

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名： 食品添加物の使用に対し新たに出現した耐性菌の影響に関する
評価指針
研究代表者名： 岩淵絵里子 【天使大学看護栄養学部栄養学科／助手】

事業の背景・目的

現在、日本では食品添加物として指定添加物 357 品目、そして既存添加物 450 品目、天然香料および一般飲食物添加物の使用が許可されている。それぞれの食品添加物の安全確認のため、10項目に及ぶ一般毒性試験や特殊毒性試験などが実施されているが、複合摂取の毒性、即ち相乗作用や相加作用などを考慮した使用基準はない。また、使用許可後も、表示の実施状況、実際の使用量および摂取量の実態調査などが行われ、安全性などが監視されている。さらに、許可されていない食品添加物等の使用、医薬品の飼料添加による畜水産食品への残留、農薬や環境汚染などから食品への残留・蓄積の例などもあり、食肉・養殖水産物の薬剤耐性菌汚染も重要な問題になっている。薬剤耐性とは、ある薬剤に本来感受性であった細菌が、長期間にわたり繰り返し何度も使用されることにより、その薬剤に対して耐性を獲得することであり、耐性を持った細菌を薬剤耐性菌と呼ぶ。この薬剤耐性は、現在既に医療現場では問題視されており、院内感染などを引き起こす要因とも言われている。例えば、院内感染分離株を含め黄色ブドウ球菌株のほとんどすべては、ペニシリン G に対して耐性を持っており、近年バンコマイシン耐性株も分離され懸念されている。こうした事は、医療現場だけの問題ではなく、日常生活の中でも十分に起こりうる問題で、薬剤耐性と同じような事が、食品添加物の継続的な使用により起こることも予想できる。食品には、保存、酸化防止、漂白などの目的で多くの食品添加物を使用しているが、これらの食品添加物に対して耐性菌出現の有無は確認されていない。

申請者は、予備的な調査・実験から、保存料のソルビン酸に耐性を示す細菌（*Bacillus* 属と *Staphylococcus* 属の菌種）が食品および環境に 1 % から 20 % に存在することを見出した。そして、食品添加物に対して耐性をもつ細菌のヒトへの影響を調査することも重要である。

本研究の目的は、食品添加物に対して耐性をもつ細菌の各種食品および環境の分布調査、給食施設別保菌率調査、家畜保菌率調査などを行い、さらに耐性菌の同定、耐性メカニズムの解明、実験小動物における生体への影響などを通して、食品添加物、特に保存料に対する健康障害の予察・予知の基盤を開発（構築）することである。そして、多くの食品を安心して食することができるように貢献したい。

内容・方法

本研究では、多くの食品添加物の中から食品を加工する際に最も多く使用される保存料に注目した。保存料として一般的なソルビン酸カリウムを選択し、水産加工品のソルビン酸カリウムに対する耐性菌の出現状況を調査した。

現在、たらやほっけなどの水産加工品由来の魚肉すり身には、保存料として使用されるソルビン酸カリウムの使用基準が設定されていないことから、本研究では北海道で製造・流通されている 44 種類のすり身を実験試料として用いた（表 1）。本研究で用いたすり身は、札幌市内のスーパーマーケット、道東および道南の製造所とスーパーマーケットから購入した。今回実験に用いた試料は、たらやほっけを加工したものである。

魚肉すり身には、ソルビン酸カリウムは、食品添加物の使用基準では、現在ソルビン酸カリウム使用制限値が設定されていない。そこで、一般的に食されているチーズに対する使用量の最大限度が 3.0g/kg と最大量であることから、3.0 g/kg を基準とし、ソルビン酸カリウムを 12.0 g/kg、24.0 g/kg、48.0 g/kgの濃度に調製したものを普通寒天培地に添加して平板を作製した。また、食品添加物の耐性菌における明確な基準などが無いことから、本研究では、独自にソルビン酸カリウムを12.0 g/kg以上添加した培地に発育した菌を耐性菌とした。

実験方法は、各試料10 g を採取し、リン酸緩衝液（PBS）90m l に入れ、ストマッカーで攪拌して得た抽出液を普通寒天培地（ソルビン酸カリウム無添加）、および4濃度のソルビン酸カリウム添加培地に 0.1 m l ずつ塗布し、37℃で48時間から72時間培養後、発育した細菌数を数えた。さらに培養後の検体から、集落を釣菌し純培養した。

耐性菌の同定は、ソルビン酸カリウムを12.0 g/kg添加した培地で発育した菌を純培養後、集落の特徴の観察とグラム染色を行い、球菌と桿菌に分類した。その後、細菌同定用のアピマニュアルキットを用いて、菌種の特定を行った。本研究では、アピマニュアルキットの中からアピスタフとアピ 50CH の2種類のキットを使用した。アピスタフは、ブドウ球菌およびマイクロコッカスの同定用キットで、被検菌を滅菌蒸留水で調製後、プレートに接種し、35℃から37℃で18時間から24時間培養後、19項目の生化学的性状テストの自発的な反応および試薬添加による呈色反応を読み取り、アピラボソフトを用いて同定を行った。アピ 50CH は、バシラス属および腸内細菌の同定用キットで、被検菌をアピ 50CHB/CHE メディウムで調製後、プレートに接種し、29±2℃で24±2時間および48±6時間培養後の2回反応を読み取り、アピスタフと同様にアピラボソフトを用いて同定を行った。

また、環境中の細菌分布調査として、一般家庭（83軒）および老人福祉施設（6施設）の調理場内落下菌の発育状況を調査した。普通寒天培地（ソルビン酸カリウム無添加）とソルビン酸カリウムを12.0 g/kg添加した培地をそれぞれ各家庭、各施設の調理場内に6時間から10時間放置し、37℃で72時間培養後、発育した細菌数を数えた。その後、1家庭、1施設から平均6個の集落を釣菌し、純培養した。さらに、普通寒天培地にソルビン酸カリウムを12.0 g/kg、24.0 g/kg、48.0 g/kgの濃度に調製したものを普通寒天培地に添加して作製した培地に採取した細菌をマイクロプランターで接種後、37℃で72時間培養後、判定した。耐性菌の同定は、上記と同様の方法で行い、本研究では、ソルビン酸カリウムを24.0 g/kg以上添加した培地に発育した細菌を耐性菌とした。

結果・成果

水産加工品由来であるすり身から発育した一部、および全ての実験試料の細菌数を表2に示した。ソルビン酸無添加培地とソルビン酸を 3.0 g/kg 添加した培地での細菌の発育を比較すると、細菌の発育の抑制には試料による差が見られた。全体的に濃度の異なるソルビン酸カリウムを添加した培地では、濃度が高くなるにしたがい発育する細菌数は減少した。ソルビン酸カリウムを24.0 g/kg添加した培地では、無添加培地での細菌の発育に対し、多くの試料において1.0 %未満の割合でしか細菌が発育しておらず、高い抑制効果が確認された。全ての試料において、ソルビン酸カリウムを48.0 g/kg添加した培地には、細菌は全く発育しなかった。このことから、ソルビン酸カリウムは、細菌の発育を抑制する働きがあり、保存料として有効であることが明らかになった。本研究では、ソルビン酸カリウムを12.0 g/kg以上添加した培地に発育した細菌をソルビン酸カリウム耐性菌としたことから、ほとんどの試料から耐性菌が発育したといえる。今回実験に用いた試料の中にたち（白子）を原料にした蒲鉾があったが、細菌がソルビン酸カリウム無添加培地では50(CFU/g(ml))の細菌が発育したが、ソルビン酸カリウムを添加した培地には、どの培地にも全く発育していなかった。

細菌の同定は、ソルビン酸カリウムを12.0 g/kg添加した培地で発育したソルビン酸カリウム

耐性菌の集落を釣菌し、純培養した被検菌で行った。純培養後、グラム染色で形態を観察したところ、球菌94株、桿菌6株を分離することができた。その後、アピマニユアルキットにより、ソルビン酸カリウム耐性菌の同定を行った結果、合計で球菌50株、桿菌5株、14菌種を特定することができた(表3)。*Staphylococcus* 属9菌種、*Bacillus* 属3菌種であった。

Staphylococcus 属は、ブドウ球菌属で自然界に広く分布しており、現在19菌種から構成されている。*Staphylococcus* 属は、ヒトや動物の腸管に存在する腸内細菌の他に、皮膚や粘膜などにも存在している常在細菌叢である。ヒトの日和見感染などの起因菌となり、分離される菌種には、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus haemolyticus*、*Staphylococcus hominis* などがある。これらの菌種は、本研究でも分離された。これらの細菌が環境の変化などで常在細菌叢の優劣が入れ替わる菌交代現象が起こり、日和見感染や他の疾病の原因菌となることも考えられる。常在細菌叢の乱れは、下痢症を引き起こすこともある。また、今回分離された *S.aureus* は、本来は化膿菌であるが、食中毒の起因菌として黄色ブドウ球菌という名称でよく知られている。*S. aureus* による感染症の主なものとして、ブドウ球菌性肺炎、敗血症、骨髄炎、ブドウ球菌腸炎、エンテロトキシンによる食中毒、エクスフォリアチンによるブドウ球菌性熱傷様症候群、毒素性ショック症候群などがある。特に、ブドウ球菌腸炎患者から分離される黄色ブドウ球菌は、抗生物質に対して高い耐性を示すと言われており、治療中、テトラサイクリン(TC)などの抗生物質使用中に菌交代現象により起こる耐性ブドウ球菌性腸炎を引き起こす。さらに、数年前には多剤耐性を示す MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) が出現し、現在使用されているほとんどの抗生物質に対して耐性である。また、MRSA は新たに開発され使用されるようになった抗生物質に対しても耐性を獲得しやすい性質をもっているようである。

Bacillus 属は、グラム陽性で芽胞を形成する好気性桿菌であり、本来土壌菌であるが、病原性のある *Bacillus anthracis* (炭疽菌) や食中毒の原因菌となる *Bacillus cereus* などもある。しかし、今回の実験からはこのような細菌は、分離されなかった。*Bacillus coagulans*、*Bacillus firmus* をはじめ今回分離された *Bacillus* 属は、主に缶詰食品などの腐敗・変敗を引き起こし、食品の風味などを悪くする細菌であるが、これらの *Bacillus* 属も稀にヒトの日和見感染などの起因菌になることがあるので安心はできない。

ほかに、*Kocuria varians/rosea*、*Micrococcus spp* が分離された。また、鴨ねぎやえび入りなど混合物の入っているすり身・蒲鉾から高い確率で家畜由来の *Staphylococcus intermedius* の可能性のある細菌が検出された。そして、*Bacillus* 属の近縁種である *Brevibacillus brevis* や *Dermaococcus/Kytococcus spp* の可能性がある細菌も分離された。また、*Sta. chromogenes*、*Sta. hominis*、*Sta. hyicus*、*Sta. lentus*、*Sta. lugdunensis*、*B.megaterium*、*B.stearothermophilus*、*Brevibacillus brevis* の可能性のある株について、現在同定中である。

環境中の細菌分布調査として、一般家庭、および老人福祉施設の調理場内のソルビン酸カリウム耐性菌の発育状況の結果を表4に示す。ソルビン酸カリウムを24.0 g/kg添加した培地では、高い抑制効果が確認された。しかし、調理場内は、ソルビン酸を添加することはないため、一般的な環境において十分に耐性菌が発育することが判明した。また、一般家庭から分離したソルビン酸耐性菌は、*Staphylococcus* 属3菌種、*Bacillus* 属4菌種が同定された(表5)。

今後の展開等

本研究から、ソルビン酸カリウムの保存料としての有効性が明らかになった。しかし、ソルビン酸カリウムを保存料として有効な濃度で使用するためには、かなり高濃度のソルビン酸カリウムを添加する必要があるが、食品自体にソルビン酸カリウムが含まれていることも考えられる。そのため、必要以上にソルビン酸カリウムを使用することを防ぐために、食品中のソルビン酸カリウム含量を正確に知ることが必要不可欠である。そのため、早急に食品中のソルビン酸カリウムの定量を行う必要がある。また、ソルビン酸カリウム濃度が高い培地になるにし

たがい、細菌抑制の効果が強くなったことは予想した通りであった。しかし、ソルビン酸カリウムは、酸性側で作用しやすい性質であるため、ソルビン酸カリウムを 3.0 g/kg 添加した培地において、pH を強い酸性にした場合、細菌の発育抑制作用が上昇することも示唆できる。今後、pH を管理した環境でのソルビン酸カリウムの細菌抑制効果を確認する必要がある。また、今回実験したソルビン酸カリウムの濃度は 3.0 g/kg の次の濃度が 12.0 g/kg であったことから、この 2 濃度間の各濃度での耐性菌の発育状況の確認を行い、ソルビン酸カリウムが保存料として有効になる濃度を明確にしたいと考える。また、一般家庭からソルビン酸耐性菌の発育が確認されたことは、非常に興味深いことであることから、今後発育環境を詳細に調査したいと考える。

今回ソルビン酸耐性菌として分離した細菌の 45 株が、未同定であるため、今後、追加試験等を行い、菌種を明らかにしたい。また、今回の実験では、ソルビン酸カリウムに対する耐性菌の出現に注目しているが、分離された耐性菌の中には、他の食品添加物や抗生物質に対しても耐性を持っている菌が存在している可能性も十分に考えられる。さらに今回分離した菌種のうち少なくとも 12 菌種には、ペニシリン G、ゲンタマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、テトラサイクリン、ホスホマイシンなど数種類の抗生物質に対して耐性を持つ、つまり多剤耐性菌である可能性があるという報告もある。このことから、分離株の薬剤感受性試験を行うことは、食の安全、そして人の健康に重要な意味を持つと思われる。さらに、食品から分離された多剤耐性菌の耐性メカニズム・性状を明らかにしたい。そして、実験小動物における生体への影響などを把握し、さらにヒトに対する影響を予測することによって、食品をより安全に食することができるように何らかの指標を作成・開発したいと考える。

表1. 実験試料

	試料数
すり身(たら)	15
すり身(ほっけ)	9
すり身(かに入り)	6
すり身(えび入り)	4
すり身(たこ入り)	1
すり身(鶏ごぼう)	4
すり身(鴨ねぎ)	2
蒲鉾(たら)	2
蒲鉾(たち)	1
計	44

表2. ソルビン酸添加培地における水産加工品由来細菌の発育

試料	ソルビン酸カリウム無添加培地に 発育した細菌数 (CFU/g)	ソルビン酸添加培地 (g/kg) に発育した細菌数 (CFU/g)			
		3	12	24	48
すけそうたらしり身	1.7 × 10 ⁴	1.1 × 10 ⁴ (67.4)	3.7 × 10 ³ (21.6)	5.0 × 10 ² (3.0)	0(0)
ほつけすり身	8.7 × 10 ³	7.6 × 10 ³ (87.9)	2.8 × 10 ³ (32.4)	5.0 × 10(0.6)	0(0)
ほつけすり身	1.9 × 10 ⁴	1.3 × 10 ⁴ (70.2)	9.4 × 10 ³ (50.0)	1.0 × 10 ² (0.5)	0(0)
かに入りすり身	4.4 × 10 ⁴	1.9 × 10 ⁴ (43.4)	9.2 × 10 ³ (21.0)	1.0 × 10 ² (0.2)	0(0)
かに入りすり身	3.4 × 10 ⁴	1.8 × 10 ⁴ (26.8)	7.0 × 10 ³ (20.3)	1.5 × 10 ² (0.4)	0(0)
えび入りすり身	5.1 × 10 ³	1.3 × 10 ³ (24.8)	5.5 × 10 ² (10.9)	2.5 × 10 ² (5.0)	0(0)
たこ入りすり身	3.5 × 10 ⁴	1.4 × 10 ⁴ (40.7)	1.2 × 10 ⁴ (34.5)	1.5 × 10 ² (0.4)	0(0)
鶏ごぼう入りすり身	4.4 × 10 ⁴	1.8 × 10 ⁴ (41.3)	1.1 × 10 ⁴ (24.3)	2.0 × 10 ² (0.5)	0(0)
鴨ねぎ入りすり身	4.5 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁴ (44.0)	9.6 × 10 ³ (21.3)	2.5 × 10 ² (0.6)	0(0)
試料の全平均	2.8 × 10 ⁴	3.0 × 10 ⁴ (100)	8.8 × 10 ³ (31.4)	2.7 × 10 ³ (9.6)	0(0)

() 内の数値は、ソルビン酸無添加培地に対するソルビン酸添加培地での細菌の発育率(%)を示す。

表3. すり身から分離されたソルビン酸耐性菌の菌種

Genus	<i>Staphylococcus</i>	Genus	<i>Bacillus</i>	その他
	<i>Sta. aureus</i> (2)		<i>B.coagulans</i> (1)	<i>Kocuria varians/rosea</i> (11)
	<i>Sta. auricularis</i> (1)		<i>B.firmus</i> (1)	
	<i>Sta. capitis</i> (3)		<i>B.lentus</i> (2)	<i>Micrococcus spp</i> (1)
	<i>Sta. cohnii ssp. Cohnii</i> (1)			
	<i>Sta. cohnii ssp. Urealyticum</i> (2)			
	<i>Sta. haemolyticus</i> (2)			
	<i>Sta. sciuri</i> (8)			
	<i>Sta. simulans</i> (1)			
	<i>Sta. xylosus</i> (18)			

()内の数値は、分離された株数を示す。

表4. ソルビン酸添加培地における調理場内落下細菌の発育

	ソルビン酸カリウム無添加培地に 発育した細菌数(CFU/g)	ソルビン酸添加培地(g/kg)に発育した細菌数(CFU/g)			
		3	12	24	48
一般家庭独居(83軒)	119	114(96)	89(75)	6(5)	0(0)
一般家庭同居(49軒)	205	186(91)	146(71)	29(14)	3(1)
老人福祉施設(6施設)	45	45(100)	45(100)	—	0(0)

()内の数値は、ソルビン酸無添加培地に対するソルビン酸添加培地での細菌の発育率(%)を示す。

表5. 一般家庭から分離されたソルビン酸耐性菌の菌種

Genus	<i>Staphylococcus</i>	Genus	<i>Bacillus</i>
<i>Sta. lentus</i>		<i>B. circulans</i>	
<i>Sta. sciuri</i>		<i>B. licheniformis</i>	
<i>Sta. xylosus</i>		<i>B. megaterium</i>	
		<i>B. subtilis</i>	