臨床微生物検査における MALDI-TOF MS の導入効果

Benefits of the MALDI-TOF MS in Clinical Microbiology

大城健哉

Takeya OHSHIRO

那覇市立病院 医療技術部検査室

(Received June 12, 2016; Accepted June 16, 2016)

1. はじめに

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 (MALDI-TOF MS) を用いた菌同定が開発され、コロニーから数分、血液培養陽性ボトルからでも1時間以内に可能となった。さらには菌同定1件あたりのランニングコストが数十円からと安価であることから、MALDI-TOF MSは臨床微生物検査における技術革新とされている¹⁾。現在、わが国では大学病院や大規模施設を中心に約100施設に導入されており、さらに広がると予想される。

今回、臨床微生物検査における MALDI-TOF MS の導入効果について、自施設導入後の私見を含め述べる。

2. 報告時間短縮による臨床貢献

那覇市立病院（沖縄県那覇市在，470床，年間微生物検査件数23,749件）には2014年8月にMALDIバイオタイパー（ブルカー・ダルトニクス株式会社）が導入された（図1）。導入後は検出菌の菌名報告が1日以上短縮され、血液培養検査では陽性検出された約80%が当日に菌名報告可能となり、感染症診療に大きく貢献していると考えられる。

MALDI-TOF MS導入前後の血液培養採血から適正抗菌薬投与までの経過時間を比較した報告²⁾では、血液培養陽性検出後、同定結果報告が平均25時間短縮し、さらに積極的な抗菌薬適正使用介入を行うことで、適正な抗菌薬投与が46時間、約2日間短縮されている（図2）。

他の報告でもMALDI-TOF MSと抗菌薬適正使用介入の導入によって30日以内の死亡者数を有意に低下させ、入院期間を短縮し、ICU在室期間も有意に短縮し、BSIの再発件数も有意に減少し、効果的な治療までの時間や最適な治療までの時間も有意に短縮されている³⁾（表1）。

当院でもDPCデータ解析を行ったところ、疾患別の平

図1. MALDIバイオタイパー。

均在院日数は敗血症（DPC6：180010）で0.8日短縮され、誤嚥性肺炎（DPC6：040081）でも0.4日短縮されていた（図3）。この差が有意なものか不明であるが、「平均在院日数を1日短縮するのに5年以上もかかるとされている中、僅か1年でここまで低下するのはとても有意なことだ」と病院経営管理課長の私見をいただいた。平均在院日数の短縮化にはいろいろな要因が影響すると考えられ、これらの結果はすべてMALDI-TOF MS導入によるものとは言えないが、少なからずとも影響したと考えられた。

3. MALDI-TOF MS導入の秘訣

臨床的には極めて有用であるものの、非常に高価な機器であるため簡単には導入できないのが現状である。大学病院や大規模施設、検査センターなど検査件数が多い施設ではランニングコストの差額で導入可能と思われる。年間4万件の検査件数があり、同定実施件数も7,600件ある佐

図2. MALDI-TOF MS導入前後の血液培養採血から適正抗菌薬投与までの経過時間比較²⁾.表1. MALDI-TOF MSによる菌種同定と抗菌薬適性使用介入の効果³⁾

結果	導入前 n = 256	導入後 n = 245	p 値
30日以内の死亡者数 (%)	52 (20.3)	31 (12.7)	0.021
入院期間 (平均日数±1S.D.)	14.2±20.6	11.4±12.9	0.066
ICU在室期間 (平均日数±1S.D.)	14.9±24.2	8.3±9.0	0.014
BSIの再発件数 (%)	15 (5.9)	5 (2.0)	0.038
30日以内の同じBSIでの再入院件数 (%)	9 (3.5)	4 (1.6)	0.262
効果的な治療までの時間 (平均時間±1S.D.)	30.1±67.7	20.4±20.7	0.021
最適な治療までの時間 (平均時間±1S.D.)	90.3±75.4	47.3±121.5	<0.001

図3. MALDI-TOF MS導入前後の疾患別の平均在院日数の比較.

賀大学では年間900万円弱のコスト差額があるため、機器購入も4～5年で採算が取れる⁴⁾。当院での同定実施件数は約半分であるため、試薬コスト差額で機器代の採算を取るのに8～10年かかることになる。

試薬コストだけでなく、労働時間も含めた検査費用の効果をアピールすることも重要である。ジョーンズ・ホプキンス病院からの報告⁵⁾では、MALDI-TOF MS導入後1年間で56.7%のコスト、日本円に換算して約1,200万円の削減

表2. 従来法と MALDI-TOF MS の年間検査費用の比較 (Johns Hopkins Hospital)⁵⁾

項目	従来法 (\$)	MALDI-TOF MS (\$)	差額 (円*)
年間試薬コスト	158,645.33	29,613.84	15,483,779
年間労働コスト (検査所要時間に基づく)	31,323.98	26,669.34	558,557
MALDI固定費用 (スタンダード試薬, 保守費用)		31,272.53	-3,752,704
合計	189,969.31	87,555.70	12,289,633

※検査件数：関連する病院3カ所，クリニック21カ所から年間175,000検体。

※年間56.7%のコスト (約1,200万円) の削減。

*1\$ = 120円で換算

が試算されている (表2)。ジョーンズ・ホプキンス病院は関連する3カ所の病院と21カ所のクリニックから年間約175,000件の検査件数を有するため削減額も大きくなっているが，労働コストに着目したのは参考になると思われる。

MALDI-TOF MSの導入には試薬コストだけでなく，労働コストも含め，臨床的效果や平均在院日数短縮などの病院経営効果を前面にアピールすることが秘訣と思われる。

4. MALDI-TOF MSが有用であった症例

4.1 同定菌名から抗菌薬が変更になった症例

患者：70歳代，男性

主訴：ストーマから出血

既往歴：慢性腎不全 (透析中)，虚血性心疾患，高血圧，十二指腸潰瘍，S状結腸憩室穿通でハルトマン手術施行。

現病歴：当日午後6時に突然絞られるような下腹部痛が出現し，ストーマから出血したため来院。S状結腸穿通と診断され緊急手術となり，メロペネムが投与された。術後2日目に発熱を認め，採取された血液培養からグラム陰性桿菌が検出された。

血液培養陽性ボトルから MALDI バイオタイパーでの直接菌同定の結果，*Elizabethkingia meningoseptica* と同定された。本菌はカルバペネム自然耐性であり，菌名迅速報告によって適正な抗菌薬に変更された。

同様にカルバペネム自然耐性である *Stenotrophomonas maltophilia* など，菌名迅速報告によって適正抗菌薬使用に繋がった症例も複数経験している。

4.2 血液培養から GNC が検出された症例

患者：1歳6カ月，女児

主訴：発熱，咳嗽，喘鳴

既往歴：超低出生体重児，生後2カ月に肺炎で入院。1歳時にRSウイルス肺炎で入院。呼吸窮迫症候群を併発し気管挿管，人工呼吸器管理。1歳2カ月時に肺炎＋気管支喘息重積発作で入院。

現病歴：前日の夕方から発熱が出現した。咳と喘鳴が次第にひどくなり，当院急病センターを受診。気管支喘息重積発作＋肺炎の診断で入院加療を行うこととなった。入院時の血液培養からグラム陰性球菌が検出された。

血液培養からグラム陰性球菌が検出された場合，本当に球菌か，桿菌が球状化したものか，もし *Neisseria meningitidis* であれば，接触者への抗菌薬予防投与を行わないといけないため，他の菌種との鑑別が急務となる。本症例で

は血液培養陽性ボトルから MALDI バイオタイパーでの直接菌同定の結果，*Moraxella catarrhalis* と同定され，接触者への抗菌薬予防投与が不要となった。MALDI-TOF MS 導入前であれば，翌日まで菌名不明のまま予防投与が行われていたかもしれない。MALDI-TOF MS 導入によって治療のみならず，不要な抗菌薬予防投与の削減につながったと考えられた。また，これらの情報は感染症医が不足しているわが国において，微生物検査室に判断を求められる場面もあり，より客観的なデータに基づいた情報提供によって診断および治療に貢献できたと考えられた。

4.3 同定菌名から感染症を特定できた症例

患者：50歳代，男性

主訴：悪寒，発熱，血圧低下

身体所見：眼球充血あり。ほか特に所見なし。

既往歴：2000年に右腎摘出 (腎細胞がん)，高尿酸血症，高LDL血症。

現病歴：一昨日，1週間のハワイ旅行から帰国。海水浴あり。登山あり。生もの摂取なし。右手第2指を紙で切った。昨日より悪寒あり。本日，近医受診しショックバイタルにて当院へ救急搬送。来院時の血液培養よりグラム陰性桿菌が検出された。

血液培養陽性ボトルから MALDI バイオタイパーでの直接菌同定の結果，*Comamonas kerstersii* と同定された。極めてまれな菌名であるため，菌名由来や文献を検索し，憩室炎との関連性⁶⁾を情報提供した。このように MALDI-TOF MS 導入後，初めて見る菌名も多く，これまで以上に文献検索力や英文読解力，臨床とのコミュニケーション能力が求められる。ちなみに本菌の種形容語の *kerstersii* はベルギーの細菌学者 Karel Kersters の名前に由来することである⁷⁾。情報提供後直ちに腹腔内感染症を疑って腹部CTが実施され，結腸に憩室が認められた。また，本菌は嫌気性菌を含む複数菌と同時に検出される症例が多いとの情報⁸⁾も付加し，複数菌をカバーする広域抗菌薬が選択された。その後 *Clostridium* sp. や *Bacteroides* sp. が嫌気性ボトルから遅れて検出され，文献を裏づける結果となった。MALDI-TOF MS 導入前であれば，本菌を同定できる同定キットや自動機器はなく，菌名を *Comamonas* sp. で報告していた場合，まして属名も不明でブドウ糖非発酵菌グラム陰性桿菌で報告していた場合，診断にたどり着くのに時間を要した可能性がある。詳細な菌名報告と文献検索力や英文読解力，臨床とのコミュニケーションの重要性が示唆された事例であった。

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i> DSM 16358T DSM	2.336	574
2 (++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.267	72407
3 (++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> DSM 30104T_QC DSM	2.21	72407
4 (++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03_B LBK	2.129	573
5 (++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 37585 PFM	2.093	573
6 (++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> DSM 30104T HAM	2.092	72407
7 (++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i> DSM 16358T HAM	2.081	574
8 (++)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 37595 PFM	2.036	573
9 (+)	<i>Enterobacter aerogenes</i> LMG 2970 LMG	1.995	548
10 (+)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 37924 PFM	1.963	573

図4. MALDI-TOF MSの誤同定例の同定菌種一覧.

図5. MALDI-TOF MSの誤同定例のマスペクトルパターン.

5. MALDI-TOF MSによる同定のピットフォール

マスペクトルパターンをデータベースとマッチングさせて同定する本法は夾雑物の影響を受ける場合がある．血液培養陽性ボトルから遠心洗浄法にて集菌し，セルスメア法で *Klebsiella pneumoniae* と同定されたが（図4），正しくは *Enterobacter cloacae* であった事例を経験した．そのときのマスペクトルパターンは図5のとおりであり，真の *K. pneumoniae* と比較しても矢印のピーク以外は似たパター

ンを示した．原因としてセルスメア法による夾雑物の影響が考えられ，エタノール・ギ酸抽出法で実施すれば正確に同定されていたかもしれない．

今回の誤同定事例は，スコアは高いものの，正確性を示す指標はCであった（図6）．このような場合には注意が必要である．実際にはグラム染色時に生鮮標本で運動性を確認していたため，運動性のない *K. pneumoniae* と矛盾し，再検したためそのまま報告することはなかったが，ヒヤットとした事例であった．

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E4 (+++)(C)	1029-1	Klebsiella pneumoniae	2.336	Klebsiella pneumoniae	2.267

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

図6. MALDI-TOF MS の誤同定例のスコアと正確性指標。

6. 嫌気性菌同定検査への貢献

日常検査における嫌気性菌同定検査での貢献度は高い。1件あたりのランニングコストが安価で、嫌気培養後のコロニーから数分で菌名が得られるため、迅速性及同定検査費用削減に大きく貢献している。MALDI-TOF MS 導入後は、同定検査よりも、鑑別培地や選択培地を駆使して如何に効率的に検出するか、分離培養に重点が置かれるようになると思われる。

7. 将来展望

MALDI-TOF MS での同定検査以外には、薬剤感受性検査への応用が期待される。現段階ではβ-ラクタマーゼの迅速検出方法などが報告されている⁹⁾。

ほかにも病原性の推定として *Staphylococcus aureus* が産生する Pantone-Valentine leukocidin のスクリーニングが可能との報告¹⁰⁾もあり、同定・薬剤感受性検査のみならず、病原因子検出への応用も期待される。

8. おわりに

臨床微生物検査における技術革新である MALDI-TOF MS の導入によって、これまで1日から数日かけていた菌同定検査が僅か数分で、血液培養陽性ボトルからも1時間以内で結果報告可能となった。それによって適切な抗菌薬投与ま

での時間が短縮され、平均在院日数の短縮にもつながった。

現時点では機器コストの面から限られた施設のみで MALDI-TOF MS の恩恵を受けているが、いずれは日本全国、全世界で臨床微生物検査のスタンダードになると思われる。今後は菌同定検査のみならず、薬剤感受性検査や病原因子検出など多方面への応用も期待される。

文 献

- 1) 大楠清文, モダンメディア, **58**, 113 (2012).
- 2) L. B. Hardy, P. L. Fitzgibbons, J. D. Goldsmith, R. N. Eisen, M. B. Beasley, R. J. Souers, R. E. Nakhleh, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **137**, 19 (2013).
- 3) A. M. Huang, D. Newton, A. Kunapuli, T. N. Gandhi, L. L. Washer, J. Isip, C. D. Collins, and J. L. Nagel, *Clin. Infect. Dis.*, **57**, 1237 (2013).
- 4) 曲淵裕樹, ブルカー・ダルトニクス株式会社 Testimonials #1.
- 5) K. E. Tan, B. C. Ellis, R. Lee, P. D. Stamper, S. X. Zhang, and K. C. Carroll, *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 3301 (2012).
- 6) O. Oputa, B. Ney, G. Zanetti, K. Jatton, G. Greub, and G. Prod'homme, *J. Clin. Microbiol.*, **52**, 1009 (2014).
- 7) <http://www.bacterio.net/comamonas.html>
- 8) M. N. Almuzara, R. Cittadini, C. Vera Ocampo, R. Bakai, G. Traglia, M. S. Ramirez, M. del Castillo, and C. A. Vay, *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 1998 (2013).
- 9) K. Sparbier, S. Schubert, U. Weller, C. Boogen, and M. Kostrzewa, *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 927 (2012).
- 10) F. Bittar, Z. Ouchenane, F. Smati, D. Raoult, and J. M. Rolain, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **34**, 467 (2009).