

## 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：34606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860469

研究課題名(和文) MALDI TOF MSを使用したヒト由来ESBL産生大腸菌の疫学的調査法の確立

研究課題名(英文) Microbial Typing of Human-Derived Extended-Spectrum beta-Lactamase producing Escherichia coli by MALDI-TOF MS

研究代表者

中村 彰宏 (Nakamura, Akihiro)

天理医療大学・医療学部・研究員

研究者番号：30647087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ESBL産生E. coliにおけるMALDIタイピングおよび世界的パンデミックタイプであるB2-ST131クローン特有のバイオマーカーを探索することを目的とする。独自に開発したMALDIタイピング手法はPFGEより劣るもののMLSTとほぼ同等レベルの識別能力を有していた。また、B2-ST131とother STを識別するバイオマーカーはB2-ST131は7,650 m/z、他のSTタイプは7,707 m/zが最も識別能力が高く、このバイオマーカープロテインはYah0 proteinと同定された。そしてこの分子量の差はE34Aのアミノ酸置換のある同一タンパク質であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study development of MALDI typing with ESBL-producing E. coli, and is to explore the specific biomarker peaks of B2-ST131 clone of global pandemic clone. Our unique MALDI typing method was identified ability comparable to MLST although inferior to PFGE. We searched for the specific biomarker peaks to distinguish between the B2-ST131 clonal group and other ST clonal groups isolated. Biomarker peaks at m/z 7650 in the B2-ST131 group and m/z 7707 in the other ST clonal groups showed the highest discrimination abilities. Differences between the molecular mass at the 7650-m/z and 7707-m/z peaks indicated an E34A amino acid substitution.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：MALDI-TOF MS ESBL産生E. coli B2-ST131 保菌調査 MALDI typing Yah0 protein

1. 研究開始当初の背景

近年、extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) やカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌を代表とするラクタマーゼ産生菌が世界的に蔓延している。特に ESBL 産生 *Escherichia coli* は院内のみならず市中においても蔓延しており、拡散防止対策が急務となっている。院内または市中においてアウトブレイクを疑う時は、正確かつ迅速なタイピングを実施し、早期発見および早期対応が求められるが、従来から実施されている手法である rep-PCR や pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) は時間を要し、操作も煩雑であるためルーチンワークとして実施することが困難である。われわれが今回使用する matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) はコロニーから約 10 分以内に菌種同定が可能な迅速性、経済性および操作性に優れた次世代型臨床微生物検査ツールであり、菌種同定と同時に迅速なタイピングやクローン識別が実施できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究は、まず国内同一市内の入院患者および健康人における腸管内 ESBL 産生 *E. coli* の保菌状況を調査し、そのクローンタイプを解析、B2-ST131 クロْنَを疫学調査する。次に MALDI-TOF MS を用いて菌種同定すると同時に世界的に蔓延している ESBL 産生 *E. coli* の迅速なタイピング手法の確立、そして世界的パンデミッククローンである高病原性多剤耐性 *E. coli* B2-ST131 クロْنَを他のクローンと鑑別可能なバイオマーカーを探索する事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は以下の研究について実施した

1) ヒト糞便由来 ESBL 産生 *E. coli* の分子疫学調査

2011 年に天理よろづ相談所病院感染症検査室に提出された糞便を用いて ESBL 産生 *E. coli* の保菌調査を実施し、検出した株について multilocus sequence typing (MLST)、phylogenetic group および PFGE を実施した。2) MALDI-TOF MS を用いた各種デンドログラムの作製と各種タイピング手法との性能比較

1) で得られた菌株の一部を使用して MALDI-TOF MS 測定を実施し、Biotyper main spectrum (MSP) によるデンドログラムと独自で考案した解析方法によるデンドログラムを作製、既存の MLST および PFGE の識別能力と simpson's index を用いて評価した。

3) B2-ST131 クロْنَ特有のバイオマーカーの探索とタンパク質同定

1) で得られた菌株を用いて ClinProTools ソフトウェア多変量解析による B2-ST131 クロْنَ特有のバイオマーカー探索を実施した。また、各種プロテオミクス解析手法によ

りそのバイオマーカープロテインを同定した。

4. 研究成果

国内のヒト糞便中 ESBL 産生 *E. coli* 保菌率およびそのクローンの調査結果、保菌率は入院患者で 12.5% (32/257)、健康人で 8.5% (42/496) であり、1998 年に実施した研究結果の 0.5% に比べ約 20 倍近く著増していた。ESBL 産生 *E. coli* クロْنَは B2-ST131 が 22% (16/74) と最も多かったが、健康人では入院患者に比べ B2-ST131 の検出率は低かった ( $P < 0.01$ ) (図 1)。

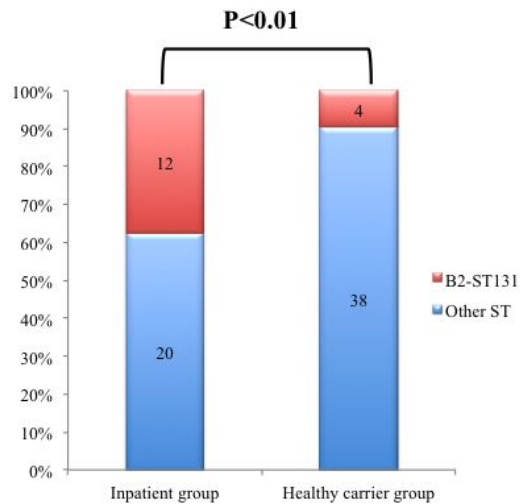


図1. 入院患者群と健康人群におけるB2-ST131の頻度

次に検出した ESBL 産生 *E. coli* のうち 36 株を用いて PFGE、MLST および ESBL 遺伝子型のそれぞれの違いが、MALDI-TOF MS でどれくらい識別可能かを比較した結果、simpson's index は PFGE が 0.929、MLST が 0.715、ESBL 遺伝子型が 0.710、MALDI-TOF MS による独自解析方法が 0.708 であり、MALDI-TOF MS による識別能力は PFGE より劣るものの MLST とほぼ同等レベルの識別能力を有していた (表 1)。

表1. 各種タイピング手法とMALDI typingの性能比較

タイピング方法	Simpson's Index
PFGE	0.929
MLST	0.715
Biotyper MSP dendrogram	Not available
Our unique dendrogram	0.708

また、ESBL 産生 *E. coli* 74 株の MALDI-TOF MS から得られたスペクトルを用いて、B2-ST131 と他の ST タイプを識別する最も適当なバイオマーカーピークを検索した。B2-ST131 は 7,650  $m/z$ 、Other ST は 7,707  $m/z$  が最も識別能力の高いバイオマーカーピークとして検出され、その判別特性は、感度 100%、特異度 89.7%であった (表 2、図 2)。このバイオマーカープロテインはプロテオミクス解析において YahO protein と同定し、

7,650  $m/z$  と 7,707  $m/z$  は E34A のアミノ酸置換のある同一タンパク質であることが明らかとなった。現在、7,650  $m/z$  および 7,707  $m/z$  以外のバイオマーカーピークについて解析中である。

表2. B2-ST131およびother ST鑑別のための各種バイオマーカー探索結果

Mass	Wilcoxon P value
7706.75	0.0000681
7650.27	0.00000792
8349.44	0.00204
10693.12	0.00152
4173.7	0.00118

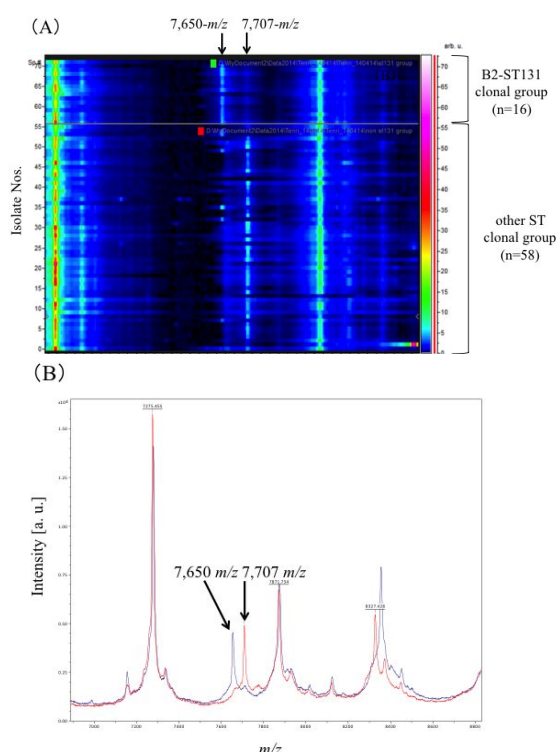


図2. 7,650 $m/z$ および7,707 $m/z$ のゲルビュー(A)およびスペクトル(B)の比較

## 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. Kubo Y, Komatsu M, Tanimoto E, Sugimoto K, Tanaka S, Migita S, Kondo Y, Yano S, Maehara K, Murata R, Nakamura A, Fujita T, Kawata Y. The spread of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* ST2 and ST246 in a hospital in Japan. *J Med Microbiol.* 2015 [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計8件)

1. Nakamura A, Hashimoto E, Abe N, Fukuda S, Kohno H, Nakamura F, Komatsu M, Kawano S. Characteristics and changes in the carriage rate of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-

producing enterobacteria in faeces of hospitalised patients and healthy individuals in Japan: comparison of data between 1998 and 2011. 23rd The European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. (20130427-20130430). Berlin, Germany

2. 中村彰宏, 阿部教行, 橋本恵理子, 松谷日路子, 福田砂織, 河野久, 岡山幸成, 中村文彦. MALDI-TOF MS により迅速診断しえた *Corynebacterium kroppenstedtii* による乳腺膿瘍の一例. 第53回日臨技近畿支部医学検査学会. 2013. 福井.

3. 中村彰宏, 橋本恵理子, 阿部教行, 福田砂織, 河野久, 小松方, 河野誠司. ヒト腸管内ESBL産生大腸菌の系統発生群分類および multilocus sequence typing. 第25回日本臨床微生物学会. 名古屋. 2014.

4. 中村彰宏, 小松方, 橋本恵理子, 松谷日路子, 阿部教行, 福田砂織, 河野久, 中村文彦. 国内健康人における糞便中 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)産生 *E. coli* の分子疫学的解析. 第54回日臨技近畿支部医学検査学会. 神戸. 2014.

5. 中村彰宏, 大野裕貴, 橋本恵理子, 阿部教行, 福田砂織, 河野久, 小松方, 河野誠司. 当院における過去4年間のカルバペネマーゼ産生腸内細菌の検出状況と分子疫学的特徴. 第26回日本臨床微生物学会. 2015. 東京.

6. 中村彰宏, 大野裕貴, 福田砂織, 小松方. 当院におけるカルバペネマーゼ産生腸内細菌の分離状況と分子疫学的特徴. 第89回日本感染症学会. 2015. 京都.

7. 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. 横浜.

8. 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同定のための前処理法の改良. 第25回日本臨床微生物学会総会. 2014. 名古屋.

〔図書〕(計1件)

1. 中村彰宏 (分担). 細菌～*Klebsiella pneumoniae*等グラム陰性桿菌～. ウイルス・細菌・真菌・寄生虫同定便覧. 2014. P.153-155.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 基質特異性拡張型ラクタマーゼ産生大腸菌 B2-ST131 クローンの検査方法

発明者: 河野誠司, 中村彰宏, 小松方

権利者: 河野誠司, 中村彰宏, 小松方

種類: 特許

番号: 特願 2015-053351

出願年月日: 2015年3月17日

国内外の別: 国内および国外

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村彰宏 (NAKAMURA AKIHIRO)

天理医療大学医療学部臨床検査学科

特別研究員

研究者番号：30647087