SHIMADZU APPLICATION NEWS
島津アプリケーションニュース
LAAN-A-TM034
●MALDI-TOF質量分析法
MALDI-TOF Mass Spectrometry
No.B47

MALDI-TOF MSによる微生物同定の適用可能条件検証 -AXIMA微生物同定システムにおける種々条件の検討-

Verification of Performance of AXIMA Microorganism Identification System

従来法とは全く異なる原理に基づいた，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が，迅速･簡便な細菌同定検査法として近年注目を集めています。MALDI-TOF MSによる微生物同定法は，微生物のタンパク質成分を検出することにより同定を行う手法のため，培養条件など種々の条件が同定結果に影響を及ぼすことが予想され，その適用可能条件についての知見が求められています。

ここでは，当社のMALDI-TOF MSラインナップであるAXIMAと微生物同定のためのデータベース検索用ソフトを組み合わせたシステムとして開発･リリースを行った“AXIMA微生物同定システム”を用いた場合の適用可能条件を検証した結果をご紹介します。

K. Shima

注:AXIMA微生物同定システムの使用は研究用途に限ります。臨床診断目的の使用は行えません。

Fig. 1にAXIMA微生物同定システムによる微生物同定のながれを示します。1）微生物試料の採取を行います。10^5 cells/サンプルウェル程度のごく微量の試料量から分析が可能です。2）採取した菌体をMALDI-TOF MSのサンプルプレートウェルに塗布します。塗布した菌体をMALDIのイオン化補助剤であるマトリックスと混合し，試料が乾燥すれば試料調製は完了です。3）調製した菌体試料を，MALDI-TOF MSを用いた微生物同定システム,“AXIMA微生物同定システム”で解析することにより，試料の微生物種同定や分類が行えます。同定は，AXIMA微生物同定システムのスペクトルデータベースSuperSpectra™に登録されている微生物種毎のマススペクトルデータと，微生物サンプルのMALDI-TOF MS測定データを照合することにより行います。MALDI-TOF MSによる測定から同定まで，1サンプルあたりおおよそ2分もあれば結果が得られます。

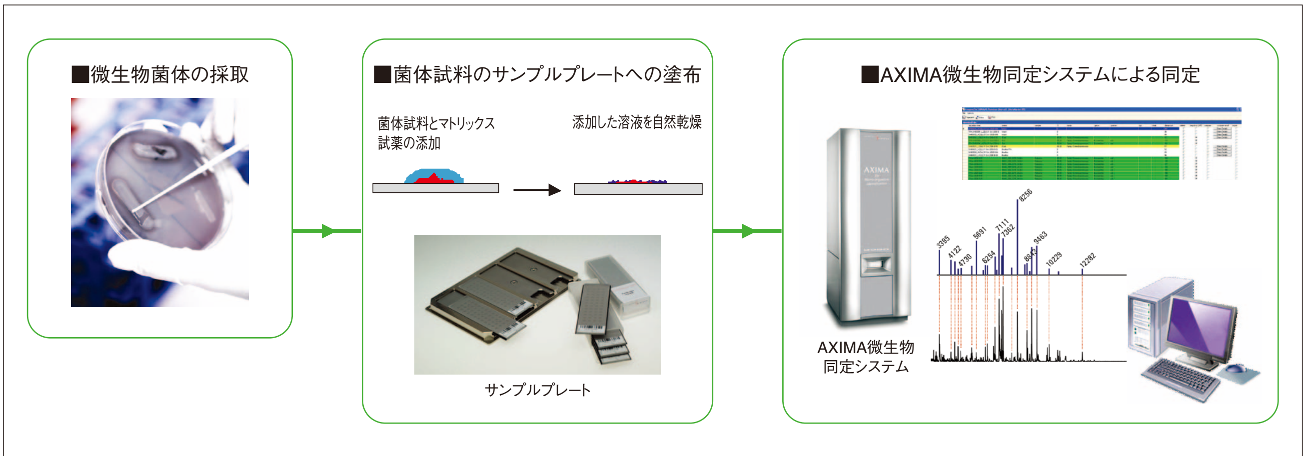

Fig. 1　AXIMA 微生物同定システムによる微生物同定のながれ
Schematic Overview of the Analysis of MALDI-TOF Mass Spectra of Intact Cells of Microorganisms Using AXIMA Microorganism Identification System

検証に用いた菌株の一覧をTable 1に示します。今回，腸内細菌科を中心に，主な菌種を11株選択しました。識別能力を検証するため，互いに似通った菌株もいくつか選びだしました。

培養条件など種々の条件を変更し，AXIMA微生物同定システムが適用可能な条件範囲を検討した結果をTable 2に示します。MALDI-TOF MSによる微生物同定法は，微生物のタンパク質成分を検出することにより同定を行う手法のため，タンパク質の発現量変化を伴う条件の変化は同定結果に大きな影響を及ぼす可能性が指摘されていましたが，今回の検討では，従来考えられていたより幅広い条件下で同定可能という結果が得られ，誤同定もありませんでした。特に，培地の種類や培養時間の変化に対する許容性の高さと，二種類の菌が混合している試料でもいくつかの株で同定可能であったという結果は，実際の微生物試料を分析する際の適用性を示す結果であり，注目すべき点であるといえます。AXIMA微生物同定システムは，1）複数の条件下においても安定して検出されるピーク群を抽出することにより構成されているSuperSpectra™スペクトルデータベース，2）培養条件など種々の条件により大きくばらつくピーク強度の情報をあえて同定に用いずピーク質量のみを同定に用いる，という二つの特長を有しており，今回の結果は，これらの独自の特長によるものと考えられます。

以上の結果から，AXIMA微生物同定システムは，MALDI-TOF MSによる微生物同定法に対して従来考えられていた適用範囲より幅広い条件での微生物の同定が可能であることが示されました。従来法とは全く異なる原理によって微生物同定を行う本システムは，微生物の同定･分類が必要なあらゆる分野において強力なツールとなることが期待されます。

Table 1　検証に用いた菌株
Strains Used for Experiments

Species	Strain
Escherichia coli	DSM 1576
Klebsiella oxytoca	DSM 5175
Klebsiella pneumoniae	DSM 16358 T
Enterobacter aerogenes	DSM 30053 T
Proteus mirabilis	DSM 4479 T
Proteus vulgaris	DSM 13387 T
Pseudomonas aeruginosa	DSM 50071
Streptococcus agalactiae	DSM 2134 T
Enterococcus faecalis	DSM 20478
Staphylococcus aureus	DSM 20652
Candida albicans	DSM 70014

Table 2　適用可能範囲の検証
Verification of Working Range

パラメーター	供試菌株数	条件						
細胞数	all		10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	
マトリックスの添加量（相対値）	5		0.2x	0.6x	1.0x	1.4x	2.0x	
サンプル調製後の保存期間（20℃）	5			0d	1d	3d	7d	
培養時間	all		16h	24h	48h	72h	120h	
培養条件	all	好気性		微好気性		嫌気性		
培養温度	all	20 ℃	30 ℃	37 ℃	42 ℃	37 ℃+3日（4 ℃）		
培地	all		株ごとに3（2）種類の異なる培地					
混合試料（混合比）	4	1:10	1:4	1:2	1:1	2:1	4:1	10:1

全ての株において高い信頼度（スコア90以上）で同定
いくつかの株において高い信頼度（スコア90以上）で同定

［謝辞］
本アプリケーションニュースはMedizinische Laboratorien DusseldorfとAnagnosTec社との共同研究によって得られた結果をもとに作成しています。

初 版 発 行：2011年7月

島津製作所　分析計測事業部　応用技術部

島津コールセンター　0120-131691　TEL:075-813-1691

3100-07101-570-IK
2011.7