第 23 回 ISH プログラム 2018

実験報告書

フーリエ変換赤外分光法(FT-IRS)による病原性未知大腸菌の同定

Typing of pathogenic E.coli stains by Fourier-Transform Infrared Spectros-copy(FT-IRS)

ハイデルベルク大学病院感染症学科

Department of Infectious Diseases, University Hospital Heidelberg (UHHD)

実験者　崇城大学生物生命学部

応用生命科学科 3 年　遠山穣

共実験者　USA　Annette Tsui

1. はじめに

本プログラムにおいて、ハイデルベルク大学病院に配属され、7 月 30 日(月)～8 月 16 日(木)の約 3 週間、「病原性未知大腸菌の同定」に関する実験を行った。

2. 目的

病原性未知大腸菌を同定することで、病原体に対する抗体がわかり、治療が可能となることがこの研究の目的である。今回の実験では 2 パターンの未知大腸菌同定方法を体験し、次世代同定法である FT-IRS がいかに効率的で優れているかを検証する。

3. 実験

まず①MULDI-TOF で用意された菌が大腸菌を判別し、②Anti-Coli-Antiseren で抗体抗原反応を示した大腸菌を③FT-IRS でデータ化した。集めたデータをもとに、未知大腸菌を②③の方法で同定し、それにかかる時間や操作を比較した。それぞれの実験について以下に示す。

① MULDI-TOF（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight）

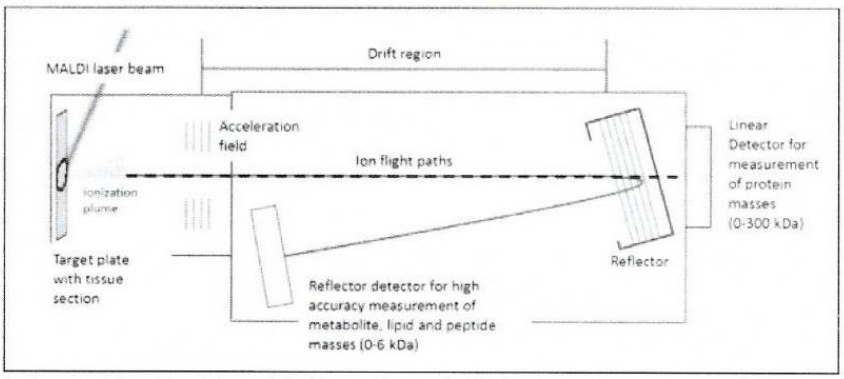

図 1　MULDI-TOF（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight）

〈原理〉

赤外線により細胞間質がイオン化して放出されるときの飛行時間で質量を分析する。イオン化において、サンプルのイオンは電気的自由漂流フィールドで加速する。大きなイオンは加速部位においてエネルギーを失い、小さなイオンに比べてゆっくり飛行する。このシステムが飛行時間によって質量を測定できる原理である。レーザーによる飛行時間は漂流フィールドの端から検出される。（図 1）

〈操作〉

1、冷蔵庫から菌を取り出し、血液培地に植菌し 24 時間 37℃で培養する。

2、培地から大腸菌を専用のプレートに薄く塗布し、乾燥させる。

3、大腸菌の上からギ酸を 1 μL 加え、40 度の加熱ブロック上で乾燥させる。

4、さらに上からマトリックスを 1 μL 加え、同様に乾燥させる。

5、MULDI-TOF で測定し、大腸菌かどうか判定する。（測定値は 2 以上）

② Anti-Coli-Antiseren

今回の実験では以下の５種類の抗体の混合液（Anti-Coli Ⅰ・Ⅱ・Ⅲ・8・9）を使用し、凝集反応が出たときに使用した混合液に含まれる抗体をさらに使用することで、大腸菌の同定を行った。（図２）

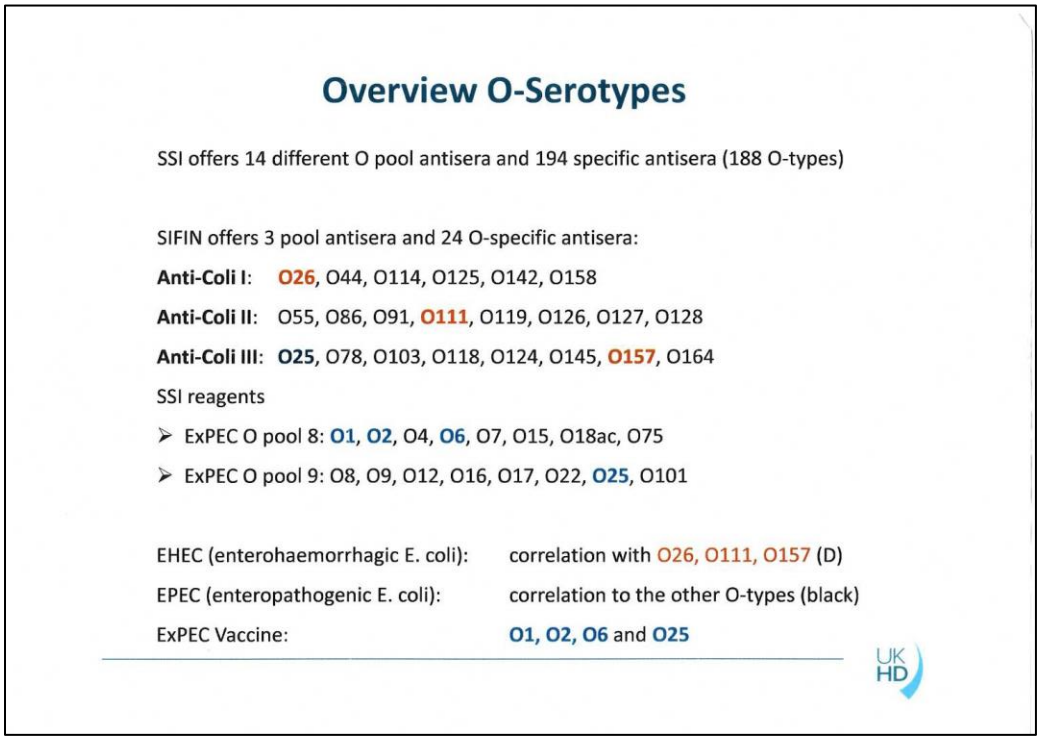

図２　実験で使用した抗体一覧（赤字は今回入手できなかったもの）

〈原理〉

大腸菌が反応液に反応する抗原を持っていれば、特異的な抗体を混合した際に結合する。その結合体は凝集反応を見せ、その反応は肉眼ではっきりと確認することができる。

〈操作〉

１、①で大腸菌と判定された菌を取り出す。

２、プレパラートに抗体の含まれた反応溶液を１，２滴落とし、そこに大腸菌を溶かして反応を見る。

３、大腸菌の抗原と反応液の抗体の種類が合えば、プレパラートに肉眼で変化が見え、それを陽性反応とし、陽性反応が出るまで実験室にある抗体を試す。

③　FT-IRS（Fourier-Transform Infrared Spectros-copy）

特異的な菌のスペクトラムを検出するシステムである。

以下の図３は大腸菌のスペクトラムである。

今回の実験では、②で抗原抗体反応が確認された大腸菌のデータを集めることで、未知大腸菌の同定を行った。（図４）

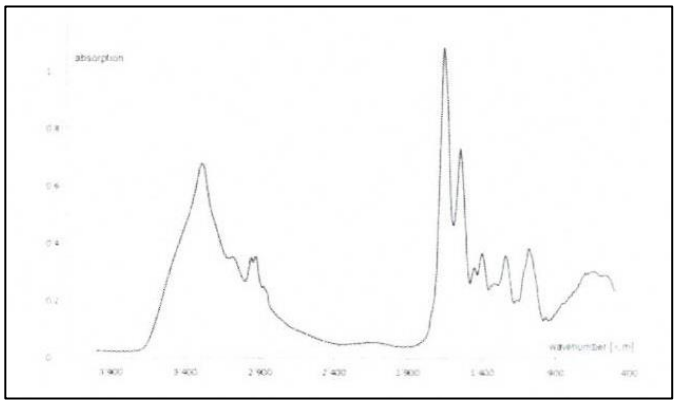

図３　大腸菌のスペクトラム

〈操作〉

１、鉄の撹拌子の入った 1.5ml のエッペンチューブに 50μL の 70%エタノールを加える。

２、1μL ループを使い大腸菌を前記のエッペンに入れ、エタノールに溶かす。

３、溶液が均質になるまでボルテックスにかける。

４、5 分以上待つ。（エタノールが大腸菌を殺菌し、代謝を止めるのに必要な時間）

５、A. dest を 50μL 加える。（アルコール濃度を下げ、表面張力を上げる。表面張力を上げることでプレートに添加した時他の水滴と混ざりにくくなる。）

６、溶液をマイクロタイタープレートに 15μL ずつ 5 スポットに添加する。スポットを溶液が覆い隠すように、マイクロチップで広げる。

７、機械で測定する。

4. 結果

①MULDI-TOF で検出した結果、いくつか大腸菌でない菌も発見された。検査の結果の例を図４、５に示す。未知大腸菌 KDOS8J は③FT-IRS で作成したデータ上に現れなかったため、今回使用しなかった抗体に対する抗原であることが考えられる。（図６）未知大腸菌 KDOS4A は、②の実験より O４４であることが判明し、確認として③で判定したところ同様の結果が得られた。（図７）

Ergebnisübersicht

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs-zahl
(+) (B)	825037 (Standard)	Escherichia coli	1.93	Escherichia coli	1.93
(-) (C)	825408 (Standard)	**Keine Identifikation möglich**	1.46	**Keine Identifikation möglich**	1.46
(-) (C)	825396 (Standard)	**keine Peaks gefunden**	0.00	**keine Peaks gefunden**	0.00
(+) (B)	825338 (Standard)	Escherichia coli	1.86	Escherichia coli	1.86
(+) (B)	825454 (Standard)	Escherichia coli	1.94	Escherichia coli	1.94
(+++) (A)	825446 (Standard)	Escherichia coli	2.20	Escherichia coli	2.20
(-) (C)	825441 (Standard)	**keine Peaks gefunden**	0.00	**keine Peaks gefunden**	0.00

Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung auf nächster Seite

図 4　MULDI-TOF による大腸菌の判定結果

Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung von vorheriger Seite

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs-zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs-zahl
(+++) (A)	29156 (Standard)	Escherichia coli	2.38	Escherichia coli	2.26
(+++) (A)	29136 (Standard)	Escherichia coli	2.33	Escherichia coli	2.25
(+++) (A)	29124 (Standard)	Escherichia coli	2.33	Escherichia coli	2.23
(+++) (A)	29122 (Standard)	Klebsiella pneumoniae	2.06	Klebsiella pneumoniae	2.02
(+++) (A)	EX838 (Standard)	Escherichia coli	2.41	Escherichia coli	2.26
(-) (C)	29137 (Standard)	**keine Peaks gefunden**	0.00	**keine Peaks gefunden**	0.00
(+++) (A)	29119 (Standard)	Escherichia coli	2.37	Escherichia coli	2.30
(+++) (C)	29135 (Standard)	Escherichia coli	2.31	Shigella dysenteriae	2.19

図 5　MULDI-TOF による大腸菌の判定結果

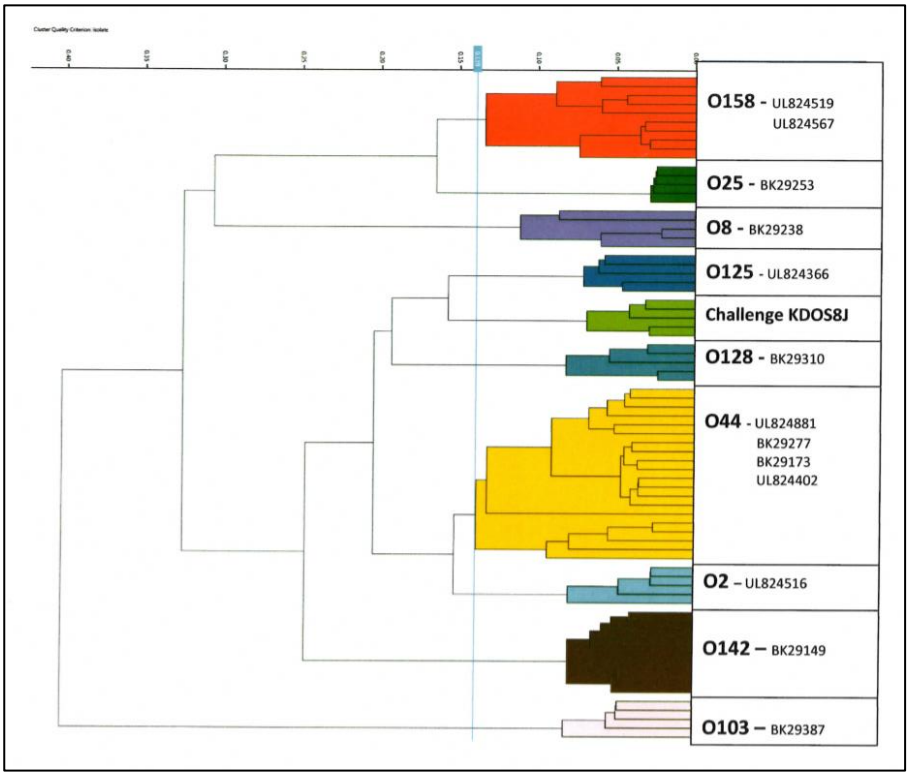

図 6　FT-IRS によるデータ上にプロットされた
未知大腸菌の判定結果（Challenge　KDOS8J）

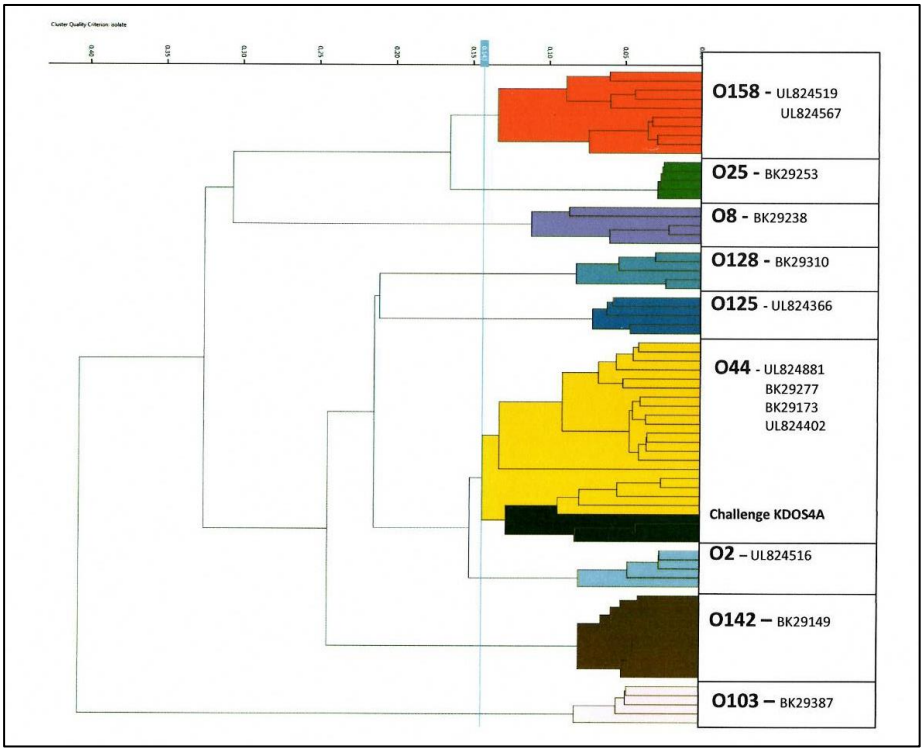

図 7　FT-IRS によるデータ上にプロットされた
未知大腸菌の判定結果（Challenge　KDOS4A）

5. 考察

FT-IRS での同定は 30 分程度で終わり、MULDI-TOF と Anti-Coli-Antiseren は作業と判定に 1 時間ほどの時間がかかった。FT-IRS により作業効率と同定効率が上がることが分かった。

6. 感想

初めての土地で初めて行う実験は、とても自分にとって新鮮なものとなりました。自分の大学にはない設備などを体験させていただいたことで、視野も広がり、良い経験となりました。これから、自分の研究を進めていくことになりますが、今回 ISH プログラムで経験させていただいたことが、きっと活きてくると思います。実験から最後の発表まで、親切にサポートしてくださったチューターの方々、ご協力いただいた方々にここで感謝の気持ちを表します。このプログラムに参加して本当に良かったです。ありがとうございました。