

課題番号 : 23指301
研究課題名 : インフルエンザ等の薬剤耐性の迅速診断法の開発
主任研究者名 : 秋山 徹
分担研究者名 : 切替 照雄

キーワード : インフルエンザ、タミフル耐性、迅速診断、病原体ゲノム
研究成果 :

本研究ではタミフル耐性インフルエンザの耐性に寄与する変異を検出する遺伝子解析法を臨床現場で利用可能とするための基礎研究および開発研究を実施する。また病原体の遺伝学的検査の基盤となる病原体ゲノム情報を収集・解析し、その情報を元に重要感染症病原体の迅速診断法を開発する。

インフルエンザのタミフル耐性の遺伝子診断法開発

本研究で対象となるインフルエンザのタミフル耐性の遺伝子診断法開発には、耐性および感受性のインフルエンザ遺伝子の準備が必要である。これに加えて、遺伝子診断法の臨床現場への導入を困難にしている1) 検体からの病原体遺伝子抽出、2) 遺伝子増幅反応実施、3) 増幅遺伝子の変異解析法、の各課題を解決する必要があった。以下ではこれらの解決についての成果を順に記述する。

1) 検体からの病原体遺伝子抽出操作の簡便化: 現在のインフルエンザ遺伝子解析では、検体からのインフルエンザ遺伝子抽出に専用のキットを使用する必要がある。このキットではカラムに病原体遺伝子を吸着後、複数の溶液で遠心機を使用して洗浄し、さらに遺伝子を回収するという複雑な工程が必要となる。しかしながらこの工程を簡略化し、熱処理のみで以降の遺伝子増幅反応を行うことが技術的に可能となっている。この技術は以降の遺伝子増幅反応を妨害する検体中の物質を抑制する特殊な緩衝液で、1段階のみの前処理を行い直接検体とする方法である。本計画では、この技術をインフルエンザ検体調整用に最適化した。検体からの病原体遺伝子抽出の簡便化: 予備的試験を実施し、加熱法による検体処理での遺伝子増幅反応への適用性を検証する。すでに他のRNAウイルスで構築されている類似法を元に、条件の最適化を行った。検体調整時間は、従来の約30分から、1段階法による抽出で、5分に短縮された。

2) 遺伝子増幅反応の簡便化: 現在のインフルエンザ遺伝子増幅反応ではRNAをDNAに変換する逆転写反応と、その後のPCR法によるDNA増幅に、専用の温度制御装置が必要であり、この反応は通常数時間を要する。これらの装置は比較的高価だったが現在では数十万円程度で入手可能となっており、臨床現場への導入は容易になってきている。本研究では、増幅反応時間を短縮するため、逆転写反応とPCR法を連続的に実施し、さらに反応が短時間で終結する高速反応酵素を採用して、数時間だった反応時間を最終的には20分程度に短縮する。これらの高速反応酵素はいくつかが製品化されており、インフルエンザ遺伝子増幅に最適な酵素の選定とさらなる最適化を実施した。遺伝子増幅反応の簡便化: すでに市販されているいくつかの高速増幅酵素のそれぞれの特性を検証し、インフルエンザの耐性遺伝子増幅に最適な酵素の選抜を行った。増幅反応に使用するプライマーを通常より長いものに設定することで、反応の頑強性を向上させると共に、増幅反応を従来の、変性・アニーリング・

増幅の3段階法から、変性・アニーリング&増幅の2段階法に切り替えることで、従来2～6時間程度を要していた反応時間を30分程度に短縮できた。

3) 増幅遺伝子解析法の簡便化：タミフル耐性などの遺伝子変異の解析にはDNAシーケンサなどの高度な装置が必要であり、診療室では実施できない。そこで結核の薬剤耐性診断に使用されているラインプローブ法を利用する。ラインプローブ法では複数の変異を一つのスリットで解析できるので、インフルエンザの抗インフルエンザ薬耐性のタイプが変化した場合でも、容易に対応可能であるという大きな利点がある。ラインプローブ法をさらに簡便化するため、非対称PCRでのPCR増幅時の産物標識の一体化、およびスリットにサンプルを滴下するだけで解析可能とするように反応と解析条件の最適化を行った。増幅遺伝子解析法の簡便化：インフルエンザの抗インフルエンザ薬耐性に寄与する遺伝子変異を検出するためのプローブを実装したラインプローブを作製する。当面タミフル耐性に焦点をあてて必要なプローブの設計とラインプローブへの搭載を行った。本プローブを使用し、国際医療研究センターの小児科との臨床研究により、インフルエンザ亜型とタミフル耐性の有無の検出における、その有用性を検証した。同ラインプローブは354株の培養ウイルス株において、特異性は100%で、タミフル耐性検出感度は99%だった。また、臨床検体においては、特異性は100%で、タミフル耐性非保有の特異性は88%だった。

4) タミフル耐性インフルエンザの人工遺伝子による評価系の構築：タミフルなどの耐性判定の遺伝子診断には、当該変異を持つ病原体が必要となる。しかしそれらのウイルスをリアルタイムで入手することは困難である。そこで本計画ではデータベースに登録される変異情報を活用し、予め構築しておいたタミフル耐性に関与する遺伝子（ノイラミニダーゼ遺伝子）の発現系にて、変異情報を組み込んだ変異体を発現させる系を構築する。これにより、ウイルス本体に頼らない評価系を構築した。タミフル耐性インフルエンザの人工遺伝子による評価系：タミフル耐性の評価が必要と考えられる季節性のH1N1インフルエンザおよびH3N2インフルエンザ、さらに新型のH1N1インフルエンザについて、それぞれのノイラミニダーゼ遺伝子をクローニングし、発現系を構築した。本発現系により発現させた人工ノイラミニダーゼの活性を発光基質法を用いて測定したところ、これらの酵素は解析に十分な酵素活性を有していた。また、タミフル耐性に関与する変異を組み込んだ酵素では、期待された通り、タミフルに対する感受性が低下していた。リレンザ、ラピアクタの各抗インフルエンザ薬との交差耐性についての解析では、タミフル耐性はリレンザ耐性とは交差しなかったが、作用点がタミフルと同じラピアクタでは、交差耐性を認め、タミフル耐性変異を持ったウイルスは、ラピアクタにも耐性になることが示唆された。

病原体ゲノム情報の収集・解析

1. インフルエンザ以外の薬剤耐性が問題となっている新興感染症の病原体および診断が困難な病原体について次世代シーケンサを活用し、ゲノム情報を収集する。新興感染症として、*Helicobacter cinaedi*の全ゲノム情報を解析し、論文発表した(Miyoshi-Akiyama T, Takeshita N, Ohmagari N, Kirikae T. *J Bacteriol.* 194(20): 5692, 2012)。

2. 国内で流行している高度多剤耐性緑膿菌と結核菌の全ゲノム配列の解析を行った。劇症型レンサ球菌感染症患者より分類された流行型のM1型菌であるM1 GAS 476株の全ゲノム配列を明らかにし、論文化した。(Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T. J Bacteriol. 194 (19) : 5466. 2012)。
3. 昨年度まで実施した高度多剤耐性緑膿菌ゲノム解析の成果を元に、同菌耐性因子を標的としたイムノクロマト法を構築し、研究用試薬として実用化し、論文発表した (Kita o T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Int J Antimicrob Agents. 39 (6) : 518-21, 2012)。
4. 本イムノクロマト法の有用性を、2011年~2012年に大手臨床検査センターで分離された多剤耐性緑膿菌の疫学研究にて検証し、IMP、AAC(6')-Ia またはAAC(6')-Ibを保有する多剤耐性緑膿菌の割合が、多剤耐性緑膿菌の約80%二相等することを明らかにした (Tojo M, Tada T, Shimojima M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Ohmagari N. J Infect Chemother. 2014 Jun 5. pii: S1341-321X(14)00180-9. doi: 10.1016/j.jiac.2014.04.014.)。
5. これまでほとんど国内では症例が報告されていなかったIMP型メタロ-β-ラクタマーゼを保有した *Enterobacter cloacae* について、その多発事例を見だし、全ゲノム解析を元に、多発事例と孤発例の識別を行った (Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Kubota S, Takeshita N, Kutsuna S, Tojo M, Ohmagari N. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jun; 58 (6) : 3441-3450.)。
6. 劇症型レンサ球菌感染症の原因菌の一つであり、これまで全ゲノム構造が明らかにされていなかったLancefield血清型C群のレンサ球菌の全ゲノム配列を世界に先駆けて明らかにした (Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Genome Biol Evol. 2013; 5 (9) : 1644-51. doi: 10.1093/gbe/evt117.)
7. A型インフルエンザウイルスの亜型を識別可能なモノクローナル抗体について、それらの反応エピトープを解析し、識別の基盤となっている機構を明らかにした (Miyoshi-Akiyama T, Yamashiro T, Maile Q, Narahara K, Miyamoto A, Shinagawa S, Mori S, Kitajima H, Kirikae T. Influenza Other Respir Viruses. 2012 Nov; 6 (6) : 434-41.)

Subject No. : 23A301

Title : Development of rapid diagnosis methods to detect drug resistance of pathogens including influenza viruses

Researchers : Tohru Miyoshi-Akiyama, Teruo Kirikae

Key word : Influenza virus, drug-resistance, rapid diagnosis, genome

Abstract :

1. Development of rapid diagnosis methods to detect drug resistance of influenza viruses: Adequate treatment of influenza requires identification of viral type as well as detection of mutation(s) conferring drug resistance. Reverse hybridization-based line probe assay (LiPA) can be equipped with a number of probes immobilized on nitrocellulose paper strips. Thus, LiPA could be utilized to determine viral subtypes and detect the presence or absence of the H274Y mutation, which confers oseltamivir resistance on H1N1 influenza viruses, simultaneously. In this study, LiPA to identify influenza virus subtypes H1N1 (pandemic 2009 type and seasonal type), H3N2 and B, and to detect the H274Y mutation was developed, and evaluated the diagnostic capability using cultured virus isolates as well as nasal swabs obtained from patients suspected of being infected with influenza. In analyzing 354 cultured virus isolates, this LiPA showed 100% specificity in virus typing and 99% specificity in detecting the H274Y mutation. In analyzing 49 nasal swabs from a clinical study, this assay showed 100% specificity in virus typing and 88% specificity in absence of the H274Y mutation although H274Y viruses positive swab based on PCR were not able to be obtained in the clinical study. Thus LiPA for influenza viruses may be used to monitor viral trends during the influenza season.

2. Determination of emerging pathogen, *Helicobacter cinaedi*: *H. cinaedi* is an emerging pathogen, which is increasingly reported to cause bacteremia in patients with malignancy. We report the completely annotated genome sequence of *H. cinaedi*. The genome sequence will provide new insights into the diagnosis, pathogenic mechanisms, and drug resistance of *H. cinaedi*.

3. Complete Annotated Genome Sequence of Mycobacterium tuberculosis Erdman: *Mycobacterium tuberculosis* strain Erdman was isolated from human sputum by William H. Feldman in 1945, at Mayo Clinic, Rochester, MN, and deposited with the Trudeau Mycobacterium Culture Collection in 1946. There is no description of the naming of "Erdman" in reference 7. Due to its consistently high virulence, it has been widely used as a standard virulent laboratory strain for virulence and immunization studies. We report the completely annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman (TMC 107; ATCC 35801), which is a well-known laboratory strain of *M. tuberculosis*.

4. Genome Sequence of *Streptococcus pyogenes* M1 476: *S. pyogenes* is a causative pathogen of life-threatening Streptococcal toxic shock syndrome (STSS). Lancefield M1 type of *S. pyogenes* is frequently isolated from STSS cases. We report the completely annotated genome sequence of M1 476 strain isolated from a STSS patient in Japan.

5. Development of rapid detection kit for multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa*: Based on the genome sequence, which was reported previously, we prepared rapid detection kit for the AAC(6')-Ib, which is a dominant determinant of aminoglycoside resistance in Japan.

Researchers には、分担研究者を記載する。

6. Discrimination of influenza A subtype by antibodies recognizing host-specific amino acids in the viral nucleoprotein.: BACKGROUND:Nucleoprotein (NP) of influenza viruses is utilized to differentiate between the A, B, and C viral serotypes. The availability of influenza genome sequence data has allowed us to identify specific amino acids at particular positions in viral proteins, including NP, known as "signature residues," which can be used to discriminate human influenza A viruses from H5N1 highly pathogenic avian influenza in human cases (HPAI) and pandemic H1N1(2009) (H1N1/2009) viruses. METHODS: Screening and epitope mapping of monoclonal antibodies (mAb) against NP of influenza A, which reacted differently with NP from human influenza A virus from HPAI and H1N1/2009 A virus. To identify the epitope(s) responsible for the discrimination of viral NP by mAbs, we prepared mutant NP proteins in the 293 cell expression system because some of the mAbs reacted with non-linear epitopes. RESULTS AND CONCLUSIONS: In the present study, we identified 3 mAbs. The results of epitope mapping showed that the epitopes were located at the signature residues. These results indicated that signature residues of NP could discriminate influenza A viruses from different origin.

7. Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of AAC(6')-Ib-producing *Pseudomonas aeruginosa*.: To detect aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase-Ib [AAC(6')-Ib]-producing, *Pseudomonas aeruginosa* isolates which are a frequent cause of nosocomial infections in Japan, an immunochromatographic assay was developed using two kinds of monoclonal antibodies (mAbs) recognizing AAC(6')-Ib. The results of the assessment were fully consistent with those of aac(6')-Ib PCR analyses.

8. IMP-43 and IMP-44 metallo- β -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.: Two novel IMP-type metallo- β -lactamase variants, IMP-43 and IMP-44, were identified in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained in medical settings in Japan. Analysis of their predicted amino acid sequences revealed that IMP-43 had an amino acid substitution (Val67Phe) compared with IMP-7 and that IMP-44 had two substitutions (Val67Phe and Phe87Ser) compared with IMP-11. The amino acid residue at position 67 is located at the end of a loop close to the active site, consisting of residues 60 to 66 in IMP-1, and the amino acid residue at position 87 forms a hydrophobic patch close to the active site with other amino acids. An *Escherichia coli* strain expressing blaIMP-43 was more resistant to doripenem and meropenem but not to imipenem than one expressing blaIMP-7. An *E. coli* strain expressing blaIMP-44 was more resistant to doripenem, imipenem and meropenem than one expressing blaIMP-11. IMP-43 had more efficient catalytic activities against all three carbapenems than IMP-7, indicating that the Val67Phe substitution contributed to increased catalytic activities against carbapenems. IMP-44 had more efficient catalytic activities against all carbapenems tested than IMP-11, as well as increased activities compared with IMP-43, indicating that both the Val67Phe and Phe87Ser substitutions contributed to increased catalytic activities against carbapenems.

9. Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167 carrying Lancefield group C antigen and comparative genomics of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains.: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) is an emerging human pathogen

that causes life-threatening invasive infections such as streptococcal toxic shock syndrome. Recent epidemiological studies reveal that invasive SDSE infections have been increasing in Asia, Europe, and the United States. Almost all SDSE carry Lancefield group G or C antigen. We have determined the complete genome sequence of a human group C SDSE 167 strain. A comparison of its sequence with that of four SDSE strains, three in Lancefield group G and one in Lancefield group A, showed approximately 90% coverage. Most regions showing little or no homology were located in the prophages. There was no evidence of massive rearrangement in the genome of SDSE 167. Bayesian phylogeny using entire genome sequences showed that the most recent common ancestor of the five SDSE strains appeared 446 years ago. Interestingly, we found that SDSE 167 harbors sugar metabolizing enzymes in a unique region and streptodornase in the phage region, which presumably contribute to the degradation of host tissues and the prompted covRS mutation, respectively. A comparison of these five SDSE strains, which differ in Lancefield group antigens, revealed a gene cluster presumably responsible for the synthesis of the antigenic determinant. These results may provide the basis for molecular epidemiological research of SDSE.

10. Biochemical Analysis of Metallo- β -Lactamase NDM-3 from a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Isolated in Japan: New Delhi metallo- β -lactamase-3 (NDM-3) was identified in a multidrug-resistant *Escherichia coli* isolate, NCGM77, obtained from the feces of a patient in Japan. The enzymatic activities of NDM-3 against β -lactams were similar to those of NDM-1, although NDM-3 showed slightly lower k_{cat}/K_m ratios for all the β -lactams tested except for doripenem. The genetic context for blaNDM-3 was *tnpA-blaNDM-3-bleMBL-trpF-dsbC-tnpA-sulI-qacEdeltaI-aadA2-dfrA1*, which was present on an approximately 250-kb plasmid.

11. Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in a Large Tertiary Care Hospital in Japan: IMP-type metallo- β -lactamase enzymes have been reported in different geographical areas and in various Gram-negative bacteria. However, the risk factors and epidemiology pertaining to IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* (IMP-producing *E. cloacae*) have not been systematically evaluated. We conducted a retrospective, matched case-control study of patients from whom IMP-producing *E. cloacae* isolates were obtained, in addition to performing thorough molecular analyses of the clinically obtained IMP-producing *E. cloacae* isolates. Unique cases with IMP-producing *E. cloacae* isolation were included. Patients with IMP-producing *E. cloacae* were matched to uninfected controls at a ratio of 1 to 3. Fifteen IMP-producing *E. cloacae* cases were identified, with five of the isolates being obtained from blood, and they were matched to 45 uninfected controls. All (100%) patients from whom IMP-producing *E. cloacae* isolates were obtained had indwelling devices at the time of isolation, compared with one (2.2%) uninfected control. Independent predictors for isolation of IMP-producing *E. cloacae* were identified as cephalosporin exposure and invasive procedures within 3 months. Although in-hospital mortality rates were similar between cases and controls (14.3% versus 13.3%), the in-hospital mortality of patients with IMP-producing *E. cloacae*-caused bacteremia was significantly higher (40%) than the rate in controls. IMP-producing *E. cloacae* isolates were frequently positive for other resistance

determinants. The MICs of meropenem and imipenem were not elevated; 10 (67%) and 12 (80%) of the 15 IMP-producing *E. cloacae* isolates had a MIC of ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$. A phylogenetic tree showed a close relationship among the IMP-producing *E. cloacae* samples. Indwelling devices, exposure to cephalosporin, and a history of invasive procedures were associated with isolation of IMP-producing *E. cloacae*. Screening for carbapenemase production is important in order to apply appropriate clinical management and infection control measures.

研究の目的

臨床現場(診療室レベル)での感染症診断への遺伝子診断の導入による高精度化および新規抗原検査法の導入

現状:

- ・抗原検査法:簡便であるが低感度。
- ・遺伝子増幅法:高感度だが煩雑。



遺伝子診断法の問題点

- ・病原体遺伝子分離が必要。
- ・専門家が必要。
- ・専用装置が必要

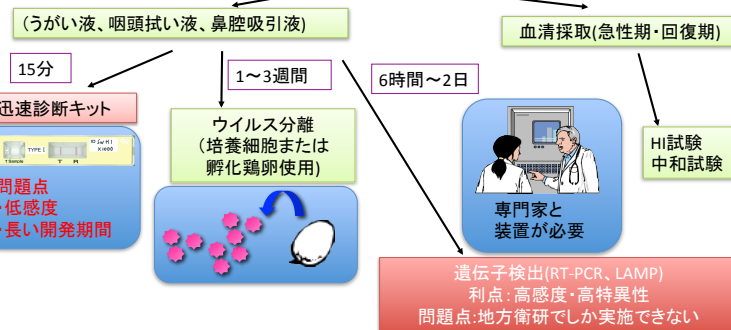
(地方衛研レベルでしか実施できない)



計画:モデルとしてインフルエンザのタミフル耐性の遺伝子増幅による迅速診断法の臨床現場への導入を目指す。また遺伝子診断法の基礎となる重要病原体の全ゲノム情報解析を実施し、その成果を元に重要病原体迅速診断法を開発する。

感染症診断の現状 (インフルエンザを例に)

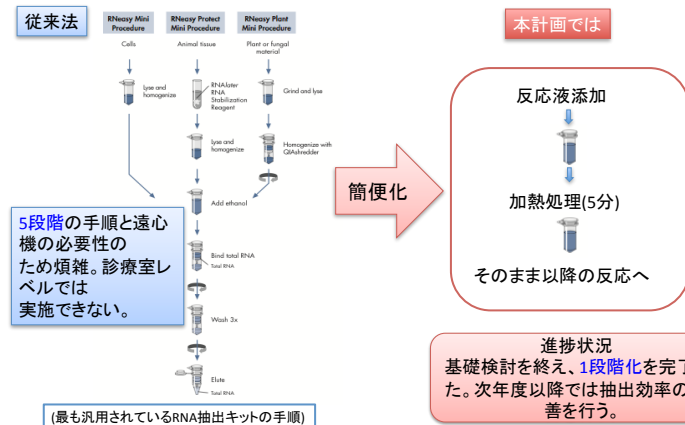
インフルエンザ様疾患患者



感染症診断における遺伝子増幅法導入の障害・問題点

1. 検体からの病原体遺伝子抽出操作の煩雑さ
(インフルエンザのようなRNAゲノムを持つ病原体の場合にはより困難)
2. 遺伝子増幅反応の煩雑さ
(インフルエンザのようなRNAゲノムの病原体では通常の増幅操作に加えてRNAをDNAに変換する逆転写反応も必要となる)
3. 高価な遺伝子増幅装置の必要性
4. 増幅遺伝子解析用の装置・器具の必要性
(地方衛研レベルでしか実施できない)
5. これら全体に由来する低い即時性
→遺伝子増幅法に基づく診断法を臨床現場に導入するためには、これら各項目を個別に簡便化・迅速化する必要がある。

研究計画と進捗(1) 検体からの病原体遺伝子抽出操作の簡便化



研究計画と進捗(2) 遺伝子増幅反応の簡便化

従来法

1. RNAをDNAに変換する逆転写反応:
2時間
2. 得られたDNAのPCR法による増幅
94°C, 2分
94°C, 20秒
55°C, 20秒
72°C, 2分
2時間

合計4時間

2回の反応が必要な上に反応液の調整が必要で時間もかかる。

本計画では

1. 逆転写反応とPCRの一体化
2. 高速反応PCR酵素の利用
3. 非対称PCRによるDNA標識

94°C, 4秒
94°C, 5秒
55°C, 5秒
72°C, 10秒

}30回

:20分

簡便化

進捗状況

1. ウイルス亜型特異的なプライマーの設計: 各亜型ごとに約100株の分離ウイルス株で正確な増幅を確認。
2. 遺伝子増幅: 反応時間を30分台に短縮完了。次年度以降では標識法の検討を行う。

研究計画と進捗(3) 増幅遺伝子解析法簡便化

従来法

遺伝子変異解析には

1. DNAシーケンサ
2. または電気泳動装置

が必要。

どちらも診療室レベルでの実施は事実上不可能

本計画では

ラインプローブ法で変異検出

PCRで増幅および標識した変異遺伝子の変異をスリットに結合させたプローブとのハイブリダイゼーションで検出

ラインプローブ法はすでに結核薬剤耐性検査で体外診断薬化されており、実績がある。

簡便化

進捗状況

プローブの設計と試作品製作を完了(国際特許出願済み)。臨床研究による評価を開始した。

変異	季節性 H3N2	季節性 H1N1	季節性 H1N1	新型 H3N2	新型 H1N1	新型 H1N1	新型 H1N1
フラック							
季節性 H3N2	■	■	■	■	■	■	■
季節性 H1N1	■	■	■	■	■	■	■
新型 H3N2	■	■	■	■	■	■	■
新型 H1N1	■	■	■	■	■	■	■
新型 H1N1	■	■	■	■	■	■	■
新型 H1N1	■	■	■	■	■	■	■

研究計画と進捗(4) タミフル耐性インフルエンザの人工遺伝子による評価系の構築

従来は

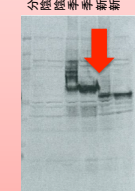
耐性判定法の評価にはタミフル耐性となった遺伝子を持つインフルエンザが必要。

→しかし実際にはすべての変異ウイルスをリアルタイムで入手することは困難。

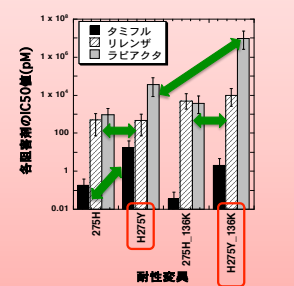
そこでデータベースを活用し、予め構築しておいたタミフル耐性に寄与する遺伝子の発現系に耐性変異を導入して、評価に必要な変異型遺伝子を手にする。

進捗状況

1. 人工遺伝子を利用した季節性、AH1pdm、B型の発現系の構築完了
2. 発現蛋白質への変異導入法の確立と活性測定系の確立を完了した



分子番号
 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100



各種菌株のIC50値(μM)

■ タミフル
□ リレンザ
▨ ラビアクタ

耐性変異

期待される成果


- タミフル耐性インフルエンザの迅速診断法の開発。
- 同様の手法はアマンタジンやリレンザ、さらにはこれから認可される他の抗インフルエンザ薬に対するインフルエンザの耐性化診断にも応用できる。
- さらに、最終的には感染症の遺伝子増幅に基づく診断法の臨床現場(診療室レベル)への導入を可能とする。

予定している判定ストリップの構成

インフルエンザ感染判定

タミフル耐性判定

Pdm H1N1 H3N2 B



1枚のストリップでインフルエンザ感染とタミフル耐性を判定

研究計画と進捗(5)

インフルエンザA型ウイルス亜型を識別可能なモノクローナル抗体

従来は

- インフルエンザNP蛋白質に対する抗体は、A型、B型インフルエンザの識別において、実績があり、臨床現場で応用されている。しかしこれらの抗体ではA型ウイルス内の亜型の識別はできなかった。

今回、A型ウイルスの亜型を識別可能な抗体を得ることができたので、その認識エピソードを詳細に解析した。

A型インフルエンザ亜型に固有のNP蛋白質内アミノ酸残基

Signature amino acids	Human	H1N1	H2N2	H3N1	H1N1/2009	Accessibility prediction
Position	Residues					
Specific for human HPAI						
33	V	0/372	0/252	14/14	0/542	Poor
100	R	0/372	0/252	14/14	0/542	Poor
136	L	0/372	0/252	14/14	0/542	Poor
305	R	0/372	0/252	14/14	0/542	Good
357	Q	0/372	0/252	14/14	0/542	Good
Specific for H1N1/2009						
21	D	0/372	1/252	0/14	542/542	Good
53	D	0/372	0/252	0/14	542/542	Good
190	A	0/372	1/252	0/14	542/542	Poor
313	V	0/372	0/252	0/14	542/542	Good
316	M	0/372	0/252	0/14	542/542	Good
350	K	0/372	1/252	0/14	542/542	Poor
371	V	0/372	1/252	0/14	542/542	Good
433	N	0/372	1/252	0/14	542/542	Good
456	L	0/372	1/252	0/14	542/542	Poor

A total of 1182 of NP sequence (372, 252, 14, and 542 of human H1N1, H2N2, HPAI in human cases, and H1N1/2009 registered as human cases at Influenza Virus Resources at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>)) were analyzed to identify signature amino acids that distinguish human influenza viruses from HPAI and H1N1/2009 viruses. Prediction of the signature residues is based on the quaternary structure of the NP proteins.

解析したモノクローナル抗体はこれらのアミノ酸を認識していることを組み換え蛋白質やペプチドに対する反応性実験で証明した。

研究計画と進捗(6)

Lancefield C型抗原を持つレンサ球菌であるStreptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis 167の全ゲノム配列

従来は

- S. dysgalactiae subsp. equisimilis(SDSE)は近年、ヒト無菌部からの分離が増加し、菌血症などの原因となることが明らかになってきた細菌である。SDSEにはC型とG型の血清型が知られているが、前者保有菌の完全ゲノム配列は明らかになっていなかった。

今回、C型抗原を持つSDSE 167株の完全ゲノム配列を解明すると共に、C型抗原合成の責任遺伝子と考えられる遺伝子群を同定した。

SDSE167株の全ゲノム構造

167とG型抗原を持つSDSEのゲノムアレランジメントマップ

ベイス法を用いた系統樹解析では現在のSDSEは約500年前に共通祖先から分岐したものと推定された。

イムノクロマト法によるAAC(6')-lae検出手順

Step 1

寒天培地で培養されたコロニーを綿棒でピックアップ

Step 2

界面活性剤を含む抽出液を用いて、抽出チューブ内で化学的かつ物理的に溶菌

Step 3

クロマトグラフィーに滴下して判定を待つ

特別な装置を必要とせず、細菌コロニー1個で検出可能なことが大きな利点である

研究成果(論文発表)

- Dissemination in Japan of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib. Tojo M, Tada T, Shimojima M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Ohmagari N. J Infect Chemother. S1341-3213(14)00180-9. 2014
- Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacter cloacae in a Large Tertiary Care Hospital in Japan. Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Kubota S, Takeshita N, Kusano S, Tojo M, Ohmagari N. Antimicrob Agents Chemother. 58(6):3441-3450 2014
- Biochemical Analysis of Metallo- β -Lactamase NDM-3 from a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Isolated in Japan. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Kirikae T. Antimicrob Agents Chemother. 58(6):3538-3540 2014
- Dissemination of 16S rRNA methylase *Arma*-producing acinetobacter baumannii and emergence of OXA-72 carbapenemase coproducers in Japan. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. Antimicrob Agents Chemother. 58(5):2916-20 2014
- Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (*Arma*, *Rmc* and *Rmf*) in Nepal. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, Kirikae T, Pokhrel BM. Int J Antimicrob Agents. 42(4):372-4 2013
- Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167 carrying Lancefield group C antigen, and comparative genomics of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains. Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Genome Biol Evol. PMID: 23938808 2013
- Concomitant Regulation of Host Tissue-Destroying Virulence Factors and Carbohydrate Metabolism During Invasive Diseases Induced by Group G *Streptococcus*. Watanabe S, Shimomura Y, Ushikata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. J Infect Dis. 208(9):1482-1493 2013
- IMP-43 and IMP-44 Metallo- β -Lactamases with Increased Carbapenemase Activities in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. Antimicrob Agents Chemother. 57(9):1427-32 2013
- Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of Enterobacter cloacae. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. PLoS One. 8(6):e66358 2013
- Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh ND, Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu LT, Son NT, Kirikae T. BMC Infect Dis. 13(1):251. 2013
- NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM. Antimicrob Agents Chemother. 57(5):2394-6 2013
- Novel 6'-n-aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. Antimicrob Agents Chemother. 57(1):96-100 2013
- Complete genome sequence of *Helicobacter cinaedi* type strain ATCC BAA-847. Miyoshi-Akiyama T, Takeshita N, Ohmagari N, Kirikae T. J Bacteriol. 194(20):5652-2012
- Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167, isolated from a patient with streptococcal toxic shock syndrome. Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T. J Bacteriol. 194(19):5456. 2012
- Monitoring of S protein maturation in the endoplasmic reticulum by calnexin is important for the infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Fukushi M, Yoshinaka Y, Matsushita Y, Hatakeyama S, Ishizaka Y, Kirikae T, Sasazuki T, Miyoshi-Akiyama T. J Virol. 86(21):11745-53 2012
- Laminin α 1 octanolate and artificial surfactant combination therapy significantly increases survival of mice infected with lethal influenza H1N1 virus. Fukushi M, Yamashita M, Miyoshi-Akiyama T, Kubo S, Yamamoto K, Kudo T. PLoS One. 7(8):e3419. 2012
- Development and evaluation of a line probe assay for rapid typing of influenza viruses and detection of the H274Y mutation. Miyoshi-Akiyama T, Akasaka Y, Ogane T, Kondo Y, Matsushita T, Funatogawa K, Kirikae T. J Virol Methods. 185(2):176-80. 2012
- Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of AAC(6')-Ib-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kitao T, Shimada K, Kirikae T. J Microbiol Methods. 91(1):11-18 2012
- Complete annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. Miyoshi-Akiyama T, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Kirikae T. J Bacteriol. 194(10):2770 2012
- Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Int J Antimicrob Agents. 39(6):518-21 2012
- Discrimination of influenza A subtype by antibodies recognizing host-specific amino acids in the viral nucleoprotein. Miyoshi-Akiyama T, Yamashiro T, Mai le Q, Narahara K, Miyamoto A, Shinagawa S, Mori S, Kitajima H, Kirikae T. Influenza Other Respi Viruses 6(6):434-41 2012

研究成果(学会発表・特許出願)

学会発表

1. 切替 照雄, 多田 達哉, 秋山 徹: 日本の医療施設で分離される多剤耐性アンストパクターバクテリオファージの分子疫学解析. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日～28日
2. 多田 達哉, 秋山 徹, 切替 照雄: 日本の医療施設で分離された IMP-43 および IMP-44 産生多剤耐性緑膿菌. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日～28日
3. 安藤 弘樹, 秋山 徹, 渡邊 真弥, 切替 照雄: A silent mutation in mabA confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日～28日
4. 加藤 雅子, 秋山 徹, 小林 慎之, 切替 照雄: Whole genome sequencing analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from residents in Tokyo. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日～28日
5. 渡邊 真弥, 切替 照雄, 秋山 徹: Lancefield C 群抗原を保有する *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 167 株の完全ゲノム配列. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日～28日
6. 久保田 真直, 高野 ルミ, 真井 雅志, 秋山 徹, 平栗 明美: 都内において分離された多剤耐性緑膿菌(院内感染由来株)の分子疫学解析. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26日～28日
7. 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山徹: G群レンサ球菌による創傷型レンサ球菌感染症発症機構の解明. 第7回細菌学基手コロッセウム, 2013年8月7日～8日, 広島県三原市.
8. 渡邊真弥, 切替照雄, 秋山徹: マウス感染モデルを用いたG群レンサ球菌の二成分制御因子CvIR5の解明. 第22回Lancefieldレンサ球菌研究会, 2013年6月28日～29日, 東京.
9. Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Transcriptomic profiling of group G *Streptococci* using a murine infection model. 113th General Meeting of American Society for Microbiology, Denver, Colorado, USA, May 18-21, 2013.
10. 渡邊真弥, 祝弘樹, 船渡川圭次, 齋島由二, 奥村香世, 加藤雅子, 橋本繁仁, 切替富美子, 秋山徹, 切替照雄: A mutation in the decoding region of 16S rRNA attenuates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. 第86回日本細菌学会総会, 2013年3月18日～20日, 千葉市.
11. 秋山徹, 多田達哉, 切替照雄: 緑膿菌における高度多剤耐性遺伝子の出現と伝播. 第86回日本細菌学会総会, 2013年3月18日～20日, 千葉市.
12. 多田達哉, 秋山徹, 切替照雄: 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の分子疫学解析. 第86回日本細菌学会総会, P8-178, 2013年3月18日～20日, 千葉市.
13. 切替照雄, 安藤弘樹, 加藤正子, 秋山徹: イナムド耐性に関する遺伝子変異に関する実験解析. 第85回実験疫病研究会総会, 2013年3月27日, 千葉市.
14. Otmagari N, Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Kato Y, Takehita N, Kirikae T, Mong W U, Phuong D M, Thu T A, Binh N G, Binh N G, Anh N Q, Nga T T T, Tuong P H, Xuan P T, Thu T A, Son N T: Emergence of 16S rRNA methylase-producing gram-negative pathogens in medical setting in Vietnam. Asian-African Resarch Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, January 23, Tokyo, Japan, 2013.
15. Kirikae T, Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal R K, Sah M K, Ohara H, Pokhel B M.: Emergence of 16S rRNA methallo-beta-lactamase producing nosocomial pathogens in a hospital in Nepal. Joint Conference on Infectious Diseases with Growing Concern in Recent Years in Nepal, Kathmandu, Nepal, January 18, 2013.
16. 多田達哉, 秋山徹, 島田佳世, 切替照雄: 医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の解明. 第41回薬剤学基研研究会, 2012年10月25日, 下呂市. 抄録集P-17.
17. 齋島正浩, 小川典規, 根人知宏, 田中雅士, 船原謙次, 秋山徹, 切替照雄: クイックメチサイラー-lae+IMPを用いた腸内細菌におけるIMP型metallo-β-lactamaseの迅速測定. 第24回臨床微生物迅速診断研究会総会, 2012年5月19日, 仙台.
18. 秋山徹, 生方公子, 切替照雄: 産産型緑膿菌感染症のマウスモデルにおける宿主因子の発現解析. 第83回日本細菌学会総会, 2012年3月28-29日, 長崎.
19. 齋島弘弘, 秋山徹, 切替照雄: 全国レベルにおける多剤耐性緑膿菌検出状況. 第27回日本環境感染学会総会, 2012年2月3日, 福岡.
20. T. Kato-Ando, T. Miyoshi-Akiyama, M. Tanaka, K. Narahara, M. Shimozono, T. Kirikae: Immunological detection system for bacteria producing metallo-β-lactamase IMP. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 6-10, 2011, Sapporo, JAPAN
21. T. Miyoshi-Akiyama: Rapid diagnosis test for multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing AAC(6')-Iae, AAC(6')-Ib and IMPs. The 7th International Conference on Nosocomial Infection Control, December 23, 2011, Hanoi, Vietnam.

特許出願

1. 出願番号: PCT/JP2011/067761A

発明の名称: 新型インフルエンザウイルスのタイプIIとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法および試料管

出願日: 2012/2/28

2. 出願番号: 特願2013-181767

発明の名称: 抗16S-rRNAメチラーゼ抗体, 並びに, アミノグリコシド系抗生剤耐性菌検出方法及びキット

出願日: 2013/3/3

3. 出願番号: 特願2013-138645

発明の名称: 結核菌の菌株の同定方法及び遺伝子変異の検出方法

出願日: 2013/6/28

課題番号 : 23指301
研究課題名 : インフルエンザ等の薬剤耐性の迅速診断法の開発
主任研究者名 : 秋山 徹
分担研究者名 : 秋山 徹

キーワード : インフルエンザ、タミフル耐性、迅速診断、病原体ゲノム
研究成果 :

本研究ではタミフル耐性インフルエンザの耐性に寄与する変異を検出する遺伝子解析法を臨床現場で利用可能とするための基礎研究および開発研究を実施する。また病原体の遺伝学的検査の基盤となる病原体ゲノム情報を収集・解析する。

インフルエンザのタミフル耐性の遺伝子診断法開発

増幅遺伝子解析法の簡便化：タミフル耐性などの遺伝子変異の解析にはDNAシーケンサなどの高度な装置が必要であり、診療室では実施できない。そこで結核の薬剤耐性診断に使用されているラインプローブ法を利用する。ラインプローブ法では複数の変異を一つのスリットで解析できるので、インフルエンザの抗インフルエンザ薬耐性のタイプが変化した場合でも、容易に対応可能であるという大きな利点がある。ラインプローブ法をさらに簡便化するため、非対称PCRでのPCR増幅時の産物標識の一体化、およびスリットにサンプルを滴下するだけで解析可能とするように反応と解析条件の最適化を行った。増幅遺伝子解析法の簡便化：インフルエンザの抗インフルエンザ薬耐性に寄与する遺伝子変異を検出するためのプローブを実装したラインプローブを作製する。当面タミフル耐性に焦点をあてて必要なプローブの設計とラインプローブへの搭載を行った。本プローブを使用し、国際医療研究センターの小児科との臨床研究により、インフルエンザ亜型とタミフル耐性の有無の検出における、その有用性を検証した (Miyoshi-Akiyama T, Akasaka Y, Oogane T, Kondo Y, Matsushita T, Funatogawa K, Kirikae T. *J Virol Methods*. 2012 Nov; 185 (2) : 276-80)。

2) タミフル耐性インフルエンザの人工遺伝子による評価系の構築：タミフルなどの耐性判定の遺伝子診断には、当該変異を持つ病原体が必要となる。しかしそれらのウイルスをリアルタイムで入手することは困難である。そこで本計画ではデータベースに登録される変異情報を活用し、予め構築しておいたタミフル耐性に関与する遺伝子 (ノイラミニダーゼ遺伝子) の発現系にて、変異情報を組み込んだ変異体を発現させる系を構築する。これにより、ウイルス本体に頼らない評価系を構築した。タミフル耐性インフルエンザの人工遺伝子による評価系：タミフル耐性の評価が必要と考えられる季節性のH1N1インフルエンザおよびH3N2インフルエンザ、さらに新型のH1N1インフルエンザについて、それぞれのノイラミニダーゼ遺伝子をクローニングし、発現系を構築した。

病原体ゲノム情報の収集・解析

1. インフルエンザ以外の薬剤耐性が問題となっている新興感染症の病原体および診断が困難な病原体について次世代シーケンサを活用し、ゲノム情報を収集する。新興感

染症として、*Helicobacter cinaedi*の全ゲノム情報を解析し、論文発表した (Miyoshi-Akiyama T, Takeshita N, Ohmagari N, Kirikae T. *J Bacteriol.* 194 (20) : 5692, 2012)。

2. 国内で流行している高度多剤耐性緑膿菌と結核菌の全ゲノム配列の解析を行った。劇症型レンサ球菌感染症患者より分類された流行型のM1型菌であるM1 GAS 476株の全ゲノム配列を明らかにし、論文化した。(Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T. *J Bacteriol.* 194 (19) : 5466. 2012)。
3. これまでほとんど国内では症例が報告されていなかったIMP型メタロ-β-ラクタマーゼを保有した*Enterobacter cloacae*について、その多発事例を見だし、全ゲノム解析を元に、多発事例と孤発例の識別を行った (Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Kubota S, Takeshita N, Kutsuna S, Tojo M, Ohmagari N. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jun; 58 (6) : 3441-3450.)。
4. 劇症型レンサ球菌感染症の原因菌の一つであり、これまで全ゲノム構造が明らかにされていなかったLancefield血清型C群のレンサ球菌の全ゲノム配列を世界に先駆けて明らかにした (Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. *Genome Biol Evol.* 2013; 5 (9) : 1644-51. doi: 10.1093/gbe/evt117.)
5. A型インフルエンザウイルスの亜型を識別可能なモノクローナル抗体について、それらの反応エピトープを解析し、識別の基盤となっている機構を明らかにした (Miyoshi-Akiyama T, Yamashiro T, Maile Q, Narahara K, Miyamoto A, Shinagawa S, Mori S, Kitajima H, Kirikae T. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012 Nov; 6 (6) : 434-41.)

課題番号 : 23指301
研究課題名 : インフルエンザ等の薬剤耐性の迅速診断法の開発
主任研究者名 : 秋山 徹
分担研究者名 : 切替 照雄

キーワード : インフルエンザ、タミフル耐性、迅速診断、病原体ゲノム
研究成果 :

本研究ではタミフル耐性インフルエンザの耐性に寄与する変異を検出する遺伝子解析法を臨床現場で利用可能とするための基礎研究および開発研究を実施する。また病原体の遺伝学的検査の基盤となる病原体ゲノム情報を収集・解析する。同知見を元に重要感染症病原体の迅速診断法を開発する。

インフルエンザのタミフル耐性の遺伝子診断法開発

本研究で対象となるインフルエンザのタミフル耐性の遺伝子診断法開発には、耐性および感受性のインフルエンザ遺伝子の準備が必要である。これに加えて、遺伝子診断法の臨床現場への導入を困難にしている1) 検体からの病原体遺伝子抽出、2) 遺伝子増幅反応実施の各課題を解決する必要があった。以下ではこれらの解決についての成果を順に記述する。

1) 検体からの病原体遺伝子抽出操作の簡便化: 現在のインフルエンザ遺伝子解析では、検体からのインフルエンザ遺伝子抽出に専用のキットを使用する必要がある。このキットではカラムに病原体遺伝子を吸着後、複数の溶液で遠心機を使用して洗浄し、さらに遺伝子を回収するという複雑な工程が必要となる。しかしながらこの工程を簡略化し、熱処理のみで以降の遺伝子増幅反応を行うことが技術的に可能となっている。この技術は以降の遺伝子増幅反応を妨害する検体中の物質を抑制する特殊な緩衝液で、1段階のみの前処理を行い直接検体とする方法である。本計画では、この技術をインフルエンザ検体調整用に最適化した。検体からの病原体遺伝子抽出の簡便化: 予備的試験を実施し、加熱法による検体処理での遺伝子増幅反応への適用性を検証する。すでに他のRNAウイルスで構築されている類似法を元に、条件の最適化を行い、1段階法での抽出が可能であることを確認した。

2) 遺伝子増幅反応の簡便化: 現在のインフルエンザ遺伝子増幅反応ではRNAをDNAに変換する逆転写反応と、その後のPCR法によるDNA増幅に、専用の温度制御装置が必要であり、この反応は通常数時間を要する。これらの装置は比較的高価だったが現在では数十万円程度で入手可能となっており、臨床現場への導入は容易になってきている。本研究では、増幅反応時間を短縮するため、逆転写反応とPCR法を連続的に実施し、さらに反応が短時間で終結する高速反応酵素を採用して、数時間だった反応時間を最終的には20分程度に短縮する。これらの高速反応酵素はいくつかが製品化されており、インフルエンザ遺伝子増幅に最適な酵素の選定とさらなる最適化を実施した。遺伝子増幅反応の簡便化: すでに市販されているいくつかの高速増幅酵素のそれぞれの特性を検証し、インフルエンザの耐性遺伝子増幅に最適な酵素の選抜を行った。本手法により従来2~6時間程度を要していた反応時間を30分未満に短縮できた。

重要感染症病原体の迅速診断法の開発

1. 昨年度まで実施した高度多剤耐性緑膿菌ゲノム解析の成果を元に、同菌耐性因子を標的としたイムノクロマト法を構築し、研究用試薬として実用化し、論文発表した (K i t a o T, T a d a T, T a n a k a M, N a r a h a r a K, S h i m o j i m a M, S h i m a d a K, M i y o s h i - A k i y a m a T, K i r i k a e T. *I n t J A n t i m i c r o b A g e n t s*. 39 (6) : 518-21, 2012, T a d a T, M i y o s h i - A k i y a m a T, T a n a k a M, N a r a h a r a K, S h i m o j i m a M, K i t a o T, S h i m a d a K, K i r i k a e T. *J M i c r o b i o l M e t h o d s*. 2012 O c t ; 91 (1) : 114-6.)。
2. 本イムノクロマト法の有用性を、2011年～2012年に大手臨床検査センターで分離された多剤耐性緑膿菌の疫学研究にて検証し、IMP、AAC (6') -I a e または AAC (6') -I b を保有する多剤耐性緑膿菌の割合が、多剤耐性緑膿菌の約80%二相等することを明らかにした (T o j o M, T a d a T, S h i m o j i m a M, T a n a k a M, N a r a h a r a K, M i y o s h i - A k i y a m a T, K i r i k a e T, O h m a g a r i N. *J I n f e c t C h e m o t h e r*. 2014 J u n 5. p i i : S1341-321X (14) 00180-9. doi: 10.1016/j.jiac.2014.04.014.)。
3. これまで国内でほとんど発生例が報告されていないニューデリー型メタロβラクタマーゼ (NDM) のうちNDM-3型を保有する大腸菌を臨床現場で分離し、全ゲノム解析などを用いて、その特徴付けを行った (T a d a T, M i y o s h i - A k i y a m a T, S h i m a d a K, K i r i k a e T. *A n t i m i c r o b A g e n t s C h e m o t h e r*. 2014 J u n ; 58 (6) : 3538-3540.)。
4. 多剤耐性緑膿菌の疫学解析中に、カルバペネムへの耐性度が上昇した、新型のIMP型メタロβラクタマーゼを保有する菌株を同定し、同酵素の酵素学的解析を実施した (T a d a T, M i y o s h i - A k i y a m a T, S h i m a d a K, S h i m o j i m a M, K i r i k a e T. *A n t i m i c r o b A g e n t s C h e m o t h e r*. 2013 S e p ; 57 (9) : 4427-32.)。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：23指301

研究課題名：インフルエンザ等の薬剤耐性の迅速診断法の開発

主任研究者名：秋山 徹

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Dissemination in Japan of multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib.	Tojo M, Tada T, Shimojima M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Ohmagari N.	J Infect Chemother.	S1341-321X(14)00180-9.	2014
Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacter cloacae in a Large Tertiary Care Hospital in Japan.	Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Kubota S, Takeshita N, Kutsuna S, Tojo M, Ohmagari N.	Antimicrob Agents Chemother.	58(6):3441-3450	2014
Biochemical Analysis of Metallo- β -Lactamase NDM-3 from a Multidrug-Resistant <i>Escherichia coli</i> Strain Isolated in Japan.	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Kirikae T.	Antimicrob Agents Chemother.	58(6):3538-3540	2014
Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing acinetobacter baumannii and emergence of OXA-72 carbapenemase coproducers in Japan.	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T.	Antimicrob Agents Chemother	58(5):2916-20	2014
Dissemination of multidrug-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal.	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, Kirikae T, Pokhrel BM.	Int J Antimicrob Agents.	42(4):372-4	2013
Complete genome sequence of <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> 167 carrying Lancefield group C antigen, and comparative genomics of <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> strains.	Watanabe S, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T.	Genome Biol Evol.	PMID: 23918808	2013
Concomitant Regulation of Host Tissue-Destroying Virulence Factors and Carbohydrate Metabolism During Invasive Diseases Induced by Group G Streptococci.	Watanabe S, Shimomura Y, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T.	J Infect Dis.	208(9):1482-1493	2013
IMP-43 and IMP-44 Metallo- β -Lactamases with Increased Carbapenemase Activities in Multidrug-Resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T.	Antimicrob Agents Chemother.	57(9):4427-32	2013
Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of <i>Enterobacter cloacae</i> .	Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T.	PLoS One.	8(6):e66358	2013
Emergence of 16S rRNA methylase-producing <i>Acinetobacter baumannii</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates in hospitals in Vietnam	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ, Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu LT, Son NT, Kirikae T.	BMC Infect Dis.	13(1):251.	2013
NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant <i>Escherichia coli</i> strain isolated in Nepal.	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM.	Antimicrob Agents Chemother	57(5):2394-6	2013
novel 6'-n-aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a clinical isolate of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T.	Antimicrob Agents Chemother.	57(1):96-100	2013
Complete genome sequence of <i>Helicobacter cinaedi</i> type strain ATCC BAA-847.	Miyoshi-Akiyama T, Takeshita N, Ohmagari N, Kirikae T.	J Bacteriol.	194(20):5692	2012
Complete genome sequence of <i>Streptococcus pyogenes</i> M1 476, isolated from a patient with streptococcal toxic shock syndrome.	Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T.	J Bacteriol.	194(19):5466.	2012
Monitoring of S protein maturation in the endoplasmic reticulum by calnexin is important for the infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus.	Fukushi M, Yoshinaka Y, Matsuoka Y, Hatakeyama S, Ishizaka Y, Kirikae T, Sasazuki T, Miyoshi-Akiyama T.	J Virol.	86(21):11745-53	2012
Laninamivir octanoate and artificial surfactant combination therapy significantly increases survival of mice infected with lethal influenza H1N1 Virus.	Fukushi M, Yamashita M, Miyoshi-Akiyama T, Kubo S, Yamamoto K, Kudo K.	PLoS One.	7(8):e42419.	2012
Development and evaluation of a line probe assay for rapid typing of influenza viruses and detection of the H274Y mutation.	Miyoshi-Akiyama T, Akasaka Y, Oogane T, Kondo Y, Matsushita T, Funatogawa K, Kirikae T.	J Virol Methods.	185(2):276-80.	2012

研究発表及び特許取得報告について

Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of AAC(6)-Ib-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kitao T, Shimada K, Kirikae T.	J Microbiol Methods.	91(1):114-6	2012
Complete annotated genome sequence of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Erdman.	Miyoshi-Akiyama T, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Kirikae T.	J Bacteriol.	194(10):2770	2012
Emergence of a novel multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6)-Iae in Japan.	Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.	Int J Antimicrob Agents.	39(6):518-21	2012
Discrimination of influenza A subtype by antibodies recognizing host-specific amino acids in the viral nucleoprotein.	Miyoshi-Akiyama T, Yamashiro T, Mai le Q, Narahara K, Miyamoto A, Shinagawa S, Mori S, Kitajima H, Kirikae T.	Influenza Other Respi Viruses	6(6):434-41	2012

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当無し				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
新型インフルエンザウイルスのタイピングとオセルタミビルリン酸塩耐性変異の検出とを同時に行うための方法および試験片	PCT/JP2011/067761A	独立行政法人・国立国際医療研究センター、株式会社ニプロ	2012年2月26日	未定
抗16S rRNAメチラーゼ抗体、並びに、アミノグリコシド系抗生剤耐性菌検出方法及びキット	特願2013-181767	独立行政法人・国立国際医療研究センター	2013年9月3日	日本
結核菌の菌株の同定方法及び遺伝子変異の検出方法	特願2013-136645	独立行政法人・国立国際医療研究センター、株式会社ニプロ	2013年6月28日	日本

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。