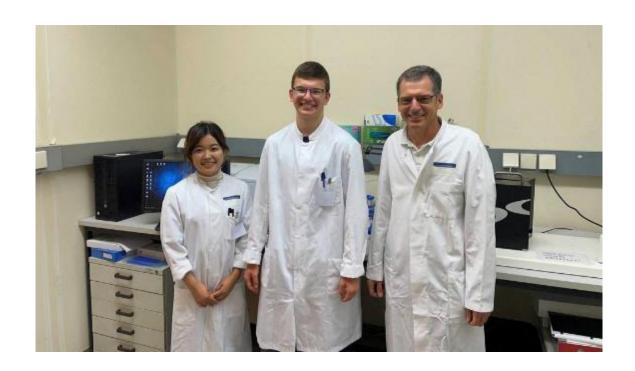
# The 25th International Summer Science School in Heidelberg 2022

# 研究報告書 -Typing of Salmonella stains by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy-



令和4年9月16日 崇城大学 応用生命科学科 4年 清水 みのり

#### 1. はじめに

熊本市と 1992 年 5 月より友好都市協定を結んでいる、ドイツ・ハイデルベルク市に 1 ヶ月派遣された。その内の 14 日間で私は University Hospital Heidelberg(ハイデルベルク大学病院)の Zimmermann 研究室にて実験を行った。

## 2. University Hospital Heidelberg について

ハイデルベルク大学病院は、44 科の診療科があり現在ドイツとヨーロッパの両方で最大かつ最も有名な病院の1つ。この病院では、毎年約100万人の外来患者と7万人の入院患者を治療している。学生はヨーロッパ圏だけでなく、中東やアジアからの学生が多く在籍していた。

## 3. サルモネラ菌について

サルモネラ菌は2千種類以上が存在しており、種類によって症状が異なる。その中でも サブグループである腸チフス菌やパラチフス菌は、より重篤な疾患を引き起こし、資源が 乏しい国だけでなく菌血症の主な原因となっている。鶏・豚・牛等の動物の腸管や河川・ 下水道等の自然界に広く生息し、経口・接触感染によってサルモネラ症を引き起こす。サ ルモネラ症の主な症状としては痙攣性の腹痛や吐き気が発症する。

### 4. MALDI-TOF MS(質量分析計)と FT-IRS による細菌のタイピングについて

MALDI-TOF MS(質量分析計)に FT-IRS を組み合わせることで迅速な細菌の種(species)レベルの同定と、同じ種の細菌のタイプ分け(タイピング)をすることができる。まず MALDI-TOF MSは細菌のペプチド断片のマススペクトルを測定してデータベースを照合することで細菌の種が同定



できる。次に FT-IRS (フーリエ変換赤外分光法)により、同一種の異なるタイプを判別する。 FT-IRS は急速に発展している簡便な細菌識別技術であり、FT-IRS のなかでも IR-Biotyper は ANN(Artificial Neural Network)と呼ばれる学習アルゴリズムにより測定細菌のリボ多糖(LPS: Lipopolysaccharide) O 抗原細菌に固有の赤外線の吸収スペクトルを読み、対象細菌の特性と既存のデータとを照合し瞬時に分類を行うことができる。本研究では、より病原性の高い腸チフスおよびパラチフス関連サルモネラ菌(S. typhi および S. paratyphi A-C)と他の腸内細菌との識別を行い、さらにサルモネラ菌のタイピングを行った。

### 5. 実験目的

従来、サルモネラ菌体抗原の各型に対するウサギ免疫グロブリン血清による検査が一般的である。しかしながら、検査結果には4週間ほどの期間を要し動物の血清を使用しているという欠点があり、院内感染などの際にはできるだけ早く菌タイプを知ることが重要なのでより迅速な方法の開発が望まれてきた。次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer)技術の発達により、細菌の全ゲノム DNA 配列を決めることも以前より早くできるようにはなったが、最短でも1週間くらいはかかるので現場のニーズにマッチしたスピードとは言えない。これに対して、FT-IRS は1-2 日ほどで結果が得られることである。本研究では、MALDI-TOF MS(質量分析計)FT-IRS ベースの IR-Biotyper の識別力に注目し、サルモネラ菌の迅速かつ信頼性の高い同定を行うことを目的とする。さらに、より病原性の高い腸チフス菌とパラチフス菌の識別を試みる。

## 6. 実験内容

· 使用機器、試薬

サルモネラ感染患者 77 名から採取したサルモネラ 77 サンプル

FT-IRS (Bruker Optics K.K.)

MALDI (Bruker Optics K.K.)

ウサギ抗血清(Sifin)

コロンビア 5%ヒツジ血液寒天培地(BD ProbeTec ET)

ミニシェーカー(IKA MS1)

プライミング/ウォーミングヒーター(BD ProbeTec ET)

## ・手法

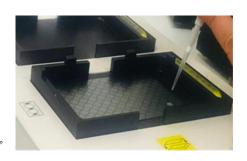
## ①解凍、継代

-80℃の超低温冷凍庫からセラムチューブに入った スキムミルク状態のサンプルを取り出し、血液寒天 培地にディスポループを用いて塗布した。37℃の インキュベーターで一晩静置培養させた。培養後、 新しい寒天培地に旧培地から適量取り出し継代し た。



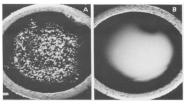
# ②FT-IRS(マイクロプレートリーダー)による計測

70%エタノール 50  $\mu$ ℓ、①の培地からサルモネラ菌をエッペン(鉄製攪拌子入り)に入れミニシェーカーで攪拌した。その後、蒸留水 50  $\mu$ ℓを入れ再びミニシェーカーにかけた。その後、マイクロプレートの各ポジションに 15  $\mu$ ℓ程度の試料液を滴下してウォーミングヒーターにより乾燥させた。マイクロプレートは赤外分析用の 96 穴のメタルプレートを用いた。



## ③Agglutination(凝集判定)

本研究では、並行してすべての分離株をウサギ抗血清 凝集法(Fig.1)での同定をした。対照実験としてウサギの 抗血清 (Poly I, Poly II, O:9, O:4, O:7 など)を用いて 実験を行った。スライドガラスを黒い背景の上に置き、 NaCl (陰性指示薬) 1 滴、抗血清 1 滴垂らした。1 分間



場性 B.降

以内に凝集塊が生じる強い凝集が観察されたものを陽性、乳白色のままを陰性とした。The White-Kauffmann-Le-Minor Scheme(Fig.2)に基づいた分類表に従って第一段階の識別を行った。



Fig.1 Rabbit antisera

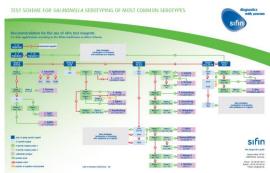


Fig.2 Salmonella antisera serotyping chart

# 7. 結果と考察

# (1) FT-IRS

77 サンプル中からチャレンジ株 38 株について検討を行い、38 種類のデータベース系統解析と多変量解析によるタイピングを行った。

Fig.3 は FT-IRS スペクトルデータの多変量解析の二次元 PCA(主成分分析)の結果を示している。FT-IRS は O:4、O:9、O:7 血清群の間で高い識別力を示した。

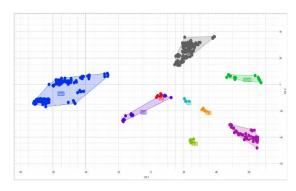


Fig.3 Compare Subtypes; PC (2D)

Fig. 4 は FT-IRS スペクトルデータの多変量解析の三次元 PCA(主成分分析)の結果を示している。Fig. 3 の二次元 PCA と同じく、各 O 抗原タイプがよく識別されていることがわかる。

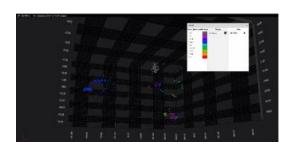


Fig.4 Compare Subtypes; PCA(3D)

# (2) Agglutination

凝集判定との相関については、38 株中 35 株が FT-IRS の結果(Fig.5)と凝集判定の結果とが一致した(92.1%)



Fig.5 Stains result

### 8. おわりに

ハイデルベルグ大学で過ごした 3 週間では、最新の機器に触れながら実験を行うことができた。教授や研究室の先輩方とは、食事や会話を楽しみながら文化の違いを発見していき仲を深めていった。Dr. Zimmermann、Dr. My-Lan は親日家で帰国後も来日の連絡などのやり取りを続けている。パートナーの Yegor(イスラエル出身)はコンピューターサイエンスに優れており、切磋琢磨しながら研究に取り組んだ。

最後に本実験を行うにあたり、終始熱心なご指導を頂いた Dr. Zimmermann、Dr. My-Lan、Annette、Galina、Sama,そして共同実験者の Yegor に感謝の意を表したい。 ありがとうございました。