

## 微生物による食品苦情事例とその解析

高橋 由美, 千葉 隆司, 猪又 明子, 和宇慶 朝昭, 甲斐 明美, 矢野 一好

## 微生物による食品苦情事例とその解析

高橋 由美\*, 千葉 隆司\*, 猪又 明子\*\*, 和宇慶 朝昭\*, 甲斐 明美\*, 矢野 一好\*\*\*

平成19年度に搬入された食品苦情30事例中4事例についてその原因を解析した。カビ臭を呈したナチュラルミネラルウォーターからは、放線菌(*Nocardia*属菌), ところてんからは、酵母(*Candida boidinii*)を検出した。生切り餅からは多種類の真菌が検出され、アムスメロンからはバラ色カビ病の原因菌である*Trichothecium* 属菌を検出した。これらの分離菌株が示した性状は、苦情の主訴と一致しており、苦情原因菌と推定した。

**キーワード:** 食品苦情, 放線菌, 塩基配列解析, ナチュラルミネラルウォーター, 2-MIB, *Trichothecium* 属菌, バラ色カビ病

### はじめに

近年、食品に関わる様々な事件が発生し、食品に関する国民意識は増加する一方である<sup>1)</sup>。このような背景から、当センターに搬入される食品苦情事例も多様化・複雑化している。特に真菌による食品汚染は、細菌による汚染と異なり、消費者の目につきやすく苦情として持ち込まれる例が多い。平成19年度に我々が経験した微生物を原因とした苦情事例数は、30事例であった。その原因の内訳は、異物混入と認識された事例が19事例で全体の約6割を占め、ついで臭いに関するもの6事例、変色5事例であった。味に関する苦情では複数要因の事例が多く、「喫食して味がおかしいと思ったらカビが生えていた」、「カビ臭がして味が変わった」などであり、味が変わった単独事例は1事例のみであった。今回は、これらの中から、特徴的な事例であった4事例、すなわち、カビ臭を感じたもの、酵母や糸状菌が発育していたもの、および異味を呈したものに関する事例について、分離菌株の解析を行い、苦情原因の推定を行ったので報告する。

### 実験方法

#### 1. 材料

平成19年度に検査依頼された食品苦情事例のうち異臭1事例(ナチュラルミネラルウォーター), 真菌の発育2事例(ところてんおよび生切り餅), 異味1事例(アムスメロン)由来の各々の苦情品4検体および参考品を供試した。各事例の詳細については、結果の項に記載した。

#### 2. 培養および形態観察

苦情部位を採取した後、光学顕微鏡下で直接鏡検試験により真菌の検索および形態観察を行った。また、苦情部位を無菌的に採取し、それぞれポテトデキストロース寒天培地(PDA: 栄研化学)で25°C, 4~7日間培養した後、肉

眼による培養形態の確認と光学顕微鏡下での形態観察を行った。なお、放線菌についてはPDAを用いて、25°C, 4~7日間および27°C, 10日間の培養を行った。

#### 3. 生化学性状試験

分離培養した菌株について、市販の真菌同定キット(酵母-API 20C AUX: 日本ビオメリユー社, 糸状菌-バイオログシステム: GSIクレオス社)を用いた。キットの操作はマニュアルに従った。また酵母については、追加表現性状試験として、窒素源同化試験用培地(YEAST CARBON BASE: Difco)を用いた硝酸塩の資化性試験、偽菌糸形成および25°C, 37°C, 42°Cでの発育を確認した。これらの結果をYeasts: Characteristics and Identification<sup>2)</sup>およびThe Yeasts: a Taxonomic Study<sup>3)</sup>の記載と比較し、菌種を決定した。

#### 4. 塩基配列解析法による同定

放線菌については、表現性状試験で分離菌株を同定することが困難であったため、「放線菌の分類と同定」<sup>4)</sup>を参考に、以下に示した塩基配列解析法により同定した。

##### 1) 試薬およびPCR条件

PCRおよびシーケンス反応は、Microseq500(アプライドバイオシステムズ)を用いて行った。操作およびPCR条件は、試薬の説明書に従って行った。

##### 2) PCRおよび増幅産物の精製

菌体からアルカリ煮沸法よりのDNAを抽出した。得られたDNAをテンプレートとしてGeneAmp 9600(PerkinElmer)を用いた核酸増幅を行った。次いで、アガロースゲル: Agarose S(ニッポンジーン)を用いた電気泳動によりPCR産物を確認し、Montage PCR Centrifugal Filter(Millipore)による限外膜ろ過によりPCR増幅産物の精製を行った。

##### 3) 塩基配列解析

精製したPCR産物を対象に、シーケンサー: Applied

\* 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

\*\* 東京都健康安全研究センター環境保健部水質・環境研究科

\*\*\* 東京都健康安全研究センター微生物部

Biosystems 3130 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。次いで、GenBank/EMBL/DBJを利用したBLAST (basic local alignment search tool) により解析した。

## 結 果

### 事例1 カビ臭を呈したナチュラルミネラルウォーター

定期的に宅配されるウォーターサーバー型のナチュラルミネラルウォーターを飲んだところ、いつもと違う異臭と口腔内の異変を感じたため、保健所へ相談した。保健所の官能検査においても、試料から異臭を確認したため、当センターへ検査依頼があった。採取された試料は2種類で、サーバーを経由したものとボトルから直接採水したものであった。搬入された試料について、複数の職員で官能検査を行ったところ、強い墨汁臭が確認された。また、理化学検査によりカビ臭の原因物質である2-メチルイソボルネオール (2-MIB) が検出された。これらの試料について、培養を行ったが、両試料に真菌の発育は認められず、多数の粉状コロニーが確認された (Fig. 1)。これらのコロニーについてグラム染色を行ったところ、グラム陽性菌であることが確認され、放線菌が疑われた。これら分離株のうち、コロニー形状が異なる3株について分離培養を行った結果、2株が墨汁臭を呈した。そこで分離した2株について、保坂らの方法<sup>5)</sup>に準拠し2-MIBとジェオスミンの検査を行ったところ、分離株からも2-MIBおよびジェオスミンが検出された。次いで、これらの菌株についてバイオログシステムを用いて同定を試みたが、同定確率が低く同定できなかった。そこで、塩基配列解析を行った結果<sup>6-7)</sup>、分離された2株は放線菌の一種である *Nocardia* 属菌と同定された (Fig. 1)。

### 事例2 インターネット販売で購入したところてん

2007年6月にインターネット販売でところてんを購入し

た。本商品は、常温の宅配便で購入者に届けられ、購入者宅でも常温で保管されていた。購入後から約1ヶ月後、開封したところ、異臭および浮遊物があり、保健所に持ち込まれたものである。なお参考品として、ところてんの未開封品も同時に検査を行った。試料を肉眼で観察した結果、苦情品・参考品共に中に入っている液体は白濁していた。異臭および腐敗臭は苦情品で強く、参考品でもわずかに確認されたため、内容液について、光学顕微鏡を用いて観察した結果、両者共に短～長桿菌を認めた (Fig. 2)。これら試料について培養検査を行ったところ、苦情品からは  $1.8 \times 10^5$  /g、参考品からは  $4.5 \times 10^4$  /g の酵母が検出された。分離した酵母についてAPI 20C AUXを用いた表現性状試験および追加表現性状試験を行った。得られたプロファイル番号とデータベース (API 20C AUX V.3.0) から選択された分類群との一致確率を確認した。これらの結果を加味して検討した結果、苦情品・参考品共に分離株は *Candida boidinii* と同定された。

### 事例3 生切り餅に見られた多種類の真菌

生切り餅1kg入りを購入、一部を喫食した。数日後、残りを食べようとしたところ、餅に黒い真菌状の異物が多数確認されたため、保健所に相談した。なお自宅での保存方法は不明であった。試料 (4個) には、脱酸素剤が封入されていたが、肉眼で真菌様集落が多数確認された (Fig. 3)。これら異物について光学顕微鏡で直接観察したところ、真菌であることが確認されたため、培養検査を行った。その結果、4種類の真菌 (*Pithomyces* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium sphaerospermum*, *Ulocladium* sp.,) が分離・同定された。また、苦情品に発育した真菌集落には、25×18mm (*Pithomyces* sp.)、45×25mm (*Curvularia* sp.) とかなり大きいものも確認されたため、分離菌株の発育速度をPDA培地を使って確認した。その結果、集落の大きさ

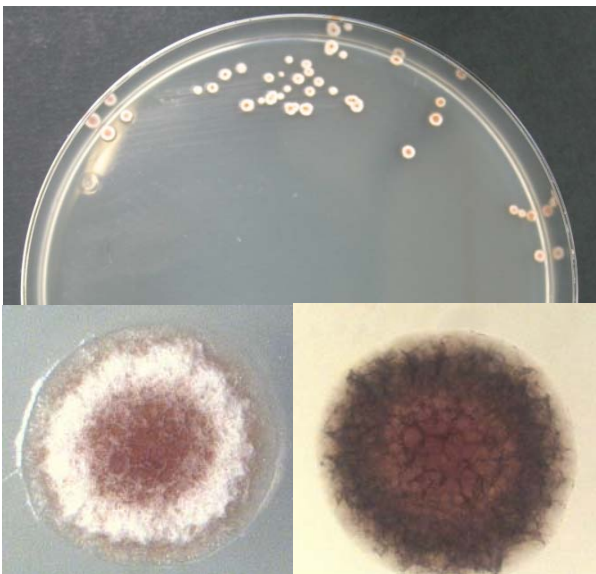


Fig. 1 Growth of Actinomycete (*Nocardia* sp.) Isolated from Natural Mineral Water.

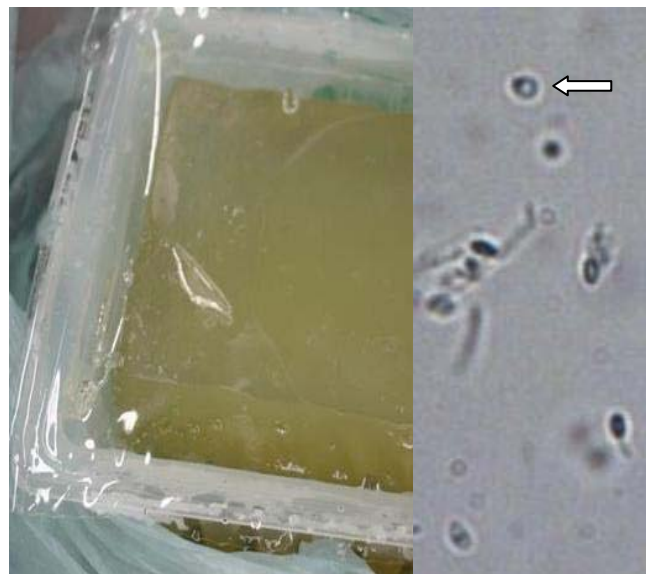


Fig. 2 Gelidium Jelly Contaminated by Yeasts (*Candida boidinii*).



Fig. 3. Rice Cake Contaminated by Many Kinds of Fungi.

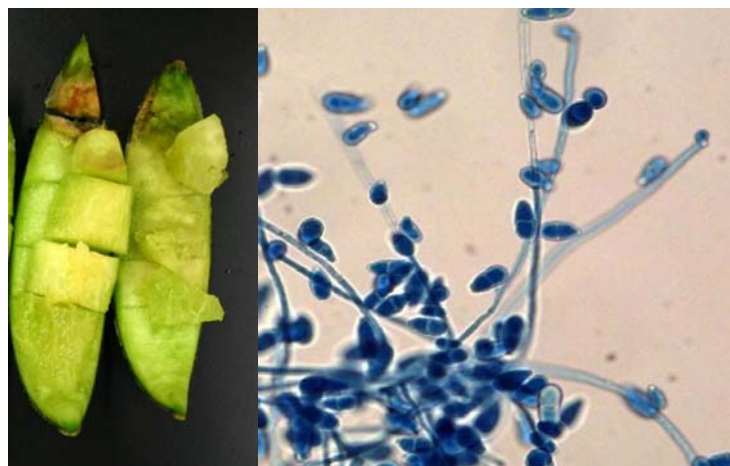


Fig. 4. Micrograph of the Fungi Isolated from Melon.( 2-celled conidia)

は25°C, 5～6日間の培養で苦情品とほぼ同等に達した。

#### 事例4 喫食時に激しい口腔内のしびれを生じたアムスメロン

自宅付近の青果店で1/2にカットされたアムスメロンを購入し、翌朝喫食したところ、舌にしびれるような苦味を感じたため、毒物の混入を疑い保健所へ相談した。苦情品を肉眼で観察したところ、果肉の一部分が淡黄褐色に変色していた (Fig. 4)。変色した果肉部分を光学顕微鏡で観察したところ、真菌菌糸と思われる部分を多数認めたため、変色部の培養を行った。その結果、変色部からは真菌が多数分離され、*Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Trichothecium* sp. の4菌種が分離された。また、苦情者が呈した症状と苦情内容が*Trichothecium* 属菌によるバラ色カビ病の症状と一致していた。

### 考 察

平成19年度に当センターが保健所から依頼された食品に関わる苦情のうち、特徴的であった4事例について分離菌株の解析を行った結果、苦情の原因が以下のように推定された。

近年、国内でのミネラルウォーター消費量は急増している。2007年の調査では、国民1人あたりのミネラルウォーター消費量は、平成元年と比べて約20倍の増加と報告されている<sup>8)</sup>。これに伴い、当センターに搬入されるミネラルウォーター関連の苦情も増加しているが、事例1は、異臭を呈したナチュラルミネラルウォーターから放線菌の一種である*Nocardia*属菌が分離され、分離菌株からも検体と同様のカビ臭物質が検出された事例であった。この結果から、本事例の原因は原水の殺菌不足等による*Nocardia*属菌の混入によるものと推定された。市販ミネラルウォーターのうち、ナチュラルミネラルウォーターは、処理方法がろ過・沈殿および加熱殺菌に限られている。また、製品に対する微生物学的な基準は一般細菌数と大腸菌群のみであり、東京都内における市販ミネラルウォーターの調査においても、

真菌および細菌の汚染が報告されている<sup>9)</sup>。放線菌は、土壌などの自然環境に広く存在しているため、製造工程を通じて食品へ混入する可能性があり、本菌の中にはカビ臭物質を産生する菌種が存在している。これらの菌種が食品中で増殖した場合、異臭味の原因になる可能性があり、特に2-MIBは、5ng/L程度の微量であっても異常を感じさせることが報告されている<sup>10)</sup>。放線菌は、同定に長い培養時間と特殊な検査技法が要求されるため、近年は、分子生物学的な手法が取り入れられている微生物群である<sup>4)</sup>。当センターにおいて過去に扱った苦情事例においても、放線菌が原因と疑われた事例が存在したが、分離株の同定には至らなかった<sup>5)</sup>。今回は、16S rDNAを利用した塩基配列解析により分離株の同定が可能であった。今後、放線菌のような同定に苦慮する微生物に対しては、分子生物学的な手法を積極的に利用することが有用であると考える。

近年、インターネットショッピングの利用人口は増加しており、食品についても多く取り扱われている<sup>11)</sup>。しかし、インターネットで販売される食品については、保存形態等、一般的な流通とは異なる部分があることや、健康被害が広域に渡る恐れがあるなどの問題点も指摘されている。また、当センター広域監視部が行った先行調査においても<sup>11)</sup>、食品衛生法等に規定する表示の情報が不十分であること、製品の違反率も一般的な販売形態と比較して高いなどの実態が明らかになっている。このような背景の中、事例2では、インターネットを通じて購入したところでの保存方法に原因があると考えられた事例であった。すなわち、製品に混入していた酵母が、販売業者が指定していた保存方法では制御できず、食品中で増殖したものと考えられた。製品に関する情報が十分とはいえないインターネットを利用して食品を購入する場合、販売までの商品の保存温度をはじめ、商品の搬送、未開封状態での家庭での保管方法などについて特に注意を払う必要がある。

真菌は環境中に多く存在しており、特に食品の原材料ではその汚染率が高い<sup>12)</sup>。しかし、食品に付着しているすべての真菌が発育するわけではなく、食品の水分活性やpH、

保存温度および食品に含まれる各種の成分などにより、食品中での真菌の発育は制御されている<sup>12-13)</sup>。事例3に示した切り餅は、かつては真菌の生えやすい食品の代表とされていたが、近年は食品の保蔵技術が向上し、真菌発生が少なくなってきた。本事例も、脱酸素剤を用いて真菌の発生を防いでいたパック入り個別包装製品であった。真菌の防除手段として脱酸素剤を利用することは、特に好乾性真菌の発育抑制に対して有効であるが、本事例の個別包装には脱酸素剤が入っておらず、外装袋内に脱酸素剤を1つ入れただけの含気包装製品であった。個包に脱酸素剤が封入されていない本事例のような製品に発育の速い真菌が付着した場合、苦情に至る可能性が高い。真菌の制御方法を正しく理解することが、真菌による苦情を防ぐためには重要である。

真菌は、加工食品に対して危害を与えるだけではなく、作物や樹木などの植物に直接危害を加える場合がある。事例4では、メロンの変色部から多種類の真菌が検出された。これらの多くは、試料搬入までの二次的な汚染であると考えられたが、分離株の中に*Trichothecium* 属菌が含まれていた。*Trichothecium* 属菌の一種である*T.roseum* は、バラ色カビ病の原因菌として知られている。バラ色カビ病は、本菌が果面の小さな亀裂等から侵入して果肉を腐らせた結果、苦味成分であるククルビタシンが局所的に産生される<sup>14)</sup>。ククルビタシンは、ウリ科作物に広く含まれているが、通常は含有量が少ない。しかし、低温や水不足、真菌の感染などにより、作物中での含有量が増加する。バラ色カビ病は、水分や糖分の多い果実にみられ、特に果皮が薄い品種で発病するため、本事例で示したアムスメロンでは発生頻度が高い。また、バラ色カビ病を発症した果実は、果面側の外観だけでは正常なメロンと見分けがつけにくいため、消費者が気づかずに購入してしまう場合がある。そして、喫食時に舌がしびれるほどの強い苦味が局所的に存在するため、毒物の混入と混同される場合もある。しかし、果実の種類や果肉面の観察、苦情者の主訴内容等を総合的に熟考すれば、苦情原因の推定が可能である。

苦情の原因を推定し、その対策を講じるには、原因の詳細な解析と結果の蓄積が重要である。ここに示した事例は、特徴的な苦情事例であることから、同様な苦情事例の解明に寄与できるものと考えられる。今後も、継続的にこのような情報を蓄積していくとともに、積極的に提供していくことが、微生物による食品苦情を減少させるためには必要であるとする。

## ま と め

平成19年度に我々が経験した特徴的な4つの苦情事例について解析した。事例1では、ナチュラルミネラルウォーター中に放線菌の一種である*Nocardia*属菌が発育し、本菌によって2-MIBを主としたカビ臭物質が産生されたものと推定された。事例2では、ところてんを汚染した酵母(*Candida boidinii*)が喫食時までの保存中に増殖した事例

であり、食品の流通過程や家庭での保管方法の徹底が重要であることが示唆された。事例3では、生切り餅が数種類の真菌に汚染されたものであり、真菌の防除手段として有効な脱酸素剤の誤った使用法が原因であると思われた。事例4では、アムスメロンがバラ色カビ病の原因菌である*Trichothecium*属菌に汚染され、苦味成分(ククルビタシン)が産生された結果、苦情者が喫食時に口腔内にしびれを感じたものと推定された。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：食品安全モニター課題報告「食品の安全性に関する意識等について」  
<http://www.fsc.go.jp/monitor/1906moni-kadaihoukoku.pdf>  
(2008年7月1日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) J,A,Barnett., R,W,Payne. and D, Yarrow.: "Yeasts: Characteristics and Identification", 3rd Ed., 2000  
Cambridge University Press, Cambridge.
- 3) Kurtzman, C.P., Fell, Jack, W.: "The Yeasts: a Taxonomic Study", 4th ed., 1998, Elsevier, Amsterdam.
- 4) 日本放線菌学会編集：放線菌の分類と同定, 2001, 日本学会事務センター, 東京.
- 5) 保坂三継, 眞木俊夫: 東京衛研年報, 52, 260-264, 2001.
- 6) 千葉隆司, 和宇慶朝昭, 諸角 聖, 他: 東京健安研七  
年報, 57, 159-163, 2006.
- 7) 千葉隆司, 和宇慶朝昭, 貞升健志, 他: 食衛誌, 48,  
1-7, 2007.
- 8) 日本ミネラルウォーター協会: ミネラルウォーターの  
1人当り消費量の推移, <http://www.minekyo.jp/08-2.pdf>  
(2008年7月1日現在、なお本URLは変更または抹消の  
可能性がある)
- 9) 藤川 浩, 和宇慶朝昭, 楠 淳, 他: 日食微誌, 13, 41-44,  
1996.
- 10) 高田 堅一, 北海道開発土木研究所月報, 611, 2004.
- 11) 東京都: 名産品のインターネット通販 検査結果,  
<http://www.metro.tokyo.jp/CHOUSA/2003/10/60dal100.htm>  
(2008年7月1日現在、なお本URLは変更または抹消の  
可能性がある)
- 12) 諸角 聖, 藤川 浩, 和宇慶朝昭, 他: 東京健安研七  
年報, 55, 3-12, 2004.
- 13) 宇田川俊一: 食品の真菌汚染と危害, 2004, 幸書房,  
東京.
- 14) 農林水産消費安全技術センター: 大きな目小さな目,  
74, 2004.
- 15) 高鳥浩介, 五十君静信: 最新 細菌・真菌・酵母 図鑑,  
2007, 技術情報協会, 東京.

**Analysis of Microbes Isolated from Complaint Foods**

Yumi TAKAHASHI\*, Takashi CHIBA\*, Akiko INOMATA\*, Tomoaki WAUKE\*,  
Akemi KAI\* and Kazuyoshi YANO\*

Among 30 food complaints received in 2007, 4 cases were studied to isolate the contaminating microorganisms. An actinomycete (*Nocardia* sp.) was detected in natural mineral water with a musty odor; yeast (*Candida boidinii*) in rotten gelidium jelly; many kinds of fungi in a raw rice cake; and *Trichothecium* sp., the causative organism of pink-mold rot, in melon. Microbiological analysis revealed that the biochemical characteristics of the isolated organisms corresponded to those of the causative agents of rotting of these food products. Therefore, it was concluded that these isolated organisms caused rotting of the food products, thereby resulting in complaints.

**Keywords:** complained Foods, actinomycete, sequence analysis, natural mineral water, 2-MIB, *Trichothecium* sp., pink-mold rot

---

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