

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 (MALDI-TOF MS) による抗酸菌の同定

— 臨床分離抗酸菌株と基準菌株を用いて —

¹新妻 一直 ¹斎藤美和子 ²小柴 静子 ³金子美千代

要旨：〔目的・方法〕MALDI-TOF MS法は、迅速かつ低コスト化など臨床微生物検査への重要な役割を果たしつつある。測定した質量スペクトルは、そのピークパターンがどの菌種のマススペクトルパターンと一致しているかが同定のポイントとなる。われわれは、MALDI-TOF MS法を用いて抗酸菌の不活化までの操作が多く感染リスクの高い初期検査手法から現行検査手法に前処理を改良かつ時間短縮し、臨床分離抗酸菌株と基準菌株を検査した。〔結果・考察〕臨床分離 *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) 158株では、拡散増幅法などの従来法と比較してマッチングパターンにおける菌種レベルでの同定一致率は94.9%、属レベルを含めると99.4%であった。非結核性抗酸菌 (NTM) 37株に関しては、属レベルでの同定一致率が94.6%であった。基準菌株のなかで *M. bovis* BCG (東京) 株がマッチングパターンでMTCと判定され、*M. tuberculosis* とDNA 相同性が高い類縁菌種であることがわかった。NTMの *M. goodii* (JATA33-01) 株を除いた基準菌株と臨床分離株スペクトルのピークパターンをみると、それぞれの菌種の特徴的なピークパターンと一致していた。しかし、臨床分離 *M. goodii* 株6株と基準菌株のピークパターンとの比較では、類似性のある質量電荷比は少なく多型性を示唆しうるマススペクトルであった。検査手法の工夫改良によってScore Value (SV) に差がみられず再現性は良好であったが、培養後の保存日数によるSVの低下 (0.3程度) が認められた。今後、普及とデータベースの充実を積み重ねることにより、臨床分離株での遺伝子型別解析の可能性、蓄積されたデータによる地域特異性などの関連性が役割として期待される。

キーワード：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 (MALDI-TOF MS)、臨床分離抗酸菌、基準菌株、データベース

1. はじめに

マイコバクテリア属は、結核菌、NTM (nontuberculous mycobacteria) やらい菌など150種で構成されている¹⁾。ヒトに対して一般的に病原性を呈するのは30種類程度で、肺感染症、皮膚・軟部組織感染症および播種性感染症などを起こすとされる。

抗酸菌感染、特に結核菌は、排菌している活動性結核患者の咳嗽やくしゃみにより、飛散する飛沫核に含まれる結核菌を吸入して成立することから、医療関連施設における感染対策の対象として重要な病原菌として知られ

ている。

結核感染症の診断には、臨床症状、画像検査、ツベルクリン反応、血清学的検査、塗抹・培養検査を含む細菌学的検査、遺伝子増幅検査などがある。塗抹検査は、培養検査に比べて感度は低いが、検体中の抗酸菌の有無を迅速に確認することができ、排菌量の把握、治療経過の評価、退院時期の判断に有用で必須の検査である。しかし、結核菌検査陽性率、同定される菌種の分離頻度は医療施設により異なり、特に *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) とNTMの迅速な鑑別は、排菌患者の管理と施設での感染対策上非常に大切である。また、NTMの菌

¹福島県立医科大学会津医療センター感染症・呼吸器内科、²福島県立南会津病院検査科、³いわき市立総合磐城共立病院検査室細菌検査室

連絡先：新妻一直，福島県立医科大学会津医療センター感染症・呼吸器内科，〒969-3492 福島県会津若松市河東町谷沢字前田21-2 (E-mail: kazuniizuma@yahoo.co.jp)
(Received 8 Nov. 2013/Accepted 27 Jan. 2014)

種同定もNTM症としての薬剤選択からその必要性も要求されてきている。

当センターへの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) の導入は、細菌や酵母を同定するうえで、迅速かつランニングコストの低下など臨床検査への重要な役割を果たしつつある¹⁾²⁾。

われわれは臨床分離抗酸菌株を用いて、MALDI Biotyper (Ver. 3.1; Bruker Daltonics社[®]製造、シーメンス社[®]販売) 上のデータベースを検証し、従来法と比しての識別同定一致率、基準菌株との比較、加えて抗酸菌同定検査の手法、培地、培養後保存日数による Score Value (SV) 評価の検討を行ったのでその結果について報告する。

2. 対象と方法

(1) 対象

2001年以降、県保健福祉部からの依頼により当医療機関にて保存されたMTC 158株、NTM 22株、いわき市立総合磐城共立病院からの分与NTM 15株を液体培地 (MGIT[®]) に増殖させて用いた。一部は固形培地 (3%小川培地) からの株を用いた。各々の臨床分離株の菌種同定には、従来法〔核酸増幅法、キャピリアTB[®]法、DDH マイコバクテリア[®] (DDH) 法、16S rRNA法〕を用いて確定した株を用いた。

また、対照の基準菌株として結核予防研究所から分与された結核菌 (KK11-291 H37Rv) 株、ワクチン株の *M. bovis* BCG (東京) 株、NTMの基準菌株として *M. avium* (JATA51-01) 株、*M. intracellulare* (JATA52-01) 株、*M. kansasii* (KK21-01) 株、*M. goodii* (JATA33-01) 株の計6株を用いた。

(2) 方法

臨床分離抗酸菌株と基準菌株を検体の前処理したのちMALDI-TOF MS検査で抗酸菌を同定し、従来法との一致率をみた。この前処理をシーメンス社[®]からのマイコバクテリア (ジルコニア・シリカビーズを用いた) 抽出法を初期検査手法 (初期手法) とし、初期検査法と Saleebらの抽出法³⁾を参考として菌の不活化前後の操作を改良・工夫し時間短縮させた方法を現行検査手技 (現行手法) とした。初期手法で実施したMTC 10株 (培養後3日以内の5株、培養後6週保存した5株) と現行手法MTC 10株 (初期手法と同じ株) を用いて現行手法へ移行のSV評価、培養後保存日数 (4週と6週) によるSV評価、基準菌株、特にNTMの臨床分離株とのピークパターンの比較、培地の違いによるSV評価を検討した。

前処理の初期手法とは以下の①→⑪で示した手法で順に施行した。

①液体培地 (MGIT[®]) に発育した抗酸菌を滅菌トランスファーピペットにて1000 μ l採取しtubeに入れる。固形培地 (小川培地[®]) からは滅菌プラスチック製エーゼで5 μ lを採取し超蒸留水1000 μ lを入れたtubeにて混濁する。②vortex後遠心 (15000 rpm (13000×G) ×2分) をし、上澄を除去する。③tube内のpelletに超蒸留水500 μ lを入れ、vortex後遠心をして上澄を除去する。④③を2回反復する。⑤pelletを300 μ lの超蒸留水を入れたtube内で懸濁 (20回程度ピペッティング) し、900 μ l超純粋エタノールを加え、vortex後10分間放置し、その後遠心をしてから上澄を除去する。⑥tube内のpelletに超蒸留水500 μ lを入れ、vortex後遠心をして上澄を除去する。⑦pelletに超蒸留水50 μ lを加えて再懸濁してoverhead付きdry heat blockで110℃30分加熱させる。⑧取り出したtubeに1200 μ l氷冷超純粋エタノールを加え、vortex後遠心をして、上澄のアルコールを完全に除去する。⑨tube内のpelletを室温で乾燥させ、ジルコニア・シリカビーズを10~20 μ lと (100%) アセトニトリル10~20 μ lを加えて5分間vortexする。⑩最後に70%蟻酸10~20 μ lを加えてvortexし、その後遠心する。⑪その上澄1 μ lをtarget plateにのせ乾燥後、Matrix [α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (α -CHCA) にOS (アセトニトリル50%, 超純水47.5%, トリフルオロ酢酸2.5%) 250 μ lを加えて調整] 1 μ lを加えて、乾燥させてから質量分析 [MALDI Biotyper 3.1 (Mycobacteria Library 1.0 [bead method], BDAL)] をする。

われわれは現在の検査手法として、初期手法では質量分析するまでの工程に180分以上を要し、結核菌を不活化するまでの操作がその大部分を占めているため、感染リスクを考慮して下記のように改良した現行手法をパターンマッチングの程度をSVにて確認したうえで、用いている。

上記①→②→③までは同様に実施後、④→⑥を省く。そのあと、⑦を軽度工夫し、pelletを200 μ lの超蒸留水を入れたtube内で懸濁 (20回程度ピペッティング) し、5000 rpm程度のflash遠心後、overhead付きdry heat blockで110℃30分加熱させる。⑧を改良し、取り出したtubeに800 μ l超純粋エタノールを加え、vortex後10分間放置する。その後遠心し、上澄を除去するが、上澄の残存がみられるため再度遠心し、残存上澄を完全に除去する。その後上記⑨→⑩→⑪と施行する。煩雑な前処理操作を短縮し、90分ほどで実施している。

3. 結果

〔検査手法〕

改良した現行手法の検証 (Fig. 1) は、MTC 10株 (培養後3日以内の5株、培養後6週保存の5株) を用いて

行った。初期手法と比してパターンマッチングの程度 (SV) に差は認められなかった。

〔識別同定一致率〕

臨床分離抗酸菌の識別同定確率の検討 (Table) において、MTC 158 株では、マッチングパターンの SV 2.0 以上が 150 株で菌種レベルでの同定一致率は 94.9%、SV 1.8~2.0 未満の 7 株を含めると 99.4% であった。残りの 1 株は、SV 1.7 未満の同定不能であった。ただ、MTC の中でマッチングパターンのベスト SV (ランク 1) 2.0 以上で、*M. bovis* と 2 株が同定された。NTM 37 株 (*M. avium* 21 株、*M. intracellulare* 6 株、*M. kansasii* 1 株、*M. gordonae* 6 株、*M. fortuitum* 1 株、*M. chelonae* 1 株、*M. heckeshornense* 1 株) に関しては、同定一致率が 35 株 (94.6%) であったが、ほぼ半数が SV 2.0 以上を示した。一致しなかった 2 株は、*M. avium* 1 株が 1.7 未満の同定不能、もう 1 株が DDH マイコバクテリア®法で *M. nonchromogenicum* と同定された株が *M. avium* と判定された。

〔培養後保存日数と培地の違いによる評価〕

MTC 同定検査の培養日数・培養後保存日数による検討 (Fig. 1, 2) では、培養後 3 日以内の株と比して 6 週

保存株のほうが SV 値に低めの傾向がみられた。培養後保存日数による SV の変化も、培養後 3 日以内の株と比して培養後 4 週と 6 週保存株 5 株で見ると、平均で SV 0.3 の低下が認められた。数が少ないため統計的に検討はしなかった。また、手法の違いはあるものの、Fig. 1 は再現性についても示唆しており、良好であった。また、NTM の固形培地と MGIT®培地の違いによるベストマッチング SV の検出頻度には差がみられなかった。

〔基準菌株とピークパターン〕

基準菌株 [*M. bovis* BCG (東京) 株、結核菌 (H37Rv) 株、*M. avium* (JATA51-01) 株、*M. intracellulare* (JATA52-01) 株、*M. kansasii* (KK21-01) 株、*M. gordonae* (JATA33-01) 株] のマススペクトルピークパターン (Fig. 3) を示す。*M. bovis* BCG (東京) 株と結核菌 (H37Rv) 株のピークパターンが類似しているが、11400 (m/z)、5700 (m/z) 付近のピークが各々 10、7 (m/z) の違いがみられている。マススペクトルにて *M. bovis* BCG (東京) 株は MTC と判定されたが、大部分がデータベース内の *M. tuberculosis* として、スペクトルマッチングパターン SV で近似性の高い菌株から順に表示 (Fig. 4) された。高い順と

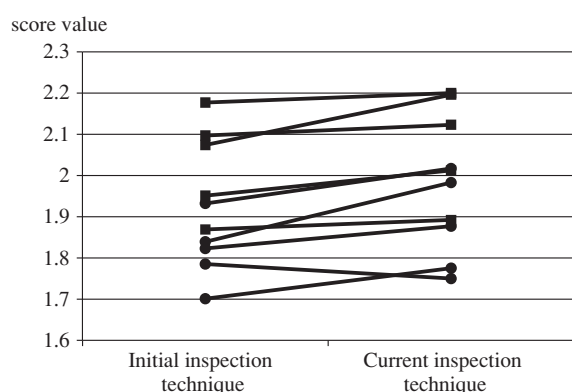


Fig. 1 Comparison of the *Mycobacterium* inspection technique analyzed by MALDI-TOF MS.

■ : MTC (5 strains) within 3 days after culture in MGIT tubes.
● : MTC (5 strains) stored for six weeks after incubations.

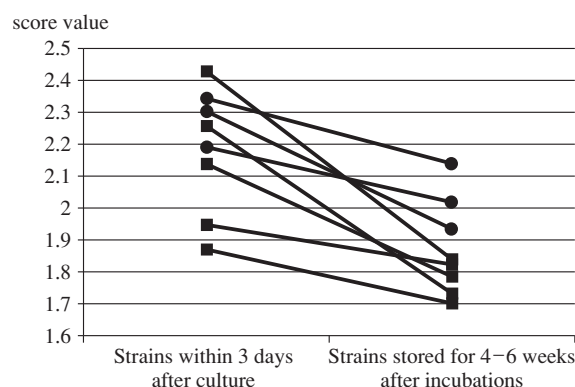


Fig. 2 Comparison of the mycobacterial mass spectral score value analyzed by culture and stored days.

■ : MTC (5 strains) stored for 6 weeks after incubations in MGIT tubes.
● : MTC (3 strains) stored for 4 weeks after incubations.

Table Clinical isolates identified by MALDI-TOF MS

	Identification	Not*	Best matched pattern score value							
			1.70~	1.80~	1.90~	2.00~	2.10~	2.20~	2.30~	2.40~
<i>M. tuberculosis</i> complex	158	157	1	3	4	17	27	40	45	21
<i>M. avium</i>	21	19	2	2	1 (1)	6 (4)	5 (4)	4 (2)	1	
<i>M. intracellulare</i>	6	6		2	1		2		1 (1)	
<i>M. kansasii</i>	1	1						1		
<i>M. gordonae</i>	6	6		2 (2)	1	1 (1)			2 (1)	
<i>M. fortuitum</i>	1	1							1 (1)	
<i>M. chelonae</i>	1	1				1				
<i>M. heckeshornense</i>	1	1				1				

*: not reliable identification

(): Numbers of clinical isolates proliferated onto the solid culture (3% Ogawa medium)

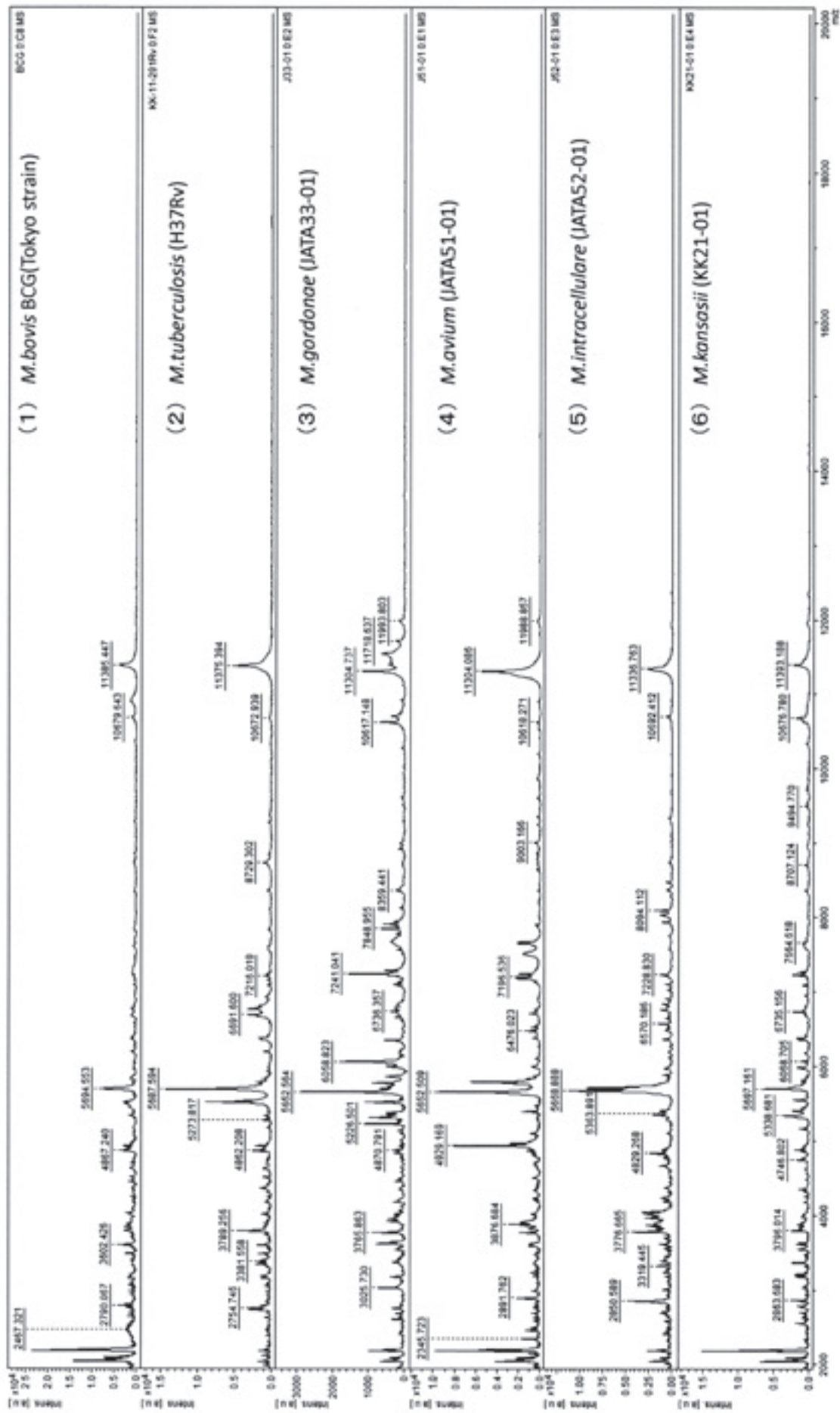


Fig. 3 Mass spectral profiles from the reference strains of *Mycobacterium*
 (1) *M. bovis* BCG (Tokyo strain); score value (SV) 2.144, (2) *M. tuberculosis* (H37Rv); SV 2.144, (3) *M. goodii* (JATA33-01); SV 2.229,
 (4) *M. avium* (JATA51-01); SV 2.103, (5) *M. intracellulare* (JATA52-01); SV 1.778, (6) *M. kansasii* (KK21-01); SV 2.288

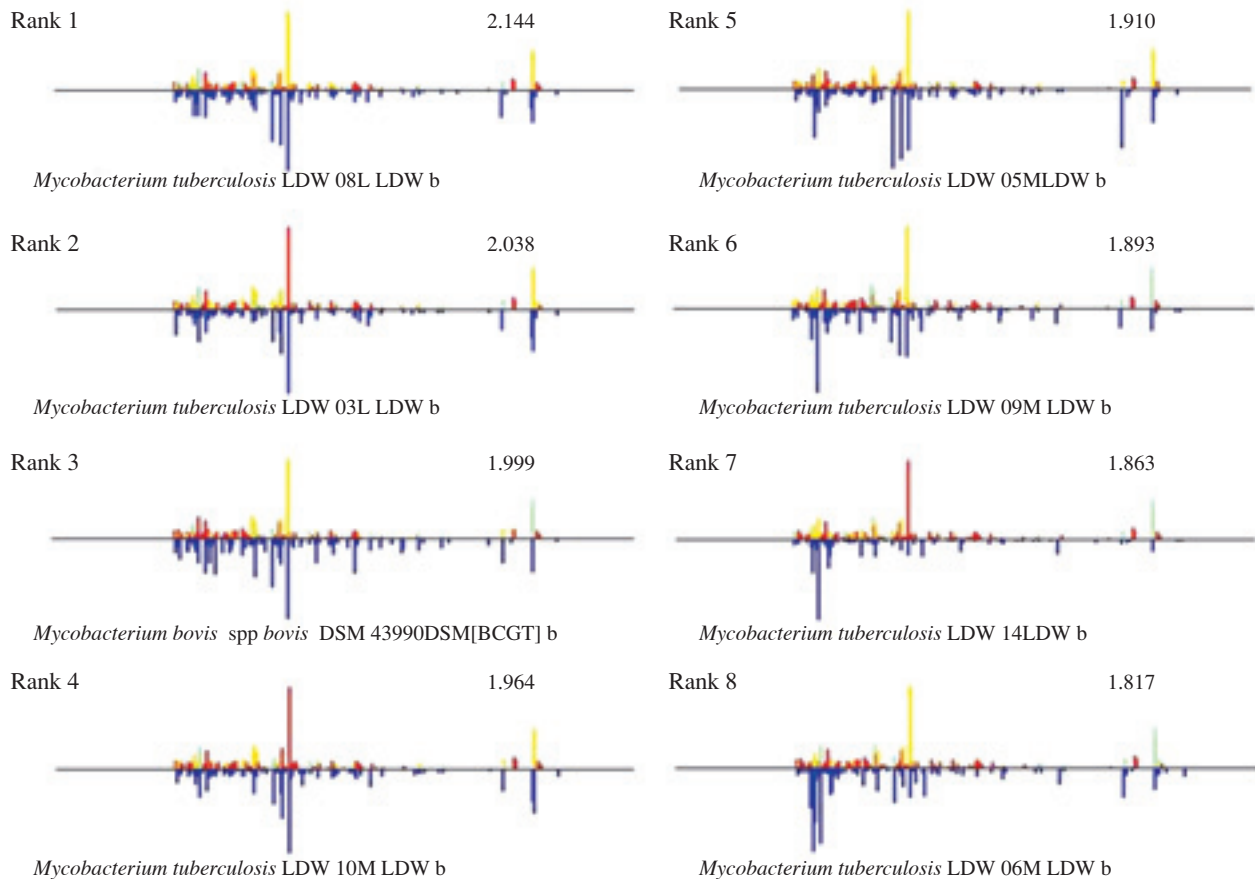


Fig. 4 Matched pattern rank and score value of *M. bovis* BCG (Tokyo strain)

Rank of reference mycobacteria strains used to create a MALDI-TOF MS database for the identification of mycobacteria.

してランク1の2.144とベストマッチングSVを示したのは *M. tuberculosis* (データベースでLDW 08L LDW b)、次に2.038のセカンドマッチングSVを示したのも *M. tuberculosis* (データベースでLDW 03L LDW b)であった。ランク3のSV1.999で *M. bovis* (データベースでDSM 43990 DSM[BCGT] b)とマッチングパターンを示した。ランク4~8でも、SVは1.910~1.817と2.0未満ではあるがデータベース内の *M. tuberculosis*とマッチングしていた。

NTMの *M. gordonae* (JATA33-01) 株を除いた基準菌株と臨床分離株スペクトルのピークパターンをみると、それぞれの菌種の特徴的なピークパターンと一致していた。しかし、臨床分離 *M. gordonae* 株6株 (Fig. 5) の場合、基準菌株のピークパターンと比して、10617, 11304 (m/z) 付近では4 (m/z) 以内の質量電荷比であったが、4700~7900 (m/z) 範囲ではそれぞれのピークパターンに2~3株前後が2 (m/z) 以内だが、その他は10 (m/z) 以上の電荷比の開きがみられた。

4. 考察

MALDIの開発と実用化はTanakaら³⁾やKarasら⁴⁾によ

って質量分析のイオン化法と大成されてきて、MALDI-TOF MSの微生物同定への応用はClaydonら⁵⁾によって試みられたとされている。細菌の主要な構成成分であるタンパク質は、乾燥重量の約50%を占め、一般に細菌中に200から6,000種ともいわれるきわめて多様な分子種として存在していることから、細菌類の化学分類法における指標成分としてよく用いられている一つである。MALDI-TOF MSは、細菌類中のタンパク質に注目して⁶⁾その識別や同定には、ピークパターンがどの菌種のマススペクトルのパターンと一致しているのがポイントとなる。縦軸にシグナルの強度、横軸に質量電荷比 (m/z) を表し、約2000 Da (ダルトン) ~20 kDaの分子量の範囲を解析している。細菌種の違いにより呈した特徴的なスペクトルパターンを指標として種々のアルゴリズムを用いた検索システムを利用して識別同定が可能となる。また、マススペクトルの高い再現性で得るためには、細菌類の培養日数、MALDI-TOF MSの測定条件を一定にする必要性があり、その違いによりピークパターンへの影響がみられる⁷⁾⁸⁾とされる。抗酸菌、特に結核菌群の場合は、初期手法では不活化までの超蒸留水による洗浄回数の多さが感染リスクを高め、超純粋エタノ

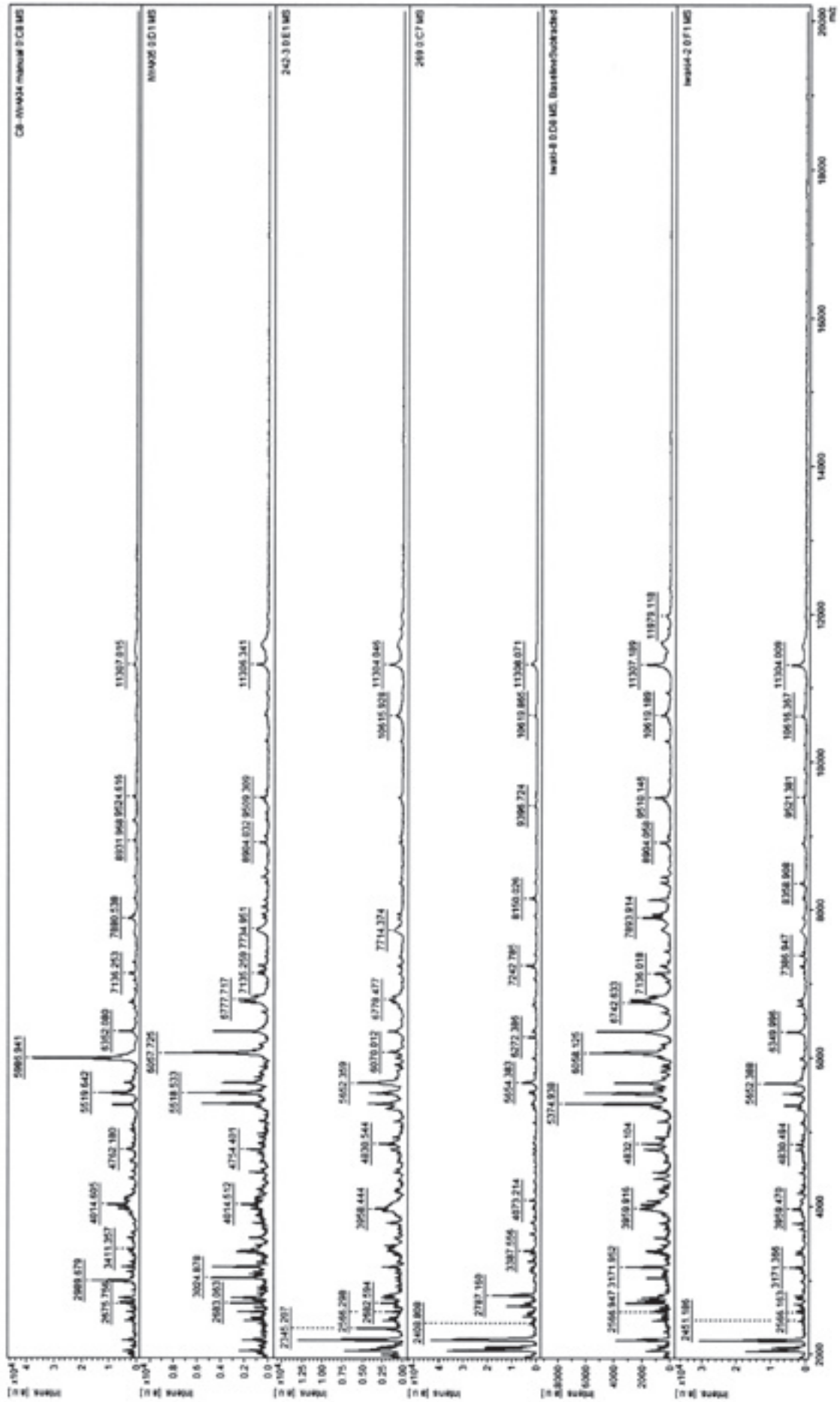


Fig. 5 Mass spectral peak patterns of the six clinically isolated *M. goodii* strains

ール処理時の汚染と洗い流しによる pellet の減少がみられた。現行手法では洗浄は1回、不活化前のエタノール処理はせず、不活化後のエタノール量を800 μ l と工夫改良して、操作を簡略化し安全性を高めた。われわれの現行手法でもマススペクトルのマッチングパターンSVの検出頻度に差がなく、再現性も示唆され、培地による影響もないと思われるが、培養後の保存日数によりSV値に差が認められた。より高い評価のためには今後、数を増しての再検討が必要と思われる。

MALDI-TOF MS を用いた菌種の同定は、データベース内の菌種⁹⁾とのマススペクトルのパターンマッチングである。同定したい菌株(菌種)は、スペクトルパターンマッチングの程度を表現するために独自のアルゴリズム; 対数スコア化され(リファレンスライブラリーにある基準菌種のピークパターンから250 ppm 以内に同様にサンプルのピークパターンがみられれば菌種レベル、250 ppm 以上600 ppm 以内に入っていれば属レベルでの相関性が高いとしてスコア化され、それらの情報を総括し類似性の高さをSVとしている)、SVが高い順にマッチング菌種名が表示される。SVが2.0以上あれば、菌種レベルで信頼度が高く、1.7~2.0未満では属レベルでの一致と判断される¹⁰⁾¹¹⁾。

また、細菌の分類は、国際細菌命名規約(International Code of Nomenclature of Bacteria: ICNB)によって規定されている。細菌を分類する最も基本的な単位は株であるが、分類上の最小単位は菌種とされている²⁾ことを考慮するなら、マッチングパターンSVが2.0以上の検出を常に念頭におくべきである。しかし、われわれの臨床分離株の検討(Table)でもMTC 158株のうち150株、NTM 37株のうち17株が2.0以上で、MTCで7株、NTMで18株が1.7~2.0未満のSVを示していた。これらSV 2.0未満のNTMのほとんどがデータベース内のマッチングパターンの高いランクから低い(1.7未満)ランクまで、同一菌種と一致していた。SV値が1.7~2.0未満の属レベルの判定でも、NTMの場合、臨床的には菌種レベルと同等と判断してもよいと思われる。いずれにしてもパターンマッチングSV値が1.7以上あれば臨床的には識別能力ありと推測される。

われわれは、Saleebら¹⁾、Shitikovら¹²⁾と同様にMALDI-TOF MSを用いて、基準菌株6株、MTCとNTMを合わせた臨床分離株195株のうち192株の識別をすることができた。PCR法などの従来法と比してMTCとして157株(99.4%)、NTMとして35株(94.6%)の同定一致率を見たが、同じ種の株間での検討はしなかった。

次に基準菌株のマススペクトルで、*M. bovis* BCG(東京)株と結核菌(H37Rv)株のピークパターンの類似性は高いが、質量電荷比でみると11400(m/z)、5700(m/z)

付近のピークが各々10, 7(m/z)の違いがみられている。このことは別な菌株であることを意味しているが、*M. bovis*と*M. tuberculosis*の系統樹解析パターンではDNA/DNA相関性が高い類縁菌種として、MTCとして表示されることから、現状下での判別は困難であると思われる。NTMの*M. avium*(JATA51-01)株、*M. intracellulare*(JATA52-01)株、*M. kansasii*(KK21-01)株とそれぞれ同定した臨床分離株スペクトルのピークパターンをみると、それぞれの菌種の特徴的なピークパターンと一致していた。しかし、臨床分離*M. gordonae* 6株(当センター2株、いわき市立総合磐城共立病院4株で共にDDH法で同定)の場合、*M. gordonae*(JATA33-01)株のピークパターンと比して、10617、11304(m/z)付近ではかなり相関性が高いが、4700~7900(m/z)範囲ではそれぞれのピークパターンに2~3株前後の類似性がみられる程度でほとんどが遺伝的多型性を示唆した。

パルスフィールド電気泳動法(PFGE)、*hsp65* PRAや16S rRNA遺伝子シーケンスによる解析を実施していないが、*M. gordonae*の遺伝的多型性¹³⁾が知られていることから臨床分離株のマススペクトルは多型性を推測させ、地域特異性を示唆している可能性がある。このことは、同じ菌種でも複数の株が登録されているので、株間にパターンの多様性がみられても同定はできるが、よりいっそう菌種同定の精度を高めるためには、データベース(リファレンスライブラリー)の量と質の充実に関わってくると思われる。

マイコバクテリアの株間の区別については、Hettickら¹⁴⁾はスペクトルパターンの特定なピークの有無よりも、共有の質量電荷比の相対的な存在量の違いによるものとしている。また、薬剤耐性菌の鑑別についても、 β -ラクタム薬やカルバペネム系薬での報告がみられている¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし、Welkerら¹⁷⁾はMALDI-TOF MSの目的は菌種レベルの同定であって、株レベルでの判別は困難であるとしている。これからの課題として、PFGEパターン解析や16S rRNA遺伝子シーケンスと同等の評価を得られていること¹⁸⁾からも、同じ菌種レベルでの菌株別データベースの充実により株レベルでの同定が期待できるし、また、同定する菌種の精度管理がより再現性・信頼性の高いものになりうること¹²⁾が示唆される。

操作と感染リスクを改良した安全性の高い現行手法での検証ではSV値の検出頻度は良かったが、培養後の保存日数によるSV値で0.3の低下が認められた。結核菌細胞壁は、培養後9日から28日への経過で主要な構成要素であるマンノシル化複合糖質の産生量が増加する⁷⁾⁸⁾とされることから、保存株におけるシリカビーズを用いたマイコバクテリア抽出法ではタンパク抽出の劣化がおり、SVの低下が予測されるが、低下の程度が保存日

数に比例するかどうかは今後の検討課題でもある。

MALDI-TOF MS法は、精度管理ばかりではなく、医療の安全性や検査技術の点から、液体培地、固形培地上に発育がみられた抗酸菌の同定に対しては、手法の改良工夫により早急に不活化することが可能となり、感染リスクの低下も期待でき安全性が高まったと思われる。また、サンプル調製から結果までの所要時間も当初の180分から約90分と大幅に短縮することができた。加えてMALDI-TOF MS法は核酸増幅法¹⁹⁾と比較して、コンタミネーションの問題が少なく、より安全性が高く、臨床の場へ迅速なフィードバックができるようになり、低コスト化も図れるようになってきた。

MALDI-TOF MS法は、迅速とはいってもサンプル直接からの同定は不可能とされ、培養を待たなければならない。液体培地MGIT[®]における検出感度は陽性となった時点で $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml (BD BBL[™]MGIT[™]の添付文書より)とされる。著者らは培養後最長でも3日以内での質量分析をしていることから菌量は $10^5 \sim 10^6$ cfu/mlと推測されるが、最小検出感度の検討¹⁹⁾も必要であると推測される。今後、普及とデータベースの充実を積み重ねながら臨床分離株での遺伝子型別解析の可能性、蓄積されたデータによる地域特性などの関連性が役割として期待される。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, et al.: Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011 ; 49 : 1790-1794.
- 2) 大楠清文：質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. 医学検査のあゆみ. モダンメディア. 2012;58:113-122.
- 3) Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al.: Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1988 ; 2 : 151-153.
- 4) Karas M, Hillenkamp F: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal Chem.* 1988 ; 60 : 2299-2301.
- 5) Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, et al.: The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology.* 1996 ; 14 : 1584-1586.
- 6) 石田康行：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による病原体の迅速識別. *J Mass Spectrom Soc Jpn.* 2003 ; 50 : 108-113.
- 7) Schwebach JR, Casadevall A, Schnerson R, et al.: Expression of a *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan antigen in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 5671-5678.
- 8) Yang L, Sinha T, Carlson TK, et al.: Changes in the major cell envelope components of *Mycobacterium tuberculosis* during in vitro growth. *Glycobiology.* 2013 ; 23 : 926-934.
- 9) Pignone M, Greth KM, Cooper J, et al.: Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 1963-1970.
- 10) Senq P, Drancourt M, Gouriet F, et al.: Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009 ; 49 : 543-551.
- 11) Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al.: Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010 ; 48 : 1549-1554.
- 12) Shitikov E, Ilina E, Chernousova L, et al.: Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria. *Infect Genet Evol.* 2012 ; 12 : 838-845.
- 13) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 岩本朋忠, 他：当センターにおける*Mycobacterium gordonae*の分子疫学的解析. *結核.* 2010 ; 85 : 609-614.
- 14) Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, et al.: Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics.* 2006 ; 6 : 6416-6425.
- 15) Burckhardt I, Zimmermann: Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer to Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. *J Clin Microbiol.* 2011 ; 49 : 3321-3324.
- 16) Sparbier K, Schubert S, Weller U, et al.: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against B-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012 ; 50 : 927-937.
- 17) Welker M, Moore E: Applications of whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol.* 2011 ; 34 : 2-11.
- 18) Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al.: 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.* 2008 ; 46 : 1946-1954.
- 19) 日暮芳己, 佐藤高彰, 平井鉄三, 他：コバス[®]TaqMan48の基礎的評価と臨床検体による検討. *結核.* 2009 ; 84 : 117-124.

Original Article

IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA BY MATRIX-ASSISTED LASER
DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY— Using Reference Strains and Clinical Isolates of *Mycobacterium* —¹Katsunao NIITSUMA, ¹Miwako SAITO, ²Shizuko KOSHIBA, and ³Michiyo KANEKO

Abstract [Purpose and Methods] Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method is being played an important role for the inspection of clinical microorganism as a rapid and the price reduction. Mass spectra obtained by measuring become points of identification whether the peak pattern match any species mass spectral pattern.

We currently use MALDI-TOF MS for rapid and accurate diagnosis of inactivated reference and clinical isolates of *Mycobacterium* because of the improved pretreatment techniques compared with former inspection methods that pose a higher risk of infection to the operator. The identification matching rate of score value (SV) peak pattern spectra was compared with that of conventional methods such as strain diffusion/amplification. Also, cultures were examined after a fixed number of days.

Compared with the initial inspection technique, the pretreatment stage of current MALDI-TOF MS inspection techniques can improve the analysis of inactivated acid-fast bacteria that are often used as inspection criteria strains of clinical isolates. Next, we compared the concordance rate for identification between MALDI-TOF MS and conventional methods such as diffusion/amplification by comparison of peak pattern spectra and evaluated SV spectra to identify differences in the culture media after the retention period.

[Results and Discussion] In examination of 158 strains of clinical isolated *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), the identification coincidence rate in the genus level in a matching pattern was 99.4%, when the species level was included 94.9%. About 37 strains of nontuberculous mycobacteria (NTM), the identification coincidence rate in the genus level was 94.6%.

M. bovis BCG (Tokyo strain) in the reference strain was judged by the matching pattern to be MTC, and it suggested that they are *M. tuberculosis* and affinity species with high DNA homology.

Nontuberculous mycobacterial *M. goodii* strain JATA 33-01 shared peak pattern spectra, excluding the isolates, with each clinically isolated strain. However, the mass spectra of

six *M. goodii* clinical isolates suggested polymorphisms with similar mass-to-charge ratios compared with those of the reference strains. The peak pattern spectra of the clinical isolates and reference strains, excluding the NTM *M. goodii* strain JATA33-01, were consistent with the peak pattern characteristics of each isolate. However, a comparison between the peak patterns of the reference strains and those of the six clinically isolated *M. goodii* strains revealed a similar mass-to-charge ratio, which may indicate few polymorphisms.

The SV spectrum of the improved inspection technique showed no fidelity, but it was acceptable after days of culture as indicated by the decrease in SV (0.3 degree). Also, the reproducibility of this method was good, but no difference was observed from the SV of the improved inspection technique, which decreased by approximately 0.3 because of the number of days of culture storage. In addition, expansion of the database and dissemination of regional specificity by genotype analysis of clinical isolates was relevant to the accumulated data, as expected.

In future studies, the relevance and regional specificity of clinical isolates by genotype analysis can be determined by stacking the solid media and database penetration.

Key words: Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), Clinical isolates of *Mycobacterium*, Reference strains, Database

¹Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Fukushima Prefectural Medical University Aizu Medical Center, ²Inspection Department, Fukushima Prefectural Minami Aizu Hospital, ³Department of Bacteriological Examination, Iwaki City General Iwaki Kyoritsu Hospital

Correspondence to: Katsunao Niitsuma, Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Fukushima Prefectural Medical University Aizu Medical Center, 21-2 Yazawa-Maeda, Kawahigashi, Aizu-Wakamatsu-shi, Fukushima 969-3492 Japan. (E-mail: kazuniizuma@yahoo.co.jp)