



## 微生物から知る食の安全性

池 晶子

微生物と食品の関わりという発酵食品を第一に思い浮かべる方が多いと思われるが、発酵食品に限らず、どのような食品も多かれ少なかれ生きて微生物が付着し、これらは食品の品質や安全性に大いに影響をおよぼしている。発酵食品は主担の微生物に高濃度に占有された、ある意味で特殊な状態にあるが、一般的な食品では、素材が置かれた環境要件に適応した複数種の微生物が中程度に増殖しマイクロフローラを形成している。マイクロフローラに食中毒や感染症を引き起こす有害微生物が混入している割合は低く、ほとんどは病原性を持たず発酵にも関わらない無作用菌である。ただし、不適切な取り扱いがなされた場合には、これら無作用菌が増殖して腐敗を引き起こし、食品の可食性を失わせる。

「食の安全安心」は、昨今の重要課題の一つである。なかでも、食物が含んでいる微生物の種類や量を知ることが、病原菌汚染の可能性、腐敗の進行、さらには食物の取り扱いの良否を知るために不可欠である。しかし、食品から個々の有害微生物を直接検出することは時間的、経済的に困難である場合が多い。そこで食品の衛生管理状態を全般的、間接的に評価するために広く用いられているのが「衛生指標菌」である。

牛乳や卵、カキ、食肉加工食品など、変質の危険性が高い食品に細菌数や大腸菌群などの衛生指標菌の規定値が定められている。本稿では毎日の食にかかわる身近な微生物知識の一つとして、衛生指標菌の意義や使い分け、確立された分析方法、活用分野などを解説したい。

### 食品の微生物相

衛生指標菌を解説する前に、日常的に摂食する食物の微生物相について述べる。食品中の微生物は食材が収穫される環境に由来するものが多く、土壌微生物や水生微生物、動物寄生微生物を主とするが、加工・消費される過程でのヒトからの二次的な微生物汚染も大いに受ける。これらの付着菌は、食品が適切に運搬、保管、洗浄、加工、保冷された場合には問題にならないが、不適切な扱いを受けた場合に腐敗などを引き起こす。表1に食品のおもな腐敗微生物を示す<sup>1)</sup>。

たとえば、日本人の主食である米は、白米に加工された時点で*Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*などの*Bacillus*属のほか*Aspergillus*, *Penicillium*などのカビ類が $10^5 \sim 10^6/g$ 程度付着している<sup>2)</sup>。炊飯すると、芽胞(胞子)をもつ*Bacillus*属を残してほとんど死滅するが、その後芽胞が発芽し、室温で増殖して米飯を腐敗させ、 $10^8/g$ に達すると、いわゆるすえた臭いを発し官能的にも腐敗が認められる。

また、畜肉の筋肉や体液はもともと無菌であるが、屠場で自身の腸内微生物や体毛の常在微生物、ヒト由来の微生物に汚染される。*Pseudomonas*属などの細菌が優占しているが、その後保存温度により変遷し、冷蔵保存では乳酸菌が増え微生物相の主要な部分を占めるようになる。保存期間が延びると肉の表層で好気性菌がアンモニアや有機酸を生成し、さらに嫌気性細菌が肉質の内部

表1. 主な腐敗微生物

属名	汚染されやすい食品
<i>Acetobacter</i> (酢酸菌)	果物, 醸造食品, ジュース類
<i>Achromobacter</i>	魚介類, 肉類
<i>Bacillus</i>	米飯, パン, 野菜, 牛乳, 乳製品, 獣肉加工品
<i>Flavobacterium</i>	魚介類, 肉類
<i>Clostridium</i>	肉類, 牛乳, 缶詰, 野菜
<i>Micrococcus</i>	肉類, 魚介類およびその加工品
<i>Pseudomonas</i>	牛乳, 卵, 肉類, 魚介類, 野菜
<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> (乳酸菌)	牛乳, 乳製品, 肉類, 野菜, 清酒
カビ類	野菜, 穀物, 果実, 干物, パン
酵母	果実, 醸造品, 肉加工品, 野菜

表2. 牛乳の加熱殺菌法

殺菌方法	殺菌条件
低温保持殺菌法 (LTLT法)	62~65°C 30分間
高温短時間殺菌法 (HTST法)	72~85°C 15秒間
超高温殺菌法 (UHT法)	120~150°C 1~3秒間

に侵入しアミンを生成して腐敗が進んでいく。

魚介類は、畜肉と比較して筋肉構造がもろいうえ水分が多く、内臓の分離が不十分なので腐敗が進みやすい。水生細菌の *Pseudomonas* 属や *Vibrio* 属が筋肉の微生物の大半をしめて、店頭に並ぶときには  $10^6 \sim 10^7/\text{cm}^2$  程度に増えている<sup>2)</sup>。 *Vibrio parahaemolyticus* は、海産魚に付着し、一般の腐敗細菌より速く増殖して腸炎ビブリオ食中毒を引き起こすので、見かけ上新鮮な魚介類でも注意が必要である。

牛乳は栄養分に富んだ非常に良好な微生物培地である。原乳は乳酸菌、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属、*Pseudomonas* 属などの細菌を含むが、結核菌、ブルセラ菌 (*Brucella*) などのいわゆる人畜共通感染症菌が含まれる可能性もある。そこで日本で市販される牛乳には一定条件以上の加熱殺菌が義務付けられている (表2)。低温保持殺菌法では加熱による風味や栄養素の損失を抑えた上、病原菌を殺菌するのに必要な条件が設定されている。他の殺菌方法よりも牛乳中に残る一般細菌が多く比較的腐敗が進みやすいため、短い消費期限を付して早期摂食を推奨している。しかし、今日では牛乳消費量の増大に伴い、パイプラインを通過させて 120~150°C で数秒間加熱殺菌する超高温殺菌法 (UHT) が一般的となっており、この方法ではほぼすべての菌が殺菌される。なかでも、140°C 以上の UHT 法で殺菌され無菌充填された滅菌乳はロングライフ牛乳 (LL 牛乳) と称され、常温流通が可能となっている。

卵も同様に良好な微生物の培養基になりうるが、割卵前は殻表面をムチンで覆われ、細菌の侵入は物理的に食い止められている。洗卵によりムチンが取り除かれると微生物の侵入が始まるが、卵白にふくまれるリゾチームなどの抗菌物質に守られて細菌増殖は阻止され、低温では容易に腐敗が起こらない。高温では侵入した害菌が卵白で生育し、卵黄に達した時点から急速に増殖する。そのため割卵した後の卵の腐敗は非常に速やかである。*Salmonella Enteritidis* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis) は近年、卵におけるサルモネラ食中毒の主な原因菌となっている。鶏の腸管に生息し産卵時に殻に付着するが、卵巣に感染している鶏では殻内部にすでに侵入している場合もある。

一方、食品素材のもつマイクロフローラに加えて、加工・消費過程で食品を扱うヒト由来の微生物による二次汚染も食中毒および感染症の大きな原因となる。ヒトの腸管内には食品由来の微生物が定着し増殖して存在している。その数は 100~300 種類で 100 兆個ともいわれる。ヒトが何らかの感染症に感染している場合は、病原微生物が糞便と共に排出され食品を汚染する原因になる。また、ブドウ球菌などヒトの皮膚や粘膜の常在菌も食中毒を引き起こす。そのため、食品加工に従事する者には常に手洗い、消毒などの衛生管理が課せられ、手指の傷や下痢症状を持つ者が従事しないように管理される。

### 衛生指標の種類と意義、分析方法

食品の微生物相が腐敗や食中毒や感染症を引き起こすことのないように、食品ごとに衛生指標菌の規定値が定められている。衛生指標菌は、それぞれに使用目的と対象とする微生物群が異なる。以下におもな衛生指標菌を解説する。

**細菌数** 細菌数は、食品が処理・加工過程において衛生的に取り扱われたか否かや、食品の保存性の判定、さらには病原微生物の混入の予測などを大局的に調べる最も一般的な指標である。細菌数の検出には、食品中のさまざまな菌種をより広範囲に検出する目的で、ペプトン、酵母エキスを主成分とし、ブドウ糖を加えた標準寒天培地<sup>3)</sup>が使用される。なお、食品衛生検査指針では細菌数は「生菌数」、「一般生菌数」と表現される。分析方法は、食品を希釈し、標準寒天培地にて混釈平板培養し、35~37°C、48時間、好気条件で得られた菌数を食品 1g (あるいは ml) あたりの値で示す。食品に由来する感染症の起因菌はほとんどが 25~45°C を増殖至適温度とする中温菌であることから、細菌数が高い食品については、病原菌の感染の可能性も高いと考えるのが妥当である。通常は細菌数が  $10^3 \sim 10^4/\text{g}$  程度の食品が多いが、増殖して  $10^7 \sim 10^8/\text{g}$  まで達したとき、タンパク性食品では初期腐敗に達したと判断される。

*Bacillus* 属、*Clostridium* 属などは、生育環境が悪化したときに菌体内に芽胞 (胞子) という休眠体を形成する。栄養細胞が消失しても芽胞は長く食品中にのこり、環境の改善を待って発芽し増殖を再開する。芽胞は通常の加熱調理や乾燥、消毒薬に対して強い抵抗性を示すため、腐敗や食中毒予防の点で大いに注意が必要である。そのため好気性芽胞数が食品衛生学的品質の指標として利用されることがあるが、この場合には、食品試料を 100°C で 10 分間熱して細菌を殺菌したのち、通常の細菌数の測定と同様に培養計測を行う。

**総菌数** 細菌数は培養可能な生菌のみを対象とするが、総菌数は顕微鏡を用いて生菌、死菌のすべてを計測する指標である。細菌数などの培養法にくらべて、より迅速に食品品質を知ることができる。例を挙げると、牛乳生産農家から集められた生乳は集乳場、ミルクプラントなどでただちに総菌数が検査され、これは乳価を定める上での指針とされているが、牛乳生産工程の良否を判断する一資料にもなっている。また、缶詰食品についても高温加熱殺菌後に缶詰内容物の総菌数が計測され、もとの食品素材の鮮度、微生物学的汚染度を推定する資料とされる。

**大腸菌群** 大腸菌群とは「グラム陰性の無芽胞桿菌で、乳糖を分解してガスを産生する好気性または通性嫌気性の細菌群」と定義され、主に腸内細菌を対象とする衛生指標であるが、細菌分類学上の名称ではなく、衛生学領域で使われる名称である。

大腸菌群として検出される菌のうち大多数を占める *Escherichia coli* は、哺乳類の腸内常在菌で、糞便中に排出され、環境中での生存時間が短いため、食品の糞便汚染指標としての意義が高い。赤痢や腸チフスなどの感染症は、食品が加工過程でヒトの糞便に直接、間接的に汚染されて起こる場合が多く、大腸菌群が高濃度に検出された場合には病原菌汚染の可能性もあることを示す。飲食物の日常検査において病原菌を直接検出する方法も最近では考案されているが、より簡便に安価に行える普及法として大腸菌群が利用されてきた。一方、大腸菌群のうち *Citrobacter* や *Klebsiella* などの腸内細菌は土壌、河川などの環境中にも分布し、野菜や魚にも必然的についてくる微生物である。よって大腸菌群が検出されたからといって、ただちに糞便汚染とつながるものではない。ただし、大腸菌群は易熱性の菌なので、加熱処理食品から検出された場合には食品衛生上「不衛生な取り扱い」の証拠と考えられ、有力な指標となる。

大腸菌群の検出は、前述の大腸菌群の定義に沿って行われる。培地はウシ胆汁末、乳糖、ペプトン、ブリアントグリーンを含むBGLB（液体）培地<sup>3)</sup>が主に用いられる。グラム陽性菌の増殖阻害効果があるウシ胆汁末およびブリアントグリーンによりグラム陰性菌が選択的に増殖する。定性試験ではまず、試験管にBGLB培地とガス捕集のためのダーラム管を入れたBGLB発酵管に食品を接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で24～48時間培養してガス発生を確認する推定試験を行う。これにより同じ腸内細菌科である赤痢菌、サルモネラ菌のような乳糖非分解、ガス非産生菌と区別できる。続いて、ペプトン、乳糖、リン酸一水素カリウム、エオジンY、メチレンブルーを

含むEMB（平板）培地<sup>3)</sup>を用いて確定試験を行う。ガスが発生したBGLB発酵管よりEMB培地に画線塗抹し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で24時間培養すると、典型的な大腸菌群は乳糖を分解してさまざまな酸を産生するために、メチレンブルーとエオジンYにより選択的に染められて黒色金属光沢や紫赤色などの特有の色のコロニーを形成する。さらに完全試験として、該当コロニーを接種した乳糖ブイヨン培地<sup>3)</sup>でのガス発生とグラム陰性無芽胞桿菌であることを検鏡確認し、大腸菌群陽性と判定する。

定量試験ではMPN算出法が用いられる。食品の連続希釈液を3本または5本ずつのBGLB培地に接種して定性試験と同様に培養し、ガス発生が認められた陽性管の出現率から、「最確数表」より、食品1gあたりに含まれる大腸菌群数のもっとも確からしい数値「最確数 (most probable number, MPN)」を確率論的に推定する。

**大腸菌** 衛生指標の大腸菌とは「大腸菌群のなかでインドール産生能、メチルレッド反応、VP (voges-proskauer) 反応、およびシモンズのクエン酸塩利用能の4つの性状試験 (IMVIC試験) の結果が「++--」または「-+-」のもので $44.5^\circ\text{C}$  で増殖できるもの」と定義する。大腸菌は自然環境中で短命であることから、食品から大腸菌が検出されることは大腸菌群よりも直接的に糞便汚染を示す指標となる。検出にはペプトン、乳糖、塩化ナトリウム、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、胆汁酸塩を含むEC培地<sup>3)</sup>を用い、他の大腸菌群が増殖できない $44.5^\circ\text{C}$  で24時間培養して、大腸菌群検査と同様にガスの発生から判定し、定量的には最確数で示される。

### 衛生指標菌の活用例

微生物学的指標の規定値が定められた食品を表3に示す。生鮮魚介類などの非加熱食品、冷凍食品の品質管理のほか、牛乳の加熱殺菌効果の判定に細菌数が使用されている。通常の牛乳では細菌数が5万/ml以下で、常温保存可能品では陰性であることが定められている。一方、大腸菌群はいずれの牛乳でも陰性とされている。また、生食用のカキは食中毒の原因食品になることが多いので、細菌数、大腸菌、腸炎ビブリオの基準値が定められ、出荷までの取り扱いの衛生状況や糞便汚染状況などが調査される。この他、食肉食品では黄色ブドウ球菌やサルモネラ菌、クロストリジウム属菌といった食中毒菌の数が規定される。

### 最後に

本稿で紹介した衛生指標菌の検出にはある一定量以上

生物学基礎講座

表3. 微生物学的基準のある食品例

	食品	規定値
細菌数	粉末清涼飲料	3000/g以下
	氷雪	100/ml以下
	氷菓	1万/ml以下
	ゆでだこ, ゆでがに	10万/g以下
	生食用カキ	5万/g以下
	冷凍食品	10万/g以下
	食鳥卵(未殺菌液卵)	鶏卵100万/g以下
	牛乳	5万/ml以下
	牛乳の常温保存可能品	陰性
大腸菌群	清涼飲料水, 粉末清涼飲料, 氷雪, 氷菓, 食肉製品, 鯨肉製品, 魚肉練り製品, ゆでだこ, ゆでがに, 冷凍食品, 牛乳	陰性
大腸菌	食肉製品, 冷凍食品	陰性
<i>E. coli</i> 最確数	生食用カキ	230/100g以下
腸炎ビブリオ	ゆでだこ, ゆでがに	陰性
腸炎ビブリオ最確数	生食用鮮魚介類	100/g以下
	生食用カキ(むき身)	100/g以下
黄色ブドウ球菌	食肉製品	1000/g以下
サルモネラ属菌	食肉製品	陰性
	食鳥卵(殺菌液卵・鶏卵)	陰性, 25g中
クロストリジウム属菌	食肉製品	1000/g以下

資料: 食品・食品添加物など規格基準(厚生労働省告示第370号)

の菌体数を必要とするものが多い。少量の菌を食品より検出しようとする、あらかじめ前培養が必要となり、結果を得るのに時間がかかる。そこで、昨今ではATP計測や一本鎖DNAの計測によって細菌の生理活性を迅速に検出する方法も開発されている<sup>4)</sup>。また、病原菌など特異な菌を検出する場合は、抗体法やDNAまたはRNAハイブリット形成法などの方法も用いることができる<sup>4)</sup>。しかし、日々膨大な食品検体数を現場で測定し、食の安全を守るためには、安価で統一された従来の衛生指標菌はまだまだ重要である。

文 献

- 1) 坂井拓夫: 改訂版 微生物学, 培風館(1998).
- 2) 小林秀光, 白石 淳: 微生物学, 化学同人(2007).
- 3) 清水英世, 杉山 章(編): (新版) 図解 食品衛生学実験, みらい(2010).
- 4) 高野光男, 横山理雄: 食品の殺菌 その科学と技術, 幸書房(1989).