

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670350

研究課題名(和文) 院内感染菌を対象に質量分析法を応用した菌株間の迅速な相同性解析手法の構築

研究課題名(英文) Development of Novel Rapid Identification Test Method of Nosocomial Pathogen clones using MALDI-TOF Measurement

研究代表者

永沢 善三 (NAGASAWA, ZENZO)

国際医療福祉大学・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)：本研究ではMRSA、緑膿菌およびClostridium difficileを対象にMALDI Biotyper 3.1とClinPro Tools ver.2.2を使用し解析を実施した。解析データからのクローンタイピング解析には自動で疫学分類するIUHW法を独自開発した。その結果、MRSAではIUHW法とPFGE法、POT法、REP-PCR法で良好な相関性が認められた。緑膿菌では一部のクローンにおいてIUHW法と乖離が認められた。C. difficileのクラスター分類は不可能であった。しかし、IUHW法では最適な条件設定を見つけ出す事で菌株間の迅速な相同性解析は可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：MALDI Biotyper 3.1 and ClinPro Tools ver.2.2 were used and measurement data for MRSA, Pseudomonas aeruginosa and Clostridium difficile was analyzed in this study. We could originally develop novel test method(IUHW method) using MALDI-TOF MS and clone typing data analysis with epidemiological auto-classification. Good relationship with IUHW method was obtained between PFGE, POT, REP-PCR for MRSA. But relationship discrepancy with IUHW method was observed in some clones for P. aeruginosa. Cluster classification was not achieved for C. difficile between PCR-ribotyping and ClinPro Tools. We think it is possible to achieve rapid classification of clones using MALDI-TOF MS by development of optimal measurement conditions and continuous study has been conducted.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：疫学解析 MRSA 緑膿菌 MALDI-TOF MS PFGE法 POT法 REP-PCR法 リボゾーム蛋白

1. 研究開始当初の背景

細菌の疫学的解析にはゴールドスタンダードと呼ばれる pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) がある。この PFGE 法は分子量の特に大きい DNA 断片を分離するためのゲル電気泳動法のひとつで、原理は細菌の染色体 DNA を制限酵素で切断すると、幾つかの異なる長さの DNA 断片に分かれる。その切断された DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、染色すると、それらの DNA 断片がバーコードのしま模様のような像として観察される。もし比較する複数の細菌の遺伝子の塩基配列が同じであればすべて同じ DNA 断片が生じるため、その泳動パターンは同じになる。逆に塩基配列が異なれば異なる長さの DNA 断片が生じるため、異なった泳動パターンを示す。この泳動パターンの相違により菌株間の相同性を比較する解析法であるが、問題点としては菌種によって DNA を切断する制限酵素が限定されるため、対応できる細菌が限定されていること、また DNA 断片の違いを比較するために DNA の抽出から解析までの技術手技が複雑であること、さらに全過程が終了するまで 2 ~ 3 日を必要とし、解析も高額な費用を要するなどの問題が指摘できる。また、PFGE 法以外の遺伝子を利用した疫学解析法に Phage Open Reading Frame Typing (POT) 法がある。この POT 法は菌株間で保有状態に差異のある遺伝子の読み取り枠 Open Reading Frame (ORF) をマルチプレックス PCR で検出することで菌株の遺伝子型を決定し、その遺伝子型パターンにより菌株間の相同性を解析する手法である。問題点は PFGE に比べて少ないが、ORF を事前に選択するため、現状では MRSA および緑膿菌の 2 菌種のみ限定されているため、適応菌種に乏しい現状にある。

2. 研究の目的

医療関連感染が社会問題化したのは、1980

年代より Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症が急増し、死亡例が報告され、現状では MRSA および多剤耐性緑膿菌を始め多菌種による医療関連感染が発生している。医療関連感染の確定には遺伝子による疫学解析法が実施されるが、解析対応な菌種が限定されること、手技が複雑で解析費用が高額なため、一部の施設でのみ実施されている現状にある。

近年、微生物同定技術に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) が本邦でも使用され、多くの臨床微生物検査室に普及しつつある。そこで、この MALDI-TOF MS で得られた分析波形を利用した疫学解析が MRSA および緑膿菌で可能となれば、遺伝子の疫学解析で不可能な菌種にも対応可能となる。さらに分析時間も数分単位で、解析費用も安価で実施できるため、多くの施設で医療関連感染が疑わしい菌株の相同性解析には極めて有用な手法になると考え、実践的研究を目的に検討を試みた。

3. 研究の方法

申請者は MALDI-TOF MS での波形データを応用し、迅速に菌株間の相同性の違いを鑑別する新しい解析手法に取り組んだ。初期段階での波形データ解析には ClinPro Tools software ver.2.2 を使用した。ただし、この解析ソフトは MALDI-TOF MS 装置に含まれていないこと、また波形データの分析には重複測定が必要になる問題点があった。そこで、菌種同定に利用される flexAnalysis software を使用し、解析データからのクローンタイピング解析を 1) S/N 比設定による再現性の高いピーク選別 ; クローンレベルでの識別を実施するためには、ノイズレベルの除去が必要となるため、解析に signal to noise

ratio (S/N 比) を *S. aureus* ATCC29213 の測定マススペクトルより設定した。2) 多変量解析成績の数値化; コンピューター処理にて自動抽出したピークのクラスター分析では、ピークがないものを 0、ピークがあるものを 1 に変換し、さらにクローンの特性をより識別するため、Intensity 10 以上を 2 に変換し実施した。3) 菌種特異ピーク除去によるクローン特異的なピークの抽出; 菌株間での共通ピークをすべて除去する上記記載の処理を自動で行う MALDI 法を独自開発した(開発期間は約 1 年: IUHW 法)。以上の検討から、MRSA に関しては S/N 比 5 で得たマススペクトルのうち 2,000-9,000m/z の範囲を解析対象とし、Intensity 2 以上を示すマススペクトルについて、再現率の低い 45 個のピークおよび菌種特異的な 39 個のピーク、クローンに非特異的な 26 個のピークのうち重複ピークを除く計 95 個を解析対象から除外するピークとした。このような解析処理により、MRSA クローンの識別の可能性が示唆された。なお、マススペクトルの精査には、*S. aureus* の基準株 ATCC29213 と佐賀大学医学部附属病院にて 2013 年に臨床材料からランダムに収集した MRSA57 株を使用した。さらに Validation test の検証には、5 医療機関より PFGE で確認済みの医療関連感染由来 MRSA24 株を使用した。MALDI-TOF MS によるデータ収集は MRSA 株をポアメディア羊血液寒天培地で 35℃, 18 時間培養し、エタノール・ギ酸抽出法にて試料の前処理をおこない、MALDI Biotyper ver. 3.0 (Bruker) で測定した。まず、1.5ml 用サンプルチューブに超純水 300 µl 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 µl 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 µl で懸濁した後、アセトニトリルを 30µl 加えて混和し、13,000rpm で 2 分間遠心した上清 1

µl 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 (6×40 laser shots on different locations) した。

このソフト開発により、MALDI Biotyper を導入している施設はすべて疫学解析が可能となった。H27 年度は MRSA を中心に MALDI TOF MS により得られたマススペクトルから IUHW 法、MALDI Biotyper software (MB 法) および ClinPro Tools software (CT 法) による多変量解析を行い、1) PFGE 法、2) POT 法、3) repetitive extragenic palindromic sequence (REP-PCR) 法などの疫学分類法と菌株間の相同性を比較検証した。その後、緑膿菌および *Clostridium difficile* に対象菌種を広げてクローンの識別を MRSA と同様な手法を用いて検討した。

4. 研究成果

MRSA では 57 株の MRSA と 1 つの *S. aureus* 基準株のマススペクトルから、MRSA のタイピングに不要となる 95 個のピークを自動抽出した。これら 58 株とは別の 24 株を使用して validation test を実施した結果、IUHW 法によるクラスター分類と、PFGE 法、POT 法および REP-PCR 法による疫学分類で良好な相関性が認められたが、MB 法および CT 法では相関しなかった。このことから、我々の未知菌株から 95 個のピークを除外しクラスター解析する方法は、普遍的に MRSA のタイピングに利用できる可能性が示唆された(図 1)。

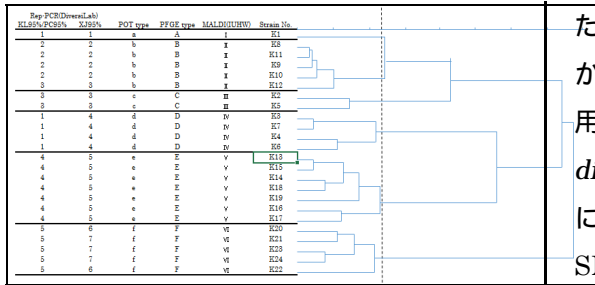


図1 MRSAを対象としたIUPW法によるクラスター分類と、PFGE法、POT法およびREP-PCR法による疫学分類の比較成績

一方、緑膿菌ではMRSAと同様な処理を実施し、疫学的分類法を検討した結果、PFGE法、POT法およびREP-PCR法の相関性が低く、IUPW法とPOT法がやや相関するのみであった(図2)。

PFGE Type	A	B	C	D	E	F	G
Strain No.	4	6	7	8	10	11	44
POT type	207	207	207	207	207	207	207
POT type	28	28	28	28	28	28	28
MALDI(IUPW)	1	1	1	1	1	1	1
DiversiLab	KJ 95%	13	12	14	12	12	8
	KL 95%	39	24	34	20	21	14
	KL 99%	4	4	4	4	4	5
	KL 99%	7	14	13	11	13	13
	PC 95%	5	5	7	5	5	6
	PC 99%	5	5	8	5	5	6

図2 緑膿菌を対象としたIUPW法によるクラスター分類と、PFGE法、POT法およびREP-PCR法による疫学分類の比較成績

この原因は、各種疫学分類法が全て一致した一部のクローンではIUPW法と概ね相関が得られる傾向にあったことから、各種疫学分類法の相関性が低かったことによるものと推察された。

また、*C. difficile* に関してはPCR-ribotypingの結果から39のタイプに分類された臨床分離株50株を使用して、MRSAと同様に測定した。なお、PCR-ribotypingの結果から、複数株が含まれていた5つのタイプをI~Vとした(ribotype I (2 strains)、ribotype II (3 strains)、ribotype III (2 strains)、ribotype IV (2 strains)、ribotype V (7 strains))。CT法を用いて系統樹を作成し

たが、PCR-ribotypingの結果とは一致しなかった。さらに、菌種特異的なpeak以外を用いて疫学解析の可能性を追加検証した。*C. difficile* のATCC BAA-1870を用いて解析に最適なpeakのSN比を検証し(n=20)、SN比を5に設定した。抽出範囲は2000-12000m/zに設定し、再現率20%以上のpeakを用いた。同一クローンに共通するpeakと、80%以上相同性があるpeakを菌種に特異的なpeakとして削除し、本条件で系統樹を作成したが、クラスター分類は不可能であった。この要因としては*C. difficile*の場合、PCR-ribotyping法により異なるクローン群として分類された菌株においてもマススペクトルパターンが近似する傾向にあるため、クラスター分類が困難であったと考えられた。しかし、IUPW法では最適な条件設定を見つけ出す事ができれば、菌株間の迅速な相同性解析は可能と考えられるため、今後も継続して検証を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. O. Ueda, S. Tanaka, Z. Nagasawa, H. Hanaki, T. Shobuike, H. Miyamoto, Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum(MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. Journal of Hospital Infection, 90, 147-155, 2015. (査読有)
2. 永沢善三, 臨床微生物学領域におけるMALDI-TOF MS応用の可能性, 検査と

技術, 142, 1364-1369, 2014. (査読無)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 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・

医学検査学科・教授

研究者番号: 80706820

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究

該当なし