

タイトル： MALDI-TOF MS を用いた微生物迅速同定

- 食品製造工程における微生物汚染への安全対策 -

株式会社 コーガアイソトープ
滅菌研究センター 山北京由
営業部 河合政利
営業部 廣庭隆行

1. はじめに

今日の食品製造は衛生管理された工場で行われており、異物の混入や微生物汚染などの対策が重要な管理事項となっている。包装・容器は、食品の特性を考慮した材質の高分子、金属および天然原料（竹皮、木の葉など）が利用されている。必要に応じてガンマ線照射などの殺菌処理がされ、微生物汚染を防止している。一方、食品材料に付着している微生物は、目視による検査ができず、製品の充填後に増殖する可能性がある。その対策として、製造装置や食品原材料の洗浄および消毒が行われている。洗浄は、微生物に対してはバイオフィルムの除去と初期菌数の減少が目的となっており⁽¹⁾、消毒は、特定微生物の除菌および殺菌が目的となっている。どちらも食品の保存性向上の点で重要な要因となる。しかし、食品の安全性から洗浄液および消毒剤の使用は、少量に抑える必要がある。そのため、食品材料や各製造工程で検出される微生物の同定は、侵入経路の特定や適切な洗浄液および消毒剤の選択と使用量を定めるのに有効である。

株式会社コーガアイソトープは、食品包装資材や医療機器のガンマ線滅菌の受託を行っている。医療機器の滅菌バリデーションにおいては、菌数測定・無菌性の試験など微生物に関する多くの試験実績がある。中でも、近年導入した MALDI-TOF MS による微生物同定は、医療機器の付着菌の迅速な同定に活用している。本稿では、MALDI-TOF MS による微生物迅速同定の原理、方法、具体例および今後の課題と食品分野の応用例を紹介する。これらが、食品製造工程内での微生物汚染対策の参考になれば幸いである。

2. MALDI-TOF MS の概要と測定原理

MALDI-TOF MS は、マトリックス支援(Matrix Assisted)レーザー脱離イオン化(Laser Desorption Ionization)飛行時間型質量分析(Time of Flight Mass Spectrometry)の略称であり、主としてタンパク質やペプチドなど生体高分子の質量を決定する装置である。

本装置は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法と飛行時間型質量分析計を組み合わせ分子の質量を計測する。分析試料とマトリックス、すなわちレーザー光を吸収して試料のイオン化を促進させる有機化合物を混合し、レーザー光を照射することで、図1に示すように分析試料にプロトン(H⁺)を付加してイオン化を行う。

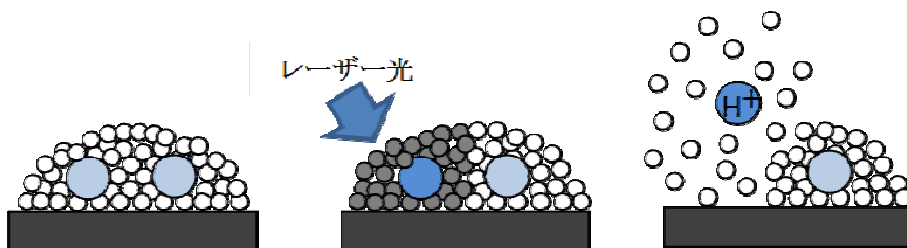
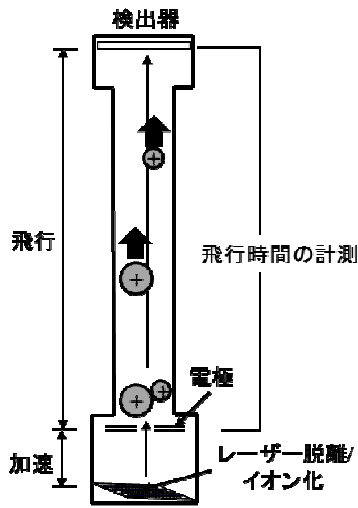


図1 MALDIの原理



イオン化された試料は、図2の様に電圧がかかると電極間で加速され、フライトチューブと呼ばれる真空の管中を通り検出器へ向かって飛行する。このとき、イオン化された試料にかかる電圧は、試料中のどのイオンに対しても一定なので、全てのイオンは同じ運動エネルギー ($E = 1/2mv^2$) を持つため、質量電荷比が小さいイオンほど高速で飛行し、検出器へ到達する。一方、質量電荷比が大きいイオンは検出器まで到達する速度は遅くなる。これらイオンの飛行時間が質量電荷比によって異なることを利用して、MALDI-TOF MS は質量分析を行う。質量分析された試料は、縦軸に検出強度(ピーク)、横軸に質量電荷比としてプロットされる。例として、大腸菌のマスペクトルは、図3⁽²⁾の様に示される。

このマスペクトルのピークの分布が、分析試料の成分および特徴を表しており、微生物の同定に利用されている。

図2 MALDI-TOF MS の測定原理

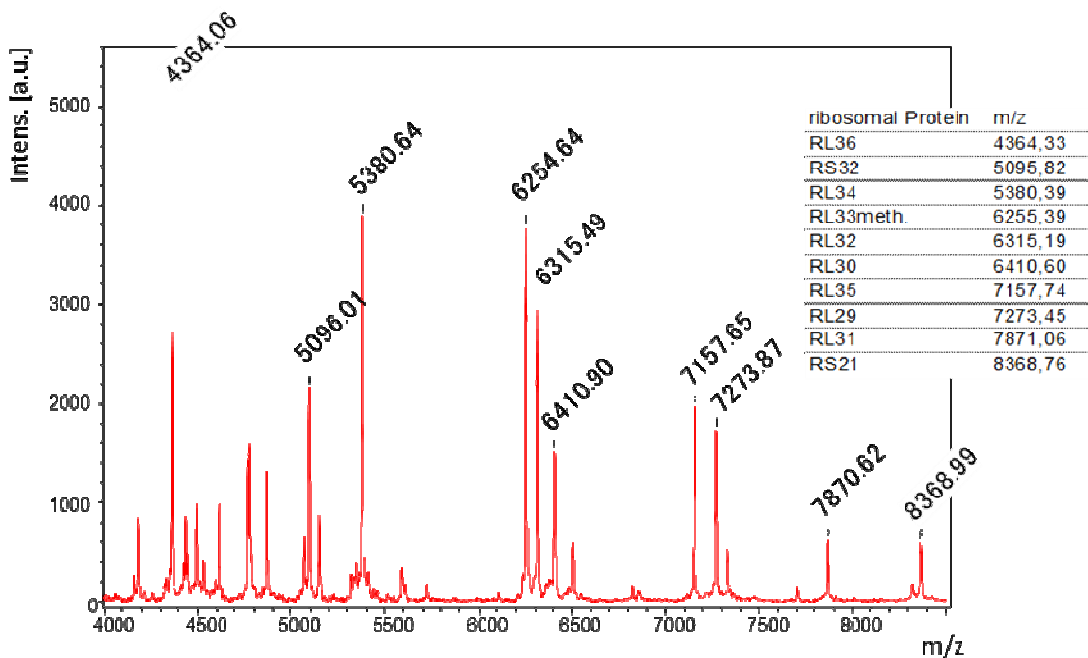


図3 大腸菌のマスペクトル

3 . MALDI-TOF MS による微生物の同定方法

3 . 1 MALDI-TOF MS による微生物同定の原理

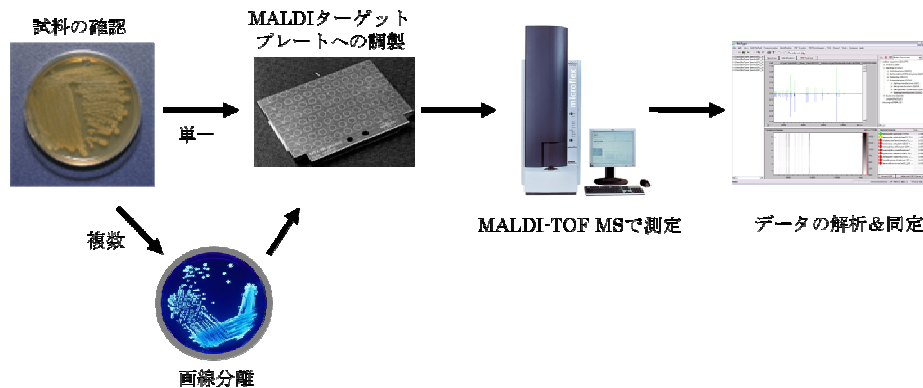
MALDI-TOF MS を用いた微生物の同定システムは、複数のメーカーから販売されており、(株)コーガアイソトープではブルカー・ダルトニクス社の MALDI Biotyper システムを導入している。この装置は、大手食品メーカーや医療機関のほか、独立行政法人製品評価技術基盤のバイオテクノロジーセンター (NBRC) も導入し、標準菌の受け入れおよび標準菌の配布時の品質管理に利用されている。MALDI-TOF MS により解析される細菌のタンパク質は、分子量が約 2,000 ~ 20,000 Da (ダルトン: 相対分子量) の範囲であり、

その半数以上がリボソーム由来である。どのような分子量のタンパク質がどれくらいのピーク強度で検出されるのか、また、得られたピークのパターンがどの菌種のマススペクトルのパターンと一致するのかが菌の同定において重要である。得られた細菌のマススペクトルは、事前にデータベースに登録されている菌種のマススペクトルとの相同性が解析されることにより、微生物が同定される。

3.2 測定の具体例および結果報告

実際に MALDI-TOF MS で微生物を同定する場合、試料は、新鮮な平板培地でコロニーが目視できるくらい(直径 2 mm 程度)になるまで培養された状態が望ましい。また、同定試料として用いるコロニーは単一なものが必要である。試料を確認した際に菌種が単一ではない場合は、画線分離を行い菌を単離する必要がある。また、菌種が単一でも、*Bacillus* 属をはじめとした芽胞形成菌の場合は、新しい培地へ画線培養を行わなければならない可能性がある。その理由は、芽胞細胞と栄養型細胞では細胞内の発現しているタンパク質の種類や量が異なるためである。一方、データベースに登録されているマススペクトルは、栄養型細胞のマススペクトルであるので、芽胞が形成された状態では同定ができない。そのため、新しい培地へ画線培養を行う。

顕微鏡観察や画線培養により試料の妥当性が確認されたならば、菌を直接ターゲットプレートへ塗りつけ、解析を行う(図4参照)。この方法はセルスマア法と呼ばれ、測定時間は1サンプルわずか10分、90サンプルでも2時間程度である。



この方法で解析ができなかった場合は、ギ酸を用いて細胞壁を破壊してタンパク質を抽出するギ酸抽出法を用いる。

図4 MALDI-TOF MS を用いた微生物同定の手順

解析された菌のマススペクトルはデータベースのどの菌種と相同性があるかを図5に示すスコア値で表示される。

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value
1 (+++)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 4910 DSM	2.388
2 (+++)	Staphylococcus aureus ATCC 29213 THL	2.375
3 (++)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 20232 DSM	2.273
4 (++)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 20491 DSM	2.241
5 (++)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 346 DSM	2.238
6 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 33591 THL	2.23
7 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 25923 THL	2.223
8 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 33862 THL	2.118
9 (+)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 11822 DSM	1.927
10 (+)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 3463 DSM	1.893

示される。

MALDI Biotyper の場合では、スコア値が2.300~3.000であれば、属・種が一致している。2.000~2.299であれば、属・種が一致している可能性が高い。1.700~1.999であれば、属は一致している可能性が高いが、種は同定不能である。1.699以下であれば、同定不能といったように判定される。MALDI Biotyper で判定された結果は、従来の菌種の同定法であるリボソームRNA遺伝子を用いた同定法と比較しても高い割合で一致し、約90%の菌種が属・種レベルで一致することが報告されている(3)。このことから、MALDI-TOF MS で同定された結果は、遺伝子同定と同等の正確性があると考えられる。

図5 MALDI Biotyper によって示された同定結果

4. 今後の課題

MALDI-TOF MS を用いた菌の同定法は、従来の菌種の同定法であるリボソーム RNA 遺伝子の塩基配列解析同定法と比べ、まだデータベースにおける登録菌数が少ない。遺伝子同定のデータベースは、世界的な公共機関である NCBI (National Center for Biotechnology Information) が運営している GenBank が、世界中から塩基配列のデータを蓄積し無償で提供している。一方、MALDI-TOF MS ではメーカーごとにデータベースの構築および販売が行われている。これらのことから、MALDI-TOF MS のデータベースはメーカーによってデータに違いや偏りが生じ、遺伝子同定法のデータベースに比べ登録菌数が少ない要因となっている(4)。しかし、MALDI-TOF MS のデータベースは、自身でデータを追加することが可能であるので、データベースを充実させ、多くの微生物を同定できることが期待される。現状の MALDI Biotyper には、380 属、5627 株の微生物がすでに登録されている。

もう一つの課題が、3.2 で述べた生育段階でタンパク質の分布が異なる微生物の同定である。*Bacillus* 属をはじめとした芽胞形成菌や、糸状菌がこれに当てはまる。芽胞形成菌は、新しい培地へ画線培養を行い、栄養型細胞へ戻すことで同定が可能になる。また、糸状菌は、液体のサブロー培地と回転ローターを用いた培養法と、ギ酸による抽出法を組み合わせることで同定が可能になることがブルカー・ダルトニクス社から報告されている(2)。

5. 食品業界での応用例

現在、食品製造は、トータルサニテーションが進み、ソフトサニテーション(清掃、洗浄、殺菌)が重要な役割を果たしている。特に食品工場は、食品に発育する微生物の洗浄と殺菌に力を注いでいる。その対策は、化学薬剤・低温加熱および加圧殺菌など用途に合わせて実施している。しかし、菌の中には、耐薬品や耐熱性の特徴を持つものも多く、使用している化学薬剤の種類や低温加熱で殺菌できない事もある。そこで菌を同定することにより、最適な殺菌方法の選択やその有効性を科学的に決定できる。

また、菌の同定は、食品材料および製造工程で微生物汚染が発生したときの菌の侵入経路の特定に有効な手段である。菌の侵入経路を特定するには、あらかじめ製造工程にどのような菌がいるのかモニタリングを行う必要がある。スワブ法等を用いて、複数の製造工程に対してどの製造工程にどのような菌がいるのかライブラリーを作成し、検出された菌の系統樹を表示する。汚染が発生したならば、コンタミネーションの分離株が、系統樹中のどの菌と一致するか確認する。このとき、MALDI-TOF MS を用いて汚染源を迅速に同定することで、微生物汚染による製造の停止時間を短くすることが可能になり、その間に食品汚染が広がるリスクも軽減することができる。

食中毒菌の同定においても MALDI-TOF MS を用いた同定は、有効な方法である。従来の食中毒菌の同定法は、選択培地を用いた特定の菌のみを調べる方法がある。しかし、複数の食中毒菌が検出された状態では、別の選択培地を用いる必要があるため、コストと時間を消費する。そこで、MALDI-TOF MS を用いることで、複数の食中毒菌が検出された場合でも一度で迅速に同定を行えることから、コストと同定時間を軽減することが可能になる。

6. おわりに

現在、一部の乳製品などは、製造ラインで滅菌・充填を行う無菌充填機の開発が進み、広く使用されている(5)。しかし、多くの食品製造ラインでは、大腸菌など特定の毒性の高い微生物を対象とした選択培地や同定キットなどを使用して、微生物管理を行っている。毒性の低い微生物まで、対策に万全を期そうとすれば、対象菌種やサンプルは増えていく(6)。このような状況では、同定の委託試験が有効な方法となる。委託試験の微生物同定は、リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列解析を用いる遺伝子同定法が広く普及している。しかし、この同定法は、試験委託すれば結果が出るまで1週間程度の日数が必要となっている。本稿で紹介した MALDI-TOF MS を用いた迅速同定法は、(株)コーガアイソトープにサンプルが到着した翌営業日までに同

定結果の速報ができる。食品は、品質保証の面で鮮度が大きな要因となるため測定時間の短いMALDI-TOF MSを用いた同定法は有効である。更に菌の同定は、微生物汚染経路の判定に有効な手段である。食品の各製造工程中における落下菌、人由来菌および付着菌などは、菌を同定することによりその侵入経路が特定できる。

現在、MALDI-TOF MSを用いた迅速同定法は、ヨーロッパを中心に普及の広がりが見受けられており、すでに臨床検査の現場では取り入れられているケースもある⁽⁴⁾。簡便かつ迅速な同定法であることから、医療機器だけでなく食品製造の各工程の微生物モニタリングに対しても有効な方法である。遺伝子同定法では1検体同定するのに通常1 - 2万円以上かかるが、MALDI-TOF MSを用いた同定法は、ランニングコストが安価で済むため、同定にかかる費用は、当社では、一万円以下とリーズナブルな価格で迅速な受託試験サービスを提供している。上記で述べた通り、MALDI-TOF MSを用いた同定法は、食品業界において有用な手段であり運用面からも優れている。微生物の同定を検討する際には、弊社までご相談いただけたら幸いである。

参考文献

- (1) 福崎智司, 兼松秀行, 伊藤日出生, 「化学洗浄の理論と実際」, 米田出版, p23 (2011)
- (2) 松山由美子, 「MALDI-TOF MSを用いた迅速微生物同定法」, 株式会社コーガアイソトープ, 第5回滅菌セミナー, (2013)
- (3) Mellman, A., Cloud, J., et al. *Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. J. Clin. Microbiol.* **49**, 1946-1954, 2008
- (4) 川崎浩子, 「MALDI-TOF MSを用いた微生物の新しい迅速同定法」, バイオメディア, 90巻, 9号, 592, (2012)
- (5) 向井浩也, 「カップ容器の無菌充填機開発の現況」, ジャパンフードサイエンス, p47-51 Vol.48 No.5, (2009)
- (6) 食品と開発編集部, 「簡易・迅速微生物検査法の開発動向」, 食品と開発, p23, Vol.48 No.1, (2013)