

第5回 日本医用マススペクトル学会東部会

質量分析による臨床微生物同定

— 講演・実習要旨集 —

令和2年10月24日（土） 10：00～16：00

会 場：麻布大学 生命・環境科学部棟1階 L104 会議室

プログラム

- 10：00 開会の挨拶
千葉大学医学部附属病院 マススペクトロメトリー検査診断学 野村 文夫
- 第1部 講演 【10：10～11：40】
- 10：10 講演1 rapid BACpro II を用いた血液培養迅速同定による診療貢献
医療法人豊田会刈谷豊田総合病院 臨床検査・病理技術科 安全環境管理室 藏前 仁
- 10：40 講演2 検査センターにおける質量分析装置の使用経験について
株式会社ビー・エム・エル 総合研究所細菌検査課 坂田 竜二
- 11：10 講演3 質量分析装置の更なる臨床活用を目指して～MBT STAR-BL を中心に～
浜松医科大学医学部附属病院 検査部 太田 悠介
- ランチョンセミナー 「最新技術のご紹介」 【12：00～12：40】
- 12：00 細菌迅速同定用前処理キット「rapid BACpro® II」のご紹介
ニッターボーメディカル株式会社 営業推進部 新保 陽平
- 12：20 MALDI バイオタイパーによる迅速微生物同定および新技術
sirius：脂質測定で詳細な微生物同定が可能に
ブルカージャパン株式会社 アプリケーション部 道家 康平
- 第2部 実習 【13：00～16：00】
MALDI-TOF MS による細菌同定
実習協力
麻布大学生命・環境科学部生化学研究室
日水製薬株式会社
ニッターボーメディカル株式会社
バイオメリュー・ジャパン株式会社
ブルカージャパン株式会社
- 16：00 閉会の挨拶
麻布大学 生命環境科学部 生化学研究室 曾川 一幸

第1部 講演 【10:10～11:40】

講演1 rapid BACpro II を用いた血液培養迅速同定による診療貢献

医療法人豊田会刈谷豊田総合病院 臨床検査・病理技術科 安全環境管理室

藏前 仁

講演2 検査センターにおける質量分析装置の使用経験について

株式会社ビー・エム・エル 総合研究所細菌検査課

坂田 竜二

講演3 質量分析装置の更なる臨床活用を目指して

～MBT STAR-BL を中心に～

浜松医科大学医学部附属病院 検査部

太田 悠介

rapid BACpro II を用いた血液培養迅速同定による診療貢献

藏前 仁

所属 医療法人豊田会刈谷豊田総合病院 臨床検査・病理技術科

近年、AMR 対策の一環として抗菌薬適正使用支援（AS）が推進されている。それに携わる細菌検査室として各種検査情報の重要性は増し、検査の特性上抱える課題である報告時間に対して質量分析装置や全自動遺伝子解析機器等の普及により結果報告の迅速化が進みつつある。今回、細菌迅速同定用キット rapid BACpro II（ニッポーバイオメディカル）を用いた感染症診療および AST 活動への運用について報告する。

本検査法の導入に当たり 2017 年 1～6 月の期間に血液培養陽性事例中 133 件を対象とし、rapid BACpro II を用いた MALDI-TOF MS による陽性ボトルからの直接同定の精度について培養コロニーからの同定と比較し評価した。また、当院 AST 検討会に情報提供するための検査運用を策定した。

本キットにより 133 件中 124 件（93%）で属レベル以上の菌名同定が可能であった。特に検出頻度の高い腸内細菌科細菌、*S. aureus* では 100%の一致率であった。これらの基礎データを基に当院では 2018 年 4 月より AST 検討会を毎朝 8 時 40 分に細菌検査室で開催される運用となり、その場において前日から陽性となった血液培養事例についてグラム染色結果に加えて本検査法による直接菌名同定結果を報告し AS に貢献すべく運用を構築した。今回、rapid BACpro II を用いて MALDI-TOF MS の特性を最大限に発揮し、血液培養陽性事例に対する迅速報告の体制構築が可能となった。それにより得られた菌名同定検査結果とアンチバイオグラム等の各種情報により AST 活動に寄与することが出来た更に遺伝子検査等との併用により AMR における AS への貢献が期待できる。今後も rapid BACpro II を用いた細菌迅速同定により感染症診療、感染制御、AS に貢献できる検査体制を成熟させたいと考える。

MEMO

検査センターにおける質量分析装置の使用経験について

坂田 竜二

所属 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所 細菌検査課

生体高分子であるタンパク質をイオン化させる技術として田中耕一氏（島津製作所）により質量分析のための「ソフトレーザー脱離イオン化法」が開発された（1）。田中氏は、この功績により2002年にノーベル化学賞を受賞している。

臨床微生物学的検査の領域では、MALDI-TOF-MS（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）の技術を利用し、バクテリアのタンパク質プロファイルを取得することで菌種同定に利用されている。実際に2011年より医療診断機器として複数の質量分析器が利用可能となり、現在は多くの病院検査室および検査センターにまで普及している。

我々の施設では、2013年にVITEK MS質量分析計（ビオメリユー・ジャパン株式会社）を導入し、1日に約150～200株の菌株について質量分析装置で菌種同定を実施している。質量分析による同定を実施する対象菌株は、嫌気性菌、生化学的性状による検査で同定に苦慮した菌株、血液培養から検出され早急に菌名を同定したい場合などである。

菌種の同定検査は、生化学的性状による従来法で通常半日から1日かかるが、質量分析では短時間で、かつ高精度に菌種同定が可能である。質量分析装置の導入は、機器購入費が高額であるものの、ランニングコストの削減や時間短縮による人件費削減、詳細な菌種同定による精度向上などの面で有用である。

我々の施設では病院検査室で同定が困難な菌株の同定依頼を多く受託している。その際、従来の同定キットでは同定が難しい菌種（*Corynebacterium* spp., α -*streptococcus* 等）が多く提出されている。これらの菌株に対しては従来法より詳細な同定結果が得られている。ただし、*Escherichia coli* と *Shigella* 等、追加試験を実施しないと区別することができない菌種も存在していることも忘れてはならない。

本口演では、同定が困難であった場合の対応方法や、質量分析装置でないと同定が出来なかった菌種など、事例を紹介しながら我々の施設における質量分析装置の使用経験について紹介したいと考えている。

1. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. (1988). "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry". *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2 (20): 151–3.

質量分析装置の更なる臨床活用を目指して ～MBT STAR-BL を中心に～

太田 悠介

浜松医科大学医学部附属病院 検査部

近年、抗菌薬の不適切な使用により、感染症治療が困難となる薬剤耐性 (Antimicrobial resistance: AMR) の病原微生物が問題となっている。2013 年には AMR に起因する死亡者数は世界で約 70 万人とされたが、何も対策を講じなければ 2050 年にはがんの死亡者数を超える 1000 万人の死亡者が想定されている。国際社会では 2015 年に世界保健総会で AMR に対する国家行動計画の策定を求めたグローバル・アクション・プランが採択され、国内では 2016 年に厚生労働省が AMR に関する包括的な取り組み方針である AMR 対策アクションプランを発表し、抗菌薬選択に関わる AMR の検出や薬剤感受性検査の迅速化を AMR 対策の目標の一つに掲げている。

β ラクタム系薬は、感染症治療で最も使用される抗菌薬の 1 つであるが、近年、 β ラクタム系薬の分解酵素である β ラクタマーゼ産生菌の増加により、その有用性が脅かされている。中でも、幅広い β ラクタム系薬に耐性を示し、その耐性情報を周囲の細菌に伝播する基質拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamase: ESBL) 産生菌やカルバペネマーゼ産生菌による感染症では、医療コストの増大や予後不良な臨床転帰と関連することから、これらの AMR の迅速な検査法が求められている。近年、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法 (Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS) を利用した菌種同定検査装置である MALDI Biotyper に、菌体の β ラクタマーゼ活性を迅速に検出できる MBT STAR-BL というソフトウェアが新たに開発された。本システムは、菌体と β ラクタム系薬を反応後に MALDI-TOF MS による測定を行い、 β ラクタマーゼにより分解された抗菌薬由来のマスマスペクトル変化を独自のアルゴリズムにより検出することを測定原理としており、本システムを活用することで、ESBL 産生菌やカルバペネマーゼ産生菌などの β ラクタマーゼ活性を短時間で検出でき、簡便に検査結果が得られるため、将来的に幅広い施設での臨床応用が期待されている。

我々は、実際の臨床検体を用いて本システムの有用性について検討を行った。今後の臨床微生物検査における MBT STAR-BL の可能性について、検討結果と併せて報告する。

MEMO

A series of horizontal dashed lines for writing a memo.

ランチョンセミナー 「最新技術のご紹介」 【12：00～12：40】

セミナー1 細菌迅速同定用前処理キット「rapid BACpro® II」のご紹介

ニッポーボーメディカル株式会社 営業推進部

新保 陽平

セミナー2 MALDI バイオタイパーによる迅速微生物同定および新技術

sirius : 脂質測定で詳細な微生物同定が可能に

ブルカーージャパン株式会社 アプリケーション部

道家 康平

細菌迅速同定用前処理キット「rapid BACpro® II」のご紹介

新保 陽平

ニッポーボーメディカル株式会社 営業推進部

昨今、MALDI - TOF MS 型質量分析計を用いた細菌同定検査が基幹病院を中心に急速に普及している。これにより、従来の細菌同定検査と比較し、より迅速かつ安価に菌種を同定することが可能になり、微生物学的検査に大きな技術革新をもたらした。

一方、血液培養液からの直接同定に関しては、血液由来成分の影響をいかに排除し測定対象物のタンパクのみを抽出できるかが核心であったが、従来は各施設独自の前処理方法や、装置メーカーが開発した専用の前処理キットが用いられてきた。しかし、現実には血液由来の夾雑物質の影響や、操作者の手技の差によって、同定結果に差異が生じるため、標準法となる効率的な前処理方法が望まれていた。

我々ニッポーボーメディカル株式会社はスペシャリティケミカルス事業部を有し、特殊な高機能ポリマーを安定的に生産・販売している。当社が販売する高機能ポリマーの一種であるカチオン性粒子は排水処理用の用途等に使用されていたが、我々は細菌の表面がマイナスにチャージされている点に着目し、カチオン性粒子と細菌が結合することができれば、より効率よく細菌を回収できるのではと考え 2017 年 4 月に「rapid BACpro® II」として上市を行った。

実際にブルカージャパン社製 MALDI-TOF 型質量分析計 Microflex を用い当社研究所で得られた代表的な菌種データの平均値について以下に述べる。

Escherichia coli : 2.39 (N=18)

Enterococcus faecalis : 2.18 (N=18)

Enterobacter cloacae : 2.21 (N=6)

Morganella morganii : 2.53 (N=18)

Staphylococcus capitis : 2.37 (N=8)

Bacillus subtilis : 2.00 (N=18)

以上より、rapid BACpro® II は細菌迅速同定において、十分な前処理能力を有しており、操作も簡便かつ 2 社の質量分析計で使用できることから、迅速同定における前処理工程の標準キットとして、日本国内だけでなく世界中の臨床現場に広く普及していくことが望まれる。

MALDI バイオタイパーによる迅速微生物同定および新技術

sirius : 脂質測定で詳細な微生物同定が可能に

道家 康平

ブルカーージャパン株式会社 ダルトニクス事業部

近年、新しい微生物同定法として質量分析装置を用いた技術が広く注目を集めており、さまざまな分野でその導入が加速度的に進んでいます。臨床分野は勿論、食品・飲料や製薬といった分野においても微生物同定検査は避けられない仕事ですが、MALDI バイオタイパーは極めて迅速に、かつ低コストで正確な同定結果を得ることができるため、様々な分野で導入を頂いております。一般細菌・糸状菌・抗酸菌と、継続的にライブラリーも充実させており、測定対象は 3,000 種を超えました。本セミナーでは MALDI バイオタイパーの測定原理、前処理法、測定フロー等をご紹介致します。

最新機種 MALDI バイオタイパー sirius の新技術・新たなアプリケーションをご紹介致します。MALDI バイオタイパー sirius は従来のポジティブモード（タンパク測定）に加え、ネガティブモード（脂質測定）を搭載しており、脂質測定する事で、より詳細な菌種同定、微生物学研究を可能にします。微生物は細胞膜状に Lipid A を持っており、菌種毎に異なる Lipid A を測定することで更なる解析が可能です。本セミナーでは脂質測定を用いた微生物同定・微生物研究の最新知見のいくつかをご紹介致します。

第2部 実習 【13:00~16:00】

MALDI-TOF MS による細菌同定

実習協力

麻布大学生命・環境科学部生化学研究室

日水製薬株式会社

ニッポーメデイカル株式会社

バイオメリユー・ジャパン株式会社

ブルカー・ジャパン株式会社




rapid BAC pro[®] II

キットに
含まれているもの



チューブ



2.0mL 1.5mL

準備するもの (この他に「チューブ立て」と「タイマー」があると便利です)



● 卓上筋絡遠心機



● 卓上ミキサー



● 200µL用チップ



● 1000µL用チップ



ピペットは2本あると便利です。

- 200µL用ピペット
- 1000µL用ピペット



- 精製水 (800µL)
- 70%エタノール (800µL)
- 70%酢酸 (30µL)
- 100%アセトニトリル (30µL)
- シリンジ

rapid BACpro[®] II ご利用の手順



MALDI バイオタイパーによる細菌同定

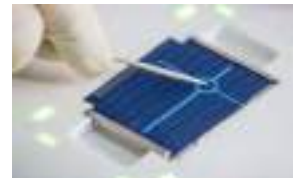
1. 実習の内容

MALDI バイオタイパーの実機を用いて、微生物同定の実演を行います。菌体に応じた前処理法を説明しつつ、一番基本的な前処理法であるセルスメア法を実際に行い、菌種同定を行って頂きます。

- ① MALDI バイオタイパーでの測定概要、実機説明
- ② 微生物同定の実技。前処理、微生物測定、レポートまでの測定フローを実演
- ③ 解析ソフト（スペクトル解析およびライブラリー登録等）の解説

2. 微生物同定 プロトコル

- ① 試薬調製（マトリクス、キャリブレーションスタンダード）。
- ② ターゲットプレートにキャリブレーションスタンダードと HCCA マトリックス溶液を 1 μ L 添加し乾燥させます。（自動キャリブレーション用の調製）。
- ③ 【セルスメア法】
コロニーをようじで少量かきとり、プレートに薄く均一になるように塗布します。HCCA マトリックス溶液を 1 μ L 添加し乾燥させます。
- ④ PC にて、flexControl と MBTCompass ソフトウェアを起動します。
- ⑤ ターゲットプレートのバーコードをスキャンし、測定ランを作成します。
- ⑥ ターゲットプレートを装置に導入し、真空度を確認します。
- ⑦ 自動キャリブレーションを行った後、検体の測定を行います。
- ⑧ 測定結果を確認し、レポートを取得します。



※以下は本セミナー中には実演しませんが、その他の前処理法を紹介します

■前処理法②：【ギ酸オンプレート法】

酵母様真菌やムコイド状の菌体など、セルスメア法でピークの検出が難しい菌種は、菌体を塗布した後 70%ギ酸を 1 μ L 添加することで結果が改善する場合があります。

■前処理法③：【エタノールギ酸抽出法】

- ① 300 μ L の水を 1.5mL のチューブにとり、培養後のコロニーを適当量（右図参照）釣菌しチューブ内に懸濁します。900 μ L のエタノールを加え、さらによく攪拌します。
- ② 13,000 rpm で 2 分間遠心した後、上清を除去します。
- ③ 70% ギ酸をペレットに加えて攪拌し、次にギ酸と等量のアセトニトリルを加えよく攪拌します。13,000 rpm で 2 分間遠心。
- ④ 上清 1 μ L をターゲットプレートに乗せ、乾燥後に HCCA マトリックス溶液を 1 μ L 添加し乾燥させます。

【参考資料】

血液培養陽性ボトルからの抽出法 : MALDI Sepsityper Kit

専用キットを用いる事で血液陽性ボトルから菌体を採取し、スメア法で菌種同定を迅速に行うことが出来ます。

- ① 陽性ボトルからの培養液 1mL をキット付属のチューブに分取します。
 - ② キット付属の LB (Lysis Buffer)を 200ul 加え、10 秒間ボルテックスします。
 - ③ 13,000 rpm で 2 分間遠心した後、上清を除去します。
 - ④ キット付属の WB (Washing Buffer)を 1mL 加えて、ピペッティングまたはボルテックスにより攪拌します。
 - ⑤ 13,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を除去します。この時点でペレットが赤色の場合は再度 4)を繰り返します。
 - ⑥ ペレットをつまようじでかきとってターゲットプレートに塗布します。真菌などの場合はスメア法と同様に 70% ギ酸 1uL を添加してください。
 - ⑦ マトリックス試薬 1uL を添加後、乾燥したら測定します。
- ※ 同定スコアが低かった場合には、菌体ペレットに対してエタノールギ酸抽出法を行うことで同定スコアが改善します。