

研究ノート

味噌に混入した糞便汚染指標菌の検出方法の検討

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

Consideration of the detection procedure of indicator bacteria of fecal pollution in *miso* (salt-fermented soybean).

Yukie Hosotani, Yukiko Ohata, Susumu Kawasaki and Yasuhiro Inatsu[§]

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

Abstract

Miso (salt-fermented soybean) is one of the traditional preservative food in Japan. Its high salt concentration and weakly acidic condition suppress the growth of spoilage or pathogenic bacteria; however low salt miso or other processed products have been developed recently. To obtain much exact results of the detection of indicator bacteria of fecal pollution, we confirmed the assay procedure of tiny amount of enterococci contaminated into *miso*; that includes several conditions such as the number of samples, the time which takes prior culture, and the culture medium. The results will contribute to improve hygiene condition via carrying out the precise voluntary testing.

Keywords: salt-fermented soybean, indicator bacteria of fecal pollution, enterococci

緒言

味噌は麴（米，麦，豆），蒸煮大豆，食塩を原料として醸造される日本古来の保存食品であり，その微生物

学的安全性は，食塩の添加による水分活性の低下および乳酸，アルコール等の生成により有害微生物の生育を抑制することで付与される。

過去の報告によると，味噌中に混入した大腸菌の生菌数は特定の保存条件下では寒天平板法の検出限界以

[§] 連絡先 (Corresponding author), inatu@affrc.go.jp

下まで減少するとされる¹⁾。また厚生労働省による食中毒発生事例の統計調査においても、2002年～2012年の11年間に発生した味噌に関連する食中毒事件は「なめ味噌」に混入した黄色ブドウ球菌を原因とする1例のみである¹⁾ことから、醸造後の味噌中に病原菌は存在しない、もしくは存在したとしても問題にならない程度の菌量であると考えられている。

このように味噌は非常に安全性が高い食品であると考えられる一方、近年、消費者ニーズの多様化から有害微生物の生育を抑制する因子である塩分を控えた味噌や、手軽に使用できるよう2次加工を受けた味噌など、多様な味噌製品が開発され、それに伴い味噌の製造方法や製造環境は大きく変容している。

食品が衛生的に製造されているか否かの指標として、衛生指標菌が一般に利用されている。具体的には一般生菌数や大腸菌群数を測定することで定量的に汚染度を推定する手法や、糞便系大腸菌 (*E. coli*) や腸球菌等を定性的に検査する手法が用いられることが多い。対象となる食品にもよるが、大腸菌群 (糞便系大腸菌を含む) の存在は糞便汚染の可能性を示唆する場合があります。該当する場合には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 *E. 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、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として重視されている。

2013年、味噌の国内製造業者から「醸造後の味噌から大腸菌群が検出される」との相談を受け、当所にて再検査を行ったところ、誤判定であることが判明した。自主検査の過程においてサンプリング数および使用培地の選択が、味噌中の衛生指標細菌を検出する際に重要であることを示す結果が得られたので報告する。

実験材料および方法

1. 検体の種類

相談を受けた国内味噌製造業者の検査結果の再確認は、同社から送付された味噌製品を用いた。同社では衛生状況の向上を目的として、製造ライン等の集中的な洗浄殺菌が実施されたため、以下の3種類の検体についても試験に供した：「A：洗浄殺菌前に仕込み、熟成終了後、製品化したもの」、「B：Aの熟成途中のもの」、「C：洗浄殺菌後に仕込み、熟成途中のもの」。

2. 社内検査の再確認

社内検査にて大腸菌群陽性と判断された味噌製品2ロットについてそれぞれ2検体、10gずつ採取し、9倍重量のリン酸緩衝液にてストマッカー (MASTICATOR, IUL, Barcelona, Spain) 処理を行った。それぞれのストマッカー処理液1mLをX-GAL寒天培地 (日水製薬, 東京) またはパールコア[®]マッコンキー寒天培地 (栄研化学, 東京) の各培地約20 mLと混合し、固化した後に35℃にて48時間まで培養を行った。またストマッカー処理液10 mLを2倍濃度のダーラム管入りBGLB培地10 mLに入れ、35℃にて48時間の培養をすることにより大腸菌群の確認を行った。

上記2つの試験のうち唯一、陽性が疑われる結果が得られたX-GAL寒天培地上の青いコロニーを同培地上にて純化し、更に普通寒天培地 (日水製薬) 上で生育させたものを顕微鏡観察、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。

3. 製造ライン洗浄後の検査

前述したA～Cそれぞれの検体について、1バッチ (500 g) あたり10 gのサンプルを10個採取し、以下の分析に供した。9倍重量の増菌培地 Mossel broth (MERCK, Darmstadt, Germany) またはACブイヨン基礎培地 (日水製薬) でそれぞれ5検体ずつストマッカー処理し、37℃で24時間の前培養を行った。それぞれの前培養液を4種の選択培地 [大腸菌群検査用培地3種：X-GAL寒天培地、パールコア[®]マッコンキー寒天培地、クロモカルト[®]コリフォーム寒天培地 (MERCK)、腸球菌検査用培地1種：EF寒天培地 (日水製薬)] に塗抹後、37℃で培養を行い経時的にコロニーの形成を観察した。また、前培養時間の違いによる菌の検出状況を比較するため、48時間まで前培養時間を延ばし、同様にコロニーの形成を観察した (図1)。コロニー形成が確認された寒天培地から釣菌し、普通寒天培地上で純化したものについて顕微鏡観察、カタラーゼ試験およびアピ Strep による生化学的性状試験に供し、菌の同定を行った。

4. 統計処理

得られた結果について、シーゲルの χ^2 検定²⁾ により分析を行った。 χ^2 値は以下の数式を用いて算出した。 $\chi^2 > 3.84$ において、5%有意水準であることを示す。

$$\chi^2 = N(|ad - bc| - N/2)^2 / ((a+b)(c+d)(a+c)(b+d))$$

N = the total number of cases

- a = test portions positive by method “x”
 b = test portions positive by method “y”
 c = test portions negative by method “x”
 d = test portions negative by method “y”

結果

社内検査で大腸菌群陽性と判定された味噌から X-GAL 寒天培地で単離した唯一の菌は、顕微鏡観察および生化学性状試験の結果、腸球菌の一種 *Enterococcus faecalis* と同定された (表 1)。

また、A～C の検体から Mossel broth および AC ブイオン基礎培地で増菌し、それぞれ 15 回ずつ菌の分離、同定を行った結果、分離された菌が *Enterococcus faecalis* であることを確認した。前培養時間が 2 日以内の場合、AC ブイオン基礎培地 (表中 AC) よりも Mossel broth (表中 Mossel) での前培養において腸球菌の検出率が高くなる傾向が見られた (表 2)。また、選択寒天培地上での培養時間については、コロニーの形成に 2 日以上培養時間を要するものも見られたが、概ね 1 日の培養時間でコロニー形成を確認することができた (表 2)。選択寒天培地において、腸球菌を選択的に培養する EF 寒天培地で、他の選択培地よりも腸球菌の検出頻度が高かった。一方で、大腸菌群用の選択寒天培地である コリフォーム寒天培地および X-GAL 寒天培地においても腸球菌の生育が確認された (表 3)。また、7 日間の前培養において、AC ブ

イオン基礎培地を用いるよりも Mossel broth を用いたほうが、EF 寒天培地における陽性コロニーの検出の頻度が高くなった (表 3)。

考察

大腸菌群はその定義上、グラム陰性で乳糖発酵性を持ち、また胆汁酸やラウリル硫酸塩等の選択剤に対する耐性がある。そのため、大腸菌群の測定には、 β -ガラクトシダーゼ活性を検出するための酵素基質と前述の選択剤を含む培地が一般に使用される。本問合せ事例においても同種の培地と味噌 10 倍希釈液の混積培養法によって検査が行われていた。しかし、問題とされた味噌から検出された菌はグラム陽性、カタラーゼ活性陰性の連鎖球菌であり、アピ Strep を用いた生化学的性状試験の結果、*Enterococcus* に属する細菌であった。食品から腸球菌が検出されたということは、製造過程において環境から汚染を受けた、あるいは原料に付着した腸球菌が製造過程で死滅しなかった可能性がある。味噌に混入した大腸菌 O157 やサルモネラは高い塩濃度と発酵過程で生成した有機酸による損傷のため、1 週間程度の常温保存によって容易に死滅することが判明しており^{1,3,4)}、製品として出荷された段階における大腸菌 O157 やサルモネラ等、腸管系食中毒菌による食中毒のリスクは極めて低いと判断される。より衛生的な製品を製造することを目的として自主衛生検査を行う場合は、大腸菌群よりも腸球菌を衛

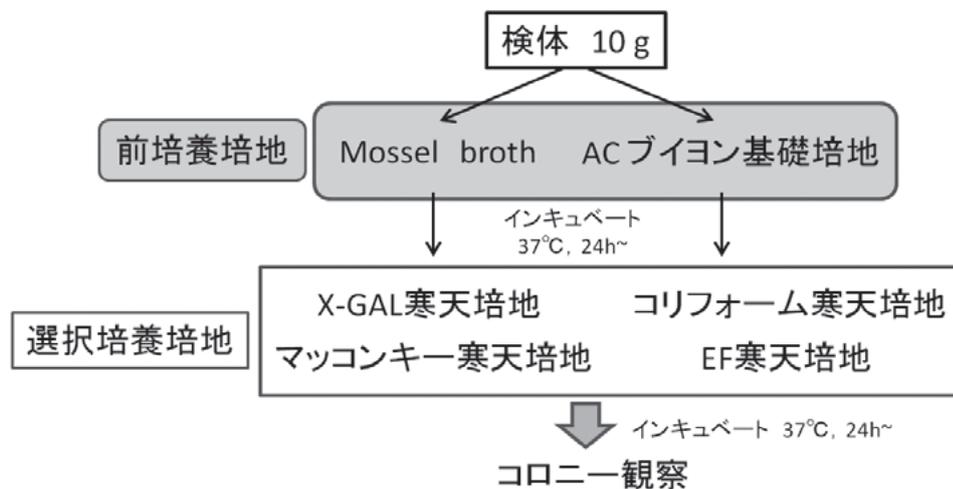


図 1. 味噌検体からの腸球菌検出のための培養スキーム

表 1. 提供を受けた味噌より単離した菌のカタラーゼ試験および生化学的性状試験結果

カタラーゼ試験		-		
酵素活性試験	ピルビン酸ナトリウム	+	エスクリン	+
	ピロリドニル-2-ナフチルアミド	+	6-ブロモ-2-ナフチル- α -D-ガラクトピラノシド	-
	ナフトール AS-B1 β -D-グルクロン酸	-	2-ナフチル- β -D-ガラクトピラノシド	-
	2-ナフチル-リン酸ナトリウム	-	L-ロイシン-2-ナフチルアミド	+
	L-アルギニン	+		
糖資化性試験	L-アラビノース	-	D-リボース	+
	D-ソルビトール	+	D-マンニトール	+
	D-トレハロース	+	乳糖	+
	D-ラフィノース	-	イヌリン	-
	グリコーゲン	-	でんぷん	+

+ : 陽性, - : 陰性

表 2. 前培養および選択培養時間による腸球菌検出数の比較

選択培地	検体名	前培養培地	腸球菌陽性検体数/15検体 ^{a)}		
			培養時間 (前培養/選択培養)		
			1日/1日	1日/7日	2日/5日
X-GAL 寒天培地	A	A C	0	0	0
		Mossel	0	1	1
	B	A C	0	0	1
		Mossel	0	1	3
	C	A C	0	0	2
		Mossel	0	0	1
マッコンキー 寒天培地	A	A C	0	0	0
		Mossel	0	0	0
	B	A C	0	0	0
		Mossel	0	0	0
	C	A C	0	0	0
		Mossel	0	0	1
コリフォーム 寒天培地	A	A C	0	0	0
		Mossel	0	1	1
	B	A C	0	0	2
		Mossel	0	1	0
	C	A C	0	0	3
		Mossel	0	0	6
EF 寒天培地	A	A C	0	0	0
		Mossel	0	0	0
	B	A C	0	0	1
		Mossel	0	0	1
	C	A C	0	0	1
		Mossel	0	0	7

a) 数字は15検体中の腸球菌陽性検体数を示す。

生指標菌として工程管理を行う方が、確実な結果が得られると考えられる。

味噌製造業者の自主検査において大腸菌群と腸球菌の誤判定が起こった理由は、大腸菌群検出用の酵素基質培地 (X-GAL寒天培地およびコリフォーム寒天培地) 中でも長時間の培養により腸球菌の生育が可能で

あったためである。この現象は前培養に Mossel broth を用い、分離培地に移す前に大腸菌群を優先的に増殖させる処理を行うことによっても回避が困難である (表 3)。そもそも味噌に関して大腸菌群を衛生指標菌として用いることにあまり意味がないと考えられることから、腸球菌の検査を行うことが重要であると考

表 3. 前培養培地および選択培地による腸球菌検出数の比較

検体名	選択培地	腸球菌陽性検体数/15検体 ^{a)}		χ^2 値 (AC v.s. Mossel)
		A	C	
A	X-GAL寒天培地	0	1	1.03
	マッコンキー寒天培地	0	0	–
	コリフォーム寒天培地	0	1	1.03
	EF寒天培地	0	0	–
B	X-GAL寒天培地	1	3	1.15
	マッコンキー寒天培地	0	0	–
	コリフォーム寒天培地	2	0	2.14
	EF寒天培地	3	2	0.24
C	X-GAL寒天培地	2	1	0.37
	マッコンキー寒天培地	0	0	–
	コリフォーム寒天培地	3	7	2.40
	EF寒天培地	4	12	8.57*

培養時間：前培養7日/選択培養1日

* : $P < 0.05$ (χ^2 値 > 3.84)

a) 数字は15検体中の腸球菌陽性検体数を示す。

えられる。腸球菌の検査では、本来ACブイヨン基礎培地で選択的に腸球菌を増殖させ、選択培地で確認を行うことが通例である。味噌中に混入し、損傷を受けていると推定されるごく少量の腸球菌を検出するためには、腸球菌が回復・増殖しやすいMossel broth等の前培養培地を用いることが望ましいと考えられた。また、大腸菌群の検出を目的としたマッコンキー寒天培地、X-GAL寒天培地、コリフォーム寒天培地でも腸球菌の生育が見られ、誤判定の原因となる恐れがあるため、EF寒天培地等で確認を行うことが必要である。

味噌製品から腸球菌が検出されたところで、ただちに健康上の危害が発生するわけではなく、あくまでも衛生管理上の指標にすぎない。しかしながら、衛生指標菌が検出されるということは有害となる微生物が残存している可能性も示唆されるため、自主衛生検査を実施することで、正確にモニタリングしていくことが望ましいと考えられる。

要 旨

味噌は日本の伝統的な発酵食品である。高い塩分濃度と弱酸性状態によって味噌中では有害細菌の増殖は抑制されるが、最近では低塩味噌やその他の加工製品も販売されるようになっている。味噌に混入した少量

の腸球菌をより正確に検出するため、サンプリング数、培養期間、および使用培地の検討を行った。本研究で得られた結果は自主衛生検査を実施する際に有用であると考えられた。

参考文献

- 1) 伊藤公雄, 今井学, 石神実, 武田茂, 安平仁美, 味噌熟成過程における添加大腸菌の消長, 味噌の科学と技術, **349**, 102-106 (1983).
- 2) Siegel, S. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, McGraw-Hill Book Co., New York, NY, (1956).
- 3) 伊藤公雄, 武田茂, 桜井令子, 北村靖則, 原山文徳, 味噌中におけるサルモネラ菌 (*Salmonella enteritidis*) の生菌数の推移, 味噌の科学と技術, **47**, 243-246 (1999).
- 4) 中央味噌研究所, みそと病原性大腸菌, 味噌の科学と技術, **45**, 274-282 (1997).

引用 URL

- i) <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html> (2013. 10. 18)