

令和元年6月20日現在

機関番号：32206

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15393

研究課題名(和文)腸内細菌属の質量分析による新たな薬剤耐性遺伝子タイピングの迅速分類法に関する構築

研究課題名(英文)Development of rapid classification method for new drug resistance genotyping by mass spectrometry (MALDI-TOF MS) of Enterobacteriaceae

研究代表者

永沢 善三 (NAGASAWA, ZENZO)

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・教授

研究者番号：80706820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はMALDI-TOF MS技術に着目し、ESBL産生菌およびCPE産生菌の鑑別を検討した。

ESBL産生菌およびCPE産生菌をClinPro Toolsと flexAnalysisで解析した結果、特異性の高いピークでの識別(9736m/z、2339m/z)や各種アルゴリズムでの解析では感度・特異度共に低く、薬剤耐性菌の検出には利用困難であった。ただし、申請者が独自開発したIUHW2法ではCPE産生菌のみ感度82%、特異度70%を示し検出に有用性があることが示唆された。このIUHW2法による解析については緑膿菌やアシネトバクターなどについても更なる検証が必要と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではESBL産生菌およびCPE産生菌にて得られたマススペクトル波形を利用して迅速に薬剤耐性菌を鑑別する技術の開発を実施した。その結果、既存のClinPro Tools(特異ピーク、各種アルゴリズム解析)や flexAnalysis(特異ピーク)では鑑別が困難であったが、独自に開発した共通ピーク除去解析技術(IUHW2法)ではCPE産生菌のみ感度82%、特異度70%を示し検出に有用性があることが示唆された。このIUHW2法は簡易にコンピュータシステムにより自動的に波形解析が実施できるため、緑膿菌やアシネトバクターなど多くの薬剤耐性菌の鑑別にも応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The applicant focused on MALDI-TOF MS technology and examined discrimination of Extended spectrum β -lactamases Enterobacteriaceae (ESBL) and carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE). As a result of analyzing ESBL and CPE with ClinPro Tools and flexAnalysis, both sensitivity and specificity were low in discrimination at highly specific peaks and analysis by various algorithms. However, in the IUHW2 method originally developed by the applicant, only CPE showed a sensitivity of 82% and a specificity of 70%, suggesting that they are useful for detection. About analysis by this IUHW2 method, we think that further examination is necessary about *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. etc.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：MALDI-TOF MS ESBL CPE ClinPro Tools software flexAnalysis software

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌による院内感染では腸内細菌科細菌を中心とするグラム陰性桿菌の急増が問題となっており、本邦において検出頻度が増加傾向にある Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)産生菌や米国 CDC が脅威の薬剤耐性菌として注意を呼び掛けている Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* (CPE)産生菌の検出意義は高い。特に CPE 産生菌のうち薬剤感受性試験による表現型試験でのスクリーニングで検出困難なステルス型が関西地方を中心に増えており、従来の検査方法の見直しが急務と言える。

これらの薬剤耐性菌は様々な抗菌薬に耐性を示すため、治療に利用可能な抗菌薬が限定され、また抗菌薬選択の誤りにより治療の難治化を招く。よって、速やかに薬剤耐性菌か否かの判断が求められるが、最も早期に薬剤耐性菌を確認できる遺伝子検査が実施できる施設は限定され、試験手法が極めて煩雑なため日常検査には不向きである。近年ではこれらの問題を解消する Multiplex PCR や Real-time PCR を利用した簡易的に測定可能な遺伝子装置が利用されるようになってきたが、試薬コストが高価なことや死菌との判別が困難なことに加え、保険診療が充実されていないことで病院経費の持ち出しになるなど課題が多い。また院内感染の伝播拡大を阻止するため、疫学解析のゴールドスタンダードである pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) や Multilocus sequence typing (MLST) が利用されるが、薬剤耐性菌の遺伝子検査と同様、実施可能な施設は限定され、試験法は煩雑であり、結果が得られるまでに3日以上の日数を要する。

一方、2012年頃より本邦に普及しているマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) では、微生物検査の現状を覆すものであり、迅速、簡便、正確で安価な試薬コストで試験ができる。現在、本装置は本邦で150台、グローバルで3,000台を超えて導入されている。

2. 研究の目的

近年、MALDI-TOF MS 法を利用した研究は、同定性能評価のみならず薬剤耐性菌の検出や毒素検出、クローン解析に至るまで多岐にわたって発展してきている。我々はこの技術に着目し、ESBL 産生菌および CPE 産生菌の確定や薬剤耐性遺伝子の判別について検討を実施した。また、これらの耐性遺伝子の判別が可能であった場合、クローン識別の可能性を考慮して追加検討を計画した。これらの手法を確立し、迅速かつ簡便な試験法として日常検査で実践的に試験し Prospective に評価した。

3. 研究の方法

ESBL 産生菌および CPE 産生菌を収集し薬剤耐性菌検出のために ClinPro Tools software version 3.0 (ブルカー・ダルトニクス社) を使用し、検出アルゴリズムの構築を試みた。検出アルゴリズムの構築では、*Escherichia coli* の ESBL 産生菌 40 株 (AmpC あるいは TEM-1 型単独保有する株を除く) および ESBL 非産生菌 50 株を使用し、CPE 産生菌では各種遺伝子型 (IMP 型、NDM 型、VIM 型、GES 型、KPC 型、) を含む CPE 産生菌 96 株およびカルバペネマーゼ非産生の各種腸内細菌科細菌 36 株を使用した。CPE 産生菌およびカルバペネマーゼ非産生菌の菌種内訳は、*E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae* complex, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* を使用した。収集した ESBL 産生菌および CPE 産生菌は、マイクロスキャン WalkAway (ベックマン・コールター社) による薬剤感受性試験を実施し、遺伝子検査としてシカジーニアス ESBL (関東化学社) や LAMP 法 (栄研化学社) 、CLSI 標準法に準拠した mCIM 法など含めた試験により総合的に判断の上、遺伝子型を決定した。検出アルゴリズムに登録す

るデータは、MALDI-TOF MS 法を原理として質量分析装置 MALDI Biotyper (ブルカー・ダルトニクス社) を使用し、細菌の前処理として推奨されるエタノール・ギ酸抽出法にてマスペクトル波形を取得した。エタノール・ギ酸抽出法は、1.5mL 用サンプルチューブに超純水 300 μ L を分注し、新鮮な単一集落から 5 - 10 mg を釣菌し懸濁した。この懸濁液に 900 μ L のエタノールと混合した後 13,000 rpm で 2 分間遠心し上清を除去した。沈殿を 70%ギ酸 30 μ L で懸濁した後、アセトニトリルを 30 μ L 加えて混和し、13,000rpm で 2 分間遠心した上清 1 μ L を試料として測定した。レーザー照射は 2,000-20,000 m/z の範囲を 60 Hz の周波数で Linear Positive Mode による duplicate にて測定し、240 ショットの積算ピークを記録 (6 \times 40 laser shots on different locations) した。

取得したマスペクトル波形データは、ClinPro Tools software の Genetic Algorithm(GA)、Supervised Neural Network(SNN)、Quick Classifier (QC)の 3 種のアルゴリズムで Cross Validation および Recognition Capability を評価し、検出アルゴリズムとして登録した。またこれらの検出アルゴリズムに登録した各菌株の詳細なマスペクトル解析のため、ClinPro Tools software による各薬剤耐性菌に特異的なピークの抽出を実施し、更に Flex Analysis software version 3.2 (ブルカー・ダルトニクス社) により視覚的にピーク形状および特異ピークの抽出を実施した。

ClinPro Tools software に登録した検出アルゴリズムを評価では、日常検査で検出された ESBL 産生菌 45 株および ESBL 非産生菌 40 株、CPE 産生菌 14 株、カルバペネマーゼ非産生菌 10 株を使用し、各薬剤耐性菌に適切に Class 分類が可能かを検証した。

また、これらの市販のソフトウェアによる検出アルゴリズムの構築の他に、客観的に分類可能な独自のソフトウェアの開発を実施した (IUHW2 法)。IUHW2 法のロジック構築には、Microsoft 社の Access ソフトウェアを使用し、薬剤耐性菌群の菌株と非薬剤耐性菌群の菌株を登録後、任意にて Signal to noise (S/N 比) および質量範囲 (m/z) を入力して解析を行う。ここで指定した解析条件の範囲で両群の異なる特異ピークを網羅的に抽出し、薬剤耐性菌のみに出現するピークあるいは非薬剤耐性菌のみに出現するピークの有無を未知の菌株で検索することで両群を判別する手法である。この IUHW2 法により ESBL 産生菌あるいは CPE 産生菌が検出可能かも追加で検証した。

尚、後述の結果により、各遺伝子タイプでの識別が困難であったため、本研究目的であるクローン解析は除外した。

4 . 研究成果

1) ESBL 産生菌検出に関する研究

ClinPro Tools に登録した菌株の内訳は、CTX-M1 group 7 株, CTX-M2 group 1 株, CTX-M9 group 21 株, TEM-1 + CTX M1 group 4 株, TEM-1 + CTX M9 group 7 株の計 40 株および ESBL 産生菌の遺伝子型を保有していないことを確認した非 ESBL 産生菌株 50 株であった。これらのうち菌株数の多い CTX-M1 group、CTX M9 group、TEM-1、ESBL 非産生菌の分類群で比較的特異性の高いピークとして ClinPro Tools software で識別された 9736m/z、2339m/z でクラスタリング解析したが分類不能であった (図 1)。また ClinPro Tools software の各種アルゴリズムの Cross validation および Recognition capability は 50%前後を示し、これらのアルゴリズムを使用した日常検査の ESBL 産生菌および ESBL 非産生菌では、最も高い感度で SNN アルゴリズムの 82.2%を示したものの、特異度は GA アルゴリズムで 37.5%であり、各種アルゴリズムによる ESBL 産生菌の検出は困難であった。

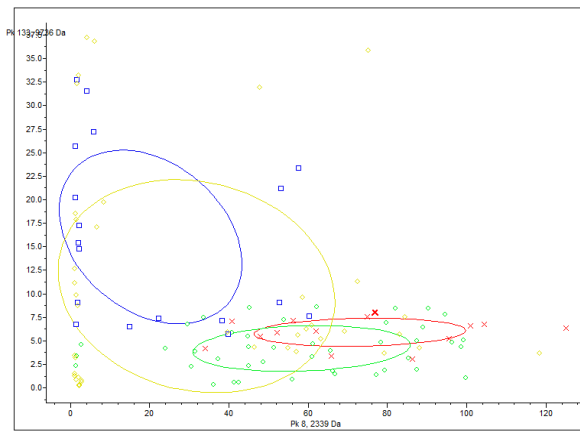


図 1 . ESBL 産生菌の遺伝子タイプ別

クラスタリング解析 (赤 : CTX M1 group 緑 : CTX M9 group 青 : TEM-1 黄色 : ESBL 非産生株)

ClinPro tools software による解析および各種アルゴリズムを利用した Classification では分類不能であり、ESBL 産生菌と ESBL 非産生菌とのマススペクトルが極めて類似し相違点が少ないことが要因と考えた。

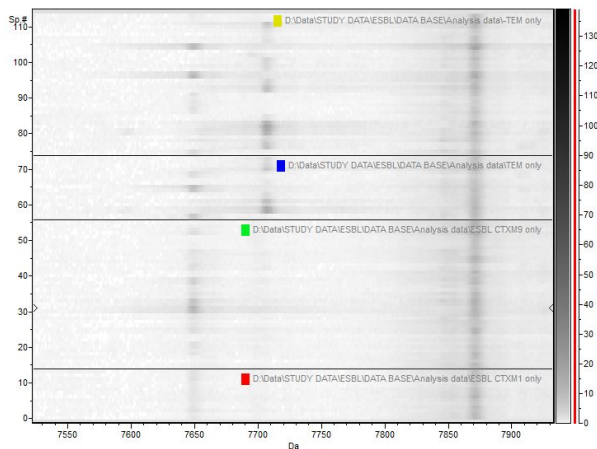


図 2 . ESBL 特異ピーク (7700m/z)

*緑 : CTX M9 group、赤 : CTX M1 group

一方、flex Analysis software によりすべてのピークを検証した結果、4170m/z、4860m/z、7700m/z、8320m/z、9750m/z 付近に ESBL 非産生菌のみに出現するピークが確認されたが、出現頻度はいずれのピークも 30%程度であり、ESBL 産生菌検出への利用は困難と考えた。本研究では *E. coli* の ESBL 産生菌検出に関し、MALDI-TOF MS 法のマススペクトルの利用は困難である。

2) CPE 産生菌検出に関する研究

ClinPro tools software に登録するための各種菌種のカルバペネマーゼ産生遺伝子型は IMP 型がもっとも多く 75 株、その他は GES 5 株、OXA 型 5 株、NDM 型 5 株、KPC 型 4 株、VIM 型 2 株であった。また ClinPro tools software に登録したデータベース検証用の CPE 産生菌 13 株も全て IMP 型であったため、本研究は主に IMP 型の CPE 産生菌検出性能の評価であった。ClinPro tools software に登録した CPE 産生菌およびカルバペネマーゼ非産生菌では、2832m/z および 4154m/z が最も高い有意差を示し、両ピークによるクラスタリング解析では各種耐性遺伝子の鑑別は困難であった。

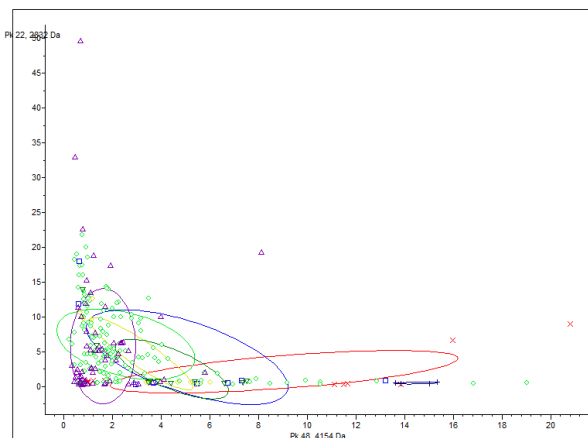
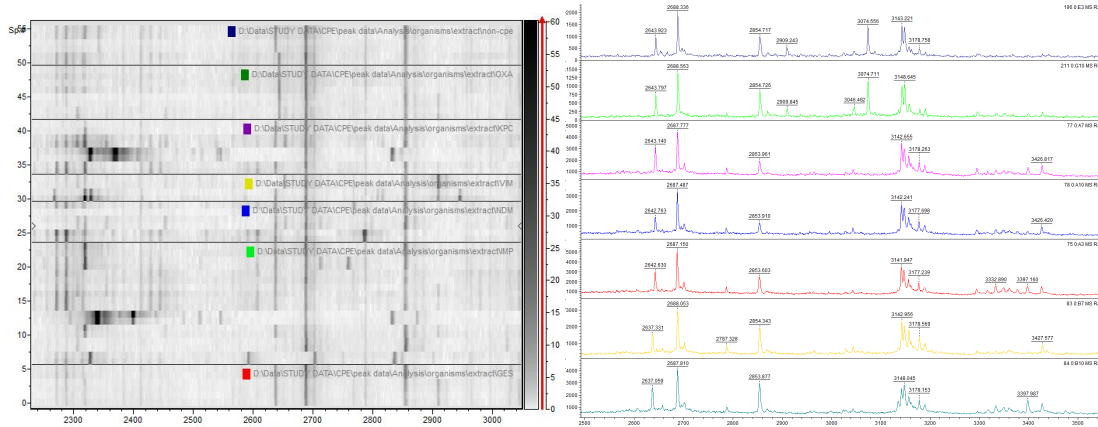


図 3 . CPE 産生菌の遺伝子タイプ別クラスタリング解析

濃青：カルバペネマーゼ非産生株 その他：CPE 産生菌各種遺伝子型

また ESBL 産生菌同様に日常検査で検出された IMP 型保有の各種腸内細菌 14 株とカルバペネマーゼ非産生菌 10 株を用いて ClinPro tools software の各種アルゴリズムでクラス分類を実施したが、SNN で最も感度が高く 92.8%を示したものの特異度は 20%であり、本アルゴリズムによる CPE 産生菌検出は困難と考えた。

一方、flex Analysis による各種耐性菌のマスペクトル解析を実施した結果、OXA 型において 2643m/z および 5287m/z に特異的ピークを確認した。一部の菌株は両ピークが存在しないものの本研究の対象菌のほとんどがこの付近にピークを持つが、他の菌株が 2637m/z、5278m/z 付近に持つのに対し、OXA 型は数 m/z ほど高くシフトすることを確認した（図 4 および図 5）。



は両ピークとも保有しない株であったことから菌種特異性を疑ったが、*K. pneumoniae* のみで考慮しても感度 100% (4/4)、特異度 96.5% (28/29) であることから極めて OXA 型 *K. pneumoniae* の鑑別に有用であることが示唆された。本菌種の OXA 型の菌株を増やしたさらなる研究の必要性がある。

また、我々は独自に CPE 産生菌検出口ジックを Microsoft Access で開発した IUHW2 法を用いて、CPE 産生菌 96 株およびカルバペネマーゼ非産生菌 36 株、またカルバペネマーゼ非産生菌として ESBL 実験に用いた ESBL 産生菌および ESBL 非産生菌 90 株を使用し、CPE 産生菌のみが持つピークとカルバペネマーゼ非産生菌のみが持つピークをソフトウェア上で網羅的に抽出する仕組みである。抽出条件は、2,000 ~ 20,000m/z の質量範囲に出現した S/N 比 2 以上のピークを 0.1 間隔の級に分割し、そのピークの ± 200 ppm を同一ピークとして CPE 産生菌あるいはカルバペネマーゼ非産生菌に特異的なピークを網羅的に抽出した。また、ClinPro tools software で用いた日常検査の CPE 産生菌株 14 株およびカルバペネマーゼ非産生株 10 株を IUHW2 法のロジックでクラス分類した結果では、感度 82.14%、特異度 70% を示し、CPE 産生菌の検出に有用であることが示唆された。この IUHW2 法による解析についても更なる株数を増やした検証が必要と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 船島由美子, 菅原和行, 平田雄哉, 加藤匡平, 佐藤謙一, 佐々木泰治, 永沢善三, 梅村創. LAMP 法を用いた簡易・迅速な Carbapenemase Big five gene 分析の試み, JARMAM, 査読有, Vol28, No.2, 2019, 77-83.
2. 永沢善三. 微生物検査の進歩(2) 質量分析検査法、臨床病理、査読無、Vol 65, No11, 2017, 1201-1209.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 加藤匡平. MALDI Biotyper を用いたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CRE) の迅速検出法の検討, 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2019.
2. 船島由美子. 分離株を用いた LAMP 法 Carbapenemase bLaIMP gene 検出法の評価、第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2019.

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：船島 由美子
ローマ字氏名：FUNASHIMA yumiko
研究協力者氏名：加藤 匡平
ローマ字氏名：KATO kyohei
研究協力者氏名：花岩 洋樹,
ローマ字氏名：HANAIWA hiroki
研究協力者氏名：成田 妙子
ローマ字氏名：NARITA taeko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。