

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460896

研究課題名(和文) MALDI-TOF MSを用いた高病原性微生物の網羅的検知

研究課題名(英文) Exhaustive detection of high pathogenic microorganism by MALDI-TOF MS

研究代表者

藤浪 良仁 (Fujinami, Yoshihito)

科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官

研究者番号：30335632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物のMALDI質量分析法が細菌芽胞・栄養型細菌・真菌およびウイルス(バクテリオファージ)などの微生物の種類にかかわらず、生物学的因子を迅速にスクリーニングするための強力な方法であることを確認した。さらに微生物培養液の不純物や賦形剤を含むことの認識は、生物剤の生産方法の認識に役立つ可能性がある。微生物種を識別して同定する能力は、生物学的因子、食物媒介性病原体の同定、および感染性微生物の臨床分析を含む多くの潜在的な応用の可能性を有する。法科学において、未知物質の取り扱い是最も困難であるが、この方法は迅速な微生物スクリーニングを可能にする。

研究成果の概要(英文)：This work confirms that MALDI-TOF MS spectrometry of microorganism was a powerful method for rapid screening biological agents regardless of the type of microorganism, such as bacterial spore, vegetative bacteria, Fungi and virus (bacteriophage). In addition, the recognition of containing culture medium impurities and excipients may be helpful for recognition of the production method. The ability to distinguish and identify microorganism species has many potential applications, including identifying biological agents, food-borne pathogens, and in clinical analysis of infectious microorganism. In forensic duties, this method enables rapid microorganism screening, but the handling of unknown substance is the most difficult.

研究分野：法微生物学

キーワード：MALDI マスペクトル 病原微生物 生物剤 賦形剤 芽胞 発芽 培養液

### 1. 研究開始当初の背景

法医学の分野では、異状死という情報の殆ど無い遺体を取り扱うため、高病原微生物等を用いた犯罪の可能性も含めて、感染の危険を含めて受け入れなければならず、さらに死因となるそれら病原体を含む有害物質の検査も同時並行で行う必要がある。それにも拘わらず、法医学領域に適応した高病原微生物等を用いた犯罪に対応した研究は殆ど行われていない。そこで高病原微生物本体の同定、混入物の検知等を特異なマスペクトルパターンを網羅的に明らかにし、高病原微生物等による感染死の法医鑑定に必要な微生物検出が必要だと考えた。

### 2. 研究の目的

現場採取資料から網羅的に MALDI-TOF MS により検出される広範囲のマスペクトルパターンを検出し、迅速かつ高い精度で、病原微生物等による感染死の法医鑑定の新規手法として構築する。各種微生物に特徴的な構成物の MALDI-TOF MS における特徴ピークを検出する。実資料を想定した微生物と微生物の保護剤などの混入物を含有する資料を作製し、混入物を微生物本体と同時に認識出来るかを検討する。

### 3. 研究の方法

#### 細菌株及び細菌毒素の入手

各種細菌株の入手経路を以下に示す。炭疽菌 (*Bacillus anthracis* PasteurII) は帯広畜産大学、無芽胞炭疽菌 (*Bacillus anthracis* Davis) およびガンマファージ ( $\gamma$ phage) は動物衛生研究所、マルタ熱菌 (*Brucella melitensis* RIMD0238001) は大阪大学、野兔病菌 (*Francisella tularensis* SCHU, Canada Muskrat B2, B38, Ebina, Hashimoto, N9, LVS) 7 株は大原病院大原研究所、ペスト菌 (*Yersinia pestis* P3-417)、チフス菌 (*Salmonella enterica* serovar typhi (*Salmonella typhi*) P3-346, P3-86, P3-434, P3-85, P3-401, P3-440, P3-87, P3-88, P3-89, P3-126, P3-312, P3-313) 12 株、パラチフス菌 (*Salmonella enterica* serovar paratyphi (*Salmonella paratyphi*) GTC0285, GTC 0572, P3-433, P3-454, P3-245, P3-453, P3-364) 7 株および類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei* P3-66, P3-67, P3-68, P3-69, P3-70, P3-71, P3-72, P3-414, P3-437) 9 株は岐阜大学から、それぞれ分譲を受けた。セレウス菌 (*Bacillus cereus* ATCC4342) は American Type Culture Collection (ATCC)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum* okra)、アスペルギルス真菌 (*Aspergillus brasiliensis* NBRC9455) 等は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC)、その他一般細菌は、岡山大学から分譲を受けたものを用いた。炭疽菌、類鼻疽菌及び一般細菌は好気条件下 BHI 寒天培地 (ニッスイ) で、ペスト菌は微好気条件下 10%馬脱繊維血 (日本生物材料セン

ター)加 BHI 寒天培地で、ブルセラ菌は微好気条件下 10%馬脱繊維血加ブルセラ寒天培地 (Difco)、野兔病菌は微好気条件下 10%緬羊脱繊維血加ユーゴン寒天培地 (Difco) を用いて凍結ストックから 37 で復元培養した。培養時のガスコントロールは、アネロパックのジャー及びガスパックを用いた。炭疽菌芽胞は、効率よく芽胞を得るため芽胞化培地を用い 4 日間好気条件の 37 で培養し、位相差顕微鏡下で栄養型が観察されなくなるまで氷冷滅菌精製水で洗浄し調整した。

#### (1) 病原細菌のマスペクトルパターン検出

全ての細菌は、未知資料からの細菌を網羅的に培養することを想定して、微好気条件下 10%緬羊脱繊維血加変法 GAM 寒天培地を用いて BSL3 対応施設において 37 で培養し対数増殖期に回収した。微量の細菌を 75%エタノールで洗浄し、50 $\mu$ l の 70%ギ酸と 50 $\mu$ l のアセトニトリルを添加した。その混合物を 0.2 $\mu$ m ポアサイズディスクフィルターで無菌ろ過し、その 1 $\mu$ l を 4 $\mu$ l のマトリックス溶液抽出法で簡易抽出し、無菌濾過したものを細菌抽出サンプルとした。これをマトリックス溶液に混和し、速やかに MALDI plate のスポットにアプライした。各スポットを m/z 2000-20000 の範囲で MALDI-TOF MS で測定した。これらマスペクトル比較は専用解析ソフトウェアの FlexAnalysis 及び BioProfiler で解析を行った。

#### (2) ビーズ破砕法を用いた MALDI-TOF MS による炭疽菌芽胞の迅速検出

炭疽菌は PasteurII 株を用い、栄養型は 37 の好気培養で寒天培地上に生じるコロニーを集菌し、芽胞は芽胞化培地で得られた粗芽胞を遠心分離法により滅菌水で精製した。攪拌抽出法は菌体を 1%トリフルオロ酢酸に懸濁しボルテックスミキサーで攪拌抽出したものを、ビーズ破砕法はピーターにより破砕したものを抽出液とした。得られた抽出液は遠心分離後の上清を 0.2 $\mu$ m のポアサイズで無菌濾過した。これをマトリックス溶液に 1:4 の割合で混和し、MALDI plate のスポットにアプライした。これらを MALDI-TOF MS の測定範囲 m/z1000-10000 に限定して解析を行った。

#### (3) MALDI-TOF MS による芽胞発芽におけるスペクトル変化の解析

セレウス菌 ATCC4342 株を用い、栄養型は 37 の好気培養で寒天培地上に生じるコロニーを集菌し、芽胞は芽胞化培地で得られた粗芽胞を遠心分離法により滅菌水で精製した。5.2 x 10<sup>8</sup> 個 (CFU) の芽胞を Nutrient Broth "Nissui" に懸濁し、Eppendorf Thermomixer 5436 を用い 1500min<sup>-1</sup> でミキシングしながら 37 でインキュベートした。抽出方法は菌体を 1%トリフルオロ酢酸に懸

濁しボルテックスミキサーで攪拌抽出したものを、ビーズ破砕法はビーターにより破砕したものを抽出液とした。得られた抽出液は遠心分離後の上清を 0.2 $\mu$ m のポアサイズで無菌濾過した。これをマトリックス溶液に 1:4 の割合で混和し、MALDI plate のスポットにアプライした。これらを MALDI-TOF MS の測定範囲 m/z1000-10000 に限定して解析を行った。

#### (4) MALDI-TOF MS による迅速スクリーニングのための微生物および生育培養液を対象とした迅速検出

細菌として炭疽菌 Pasteur II、ペスト菌 P3-417、ボツリヌス菌 Lamanna (Type B)等、真菌としてアスペルギルス真菌 NBRC9455 等9株、および $\gamma$ phageを使用した。培地は、寒天培地および液体培地を使用した。菌体は純培養で寒天培地上に生じるコロニーを集菌し、芽胞は遠心分離法により滅菌水で精製した。 $\gamma$ phage の培養はセレウス菌 ATCC4342 を用いて 37 で行った。菌体抽出法は菌体を 1%トリフルオロ酢酸に懸濁し、ビーズ破砕したものを抽出液とした。培養液に対しては、得られた抽出液は遠心分離後の上清を無菌濾過した。これらを測定範囲 m/z 1000-10000 に限定し MALDI-TOF MS で解析を行った。

#### (5) MALDI-TOF MS による微生物の迅速検出における賦形剤の影響

細菌としてセレウス菌 ATCC4342 の栄養型を普通寒天培地で 37 で好気培養したものを使用した。賦形剤はバレイショポテトスターチ、ラクトース、ヒドロキシプロピルセルロース等を、市販されている複数の乳酸菌製剤を用いた。

新鮮な細菌コロニーと賦形剤を段階的な比率で混和し、0.3%TFA50%ACN 含有 CHCA 溶液を用いて、賦形剤の高分子成分の測定を目指して測定範囲 m/z 2000-20000 の範囲で MALDI-TOF MS で検出し解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 病原細菌のマススペクトルパターン検出

MALDI-TOF MS を用いたスクリーニング法は 30 分以内で行うことが可能であり、ライブラリーに対して検索することで、病原微生物のスクリーニングに有効であることが示された。自動検出における検出細菌種の精度は 97.4%(38/39 株)であった。しかしメーカーが種レベルで高い信頼性評価として提唱している基準以上を示したのはそのうち 20.5% (8/39 株)であった。しかしながらランキング上位の判定は正答率が高く、迅速な細菌種の絞り込み方法として有効と思われた。手動測定において自動検出よりチフス菌において相同性評価値が有意に高い値が得られた。自動検出と手動検出においても検出細菌を誤判定した LVS 株のマススペクトルを

描画すると、明らかに他の野兔病とマススペクトルパターンが異なっており、このような例外株の存在も明らかとなった。

#### (2) ビーズ破砕法を用いた MALDI-TOF MS による炭疽菌芽胞の迅速検出

2 種類の抽出法で比較したところ、栄養型では攪拌抽出法で有効ピーク数が少なかったが、ビーズ破砕法は有効ピークが多数得られた。芽胞に対しても同様に行なったところ、攪拌抽出法では有効ピークが全く検出されなかったが、ビーズ破砕法では栄養型と同レベルの有効ピーク数が検出された。このことから、攪拌抽出法よりもビーズ破砕法の方が抽出効率が高いと思われた。ビーズ破砕法により栄養型と芽胞は異なるマススペクトルパターンを示し、特に炭疽菌芽胞に固有のピークとして報告のある m/z9735 のピークが確認され、迅速検出に有効である。

#### (3) MALDI-TOF MS による芽胞発芽におけるマススペクトル変化の解析

芽胞の特異ピークとして m/z4705、4816 が観察された。発芽誘導 2h 後に m/z1800-2200 にピーク群が生じたが 6h 後には消失し、同様に 6h 後には m/z7779 のピークが新たに発現していたが、これも 12h 後には消失した。さらに培養時間が 12h を超えると出現すると思われるピークとして m/z6693、6837 が観察された。発芽過程のどのステージでも最も普遍的に検出できるピークとして m/z4334 が検出された。一方、培養液のマススペクトルは 2h 後まで変化がなく、6h 後に培地の特異ピークが消失し、12h 後から m/z6296 の新たな特異ピークが観察された。このように発芽過程の各段階で菌体と培地のマススペクトルが異なるため、不審物として回収された芽胞の MALDI-TOF MS による各発芽ステージの特異ピーク検出は、芽胞の調整状態の推定に有用である。

#### (4) MALDI-TOF MS による迅速スクリーニングのための微生物および生育培養液を対象とした迅速検出

細菌、真菌の菌体については、それぞれ異なる MALDI-TOF MS のマススペクトルが得られた。培養液についてはボツリヌス菌において、培養前と培養後のマススペクトルを比較すると、培養することで発生する分子群と思われるマススペクトル変化が観察された。さらにガンマファージに感染した ATCC4342 株の培養液において、ガンマファージ本体に由来すると思われるピーク (m/z6722) が観察されたことから、ウイルス含有培養液にも適用できることが示唆された。

#### (5) MALDI-TOF MS による微生物の迅速検出における賦形剤の影響

セレウス菌に賦形剤のバレイショポテト

スターチを添加したところ、賦形剤の容量依存的に検出阻害がかかり、10倍量のポテトスターチを混和したとき全く検出されず、等量の混和では、セレウス菌の低分子領域のピークは検出されたが高分子領域は検出されなかった。一方、賦形剤そのものを同時検出することを試みたが、本条件ではイオン化が困難であり、微生物の構成分子がイオン化するレーザー強度で全く賦形剤成分は検出されず、エネルギー強度を上げて高分子ポリマーの断片化を試みたが測定領域にフラグメントは検出されなかった。また実際に市販されている乳酸菌製剤から直接乳酸菌由来のピーク検出を試みたが、マススペクトルパターンは検出できなかった。しかし乳酸菌以外にも生薬を含有する製剤では、生薬成分と思われるピーク群が検出された。このことから分離培養を介さずに直接MALDI-TOF MSで得られるマススペクトルパターンでスクリーニングをする場合、賦形剤を混ぜて製剤化されると検出阻害が引き起こされることが確認された。

#### 結語

今回用いた病原微生物等のMALDI-TOF-MSによる迅速異同識別法は、抽出過程から解析まで30分以内で行うことが可能であり、既存のデータベースを適用することで、高病原微生物の炭疽菌、ペストなど細菌だけでなく、真菌及びウイルスを含む微生物の検出が可能であった。さらに高度に精製された芽胞の迅速検出は炭疽菌の栄養型にない芽胞特異的ピークを検出することで、芽胞が多量存在するという危険性を迅速に検出可能と思われた。逆に高度に精製されず、培養液が混入する場合、培養液のスペクトルを検出することで、微生物混入の疑いや製造方法を推察することが可能と思われた。しかし万能ではなく、微生物の製剤化という犯意の証明のために、微生物検出と同時に賦形剤の検出が出来ればと試みたが、同時検出どころか賦形剤の混入のような単純なものでも検出阻害が生じ、従来法どおりに資料からの微生物再培養も必ず実施する必要性も再確認された。

このように、病原微生物等のMALDI-TOF-MSは、迅速且つ簡便な手法であるため、微生物種や微生物の培養液、生物剤が疑われる未知試料のスクリーニング方法に有効と思われるが、今後より精度が高まると思われるが、その精度に合わせてスクリーニングに適用されることが望まれる。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計4件)

藤浪良仁、武藤淳二

ビーズ破砕法を用いたMALDI-TOF MSによる炭疽菌芽胞の迅速検出  
第88回日本細菌学会総会  
2015年

藤浪良仁、武藤淳二、水野なつ子

MALDI-TOF MSによる迅速スクリーニングのための微生物および生育培養液を対象とした迅速検出  
第89回日本細菌学会総会  
2016年

藤浪良仁

MALDI-TOF MSによる微生物の迅速検出における賦形剤の影響  
第90回日本細菌学会総会  
2017年

藤浪良仁

MALDI-TOF MSによる芽胞発芽におけるスペクトル変化の解析  
第91回日本細菌学会総会  
2018年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤浪 良仁 (FUJINAMI, Yoshihito)  
科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官  
研究者番号：30335632