

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07947

研究課題名(和文) 質量分析計によるレジオネラ属菌の同定及び血清型別法の構築・臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application of serotyping of clinical isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS

研究代表者

曾川 一幸 (Sogawa, Kazuyuki)

麻布大学・生命・環境科学部・准教授

研究者番号：50436440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レジオネラ肺炎による死亡数は依然として高く、呼吸不全を呈する市中肺炎の原因菌に限ると肺炎球菌(18.2%)に次いでレジオネラ菌(14.4%)が多い。レジオネラ肺炎の診断には尿中抗原検査が有用であるが、*L. pneumophila*血清1型以外の感度は著しく低い。質量分析計による細菌同定はサンプル調整が容易で、測定操作も簡便であり、一菌種約5分で同定結果が得られる。この特徴を活かして、*Legionella pneumophila*血清型別を容易に識別するシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジオネラ肺炎による死亡数は依然として高く、呼吸不全を呈する市中肺炎の原因菌に限ると肺炎球菌(18.2%)に次いでレジオネラ菌(14.4%)が多い。レジオネラ肺炎の診断には尿中抗原検査が有用であるが、*L. pneumophila*血清1型以外の感度は著しく低い。質量分析計による細菌同定はサンプル調整が容易で、測定操作も簡便であり、一菌種約5分で同定結果が得られる。また、レジオネラ属菌の同定率の向上、同定及び*L. pneumophila*の血清型別に要する時間の短縮、ランニングコストが約1/10に減り、社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要(英文)： *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) is responsible for most Legionnaire's disease cases diagnosed worldwide. MALDI-TOF MS can be used to identify the *L. pneumophila* serogroup. In this study, we compared three sample preparation methods that are compatible with MALDI-TOF MS: DCTM, OTEM, and ITEM. The aim was to improve the low identification rates for *L. pneumophila*, and establish and validate a simple, rapid and robust MALDI-TOF MS-based method for routine use in microbiological laboratories for assignment of *L. pneumophila* isolates to serogroups and identification of reliable peak biomarkers. Using ITEM, 100.0% of hot spring water samples and clinical isolates were correctly identified at the species level. Augmented reference spectra correctly identified all 29 strains at the species level and 29 isolates at the serogroup level, displaying sensitivity, specificity and accuracy of 100.0% for serogroup assignment.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：レジオネラ属菌 質量分析計 細菌同定 血清型別

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ肺炎は市中肺炎の1%程度と頻度は多くない。感染症発生動向調査によると平成15年に尿中抗原検査が保険適用になって以来レジオネラ症の患者数は平成15年に約200人であるのに対し、平成27年に約1600人と8倍増加している。また、その死亡数は依然として高く、呼吸不全を呈する市中肺炎の原因菌に限ると肺炎球菌(18.2%)に次いでレジオネラ菌(14.4%)が多い。レジオネラ肺炎の予後改善には早期診断治療が必要であり、治療開始の遅れは死亡率増加につながる。レジオネラ肺炎の診断には尿中抗原検査が有用で、検査の容易性と迅速性から本邦におけるレジオネラ肺炎の8割以上が尿中抗原検査で診断されている(国立感染症研究所感染症情報センター、<http://idsc.nih.go.jp/disease/legionellosis/sokuho>)。しかし、尿中抗原検査は *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) 血清1型以外の感度が著しく低く、陰性であってもレジオネラ肺炎の否定はできない。質量分析計による細菌同定は煩雑な試料前処理を行わず、属や種を容易に識別することのできる手法として注目され、病院検査室や検査センターに約200台程度導入されている。しかし、*L. pneumophila* や *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌の同定一致率は62.26%、66.4%と著しく低い状態である。血清型別検査は頻度の高い *L. pneumophila* の血清型1の試薬、および2から14までの型混合ラテックス試薬を用いているため、血清型1は判定できるが2から14までの血清型を判定することは困難である。

質量分析計を用いることにより、菌株によってマススペクトルのパターンは異なり、データベースとのパターンマッチングによる菌種同定及び血清型別が可能になる。しかし、現状のデータベースには血清型別については登録されていないため、独自のデータベースを構築する必要がある。平板培地に発育したコロニーの同定検査及び血清型別の結果が約5分で得られ、早期治療が可能となる。

2. 研究の目的

質量分析計(MALDI-TOFMS)で同定率の低い *L. pneumophila* に注目して、同定率の向上及び *L. pneumophila* の血清型別法を構築し、臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) *L. pneumophila* の同定率の向上

MALDI Biotyper database に登録されているレジオネラ属菌の菌株数が非常に少ないため、独自のデータベースを構築する必要がある。レジオネラ属菌同定の従来法は、細菌自動分析装置である BD Phoenix system (BD Diagnostics Systems)、API system (Sysmex Biomerieux) と生化学的性状で判定する。従来法と質量分析法の同定結果が異なった場合は16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行う。*L. pneumophila* 同定に適したコロニーの前処理を検討する。コロニーの前処理方法として、オンプレート法(DCTM法)、オンプレートギ酸抽出法(OTEM法)、エタノール・ギ酸抽出法(ITEM法)の3種類がある。麻布大学生命・環境科学部微生物学研究室に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株19株と千葉大学医学部附属病院検査部に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株10株を使用して検討した。

(2) *L. pneumophila* の血清型別解析

L. pneumophila の血清型別を解析するデータベースはMALDI Biotyper database に登録されていないため、独自のデータベースを構築する必要がある。*L. pneumophila* の血清型別の従来法は、レジオネララテックスキット(関東化学)で判定する。まず Public Health England (PHE) reference strains の保有する National Collection of Type Cultures (NCTC) 株である *L. pneumophila* 菌株5株(1型(NCTC 11192)、3型(NCTC 11232)、5型(NCTC 11405)、6型(NCTC 11282)、7型(NCTC 11984))を使用してデータベースを構築する。BCYE α 培地上の8コロニーをMTP BigAnchorChip ターゲットプレート上にそれぞれ塗布する。塗布した菌に1 μ Lの α シアノ4ヒドロキシケイ皮酸マトリックス溶液を添加し乾燥後、AutoFlex® II TOF/TOF MS で測定する。得られた8マススペクトルを平均化し、株ごとにマススペクトルをデータベース化する。麻布大学生命・環境科学部微生物学研究室に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株19株と千葉大学医学部附属病院検査部に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株10株を使用して構築したデータベースを検証する。

4. 研究成果

(1) コロニー前処理方法による *L. pneumophila* の同定率

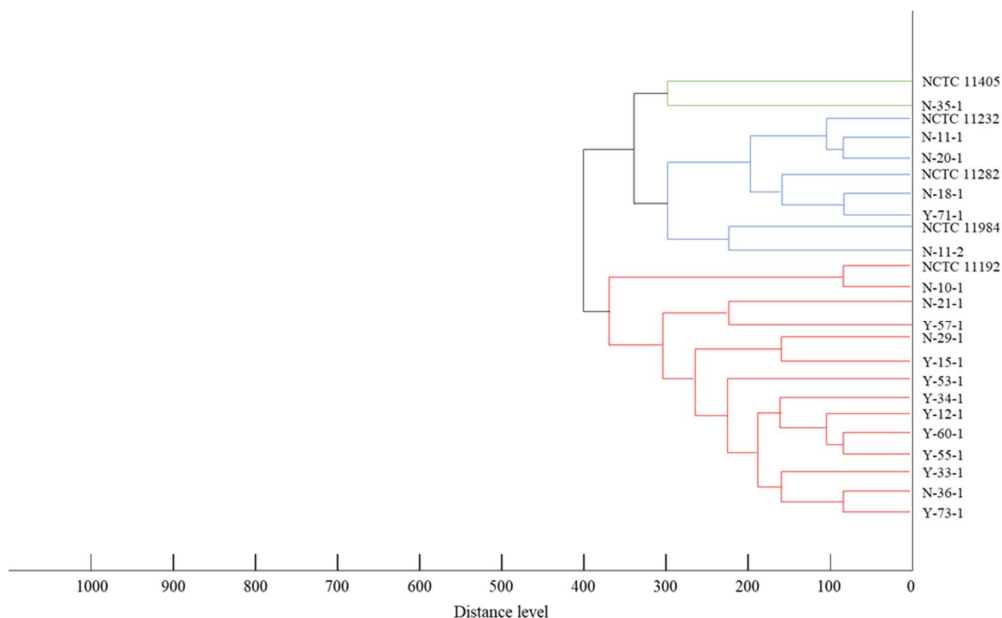
麻布大学生命・環境科学部微生物学研究室に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株 19 株と千葉大学医学部附属病院検査部に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株 10 株を使用してコロニーの前処理方法である DCTM 法、OTEM 法、ITEM 法の 3 種類を検討した。

DCTM 法では、種レベルは 75.9%、属レベルは 100% の同定率であった。OTEM 法では、種レベルは 82.8%、属レベルは 100% の同定率であった。ITEM 法では、種レベルは 100%、属レベルは 100% の同定率であった。*L. pneumophila* の同定に最も適したコロニーの前処理法は ITEM 法であった。

Extraction method	Correct identification		No identification
	Species level	Genus level	
DCTM	75.9%	100.0%	0.0%
OTEM	82.8%	100.0%	0.0%
ITEM	100.0%	100.0%	0.0%

(2) *L. pneumophila* の血清型別解析

Public Health England (PHE) reference strains の保有する National Collection of Type Cultures (NCTC) 株である *L. pneumophila* 菌株 5 株 (1 型 (NCTC 11192)、3 型 (NCTC 11232)、5 型 (NCTC 11405)、6 型 (NCTC 11282)、7 型 (NCTC 11984)) を使用してデータベースを構築し、麻布大学生命・環境科学部微生物学研究室に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株 19 株と千葉大学医学部附属病院検査部に保存してある *L. pneumophila* 保存菌株 10 株を使用して構築したデータベースを検証した。保存菌株 29 株全株において、血清型別を分けることが可能であった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sogawa Kazuyuki, Takano Shigetsugu, Ishige Takayuki, Yoshitomi Hideyuki, Kagawa Shingo, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Nomura Fumio, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Usefulness of the MALDI-TOF MS technology with membrane filter protocol for the rapid identification of microorganisms in perioperative drainage fluids of hepatobiliary pancreatic surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 246002-246002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 曾川 一幸, 清祐 麻紀子, 服部 佳奈子, 村田 正太, 渡 智久, 奥村 元, 関口 幸恵, 藤永 あずみ, 中山 智祥	4. 巻 45
2. 論文標題 質量分析装置Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometryの細菌同定における内部精度管理実施要領の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医療検査と自動化	6. 最初と最後の頁 255-259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Hiroto, Ishige Takayuki, Watanabe Toshifumi, Sogawa Kazuyuki	4. 巻 64
2. 論文標題 Use of the MALDI-TOF MS for identification of microorganisms causing felis urine samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 11~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2198/electroph.64.11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 SOGAWA KAZUYUKI, KIYOSUKE MAKIKO, HATTORI KANAKO, MURATA SYOTA, WATARI TOMOHISA, KUSABA KOJI, SAEKI YUJI, HORIUCHI KAZUKI, YASUDA KAZUNARI, UECHI KOHEI, OKUMURA HAJIME, SEKIGUCHI SACHIE, FUJINAGA AZUMI, MURAKAMI MASAMI, NAKAYAMA TOMOHIRO	4. 巻 26
2. 論文標題 Examination of conditions for regular internal quality control in identification of microorganisms using MALDI-TOF MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biocontrol Science	6. 最初と最後の頁 99~104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4265/bio.26.99	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sogawa K, Ishizaki N, Ishige T, Murata S, Taniguchi T, Furuhashi K	4. 巻 27
2. 論文標題 Evaluation of serotyping of environmental and clinical isolates of Legionella pneumophila using MALDI-TOF MS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biocontrol Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 曾川一幸、清祐麻紀子、服部佳奈子、村田正太、渡 智久、奥村 元、関口幸恵、藤永あずみ、中山智祥
2. 発表標題 質量分析装置Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometryの細菌同定における内部精度管理の検討
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古畑 勝則 (Furuhata Katsunori) (00308305)	麻布大学・生命・環境科学部・教授 (32701)	
研究分担者	谷口 俊文 (Taniguchi Toshifumi) (20724826)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	石毛 崇之 (Ishige Takayuki) (30757315)	千葉大学・医学部附属病院・臨床検査技師 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小寺 義男 (Kodera Yoshio) (60265733)	北里大学・理学部・教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関