

質量分析計を用いた食品由来微生物同定の検討

上原 さとみ^a, 高橋 由美^a, 小林 真紀子^a, 加藤 玲^a, 西野 由香里^b, 下島 優香子^a
小西 典子^a, 千葉 隆司^c, 横山 敬子^c, 平井 昭彦^a, 貞升 健志^d

食品から分離された細菌及び酵母を新しい菌種同定法である質量分析計 (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry : MALDI-TOF MS) を用いて同定し, 生化学的性状試験法又はリボソームDNAによる塩基配列解析法による結果と比較した. 前処理法はセルスマエ法を用い, ビブリオ属菌や酵母については他の方法を検討した. ビブリオ属菌ではエタノール・ギ酸抽出法の同定率が高く, 酵母ではより簡便なギ酸法がエタノール・ギ酸抽出法と同等の同定精度を示した. 細菌275株はMALDI-TOF MS法により27属59菌種に同定され, 従来法との一致率は属レベルで93.8%, 種レベルで54.9%であった. 種レベルの一致率が低かった要因として, 供試菌株の49%を占めた *Enterobacter* 属菌の菌種鑑別が, いずれの手法でも困難であり菌種が一致しなかったことが考えられた. 酵母106株はMALDI-TOF MS法により11属18菌種に同定され, 84.9%が従来法と種レベルで一致した. MALDI-TOF MSを利用した食品由来微生物の同定は, 従来法と同等の精度を有し迅速かつ簡易に実施可能であった. 同定率の向上又は同定精度をさらに高めるためにはインハウスライブラリーの充実を図る必要があると考えられた.

キーワード : MALDI-TOF MS, 菌種同定, 食品分離株, *Enterobacter* 属菌

はじめに

食品微生物の検査では食品の安全性を確保するため, 危害微生物の迅速かつ正確な同定が重要となる. 微生物の同定検査は従来より菌の形態や染色性, 生理・生化学的性状, 血清学的性状などの表現性状により行われてきた. 加えて分子生物学的手法として, 塩基配列解析による同定法も一般的に用いられるようになっていく. しかし, これらの方法は時間を要し, 煩雑な作業や高い専門性が求められる.

近年, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析 (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, 以下MALDI-TOF MS) を利用した微生物同定法が開発され, 大学病院等の臨床の現場で普及してきている¹⁻³⁾. MALDI-TOF MS法を利用した微生物同定は, 前処理によって抽出した菌体由来のタンパク質を分析し, 得られたマススペクトルをソフトウェアに登録された既知の菌株ライブラリーとパターンマッチングすることにより菌種同定や株の識別を行う. 本法は臨床分離株を中心に導入が進んできた経緯から, 食品微生物分野では実用性に関する知見が少ない⁴⁾. そこで食品由来の細菌及び酵母についてMALDI-TOF MS法による同定精度の検討を目的として, 従来法による同定結果と比較した.

実験方法

1. 試料

2012年から2016年に東京都内に流通した食品から分離し

た株を中心に細菌279株, 酵母106株及び独立行政法人製品評価技術基盤機構から購入した酵母 (以下, NBRC株) 10株を供試した. また, 臨床分離株の対照としてヒトの糞便から分離された細菌57株を使用した.

2. 前処理法の検討

MALDI-TOF MS 法の前処理法はターゲットプレートにコロニーを直接塗布するセルスマエ法を用いた. なお, ビブリオ属菌及び酵母についてはセルスマエ法では同定困難であったため前処理法を検討した.

1) ビブリオ属菌

食品から分離したビブリオ属菌 5 菌種 (*Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*) 11 株についてセルスマエ法, ギ酸法及びエタノール・ギ酸抽出法の 3 法で前処理を実施し, 同定結果を比較した.

2) 酵母

菓子類から分離した株 (以下, 菓子由来株) 15 株及び NBRC 株 10 株についてギ酸法, エタノール・ギ酸抽出法及びホモジナイズ法の各前処理法を行った. 菓子由来株は LSU-D1D2 領域⁵⁾の塩基配列を用いた BLAST の相同性検索によりあらかじめ菌種を決定した.

3) 前処理法

(1) セルスマエ法

コロニーをターゲットプレートに直接塗布して乾燥させ

^a 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター精度管理室

^c 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^d 東京都健康安全研究センター微生物部

た後、 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Bruker Daltonics) (以下、マトリックス試薬) を 1 μ L 添加して乾燥させた。

(2) ギ酸法

コロニーをターゲットプレートに直接塗布し、70%ギ酸 1 μ L を添加して乾燥させた後、マトリックス試薬 1 μ L を添加して乾燥させた。

(3) エタノール・ギ酸抽出法

1.5mL マイクロチューブにいたれた蒸留水 300 μ L に少量のコロニーを懸濁後、エタノール 900 μ L を加えて再度懸濁した。13,000 rpm で 2 分間遠心後、沈渣に 70%ギ酸 40 μ L とアセトニトリル 40 μ L を加えて攪拌し、13,790 \times g で 2 分間遠心した上清 1 μ L をターゲットプレートに添加し乾燥させた後、マトリックス試薬 1 μ L を添加して乾燥させた。

(4) ホモジナイズ法

1.5 mL マイクロチューブに 70%ギ酸 50 μ L とアセトニトリル 50 μ L を加え、少量のコロニーを懸濁した。チューブ用ホモジナイザーを装着したハンドドリルを用いて氷中にて 60 秒間破碎した。破碎液を 13,790 \times g で 2 分間遠心し、上清 1 μ L をターゲットプレートに添加し乾燥させた後、マトリックス試薬 1 μ L を添加して乾燥させた。

3. MALDI-TOF MS 法と従来法による同定菌種の比較

食品由来細菌 275 株、酵母 106 株、ヒト由来細菌 57 株について従来法と MALDI-TOF MS 法で同定し、菌種を比較した。

1) 従来法による菌種同定

従来法として、生化学的性状試験による同定又は塩基配列解析による同定を行った。

生化学的性状試験法は Microstation システム (Biolog), API20E 又は ID32E (シスメックス・ビオメリュー) のいずれかを用いた。Microstation システム, API20E 及び ID32E は添付文書に従って試験を行い、最も確率の高い菌種名を採用した。

塩基配列解析はアルカリ熱抽出法又は Lyse and Go PCR Reagent (Thermo Fisher Scientific) により DNA を抽出した。細菌は 16S rDNA の上流側約 500 塩基対を対象としたプライマー (515F 及び 1115R, 又は 9F 及び 1541R) ⁶⁾ を使用し、GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 95°C, 30 秒, 55°C, 30 秒, 72°C, 60 秒で 20-35 サイクルで増幅した。酵母は LSU-D1D2 領域を対象としたプライマー (NL-1 及び NL-4) ⁵⁾ を用いて 94°C, 1 分, 52°C, 30 秒, 72°C, 2 分で 36 サイクル実施した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) により PCR 産物のシーケンシング反応を行い、BigDye XTerminator (Thermo Fisher Scientific) により反応産物を精製した後、ABI PRISM 3130 (Thermo Fisher Scientific) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列については GenBank/ DDBJ/ EMBL のデータを用いた

BLAST の相同性検索により菌種名を決定した。

複数の方法で同定を行った場合は塩基配列解析法、Microstation システム, ID32E, API20E の順に菌種名を優先した。

2) MALDI-TOF MS 法による菌種同定

前処理法の検討結果を元に、細菌はセルスマエ法又はギ酸法により、酵母はギ酸法又はエタノール・ギ酸抽出法により前処理を行った。質量分析は autoflex III 又は Microflex LT (Bruker Daltonics) を使用し、解析ソフトウェア Biotyper ver3.1 を用いて菌種同定を行った。質量分析計でマススペクトルが取得不能の場合を「分析不能」、マススペクトルは取得可能であったがライブラリーとマッチングしない場合を「同定不能」とした。また同定精度を示すスコア値は 2.0 以上を種レベル、1.7 以上 2.0 未満を属レベルの同定精度、1.7 未満は同定不能と判定した。

4. ライブラリー未登録菌種の再同定

ライブラリー未登録のため同定不能となった菓子由来株については、NBRC 基準株から取得したデータをインハウスライブラリーに登録した後、再同定を行った。登録した菌種は *Candida sorbosivorans* (NBRC103917^T) 及び *Citeromyces matritensis* (NBRC0954^T) の 2 菌種である。マニュアルに従い 1 菌種につき 1 つの Main Spectrum を作成してライブラリーに登録した後、塩基配列解析法により登録菌種と同一の菌種と推測された各 3 株について、新たに登録した株を含むライブラリーで再同定を行った。

結果及び考察

1. 前処理法の検討

前処理法はセルスマエ法、ギ酸法、ホモジナイズ法、エタノール・ギ酸抽出法の順に操作性が煩雑になり、前処理に時間を要した。

1) ビブリオ属菌

V. furnissii, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus* の 3 菌種はセルスマエ法でも 100% 同定可能であったが、*V. alginolyticus*, *V. fluvialis* の 2 菌種はセルスマエ法又はギ酸法では分析不能となる頻度が高く、エタノール・ギ酸抽出法の同定率が向上した (Table 1)。

一部のビブリオ属菌の同定にセルスマエ法又はギ酸法が適用できなかった理由として、ビブリオ属菌は菌体表面に莢膜をもつため、簡易な前処理法では菌体タンパク質の抽出が不十分であった可能性が考えられた。ビブリオ属菌以外にも、ムコイド型の細菌や厚いペプチドグリカン層をもつグラム陽性菌などは、コロニー性状や莢膜の有無等の細菌の特徴に応じて前処理法を選択する必要があると考えられた。

2) 酵母

酵母の前処理法の検討結果を Table 2 に示す。同定精度を示すスコアの平均値は、ギ酸法、ホモジナイズ法、エタノール・ギ酸抽出法の順に高くなった。スコア値 1.7 未満

の同定不能はホモジナイズ法では3菌種, ギ酸法では1菌種で, エタノール・ギ酸抽出法では認められなかった. 各前処理法のマスペクトルのピーク数は, ギ酸法, ホモジナイズ法, エタノール・ギ酸抽出法の順に多くなった (Fig. 1).

各前処理法の操作性について比較すると, エタノール・ギ酸抽出法は多数の菌株を同時に検査する際には操作が煩雑であるため, 処理の時間差が検査結果に影響する可能性があることから注意が必要である. 一方, ギ酸法は操作が容易であることから, 多数の菌株を迅速に同定する場合に有用であると考えられた. ホモジナイズ法は破碎時の手技により同定精度がばらつきやすく, 再現性に問題が生じる場合があると考えられた.

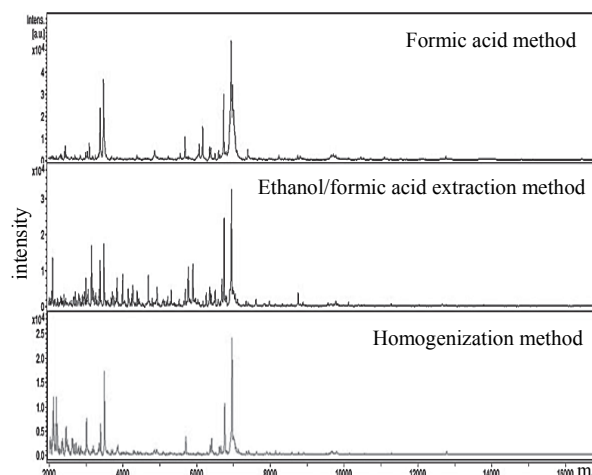


Fig.1. Mass Spectra of *Debaryomyces hansenii* by Three Pretreatment Methods

Table 1. Comparison of Three Pretreatment Methods for MALDI-TOF MS in *Vibrio* spp.

species	No. of samples identified / No. of tested (%)		
	Direct smear method	Formic acid method	Ethanol/formic acid extraction method
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1/4 (25)	1/3 (33)	2/2 (100)
<i>Vibrio fluvialis</i>	2/5 (40)	1/3 (33)	1/2 (50)
<i>Vibrio furnissii</i>	1/1 (100)	-	-
<i>Vibrio metschnikovii</i>	3/3 (100)	0/3 (0)	1/3 (33)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2/2 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)

Table 2. Comparison of Score Values by Three Pretreatment Methods of MALDI-TOF MS in Yeasts

	Formic acid method	Ethanol/formic acid extraction method	Homogenization method
Type strains			
<i>Candida albicans</i> NBRC 1385 ^T	1.938	2.345	2.126
<i>Candida guilliermondii</i> NBRC 10279 ^T	1.926	2.039	2.128
<i>Candida krusei</i> NBRC 1395 ^T	2.041	2.383	1.954
<i>Candida parapsilosis</i> NBRC 1396 ^T	1.880	2.277	1.996
<i>Filobasidium uniguttulatum</i> NBRC 0699 ^T	2.125	2.329	2.018
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 10005 ^T	2.192	2.225	1.941
<i>Pichia membranifaciens</i> NBRC 10215 ^T	1.765	2.224	2.137
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NBRC 0909 ^T	1.753	2.216	<u>1.699</u>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> NBRC 10213 ^T	2.238	1.929	2.005
<i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i> NBRC 0808 ^T	2.218	2.278	2.287
Score average	2.008	2.225	2.066
Isolated strains			
<i>Candida intermedia</i>	1.921	2.501	2.028
<i>Candida metapsilosis</i>	<u>1.614</u>	2.009	<u>1.388</u>
<i>Candida orthopsilosis</i>	1.880	2.273	1.733
<i>Candida parapsilosis</i>	2.028	2.113	1.941
<i>Clavispora lusitaniae</i>	1.930	2.383	2.165
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1.758	2.084	2.275
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1.808	2.139	1.971
<i>Pichia membranifaciens</i>	1.893	2.120	1.928
<i>Rhodotorula minuta</i>	1.912	2.368	2.278
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1.860	2.020	1.811
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.935	2.140	2.136
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1.725	2.030	<u>1.510</u>
<i>Trichosporon ovoides</i>	1.701	1.877	1.825
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1.904	2.061	1.882
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1.762	2.305	1.746
Score average	1.858	2.162	1.978

T : Type strain

Score value : $2.0 \leq \text{score}$ probable species identification, $1.7 \leq \text{score} < 2.0$ probable genus identification, $\text{score} < 1.7$ not reliable identification

ギ酸法は3法の中で最もスコア平均値が低くなったが、その原因はエタノール・ギ酸抽出法を行って検出したマスペクトルがライブラリーに登録されるためであると考えられた。すなわち、ギ酸法はエタノール・ギ酸抽出法に比べてピーク数が減少するため、パターンマッチングの比率が下がり、その結果としてスコア値が低くなると考えられた。しかしながら、ギ酸法はスコア値が2.0未満の属レベルの場合でもエタノール・ギ酸抽出法と同じ菌種名を示した。また、ライブラリーに同一菌種が複数登録されている場合は、同定結果の上位10菌種の多くを同一菌種が占めていた。酵母の場合はスコア値が属レベルの場合であっても、スコア値が1.7以上かつ上位に複数の同一菌種を示している場合は、ギ酸法でも菌種レベルの同定精度が確保されることが示唆された。

2. MALDI-TOF MS法と従来法による同定菌種の比較

1) 食品由来細菌及びヒト由来細菌

食品由来細菌及びヒト由来細菌の同定結果をTable 3及びTable 4に示す。食品由来細菌275株はMALDI-TOF MS法で27属59菌種に同定され、同定不能株はなかった。MALDI-TOF MS法と従来法の同定結果が属レベルで一致した株は258株(93.8%)であり、種レベルは151株(54.9%)、不一致は17株(6.2%)であった。一方、対照としたヒト由来細菌57株は14属22菌種に同定され、従来法との一致率は属レベルが53株(93.0%)、種レベルが47株(82.5%)であり、不一致は4株(7.0%)であった。属レベルでの一致率を見ると、食品由来93.8%、ヒト由来93.0%と同等であったが、種レベルでの一致率では前者54.9%、後者82.5%であり、ヒト由来株の一致率が高かった。また、不一致率は前者6.2%、後者6.9%とほぼ同等であった。

食品由来細菌において、属レベルでは一致したが種レベルの同定が異なっていた細菌は、*Salmonella*属菌を除き11属あった。種レベルでの一致率が低かった理由として、供試菌株の49%を占めていた*Enterobacter*属菌の中に従来法では鑑別できない菌種が一部で存在していたことや、菌株の30%を占めていた*Enterobacter cloacae*類縁菌

(*Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter nimipressuralis*の6菌種)⁷⁾である*Enterobacter asburiae*の一致率が低かったことが主な原因であった。また、*Citrobacter*属菌や*Raoultella*属菌、*Cronobacter*属菌の種レベルの一致率が低かったことも要因として考えられた。MALDI-TOF MS法による*Enterobacter cloacae*類縁菌^{8,9)}や*Cronobacter*属菌¹⁰⁾の同定の難しさは他の報告でも指摘されているが、これらの菌種は従来法でも菌種鑑別が難しい。一方、従来法において鑑別が困難であった*Klebsiella*属菌と*Raoultella*属菌は、MALDI-TOF MS法では両属のマスペクトルパターンが異なり、鑑別可能であった(Fig. 2)。

両法で不一致であった21株について追加の生化学性状試験を実施し詳細に確認したところ、MALDI-TOF MS法に

よる同定が正しいと推定された株が17株(*Enterobacter*属3株、*Escherichia*属3株、*Klebsiella*属4株、*Raoultella*属3株、*Staphylococcus*属1株、*Hafnia*属2株、*Providencia*属1株)、従来法による同定が正しいと推定された株が4株

(*Enterobacter*属1株、*Pantoea*属1株、*Cronobacter*属1株、*Salmonella*属1株)であった。この結果を加算すると、食品由来細菌のMALDI-TOF MS法における属レベル以上の同定精度は98.5%(275株中271株)となった。

食品由来細菌は検出される菌種が多岐にわたることから同定には時間と高い専門性が必要であり、細菌数や大腸菌群などの日常検査で検出される指標菌を菌種まで同定しようと試みる場合は困難が伴う。MALDI-TOF MS法は簡易・迅速に高精度の同定が行えることから、指標菌の同定にも有用であると考えられた。今後、種レベルの同定精度をさらに高めていくためには、食品分離株のデータをインハウスライブラリーに蓄積することが重要であると考えられた。

2) 酵母

酵母106株のうち90株(84.9%)はMALDI-TOF MS法により11属18菌種に同定され、16株は同定不能であった(Table 5)。同定可能であった株はすべて従来法と種レベルで一致した。同定率を見ると、臨床由来酵母の報告85.2%¹⁾、92.0~96.3%¹¹⁾に比べて若干低くなった。

同定不能であった16株のうち7株(3菌種)(*Candida sorbosivorans*, *Citeromyces matritensis*, *Rhodotorula dairenensis*)は、塩基配列解析法で同定された菌種名がライブラリー未登録であり、残りの9株(5菌種)

(*Filobasidium capsuligenum*, *Candida infanticola*, *Candida spandovensis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon ovoides*)はライブラリーの登録株数が1菌種当たり1株~4株であった。ライブラリー登録菌種であるにもかかわらず同定不能となった理由として、同じ菌種でもマスペクトルパターンには若干の幅が存在することから、ライブラリー登録数が少ない菌種ではマスペクトルが近似していない場合に、同定できなかった可能性が推察された。ライブラリーの登録株数が少ない場合、同定不能や誤同定になりやすいことは他の報告でも指摘されている¹²⁾。

酵母は糸状菌に比べて形態的形狀に乏しいため、同定が極めて困難であり熟達した技術が必要とする。また、塩基配列解析法では手技が煩雑であり時間を要する。一方、MALDI-TOF MS法は特別な技術や試薬等が不要であり、簡易・迅速に同定が可能である。また、今回供試した酵母の93.4%はソフトウエアのライブラリーでカバーされており、菓子由来酵母については一定の有効性が確認された。さらに、同定可能であった株は塩基配列解析法と種レベルで100%一致したことから、同定精度も高いと考えられた。

3. ライブラリー未登録菌種の再同定

NBRC株をインハウスライブラリーに登録後、2菌種6株の再同定を行った結果、*Candida sorbosivorans*は同定が可

能となったが, *Citeromyces matritensis*は再同定も不能であった。再同定不能となった理由は、菓子由来株のマススペクトルが基準株のマススペクトルに近似していなかったた

めと考えられた。これについてはSengら²⁾も同様の報告をしている。これまでにMALDI-TOF MS法で同定した細菌及び酵母約1,900株のうち、同定不能であった18株のライ

Table 3. Identification of Bacteria Isolated from Food by MALDI-TOF MS and Other Methods

MALDI-TOF MS	Other methods (n)			Mismatched bacterial names by other methods
	Species	Genus	Mismatch	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1			
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1			
<i>Acinetobacter pittii</i>		1		
<i>Aeromonas caviae</i>	1			
<i>Aeromonas veronii</i>		2		
<i>Bacillus atrophaeus</i>		1		
<i>Bacillus cereus</i>	2			
<i>Bacillus flexus</i>	1			
<i>Citrobacter braakii</i>	2	4		
<i>Citrobacter freundii</i>	19	4		
<i>Cronobacter sakazakii</i>		2	1	<i>Enterobacter aerogenes</i> *4
<i>Enterobacter aerogenes</i>		2	1	<i>Pantoea agglomerans</i> *4
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1			
<i>Enterobacter asburiae</i> *1	6	27	3	<i>Cronobacter malonaticus</i> *4, <i>Raoultella terrigena</i> *5, <i>Kluyvera ascorbate</i> *5
<i>Enterobacter cloacae</i> *1	43	2		
<i>Enterobacter hormaechei</i> *1,2		1		
<i>Enterobacter kobei</i> *1,2		36	1	<i>Kluyvera cryocrescens</i> *5
<i>Enterobacter ludwigii</i> *1,2		12		
<i>Escherichia coli</i>	6			
<i>Escherichia hermannii</i>	1			
<i>Escherichia vulneris</i>			3	<i>Klebsiella oxytoca</i> *5
<i>Hafnia alvei</i>	4			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2		1	<i>Escherichia vulneris</i> *5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12		3	<i>Raoultella planticola</i> *5, <i>Leclercia adecarboxylata</i> *5
<i>Kocuria marina</i>	1			
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2			
<i>Listeria innocua</i>	1			
<i>Listeria monocytogenes</i>	4			
<i>Morganella morgani</i>	7			
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1			
<i>Paenibacillus odorifer</i>	1			
<i>Paenibacillus pasadenensis</i>		1		
<i>Pantoea agglomerans</i>	1			
<i>Pantoea septica</i>		1		
<i>Photobacterium damsela</i>	3			
<i>Pluralibacter pyrinus</i>	4			
<i>Proteus mirabilis</i>	2			
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2			
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>		2		
<i>Pseudomonas monteilii</i>		2		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1			
<i>Rahnella aquafilis</i>	3			
<i>Raoultella ornithinolytica</i>		1	3	<i>Klebsiella oxytoca</i> *5, <i>Enterobacter cloacae</i> *5
<i>Raoultella planticola</i>		1		
<i>Raoultella terrigena</i>		1		
<i>Salmonella</i> sp. *3		1		
<i>Serratia fonticola</i>	1			
<i>Serratia liquefaciens</i>	1			
<i>Staphylococcus aureus</i>	1			
<i>Staphylococcus simulans</i>	1			
<i>Staphylococcus warneri</i>		1	1	<i>Sphingomonas paucimobills</i> *5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	2		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1			
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	1			
<i>Vibrio furnissii</i>	1			
<i>Vibrio fluvialis</i>	2			
<i>Vibrio metschnikovii</i>	3			
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1			
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1			
total	151	107	17	

*1: *Enterobacter cloacae* complex

*2: These bacterial species can not be identified by conventional phenotypic methods.

*3: Salmonella can only be identified on genus level.

*4: These bacterial species misidentified by MALDI-TOF MS.

*5: These bacterial species misidentified by other methods.

ブラリー登録株数は0~3株であり、1菌種当たりの登録株数が少ない程、同定できない株が多かった。MALDI-TOF MS法では、ライブラリーに登録されている微生物の種類数だけでなく1菌種当たりの登録株数が同定精度に大きく

影響する可能性がある。また、同定精度と同一菌種の登録株数の間には有意な相関関係があるという報告²⁾もあることから、1菌種について少なくとも5株以上を登録することにより同定精度が向上すると考えられた。

Table 4. Identification of Bacteria Isolated from Clinical samples by MALDI-TOF MS and Other Methods

MALDI-TOF MS	Other methods (n)			Mismatched bacterial names
	species	genus	mismatch	
<i>Acinetobacter junii</i>	1			
<i>Aeromonas caviae</i>	1			
<i>Campylobacter jejuni</i>	25			
<i>Campylobacter rectus</i>	1			
<i>Campylobacter showae</i>	1			
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	1		
<i>Citrobacter braakii</i>	1	2		
<i>Citrobacter freundii</i>	1			
<i>Citrobacter youngae</i>	1			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1			
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1			
<i>Escherichia coli</i>	2			
<i>Hafnia alvei</i>			2	<i>Enterobacter aerogenes</i> ^{*2} , <i>Yokenella regensburgei</i> ^{*2}
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1			
<i>Morganella morganii</i>	2			
<i>Proteus mirabilis</i>	3			
<i>Providencia rettgeri</i>			1	<i>Raoultella planticola</i> ^{*2}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1			
<i>Pseudomonas koreensis</i>		1		
<i>Salmonella</i> sp. ^{*1}		2	1	<i>Citrobacter koseri</i> ^{*3}
<i>Staphylococcus aureus</i>	2			
total	47	6	4	

*1: *Salmonella* can only be identified on genus level.

*2: These bacterial species misidentified by other methods.

*3: These bacterial species misidentified by MALDI-TOF MS.

Table 5. Identification of Yeasts by MALDI-TOF MS and Other Methods

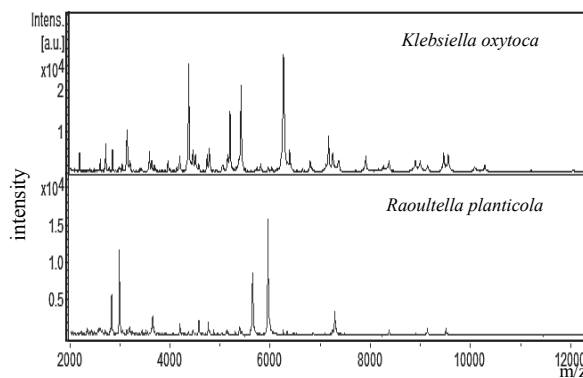
MALDI-TOF MS	Other methods (n)		
	species	genus	mismatch
<i>Candida guilliermondii</i>	1		
<i>Candida intermedia</i>	1		
<i>Candida metapsilosis</i>	3		
<i>Candida orthopsilosis</i>	6		
<i>Candida parapsilosis</i>	10		
<i>Candida pelliculosa</i>	4		
<i>Clavispora lusitaniae</i>	8		
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1		
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1		
<i>Pichia membranifaciens</i>	2		
<i>Rhodotorula minuta</i>	1		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	8		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2		
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	6		
<i>Trichosporon ovoides</i>	2		
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	26		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2		
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	6		
subtotal	90 (84.9%)		
not reliable identification	16* (15.1%)		
total	106		

*: These strains identified the following bacterial species by other methods.

Candida sorbivorans (3), *Candida infanticola* (1), *Candida Spandovensis* (5)

Citeromyces matritensis (3), *Filobasidium capsuligenum* (1), *Rhodotorula dairenensis* (1)

Torulasporea delbrueckii (1), *Trichosporon ovoides* (1)

Fig.2. Mass Spectra of *Klebsiella oxytoca* and *Raoultella planticola*

4. MALDI-TOF MSを利用した同定の利点と注意点

検査に要した時間は、従来法の生化学的性状試験では最短でも24時間以上、塩基配列解析法では48時間以上であった。一方、MALDI-TOF MS法ではターゲットプレート1枚(95株)につき2時間未満であり、特別な手技も不要であった。また、最も時間のかかるエタノール・ギ酸抽出法で前処理法を行った場合でも4時間程度であり、大幅な時間短縮が可能であった。このような手技の簡便さと時間短縮は、MALDI-TOF MS法が従来法と比べて優位な点と考えられる^{1-4,12)}。

MALDI-TOF MSを利用した食品由来微生物の同定は、菌種鑑別が困難な一部の属を除き、従来法と高い一致率を示した。また、菌種により適切な前処理法を選択することにより、同定精度の向上が見込まれた。一方で、*Enterobacter cloacae* 類縁菌など菌種鑑別が難しい細菌については、同定結果とコロニー形状、生化学性状試験等の他の情報と照らし合わせて、菌種名を判断する技術や知識も必要であると考えられた。

ま と め

食品から分離された細菌及び酵母について質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いた菌種同定のための前処理法を検討し、従来法である生化学的性状試験法又は塩基配列解析法による同定結果と比較した。

前処理法を検討した結果、ビブリオ属菌はギ酸法よりもエタノール・ギ酸処理が適していた。酵母はより簡便なギ酸法がエタノール・ギ酸抽出法と同等の同定精度を示した。

MALDI-TOF MS法と従来法における菌種同定の一致率は、食品由来細菌275株では属レベル93.8%、種レベル54.9%であり、対照としたヒト由来細菌57株では属レベル93.0%、種レベル82.5%であり、酵母106株では84.9%が種レベルで一致した。食品由来細菌の供試菌株の30%を占めていた*Enterobacter cloacae* 類縁菌はいずれの手法でも菌種鑑別が困難であり、これが食品由来細菌の種レベルでの一致率が低くなった要因と考えられた。

MALDI-TOF MSを利用した食品由来微生物の同定は、

多くの属において従来法と同等の同定精度を示した。しかし、食品から分離される菌種は多岐にわたることから、さらに同定精度を高めるためにはインハウスライブラリーの充実を図る必要があると考えられた。

謝 辞

本論文の執筆に当たり、質量分析装置及び解析用ソフトウェアについてご協力いただきました慶應義塾大学専任講師加藤真吾先生並びに慶應義塾大学感染症学教室に深謝いたします。

文 献

- 1) van Veen, S., Q., Claas, E. C. J. and Kuijper, Ed J. : *J. Clin. Microbiol.*, **48**, (3), 900-907, 2010.
- 2) Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., *et al.* : *Clin. Infect. Dis.*, **49** (4), 543-551, 2009.
- 3) Clark, A. E., Arora, A., Wolk, D. M., *et al.* : *Clin. Microbiol. Rev.*, **26**(3), 547-603, 2013.
- 4) Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R., *et al.* : *Open Microbiol. J.*, **7** 135-141, 2013.
- 5) Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. : *J. Clin. Microbiol.*, **35**(5), 1216-23, 1997.
- 6) 中川恭好, 田村朋彦, 川崎浩子: 遺伝子解析法, 日本放線菌学界編, 放線菌の分類と同定, 83-140, 2001, 財団法人日本学会事務センター, 東京.
- 7) Paauw, A., Caspers, M. P., Schuren, F. H., *et al.* : *PLoS ONE* **21**: e3018, 2008.
- 8) Rodrigues, N. M. B., Bronzato, G. F., Santiago, S. G., *et al.* : *Braz. J. Microbiol.*, **48**(1), 132-138, 2017.
- 9) Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A. N., *et al.* : *FEMS Microbiol. Lett.*, **328**(1), 46-53, 2012.
- 10) Stephan, R., Ziegler, D., Pflüger, V., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, **48**(8), 2846-2851, 2010.
- 11) Dhiman, N., Hall, L., Wohlfiel, S. L., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, **49**(4), 1614-1616, 2011.

Identification of Bacteria and Yeasts Isolated from Foods Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

Satomi UEHARA^a, Yumi TAKAHASHI^a, Makiko KOBAYASHI^a, Rei KATO^a, Yukari NISHINO^a, Yukako SHIMOJIMA^a, Noriko KONISHI^a, Takashi CHIBA^a, Keiko YOKOYAMA^a, Akihiko HIRAI^a and Kenji SADAMASU^a

Bacteria and yeast isolated from foods were identified using a matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), which is a new method for the identification of microbial species. Results of species identification using MALDI-TOF MS were compared with the results obtained using a biochemical identification method and DNA sequence analysis. Most bacterial species were examined using the direct smear pretreatment method, but other methods were used for *Vibrio* spp. and yeast. For *Vibrio* spp., identification rate of the ethanol/formic acid extraction pretreatment method was higher than that of the formic acid method. To identify species of yeasts, the formic acid and ethanol/formic acid extraction methods indicated equivalent levels of precision in identification.

Using MALDI-TOF MS, a total of 275 bacterial strains was identified and classified into 27 genera and 59 species. These results agreed with those obtained using conventional methods at a rate of 93.8% at the genus level and 54.7% at the species level. *Enterobacter* spp., which accounted for 49% of the strains tested, was particularly difficult species of bacteria to identify using either method. The difficulty in identifying this species may help to explain the low matching rate in species identification between the methods. Using MALDI-TOF MS, a total of 106 yeast strains was identified and classified into 11 genera and 18 bacterial species. These agree with those obtained using conventional methods at a rate of 84.9% at the species level.

Identification of bacteria and yeasts isolated from foods using MALDI-TOF MS showed high accuracy comparable to conventional methods at the species level. Because the types of microorganisms isolated from foods are diverse, it is important to increase the number of mass spectra included in in-house libraries to raise identification accuracy.

Keywords: MALDI-TOF MS, species identification, isolated from foods, *Enterobacter* spp.

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan