

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-222712

(P2009-222712A)

(43) 公開日 平成21年10月1日(2009.10.1)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)		GO 1 N 33/569		E
GO 1 N 33/536 (2006.01)		GO 1 N 33/536		D

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2009-37160 (P2009-37160)</p> <p>(22) 出願日 平成21年2月19日 (2009.2.19)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2008-39818 (P2008-39818)</p> <p>(32) 優先日 平成20年2月21日 (2008.2.21)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国(JP)</p> <p>(出願人による申告) 文部科学省科学技術振興調整費、先端融合領域イノベーション創出拠点の形成プログラム「分析・診断医工学による予防早期医療の創成」協働研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願</p>	<p>(71) 出願人 504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番</p> <p>(74) 代理人 100114362 弁理士 萩野 幹治</p> <p>(72) 発明者 山田 景子 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内</p> <p>(72) 発明者 太田 美智男 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内</p> <p>(72) 発明者 岡本 行広 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 メチシリン耐性ブドウ球菌の検出法、検出用試薬及び検出用キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】メチシリン耐性ブドウ球菌(MRS)を特異的に且つ精度よく検出するための手段(検出法、検出用試薬、及び検出用キット)を提供すること。

【解決手段】PBP2a(Penicillin-binding protein 2a)に対するニワトリIgYを用いてメチシリン耐性ブドウ球菌を免疫学的に検出する。以下のステップ(1)及び(2)を含むことを特徴とする検出法:(1)検体と、PBP2aに対するニワトリIgYとを接触させるステップ;(2)生成する抗原抗体複合体を検出するステップ。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PBP2a (Penicillin-binding protein 2a) に対するニワトリIgYを用いることを特徴とする、メチシリン耐性ブドウ球菌の検出法。

【請求項 2】

以下のステップ(1)及び(2)を含むことを特徴とする、請求項1に記載の検出法：

- (1) 検体と、PBP2aに対するニワトリIgYとを接触させるステップ；
- (2) 生成する抗原抗体複合体を検出するステップ。

【請求項 3】

ニワトリIgYが蛍光標識したニワトリIgYであり、
抗原抗体複合体の検出が蛍光の検出によって行われる、
ことを特徴とする、請求項2に記載の検出法。

10

【請求項 4】

メチシリン耐性ブドウ球菌がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌であることを特徴とする、
請求項1に記載の検出法。

【請求項 5】

PBP2aに対するニワトリIgYからなる、メチシリン耐性ブドウ球菌検出用試薬。

【請求項 6】

請求項5に記載の試薬を含む、メチシリン耐性ブドウ球菌検出用キット。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明はメチシリン耐性ブドウ球菌(MRS: methicillin-resistant staphylococci)の
検出法、検出用試薬及び検出キットに関する。

【背景技術】

【0002】

グラム陽性球菌の一種である黄色ブドウ球菌は鼻腔や皮膚などにおける常在菌であり、
皮膚軟部組織感染症や慢性中耳炎、腸炎(食中毒を含む)などの原因となる。ラクタム
系抗菌剤(ペニシリンなど)に耐性を獲得した黄色ブドウ球菌はメチシリン耐性黄色ブ
ドウ球菌(MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus
aureus)と呼ばれる。MRSAは多剤耐性化の傾向が強く、病院感染の原因菌の中で特に注目
されている。MRSAは染色体上にstaphylococcal chromosomal
cassette mec (SCCmec)領域と呼ばれる外来遺伝子群をもつ。耐性化の原因遺伝子はこの
領域にあるmecA遺伝子である。当該遺伝子は、細胞壁合成酵素として働くと考えられて
いるPBP2a(あるいはPBP2'ともよばれる)タンパク質をコードしている。PBP2aは、菌がも
ともも持っている細胞壁合成酵素に比較してラクタム系抗生物質に対する親和性が低く、
ラクタム系抗生物質によって不活化されない。このためMRSAはラクタム系抗生物質
の存在下でも細胞壁を合成でき、耐性を示す。

30

MRSAと同様、mecA遺伝子による耐性を獲得した細菌であるメチシリン耐性表皮ブドウ球
菌(MRSE: Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis)も病院感染の原因菌と
して重要である。MRSEはヒトの表皮に常在する。

40

【0003】

ところで、黄色ブドウ球菌が産生するプロテインAは、ヒトをはじめマウスやウサギな
ど様々な生物種の抗体のFc領域と反応する。従って、このような生物種由来の抗体をMRSA
の検出に用いると、非特異的な結合反応(陽性結果)が生じ擬陽性となることがある。従
って、MRSAを特異的に検出することはできない。

一方、ラテックス凝集反応を利用したMRSA用検出キットが開発されているが、その原理
上、当該検出キットの検出感度は比較的低い。また、ラテックス凝集反応は一般にその結
果の判定が困難な場合も多く、他の検出法において頻用されるELISAに比べ特異性の点で
も大きく劣る。

50

また、プロテインAに対する抗体を利用して黄色ブドウ球菌を検出する方法が提案されている（特許文献1）。この方法では、黄色ブドウ球菌が広く一般に産生するプロテインAを標的としている以上、MRSAを特異的に検出することは不可能である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平9-211000号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

本発明は、以上の背景の下、メチシリン耐性ブドウ球菌（MRS）を特異的に且つ精度よく検出するための手段（検出法、検出用試薬、及び検出用キット）を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

黄色ブドウ球菌はプロテインAを産生し、これがIgGのFc領域に結合を行うことにより本来の抗原抗体反応を攪乱し、ヒトなどの宿主の免疫機構を回避している。プロテインAは細胞壁分画及び培養上清に検出され、菌株毎にその産生量が異なるためにマウスやウサギ等の抗体を用いた解析を困難にしている。一方、ニワトリの抗体IgYは哺乳類のIgGと同様の役割を果たす一方でプロテインAとは反応しない。本発明者らはこの性質に着目し、PBP2aを抗原として調製したIgYを用いてメチシリン耐性菌の検出を試みた。まず、免疫染色（ウエスタンブロッティング）実験を施行したところ、メチシリン耐性菌試料のみに目的のバンド（PBP2a）が検出された。一方、蛍光標識化したIgYを用いることによって、菌体を破砕する工程を経ることなく、メチシリン耐性菌を検出することに成功した。以上のように、PBP2aに対するIgYを用いればメチシリン耐性菌を特異的且つ精度よく検出できることが示された。尚、IgYを用いた場合、蛍光標識抗体を利用した検出系（実施例を参照）やELISA法による検出系を構築可能である。このような検出系ではその結果を数値化し易く、自動化が容易である。

20

本発明は以上の知見ないし成果に基づくものであり、次の通りである。

[1] PBP2a (Penicillin-binding protein 2a) に対するニワトリIgYを用いることを特徴とする、メチシリン耐性ブドウ球菌の検出法。

30

[2] 以下のステップ(1)及び(2)を含むことを特徴とする、[1]に記載の検出法：

(1) 検体と、PBP2aに対するニワトリIgYとを接触させるステップ；

(2) 生成する抗原抗体複合体を検出するステップ。

[3] ニワトリIgYが蛍光標識したニワトリIgYであり、抗原抗体複合体の検出が蛍光の検出によって行われる、ことを特徴とする、[2]に記載の検出法。

[4] メチシリン耐性ブドウ球菌がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌であることを特徴とする、[1]に記載の検出法。

40

[5] PBP2aに対するニワトリIgYからなる、メチシリン耐性ブドウ球菌検出用試薬。

[6] [5]に記載の試薬を含む、メチシリン耐性ブドウ球菌検出用キット。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】全菌体タンパク質を用いた免疫染色（ウエスタンブロッティング）の結果。左：抗PBP2a抗血清（ウサギ）を一次抗体とし、HRP標識ヤギ由来抗ウサギ抗体を二次抗体として検出。右：HRP標識ニワトリ由来抗PBP2a抗体（IgY）で検出。

【図2】蛍光標識ニワトリ由来抗PBP2a抗体（IgY）を用いた、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（菌体）の検出。左：蛍光強度の実測値の比較。右：相対蛍光強度の比較。

【図3】反応容器の一例。反応容器全体の平面図（上）及び堰5部分の拡大断面図（下）

50

を示す。

【図4】磁性粒子を利用した測定系の構成例。

【図5】抗体結合磁気微粒子の作製法(a)、抗体結合磁気微粒子へのMRSAの結合(b)、抗体結合磁気微粒子の標識化(c)。

【図6】ELISAでのMRSAの検出結果(吸光度の相対評価)を示すグラフ。MRSA(標準株及び臨床分離株)、MSSA(標準株及び臨床分離株)、他のブドウ球菌属を評価に用いた。

【発明を実施するための形態】

【0008】

1. メチシリン耐性ブドウ球菌の検出法

本発明の第1の局面はメチシリン耐性ブドウ球菌の検出法に関する。「メチシリン耐性ブドウ球菌(MRS)」とは、ラクタム系抗菌剤に耐性を獲得したブドウ球菌の総称であり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下、「MRSA」ともいう)及びメチシリン耐性表皮ブドウ球菌(以下、「MRSE」ともいう)を含む。本発明は、mecA遺伝子が耐性化の原因遺伝子であるメチシリン耐性ブドウ球菌の検出に広く適用可能である。

【0009】

本発明の検出法はPBP2a(Penicillin-binding protein 2a; ペニシリン結合タンパク質2a)に対するニワトリIgY(以下、「ニワトリIgY」を省略して「IgY」ともいう)、即ちPBP2aを特異的に認識するIgYを用いることを特徴とする。PBP2aは、耐性化の原因遺伝子であるmecA遺伝子がコードするタンパク質であり、別名「PBP2」ともよばれる。PBP2aに対するIgYは、MRSの特異的な検出が可能な限り、ポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体(数種~数十種の抗体の混合物)、及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。ポリクローナル抗体又はオリゴクローナル抗体は、免疫後のニワトリから得た抗血清や卵黄から調製することができる。

【0010】

免疫学的手法により調製したIgYの他、遺伝子工学的手法を用いて調製した組換え型IgYを用いることもできる。また、本発明におけるIgYは、プロテインAと実質的に反応しない限り、完全な構造のIgY(即ち、VH及びCH1~CH4を備える重鎖二本と、VL及びCLを備える軽鎖二本との組合せからなるIgY)でなくてもよい。本発明におけるIgYは、典型的には、IgYがプロテインAと反応しないことに直接関与するCH4領域を備える。

【0011】

免疫学的手法によるポリクローナル抗体の調製は常法で行えばよい(例えば、Losch, U. The chicken egg, an antibody source. J. Vet. Med. B 33:609-619 (1986).を参照)。ポリクローナル抗体の調製法の一例を以下に示す。まず、抗原(PBP2a又はその一部)を調製し、これを用いてニワトリに免疫を施す。抗原は、生体試料を精製することにより得ることができる。また、組換えタンパク質からなる抗原(組換えPBPa2)を用いることもできる。PBP2aは約660個のアミノ酸からなる膜タンパク質である。PBPa2の全長アミノ酸配列(Accession No.: NP_373278.1)を配列番号1に示す。実際の検出に必要なのは膜貫通領域以降の部分(当該部分のアミノ酸配列を配列番号2に示す)であることから、当該部分、又は当該部分を含む部分タンパク質を抗原として用いることにしてもよい。組換えPBPa2は、所定のアミノ酸配列(例えば配列番号2のアミノ酸配列)をコードする遺伝子コンストラクトの宿主への導入、宿主内でのタンパク質の発現、及びタンパク質の回収からなる一連の操作によって調製することができる。

【0012】

免疫惹起作用を増強するために、キャリアタンパク質を結合させた抗原を用いてもよい。キャリアタンパク質としてはKLM(Keyhole Light Hemocyanin)、BSA(Bovine Serum Albumin)、OVA(Ovalbumin)などが使用される。キャリアタンパク質の結合にはカルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、ジアゾ縮合法、MBS(マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド)法などを使用できる。一方、対象タンパク質(又はその一部)を、GST、ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク、又はヒスチジン(His)タグ等との融合タンパク質として発現させた抗原を用いることもできる。このような融合タンパク質は、

汎用的な方法により簡便に精製することができる。

【0013】

必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で採血し、遠心処理などによって血清を得る。得られた抗血清を硫酸沈澱及び/又はアフィニティー精製し、ポリクローナル抗体とする。また、卵黄からも同様にポリクローナル抗体を調製することができる。尚、卵黄からIgYを精製するためのキットが市販されており、これを利用することにしてもよい。

【0014】

モノクローナルIgYの調製も常法で行うことができる(例えばNishinaka, S. et al. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 89, 416(1989); Nishinaka, S. et al. *J Immunol Methods*, 139, 217(1991); Nishinaka, S. et al. *J Vet Med Sci*, 58, 1053(1996)を参照)、モノクローナルIgYの調製法の一例を示す。まず、上記と同様の手順で免疫操作を実施する。必要に応じて免疫を繰り返し、十分に抗体価が上昇した時点で、免疫したニワトリから抗体産生細胞を摘出する。次に、得られた抗体産生細胞を用い、細胞融合法によってハイブリドーマを得る。続いて、このハイブリドーマをモノクローナル化した後、PBPa2に対して高い特異性を有する抗体を産生するクローンを選択する。選択されたクローンの培養液を精製することによって目的の抗体が得られる。上記培養液の精製には、抗原を固相化したアフィニティークロマトグラフィーを用いることができる。また、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、硫酸分画、及び遠心分離等の方法を用いることもできる。これらの方法は単独ないし任意に組み合わせられて用いられる。

10

20

【0015】

本発明の検出法では、PBP2aに対するIgYとPBP2aとの間の抗原抗体反応を利用する。抗原抗体反応を利用した様々な測定法を採用することができる。測定法として、蛍光免疫測定法(FIA法)、酵素免疫測定法(EIA法)、放射免疫測定法(RIA法)、ウエスタンブロット法を例示することができる。好ましい測定法としては、FIA法及びEIA法を挙げることができる。これらの方法によれば高感度、迅速且つ簡便に検出可能である。FIA法では蛍光標識したIgYを用い、蛍光をシグナルとして抗原抗体複合体(免疫複合体)を検出する。一方、EIA法では酵素標識したIgYを用い、酵素反応に基づく発色ないし発光をシグナルとして免疫複合体を検出する。EIA法の中でもサンドイッチELISA法が特に好ましい。

尚、非競合法に限らず、競合法(検体とともに抗原を添加して競合させる方法)を用いることにしてもよい。

30

【0016】

検体中の目的の抗原を標識化抗体で直接検出する方法、捕捉用抗体に目的の抗原を結合させた後、標識化IgYを反応させて検出する方法(サンドイッチ法)のいずれを採用してもよい。サンドイッチ法では、エピトープの異なる2種類の抗体(捕捉用抗体及び検出用抗体。いずれも抗原はPBPa2である)が用いられる。検出用抗体はIgYである必要があるが、捕捉用抗体はIgYでなくてもよい。即ち、マウス、ウサギ、ヤギなど、ニワトリ以外の動物に由来する、PBP2aに対する抗体を捕捉用抗体に用いてもよい。もっとも、捕捉用抗体もIgYにすればプロテインAに対する反応性を排除でき、より特異的な検出が可能である。従って、好ましくは捕捉用抗体と検出用抗体の両者をIgYとする。

40

【0017】

測定法に応じて、適当な標識物質で標識された抗体が用いられる。標識物質の例は、ペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素などの酵素、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)及びユーロピウムなどの蛍光物質、ルミノール、イソルミノール及びアクリジニウム誘導体などの化学発光物質、NADなどの補酵素、ビオチン、並びに ^{131}I 及び ^{125}I などの放射性物質である。

採用する測定法によって具体的な操作手順は異なるが、本発明の測定法では大別して以下の2つのステップ(1)及び(2)が実施される。

50

(1) 検体と、PBP2aに対するニワトリIgYと、を接触させるステップ。

(2) 生成する抗原抗体複合体を検出するステップ。

【0018】

ステップ(1)における検体は特に限定されず、例えば皮膚、咽頭、鼻腔等を擦過して得た試料、創傷部や化膿巣から採取した試料、拭き取り試料、各種食品、嘔吐物、糞便等を検体として用いることができる。これらの検体は必要に応じて前処理に供される。前処理として例えば検体の懸濁、フィルターろ過や遠心による夾雑物の除去、アルカリ処理などが行われる。尚、例えばFIA法等、高感度の測定法を採用した場合、検体中の菌体の破砕ないし溶菌のための操作を行うことなく検出することにしてもよい。即ち、菌体の破砕ないし溶菌操作は必須でない(但し、このような操作を併用することを妨げない)。また、高感度の検出が可能となるため事前の培養も必須ではない。但し、検体の性質を考慮して或いは信頼性のより高い検出結果を得るためなど特定の目的の下、事前の培養を行うことにしてもよい。

10

【0019】

検体とIgYとの接触は、典型的には、検体にIgYを添加することによって行われる。接触時間(インキュベート時間)は、採用する測定法に応じて適宜設定されるが、例えば1分~オーバーナイトとする。その他の条件(温度や使用する緩衝液など)は常法に従えばよい。

【0020】

ステップ(2)では、ステップ(1)によって生成する抗原抗体複合体を検出する。検出操作は測定法毎に異なり、例えば、FIA法を採用した場合には蛍光をシグナルとして抗原抗体複合体を検出する。

20

【0021】

反応用の容器は特に限定されないが、本発明の一態様では、図3に一例を示すように、流入口2及び流出口3を備える流路4が形成された容器1を用いる。流路4には、MRSの菌体が通過できない径(幅) d を有する堰5が設けられている。ここでの径 d は例えば $0.3\sim 0.5\mu\text{m}$ である。

この容器1を用いて検出する場合の操作手順についてFIA法を例に採り説明する。まず、流入口2に検体を添加し流出口3から廃棄する。続いて、流入口2から蛍光標識IgYを添加した後、インキュベートする(抗原抗体反応)。インキュベート時間は特に限定されないが、例えば1分~10分とする。尚、検体と蛍光標識IgY抗体をあらかじめ反応させておいてから容器1に導入してもよい。

30

【0022】

次に、洗浄液(例えばリン酸緩衝生理食塩水PBS等のバッファー)を流入口2から添加し流出口3から廃棄する。これによって、MRSに結合しなかったIgYは廃棄される。一方で、検体中のMRSは堰5を通過できないことから、蛍光標識抗体が結合したMRSは流路4に留まることになる。洗浄操作後、蛍光リーダーを用いて流路4の蛍光を検出する。

以上のような容器を用いた測定法は、多数検体を同時に処理できる(ハイスループット化)、検体量が少量で済む、自動化が容易である、反応試薬なども少量で済み廃棄物も軽減される等の利点を有する。

40

【0023】

本発明の他の一態様では磁気微粒子(磁性粒子)を利用する。この態様に適した装置の構成例を図4に示す。この例では流路7が形成された容器6(樹脂ポリマー性のマイクロチップ)を使用する。流路7は片側で二股に分岐しており、検体と抗体結合磁気微粒子用の第1流入口7aと、蛍光分子結合抗体用の第2流入口7bを形成する。流路の他端は流出口8となる。流路の中央が検出部7cとなるが、ここには磁場が形成されている。検出部7cには、検出の際、光源9からの光が照射する。以下、当該構成例を用いた測定法を説明する。まず、実際の測定に先立って、抗体結合磁気微粒子を作製しておく(図5(a))。具体的には磁気微粒子(例えば粒子径 $1.1\mu\text{m}$ 、表面官能基がカルボキシル基の磁気微粒子)と抗PBP2aIgYを、架橋剤(例えばEDC)を用いて結合させる。このようにして用

50

意した抗体結合磁気微粒子と検体を混合した後、容器6の第1流入口7aに滴下する。混合液は流路7内を進行し、最終的に流出口8から廃棄されるが、抗体結合磁気微粒子は磁場によって検出部7cに捕捉(トラップ)されることになる。検体中に検出対象(この例ではMRSA)が存在すると、MRSAを捕捉した抗体結合磁気微粒子が磁場によって検出部7cに捕捉される(図5(b))。続いて、蛍光分子結合抗体(この例ではHilyte Fluor647標識抗PBP2aIgY)を第2流入口7bに滴下する。蛍光分子結合抗体は流路7を進行し、検出部7cにおいて抗体結合磁気微粒子と接触する。抗体結合磁気微粒子にMRSAが捕捉されていると、蛍光分子結合抗体はMRSAを介して抗体結合磁気微粒子に結合する(図5(c))。このようにして、MRSAが存在する検体の場合、検出部7cには蛍光分子で標識された磁気微粒子が捕捉されることになる。次に、洗浄液を第1流入口7a又は第2流入口7bから添加し、非特異的な結合成分を洗浄する。以上の操作の後、検出部7cの蛍光を検出する。

以上の態様では、マイクロ空間を利用したことによって、検体量及び試薬量の削減、抗体結合時間の短縮などの効果が奏される。また、磁場を用いたことによって、MRSAの特異的且つ効率的な捕捉、濃縮による高感度検出などの効果が奏される。

【0024】

2. メチシリン耐性ブドウ球菌検出用試薬及びキット

本発明の第2の局面は、本発明の検出法に用いられる試薬及びキットに関する。本発明の試薬はPBP2aに対するニワトリIgYである。一態様では、本発明の試薬はその用途に合わせて標識化されている。抗体の標識化に使用可能な標識物質の例は上記の通りである。また、一態様では、本発明の試薬はその用途に合わせて固相化されている。固相化に用いる不溶性支持体は特に限定されない。例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂や、ガラス等の水に不溶性の物質からなる不溶性支持体を用いることができる。不溶性支持体への抗体の担持は物理吸着又は化学吸着によって行うことができる。

本発明のキットは主要構成要素として本発明の試薬を含む。検出法を実施する際に使用するその他の試薬(緩衝液、ブロッキング用試薬、酵素の基質、発色試薬など)及び/又は装置ないし器具(容器、反応装置、蛍光リーダーなど)をキットに含めてもよい。また、抗原(PBP2a)をキットに含めてもよい。尚、通常、本発明のキットには取り扱い説明書が添付される。

【実施例】

【0025】

1. PBP2a組換えタンパク質(rPBP2a)の調製

PBP2aは膜タンパク質であるため、実際の検出に必要な部分は膜貫通領域以降のアミノ酸配列(配列番号2)である。PBP2aの膜貫通領域と推定される部分を除いて発現するように、組換えタンパク質発現ベクターpQE30(Qiagen社)にPBP2aをコードする遺伝子mecA(配列番号3)を組み込み、大腸菌にプラスミドを導入した。発現ベクターを導入した大腸菌を培養し、rPBP2aタンパク質の発現を誘導し、菌体を回収した。菌体を物理的に破碎し、超遠心により細胞質画分を得、アフィニティークロマトグラフィーの手法によりrPBP2aを精製した。

【0026】

2. 抗rPBP2a抗体の調製

rPBP2aをフロイト完全及び不完全アジュバントと懸濁し、ニワトリに免疫を行った。得られた抗血清からは硫酸沈殿法により、卵黄からはIgY精製キット(Promega社)により、イムノグロブリン分画(IgY)を分取した。IgYのうち特異的に反応する抗体のみを得るため、Affi Gel 10 (BioRad社)を用いてrPBP2aを固相化したカラム作製し、アフィニティークロマトグラフィーを行い、得られたrPBP2aに対する特異的抗体に酵素標識又は蛍光標識を行った。

【0027】

3. 全菌体タンパク質を用いた免疫染色(ウエスタンブロッティング)

対象となるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌株(COL株および3429株)およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(RN4220株および3429mecA遺伝子欠失株)をLB培地にて培養し、吸光度0.7においてその菌体1 mlを回収した。細胞壁分解酵素リゾスタフィン、DNA分解酵素、RNA分解酵素を加え30分37℃でインキュベートすることにより菌体および核酸を分解し、菌体全タンパク質を得た。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とその後のゲル内のタンパク質をPVDF膜への転写を行い、抗PBP2a抗体により免疫染色を行った。ニワトリ由来抗PBP2a抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識を行い、他の哺乳類由来の二次抗体を使う必要を排除した。比較対照の哺乳類由来抗体としては、rPBP2aで免疫したウサギの抗血清(ウサギ由来抗PBP2a抗体;一次抗体)及び西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ由来抗ウサギ抗体(二次抗体)を用いた。結果を図1に示す。ニワトリ由来抗PBP2a抗体を用いた場合、メチシリン耐性菌(MRSA)では目的のPBP2aタンパク質のバンドのみが検出され、メチシリン感受性菌(MSSA)では当該バンドが検出されなかった。よって、本抗体により耐性菌のみを検出できると考えられる。一方、ウサギ由来抗PBP2a抗体(一次抗体)とHRP標識ヤギ由来抗ウサギ抗体(二次抗体)を用いた場合、メチシリン耐性菌(MRSA)とメチシリン感受性菌(MSSA)の両方において、黄色ブドウ球菌が産生するプロテインA由来と考えられる複数のバンドが検出された。プロテインAは菌株により産生量が異なる。従って、このように哺乳類由来の抗体を用いた場合にはバックグラウンドの量が異なることとなり、抗原抗体反応を用いたELISAなどでは正確な測定が困難と考えられる。

10

20

30

40

50

【0028】

4. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌体の検出

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌株(MRSA; 3429株)およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA; 3429mecA遺伝子欠失株)をLB培地にて培養し、吸光度0.7においてその菌体0.5 mlを回収し15,000 rpm 5分遠心することにより菌体を得た。リン酸緩衝生理食塩水(PBS pH7.4)を用いて懸濁して菌体を洗い再び遠心後、0.1 N NaOH 0.5 mlで懸濁し37℃、10分インキュベートした。菌体を遠心し上清を捨て、PBSにより2回洗浄後、100 µlのPBSで懸濁しサンプルとした。ニワトリ由来抗PBP2a抗体はHilyte Fluor647 Labeling Kit(同仁化学)により蛍光標識したものをを用いた。標識抗体をサンプルに加えて2時間インキュベートし反応させた。PBSで2回洗浄後100 µlのPBSで懸濁し、蛍光プレートリーダー(大日本製薬)で分析した(励起646 nm、蛍光676 nm)。結果を図2に示す。MSSAに比較してMRSAの蛍光強度は強く、ニワトリ由来抗PBP2a抗体がMSSAよりもMRSAに対して高い反応性を示すことが確認された。また、この結果より、蛍光強度の差によってMRSAを検出できることがわかる。

【0029】

5. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の臨床分離株への応用および特異性の検証

複数のMRSA株、MSSA株、および他のブドウ球菌数種を用いて検証を行った。ニワトリ由来抗PBP2a抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識を行いELISAでの検出を行った。capture抗体をPBSで希釈し、プレートに100 µlずつ添加し室温で2時間静置し洗浄し、ゼラチン0.5%-PBS 300 µlでブロッキングしELISA用プレートを調製した。MRSA(標準株ATCC43300およびCOL、臨床分離株T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9、T10)、MSSA(標準株ATCC29213およびRN4220、臨床分離株R1、R2、R3、R4)、他のブドウ球菌属(*S. epidermidis* ATCC12228、*S. saprophyticus* ATCC49907、*S. warneri* ATCC29885、*S. lugdunensis* ATCC49576、*S. intermedius* ATCC29663、*S. sciuri* ATCC29060、*S. haemolyticus* ATCC29970、*S. xylosus* ATCC49148)を評価に用いた。各菌株を培養し、OD₆₁₀ 1.0の菌体を遠心により回収した。10分の一量の0.1N NaOHで懸濁し、5分後に等量の0.3M KH₂PO₄ pH6.0により中和し検体とした。ELISAプレートに検体100 µlずつ添加して2時間室温で静置し洗浄した。次にHRP標識IgY抗体をPBSで希釈し、100 µlずつ添加して2時間静置後に洗浄した。基質溶液を添加し、10~20分後にH₂SO₄を添加し反応を止めプレートリーダーで吸光度を計測した。結果を図6に示す。非MRSA株に比較してMRSA株では吸光度が高くMRSAを選択的に検出できることがわかる。臨床分離株での応用が可能であり、他のブドウ球菌

属と交差反応していないことがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0030】

本発明の検出法はメチシリン耐性ブドウ球菌の検出に利用される。MRSAの検出に限らず、MRSEの検出にも本発明の検出法を適用可能である。本発明の検出法によれば、メチシリン耐性ブドウ球菌を特異的に且つ精度よく検出することができる。

【0031】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

【符号の説明】

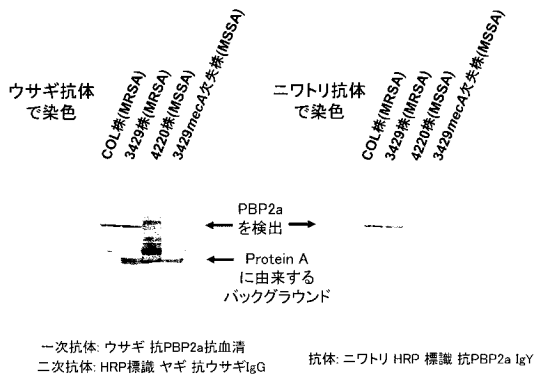
【0032】

- 1 容器
- 2 流入口
- 3 流出口
- 4 流路
- 5 堰
- 6 容器（ポリマー製マイクロチップ）
- 7 流路
- 7 a 第1流入口
- 7 b 第2流入口
- 7 c 検出部
- 8 流出口
- 9 光源

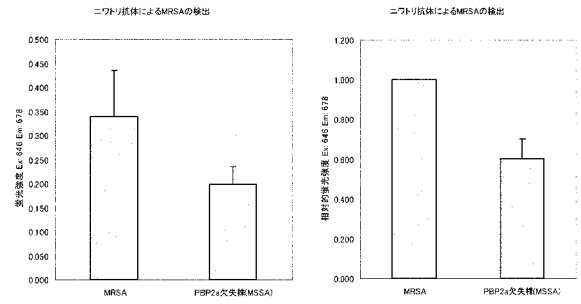
10

20

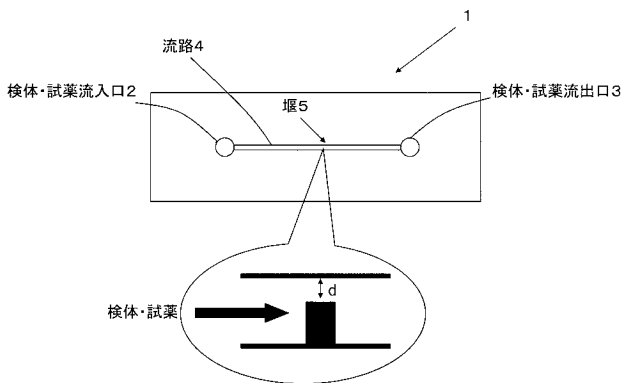
【 図 1 】



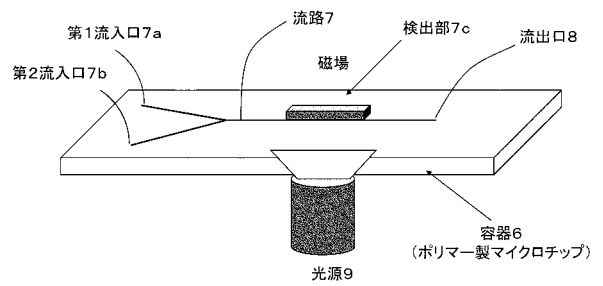
【 図 2 】



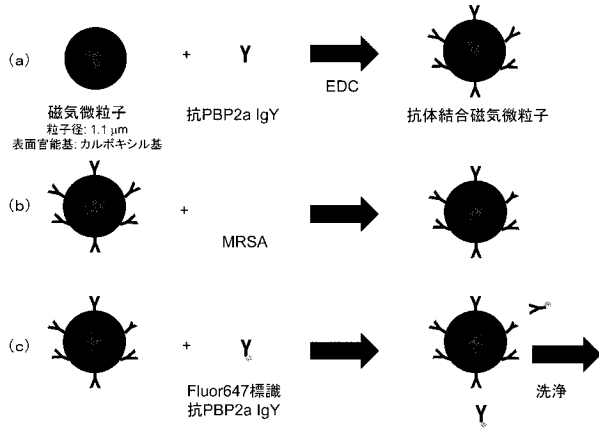
【 図 3 】



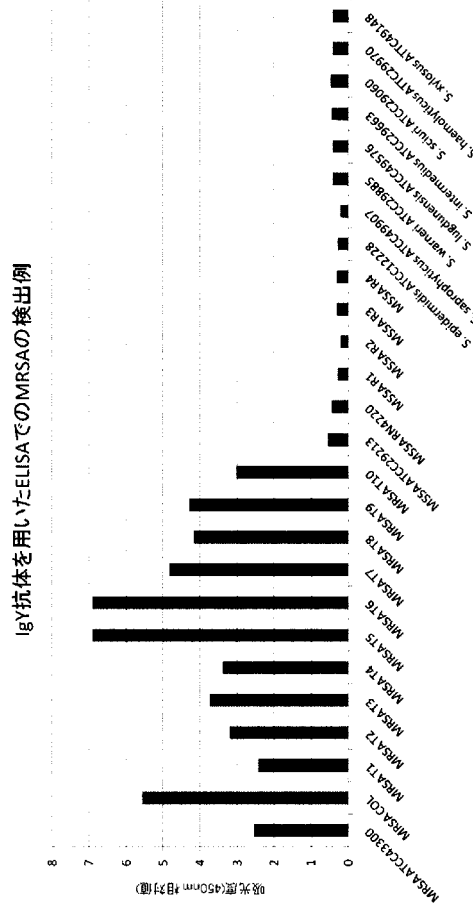
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2009222712000001.app

专利名称(译)	检测耐甲氧西林的葡萄球菌的方法，检测试剂和检测试剂盒		
公开(公告)号	JP2009222712A	公开(公告)日	2009-10-01
申请号	JP2009037160	申请日	2009-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
[标]发明人	山田景子 太田美智男 岡本行広		
发明人	山田 景子 太田 美智男 岡本 行広		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/536		
FI分类号	G01N33/569.E G01N33/536.D		
代理人(译)	萩野 干治		
优先权	2008039818 2008-02-21 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种方法（检测方法，检测试剂和检测试剂盒），用于特异性和准确地检测耐甲氧西林的葡萄球菌（MRS）。解决方案：使用鸡抗PBP2a（青霉素结合蛋白2a）的IgY免疫检测耐甲氧西林的葡萄球菌。一种检测方法，其特征在于包括以下步骤（1）和（2）：（1）使样品与抗PBP2a的鸡IgY接触；（2）检测产生的抗原-抗体复合物。[选择图]无

