

分子生物学的手法を用いた真菌による食品苦情原因の解析

千葉 隆司^a, 高橋 由美^a, 木下 輝昭^b, 早矢仕 裕子^c, 廣島 愛弓^d,
江夏 瑛理子^e, 清水 永之^d, 宮迫 大輔^d, 仲真 晶子^f, 貞升 健志^a,
甲斐 明美^g

2012~2013年に扱った食品苦情検体のうち、表現性状試験による検査ができなかった3事例について分子生物学的な手法を利用した解析を行った。苦情起因菌の同定に塩基配列解析を利用した結果、清涼飲料水の事例（沈殿）では酵母 (*Brettanomyces* 属)、ゆで麺の事例（黒色異物）では死滅した糸状菌 (*Cladosporium* 属) の混入が原因と推定された。さらに、これら2事例について製造工場から分離した株の分子系統樹解析を行った結果、苦情起因菌の汚染源を推定することが可能であった。一方、培養検査を行うことができなかったレトルト食品の事例（異臭）では、食品から酵母 (*Candida* 属) のDNA断片が検出された。そこで、同定された菌種と同種の保存菌株を用いて検討した結果、すべての株で同様の異臭生成は見られず、本菌が苦情原因であることが否定された。

キーワード：食品苦情、塩基配列解析、分子系統樹解析、汚染経路推定、菌株識別

はじめに

食品安全性を微生物学的な側面から確保するには、対象となる食品に対して危害性を有する菌を特定（同定）する技術が必要である¹⁾。しかし、カビ・酵母に代表される真菌の同定は、形態的な特徴や糖類等の利用能（資化性）など、長時間の培養と煩雑な操作を伴う表現性状試験が用いられており、一般的な検査室で容易に行える方法とはいひ難い。加えて、調理・加工等により原因菌が死滅・損傷しているケース²⁾では、本法の使用は困難である。

近年、このような問題を解決するために食品真菌の分野にも分子生物学的な手法が取り入れられるようになり、多様化・複雑化する食品苦情事例の解析への応用が期待されている。今回、当センターで扱った食品苦情事例のうち、表現性状試験のみでは対応が困難であった3事例について、分子生物学的な手法を中心とした解析を行った。

実験方法

1. 材料

2012~2013年に当研究室で扱った事例のうち、①製品中に白色の沈殿が見られた清涼飲料水（ペットボトル炭酸飲料）、②黒色の異物が認められたゆで麺（うどん）、③開封時に石油のような異臭を呈したレトルト食品（焼き芋）で収去された食品を対象とした。また、清涼飲料水およびゆで麺の事例では、原因菌の汚染経路を推定するために製造

工場から中間製品や、ふき取り検体も採取した。

2. 表現性状試験

1) 肉眼および光学顕微鏡による形態観察

清涼飲料水とゆで麺の2事例では、苦情部位を肉眼および実体・光学顕微鏡下で観察（直接鏡検）した後、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（PDA）培地（栄研化学）に接種した。また、製品および中間製品については原液、または10倍乳剤を作成し、ふき取り検体については原液のままPDA培地に塗布した。それぞれの培地について25°C、4~7日間培養した後、発育した真菌について形態観察を行った。

2) 生理・生化学性状（酵母）

清涼飲料水の事例で分離した酵母について、生理生化学性状を利用した市販のキットを利用した。また、これに加えて偽菌糸形成、25°C、37°C、42°Cでの発育を確認し、得られた結果についてThe Yeasts: a Taxonomic Study³⁾の記載と比較して菌種を決定した。なお、同定キットはID 32 Cアピ（システムズ・ビオメリュー）とRap ID Yeast Plus SYSTEM（アムコ）を併用した。

3. 分子生物学的試験

1) サンプルからのDNA抽出

清涼飲料水とゆで麺の事例では、食品中に認められた異

^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薬事環境科学部環境衛生研究科

^c 東京都健康安全研究センター広域監視部食品監視第二課

^d 東京都健康安全研究センター広域監視部食品監視第一課

^e 島しょ保健所大島出張所

^f 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（当時）

^g 東京都健康安全研究センター微生物部

物と中間製品・ふき取り検体から分離した株をサンプルとした。また、肉眼上は異常が認められなかったレトルト食品の事例では検体の10倍乳剤を作成後、その2 mLを採取し、TEバッファーで3回洗浄したものをサンプルとした。各サンプルについて、アルカリ煮沸法によりDNAを抽出した。

2) PCRおよび塩基配列解析法

Kurtzmanら⁴⁾、Whiteら⁵⁾および著者ら²⁾が報告したrRNA遺伝子（rDNA）中のLSU-D1/D2およびITS領域に設定したプライマーを用いてPCRを行った。DNAの増幅はTaKaRa EX Taq HS試薬（タカラバイオ）およびサーマルサイクランGeneAmp 9700 (Applied Biosystems) を用いて行い、操作は試薬の添付文書に従った。塩基配列の解析は、PCR反応と同一のプライマーを用いたダイレクトシーケンス法により行った。PCRで得られた反応生成物について、BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems) によるシーケンス反応を実施し、ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を取得した。得られた塩基配列について、GenBank / EMBL / DDBJを利用したBLASTによる解析⁹⁾を行った。

3) 分子系統樹解析

清涼飲料水とゆで麺の事例で分離した株について MEGA4⁶⁾を使用し、分子系統樹解析を行った。なお、系統樹の作成はMCL (Maximum Composite Likelihood) モデルによるNJ (Neighbor-Joining) 法⁷⁾を用い、樹形の信頼性はブートストラップ法を用いて確認した。

4. 異臭生成の確認（スチレン生成試験）

1) 供試菌株

当センターで保有する*Candida zeylanoides* 8株（食品および食品製造工場由来株）に加え、対照として *Saccharomyces cerevisiae* 1株（食品由来）、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから購入した*Debaromyces hansenii* / *Candida famata* (NBRC0083) 1株を供試した。

2) スチレン生成試験

諸角ら⁸⁾の報告を参考に、5%ブドウ糖加0.5%酵母エキス(GY) 培地にケイ皮酸を0.01% (w/v) 加えた培地を用いた。また、市販焼き芋（滅菌および未滅菌）の10倍乳剤を作成し、それぞれに被検菌を添加した後、25°Cで4日間培養した。次いで、培養液の遠心上清をMillQ水で100倍に希釈し、ページ&トラップ (P&T) GC/MSシステム (P&T部：AQUAPORT 5000J PLUS (ジーエルサイエンス)、GC/MS部：7890A (アジレント) / JMS-Q1050 (日本電子)) を用いて揮発性成分の分析を行った。

結果

事例1 白色沈殿が見られた清涼飲料水

未開封の清涼飲料水（ペットボトル入り炭酸飲料）中に、白色の沈殿が認められた事例である。沈殿物を光学顕微鏡

で観察したところ酵母様の単細胞が確認されたため、培養検査に供試した。その結果、形態的には長楕円形で針状の酵母であることが判明した (Fig. 1)。そこで、2種類の市販キットを用いたが、いずれのキットでも同定することができなかつたため、LSU-D1/D2とITS領域の塩基配列解析法を試みた。その結果、分離株は*Brettanomyces naardenensis*と推定された。この結果を元に、再度、表現性状を確認したところ、沈殿物は*B. naardenensis*の菌塊であることが判明した。次いで、製品への同菌の混入経路を推定するため、最終製品（リターナブル瓶および別ロットのペットボトル）、原材料のシロップ、水および炭酸水、予備充填用の廃液（ノズル洗浄液）を検査に供した。その結果、リターナブル瓶製品 (1.6×10^1 cfu/mL) および別ロットペットボトル製品 (5 cfu/mL)、ノズル洗浄液から苦情品と同種の酵母が検出された。これら分離株について分子系統樹解析を行った結果、工場内から分離された*B. naardenensis*は大きく2つの系統に分かれることが判明した。また、苦情品から分離された株 (130157) とペット飲料から分離された株 (130064) が99%のブートストラップ値で同じ系統であることが示されるとともに、ノズル洗浄液か

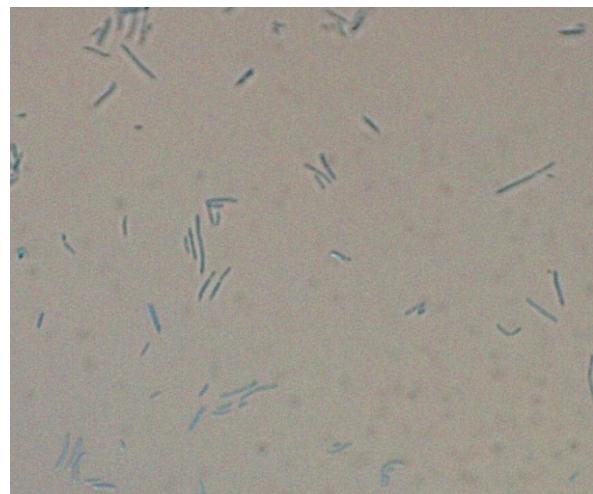


Fig. 1. Micrograph of the Yeasts Isolated from Bottled Soft Drink Contaminated.

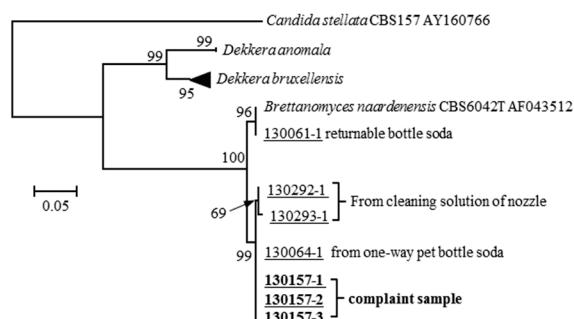


Fig. 2. Phylogenetic Analysis (Neighbor-Joining Method) of Fungi Isolated from Complaint of Bottled Cider and the Food Plant's Swabs, Based on ITS1-5.8S-ITS2 Sequences.

ら分離した株（130292, 130293）もサブクラスターに帰属された。これらに加え、リターナブル瓶飲料から分離された株（130061）は96%のブートストラップ値で別系統であることが示された（Fig. 2）。以上の結果から、苦情原因菌の汚染源は、清涼飲料水の充填ノズル付近にある可能性が示唆された。

事例2 黒色異物が認められたゆで麺

未開封のゆで麺（うどん）中に、黒色の異物（5mm×10mm程度）が混入していた事例である（Fig. 3）。異物を直接鏡検した結果、胞子未形成の黒色菌糸が多数認められたが、培養検査では発育が認められなかった。本品の製造では包装後に殺菌工程があつたことから、苦情起因菌は既に死滅していたものと考えられたため、異物から直接DNAを抽出し塩基配列解析法に供した。その結果、異物は*Cladosporium sphaerospermum*の菌塊であることが判明した。次いで、本菌の汚染経路を推定するために中間製品6検体と2つの製造ライン（苦情品を製造していたライン1、および別の製造ライン2）からのふき取り9検体、計15検体を採取した。培養検査を行った結果、11検体から真菌が検出され、このうち5検体（ライン1のふき取り2検体とライン上部給水管付着物1検体、ライン2の中間製品2検体）から*C. sphaerospermum*が分離された。また、分離された5株に苦情起因菌を加えた計6株を用いて分子系統解析を行った結果、工場内から分離された*C. sphaerospermum*は大きく2つの系統に分かれることが判明し、苦情品由来株（120675）と同ラインの上部給水管付着物（菌塊）から分離した株（130018）が、96%のブートストラップ値で同系統であることが示された（Fig. 4）。以上の結果から、給水管周辺が本苦情の汚染源の一つであると推定された。

事例3 石油臭を呈したレトルト食品

レトルト食品（焼き芋）の開封時に、石油のような異臭が認められた事例である。外観上、苦情品には臭気以外の異常は認められず、培養検査では真菌の発育は認められなかつた。そこで、食品からDNAを直接抽出し、塩基配列解析を行つた。この結果、苦情品から酵母の一種である*Candida zeylanoides*らのDNAが検出された。過去の食品苦情事例において、酵母による石油臭（スチレン）の産生が報告⁸⁾されていたことから、当センターで保存していた*C. zeylanoides* 8株を対象にスチレン産生試験を実施した。この結果、全ての株でスチレンの産生は認められなかつた。また、スチレン以外の異臭産生を考慮し、市販の焼き芋（滅菌および未滅菌）への接種試験を行つたが臭気の異常は見られず、P&T-GC/MSにおいても微量のアルコール産生以外は認められなかつた。以上の結果から、本事例で検出された*C. zeylanoides*による石油臭産生の可能性は否定された。また、同時に実行した理化学分析により異臭成分は灯油に類似したピークを示したことから、本苦情は製造工程で使用されていた灯油が何らかの形で製品に混入したもの

と推定された。

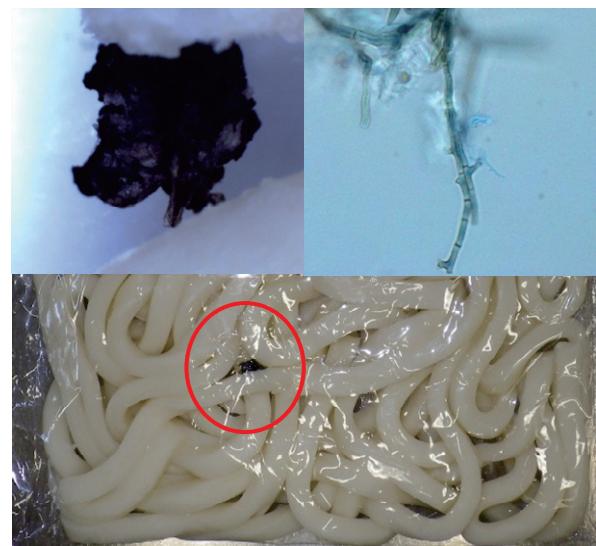


Fig. 3. Micrograph of the Dematiaceous Fungi (*Cladosporium sphaerospermum*) Isolated from Boiled Noodles Contaminated.

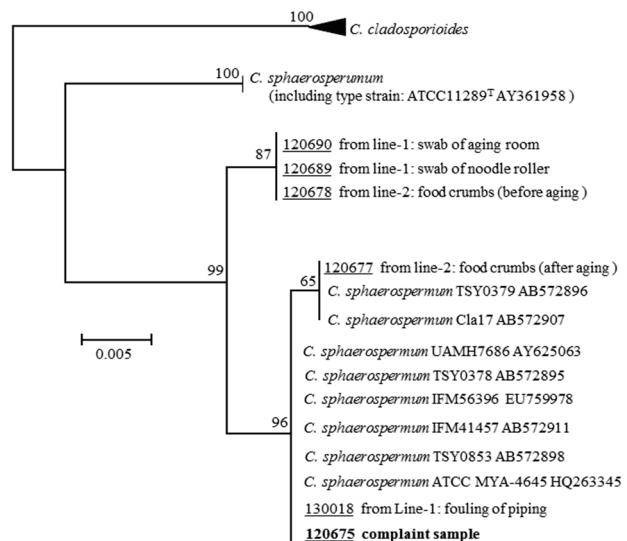


Fig. 4. Phylogenetic Analysis (Neighbor-Joining Method) of Fungal Isolated from Complaint of Boiled Noodles and the Food Plant's Swabs, Based on ITS1-5.8S-ITS2 Sequences.

考 察

分子生物学的な解析手法は、微生物の分類や同定に利用されるとともに、現在、微生物の汚染・感染経路の究明や危険分析などにも広く応用され、食品真菌分野にも導入されつつある。今回、既存の表現性状試験のみでは対応が困難であった食品苦情3事例に分子生物学的手法を適用し、苦情原因の解析と汚染源の解明を試みた。

清涼飲料水は、成分規格で製品充てん時の殺除菌を定めているが、炭酸類については一般に低いpHと炭酸ガスの静菌作用により微生物が増殖しにくいと考えられ、殺除菌

の義務が課されていない。しかし、真菌の中にはこのような環境下でも増殖する種類が存在し、製品中の菌数が 10^4 cfu/mL程度から濁りや沈殿として視認される^{9, 10)}。事例1は、未開封の炭酸飲料中で製品に混入した酵母が増殖した結果、沈殿物として確認された事例であり、分離された酵母は市販の同定キットで同定できず、塩基配列解析により*Brettanomyces*属の一種であることが判明した。

*Brettanomyces*属（有性世代：*Dekkera*属）は、炭酸飲料に加えてワインやビールなどのアルコール飲料、また、それらの製造工場から分離され、異臭（オフフレーバー）の原因になることが報告されているが^{11, 12, 13)}、本事例では喫飲前に届け出られたため異臭の訴えはなかった。一方、本菌の汚染経路を調査した結果、同じ工場で製造された未開封のリターナブル瓶飲料から苦情品と同種の酵母が他の製品よりも高い菌数で検出されていた。ラムネ瓶などの構造が複雑なリターナブル瓶を利用した炭酸飲料については、以前から酵母による汚染が報告されている^{9, 10)}。このことから、当初は洗浄が不十分なリターナブル瓶が汚染源の1つとして疑われていた。しかし、分子系統解析によりリターナブル瓶飲料から分離した株が苦情起因菌とは別系統であることが高いブートストラップ値で示されるとともに、苦情起因菌と近い系統の株が製品充填ノズルから分離された。清涼飲料水は、当センターで扱った食品苦情事例において苦情の発生頻度が高い食品群であることからも¹⁴⁾、本事例に示した解析は清涼飲料水製造時の危害分析に有用な資料として活用できると考えられる。

微生物による食品苦情の原因究明では、検査に供した時点で原因菌が死滅あるいは損傷しているために培養法で検査できない例も散見される²⁾。事例2は、苦情品中の黒色異物が直接鏡検により真菌の菌塊であることが判明したが培養法で検査できなかった事例であり、塩基配列解析により苦情起因菌は*C. sphaerospermum*であることが判明した。しかし、本菌は自然界に広く分布するクロカビ（クロカワカビ）の一種であり、食品や室内環境中からも高頻度に分離される¹⁾。この結果から、苦情起因菌の汚染経路を特定するには分離株を*C. sphaerospermum*と同定した上でさらに株レベルの識別を行う必要があった。

工場内から分離した*C. sphaerospermum*について分子系統解析を行った結果、苦情品を製造していたラインの給水管付着物から分離された株が苦情起因菌と同系統であることが判明し、本部位が汚染源の一つであると推定された。本事例での解析結果は、培養が困難なケースについても分子生物学的手法を適用することで、原因菌種の特定に加えて汚染源の推定まで行うことができる可能性を示唆すると考えられる。

都内で発生する食品苦情のうち、異臭として届け出られる事例は少なくない¹⁴⁾。このうち、真菌が原因となった事例では*Pichia anomala*（以前は*Hansenula anomala*、現在は*Wickerhamomyces anomalus*に菌名変更）に代表される酢酸エチル産生酵母による苦情（シンナー臭生成）の頻度が高

い¹⁾。一方、過去の食品苦情において、食品中のケイ皮酸を酵母が分解してスチレンを產生した結果、強い石油臭を呈した事例が報告されている⁸⁾。このことから、事例3では当初から酵母の関与が疑われていた。しかし、培養検査では酵母が検出されず、苦情起因菌の死滅を考慮して食品から直接DNAを検出する方法を適用した結果、*C. zeylanoides*のDNA断片を検出した。

*C. zeylanoides*は、ヒトや動物を含む環境中に広く分布し、市販食品からも分離されるが、本菌によるスチレン产生は報告されていない。そこで、当センターで保存していた*C. zeylanoides*株を使用してスチレン产生性を確認したが本菌にはスチレン产生能は認められず、市販品への接種試験においても石油臭を含む異臭の产生は確認されなかった。本事例は、分子生物学的な手法により苦情発生当初に疑われていた原因を否定する形ではあったが、これらの結果を既存の方法で得ることは困難であり、本法が食品苦情原因の絞り込みを行っていく上で有用であることを示した事例と考えられる。

食品苦情の中には、喫食後にはじめて異常に気づく場合がある^{14, 15)}。今回の3事例は、幸いにしてすべて喫食前に発見された事例であったが、喫食事例では消費者の健康影響や心理的不安を取り除くなど、社会的な損失は極めて大きくなる。このような食品苦情の低減や未然防止対策を講じていくためには、個々の苦情事例で原因を究明していくことが不可欠であるが、既存の方法のみで複雑多様化する食品苦情に対応していくことは難しい。今回示した解析結果は、真菌による食品苦情の原因解明における分子生物学的な手法の有用性を示すものと考えられ、今後、同様の事例での積極的な活用が期待される。

ま と め

2012～2013年に当研究室で扱った食品苦情のうち、既存の表現性状試験だけでは原因の究明が行えなかった3事例について、分子生物学的な手法を利用した解析を行った。

その結果、事例1の混濁・沈殿が見られた清涼飲料水からは酵母（*Brettanomyces*属）、事例2の黒色異物が混入していたゆで麺からは死滅した糸状菌（*Cladosporium*属）が検出された。また、これら2事例では、製造工場内から分離した株の分子系統樹解析により、汚染源の推定が可能であることが示唆された。一方、異臭を呈したレトルト食品では汚染菌は検出されず、酵母（*Candida*属）のDNA断片のみが検出された。同定された菌種と同種の保存菌株を用いて検討した結果、同様の異臭生成は見られず、本菌が苦情原因である可能性が否定された。

以上の結果から、分子生物学的な手法は苦情原因菌の特定や汚染経路推定への利用に加え、食品苦情原因の絞り込みへの応用が可能であると考えられた。

文 献

- 1) 諸角 聖、藤川 浩、和宇慶 朝昭、他：東京健安研セ

- 年報, **55**, 3-12, 2004.
- 2) 千葉 隆司, 和宇慶 朝昭, 貞升 健志, 他: 食衛誌, **48**, 1-7, 2007.
- 3) Kurtzman, C. P., Fell, Jack, W.: "The Yeasts: a Taxonomic Study", 5th ed., 2011, Elsevier, Amsterdam
- 4) Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J.: *J. Clin. Microb.*, **35**, 1216-1223, 1997.
- 5) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. et al.: PCR protocols, a guide to methods and applications., 315-322, 1990.
- 6) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. et al.: *Mol Biol Evol.*, **24**, 1596-1599, 2007.
- 7) Tamura, K., Nei, M., Kumar, S.: *Proc Natl Acad Sci USA.*, **101**, 11030-11035, 2004.
- 8) 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 田村行弘, 他: 食品と微生物, **9**, 113-119, 1992.
- 9) 藤川 浩: 防菌防黴, **28**, 207-208, 2000.
- 10) 藤川 浩: 防菌防黴, **28**, 537-539, 2000.
- 11) Buron, N., Coton, M., Legendre, P. et al.: *Int J Food Microbiol.* **153**, 159-65, 2012(11) Gray, S., R., Rawsthorne, H., Dirks, B., et al.: *Letters in Applied Microbiology*. **52**, 352-9, 2011.
- 12) Gray, S., R., Rawsthorne, H., Dirks, B., et al.: *Letters in Applied Microbiology*. **52**, 352-9, 2011.
- 13) Buron, N., Coton, M., Desmarais, C., et al.: *Food Microbiol.*, **28**, 1243-51, 2011.
- 14) 藤川 浩, 和宇慶朝昭, 諸角 聖: 日食微誌, **22**, 24-28, 2005.
- 15) 高橋 由美, 千葉 隆司, 猪又 明子, 他: 東京健安研七年報, **59**, 161-165, 2008.

Analytical Case Studies on Complaint Foods of Fungal Contamination by Molecular Biological Methods

Takashi CHIBA^a, Yumi TAKAHASHI^a, Teruaki KINOSHITA^a, Yuko HAYASHI^b, Ayumi HIROSHIMA^a, Eriko KOUKA^c
Nagayuki SHIMIZU^a, Daisuke MIYASAKO^a, Akiko NAKAMA^d, Kenji SADAMASU^a and Akemi KAI^a

In this paper, we analyzed the fungi isolated from three cases of complaints food, which could not be examined by phenotypic tests, in 2012 to 2013 using molecular biological methods. The species of the isolates were identified by using sequence analysis. In the case of precipitation in a soft drink, it was estimated to be due to contamination of the yeast (*Brettanomyces* sp.). Black substance in boiled noodle in another case was estimated to fungal contamination (*Cladosporium* sp.). In addition, the fungi isolated from the food manufacturing factories of these cases were analyzed by molecular phylogenetic tree analysis and the contamination sources of the fungi to complaints were estimated.

In contrast, in the case of off-flavor in retort-pouch could be not applicable cultural method, but it was identified to yeast (*Candida* sp.) by direct-detection of DNA fragments from foods. Then, the same species stocked as the yeast were examined for the production of off-flavors. As the results of the test, all the strains did not produce flavors, so this yeast was estimated not to be the cause of complaints.

Keywords: food complaints, DNA sequence analysis, molecular phylogenetic tree analysis, food contamination sources, strain typing

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 2nd Food Safety Control Section

3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa-shi, Tokyo 190-0023 Japan

^c Islands Public Health Center, Oshima Branch Office

4-275, Motomachi, Umanose, Oshima-machi, Tokyo 100-0101 Japan

^d Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out