

免疫血清分野

尿一般分野

病理解分野

細胞診分野

血液一般分野

生化学分野

先天性代謝異常分野

微生物分野

質量分析装置による微生物同定検査

～同定検査の新たなツール～

検査科微生物係

はじめに

微生物同定検査は、患者から採取されたさまざまな検査材料（喀痰・糞便・尿・血液・膿など）から、感染症の原因菌の検出を目的とした検査です。

当検査センターでは2019年2月より、分子レベルで菌を同定できる質量分析装置「MALDI Biotyper」を導入しましたのでご紹介します。

1. 質量分析装置「MALDI Biotyper」とは

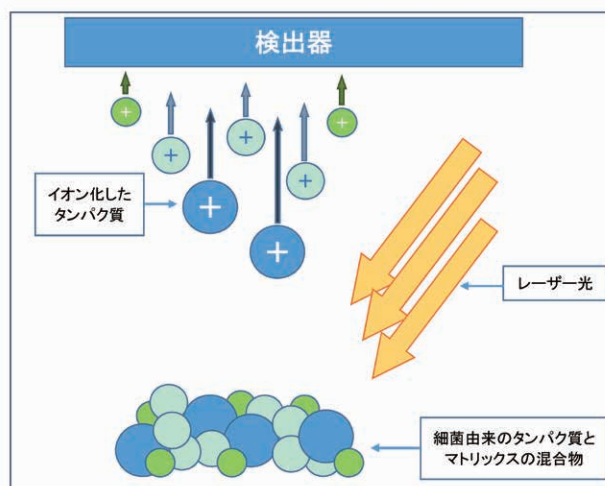


図1 質量分析のイメージ

質量分析装置は、2002年に島津製作所の田中耕一博士がノーベル化学賞を受賞した技術「ソフトレーザー脱離イオン化法」を用いて開発された装置です。この原理を利用して、イオン化したタンパク質を分離し、検出器に到達するまでの時間の違いを利用し微生物の同定を行います（図1）。

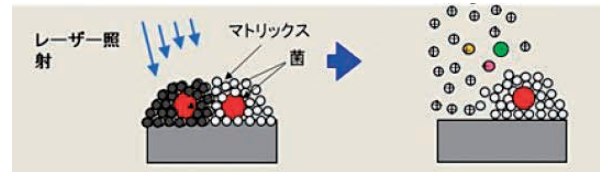
これまで同定検査はコロニー発育後、1日から数日かかっていましたが、質量分析装置を用いることでコロニーをターゲットプレートに塗布し同定菌名が出るまで1検体当たり約5分で検査を行うことができます。当検査センターでは一般細菌だけでなく、嫌気性菌、酵母様真菌、糸状菌の同定も質量分析装置で行っています。

2. 質量分析装置「MALDI Biotyper」の原理

質量分析装置「MALDI Biotyper」は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（Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry：MALDI-TOF MS）という方法を用いて検査をしています。この方法は3つのステップで成り立っています。

<ステップ1：試料中の成分のイオン化>

レーザー光を吸収する特性を持つ化合物のマトリックス試薬と菌を混合し、レーザーを照射することによってイオン化します。



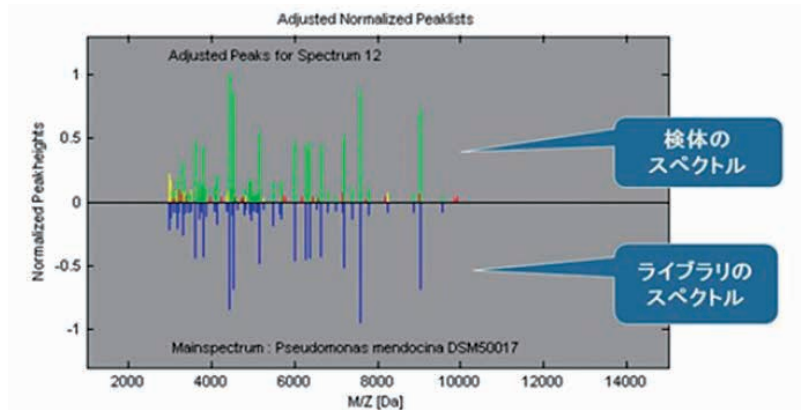
<ステップ2：イオンの分離>

次に、真空管でイオンを飛行させ、検出器までの飛行時間を測定します。軽い分子は早く、重い分子は遅く飛行するため、検出器へのイオンの到着時間に差が生じます。



<ステップ3：パターンマッチングで同定>

ステップ2で測定した飛行時間を質量に換算した波形のパターンをマススペクトルと呼びます。このマススペクトルをライブラリ（データベース）に登録されているスペクトルと照合させます。ライブラリのスペクトルと検体のスペクトルが一致することで、菌名を同定することができます。



※検体のスペクトルとライブラリのスペクトルを比較して菌種の同定を行うため、ライブラリ上にない菌は同定菌名を出すことができません。

3. 同定検査の流れ

実際に当検査センターで行っている質量分析装置による同定検査の流れをご紹介します(図2)。1日目は検体受付を行い、検査材料を培地に塗布します。一昼夜培養し、培養2日目に発育したコロニーから同定検査を行います。

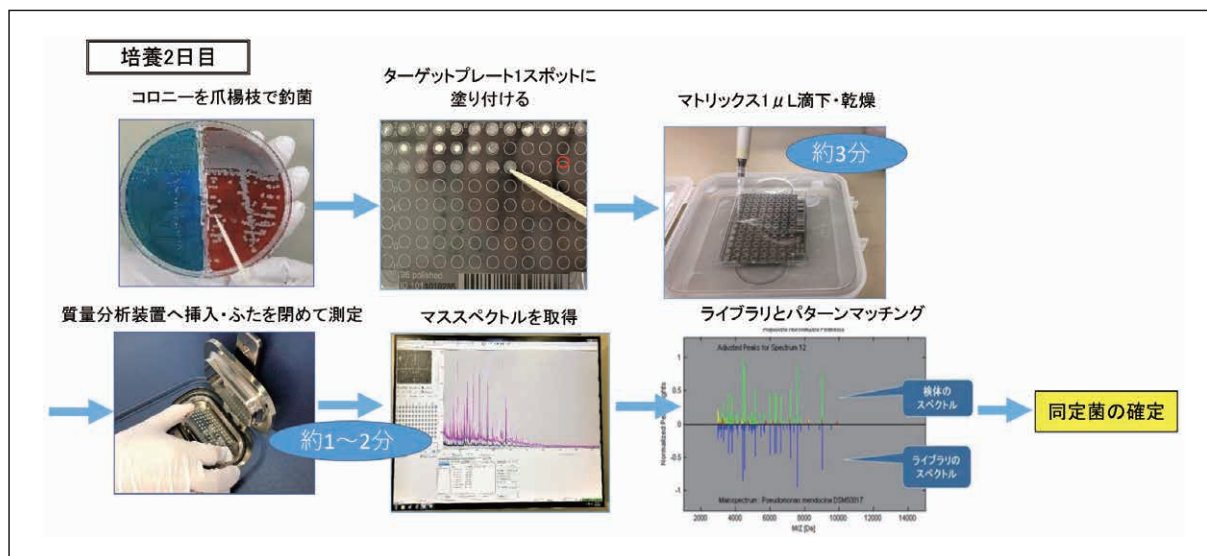


図2 質量分析装置による同定検査の流れ

4. 質量分析装置のメリット

①同定時間の短縮

従来法ではコロニー発育後、菌の同定には1日以上かかっていましたが、質量分析装置による同定ではコロニーから直接同定検査を行うことができ、装置へ挿入後、約1～2分で同定菌を確定できます。培養2日目以降にお問い合わせいただくと、同定結果をご報告できます。（報告書は薬剤感受性検査結果と同時にお返しします。）

血液検体では同定菌を確定後、直ちに電話とFAX送信で結果をご報告しています。

②同定検査の正確性

表1は既知の微生物を質量分析装置で同定を行った場合の一致率を示しています。すべての菌種で同定一致率90%以上と高い結果を得ています。不一致の同定菌に関しても属レベルまで同定が一致しているものもあり、他の方法の一致率と比較しても良好です。また、質量分析装置は遺伝子学的手法と高い一致率を示すと記載のある文献もあります。

出典：Bruker Daltonik GmbH

微生物グループ	N	同定一致率
非発酵性グラム陰性菌	229	93.89%
<i>Enterobacteriaceae</i> (腸内細菌科)	265	99.25%
その他のグラム陰性菌	204	95.59%
グラム陽性菌	230	97.34%
酵母様	225	97.33%
合計数	1153	96.79%

表1 MALDI Biotyper の性能評価の結果

③詳細な菌名報告

従来法の判定で一部同定が困難な菌は、菌の総称でご報告していましたが、質量分析装置を用いることで菌種名までご報告できるようになりました(表2)。

旧名称(総称)	新名称(菌種名)
<i>α-streptococcus</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
	<i>Streptococcus oralis</i>
	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Streptococcus parasanguinis</i> etc.
CNS(コアグララーゼ陰性 <i>Staphylococcus</i>)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Staphylococcus caprae</i>
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> etc.
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Enterococcus avium</i> etc.
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i> etc.

表2 報告菌名が詳細になった菌種

④あらゆる菌種を測定

質量分析装置は一般細菌だけでなく、嫌気性菌、酵母様真菌、糸状菌、抗酸菌の同定にも利用することができます。従来法では菌種や発育条件により、さまざまな検査法や同定キットを用いて同定検査を行っていましたが、現在は質量分析装置のみであらゆる菌種を同定することができるようになりました。

当検査センターでも *Mycobacterium abscessus* という非結核性抗酸菌を一般細菌培養から検出した例があります。*M.abscessus* は迅速発育菌群に含まれ、まれに一般細菌用培地に発育することがあります。以前は一般細菌用培地に抗酸菌が発育した場合、同定困難となっていました。現在は質量分析装置を用いることでこのようなイレギュラーな場面においても正確な結果をご報告できるようになりました。

5. 質量分析装置導入後検出された菌

質量分析装置を導入後、同定可能となった主な菌についてご紹介します（表3）。

菌名	菌の特徴
<i>Aerococcus urinae</i>	グラム陽性球菌 尿路感染症の起因菌となることがあります。ヒトの皮膚にも常在するため病原性は弱いですが、稀に心内膜炎などの感染症も報告されています。
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	グラム陽性球菌 コアグラーゼ陰性 <i>Staphylococcus</i> (CNS) の一つで、ヒトの皮膚常在菌です。比較的病原性が高い菌で、皮膚・軟部組織病変や心内膜炎、菌血症で検出されることがあります。
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	グラム陽性球菌 ヒトの喉や口腔、消化管の常在菌です。基礎疾患を持つ患者や高齢者から検出されることがあり、 <i>Streptococcus pyogenes</i> に似た感染症を起こすことがあります。
<i>Actinomyces sp.</i>	グラム陽性桿菌 ヒトの口腔内や消化管に常在しています。放線菌症の原因菌となることがあり、検体中に菌塊（硫黄顆粒）がみられることがあります。
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	グラム陰性桿菌 以前は <i>Klebsiella</i> 属に分類されていました。膿瘍、尿路感染、敗血症を起こすことがあり、 <i>K.pneumoniae</i> の病態と類似することがあります。
<i>Peptoniphilus harei</i>	嫌気性グラム陽性球菌 ヒトの皮膚や消化管、腔に常在しています。細菌性膿症、腹腔内膿瘍、皮膚軟部組織感染症などから分離されます。

表3 質量分析導入後に検出された主な菌の特徴

おわりに

現在、広島県では当検査センターを含め7施設で質量分析装置による同定検査が行われています。今後、より迅速で正確な同定検査の新たなツールとしてさらに多くの施設で導入されることが予想されます。

質量分析装置導入後、報告可能な菌名が3000菌種以上に増えました。初めて目にする細菌が多くあり、どのような特徴の細菌なのか文献や資料等で日々勉強しています。今後も先生方のお役に立てるよう努めてまいりますので、ご指導のほどよろしくお願いいたします。

参考資料：

1. MALDI バイオタイパーを用いた菌種同定実践ガイド, BECKMAN COULTER.
2. JAMT 技術教本シリーズ 臨床微生物検査, 丸善出版
3. 臨床と微生物 Vol.46 No.5, 近代出版
4. 臨床微生物検査ハンドブック 第5版, 三輪書店

担当：角本 菜摘（検査科微生物係）

* ウェブページでもご覧いただけます。 <http://www.labo.city.hiroshima.med.or.jp/>