

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K13835

研究課題名（和文）水産発酵食品の食中毒菌混入実態の解明と食中毒菌の性状解析

研究課題名（英文）Investigation of contaminated food poisoning bacteria in fermented seafood products and analysis of their pathogenic characterization

研究代表者

大島 千尋 (Ohshima, Chihiro)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(長崎)・研究員

研究者番号：60824357

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：水産発酵食品は保存食として製造され始めた食品であり、それに加えて古くからの喫食文化があることから、消費者は安全性の高いものであると信じている。しかし、その安全性に関する検証例は意外なほど少ない。そこで本研究では、水産発酵食品における食中毒菌汚染混入の状況を明らかにし、食中毒菌の毒素産生能、環境耐性等から食中毒リスクの低減方法を検討した。その結果、水産発酵食品の一部に *Bacillus cereus* が混入しており、それらの耐塩性が高いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、日本国内の水産発酵食品における *Bacillus cereus* の汚染率は低いと見られるが、一方で一部の水産発酵食品においては *B. cereus* が増殖するリスクがあると考えられた。また、水産発酵食品に由来する *B. cereus* の塩分耐性が高いことが明らかとなり、製造時の塩分による水分活性コントロールや、低温管理の徹底により *B. cereus* によるリスクを減らすことが可能になると考えられた。これは、安全な水産発酵食品の生産に資する成果である。

研究成果の概要（英文）：Fermented seafood products began to be manufactured as preserved foods, and there is a long culture of eating them. Consumers therefore consider them to be highly safe. However, there are few reports about its safety. In this study, we investigated the contamination of pathogenic bacteria in fermented seafood products and examined ways to reduce the risk of food poisoning based on the toxin-producing ability and environmental tolerance of food poisoning bacteria. As a result, it was found that *Bacillus cereus* was contaminated in some fermented seafood products, and that these strains were highly salt-tolerant.

研究分野：食品衛生学

キーワード：水産発酵食品 *Bacillus cereus* 食品衛生 食中毒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産発酵食品とは、鮮度の落ちやすい水産物の保存性を高めるために作られ始めた加工食品の1つである。水産発酵食品の多くは、水産物を高濃度の塩につけて密閉した容器の中で長期間熟成させて作られる。生の水産物には腐敗の原因となる様々な雑菌が付着しているが、水産物を高い濃度の塩につけ、さらに乳酸菌やそのほか発酵食品を構成する上で欠かせない有用菌が優先的に増殖できる環境を整えることで、それらの雑菌の繁殖を抑え長期の保存が可能となる¹⁾。このように、水産発酵食品は保存食として製造され始めた食品であり、それにくわえて古くからの喫食文化があることから、消費者は安全性の高いものであると信じている。しかし、その安全性に関する検証例は意外なほど少なく、国際的に規格を設けているのは、アレルギー様食中毒の原因となるヒスタミンだけである。

しかし、近年になって消費者の減塩志向が高まったことに対応して製造された製品があり、このように新たな形態の水産発酵食品はこれまでの経験からは想定できない食中毒の原因となることがある。また、申請者が参画した過去の研究において、一部の水産発酵食品から食中毒菌である *Bacillus cereus* や大腸菌が検出された例もある。しかし国内の水産発酵食品においては、食中毒菌による汚染の実態解明や食中毒菌低減技術の検証が十分になされていないのが現状である。そこで本研究では、水産発酵食品における食中毒菌汚染混入の状況を明らかにし、食中毒菌の環境耐性等から食中毒リスクの低減方法を検討する。

2. 研究の目的

はじめに、水産発酵食品の微生物叢と食中毒菌による汚染実態を明らかにする。発酵食品は著量の微生物の働きにより製造される食品であり、発酵食品の微生物叢は、科学的にその食品がどのような食品であり、また安全であるのか証明するための重要なデータである。味噌やヨーグルト等においては構成微生物が明らかとなっている一方で、水産発酵食品においてはそれが不明な食品が多い。そのため本研究では多様な水産発酵食品の微生物叢を新たに明らかにする。また、これまで問題視されず調査も実施されていなかった食中毒菌による水産発酵食品の汚染実態を明らかにする。特に、発酵食品に特有の高塩分、低水分活性という環境下で生残する食中毒菌や、海外で主に問題視される食中毒菌について新たに調査する。

次に、混入している食中毒菌の毒性や病原性、環境耐性を解析し、水産発酵食品の食中毒リスクを評価するとともに食中毒リスクの低減法を検討する。食中毒菌の存在は食品の安全性を脅かすものではあるが、その食品が食中毒の原因食品となりうるリスクは、当該食中毒菌の病原性や毒性を評価して初めて明らかになるものである。食中毒菌の存在に過剰に反応することは風評被害による経済損失や膨大な食品ロスを生みかねない。そのため本研究においては、病原性や毒性および pH や水分活性などへの環境耐性を、遺伝子プロファイルの解析と食品中での食中毒菌の挙動試験により評価する。

3. 研究の方法

はじめに、日本国内で販売されている水産発酵食品(塩辛、きりこみ、めふん、ぬか漬け、みそ漬け)を96検体採集した。全検体について、発酵食品で生存する可能性が考えられる大腸菌、*Bacillus cereus*、リステリア菌を、各菌の選択増菌培地および鑑別培地を用いて調べた。また、一般生菌数および乳酸菌数についても、TSA および MRS 培地を用いて測定した。さらに、発酵食品の各種類から代表して2-3検体について、16S rDNA のアンプリコンシークエンスによる解析を行い、菌叢を明らかにした。

次に、発酵食品から分離された *B. cereus* 様菌株について、16S rDNA の塩基配列解析結果を BLAST 検索に供し、*B. cereus* グループに属する菌であることを確認した。さらに、溶血性、運動性、チロシン分解能を調べて *B. anthracis* ではないことを確認したのち、Multiplex PCR¹⁾ により種の同定を行った。

分離された14株の *B. cereus* について、*cesB* 遺伝子の有無を PCR により確認し、嘔吐毒産生能を調べた。また、非溶血性および溶血性エンテロトキシン産生の関連遺伝子である *HbIA*、*HbIC*、*HbID* および *NheA*、*NheB*、*NheC*、*cytK* 遺伝子の保有状況を PCR²⁾ により確認し、さらに、培養上清を用いてラテックス凝集反応試験を行って毒素の産生能を調べた。

次に、分離された14株について、*glpF*、*gmk*、*ilv*、*pta*、*pur*、*pyc*、*tpi* 遺伝子の塩基配列解析を行い、得られた結果から Multi-locus sequence typing (MLST) 解析を行った。MLST 解析の結果得られた ST について、pubMLST 上に登録されている菌株と比較した。

最後に、14株のうちエンテロトキシン産生能が確認された2株について、NaCl を添加し水分活性(*A_w*)を変化させた培地を用いて増殖の有無から、塩分耐性を調べた。

4. 研究成果

塩辛、きりこみ、ぬか漬けについて2検体ずつ菌叢解析を行った(Fig. 1)。その結果、塩辛およびぬか漬けにおいては、片方のサンプルは特定の菌種が菌叢の大半を占めていたが、もう一方のサンプルでは多様な菌種が確認された。それに対し、きりこみの菌叢は *Staphylococcaceae* や

Moraxellaceae などの特定の菌種が大半を占めていた。発酵食品は通常、塩や糖と水産物を混合し発酵が進む過程で原料に由来する多様な菌種の中から、単一の菌種に収束していく。近年では、消費者の減塩志向に応える形で、水産物を発酵食品風の調味液に短期間漬ける製造方法が普及している。菌叢に多様性がみられた検体は、その様な製造方法で作られた発酵食品であると推察された。また、塩辛やぬか漬けにおいては、検体の原材料表示欄に塩や糖と水産物以外が含まれる発酵食品では、菌叢が多様化しており、このことから、菌叢が多様化している検体は調味液に漬け込む方法で作られた製品であると推察された。

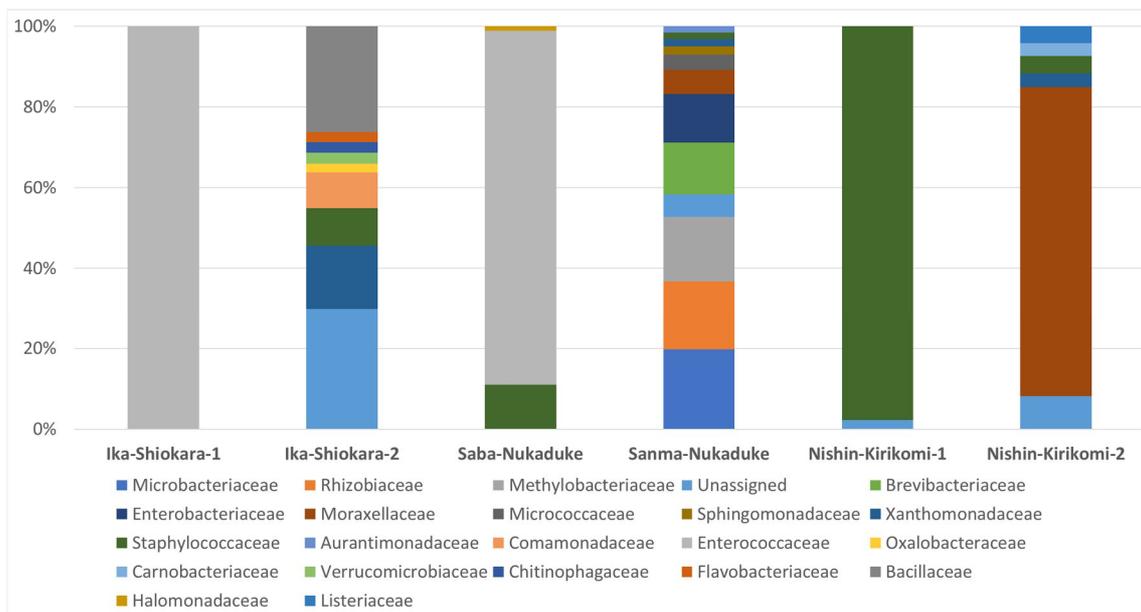


Fig. 1 代表的な水産発酵食品の菌叢解析結果

次に、96 検体の水産発酵食品における主要食中毒菌の調査を行った。その結果、大腸菌およびリステリア菌による汚染は確認されなかった。一方で、96 検体中 3 検体において、セレウス菌の鑑別培地である NGKG 寒天培地および PEMBA より *B. cereus* 様コロニーが検出された。これらの水産発酵食品から分離された 14 株の *B. cereus* 様コロニーについては、16S rDNA 塩基配列解析の結果から *B. cereus* グループの菌であると明らかになった。続いて、種を同定するために Multiplex PCR を実施した。その結果、*B. cereus* に特異的な増幅産物を確認したことから、これらの菌株を *B. cereus* と決定した (Table 1)。過去の研究においては、東南アジアの水産発酵食品から *B. cereus* グループの菌が高確率で検出されていた (data not shown)。しかし、本研究の結果から、日本の水産発酵食品における *B. cereus* の汚染率は低いと考えられた。また、原材料やそこから推察される製造方法の違いによる *B. cereus* 汚染率の違いは確認されなかった。

続いて、14 株の *B. cereus* の毒素産生能を調べた (Table 1)。各種毒素産生関連遺伝子の保有状況を PCR により確認した結果、溶血性エンテロトキシン産生関連遺伝子 *HblA*, *HblC*, *HblD* を 2 つの検体に由来する 7 株が保有していた。これらの株について、逆受身ラテックス凝集反応により実際に毒素が産生されているか確認したところ、1 検体に由来する 2 株が毒素産生能を有することが確認された。非溶血性エンテロトキシン産生関連遺伝子である *NheA*, *NheB*, *NheC* はすべての株が有していた。また、サイトトキシン K 産生関連遺伝子 *cytK* は 3 検体に由来する 8 株が有していた。一方で嘔吐毒セレウリド産生関連遺伝子 *cesB* を保有する株はなかった。この結果から、本研究の調査結果においては水産発酵食品から分離された *B. cereus* には嘔吐毒産生能はなく、下痢毒素産生能を持つ株が多いことが明らかとなった。

この 14 株について MLST 解析を行った結果、12 株が 1 つ以上の新しいアレルを示し、新規の ST に分類された (Table 1)。また、同一検体に由来する 2 株は同一の ST を示すことが分かった。しかし、ほかの 12 株については、由来する検体が同じであっても別の ST に分類されていた。このことから、*B. cereus* による汚染が確認された水産発酵食品には、複数の *B. cereus* が混入していることが明らかとなった。

最後に、非溶血性エンテロトキシン産生能が確認された 2 株 (Strain No.14, 15) について、塩分耐性試験を行った。その結果、これら 2 株は *B. cereus* の標準株よりも高塩分 (低 Aw) への耐性があることが確認され、30 で培養した場合には Aw が 0.935、10%NaCl 存在下でも増殖した。Aw が 0.922 未満の場合は増殖が確認されなかった。また、2 株を Aw1.0 から 0.935 の培地に接種し 8, 10, 15, 20 で増殖試験を行った結果、Aw が 1.0 の場合には 10 以上、Aw が 0.935 の場合は 15 以上で増殖が確認された。本研究でエンテロトキシン産生株が検出された食品は、Aw が 0.941 であり、保存温度、消費期限が明記されていない

かった。このような食品が低温管理されなかった場合に、エンテロトキシン産生 *B. cereus* が増殖する可能性が示唆された。

本研究の結果から、国内で生産される水産発酵食品の多くは *B. cereus* による汚染の恐れがないと考えられるが、一部の水産発酵食品では本菌に汚染されている可能性があった。水産発酵食品の製造時には、低 A_w 下でも増殖可能な *B. cereus* の存在に留意し、塩分等により A_w を調整する、保存温度を明確にするなどして、*B. cereus* の増殖を抑制する必要があると考えられた。

Table 1. 水産発酵食品より分離された *B. cereus* の非溶血性毒素産生能および MLST 遺伝子型

Strain No.	Origin	Hemolytic enterotoxin related gene			Enterotoxin (latex agglutination reaction)	ST
		<i>HbIA</i>	<i>HbIC</i>	<i>HbID</i>		
1	Shiokara	-	-	-	-	newST
2	Shiokara	-	-	-	-	newST*
3	Shiokara	-	-	-	-	newST
4	Shiokara	-	-	-	-	newST*
5	Shiokara	-	-	-	-	newST
6	Shiokara	-	-	-	-	newST
7	Shiokara	-	-	-	-	newST
8	Nukaduke	+	+	+	-	2561
9	Nukaduke	+	+	+	-	newST
10	Nukaduke	+	+	+	-	newST
11	Nukaduke	+	+	+	-	newST
12	Nukaduke	+	+	+	-	newST
13	Shiokara	+	+	+	+	18
14	Shiokara	+	+	+	+	newST

- 1) 藤井, 日本食品保蔵科学会誌, 1999, 25; 5
- 2) Yang Liu et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 67:2499-2508(2017).
- 3) Pengfei Yu et al., Front. Microbiol., 10:948(2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------