

[総 説]

MALDI-TOF MS を用いた臨床微生物学的検査の新しい潮流
原理から応用まで

小松 方

天理医療大学医療学部臨床検査学科

(平成 28 年 2 月 9 日受付)

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型マスペクトロメトリー) を用いた細菌同定法が臨床微生物学分野に登場してから, すでに 10 年が経過しようとしている。わが国においても使用施設が年々増加しており, MALDI-TOF MS 導入による微生物学的検査全般の turn-around time が見直されている。MALDI-TOF MS は分離培養集落があれば, 簡便かつ短時間で測定が完了する迅速同定法として注目されている。さらに, 集落の前処理法の開発とデータベースの充実が進み, 嫌気性菌, *Mycobacterium*, *Nocardia* および真菌の同定精度も向上している。髄液や尿, あるいは血液培養ボトル溶液などの液状検体は, 夾雑蛋白質を除去するための 30 分~1 時間程度の前処理法を施すことで, 検体中に存在する細菌を直接的に同定が可能である。新しい β ラクタマーゼ検査法として, 抗菌薬の溶液と菌液を混合し, 抗菌薬の加水分解による β ラクタマーゼの構造変異に伴う分子量の変化を MALDI-TOF MS で検出する方法が考案されている。また基質拡張型 β ラクタマーゼ産生菌, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, ペロ毒素産生大腸菌等の臨床的に重要な耐性菌や毒素産生株のマスペクトルを, ソフトウェアを用いて多変量解析することで, 菌群に特有のバイオマーカーの発見や疫学解析にも応用可能な方法として注目されている。

Key words: MALDI-TOF MS, 迅速同定検査, バイオマーカー, 疫学解析

はじめに

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析) は質量分析法の一種である。本方法は 1988 年に島津製作所の田中耕一博士によって考案¹⁾された。MALDI-TOF MS は, 質量測定の対象物にレーザー照射し, この衝撃に対しても対象物を壊すことなく真空管の中を飛行させ, その飛行時間の違いを以て対象物の質量を測定可能とする方法である。本法は, 臨床微生物学の分野

における細菌の迅速同定法として脚光を浴びており, 形態学および生化学的手法を主体とした同定法とは異なり, 菌体内タンパク質のマスペクトルをあらかじめデータベース化し, 被検株のマスペクトルをこれとマッチングさせて同定する方法である。分離培養集落さえ確保できれば, 最速で 5 分以内に菌名を決定することが可能である。従来²⁾の分離培養・同定検査は 3 日以上³⁾の時間を必要としていたが, MALDI-TOF MS の導入によって分離培養翌日には, 一般的細菌の集落同定が可能となる。すなわち, 分離培養・同定検査の所要時間は従来法と比較して少なくとも 1 日以上短縮が可能となる^{2,3)}。また従来法と比較して, 菌種の違いによって分子量が異なるリボゾームタンパク質を主体としてマスペクトルをとるため, 16S rRNA シークエンスを用いた同定法に限りなく近い精度も得られる⁴⁾。さらに, 従来法と比較すると, 試薬代や労務費の削減^{5,6)}, および早期に同定結果が得られること

著者連絡先: (〒632-0018) 奈良県天理市別所町 80-1
天理医療大学
小松 方
TEL: 0743-63-7811 内線 546
FAX: 0743-63-6211
E-mail: komatsu@tenriyoro-u.ac.jp

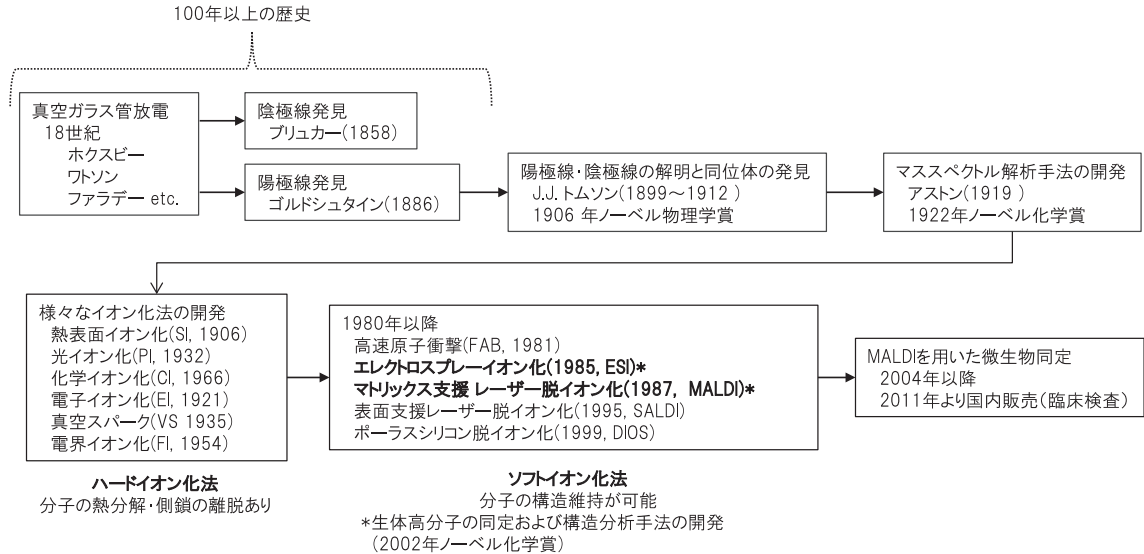


図1. 質量分析の歴史 (文献 16, 17 を要約し作図)

から抗菌薬適正使用による入院期間の短縮や死亡率の低下にも貢献する⁷⁻⁹⁾。既に MALDI-TOF MS を用いた集落同定法は年々、国内の臨床検査室へ導入されており、近い将来は本法を用いた同定技術が微生物学的検査の主体となる可能性が高い。MALDI-TOF MS の技術はさらに、血液培養液¹⁰⁾、尿¹¹⁾や髄液¹²⁾などの検体中に含まれる細菌の直接同定や、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)¹³⁾、基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBLs) 産生腸内細菌科細菌やメタロ β ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas aeruginosa*¹⁴⁾ のように臨床的に重要な薬剤耐性菌、並びに Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)¹⁵⁾ 等の毒素原性菌に特有なバイオマーカーを多変量解析によって区別できる可能性がある。さらに、タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS, MALDI-TOF/TOF) を組み合わせ、抽出したバイオマーカーのアミノ酸配列まで決定する高度なプロテオミクス解析まで発展させることができる。

本項では、MALDI-TOF MS の開発までに至った質量分析の歴史を振り返り、その原理、臨床微生物学への応用と将来像について解説を行う。

1. 質量分析の歴史と原理¹⁶⁾¹⁷⁾

質量分析 (mass spectrometry, MS, エムエスと呼称) の歴史は 18 世紀までさかのぼる (図 1)。真空ガラス管に電流を流すと陰極側からある物質が放出され、ガラス管の内側に衝突すると同時に蛍光を放つこ

とが研究者らによって明らかにされ、これを陰極線とした。また陰極線が何かに衝突して陽極と反発する方向に発する光が見いだされ、これを陽極線とした。イギリス ケンブリッジ大学のジョゼフ・ジョン・トムソン (JJ トムソン, 1856-1940) は陰極線と陽極線をそれぞれ電子 (1899) と正イオン (1912, 分子が電子と衝突してプラス荷電したもので、同位体を持つ) であること証明した。JJ トムソンは陽極線である正イオンをパラボラ写真に写しだして測定することを発明し、1906 年にノーベル物理学賞を受賞した。この業績から、彼は「質量分析学の祖」といわれている。その弟子であるフランシス・アストン (1877-1945) はイオン化した分子のピークを質量の順番に並べたマスペクトルの概念を提唱した。そして、現在ある質量分析装置の礎を築いた。この功績から 1922 年にアストンはノーベル化学賞を受賞した。以降、この質量分析装置を使用して分子をイオン化させる方法が数々と報告された。しかし、当時の方法は分子をイオン化する際に発生する熱等によって分解や側鎖が離脱してしまうハードイオン化法であり、実際の分子の分子量を正確には測定できない方法であった。現在タンパク質等の分析に実用されているのは電子イオン化法であるが、この方法を発展させて、高分子の構造が分解することなく質量を測定できる様々なソフトイオン化法が開発された。この方法の一つが現在細菌同定に使用されている方法となる。2002 年のノーベル化学賞はソフトイオン化法を開発した田中耕一博士¹⁾と同じソフ

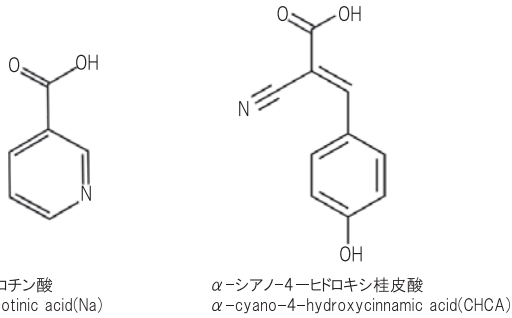


図2. MALDI-TOF MSによる細菌同定で使用するマトリックス (CHCA, 右図) とその構造式

トイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization : ESI) を発明したバージニアのジョン・フェン博士, そして分子の構造を核磁気共鳴分光法 (NMR) によって分析する方法を開発したスイス チューリッヒ工科大学のクルト・ヴェートリッヒ博士に同時に授与された。高分子タンパク質が分解することなく質量を測定可能とした MALDI-TOF MS は, 後にドイツ ミュンスター大学のフランツ・ヒレンカンプ博士ら¹⁸⁾がマトリックス (図2) としてニコチン酸の誘導体を使用し, 現在の細菌同定法となっている。

MS とは, 重量計量用の天秤では測定できない原子や分子等の極微小な重量を測定する方法である。MS の対象物は大きくてもタンパク質の分子レベルである。これら極微小な物質を計量するために, 物質に荷電粒子を付加し, イオン化してから測定を行う。MS は試料導入部, イオン源, 分析部, 検出部およびコンピューター解析部の順に構成されている。試料導入部は, 試料を液状化 (liquid chromatography : LC) あるいはガス状化 (gas chromatography : GC) しながら, 試料の特性 (疎水性, イオン性, 分子量等) の違いにより分離しながらイオン源へ移動する。イオン源は水素イオン等を付加あるいは除去し試料を帯電させる部位であり, 現在汎用されている原理に MALDI や ESI 等がある。次に分析部はイオン化したそれぞれの分子を真空の中に投げ, 質量 (m) と荷電 (z) の質量荷電比 (m/z : エム・オーバー・ジーと呼称) の違いで, 真空内を移動する時間の違いをもって分離する。MALDI であれば真空内をイオン化した分子が飛行する時間 (time of flight : TOF) を計測する。試料導入部—イオン源—分析部の組み合わせの違いで, LC-ESI MS, MALDI-TOF MS 等と表記して分析方法を区別する。通常, 分子の荷電 (z) は1価のイオン

表1. 菌群別のサンプル調整法

菌属, 菌群	サンプル調整法	
一般細菌全般	セルスマア法 or オンプレートギ酸抽出法 or エタノール・ギ酸抽出法	
	嫌気性菌	
	オンプレートギ酸抽出法 or エタノール・ギ酸抽出法	
<i>Mycobacterium</i>	95°C, 1時間熱処理 ↓ ガラスビーズ溶菌 ↓ エタノールギ酸抽出法	
	<i>Nocardia, Actinomyces</i>	95°C, 10分熱処理 ↓ ガラスビーズ溶菌 ↓ エタノールギ酸抽出法
		Yeast
糸状菌		
	サブローブロスで増菌, 遠心集菌 ↓ エタノールギ酸抽出法	

文献 19, 25, 26 から引用, 一部改変

である事が多く, 得られた m/z の数値そのものは質量 (m) となる。しかし, MALDI のような方法は時として2価や3価のイオンも産出することがあり, 1種類の分子が2~3種類の m/z で検出されることがある。検出部およびコンピューター解析部は TOF と信号強度の違いをそれぞれ横軸と縦軸の二次元上で信号化する。この表示をマススペクトルと呼ぶ。細菌同定は菌体成分 (主にリポゼームタンパク質) を菌種ごとにマススペクトルをとり, これをデータベースにし, 被検株のマススペクトルと比較して菌名を決定する方法である。なお, 後述する耐性因子検出のための抗菌薬のマススペクトルや, バイオマーカー探索, 未知タンパク質の同定等については, スペクトルひとつずつを細かく読み取る必要があるため, 上述したマススペクトルの発生の原理や分子のイオン化の特性についてはさらに詳しい知識を得る必要がある。

2. 細菌同定検査装置としての MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS は複数の機種が存在し性能も様々である。国内の臨床検査目的で販売されている質量分析装置は VITEK-MS (シスメックス・バイオメリユー株式会社) と MALDI バイオタイパー (ブルカー・

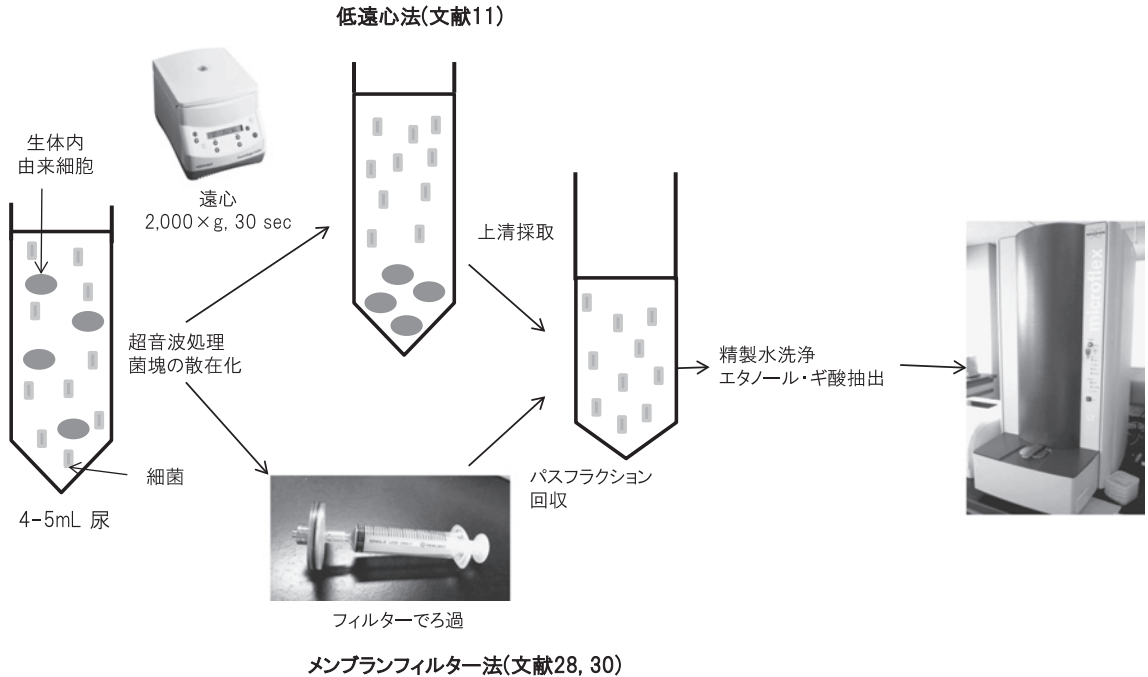


図3. MALDI-TOF MSを用いた尿中細菌の直接同定法
サンプル調整のためのフローチャート

ダルトニクス株式会社)である。これらの装置は、国内で販売されている既存の細菌同定・薬剤感受性自動分析装置、血液培養装置等の細菌学的検査装置一式と総合システムを以て連動できる。MALDI-TOF MSの同定性能は本学会総会やPubMed上でも多く報告されており、普通寒天培地、血液寒天培地等の一般培地に発育する細菌は高い確率で同定ができる事が証明されている。菌群ごとの同定性能はClarkら¹⁹⁾の総説を参照されたい。ただし、16S rRNAの相同性が高い*Streptococcus mitis* グループ(*Streptococcus pneumoniae*, *S. oralis* 等)が誤同定されるが²⁰⁾、データベースの再構築で鑑別可能とする報告²¹⁾もある。また、*Escherichia coli* と *Shigella*, あるいは *Salmonella enterica* の血清型群である Enteritidis, Paratyphi A, Typhi 等は通常の操作では鑑別ができない。これらは、属レベルあるいは菌群 (complex) レベルまでの同定であり、種レベルでの鑑別が困難な菌種はシステム上アラートが出現する仕組みがある。*S. Typhi* や *Shigella* は特定のバイオマーカーピーク解析によって non-Typhi 群や *E. coli* との識別が可能であるが²²⁾²³⁾、別途解析技術が必要である。現状は、法的手続きが必要な感染症原因細菌 (*Shigella*, *Salmonella Typhi*)

や *S. pneumoniae* のような臨床的意義が高い菌種のMALDI-TOF MSを用いた同定検査だけでは十分ではなく、生化学的性状試験や血清型別等を追加する必要がある。

次に、培養集落の測定までの調整方法について解説する(表1)。この操作が綺麗なマススペクトルを描かせ、結果的に高い精度で同定結果を得ることが出来る最も重要なステップである。MALDI-TOF MSではターゲットプレート上にサンプルを塗布し、乾燥後にマトリックスである α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(ニコチン酸の誘導体、図2, CHCA または HCCA と呼称)を重層する。サンプルの塗布は一般的に新鮮な培養集落をエーゼで釣菌し、そのままターゲットプレートに塗布する方法(セルスメア法あるいはダイレクトスメア法と呼称)が最も簡便な操作法である。しかし、粘度が高い集落、嫌気性菌、*Mycobacterium*, *Nocardia*, 真菌などはセルスメア法ではきれいなマススペクトルが得られず同定ができないことがある。この場合、集落をエタノールで処理(脂質類の除去)しギ酸(formic acid)による菌体内タンパク質の抽出を行う。さらに、*Mycobacterium*, *Nocardia* 等は溶菌促進や術者の感染防止上、菌体の活性の不活化を促

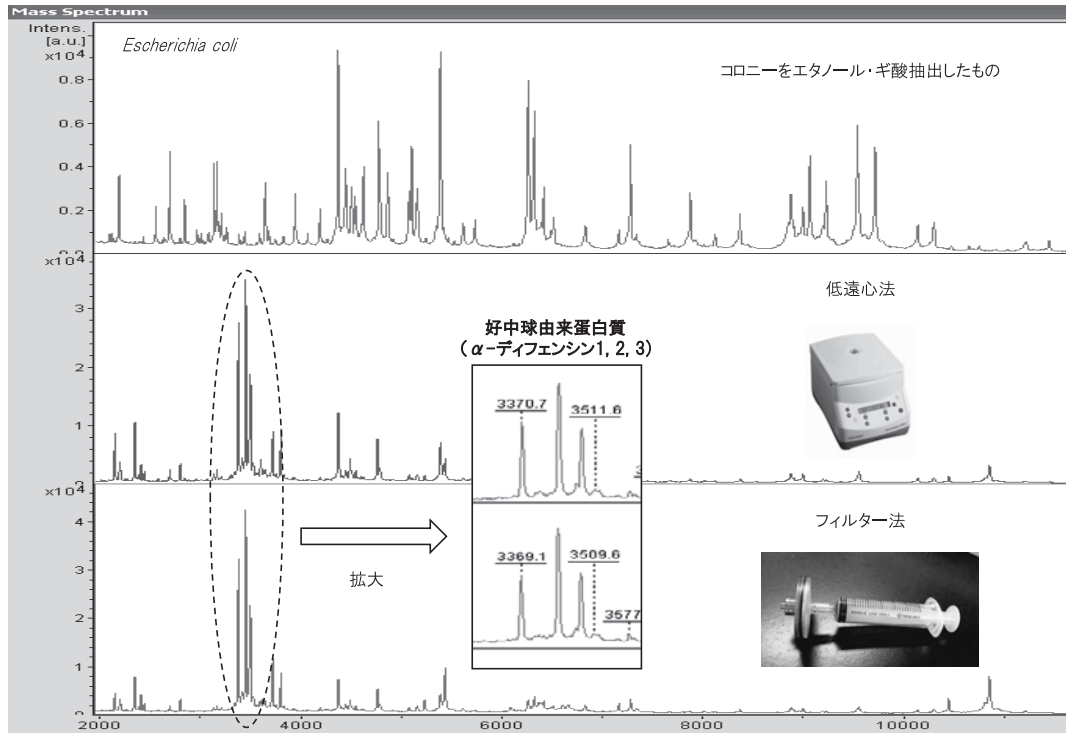


図4. 好中球由来蛋白質の大量混入による同定結果への影響

Escherichia coli (Sample No. THU13) を含む尿の前処理後(低速心法, メンブランフィルター法)および分離株のエタノール・ギ酸抽出後のマススペクトルの比較。3種類の α -ディフェンシンの強いスペクトルの影響で菌体タンパク質のイオン化が抑制されている。

すため、加熱処理を行い、次いで溶菌目的としてガラスビーズ処理を追加する。これらの菌群はデータベースが追加されていく中で、当初同定が困難であった菌種も同定精度の向上が認められている²⁴⁾²⁵⁾。糸状菌も菌体タンパク質の抽出法の問題によって同定が困難なケースが存在したが、抽出法の改良やデータベースの集積によって、同定精度の向上が見られている²⁶⁾。

3. MALDI-TOF MS を導入することによる効果

MALDI-TOF MS 導入による臨床的效果に関する研究が行われている。装置購入のための初期費用は高額であるものの、同定のためのランニングコストおよび操作時間短縮による人件費の低額化が見込まれ、従来法よりコスト削減が可能である。Tranら⁵⁾は米国ノースカロライナ・ヘルスケア大学の事例を用いて必要経費の削減について詳細に分析している。1年間に21,930株(1日平均60株、解析に一般細菌と抗酸菌を含み、嫌気性菌と糸状菌は含まない)の同定に要し

たコスト計算についてMALDI-TOF MSと従来法による比較を行なった。年間のコスト削減が試薬コストのみで\$69,108.61(約800万円; \$1.0=117円計算の場合)、検査技師の人件費、機器メンテナンス費を含めたトータルコストは従来法で\$142,532.69(約1,660万円)、MALDI-TOF MSで\$68,886.51(約800万円)と大きく差を認めた。MALDI-TOF MS機器購入の初期投資費用の減価償却は約3年で回収できたとした。

次に、感染症診断・治療上におけるMALDI-TOF MS導入の効果について、同定結果が従来法よりも1日以上短縮して臨床医に報告されるため、適切な抗菌薬選択までの時間およびstewardship team介入までの時間が短縮される。Huangら⁷⁾は501名の菌血症またはカンジダ血症の患者群を使用し、MALDI-TOF MSによる同定群(n=245)とVITEK2による同定群(n=256)の2群に分けて、MALDI-TOF MS導入効果について詳細に分析している。MALDI-TOF MS導入によって短縮あるいは減少した項目は、集落同定時間が84.0時間から55.9時間(p<0.001)、効果的な抗

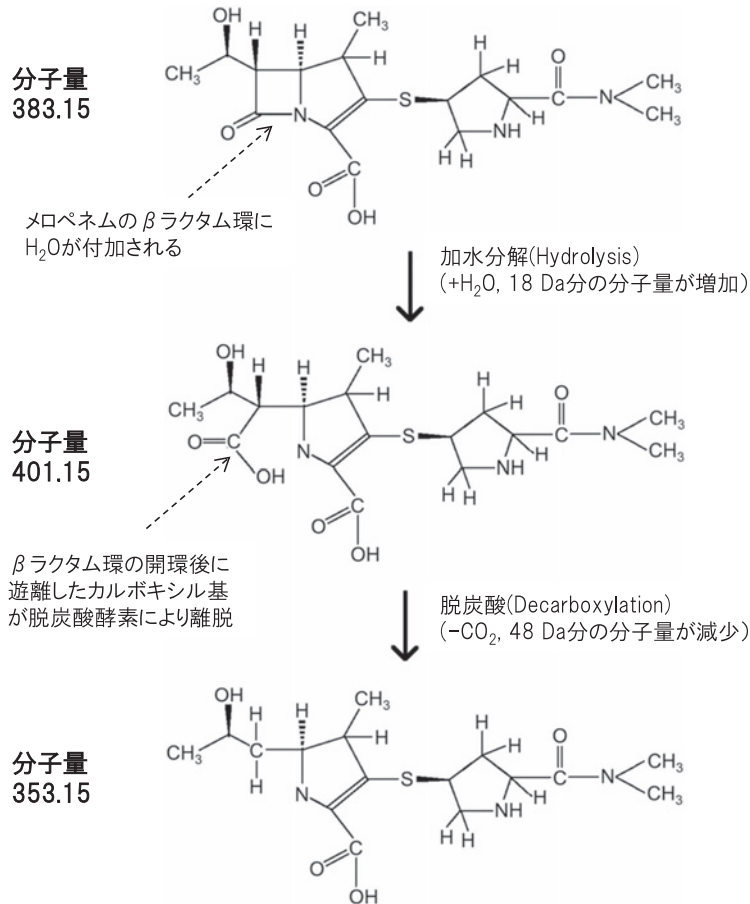


図5. カルバペネマーゼによるメロペネムの構造の変化 (文献 35 を改変)

菌薬治療 (effective therapy) への変更が 30.1 時間から 20.4 時間 ($p=0.021$), 最適な抗菌薬治療 (optimal therapy) への変更が 90.3 時間から 47.3 時間 ($p<0.001$), ICU 滞在期間が 14.9 日から 8.3 日 ($p=0.014$), 菌血症の再燃が 5.9% から 2.0% としている。

4. 臨床材料 (尿, 髄液) および血液培養ボトル中の細菌の同定

尿¹¹⁾および髄液¹²⁾中に存在する細菌を MALDI-TOF MS を用いて直接同定する例がいくつか報告されている。Ferreira ら¹¹⁾は尿を 2,000×g, 30 秒間の低速心により, 細菌分画と生体内細胞分画を比重の違いで分離し, 上清に残存した細菌分画を回収後, 夾雑蛋白質を洗浄によって除去し, エタノール・ギ酸抽出法で細菌のタンパク抽出を行い MALDI-TOF MS で同定した。10⁵ CFU/mL 以上を含む細菌尿 220 検体について

低速心法で前処理を実施し, MALDI-TOF MS で分析したところ, 種レベルの同定確率を示したのが 91.8% (202 検体), 属レベル以上では 92.7% (204 検体) であった。ただし, 本研究の母集団の 79% (173 検体) は *E. coli* の分離例であり, 他の菌種の実施は多くない。Ferreira の検討でグラム陽性球菌群 (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*) は 15 検体使用されていたが, そのうち同定できたのは 10 検体 (67%) に留まった。数例の報告を比較すると, 検出感度はおよそ 10⁴⁻⁶ CFU/mL である^{11)27)~29)}。著者ら²⁸⁾は孔径 5.0 μm のメンブランフィルターで生体内細胞を除去し, パスフラクション中に移動した細菌分画を MALDI-TOF MS で分析する方法を検討した。同時に, Ferreira の方法を検証したが, 著者らも Ferreira らの方法もグラム陽性球菌が混入している一部の尿において, 連鎖やクラスター形成の著しい細菌は, 比重やサイズが

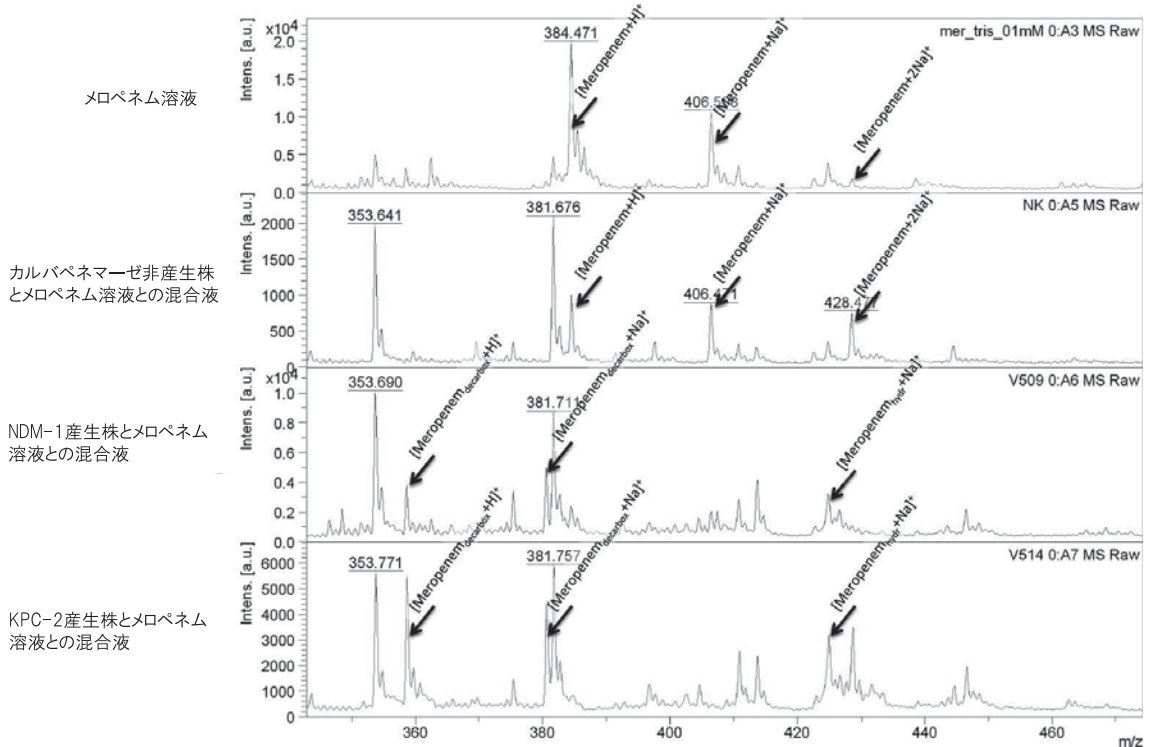


図 6. カルバペネマーゼ産生株とメロペネム溶液の反応後のマススペクトル (文献 35 を改変)

大きくなるため低速心法でもフィルター法でも細菌分画を回収できない現象を発見した。この現象を改善するため、著者ら³⁰⁾は前処理前に超音波発生装置を使用して尿中細菌のクラスターや連鎖形成を散在化させる処理を加え、同定精度上げる事に成功した (図 3)。その他、同定精度を下げる要因として、ヒト好中球由来タンパク質である α -ディフェンシン (3371, 3440, 3486 Da.) の混入がある (図 4)²⁹⁾³¹⁾。このタンパク質はイオン化しやすく、本来検出すべき細菌タンパク質のイオン化が抑制され同定ができないケースが認められる。この現象を解消するため、Sánchez-Juanes ら³²⁾は低速心法に加え SDS を加えた処理を実施することで、同定スコアが <2.0 を示した検体の 46.5% が同定確率の向上を認めたとしている。尿中細菌の検出に関しては感染症診断や治療や選定に関して極めて有用性が高いと考えるが、さらに同定精度を高めるためには、夾雑タンパク質を如何に取り除く前処理を開発するかが今後の課題となろう。

血液培養ボトル内の細菌の同定性能についてもより多くの報告がある。Christner ら³³⁾は MALDI-TOF MS で血液培養ボトル内の細菌を確実に同定するために必

要な菌量は 10^6 CFU/mL 以上必要としている。血液培養ボトル中の細菌を直接同定する方法は、血液培養抽出キットである MALDI セプシタイプ血液培養抽出キット (ブルカー・ダルトニクス株式会社) 等の前処理キットを併用すれば約 30 分以内に同定が可能となる。血液培養ボトル内の迅速同定は従来法と比較すれば 1 日以上早く菌名を得ることができることから、菌血症やカンジダ血症の診断と治療薬の決定が早期に可能となり、第 3 項で解説したように臨床的なインパクトは極めて高い⁷⁾¹⁹⁾³⁴⁾。

5. MALDI-TOF MS を用いた抗菌薬耐性の検出

MALDI-TOF MS を用いた抗菌薬耐性の検出は 2 通りの考え方がある³⁵⁾。1 つは β ラクターゼによる β ラクタム系抗菌薬の加水分解、rRNA メチラーゼのようにアミノグリコシド、クリンダマイシン等に側鎖を修飾する酵素の保有を、あらかじめ準備した抗菌薬溶液と分離株を混合し反応させ、抗菌薬構造の分子量の変化を MALDI-TOF MS で測定する方法である。特にカルバペネマーゼ産生菌について、メロペネムの加水分解産物を MALDI-TOF MS で検出する方法はす

でに海外の検査室で導入されている。方法は分離株とメロペネム溶液を2時間反応させ、すぐさまMALDI-TOF MSで分解産物を検出できるため、短時間にカルバペネマーゼの産生性を決定できる(図5, 6)。もう1つの検出方法は耐性因子あるいは関連バイオマーカーをMALDI-TOF MSで直接検出する方法である。集落のエタノール・ギ酸抽出物を使用し, sinapic acid (シナピン酸) や dihydroxybenzoic acid (DHB) 等の細菌同定用とは異なるマトリックスを使用してβラクタマーゼ(約29 kDa)を直接検出する試みや³⁶⁾, MSSAとMRSA¹³⁾, バンコマイシン感性和耐性腸球菌の区別³⁷⁾³⁸⁾を特異的なピークを捉えることで識別する方法が報告されている。

6. MALDI-TOF MSを用いた他の応用例

MALDI-TOF MSで菌種を同定すると数百のピークが出現する。これらのピークをクラスタリング解析する事でパルスフィールド電気泳動(PFGE)のような疫学解析を実施できるツールがある。性能は未だ明らかにされていないが、PFGEレベルの識別能力あるいはそれより劣るがMRSA分離株の相同性を簡便に確認する一次スクリーニングとしての利用価値がある³⁹⁾⁴⁰⁾。さらに、ClinProTools(ブルカー・ダルトニクス株式会社)などのソフトウェアで解析することで、ある耐性因子保有株と非保有株、あるいはある毒素因子保有株と非保有株を識別できる特異ピーク(バイオマーカー)を見いだす方法がある⁴¹⁾⁴²⁾。Nakamuraら⁴²⁾は世界流行株である*E. coli* ST131と他のSTタイプを識別可能な特異ピーク(YahO)をClinProToolsで発見している。またChristnerら¹⁵⁾は2011年に北ドイツで流行した*E. coli* O104:H4(STEC株)と非流行STEC株を識別可能な特異ピーク(YdgAとunknown protein)を見出している。いずれの報告も、MS機能を有する機器を2台接続したタンデム質量分析計(MALDI-TOF/TOFやLC-MS/MS)を組み合わせ、検出した特異ピークのアミノ酸シークエンスも同定している。今後、このような特異ピークが多く発見されれば、MALDI-TOF MSを用いて抗菌薬耐性菌や毒素産生菌の迅速同定が可能となるかもしれない。

おわりに

MALDI-TOF MSを用いた細菌同定法がわが国で導入されてより数年が経過しており、大学病院をはじめとして徐々に臨床微生物検査室へ導入されている。本検査法は従来法で要していた検査所要時間を日単位で短縮可能な方法であり、既存の微生物学的検査フロー

が大きく見直され進展するのは間違いない。これに伴い感染症診断や治療に関する情報提供やantimicrobial stewardship teamの介入もより迅速となる。また、集落の迅速同定だけではなく、臨床材料から直接同定する方法、抗菌薬耐性因子や毒素因子、また疫学解析にまで応用できる可能性が秘められている。今後、検査を実施する当事者たちがプロテオミクス解析の技術と知識をさらに習得すれば、MALDI-TOF MSを操作する日常検査の質がより向上するのは勿論の事、臨床微生物学の発展にも大きく寄与できると確信している。

文 献

- 1) Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, et al. 1988. Protein and polymer analysis up to m/z 100000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2: 151-153.
- 2) Wieser, A., L. Schneider, J. Jung, et al. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 965-974.
- 3) Seng, P., J.M. Rolain, P.E. Fournier, et al. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 5: 1733-1754.
- 4) Mellmann, A., J. Cloud, T. Maier, et al. 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 46: 1946-1954.
- 5) Tran, A., K. Alby, A. Kerr, et al. 2015. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 53: 2473-2479.
- 6) Tan, K.E., B.C. Ellis, R. Lee, et al. 2012. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol* 50: 3301-3308.
- 7) Huang, A.M., D. Newton, A. Kunapuli, et al. 2013. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and can-

- didemia. Clin Infect Dis 57: 1237-1245.
- 8) Wenzler, E., D.A. Goff, J.E. Mangino, et al. 2016. Impact of rapid identification of *Acinetobacter baumannii* via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry combined with antimicrobial stewardship in patients with pneumonia and/or bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis 84: 63-68.
 - 9) Nagel, J.L., A.M. Huang, A. Kunapuli, et al. 2014. Impact of antimicrobial stewardship intervention on coagulase-negative *Staphylococcus* blood cultures in conjunction with rapid diagnostic testing. J Clin Microbiol 52: 2849-2854.
 - 10) Stevenson, L.G., S.K. Drake, P.R. Murray. 2010. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 48: 444-447.
 - 11) Ferreira, L., F. Sánchez-Juanes, M. González-Avila, et al. 2010. 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.
 - 12) Segawa, S., S. Sawai, S. Murata, et al. 2014. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. Clin Chim Acta 435: 59-61.
 - 13) Edwards-Jones, V., M.A. Claydon, D.J. Evason, et al. 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. J Med Microbiol 49: 295-300.
 - 14) Schaumann, R., N. Knoop, G.H. Genzel, et al. 2012. A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. Med Sci Monit 18: MT71-77.
 - 15) Christner, M., M. Trusch, H. Rohde, et al. 2014. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of shiga-toxigenic *Escherichia coli*. PLoS One 9 (7): e101924.
 - 16) 高山光男, 和田芳直. 2013. 質量分析学の発展史. p. 11-22, 現代質量分析学 (高山光男編), 化学同人, 京都.
 - 17) 荒川隆一, 高山光男. 2013. イオン化法②ソフトイオン化法. p. 39-62, 現代質量分析学 (高山光男編), 化学同人, 京都.
 - 18) Hillenkamp, F., M. Karas, R.C. Beavis, et al. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. Anal Chem 63: 1193A-1203A.
 - 19) Clark, A.E., E.J. Kaleta, A. Arora, et al. 2013. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 26: 547-603.
 - 20) Kaleta, E.J., A.E. Clark, A. Cherkaoui, et al. 2011. Comparative analysis of PCR-electrospray ionization/mass spectrometry (MS) and MALDI-TOF/MS for the identification of bacteria and yeast from positive blood culture bottles. Clin Chem 57: 1057-1067.
 - 21) Werno, A.M., M. Christner, T.P. Anderson, et al. 2012. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 50: 2863-2867.
 - 22) Kuhns, M., A.E. Zautner, W. Rabsch, et al. 2012. Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One 7 (6): e40004.
 - 23) Paauw, A., D. Jonker, G. Roeselers, et al. 2015. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Med Microbiol 305: 446-452.
 - 24) Rodríguez-Sánchez, B., M.J. Ruiz-Serrano, A. Ruiz, et al. 2016. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria library v3.0 for the identification of non-tuberculous Mycobacteria. J Clin Microbiol. accepted manuscript.
 - 25) Toyokawa, M., K. Kimura, I. Nishi, et al. 2013. Reliable and reproducible method for rapid identification of *Nocardia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi 24: 1-8.
 - 26) Lau, A.F., S.K. Drake, L.B. Calhoun, et al. 2013. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 51: 828-834.
 - 27) Kim, Y., K.G. Park, K. Lee, et al. 2015. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the Vitek MS system based on matrix-assisted

- laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann Lab Med* 35: 416-422.
- 28) Komatsu, M., A. Kondo, S. Matsuo. 2013. Rapid and simple method for direct identification of bacteria in urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany.
- 29) Veron, L., S. Mailler, V. Girard, et al. 2015. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34: 1787-1795.
- 30) 小松 方, 中村彰宏, 阿部教行, 他. 2014. MALDI バイオタイパーを用いた尿路感染症原因細菌の迅速同定法の改良. 第 25 回日本臨床微生物学会総会, 名古屋市.
- 31) Köhling, H.L., A.A. Bittner, K.D. Müller, et al. 2012. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol* 61: 339-344.
- 32) Sánchez-Juanes, F., M. Siller Ruiz, F. Moreno Obregón, et al. 2014. Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 52: 335-338.
- 33) Christner, M., H. Rohde, M. Wolters, et al. 2010. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 48: 1584-1591.
- 34) Morgenthaler, N.G., M. Kostrzewa. 2015. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *Int J Microbiol* 827416.
- 35) Hrabák, J., E. Chudácková, R. Walková. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 26: 103-114.
- 36) Camara, J.E., F.A. Hays. 2007. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 389: 1633-1638.
- 37) Griffin, P.M., G.R. Price, J.M. Schooneveldt, et al. 2012. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol* 50: 2918-2931.
- 38) Nakano, S., Y. Matsumura, K. Kato, et al. 2014. Differentiation of *vanA*-positive *Enterococcus faecium* from *vanA*-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents* 44: 256-259.
- 39) Ueda, O., S. Tanaka, Z. Nagasawa, et al. 2015. Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Hosp Infect* 90: 147-155.
- 40) Østergaard, C., S.G. Hansen, J.K. Møller. 2015. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol* 305: 838-847.
- 41) Matsumura, Y., M. Yamamoto, M. Nagao, et al. 2014. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 52: 1034-1040.
- 42) Nakamura, A., M. Komatsu, A. Kondo, et al. 2015. Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry: discovery of a peculiar amino acid substitution in B2-ST131 clonal group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 83: 237-244.

A new trend in clinical microbial studies using MALDI-TOF MS From principle to application

Masaru Komatsu

Department of Clinical Laboratory Science, Faculty of Health Care, Tenri Health Care University

Almost 10 years have passed since the method of identifying bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) first appeared in the field of clinical microbiology. In Japan, more and more institutions are using this method every year, and the turn-around time of microbial studies in general is being reviewed. MALDI-TOF MS is drawing attention as a rapid method of identification because if there are isolated colonies, about 10 minutes are needed to complete the measurement using simple procedures. Furthermore, developments in the method of preprocessing colonies and enhancements of the database have contributed to the improved accuracy of identification of anaerobic bacteria, *Mycobacterium*, *Nocardia* and fungi. Bacteria that exist in fluid specimens such as spinal fluid, urine or blood culture fluid can be directly identified by using a 30 to 60-minute preprocessing method to remove contaminating proteins. A new β -lactamase examination method has been invented in which after mixing a solution of antibacterial agent with the bacterial culture, variations in molecular weight that are associated with the structural mutation of a β -lactam agent via hydrolysis are detected by MALDI-TOF MS. Also, multivariate analysis conducted with software of the mass spectra of clinically important resistant bacteria or toxin-producing strains such as extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and verotoxin-producing *Escherichia coli* has received attention as an applicable method for the discovery and epidemiological analysis of biomarkers unique to bacteria.