

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06814

研究課題名(和文) 実験動物病原菌のMALDI-TOF MS迅速モニタリング検査システムの確立

研究課題名(英文) Development of dataset of MALDI-TOF MS for bacteria derived from laboratory rodents

研究代表者

林元 展人 (Hayashimoto, Nobuhito)

公益財団法人実験動物中央研究所・ICLASモニタリングセンター・センター長

研究者番号：30332208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：MALDI-TOF MSを用いた微生物同定における既存のデータベースはヒト臨床での活用を想定されており、実験動物における病原体については不十分である。そこで実験動物の微生物学的品質管理への応用を目的としてデータベースの拡充を行なった。肺パスツレラ、肺マイコプラズマ、ネズミコリネ菌などを中心にその近縁種も含めマススペクトルデータの取得、データベースへの登録を行なった。その結果、デフォルトのデータベースでは同定不能であった株も精度高く同定することが可能となり、実験動物の微生物学的品質管理の現場に応用できる体制を構築できた。

研究成果の概要(英文)：Existing databases for microbial identification using MALDI - TOF MS are assumed to be used in human clinical test, and data of pathogens in experimental animals are insufficient. We expanded the database for the purpose of application to microbiological quality control of experimental animals. Mass spectral data including its closely related species, such as *Pasteurella pneumotropica*, *Mycoplasma pulmonis*, *Corynebacterium kutscheri*, etc., was acquired and registered in the database. As a result, it was possible to accurately identify strains that could not be identified in the default database, and we could build a system applicable to the site of microbiological quality control of experimental animals.

研究分野：実験動物感染症学

キーワード：MALDI-TOF MS 微生物学的品質管理

1. 研究開始当初の背景

MALDI-TOF MS を用いた微生物同定はタンパク質の質量分析による同定法であり、被検菌の測定結果から得られたスペクトルとデータベースのマッチングにより菌種の同定を行う。従来の生化学的性状検査のように培養時間に依存せず、非常に迅速な同定法であることなどから、ヒトの臨床の現場を中心に広く導入されてきている。しかし、既存のデータベースはヒト臨床での活用を想定されており、実験動物における病原体についてはデータベースが不十分である。MALDI-TOF MS による微生物同定はデータベースに依存し、被検菌の菌種がデータベースに存在しない、もしくは不十分であるとスペクトルが得られても同定に至らない。そのためデータベースの拡充が大きな課題である。

2. 研究の目的

実験動物のマウス・ラットの品質管理対象である病原微生物の内、近年比較的高陽性率の高い細菌群を中心に MALDI-TOF MS のデータベースの拡充を行い、実験動物の微生物学的品質管理体制を構築する

3. 研究の方法

自組織に保存してある野外分離株、*Pasteurella pneumotropica* 59 株、*Corynebacterium kutscheri* 23 株、*Mycoplasma pulmonis* 15 株、*B. bronchiseptica* 54 株を用いた。またそれぞれの菌種の類縁菌について、*P. pneumotropica* は 7 菌種 9 株 (*Actinobacillus muris*, *A. ureae*, *P. aerogenes*, *P. dagmatis*, *P. gallinarum*, *P. haemolytica*, *P. multocida*)、*C. kutscheri* に関しては 4 菌種 12 株 (*C. stations*, *C. amycolatum*, *C. ammoniagenes*, *C. bovis*) を用いた。*B. bronchiseptica* に関しては類縁菌 5 菌種 5 株 (*Bordetella ansorpii*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella trematum*) を用いた。またこれらの菌の中には再分類され種名が

変わっているものも存在するが、ここでは分離時、購入時の種名を記載する。

4. 研究成果

マウス・ラットの病原微生物として扱われる *Pasteurella pneumotropica* について、既に従来の方法 (生化学的性状検査、PCR 検査、凝集反応)⁵⁾ により同定された 59 株 (マウス由来、生物型 Heyl, 22 株、マウス由来、生物型 Jawetz, 22 株、ラット由来 15 株) を用いて既存のデータベースにより同定を行ったところ、スコア 2.000 以上で種の同定に至ったものは 51% に留まった。そこで、Reference strain : ATCC 35149, CNP 160, 野外株 : マウス由来、生物型 Heyl, 3 株、マウス由来、生物型 Jawetz, 6 株、ラット由来生物型 Jawetz 3 株を用いてデータベースを構築し、再度 59 株について既存のデータベースに新規データを加えたもので同定を行った。その結果、全ての検体でスコア 2.000 以上となり 100% の同定一致率が確認された (Table.1)。

また実験動物から検出される *Pasteurella pneumotropica* の類縁菌について既存のデータベースに新規データを加えたもので同定を行った。使用したのは、Type strain : *Pasteurella aerogenes* (ATCC 29554), *Pasteurella dagmatis* (ATCC 43325), *Pasteurella multocida* (ATCC 43137), *Actinobacillus muris* (ATCC 49577), *Actinobacillus ureae* (ATCC 29693), *Avibacterium gallinarum* (ATCC 13361), *Mannheimia haemolytica* (ATCC 33396), 野外株 : *Pasteurella dagmatis* *Pasteurella multocida* である。これらの類縁菌について既存のデータベースに新規のデータを追加したもので同定を行い、*Pasteurella pneumotropica* には同定されず、区別されることを確認した。

Corynebacterium kutscheri について、既に従来の方法 (生化学的性状検査、PCR 検査) により同定された 23 株を用いて既存のデータベースにより同定を行ったところ、スコア 2.000 以上で種の同定に至ったものは 96% に留まり、23 検体中 1 検体において同定されなかった。そこで、Reference strain : JCM 9385, CK1, 野外株 : ラ

ット由来5株を用いてデータベースを構築し、再度23株について既存のデータベースに新規データを加えたもので同定を行った。その結果、全ての検体でスコア2.000以上となり100%の同定一致率が確認された (Table.2)。また実験動物から検出される *Corynebacterium kutscheri* の類縁菌について既存のデータベースに新規データを加えたもので同定を行った。使用したのは、Type strain : *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC 6871), *Corynebacterium bovis* (ATCC 7715), 野外株 : *Corynebacterium ammoniagenes* 1株, *Corynebacterium amycolatum* 3株, *Corynebacterium satationis* 6株である。これらの類縁菌について既存のデータベースに新規のデータを追加したもので同定を行い、*Corynebacterium kutscheri* には同定されず、区別されることを確認した。

Mycoplasma pulmonis について、既に従来の方法 (PCR 検査) により同定された15株を用いて既存のデータベースにより同定を行ったところ、既存のデータベースには *Mycoplasma pulmonis* が含まれないため、全ての検体において同定されなかった。そこで、Reference strain : m53, 野外株 : マウス由来2株, ラット由来1株を用いてデータベースを構築し、再度23株について既存のデータベースに新規データを加えたもので同定を行った。その結果、全ての検体でスコア2.000以上となり100%の同定一致率が確認された (Table.3)。また実験動物から検出される *Mycoplasma pulmonis* の類縁菌について既存のデータベースに新規データを加えたもので同定を行った。使用したのは、Type strain : *Mycoplasma neurolyticum* Type A, 野外株 : *Mycoplasma arginini* 1株, *Mycoplasma hyorhinis* 1株, *Mycoplasma neurolyticum* 1株である。これらの類縁菌について既存のデータベースに新規のデータを追加したもので同定を行い、*Mycoplasma pulmonis* には同定されず、区別されることを確認した。

Bordetella bronchiseptica について、既に従

来の方法 (生化学的性状検査、PCR 検査) により同定された54株を用いて既存のデータベースにより同定を行ったところ、全ての検体において齟齬なく本菌と同定された (Table.4)。しかし、全ての検体で近縁菌種である *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis* との明確な差が得られなかった。また実験動物から検出される *Bordetella bronchiseptica* の類縁菌について既存のデータベースにより同定を行った。使用したのは、Type strain : *Bordetella ansorpii* (NCTC 13364), *Bordetella avium* (ATCC 35086), *Bordetella hinzii* (ATCC 51783), *Bordetella holmesii* (ATCC 51541), *Bordetella trematum* (ATCC 700309) である。これらの類縁菌について既存のデータベースで同定を行ったところ、*Bordetella bronchiseptica* には同定されず、区別されることを確認した。

Bordetella bronchiseptica は、*Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis* との明確な差が得られないものの、高いスコアでの同定一致率を示し、他の検査方法との併用が必要ではあるがスクリーニング検査においては非常に有用であることを確認した。以上の結果から実験動物のマウス、ラットにおける主要な細菌病原体に対する実用的なデータベースの構築ができた。

Table1. *Pasteurella pneumotropica* におけるデータベース拡充とそれを用いた菌種同定

	Results of Identification			
	No of isolates	Species level	Genus or Family level	No matching
Braker Database	59	30 (51%)	28 (47%)	1 (2%)
Braker +CIEA Database	59	59 (100%)	0	0

Braker Database: デフォルトのデータベース, CIEA Database: 新たに拡充したデータベース

Table2. *Corynebacterium kutscheri*におけるデータベース
拡充とそれを用いた菌種同定

	Results of Identification			
	No of isolates	Species level	Genus or Family level	No matching
Bruker Database	23	22 (96%)	0	1 (4%)
Bruker +CIEA Database	23	23 (100%)	0	0

Bruker Database: デフォルトのデータベース, CIEA Database: 新たに拡充したデータベース

Table3. *Mycoplasma pulmonis*におけるデータベース
拡充とそれを用いた菌種同定

	Results of Identification			
	No of isolates	Species level	Genus or Family level	No matching
Bruker Database	15	0	0	15 (100%)
Bruker +CIEA Database	15	15 (100%)	0	0

Bruker Database: デフォルトのデータベース, CIEA Database: 新たに拡充したデータベース

Table4. *Bordetella bronchiseptica*におけるデータベース
拡充とそれを用いた菌種同定

	Results of Identification			
	No of isolates	Species level	Genus or Family level	No matching
Bruker Database	54	54 (100%)	0	0
Bruker +CIEA Database	54	54 (100%)	0	0

Bruker Database: デフォルトのデータベース, CIEA Database: 新たに拡充したデータベース

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 森田華子、林元展人. MALDI-TOF MS を用いた細菌同定受託検査の現状. 電気泳動. 2017. 149-151.
2. 林元展人、森田華子、石山沙也香、内田立樹、佐々木健、宮下礼行、元木貢. 東京と神奈川で捕獲されたクマネズミ、ドブネズミにおける微生物調査：実験動物施設の潜在的な感染源として. 実験動物技術. 2017. 67-76.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 林元展人. 細菌同定検査におけるイノベーション(招待講演). 2016. 第 63 回日本実験動物学会総会. 川崎市
2. 森田華子、石山沙也香、林元展人. マウス・ラットの病原微生物における MALDI-TOF MS を用いた細菌同定の評価. 2016. 第 63 回日本実験動物学会総会. 川崎市
3. 石山沙也香、森田華子、林元展人. 実験動物のマウスにおけるメチシリン耐性ブドウ球菌感染の疫学調査. 2017. 第 64 回日本実験動物学会総会. 郡山市
4. 林元展人. コモンマームセットの腸管病原性大腸菌感染症 (招待講演). 2017. 第 64 回日本実験動物学会総会. 郡山市
5. 林元展人. 世界の微生物保有状況と日本の対策 (招待講演). 2017. 第 51 回日本実験動物技術者協会総会. 山形市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林元展人 (Hayashimoto Nobuhito)
公益財団法人実験動物中央研究所・
ICLAS モニタリングセンター・センター長
研究者番号: 30332208

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし