

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：32809

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18199

研究課題名(和文) 質量分析法を用いた薬剤耐性菌の検出と代謝メカニズムの解明

研究課題名(英文) A study of rapid detection of bacteria producing extended-spectrum beta-lactamases using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry

研究代表者

松村 有里子 (MATSUMURA, Yuriko)

東京医療保健大学・医療保健学研究科・准教授

研究者番号：10439507

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)：抗菌薬の選択において原因菌の感受性の有無が問題であり、検体提出から適切な抗菌薬の選択までには数日を有する。本研究では基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ(ESBLs)産生菌を対象に、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(MALDI-TOF-MS)を用いて微生物同定と薬剤耐性の有無を迅速に判断する方法の構築を目的とした。

本研究で構築した判別方法は、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する薬剤感受性試験の迅速化を可能とし、临床上重要な3菌種に対して加水分解酵素産生能の低い臨床分離株でも30分以内に ESBLs 産生菌の判別が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬の選択において原因菌の感受性の有無が問題であり、検体提出から適切な抗菌薬の選択までには数日を有する。本研究では、ESBLs産生菌の産生する加水分解酵素による抗菌薬の加水分解過程を明らかにするとともに、標準菌株を用いてESBLs産生菌を30分以内に検出できる方法の確立を行なった。加水分解酵素産生能の低い臨床分離株でも迅速検出の可能性が示された。このことは、検体提出から適切な抗菌薬の選択までの時間を短縮できる可能性を示すものであり、より早期に適切な抗菌薬への変更に至る検査結果の提示につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：The increase in multidrug-resistant microorganisms has been a major problem all over the world. In the initial treatment of infectious diseases, a wide range of antibacterial drugs are often administered as an empiric therapy, and then an antimicrobial de-escalation is performed using results of microbial identification tests and antimicrobial susceptibility tests. As the antimicrobial de-escalation is an important strategy to reduce the spectrum of antimicrobials and to prevent the emergence of bacterial resistance, a rapid report of these results is required. In this study, the rapid detection of bacteria producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) was performed by monitoring the hydrolysis of antibacterial drugs using MALDI-TOF MS. It became clear that ESBLs-producing strains and sensitive strains could be distinguished within 15-30 minutes, suggesting that our methodology is applicable for shortening the time for antimicrobial susceptibility test.

研究分野：分析化学・感染制御学

キーワード：薬剤耐性菌 質量分析法 基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ MALDI-TOF MS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感染症診療で重要な役割を担う原因微生物の臨床検査は、自動同定・感受性機器を用いた検査、遺伝子解析技術を用いた検査、そして質量分析法を用いた検査が主に行われている。近年、質量分析法の中でも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計(Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF MS)を用いた微生物同定法が臨床現場で用いられてきている。これは、ライブラリに登録された菌種を参考に同定するものであり、1株あたり10分程度で同定結果が得られる利点を有しており、その結果は16S rRNA 遺伝子解析と高い相関性があることが示されている。

薬剤感受性に焦点を絞ると、世界的に extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) 産生菌の増加が懸念されており、現在の感染症診療における抗菌薬選択の上で考慮しなければならない存在となっており、日本でも ESBLs 産生菌の増加が報告されている。微生物の薬剤耐性メカニズムとして生化学的メカニズムと遺伝学的メカニズムが知られており、病原菌の薬剤耐性の確認には薬剤感受性検査を実施する必要がある。特に血液培養で陽性となった患者に対しては、迅速な抗菌薬治療の必要があり、検体より純培養した集落を薬剤を含む培地に接種して菌の増殖の有無で判定を行うのが主流となっている。しかし、培養には数日を要することが抗菌薬を選択する上で問題となっている。この問題点を解消するために、Real-Time PCR を用いた耐性遺伝子の検出や短時間培養による従来法での薬剤感受性検査に関する検討がなされ、最近では、カルバペネマーゼ産生菌やメチシリンやバンコマイシン耐性菌の MALDI-TOF-MS を用いた検出が報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、ESBLs 産生菌が産生する  $\beta$ -ラクタマーゼに着目し、微生物同定検査で使用される MALDI-TOF MS で  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の構造変化を捉えて、ESBLs 産生性の有無を判別するとともに、薬剤耐性菌を迅速に検出する方法の構築を目指す。現在、微生物同定用の MALDI-TOF MS として臨床利用可能な機種は2機種あるため、測定機種に依存しない検出方法を確立することとした。さらに、複数の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対応し、臨床上重要な *Escherichia coli* (*E. coli*)、*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)、*Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) の臨床検体を用いた解析を行うことで、本研究で見出した評価方法の有用性について検討を行う。以上の結果を総合して、臨床応用可能な迅速検査法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の構造変化から対象とする菌の ESBLs 産生性の有無を判断し、薬剤耐性菌の迅速を行う。

#### (1) 供試菌株

標準菌株は *E. coli* NCTC 13462、*E. coli* ATCC 25922 と *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 を、臨床分離株は計115株を用いた。

#### (2) 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査は Clinical and Laboratory Standards Institute の方法に準じ、微量液体希釈法にて最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。リアルタイム PCR にて *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子保有の確認を行なった。

#### (3) 質量分析

液体クロマトグラフィーイオントラップ 飛行時間型質量分析計 (LCMS-IT-TOF)(島津製作所)、AXIMAR Confidence (島津製作所)、VITEK MSR Plus (bioMérieux)装置、および MALDI Biotyper (Bruker)を使用した。

供試菌株を滅菌食塩水で McFarland No. 1.0 の濁度に調製した後、薬剤感受性キットであるドライプレート '栄研' DPD-1(栄研化学)の対象ウエルに一定量接種し、35℃の大気下で一定時間接触させ、上清を各質量分析装置にて測定した。なお、LCMS-IT-TOF では、上清を50%アセトニトリル水溶液で10,000倍希釈し、0.20  $\mu$ m メンブレンフィルターでろ過して測定用試料とした。LC 条件は、流量0.2 mL/min、移動相0.05%ギ酸とアセトニトリルの1:1混合溶媒とし、カラムは使用しなかった。サンプル注入量は1  $\mu$ L とし、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)にてイオン化し、質量200~600 Da の範囲で positive および negative モードで測定した。

MALDI-TOF MS では、2-cyano-4-hydroxy- cinnamate(CHCA)をマトリックスとして用い、リニアモードで質量範囲150~1,000 Da の positive イオンを検出した。

## 4. 研究成果

### (1) MALDI-TOF MS による抗菌薬の加水分解産物の検出

抗菌薬の加水分解産物の検出の一例として、Cefotaxime (CTX) を *E. coli* ATCC 25922 または *E. coli* NCTC 13462 の懸濁液と 60 分間接触した後の MALDI-TOF MS スペクトルを図 1 に示す。CTX を *E. coli* ATCC 25922 懸濁液と接触すると、生理食塩水中と同様の 455.73 Da と 477.76 Da にシグナルが観測された。一方、*E. coli* NCTC 13462 の懸濁液と接触すると、456 Da と 478 Da 付近にシグナルは観察されず、369.86 Da と 413.74 Da にシグナルが観測された。これらのシグナルをプリカーサーイオンとして MS/MS 分析を行うと、414 Da からは 126.14、169.26、201.16、213.13、259.15、326.25、352.37、370.23 Da にシグナルが観測され、414 Da のフラグメントイオンに 370 Da に相当するフラグメントイオンが観測された。また、フローインジェクション分析により、Positive モードで 413.24 Da にのみシグナルが観測された。このことは、上清中に 413.24 Da の化合物しか存在しないことを意味しており、370 Da の構造は 414 Da から生成したものであることが同定された。

CTX の加水分解後に進行し得る反応機構は、CTX が加水分解され、精密質量 495.05 の構造となり、脱炭酸、脱アセチル化、縮合環化の過程を経て精密質量 396.06 の構造となるものである。また、脱アセチル化の過程を経て精密質量 413.05 の構造となる機構が考えられた。

他のラクタム系抗菌薬に対しても同様の検討を行なった。

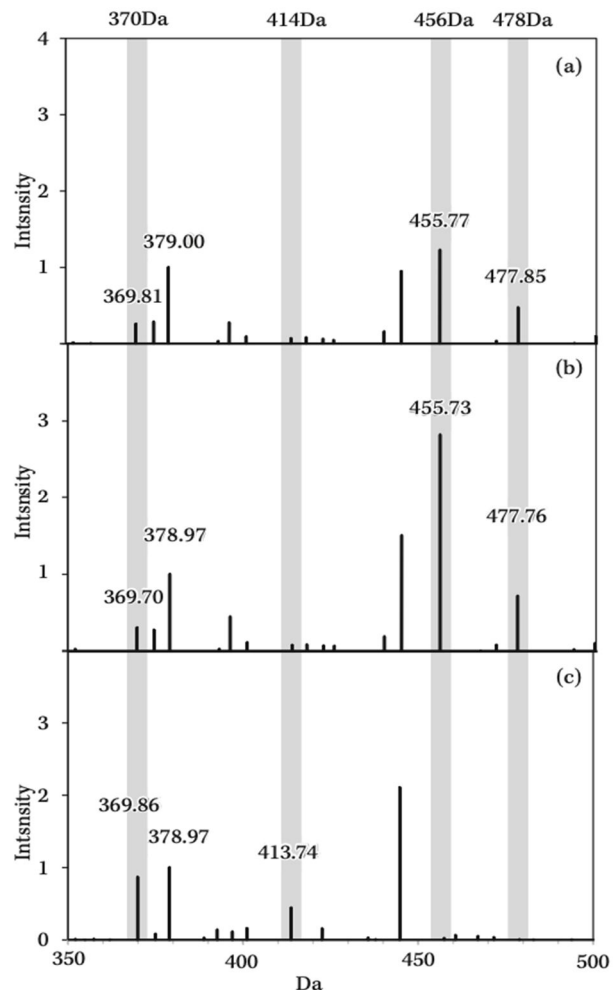


図 1 抗菌薬 Cefotaxime(CTX)を生理食塩水 (a)、*E. coli* ATCC 25922 (b)または *E. coli* NCTC 13462 (c)の菌懸濁液と 60 分間接触後の MALDI-TOF MS スペクトル。

### (2) 薬剤耐性菌の検出

抗菌薬のシグナルと同定した加水分解産物のシグナルを用いて、ESBLs 産生菌と感性菌の判別について検討を行った。ここでは、代表例として抗菌薬に CTX を用いた結果について述べる。

菌液濁度を McFarland No.0.5 の 10 倍希釈、McFarland No. 0.5、McFarland No. 1.0 として、CTX と 60 分間接触して得られるシグナル強度をマトリックスのシグナル強度に対して基準化した相対シグナル強度 ( $I_x/x$  は  $m/z$ ) を図 2 に示す。*E. coli* ATCC 25922 では、CTX 由来の  $I_{456}$  および  $I_{478}$  と加水分解産物由来の  $I_{370}$  および  $I_{414}$  は、菌液濁度が上昇しても相対シグナル強度に変化は認められなかった。一方、*E. coli* NCTC 13462 では、菌液濁度の上昇にしたがって CTX 由来の  $I_{456}$  と  $I_{478}$  は減少し、CTX 加水分解産物由来の  $I_{370}$  と  $I_{414}$  は増加した。

また、*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 では、 $I_{456}$  は菌液濁度が上昇すると減少したが、 $I_{478}$  には傾向は認められなかった。一方、 $I_{370}$  と  $I_{414}$  はいずれも菌液濁度の上昇とともに増加した。これは CTX のシグナルとしては  $I_{456}$  が適しており、抗菌薬のシグナルと抗菌薬の加水分解産物のシグナルの双方を用いることで ESBLs 産生菌かどうかの判別が可能であることを意味している。

### (3) 臨床分離株を用いた検討

最後に、ラクタム系抗菌薬として CTX、Cefpodoxime-proxetil (CPDX)、Ampicillin (ABPC)、Piperacillin (PIPC) を用い、ネガティブコントロールとして Meropenem (MEPM) を用いて臨床分離株に対する薬剤耐性菌の検出について検討した。臨床分離株には、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* を用いた。

いずれの菌種においても CTX、CPDX、ABPC、PIPC の加水分解産物と非加水分解物のシグナル強度比は、ESBLs 産生株が感性株より高いことが明らかとなった。CTX について、阻害剤である Clavulanate (CVA) 共存下では、加水分解産物のシグナルは検出されなかった。

以上の結果は、VITEK MSR Plus および MALDI Biotyper のいずれの質量分析装置を用いても同様であり、本研究手法が測定機種に依存しない方法であることが示された。

一方、ネガティブコントロールの MEPM を用いると、感性株、ESBLs 産生株のいずれの株でも非加水分解物由来のシグナルのみ観測され、加水分解物由来のシグナルは観測されなかった。また、菌種による違いも認められなかった。このことは、抗菌薬の非加水分解物由来のシグナルと加水分解物由来のシグナルを用いて ESBLs 産生菌であるか否かを判別する本研究手法の妥当性を示すものである。

本手法において、いずれの抗菌薬を用いても、ESBLs 産生株と感性株を 30 分以内で判別できた。

本研究課題では、ESBLs 産生菌が産生するラクタマーゼによる各抗菌薬の加水分解機構を明らかにするとともに、菌種同定用の質量分析装置で抗菌薬の構造変化を捉えることで ESBLs 産生菌と感性菌の判別

を可能とした。本研究手法は測定機種に依存しない方法であり、加水分解酵素産生能の低い臨床分離株でも ESBLs 産生菌の判別を可能とすることを明らかにした。以上より、MALDI-TOF MS による ESBLs 産生菌を迅速に検出できる新たな手法の可能性を示した。

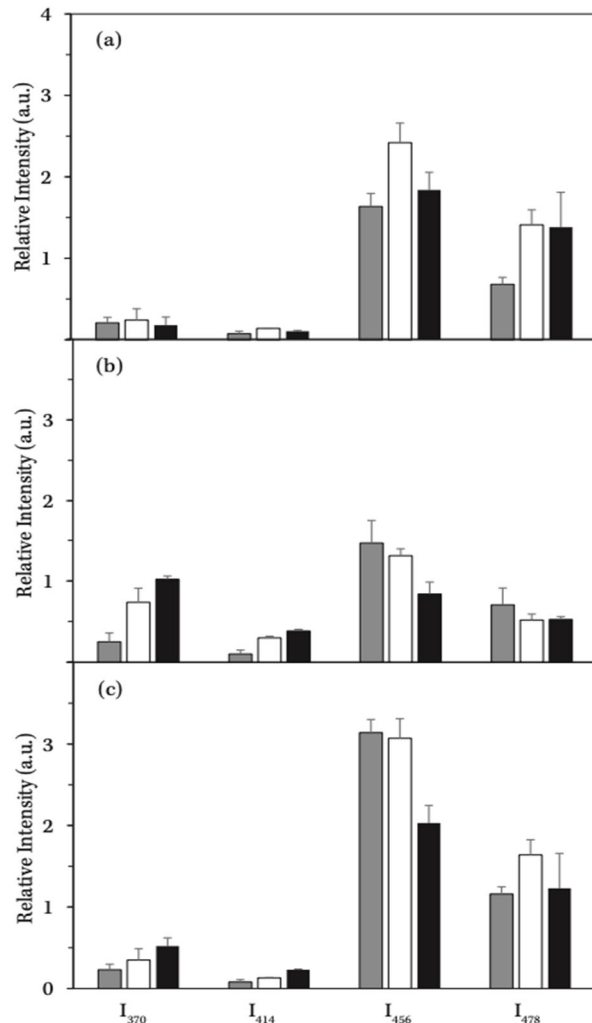


図2 抗菌薬 CTX と菌懸濁液を 60 分間接触した後の相対シグナル強度。McFarland No. 0.5 の 10 倍希釈 (灰色)、McFarland No. 0.5 (白色)、McFarland No. 1.0 (黒色)。(a): *E. coli* ATCC 25922、(b): *E. coli* NCTC 13462、(c): *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 池ヶ谷佳寿子、松村有里子、島圭介、岩澤篤郎、木村哲、土屋憲	4. 巻 67
2. 論文標題 質量分析法を用いた基質特異性拡張型 ラクタマーゼ産生菌検出法の構築に関する検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本化学療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 29-37
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuriko Matsumura, Kazuko Ikegaya, Daiki Kaji, Atsuo Iwasawa
2. 発表標題 The rapid detection of the multidrug-resistant microorganisms using two kinds of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometer.
3. 学会等名 The 25th International SPACC Symposium -Functional complexes leading fusion of multiple scientific fields- (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村有里子
2. 発表標題 質量分析法を用いた薬剤耐性菌の迅速検出法の開発
3. 学会等名 第4回OCUシンポジウム「材料・エネルギー・環境化学と計測分析化学」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村有里子
2. 発表標題 質量分析法の迅速な薬剤感受性評価法としてのアプローチ
3. 学会等名 第13回Infection Forum Tokyo (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加地大樹、松村有里子、岩澤篤郎、木村哲、岩間暁子
2. 発表標題 MALDI-TOF MSによる5種のラクタム系抗菌薬を対象としたESBLs産生菌検出の検討
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加地大樹、松村有里子、岩澤篤郎、木村哲、岩間暁子
2. 発表標題 抗菌薬の構造変化に着目したMALDI-TOF MSによるESBLs産生菌検出の迅速化検討
3. 学会等名 第34回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池ヶ谷佳寿子、松村有里子、岩澤篤郎、木村哲、土屋憲
2. 発表標題 MALDI-TOF MSを使用したCefotaximeの薬剤感受性評価と基質拡張型 -ラクタマーゼ産生菌の迅速検出法
3. 学会等名 先端錯体工学研究会 (SPACC)2017年度年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池ヶ谷佳寿子、松村有里子、岩澤篤郎、木村哲、土屋憲
2. 発表標題 MALDI-TOF MSを使用した薬剤感受性試験法—Cefotaximeと大腸菌を用いた検討—
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第44回年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池ヶ谷佳寿子、松村有里子、岩澤篤郎、木村哲、土屋憲
2. 発表標題 VITEK MS Plusを使用した基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生Escherichia coliの迅速検出に関する検討
3. 学会等名 第33回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村有里子、加地大樹、岩澤篤郎、木村哲
2. 発表標題 MALDI-TOF MSを利用した基質特異型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の迅速検出に関する3菌種を用いた検討
3. 学会等名 2019年度SPACC年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加地大樹、松村有里子、岩澤篤郎、木村哲、岩間暁子.
2. 発表標題 MALDI-TOF MSによる複数の $\beta$ -ラクタム系抗菌薬を対象としたESBLs産生菌検出の検討.
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第46回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加地大樹、松村有里子、岩澤篤郎、木村哲、岩間暁子.
2. 発表標題 複数の $\beta$ -ラクタム系抗菌薬とESBLs産生菌を用いたMALDI-TOF MSによる迅速検出法の検討.
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daiki Kaji, Yuriko Matsumura, Atsuo Iwasawa, Satoshi Kimura
2. 発表標題 A study on rapid detection of three kinds of bacteria producing extended- spectrum $\beta$ -lactamases using matrix-assisted laser desorption ionization- time-of-flight mass spectrometry
3. 学会等名 The 26th International SPACC Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019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