

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659286

研究課題名(和文)MALDI-TOF-MSを使用した感染症迅速診断システムの開発

研究課題名(英文)Development of the rapid diagnosis system of the infectious disease using MALDI-TOF-MS

研究代表者

小松 方(Komatsu, Masaru)

天理医療大学・医療学部・准教授

研究者番号：00626814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：MALDI-TOF-MSを応用し尿中の細菌を迅速同定するシステムを開発した。尿中細菌を検出する最低必要な菌数は10万個/mLでありグラム染色と同等であった。属レベルの同定一致率は、グラム陰性桿菌90%以上、グラム陽性球菌65%程度であった。全行程20分以内に完了した。さらに分離培養集落を用いてカルバペネマーゼの産生を検出する方法の開発を試みた。カルバペネマーゼを産生するクローン由来のカルバペネマーゼ消化後のペプチドは60%以上回収できた。しかし、臨床分離株の多くは他の夾雑蛋白質の影響により検出ができなかった。本件については継続して研究を遂行する。

研究成果の概要(英文)：MALDI-TOF-MS has become prevalent in hospital laboratories as a method to rapidly identify bacterial colonies. We have developed a system that quickly identifies the pathogenic bacteria in urine by applying this method. The minimum bacterial count required for the detection of bacteria in urine was 100,000 bacteria/mL, which was almost equal to that required in Gram staining. At the genus level, the concordance rates of identification were 90% and above in Gram-negative bacillus and nearly 65% in Gram-positive cocci. The whole process was completed within 20 minutes. Furthermore, we tried to develop a method that detected the production of carbapenemase by using isolated and cultured colonies. The recovery of peptides from carbapenemase-producing clones was more than 60%. However, most carbapenemase-producing clinical isolates could not be detected because of the influence of other contaminant proteins. We will continue the study of this issue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：挑戦的萌芽研究(境界医学 病態検査学 臨床微生物学)

キーワード：MALDI-TOF-MS 尿路感染症 カルバペネマーゼ 感染症迅速診断

1. 研究開始当初の背景

レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) 装置が開発されて以来、微生物学分野において細菌や真菌の同定方法 (Ferroni, J Clin Microbiol, 48, 2010: 1542-8), あるいはウイルスのジェノタイピング (Iliina, J Clin Microbiol, 43, 2005: 2810-15) 等に関する研究が飛躍的に発展した。しかし、本装置を応用して臨床検体中の病原性微生物を直接同定することは困難であった。したがって、本研究で MALDI-TOF-MS による病原細菌同定システムの新しい開発は、臨床検体における細菌の直接同定が可能となるだけでなく、病原因子あるいは耐性因子を速やかに解析できる可能性があり、学問的にも意義がある。MALDI-TOF-MS を利用した病原細菌同定システムは、感染症診断と治療および患者の予後に関する情報を迅速に提供することが可能であり、臨床微生物学の発展に大きく貢献できると考えられる。このように、本計画を早急に進めることが感染症の迅速診断と治療に繋がると考えた点が、本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

従来から行われてきた分離培養法依存型の臨床微生物学的検査は、検体採取から結果の報告まで数日間を要することから細菌感染症の迅速診断、それに伴う抗菌薬の迅速な決定に関する情報として必ずしも貢献していない。そこで、MALDI-TOF-MS を用いて、臨床材料に含まれる病原性微生物を迅速に同定する新しいシステムの開発を試みる。この方法は MALDI-TOF-MS を臨床検体に応じた斬新的な取り組みであり、新規性がある。特色は従来の分離培養法で得られたコロニーを使用した MALDI-TOF-MS による同定に比べ、この方法によってより一層早く同定することが可能となる。本研究では、主に臨床材料を何らかの処理を加えることで材料中の病原性細菌の迅速同定を行う系を構築すること、および細菌の同定菌名のみならず、同時に抗菌薬耐性因子や病原因子の特定する系の構築を研究の目標とした。

3. 研究の方法

1) 臨床材料中の病原細菌の同定、および MALDI-TOF-MS に影響を与える夾雑物質の除去方法の確立

グラム染色で細菌を確認した膿尿 106 検体を使用した。測定機器は MALDI Biotyper Ver.3.1 (Bruker 社) を使用した。尿は 4mL を前処理に使用した。方法は超音波洗浄機で菌塊破壊を実施後、遠心法とフィルター法それぞれを実施し、生体内細胞と細菌の分画を行った。遠心集菌後、蒸留水およびエタノールで洗浄、ギ酸で蛋白質の抽出を行った。抽出液はアセトニトリルと混合し、MALDI-TOFMS 用ターゲットプレートに滴下乾

燥後、マトリックスを滴下し MALDI Biotyper で測定した。得られたマススペクトルは既存のデータベースと照合し同定結果を得た。尿を直接使用した際の同定精度は分離培養で得た集落の MALDI-TOF MS 同定成績との一致率をもって評価した。

2) MALDI-TOF-MS による抗菌薬耐性因子と病原因子の検出系の構築

IMP-1 産生 *Pseudomonas aeruginosa* THU3 臨床分離株を用いて、IMP-1 の pET ベクターへのクローニングを行い、IMP-1 の精製を行った。精製物はトリプシンで消化し MALDI-TOF-MS で IMP-1 のペプチド断片を検出した。(表 1) この消化物を陽性コントロールとして臨床分離株のペリプラスム層を抽出し、抽出液のトリプシン処理を施行後、MALDI-TOF-MS を行い表 1 のペプチド断片に相当する分子量ピークを探索した。

表 IMP-1 のトリプシン処理後のペプチドシークエンス

分子量	ポジション	ペプチドシークエンス
2793.4	171-196	ILFGGCFIKPYGLNLDGAN IEAWPK
2532.3	41390	LSVFFHFLFCSIATAAESLP DLK
2521.3	148-169	IEVFYPGPGHTPDNVV VWLP ER
2461.2	30-51	LDEGVYVHTSFEEVNGWGVV PK
2274.1	90-110	GSISSHFHSDSTGGIEWLNS R
2271.2	52-72	HGLVVLVNAEAYLIDTPFTA K
1812.9	130-145	VQATNSFSGVNYWLVK
1678.9	111-125	SIPTYASELTNELLK
1650.9	210-225	LVVPSHSEVGDASLLK
1620.9	210-225	LVVPGHSEVGDASLLK
1049.6	77-84	LVTWFVER
901.5	226-233	LTLEQAVK
757.4	240-246	KPSKPSN
647.3	234-239	GLNESK

4. 研究成果

1) 臨床材料中の病原性細菌の同定、および MALDI-TOF-MS に影響を与える夾雑物質の除去方法の確立

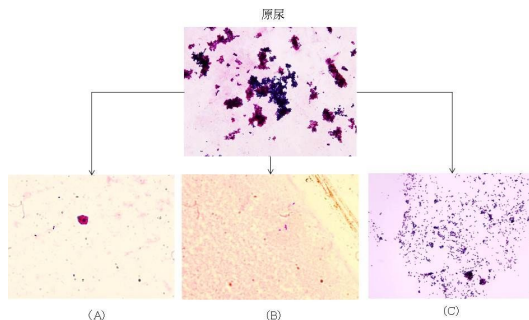


図 1. 尿中で菌塊形成する *Staphylococcus* の超音波処理による菌塊破壊。(A), 超音波未処理検体の低遠心法による細菌分画;(B), 超音波未処理検体のフィルター法による細菌分画。(A),(B)ともに菌体を認めない。(C), 超音波処理後のフィルター法による細菌分画。菌体を多数回収できており、好中球等の細胞類は認めない。

MALDI の検出感度は 10^5 CFU/mL であり、原尿を使用したグラム染色による感度と類似した。属レベルでの同定一致率は、グラム陰性桿菌は低遠心法 92%、フィルター法 93%、

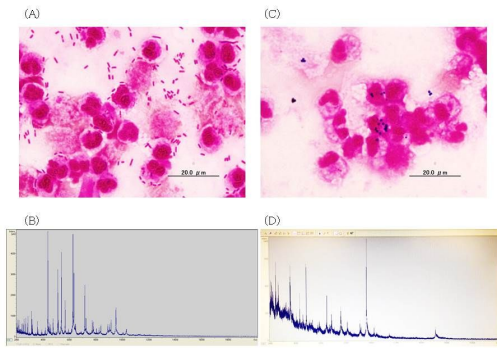


図2. 検出率を低下させる要因分析. (A)(B) *Escherichia coli* 感染尿のグラム染色とマススペクトル, (C)(D) *Staphylococcus aureus* 感染尿のグラム染色とマススペクトル. グラム陽性球菌は菌数が少ないことが理由によりクリアーなマススペクトルが得られない場合が多い.

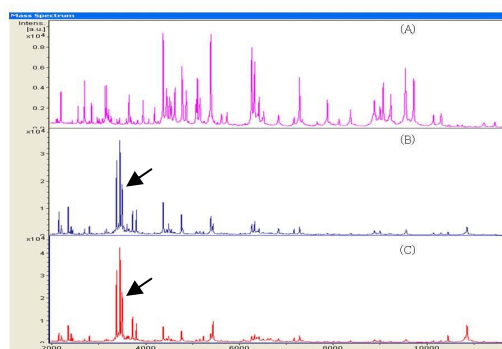


図3. 検出率を低下させる要因分析. 好中球由来と思われるディフェンシン蛋白質の混入 (m/z 3500 付近の強いピーク, 図中矢印) により細菌由来蛋白質のイオン化が抑制される. (A) *Escherichia coli* の集落の干酸抽出液, (B) 低速心法, (C) フィルター法

グラム陽性球菌は低速心法 65%, フィルター法 67% であった. グラム陽性球菌は尿中でクラスターや連鎖形成をしやすい超音波処理を加えることによって検出感度が上昇した. 超音波処理を施さない場合, 同定率が 30% 程度と低かった. グラム陰性菌にも一部の検体に同様の現象を認めた. しかし超音波処理を実施してもグラム陽性球菌の同定率は 60% 台に留まった. その理由としてグラム陽性球菌はグラム陰性菌の場合と比較してマススペクトルがクリアーでない現象を多く認めた. (図2) この理由はグラム陰性桿菌とグラム陽性球菌の尿中に存在する菌量の差であると推定した. その他, 低速心法やフィルター法で同定できない要因として図3に示すような好中球由来と思われるディフェンシン蛋白質と思われるイオンピークが強く出現する検体が存在した. この場合, 本来出現すべき細菌由来のピークが完全に抑制され同定率を低下させた. このような蛋白質が出現する理由は特定していないが, 検体測定までの保存時間による影響の可能性があると考えられた.

今回確立した方法は, 検査工程は 20 分程度で完了し, 感染症の迅速診断や治療薬選定

のための有益なツールとなるものと思われる.

2) MALDI-TOF-MS による抗菌薬耐性因子と病原因子の検出系の構築

クローンから IMP-1 特異ペプチドは 60% 以上回収できた. (図4, 図5) またクローン株のペリプラスム分画に存在する IMP-1 もトリプシン処理によって特異ペプチドの検出を認めた. 一方, 臨床分離株の多くは, 他の夾雑蛋白質の影響により特異ペプチドの検出は困難であった. 引き続き新たな夾雑蛋白除去法を加えて方法論の確立を行いたい.

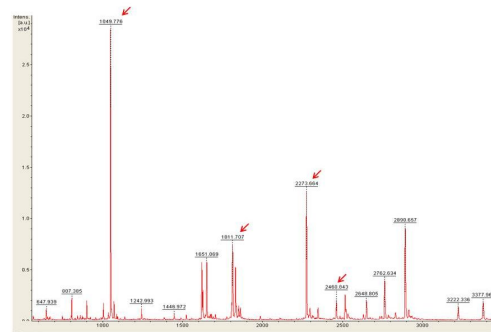


図4. クローン株由来 IMP-1 精製物のトリプシン処理後のマススペクトル. 矢印の分子量ピークは IMP-1 由来のペプチド.

1 AESLPDLKIE KLDEGVYVHT SFEEVNGWV VEKHGLVVLV NAEAYLIDTP
51 FTAKDTEKLV TWFVERGYKI KGSISSHPHS DSTGGIEWLN SRSIPTVASE
101 LTNELLKKDG KVQATNSFSG VNYWLVKNI EVFYFPGHPT FDNVVWLPE
151 RKILFGGCFI KPYGLNLGD ANIEAWPKSA KLLSKYKGA KLVVSHSEV
201 GDASLLKLT EQAVKGLNES KK

図5. クローン株由来 IMP-1 精製物のトリプシン処理後のマススペクトルから得られた分子量ピークのマスコットサーチ (<http://www.matrixscience.com/>) による解析. 赤色のアミノ酸配列が MALDI-TOF-MS で検出されたペプチド断片. Protein sequence coverage: 63%.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

小松 方: 質量分析装置 MALDI バイオタイパーを使用した運用メリットと将来像, 第 24 回日本臨床微生物学会総会, 2013 年 02 月 02 日, パシフィコ横浜 (ランチョンセミナー講演)

小松 方, 中村彰宏, 阿部教行, 福田砂織, 河野 久, 松尾収二: MALDI バイオタイパーを用いた尿路感染症原因細菌の迅速同定について, 第 24 回日本臨床微生物学会総会, 2013 年 02 月 02 日, パシフィコ横浜 (一般演題発表)

Komatsu M, Kondo A, Matsuo S: Rapid and simple method for direct identification of bacteria in urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious

Diseases 29th April 2013, Berlin, Germany
(一般演題発表)

小松 方：細菌同定法と感染症迅速診断法の新しい潮流-MALDI-TOF MS の臨床微生物検査への応用と将来，第 24 回 SCANIC 学術セミナー，2013 年 5 月 25 日，新大阪ワシントンホテル。(教育講演)

小松 方，中村彰宏，阿部教行，福田砂織，河野 久，松尾収二：MALDI バイオタイパーを用いた尿路感染症原因細菌の迅速同定法の改良，第 25 回日本臨床微生物学会，2014 年 2 月 1 日，名古屋国際会議場(一般演題発表)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 方 (KOMATSU Masaru)
天理医療大学・医療学部・准教授
研究者番号：00626814

(2)研究分担者

松尾 収二 (MATSUO Shuji)
天理医療大学・医療学部・教授
研究者番号：20626816

近藤 明 (KONDOU Akira)
天理医療大学・医療学部・講師
研究者番号：10570236