - 11) Qライン極東® PBP2' 添付文書  
[https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/230134\\_30100EZX00006000\\_A\\_01\\_01.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/230134_30100EZX00006000_A_01_01.pdf)  
(引用2022.12/1)
  - 12) Bai AD, Lo CKL, Komorowski AS, Suresh M, Guo K, Garg A, et al. *Staphylococcus aureus* bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2022; **28**(8): 1076-1084.
  - 13) MRSA感染症の治療ガイドライン作成委員会. MRSA感染症の治療ガイドライン. 2019.
  - 14) LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; **48**(12): 4665-4672.
  - 15) Stryjewski ME, Szczech LA, Benjamin DK, Jr., Inrig JK, Kanafani ZA, Engemann JJ, et al. Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2007; **44**(2): 190-196.
  - 16) McConeghy KW, Bleasdale SC, Rodvold KA. The empirical combination of vancomycin and a beta-lactam for *Staphylococcal* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2013; **57**(12): 1760-1765.