

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590680

研究課題名(和文) プロテオミクス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・その他部局等・講師

研究者番号：50436440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：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、操作が煩雑で熟練を要するなどの難点があった。質量分析法では1菌種約6分ときわめて短時間に正確な同定結果が得られる。本法により、血液培養陽性ボトルからの直接迅速同定検査の確立およびStaphylococcus aureusのメチリン感受性株(MSSA)とメチリン耐性株(MRSA)の鑑別システムを構築した。

研究成果の概要(英文)：MALDI-TOF MS is increasingly used in clinical microbial diagnostics for species identification of pathogens. The identification rates at the species and genus levels were 91.7% and 97.0%, respectively, and both rates were improved by adding clinical isolate data obtained in our laboratory to that in the original commercial database.

MRSA is one of the major pathogens responsible for nosocomial infection. The presence of MRSA in a hospital is detrimental to patients and to hospital management. Thus, rapid identification of MRSA is needed. Here, we report a prospective study of rapid discrimination of MSSA from MRSA using MALDI-TOF MS in 160 clinical isolates of S. aureus. The predictive model was trained using 50 MSSA and 50 MRSA. The identification rates were 90.0% for MSSA and 87.5% for MRSA. In blind test sets, 30 MSSA and 30 MRSA were correctly classified, with identification rates of 93.3% for MSSA and 86.7% for MRSA.

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 プロテオミクス

## 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6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ている。

Eignerらは、臨床分離株1116株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95.2%(グラム陰性細菌:93.8%、グラム陽性細菌:97.7%)であった(*Clin Lab* 55:289-296.2009)。Sengらは、臨床分離株1660株を用いて、属レベルの同定では95.4%、種レベルの一致率は84.1%であった(*Clin Infect Dis* 49:543-551.2009)。van Veenらは、臨床分離株327株を用いて、属レベルの同定では95.1%、種レベルの一致率は85.6%であった

(*J Clin Microbiol* 48:900-907.2010)。Bizziniらは、臨床分離株1371株を用いて、属レベルの同定では94.5%、種レベルの一致率は91.7%であった(*J Clin Microbiol* 48:1549-1554.2010)。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。コロニーを直接、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・属レベルの同定に達している。

## 2. 研究の目的

質量分析計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、適切な抗菌剤の選択に必要な薬剤感受性試験、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への応用を目的とする。

## 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

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。

### (2) 尿路感染症の尿検体からの細菌回収方法

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。300 $\mu$ L の滅菌水と 900  $\mu$ L のエタノールを入れ混和する。15000 $\times$ g, 2 分間遠心後、上清を捨てる。

### (3) 細菌の蛋白抽出方法

20 $\mu$ L のギ酸を入れ、3 分間ボルテックスをする。20 $\mu$ L のアセトニトリルを加え混和する。15000 $\times$ 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。

### (4) 細菌の同定方法

1 $\mu$ L 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 $\mu$ L の $\alpha$  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<sup>®</sup> II 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<sup>™</sup> 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。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。

### (5) 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相同性検索は、GenBank/EMBL/DBJ データベースを利用する。

## 4. 研究成果

### (1) In house database 構築による同定率の向上

2011 年 5 月 24 日から 2011 年 6 月 1 日に平板培地により分離された 39 菌種 205 株をデータベースに追加し、2011 年 6 月 2 日から 2011 年 6 月 10 日に分離された 40 菌種 264 株について検証した。

臨床分離株を追加する前の市販データベースでは、種レベルで 87.1% (230 株/264 株) の一致率であったが、臨床分離株を追加した後のデータベース (in-house) では、種レベルで 93.2% (246 株/264 株) の一致率であり、score value も 61.4% (162 株/264 株) で上昇し、同定一致率が向上した。追加した菌種以外の同定には、影響がみられなかった。

### (2) 血液培養陽性ボトルの微生物迅速同定の評価

千葉大学医学部附属病院検査部で血液培養が陽性となった血液培養ボトルを使用し、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、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。

### (3) MSSA と MRSA の鑑別

2012 年 1 月 10 日から 2013 年 4 月 12 日に当院検査部で分離された臨床分離株 98 株 (MSSA : 50 株、MRSA : 48 株) で ClinProTools™ software3.0 (Bruker Daltonics) のサポートベクターマシンを用いて判別アルゴリズムを作成し、2013 年 4 月 15 日から 2013 年 8 月 16 日に分離された臨床分離株 60 株 (MSSA : 30 株、MRSA : 30 株) について検証した。

臨床分離株 98 株でアルゴリズムを作成し、判別を試みた結果、従来法との一致率は MSSA で 90.0%(45 株/50 株)、MRSA で 87.5%(42 株/48 株)であった。検証に用いた臨床分離株 60 株では、MSSA で 93.3%(28 株/30 株)、MRSA で 86.7%(26 株/30 株)であった。

### 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 3 件)

Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Miyabe A, Murata S, Saito T, Nomura F. Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performance by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. Analytical and bioanalytical chemistry. 403. 2012. 1811-1822.

doi: 10.1007/s00216-011-5656-1

曽川一幸、渡邊正治、野村文夫、質量分析計による微生物迅速同定、臨床病理、査読有、61 巻、2013、44-51

Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, Watanabe M, Satoh M, Matsutani T, Kobayashi M, Iwadate Y, Kuwabara S, Saeki N, Nomura F. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. Clinica Chimica Acta. 435. 2014. 59-61.

doi: 10.1016/j.cca.2014.04.024

Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, Matsushita K, Kamei K, Nomura F. Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. Clinical Proteomics. 12. 2015. 1-6.

doi:10.1186/s12014-015-9078-5

〔学会発表〕(計 10 件)

曽川一幸、渡邊正治、野村文夫、質量分析計を用いた細菌迅速同定法の臨床応用に向けて、第 19 回日本遺伝子診療学会大会、2012 年

曽川一幸、渡邊正治、野村文夫、質量分析計を用いた微生物迅速同定法、第 52 回日本臨床化学会年次学術集会、2012 年

曽川一幸、渡邊正治、瀬川俊介、宮部安規子、村田正太、齊藤知子、野村文夫、質量分析計を用いた MSSA と MRSA の迅速鑑別の試み、日本臨床検査自動化学会第 44 回大会、2012 年

曽川一幸、渡邊正治、瀬川俊介、宮部安規子、村田正太、齊藤知子、野村文夫、MALDI-TOF MS を用いた MSSA と MRSA の鑑別の試み、第 37 回日本医用マススペクトル学会年会、2012 年

宮部安規子、渡邊正治、曾川一幸、齊藤知子、村田正太、瀨川俊介、佐海知子、野村文夫、MALDI-TOF MS を用いた血液培養陽性ボトルからの直接同定の評価、第 24 回日本臨床微生物学会総会、2013 年

瀨川俊介、西村 基、曾川一幸、村田正太、齊藤知子、宮部安規子、佐海知子、上原麻美、渡邊正治、亀井克彦、野村文夫、細菌検査における MALDI-TOF MS を用いた *Nocardia* 属の同定について、第 38 回日本医用マスペクトル学会年会、2013 年

瀨川俊介、渡邊正治、村田正太、齊藤知子、宮部安規子、佐海知子、上原麻美、曾川一幸、澤井 撰、別府美奈子、西村基、野村文夫、MALDI-TOF MS を使用した細菌迅速同定が有用であった細菌性髄膜炎の 1 例、日本臨床検査自動化学会第 45 回大会、2013 年

曾川一幸、村田正太、中村恵海、上原麻美、佐海知子、瀨川俊介、宮部安規子、齊藤知子、渡邊正治、三田明弘、野村文夫、質量分析計を用いた MSSA と MRSA の鑑別の試み、第 39 回日本医用マスペクトル学会年会、2014 年

西村基、瀨川俊介、曾川一幸、村田正太、齊藤知子、宮部安規子、佐海知子、上原麻美、渡邊正治、松下一之、亀井克彦、野村文夫、MALDI-TOF MS を使用した *Nocardia* 属の臨床細菌検査における同定改善の試み、第 61 回日本臨床検査医学会学術集会、2014 年

瀨川俊介、西村基、曾川一幸、村田正太、齊藤知子、宮部安規子、佐海知子、上原麻美、渡邊正治、松下一之、亀井克彦、野村文夫、MALDI-TOF MS による *Nocardia* 属同定の為のデータベース構築と評価、第 26 回日本臨床微生物学会総会、2015 年

〔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

### (2) 研究分担者

野村文夫 (NOMURA FUMIO)  
千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：80164739

佐藤守 (SATO H MAMORU)  
千葉大学・医学部附属病院・寄附研究部門  
教員  
研究者番号：20401002

佐藤謙一 (SATO KENICHI)  
国際医療福祉大学・保健医療学部・講師  
研究者番号：90505687

### (3) 連携研究者

小寺義男 (KODERA YOSHIO)  
北里大学・理学部・准教授  
研究者番号：60265733