

令和元年6月6日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08979

研究課題名(和文) 質量分析計による病原微生物迅速同定法の構築・臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application of rapid bacterial identification using mass spectrometry

研究代表者

曾川 一幸 (Sogawa, Kazuyuki)

麻布大学・生命・環境科学部・講師

研究者番号：50436440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌感染症の原因菌を確実に迅速に同定することは早期に有効な治療を開始するために必須である。従来、コロニーからの細菌同定には形態学的・生化学的手法が用いられてきたが、長時間を要し(平均24時間)、操作が煩雑で熟練を要するなどの難点があった。最近、質量分析計(MALDI-TOF MS)による細菌の種レベルの同定に有用であり、病院検査室に導入されている。本法は1菌種約5分と比べて短時間で正確な同定結果が得られる。本法で尿検体からの直接同定、肝胆膵領域術後患者のドレーン排液からの直接同定を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液培養陽性ボトル、尿検体、ドレーン排液から直接同定することにより従来よりも約1-2日早く判明するので、早期に治療を開始できる。特に迅速な結果判定が求められる血液培養やドレーン排液におけるメリットは測り知れない。また、尿路感染症では培養なしに直接尿検体からの同定も可能となった。

コスト面ではランニングコストが従来法の約1/5に減り、結果判明が著明に早まることにより、抗菌剤の予防的投与の機会も減ることになった。

研究成果の概要(英文)： With the increasing number of cats kept as pets, opportunities to treat cats with lower urinary tract disease (LUTD) have recently increased in the clinical veterinary field. Urine samples collected from 50 cats with bacterial cystitis brought to Maeda Veterinary Hospital between August 10, 2015 and March 31, 2017 were used in the study. Sample preparation of the urine was performed using a MALDI Sepsityper kit and rapid BACpro. To identify the isolates, MALDI-TOF MS was performed on an AutoFlex TOF/TOF mass spectrometer. MALDI-TOF MS using rapid BACpro for pretreatment was found to be a quick and reliable method for identification of bacteria from infected urine, with a shortened analysis time enabling earlier and more accurate selection of antibiotics for treatment of feline LUTD.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：病原微生物 細菌同定 MALDI-TOF MS 細菌尿 血液培養陽性ボトル ドレーン排液

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

## 1. 研究開始当初の背景

組織や体液に存在しているすべての蛋白質を網羅的に解析するプロテオミクス研究はその解析技術の進歩と相俟って、近年急速に展開している。質量分析法はプロテオーム解析における最も重要な手法であるが、質量分析計を用いた細菌同定は、1975年に Anhalt らによって、ペプチドスペクトルをベースとしたパターンマッチングによる同定が行われた。Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella sp, Proteus morgani, Proteus rettgeri の 7 菌種の同定が報告されている(Anhalt JP and Fenselau C. Anal Chem 47:219-225.1975)。

従来細菌の同定には、主に形態学的手法(グラム染色、コロニーの形状やその大きさ)や生化学的手法が用いられている。しかしながらいずれの手法も煩雑な作業であり高い専門性が要求される。高い識別能力がある 16S rRNA を指標とする手法は、多くの検体を一度に解析することは難しく、日常的に用いることは困難でありコストがかかる。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 分で同定結果がえられる(Freiwald A and Sauer S. Nature Prot 4:732-742.2009)。この特徴を活かして、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、病院検査室に約 40 台程度導入されている。

我々は臨床分離株 85 菌種 442 株について、従来法と質量分析法を行った結果、属レベルの同定では 97.0% (454 株/468 株)、種レベルの一致率は 91.7% (429 株/468 株)であった(Anal Bioanal Chem 400:1905-11.2011)。また、機器の安定性及び培養日数に影響が無いことを確認している。細菌同定に使用しているデータベースにはまだまだ問題があるが、臨床分離株をデータベースに加えることにより同定率向上につながることを確認している(Anal Bioanal Chem 403:1811-1822. 2012, Clinical Proteomics 12:1-6. 2015)。

Thomin らは、血液培養陽性ボトル 200 本を用いて従来法と質量分析法を行った結果、種レベルの一致率は 83.0%であった。グラム陰性菌は 99.0%以上種レベルの一致率がみられた(J Microbiol Methods 115:54-56.2015)。Kohlmann らは、血液培養陽性ボトルを用いて行った結果、種レベルの一致率はグラム陽性球菌 68.4%、グラム陰性菌 97.6%であった(Int J Med Microbiol 305:469-479. 2015)。Rossello らは、尿サンプル(菌量 > 1×10<sup>5</sup> CFU/mL) 100 検体を用いて行った結果、種レベルの一致率はグラム陽性菌 65.0%、グラム陰性菌 96.3%であった。菌量が 1×10<sup>4</sup> CFU/mL 未満の尿サンプル 16 検体を用いて行った結果、種レベルの一致率はグラム陽性菌、グラム陰性菌ともに 0.0%であった。(J Clin Microbiol 48:900-907.2010)。

我々は血液陽性培養ボトル 37 本を用いて従来法と質量分析法を行った結果、種レベルの同定では 86.5%の一致率であり(臨床病理 59 補冊:170. 2011)、尿サンプル(菌量 > 1×10<sup>5</sup> CFU/mL) 50 検体を用いて行った結果、種レベルの一致率は 84.0%であった。血液培養陽性ボトルと尿検体を直接、MALDI-TOF MS で同定する方法は、報告されている 4 報の種レベルの同定に達している。

MALDI-TOF MS により平板培地に発育したコロニーの同定検査だけでなく、本法で同定率の低いグラム陽性菌に注目して、血液培養陽性ボトルの迅速同定、尿検体からの直接同定、肝胆膵領域術後患者のドレーン排液からの直接同定を構築し、臨床応用を目的とする。

## 2. 研究の目的

本研究は MALDI-TOF MS で同定率の低いグラム陽性菌に注目して、血液培養陽性ボトルの迅速同定検査、尿路感染症では培養なしに直接尿検体からの同定検査、肝胆膵領域術後患者のドレーン排液からの直接同定検査を構築し、臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 血液培養陽性ボトルからの細菌回収方法・蛋白抽出方法

生化学用採血管(インセパック II, 徳山積水工業株式会社)に陽性の血液培養液を 3mL 入れる。1580×g, 5 分間遠心後、上清を捨てる。分離剤上に集積した細菌を 1mL の滅菌水で混和し回収する。回収した滅菌水を 15000×g, 10 分間遠心後、上清を捨て、エタノールを 1mL 入れ混和する。15000×g, 10 分間遠心後、上清を捨てる。20μL のギ酸を入れ、3 分間ボルテックスをする。20μL のアセトニトリルを加え混和する。15000×g, 10 分間遠心後、上清を回収し、細菌のタンパク質抽出液とする。

### (2) 尿路感染症の尿検体・肝胆膵領域術後患者のドレーン排液からの細菌回収方法・蛋白抽出方法

1.5mL マイクロチューブ(スミロンプロテオセーブ SS, 住友ベークライト株式会社)に尿を 1mL 入れる。2000×g, 30 秒間遠心後、上清を回収する。回収した液を 15000×g, 10 分間遠心後、上清を捨てる。300μL の滅菌水と 900 μL のエタノールを入れ混和する。15000×g, 2 分間遠心後、上清を捨てる。その後、rapid BACpro(ニットーポーメディカル株式会社)とポリマー樹脂を組み合わせてグラム陽性菌を抽出する。10μL のギ酸を

入れ、3 分間ボルテックスをする。10 mL のアセトニトリルを加え混和する。15000×g、10 分間遠心後、上清を回収し、細菌のタンパク質抽出液とする。

### (3) 同定方法

1 μL のタンパク質抽出液を質量分析計の MTP BigAnchorChip ターゲットプレート (Bruker Daltonics, Inc.) 上に添加する。乾燥後 1 μL の α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA; Bruker Daltonics, Inc.) マトリックス溶液を添加し乾燥後、AutoFlex® TOF/TOF MS (Bruker Daltonics, Inc.) で測定する。得られたマススペクトルを菌種ごとにマススペクトルをデータベース化した MALDI BioTyper™ 2.0 (Bruker Daltonics, Inc.) で照合する。score value が 2.000 以上を同定とする。

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。

### (4) 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析法

血液寒天培地で 24 時間培養したコロニーから集菌し、MagNAPure Compact DNA isolation kit I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用いて DNA 抽出を行う。16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析は、岡崎ら (Int J Syst Evol Microbiol 59:1336-1341, 2009) と大塚ら (J Clin Microbiol 43:3713-3717, 2005) の報告に基づき行う。16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅用プライマーには、8UA (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') と 1485B (5'-TACGGTTACCTTGTTACGAC-3') を用いることによりほぼ全長 1500bp の PCR 産物を得る。シーケンス用プライマーには、519A (5'-CAGC(A/C)GCCGCGGTAAT-3')、519B (5'-ATTACCGCGGC(G/T)GCTG-3')、907A (5'-AAACT(T/C)AAA(T/G)GAATTGACGG-3')、907B (5'-CCGTCAATTC(A/G)TTT(A/G)AGTTT-3') を使い、Applied Biosystems 3130/Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc., CA, USA) で塩基配列を決定する。塩基配列の既存菌種との同源性検索は、GenBank/EMBL/DDBJ データベースを利用する。

## 4. 研究成果

### (1) 血液培養陽性ボトルの微生物迅速同定結果

千葉大学医学部付属病院で血液培養が陽性になった血液培養ボトルを使用して、分離菌種 19 菌種 43 株で行った。

血液培養ボトルに 1 菌種の場合は、種レベルの同定では、86.5% (32/37) の一致率であり、*Bacillus coagulans*, *Candida lusitanae*, *Staphylococcus caprae*, *Streptococcus mitis* は従来法とは一致しなかった。血液培養ボトルに 2 菌種の場合、*Staphylococcus aureus* と *Staphylococcus epidermidis* では *S. aureus* が同定され、*S. epidermidis* と *Staphylococcus haemolyticus* では *S. haemolyticus* が同定され、2 菌種同時に同定することはできなかった。

### (2) 尿路感染症では培養なしに直接尿検体からの同定検査

MALDI-BioTyper System を応用し、ネコの尿における直接菌種同定を試み、時間の短縮について検討を行った。2015 年 8 月 10 日から 2016 年 3 月 31 日の間に前田獣医科医院に受診し、細菌性膀胱炎と診されたネコ 43 匹の尿を検体とした。MALDI-BioTyper System による細菌の同定は、グラム陰性菌で 92.0%、グラム陽性球菌で 37.5% であり、検体採取後 30 分で同定可能であった。

### (3) 肝胆膵領域術後患者のドレーン排液からの直接同定検査

外科手術後、臓器・体腔感染をできるだけ早期に同定することは、適切な抗生物質の選択や、ドレナージの必要性の判断などに重要である。対象は千葉大学医学部付属病院肝胆膵外科で 2012 年 2 月から 2018 年 4 月に手術施行した肝切除術 8 例、膵切除術 10 例、胆道手術 4 例の 22 例におけるドレーン排液 98 検体を用いた。尿中に 1 菌種の場合は、種レベルの同定では、88.1% (37/42) の一致率であり、*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* は従来法とは一致しなかった。尿中に 2 菌種の場合は、種レベルの同定では、85.7% (12/14) の一致率であった。2 検体は菌量が  $1.0 \times 10^4$  CFU/ml 以下であり同定まで至らなかった。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 5 件)

Sogawa K, Watanabe M, Ishige T, Segawa S, Miyabe A, Murata S, Saito T, Sanda A, Furuhashi K, Nomura F. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biocontrol Science*. 22. 2017. 163-169. doi: 10.4265/bio.22.163.

曾川一幸、林加織、村田正太、古畑勝則、野村文夫. MALDI biotyping の臨床応用. 電気泳動. 61. 2017. 141-144. doi: 10.2198/electroph.61.141.

Maeda H, Hayashi K, Ishige T, Sunagawa T, Tanigawa S, Mishina M, Watanabe T, Sogawa K. Use of the MALDI BioTyper system and rapid BACpro with MALDI-TOF MS for rapid identification of microorganisms causing bacterial urinary tract infection in feline urine samples. The Journal of Veterinary Medical Science. 80. 2018. 1490-1494. doi: 10.1292/jvms.18-0145.

前田浩人、曾川一幸、林加織、石毛崇之、阿部抄織、砂川知宏、谷川滋子、金岩篤司、三品美夏、渡辺俊文、古畑勝則. ネコ尿検体に対して MALDI Bio Typer System を応用した直接菌種同定の検討. 日本獣医腎泌尿器学会誌. 10. 2018. 50-54.

前田浩人、林加織、石毛崇之、三品美夏、渡辺俊文、曾川一幸. 質量分析計を用いたネコ尿検体中の細菌種の同定. 電気泳動. 62. 2018. 59-62. doi: 10.2198/electroph.62.59.

〔学会発表〕(計 7件)

Kazuyuki Sogawa, Kaori Hayashi, Saori Abe, Tomohiro Sunagawa, Shigeko Tanigawa, Atsushi Kanaiwa, Mika Mishina, Toshifumi Watanabe, Hiroto Maeda, Katsunori Furuhashi. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF MS for rapid identification of microorganisms causing bacterial urinary tract infection from urine samples. Mass Spectrometry Applications to the Clinical Lab (MSACL) 2016 EU. 2016.

前田浩人、林加織、阿部抄織、砂川知宏、谷川滋子、金岩篤司、三品美夏、渡辺俊文、三田明宏、曾川一幸. イヌおよびネコの尿に対し MALDI BioTyper System を応用した直接菌種同定の検討. 第9回 日本獣医腎泌尿器学会学術集会・総会. 2016.

Kazuyuki Sogawa, Kaori Hayashi, Masaharu Watanabe, Takayuki Ishige, Syota Murata, Katsunori Furuhashi, Fumio Nomura. Rapid discrimination between MRSA and MSSA. Mass Spectrometry Applications to the Clinical Lab (MSACL) 2017 EU. 2017.

曾川一幸、林加織、前田浩人、野村文夫. 質量分析法による尿へのアプローチ. 第24回日本排尿機能学会. 2017.

曾川一幸、林加織、村田正太、古畑勝則、野村文夫. MALDI biotyping の臨床応用. 第68回日本電気泳動学会総会. 2017.

Maho Yano, Kazuyuki Sogawa, Hiroto Maeda. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF MS for rapid identification of microorganisms causing bacterial urinary tract infection from urine samples. THE 22nd INTERNATIONAL MASS SPECTROMETRY CONFERENCE (IMSC). 2018.

曾川一幸. 質量分析計による細菌尿の直接同定. 第68回日本電気泳動学会シンポジウム. 2018.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：谷口俊文

ローマ字氏名：Taniguchi Toshifumi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：20724826

研究分担者氏名：佐藤守  
ローマ字氏名：Sato Mamoru  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：特任准教授  
研究者番号（8桁）：20401002

研究分担者氏名：石毛崇之  
ローマ字氏名：Ishige Takayuki  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：臨床検査技師  
研究者番号（8桁）：30757315

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小寺義男  
ローマ字氏名：Kodera Yoshio

※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。