

MALDI-TOF MS を用いた食品由来微生物の同定と汚染原因追究への活用

舟越 良子

(株)紀文安全食品センター 検査分析部

〒273-0014 千葉県船橋市高瀬町 44

TEL: 047-400-5365

E-mail: y-nagai@kibun.co.jp

1.微生物同定について

近年、食の安全性に関する意識が高まってきている中、食品メーカーでは製品の保存上問題となった微生物について、迅速な同定が求められる。

微生物の同定は、主にグラム染色などの形態学的手法または生化学的手法が用いられるが、煩雑な操作であり、時間と高い専門性が要求される。また、高い識別能力がある 16S rRNA 配列解析による分子生物学的手法については、サンプル処理が煩雑な上に、コストが高く、6～8 時間を要するため、日常的に用いることは困難である²⁾。

そこで近年、新しい微生物同定法として注目を集めているのが、MALDI-TOF MS を用いた同定方法である。これは、従来法と比較しサンプル調製が容易で、操作性も簡便かつ、低コストで正確に属や種を識別できる手法である。この技術は、既にヨーロッパを中心に医療の分野で認められており、日本では食品・飲料分野においても活用されつつある³⁾。

2. MALDI-TOF MS による同定の仕組

微生物同定に応用されているのは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化－飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) である。これは、イオン化法に MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption)、分析計に TOF (Time of Flight) を組み合わせたタイプの質量分析装置である。

サンプル調製～同定までの流れを以下に示す。

- ① 培地上のコロニーを少々掻き取り、質量分析計のターゲットプレートに塗布する。
- ② ターゲットプレートに塗布した菌に、マトリックス溶液 (α -cyano-4hydroxycinnamic acid) を添加する。
- ③ マトリックス溶液乾燥後、質量分析装置内へ導入し、測定する。

MALDI-TOF MS の原理は、レーザー照射によりイオン化されたマトリックスによって、サンプル (この場合タンパク質) が二次的にイオン化および脱離し、その分子は電場の作用により飛行する。イオン化されたタンパク質は検出器に向かって飛行し、その到達時間からタンパク質の質量が計算される仕組である。それによって、質量の異なるピークが検出される。得られたスペクトルパターンから、パターンマッチングによる解析手法により、菌種が同定される。

同定に必要な菌量は数 μg 程度で、菌数で 10^5 個程度あれば同定可能であり、測定に要す

る時間は約 2 分と迅速な同定ができる。

得られたマスペクトル中に観察されるピークは主として菌体のタンパク質に由来すると考えられる。中でもリボソームタンパク質が発現量、分子量の範囲などの点から、マスペクトル中の主な成分として観察される。そのため、リボソームタンパク質を主な成分としたマスペクトル（図 1）が得られ、微生物の種類によってマスペクトルのパターンが異なり、データベースとのパターンマッチングにより精度の高い微生物同定が可能になる。

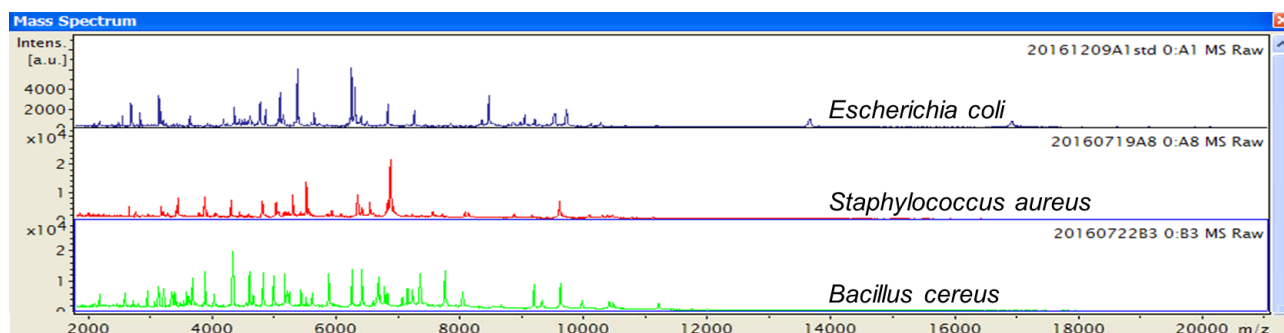


図 1. 微生物より得られたマスペクトル

3.食品由来微生物の同定から汚染原因追究への流れ

お客様からのご指摘をいただいた場合や工場での官能検査にて異常がみられた場合、または日常の製品における微生物検査で管理基準を逸脱した場合など、製品における微生物由来による異常が発生した際、製造現場の迅速な衛生改善が必要とされる。そこで、我々は異常発生原因を科学的根拠に基づいて分析し、製造現場での衛生改善に繋げることを目的として、MALDI-TOF MS を用いた微生物同定を活用している。

まず製品において何が異常を引き起こしたのかを調査するため、食品由来の微生物を MALDI-TOF MS を用いて同定する。その結果より、原因微生物の特性を考慮しその汚染原因について仮説を立てて、衛生管理上どこに問題があるのか原因追究のための調査を行う。食品由来微生物が芽胞形成細菌であった場合は、耐熱性のある細菌であるため、加熱前工程や原料に汚染原因がある可能性がある。また、グラム陰性の非芽胞形成細菌であった場合は、加熱後工程に汚染原因がある可能性がある。また、水場を好む微生物や乾燥に耐えられる微生物、などの特性より見当をつける。このように、汚染原因となり得る箇所を絞り込み、工程の該当する箇所について適切な培地を使用して拭き取り検査や製品の抜き取り検査を実施し、そこから得られた微生物を同定する。

MALDI-TOF MS の最大のメリットは、被検菌がデータベース上にない菌種であっても、系統樹による解析を行うことができることである。また、1 検体あたりのコストが安価なため、多検体の同定が可能である。このように食品由来微生物と汚染原因調査から得られた微生物の系統樹を解析し、汚染原因を特定する。科学的根拠に基づき汚染原因が特定されることにより、製造現場に対して納得できる衛生改善の提案ができ、効果的な改善活動が実現できる。

4.活用事例

(1) 食品における軟化・変色事例の原因微生物の特定

魚肉ねり製品における変敗事例として一般的に、芽胞形成細菌が原因となり軟化や変色が引き起こされる事例が報告されている^{1,4,5)}。この細菌には耐熱性があることから原料や製造工程由来と言われており、菌の持つ耐熱性から加熱工程において完全に殺菌することが困難である。そこで、賞味期限まで冷蔵保管した製品より芽胞形成細菌が検出されるか調査を行った。

調査した結果、製品から稀に芽胞形成細菌 **a** が検出されることを発見した。今回検出された細菌は、海水に常在し 10°C 以下の低温でも増殖することが知られている⁷⁾。この芽胞形成細菌の由来を調査するため工程の拭き取り検査を実施したが、細菌は検出されなかった。外観での変敗を引き起こす菌数ではなかったが、製品から検出された芽胞形成細菌 **a** の由来について調査することとした。

【調査内容】

製造工程より①～⑥についてサンプリングを行った。(図2参照)

①原料すり身(魚種、メーカーごと)、②攪拌生身、③成型生身、④加熱後抜き取り品、⑤放冷後抜き取り品、⑥最終製品

工程図

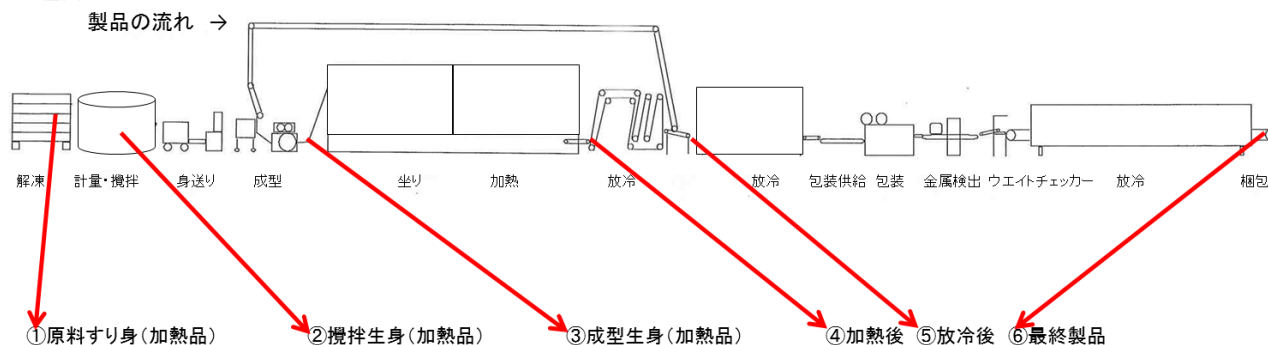


図2. 工程図

製品から検出された芽胞形成細菌 **a** はかなり少量であったため、サンプリング直後の検体からも検出されなかった。そのため、サンプリング後冷蔵保管したものについて微生物検査を行い、これらから検出された細菌について、同定を行った。同定結果(図3)および系統樹(図4)を下記に示す。

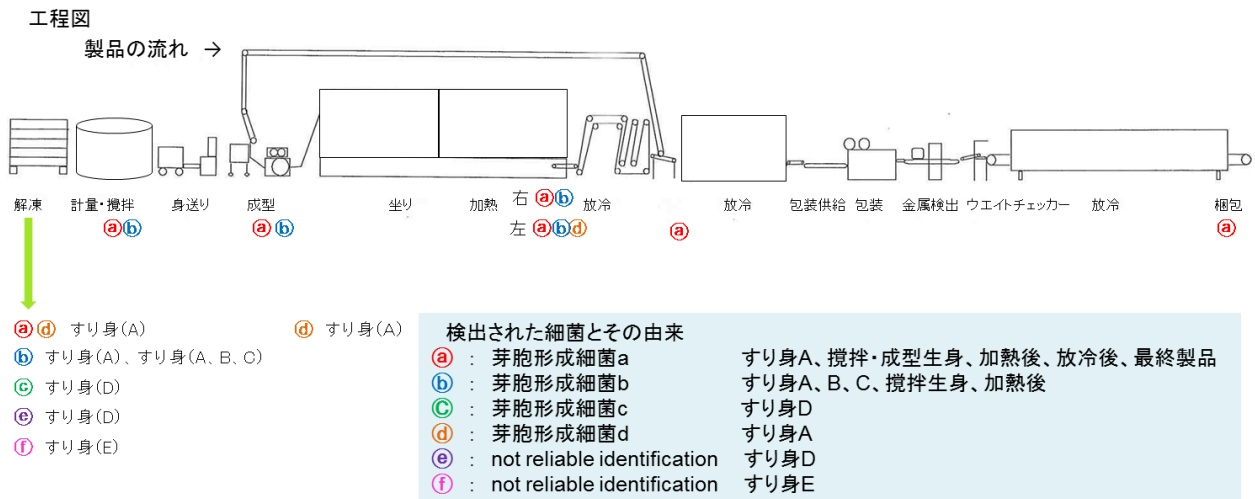


図 3. 工程図と同定結果

今回の調査より、芽胞形成細菌 **a** はすべてのサンプルから検出され、工程上で最上流である原料すり身 **A** に由来すると推定された。

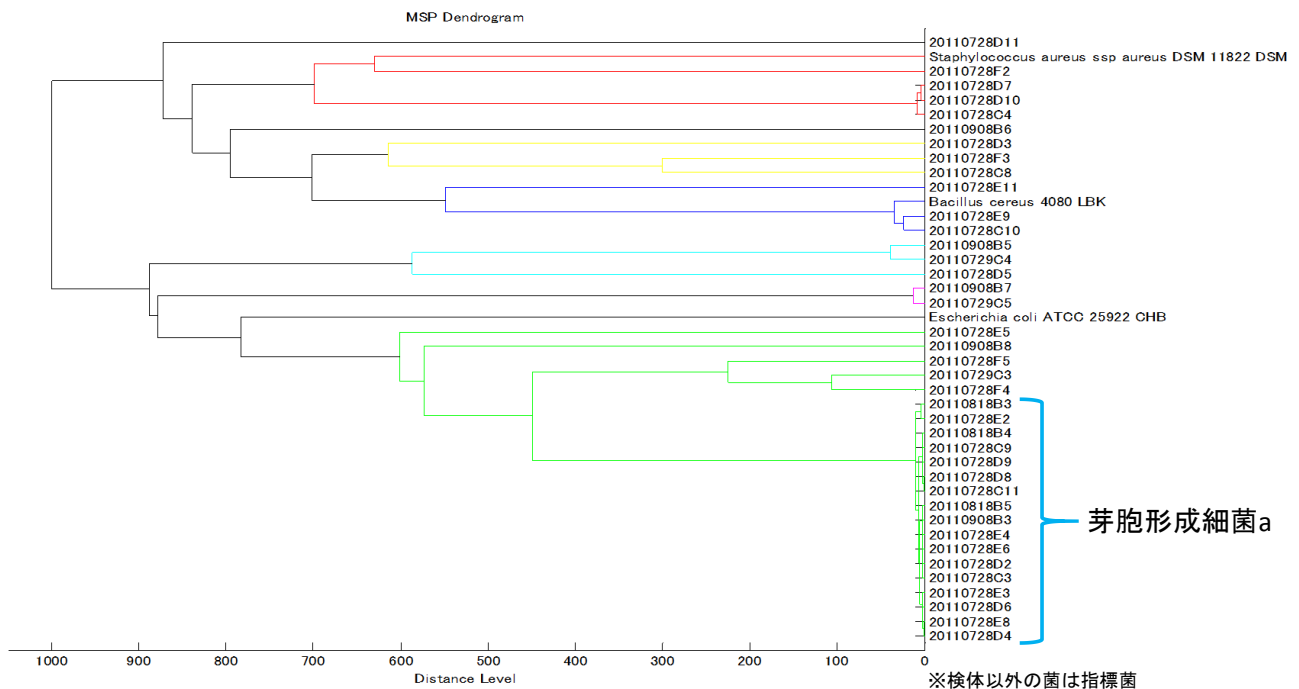


図 4. 系統樹

(2) 食品における変色事例の原因微生物の特定

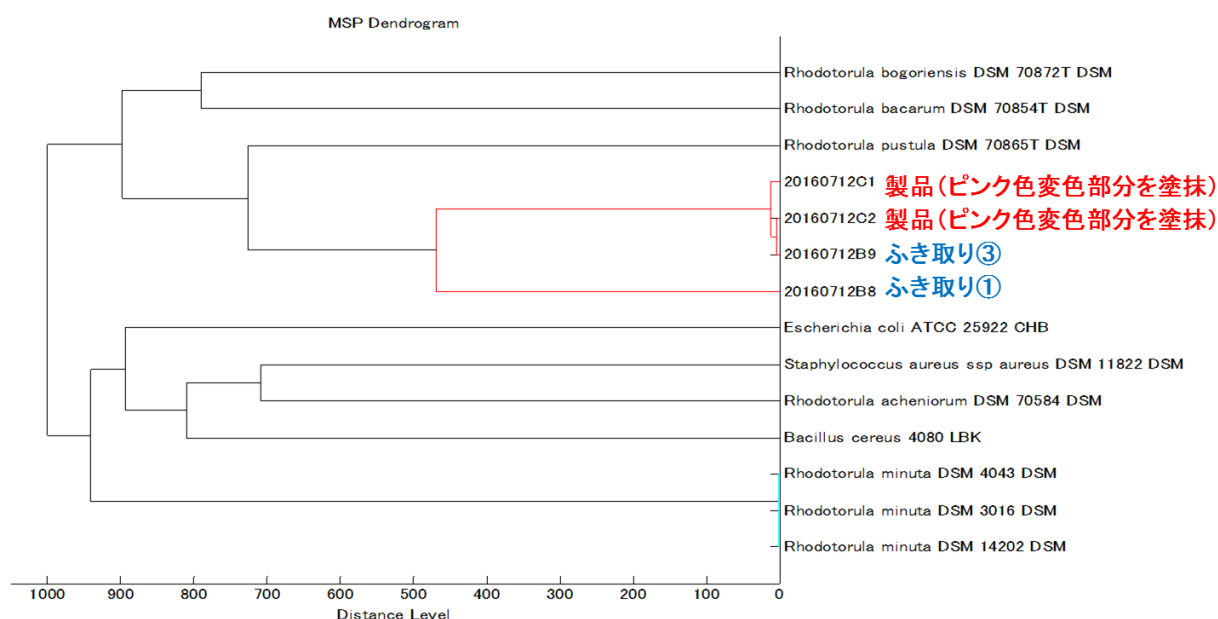
食品における変色の原因として、酵母による色素産生がある⁴⁾。工場で賞味期限満了後保管していたある製品の一部がピンク色に変色した。賞味期限は過ぎていたが、何らかの汚染原因が存在する可能性があったため、その原因微生物の同定および汚染原因の特定を行った。

【調査内容】

製品のピンク色変色部分を検鏡したところ酵母であることが判明し、PDA 培地に塗抹・培養し同定した結果、*Rhodotorula* 属（酵母）が検出された。*Rhodotorula* 属（酵母）は、一般に湿っぽい場所や水回りでピンク色のぬめりの原因となる酵母である。これは、環境中（土壌、水、空気など）に広く分布する酵母で、低温～中温で増殖するとピンク色の色素を産生する。

酵母は一般的に耐熱性がなく、加熱後工程の製造環境に汚染原因がある可能性があると考えられた。これより、PDA 培地を用いて拭き取り検査を行い、工程の衛生状態の調査を実施した。

拭き取り検査にて得られた酵母について同定を実施した結果、ある拭き取り箇所③から、製品と同じ *Rhodotorula* 属（酵母）が検出され、系統樹（図 5）による解析にて一致した。



※検体以外の菌は、デンドログラムをかける上で必要な指標菌です。

図 5. 系統樹

(3) 食品由来微生物の汚染原因の特定

魚肉ねり製品の保存中における腐敗原因微生物について、芽胞形成細菌である *Bacillus* 属細菌や *Micrococcus* 属細菌などがあることが知られている^{4,6)}。加熱工程により非耐熱性細菌は殺菌できるが、耐熱性のある *Bacillus* 属細菌は完全に殺菌することは困難である。そこで製品の微生物検査において、外観での変敗を引き起こす菌数ではなかったが、検出された生菌についての菌叢およびその細菌の由来を調査することとした。

【調査内容】

ある一製品の微生物検査より、主に 3 種類の細菌（*Lysinibacillus* 属細菌、*Bacillus* 属細菌、菌名不明の細菌（グラム染色の結果：グラム陽性有芽胞桿菌））が検出された。すべて芽胞形成細菌であり、耐熱性があるため、加熱前工程（攪拌～成型など）を中心に拭き取

り検査および原料の調査を行った。

原料すり身 9-2 より、耐熱性菌（ 9×10 CFU/g）が検出され、その一部の耐熱性細菌が製品由来菌の *Lysinibacillus* 属細菌と一致した。（図 6 系統樹解析より）

拭き取り検査から検出された細菌は、製品由来菌とは一致しなかった。

<系統樹>

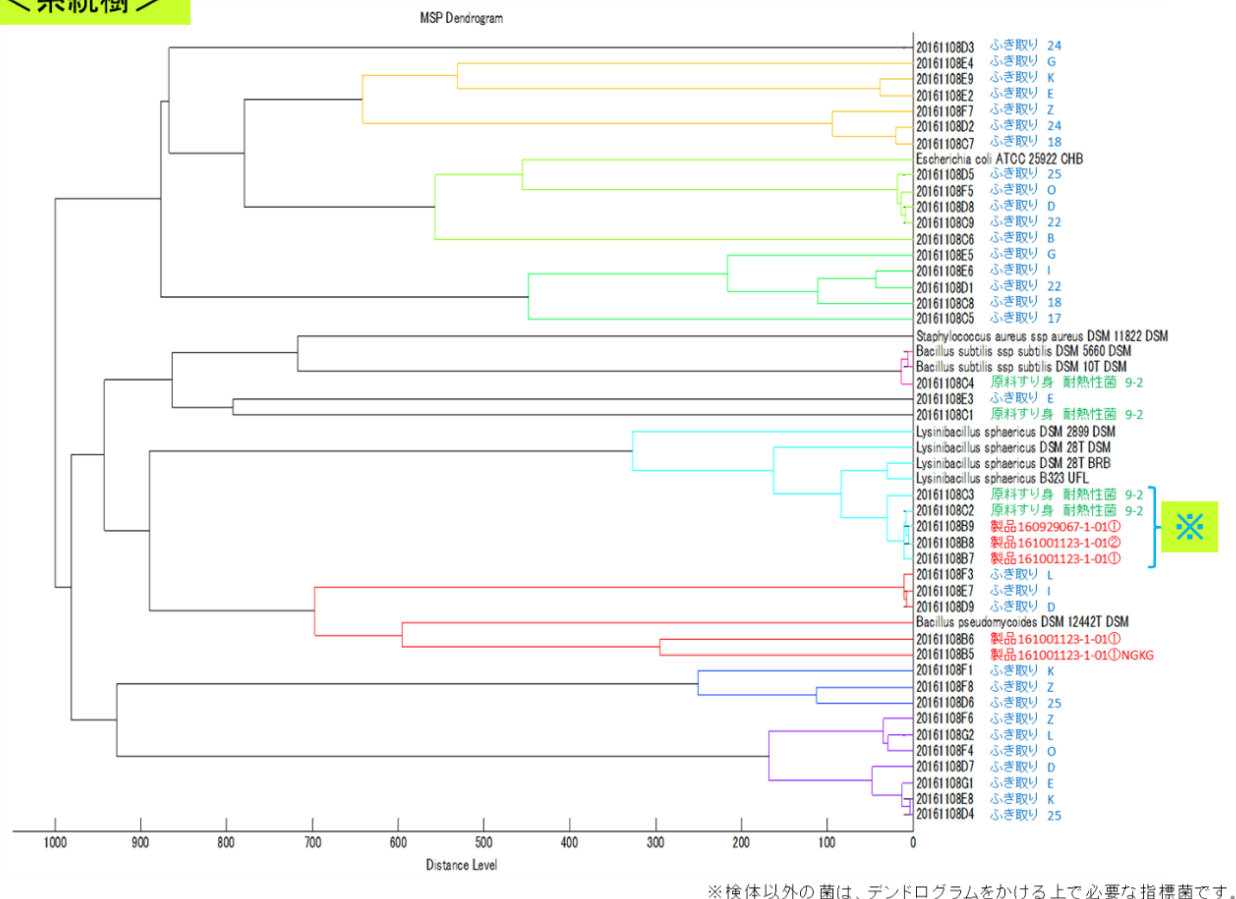


図 6. 系統樹

5.今後の展望

本手法は従来の同定方法と比較し操作が簡便・迅速であり、1 検体当たりの実施コスト（試薬）は数十円程度と安価であるため、多検体（拭き取り検査や抜き取りサンプル等）実施することが可能である。また、データベースと一致せず菌種がわからなかった場合でも、系統樹による解析や独自のライブラリ作成などのソフトウェアの活用により、汚染原因追究に役立つツールとしてさらに期待できると思われる。今後は、徐々にデータベースが充実しつつあるカビについても活用できるように検討していきたい。

参考文献

- 1) 青山好男、遠田智江：低温芽胞菌の耐熱性と低温での増殖性．東洋食品研究所研究報告書,28.47-53（2010）

- 2) 曾川一幸、渡邊正治、野村文夫：質量分析計による新しい同定法. 日本防菌防黴学会誌, Vol.41, No.5, 269-273 (2013)
- 3) 松山由美子：MALDI TOF MS による迅速微生物法. ジャパンフードサイエンス, 1, 57-62 (2012)
- 4) 山本茂貴. 現場必携・微生物殺菌実用データ集. サイエンスフォーラム (2005)
- 5) 渡部一仁：芽胞細菌の種類と殺滅条件. 日本防菌防黴学会誌, Vol.43, No.5, 233-238 (2015)
- 6) Coton M, Denis C, Cadot P, Coton E. : Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products. *Food Microbiol.* 2011 Apr;28(2):252-60.
- 7) Yoon JH1, Lee KC, Weiss N, Kho YH, Kang KH, Park YH. : *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of th. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 May;51(Pt 3):1079-86.