

研究ノート

国産豆腐より分離された腸球菌の特性

細谷幸恵, 大畑由紀子, 川崎晋, 稲津康弘*

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所

Biochemical characteristics and antibacterial sensitivity of enterococci isolated from soybean curds purchased in Japan.

Yukie Hosotani, Yukiko Ohata, Susumu Kawasaki and Yasuhiro Inatsu *

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

Tofu (soybean curds) is one of the traditional processed food and commonly eaten in Japan. In this study, we isolated enterococci (indicator bacteria of fecal contamination) from *Tofu* purchased in Japan, and identified enterococcal species. In addition, we report the sensitivities to antibiotics of these bacteria.

Key words: enterococci, indicator bacteria of fecal contamination

緒言

豆腐は大豆を加水、磨砕した大豆汁を加熱することにより得られた豆乳に、にがり等の凝固剤を加えて凝固、成形することにより製造される生鮮食品である。日本での食習慣において、豆腐は生食で供される機会が多い食品である。一般に、市販豆腐は豆腐と共に水を充填する包装形態が取られるため、加熱工程後の操作も多い。それゆえ、二次汚染の起こる可能性が考え

られる。

豆腐を原因食品とした食中毒事例は、例えば、昭和63年、佐賀県・長崎県において病原性大腸菌による事例が報告されている(発症者:670名)¹⁾。

一般に、食品が衛生的に製造されているか否かを検討するための微生物指標として、一般生菌数や大腸菌群数といった定量的に汚染度を評価する手法が用いられ、また、糞便系大腸菌群 (E.coli) や腸球菌等の衛生指標菌の有無を定性的に検査する手法が用いられている。対象となる食品にもよるが、糞便系大腸菌を含む

* 連絡先 (Corresponding author), inatu@affrc.go.jp

大腸菌群の存在は糞便汚染の可能性を示唆し、製造過程での取扱いが不良であったと判断される。また、一部の腸球菌 (*Enterococcus faecalis* および *Enterococcus faecium*) はヒトや動物の腸管内に常在する微生物であり、乾燥に強く、外界での増殖率が低いこと、さらに土壌や水への分布が大腸菌群と比べて少ないことから、大腸菌群や糞便系大腸菌の代替となりうる糞便汚染指標菌として重視されつつある²⁾。

近年、複数の抗生物質に対して耐性を示すバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE: Vancomycin Resistant Enterococci) による日和見感染が医療現場において問題視されており、食品についてもVRE汚染の拡大が懸念されている³⁾。

本研究では、国内36都道府県において購入した市販豆腐について腸球菌の分離を試み、分離株についての生化学的性状試験により同定を行った。ならびに、分離株について薬剤感受性試験を行ったので、結果を併せて報告する。

実験材料および方法

1. 検体の種類

2009年9月から2011年10月の間に、国内で製造された市販豆腐 (もめん豆腐: 12検体, きぬごし豆腐: 4検体,

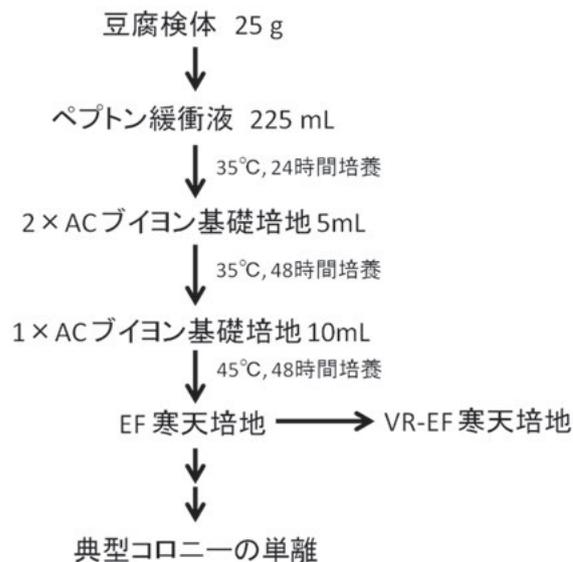
充填豆腐: 1検体, ソフト豆腐: 1検体) を検査対象とした。

2. 豆腐検体からの腸球菌の分離

腸球菌の検出方法は図1に示した方法で行った。豆腐検体は各25 g 採取し、9倍重量のペプトン緩衝液 (MERCK, Darmstadt, Germany) でストマッカー (MASTICATOR, IUL, Barcelona, Spain) 処理により乳剤化した。処理後の乳剤を、35°Cで、24時間培養し、その培養液5 mLを2倍濃度のACブイオン基礎培地 (日水製薬, 東京) 5 mLと混和し、35°Cで、48時間培養を行った。培養後、1白金耳量の菌液を通常濃度のACブイオン基礎培地10 mLに接種し、さらに45°C、48時間培養を行った。増菌により混濁の認められた培養液については、菌液をEF寒天培地 (日水製薬) に画線塗抹し、35°C、48時間培養した。培養後、腸球菌の典型性状コロニーを認めたものについて単離し、以下の生化学的性状試験に供した。

3. 生化学的性状試験と菌種同定法

EF寒天培地にて単離された菌株は普通寒天培地 (日水製薬) 上に画線塗抹後、35°C、48時間培養し、顕微鏡観察、カタラーゼ試験、およびアピStrep (SYSMEX bioMérieux, Lyon, France) による生化学的性状試験に供した。



(図中製品名: 培地名称)

- ・ACブイオン基礎培地: Azide Citrate培地
- ・EF寒天培地: *Enterococcus faecalis/faecium* (腸球菌) 選択分離培地
- ・VR-EF寒天培地: バンコマイシン耐性腸球菌選択分離培地

図1. 豆腐検体からの腸球菌検出のための培養方法

4. 各種抗生物質に対する感受性試験

アピStrepにより、*Enterococcus faecalis*および*Enterococcus faecium*と同定された18株を、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)検査用培地であるVR-EF寒天培地(日水製薬)上に塗抹し、発育の可否について確認した。また、腸球菌の薬剤感受性試験はK-B(Kirby-Bauer)法⁴⁾に則り実施した。分離した18株について、普通寒天培地上で培養の後、単一の菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、濃厚菌液を調製した。滅菌綿棒を用いて、ミュラーヒントン寒天培地に菌液を均等に塗布し、それぞれの抗生物質を含むBDセンシ・ディスク™(日本ベクトン・ディッキンソン、東京)を置いた。24時間培養の後に、発育阻止円径の測定を行った。得られた発育阻止円径の大きさから、判定表に従い、各種抗生物質に対する感受性の強さについて3段階(R:耐性, I:中間, S:感性)の判定を行った。

結果

国内で市販されている豆腐18検体より腸球菌の検出を行い、18株の腸球菌を分離した。顕微鏡観察および生化学性状試験に供した結果、*Enterococcus faecium*は計16株(もめん豆腐より7株、きぬ豆腐より2株、充填豆腐より1株、ソフト豆腐より1株)、*Enterococcus faecalis*は計2株(もめん豆腐より2株)と同定された(表1)。

分離した18株について、VR-EF寒天培地上に塗抹し、発育の可否について判定を行ったところ、2検体についてVR-EF寒天上での発育が認められた。また、ディスク拡散法により分離菌株について薬剤感受性試験を行ったところ、18株中2検体についてはバンコマイシン耐性(R)判定、1検体について中間(I)判定として得られた(表2)。

表1. 豆腐より分離した腸球菌の生化学的性状試験結果

分離源	同定名	catalase	Vp	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
充填豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
ソフト豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-

(略号: 基質名) Vp: ビルビン酸ナトリウム, HIP: 馬尿酸ナトリウム, ESC: エスクリン, PYRA: ピロリドニル-2-ナフチルアミド, α GAL: 6-プロモ-2-ナフチル- α -D-ガラクトピラノシド, β GUR: ナフトール-AS-BI β -D-グルクロン酸, β GAL: 2-ナフチル- β -D-ガラクトピラノシド, PAL: 2-ナフチル-リン酸ナトリウム, LAP: L-ロイシン-2-ナフチルアミド, ADH: アルギニン, RIB: D-リボース, ARAL: アラビノース, MAN: D-マンニトール, SOR: D-ソルビトール, LAC: 乳糖, TRE: D-トレハロース, INU: イヌリン, RAF: D-ラフィノース, AMD: でんぷん, GLYG: グリコーゲン

表2. 豆腐検体より分離された腸球菌の薬剤感受性

	TC	EM	CP	VCM	TEIC	ABPC	SM	GM
R(耐性)	1	15	2	2	1	0	17	10
I(中間)	0	3	7	1	3	0	1	8
S(感性)	17	0	9	15	14	18	0	0

(検体数 / 18検体)

(表中略号: 薬剤名) TC: テトラサイクリン, EM: エリスロマイシン, CP: クロラムフェニコール, VCM: バンコマイシン, TEIC: テイコブラニン, ABPC: アンピシリン, SM: ストレプトマイシン, GM: ゲンタマイシン

考察

本研究では「きぬごし豆腐」、「もめん豆腐」、「ソフト豆腐」、「充填豆腐」の各種豆腐を、腸球菌の検出試験に供し、18株の腸球菌を分離した。この結果は、豆腐の製造環境中に何らかの形で腸球菌汚染の実態が存在することを示している。豆腐の製造環境は、水槽中での豆腐の固化や、切断、包装の際の水の充填など複数の製造段階があることから、水の飛散により汚染が拡大しやすく、特に加熱調理後の取り扱いには注意が必要である。

食品中から腸球菌が検出されたとしても、ただちに健康上の危害が発生するわけではなく、あくまで製造管理上の衛生管理指標に過ぎない。しかしながら、腸球菌のような衛生指標菌が検出されるということは、製造過程において何らかの汚染を受けた、あるいは殺菌が不十分であった可能性があり、有害細菌の混入・残存が示唆される。分離された腸球菌がヒトの健康に対し直接的な被害を与えることには直結しないが、少なくともヒト糞便由来の汚染指標菌が検出されたことから、今後、豆腐の製造環境における衛生状態をモニタリングする必要がある。

また、本試験ではK-B法により対象薬剤に対する耐性について判定を行い、2株がバンコマイシンへの耐性を示した。バンコマイシン耐性腸球菌の判定については、VR-EF寒天培地での発育や、K-B法による発育阻止円の形成を確認するのみでなく、バンコマイシン耐性遺伝子の検出による確定試験を行うことが望ましい⁵⁾。本試験において分離された腸球菌の中にも、2株についてVR-EF寒天培地で発育が見られたが、VRE確定試験は行われていないため、それらの追加検討が必要である。

要旨

豆腐は日本の伝統的な大豆加工食品であり、日常的に食されている。本研究は、日本国内で製造販売された豆腐に混入した衛生指標菌の分離を試み、18株の腸球菌を検出した。それらの分離株について生化学性状試験により *Enterococcus faecalis* 2株、および *Ent. faesium* 16株と同定した。また、それら分離株の特性を把握するため、薬剤感受性試験を実施し、2株についてバンコマイシン耐性の傾向を示すことが明らかとなった。

参考文献

- 1) 松浦 元幹, 福岡 逸朗, 山村 勝幸, 精進料理による病原大腸菌食中毒, 食品衛生学会誌, **30**, 463-465 (1989).
- 2) 厚生労働省監修, 「食品衛生検査指針 微生物編」, 社団法人日本食品衛生協会, (2004).
- 3) Klein G., Pack A., Reuter G., Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany., *Environ. Microbiol.*, **64**, 1825-1830, (1998).
- 4) Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M., Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45**, 493 - 496, (1966).
- 5) Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, *J Clin Microbiol*, **33**, 24-27 (1995).