

研究報告

MALDI-TOF MS 微生物同定システムの食品衛生管理への活用

日渡美世^{*1}、工藤尚子^{*1}、三浦健史^{*1}

Application of MALDI-TOF MS Microorganism Identification System to Food Hygiene Management

Miyo HIWATASHI^{*1}, Naoko KUDO^{*1} and Takeshi MIURA^{*1}Food Research Center ^{*1}

和洋菓子を対象に工場や半製品から分離された細菌を Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) により同定した。試料調製方法を検討した結果、*Staphylococcus* では前処理方法により同定率が変動した。分離された細菌 622 株を同定した結果、同定率は 47%であった。本システムで同定されなかった細菌を DNA 配列により同定した結果、*Kocuria* 属や *Microbacterium* 属が高い割合を占めた。

1. はじめに

食品業界において、一般衛生管理及び HACCP 導入への取り組みが一層求められている。菓子業界では、特に賞味期限の短い和洋生菓子で、細菌による変敗が問題となる。そのため、製造工程や製品中の細菌汚染の把握と適切な制御が必要である。近年、新しい微生物同定手法として MALDI-TOF MS を用いた微生物同定装置が導入されるようになってきている^{1),2)}。本装置は微生物の同定を簡便かつ短時間で行えることから、通常の拭き取り試験や製品の微生物検査と、本法による種の同定を併用することで、食品工場の衛生管理への活用が期待できる。しかしながら、本装置は医療分野での利用が先行しており、食品変敗に関わる細菌や食品工場で検出される細菌に関するデータベースが不十分である³⁾。

本研究では、和洋生菓子工場で検出される細菌を対象として、まず試料調製方法による同定率の違いを検討した。次に、生菓子工場や半製品から採取した細菌について、MALDI-TOF MS による同定可否と種の傾向を検証した。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

(独) 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) 保有株、及び、食品工場及び半製品から分離した株を使用した。使用した NBRC 株を表 1 に示した。

2.2 食品工場及び半製品からの細菌の分離

愛知県内の和菓子製造企業 2 社、洋菓子製造企業 2

社を対象とし、表面付着菌及び半製品の採取を行った。表面付着菌は拭き取り検査キット (ST25-100、((株) エルメックス) を用い、工場内の水回り、取っ手、作業台等、及び器具類から採取した。半製品は、和菓子 (生地、餡、手粉等) は保存前または 30°C、24 時間保存後、洋菓子 (生クリーム、スポンジケーキ、チョコレート等) は保存前、または 10°C、72 時間保存後の試料について、標準寒天培地を用いて混釈法により 35°C で 48 時間培養した。培養後のシャーレから任意のコロニーを採取し、MALDI-TOF MS 分析に供した。

2.3 MALDI-TOF MS による種の同定

MALDI-TOF MS による微生物同定は、AXIMA 微生物同定システム ((株) 島津製作所) を使用した。試料調製はエタノール-ギ酸抽出法 (以下、抽出法) により行った。ただし、試料調製方法の検討においては、直接法、直接法 (ギ酸処理)、抽出法を比較した。直接法ではコ

表 1 使用した NBRC 株

<i>Bacillus coagulans</i> NBRC12583
<i>Staphylococcus warneri</i> NBRC109769
<i>Pantoea agglomerans</i> NBRC102470
<i>Moraxella osloensis</i> NBRC111460
<i>Kocuria marina</i> NBRC110801
<i>Kocuria varians</i> NBRC15358
<i>Kocuria palustris</i> NBRC16318
<i>Kocuria rhizophila</i> NBRC16319
<i>Kocuria salsicia</i> NBRC109970

*1 食品工業技術センター 分析加工技術室

ロニーをプレート上に塗布し乾燥後、マトリックス（飽和 CHCA、2.5% (v/v) TFA、50% (v/v) アセトニトリル）を添加し分析に供した。直接法（ギ酸処理）では、コロニーをプレートに塗布し 25% (v/v) ギ酸溶液と混合して乾燥後、マトリックスを添加した。抽出法では、コロニーを 70% (v/v) エタノール内で懸濁し遠心分離（13,000rpm、2min）後、沈殿に 70% (v/v) ギ酸溶液、アセトニトリルを添加した懸濁液を調製した。懸濁液をプレート上に塗布し乾燥後、マトリックス（10mg/mL CHCA、2.5% (v/v) TFA、50% (v/v) アセトニトリル）を添加し分析に供した。MALDI-TOF MS 分析は、試料調製方法の検討では 1 試料につき 8 測定、食品工場から分離した細菌の同定では 1 試料につき 2 測定、*Kocuria* 属の基準株の比較では、1 株あたり 2 回培養を行い、各培養回ごとに 4 測定を行った。

解析はソフトウェア SARAMIS Premium（データベースは Version4.13）（ビオメリュー、(株) 島津製作所）を使用した。食品工場から分離した細菌の同定は、クラスター解析機能を併用して行った。

2.4 16S rDNA 配列による未同定株の同定

16S rDNA の増幅は、8F-896R プライマーセットと、PCR 用酵素 QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN 製) を用いて行った。PCR の温度条件は、95°C 5 分、40 サイクルの 96°C 5 秒；55.5°C 5 秒；68°C 27 秒、72°C 1 分とした。得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、NCBI から利用できる BLAST プログラム (National Center for Biotechnology Information、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) によりホモロジー検索を行い、細菌の種を同定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 試料調製法の予備的検討

食品工場及び半製品から検出された細菌のうち、グラム染色性及び形態が異なる細菌について、基準株を用いて試料調製方法が同定結果へ及ぼす影響を検討した。異なる試料調製方法で得られた菌体たんぱく質のマスペクトルを図 1 に示す。

Moraxella osloensis NBRC 111460 株では、直接法、抽出法のいずれも同定に必要な 3000~10000m/z の領域のマスペクトルが得られた。*Bacillus coagulans* NBRC12583 株、*Pantoea agglomerans* NBRC102470 株についても同様の結果だった（結果は図示せず）。一方、*Staphylococcus warneri* NBRC109769 株では、抽出法では同定に必要な領域のマスペクトルが得られたが、直接法では採取量やギ酸処理の有無に関わらず、特に高質量域のマスペクトルが得られず、同定不能であった。これは菌体たんぱく質の抽出不良によると推察された。

次に、本研究で分離した *Staphylococcus* 属 7 株 (*S. warneri* 3 株、*S. saprophyticus* 2 株、*S. epidermis* 2 株) について、直接法による同定可否を確認した。結果を表 2 に示した。*S. warneri* の 1 株では NBRC109769 株と同様、直接法による同定が困難であったが、*S. warneri* の 2 株と *S. saprophyticus* ではギ酸処理による同定率の向上が認められた。*S. epidermis* ではギ酸処理の有無に関わらず同定可能であった。なお、抽出法では、*S. warneri* 3 株、*S. saprophyticus* 2 株、*S. epidermis* 2 株のいずれの株も同定可能であった。

多くのグラム陰性菌は菌体をマトリックスと直接混

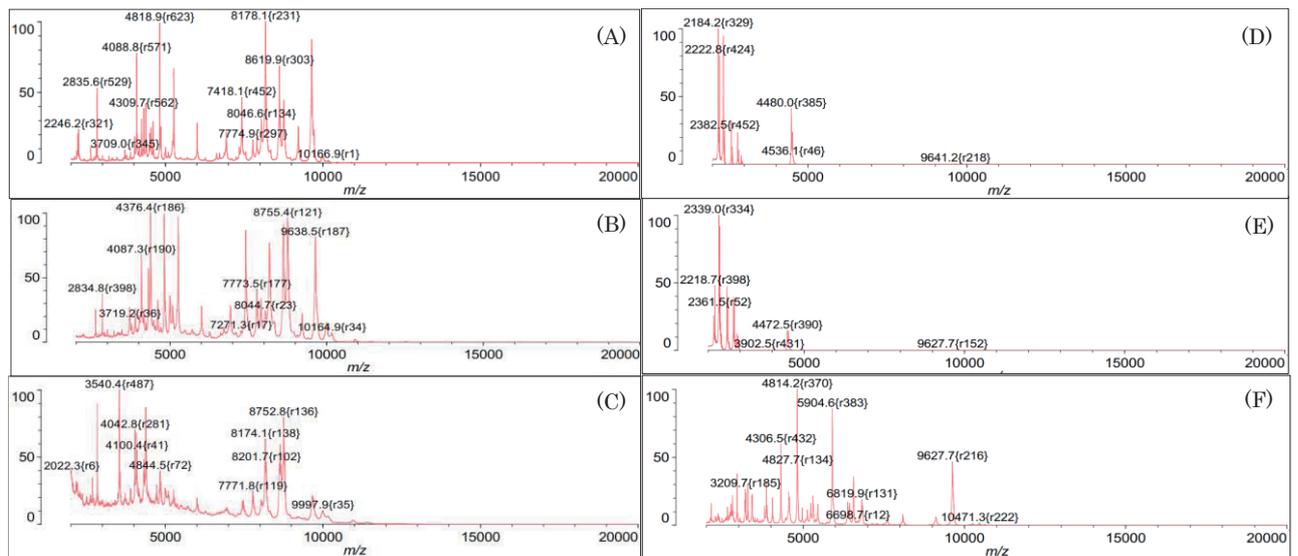


図 1 各抽出条件におけるマスペクトル
A~C: *M. osloensis* NBRC 111460、D~F: *S. warneri* NBRC 109769
A, D: 直接法、B, E: 直接法（ギ酸処理）、C, F: 抽出法

表2 *Staphylococcus* の直接法による同定可否

菌株	同定可能数/分析数	
	直接法	直接法 (ギ酸処理)
<i>S. warneri</i> NBRC100769	0/8	0/8
<i>S. warneri</i> kh3-2	0/8	1/8
<i>S. warneri</i> mh3-1	2/8	6/8
<i>S. warneri</i> mh3-9	2/8	8/8
<i>S. saprophyticus</i> mh2-1	2/8	7/8
<i>S. saprophyticus</i> mf2-2	1/8	5/8
<i>S. epidermis</i> mr2-7	6/8	8/8
<i>S. epidermis</i> mf6-1	8/8	8/8

合する直接法で同定可能である。一方、グラム陽性菌では、細胞壁や細胞表面成分によりたんぱく質抽出が阻害されることがあり、ギ酸処理による細胞壁の破壊や抽出処理による夾雑物の除去が必要な例が報告されている²⁾。食品変敗に関わる細菌はグラム陰性菌だけでなく、*Bacillus* 属細菌や乳酸菌といったグラム陽性菌も含まれることから、食品工場から分離された細菌については、ギ酸処理または抽出法が適切であると考えられた。抽出法は直接法に比べて操作が煩雑であるが、1~10mg の菌体量で同定可能であることを確認した(結果は図示せず)。

3.2 同定率の検証と未同定株の同定

和洋菓子工場及び半製品から分離した約 600 株について、MALDI-TOF MS による同定可否を検証した。その結果、同定率は和菓子工場で 48% (208 株中 100 株)、和菓子半製品で 78% (80 株中 62 株)、洋菓子工場で 40% (209 株中 83 株)、洋菓子半製品で 61% (125 株中 46 株)であった。半製品由来細菌は 60%以上の同定率であったが、表面付着菌では 50%以下の同定率だった。

MALDI-TOF MS により同定された主な属を表 3 に示す。*Staphylococcus* 属、*Acinetobacter* 属、*Moraxella*

表3 和洋菓子工場から分離した細菌の MALDI-TOF MS による同定結果

属	株数
<i>Acinetobacter</i>	44
<i>Moraxella</i>	37
<i>Sphingomonas</i>	7
<i>Bacillus</i>	39
<i>Staphylococcus</i>	92
<i>Lactobacillus</i>	10
<i>Enterococcus</i>	7
<i>Kocuria</i>	30
<i>Micrococcus</i>	18

表4 MALDI-TOF MS によって未同定であった株の属

属	株数
<i>Sphingomonas</i>	6
<i>Chryseobacterium</i>	17
<i>Paenibacillus</i>	7
<i>Exiguobacterium</i>	26
<i>Leuconostoc</i>	20
<i>Kocuria</i>	49
<i>Curtobacterium</i>	8
<i>Microbacterium</i>	41

属、*Bacillus* 属、*Kocuria* 属が多く検出された。MALDI-TOF MS による未同定株は、いずれも候補種が表示されず、種の同定に用いられるデータベースに未登録であると考えられた。そこで、MALDI-TOF MS による未同定株について、16S rDNA 配列による種の同定を行った。主要な結果を表 4 に示す。

Sphingomonas 属、*Leuconostoc* 属、*Kocuria* 属の一部の種はデータベースに登録されているものの、登録種とは異なる種が DNA 配列により同定された。MALDI-TOF MS による未同定株は、特に *Kocuria* 属と *Microbacterium* 属が占める割合が高かった。*Chryseobacterium* 属、*Curtobacterium* 属、及び *Exiguobacterium* 属は野菜類からの検出例が報告されており、主に土壌由来と推測されている⁴⁾。また、*Paenibacillus* 属は食品変敗に関わる低温芽胞菌である。したがって、MALDI-TOF MS による未同定株であるこれらの細菌は、食品衛生上重要であり、長期的には同定が可能になることが望ましいと考えられた。さらに今後、和洋菓子工場で検出された細菌種の空間的な傾向把握、及び、半製品の二次汚染源の推察に繋がる解析を行う必要がある。

3.3 未同定種のスペクトル比較

MALDI-TOF MS による未同定株の中で特に高い割合を占めた *Kocuria* 属について、本研究で分離された種を中心に、マススペクトルの類似性を比較した。*Kocuria* 属 5 種の基準株(表 1)、及び本研究で分離した 10 株について、クラスター解析機能によるマススペクトルの比較を行い、デンドログラムを作成した(図 2)。

K. varians、*K. rhizophia*、*K. salsicia*、*K. marina*、*K. palustris* の基準株は、デンドログラム上では 50%の類似性で区別された。分離株は同じ種の基準株とデンドログラム上で 60~80%の類似性を示し、同一種内でクラスターを形成した。MALDI-TOF MS による同定では、未同定の場合、マススペクトルの一致数 35 以上の株が極めて類似性が高い株として表示される。本研究で解析を行った *Kocuria* 属 5 種では、分離株と基準株とのマス

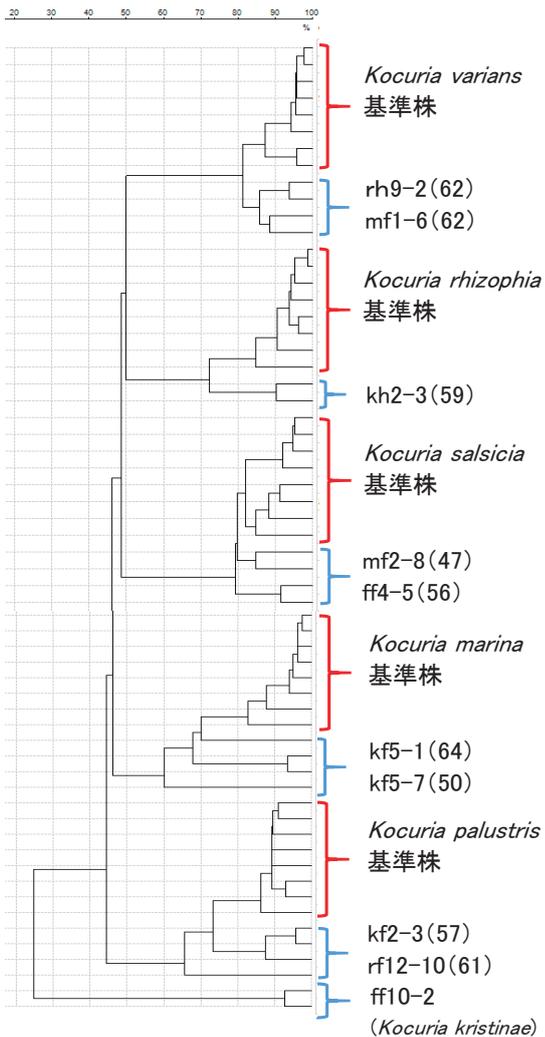


図2 分離株と基準株とのデンドログラム
(括弧内は基準株との一致マスペクトル数)

スペクトルの一致数は47~62であり、分離株10株全てで、16S rDNA配列による同定結果と同じ種のみが類似性が高い株として表示された。

SARAMISによる種同定は、同一種の複数株のマス

ペクトルの中で共通したマスペクトルにより構築された「SuperSpectra」を用いて行われる。*Kocuria* 属については SuperSpectra 構築の前段階として、2000~20000m/z のマスペクトルの比較により種の推定が可能であることが示唆された。なお、*Microbacterium* 属は、同一種の異なる株間のマスペクトル類似性が低く、マスペクトルの比較による種の推定は困難であった(結果は図示せず)。本研究で分離された *Kocuria* 属については種の推定が可能であることが示唆されたが、今後新たに分離される株については引き続き、種の推定可否を検証する必要がある。

4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

- (1) 和洋菓子工場の表面付着細菌、半製品由来細菌の主要な属とそれらの MALDI-TOF MS による同定可否を明らかにした。
- (2) *Kocuria* 属についてはマスペクトルの比較により種の推定の可能性を示した。
- (3) 食品衛生管理への活用を進めるために、検出された細菌種の空間的な傾向、半製品の二次汚染源の推察などの詳細な解析を引き続き行う必要がある。

文献

- 1) 関口幸恵: 腸内細菌学雑誌, **29**, 169(2015)
- 2) N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, J. S. Virdi: *Front. Microbiol.*, **6**, 791(2015)
- 3) 上原さとみ, 高橋由美, 小林真紀子, 加藤玲, 西野由香里, 下島優香子, 小西典子, 千葉隆司, 横山敬子, 平井昭彦, 貞升健志: 東京都健康安全研究センター年報, **68**, 101(2017)
- 4) 泉秀実: 日本食品微生物学会雑誌, **26**, 60(2009)