

氏 名 まつい あつし
松井 篤

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 324 号

学位授与年月日 令和 2 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

**A Rapid ATP Bioluminescence-based Test for
Detecting Levofloxacin Resistance Starting from
Positive Blood Culture Bottles**

(陽性化した血液培養検体を直接使い、ATP生物発光
を基にした迅速レボフロキサシン感受性迅速試験の
開発)

論文審査委員

(主査)	教 授	山本 善裕
(副査)	教 授	岸 裕幸
(副査)	教 授	清水 忠道
(副査)	教 授	佐藤 勉
(指導教員)	教 授	戸邊 一之

論 文 要 旨

論 文 題 目

A Rapid ATP Bioluminescence-based Test for Detecting Levofloxacin

Resistance Starting from Positive Blood Culture Bottles

陽性化した血液培養検体を直接使い、ATP生物発光を基にした

レボフロキサシン感受性迅速試験の開発

氏 名 _____ 松井 篤 _____

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

〔目的〕

血液培養検体の薬剤感受性試験は、陽性後検体に含まれる細菌を平板培地で分離培養を行い、それで得られた分離株に対して行うのが一般的であるが、薬剤感受性試験迅速化のため近年では血液培養検体を直接用いた手法が開発されている。細菌増殖の検出には、濁度測定や顕微鏡的にコロニー形成を確認する手法が採用されている。一方で、アデノシン三リン酸（ATP）は全ての生物に共通のエネルギー分子であり、生菌内ATP量を経時的に測定することで濁度やコロニー形成による判定よりも更に鋭敏に細菌増殖を検出することが可能ではないかと考えた。ATP生物発光に基づく薬剤感受性試験そのものは、既に尿検体や単離株には応用されているが血液培養標本は今までの研究では対象となっていない。これは検体中の血球に含まれる細胞内ATP（background ATP）が生菌由来のATP量に比して歴大であり、感受性試験への影響が無視できないことによる。本研究では、この問題を解決し、ATP生物発光を基にした血液培養検体を直接用いる、抗菌薬感受性を検出するための鋭敏かつ迅速な方法を開発することである。


〔方法並びに成績〕

ATP生物発光に基づく迅速な方法は、4つの工程で構成される。①血液培養検体に含まれる血球成分を血清分離採血管で遠心分離（2000G，10分間）することで除去する，②得られた上清と分離剤上のペレットとなった細菌を均一化して培養液で30000倍に希釈し、遊離ATP除去目的にATP除去試薬を添加する，③抗菌薬とともに培養させ、一定時間ごとにサンプル採取を行って生菌内ATPをATP抽出試薬で抽出する，④抽出された生菌内ATPをATP生物発光で測定し、経時変化をプロットする。①～②の工程により、健常人血液による疑似陰性検体から得られた最終サンプル溶液10 μ Lあたりのbackground ATPは、10,000,000amolから100～400amolへと著明に低下させることが出来た。臨床検体15検体（12菌種）による検討において、本手法で得られたレボフロキサシンの発育阻止濃度は15検体中10検体で従来法の値と完全に一致し、特に発育速度の早いグラム陰性桿菌では最速で4時間での判定が可能であった。残りの5検体では従来法よりも高値であり、従来法よりも低値となった検体はなかった。また、追加検討で行った分離株による疑似陽性検体においても同様の傾向を認めた。これは、ATP生物発光を用いる分子生物学的な検出系は濁度やコロニー形成など物理的な検出系と比べてより高感度に細菌増殖を検出する、という仮説を支持している。また、この微細な変化は上述のbackground ATPの減少なくしては検出不可能であった。

〔総括〕

ATP生物発光を基にした血液培養検体を直接用いる薬剤感受性試験を開発し、従来法と比して鋭敏かつ迅速（最速4時間）な抗菌薬感受性判定を可能とした。今後は種々の抗菌薬で大規模検討を行い、実用化を目指す計画である。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	松井 篤
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教授	山本 善裕	
	(副査) 教授	清水 忠道	
	(副査) 教授	岸 裕幸	
指導 (紹介) 教員	教授	戸邊 一之	
(論文題目) A Rapid ATP Bioluminescence-based Test for Detecting Levofloxacin Resistance Starting from Positive Blood Culture Bottles (陽性化した血液培養検体を直接使い、ATP生物発光を基にしたレボフロキサシン感受性迅速試験の開発)			(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
〔目的〕			
<p>血液培養検体の薬剤感受性試験は、培養陽性後検体に含まれる細菌を平板培地で分離培養（二次培養）を行い、それで得られた分離株に対して行うのが一般的である。しかし近年では、薬剤感受性試験迅速化のため血液培養検体を直接用いた手法が開発されてきている。細菌増殖の検出には、従来より濁度測定や顕微鏡的にコロニー形成を確認する手法が採用されている。一方で、アデノシン三リン酸（ATP）は全ての生物に共通のエネルギー分子であり、生菌内ATP量を経時的に測定することで濁度やコロニー形成による判定よりも更に鋭敏に細菌増殖を検出することが可能ではないかと考えた。ATP生物発光に基づく薬剤感受性試験そのものは、既に尿検体や単離株には応用されているが血液培養陽性検体はこれまでの研究では対象となっていなかった。これは検体中の血球に含まれる細胞内ATP（background ATP）が生菌由来のATP量に比して歴大であり、感受性試験への影響が無視できないことによる。本研究では、この問題を解決し、ATP生物発光を基にした血液培養検体を直接用いる、抗菌薬感受性を検出するための鋭敏かつ迅速な方法を開発することである。</p>			
〔方法並びに成績〕			
<p>ATP生物発光に基づく迅速な方法は、4つの工程で構成される。①血液培養検体に含まれる血球成分を血清分離採血管で遠心分離（2000G, 10分間）することで除去する、②得られた上清と分離剤上のペレットとなった細菌を均一化して培養液で30,000倍に希釈し、遊離ATP除去目的に</p>			

ATP消去試薬を添加する、③抗菌薬とともに培養し、一定時間ごとにサンプル採取を行って生菌内ATPをATP抽出試薬で抽出する、④抽出された生菌内ATPをATP生物発光で測定し、経時的変化をプロットする。①～②の工程により、健康人血液による疑似陰性検体から得られた最終サンプル溶液10 μ Lあたりのbackground ATPは、10,000,000amolから100～400amolへと著明に低下させることが可能となった。血液培養陽性検体15検体(12菌種)による検討において、本手法で得られたレボフロキサシンの発育阻止濃度は15検体中10検体で従来法の値と完全に一致し、特に発育速度の早いグラム陰性桿菌では最速で4時間での判定が可能であった。残りの5検体では従来法よりも高値(抵抗性)であり、従来法よりも低値(感受性)となった検体はなかった。また、追加検討で行った分離株による疑似血液培養陽性検体8検体においても抵抗性が感受性となる誤判定は認められなかった。従来法より抵抗性に判定された理由として、抗菌薬へのSOS応答としての形態変化である、細菌のフィラメント化が考えられる。フィラメント細菌は濁度においては変化しないが、一菌体内に定常状態の20倍のATPを含むと報告されている。

[総括]

本研究で松井氏は、アデノシン三リン酸(ATP)生物発光を基にした血液培養陽性検体を直接用いるレボフロキサシンに対する薬剤感受性迅速試験を開発した。通常、感受性試験結果が培養後30時間以上必要であった従来法と比較して、最速4時間で検出可能となった。感受性結果は従来法と比較して抵抗性が感受性となった検体はなく、ATP生物発光を用いる検出系はこれまで行われてきた濁度やコロニー形成など物理的な検出系と比較して、より高感度に細菌増殖を検出しようと考えられた。この微細な変化を捉えることが可能となったのは、検体中の血球に含まれる細胞内ATP(background ATP)を著明に減少させることができたためである。また、現在は96wellマイクロプレート対応機を作製し、レボフロキサシンを含めた24種類の抗菌薬を同時に測定するオリジナル抗菌薬パネルを完成させている。

これらのことから、従来法と比して鋭敏かつ迅速な抗菌薬感受性判定を可能とした点で医学における学術的重要性も高く、機械化することにより多数の抗菌薬を同時に測定可能となった点で臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。