

MALDI-TOF MS を用いた微生物の新しい迅速同定法

川崎 浩子

微生物研究開発の現場、医療分野、品質管理分野では、日常的に微生物の“同定”が行われている。分類学で行う多層的アプローチによる正しい学名の導き出しというよりは、既知の微生物と同一かどうか、病原微生物や有害微生物に該当するかどうかの判断を、より早く正確に行うことが求められている。つまり、学名を確定できなくても高い確率で同定もしくは識別できればよい。今回紹介する方法はそれに適した同定法である。

近年、MALDI-TOF MS を用いた微生物の迅速同定技術が、ヨーロッパを中心に急激な広がりを見せている。すでに臨床検査の現場に導入されているケースもある。その理由は、迅速で行程が簡便、そしてランニングコストが安価であるからだ。MALDIとはマトリックス支援レーザー脱離イオン化法のこと、TOFMSとは飛行時間型質量分析法のことである。MALDI-TOF MS はこれら両者を組み合わせたものであり、高いイオン化法によって得られた物質（生体高分子）の質量をより広範囲に決定することができる。本分析装置を用いた微生物の同定は、微生物由来のタンパク質パターンが種あるいは種内のグループごとに特徴を持つことに注目し、タンパク質パターンのマッチングによって行う。このような微生物同定の試みはClaydonらの報告が最初と思われる¹⁾。比較解析の対象となるタンパク質は、分子量約5,000から15,000のもので、得られるピークの半数以下がリボソームタンパク質由来である。分析方法は至って簡単で、ピペットマンのチップの先でコロニーから少量の菌体を取り、それをMALDI-TOF MS のターゲット上に乗せ、マトリックス剤と混合させる。コロニー形成が難しい場合は、液体培養した細胞を使用する。試料を乾燥後、直接装置にかけて解析する。約2～3分で解析結果を得ることができる。細胞壁が強固な微生物の場合は、ギ酸処理により細胞破壊のステップを加えて行うなどの工夫が必要である。得られたタンパク質パターンは、データベース上の微生物MALDI-TOF MS ライブラリーと相同性解析を行い、その同一性から微生物を同定する。タンパク質検出から相同性解析まで自動化が可能であり、ターゲットを装置にかけ同定結果を得るまでの時間は5分程度である。

もっとも普及している対象微生物は細菌で、すでに多くの論文が発表されている²⁾。細菌の場合、種が異なればタンパク質パターンにも明確な相違が見られ、種レベル以下のグルーピングも可能である。酵母においても、

Candida albicans のような臨床微生物の同定が可能である³⁾。糸状菌や放線菌でもいくつかの報告がされているが、生育段階で異なるタンパク質パターンを示すことや、細胞が壊れにくい点で、細菌に比べ容易にはいかない場合が多い。

今後の課題は、①データベースの構築とその共有化、さらに②糸状菌などのような生育段階でタンパク質パターンが異なる微生物の同定である。MALDI-TOF MS 分析の性質から、マトリックス剤や検出器（メーカーなど）の違いによって得られるデータに相違が生じる。そのことから、他社で得られた結果や他社のデータベースとは直接比較できない。データベースの構築の違いも起因している。メーカーから販売されているデータベースの微生物の種類に偏りがあることも問題である。すべての微生物MALDI-TOF MS データを共有できれば、同定感度がより向上し、多様な微生物の同定も進むことが期待される。もう一つの課題である生育段階によるタンパク質パターンの相違の解決はかなり困難である。培養条件を一定にするなどの工夫が試みられているが、異なる実験室で一定にすることは難しい。本課題を解決できる方法としては、寺本らの精製したリボソームタンパク質に注目したMALDI-TOF MS 解析法がある⁴⁾。ゲノム解読された近縁微生物の情報を参考にリボソームタンパク質を同定し、比較解析するというものである。本方法はメーカーの違いに依存しない点、培養条件に比較的左右されないという点で優位である。反面、精製行程が加わることで迅速性が劣り、また、ハウスキーピングタンパク質であるリボソームタンパク質は種内の多様性が他のタンパク質に比べ低いいため識別感度が低下する場合もある。

現在もっとも普及している微生物同定法は、リボソームRNA遺伝子の塩基配列に基づく同定法である。今回紹介したMALDI-TOF MS を用いた同定法は、塩基配列解析手法に比べ、圧倒的に迅速性と簡便性に優れ、ランニングコストが安価（1検体50円程度）であることから、今後益々普及すると思われる。さまざまな分野における微生物同定の強いツールになることは確実だろう。

- 1) Claydon, M. A. *et al.*: *Nature Biotech.*, **14**, 1584 (1996).
- 2) van Veen, S. Q. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 900 (2010).
- 3) Marklein, G. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2912 (2009).
- 4) 寺本華奈江ら：分析化学, **55**, 987 (2006).