

質量分析法を用いた細菌同定の有用性

多根総合病院 中央検査部

松 下 早 苗 安 井 孝 輔 川 住 勇 竹 浦 久 司

要 旨

臨床分離菌について、質量分析法による菌種同定を行い、従来法での同定成績と比較した結果、種レベルで87.1%、属レベルで95.7%の一致率を認めた。

質量分析法は、起炎菌の迅速菌種同定が可能で、臨床的にきわめて有用な検査法であることを確認した。

Key words : MALDI-TOF MS ; MALDI Biotyper

はじめに

感染症の早期診断をすることは、治療方針や予後に大きな影響を与えるため、正確で迅速な結果報告が求められている。

細菌感染症の場合、原因微生物の同定は、グラム染色をはじめとした形態学的所見、集落性状、糖の分解能などの生化学的性状、血清型を基に行われてきた。これら従来法では、手技が煩雑で判定に個人差が生じる事や報告までに時間を要するといった問題がある。また、必要に応じて16S rRNA 遺伝子解析による同定も用いられているが、操作性・専門性などが要求されるため実施できる施設に限られるという問題がある。

2000年頃よりヨーロッパを中心として質量分析法(MS法)を用いた新しい細菌同定の方法が注目され、2011年9月、わが国においても医療機器としての承認を受けた。高電圧をかけた真空中で蛋白質やペプチドを含む試料をイオン化すると、イオンは静電力によって装置内を飛行する。この運動(飛行)は蛋白質やペプチドの質量によって異なり、同じ質量電荷比を持った2つの粒子は同じ経路を同じ速さで運動する性質を利用して、イオンの質量電荷比を求める方法がMS法である。検出器で飛行したイオンを質量電荷比に応じて分離検出し、それぞれの検出強度によりマス

スペクトル(横軸:質量電荷比,縦軸:検出強度)として表示される。分析に供する試料物質をイオン化し電荷を持たせるには、目的に応じて様々な手法があり、微生物同定用の本装置では生体高分子をそのままイオン化するMALDI(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)法が用いられている。この方法は試料をマトリックス(芳香族有機化合物など)中に混ぜて結晶を作り、これにレーザーを照射することでイオン化する方法で、蛋白質などの高分子化合物であっても安定してイオン化することが可能である。また、イオン化された試料を分離するにもいくつかの方法があり、本装置では飛行時間型(Time of Flight: TOF)が使われている(図1)。マススペクトルは多くの微生物に対して種特異的である為、膨大なリファレンス株についてのマススペクトルのデータベースと比較して菌種同定が可能となる。披検サンプルのマススペクトルとデータベースのマススペクトルとの一致率によりscore value(表1)として表され、score valueの上位10菌種が表示される。1例として臨床分離株の*Staphylococcus aureus* 1株について質量分析法により得られた成績を表2に示す。Score valueの上位10菌種が表示され、*Staphylococcus aureus*のscore valueが2.300以上であることにより、*Staphylococcus aureus*との同定が可能となる。

2013年3月、多根総合病院にMALDI-TOF MS

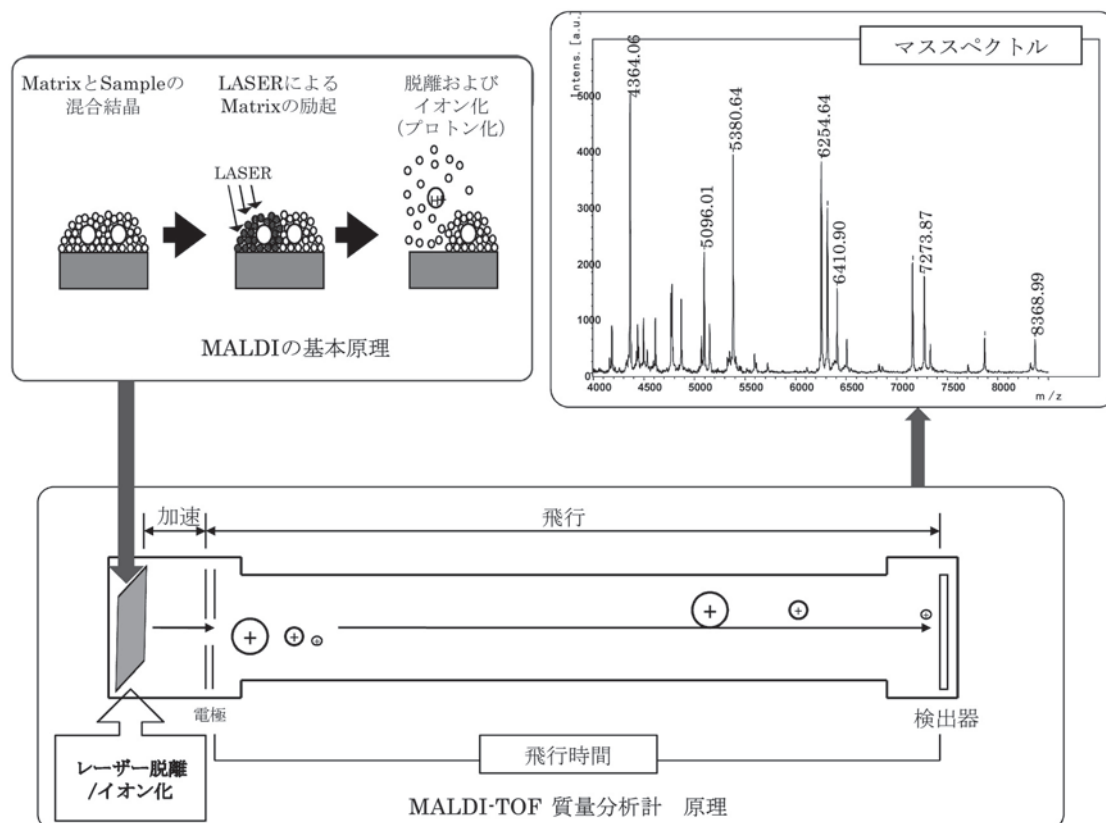


図1 MALDI-TOF MS

表1 MALDI Biotyper で表示される score value の意義

score value	意義
2.300 ~ 3.000	高い確率で菌種レベルで一致している
2.000 ~ 2.299	確率は少し低いが菌種レベルで一致している
1.700 ~ 1.999	属レベルでは一致している
0.000 ~ 1.699	信頼度が低く、一致とはいえない

表2 質量分析法により得られた *Staphylococcus aureus* の成績

Rank	Matched Pattern	Score Value
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 3463 DSM	2.362
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 THL	2.265
3	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 346 DSM	2.262
4	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	2.167
5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	2.120
6	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 11822 DSM	2.108
7	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 4910 DSM	2.104
8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 THL	2.092
9	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 20232 DSM	1.950
10	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp <i>aureus</i> DSM 20491 DSM	1.939

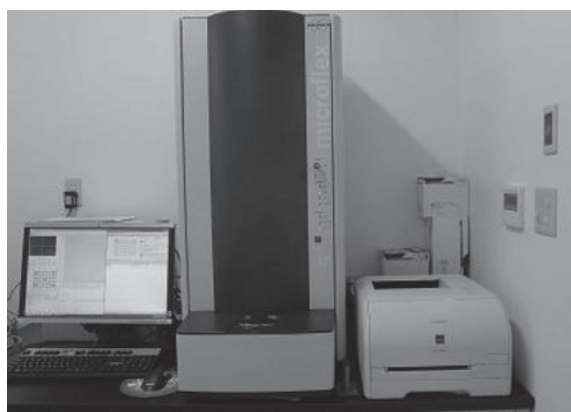


図2 MALDI Biotyper

表3 血液分離菌についての比較成績

従来法による同定菌名と分離株数	質量分析法による同定		
	菌種同定可能	菌属同定可能	他菌種として同定あるいは信頼度の低い同定
<i>Escherichia coli</i>	21	19	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	2	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	8	
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	1	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	6	2 <i>Staphylococcus capitis</i> (2)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	1	
<i>Staphylococcus hominis</i>	4	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)
<i>Staphylococcus hyicus</i>	2	1	<i>Staphylococcus simulans</i> (1)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2	
<i>Enterococcus faecium</i>	2	2	
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	1	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	2	2	
<i>Streptococcus oralis</i>	2		同定不能 (2)
<i>Streptococcus species</i>	2		同定不能 (2)
<i>Peptostreptococcus species</i>	2		同定不能 (2)
<i>Bacillus species</i>	1		1
合 計	76	58	7 11 () 内は株数

を用いたシステム、ブルカー・ダルトニクス社製“MALDI Biotyper”が導入された(図2)。今回、臨床検体より分離された細菌について、本システムを用いた同定結果と従来実施していた方法による同定結果を比較し、質量分析法による菌種同定の有用性について検討した。

対象・方法

(1) 対象

2013年3月から4月の間に当院にて血液より分離された20菌種76株、血液以外の検体より分離された40菌種390株を対象とした。

(2) 細菌の同定法

①従来法

分離培地で発育した集落のグラム染色の結果より、同定キットであるAPI(シスメックス・ピオメリユール)或いは、IDテスト(日水製薬)を使用し、腸内細菌科と判断される場合は、簡易同定としてTSI寒天培

表4 血液以外の検体から分離された細菌についての比較成績

従来法による同定菌名と分離株数	質量分析法による同定			
	菌種同定可能	菌属同定可能	他菌種として同定あるいは信頼度の低い同定	
<i>Citrobacter freundii</i>	6	4	2	0
<i>Citrobacter koseri</i>	7	7	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	2	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	27	10	0	0
<i>Enterobacter asburiae</i>	0	3	2	0
<i>Enterobacter kobei</i>	0	7	1	0
<i>Enterobacter ludwigii</i>	0	3	1	0
<i>Escherichia coli</i>	66	62	3	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	5	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	28	3	1
<i>Morganella morganii</i>	8	8	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	8	8	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	0	0
<i>Providencia rettgeri</i>	1	1	0	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	1	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	8	6	2	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	27	1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	2	0	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	3	2	0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2	2	0	0
<i>Branhamella catarrhalis</i>	3	3	0	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	7	6	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	38	4	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	1	1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	10	0	<i>Staphylococcus capitis</i> (1)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	3	2	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	1	0	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	2	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	1	0	0
<i>Enterococcus avium</i>	3	3	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	23	1	0
<i>Enterococcus faecium</i>	15	15	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	14	12	2	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4	4	0	0
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	1	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	2	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	6	4	2	0
<i>Streptococcus species</i>	4	0	0	<i>Streptococcus bovis</i> (1) <i>Streptococcus salivarius</i> (3)
<i>Corynebacterium striatum</i>	24	21	2	<i>Corynebacterium species</i> (1)
<i>Candida albicans</i>	6	6	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	2	2	0	0
合 計	390	348	33	9 () 内は株数

地, シモンズ・クエン酸ナトリウム培地, OIML 培地を用い, 説明書に従って判定し同定を行った。

② MALDI Biotyper による質量分析法 (MS 法)

血液ボトルの場合は, 培養陽性を確認後, ボトルから培養液を抜き取り遠心した沈渣をターゲットプレートに塗布し, 70%ギ酸とマトリックス試薬を添加し乾燥後, 装置に装填し測定した。血液以外の検体では, 材料を培地に接種し, 翌日発育してきた集落をターゲットプレートに塗布し, マトリックス試薬を添加乾燥させ, 装置に装填し測定した。ムコイドタイプの集落ではマトリックス試薬添加前に, 血液ボトルの場合と同様にギ酸処理を行った。マトリックス試薬添加のみで score value の高い菌種名が表示されない場合には, ギ酸処理を加えて再測定を行った。1 検体を装置に装填するまでに要する時間は, 血液ボトルでは陽性確認後約 20 分, 集落からの場合は約 3 分, 装置に装填後は約 3 分で同定結果が得られる。

結 果

血液から分離された 20 菌種 76 株について, 従来法と MS 法での比較をした成績を表 3 に示した。MS 法により菌種レベルで同定可能であった株は 76 株中 58 株で従来法との一致率は 76.3%であった。属レベルで同定可能であった株は 76 株中 65 株で従来法との一致率は 85.5%であった。MS 法で属レベルでの同定が可能であった *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius* の 4 菌種中 7 株は, MS 法での score value のランク上位 10 菌種のうち半数以上は従来法で同定された菌名と同一菌名であり, 菌種レベルで同定可能であったと考えられる。MS 法で菌種レベルでの同定結果が従来法による菌種名と不一致となった株は *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans* の 3 菌種 4 株であった。従来法で *Streptococcus oralis*, *Streptococcus species*, *Peptostreptococcus species* と同定された 3 菌種 6 株においては, MS 法では結果を得ることが出来なかった。*Bacillus* 属では信頼度の低い同定結果であったが属レベルで一致していた。

血液以外の検体から分離された 40 菌種 390 株について, 従来法と MS 法での比較した成績を表 4 に示した。MS 法により菌種レベルで同定可能であった株は 390 株中 348 株で従来法との一致率は 89.2%であった。属レベルで同定可能であった株は 390 株中 381 株で従来法との一致率は 97.7%であった。MS 法で信頼度が低い同定結果として示された *Escherichia coli*,

Klebsiella oxytoca, *Klebsiella pneumoniae* の 3 菌種中 3 株は, MS 法での結果 score value の上位 10 菌種のうち半数以上は従来法で同定された菌名と同一菌名であった。MS 法で, 菌種レベルでの同定結果が不一致となった株が *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus salivarius*, *Corynebacterium species* の 5 菌種 6 株で認められた。*Streptococcus* 属においては, 従来法で鑑別できなかった 4 株が, MS 法で *Streptococcus bovis*, *Streptococcus salivarius* の同定が可能であった。また, *Enterobacter cloacae* 23 株においても従来法では全て *Enterobacter cloacae* と同定されていたが, MS 法では *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* の鑑別が可能であった。

考 察

当院で血液および血液以外の検体から分離された 47 菌種 466 株における従来法と MS 法による細菌同定結果の一致率は, 菌種レベル 87.1% (406 株/466 株), 属レベル 95.7% (446 株/466 株)であった。他施設の報告においても一致率は, 種レベルでは 80 ~ 90%, 属レベルでは 90%以上との報告が多い^{1~3)}。また, MS 法での同定結果は, 16S rRNA 遺伝子解析と同等の精度評価を受けている²⁾。*Staphylococcus spp.* や腸内細菌科では 90%以上の同定が可能であるが, 遺伝子の相同性が高い *Escherichia coli* と *Shigella spp.* の鑑別や *Streptococcus spp.* においては精度が劣るため血清型などの鑑別が必要であるといわれている⁴⁾。当院で, 肺炎球菌を疑う集落を従来法のオプトヒン感受性検査と MS 法での検査を実施したところ, オプトヒン感受性検査では阻止円を認めなかったが, MS 法では *Streptococcus pneumoniae* (score value は 2.000 以上) と同定された株があった。このような問題点も存在するが, MS 法による菌種同定は, 簡便で迅速性と正確性に優れた検査法であると言える。

また, 検体中に 10^5 CFU/ml 以上の微生物量があれば, 検体を直接ターゲットプレートに塗布して MS 法にて測定することが可能との報告がある⁵⁾。細菌性髄膜炎を疑う症例において, 現状のグラム染色と同時に MS 法による検査を実施することにより迅速に菌種同定が可能となる。

細菌の同定結果を早期に報告できることにより, 患者に対する適切な治療を速やかに実施することが可能となるだけでなく, 耐性菌や医療費の減少にも繋がる事はもちろん, 稀な細菌が検出された場合には, 届

出や感染対策，二次被害の防止など社会的にも貢献できる大きな効果も期待される。

質量分析法による同定検査は，同定精度の向上や耐性菌の検出，疫学調査への活用など様々な研究が行われており，それらの結果も注目されている。

MS法により菌名を迅速に報告することで，今まで以上に医師との連携が可能となり，患者を中心としたチーム医療が出来ると思われる。

ま と め

臨床分離の47菌種466株について，従来法とMS法による菌種同定を行い同定結果を比較した結果，菌種レベルで87.1%，属レベルで95.7%の一致率を認めた。敗血症などの重症細菌感染症においては，早期診断・早期治療が求められるため，迅速な菌種同定結果の報告は適切な抗菌薬の選択に繋がり，患者の予後を大きく改善すると考えられる。MS法は，①16S rRNA 遺伝子解析に近い正確性②集落を塗布するだけの簡便性③塗布から数分で結果が得られる迅速性など優れた細菌同定の方法である。その一方で，鑑別できない菌種もあることを理解して同定を行う必要がある。

このシステムを活用し積極的な情報発信をすることで，医師とより密接な連携が可能となるので，一層臨床に貢献できる細菌検査を行っていきたいと思う。

文 献

- 1) Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. : Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 48 (5) : 1549-1554, 2010
- 2) 曾川一幸, 渡邊正治, 佐藤謙一, 他 : MALDI - TOF Mass Spectrometry と MALDI BioTyper™ を用いた微生物迅速同定法の評価. *JJCLA*, 37 (1) : 65-73, 2012
- 3) 宇木 望, 永沢善三, 草場耕二, 他 : 質量分析装置 MALDI バイオタイパーを使用した各種 ATCC 菌株による同定精度の評価および血液培養ボトルからの直接迅速同定法の有用性に関する検討. *臨床と微生物*, 39 (2) : 185-195, 2012
- 4) 大楠清文 : いま知りたい臨床微生物検査実践ガイド. 大楠清文編, 知っておきたい質量分析法を用いた細菌の同定, 医歯薬出版, 東京, 120-135, 2013
- 5) Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, et al. : Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 48 (6) : 2110-2115, 2010