

## 【9】

氏 名	すず き ひろ みち 鈴木 弘 倫
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第669号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (感染制御・臨床検査医学)
学位論文題目	A novel cluster of <i>Mycobacterium abscessus</i> complex revealed by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (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法 (MALDI-TOF MS) による <i>Mycobacterium abscessus</i> complex の新クラスター分類)
論文審査委員	(主査) 教授 川 又 均 (副査) 教授 千 種 雄 一 教授 石 井 芳 樹

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

*Mycobacterium abscessus* complexは迅速発育抗酸菌 (rapidly growing mycobacterium : RGM) で、肺感染症、皮膚・軟部感染症、菌血症など、様々な感染症を起こす。*M. abscessus* complex感染症は多くの抗菌薬に耐性を示し治療が難しい。近年の分類学では、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* sensu stricto (*M. abscessus*)、*Mycobacterium massiliense* (*M. massiliense*) および *Mycobacterium bolletii* (*M. bolletii*) の3菌種に細分類される。また、*in vitro*においてこれら3菌種はクラリスロマイシンの感受性に違いが見られる。しかし、これらの3菌種を細分類するのは簡単ではない。詳細な同定は*hsp65*、*rpoB*遺伝子の塩基配列に基づいた同定が行われ、多くの検査室では時間が掛かり、費用も高く、実施できない。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) による微生物同定が可能となり、RGMの同定においての報告もされている。しかし、*M. abscessus* complexにおいて細分類の改善が必要である。また近年、*M. massiliense*の遺伝的多様性が報告された。反復配列多型分析 (variable number tandem repeat : VNTR) typingによって*M. abscessus* complexの5のクラスターが明らかとなった。クラスターAは*M. abscessus*のグループであり、クラスターB、C、DおよびEは*M. massiliense*であった。クラスターDは他のクラスターと比べ*M. abscessus*に近かった。

## 【目 的】

今回、日本4施設から分離された株を用いてMALDI-TOF MSによる特異的ピークによる *Mycobacterium abscessus* complexの細分類とMALDI-TOF MS解析とVNTR解析の比較をしたので報告する。

## 【対象と方法】

対象は国内4施設にて分離された*M. abscessus* complex 103株と標準菌株JCM13569 *M. abscessus*の104株とした。

### シーケンス解析

遺伝子解析は*hsp65*、*rpoB*領域のシーケンス解析を行った。蒸留水50 $\mu$ lにヒツジ血液寒天培地にて3日間培養した菌株をコロニー1個分、懸濁させ、100 $^{\circ}$ C10分加熱し、軽く遠心した上清を用いた。*hsp65*領域のプライマーHSPF3 5'-ATGCCAAGGAGATCGAGCT-3'、HSPR4 5'-AAGGTGCCGCGGATCTTGTT-3'と*rpoB*領域のプライマー*rpoB*-mycoF 5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3'、*rpoB*-mycoR 5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3'を使用して、反応条件は98 $^{\circ}$ C 4秒、55 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分を45サイクル行った。PCR産物を精製した後、シーケンスキットBigDye Terminator<sup>®</sup> v1.1 Cycle Sequencing Kitを用い、プライマーは前述のプライマーを使用してシーケンスを行った。得られた塩基配列をBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) 解析し、菌種同定を行った (BLASTN algorithm : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

### MALDI-TOF MSによる解析

MALDI-TOF MSの測定は、Middlebrook 7H11平板寒天培地にて30 $^{\circ}$ C、3日間培養した菌を使用し、Saleebらのシリカビーズによる前処理法の改良した方法を行いMALDIバイオタイパー (Ver.3.1) Microflex LTによって行った。1.5mlのエッペンドルフチューブに蒸留水300 $\mu$ lを加え、チューブにループを使用して菌体を鈎菌ループで撹拌した。95 $^{\circ}$ Cで30分加熱し、室温で数分放置後900 $\mu$ lのエタノールを加え、激しく撹拌した。15,000rpmで2分間遠心し、上清を捨て、得られたペレットを風乾させた。シリカビーズとアセトニトリル30 $\mu$ lを加え、5分間ボルテックスした。70%ギ酸30 $\mu$ lに加え、10秒程度ボルテックスした。15,000rpmで2分遠心し、上清1 $\mu$ lを試料とし測定した。解析は、ソフトウェアFlex Analysisを使用して行った。

## 【結 果】

シーケンス解析により解析株は*M. abscessus* 59株、*M. massiliense* 42株、および*M. bolletii* 2株と同定した。

MALDI-TOF MSによる同定結果はすべて*M. abscessus* complexとなり、現行のライブラリーでは3菌種を分けることは出来なかった。そこで、ソフトウェアFlex Analysisによるマニュアル解析を行った。その結果、*M. abscessus*に特異的なシグナル4か所 (4,391.24*m/z*、7,637.27*m/z*、8,781.77*m/z*、9,473.82*m/z*)と*M. massiliense*に特異的なシグナル3か所 (4,385.05*m/z*、7,667.09*m/z*、8,767.98*m/z*)を特定した。*M. abscessus*は4,391.24*m/z*と8,781.77*m/z*の2か所に100%シグナルを認め、7,637.27*m/z*に93.2%と9,473.82*m/z*に64.4%シグナルを認めた。*M. massiliense*は4,385.05*m/z*と8,767.98*m/z*の2か所に

100%シグナルを認め、7,667.09 $m/z$ が88.1%シグナルを認めた。また、*M. bolletii*は*M. abscessus*と同一のシグナルパターンを示した。さらに、*M. massiliense*の6株において*M. abscessus*とシグナルパターンが近いことが明らかとなった。それらの*M. massiliense* 6株はVNTR解析によって得られたクラスターDであった。

#### 【考 察】

我々は、*M. abscessus* 59株、*M. massiliense* 42株、および*M. bolletii* 2株についてMALDI-TOF MSによる解析を行った。MALDI-TOF MSによる特異的シグナル波形による細分類は幾つか報告がある。本研究では4か所の波形の有無で*M. massiliense*は他の2菌種と明確に分けることが可能であった。この4か所の波形のうち*M. abscessus*に特異的な波形4,391.24 $m/z$ は、新たに分かった波形であった。また、MALDI-TOF MSによるシグナルは、遺伝子解析であるVNTR解析のクラスターを一部反映している。今後、*M. abscessus*に遺伝子的に近いクラスターDの*M. massiliense*の病原性についても調べる必要がある。

#### 【結 論】

本研究では、同定が困難である*M. abscessus*、*M. massiliense*、*M. bolletii*において、MALDI-TOF MSを用いて*M. massiliense*と*M. abscessus*、*M. bolletii*に分類することが可能であることを明らかにした。また、MALDI-TOF MSは菌種同定だけでなく*M. massiliense*におけるクラスター分類の可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

*Mycobacterium abscessus* complexは迅速発育抗酸菌 (rapidly growing mycobacterium : RGM) で、肺感染症、皮膚・軟部感染症、菌血症など、様々な感染症を起こす。近年の分類学では、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* sensu stricto (*M. abscessus*)、*Mycobacterium massiliense* (*M. massiliense*) および*Mycobacterium bolletii* (*M. bolletii*) の3菌種に細分類される。しかし、これらの3菌種を細分類するのは簡単ではない。申請論文では日本4施設から分離された103株と標準菌株を用いて、詳細な遺伝子同定と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) を用いた細分類を行い、さらに、反復配列多型 (variable number tandem repeat : VNTR) 解析と比較して、遺伝子多形性とMALDI-TOF MSによる波形の関連性を明らかにしている。

対象菌株は、シーケンス解析により*M. abscessus* 59株、*M. massiliense* 42株、および*M. bolletii* 2株であった。MALDI-TOF MSによる同定結果はすべて*M. abscessus* complexとなり、現行のライブラリーでは3菌種に分けることは出来なかった。そこで、マニュアル解析を行った結果、*M. abscessus*に特異的なシグナル4か所 (4,391.24 $m/z$ 、7,637.27 $m/z$ 、8,781.77 $m/z$ 、9,473.82 $m/z$ ) と*M. massiliense*に特異的なシグナル3か所 (4,385.05 $m/z$ 、7,667.09 $m/z$ 、8,767.98 $m/z$ ) を特定した。また、*M. bolletii*は*M. abscessus*と同一のシグナルパターンを示した。さらに、*M. massiliense*の6株において*M. abscessus*

とシグナルパターンが近いことが明らかとなった。これらの*M. massiliense* 6株は、VNTR解析によって新たに同定されたクラスターDであることを明らかにした。

本研究では、同定が困難である*M. abscessus*、*M. massiliense*、*M. bolletii*において、MALDI-TOF MSを用いて*M. massiliense*と*M. abscessus*、*M. bolletii*に分類することが可能であること、MALDI-TOF MSは菌種同定だけでなく*M. massiliense*における新しいクラスター分類への応用が可能であると結論づけた。

#### 【研究方法の妥当性】

申請論文では、全国諸施設から集められた*M. abscessus* complex 103株用いて、標準的な実験方法である遺伝子同定とMALDI-TOF MSによる同定を行い、詳細な比較検討を行っている。よって、本研究方法は妥当なものである。

#### 【研究結果の新奇性・独創性】

MALDI-TOF MSによる微生物同定が可能となり、RGMの同定においての報告もされている。しかし、*M. abscessus* complexにおいて細分類の改善が必要である。申請論文では、豊富な菌株を用いて、MALDI-TOF MSによる4か所の波形の有無で*M. massiliense*は他の2菌種と明確に分けることが可能であることを示した。この4か所の波形のうち*M. abscessus* に特異的な波形4,391.24m/zは、新たに分かった波形である。また、MALDI-TOF MSによるシグナルは、遺伝子解析であるVNTR解析のクラスターを一部反映していることを初めて明らかにしている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

#### 【結論の妥当性】

申請論文では、多数の菌株を対象に、確立された実験手法を用いて、遺伝子同定とMALDI-TOF MSによる同定を行い、詳細な比較検討を行っている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、微生物学、疫学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### 【当該分野における位置付け】

申請論文では、同定が困難である*M. abscessus*、*M. massiliense*、*M. bolletii*において、MALDI-TOF MSを用いて*M. massiliense*と*M. abscessus*、*M. bolletii*に分類することが可能であること、MALDI-TOF MSは菌種同定だけでなく*M. massiliense*におけるクラスター分類への応用が可能であることを示した。これは、*M. abscessus* complex 感染症における治療および病態を考察する上で大変貴重な知見であり、当該分野への貢献度も極めて高いと評価できる。

#### 【申請者の研究能力】

申請者は、臨床微生物学や臨床検査医学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

#### 【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

83 : 365-370, 2015