

平成26年度病院医学教育研究助成成果報告書

報告年月日：平成27年 3月 24日

研究・研修課題名	血液培養陽性ボトルから直接MALDI-TOF MS（質量分析）を行い、迅速に細菌同定を実施できるより安価な方法の検討。
研究・研修組織名（所属）	検査部：感染対策室
研究・研修責任者名（所属）	森山英彦（検査部：感染対策室）
共同研究・研修者名（所属）	石飛慎、竹内志津絵、湊田比呂志、坂根圭子、西村信弘

目的及び方法、成果の内容

① 目的

血液培養は敗血症診断に不可欠な検査であり、陽性時にはより早い菌種同定が求められる。現在細菌同定は MALDI-TOF MS により実施しているが、平板培地に継代しコロニーを形成してからの実施（ダイレクトスメア法）であり、発育の早い菌でも 6 時間後の対応となる。培養ボトルから直接同定が可能であれば、正しい抗菌薬の選択や不必要な抗菌薬投与の抑制にもつながる。岐阜大学ではすでに市販キットを用いた運用が始まっており、大楠らにより年間薬剤費 1900 万円の削減、平均入院期間 3 日間の短縮が報告されている。このキットは 1 件あたり 800 円のコストがかかるため、より安価な方法を検討する。

② 方法

1. 対象：2014 年 3 月から 2015 年 3 月において、血液培養が陽性となり、グラム染色により細菌を認めた 150 検体を用いた。
2. 方法

血液培養陽性となったボトルを用い、下記の前処理を行い MALDI-TOF MS にて測定した（以下直接法）。その結果とサブカルチャーで発育したコロニーからのダイレクトスメア法（以下 D 法）との結果を比較した。

- ① 血液培養ボトル内容液 6ml を 1200rpm、1 分遠心。
- ② 上清 1ml 程度をスピッツに移し、蒸留水 5ml を加えさらに 3000rpm で 10 分遠心。
- ③ サンプルスライド上でその沈渣 1 μ l に 70%ギ酸を 0.5 μ l 加えて混和し乾燥させた上にマトリックス 1 μ l を載せ、VITEK MS(シスメックスピオメリユー株式会社)で測定。

④ 成果

1. 結果

150 検体の内訳はグラム陽性球菌 96 検体（ブドウ球菌 79 株、レンサ球菌 5 株、腸球菌 12 株）。グラム陽性桿菌 1 検体、グラム陰性桿菌 53 検体（腸内細菌 48 株、緑膿菌 4 株、ヘモフィルス 1 株）であった。150 検体のうち直接法と D 法が一致したのは 68 検体（45.3%）であった。グラム陽性球菌 96 検体のうち直接法と D 法が一致したのは 34 検体（35.4%）であった。一致した菌種を表 1 に示す。グラム陽性桿菌は *Clostridium perfringens* であり両法が一致した。グラム陰性桿菌では 53 検体中 33 検体（62.3%）が一致した。一致した菌種を表 2 に示す。両方法が一致しなかった検体の半数は直接法の結果が得られなかった。残りの半数は結果が得られたものの 2～4 菌種が候補に挙がるか、信頼度が低く D 法と一致しなかった。

表1 グラム陽性球菌の一致例 (n=34)

菌名	信頼度	検体数
<i>S.aureus</i>	99.9	9
<i>S.epidermidis</i>	99.9	6
<i>S.capitis</i>	99.9	1
<i>S.hominis</i>	99.9	4
<i>S.caprae</i>	99.9	2
<i>S.saccharolyticus</i>	99.9	1
<i>E.faecalis</i>	99.9	5
<i>E.faecium</i>	99.9	2
<i>E.gallinarum</i>	99.9	1
<i>Str.pneumoniae</i>	99.9	1
<i>Str.agalactiae</i>	99.9	1
<i>Str.intermedius</i>	99.9	1

表2 グラム陰性桿菌の一致例 (n=33)

菌名	信頼度	検体数
<i>E.coli</i>	99.9	18
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	99.9	1
<i>Kleb.oxytoca</i>	99.9	3
<i>Kleb.pneumoniae</i>	99.9	3
<i>P.aeruginosa</i>	99.9	4

<i>P.mirabilis</i>	99.9	2
<i>Enterobacter cloacae / asburiae</i>	50/50	1
<i>E.aerogenes</i>	99.9	1

2. まとめ

市販キットを使用せず、低コストな前処理により MALDI-TOF MS による菌種同定が可能であった。血液培養が陽性となった1時間後に菌種同定が可能となることは大変有意義であるが、D法との一致率が45.3%であり、まだ改善の余地が残されている。グラム陰性桿菌に比べグラム陽性球菌の一致率が悪い原因としては、もともとグラム陽性球菌では血液培養陽性時の菌量が少ないことや、グラム陽性球菌は菌塊を作りやすく前処理の遠心時に沈渣に含まれてしまい菌体の回収率が悪いためと考えられた。九州大学：清佑らの検討では一致率がグラム陽性球菌57.3%、グラム陰性桿菌70.4%であり、我々の検討より良好な結果であった。今後集菌法や遠心条件などの検討により、さらに一致率の改善を目指したい。