

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19416

研究課題名(和文) 質量分析によるM.avium complexの同定および肺MAC症増悪因子の検討

研究課題名(英文) identification of M.avium complex and exacerbation factor of pulmonary MAC disease by mass spectrometry

研究代表者

牛木 淳人(USHIKI, Atsuhito)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：10467160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺MAC症はM.aviumなどによる肺の感染症であるが、近年その患者数が増えている。本症の予後は不変から増悪まで様々であるが、なぜこのように予後の違いが生じるかは明らかではない。質量分析とは試料中の物質の分子量の分布を測定し、試料を同定する方法の一種である。またその分子量分布から試料に含まれる蛋白質の分析も可能である。本研究では肺MAC症患者の気道由来検体に対して質量分析を行い、菌の同定と増悪に関与する蛋白質の同定を試みた。15検体を用いて検討を行い、8検体で菌の同定は可能であった。しかし7検体では真菌の汚染や、乾燥の影響で同定できなかった。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary MAC disease is an infectious disease of the lung by M. avium., and in recent years the number of patients has increased. Although the prognosis of this disease varies, it is not clear why the difference in prognosis. Mass spectrometry is a method for measuring the distribution of the molecular weight and identifying the sample. From the molecular weight distribution, it is also possible to analyze the protein contained in the sample. In this study, we examined identification of MAC and exacerbation factor of pulmonary MAC disease by mass spectrometry. We examined using 15 specimens, and it was possible to identify bacteria in 8 specimens. However, 7 specimens could not be identified due to fungal contamination or drying.

研究分野：呼吸器内科学、感染症学

キーワード：肺MAC症 肺非結核性抗酸菌症 質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症は環境中に常在する非結核性抗酸菌の一種である *M. avium* および *M. intracellulare* による肺の感染症であるが、近年その患者数の増加が指摘されている (N Engl J Med 321: 863-868, 1989)。症例により予後は大きく異なり、自覚症状がほとんどなく、年余にわたって増悪をきたさない不変例から、数か月の経過で徐々に増悪し、最終的には呼吸不全にいたる増悪例まで様々である。なぜこのように予後の違いが生じるかは明らかではない。増悪例ではその治療としてクラリスロマイシンを中心とした多剤併用療法が行われる (結核 87: 83-86, 2012、Am J Respir Crit Care Med 175: 367-416, 2007)。60~90%の症例で改善が得られると報告されているが (Am J Respir Crit Care Med 160: 866-872, 1999、Chest 136: 1569-1575, 2009)、治療終了後の再増悪も多い。抗微生物薬のみでは治癒させることが困難であり、特に重症例では治療に難渋する。

(2) 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 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF MS) とは未知の試料中の物質の分子量の分布を測定し (その分布をマススペクトルと呼ぶ) 試料を同定する方法の一種である。またそのマススペクトルから試料にどのような蛋白質が含まれるかなどの分析も可能である。試料にマトリックスと呼ばれる試薬を添加し、レーザーを照射することにより蛋白質をイオン化する。このマトリックスは試料のイオン化を促進する物質である (図1)。次に電圧をかけて、真空中のある一定距離だけイオンを飛ばし、その飛行時間から質量を計測する (図2)。細菌のコロニーを試料として用いることにより、細菌の同定に用いることも可能であり、生化学的分析や遺伝子学的分析を用いる従来法と比較して、安価で迅速に同定できるため、一般細菌においては既に臨床応用もされている。

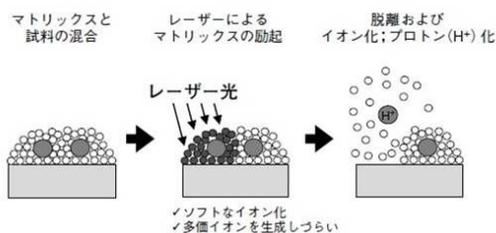


図1 マトリックス支援レーザー脱離の原理
試料にマトリックスを添加することにより、レーザーのエネルギーを効率的に吸収させ、イオン化を促進する。試料の分解を防ぐ役割

もある。

(モダンメディア 58 巻 P113-122, 2012 より引用)

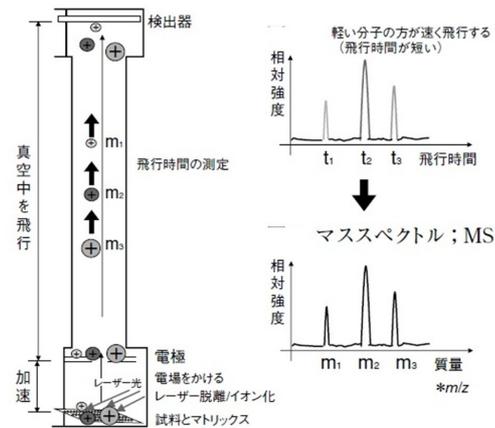


図2 飛行時間型質量分析

イオン化した試料に電圧をかけて真空中を検出器まで走行させる。電荷量が等しいイオンであれば、質量の小さい分子ほど飛行速度が速く、検出器に早く到達する。各々のイオンの到達時間を計測することにより、質量を割り出すことが可能である。検出器には質量の軽いものから順に検出器で信号を発生する。この信号を変換し、縦軸に検出強度、横軸に質量をプロットしたものがマススペクトルである。(モダンメディア 58 巻 P113-122, 2012 より引用)

2. 研究の目的

本研究では肺 MAC 症の病状が不変の患者と、増悪の患者より分離された MAC の分子量分布を比較し、増悪患者の MAC に特徴的な蛋白質を同定する。本研究により増悪に関与する蛋白質が同定されれば、増悪のメカニズムを明らかにすることができる。

3. 研究の方法

(1) 検体

当教室に-80 で保存されている肺 MAC 症患者の気道由来検体を検体として本研究を行う。

(2) 培養

上記の検体を 7H11 培地に塗布し、37、5%CO₂ の条件下に 4 週間培養する。

(3) MALDI-TOFMS による同定

培養されたコロニーを Bruker 社、MALDI Biotyper を用いて MALDI-TOF MS を行う。本装置は微生物同定専用の MALDI-TOF MS 装置である。手順の概要は以下のとおりである。

コロニーを滅菌蒸留水に溶解後、熱処理やエタノール添加により不活化および MAC 表面の脂質を溶解する。エタノール乾燥後にシリコンビーズを添加し、ボルテックスを用いて菌体を破壊する。アセトアニリルおよびギ酸を添加し蛋白質を抽出し、マトリックスを添加後質量分析を行う。得られたマススペクトルと、MALDI Biotyper 内ライブラリに保存されている各種細菌のマススペクトルと自動で比較し、細菌の同定を行う。

抽出された蛋白質のうち、今回の検討で使用しなかった残りは-80 で保存し、次項の増悪に關与する蛋白質の検討に用いる。

(4) MALDI-TOF MS による増悪に關与する蛋白質の検討

MALDI-TOF MS は AB SCIEX 社、TOF/TOF 5800 を用いて同定を行う。本装置は未知の試料の同定だけでなく、マススペクトルのピークを自動で分析し、その試料を構成する蛋白質の同定も可能である。不変例および増悪例の群分けは主に胸部 CT 所見の推移で判断する。胸部 CT の読影は 1 名以上の呼吸器内科専門医および 1 名以上の放射線科専門医の、計 2 名以上で行う。不変例および増悪例のマススペクトルを比較し、増悪に關与する蛋白質を同定する。不変例および増悪例に特異的な分子量のピークが得られない場合は、同じ分子量のピークでも、その信号強度を比較することを検討する。

4. 研究成果

まず 15 検体を用いて検討を行った。この検体すべてで抗酸菌が培養され、遺伝子学的同定法で *M. avium* と同定済みである。その結果 7 検体由来のコロニーで *M. avium* と同定され、従来法との一致が認められた(図 3、4、表 1)。

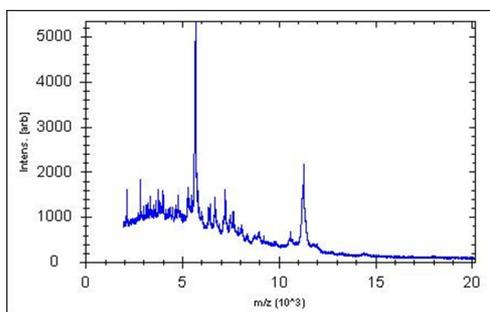


図 3 当院保存検体 A から得られたコロニーを質量分析した際のマススペクトル
当院に保存されていた気道由来検体を 7H11 培地で 4 週間培養後に得られたコロニーを MALDI Biotyper で質量分析を行った。その結

果上記のようなマススペクトルが得られ、*M. avium* と同定された。

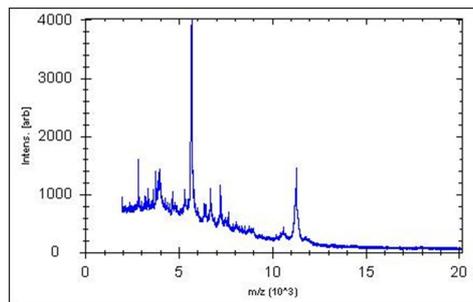


図 4 当院保存検体 B から得られたコロニーを質量分析した際のマススペクトル
保存検体 A と同様の手順で得られたマススペクトル。保存検体 A とほぼ同様のマススペクトルである。このマススペクトルも *M. avium* と同定された。

表 1 各検体の質量分析による同定結果

検体	菌種	Score
A	<i>M. avium</i>	2.12
B	<i>M. avium</i>	2.023
C	<i>M. avium</i>	1.944
D	<i>M. avium</i>	2.138
E	<i>M. avium</i>	1.969
F	<i>M. avium</i>	1.809

検体 A~F 由来のコロニーの質量分析による同定結果。Score が 2 以上であれば菌種レベルで同定の信頼性がある。Score が 1.7 以上 2 未満であれば属レベルで同定の信頼性がある。

しかし、8 検体では真菌が培養されたため、抗酸菌のコロニーを得ることができなかった。そこで培地に抗真菌薬を添加し、8 検体の培養を行った。その結果 1 検体由来のコロニーで *M. avium* と同定され、従来法との一致が認められた。しかし、残りの 7 検体は培地の乾燥が強く、質量分析を行うためのコロニーを採取することができなかった。湿度管理や、培養時間を短くしたが乾燥を防ぐことができなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Hama M, Ushiki A, Kosaka M, Yasuo M, Yamamoto H, Hanaoka M. Health-related

quality of life in patients with pulmonary non-tuberculous mycobacteria infection. Int J Tuberc Lung Dis. 2016; 20: 747-752、査読有り

2. Kato A, Yamamoto H, Ikeda M, Tateishi K, Ushiki A, Yasuo M, Kawakami S, Asaka S, Oguchi K, Hanaoka M. A case of pulmonary Mycobacterium avium infection in an immunocompetent patient who showed a huge consolidation with a high FDG uptake on PET/CT. Respir Med Case Rep 2016; 19: 49-52、査読有り

[学会発表](計 1 件)

1. 山中美和、西江健一、北口良晃、小林信光、立石一成、牛木淳人、安尾将法、漆畑一寿、山本洋、花岡正幸. CAM、RFP、EB 治療で改善した Mycobacterium shinjukuense 肺感染症の 1 例. 第 170 回日本結核病学会関東支部会 第 221 回日本呼吸器学会関東地方会合同学会, 2016 年 9 月 24 日、甲府市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

牛木 淳人 (USHIKI, Atsuhito)

信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・講師

研究者番号 : 10467160