

〈特集：第27回生物試料分析科学学会（新潟）教育講演〉

質量分析は臨床検査でどこまで活用できるか？

野村 文夫

Applications of mass spectrometry to laboratory medicine -Present and promising future-

Fumio Nomura

Summary Mass spectrometry (MS) is a powerful analytical tool used in an increasing number of clinical laboratories around the world. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) has been used for newborn screening, toxicology, therapeutic drug monitoring, endocrinology, and more recently for measurements of targeted proteins and peptides. Although immunoassay-based methods have dominated the clinical chemistry field for many years, LC/MS/MS has offered significant advantages over immunoassays in terms of analytical specificity. Moreover, LC/MS/MS enables simultaneous measurements of multiple targets within a single run. Use of LC-MS/MS in clinical chemistry laboratories, however, has remained very limited because of substantial challenges. These challenges include the high capital cost of equipment, requirements for a skilled labor force, lack of standardization and automation, and also regulatory uncertainties and reimbursement issues.

The most successful application of this technology is bacterial identification based on matrix assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry (MALDI – TOF MS). Indeed, a revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology has been made. Identification results are generated within 10 min in contrast to almost one day when conducted by the traditional methods. The rate of successful identification at the species levels, however, is still not 100%. One of the reasons for the problematic identifications may be incomplete databases. Also, for some pathogens such as *Nocardia*, extensive pretreatment of the samples is required to obtain appropriate bacterial proteomic profiles. The MS-based method is useful for direct analysis of bacteria in three types of specimens; urine, cerebrospinal fluid (CSF), and blood. In addition to identification of bacteria, other uses of MS in clinical microbiology are being actively investigated particularly for detection of antibiotic resistance. For this purpose, LC/MS/MS could be more appropriate than MALDI-TOF MS.

Undoubtedly, MS is going to play major roles in laboratory medicine in very near future. To meet with rapid progress in applications of MS to laboratory medicine, it is mandatory to have

MS-oriented staff. The Japanese Society for Biomedical Mass Spectrometry has started to certify medical mass spectrometrists in 2013. As of Dec. 2017, a total of 265 persons have been certified.

Key words: mass spectrometry, MALDI – TOF MS, LC/MS/MS, medical mass spectrometrists

I. はじめに

質量分析技術 (MS) が臨床検査室レベルで活用されるようになったのは最近のことであるが、技術それ自体の歴史は古く、基本原理が初めて示されたのは19世紀末にさかのぼる。MSの医療応用ではガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) の利用が早く、1966年に米国エール大の日本人研究者田中圭氏らがGLC-MSを用いて有機酸の先天代謝異常症のイソ吉草酸血症を発見した¹⁾。1981年には米国の空母Nimitzの事故を契機にMSが注目されることとなった。海兵隊員のマリファナ使用が問題となり、多くの隊員を対象とした尿検体のスクリーニング検査が行われたが、当初用いられた免疫学的方法では多くの偽陽性が存在することがGC-MSによる確認検査の結果明確に示された。このことがMS技術の社会的認知につながるとされている²⁾。1980年代後半になると2002年のノーベル化学賞の受賞対象となった田中耕一氏のソフトレーザー脱離イオン化法の考案とmatrix assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometer (MALDI – TOF MS) の進歩、J. B.Fenn氏によるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) の開発の結果、解析対象が従来の低分子化合物から高分子化合物に広がることとなった。そして、低分子化合物においてもESIとLiquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) の組み合わせによる定量法が急速に普及し現在に至っている。

II. 質量分析技術 (MS) とその検査応用の概要

2017年3月31日付で質量分析装置が薬機法 (「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」) 上、正式に医療機器の一般名称として承認されるに至った (薬生発0311第1号)。MSの臨床検査応用にとって2017年は大きな節目の年であり、今後に向けて

の追い風となると期待される。

臨床検査においてMSが現在活用されている、あるいは今後利用されると思われる領域を手別にTable 1に示した。質量分析を利用した先天代謝異常症の診断においては先ずGC/MSが利用されたが、現在でも有機酸代謝異常症においてGC/MSによる尿中有機酸分析はきわめて重要である³⁾。我が国における新生児マススクリーニングでは①フェニルケトン尿症、②ホモシスチン尿症、③メープルシロップ尿症の3つのアミノ酸代謝異常、④先天性甲状腺機能低下症、⑤先天性副腎過形成、⑥ガラクトース血症の計6疾患が対象となっていたが、タンデムマス法の導入により従来のアミノ酸代謝異常症 (①～③) を含む22疾患 (一次対象疾患は16疾患) を1回の検査でスクリーニングできるようになった⁴⁾。しかし、その他の3疾患 (④～⑥) については従来の方法を続ける必要がある。タンデムマススクリーニングは2011年の厚労省からの通達を受けて全国すべての自治体に普及している。LC/MSは法医学における薬毒物分析や血中薬物濃度モニタリングにおいても必須のツール

Table 1 Applications of mass spectrometry to laboratory medicine

GC/MS

- ◆薬毒物分析
- ◆有機酸代謝異常症, メタボローム解析など

LC/MS/MS (ESI/APCI)

- ◆先天代謝異常症のスクリーニング
- ◆法中毒分析, 血中薬物濃度モニタリング
- ◆臨床化学 (ホルモン, ビタミン, 脂質等)
- ◆臨床微生物 (タイピング, 耐性検出など)
- ◆遺伝型タイピング, DNAメチル化解析

MALDI-TOF MS

- ◆臨床微生物 (細菌・真菌の迅速同定)
- ◆質量分析イメージング (MALDI-IMS)

となっている⁵⁾。MSは遺伝子関連検査においても利用可能であり、DNA-freeの遺伝型決定⁶⁾、DNAメチル化解析⁷⁾などへの活用が報告されている。さらに質量分析イメージングも新たな応用分野として重要であり、病理学領域におけるbreakthroughとなっている⁸⁾。このようにMSの臨床応用はきわめて多岐にわたるが、本稿では現時点で病院の臨床検査室と縁が深い臨床化学と臨床細菌学を取り上げる。

Ⅲ. 臨床化学領域における質量分析

1. 質量分析技術 (MS) の利点と欠点 (課題)

臨床化学領域におけるLC/MS/MSの利点をTable 2にまとめた。

なお、LC/MS/MSという表記は検査技術自体を指し、LC-MS/MSは検査機器を示す。

各種イムノアッセイは感染症関連の抗原・抗体検査、腫瘍マーカーをはじめとする検査に多用され、検査部の化学検査室の主役である。しかし、イムノアッセイでは同一項目について多くの検査試薬が存在し、使用される抗体も異なるため、測定法間差・試薬間差が生じる。そして低濃度域の定量性が不十分なこと、類似物質と抗体の交差反応により特異度が十分でない場合があることなどの課題が指摘されてきた。

また、イムノアッセイでは特異抗体が持続的に供給され、入手可能であることが大前提である。我が国におけるバゾプレッシン (AVP) の唯一の測定系であったRIAで使用されていた抗血清の供給が停止されたため、一時期本邦におけるAVPの測定がストップしてしまったことはまだ記憶に新しいが、抗体に依存し過ぎることの危うさを示している。

一方、MSとくに大気圧イオン化 (APCI) またはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) と

selected reaction monitoring (SRM) モードを用いた三連四重極質量分析計によるLC/MS/MSは特異性が高く、高感度であり、かつ多項目の同時測定が可能で、ランニングコストも低い。

しかし、初期投資に費用がかかり、機器の操作、維持、管理に専門的知識が要求されること、現時点ではマニュアル操作に頼る部分が多く、サンプルの前処理操作 (臨床検体からの抽出、分離精製、誘導体化など) が必要なことが問題であり、現状では外来患者に対するいわゆる診察前検査としての利用は困難である。今後は自動化も含め、検査系をいかに簡便化できるかが課題である。一方で目的物のイオン化抑制にも常に注意を払う必要がある。さらにイムノアッセイのようにコマーシャルベースで測定系全体が提供されるわけではないので、現時点では項目ごとに至適な条件を組み合わせるIn-houseで測定系を作り上げる技術と知識、経験が求められる。

筆者らも参考にしているその概要⁹⁾をFig. 1に示した。

以上のようにLC-MS/MSを用いた臨床化学検査においては、正確性・精密性は申し分ないが、迅速性、簡便性、保険償還に課題がある。互換性については従来、MSはイムノアッセイに比して施設間差が小さいと考えられてきたが、使用するstandardやcalibratorの違いによりある程度の施設間差が生じ得るので、機器と関連試薬を一体に考えた実用化が必要である。

2. 質量分析技術 (MS) によるホルモン測定 (ビタミンDを含む)

ステロイドホルモン、ペプチドホルモンの測定の主流は各種イムノアッセイであるが、LC/MS/MSが徐々にかつ確実に普及しつつある。

例えば、テストステロン、エストラジオールなどの性ホルモンについては、それぞれ成人男性、成人女性における中・高濃度域の測定については現行のイムノアッセイでも可能であるが、低濃度域、すなわち女性・小児におけるテストステロンの測定、男性・小児・更年期女性などにおけるエストラジオールの測定においてはイムノアッセイに限界があり、LC-MS/MSによる測定がより正確である¹⁰⁾。またエストラジオール (E2) だけでなく、エストロン (E1)

Table 2 Advantages of LC/MS/MS in clinical chemistry

- ◆同一試料からの多項目同時分析
- ◆前駆体・代謝物の一斉分析
- ◆感度・特異度の改善
- ◆施設間差・方法間差の縮小
- ◆抗体に依存しないことによる検査の継続性の確保
- ◆ランニングコストの軽減
- ◆他の測定系に対する Gold standard

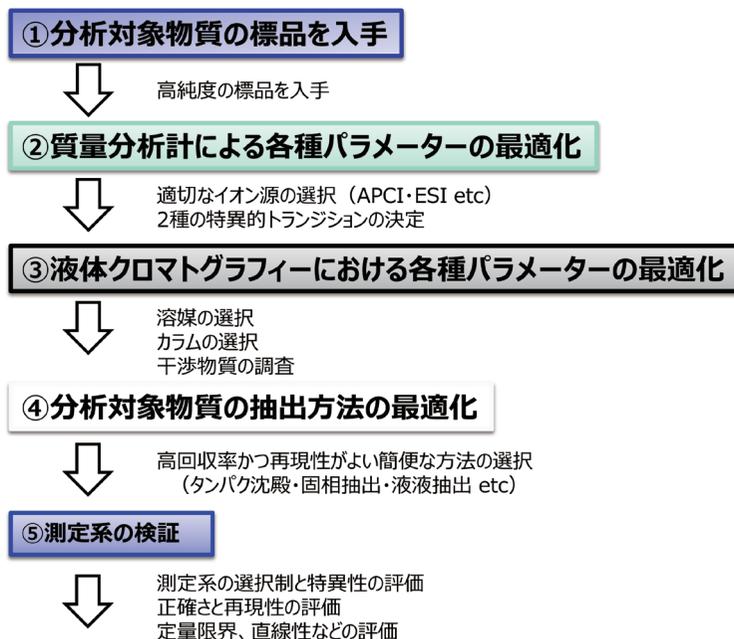


Fig. 1 Method development workflow for analysis of small molecules by LC/MS/MS (from ref 9 with modification)

も同時測定できるのでより深い解析が可能となる。

ビタミンDはカルシウム代謝調節に必須な脂溶性ビタミンとして知られてきたが、活性化ビタミンDが骨代謝調節以外にも多岐にわたる生理活性を有することが明らかとなり、ビタミンDの不足が多くの疾患の易罹患性を高めることが注目された。その結果、生体におけるビタミンDの過不足の示標となる血中25OHビタミンD (25OHD) の測定の依頼件数が諸外国では指数関数的に増加したが¹¹⁾、現在は、その測定の適応が厳しく見直されている。我が国においては2016年より保険診療で実施可能となったが、測定法が一部のイムノアッセイに限定された形になっている。

血中25OHDの大部分は25OHD₂として存在するが、ビタミンD₂のサプリメントを常用している場合は25OHD₂の比率が増してくる。従来のイムノアッセイは25OHD₂と25OHD₃を測り分けることができないだけでなく、その他の代謝物も測り込む可能性があり、特異性が十分とは言えない。25OHDの測定においてはLC-MS/MSがgold standardであり、日本臨床化学会の標準化

専門委員会の見解¹²⁾でも、自施設の測定値がLC-MS/MSとのトレーサビリティを確保していることが求められている。同委員会の25OHD測定の標準化に向けた活動においてもLC/MS/MSによる測定値がgold standardとして用いられている¹³⁾。

筆者らはLC/MS/MSによる25(OH)D₃、3-epi-25(OH)D₃、25(OH)D₂、24,25(OH)2D₃、1,25(OH)2D₃の分別定量法を開発し、臨床応用している¹⁴⁾⁻¹⁵⁾ (Fig. 2)。これらの代謝物を分別測定できることの意義は単にビタミンD₂の影響を除くだけでなく、3-epi体の割合が比較的多い新生児サンプルの測定を正確にするために必要である。さらには乳児でみられる原因不明の高カルシウム血症においてはCYP24A1遺伝子変異による24,24(OH)2D₃の異常低値の確認が鑑別診断上重要である¹⁶⁾。

IV. 臨床微生物検査における質量分析技術 (MS)

1. 歴史的変遷

MSの微生物同定への応用はGC-MS時代の1970年代にさかのぼる¹⁷⁾。その後のMALDIの発

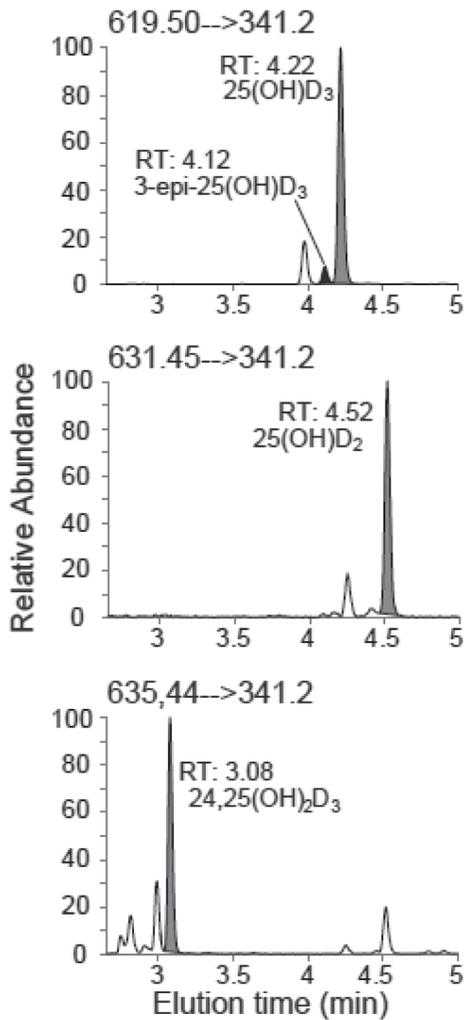


Fig. 2 SRM chromatograms of vitamin D metabolites by LC/MS/MS

展を受けて、すでに1996年頃からMALDI-TOF MSを用いた菌体のプロテオーム解析による細菌同定に関する報告が複数なされた。しかし、本手法が微生物同定法として臨床細菌検査室で広く受け入れられるまでにはその後かなりの期間を要した。その理由として、①プロテオームは生体内でダイナミックに変化するものなので、培養条件の影響を受けやすいという懸念、②MSスペクトルの差異が現在確立されている分類法と完全に一致するかどうかについての疑問、③不完全なデータベース、④細菌学者から

みて微生物同定という大変な作業がそれ相応の鍛錬を受けていない者でもあまりにも容易にできてしまうことに対する疑念、⑤初期の論文が公表される雑誌がMS関連誌に偏り過ぎていたこと、などが指摘されている¹⁸⁾。

2. コロニーからの直接同定

我が国では解析ソフトと分析機器が一体となったMALDI BiotyperとVITEK[®]MSが市販されており、いずれの機器も検査の保険償還が可能である。平成30年度の診療報酬改定により質量分析加算が認められることとなった。2017年12月20日時点の我が国の医療機関における稼働台数をそれぞれのメーカー担当者に直接確認したところ、両者を合わせて約170 (MALDI Biotyper 約120、VITEK MS 約50) となっている。現状では感受性検査は原則、従来法により実施する必要があるが、迅速同定法として細菌検査室における必須の技術となり、最近日本臨床微生物学会からハンドブックが発刊された¹⁹⁾。一般細菌の同定能力についての評価はほぼ定まり²⁰⁾⁻²¹⁾、抗酸菌²²⁾ や糸状菌²³⁾ の同定への応用が進んでいる。

MALDI-TOF MSによる一般細菌 (一部の真菌を含む) の同定率は種レベルでも90%を超えるが、100%とならない理由は主として3つある。1つ目はデータベースの問題である。MALDI-TOF MSによる微生物同定能力はデータベースの質と量に大きく左右される。すなわちその菌種がデータベースに存在しないあるいはデータ量が不十分な場合はMSスペクトルが得られても同定に至らない。筆者らも市販のデータベースに当施設での分離株のスペクトルを追加した強化データベースを用いることにより、同定率が上昇することを確認している²⁴⁾ が、市販のデータベースも定期的な改良が行われている。

第2の理由は菌によっては適切な前処理が必要な点である。本技術の利点の1つは簡便性にあり、コロニーの一部をMALDI プレートに直接塗布し、マトリックスを加えてそのままTOF MSを行える場合も多いが、菌種によっては菌体の十分な蛋白質抽出のための前処理を加える必要がある。ブドウ球菌などではプレート上での処理が可能であるが²⁵⁾、マイコバクテリウム属、ノカルジア属などではより強力な抽出処理

が必要である。結核菌などでは十分な前処理は蛋白質抽出だけでなく、不活化により操作上の安全性を担保するためにも必要である。ノカルジア属については強力な前処理が必要なこと、そして市販のデータベースが不十分であることから、筆者らは前処理法の改良および千葉大学真菌医学センターの協力を得てデータベースの強化を行うことにより、Table 3に示したようにその同定率が飛躍的に増加したのでルーチン検査においても活用している²⁶⁾。

さらに第3の理由として、遺伝子レベルで近縁の菌種の区別が困難な点があげられるが、従来は判別困難とされた菌種においてもMSの活用が模索されている²⁷⁾。また、MALDI-TOF MSによる微生物同定に関しては在院日数の短縮やコスト削減など実際面への貢献を示す報告も増えている²⁸⁾。

3. 尿、髄液、血液培養陽性検体からの直接同定
本技術は現時点では同定のためには一定量以上の菌量が必要なことからコロニー形成をみて

から利用される場合が多いが、特に迅速性が求められる血液培養では培養陽性と判明した時点で培養液から直接同定作業に入ることが可能であり迅速診断としての意義が大きく、菌種により異なるが60～80%程度の陽性率が得られている²⁹⁾。しかし、血液培養液にはヘモグロビンを初めとして細菌以外の蛋白質が大量に含まれているので、菌体を選択的に回収するための前処理が必須であり、内外から多数の報告がある^{30)–32)}。

尿路感染症の診断においても一定量以上の菌体量があれば直接同定が可能であるが³³⁾、複数菌の場合の対応が課題である。MALDI-TOF MSによる診断の迅速性は治療開始までに時間的猶予がない細菌性髄膜炎において威力を発揮する、筆者らも*Klebsiella pneumoniae*による細菌性髄膜炎の診断にMALDI-Biotyperが有用であった症例を報告している³⁴⁾。

4. 今後の課題—Beyond identification

近年、MALDI-TOF MSによる細菌同定の領

Table 3 Identification rates of *Nocardia* isolates before and after Augmentation by in-house data base (Analysis of 64 isolates) (from Ref 26 with modification)

	No. of isolates	Before the NDCUH introduction			After the NDCUH introduction		
		Species level	Genus level	No match	Species level	Genus level	No match
<i>N. abscessus</i>	2			2	1	1	
<i>N. aobensis</i>	2		1	1	2		
<i>N. arthritidis</i>	2			2	1	1	
<i>N.a asiatica</i>	3	2	1		3		
<i>N. asteroides</i>	2			2	2		
<i>N. beijingensis</i>	2			2	2		
<i>N. brasiliensis</i>	2		2		2		
<i>N. concava</i>	2	1		1	1	1	
<i>N. cyriacigeorgica</i>	4			4	4		
<i>N. elegans</i>	4		3	1	4		
<i>N. exalbida</i>	2			2	2		
<i>N. farcinica</i>	7			7	7		
<i>N. niigatensis</i>	2		2		2		
<i>N. nova</i>	8	5	3		7	1	
<i>N. otitidiscaviarum</i>	3		2	1	3		
<i>N. paucivorans</i>	1	1			1		
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	2			2	1	1	
<i>N. puris</i>	3			3	3		
<i>N. transvalensis</i>	2	1	1		1	1	
<i>N. veterana</i>	2		1	1	2		
<i>N. vinacea</i>	2			2	2		
<i>N. wallacei</i>	5			5	5		
Total	64	10(15.6%)	16(25.0%)	38(59.4%)	58(90.6%)	6(9.4%)	0(0.0%)

域ではBeyond identificationとしてstrain typingや抗菌薬に対する感受性・耐性の判定への利用が求められている。Strain typingではたとえば大腸菌のH抗原によるタイピングなどの成功例の報告が増えている³⁵⁾。同定された菌種の抗菌剤に対する感受性・耐性の判別におけるMALDI-TOF MSの役割については最近の総説に記載されている^{36)–37)}。未だ広く実用化される状況ではないが、carbapenemase 活性の検出³⁸⁾ や耐性に関わるporinの変化の検出³⁹⁾ などが試みられている。PubMedにおけるMALDI&bacteriaとLC-MS/MS&bacteriaのキーワード検索により関連する論文数の年次別推移を調査してみると、LC-MS/MS関連の論文が確実に増えていることが明らかであり (Fig. 3)、例えばブドウ球菌の同定と薬剤感受性を同時に検出できる手法が報告されている⁴⁰⁾。

一方、血液培養陽性ボトルからの迅速同定においては遺伝子レベルの手法も進歩している⁴¹⁾。原因菌と薬剤耐性遺伝子の同時検出が可能な自動多項目同時遺伝子関連検査システムも登場しており、MSベースの手法との比較検討が始まっている⁴²⁾。

V. おわりに

MSの技術革新により臨床検査が大きく変わろうとしている。

特にMALDI-TOF MSによる迅速微生物同定

は臨床細菌検査における必須の手法になりつつあるが、今後はLC/MS/MSの役割が増していくと予想される。またLC/MS/MSの臨床化学への応用においては操作性の簡便化、保険償還など課題はあるが、近い将来臨床検査室の中核的な技術となることは確実である。しかし、分析技術がいかに進歩したとしてもこれらの技術は臨床微生物や臨床化学の検査を熟知した者が従来の手法と適切に組み合わせて活用するべきであることを強調したい。質量分析技術の臨床検査応用がさらに加速することに備えて日本医用マススペクトル学会では4年前より医用質量分析認定士制度 (<http://www.jsbms.jp/>) がスタートし、2017年12月20日現在で臨床検査技師を中心にすでに265名が認定を受けている。

文献

- 1) Tanaka K, Budd MA, Efron ML and Isselbacher KJ: Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A, 56: 236-242, 1966.
- 2) Jannetto PJ and Fitzgerald RL: Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. Clin Chem, 62: 92-98, 2016.
- 3) Kuhara T: Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 855: 42-50, 2007.
- 4) 山口清次編; タンデムマス・スクリーニングガイドブック. 診断と治療社, 東京, 2013.

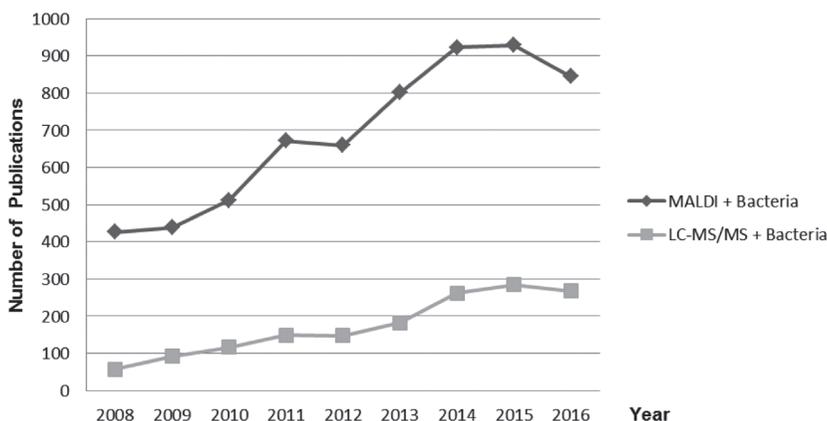


Fig. 3 Number of MS-based bacterial study reported in PubMed from 2008 to 2016

- 5) 丹羽利充・野村文夫編; 石井 晃 他: 法医学における質量分析. 医用質量分析ガイドブック, 128-133, 診断と治療社, 東京, 2013.
- 6) Nishimura M, Satoh M, Nishimura S, Kakinuma S, Sato K, Sawai S, Tsuchida S, Kazama T, Matsushita K, Kado S, Koda Y and Nomura F: Human apolipoprotein e resequencing by proteomic analysis and its application to serotyping. *PLoS One*, 9:e85356. 2014.
- 7) Huang Q, QinjinYang, Mo M, Ye X, Zhang J, Zhang L, Chen B, Li J and Cai C: Screening of exon methylation biomarkers for colorectal cancer via LC-MS/MS strategy. *J Mass Spectrom*, 52: 860-866, 2017
- 8) Caprioli RM: Imaging mass spectrometry: Molecular microscopy for the new age of biology and medicine. *Proteomics*, 16: 1607-1612, 2016.
- 9) Bozovic A and Kulasingam V: Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: From small molecules to proteins. *Clin Biochem*, 46 : 444-455, 2013.
- 10) Kushnir MM, Rockwood AL and Bergquist J: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrometry Reviews*, 29 : 480-502, 2010.
- 11) Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, and Herrmann M: State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem*, 58 : 531-542, 2012.
- 12) 渭原 博, 岡野登志夫, 橋詰直孝: 血清25ヒドロキシビタミンD測定の標準化に関する日本臨床化学会栄養専門委員会の見解. *臨床化学*, 38: 140-151, 2009.
- 13) 西村 基, 佐藤 守, 石毛 崇之, 東 達也, 野村 文夫: 自動分析法による血清25ヒドロキシビタミンD測定値の標準化 SRM 972aを校正に用いた測定. *臨床化学*, 44 (Suppl). 1 : 117, 2015.
- 14) Satoh M, Ishige T, Ogawa S, Nishimura M, Matsushita K, Higashi T and Nomura F: Development and validation of the simultaneous measurement of four vitamin D metabolites in serum by LC-MS/MS for clinical laboratory applications. *Anal Bioanal Chem*, 408: 7617-7627, 2016.
- 15) Ishige T, Satoh M, Ogawa S, Nishimura M, Matsushita K, Higashi T and Nomura F: Improved sensitivity of serum/plasma 1 α ,25-dihydroxyvitamin D quantification by DAPTAD derivatization. *Clin Chim Acta*, 473: 173-179, 2017.
- 16) Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S, Irwin A, Goos C, John U, Misselwitz J, Klaus G, Kuwertz-Bröking E, Fehrenbach H, Wingen AM, Güran T, Henderop JG, Bindels RJ, Prosser DE, Jones G and Konrad M. Mutations in *CYP24A1* and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med*, 365: 410-421, 2011.
- 17) Anhalt JP and Fenselau C: Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*, 47: 219-225, 1975.
- 18) Welker M: Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics*, 11: 3143-3153, 2011.
- 19) 日本臨床微生物学会: 臨床微生物質量分析計検査法ハンドブック. *日本臨床微生物学雑誌*, 27 (Suppl), 2017.
- 20) Croxatto A, Prod' hom G and Greub G: Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 36: 380-407, 2012.
- 21) Nomura F: Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) : A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology (Review). *Biochim Biophys Acta*, 1854: 528-537, 2015.
- 22) Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, Deml SM, Wohlfel SL and Wengenack NL: Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and other aerobic Actinomycetes. *J Clin Microbiol*, 54: 376-384, 2016.
- 23) Sanguinetti M and Posteraro B: Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 55: 369-379, 2017.
- 24) Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Miyabe A, Murata S, Saito T and Nomura F. Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performances by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. *Anal Bioanal Chem*, 403: 1811-1822, 2012.
- 25) Matsuda N, Matsuda M, Notake S, Yokokawa H, Kawamura Y, Hiramatsu K and Kikuchi K: Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50: 3862-3868, 2012.
- 26) Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, Matsushita K, Kamei K and Nomura F: Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight

- mass spectrometry. *Clin Proteomics*, 12: 6, 2015.
- 27) Khot PD and Fisher MA: Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 51: 3711-3716, 2013.
 - 28) Tran A, Alby K, Kerr A, Jones M and Gilligan PH: Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 53: 2473-2479, 2015.
 - 29) Scott JS, Sterling SA, To H, Seals SR and Jones AE: Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry in blood bacterial infections: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis (Lond)*, 48: 530-536, 2016.
 - 30) Ashizawa K, Murata S, Terada T, Ito D, Bunya M, Watanabe K, Teruuchi Y, Tsuchida S, Satoh M, Nishimura M, Matsushita K, Sugama Y and Nomura F: Applications of copolymer for rapid identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods*, 139: 54-60, 2017.
 - 31) Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T and Watanabe T: Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis*, 52: 37-42, 2016.
 - 32) Faron ML, Buchan BW and Ledebøer NA: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: Methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol*, 55: 3328-3338, 2017.
 - 33) Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM and Muñoz-Bellido JL: Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 48: 2110-2115, 2010.
 - 34) Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, Watanabe M, Satoh M, Matsutani T, Kobayashi M, Iwadate Y, Kuwabara S, Saeki N and Nomura F: Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta*, 435: 59-61, 2014.
 - 35) Sauguet M, Valot B, Bertrand X and Hocquet D: Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol*, 25: 447-455, 2017.
 - 36) Doern CD, Butler-Wu SM: Emerging and future applications of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory: A report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*, 18: 789-802, 2016.
 - 37) Angeletti S: Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*, 138: 20-29, 2017.
 - 38) Chong PM, McCorrister SJ, Unger MS, Boyd DA, Mulvey MR and Westmacott GR: MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods*, 111: 21-23, 2015.
 - 39) Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Zhang R and Chen GX: Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Front Microbiol*, 6: 784, 2015.
 - 40) Charretier Y, Dauwalder O, Franceschi C, Degout-Charmette E, Zambardi G, Cecchini T, Bardet C, Lacoux X, Dufour P, Veron L, Rostaing H, Lanet V, Fortin T, Beaulieu C, Perrot N, Dechaume D, Pons S, Girard V, Salvador A, Durand G, Mallard F, Theretz A, Broyer P, Chatellier S, Gervasi G, Van Nuenen M, Roitsch CA, Van Belkum A, Lemoine J, Vandenesch F and Charrier JP: Rapid bacterial identification, resistance, virulence and type profiling using selected reaction monitoring mass spectrometry. *Sci Rep*, 5: 13944, 2015.
 - 41) Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Abe A, Tsurue T, Mori M, Tabata H, Minami H, Goto M, Akiyama M, Yamamoto Y, Saito S and Kitajima I: Melting temperature mapping method: A novel method for rapid identification of unknown pathogenic microorganisms within three hours of sample collection. *Sci Rep*, 28: 125-143, 2015.
 - 42) Arroyo MA and Denys GA: Parallel evaluation of the MALDI Sepsityper and Verigene BC-GN assays for rapid identification of Gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*, 55: 2708-2718, 2017.