

Application
News

No. B91

MALDI-TOF 質量分析法

MALDI-TOF MSと統計解析ソフト
eMSTAT Solution™を用いたA群溶血性
レンサ球菌の*emm1*型株識別

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) を用いた微生物同定法は、従来法と比べて迅速・簡便な微生物同定検査法として普及しつつあります。MALDI-TOF MS の同定検査法としての地位は既に確立しているため、更なる展開として、同定以外の微生物検査にも MALDI を応用しようとする取り組みも盛んに行われています。

近年、A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) を原因とする侵襲性感染症が増加傾向にあります。その中でも *emm1* 型菌は病原性が高く、その侵襲性感染症は劇症型を呈する例が有意に多く、死亡率や後遺症残存率が高いといわれています。ここでは、MALDI-TOF MS と統計解析ソフト eMSTAT Solution を使って、病原性の高い *emm1* 型とその他の型の識別を行った例を紹介いたします。

K. Shima

■ 材料と方法

まず、侵襲性感染症由来 GAS 株の中で分離頻度が高い *emm1* 型株と *emm12* 型株、*emm28* 型株、*emm89* 型株の各 10 株を用いて、*emm* 型を識別可能なマーカーの探索を行いました。

上記 4 種の *emm* 型の菌株を血液寒天培地で 24 時間培養後、エタノール・ギ酸抽出を行い、シナピン酸をマトリックスとして用いて、AXIMA 微生物同定システムによる分析を行いました。マーカーの再現性を担保するため、サンプルを再度培養したコロニーから調製するなどして、各株毎に合計 9 回の測定を行いました。各マススペクトルから得られたピークリストを eMSTAT Solution ソフトウェアを用いて多変量解析を行うことにより、*emm* 型の識別を試みました。さらに、B、C、G 群溶血性レンサ球菌を含む、咽頭炎・扁桃炎由来の 379 株を用いてブラインドテストを行いました。

■ 結果

A 群溶血性レンサ球菌 *emm1* 型とその他の型のマススペクトル例を図 1 に示します。マススペクトルのパターンは互いに似通っており、一見すると識別は困難と思われましたが、eMSTAT Solution による多変量解析 (アルゴリズム: PLS-DA) を行ったところ、*emm1* 型とその他の型の 2 グループに分けることができました (図 2)。

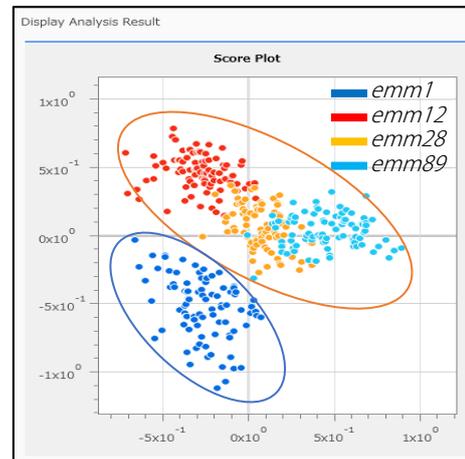


図 2 A 群溶血性レンサ球菌の多変量解析結果 (スコアプロット)

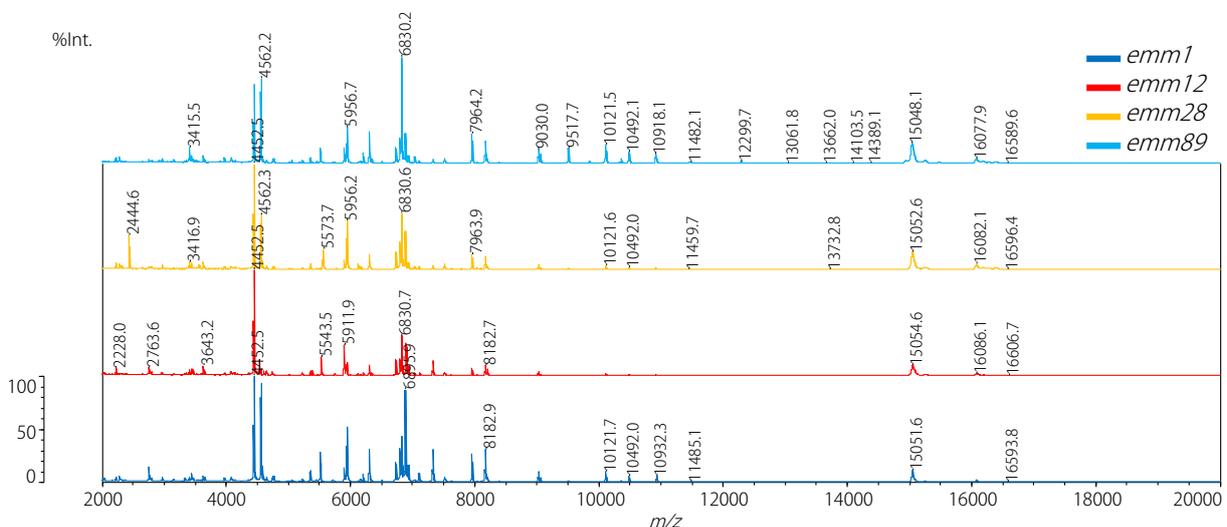


図 1 A 群溶血性レンサ球菌 *emm1* 型とその他の型のマススペクトル比較

さらに、*emm1*型とその他の型の識別に寄与するマーカーピークの探索を eMSTAT Solution を用いて行いました。探索の結果、Peak Matrix の表から、*m/z*10932 のピークが *emm1*型の 90 サンプルすべてで検出されており、その一方、他の型では全サンプルで未検出であることを確認することができました (図 3)。該当するマススペクトルの質量範囲を確認したところ、確かに、*m/z*10932 のピークが *emm1*型のみ検出されていることが確認できます (図 4)。

次に、*m/z*10932 のピークを指標に臨床分離株 379 株 (表 1) のブラインドテストを行いました。従来法の遺伝子解析にて *emm1*型が 379 株中 97 株と判定されたのに対し、本手法ではその 97 株中 92 株 (94.8%) が *emm1*型と判定され、高い陽性一致率を示しました。また、本手法では、*emm1*型株が非 *emm1*型株と判定されたのは 3 株 (*emm11*型株 (n=1) と *emm28*型株 (n=2)) で、陰性一致率は 98.9% でした (表 2)。

Peak Matrix 1519 peaks						
<input checked="" type="checkbox"/>	<i>m/z</i>	ANOVA	<i>emm1.0</i>	<i>emm12.0</i>	<i>emm28.0</i>	<i>emm89.0</i>
<input checked="" type="checkbox"/>	10529.53	0.45215	0	1	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10580.12	0.022573	0	0	0	4
<input checked="" type="checkbox"/>	10689.77	0.13804	5	1	9	2
<input checked="" type="checkbox"/>	10697.97	1.1797E-16	64	80	55	84
<input checked="" type="checkbox"/>	10706.51	0.32824	3	2	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10717.11	0.76438	2	1	2	3
<input checked="" type="checkbox"/>	10725.56	0.27327	0	0	1	2
<input checked="" type="checkbox"/>	10734.97	0.26564	0	2	0	4
<input checked="" type="checkbox"/>	10918.12	4.173E-74	0	88	90	89
<input checked="" type="checkbox"/>	10931.66	8.8298E-56	90	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10951.27	0.45215	0	1	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	10963.42	0.0097304	0	0	0	7
<input checked="" type="checkbox"/>	10970.66	0.45215	1	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	11000.27	0.0046591	6	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	11007.57	0.45215	1	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	11025.18	0.13935	0	3	0	0

図 3 Peak Matrix 機能によるマーカーピークの特定

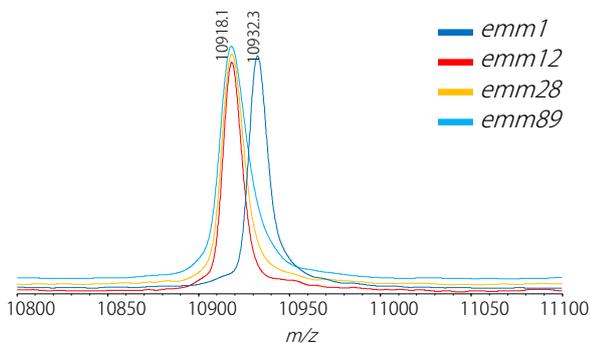


図 4 A 群溶血性レンサ球菌 *emm1*型とその他の型のマススペクトル拡大図

まとめ

従来の *emm* 型別法では、培養と GAS の単離、PCR による *emm* 遺伝子の増幅、シーケンス解析と結果を得るまでに 3 日間を要しました。一方、本手法を用いると、培養後十数分で結果を得ることが可能です。本手法は、病原性の高い *emm1*型を短時間で識別できる新しい手法として、今後の展開が期待されます。

表 1 ブラインドテストに用いた臨床分離株

<i>emm1</i>	97
<i>emm2</i>	2
<i>emm3</i>	4
<i>emm4</i>	31
<i>emm6</i>	2
<i>emm9</i>	7
<i>emm11</i>	11
<i>emm12</i>	92
<i>emm28</i>	59
<i>emm75</i>	6
<i>emm77</i>	1
<i>emm89</i>	58
<i>emm112</i>	3
Other	6
Total	379

表 2 ブラインドテストの結果

<i>emm1</i> 型		従来法 (遺伝子解析)		Total
		(+)	(-)	
質量分析	(+)	92 (94.9%)	3 (1.1%)	95
	(-)	5 (5.2%)	279 (98.9%)	284
Total		97	282	379

<参考文献>

佐久間 恵、諸角 美由紀、生方 公子、岩田 敏、2018. MALDI-TOF MS を用いた A 群溶血性レンサ球菌の *emm1* 型株識別能の検討. 第 67 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第 65 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会

<謝辞>

本アプリケーションニュースは慶應義塾大学医学部感染症学教室との共同研究によって得られた成果をもとに作成しています。

eMSTAT Solution は、株式会社 島津製作所の商標です。

本製品は研究用途にのみ使用可能です。医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年1月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。