

# 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：鈴木 弘倫

専攻分野（所属）：感染制御・臨床検査医学

指導（推薦）教授：菱沼 昭

主論文題名：

A novel cluster of *Mycobacterium abscessus* 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 *Mycobacterium abscessus* complex の新クラスター分類)

論文の公表（予定）年月日

2015年12月 公表

公  
表  
誌  
名  
・  
巻  
・  
頁

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

83:365-370

## 【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。時に、手術器具や水の汚染によりヘルスケアや医療関連感染と関連がある。*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。*M. abscessus* および *M. bolletii* は、*erm41* 遺伝子によりクラリスロマイシンの誘導耐性を示す場合がある。これに対して、*M. massiliense* は *erm41* 遺伝子が欠損しているためクラリスロマイシン感受性を示す。*M. abscessus* 感染症は *M. massiliense* の *rhl* 遺伝子変異によるクラリスロマイシン獲得耐性を除いて、より治療が難しい。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 の同定における報告もされている。しかし、*M. abscessus* complex において細分類の改善が必要である。Teng らは、台湾の分離株を用いて MALDI-TOF MS による *M. abscessus* と *M. massiliense* の同定を評価した。Fangous らは、フランスの分離株を用いて 94% 同定可能だったと報告している。しかし、この2つの研究では特異的ピークが異なっている。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  $^{\circ}$ C 10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 °C 4 秒、55 °C 30 秒、72 °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® 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 °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。1.5 ml のエッペンドルフチューブに蒸留水 300 µl を加え、チューブにループを使用して菌体を釣菌しループで攪拌した。95 °C で 30 分加熱し、室温で数分放置後 900 µl のエタノールを加え、激しく攪拌した。15,000 rpm 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 µl を加え、5 分間ボルテックスした。70 %ギ酸 30 µl 加え、10 秒程度ボルテックスした。15,000 rpm で 2 分遠心し、上清 1 µl 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。

#### 培地による測定差の比較検討

培地による測定差の検討は、*M. abscessus* 11 株、*M. massiliense* 11 株および *M. bolletii* 1 株を対象とし、Middlebrook 7H11 agar plate、工藤 PD 培地 “ニチビー” (Japan BCG Laboratory)、MGIT (Becton, Dickinson-Diagnostic Systems) の 3 種類の培地において培養した菌を用いて測定した。培養条件は、Middlebrook 7H11 agar plate の場合は 30°C、3 日間培養した菌を使用した。工藤 PD 培地 “ニチビー” は 37°C、7 日間培養した菌を使用した。MGIT による液体培養は、BD バクテック™ MGIT™ システムにより陽性となった MGIT チューブの沈渣を用いた。

#### 菌の破砕時間の比較検討

前処理の工程にある、菌を物理的に破砕する時間 (ボルテックス時間) の検討を行った。ボルテックス時間の検討は、*M. abscessus* 5 株、*M. massiliense* 5 株を対象とし、7H11 agar plate を用い 30°C、3 日間培養した菌を使用した。前処理のボルテックス時間を 1 分間、5 分間、30 分間の 3 パターン行い測定した。

### **【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。

培地による測定差の検討結果は、MGIT において、7,637.27  $m/z$  が 36.4 % とシグナル検出率が低く、9,473.82  $m/z$  においてはシグナルを認めなかった。しかし、それ以外のシグナルにおいては 3 種類の培地の違いで、特異的シグナルの検出に違いは認められなかった。ボルテックス時間の検討結果は、前処理のボルテックス時間による特異的シグナルの検出率に差は認めなかった。

### 【考察】

*M. massiliense* の検出頻度は地域によって異なり、欧米では *M. abscessus* complex の 1/4 が *M. massiliense* である。韓国と台湾では約半分を占め、日本では 26% と報告もあるが近年の分子疫学的研究ではより多くなっている。

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。