

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士論文 要旨

MALDI-TOF MS による薬剤耐性菌の迅速検出法の検討

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士課程
領 域 名 感染制御学
学籍番号 HD020001
氏 名 加地 大樹

背景 (Background)

感染症の初期治療では原因菌が特定されていないため Empiric therapy として広域スペクトルを有する抗菌薬が投与される場合がある。しかし、近年、Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) 産生菌などの多剤耐性菌の増加が世界的な問題となり、それらの蔓延を防ぐためにも適切な抗菌薬への de-escalation を早期に実践し Definitive therapy に変更する必要がある。微生物検査への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 spectrometer: MALDI-TOF MS) の普及に伴い、微生物同定検査の迅速化が実現したが、薬剤感受性試験には汎用な迅速検出法はない。

目的 (Objective)

ESBLs 産生菌が産生する β ラクタマーゼ量に着目し、微生物同定検査用の MALDI-TOF MS で β ラクタム系抗菌薬の構造変化を捉えることで迅速に ESBLs 産生性の有無を判別することを目的とした。また、尿検体から直接 ESBLs 産生菌を判別できるかを検討し、臨床応用への可能性を探索した。

方法 (Methods)

標準菌株は、ESBLs 産生株には *Escherichia coli* NCTC13462 を、感性株には *E. coli* ATCC®25922 を用いた。臨床分離株は、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子の保有株を ESBLs 産生株、未保有株を感性株に分類して各菌種 20 株の計 60 株を用いた。MALDI Biotyper®を用い、生理食塩水で調整した試験菌株の菌懸濁液を各抗菌薬が固相されたドライプレートの対象ウェルに添加後、35°C の好気環境下で一定時間接触した培養上清を分析した。また、試験菌株を生理食塩水、Lブロスまたは健常者の尿検体に分散した模擬検体、およびグラム染色で腸内細菌目細菌を認めた尿 15 検体を前処理して、MALDI Biotyper®で分析した。

結果 (Results)

各菌懸濁液を抗菌薬 Cefotaxime (CTX)、Cefpodoxime (CPDX)、Piperacillin (PIPC) または Cefpirome (CPR) に接触させると、非加水分解物由来シグナルはいずれの菌株でも観測され、加水分解物由来シグナルは、ESBLs 産生株でのみ 15 分間の接触時間で観測された。加水分解物由来シグナルを加水分解物由来シグナルと非加水分解物由来シグナルの総和で除した結果、臨床分離株の ESBLs 産生株と感性株をオーバーラップすることなく区別することができた。さらに、模擬検体または尿検体を前処理することで、ESBLs 産生株と感性株を 5 分の接触時間で判別することができ、検出下限の菌量は 10^4 CFU/mL であった。

結論 (Conclusions)

本研究で、MALDI-TOF MS を用い抗菌薬の加水分解産物等を測定することにより、ESBLs 産生菌と感性菌の判別が僅か 15 分で可能であることが明らかとなった。また、模擬感染尿検体を前処理することで、菌株を用いて実施した結果と同様に、培養することなく ESBLs 産生菌による感染か感性菌による感染かを判別できる可能性が示唆された。加水分解酵素による抗菌薬の構造変化を捉える本法は、同様の作用機序で耐性を発現する菌に応用可能であることから、多剤耐性菌の迅速検出に繋がることが示唆された。

キーワード (Key Words)

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) 産生菌、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 (MALDI-TOF MS)、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus mirabilis*、 β ラクタム系抗菌薬