

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

MALDI-TOF MS による薬剤耐性菌の
迅速検出法の検討

2020 年度入学

2023 年 3 月 15 日 博士

医療保健学研究科 医療保健学専攻 感染制御学

学籍番号 HD020001 氏名 加地 大樹

研究指導教員 木村 哲

副研究指導教員 松村 有里子、岩澤 篤郎

| | |
|------|--|
| 論文題目 | MALDI-TOF MS による薬剤耐性菌の迅速検出法の検討 |
| 氏名 | 加地 大樹 |
| 所属 | 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 感染制御学 |
| 助成金 | |

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接種後、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、標準菌株などを混和した L ブロスや尿検体の分散液やグラム染色で腸内細菌目細菌を認めた尿 15 検体を用いて β ラクタマーゼを抽出後、MALDI Biotyper[®]で分析した。

結果 (Results)

抗菌薬 Cefotaxime (CTX)、Cefpodoxime (CPDX)、Piperacillin (PIPC) および Cefpirome

(CPR) を用いると、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。尿検体より β ラクタマーゼの抽出法を用いた結果、臨床分離株同様に ESBLs 産生株と感性株を判別することができ、検出下限の菌量が 10^4 CFU/mL まで捉えられた。

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、模擬感染尿検体より抽出した β ラクタマーゼを用いることで、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

内容

| | |
|--|----|
| 第 1 章 序章 | 1 |
| 第 2 章 MALDI-TOF MS を用いた薬剤耐性菌の迅速検出方法の検討 | 4 |
| 2-1 実験方法 | 4 |
| 2-1-1 試験菌株 | 4 |
| 2-1-2 使用抗菌薬 | 4 |
| 2-1-3 薬剤感受性試験 | 4 |
| 2-1-4 表現型確認検査 | 5 |
| 2-1-5 <i>bla</i> _{CTX-M} group の確認 | 5 |
| 2-1-6 菌株の選定方法 | 5 |
| 2-1-7 MALDI-TOF MS を用いた耐性菌検出の測定方法 | 6 |
| 2-2 結果 | 7 |
| 2-2-1 標準菌株の薬剤感受性の特徴 | 7 |
| 2-2-2 臨床分離株の特徴 | 7 |
| 2-2-3 MALDI Biotyper [®] における CTX の検出 | 8 |
| 2-2-4 内部標準物質の選定 | 9 |
| 2-2-5 βラクタム系抗菌薬および MEPM の MS スペクトル | 9 |
| 2-2-6 抗菌薬と菌懸濁液の接触時間の検討 | 9 |
| 2-2-7 臨床分離株における ESBLs 産生菌検出の検討 | 10 |
| 2-3 考察 | 13 |
| 第 3 章 尿検体を用いた薬剤耐性菌の迅速検出方法の検討 | 16 |
| 3-1 実験方法 | 16 |
| 3-1-1 試験菌株 | 16 |
| 3-1-2 尿検体 | 16 |
| 3-1-3 使用抗菌薬 | 16 |
| 3-1-4 薬剤感受性試験 | 16 |
| 3-1-5 表現型確認検査および保有耐性遺伝子検査 | 17 |
| 3-1-6 βラクタマーゼの抽出方法 | 17 |
| 3-1-7 MALDI-TOF MS を用いた耐性菌検出の測定方法 | 17 |
| 3-2 結果 | 18 |
| 3-2-1 試験菌株の特徴 | 18 |
| 3-2-2 βラクタム系抗菌薬 CPR の MS スペクトル | 18 |
| 3-2-3 模倣尿として L ブロスを用いた結果 | 18 |
| 3-2-4 抗菌薬と菌懸濁液の接触時間の検討 | 18 |
| 3-2-5 標準菌株を添加した分散液を用いた検出下限量の検討 | 19 |
| 3-2-6 臨床菌株を添加した分散液を用いた検出下限量の検討 | 20 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3-2-7 | $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値に対する性別および年齢の影響 | 21 |
| 3-2-8 | $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値に対するグラム陽性球菌の影響 | 21 |
| 3-2-9 | β ラクタマーゼ抽出に使用する検体量の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値に対する影響 | 21 |
| 3-2-10 | 臨床検体を用いた検討 | 22 |
| 3-3 | 考察 | 23 |
| 第4章 | 結論 | 27 |
| | 謝辞 | 28 |
| | 引用文献 | 29 |
| | Figure | 32 |
| | Table | 75 |
| | Abstract | 78 |

第1章 序章

近年、ペニシリン系抗菌薬やセファロスポリン系抗菌薬などの効かない薬剤耐性菌が世界中に拡大している。1961年にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA）¹⁾を検出して以降、1988年にはバンコマイシン耐性腸球菌（Vancomycin-Resistant Enterococci: VRE）を認め、グラム陽性球菌で薬剤耐性菌が拡大していった。一方、グラム陰性桿菌では Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) 産生菌が1980年代ヨーロッパで広がり、続いて米国で感染が拡大し、1990年代後半には Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) の一種である *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) が検出されるなど複数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌^{2,3)}が出現している。

ESBLs 産生菌は、2000年以降に急速に拡大しており、中国やインドでは2014年に *E. coli* のうち50%以上をESBLs 産生菌が占めた⁴⁾。ESBLs 産生菌はヒトの腸管に保管されやすい性質をもつ腸内細菌目細菌に多く出現し、プラスミド上の耐性遺伝子が容易に他の菌種へ水平伝播する性質をもつ。そのため、世界の様々な地域において、腸内細菌目細菌でESBLs 産生菌が検出され感染の拡大が懸念されている⁴⁾。CREは、カルバペネマーゼを産生してカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すのみならず、フルオロキノロン系抗菌薬など他の抗菌薬に対する耐性を獲得していることが多く⁵⁾、感染症が発症すると治療が困難になることから「悪魔の耐性菌」として注目を集めている。また、CREの種類や拡散方法は国や地域によって大きく異なる。カルバペネマーゼは大きく分けて活性中心の構造によってメタロ型とセリン型が存在し、メタロ型の New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM) はインドや東南アジアにおいて腎移植や美容整形手術などの医療関連感染による広がりを見せるのに対し、セリン型の KPC は米国での手術部位感染で発見されて以来、米国北東部や中国での拡大を見せている⁵⁾。日本で検出される多くの CRE は、IMP-型や VIM-型であり、NDM などの他の CRE は海外からの持ち込みで検出される場合が多い⁶⁾。

日本における多剤耐性菌の分離率の推移を厚生労働省院内感染対策サーベイランス (Japan Nosocomial Infections Surveillance: JANIS) の報告データ⁷⁾をもとに Table 1 に示す。諸外国で猛威を振るっている CRE の分離率は、0.27% (2017年) から 0.32% (2021年) と殆ど変化はなく、日本での拡大は今のところ見られない。MRSA の分離率は 6.48% (2017年) から 6.02% (2021年) に減少傾向を示している。MDRP の分離率は 0.05% (2017年) から 0.03% (2021年) となり、2017年以降の分離率は減少傾向を示している。一方、ESBLs 産生菌は、1995年に Toho-1 型 β ラクタマーゼ (CTX-M 型) を産生する株⁸⁾が報告されて以降年々増加傾向にあり、第三世代セファロスポリン耐性 *E. coli* は、2.35% (2017年) から 3.60% (2021年)、第三世代セファロスポリン耐性 *K. pneumoniae* では 0.38% (2017年) から 0.79% (2021年) との分離率となっている。

ESBLs 産生菌に起因する感染症治療には、ペニシリン系抗菌薬やセファロスポリン系抗菌薬は無効であり、重症感染症ではない場合は、カルバペネム系抗菌薬とセファマイシン系抗菌薬が推奨される。重症感染症の場合は、カルバペネム系抗菌薬が選択されることが多い⁹⁾。しかし、広域抗菌薬であるカルバペネム系抗菌薬の投与は、新たな耐性菌を出現させる可能性もある。新たな抗菌薬の開発は停滞しており、既存の抗菌薬が無効な薬剤耐性菌の出現が国際社会で大きな問題となっている。そのため、感染症対策を行う上で ESBLs 産生菌の存在は注視していく必要がある。

2015年に世界保健機関(World Health Organization: WHO)総会で、薬剤耐性(Antimicrobial Resistance: AMR)に関するグローバル・アクションプランが採択された¹⁰⁾。そこでは、薬剤耐性菌による感染の拡大や新たな薬剤耐性菌の出現を押さえ込むために、1) 普及啓発・教育、2) 動向調査・監視、3) 感染予防・管理、4) 抗微生物剤の適正使用、5) 研究開発・創薬が5つの柱として挙げられた。日本では、2016年4月に「国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議」において、「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」が策定された¹²⁾。このアクションプランは、日本が国際社会に対してAMR対策の主導力を発揮すべく、WHOの「薬剤耐性に関するグローバル・アクションプラン」に6) 国際協力を加えた6つの分野に関して、目標の設定、戦略、そして具体的な取組を盛り込んだ内容となっている。この6つの分野の中で薬剤耐性菌の対策では、「抗微生物剤の適正使用」が特に重要となっている。不適切な抗菌薬の使用を減少させるための方策として、各病院において特定の抗菌薬の許可制や届出制の導入等の取り組みが行われている。また、抗微生物剤の適正使用支援の取組を目指し、2017年に公益社団法人日本化学療法学会を含む8学会が共同で「抗菌薬適正使用支援プログラム(Antimicrobial Stewardship Program: ASP)実践のためのガイダンス」を公表し、抗菌薬処方での適正使用を推進するための組織的な取組が行われるようになった¹²⁾。さらに2018年には、AMR対策を推進する目的と抗菌薬の適正支援の推進の観点から「抗菌薬適正支援加算」が新設される¹³⁾など、抗菌薬の適正な使用に関する取り組みが行われている。

医療機関において、何らかの感染症に罹患した患者が来院した場合、原因菌が明らかになっていることは少なく、多くの場合 empiric therapy として広域な抗菌薬が投与される。細菌検査室では、提出された検体は培地に塗布され、35°Cの好気培養条件下で16~18時間分離培養される。発育したコロニーを用いて生化学的性状確認試験や凝集試験などの同定検査と、感染症の治療に有効な抗菌薬を選択するための薬剤感受性試験が実施される。判定には検体提出より32~36時間を要する。薬剤感受性試験の判定は、Clinical laboratory standards institute: CLSI の Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing に基づく微量液体希釈法で測定された最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)から、感性: Susceptible、中等度耐性: Intermediate、耐性: Resistant のカテゴリーに判別される。特に、ESBLs産生菌が疑われた場合、Fig.1に示すように薬剤感受性試験の再検査が必要となり、詳細な薬剤耐性菌のスクリーニング試験が実施され検体提出より48~54時間後に判定される。ここでESBLs産生菌の可能性が疑われた株は、さらに確認試験が実施され、検体提出より64~72時間後にESBLs産生菌であることが確定される。これらの細菌検査結果が臨床に報告されると、臨床ではde-escalationされ、処方される抗菌薬が適切なものに変更されたdefinitive therapyが行われる。しかし、臨床医に検査結果が届くまでには検体が提出されてから早くても3日かかり、多剤耐性が疑われる菌が検出された場合には薬剤感受性試験の再検査や薬剤耐性の確認試験等を行った後に検査結果を最終報告するため5日以上を要するのが現状である。ASP実践の観点からも、薬剤感受性試験の迅速な結果報告が必要となる。

2007年、微生物学的検査の中で、同定検査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計(Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometer: MALDI-TOF MS)が導入された。MALDI-TOF MSでは、パルス状の紫外線レーザー(主に窒

素)をマトリックスに照射することで、マトリックスと試料間でのプロトン供授が起こり、試料がイオン化された後、イオンの飛行時間から分子の質量情報を得ている¹⁴⁾。主に細胞のリボソーム由来タンパクの質量情報が菌種により異なることを利用して、得られたマスマスペクトルパターンとデータベースに構築されたマスマスペクトルパターンとのパターンマッチングにより菌種の同定が行われている。現在、MALDI Biotyper[®] (ブルカー・ダルトニクス株式会社)とVITEK[®] MS (ビオメリユー・ジャパン株式会社)の2機種が臨床で使用できるMALDI-TOF MSとして販売されている。従来法で10時間ほど要した同定検査に比べて、わずか数分で測定が終了し、迅速に結果が得られるのが特徴である。さらに、従来法に比べて同定可能な菌種が豊富である。測定にはコロニーをターゲットプレートに塗布するための爪楊枝とマトリックスおよびマトリックスを接種するためのチップのみが必要であり、MALDI-TOF MSによる同定検査は、従来法より費用面においても試薬代や労務費の大幅な削減が可能となるものである^{15,16)}。一方、薬剤耐性菌の新たな検出方法としてMALDI-TOF MSを用いた研究が盛んに行われている。これまでに、特異的なピークを検出することでMRSAとメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: MSSA)を迅速に識別する方法¹⁷⁾がある。また、 β ラクタマーゼによる β ラクタム系抗菌薬の加水分解物からCRE¹⁸⁾やESBLs産生菌^{19,20)}を検出する方法が報告されているが、試薬の使用期限が短いこと、培養時間が4時間ほどかかることから汎用されていないのが現状である。池ヶ谷らは、ドライプレート‘栄研’DPD-1(栄研化学株式会社)に固相された抗菌薬Cefotaxime (CTX)とESBLsを産生する*E. coli*を用いて、 β ラクタマーゼが引き起こす抗菌薬の加水分解物をVITEK[®]MSで捉えることで、わずか15分間の培養で薬剤耐性菌を検出できる方法を見出した²¹⁾。

以上のように、薬剤耐性菌の迅速検出に関する多くの研究が行われているが、実用化された方法はなく、臨床応用可能な方法の構築が求められている。第2章では、ESBLs産生菌の迅速検出法の確立を目指し、ESBLsを産生する*E. coli*標準菌株を用いて、MALDI Biotyper[®]で4種の β ラクタム系抗菌薬の β ラクタマーゼによる加水分解物の検出方法を検討し、感性菌とESBLs産生菌の判別が15分で可能であることを見出した。次に、臨床分離株への適用が可能であるか*E. coli*の臨床分離株を用いて検討するとともに、临床上重要な*K. pneumoniae*、*Proteus mirabilis*を用いて、4種の β ラクタム系抗菌薬に対して*E. coli*と同様の検討を行いこの迅速検出法が有用であることが示された。第3章では、第2章で使用した菌株が抗菌薬と15分間の接触時間でESBLs産生菌の薬剤感受性試験結果で同じ抗菌薬のMICを示しているが、MALDI-TOF MSで得られた抗菌薬の加水分解物由来シグナル量が異なるものが見られたので、この違いが酵素量あるいは酵素活性の違いに起因するものと考え、 β ラクタマーゼ抽出を行いMALDI-TOF MSで測定できるか試みた。また、この抽出法を臨床に応用すべく尿検体からESBLs産生菌の判別が出来ないか検討した。第4章では、第2章と第3章より得られた結果を総括し、今後の展望を述べる。

本研究で使用する β ラクタム系抗菌薬とその組成式および精密質量を一覧Fig. 2に示す。

第2章 MALDI-TOF MS を用いた薬剤耐性菌の迅速検出方法の検討

池ヶ谷らが VITEK[®]MS で構築した方法²¹⁾は、CTX の非加水分解物由来シグナルと ESBLs 産生菌が産生する βラクタマーゼにより CTX の化学構造が変化した加水分解物由来のシグナルを捉えることで、*E. coli* が ESBLs 産生株であるか否かを迅速に判定できる方法である。

本章では、ESBLs 産生菌の迅速検出法の確立を目指し、ESBLs を産生する *E. coli* 標準菌株を用いて、MALDI Biotyper[®]で4種のβラクタム系抗菌薬のβラクタマーゼによる加水分解物の検出方法を検討し、感性菌と ESBLs 産生菌の判別を行った。さらに、臨床分離株への適用が可能であるかを臨床重要な *K. pneumoniae*、*P. mirabilis* を用いて、4種のβラクタム系抗菌薬に対して *E. coli* と同様の検討を行った。

2-1 実験方法

2-1-1 試験菌株

標準菌株は、ESBLs 産生株として *E. coli* NCTC13462 を、感性株として *E. coli* ATCC[®]25922 を使用した。臨床分離株は、CLSI ドキュメント (Fig. 1) に記載されている *E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* の3菌種とし、標準菌株は *E. coli* の感性株と ESBLs 産生株を用い、臨床分離株はいずれの菌種も感性株10株と ESBLs 産生株10株の合計20株を用いた。臨床における *K. pneumoniae* と *P. mirabilis* の ESBLs 産生株の検出数が *E. coli* に比べて少ないことから、菌株収集期間は2014年1月から2018年12月の5年間とした。実験には、-80℃で凍結保存された菌株をトリプチケースソイ5%血液寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社：日本BD)に塗布後、35℃で一晩好気培養したコロニーを用いた。

2-1-2 使用抗菌薬

薬剤感受性試験に使用した抗菌薬を以下に示す。

Ampicillin (ABPC)、Amikacin (AMK)、Aztreonam (AZT)、Ceftazidime (CAZ)、Cefditoren (CDTR)、Cefazolin (CEZ)、Cefepime (CFPM)、Cefmetazole (CMZ)、Cefpodoxime-proxetil (CPDX-PR)、Cefpirome (CPR)、Cefotiam (CTM)、Ceftriaxone (CTRX)、Cefotaxime (CTX)、Gentamicin (GM)、Imipenem (IPM)、Latamoxef (LMOX)、Levofloxacin (LVFX)、Ciprofloxacin (CPFX)、Meropenem (MEPM)、Minomycin (MINO)、Piperacillin (PIPC)、Sulbactam/Ampicillin (SBT/ABPC)、Sulbactam/Cefoperazone (SBT/CPZ)、Sulfamethoxazole-Trimethoprim (ST)、Tazobactam/Piperacillin (TAZ/PIPC)。

MALDI-TOF MS による薬剤耐性菌の検出には、ドライプレート‘栄研’DPD-1 (栄研化学株式会社) に固相されている中から以下の13種を用いた。CTX、CPDX、ABPC、PIPC、IPM、AZT、SBT/CPZ、GM、AMK、MINO、LVFX、Flomoxef (FMOX)、Fosfomycin (FOM)。

2-1-3 薬剤感受性試験

実験に供した微生物の薬剤感受性は、以下に示す方法で判定した。BD フェニックス[™] グラムネガティブ NMIC-207 パネル(日本BD)を用い、全自動同定感受性検査システム BD フェニックス(日本BD) 微量液体希釈法で MIC を測定した後、CLSI M07-A9 M100-S22²²⁾ に準拠して MIC をもとに感性：Susceptible、中等度耐性：Intermediate、耐性：Resistant のカテゴリーに分けた。対象抗菌薬は、ペニシリン系抗菌薬の ABPC、PIPC、ペニシリン系抗

菌薬合剤の SBT/ABPC、SBT/CPZ、TAZ/PIPC、セファロsporin系抗菌薬の CEZ、CTM、CTX、CAZ、CPDX、CTRX、CDTR、CPR、セファマイシン系抗菌薬の CMZ、オキサセフェム系抗菌薬の LMOX、モノバクタム系抗菌薬の AZT、カルバペネム系抗菌薬の IPM、MEPM、アミノ配糖体抗菌薬の AMK、GM、ニューキノロン系抗菌薬の LVFX、CPFX、テトラサイクリン系抗菌薬の MINO、ST 合剤の ST とした。

2-1-4 表現型確認検査

AmpC 型 β ラクターゼの過剰産生菌は、ESBLs 産生菌と同じく CTX などの第 3 世代セファロsporin系抗菌薬に耐性を示す。実験に供した微生物の表現型は、AmpC/ESBL 鑑別ディスク（関東化学株式会社）を使用して以下に示す方法で確認した。生理食塩水で McFarland 0.5 に調整した試験菌株の懸濁液を滅菌綿棒でミューラヒントン寒天培地（日本 BD）に 3 方向から塗布した後、薬剤含有ディスクを設置した。35~37°C の好気環境下で 18~24 時間培養後、阻止円径を測定した（Fig. 3）。すべてのディスクに対する阻止円径の差が 2 mm 以下のものを感性感株とした。次に、ESBLs 阻害剤無ディスク A を基準に阻害剤含有ディスク B との阻止円径の差が 5 mm 以上であり、ESBLs 阻害剤無・AmpC 阻害剤含有ディスク C を基準に ESBLs 産生菌阻害剤と AmpC 阻害剤の含有ディスク D との阻止円径の差が 5 mm 以上であること、およびディスク A とディスク C の阻止円径の差とディスク B とディスク D の阻止円径の差が 4 mm 以下のものを陽性と判定した。

2-1-5 *bla*_{CTX-M} group の確認

生理食塩水で McFarland 0.5 に調整した試験菌株の懸濁液 10 μ L を、シカジーニマス[®]DNA 抽出試薬（関東化学株式会社）100 μ L と混合し、72°C で 20 分のインキュベート、94°C で 3 分のインキュベート後、15,000 rpm で 1 分間遠心分離した上清を核酸抽出液とした。*bla*_{CTX-M} group の判別には、シカジーニマス[®]ESBL 遺伝子型検出キット（関東化学株式会社）を用いた。*bla*_{CTX-M-1} group と *bla*_{CTX-M-9} group のプライマーが入った Reaction mixture 1 と *bla*_{CTX-M-2} group と *bla*_{CTX-M-8} group のプライマーが入った Reaction mixture 2 の 2 種類を調整し、Light Cycler[®]96（ロシュ・ダイアグノスティック株式会社）を用いて、DNA の熱変性を 94°C で 15 秒、アニーリングを 66°C で 15 秒、DNA 鎖の伸張反応を 72°C で 40 秒の 3 段階増幅を 30 サイクル行った。アガロースゲル電気泳動には、2%アガロースゲル（関東化学株式会社）を作成し、電気泳動装置：Mupid[®]-2plus（株式会社ミューピッド）で 100 V で 30 分間泳動後、臭化エチジウム溶液に 30 分間浸漬させて DNA を染色した。その後、トランスイルミネーターで観察し、688 bp (*bla*_{CTX-M-1} group)、404 bp (*bla*_{CTX-M-2} group)、246 bp (*bla*_{CTX-M-8} group)、565 bp (*bla*_{CTX-M-9} group) にバンドが認められた株を *bla*_{CTX-M} 型遺伝子保有株とした（Fig. 4）。

2-1-6 菌株の選定方法

Fig. 5 のフローに従い、2-1-3 の薬剤感受性試験の検査後、薬剤耐性菌が疑われた菌に関して、2-1-4 の表現型確認検査である AmpC/ESBL 鑑別ディスクを実施し、ESBLs 産生菌疑い株を選別する。その後、2-1-5 の *bla*_{CTX-M} group の確認の確認をシカジーニマス[®]ESBL 遺伝子型検出キットで用いて、ESBLs 産生菌と感性感株を選定した。なお、本研究では、

AmpC/ESBL 鑑別ディスクで判別が困難な CTX や CPDX の MIC が低い ESBLs 産生菌の存在も考え、全株に関してシカジーニアス®ESBL 遺伝子型検出キットで *bla*_{CTX-M} group の確認を行った。

2-1-7 MALDI-TOF MS を用いた耐性菌検出の測定方法

生理食塩水で McFarland 1 に調整した試験菌株の懸濁液を、ドライプレート‘栄研’DPD-1 の CTX : 32 µg/mL、CPDX : 32 µg/mL、ABPC : 32 µg/mL、PIPC: 32 µg/mL のウエルに 100 µL、Ceftaxime-Clavulanate (CTX/CLA) : 4 µg/mL/4 µg/mL、Cefpodoxime-Clavulanate (CPDX/CLA) : 4 µg/mL/4 µg/mL のウエルに 25 µL、MEPM: 16 µg/mL のウエルに 50 µL 添加した。35°Cの好気条件下で一定時間培養後、試料上清 3 µL をターゲットプレート MSP 96 target polished steel BC (ブルカー・ダルトニクス株式会社) に塗布して乾燥させ、内部標準物質溶液 1 µL、マトリックス溶液 1 µL を重層して自然乾燥させ、MALDI-TOF MS の測定試料とした。マトリックス溶液は、2-Cyano-4-hydroxycinnamate (HCCA) を 50% Acetonitrile、49.9% HPLC-grade water、0.1% Trifluoroacetic acid の混合溶液 250 µL に溶解して調整した。MALDI-TOF MS には MALDI Biotyper®を使用し、150~1,000 Da の範囲で検出した。なお、キャリブレーションは HCCA にて行った。

2-2 結果

2-2-1 標準菌株の薬剤感受性の特徴

標準菌株として使用した *E. coli* ATCC®25922 と *E. coli* NCTC13462 の微量液体希釈法による各抗菌薬に対する MIC 値と ESBLs 表現型確認検査の結果および *bla*_{CTX-M} 型遺伝子保有の有無を Table 2 に示す。感性株の *E. coli* ATCC®25922 では、本研究で検討したペニシリン系抗菌薬の ABPC、PIPC、ペニシリン系抗菌薬合剤の SBT/ABPC、SBT/CPZ、TAZ/PIPC、セファロsporin系抗菌薬の CEZ、CTM、CTX、CAZ、CPDX、CTRX、CDTR、CPR、セファマイシン系抗菌薬の CMZ、オキサセフェム系抗菌薬の LMOX、モノバクタム系抗菌薬の AZT、カルバペネム系抗菌薬の IPM、MEPM、アミノ配糖体の AMK、GM、ニューキノロン系抗菌薬の LVFX、CPFEX、テトラサイクリン系抗菌薬の MINO、ST 合剤の ST のすべての抗菌薬に対して感性を示した。一方、ESBLs 産生株の *E. coli* NCTC13462 では、ペニシリン系抗菌薬の ABPC、PIPC、ペニシリン系抗菌薬合剤の SBT/ABPC、SBT/CPZ、セファロsporin系抗菌薬の CEZ、CTM、CTX、CAZ、CPDX、CTRX、CDTR、CPR、モノバクタム系抗菌薬の AZT、アミノ配糖体の GM、ST 合剤の ST に対して耐性を示したものの、カルバペネム系抗菌薬の IPM、MEPM、ペニシリン系抗菌薬合剤の TAZ/PIPC、セファマイシン系抗菌薬の CMZ、オキサセフェム系抗菌薬の LMOX、アミノ配糖体の AMK、ニューキノロン系抗菌薬の LVFX、CPFEX、テトラサイクリン系抗菌薬の MINO に対して感性を示した。

ESBLs 表現型確認検査では、感性株の *E. coli* ATCC®25922 において阻止円径は、A : 24 mm、B : 24 mm、C : 26 mm、D : 26 mm となり、4 つのディスク間の差は 2 mm 以下で陰性と判定された。一方、ESBLs 産生株の *E. coli* NCTC13462 の阻止円径は、A : 6 mm、B : 15 mm、C : 7 mm、D : 17 mm となり、ESBLs 産生株の基準を満たす結果を示し、ESBLs 表現型確認検査は陽性と判定された (Fig. 3)。

マルチプレックス PCR による *bla*_{CTX-M} 型遺伝子保有の有無を Fig. 4 に示す。感性株の *E. coli* ATCC®25922 ではバンドが見られなかったのに対し、ESBLs 産生株の *E. coli* NCTC13462 では CTX-M-2 に相当する 404 bp にバンドが認められ、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子保有株であることが確認された。

2-2-2 臨床分離株の特徴

本研究で使用した臨床分離株は、君津中央病院で 2014 年 1 月から 2018 年 12 月までに臨床で分離された 89,717 菌株のうち、薬剤感受性試験を実施した 29,480 株の中から *E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* を各 20 株選定した。そのうち、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子を保有しない *E. coli* 10 株、*K. pneumoniae* 10 株、*P. mirabilis* 10 株の計 30 株を感性株として扱い、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子を保有する *E. coli* 10 株、*K. pneumoniae* 10 株、*P. mirabilis* 10 株の計 30 株を ESBLs 産生株として扱うこととした。なお、各菌株ともに分離日の新しい株から 10 番目までを実験に用いた。選定した臨床分離株について、標準菌株と同様に微量液体希釈法による薬剤感受性試験、ESBLs 表現型確認検査、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子保有の有無を確認した。臨床分離株 *E. coli* の ESBLs 産生株は、薬剤感受性試験で ABPC、PIPC、CTX、CPDX に対して全株で耐性を示し、LVFX と MINO に対して一部の株で耐性を認め、TAZ/PIPC、CMZ、LMOX、IPM、MEPM、AMK に対して全株で感性を示した。AmpC/ESBL 鑑別ディスクを用いた表現型確認検査では、すべての株で判定基準を満たす結果となり、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子として

CTX-M-1 型は 4 株、CTX-M-8 型は 2 株、CTX-M-9 型は 4 株で保有が確認された。一方感性株は、薬剤感受性試験ではすべての抗菌薬に対して感性を示し、表現型確認検査でもすべての株において 4 つのディスク間の差は 2 mm 以下となり陰性と判定され、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子の保有も確認されなかった。次に臨床分離株 *K. pneumoniae* の ESBLs 産生株は、薬剤感受性試験では ABPC、PIPC、CTX、CPDX に対して全株で耐性を示し、LVFX に対して 2 株で耐性を認め、TAZ/PIPC、CMZ、LMOX、IPM、MEPM、AMK、MINO に対して全株で感性を示した。AmpC/ESBL 鑑別ディスクを用いた表現型確認検査では、すべての株で判定基準を満たす結果となり、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子として CTX-M-1 型は 3 株、CTX-M-9 型は 7 株で保有が確認された。一方感性株は、薬剤感受性試験では自然耐性を示す ABPC 以外はすべての抗菌薬に対して感性を示し、表現型確認検査でもすべての株で 4 つのディスク間の差は 2 mm 以下で陰性と判定され、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子の保有も確認されなかった。次に臨床分離株 *P. mirabilis* の ESBLs 産生株は、薬剤感受性試験では、ABPC、PIPC、CTX、CPDX、MINO に対して全株で耐性を示し、LVFX に対して 7 株で耐性を認め、TAZ/PIPC、CMZ、LMOX、IPM、MEPM、AMK に対して全株で感性を示した。AmpC/ESBL 鑑別ディスクを用いた表現型確認検査では、すべての株で判定基準を満たす結果となり、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子として CTX-M-2 型は全株で保有が確認された。一方感性株は、薬剤感受性試験では自然耐性を示す MINO 以外はすべての抗菌薬に対して感性を示し、表現型確認検査でもすべての株において 4 つのディスク間の差は 2 mm 以下となり陰性と判定され、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子保有の有無も確認されなかった。

2-2-3 MALDI Biotyper[®]における CTX の検出

CTX を生理食塩水と 30 分間接触させたときの MS スペクトルを Fig. 6(a) に示す。MS スペクトルには 379.1 Da にマトリックスの分子イオンシグナル ($[2M + H]^+$) が観測され、455.9 Da と 477.8 Da に CTX の非加水分解物由来のシグナルが観測された。次に標準菌株 *E. coli* ATCC[®]25922 または *E. coli* NCTC13462 を McFarland 1 に調整した菌懸濁液を生理食塩水と同様に 30 分間接触させたときの MS スペクトルを Fig. 6(b,c) に示す。感性株の *E. coli* ATCC[®]25922 と接触すると、CTX の非加水分解物由来のシグナルである 456.0 Da と 478.0 Da にシグナルが観測された。一方、ESBLs 産生株の *E. coli* NCTC13462 と接触すると、455.9 Da に CTX の非加水分解物由来のシグナルが観測されたのに加えて、370.1 Da と 414.0 Da に CTX の加水分解物由来のシグナルが観測された。

感性株の *E. coli* ATCC[®]25922 と ESBLs 産生株の *E. coli* NCTC13462 を CTX と接触させたときの相対シグナル強度と接触時間との関係を Fig. 7 に示す。ここで、観測された各シグナル強度はマトリックスのシグナル強度で標準化して相対シグナル強度とした。CTX の非加水分解物由来の 456 Da の相対シグナル強度を、接触時間が 15 分間、30 分間、60 分間の順で確認すると、感性株では 1.37、1.49、1.40 とほぼ一定であったのに対し、ESBLs 産生株では 0.79、0.81、0.57 となった。CTX の加水分解物由来の 370 Da の相対シグナル強度を、接触時間が 15 分間、30 分間、60 分間の順で確認すると、感性株ではどの時間も 0 で推移したのに対し、ESBLs 産生株では 0.57、0.56、0.51 であった。

MALDI Biotyper[®] のターゲットプレートに接種する試料上清のサンプル接種量と CTX 非加水分解物由来の相対シグナル強度との関係を Fig. 8 に示す。456 Da の相対シグナル強度

は、サンプル接種量が 1 μL 、2 μL 、3 μL 、4 μL の順で 1.52、1.22、2.38、2.23 となった。478 Da の相対シグナル強度はサンプル接種量が 1 μL 、2 μL 、3 μL 、4 μL の順で 0.65、0.30、31.41、1.52 となった。いずれの相対シグナル強度もサンプル接種量が 3 μL と 4 μL で高い値となった。用いる測定機器の種類により最適な試料接種量が存在し、VITEK[®] MS では 4 μL ²¹⁾であるのに対し MALDI Biotyper[®]では 3 μL であった。

2-2-4 内部標準物質の選定

内部標準物質の選定には、利便性を考えドライプレート‘栄研’DPD-1 に固相された抗菌薬で、本研究対象の抗菌薬を除く 9 薬剤を候補とした。この 9 薬剤を生理食塩水と 30 分間接触させると、IPM は 300.1 Da に、AZT は 455.2 Da に、SBT/CPZ は 455.0 Da に各抗菌薬の非加水分解物由来のシグナルが観測された。それ以外の 6 薬剤に関しては、各抗菌薬の非加水分解物由来のシグナルは観測されなかった。残る 3 薬剤のうち AZT と SBT/CPZ の MS スペクトルには CTX の非加水分解物由来シグナルである 456 Da 付近にシグナルが観測されたことから除外され、内部標準物質として IPM が最も適切であることが判明した。IPM の MS スペクトルを Fig. 9 に示す。

2-2-5 β ラクタム系抗菌薬および MEPM の MS スペクトル

上述の CTX と同系統であるセファロsporin系抗菌薬の CPDX、ペニシリン系抗菌薬の PIPC、ESBLs 産生菌による加水分解の影響を受けないカルバペネム系抗菌薬の MEPM の 4 薬剤を使用したときの MS スペクトルを Fig. 10-12 に示す。いずれの抗菌薬を用いても、すべての測定条件下で 379.1 Da にマトリックスの分子イオンシグナル ($[2M+H]^+$) が観測された。各抗菌薬の非加水分解物由来のシグナルは、Fig. 10(a)と Fig. 11(a)に示すように、CPDX では 428.0 Da、PIPC では 539.6 Da、MEPM では 406.2 Da に観測された。感性株の *E. coli* ATCC[®]25922 の菌懸濁液と 30 分間接触すると、いずれの抗菌薬でも生理食塩水と接触したときと同じ質量数にシグナルが観測された (Fig. 10(b), Fig. 11(b))。一方、ESBLs 産生株の *E. coli* NCTC13462 の菌懸濁液と接触すると、CPDX では非加水分解物由来の 428.0 Da に加えて 370.1 Da に加水分解物由来シグナルが観測された (Fig. 10(c))。PIPC では非加水分解物由来の 539.7 Da に加えて 579.6 Da に加水分解物由来シグナルが観測された (Fig. 11(c))。MEPM では、いずれの *E. coli* の菌懸濁液と接触しても、生理食塩水と接触したときと同じ非加水分解物由来のシグナルが観測され、加水分解物由来のシグナルは観測されなかった (Fig. 12)。

2-2-6 抗菌薬と菌懸濁液の接触時間の検討

CPDX、PIPC および MEPM で観測されたシグナルが、CTX で決定した 15 分間の接触時間でも検出されるか *E. coli* 標準菌株を用いて検討した。菌懸濁液と 15 分間または 30 分間接触したときの各シグナル強度を内部標準物質 IPM のシグナル強度で標準化し、相対シグナル強度 ($I_x : x$ は質量数) として Fig. 13-15 に示す。

CPDX の 428 Da における非加水分解物由来の相対シグナル強度 I_{428} は、Fig. 13 に示すように、感性株を用いると 15 分間、30 分間の接触時間では、1.15 と 1.16 であったのに対し、

ESBLs 産生株を用いると 0.94 と 1.16 とわずかに 30 分間の接触の方が高い値となった。加水分解物由来の 370 Da における相対シグナル強度 I_{370} は、感性株では 0.05 と接触による影響は認められなかったのに対し、ESBLs 産生株を用いた場合 15 分間、30 分間の接触では、0.42、0.45 であった。また、ESBLs 産生株と感性株とで比較すると、 I_{370} は 15 分の接触時間でも ESBLs 産生株の方が感性株より高かった。

PIPC の非加水分解物由来シグナルの I_{540} は、15 分間、30 分間と接触時間を長くすると、感性株では 0.33 と 0.63、ESBLs 産生株では、0.55 と 0.54 とどちらの株もほぼ差のない結果であった (Fig. 14)。PIPC の加水分解物由来シグナルの I_{580} は、感性株では 15 分間と 30 分間いずれの接触時間でも 0 に近い値であり、ESBLs 産生株ではいずれの接触時間でも 0.07 となり、15 分間の接触時間でも ESBLs 産生株は感性株より高い値であった。

最後に MEPM では、非加水分解物由来シグナル I_{406} は、15 分間と 30 分間の接触時間の順に感性株では 0.22 と 0.12 となり、ESBLs 産生株では、0.12 と 0.11 となり、株による値の違いはなかった。加水分解物由来シグナルの I_{358} は、30 分間接触してもいずれの株でも検出されなかった (Fig. 15)。

2-2-7 臨床分離株における ESBLs 産生菌検出の検討

本節では、臨床分離株を使用した時の ESBLs 産生菌検出の結果を示す。*E. coli* 標準菌株を使用したときと同様の方法で測定し、各抗菌薬の非加水分解物由来の相対シグナル強度と加水分解物由来の相対シグナル強度との関係を抗菌薬別に Fig. 15-18 に示す。なお、相対シグナル強度 (I_x ; x は観測される質量電荷比) は $\text{means} \pm \text{SD}$ で記載する。

抗菌薬として CTX を用いると、Fig. 16(b) に示すように、臨床分離株 *E. coli* では、CTX 非加水分解物由来の 456 Da のシグナルはいずれの株でも検出され、 I_{456} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株では 2.44 ± 0.66 と 2.03 ± 0.54 と、ESBLs 産生株の 1.72 ± 0.41 と 1.79 ± 0.19 よりわずかに高い値となった。一方、CTX 加水分解物由来シグナルの 370 Da のシグナルは感性株では検出されず、ESBLs 産生株の I_{370} は、それぞれの接触時間で 0.74 ± 0.19 と 0.68 ± 0.19 となり、15 分間の接触時間でも *E. coli* 標準菌株と同程度の値となった。*K. pneumoniae* を用いると、Fig. 16(c) に示すように、 I_{456} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株で 5.34 ± 1.54 と 3.75 ± 1.67 、ESBLs 産生株では 2.56 ± 1.25 と 2.50 ± 0.70 となり、*E. coli* 標準菌株より高い値を示した。一方、 I_{370} は、*E. coli* 標準菌株と同様に感性株では検出されなかったのに対し、ESBLs 産生株はそれぞれの接触時間で 1.14 ± 0.28 と 1.48 ± 0.37 と *E. coli* 標準菌株と同程度の値を示した。*P. mirabilis* を用いると、Fig. 16(d) に示すように、 I_{456} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株で 3.61 ± 1.11 と 3.65 ± 0.82 、ESBLs 産生株で 2.69 ± 0.91 と 3.19 ± 0.57 と *K. pneumoniae* 程ではないが *E. coli* 標準菌株より高い値となった。 I_{370} は、*E. coli* 標準菌株と同様に感性株では検出されなかったのに対し、ESBLs 産生株はそれぞれの接触時間で 1.96 ± 0.50 と 2.86 ± 0.50 と *E. coli* 標準菌株より高い値であった。

CPDX を用いると、Fig. 17(b) に示すように、臨床分離株 *E. coli* では CPDX 非加水分解物由来の 428 Da はいずれの株でも検出され、 I_{428} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株で 2.50 ± 0.76 と 2.62 ± 0.39 、ESBLs 産生株の 1.95 ± 0.44 と 2.14 ± 0.46 より高い値であった。一方、加水分解物由来シグナルの 370 Da のシグナルは感性株では検出されず、ESBLs 産生株の I_{370} は、それぞれの接触時間で 0.58 ± 0.18 と 0.59 ± 0.17 と高い結果を示し、*E. coli* 標準菌株

と同程度の値であった。*K. pneumoniae* を用いると、Fig. 17(c)に示すように、 I_{428} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株で 5.00 ± 1.01 と 4.62 ± 0.82 、ESBLs 産生株では 3.16 ± 0.70 と 3.50 ± 0.76 となり、*E. coli* 標準菌株より高い値を示した。一方、 I_{370} は、*E. coli* 標準菌株と同様に感性株では検出されなかったのに対し、ESBLs 産生株ではそれぞれの接触時間で 1.17 ± 0.38 と 1.33 ± 0.59 と *E. coli* 標準菌株より高い値となった。*P. mirabilis* を用いると、Fig. 17(d)に示すように、 I_{428} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株で 3.53 ± 1.63 と 3.83 ± 1.06 、ESBLs 産生株で 4.13 ± 1.81 と 3.27 ± 0.99 と *K. pneumoniae* 程ではないが *E. coli* 標準菌株より高い値となった。 I_{370} は、*E. coli* 標準菌株と同様に感性株では検出されなかったのに対し、ESBLs 産生株はそれぞれの接触時間で 2.57 ± 1.06 と 2.45 ± 0.87 と *E. coli* 標準菌株より高い値であった。

PIPC を用いると、Fig. 18(b)に示すように、臨床分離株 *E. coli* では PIPC 非加水分解物由来の 540 Da はいずれの株でも検出され、 I_{540} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株の方で 1.54 ± 0.70 と 1.22 ± 0.35 、ESBLs 産生株の 0.96 ± 0.52 と 0.89 ± 0.58 より高い値であった。一方、加水分解物由来シグナルの 580 Da におけるシグナルは感性株では検出されず、ESBLs 産生株では、 I_{580} はそれぞれの接触時間で 0.31 ± 0.11 と 0.40 ± 0.15 であり、*E. coli* 標準菌株と同程度の値であった。*K. pneumoniae* を用いると、Fig. 18(c)に示すように I_{540} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に、感性株で 2.23 ± 0.62 と 2.50 ± 0.43 、ESBLs 産生株では 1.47 ± 0.17 と 1.14 ± 0.34 となり、*E. coli* 標準菌株より高い値を示した。一方、 I_{580} は、*E. coli* 標準菌株と同様に感性株では検出されなかったのに対し、ESBLs 産生株ではそれぞれの接触時間で 0.50 ± 0.20 と 0.79 ± 0.37 と *E. coli* 標準菌株より高い値となった。*P. mirabilis* を用いると、Fig. 18(d)に示すように、 I_{540} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株で 2.06 ± 0.81 と 2.46 ± 0.48 、ESBLs 産生株で 1.14 ± 0.56 と 1.39 ± 0.27 となり、*K. pneumoniae* 程ではないが *E. coli* 標準菌株より高い値となった。 I_{580} は、*E. coli* 標準菌株と同様に感性株では検出されなかったのに対し、ESBLs 産生株はそれぞれの接触時間で 0.63 ± 0.23 と 0.87 ± 0.21 と *E. coli* 標準菌株より高い値であった。

MEPM は Fig. 19 に示すように、*E. coli* の非加水分解物由来の 406 Da のシグナルはいずれの株でも検出され、 I_{406} は接触時間が 15 分間、30 分間の順に感性株で 0.40 ± 0.11 と 0.37 ± 0.15 、ESBLs 産生株 0.27 ± 0.06 と 0.34 ± 0.12 となり、*E. coli* 標準菌株とほぼ同じ値であった。加水分解物由来の 358 Da のシグナルは、感性株と ESBLs 産生株のいずれにおいても検出されなかった。*K. pneumoniae* と *P. mirabilis* を用いても同様の結果であった。

次に *E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* の臨床分離株に対して、加水分解物由来の相対シグナル強度を非加水分解物由来の相対シグナル強度で除することで相対シグナル強度比を算出し、加水分解物の存在比を明確化した。各抗菌薬に対して以下に示す式を用いて算出し、means \pm SD で表記した。CTX は I_{370}/I_{456} 、CPDX は I_{370}/I_{428} 、PIPC は I_{580}/I_{540} 、MEPM は I_{358}/I_{406} である。臨床分離株毎の相対シグナル強度比を Fig. 20 と Fig. 21 に示す。Fig. 20(a) に示す 15 分間接触時の CTX の I_{370}/I_{456} は、感性株、ESBLs 産生株、クラブラン酸存在下の ESBLs 産生株の順に、*E. coli* では 0.09 ± 0.02 、 0.47 ± 0.18 、検出感度以下となり、*K. pneumoniae* では 0.10 ± 0.03 、 0.49 ± 0.14 、 0.03 ± 0.01 となり、*P. mirabilis* では、 0.08 ± 0.05 、 0.75 ± 0.11 、 0.02 ± 0.01 となり、いずれの菌種でも ESBLs 産生株の方が感性株に比べて有意に高い結果となった ($p < 0.01$)。Fig. 20(b)に示す CPDX の I_{370}/I_{428} は、感性株、ESBLs 産生株、クラブラン

酸存在下の ESBLs 産生株の順に、*E. coli* では、 0.07 ± 0.02 、 0.32 ± 0.08 、検出感度以下となり、*K. pneumoniae* では 0.04 ± 0.01 、 0.36 ± 0.06 、 0.01 ± 0.01 となり、*P. mirabilis* では 0.05 ± 0.03 、 0.68 ± 0.18 、 0.04 ± 0.07 となり、いずれの菌種でも ESBLs 産生株の方が感性株に比べて有意に高い結果となった ($p < 0.01$)。Fig. 21 に示す PIPC の I_{580}/I_{540} は、感性株、ESBLs 産生株の順に、*E. coli* では、検出感度以下と 0.52 ± 0.27 、*K. pneumoniae* では、 0.05 ± 0.03 と 1.18 ± 0.30 、*P. mirabilis* では、 0.04 ± 0.04 と 0.64 ± 0.27 となり、いずれの菌種でも ESBLs 産生株の方が感性株に比べて有意に高い結果となった ($p < 0.01$)。ネガティブコントロールの MEPM は、358 Da にシグナルが観測されないことから、いずれの菌種においても I_{358}/I_{406} 値は 0 となり、ESBLs 産生株と感性株は検出感度以下であった。

最後に *E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* の臨床分離株に対して、15 分間接触したときの各抗菌薬の加水分解物由来のシグナル強度を検出された非加水分解物由来シグナル強度と加水分解物由来シグナル強度の総和で除した値 ($I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$) をプロットし、各群の平均とともに Fig 22 に示す。

CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は、感性株、ESBLs 産生株の順に *E. coli* では 0.05 ± 0.02 、 0.26 ± 0.05 、*K. pneumoniae* では 0.05 ± 0.05 、 0.28 ± 0.06 、*P. mirabilis* では 0.06 ± 0.05 、 0.36 ± 0.07 であった。CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値は、感性株、ESBLs 産生の順に *E. coli* 0.04 ± 0.02 、 0.14 ± 0.07 、*K. pneumoniae* では 0.02 ± 0.01 、 0.20 ± 0.03 、*P. mirabilis* では 0.03 ± 0.02 、 0.34 ± 0.08 であった。

PIPC の $I_{580}/I_{(540+562+580)}$ 値は、感性株、ESBLs 産生株の順に *E. coli* 0.00 ± 0.00 、 0.29 ± 0.18 、*K. pneumoniae* では 0.04 ± 0.03 、 0.42 ± 0.12 、*P. mirabilis* では 0.02 ± 0.05 、 0.41 ± 0.17 であった。

2-3 考察

感染症治療において、複数の抗菌薬が効かない多剤耐性菌の存在が国際的に大きな問題となっている。本研究では、多剤耐性菌の増加や新たな菌種の出現を押さえ込むために抗菌薬適正使用の観点から、薬剤感受性試験の結果を迅速に得るための方法として、MALDI-TOF MS を用いた検出方法の検討を行った。

薬剤感受性試験には、ドライプレートを用いた従来法とドライプレートに発育する菌を1時間毎にモニタリングし、その発育状況から迅速に薬剤感受性試験を行う微生物感受性分析装置を用いる方法がある。ESBLs 産生菌の検出率は、従来法では CTX と CPDX とともに 96% であるのに対して、微生物感受性分析装置を用いた判定において 5 時間後に CTX の検出率が 75% であるのに対し CPDX では 96% であると報告されている²³⁾。検出率の違いは、CPDX の方が CTX より ESBLs 産生菌を捉えやすい可能性を有するものと考えられる。そこで、本研究で検討する抗菌薬を CTX に加えて Fig. 2 に示すセファロsporin系抗菌薬の CPDX とペニシリン系抗菌薬の PIPC を用い、ネガティブコントロールとして ESBLs 産生菌から産生される β ラクタマーゼに分解されないカルバペネム系抗菌薬の MEPM を用いることとした。

MALDI Biotyper[®]では、CTX は 455.9 Da と 477.8 Da にシグナルが観測され (Fig. 5)、同機種を用いた先行研究²⁴⁾の 456.1 Da と 478.1 Da と同様の結果となった。また、VITEK[®] MS の測定においても同じ質量電荷比にシグナルが観測された²¹⁾。これらのシグナルは、生理食塩水中でカルボキシラートアニオンとして存在する CTX がイオン化の過程でプロトン付加体またはナトリウムイオン付加体として存在することに由来する²¹⁾。CTX を感性株 *E. coli* ATCC[®]25922 と接触すると、456.0 Da と 478.0 Da にシグナルが観測され、ESBLs 産生株である *E. coli* NCTC13462 と接触させると、これらのシグナルに加えて 370.1 Da と 414.0 Da に新たなシグナルが観測された。これは、VITEK[®] MS での結果と同じであり MALDI Biotyper[®]で再現出来ることが確認された。CTX を ESBLs 産生株と接触させた時に新たに出現したシグナルは、以下の反応機構で説明される (Fig. 23)²¹⁾。CTX (Fig. 23(a)) は ESBLs 産生株が産生する β ラクタマーゼによって加水分解を受け、縮合環化反応を経て精密質量 413.1 Da (Fig. 23(c)) となる。さらに脱炭酸反応により精密質量 369.1 Da (Fig. 23(d)) となる。この縮合環化反応後の生成物 (Fig. 23(c)) とそれに続く脱炭酸反応により生成物 (Fig. 23 (d))となる。

検討対象とする CPDX、PIPC、MEPM は、それぞれ 428.0 Da、539.6 Da、406.2 Da に各抗菌薬の非加水分解物由来のシグナルが観測された (Fig. 10(a) ~ Fig. 12(a))。これらは Fig. 2 に示す各抗菌薬の精密質量と同等の値であり、いずれの抗菌薬も MALDI Biotyper[®] で検出可能であった。次に、各抗菌薬に対して ESBLs 産生菌が産生する β ラクタマーゼによる加水分解反応を追跡した。CPDX は先行研究²⁴⁾において、CPDX の非加水分解物由来シグナルはプロトン付加体 ($[M+H]^+$) として 428.5 Da に加水分解物由来シグナルはプロトン付加体 ($[M_{h/d}-X+H]^+$) として 370.5 Da に検出されており、PIPC²⁵⁾の非加水分解物由来シグナルはナトリウムイオン付加体 ($[M+Na]^+$) として 540.2 Da に検出され、加水分解物由来シグナルは 2 個のナトリウムイオンが付加した $[M_h+2Na]^+$ として 580.2 Da に検出されている。CPDX と PIPC を ESBLs 産生株 *E. coli* NCTC13462 懸濁液と 30 分間接触すると、CPDX では 428.0 Da と 370.1 Da にシグナルが観測され (Fig. 10)、PIPC では 539.9 Da および 579.6

Da にシグナルが観測された (Fig. 11)。これらのシグナルは、先行研究と同様の結果であり、精密質量とも合致することから、各抗菌薬の非加水分解物由来シグナルおよび加水分解物由来シグナルが検出されているものと考えられる。抗菌薬の化学構造に着目すると、CPDX は CTX のヘテロ六員環のカルボキシル基にプロキセチル基がエステル結合で導入されていることに加え、同ヘテロ環のカルボン酸エステルがメトキシ基に変換された構造となっている。本研究において CTX と CPDX で同様の結果が得られたことから、これらの官能基は、加水分解酵素による β ラクタム環の加水分解反応に影響を及ぼさないものと示唆される。MEPM では、生理食塩水、感性株の *E. coli* ATCC[®]25922 懸濁液および ESBLs 産生株 *E. coli* NCTC13462 懸濁液のいずれと 30 分間接触しても 406.0 Da にシグナルが観測された (Fig. 12)。これは、Fig. 2(d) に示す精密質量とほぼ同じ値を示し、先行研究²⁵⁾でも非加水分解物由来シグナルがナトリウムイオン付加体 ($[M+Na]^+$) として 406.1 Da に検出されている。また、ESBLs 産生株と接触しても新たなシグナルは観測されず、MEPM が ESBLs 産生菌の産生する β ラクタマーゼに分解されないことを反映した結果となった。以上より、セファロsporin 系抗菌薬の CTX と CPDX、およびペニシリン系抗菌薬の PIPC が ESBLs 産生菌による加水分解を受け、MALDI Biotyper[®] でこの構造変化を捉えることが可能であり、ネガティブコントロールとしてカルバペネム系抗菌薬の MEPM を採用可能であることが明らかとなった。

MALDI-TOF MS は装置の特性上、機器毎や測定毎で観測されるシグナル強度が異なる。抗菌薬のシグナル強度を比較するためには内部標準物質を設定して強度の標準化を行い、相対シグナル強度として比較することが望ましい。内部標準物質をマトリックス ((HCCA)₂) のシグナル強度を用いて相対シグナル強度とし、ESBLs 産生菌の迅速検出法を確立した²¹⁾。しかし、(HCCA)₂ は抗菌薬に比べて過剰量存在し、MS スペクトル上で抗菌薬のシグナル強度よりはるかに高い。(HCCA)₂ に変わる新たな内部標準物質として、ドライプレート‘栄研’DPD-1 上に固相された抗菌薬から探索した。本研究対象の抗菌薬を除く 9 薬剤のうち、MS スペクトル上に研究対象の抗菌薬由来の質量電荷比にシグナルを示さない IPM を採用し、検討対象とする抗菌薬のシグナル強度と同程度のシグナル強度となるよう CTX と CPDX に対して 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度を使用し、シグナル強度が低い PIPC および MEPM では、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度を使用して相対シグナル強度 ($I_x : x$ は質量電荷比) を求めた。

ESBLs 産生菌の産生する β ラクタマーゼによる、 β ラクタム系抗菌薬の加水分解反応は接触時間に依存して進行する。そのため、対象とする抗菌薬の非加水分解物由来のシグナル強度および加水分解物由来のシグナル強度は接触時間の影響を受けるものと考えられる。CTX を用いると Fig. 7 に示すように *E. coli* 標準菌株の ESBLs 産生菌とは接触時間依存的に CTX の加水分解物のシグナル強度が増加したが、60 分間の接触時間で減少した。これは、接触時間が長くなると、抗菌薬の加水分解反応後にさらなる分解が進み、検出対象としたシグナルの構造体の存在量が減少したものと推察される。ESBLs 産生株と感性株の判別には接触時間を 15 分間と 30 分間で検討することとした。CTX は Fig. 16 に示すように、*E. coli* の臨床分離株では、15 分間と 30 分間いずれの接触時間でも、非加水分解物由来の相対シグナル強度は感性株の方が ESBLs 産生株より高い値を示したのに対し、加水分解物由来のシグナルは、ESBLs 産生株でのみ観測され、その相対シグナル強度は接触時間によらずほぼ同じ値を示した。同様の結果が *K. pneumoniae* と *P. mirabilis* でも認められた。このこと

は、臨床分離株が ESBLs 産生株であるかどうかの判別に、456 Da と 370 Da のシグナルを使用可能であることを意味している。また、抗菌薬として CPDX または PIPC を用いても Fig. 17 および Fig. 18 に示すように、CTX と同様の結果となった。ネガティブコントロールの MEPM は、Fig. 19 に示すように、いずれの菌種、いずれの株においても非加水分解物由来のシグナルのみ観測された。以上より、抗菌薬と 15 分間接触することで、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 産生株であるか否かを判別できることが示唆された。*P. mirabilis* に着目すると、加水分解物由来の相対シグナル強度は、CTX と CPDX において *E. coli* および *K. pneumoniae* より高く、PIPC において *E. coli* より高く *K. pneumoniae* と同程度となった。このことは、菌種により加水分解酵素産生能または産生された加水分解酵素の抗菌薬に対する活性が異なることを意味しており、相対シグナル強度はこれらの違いを明確に反映している可能性が示唆された。

相対シグナル強度は、測定系内に存在する非加水分解物または加水分解物の濃度を反映していることから、加水分解物の存在比を可視化するために、加水分解物由来の相対シグナル強度を非加水分解物由来の相対シグナル強度で除すると、Fig. 20 と Fig. 21 に示すように、いずれの菌種でも本研究対象としたすべての抗菌薬において、ESBLs 産生株の方が感性株より有意に大きな値となった ($p < 0.01$)。セファロスポリン系抗菌薬の CTX と CPDX では、Fig. 20 に示すように ESBLs 産生株の相対シグナル強度比は菌種により大きく異なり、*P. mirabilis* は *E. coli* や *K. pneumoniae* の 2 倍近く大きな値となった。また、 β ラクタマーゼ活性の阻害剤である CLA 共存下では、感性株と同程度の値まで低下し、接触時間を 30 分と長くしても、同様の結果であった。Fig. 21 で示すようにペニシリン系抗菌薬の PIPC でも、いずれの菌種においても、相対シグナル強度比は ESBLs 産生株の方が感性株より有意に大きな値となった。以上より、ESBLs 産生株において測定系内に抗菌薬の加水分解物が有意に多く存在することが明らかとなった。

ESBLs 産生株で加水分解物の存在比が高くなることから、加水分解物由来シグナル強度を、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することで、感性株と ESBLs 産生株の判別を行った。Fig. 22 に示すように感性株は CTX では 0.11 未満、CPDX および PIPC では 0.06 未満となり、ESBLs 産生株とオーバーラップすることなく区別出来ることが明らかとなった。

以上より、*E. coli* 標準菌株を用いて決定した条件を臨床分離株の判別に適用でき、判定には 15 分間の接触時間で実施できることが示唆された。

第3章 尿検体を用いた薬剤耐性菌の迅速検出方法の検討

抗菌薬と菌懸濁液を15分間接触させることで、ESBLs産生菌を判別ができたが、抗菌薬に対するMIC値が同値を示しているものの、異なるシグナル強度を示す菌株が存在した。MALDI-TOF MSで観測されたシグナル強度は、測定系内の観測対象とする構造を持つ抗菌薬量及びその代謝産物量を反映していることから、この違いが酵素量あるいは酵素活性の違いに起因すると考えた。本章では、ESBLs産生菌が産生するβラクタマーゼに着目して、βラクタマーゼの抽出方法を模索し、臨床検体より分離培養を行わず、より迅速に薬剤耐性菌の存在の有無を判別することを目的とした。測定検体には、模倣尿としてLブロスを用い、尿路感染症の模倣尿として菌を添加した健常尿を用い、臨床検体には尿路感染症の尿検体を用いた。

3-1 実験方法

3-1-1 試験菌株

標準菌株は、ESBLs産生株として*E. coli* NCTC13462を、感性株として*E. coli* ATCC®25922を使用した。臨床分離株は、国保直営総合病院君津中央病院で過去に分離され-80°Cで凍結保存されたMRSA、MSSA、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*を使用し、実験には、トリプチケースソイ5%血液寒天培地（日本BD）に塗布後、35°Cで一晩好気培養したコロニーを用いた。

3-1-2 尿検体

臨床検体は、国保直営総合病院君津中央病院で2022年1月から2022年6月までに臨床より提出され、グラム染色で腸内細菌目細菌による尿路感染が疑われた15検体と20代～50代の男女の健常者尿および血液混入尿を用いた。本章における研究は、国保直営総合病院 君津中央病院 研究倫理委員会の承認（承認番号：第650号）を得て実施した。

3-1-3 使用抗菌薬

薬剤感受性試験に使用した抗菌薬を以下に示す。

ABPC、AMK、AZT、CAZ、CEZ、CXM、CFPM、CMZ、CPDX-PR、CTRX、CTX、GM、IPM、LMOX、LVFX、CPFX、MEPM、MINO、PIPC、Colistin（CL）、SBT/ABPC、Ceftolozane/Tazobactam（CTLZ/TAZ）、ST、TAZ/PIPC。

MALDI-TOF MSによる薬剤耐性菌の検出には、ドライプレート‘栄研’DPD-1（栄研化学株式会社）の販売中止に伴い、後発品のドライプレート‘栄研’DPE-1（栄研化学株式会社）に固相されているCTX、CPDX、CPR、MEPMの4種を用いた。

3-1-4 薬剤感受性試験

実験に供した微生物の薬剤感受性は、以下に示す方法で判定した。BD フェニックス™ グラムネガティブ NMIC-440 パネル（日本BD）を用い、全自動同定感受性検査システム BD フェニックス（日本BD）微量液体希釈法でMICを測定した後、CLSI M07-A9 M100-S26²⁶⁾に準拠してMICをもとに感性：Susceptible、中等度耐性：Intermediate、耐性：Resistantのカテゴリーに分けた。対象抗菌薬は、ペニシリン系抗菌薬のABPC、PIPC、ペニシリン系抗

菌薬合剤の SBT/ABPC、CTLZ/TAZ、TAZ/PIPC、セファロsporin系抗菌薬の CEZ、CXM、CTX、CAZ、CPDX、CTRX、CFPM、セファマイシン系抗菌薬の CMZ、オキサセフェム系抗菌薬の LMOX、モノバクタム系抗菌薬の AZT、カルバペネム系抗菌薬の IPM、MEPM、アミノ配糖体抗菌薬の AMK、GM、ニューキノロン系抗菌薬の LVFX、CPFX、テトラサイクリン系抗菌薬の MINO、ポリペプチド系抗菌薬の CL、ST 合剤の ST とした。

3-1-5 表現型確認検査および保有耐性遺伝子検査

実験に供した微生物の表現型および保有耐性遺伝子の確認は、2-4-2 の表現型確認検査および 2-4-3 の *bla*_{CTX-M} group に記載した方法で測定した。なお、第 2 章で *bla*_{CTX-M} group の判別に使用したシカジーニアス®ESBL 遺伝子型検出キットの販売中止に伴い、後発品のシカジーニアス®ESBL 遺伝子型検出キット 2(関東化学株式会社)を用いた。プライマーが *bla*_{CTX-M-25} group、*bla*_{CTX-M chimera}、*bla*_{CTX-M-1} group および *bla*_{CTX-M-8} group が入った Reaction mixture 1 と *bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M-2} group、*bla*_{CTX-M-9} group、*bla*_{GES} および *bla*_{TEM} が入った Reaction mixture 2 となったが、試薬の調整や測定方法に変更はない。

3-1-6 βラクタマーゼの抽出方法

菌の分散液として、生理食塩水、L ブロス、尿検体を使用して、McFarland 1 の菌液濁度に調整した調整液 1 mL を 14,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除去後、PBS (-) 1 mL で洗浄し、再度遠心分離の工程を 2 回繰り返した。上清を除去後、タンパク質抽出試薬 BugBuster® Protein Extraction Reagent (メルク) 100 μL を混和した。10 分間静置後 14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、Pierce™ Micro-Spin Columns を用いて上清から界面活性剤成分を除去して、βラクタマーゼ抽出液を作製し、3-2-2 から 3-2-8 の検討に使用した。なお 3-2-9 と 3-2-10 の検討では、同じ調整液 10 mL を用いて 3,400 rpm で 10 分間遠心分離後、上清を除去した。PBS (-) 1 mL を用いて沈査を 1.5 mL マイクロチューブに移し、PBS(-)での洗浄工程以降は上記と同じ方法で行った。

3-1-7 MALDI-TOF MS を用いた耐性菌検出の測定方法

βラクタマーゼ抽出液を、ドライプレート‘栄研’DPE-1 の CTX : 32 μg/mL と CPDX : 32 μg/mL のウエルに 100 μL、CPR: 16 μg/mL のウエルに 50 μL、Cefpirome-Clavulanate (CPR/CLA) : 4 μg/mL/4 μg/mL のウエルに 25 μL、MEPM: 8 μg/mL のウエルに 25 μL 添加した。35°Cの好気条件下で一定時間培養後、試料上清 3 μL をターゲットプレート MSP 96 target polished steel BC (ブルカー・ダルトニクス株式会社)に塗布して乾燥させ、内部標準物質溶液 1 μL、マトリックス溶液 1 μL を重層して自然乾燥させ、MALDI-TOF MS の測定試料とした。

測定結果は、第 2 章で用いた算出法を一般化して、各抗菌薬の加水分解物由来のシグナル強度を検出された非加水分解物由来シグナル強度と加水分解物由来シグナル強度の総和で除した値 ($I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$; 式 1) を means±SD で表した。

$$\frac{I_{\text{hydro}}}{I_{\text{total}}} = \frac{\text{加水分解物由来のシグナル強度}}{\text{非加水分解物由来シグナル強度} + \text{加水分解物由来のシグナル強度}} \quad (\text{式 1})$$

3-2 結果

3-2-1 試験菌株の特徴

本章で使用した検体は、君津中央病院で 2022 年 1 月から 2022 年 6 月に臨床より尿路感染症が疑われ、グラム染色により腸内細菌目細菌様のグラム陰性桿菌を認めた 15 検体を用いた。それらの特性を Table 3 に示す。そのうち、*bla*_{CTX-M}型遺伝子を保有する株は、*E. coli* 5 検体であり、その他の 10 検体は *bla*_{CTX-M}型遺伝子を保有しなかった 5 検体から *E. coli* が検出され、2 検体から *K. pneumoniae*、1 検体から *Morganella morganii*、1 検体から *Enterobacter cloacae* が検出された。また、*E. coli* と *K. pneumoniae* の複数菌種が検出された検体が 1 検体あった。*bla*_{CTX-M} 型遺伝子として CTX-M-1 型は 1 株、CTX-M-9 型を 4 株認めた。

3-2-2 βラクタム系抗菌薬 CPR の MS スペクトル

CTX や CPDX と同系統であるセファロスポリン系抗菌薬の CPR を使用したときの MS スペクトルを Fig. 2 に示す。マトリックスの分子イオンシグナル ($[2M + H]^+$) は 379.1 Da に観測された。各抗菌薬の非加水分解物由来のシグナルは、Fig. 24(a)に示すように、514.9 Da と 396.1 Da に観測された。感性株の *E. coli* ATCC®25922 の菌懸濁液と 30 分間接触しても、Fig. 24(b)に示すように非加水分解物由来のシグナルが 514.9 Da と 396.0 Da に観測された。一方、ESBLs 産生株の *E. coli* NCTC13462 の菌懸濁液と 30 分間接触すると、Fig. 24(c)に示すように非加水分解物由来のシグナルに加えて 369.9 Da と 323.8 Da に加水分解物由来のシグナルが観測された。

3-2-3 模倣尿としてLブロスを用いた結果

分散液に L ブロスまたは生理食塩水を用いて ESBLs 産生菌の *E. coli* NCTC13462 を混和させた時の各抗菌薬の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値を Fig. 25 に示す。

CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は、L ブロスでは 0.92 ± 0.03 、生理食塩水では 0.74 ± 0.03 であった。CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値では、L ブロスでは 0.56 ± 0.03 、生理食塩水では 0.33 ± 0.03 であり、CPR の $I_{370}/I_{(370+396+515)}$ 値では、L ブロスでは 0.48 ± 0.07 、生理食塩水では 0.47 ± 0.06 であった。

3-2-4 抗菌薬と菌懸濁液の接触時間の検討

抗菌薬と菌懸濁液を 5 分間、15 分間、30 分間の接触させた時の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値を Fig. 26 に示す。

CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は、感性株では、接触時間によらず 0.07~0.09 となり、接触時間による影響は認められなかった。一方、ESBLs 産生株では、接触 15 分間で 0.92 と最も高い値となったが、30 分間の接触では、0.87 とわずかに減少した。

CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値は、感性株では、接触時間によらず 0.05~0.06 となり、接触時間による影響は認められなかった。一方、ESBLs 産生株では、接触 15 分間で 0.56 と最も高い値となったが、30 分間の接触では、0.49 とわずかに減少した。

CPR の $I_{370}/I_{(370+396+515)}$ 値は、感性株では、接触時間によらず 0.12~0.16 となり、接触時間による影響は認められなかった。一方、ESBLs 産生株では接触 5 分間では 0.19 と感性株と

同程度であったが、接触時間が 15 分間 30 分間と長くなると、 $I_{370}/I_{(370+324+515)}$ 値は 0.48 および 0.72 と接触時間依存的に大きくなった。

3-2-5 標準菌株を添加した分散液を用いた検出下限量の検討

L ブロスまたは健常者の尿検体を用いて種々の菌液濃度に調整した時の各抗菌薬の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値を Fig 27~Fig. 32 に示す。

L ブロス用いて $10^3\sim 10^8$ CFU/mL に調整した菌懸濁液を用いると、接触時間 15 分における CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は、*E. coli* ATCC®25922 では、菌液濃度によらず $0.08\pm 0.02\sim 0.16\pm 0.04$ であった (Fig. 27(a))。一方、*E. coli* NCTC13462 では、 10^5 CFU/mL 以下では $0.13\pm 0.02\sim 0.15$ であったが、 10^6 CFU/mL で 0.34 ± 0.03 、 10^7 CFU/mL で 0.84 ± 0.03 、 10^8 CFU/mL で 0.93 ± 0.02 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 27(b)に示すように接触時間 15 分と同様の傾向を示した。接触時間 15 分における CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値は、*E. coli* ATCC®25922 では、菌液濃度によらず $0.05\pm 0.01\sim 0.10\pm 0.03$ であった (Fig. 28(a))。一方、*E. coli* NCTC13462 では、 10^5 CFU/mL 以下では $0.08\pm 0.01\sim 0.10\pm 0.01$ であったが、 10^6 CFU/mL で 0.22 ± 0.02 、 10^7 CFU/mL で 0.56 ± 0.05 、 10^8 CFU/mL で 0.87 ± 0.01 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 28(b)に示すように接触時間 15 分と同様の傾向を示した。接触時間 15 分における CPR の $I_{370}/I_{(370+396+515)}$ 値は、*E. coli* ATCC®25922 では、菌液濃度によらず $0.06\pm 0.03\sim 0.12\pm 0.04$ であった (Fig. 29(a))。一方、*E. coli* NCTC13462 では、 10^6 CFU/mL 以下では $0.11\pm 0.02\sim 0.14\pm 0.03$ であり、 10^7 CFU/mL で 0.48 ± 0.05 、 10^8 CFU/mL で 0.61 ± 0.05 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 29(b)に示すように *E. coli* ATCC®25922 は同様の傾向を示し、*E. coli* NCTC13462 は、 10^5 CFU/mL 以下 $0.12\pm 0.02\sim 0.13\pm 0.04$ であり、 10^6 CFU/mL で 0.18 ± 0.1 、 10^7 CFU/mL で 0.73 ± 0.03 、 10^8 CFU/mL で 0.89 ± 0.03 となった。

健常者の尿検体を用いて $10^3\sim 10^7$ CFU/mL に調整した菌懸濁液を用いると、接触時間 15 分における CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は、*E. coli* ATCC®25922 では、菌液濃度によらず $0.05\pm 0.01\sim 0.10\pm 0.01$ であった (Fig. 30(a))。一方、*E. coli* NCTC13462 では、 10^5 CFU/mL 以下では $0.09\pm 0.01\sim 0.18\pm 0.03$ であったが、 10^6 CFU/mL で 0.60 ± 0.03 、 10^7 CFU/mL で 0.92 ± 0.02 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 30(b)に示すように *E. coli* ATCC®25922 は同様の傾向を示し、*E. coli* NCTC13462 は、 10^4 CFU/mL 以下 $0.11\pm 0.04\sim 0.14\pm 0.02$ であり、 10^5 CFU/mL で 0.51 ± 0.2 、 10^6 CFU/mL で 0.85 ± 0.03 、 10^7 CFU/mL で 0.98 ± 0.04 となった。接触時間 15 分における CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値は、*E. coli* ATCC®25922 では、菌液濃度によらず $0.04\pm 0.01\sim 0.04\pm 0.04$ であった (Fig. 31(a))。一方、*E. coli* NCTC13462 では、 10^5 CFU/mL 以下では $0.08\pm 0.01\sim 0.10\pm 0.01$ であり、 10^6 CFU/mL で 0.20 ± 0.02 であり、 10^7 CFU/mL で 0.67 ± 0.05 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 31(b)に示すように *E. coli* ATCC®25922 は同様の傾向を示し、*E. coli* NCTC13462 は、 10^4 CFU/mL 以下 $0.09\pm 0.02\sim 0.10\pm 0.01$ 、 10^5 CFU/mL で 0.27 ± 0.02 、 10^6 CFU/mL で 0.65 ± 0.03 、 10^7 CFU/mL で 0.95 ± 0.02 となった。接触時間 15 分における CPR の $I_{370}/I_{(370+396+515)}$ 値は、*E. coli* ATCC®25922 では、菌液濃度によらず $0.08\pm 0.04\sim 0.13\pm 0.02$ であった (Fig. 32(a))。一方、*E. coli* NCTC13462 では、 10^4 CFU/mL 以下では $0.12\pm 0.04\sim 0.12\pm 0.02$ 、 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL で $0.20\pm 0.02\sim 0.20\pm 0.03$ となり、 10^7 CFU/mL で 0.45 ± 0.06 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 32(b)に示すように *E. coli* ATCC®25922 は同様の傾向を示し、*E. coli* NCTC13462 では、 $10^3\sim 10^4$ CFU/mL の菌液濃度で $0.15\pm 0.03\sim 0.12\pm 0.03$ であり、

10^5 CFU/mL で 0.26 ± 0.01 、 10^6 CFU/mL で 0.32 ± 0.03 、 10^7 CFU/mL で 0.86 ± 0.07 となった。

ESBLs 産生菌の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値が感性株より有意に高い値を示す最低菌液濃度は、いずれの抗菌薬でも L プロスでは 10^6 CFU/mL であったのに対し、健常者の尿検体では 10^5 CFU/mL であった。

3-2-6 臨床菌株を添加した分散液を用いた検出下限量の検討

L プロスまたは健常者の尿検体を用いて菌液濃度を $10^3 \sim 10^7$ CFU/mL に調整した時の各抗菌薬の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値を Fig 33~Fig. 38 に示す。

L プロスを菌液調整に用いると、接触時間 15 分における CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は、感性株では、菌液濃度によらず $0.08 \pm 0.01 \sim 0.11 \pm 0.01$ であった (Fig. 33(a))。一方、ESBLs 産生株で 10^5 CFU/mL 以下で $0.09 \pm 0.02 \sim 0.11 \pm 0.01$ となり、 10^6 CFU/mL で 0.20 ± 0.01 、 10^7 CFU/mL で 0.44 ± 0.2 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 33(b) に示すように接触時間 15 分と同様の傾向を示した。接触時間 15 分における CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値は、感性株では菌液濃度によらず $0.09 \pm 0.01 \sim 0.10 \pm 0.02$ であった (Fig. 34(a))。一方、ESBLs 産生株で 10^5 CFU/mL 以下では $0.09 \pm 0.01 \sim 0.09 \pm 0.02$ となり、 10^6 CFU/mL で 0.14 ± 0.01 、 10^7 CFU/mL で 0.33 ± 0.01 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 33(b) に示すように接触時間 15 分と同様の傾向を示した。接触時間 15 分における CPR の $I_{370}/I_{(370+396+515)}$ 値は、感性株では菌液濃度によらず $0.06 \pm 0.01 \sim 0.11 \pm 0.02$ であった (Fig. 35(a))。一方、ESBLs 産生株で 10^6 CFU/mL 以下では、 $0.13 \pm 0.01 \sim 0.17 \pm 0.03$ となり、 10^7 CFU/mL で 0.21 ± 0.01 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 35(b) に示すように感性株は同様の傾向を示し、ESBLs 産生株は 10^3 CFU/mL で 0.12 ± 0.02 、 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL で $0.20 \pm 0.03 \sim 0.22 \pm 0.02$ であり、 10^7 CFU/mL で 0.38 ± 0.02 となった。

健常者の尿検体を菌液調整に用いると、接触時間 15 分における CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は、菌液濃度によらず $0.07 \pm 0.03 \sim 0.10 \pm 0.02$ であった (Fig. 36(a))。一方、ESBLs 産生株で 10^5 CFU/mL 以下で $0.10 \pm 0.01 \sim 0.16 \pm 0.01$ であり、 10^6 CFU/mL で 0.34 ± 0.01 となり、 10^7 CFU/mL で 0.86 ± 0.07 となった。Fig. 36(b) に示すように感性株は同様の傾向を示し、ESBLs 産生株は、 10^4 CFU/mL で以下 $0.09 \pm 0.01 \sim 0.11 \pm 0.03$ となり、 10^5 CFU/mL で 0.26 ± 0.03 、 10^6 CFU/mL では 0.71 ± 0.01 となり、 10^7 CFU/mL で 0.99 ± 0.20 となった。接触時間 15 分における CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値は、菌液濃度によらず $0.07 \pm 0.03 \sim 0.10 \pm 0.02$ であった (Fig. 37(a))。一方、ESBLs 産生株で 10^5 CFU/mL 以下で $0.05 \pm 0.01 \sim 0.09 \pm 0.01$ であり、 10^6 CFU/mL で 0.20 ± 0.01 となり、 10^7 CFU/mL で 0.70 ± 0.04 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 37(b) に示すように感性株は同様の傾向を示し、ESBLs 産生株は、 10^4 CFU/mL で以下 $0.05 \pm 0.01 \sim 0.05 \pm 0.02$ となり、 10^5 CFU/mL で 0.16 ± 0.02 、 10^6 CFU/mL では 0.48 ± 0.05 となり、 10^7 CFU/mL で 0.96 ± 0.02 となった。接触時間 15 分における CPR の $I_{370}/I_{(370+396+515)}$ 値は、菌液濃度によらず $0.09 \pm 0.01 \sim 0.11 \pm 0.01$ であった (Fig. 38(a))。一方、ESBLs 産生株で 10^4 CFU/mL 以下で $0.07 \pm 0.01 \sim 0.13 \pm 0.01$ となり、 10^5 CFU/mL で 0.21 ± 0.02 、 10^6 CFU/mL で 0.24 ± 0.01 であり、 10^7 CFU/mL で 0.29 ± 0.02 となった。接触時間 30 分でも、Fig. 38-(b) に示すように感性株は同様の傾向を示し、ESBLs 産生株は、 10^4 CFU/mL で以下 $0.13 \pm 0.01 \sim 0.16 \pm 0.04$ となり、 10^5 CFU/mL で 0.19 ± 0.03 であり、 10^6 CFU/mL で 0.22 ± 0.03 となり、 10^7 CFU/mL で 0.58 ± 0.03 となった。

ESBLs 産生菌の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値が感性株より有意に高い値を示す最低菌液濃度は、いずれの抗菌薬でも L プロスでは 10^6 CFU/mL であったのに対し、健常者の尿検体では 10^5 CFU/mL

であった。

3-2-7 $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値に対する性別および年齢の影響

20代～50代の男性または女性の健常者の尿に *E. coli* ATCC®25922 を添加した時の各抗菌薬の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値を Fig. 39 に示す。

15分間の接触時間では、Fig. 39(a)で示すように CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は50代以下の男性の尿で 0.08～0.11 となり、50代以下の女性の尿で 0.05～0.10、血尿で 0.06 となった。CPDX の $I_{370}/I_{(370+428+450)}$ 値では、50代以下の男性の尿で 0.05～0.06、50代以下の女性の尿で 0.01～0.07、血尿で 0.05 であった。CPR の $I_{370}/I_{(370+396+515)}$ 値は、50代以下の男性の尿で 0.10～0.14、50代以下の女性の尿で 0.08～0.11、血尿で 0.08 であった。30分間の接触時間では Fig. 39(b)に示すように、15分間の接触時間と同様の結果であった。

3-2-8 $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値に対するグラム陽性球菌の影響

健常者の尿にグラム陽性球菌を添加した時の各抗菌薬の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値を Fig. 40 に示す。

CTX と 15分間または 30分間接触すると、 $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値はそれぞれ MRSA で 0.07、0.09、MSSA で 0.12、0.06、*E. faecalis* で 0.13、0.09 となり、*E. faecium* はいずれの接触時間でも 0.07 であった。いずれの菌種を CPDX と接触しても、接触時間によらず $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値は 0.04～0.10 の値となり、CPR と接触しても $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値は 0.06～0.10 の値であり、グラム陽性球菌の種類による違いは見られなかった。

3-2-9 β ラクタマーゼ抽出に使用する検体量の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値に対する影響

尿路感染症患者の尿中に存在する菌量が少ない場合でも、菌液濃度を上げることで検出感度を高めることが期待される。そのための手法として、 β ラクタマーゼ抽出操作に使用する検体量を増やす方法が考えられる。尿検体を用いた検討に先立ち、Lブロスまたは健常者の尿検体を用いて $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL に調整した調整液 10 mL から、遠心分離による菌の濃縮工程の有無による違いを抗菌薬と菌懸濁液との接触時間を 15分として検討した。

Lブロスで調整した菌懸濁液では、Fig. 41 に示すように CTX の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は調整液量 1 mL の場合に、ESBLs 産生株である *E. coli* NCTC13462 の菌液濃度が $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL では 0.13 程度となり、調整液量 10 mL から遠心分離による濃縮を行うと、 10^3 CFU/mL で 0.10 ± 0.01 、 10^4 CFU/mL で 0.09 ± 0.01 、 10^5 CFU/mL で 0.24 ± 0.03 であった。 10^3 CFU/mL と 10^4 CFU/mL で差を認めなかったが、 10^5 CFU/mL で有意な差を認めた ($p < 0.05$)。一方、感性株である *E. coli* ATCC®25922 では調整液量 1 mL の場合に $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL では 0.13 程度であり、調整液量 10 mL から遠心分離による濃縮を行っても 0.10 程度であった。

健常者の尿検体で調整した菌懸濁液では、Fig. 42 に示すように、ESBLs 産生株である *E. coli* NCTC13462 では、調整液量 1 mL の場合、 10^3 CFU/mL で 0.09 ± 0.01 、 10^4 CFU/mL で 0.11 ± 0.02 、 10^5 CFU/mL で 0.18 ± 0.02 であり調整液量 10 mL から遠心分離による濃縮を行うと、 10^3 CFU/mL で 0.06 ± 0.01 、 10^4 CFU/mL で 0.19 ± 0.01 、 10^5 CFU/mL で 0.28 ± 0.04 であった。 10^3 CFU/mL 差を認めなかったが、 10^4 CFU/mL で ($p < 0.05$)、 10^5 CFU/mL で ($p < 0.01$) と有意な差を認めた。*E. coli* ATCC®25922 を混和させた調整液量 1 mL の場合に $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL で、0.07 程度であり、調整液量 10 mL から遠心分離による濃縮を行っても 0.08 程度であった。

3-2-10 臨床検体を用いた検討

尿検体からβラクタマーゼを抽出し抗菌薬と接触させた時の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値を Fig 43 に示す。

*bla*_{CTX-M} 型遺伝子を保有しないグラム陰性桿菌を認めた 10 検体は、βラクタマーゼ抽出液と抗菌薬を 15 分間接触しても $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値は CTX で 0.09 ± 0.02 、CPDX で 0.05 ± 0.03 、CPR で 0.11 ± 0.01 であるのに対し、*bla*_{CTX-M} 型遺伝子を保有する *E. coli* を認めた 5 検体は、βラクタマーゼ抽出液と抗菌薬を 15 分間接触すると $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値は CTX で 0.96 ± 0.02 、CPDX で 0.98 ± 0.02 、CPR で 0.87 ± 0.09 であった。30 分間接触しても $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値は 15 分間接触した結果と同様の値であった。また、CLA 共存下での CTX、CPDX および CPR の $I_{\text{hydro}}/I_{\text{total}}$ 値は、いずれの検体でも 15 分間の接触で 0.11 程度、30 分間の接触で 0.13 程度であった。

3-3 考察

現在、検体から直接薬剤耐性菌を検出する方法として、血液培養の陽性ボトル溶液を用いた2つの方法が実用化されている。1つは、菌の同定や耐性遺伝子を検出できる全自動多項目遺伝子検査システム FilmArray (バイオメリュー・ジャパン株式会社) の BioFire 血液培養パネル 2 を用いる方法であり、もう1つは European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)のディスク拡散法を実施する Rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) である。前者は、測定時間が1時間と短く、30菌種と10種の耐性因子を測定することが可能であり、培養検査や薬剤感受性試験の結果との相関が良いとの報告がある^{27,28)}。後者は、4時間の培養時間で薬剤感受性試験の判定が可能な場合があり、従来薬剤感受性試験結果との相関も良く、最終結果報告までの時間が17時間短縮されたとの報告がある²⁹⁾。しかし、これらの方法は血液培養分析装置の陽性シグナルが検出されてから実施される検査であり、検体が提出されてから10時間以上経過しているため、最終結果報告までの時間を要する。本章では、臨床検体より分離培養を行わずに薬剤耐性菌の存在の有無を判別することを目的とし、ESBLs 産生菌が産生する β ラクタマーゼに着目して検討を行った。

臨床より尿路感染症を疑い、グラム染色で腸内細菌目細菌様のグラム陰性桿菌が検出された15検体のうち、*bla*_{CTX-M}型遺伝子を保有する株は5検体でいずれも *E. coli* が検出され、*bla*_{CTX-M}型遺伝子を保有しなかった15検体のうち *E. coli* が5検体、*K. pneumoniae* が2検体、*Morganella morganii* が1検体、*Enterobacter cloacae* が1検体から検出された。また、*E. coli* と *K. pneumoniae* の複数菌種が検出された検体が1検体あった。ESBLs 産生株は、CLSI ドキュメント (Fig. 1) に記載されている *E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* のうち *E. coli* のみであった。感性株は、*E. coli* による尿路感染5検体、*K. pneumoniae* は2検体、*M. morganii*、*E. cloacae* がそれぞれ1検体、*E. coli* と *K. pneumoniae* の2菌種による尿路感染1検体であった。*M. morganii* は日和見感染やカテーテル尿で見られることがあり、*E. cloacae* はカテーテル留置状態での尿路感染が起すことがある。この2菌種とも、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* に比べれば検出頻度はかなり低い、AmpC型 β ラクタマーゼ産生菌であり無効な β ラクタム系抗菌薬の投与により、AmpC型 β ラクタマーゼが過剰に産生されカルバペネム系抗菌薬をはじめほとんどの β ラクタム系抗菌薬が効かなくなる場合があることから、感染対策上は注視したい菌種である^{30,31)}。

MALDI-TOF MS を用いた検討では、第2章で使用した栄研 DPD-1 パネルの販売中止に伴い、後継パネルである DPE-1 パネルを用いた。DPE-1 パネルには、ペニシリン系抗菌薬の PIPC が固相されていないため実験に供せず、新たに AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌の判別で利用できる可能性のある第4世代セファロsporin系抗菌薬の CPR を用いることとした。これまでに CPR を MALDI-TOF MS で分析した報告例がないことから、 β ラクタマーゼを対象とした検討に先立ち、MALDI-TOF MS で CPR の加水分解反応の追跡が可能か検討した。CPR の非加水分解物は 514.9 Da にシグナルが検出され (Fig. 24)、Fig. 2 に示す精密質量と同等の値であったことから、MALDI-TOF MS で CPR を分析可能であることが明らかになった。CPR は β ラクタマーゼによる加水分解を受けると、369.8 Da と 323.8 Da に新たなシグナルが観測された。323.8 Da のシグナルは、CPR を生理食塩水または感性株と接触しても観測されたことから、本章での検討対象から除外した。一方 369.8 Da のシグ

ナルは、生理食塩水や感性株との接触では検出強度が低く、ESBLs 産生株との接触で時間依存的に強度が高くなった。本章で観測対象とする CPR のシグナルは、非加水分解物由来のシグナルとして 514.9 Da を、加水分解物由来のシグナルとして 369.8 Da を用いることとした。

第 2 章で用いた臨床分離株の中で、抗菌薬と菌懸濁液の接触 15 分で ESBLs 産生菌として判別できたが、抗菌薬に対する MIC が同値を示すものの、異なるシグナル強度を示す菌株が存在した。MALDI-TOF MS で観測されたシグナル強度は、測定系内の観測対象とする構造を持つ抗菌薬量を反映していることから、この違いが酵素量あるいは酵素活性の違いに起因すると考えた。ESBLs 産生菌の標準菌株である *E. coli* NCTC13462 を生理食塩水で McFarland 1 に調整した菌懸濁液より β ラクターマーゼを抽出したところ、15 分間 CTX と接触した時の $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は 0.74 ± 0.03 と、菌懸濁液と接触した時の 0.26 ± 0.05 (第 2 章の結果より算出) より高い値を示した。このことは、菌懸濁液から抽出した β ラクターマーゼを用いることで効率的に抗菌薬を加水分解することが可能であることを意味しており、結果として検出感度を高めることに寄与していることが示唆された。また、第 2 章で用いた式 (Fig. 22) を一般化した式 1 により感性菌と ESBLs 産生菌の判別を行ったところ、シグナル強度比はオーバーラップすることなく、異なる値を示した。このことから、今後の判別法として、式 1 を用いることが有用であるものと言える。

菌株を用いる第 2 章での検討で、菌懸濁液との接触時間は 15 分間が最適であると結論付けたが、本章では β ラクターマーゼの抽出により検出感度を高められたことから、接触時間をより短縮できる可能性を有するものと考えられる。Fig. 26 で示すように CTX、CPDX、および CPDX のいずれの抗菌薬でも 5 分間以上の接触で加水分解物由来のシグナルを捉えることができた。特に CTX と CPDX は 15 分間の接触時にシグナル強度が最も高く、CPR は接触時間の経過とともにシグナル強度が増加し、30 分間の接触が最も高い値となった。以上より、5 分間の接触時間でも ESBLs 産生菌の有無を判別出来る可能性が示唆された。臨床への応用を考えると、抗菌薬との接触時間を 15 分間または 30 分間とするのがルーチン業務内での操作性から実施可能であると判断し、以降の検討では 5 分間の接触時間を除外して検討することとした。

尿路感染症の尿検体から ESBLs 産生菌の有無を判別するのにあたり、尿中に含まれるアミノ酸等の微量成分、潜血、患者の性別や年代等の影響、共存するグラム陽性球菌が測定結果に影響を及ぼさないか確認する必要がある。そこでトリプトンや酵母エキスの入った L ブロスを使用して検出感度への影響を検討した。検討対象としたいずれの抗菌薬でも、Fig. 25 に示すように、生理食塩水と L ブロスで検出感度に差は認められなかった。このことは、菌株から抽出した β ラクターマーゼを用いる本実験方法は、アミノ酸等の微量成分が含有されていても検出感度には影響を及ぼさないことが明らかとなった。健常者の男女 20~50 代の尿に *E. coli* ATCC®25922 を混和し測定した結果、Fig. 39 に示すように、CTX、CPDX および CPR の全ての薬剤で 30 分間の接触でもシグナル強度比は 0.2 以下であった。さらに、血尿を用いても 0.2 以下のシグナル強度比となり、年代、性別、血尿の有無が感度に影響しないことがわかった。グラム陽性球菌を共存させた結果、Fig. 40 に示すように、いずれの薬剤でもシグナル強度比は 0.2 以下となり、グラム陽性球菌併存の有無が感度に影響しないことが示唆された。以上より、尿検体中における ESBLs 産生菌の存在の有無の判別に、

性別や年齢、腸内細菌目細菌以外の菌種の混在が影響することはなく、シグナル強度比は 0.2 以下であることが明らかとなった。

検出下限となる菌量は、臨床検体を測定していくにあたり知る必要がある重要な因子の一つである。Lブロスを用いてシグナル強度比への菌量の違いを検討したところ Fig. 27 で示すように、CTX は 15 分間および 30 分間の接触時間で、*E. coli* ATCC®25922 の菌量が $10^3\sim 10^8$ CFU/mL では $0.08\pm 0.02\sim 0.16\pm 0.04$ と菌量によらず値が変化しなかったのに対し、*E. coli* NCTC13462 では $10^3\sim 10^5$ CFU/mL の菌量で *E. coli* ATCC®25922 とほぼ同値であったが、 10^6 CFU/mL で 0.34 ± 0.03 と有意に高い値となった。また、CPDX を用いても、Fig. 28 に示すように CTX 同様の結果となった。CPR を用いると、Fig. 29 に示すように *E. coli* ATCC®2592 は CTX と同様であったが、*E. coli* NCTC13462 は 15 分間接触させた場合、 $10^3\sim 10^6$ CFU/mL までは感性株と変わらなかったが、 10^7 CFU/mL で 0.48 ± 0.05 値と有意に高くなった。30 分間の接触時間で、CTX および CPDX と同様に 10^6 CFU/mL で差が出る結果となった。このことから、Lブロスの用いた場合に検出下限となる菌量は 10^6 CFU/mL であり、CTX、CPDX は 15 分間の接触時間、CPR は 30 分間の接触時間で ESBLs 産生株と感性株を判別できることが明らかとなった。健常者の尿検体を用いると、Fig. 30 に示すように、CTX では *E. coli* ATCC®25922 との接触時間によらずシグナル強度比は 0.1 以下となり菌量による変化はなかった。一方、*E. coli* NCTC13462 の菌量を 10^5 CFU/mL とすると、シグナル強度比は 15 分間の接触で 0.18 ± 0.03 、30 分間の接触では 0.51 ± 0.2 と感性株より有意に高くなった。また CPDX または CPR でも、Fig. 31 および Fig. 32 に示すように、CTX と同様の結果であった。以上より、分散液に患者検体を用いた場合でも、抗菌薬との 15 分間の接触では検出下限となる菌量は 10^6 CFU/mL であるが、30 分間の接触時間では 10^5 CFU/mL と Lブロスより少ない菌量で判別可能であることが示唆された。

第 2 章では、*E. coli* 標準菌株は同菌種の臨床分離株より非加水分解物由来のシグナル強度が高い結果であったことから、臨床分離株での検討では検出下限となる菌量が標準菌株より多くなる可能性がある。Lブロスを用いた場合、Fig. 33～Fig. 35 に示すように、シグナル強度比は臨床分離株の方が標準菌株より低い値であったが、いずれの抗菌薬でも 15 分間の接触時間では 10^6 CFU/mL の菌量で ESBLs 産生菌の判別が可能であった。尿検体を用いても、Fig. 36～Fig. 38 に示すように、 10^6 CFU/mL の菌量で ESBLs 産生菌の判別が可能であった。以上より、ESBLs 産生菌の判別に必要な菌量の検出下限量は、15 分間の接触では 10^6 CFU/mL であり、30 分間の接触では 10^5 CFU/mL であることが示唆された。

臨床検査室では、尿路感染症が疑われた検体は、グラム染色で腸内細菌目細菌が認められた場合に薬剤感受性試験を実施して薬剤耐性菌の有無を判別する。薬剤感受性試験には培養したコロニーを用いるが、本章での検討では、尿検体から直接検査を実施するため、尿検体中の菌量が重要になる。一般に、尿検体を用いたグラム染色の感度は、1 視野に 1 菌認められた場合、翌日の培養検査で $10^4\sim 10^5$ CFU/mL の発育をする。上述の通り、検出下限の菌量は 15 分の接触時間で 10^6 CFU/mL、30 分の接触時間で 10^5 CFU/mL であるため、臨床応用には少なくとも菌量を 1 オーダー上げる必要がある。一般的な臨床検査室で実施可能な菌の濃縮方法として、遠心分離による菌の濃縮方法がある。そこで、分散液の量を 1 mL から 10 mL に変更して、遠心分離により菌の濃縮を行った。分散液として Lブロスを用いた場合は 10^5 CFU/mL (Fig. 41)、尿検体を用いた場合は 10^4 CFU/mL (Fig. 42)以

上の菌濃度で ESBLs 産生株と感性株を判別出来る可能性が示唆された。

臨床検体 10 mL から遠心分離を行った後に β ラクタマーゼの抽出を行い、MALDI-TOF MS で ESBLs 産生菌の有無を判別すると、感性株の検体はいずれの抗菌薬でもシグナル強度比が 0.2 以下の値となった。一方、ESBLs 産生株を含む検体は、CTX、CPDX で 0.9 以上の値であり、CPR では 0.7 以上の値を示した。また、CLA 存在下では ESBLs 産生株の値は 0.2 以下となり、CLA による阻害を受けて感性株と同程度の値となることが示され、ESBLs 産生株の特性に合う結果であった。さらに、*E. coli* と *E. faecalis* を認めた検体

(Table 3 の E-5 および S-3) でも、シグナル強度比は、CTX、CPDX、CPR の順に ESBLs 産生株で 1.0、1.0、0.72、感性株で 0.08、0.05、0.11 となり、臨床検体でも共存菌の影響を受けることなく ESBLs 産生株と感性株を判別できることが明らかとなった。また、他の菌種が共存した ESBLs 産生株を含む検体においても、L ブロスまたは健常者の尿検体にグラム陽性菌を添加した検討結果と同様に、その影響を受けることなく感性株と判別することができた。以上より、 β ラクタマーゼを捉える本法は、臨床検体においても他の菌種共存の影響を受けることなく ESBLs 産生株と感性株を判別できることが明らかとなった。

最後に、第 2 章の菌株を用いた検討においてシグナル強度が異なる菌株が認められたが、ESBLs 産生菌から抽出した β ラクタマーゼを用いた本章の検討では、 $I_{370}/I_{(370+456+478)}$ 値は 0.96 ± 0.02 と菌株による違いは認められなかった。ESBLs 産生菌において使用した菌株は 5 検体と少なく、いずれも CTX に対する MIC 値が $32 \mu\text{g/mL}$ 以上の値を示したことから、シグナル強度比と菌株の保有する酵素量あるいは酵素活性との関係を考察するには十分なデータ量ではないため、今後検体数を増やして検討を行う必要がある。

本章では、尿検体から ESBLs 産生菌が産生する β ラクタマーゼを抽出することで、抗菌薬との接触時間が 15 分間と短時間で MALDI-TOF MS を用いて ESBLs 産生菌と感性菌をオーバーラップすることなく判別することが可能であることを見出した。その検出下限となる菌量は 10^4CFU/mL であり、共存する他の菌種の影響を受けないことを明らかにした。

第4章 結論

本研究では、測定機種に依存しない MALDI-TOF MS による ESBLs 産生菌の迅速検出法の確立と臨床への応用を目指して、複数の β ラクタム系抗菌薬に対応し、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis* に対して判定可能な検出方法の構築と実検体である尿を用いた検討を行った。

第2章では、MALDI-TOF MS による迅速検出法の確立を目指し、VITEK[®] MS で構築された方法を MALDI Biotyper[®] に適用可能であることを示し、測定に用いる機器の種類により最適な試料接種量が存在し、VITEK[®] MS では 4 μ L であるのに対し MALDI Biotyper[®] では 3 μ L であることを明らかにした。さらに、CTX に加えて、同じセファロスポリン系抗菌薬の CPDX とペニシリン系抗菌薬の PIPC でも各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 産生菌の判別が可能であることが明らかとなった。CTX、CPDX、PIPC は、いずれの抗菌薬も 15 分間の接触時間で、各抗菌薬の非加水分解物由来シグナルと加水分解物由来シグナルを観測できた。また、*E. coli* に加えて、*K. pneumoniae* と *P. mirabilis* にも本手法を適用可能であることを示し、内部標準物質に IPM を用いて算出した相対シグナル強度比より、ESBLs 産生菌と感性菌を 30 分以内に判別できることが明らかとなった。

第3章では、ESBLs 産生菌が産生する β ラクタマーゼに着目して、 β ラクタマーゼの抽出方法を模索し、臨床検体より分離培養を行わず、より迅速に薬剤耐性菌の存在の有無を判別することを目的とした。分散液として L ブロス、菌を添加した健常尿を用いた結果、CTX、CPDX および CPR のいずれの抗菌薬も 5 分間の接触時間で、抗菌薬の非加水分解物由来シグナルと加水分解物由来シグナルを検出することが可能であった。ルーチン作業での操作性を考慮して 15 分間または 30 分間の接触時間で ESBLs 産生株の判別に影響する因子を検討した結果、尿に含まれるアミノ酸等の微量成分、潜血、患者の性別や年代等の影響、共存するグラム陽性球菌が測定結果に影響を及ぼさないことが明らかとなった。検出下限となる菌量は、15 分間および 30 分間のいずれの接触時間 10⁶ CFU/mL であったが、分散液量を 1 mL から 10 mL とし遠心分離により菌を濃縮させ、 β ラクタマーゼ量を増やした結果、検出下限となる菌量は 15 分間の接触時間で 10⁴~10⁵ CFU/mL まで捉えられる可能性が示唆された。臨床検体を測定した結果、CTX、CPDX および CPR とともに 15 分間の接触時間で、ESBLs 産生株と感性株を明確に判別できることが明らかとなった。

以上より、第2章では測定機種に依存しない ESBLs 産生菌の MALDI-TOF MS による迅速検出法を確立し、第3章では β ラクタマーゼを抽出して確立した検出方法で分析することで検出下限の菌量が 10⁴ CFU/mL まで捉えられたことから、

本研究は耐性菌が産生する β ラクタマーゼによる構造変化を捉えることで耐性菌を検出する原理を用いているため、CRE や AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌などのように ESBLs 産生菌と同様に β ラクタマーゼを産生する耐性菌の検出にも応用可能であり、臨床における本手法の有用性は極めて高いものと考えられる。本研究で得られた結果は、感染症治療において早期に抗菌薬の de-escalation を可能とするものであり、耐性菌が検出された場合でも早期に適切な抗菌薬への変更が可能となり、抗菌薬の適正使用の観点から、多剤耐性菌の蔓延の防止に貢献することが期待される。

謝辞

この博士論文を作成するにあたり、多くの方々のご指導ご鞭撻を賜りました。

研究指導教員である東京医療保健大学 名誉学長 木村哲 教授には、まず本論文の審査にあたりご多忙の中ご精読いただきましたこと深く感謝いたします。本研究にあたり、研究ゼミ内での的確なご指導、また、学会発表の抄録や発表スライドへのご教示をしていただき、その都度適切な方向へ導いていただきました。深く感謝申し上げます。

副研究指導教員の東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 岩澤篤郎 教授、松村有里子 准教授には、この研究活動全般を通じて様々なことを教えていただきました。

岩澤篤郎 教授は、同じ臨床検査技師というのもあり研究で行き詰った時に色々と話を聞いていただきました。何度となく励ましてくださいましたこと大変感謝いたします。また、細菌の他に真菌やウイルスと様々な生物を扱える教授の下で研究出来たことは、細菌しか扱ったことのない私にとって物凄く良い経験となりました。ありがとうございました。

松村有里子 准教授には、研究の方法や抄録や論文の書き方など多岐にわたり教えていただきました。研究の道に進もうか悩んでいた私にとって、先生と出会えたことは幸運であり、感謝してもしきれません。それに加え、私が研究で悩んでいる時は、優しく丁寧に話を聞いてくださり、自分自身でその悩みを解決に導けるように助言していただきました。楽しく研究に取り組むことが出来たのは、松村 准教授のおかげです。深く感謝致します。

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科の感染制御学の先生方には、研究ゼミで大変お世話になりました。検査技師の世界しか知らない自分にとって、様々な視点からのご意見をいただけたことは、大変貴重なものでした。

社会人学生として研究する機会とともに多大なるご支援とご協力をいただいた君津中央病院 医療技術局 臨床検査科 微生物検査室の方々には本当に感謝いたします。研究を最後までやり遂げられたのはスタッフの皆様がいてくれたおかげです。本当にありがとうございました。

最後になりましたが、大学院進学としてからの長きにわたり、応援してくれた家族の方々に心より感謝いたします。仕事や対外的な業務も重なり多忙を極め、家庭のことは妻に任せきりでした。それでも、いつも笑顔で送り出してくれた姿に本当に感謝しかありません。深く感謝致します。

引用文献

- 1) Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Path* 1961; 14: 385-393.
- 2) George A. Epidemiology of Extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 81-83.
- 3) Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009 ; 9 : 228-236.
- 4) Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. The ecology of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med* 2017; 24: 44-51.
- 5) Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 821-830.
- 6) Latania K, Robert A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis* 2017; 215: S28-S36.
- 7) 厚生労働省, 「院内感染対策サーベイランス事業」,
https://janis.mhlw.go.jp./report/open_report/2018/2/1/ken_Open_Report_201804.pdf (Accessed 10 Dec. 2022) .
- 8) Ishi Y, Ohno A, Yaguchi H, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2269-2275.
- 9) Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, et al. Multicenter retrospective study cefmetazole and flomoxef for treatment of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 5107-5113.
- 10) WHO, “Global action plan on antimicrobial resistance [Internet]”,
<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/> (Accessed 10 Dec. 2022) .
- 11) 厚生労働省, 「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」,
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>. (Accessed 10 Dec. 2022) .
- 12) 公益社団法人日本化学療法学会, 「抗菌薬適正使用支援プログラム実践のためのガイドライン」,
http://www.chemotherapy.or.jp/guideline/kobiseibutuyaku_guidance.pdf. (Accessed 10 Dec. 2022)

- 13) 厚生労働省, 「平成 30 年度診療報酬改定 抗菌薬適正使用支援加算」, <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/siryos5.pdf>. (Accessed 10 Dec. 2022) .
- 14) 松村 有里子. 質量分析の世界-臨床分野への活用について-. 株式会社幸書房編. 感染と消毒. 大阪 : サラヤ株式会社 2017 ; 15-24.
- 15) Tran A, Alby K, Kerr A, et al. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2473-2479.
- 16) Tan KE, Ellis BC, Lee R, et al. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3301-3308.
- 17) Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000; 49: 295-300.
- 18) Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2000; 49: 3321-3324.
- 19) Katrin S, Soren S, Ulrich W, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 927-937.
- 20) Foschi C, Compri M, Smirnova V, et al. Ease-of-use protocol for the rapid detection of third-generation cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures using matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Hospital Infection* 2016; 93: 206-210.
- 21) 池ヶ谷 佳寿子、松村 有里子、岩澤 篤郎、木村 哲、土屋 憲. 質量分析による ESBLs 検出法の検討. 日化療会誌 2018 ; 67 : 29-37.
- 22) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22, CLSI, Wayne, Pa, 2012; 32 (3)

- 23) Kobayashi S, Nakamura T, Kusuki M, et al. Rapid detection of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria using DPS192iX. *J Med Tech* 2017; 66: 649-655.
- 24) Sparbier K, Schubert S, Weller U, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 927–937.
- 25) Marina O, Marta G, Maria J, et al. Towards the early detection of b-lactamase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 2259–2262.
- 26) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. ; CLSI document M100-S26., CLSI, Wayne, Pa, 2016
- 27) Venere C, Tiziana D, Liliana G, et al. Comparing BioFire FilmArray BCID2 and BCID Panels for Direct Detection of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance Genes from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2021; Vol. 59, No. 4
- 28) Tanja H, Jukka T, Nathalie F, et.al. Rapid molecular detection of pathogenic microorganisms and antimicrobial resistance markers in blood cultures: evaluation and utility of the next-generation FilmArray Blood Culture Identification 2 panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2022; 41: 363–371.
- 29) Jasmin K, Stefan Z, Irene B. Evaluation of EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) for positive blood cultures in clinical practice using a total lab automation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39(7):1305-1313.
- 30) Chi-H, Yi-T, Che-H. et.al. Risk factors of community-onset urinary tract infections caused by plasmid-mediated AmpC b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015; 48(3):269-75.
- 31) Gemma J, Jaime BorregoJ, Blanca G. et.al. Susceptibility evolution to antibiotics of *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Klebsiella aerogenes* and *Citrobacter freundii* involved in urinary tract infections: an 11-year epidemiological surveillance study. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020; 38(4):166-169.

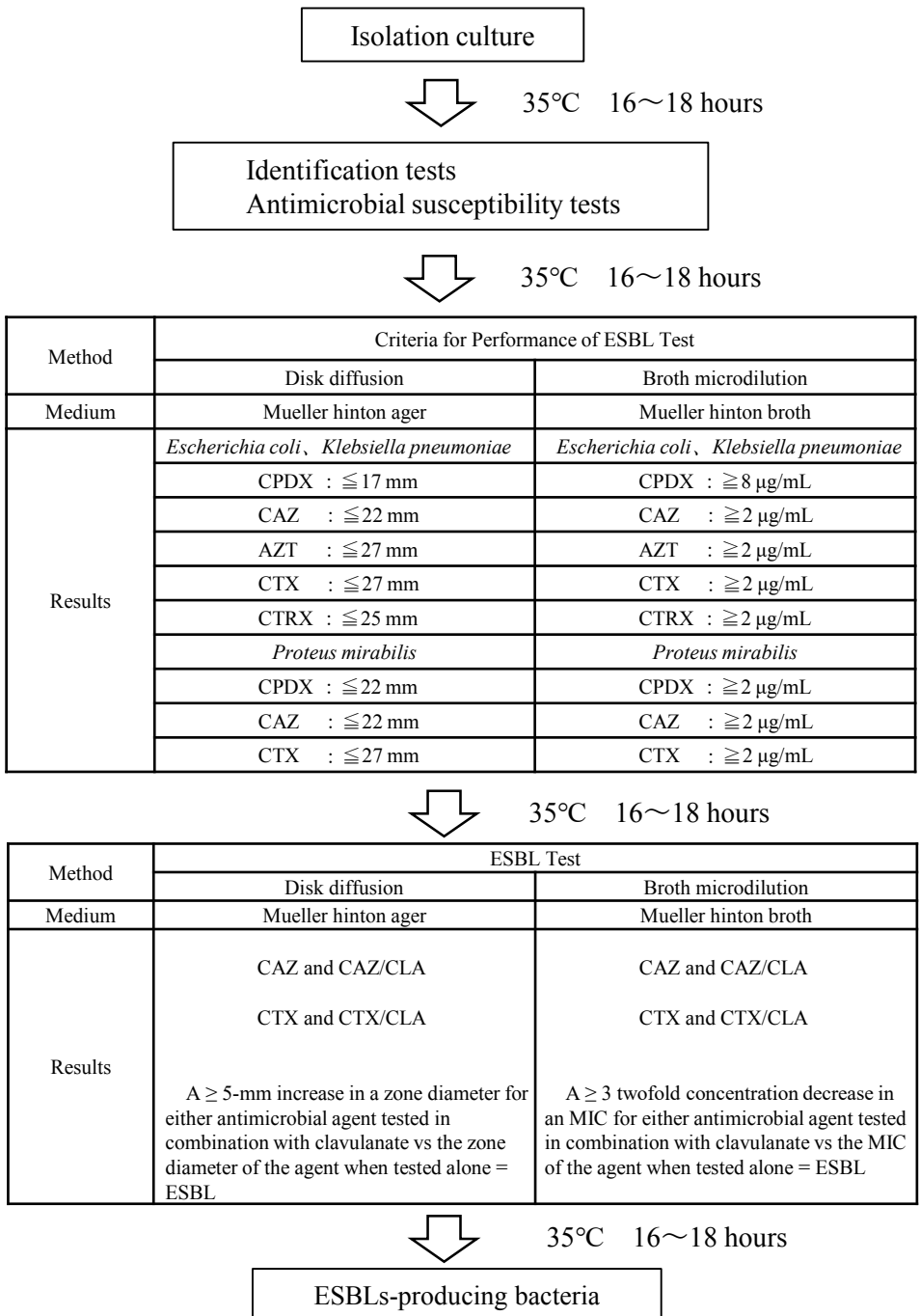
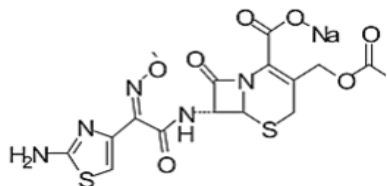


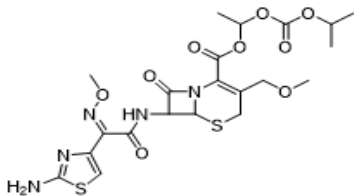
Fig. 1. Screening and identification test methods for the detection of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBLs)-producing bacteria based on the CLSI document (M100-S20) .

(a) cefotaxime (CTX)



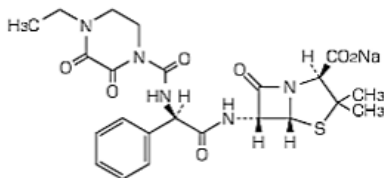
$C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$
Exact Mass : 477.04
(-Na: 455.06)

(b) cefpodoxime (CPDX)



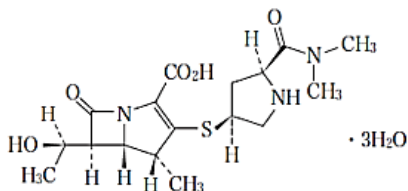
$C_{21}H_{27}N_5O_9S_2$
Exact Mass : 557.13
(-proxetil group: 427.06)

(c) piperacillin (PIPC)



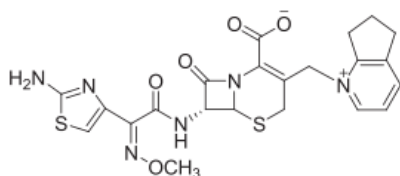
$C_{23}H_{26}N_5NaO_7S$
Exact Mass : 539.15
(-Na: 517.27)

(d) meropenem (MEPM)



$C_{17}H_{25}N_3O_5S$
Exact Mass : 383.15

(e) cefpirome (CPR)



$C_{22}H_{22}N_6O_5S_2$
Exact Mass : 515.12

Fig. 2. Chemical structures, molecular formula, and exact masses of antimicrobial drugs.

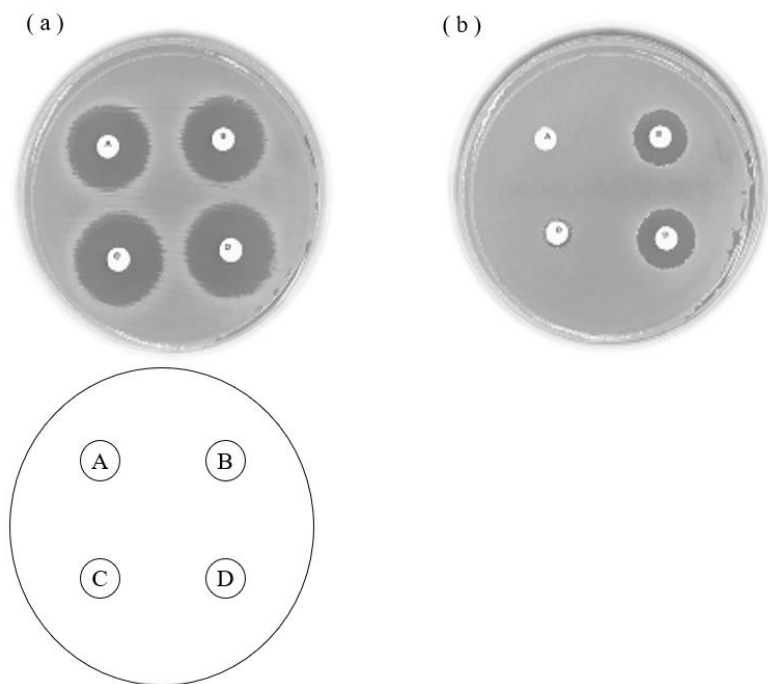


Fig. 3. Methods for determining sensitive strain ESBLs-producing strain in the AmpC and ESBL Detection Set. (a) Sensitive strain (*E. coli* ATCC®25922) and

(b) ESBLs-producing strain (*E. coli* NCTC13462).

Disc type and drug contained;

A: CPDX 10 μ g

B: CPDX 10 μ g + ESBL - inhibitor

C: CPDX 10 μ g + AmpC - inhibitor

D: CPDX 10 μ g + ESBL - inhibitor + AmpC - inhibitor

Sensitive strain : $|A-B|$, $|A-C|$, $|A-D| \leq 2$ mm

ESBLs-producing strain : $B-A$ and $D-C \geq 5$ mm,

moreover $|B-D|$ and $|A-C| \leq 4$ mm

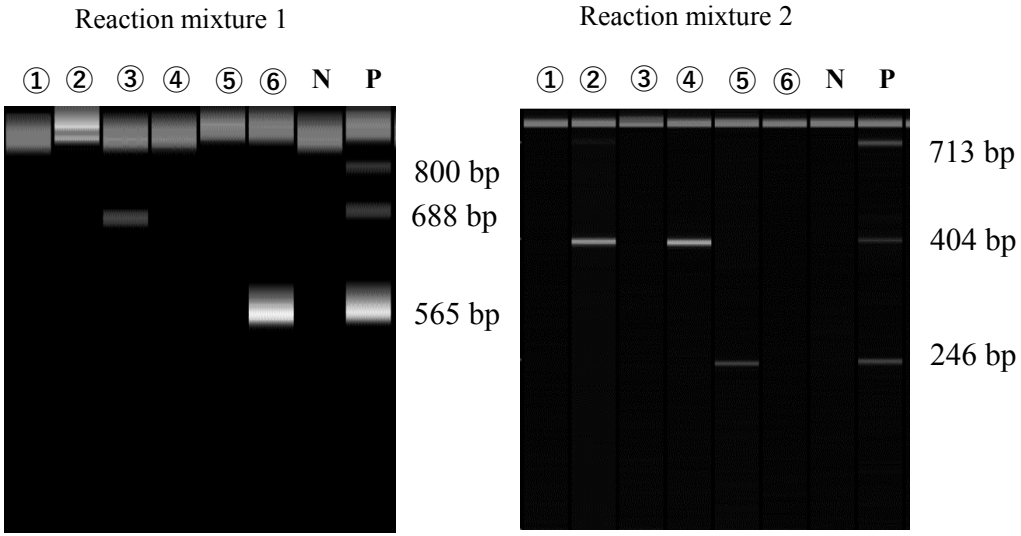


Fig. 4. Electrophoresis with Cica genus ESBL Genotype Detection KIT.

Reaction mixture 1 contains $bla_{\text{CTX-M-1}}$ group and $bla_{\text{CTX-M-9}}$ group primers.
 Reaction mixture 2 contains $bla_{\text{CTX-M-2}}$ group and $bla_{\text{CTX-M-8}}$ group primers.

Position ①: *E. coli* ATCC® 25922

Position ②: *E. coli* NCTC13462

Position ③: CTX-M1

Position ④: CTX-M2

Position ⑤: CTX-M8

Position ⑥: CTX-M9

Position N: negative control

Position P: positive control

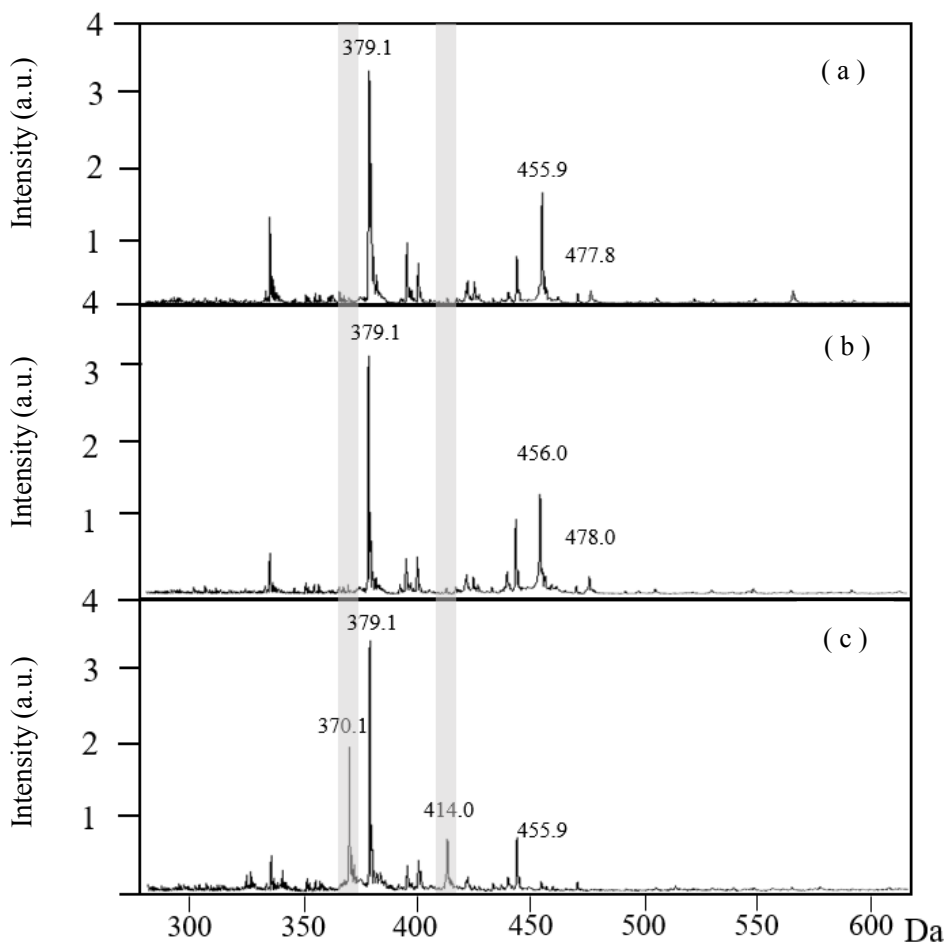


Fig.6. MALDI-TOF MS of CTX, (a) antimicrobial drug in saline (negative control); (b) supernatant of *E. coli* ATCC[®] 25922 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min; (c) supernatant of *E. coli* NCTC 13462 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min. Gray bars indicate the positions of mean the hydrolyzate-derived signal.

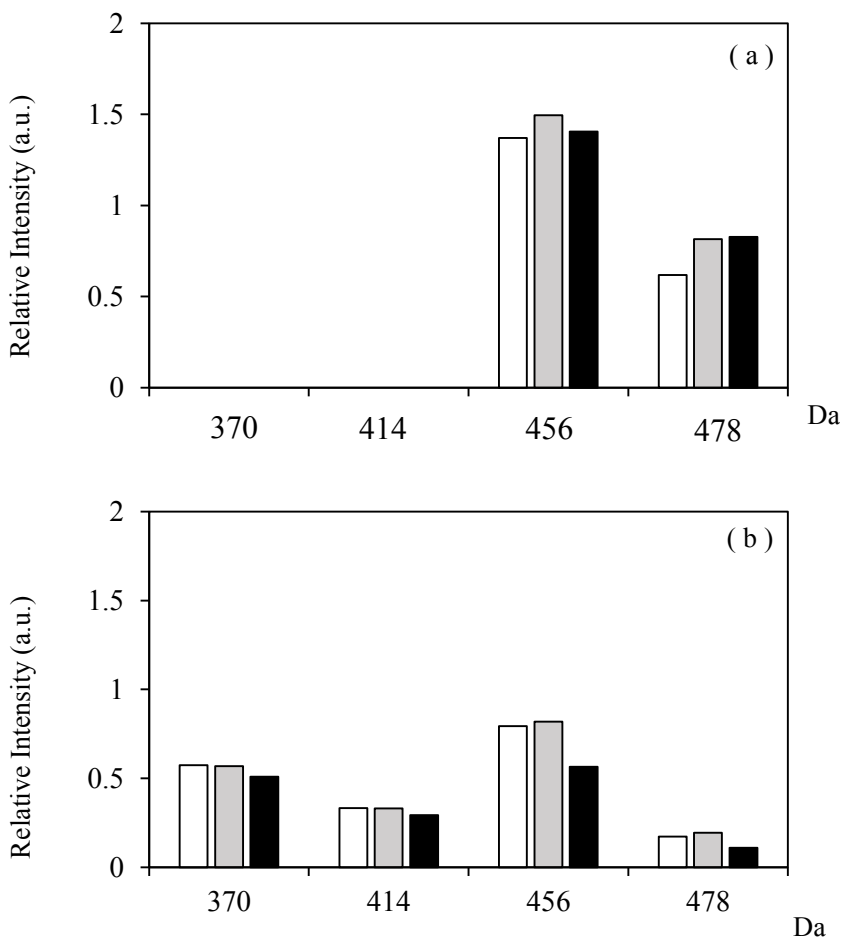


Fig.7. Relationship between CTX signal intensity from non-hydrolyzed and hydrolyzed products at 15 min culture (open bar), 30 min culture (shaded bar), and 60 min culture (solid bar). (a) *E. coli* ATCC 25922, and (b) *E. coli* NCTC 13462.

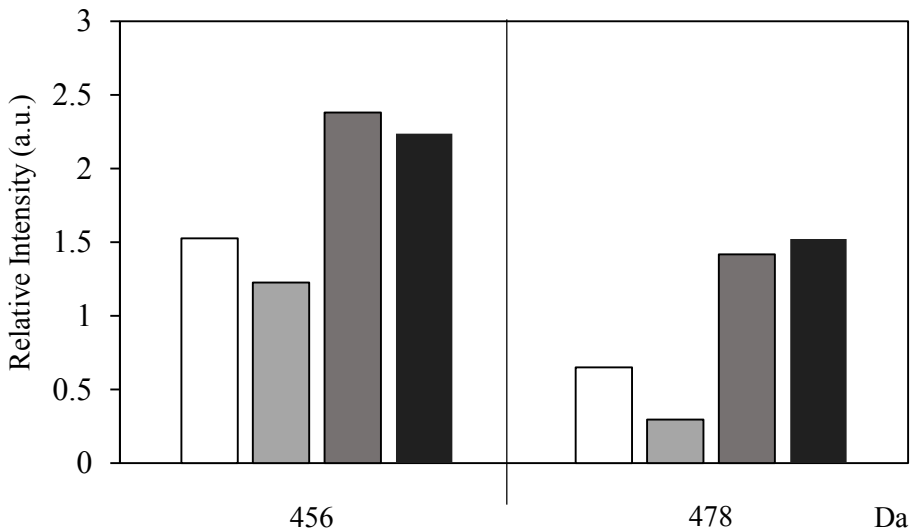


Fig. 8. Relationship between CTX signal intensity from non-hydrolysates and hydrolysates with various volumes of sample inoculum. Open bar: 1 μL ; Light shaded bar: 2 μL ; Shaded bar: 3 μL ; Solid bar: 4 μL .

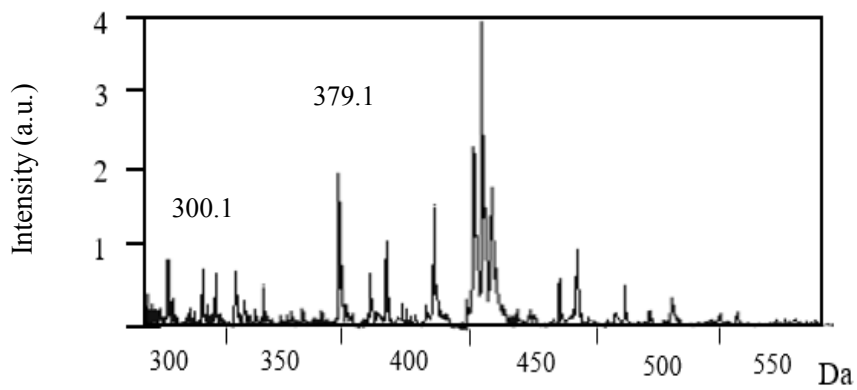


Fig.9. MALDI-TOF MS of IPM in saline.

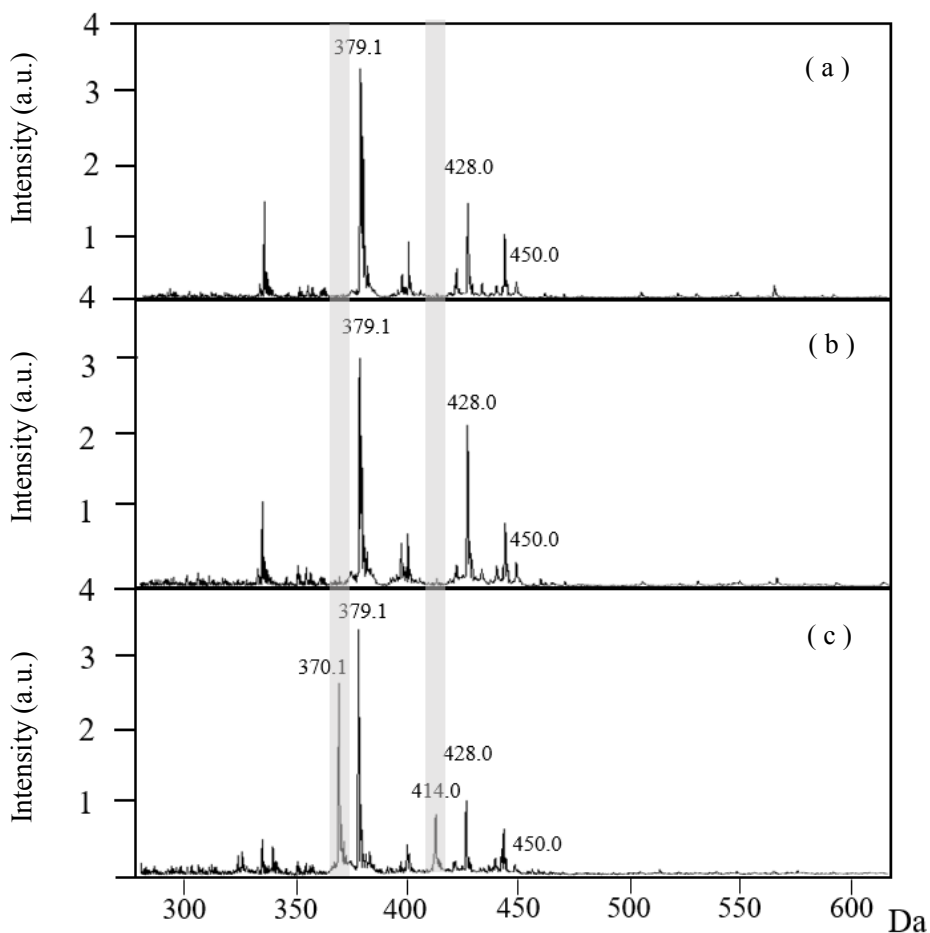


Fig.10. MALDI-TOF MS of CPDX.

(a) antimicrobial drug in saline (negative control); (b) supernatant of *E. coli* ATCC[®] 25922 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min; (c) supernatant of *E. coli* NCTC 13462 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min. Gray bars indicate the positions of mean the hydrolyzate-derived signal.

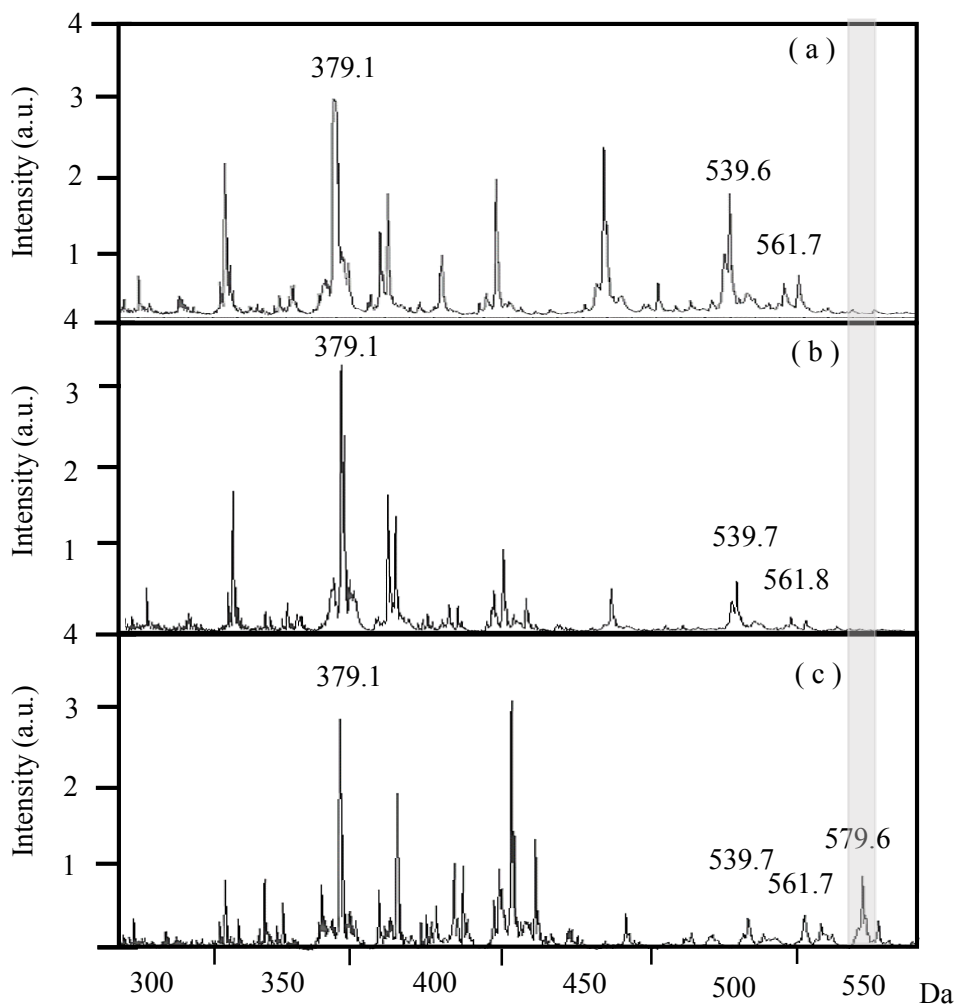


Fig.11. MALDI-TOF MS of PIPC.

(a) antimicrobial drug in saline (negative control); (b) supernatant of *E. coli* ATCC® 25922 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min; (c) supernatant of *E. coli* NCTC 13462 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min. Gray bars indicate the positions of mean the hydrolyzate-derived signal.

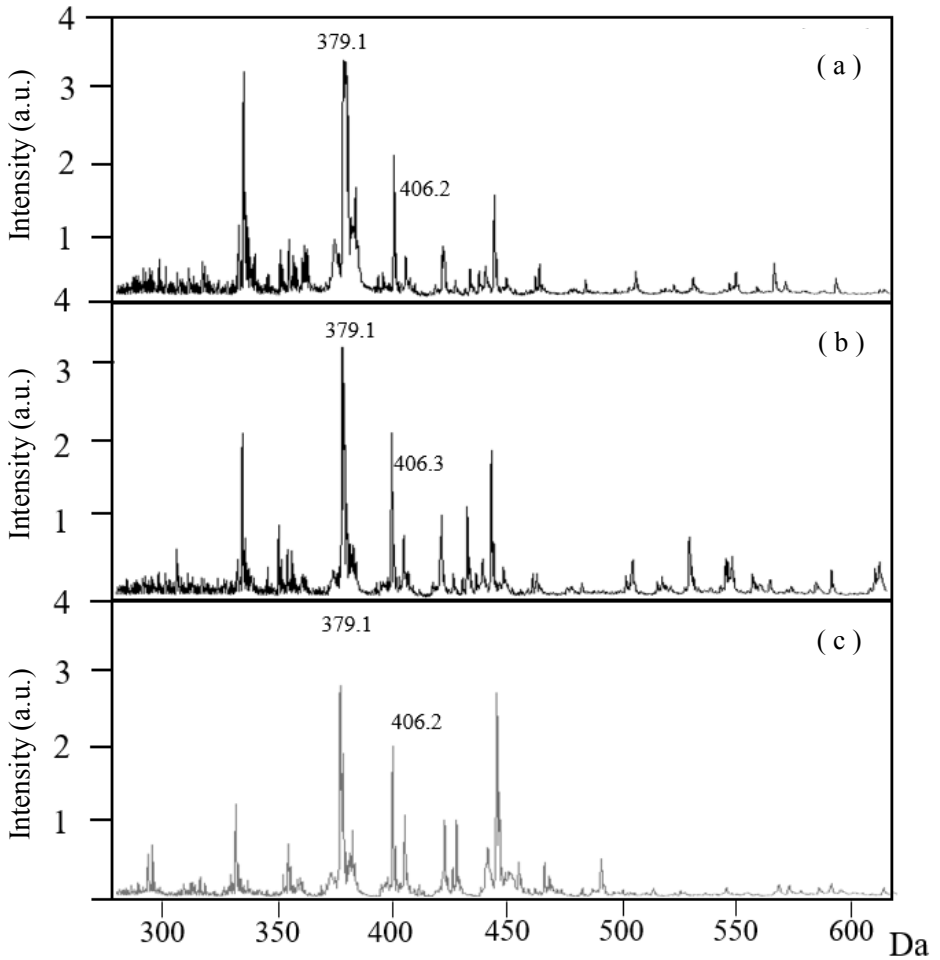


Fig.12. MALDI-TOF MS of MEPM.

(a) antimicrobial drug in saline (negative control); (b) supernatant of *E. coli* ATCC[®] 25922 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min; (c) supernatant of *E. coli* NCTC 13462 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min.

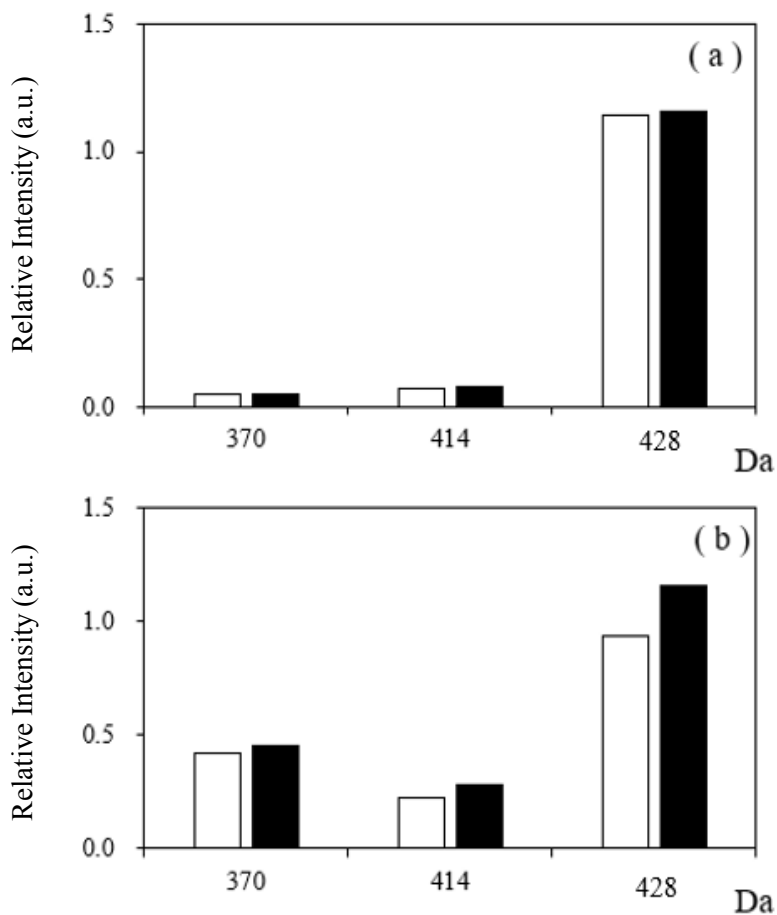


Fig. 13. Relationship between CPDX signal intensity from non-hydrolyzed and hydrolyzed products. Incubation time: 30 min culture (open bar) and 60 min culture (solid bar). (a) *E. coli* ATCC[®] 25922; (b) *E. coli* NCTC 13462 .

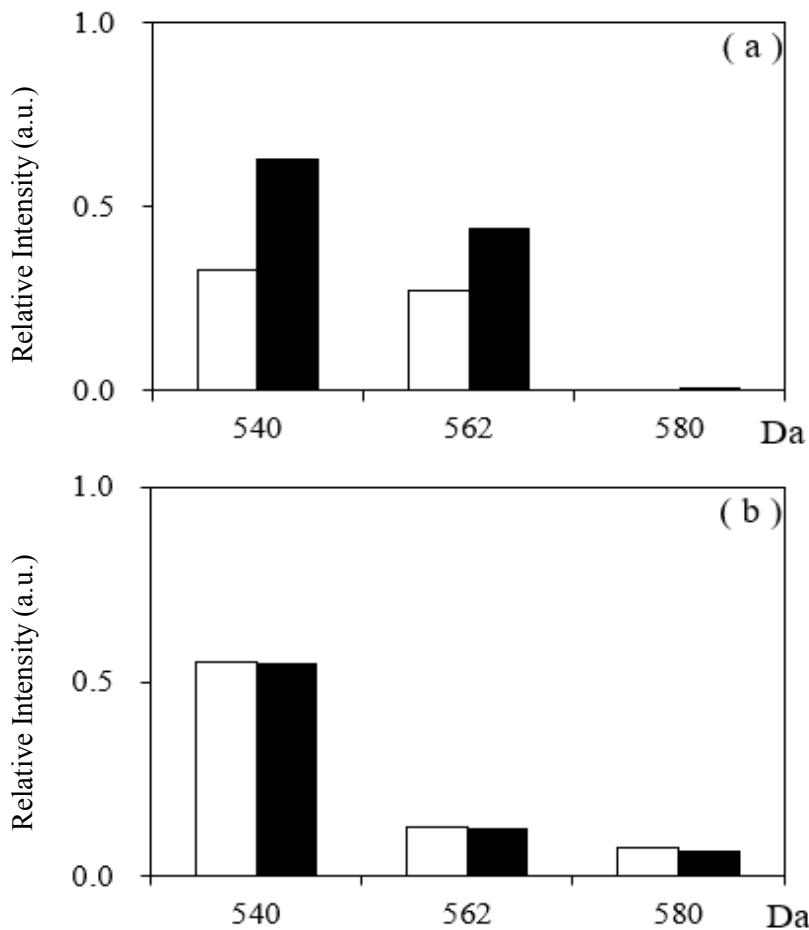


Fig. 14. Relationship between PIPC signal intensity from non-hydrolyzed and hydrolyzed products. Incubation time: 30 min culture (open bar) and 60 min culture (solid bar). (a) *E. coli* ATCC[®] 25922 ; (b) *E. coli* NCTC 13462.

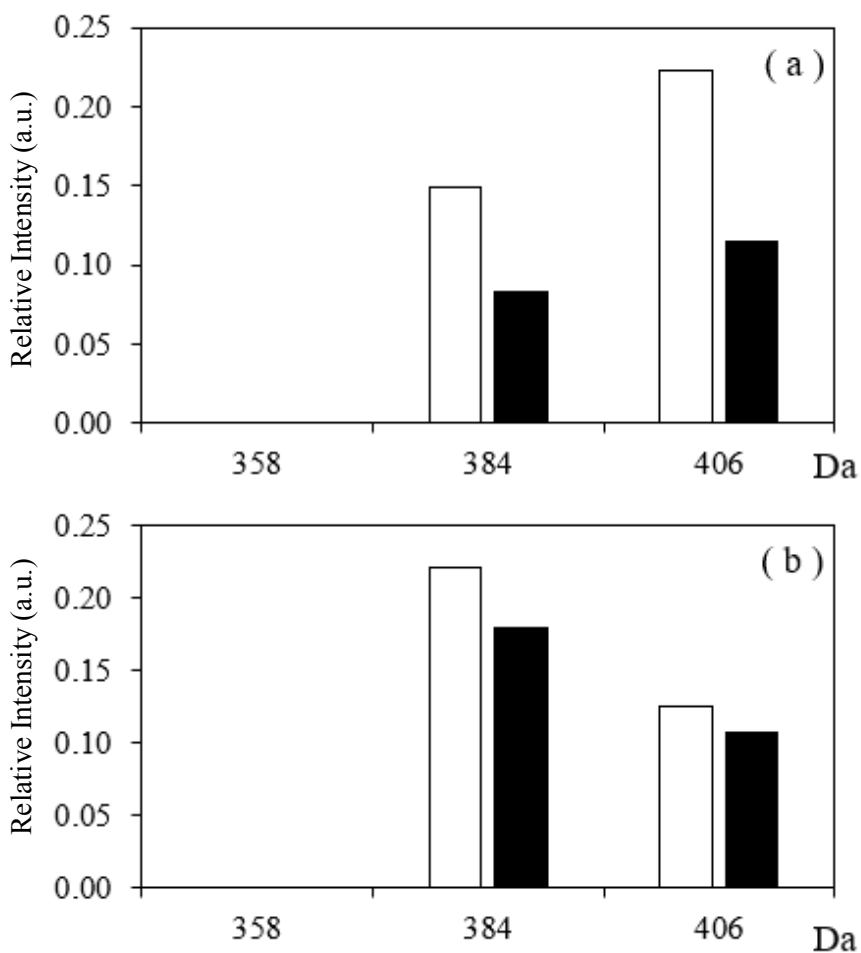


Fig.15. Relationship between MEPM signal intensity from non-hydrolyzed and hydrolyzed products. Incubation time: 30 min culture (open bar) and 60 min culture (solid bar). (a) *E. coli* ATCC[®] 25922 ; (b) *E. coli* NCTC 13462.

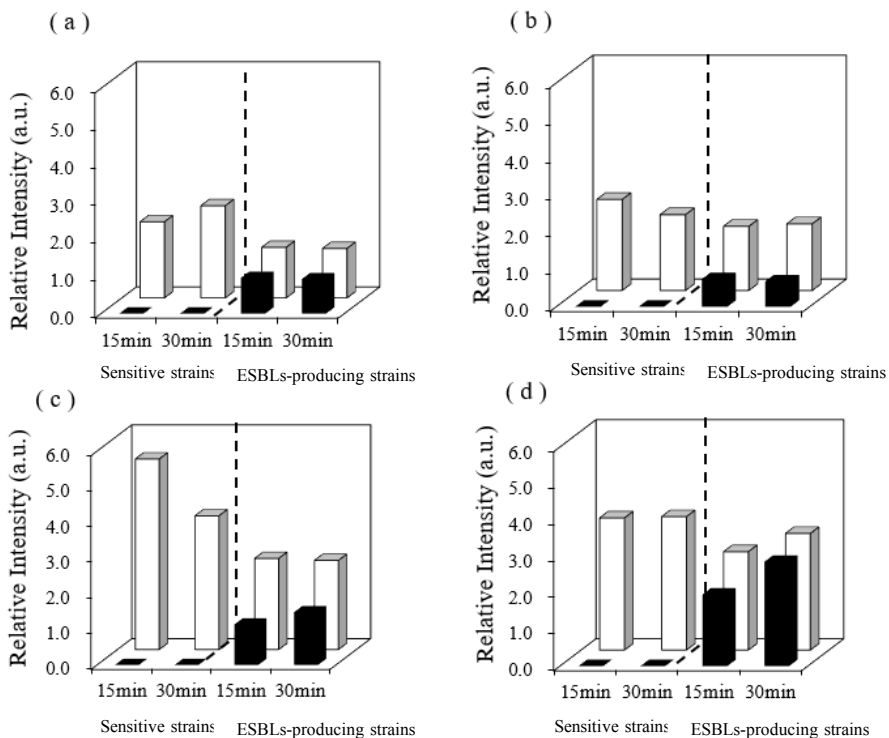


Fig. 16. Relative signal intensity of CTX from non-hydrolyzed antimicrobial drugs vs. relative signal intensity from hydrolyzed antimicrobial drugs. (a) *E. coli* standard strain (ATCC® 25922, NCTC13462); (b) *E. coli* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (c) *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (d) *Proteus mirabilis* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); Open bar: CTX antimicrobial drug non-hydrolyzed substance from 456 Da, Solid bar: CTX antimicrobial drug hydrolyzed substance from 370 Da.

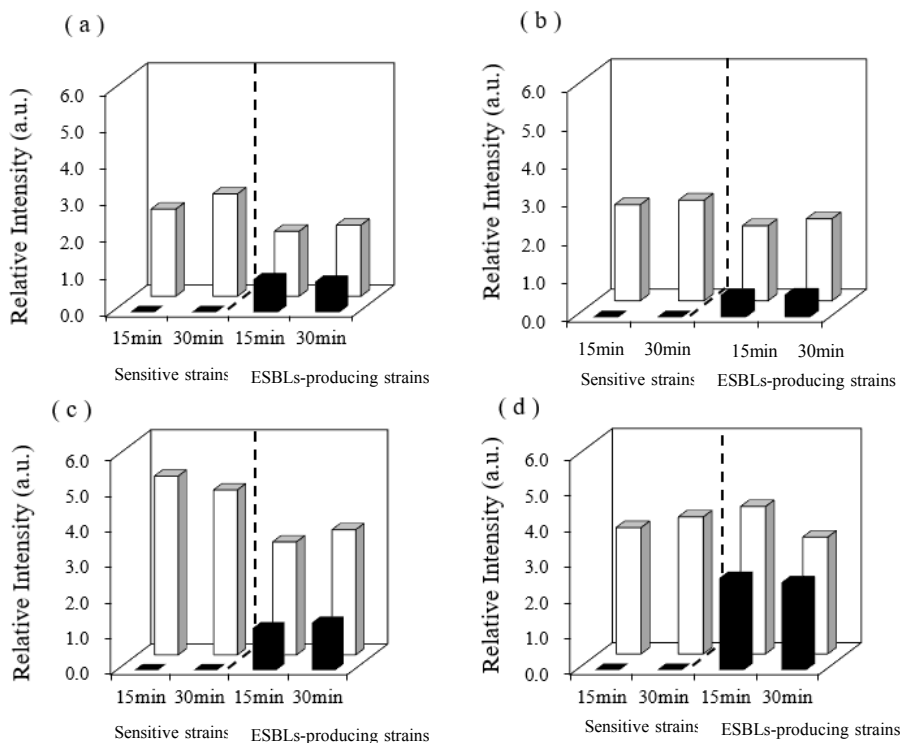


Fig. 17. Relative signal intensity of CPDX from non-hydrolyzed antimicrobial drugs vs. relative signal intensity from hydrolyzed antimicrobial drugs. (a) *E. coli* standard strain (ATCC® 25922, NCTC13462); (b) *E. coli* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (c) *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (d) *Proteus mirabilis* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); Open bar: CPDX antimicrobial drug non-hydrolyzed substance from 428 Da, Solid bar : CPDX antimicrobial drug hydrolyzed substance from 370 Da.

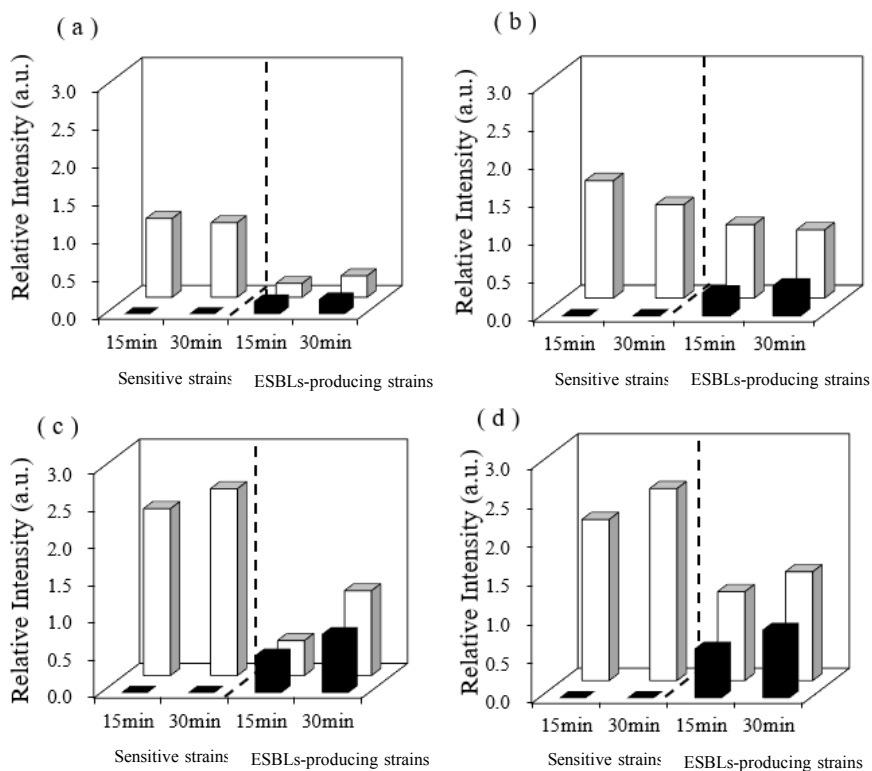


Fig. 18. Relative signal intensity of PIPC from non-hydrolyzed antimicrobial drugs vs. relative signal intensity from hydrolyzed antimicrobial drugs. (a) *E. coli* standard strain (ATCC[®] 25922, NCTC13462); (b) *E. coli* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (c) *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (d) *Proteus mirabilis* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10).

Open bar: PIPC antimicrobial drug non-hydrolyzed substance from 540 Da,
 Solid bar : PIPC antimicrobial drug hydrolyzed substance from 580 Da.

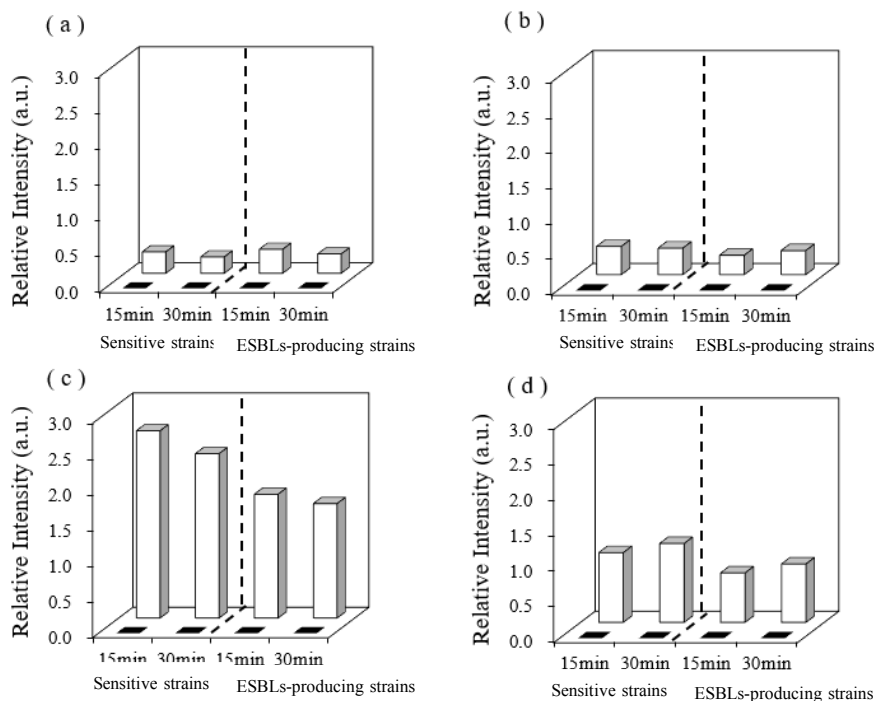


Fig. 19. Relative signal intensity of MEPM from non-hydrolyzed antimicrobial drugs vs. relative signal intensity from hydrolyzed antimicrobial drugs. (a) *E. coli* standard strain (ATCC® 25922, NCTC13462); (b) *E. coli* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (c) *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10); (d) *Proteus mirabilis* clinical isolate (sensitive strains 10, ESBLs-producing strains 10).

Open bar: PIPC antimicrobial drug non-hydrolyzed substance from 406 Da,
 Solid bar: PIPC antimicrobial drug hydrolyzed substance from 358 Da.

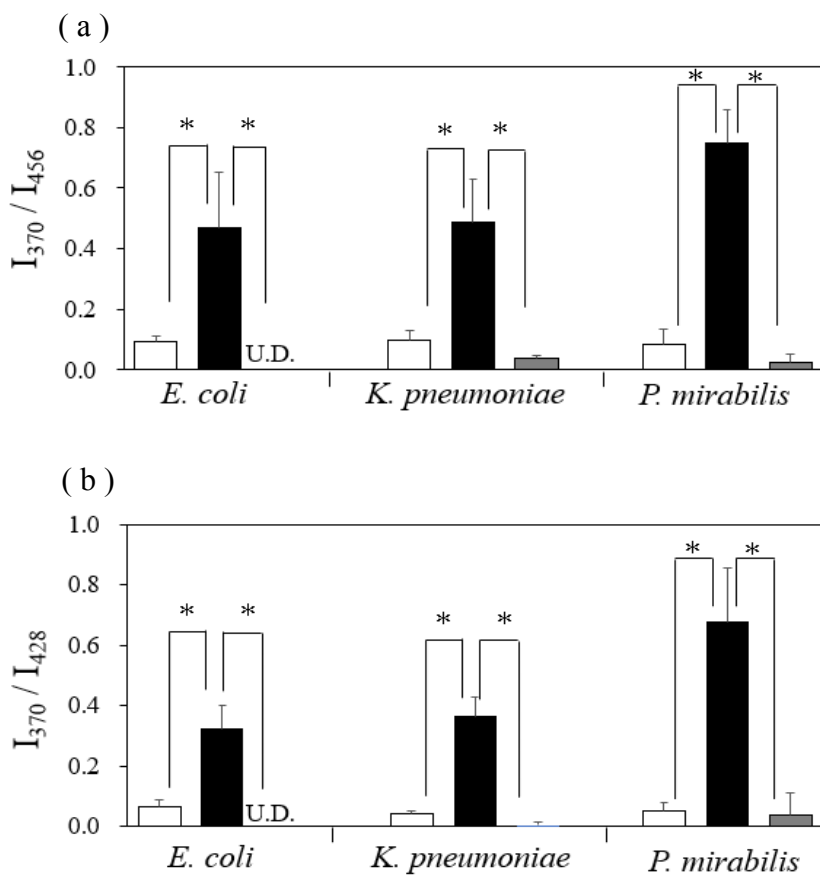


Fig. 20. Relative signal intensity ratio of antimicrobial drugs non-hydrolysate-derived/ antimicrobial drugs hydrolysate-derived relative signal intensities in clinical isolates at 15 min incubation for sensitive strains (open bar), ESBLs-producing strains (solid bar), and ESBLs-producing strains in the presence of CLA (shaded bar). (a) I_{370} / I_{456} values for clinical isolates using CTX; (b) I_{370} / I_{428} values for clinical isolates using CPDX.

U.D.: Undetectable

* $p < 0.01$

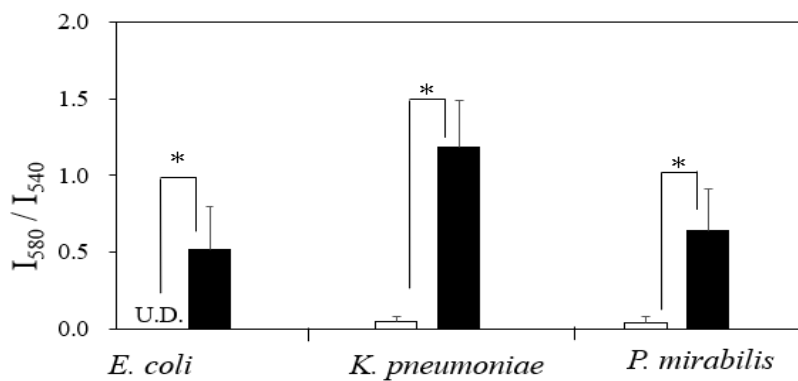


Fig. 21. Relative signal intensity ratio (I_{580} / I_{540}) of PIPC non-hydrolysate-derived/ PIPC hydrolysate-derived relative signal intensities in clinical isolates at 15 min incubation for sensitive strains (open bar), ESBLs-producing strains (solid bar), and ESBLs-producing strains in the presence of CLA (shaded bar).

U.D. : Undetectable

* $p < 0.01$

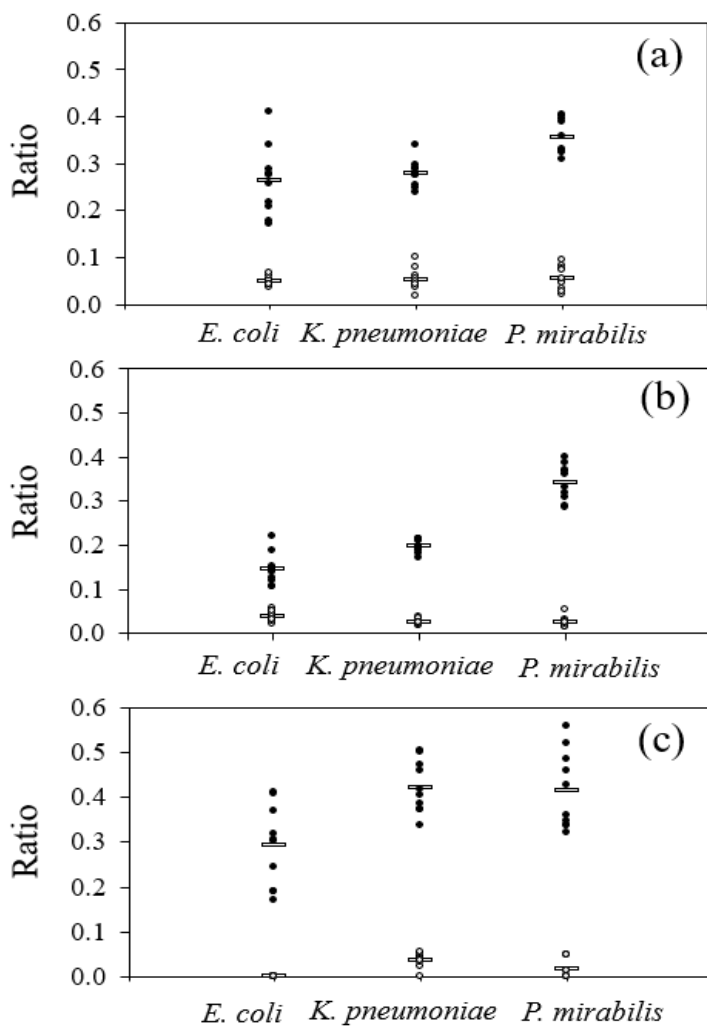


Fig. 22. Ratios of MALDI-TOF MS signal intensity derived from antimicrobial hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug.

(a) CTX signal intensity at 370 Da/(456 Da + 478 Da + 370 Da);
 (b) CPDX signal intensity at 370 Da/(428 Da + 450 Da + 370 Da); and
 (c) PIPC signal intensity at 580 Da/(540 Da + 562 Da + 580 Da).

Solid circles indicate ESBLs-producing strains

Open circles indicate sensitive strains.

The bar represents the mean value.

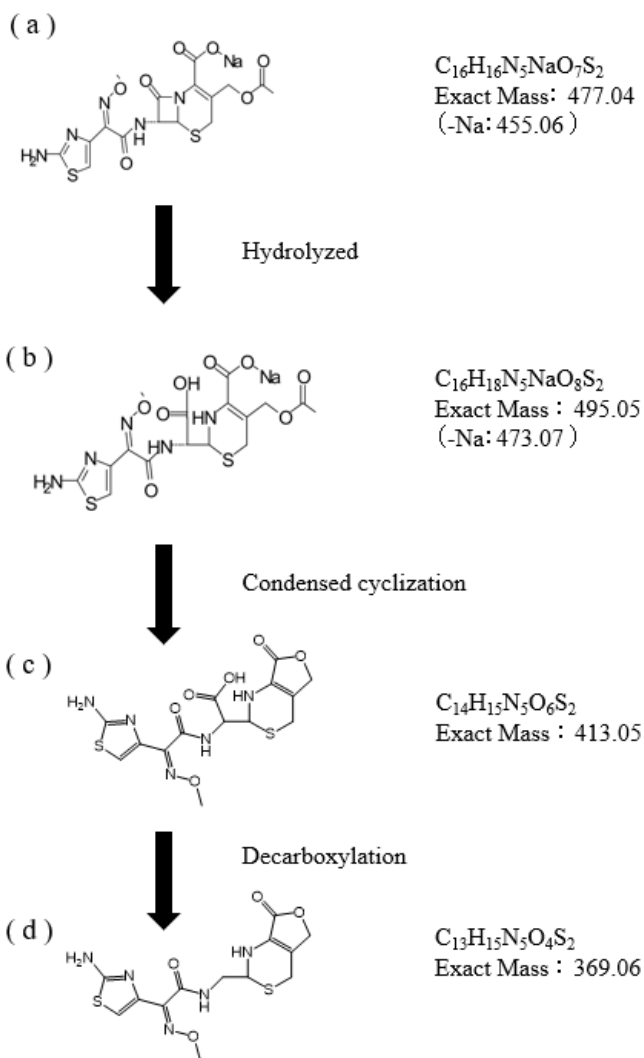


Fig. 23. Hydrolyzed metabolites of CTX ²¹⁾.

CTX (a) is hydrolyzed by β -lactamase produced by ESBLs-producing bacteria to form β -lactam ring-opened structure (b). The structure (c), which is formed through condensation cyclization, becomes the structure (d) by decarboxylation.

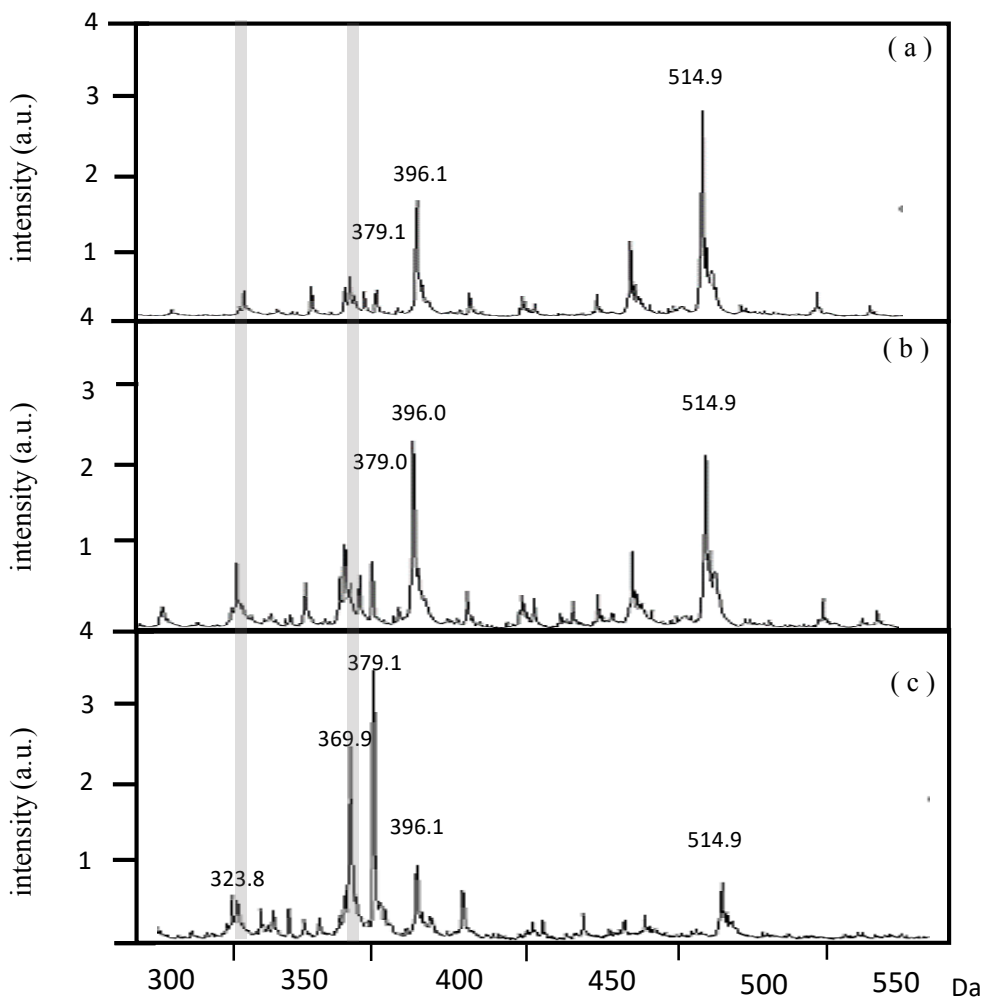


Fig. 24. MALDI-TOF MS of CPR.

(a) antimicrobial drug in saline (negative control); (b) supernatant of *E. coli* ATCC[®] 25922 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min; (c) supernatant of *E. coli* NCTC 13462 suspension incubated with antimicrobial drug for 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Gray bars indicate the positions of mean the hydrolyzate-derived signal.

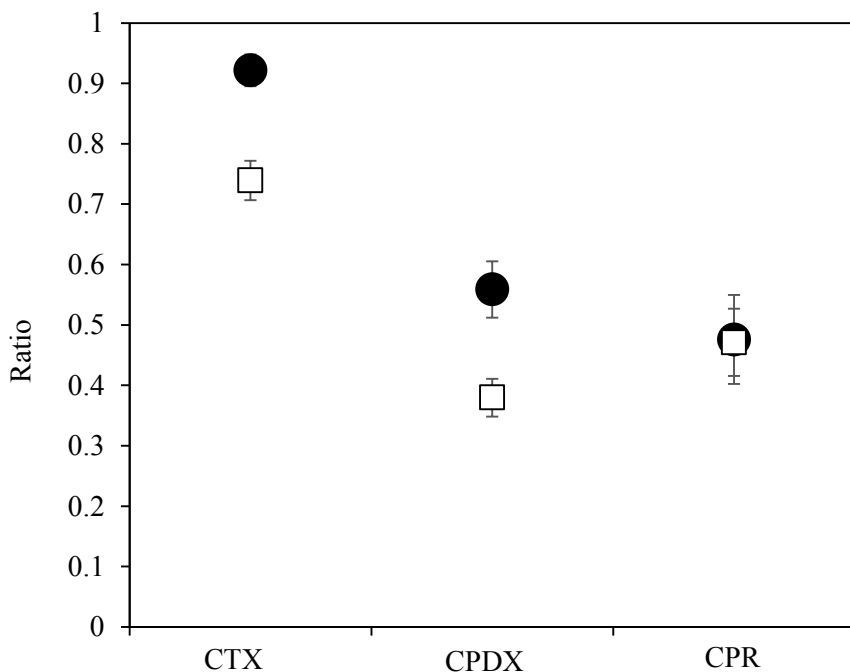


Fig. 25. Comparison of dispersions using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from antimicrobial hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. CTX signal intensity at 370 Da/(456 Da + 478 Da + 370 Da); CPDX signal intensity at 370 Da/(428 Da + 450 Da + 370 Da); and CPR signal intensity at 370 Da/(370 Da + 396 Da + 515 Da). The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Solid circles indicate the suspension of ESBLs-producing strain (*E. coli* NCTC13462) in L-broth.

Open squares indicate the suspension of ESBLs-producing strain (*E. coli* NCTC13462) in saline.

Data represents the mean value \pm SD.

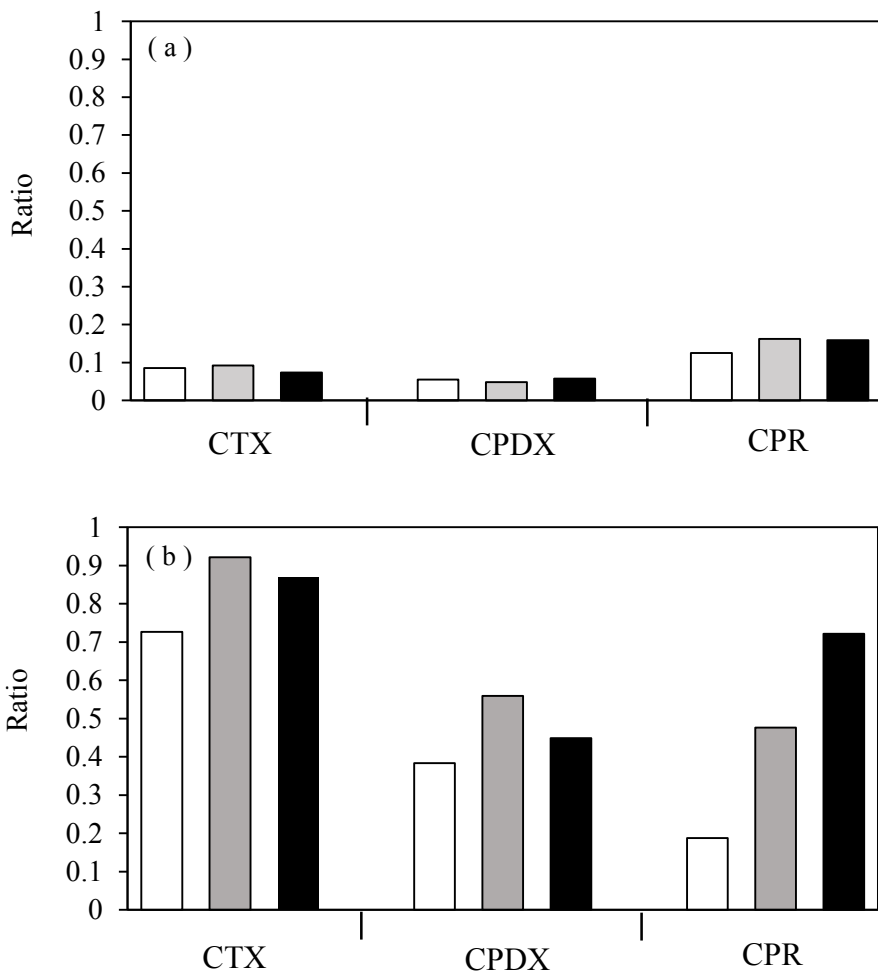


Fig. 26. Ratios of MALDI-TOF MS signal intensity derived from antimicrobial hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug with incubation time for 5 min (open bar), 15 min (shaded bar), and 30 min (solid bar). CTX signal intensity at 370 Da/(456 Da + 478 Da + 370 Da); CPDX signal intensity at 370 Da/(428 Da + 450 Da + 370 Da); and CPR signal intensity at 370 Da/(370 Da + 396 Da + 515 Da). The extracted β -lactamase were used for the measurements.

(a) Suspension of sensitive strain (*E. coli* ATCC[®] 25922) in saline.

(b) Suspension of ESBLs-producing strain (*E. coli* NCTC 13462) in saline.

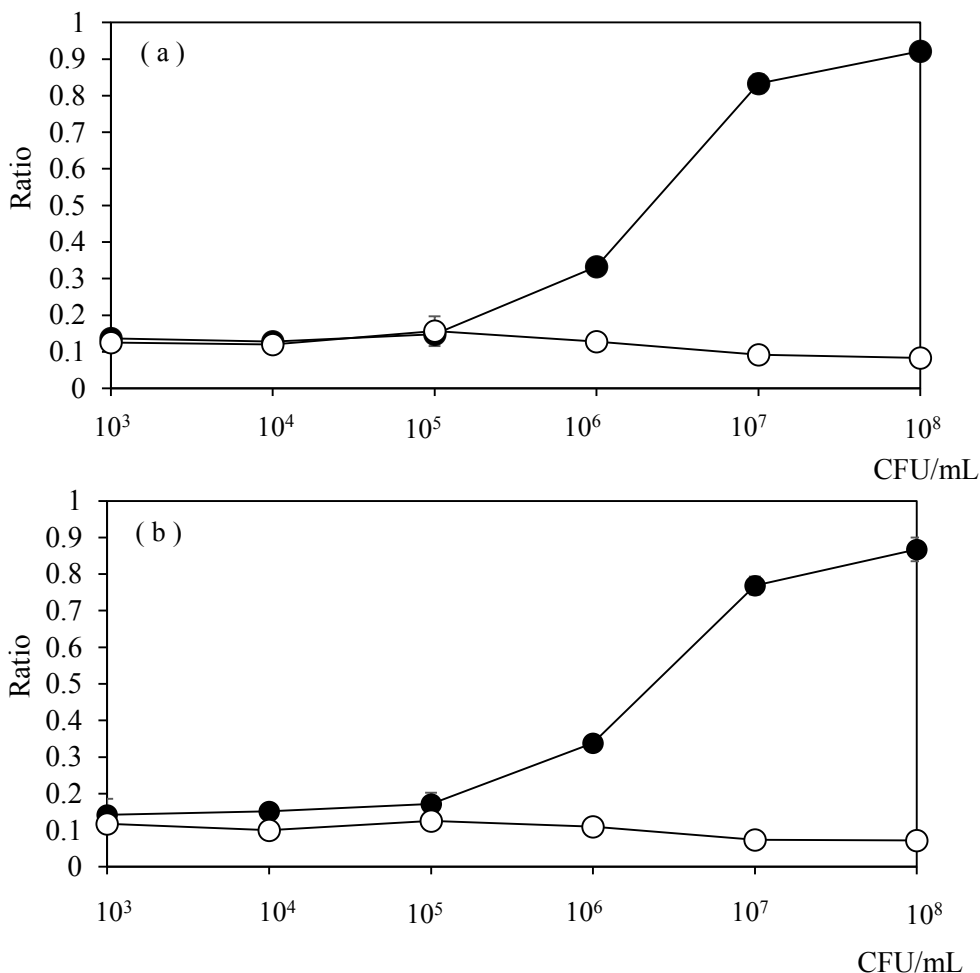


Fig. 27. Dilution series of bacterial volumes suspended in L-broth using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CTX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate *E. coli* ATCC[®] 25922. Solid circles indicate *E. coli* NCTC13462.

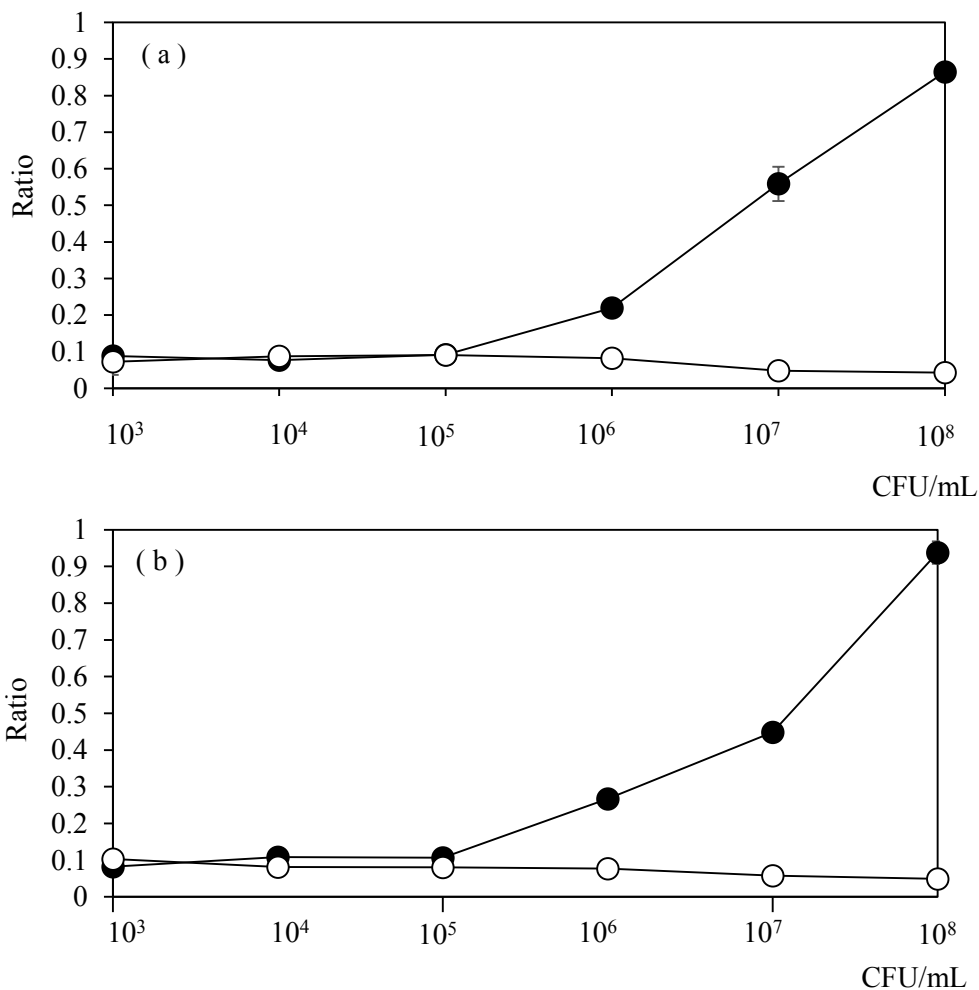


Fig. 28. Dilution series of bacterial volumes suspended in L-broth using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPDX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate *E. coli* ATCC® 25922. Solid circles indicate *E. coli* NCTC13462.

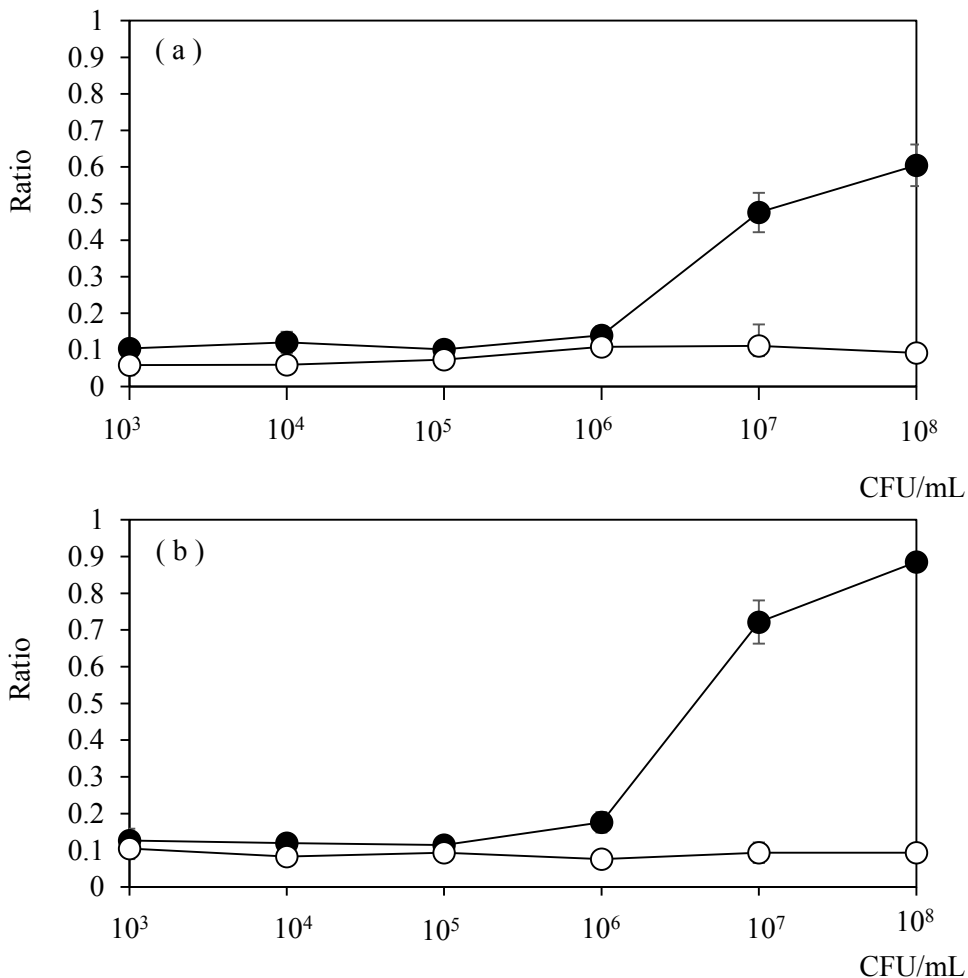


Fig. 29. Dilution series of bacterial volumes suspended in L-broth using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPR hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate *E. coli* ATCC[®] 25922. Solid circles indicate *E. coli* NCTC13462.

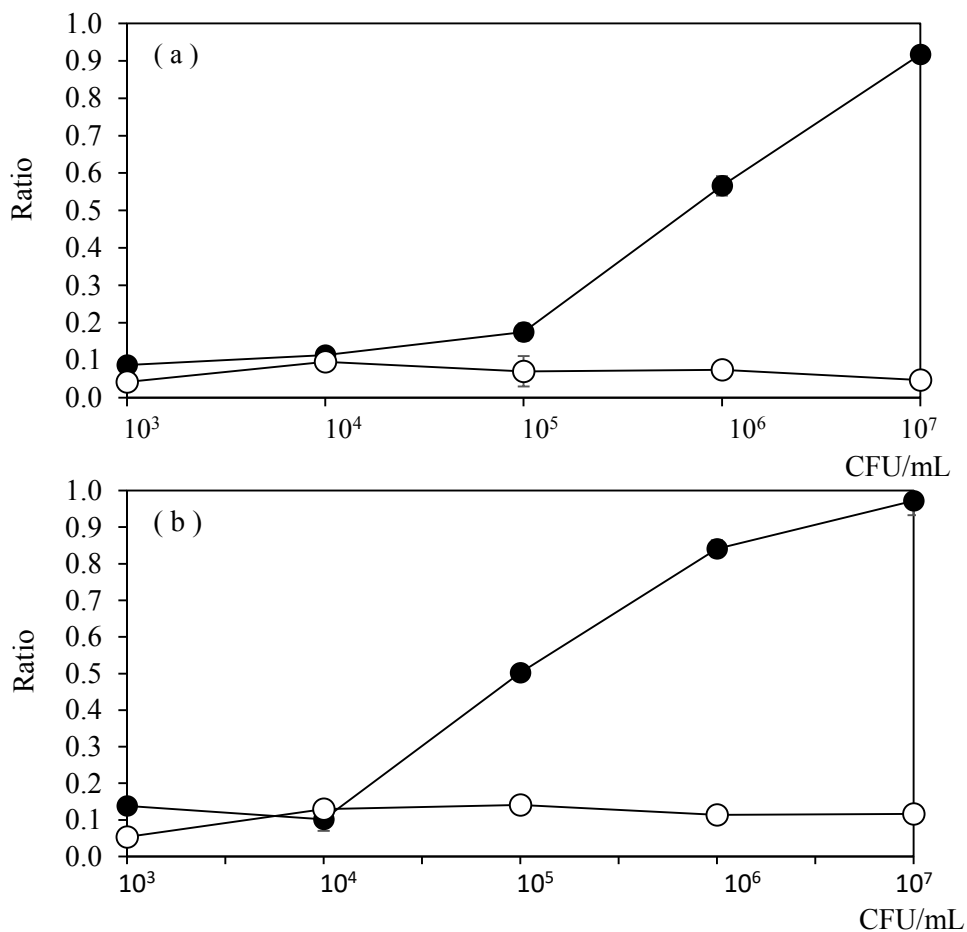


Fig. 30. Dilution series of bacterial volumes suspended in urine samples using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CTX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Open circles indicate *E. coli* ATCC[®] 25922.

Solid circles indicate *E. coli* NCTC13462.

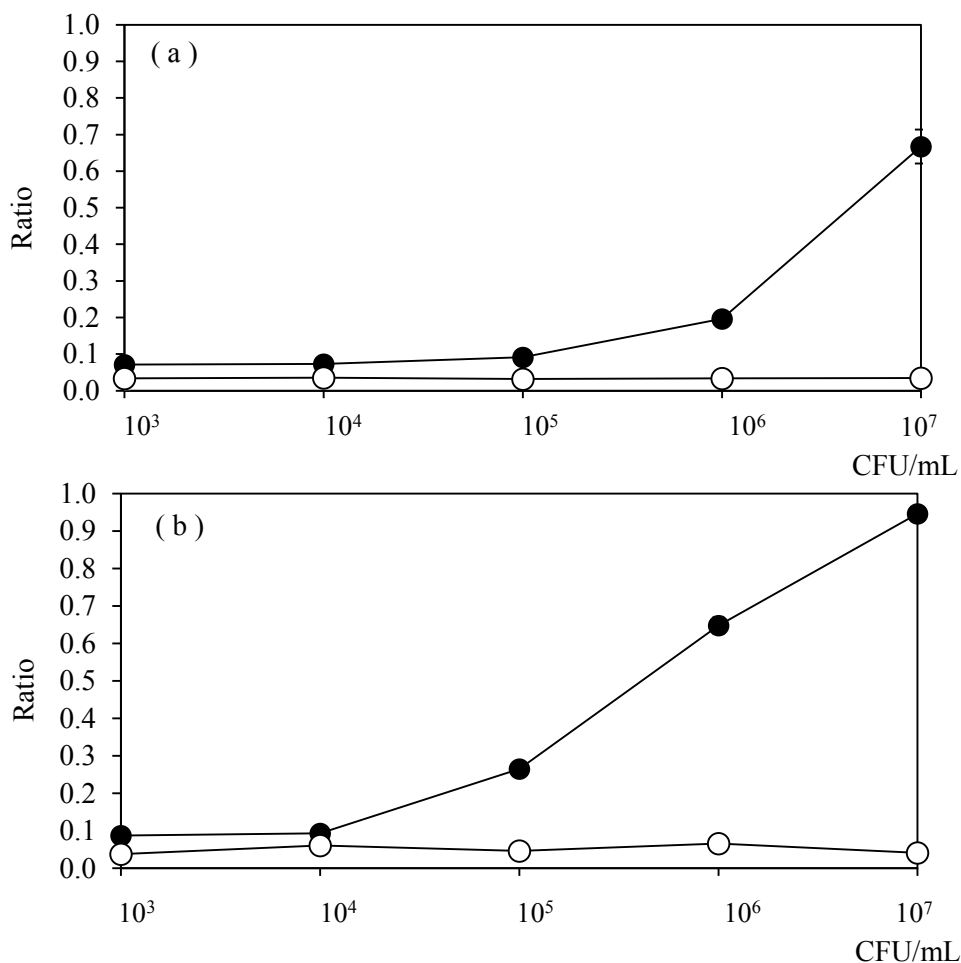


Fig. 31. Dilution series of bacterial volumes suspended in urine samples using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPDX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Open circles indicate *E. coli* ATCC[®] 25922.

Solid circles indicate *E. coli* NCTC13462.

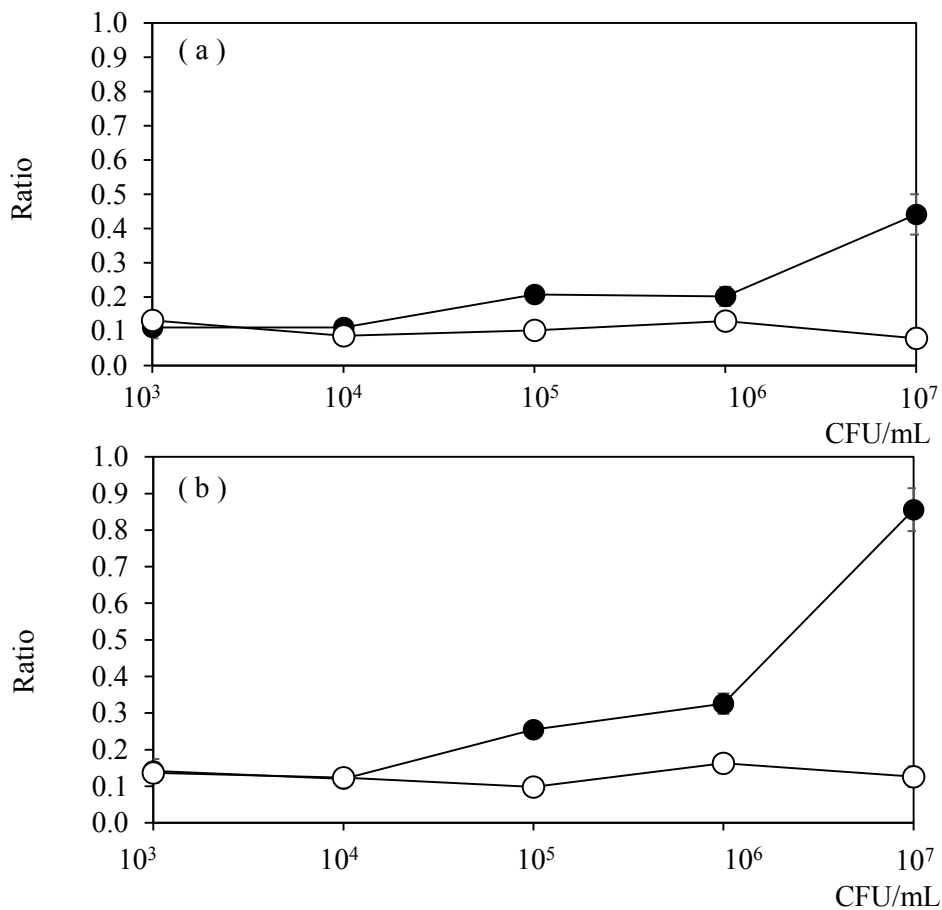


Fig. 32. Dilution series of bacterial volumes suspended in urine samples using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPR hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Open circles indicate *E. coli* ATCC[®] 25922.

Solid circles indicate *E. coli* NCTC13462.

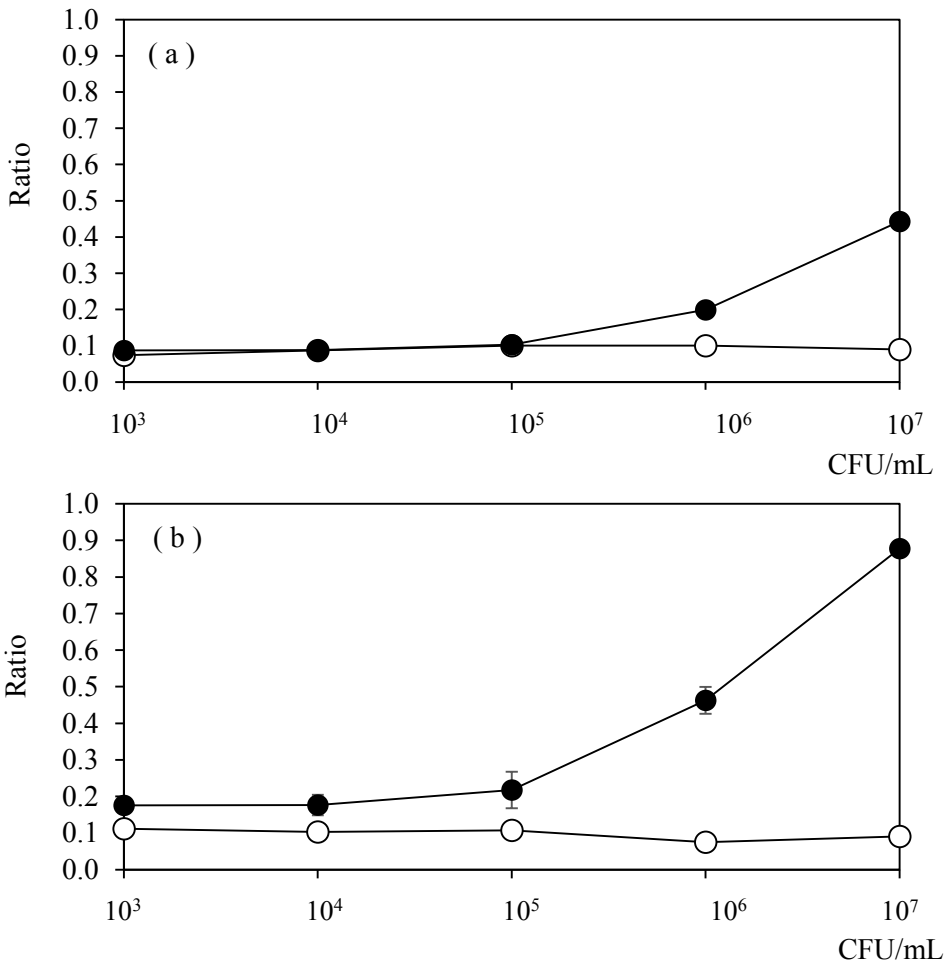


Fig. 33. Dilution series of bacterial volumes suspended in L-broth using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CTX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate clinical isolates of sensitive strains. Solid circles indicate clinical isolated of ESBLs-producing strains.

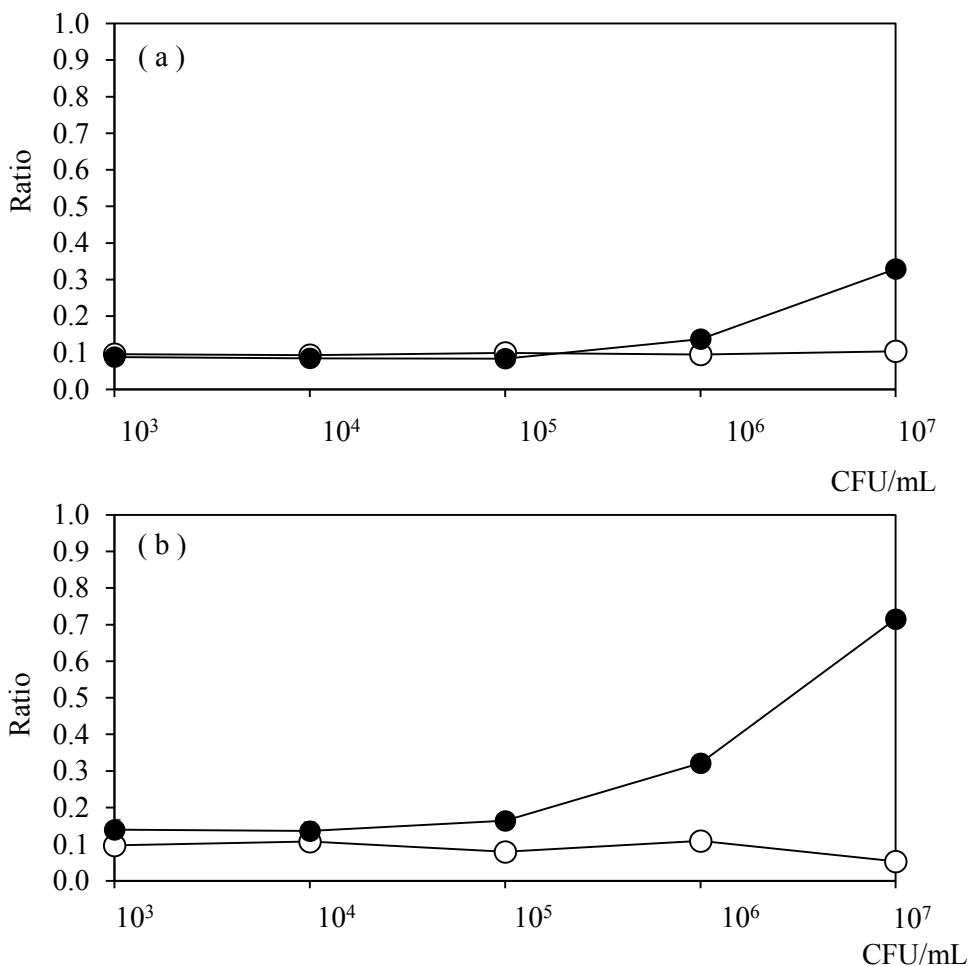


Fig. 34. Dilution series of bacterial volumes suspended in L-broth using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPDX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate clinical isolates of sensitive strains. Solid circles indicate clinical isolated of ESBLs-producing strains.

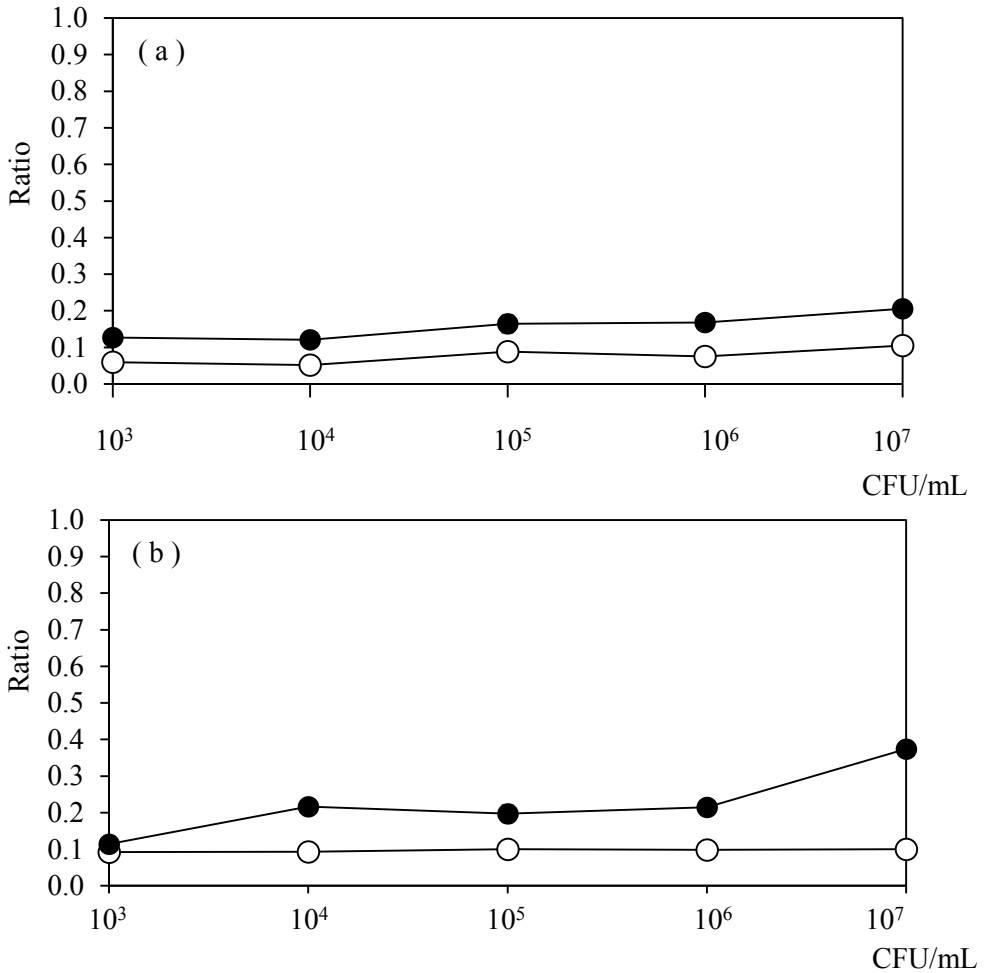


Fig. 35. Dilution series of bacterial volumes suspended in L-broth using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPR hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate clinical isolates of sensitive strains. Solid circles indicate clinical isolated of ESBLs-producing strains.

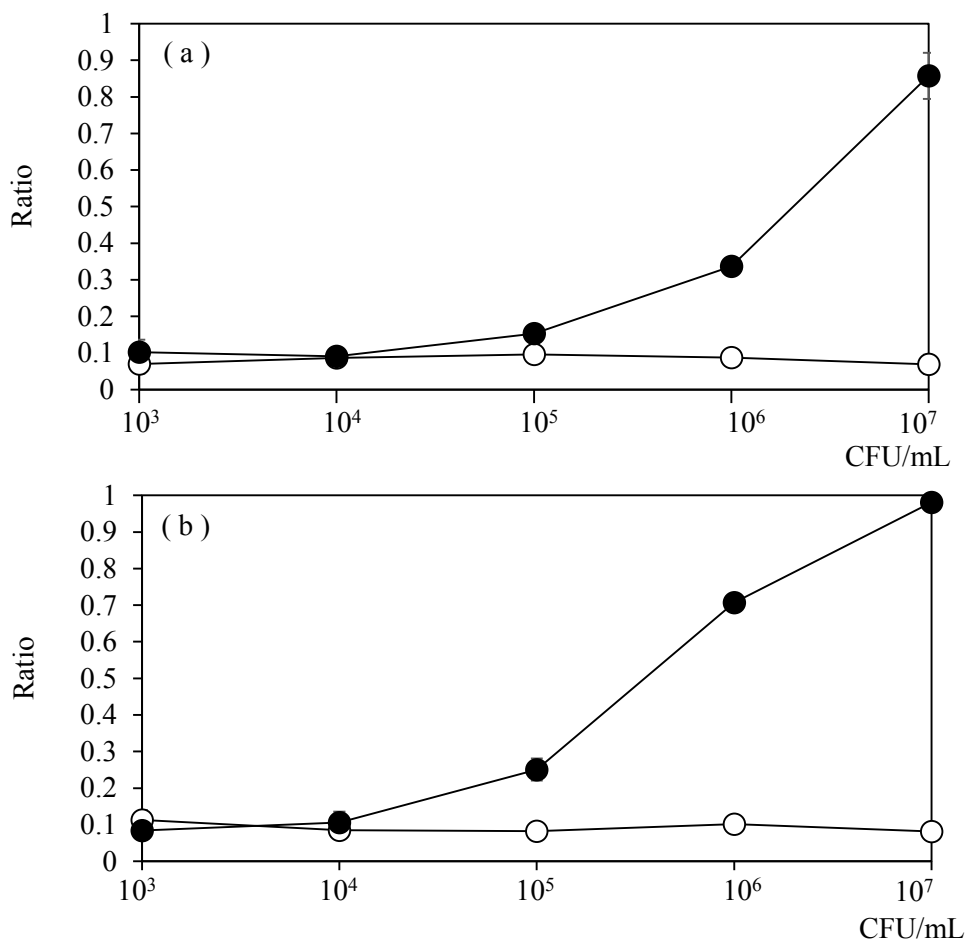


Fig. 36. Dilution series of bacterial volumes suspended in urine samples using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CTX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Open circles indicate clinical isolates of sensitive strains.

Solid circles indicate clinical isolated of ESBLs-producing strains.

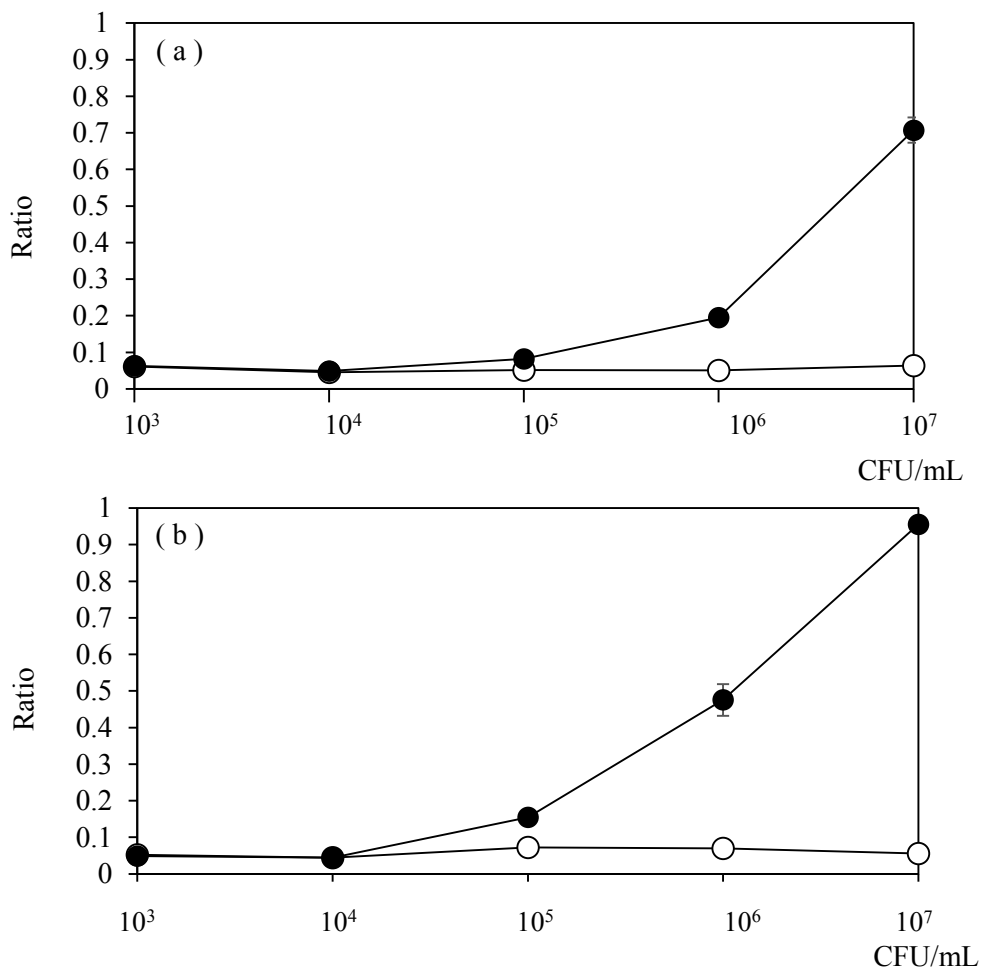


Fig. 37. Dilution series of bacterial volumes suspended in urine samples using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPDX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Open circles indicate clinical isolates of sensitive strains.

Solid circles indicate clinical isolated of ESBLs-producing strains.

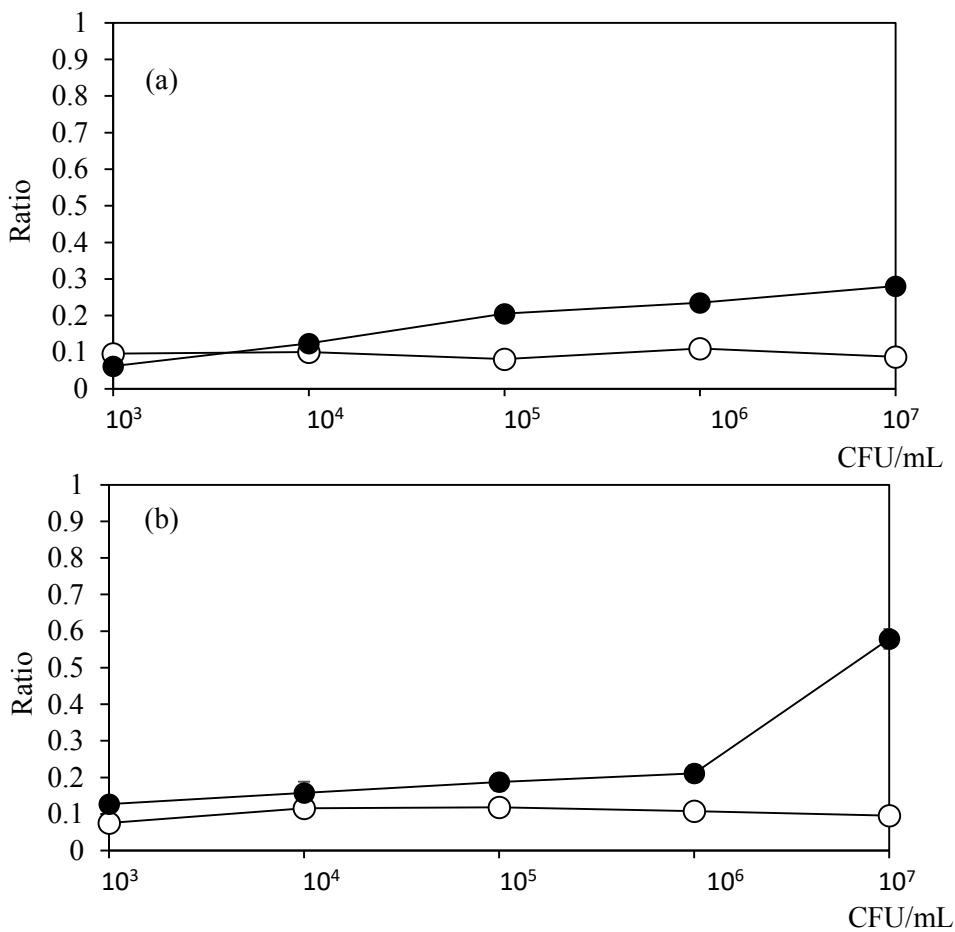


Fig. 38. Dilution series of bacterial volumes suspended in urine samples using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CPR hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

Open circles indicate clinical isolates of sensitive strains.

Solid circles indicate clinical isolated of ESBLs-producing strains.

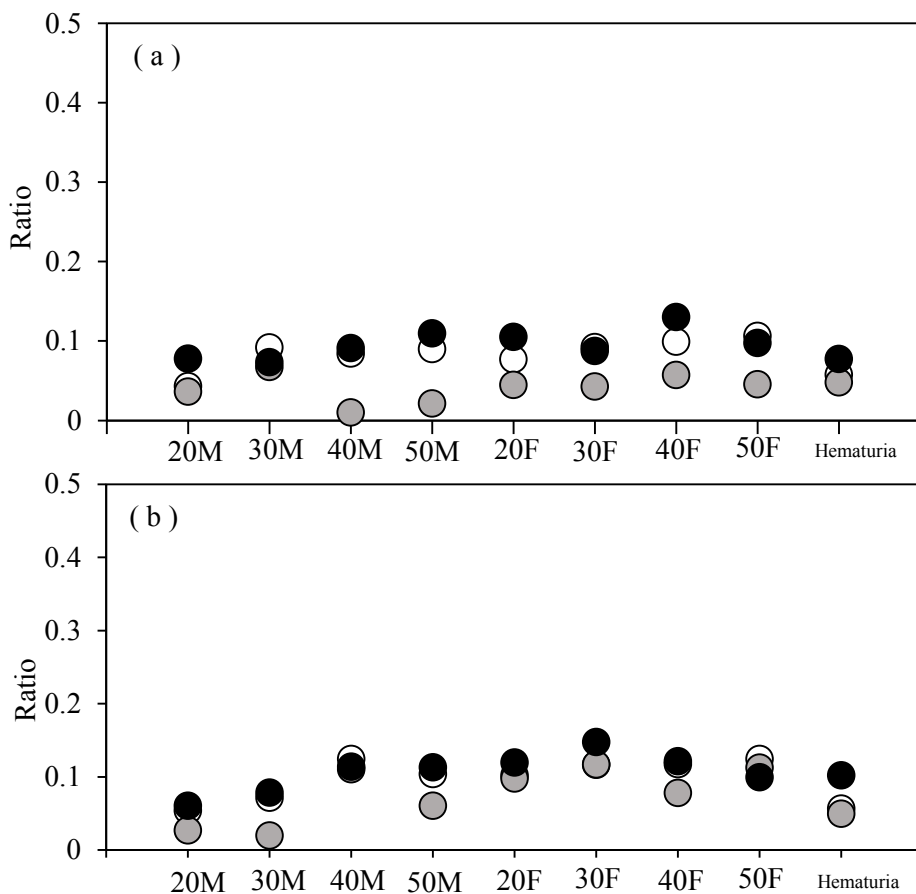


Fig. 39. The ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from antimicrobial hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug for male(M) and female(F) with different age. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. Suspension of a sensitive strain (*E. coli* ATCC® 25922) prepared with healthy urine and Hematuria from men and women of all ages. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate CTX; shaded circles indicate CPDX; and solid circles indicate CPR.

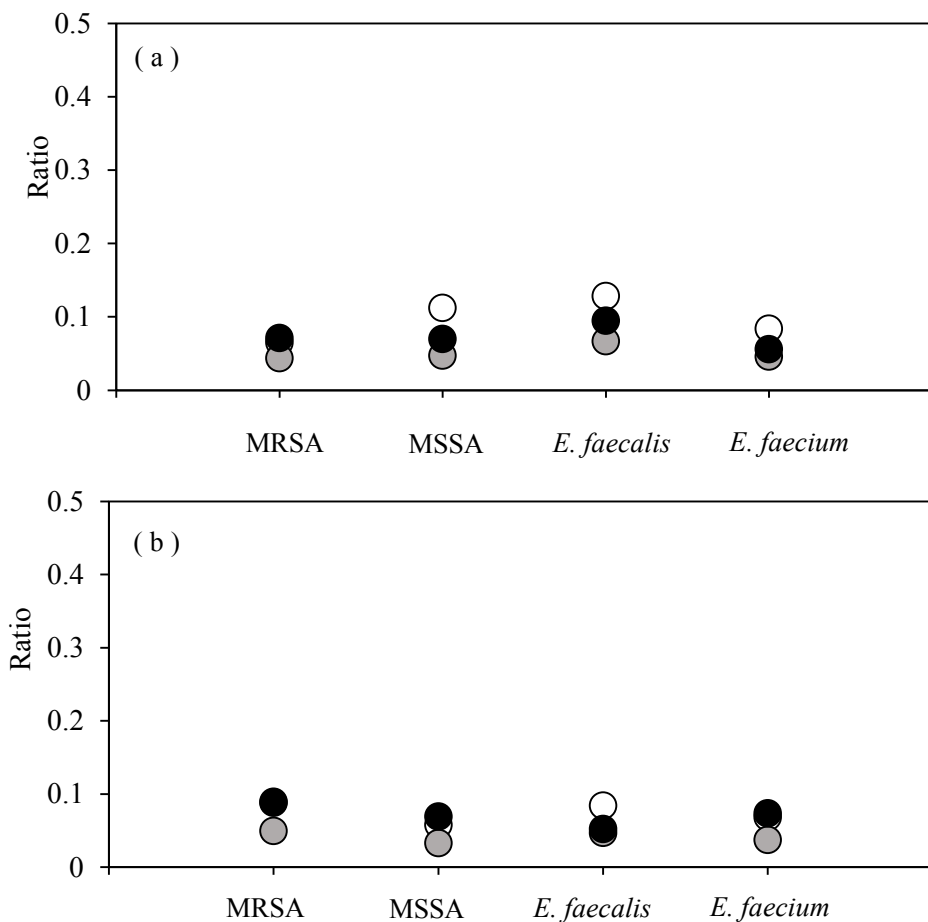


Fig. 40. The ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from antimicrobial hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug using the suspension both of sensitive strain (*E. coli* ATCC® 25922) and gram-positive cocci in urine of healthy subjects. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. Open circles indicate CTX; shaded circles indicate CPDX; and solid circles indicate CPR.

MRSA : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA : Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

E. faecium : *Enterococcus faecium*

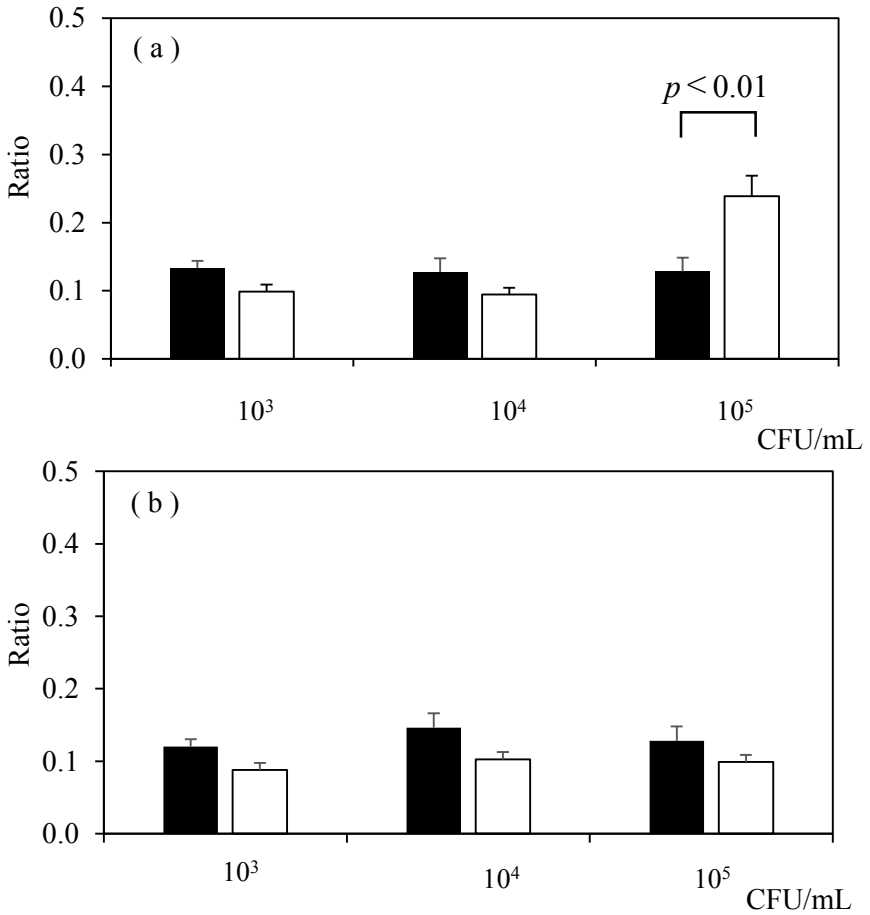


Fig. 41. Comparison of detection sensitivity using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CTX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug with 15 min incubation. ESBLs-producing strain *E. coli* NCTC13462 (a) and sensitive strain *E. coli* ATCC® 25922 (b) were suspended in 1 mL (solid bar) and 10 mL (open bar) of L- broth. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

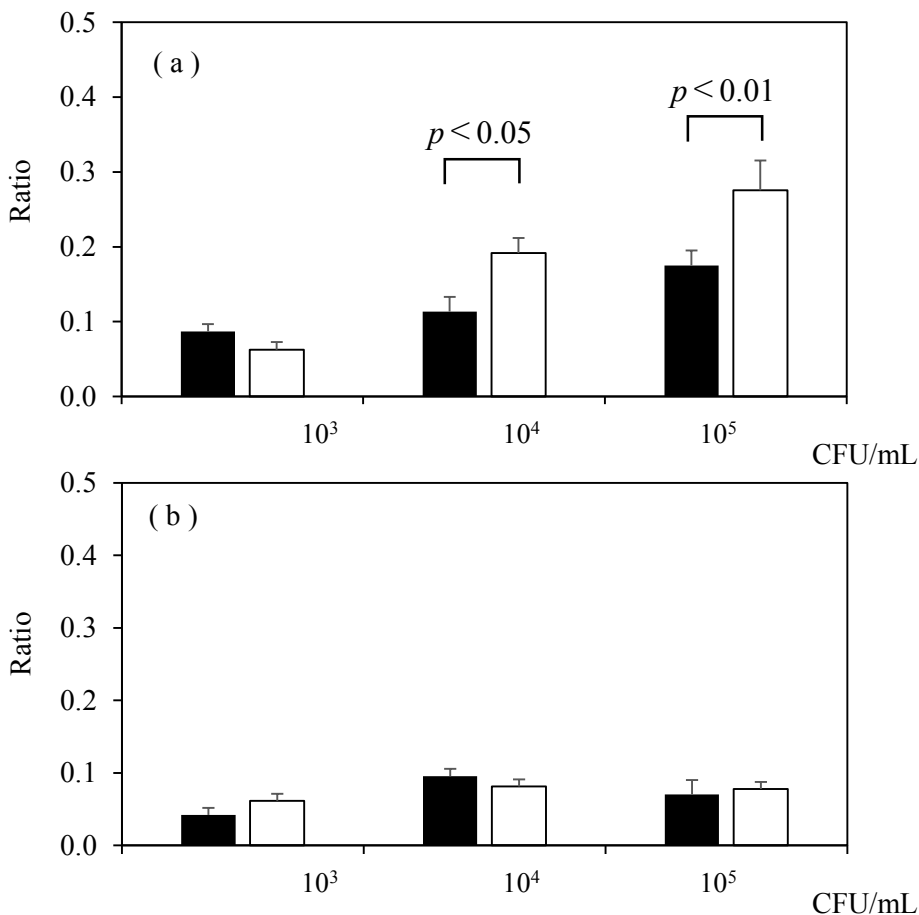


Fig. 42. Comparison of detection sensitivity using the ratio of MALDI-TOF MS signal intensity derived from CTX hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug with 15 min incubation. ESBLs-producing strain *E. coli* NCTC13462 (a) and sensitive strain *E. coli* ATCC® 25922 (b) were suspended in 1 mL (solid bar) and 10 mL (open bar) of urine samples. The extracted β -lactamase were used for the measurements.

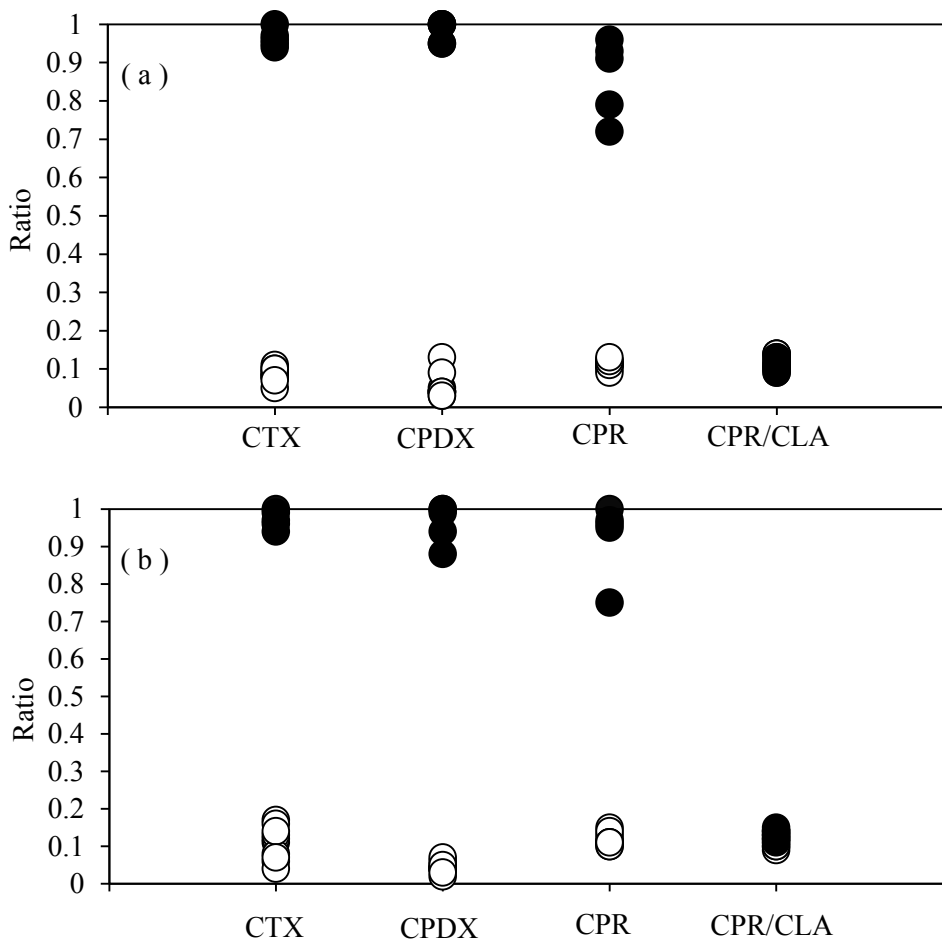


Fig. 43. Ratios of MALDI-TOF MS signal intensity derived from antimicrobial hydrolysate divided by the sum of the signal intensities derived from the detected hydrolysate and unhydrolysed drug. The incubation times were (a) 15 min and (b) 30 min. The extracted β -lactamase were used for the measurements. CTX : signal intensity at 370 Da/(370 Da + 456 Da + 478 Da); CPDX : signal intensity at 370 Da/(370 Da + 428 Da + 450 Da); CPR : signal intensity at 370 Da/(370 Da + 396 Da + 515 Da). Solid circles indicate ESBLs-producing strains. Open circles indicate sensitive strains.

Table 1. Trends in the isolation rate of multidrug-resistant bacteria in Japan

| Multi-drug resistant bacteria | year | | |
|--|--------|--------|--------|
| | 2017 | 2019 | 2021 |
| MRSA (Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>) | 6.48 % | 6.47 % | 6.02 % |
| CRE (Carbapenem-Resistant <i>Enterobacteriaceae</i>) | 0.27 % | 0.33 % | 0.32 % |
| MDRP (Multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) | 0.05 % | 0.04 % | 0.03 % |
| Third-generation cephalosporin-resistant <i>Escherichia coli</i> | 2.35 % | 3.37 % | 3.60 % |
| Third generation cephalosporin-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 0.38 % | 0.57 % | 0.79 % |

Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS)

Modified "Number of patients with specific resistant isolates and distribution of isolation rates among all medical institutions"

Table 2. Characteristics of drug susceptibility testing and genetic testing of standard strains

| Strain | | <i>E. coli</i> ATCC® 25922 | | <i>E. coli</i> NCTC13462 | |
|---|----------|-----------------------------|---|---------------------------|---|
| Antibacterial drug | | Broth microdilution (µg/mL) | | | |
| Penicillin | ABPC | =4 | S | >16 | R |
| | PIPC | =2 | S | >64 | R |
| β-Lactam/β-Lactamase inhibitor combinations | SBT/ABPC | ≤4/2 | S | >16/8 | R |
| | SBT/CPZ | ≤0.5/8 | S | >32/8 | R |
| | TAZ/PIPC | ≤4/4 | S | ≤4/4 | S |
| Cephalosporin | CEZ | ≤2 | S | >16 | R |
| | CTM | ≤0.5 | S | >16 | R |
| | CTX | ≤1 | S | >32 | R |
| | CAZ | ≤0.5 | S | =2 | R |
| | CPDX | ≤1 | S | >4 | R |
| | CTRX | ≤0.5 | S | >32 | R |
| | CDTR | =0.5 | S | >2 | R |
| | CPR | ≤2 | S | >16 | R |
| Cephameycin | CMZ | ≤8 | S | ≤8 | S |
| Oxacefem | LMOX | ≤4 | S | ≤4 | S |
| Monobactam | AZT | ≤0.5 | S | >16 | R |
| Carbapenem | IPM | ≤0.5 | S | ≤0.5 | S |
| | MEPM | ≤0.5 | S | ≤0.5 | S |
| Aminoglycoside | AMK | ≤4 | S | ≤4 | S |
| | GM | ≤2 | S | >8 | R |
| New quinolone | LVFX | ≤0.5 | S | ≤0.5 | S |
| | CPDX | ≤0.5 | S | ≤0.5 | S |
| Tetracycline | MINO | ≤0.5 | S | ≤0.5 | S |
| Trimethoprim-sulfamethoxazole | ST | ≤1/19 | S | >4/76 | R |
| AmpC/ESBL ID TEST | | | | | |
| Sensitive strains A-B , A-C , A-D ≤2 mm | | 0 mm, 2 mm, 2 mm | | 5 mm, 9 mm, 11 mm | |
| ESBLs-producing strains B-A and D-C ≥5 mm B-D and A-C ≤4 mm | | 0 mm, 0 mm 2 mm, 2 mm | | 9 mm, 10 mm 2 mm, 1 mm | |
| Cica genus ESBL genotype detection kit | | | | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M} | | none | | CTX-M-2 | |

S: Susceptible R: Resistant

Table 3. Characterization of bacterial species detected in clinical specimens

| No. | Detected bacteria species | <i>bla</i> _{CTX-M} |
|------|--|-----------------------------|
| E-1 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | CTX-M-9 |
| E-2 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | CTX-M-9 |
| E-3 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | CTX-M-1 |
| E-4 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | CTX-M-9 |
| E-5 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | CTX-M-9 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> 10 ⁷ CFU/mL | — |
| S-1 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| | Coagulase negative Staphylococcus 10 ² CFU/mL | — |
| S-2 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| | Coagulase negative Staphylococcus 10 ² CFU/mL | — |
| S-3 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> 10 ² CFU/mL | — |
| S-4 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁶ CFU/mL | None |
| | α – <i>Streptococcus</i> 10 ² CFU/mL | — |
| S-5 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| S-6 | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁶ CFU/mL | None |
| | γ – <i>Streptococcus</i> 10 ⁴ CFU/mL | — |
| S-7 | <i>Morganella morganii</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| S-8 | <i>Enterobacter cloacae</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| S-9 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> 10 ⁶ CFU/mL | None |
| | <i>Corynebacterium</i> sp. 10 ² CFU/mL | — |
| S-10 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| | <i>Escherichia coli</i> 10 ⁷ CFU/mL | None |
| | <i>Streptococcus agalactiae</i> 10 ⁶ CFU/mL | — |

E = ESBLs-producing strain; S = sensitive strain

Abstract

A study of rapid detection of drug-resistant bacteria by MALDI-TOF MS

Daiki KAJI

Division of Infection Prevention and Control, Department of Healthcare, Postgraduate School of Healthcare, Postgraduate School, Tokyo Healthcare University

BACKGROUND. In the initial treatment of infectious diseases, broad-spectrum antimicrobial agents are sometimes administered as empiric therapy because the causative organisms have not been identified. However, in recent years, the increase in multidrug-resistant bacteria such as extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing bacteria has become a global problem, and there is a need for appropriate de-escalation therapy to prevent their spread. In order to prevent their spread, de-escalation to an appropriate antimicrobial agent should be implemented as soon as possible, and the therapy should be changed to definitive therapy. With the widespread use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometers (MALDI-TOF MS) in microbiological testing, the rapidity of microbiological identification testing, but there is no general-purpose rapid detection method for drug susceptibility testing.

OBJECTIVE. We focused on the amount of β -lactamase produced by ESBLs-producing bacteria. The objective of this study was to determine the presence or absence of ESBLs production by capturing the synthesis changes of β -lactams by MALDI-TOF MS for ESBLs testing. In addition, we investigated whether ESBLs-producing bacteria can be directly identified from urine samples, and explored the possibility of clinical application.

METHODS. *Escherichia coli* NCTC13462 was used as the ESBLs-producing strain and *E. coli* ATCC® 25922 as the sensitive strain. The clinical isolates were 60 strains in total, 20 of which were classified as ESBLs-producing strains and 20 of which were sensitive strains. After inoculating the target wells of dry plates coated with each antimicrobial agent, the inoculum was placed in an aerobic environment at 35°C. The inoculum was then incubated in the wells until 1 hour. The supernatant of the culture was analyzed after a certain period of contact under an aerobic environment at 35°C. The supernatant was then inoculated into the wells of a dry plate coated with each antibiotic. The supernatant of the culture was analyzed under an aerobic environment at 35°C for a certain period of time. L broth mixed with standard strains, dispersions of urine samples, and 15 urine samples containing Enterobacteriaceae by Gram staining were analyzed for β -lactamase. The β -lactamase was extracted from the culture supernatant and analyzed by MALDI Biotyper®.

RESULTS. With the antimicrobials Cefotaxime (CTX), Cefpodoxime (CPDX), Piperacillin (PIPC), and Cefpirome (CPR), nonhydrolysate-derived signals were observed in all strains, while hydrolysate-derived signals were observed only in ESBLs-producing strains at 15 minutes for the ESBLs-producing strains. Dividing the hydrolysate-derived signal by the sum of the hydrolysate- and nonhydrolysate-derived signals allowed us to distinguish between ESBLs-producing and sensitive strains of clinical isolates without overlap. Using β -lactamase extraction from urine samples, we were

able to discriminate ESBLs-producing and sensitive strains as well as clinical isolates, and the lower detection limit of 10^4 CFU/mL of bacteria was captured.

CONCLUSIONS. This study suggested the possibility of discriminating ESBLs-producing bacteria from sensitive bacteria using MALDI-TOF MS in a short contact time of 15 minutes with the test strains and antimicrobial agents. It was also suggested that β -lactamase extraction from urine samples could discriminate ESBLs-producing and susceptible bacteria similarly to the test strains. This method, which captures the structural change of antimicrobials by hydrolytic enzymes, can be applied to bacteria that develop resistance by the same mechanism of action, suggesting that this method can lead to rapid detection of multidrug-resistant bacteria. This method can be applied to bacteria that develop resistance through a similar mechanism of action.