



質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法

おお くす きよ ふみ
大 楠 清 文
Kiyofumi OHKUSU

はじめに

地球が誕生したのが約45億年前とされており、最古の細菌は約35億年前に現れたことが確認されている。すなわち、細菌は地球誕生から約10億年かけて自己複製能力を身につけた生命体として進化を遂げたことになる。「細菌」(microbe)という語は、1879年に外科医セディヨウが医学アカデミー会員として「パスツール氏の研究が外科学の進歩に与えた影響について」と題した講演のなかで初めて用いられたようである。この19世紀末から20世紀初めは、細菌学の創始者パスツールとコッホの研究と貢献に引き続いて、病原細菌発見の黄金時代と呼ばれている。すなわち、炭疽(1876年)、腸チフス(1880年)、結核(1882年)、コレラ(1883年)、ジフテリアおよび破傷風(1884年)、ペスト(1894年)、梅毒(1905年)といった感染症の原因菌が短期間のうちに次々と発見された。この頃の細菌の記載方法は、病原細菌を一般の細菌と区別するために、形態と生化学性状を中心としたものであった。その後、多数の性状をコンピューター化した数値分類、細菌の細胞構成成分を指標とした化学分類、さらに遺伝子増幅法や自動塩基配列決定技術の急速な進歩の影響を受けながら、ゲノム細菌学とも呼ぶべき時代を迎えた。そして、ポストゲノム時代の現在、ここでも基礎的研究が新しい理論や技術を生み出し、社会や産業を一変させる成果へと進展した姿を見ることができ。それが2002年にノーベル化学賞を受賞した田中耕一博士(島津製作所)が開発した技術「生体

高分子の質量分析法のための脱離イオン化法」である。この成果を発端としているマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いた微生物の新しい同定法が大きな注目を集めており、欧州ではすでに500施設以上で実用化されている。わが国でも2011年から臨床微生物検査の現場での使用が開始されており、今後急速に普及していくことが予想される。

本稿では、細菌の分類と同定の概念を再考しつつ、分類体系の変遷と最近の動向を概説しながら、質量分析技術による細菌同定の原理や日常検査における活用法と今後の展望について紹介したい。

I. 分類そして同定とは

新たな技術が登場して、その技術が臨床微生物検査に応用される際には、今一度「分類」や「同定」の概念を見つめ直すことが大切である。分類学 taxonomy の語源はギリシャ語の taxis = 整理 arrangement と nimina = 配列 distribution に由来するとされている。分類学には歴史的にさまざまな見解があるが、著名な分類学者である Cowan 博士は、分類学を次の3つの概念に分けた。すなわち、①分類 classification : 類似性に基づいてグループの中に細菌を秩序正しく配列すること、②命名 nomenclature : ①によって定義されたグループの単位に名前を付けること、そして③同定 identification : 未知の細菌が①および②によって定義・命名されたグループのどれに属するかを決定するプロセスである。そして、この三位一体の総合が分類学であるとした。したがっ

て、日常検査における「細菌の同定」は、未知の分離菌株がすでに記載されたどの菌種にもっとも近いかを決定する作業である。いわば同定とは、分類と命名の実践的な応用なのである。同定を行う場合、未知の分離菌株の性状を調べてその特徴を類似した菌種の記載と比較する。同定ではその菌種をお互いに効率よく識別するために重みづけされた性状を用いる一方で、分類では性状に重みづけしないことが望ましい。この点で同定は分類とは大きく異なるのである。しばしば分類と同定が混同されているので注意が必要である。

II. 細菌の分類体系

細菌は約 8,000 種類が記載されており、毎年約 100 種類が新種として追加されている。細菌の分類は、国際細菌命名規約 (International Code of Nomenclature of Bacteria ; ICNB) によって規定されている。細菌を分類する最も基本的な単位は株 strain である。しかし、分類学上の最小単位は、株ではなく菌種 species である。実際、国際細菌命名規約では、種 (ときに亜種 subspecies) 以上の細菌を取り扱い、種を細分する血清型 serovar、ファージ型 phagovar、病原型 pathovar、生物型 biovar は規約の対象外である。

菌種名は二命名法 binomial nomenclature によりラテン語で記載される。この命名法では、最初の名は属名 genus で、最初の文字は大文字で示される。第 2 の名は、種形容語 specific epithet と呼ばれている。属名と種形容語を一緒にすることにより 1 つの種名を表している。よって、種形容語の部分のみを指して種名というのは誤りなので注意が必要である。

種の定義は、「全染色体 DNA の定量的な DNA/DNA ハイブリッド形成が最適条件下で 70% 以上あり、かつハイブリッドの熱安定度が 5°C 以内におさまる菌株の集まり」としている¹⁾。現在の分類学的なアプローチでは、上述の DNA/DNA ハイブリッド試験に基づいて菌株をグルーピングした後、これに対応するようなキーとなる表現性状を探して、それらを菌種の識別指標として同定を行うことになる。

近年、次世代型シーケンサーの台頭により数日間

で細菌の全ゲノムの配列を決定・比較できるようになった。ゲノム解析技術とその解析結果が分類学の概念や分類体系の構築に影響を与えるかもしれない。

III. 細菌分類の変遷

細菌の分類は、20 世紀の前半には病原性菌種とそのほかの菌種を識別することから始まった。その手段として、集落の性状、染色所見、菌の形態や配列、血清型、そして少数の生化学的性状で病原性菌種を識別する検査方法が採用された。その後、菌種が増加するにつれ、調べなければいけない性状が多くなり、コンピューターを使った数値分類法へと進展し、これまで臨床微生物検査の現場で利用されている。すなわち、この数値分類の概念は日常検査で頻用されている同定キットや自動同定機器の開発に貢献したのである。1970 年代後半には、再現性の高い方法として細菌の基本構造の成分を利用する化学分類が発展した。細胞壁のペプチドグルカンの組成、呼吸鎖酵素キノンの分子種、細胞壁の脂質や脂肪酸の種類、DNA の GC% などを分類指標としている。1980 年代からは、16S rDNA の配列に基づく分子進化学的な系統分類が主流となった。16S rDNA のほぼ全塩基配列 (約 1,500 bp) を決定し、類似度が 98.7% 以上の菌種がない場合は新しい菌種の可能性が高い²⁾。つまり、16S rRNA のシーケンスを決定して系統解析を行えば、未知の菌株がどの属に所属しているか、あるいはどの菌種と類縁関係にあるかを推定できるようになったのである。そしてポストゲノムの時代を迎えた今日、質量分析計を用いて細菌に由来したタンパク質成分の分子量情報 (マススペクトル) のパターンから、わずか 5 分足らずで分離菌株の同定をできるようになったのである。しかしながら、前述のように「同定」がすでに記載されたどの菌種にもっとも近いかを決定する作業であることに変わりはなく、今回の主題である「質量分析法」を利用した最新の方法であっても、分離されたすべての細菌を完全に同定することはできない。細菌が「生き物」である以上は今後も細菌の培養と表現性状を解析する重要性はいささかも変わらないことを申し添えておきたい。

IV. 質量分析法とは

タンパク質やペプチドなどの分子の重さ（質量）を計ることが「質量分析（Mass Spectrometry）」である。英語の Mass Spectrometry の頭文字から MS と略記されるので、慣用的に「マス」と読むことが多い。タンパク質は各々固有の重さを持っているので、この重さの違いを利用すれば、分子量からタンパク質の名前やその濃度を知ることができる。また、未知の試料にどのようなタンパク質がどのくらい含まれているのかも解析できる。すなわち、質量分析法の最大の利点は、さまざまな物質を同時に検知して同定と定量の両方が可能なことである。実際、医療領域では代謝疾患や悪性腫瘍の患者のタンパク質を探索して、その病態に関与するバイオマーカーの研究ですでに利用されている。病態に関与する既知のタンパク質を同定できるだけでなく、未知のタンパク質の構造を決定するうえでも大きな役割を果たしているのである。

では、タンパク質の重さをどのようにして計るのか。分子レベルで極めて微量であるため、試薬のように天秤に載せて計るというわけにはいかない。質量分析計を用いて測定する。すなわち、質量分析は次の3つのステップからなる。①試料をイオン化する、②イオンを分離する（重さで分ける）、③そのイオンを検出する。つまり、質量分析を一言で表現すると「イオン化して飛ばした後、キャッチする」のである。各々のステップにはいくつかの手法が開発されている（表1）。これらの組み合わせによって質量分析計はさまざまなタイプの装置が存在する。たとえば、後述するような細菌の同定に使用されている装置は、マトリックスという試薬と試料を混合して「レーザー」を照射することによってイオン化するタイプと、真空中のある一定の距離をイオンがどのくらいの時間で飛んでいくかを計測して質量を割

り出すタイプとの組み合わせである。このタイプの質量分析装置は、MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer) と呼ばれており、日本語に訳すと「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計」である。

V. MALDI-TOF MS とは

ここでは MALDI-TOF MS の原理をまとめてみたい。この複雑な名前の原理を理解するために、まずはこの「MALDI-TOF MS」という名前を構成する各要素をキーワードとしてその概念を紹介する。つまり、①マトリックス支援 (Matrix Assisted)、②レーザー脱離イオン化あるいはレーザーイオン化 (Laser Desorption/Ionization)、③飛行時間型質量分析計 (Time of Flight Mass Spectrometer ; TOF MS) の3項目を順に概説する。

1) マトリックス支援 (Matrix Assisted) とは

「マトリックス」の明確な定義は定まっていないが、一般には「レーザー光を吸収して試料のイオン化を促進する有機化合物」である。MALDIでは、窒素レーザー（波長337nm）が頻用されている。また、微生物同定に適したマトリックスとして、 α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (CHCA) や sinapinic acid (シナピン酸) などのベンゼン骨格を持つ有機化合物が使用されている。ベンゼン環がレーザー光を吸収して、-COOH (カルボキシル基) のような官能基が H^+ (プロトン) を試料へ供給することによってタンパク質がイオン化されるのである。マトリックスの働きは、①レーザーのエネルギーを効率的に吸収する、②プロトンを試料に供給してイオン化を促進する、③試料が分解するのを防ぐことである。すなわち、マトリックスの支援(助け)を借りてタンパク質を壊さずに効率的にイオン化するのがMALDIである(図1)。

表1 質量分析のステップと解析手法

①試料のイオン化	②イオンの分離	③イオンの検出
<ul style="list-style-type: none"> ✓電子イオン化 (EI) ✓化学イオン化 (CI) ✓高速原子衝撃 (FAB) ✓エレクトロスプレーイオン化 (ESI) ✓マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓磁場型 ✓四重極型 ✓イオントラップ型 ✓サイクロトロン共鳴型 ✓飛行時間型 (TOF) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓電子増倍管 ✓マイクロチャンネルプレート

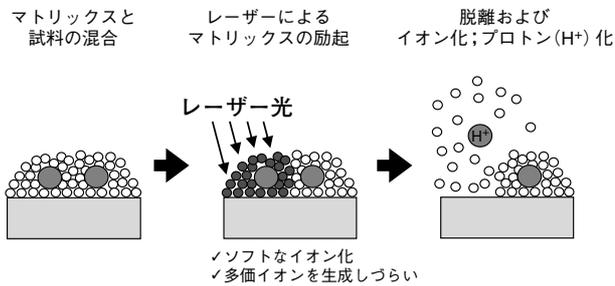


図1 MALDIの基本原理

2) レーザー脱離/イオン化とは

レーザーイオン化とは文字通り、試料にレーザー光を照射することによってプロトンの受け渡しをしてイオンを生成させることである。一方、レーザー脱離は試料（固体あるいは液体）にレーザー光を照射すると急速に加熱されるので、試料が気相へガス化（脱離）される方法である。この脱離は広義にはイオン化も含まれるので、Laser Desorption/Ionization（レーザー脱離/イオン化）と表現される。

ところで、タンパク質は熱に弱いので、レーザーを直接当てると壊れてしまうため、タンパク質をうまくイオン化することに1985年頃まで誰も成功していなかった。ここで田中耕一博士の登場である。田中博士はレーザーを当ててもタンパク質を壊さないようにするために、レーザーのエネルギーを弱める物質（補助剤）を日夜探していた。ある時、間違った試薬を混合して補助剤を作製してしまい、普通ならばそのまま破棄してしまうところを、この補助剤を試料に混ぜてレーザーを照射したところ、タンパク質を壊さずに「ゆるやかな（ソフトな）イオン化」に成功したのだ。この成果³⁾が2002年にノーベル化学賞の受賞に繋がったのである。

3) 飛行時間型

(Time of Flight-Mass Spectrometer ; TOF-MS)

イオンを重さ（質量電荷比）で分離する手法の1つである。サンプルプレート上でイオン化された試料は電圧をかけると加速されて、真空中を検出器に向かって走行する（図2）。この時、イオンが受け取るエネルギーは電荷量が同じであれば一定なので、すべてのイオンは加速領域を出る段階で同じ運動エネルギー $K = \frac{1}{2}mv^2$ を持つ。エネルギー保存の法則から質量（m）の小さい分子ほど飛行速度（v）が

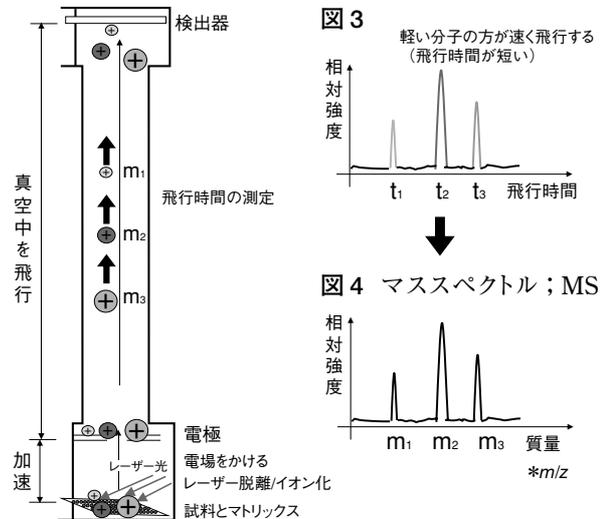


図2 MALDI-TOF MSの基本原理

早く、検出器に早く到達するが、質量の大きな分子は飛行速度が遅くなり、検出器までの到達時間も遅くなる。つまり、各々のイオンの検出器までの到達時間を計測すれば、それぞれの質量（質量電荷比）を割り出すことができるのである。

軽い分子は早く走り、重い分子は遅れて走るので検出器には質量の軽いものから順に検出器で信号が発生する。この現象を横軸に時間、縦軸に検出強度としてプロットしたのが図3である。さらに、この飛行時間を質量（質量電荷比）に換算して作図をしたものが図4であり、この波形のパターンをマススペクトルと呼ぶ。このマススペクトルは特定の分子量（1つのピーク）から試料に含まれる成分を推定することにも利用される一方で、この波形全体のパターン（ピーク分布）自体がその試料の特性を示しているともいえる。そこで、ある細菌をまるごと飛ばしたタンパク質のマススペクトルのピーク分布が特定の菌種のマススペクトルのパターンと同じであれば、その細菌と同定できるのではないかとの発想が生まれたのであろう。次に、その原理と市販の細菌同定システムを紹介したい。

VI. MALDI-TOF MSによる 細菌同定の基本原理

質量分析法による細菌同定の装置・システムとして2種類が販売されている（図5）。1つはブルカー・ダルトニクス社（ドイツ）の「MALDI Biotyper」

ブルカー・ダルトニクス社
MALDI Biotyper Ver.3.0

島津製作所：AXIMA微生物同定システム
シスメックス・バイオメリュー社：VITEK MS



(ブルカー・ダルトニクス社の許可を得て転載) (シスメックス・バイオメリュー社の許可を得て転載)

図5 MALDI-TOF MSを用いた微生物同定システム

である。国内ではブルカー・ダルトニクスの日本法人と日本BDそしてシーメンスの3社が取り扱っている。もう1つは島津製作所のAXIMA微生物同定システムである。本システムはシスメックス・バイオメリュー社から「VITEK MS」としても販売されている。「MALDI Biotyper」と「VITEK MS」はともにMALDI-TOF MSタイプの装置で、すでに医療機器として認可されている。

微生物の同定にMALDI-TOF MSタイプの質量分析計が利用される理由として次の3つがあげられる。①少ない菌量(約 10^5 個)で前処理が簡便である、②精製されたタンパクでなくてもイオン化の効率がそれほど低下しない、③1価のイオン生成が主体であるためスペクトルの解析が容易である。

まずはMALDI-TOF MSを用いて実際に大腸菌をまるごと飛ばしてみよう！そのマスペクトルのパターンが図6である。いわば、この波形が大腸菌の

「指紋」のようなものである。横軸が質量(質量電荷比)で約2,000～20,000ダルトン(Da)の分子量の範囲が解析に用いられる。縦軸はシグナルの強度である。どの分子量にどのくらいの強度でピークが観察されるか、またそのピークのパターンがどの菌種のマスペクトルのパターンと一致しているかが同定のポイントとなる。なお、ここで観察される波形のピークは菌体を構成しているタンパク質が主体であるが、とりわけ細菌のリボソームに由来するタンパクが50～70%を占めている。リボソームは細菌の「タンパク合成の工場」であるため、発現量も多く、塩基性の成分が大半であるがゆえにイオン化されやすく、分子量も上述の範囲内に収まっているので、マスペクトルの主要なピークとして観測されるのである。

ところで、このマスペクトルは菌種が異なればパターンも違うのか(識別能力)。図7に6菌種のマスペクトルを比較してみる。確かに菌種によってピークと強度のパターンが異なっている。次に、同じ菌種であれば菌株の違いによる影響は受けないのか(再現性)。これも図8に2菌種において各々5株のマスペクトルで比較しているが、やはり同じ菌種であれば同じパターンである。そこで、さまざまな菌種のさまざまな菌株をデータベースに登録しておき、コンピューターの力を借りて未知の菌株のマスペクトルがどの菌種のパターンと一致しているかをデータベースの中から瞬時に探すのである。つまり、MALDI-TOF MSを用いた菌種の同定を一言で表現すれば、「データベースに登録されている

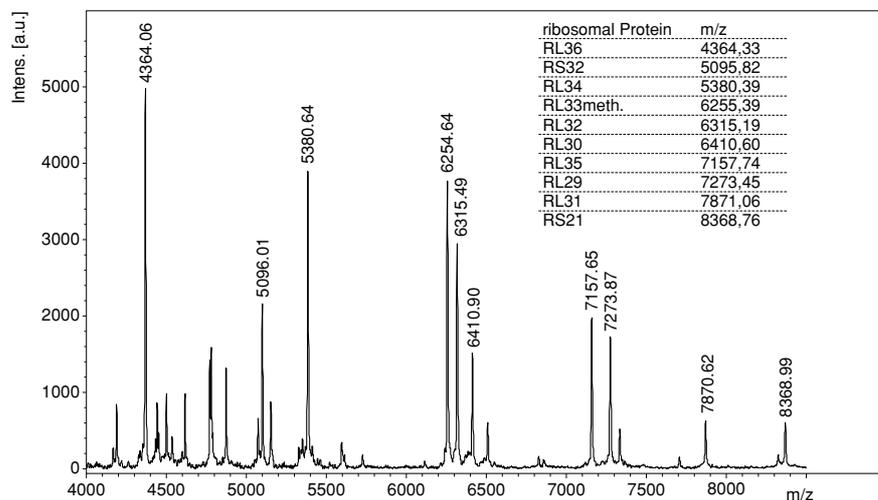
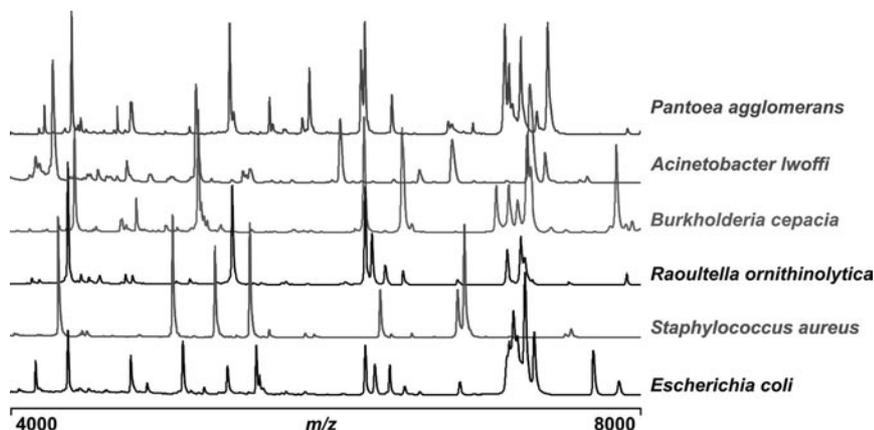
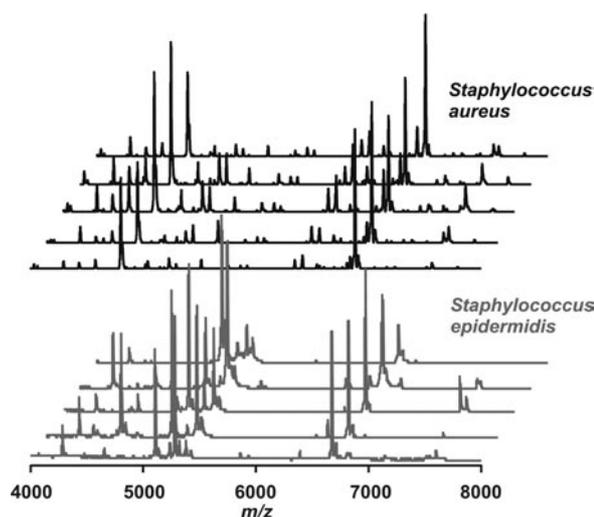


図6 大腸菌のマスペクトル



(シスメックス・バイオメュー社の許可を得て転載)

図7 マススペクトルのパターンは菌種によって異なる



(シスメックス・バイオメュー社の許可を得て転載)

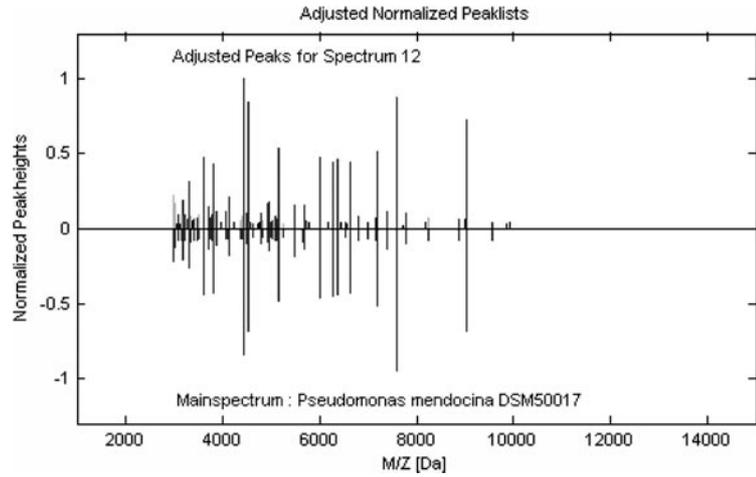
図8 同じ菌種であれば同じマススペクトルのパターン

菌種とのマススペクトルのパターンマッチング」である(図9)。どの菌種の「指紋」と一致するかを探るのである。となれば、精度の高い同定を達成するカギを握るのが「データベース(ライブラリー)の充実」と「パターンマッチングのロジック」であろう。「MALDI Biotyper」と「VITEK MS」のデータベースの基本概念を次に紹介する。最初に断っておきたいことは、両方のシステムのデータベース(ライブラリー)は毎年1,2回の更新が予定されているので、現時点で登録されている菌種数や菌株数の比較を行うことは意味をなさない。ここでは両システムにおけるデータベースの基本的な構築理念を概説したい。

MALDI Biotyperは「Main Spectra (MSP)」が基本のコンセプトである。各菌株(基本的には基準株)

を複数回測定して、マススペクトルの各ピーク(分子量)とその強度の平均値を算出する。また、各ピークの検出頻度を考慮しながら、まれにしか検出されないピークはあらかじめノイズとして除去後、データベースに登録される。同定したい菌株がこのデータベースのどの菌株(菌種)と近縁であるか(系統樹解析を行い、独自のアルゴリズムで行うとこのことで詳細は未公開)をスコア値で表現され、このスコア値が高い順に候補の菌種名が表示される(図10)。スコア値が2.0以上であれば菌種レベルで信頼性が高く、1.7以上2.0未満では属レベルでの一致と判断される。同じ菌種でも複数の株が登録されているので、株間にパターンの多様性があっても正確な同定が可能とされている。

他方、VITEK MSの基本理念は「SuperSpectra™」



(ブルカー・ダルトニクス社の許可を得て転載)

図9 マススペクトルのパターンマッチング

ピークの質量と強度の分布から未知の菌株のパターン（上段）がデータベースの登録された菌株のパターン（下段）と一致した。

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>Clostridium perfringens</i> B 1968_NCTC 3110_BOG	2.514	1502
2 (+++)	<i>Clostridium perfringens</i> B 1038_NCTC 4964_BOG	2.454	1502
3 (+++)	<i>Clostridium perfringens</i> B 1971_ATCC 3626_BOG	2.305	1502
4 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> A 1037_NCTC 8237_BOG	2.254	37763
5 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> D 2150_NCTC 8346_BOG	2.253	107819
6 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> C 1041_NCTC 10720_BOG	2.111	79668
7 (-)	<i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244 HAM	1.308	285
8 (-)	<i>Listeria grayi murrei</i> DSM 20596 DSM	1.262	1641
9 (-)	<i>Bacillus atrophaeus</i> DSM 675 DSM	1.163	1452
10 (-)	<i>Clostridium beijerinckii</i> 1072_ATCC 25752_BOG	1.136	1520

■ 表示菌株の菌種と一致
 ■ 属は一致
 ■ 一致していると言えない

(ブルカー・ダルトニクス社の許可を得て転載)

図10 MALDI Biotyper による菌株の同定結果

である。同一菌種の複数株（複数の施設で分離された15株以上）を多重測定し、安定して検出されるピーク群のうち科、属、菌種に特徴的なピークに重み付けを行う⁴⁾。つまり、菌種に特異的なピークをバイオマーカーとして抽出後に重みづけを行ったデータ（スーパースペクトル）がデータベースに登録されている。科、属、菌種レベルの順にスコア値を高く設定しておき、一致したピークのスコア値をすべて加算する。この合計スコア値によって同定を行う。

VII. MALDI-TOF MS システムによる細菌同定の実際

質量分析法による菌株の同定は3つのステップか

らなる。①菌体とマトリックス試薬を混ぜて乾燥させる、②MALDI-TOF MSでマススペクトルを取得する、そして③そのマススペクトルをデータベースに照合してパターンマッチングを行う。これらのワークフローを図11に示す。基本的には新鮮な集落を直接サンプルプレートに載せて解析を行う（ダイレクトスメア法あるいはセルスメア法と呼ぶ）。マトリックス試薬を滴下して乾燥する時間を含めて、約10分で同定結果が得られる（MALDI-TOF MSでの測定自体は約2分）。もし、うまく解析ができなかった場合には、菌体からタンパクを抽出する操作（ギ酸溶液を使用；抽出法と呼ぶ）が必要なため、追加で10分ほどの時間が必要である。1検体あたりのランニングコストは20円から50円ほどである。なお、

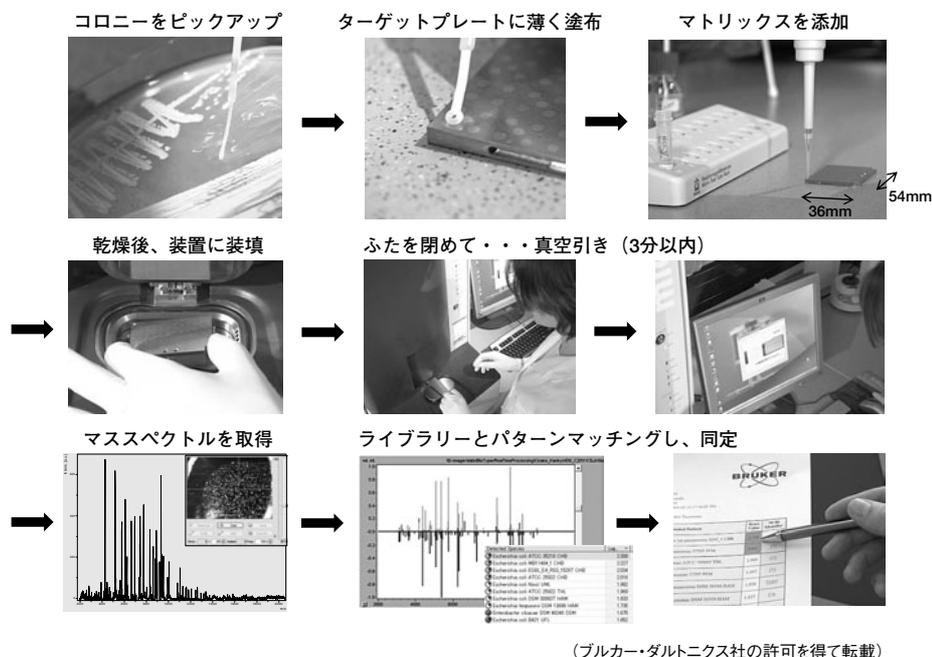


図 11 MALDI Biotyper による菌株同定のワークフロー

測定機器・システムの定価は、MALDI Biotyper が 2,800 万円、VITEK MS は 2,980 万円と公開されているが、データベースの更新料や窒素レーザー交換などのメンテナンス料を含めて、詳細は各メーカーにお問い合わせいただきたい。

所要時間やコストもそうではあるが、従来法の同定キットや自動同定機器による生化学的手法と MALDI-TOF MS による同定の比較・検討が一番興味のあるところである。事実、毎月のように欧米での臨床微生物関連の学術雑誌に検討結果が掲載されている。誌面の都合上、これらのデータの詳細を紹介することはできないが、いくつかの文献^{5~7)}を提示するので参照されたい。検討した医療施設の規模や菌種の分離頻度が異なるため、あくまで大まかな一致率ではあるが、菌種レベルで 70~95%、属レベルで 80~98%との報告が多い。腸内細菌群や *Staphylococcus* 属の同定では菌種レベルで 90%以上の同定精度であるものの、*Streptococcus* 属の同定はやや劣るようである。これは、*S. pneumoniae* (肺炎球菌) と *S. mitis* group の鑑別・同定は困難であることが影響しているのであろう。前述のように、MALDI-TOF MS は主にリボソーム由来のタンパクの違いで同定を行っているため、16S rDNA の配列相同性が高い類縁菌種の同定は難しい傾向がある。その他、MALDI-TOF MS で同定ができない菌

種の組み合わせとして、*Escherichia coli* (大腸菌) と *Shigella flexneri* (赤痢菌)、*Mycobacterium tuberculosis* (ヒト型結核菌) と *M. bovis* (ウシ型結核菌)、*Bacillus cereus* (セレウス菌) と *B. anthracis* (炭疽菌)、*Yersinia pestis* (ペスト菌) と *Y. pseudotuberculosis* (偽結核菌) などである。これらの組み合わせの菌種は DNA/DNA 相同性が互いに 70%以上を示すので、本来は同一の菌種であるという分類学上の問題に起因することを追記しておきたい。

VIII. MALDI-TOF MS システムの活用と今後の展望

MALDI-TOF MS は一般細菌だけでなく、嫌気性菌、抗酸菌、酵母様真菌、糸状菌の同定にも利用できることが大きな利点である。すなわち、同定キットの種類や自動同定機器のパネルを選択することなく、1つのシステムで臨床的に重要なあらゆる菌種を取り扱うことができるのである。2012年1月現在、嫌気性菌、放線菌、抗酸菌は、データベースに収載されている菌種がやや少ないが、今後ライブラリーが充実してくれば利用できるであろう。実際、MALDI Biotyper には 2011 年末に約 100 菌種の *Mycobacterium* 属菌がライブラリーに追加されたので、臨床分離株を用いた検討結果に注目したい。

一方、酵母様真菌の特に *Candida* 属菌や *Cryptococcus* 属菌は正確な菌種の同定が可能である^{8,9)}。糸状菌は固定培地で発育した集落での同定は困難であるが、液体培養で攪拌培養した後、同定を行えば再現性の高いマススペクトルが得られるとの情報がある。

その他、MALDI-TOF MSの活用として最も臨床的に有用性が高いのが、血液培養陽性時の培養液から直接の菌種同定である。すでに多くの施設で検討されており、約70～80%の同定精度との報告^{10～12)}が多い。なお、血液培養液には血球ほかヒトのタン

パクを多く含むため、培養液を直接、MALDI-TOF MSに塗布して解析することはできない。血液培養液の前処理用の試薬キット (MALDI SepsityperTM) がブルカー・ダルトニクス社から販売されている。所要時間は約5分で操作も簡便である (図12)。1検体あたり800円のコストがかかるため、今後、さまざまな前処理法の検討・評価が行われることに期待したい。

次にはおそらく臨床検体から直接に菌種の同定ができないかとの期待が大きく膨らむであろう。現在のシステムでは10⁵個くらいの菌量を必要とするため、敗血症の診断に血液から直接に菌種の同定を行うことは困難である。一方、感染時の菌量が多い尿や髄液では検体直接の同定が可能との報告^{13,14)}がある。とりわけ、細菌性髄膜炎では迅速な起炎菌の診断が患者の予後に大きく影響するため、MALDI-TOF MSによる髄液から直接の菌種同定は臨床への貢献度がきわめて高い。尿や血液培養液に複数菌¹⁵⁾が存在する場合 (混合感染) があるが、2菌種の比率が5:1くらいであれば、双方の菌種を同定できる。これ以上の比率になると多く存在する方の菌種のみが同定されて、少量の方の菌名は候補にあがらないようである。

その他、細菌が出す毒素の検出やウイルスの同定に適用した報告^{16,17)}がある。薬剤耐性菌の鑑別については、β-ラクタム薬やカルバペネム系薬での検討結果が報告^{18,19)}されているが、今後の詳細な検討を待つべきである。株レベルのタイピングは現状のシステムではあまり期待できない (表2)。すなわち、MALDI-TOF MSの主要な用途はあくまでも菌種レベルの同定であり、株レベルの異同の判定は現在のところ、困難であるとの見解²⁰⁾である。

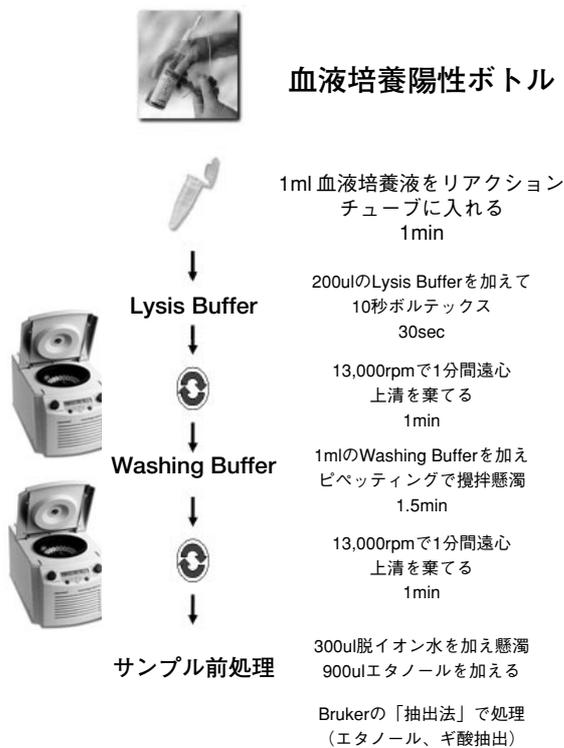


図12 Bruker MALDI Sepsityper キットを用いた血液培養陽性ボトル液の前処理法

表2 分類の代表的な方法とその適用範囲

分類・同定・タイピングの方法	科 Family	属 Genes	種 Species	株 Strain
DNA-DNA ハイブリダイゼーション			■	■
16S rRNA 遺伝子の配列相同性	■	■	■	■
G+C mol %	■	■		
血清型、フェージ型				■
多型解析 (PFGE)、リボタイピング				■
Multilocus sequence typing (MLST)			■	■
MALDI-TOF MS		■	■	

おわりに

近年の飛躍的な技術の進歩によって臨床微生物検査が大きな変貌を遂げようとしている。すなわち、臨床微生物検査における「三大技術革新」ともいえる自動同定感受性機器、遺伝子増幅技術、そして今回ご紹介した質量分析法が日常検査に導入されるようになったのである。しかしながら、これらの技術はあくまでも感染症検査のためのツールにすぎない。検査の対象が細菌という生き物であるがゆえに、鏡検・培養・感受性試験の「三種の基本技術」が今後も大切であることは何ら変わらない。そして、患者診療に直結するこれら検査の一つ一つが結局は、臨床微生物検査技師の「テクニック・ノウハウ・スキル」にすべて委ねられている以上、今後もわれわれ自身がこれら「三種の実践的な智慧」に磨きをかけていくことが何より重要だと思ふのである。

文 献

- 1) Wayne LG et al.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* **37** : 463-464, 1987.
- 2) Stackebrandt E, Ebers, J : Taxonomic parameters revisited : tarnished gold standards. *Microbiology Today.* **33** : 148-155, 2006.
- 3) Tanaka K, Ido Y, Akita S, et al.: Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry. SECOND JAPAN-CHINA JOINT SYMPOSIUM ON MASS SPECTROMETRY ABSTRACT, 1987.
- 4) 島圭介：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析を用いた微生物同定法とは？. *Medical Technology.* **39** : 491-496, 2011.
- 5) Senq P, Drancourt M, Gouriet F, et al.: Ongoing revolution in bacteriology : routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* **49** : 543-551, 2009.
- 6) Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al.: Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* **48** : 1549-1554, 2010.
- 7) Sffert R, Cunningham S, Ihde S, et al.: Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* **49** : 887-892, 2011.
- 8) Marklein G, Josten M, Klanke U, et al.: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *J Clin Microbiol.* **49** : 2912-2917, 2011.
- 9) Dhiman N, Hall L, Wohlfiel S, et al.: Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *J Clin Microbiol.* **49** : 1614-1616, 2011.
- 10) Scola L, Raoult D : Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* **4** : e8041, 2009.
- 11) Kok J, Thomas L, Olma T, et al.: Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* **6** : e23285, 2011.
- 12) Schmidt V, Jarosch A, Marz P, et al.: Positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 [Epub ahead of print].
- 13) Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, et al.: Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* **48** : 2110-2115, 2010.
- 14) Hyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Bocher S, et al.: Mass spectrometry : pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand Infect Dis.* **42** : 716-718, 2010. *Proteomics.* **4** : 2877-2892, 2004.
- 15) Warscheid B, Fenselau C : A targeted proteomics approach to the rapid identification of bacterial cell mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics.* **4** : 2877-2892, 2004.
- 16) Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, et al.: MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin. *Int J Antimicro Agents.* **34** : 467-470, 2009.
- 17) La Scola B, Campocasso A, et al.: Tentative characterization of new environmental giant viruses by MALDI-TOF mass spectrometry. *Intervirology.* **53** : 344-353, 2010.
- 18) Burckhardt I, Zimmermann : Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. *J Clin Microbiol.* **49** : 3321-3324, 2011.
- 19) Sparbier K, Schubert S, Weller U, et al.: Rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2011 [Epub ahead of print].
- 20) Welker M, Moore E.: Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol.* **34** : 2-11, 2011.