

苦情ミネラルウォーターから検出された真菌の塩基配列解析による同定

谷岡 絵理^{1*} 辻 英高¹ 西海 弘城¹ 高井 伝仕¹ 藤田 昌民² 近平 雅嗣¹

Identification of Fungi Isolated from Complained Mineral Water Using Sequencing Analysis

Eri TANIOKA^{1*}, Hidetaka TSUJI¹, Hiroki NISHIUMI¹, Denshi TAKAI¹,
Masatami FUJITA² and Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹Infectious Disease Research Division, and ²Life Science Division,
Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences,
2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

The complaint that the mineral water was contaminated with a mold-like float was reported to the public health center. The public health center collected some packs of the mineral water from the manufacturer and asked our institute for a quality conformance examination of them. As a result, the coliform bacteria was not detected in all samples and the standard plate count was $2.5 \times 10^5 - 1.5 \times 10^6 / \text{mL}$. Additionally two kinds of fungi were detected by morphological observation. One of them was identified as *Cladosporium* sp. morphologically, however the other could not be. We performed sequence analysis about ITS region of rRNA gene to clarify the unidentified fungi, it was identified as *Exophiala salmonis* because of high concordance rate (99%) with sequence data of *E. salmonis* disclosed in the internet database. Therefore, it is useful to use sequence analysis in combination with morphological observation in identification of fungi isolated from foods.

I はじめに

加工技術や流通手段の進歩により食品が多様化するなか、食品の偽装問題や食品による健康被害事例が増えている。また、2008年には中国産冷凍餃子が原因と疑われる健康被害事件が県内で発生したことが契機となって、消費者の食品に対する「安全安心」への関心がより高まっている。このような状況の中で、2008年6月に住民から京都市の保健所に、「購入したミネラルウォーターにカビ様の異物が浮いている」との苦情があった。食品衛生法第11条第2項違反疑いとして、通知を受けた県内の製造業者を管轄す

る健康福祉事務所は立ち入り調査し、苦情品と同一の商品 19 ロット 28 サンプルを収去し、その収去品 4 検体について研究センターに検査依頼があった。

ミネラルウォーターは食品衛生法における、清涼飲料水成分規格の適用を受け、混濁、沈殿物、大腸菌群などが規定されている。さらに、清涼飲料水は製造基準として、原水の一般細菌数が 100 個/mL 以下であることが定められている。このことから、研究センターでは依頼品について、大腸菌群試験、一般細菌数測定試験及び真菌の同定試験を行った。

真菌の同定は通常、肉眼や顕微鏡による形態的特徴などの表現性状を指標に行われるが、培養に時間を要するうえに、鑑別のための専門的な知識や熟練した技術が必要とされ、非定型な菌株ではその判定に困難を伴う。

近年、微生物の同定にも、迅速で客観的な判定が可能ならぬに再現性に優れた分子生物学的手法が取

¹感染症部 ²健康科学部

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所
感染症部 谷岡 絵理

り入れられるようになっており、その中でも、すべての生物が共有するリボゾーム RNA (rRNA) 遺伝子の塩基配列を比較する相同性解析がよく用いられている。今回、真菌検査において、形態観察と共に、rRNA 遺伝子の中で遺伝情報の保存性が低く種の同定に適しているとされる ITS 領域の解析による同定を試みたので、当該事例の検査結果とあわせて報告する。

II 材料と方法

1. 試料

搬入されたミネラルウォーターは合成樹脂製の容器 (1L入り) に充填されており、4検体すべてに浮遊性の異物が認められた。

2. 鏡検

異物を無菌的に採取し、光学顕微鏡で直接鏡検した。

3. 大腸菌群

試料原液の10mL, 1mL及び10倍希釈液1mLをそれぞれ、LB発酵管に接種し、35℃で48時間培養して培地の黄変とガス産生の有無を観察した。

4. 一般細菌数

試料原液を滅菌リン酸緩衝液で10~10⁴倍に段階希釈して、各々1mLずつを2枚のシャーレに分注、これに滅菌標準寒天培地15~20mLを加えて混合した後、35℃で24時間培養し、集落計数した。

5. 真菌の同定

5.1 培養

試料900mLをメンブランフィルター (孔径0.45 μm, millipore) でろ過し、フィルター上の異物を2mLの滅菌蒸留水に懸濁して450倍濃縮液を作成した。濃縮液0.1mLをクロラムフェニコール加PDA培地に塗布し、25℃10日間培養した。さらに、この濃縮液1mLをクロラムフェニコール加サブローブロスに添加して、25℃10日間培養後、PDA培地に画線して25℃10日間培養した。

5.2 真菌の形態学的試験

PDA培地上のコロニーを釣菌して再度PDA培地で10~15日間純培養し、コロニーの形態観察を行った。同時に、スライドカルチャーを行い顕微鏡で微細構造を観察し、それらの形態をかび検査マニュアルカラー図譜¹⁾と比較した。

5.3 DNA塩基配列の決定と解析

5.3.1 DNAの抽出

PDA培地上の純培養真菌から、Hengらの方法²⁾でDNA

抽出を行った。

5.3.2 PCR条件及び増幅産物の精製

ITS1領域増幅用PCRプライマーはITS1F(5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3')及びITS1R(5'-CGTTCTTCATCGATG-3')³⁾を用いた。反応液は0.5 μMプライマー、200 μM dNTP Mixture、0.5U TaKaRa Ex-Taqに抽出DNA 1 μLを加えて反応液を25 μLとした。DNA増幅は、95℃/5分、94℃/30秒-55℃/30秒-72℃/60秒 (35サイクル)、72℃/10分で行った。エチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により標的DNAの増幅を確認した後、その反応液をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社)により精製した。

5.3.3 DNA塩基配列の決定

精製DNAはBig-Dye terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて、93℃/10分、96℃/10秒-48℃/20秒-60℃/3分 (25サイクル)でダイレクトシーケンス反応を行った。反応産物のスピンカラムゲルろ過精製を行い、95℃5分間加熱後氷冷して、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerで塩基配列を決定した。

5.3.4 DNA塩基配列の解析

確定した塩基配列について、BLAST (basic local alignment search tool)による相同性解析により菌種を決定した。

III 結果および考察

1. 大腸菌群及び一般細菌数

汚染の指標となる大腸菌群は陰性で、清涼飲料水の規格基準に適合していた。

一般細菌数は2.5×10⁵~1.5×10⁶個/mLであった。一般細菌数は清涼飲料水の規格基準には定められていないものの、その製造基準で、原水一般細菌数は100個/mL以下と規定されている。今回の結果は、この数値を大幅に上回っており、製造時の原水が基準を満たしていなかった可能性や、基準に適合した原水が用いられていた場合には、製造・輸送・貯蔵過程において適切に取り扱われなかったために一般細菌が増殖したことが示唆された。

2. 真菌の同定

試料中の異物を直接鏡検したところ、菌糸塊が認められ (Fig.1)、その形態から2種類の菌種の混在が疑われたものの、同定の指標となる特徴的な形態は確認できなかった。培養試験では、すべての検体

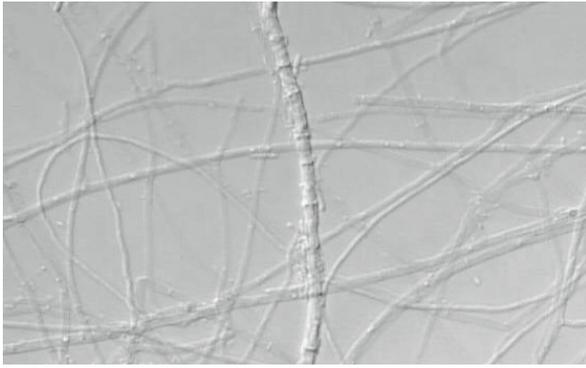


Fig.1 Micrograph (×400) of mold-like floats in the complained mineral water

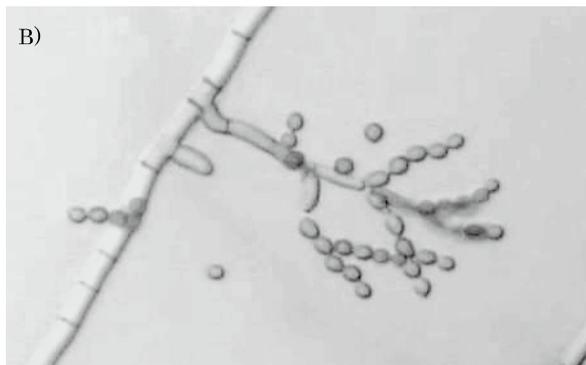
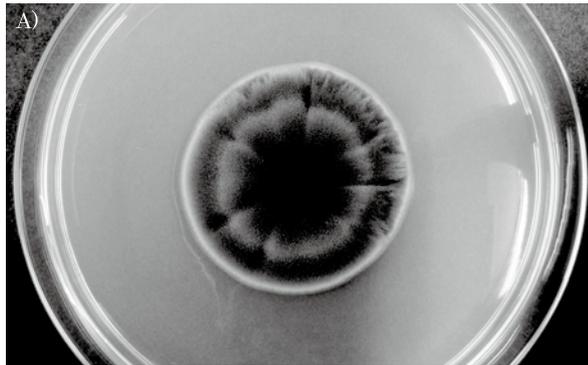


Fig.2 *Cladosporium* sp.
A) Cultured colony in PDA (25°C, 15 days)
B) Micrograph (×400)

で性状の異なる2種類のコロニーが観察された。これらのコロニーについて、プレートを用いた純培養及びスライドカルチャーによる形態観察を行った。このうち一つはコロニーの性状及び分生子などの形態的特徴から *Cladosporium* 属菌と考えられた (Fig.2)。もう一方は、形態からの菌種の探索が困難であったため、この菌の rRNA 遺伝子の ITS1 領域の塩基配列を決定し相同性解析を行った。解析した 263bp は、*Exophiala salmonis* (GenBank accession number : AY213652) の当該領域と 99%一致した。これに基づいて、当該菌の形態的な特徴について再度確認したところ、PDA 培地上のコロニー形態及び分生子の形状が *Exophiala salmonis* の特徴と合致した

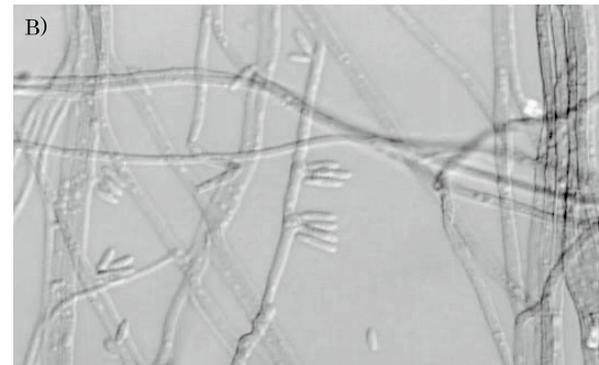


Fig.3 *Exophiala salmonis*
A) Cultured colony in PDA (25°C, 15 days)
B) Micrograph (×400)

(Fig.3).

また、形態的特徴から *Cladosporium* 属と考えられた菌についても、同様に解析したところ、解析した 226bp は *Cladosporium* sp. (GenBank accession number : EU139855) の当該領域と 100%一致した。

以上のことから、ミネラルウォーター中の異物は *Exophiala salmonis* 及び *Cladosporium* 属による菌糸塊と考えられた。

食品由来真菌の同定に分子生物学的手法を用いた報告は少ない。その中で、千葉ら⁴⁾は表現性状試験のみでは真菌の同定に苦慮するような場合において、塩基配列決定による相同性解析が有効であったと報告している。真菌の rRNA 遺伝子は 18S (small subunit rRNA), 5.8S, 28S (large subunit rRNA) の3種のサブユニットと、それらの間に介在する ITS (internal transcribed spacer), ETS (external transcribed spacer), IGS (intergenic spacer) のスペイサー領域で構成されている⁵⁾。rRNA 遺伝子の中でも、18S や 28S といったサブユニット領域は属の同定に適しているとされている。これに対して ITS 領域は比較的多くの変異が蓄積された領域であるため、近縁の菌種を区別するのに有用であるとされている^{5,6)}。このことから、今回我々は分離された真菌について、日本薬局方記載の方法によって ITS1

領域を解析したが、*Cladosporium* 属であることは判明したものの、その種の特定には至らなかった。これについては、種によって区別に適した解析領域が異なると指摘する報告⁷⁾もあることから、効率よく正確に同定するための必要最小限の複数の領域を選定することが必要と思われた。

真菌は形態的分類に基づいて、国際植物命名規約で命名されている。一方、遺伝子での分類体系は確立されておらず、また菌種によって遺伝子登録データ数に大きな偏りがあるなど、真菌における塩基配列解析には課題が残されている。しかし、これらのことを留意しつつ、従来法である形態に基づく同定結果に、塩基配列解析の結果を加味することで、迅速で正鵠を射た同定が可能になると思われる。

3. 清涼飲料水における真菌の混入

清涼飲料水では *Penicillium*, *Cladosporium* および *Aureobasidium* などの汚染が多いと報告されている⁸⁻¹⁰⁾。今回、我々が同定した *Cladosporium* 属や *Exophiala* 属は、様々な飲料水から検出されている¹¹⁾。*Cladosporium* 属は空中浮遊菌の 30~40% を占めるとされ、*Exophiala* 属は使用水や環境中に存在する菌であることから¹¹⁾、今回の苦情製品は製造過程におけるパイプラインや充填時の汚染、あるいは充填容器の不適切な管理などが原因と考えられた。

Cladosporium 属菌、*Exophiala* 属菌は生活環境中に常在しており、摂取しても人体への影響は少ないと考えられる。しかし、真菌による健康被害については不明な点も多く、これらによる食品汚染は軽視すべきではない。カビによる製品汚染を防止するには、諸角ら¹⁰⁾が指摘しているように、原材料から製品に至るまでの様々な工程でカビ汚染に対するリスク評価を行い、これに基づいて適切な管理基準を設定し定期点検を行うなど、製造環境の衛生管理が求められる。

IV まとめ

2008年6月、購入したミネラルウォーターにカビ様の異物が浮いているとの苦情があり、兵庫県内の健康福祉事務所が当該製造所に立ち入り調査をした。健康福祉事務所が収去した製品について、当センターで検査した結果、大腸菌群はいずれも陰性、一般細菌数は $2.5 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ 個/mL であった。真菌では、*Cladosporium* 属菌及び *Exophiala salmonis* が検出された。*Exophiala salmonis* については、形態観察のみでは同定できなかったが、rRNA 遺伝子の

ITS1 領域の塩基配列解析によって、菌種を決定できた。このことから、食品由来の真菌同定に塩基配列解析法を併用することは、迅速性や正確性において有用であると考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご協力いただきました県生活衛生課、和田山健康福祉事務所の関係者方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 高鳥浩介監修：かび検査マニュアルカラー図譜、p.242-429、株式会社テクノシステム、東京(2002)
- 2) Zhu, H., Qu, F., Zhu, L. H. : Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.*, 21(22), 5279-5280(1993)
- 3) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方、p.1580-1581、厚生労働省(2006)
- 4) 千葉隆司、和宇慶朝昭、諸角聖、矢野一好、甲斐明美、山田澄夫：DNA 塩基配列解析法を利用した苦情食品由来真菌の同定に関する検討。東京健康安研セ年報、57, 159-163(2006)
- 5) 久保田裕子：カビ検査を考える。日食微誌、25(2), 66-69(2008)
- 6) Sugita, T., Nishikawa, A. : Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Jpn. J. Med. Mycol.* (in Japanese), 45, 55-58(2004)
- 7) 千葉隆司、和宇慶朝昭、貞升健志、矢野一好、諸角聖：食品由来酵母の同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較。食衛誌、48(1), 1-7(2007)
- 8) 北爪晴恵、桐ヶ谷忠司、石黒裕紀子、鈴木正樹、松本裕子、山田三紀子、武藤哲典：真菌を原因とする苦情食品事例。横浜衛研年報、45, 69-73(2006)
- 9) 諸角聖：市販食品のカビ汚染とその防止対策。日食微誌、25(2), 56-63(2008)
- 10) 諸角聖、藤川浩、和宇慶朝昭、千葉隆司：食品のカビ汚染と防止対策。東京健康安研セ年報、55, 13-22(2004)
- 11) 宇田川俊一：食品のカビ汚染と危害、p.55-41,155-159、幸書房、東京(2004)