

梅果汁粉末添加による食品中の細菌増殖抑制効果の検証（1）

野村 卓正^{*}・月田 実里^{*}・中村 裕也^{*}・藤田 はるか^{*}

出口 桃子^{*}・千葉 歩美^{*,**}・谷 政八^{***}

仁愛大学人間生活学部健康栄養学科^{*}・大竹栄養専門学校^{**}・仁愛大学名誉教授^{***}

Inhibitory Effect of Plum Juice Powder on the Bacterial Growth in Food

Takamasa NOMURA^{*}, Misato TSUKITA^{*}, Yuya NAKAMURA^{*}, Haruka FUJITA^{*},
Momoko DEGUCHI^{*}, Ayumi CHIBA^{*,**} and Masahachi TANI^{***}

^{*}Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life, Jin-Ai University,

^{**}Ohtake Nutrition College, ^{***} Emeritus professor of Jin-Ai University

福井県産紅映梅果汁粉末を食中毒予防に応用するため、にぎりめし中の細菌の増殖抑制効果を検証した。炊飯後の白飯に、食塩、食酢、クエン酸粉末および梅果汁粉末を添加・混釈した後、指標菌として表皮ブドウ球菌を 10^4 個/g になるよう接種して、にぎりめしを調理した。にぎりめしは真夏日を想定して 30°C で、24 および 48 時間保存した後、一般生菌数検査により検出した。紅映梅果汁粉末を 3% 添加したにぎりめしでは、接種した表皮ブドウ球菌の増殖が強く抑制されたことから、食中毒起因菌の一つである黄色ブドウ球菌の増殖ならびに毒素産生を抑制し、食中毒予防を期しうることが示唆された。さらに、不衛生な手で調理して 6 時間常温放置したにぎりめし中の細菌増殖も、梅果汁 3% 添加によって大幅に抑制された。これらの結果から、梅果汁粉末には、食品中の食中毒起因細菌の増殖を抑制する効果が認められ、手洗いや冷蔵保存等の衛生管理が難しい避難所などにおいて、手指等から持ち込まれる黄色ブドウ球菌に起因する食中毒事故を予防するための衛生効果を備えた備蓄食材として有効に利用できる可能性が示唆された。

キーワード：ブドウ球菌，食中毒予防，梅果汁粉末

1. はじめに

1.1. 黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、フィルミクテス門 (Firmicutes) バシラス綱 (Bacilli), バシラス目 (Bacillales) ブドウ球菌科 (Staphylococcaceae) ブドウ球菌属に属する通性嫌気性のグラム陽性菌であり、房状に連なった菌塊を成形して発育する^{1) 2)}。ブドウ球菌属に属する細菌は耐塩性を有しており、塩分濃度が 5% 以上でも増殖が可能である。pH に関しては、pH6 ～ 9 が至適 pH であり、他の菌や微生物と同

じような特徴を持つ。通常、健康なヒトの鼻腔、皮膚、糞便や動物、環境から検出される²⁻⁵⁾。

本菌は、ブドウ球菌属の中で最も病原性が高く、化膿性疾患や食中毒を引き起こす。多様な病態の一つに、本菌が産生する外毒素（エンテロトキシン）による食中毒がある。食中毒の主な原因食品としては、おにぎりやサンドイッチ、お弁当など様々な食品が報告されており、原因食品の汚染経路として、特に手や指に傷や湿疹、傷口が化膿している調理者からの二次汚染事例が多くみられる⁸⁻²⁰⁾。

黄色ブドウ球菌は、食品中で増殖しながらエンテロトキシンという腸管毒素（嘔吐毒）を産生する。菌量が約 10^{5-6} 個/g 以上になると食中毒を発生するのに十分な量のエンテロトキシンが蓄積するといわれており^{2) 6) 7)}、そのエンテロトキシンが蓄積された食品を摂取することで食中毒を引き起こす典型的な食品内毒素型の食中毒菌である。

本菌による食中毒は、喫食後、約数時間で発症し、症状として、嘔吐、腹痛、下痢などがある。また、黄色ブドウ球菌自体は易熱性で、75℃、1 分間の加熱で死滅するが、産生される毒素エンテロトキシンは耐熱性で、120℃、20 分間の加熱でも不活化されないため、食品内で一度生産されてしまうと、再加熱によって食中毒を防ぐことは難しい^{2) 7) 21)}。したがって、黄色ブドウ球菌による食中毒を予防するためには、菌を食品につけないようにするか、食品中の菌の増殖を抑制するしかない。

1.2. 黄色ブドウ球菌による食中毒の発生傾向と代表的な事例

黄色ブドウ球菌による食中毒の代表的な事例を表 1 に示す^{8-20) 22) 23)}。代表的な事例として、2000 年に大阪で、黄色ブドウ球菌が産生したエンテロトキシンに汚染された「雪印低脂肪乳」を原因とする大規模な食中毒事件がある。旧雪印乳業（現メグミルク）大阪工場で製造された低脂肪乳を摂取した消費者たちが、嘔

吐や下痢の症状を訴えた。患者総数は 14,000 人を超え、第二次世界大戦後、最大規模の食中毒事例となった。当初、工場の逆流防止弁の洗浄不足による汚染によるものとされていたが、北海道広尾郡大樹町にある同社大樹工場での原料乳汚染であることが判明した^{22) 23)}。

1985 年～1994 年のわが国におけるブドウ球菌食中毒事例の原因食品としては、穀類およびその加工品（にぎりめし、餅類、麺類、サンドイッチ等）による発生件数が最も多く、次いで複合調理品（弁当、複合惣菜）であった。その他、旅館やホテルで提供される多品目料理など御飯に関連したものが多い傾向があった。これらの食品は加熱調理後、調理従事者による成形、盛付、詰め合わせの工程を経ており、調理従事者の手指からの二次汚染が原因である可能性が高いと分析されている²⁾。1980 年代ごろまでは、現在のようない食品の衛生管理の方法論や法令が整備されておらず、また、現在のような冷凍・冷蔵機器が十分に普及していなかったことから食中毒細菌による汚染の頻度が高かった。

1990 年代以降、本菌による食中毒事故の発生件数は減少する傾向にある²⁾。しかし、近年、毎年のように災害が発生しており、2016 年 5 月に、熊本県の熊本地震後の避難所で配布されたにぎりめしを喫食した被災者たちが、嘔吐や下痢などを発症した。にぎりめしから黄色ブドウ球菌が検出され、集団食中毒と判明した。感染源や感染経路は明らかになっていないが、

表 1 黄色ブドウ球菌による主な集団食中毒事例

発生年月日	都道府県	原因施設	原因食品	喫食者数	患者数	死者数	文献
1981年 4月11日	北海道	事業場	おにぎり	674名	106名	0名	8
1982年 2月20日	岩手県	旅館	笹かまぼこ、野菜炒め等	334名	274名	0名	9
1983年 7月27日	山梨県	旅館	おにぎり	152名	78名	0名	10
1984年 4月 8日	大阪府	旅館	バイキング料理	2,003名	296名	0名	11
1985年 7月25日	大分県	旅館	おにぎり	145名	52名	0名	12
1985年11月17日	長野県	給食施設	ちらし飯弁当（錦糸卵）	145名	52名	0名	13
1986年 9月23日	山形県	販売所	おはぎ	203名	145名	0名	14
1989年 9月15日	静岡県	仕出し屋	折詰弁当	952名	311名	0名	15
1990年10月 4日	奈良県	仕出し屋	サンドイッチ弁当	826名	427名	0名	16
1992年10月 1日	奈良県	仕出し屋	仕出し弁当（ゆで卵）	687名	194名	0名	17
1992年10月10日	福島県	結婚式場	結婚披露宴の料理	不明	185名	0名	18
1997年11月13日	大阪府	病院	里芋の磯辺和え	385名	66名	0名	19
2000年 6月27日	大阪府	製造所	低脂肪乳・他	不明	14,780名	0名	23
2014年 7月20日	長野県	仕出し屋	弁当（鳥そぼろ）	2,518名	741名	0名	20
2016年 5月 6日	熊本県	飲食店	おにぎり	43名	34名	0名	24

熊本市では食中毒が起こった当日、午後1時過ぎに気温が25.5℃まで上がるなど、一部の地域で25℃以上の夏日を観測していた²⁴⁾。この熊本大震災時の避難所における食中毒事例のように、衛生管理が難しい災害避難の現場等においては、依然として本菌による食中毒発生のリスクが潜在していることは注意を喚起する必要がある^{24) 25)}。

1.3. 福井県産の紅映梅について

福井県では、「紅映（べにさし）」という品種の梅が特産品種として栽培されており、一般に福井梅というところの紅映梅のことを言う。紅映梅は、青梅の表皮が熟すに従って鮮やかな紅色に染まり、芳香を放つ。また、種が小さく、果肉が厚いという特徴があり、梅の可食部（果肉歩合）は、91.5～93%を占めている^{26) 27)}。

福井県産の紅映梅の成分を、和歌山県産の南高梅と比較すると、紅映梅の有機酸含量は4.6%前後とやや少なく、pH2.7程度のため、南高梅と比べ酸味が弱く食べやすい酸味を持っている。また、糖分も控えめで、うまみ成分である果肉中のショ糖や遊離アミノ酸含量が高く、カルシウム・マグネシウム・カリウム等のミネラル成分を多く含んでいるので、梅酒にするとこれらの成分が抽出され、味わい深い仕上がりになる²⁷⁾。さらに、紅映梅は果肉がやわらかく繊維が少ないため、梅干に加工するのに適した品種である。また、皮が薄いため、梅干しの加工において、シソの赤色素で綺麗に染まり、品質の良いものができる反面、皮が破れやすいデメリットもある。紅映梅が小さいぶん果肉が分厚く、また果汁が多く皮が薄いため、食感が良いのが特徴である。

平成28年度の梅の収穫量及び出荷量では、福井県は全国で第5位の出荷量を誇っており、紅映梅を原材料とした様々な商品もこれまでに開発されている。その1つとして、紅映梅の果汁を粉末状にした紅映梅果汁粉末が開発された²⁸⁾。この紅映梅果汁粉末の主成分は、微生物増殖抑制効果が比較的強い有機酸の一つであるクエン酸であるため、耐塩性を有する黄色ブドウ球菌に対しては、食塩（塩化ナトリウム）より強い抑制効果が期待できる。したがって、栄養成分や調味成分としてだけでなく、微生物増殖抑制効果を有する機能性食品素材としての応用も期待できる。

1.4. 本研究の目的

にぎりめしの調理においては、伝統的に味付けを兼ねて食塩を添加することで腐敗防止や食中毒予防を期してきた。しかし、上述したようにブドウ球菌属は耐塩性であり、食塩添加（塩蔵）による増殖抑制効果を期待しにくい。さらに近年の減塩志向により、他の食中毒細菌による食中毒のリスクも増加している。一方、食酢（酢酸）等の添加による酸性pH下における増殖抑制効果は、ブドウ球菌属においても期待できる。

そこで、本研究では、黄色ブドウ球菌による食中毒の潜在的リスクの高いにぎりめしにおいて、主成分がクエン酸である「紅映梅果汁粉末」による微生物抑制効果について検証した。

2. 材料と方法

2.1. 細菌培養用培地類および試薬類

- ・平板寒天培地：普通寒天培地、パールコア標準寒天培地あるいはパールコアマンニット食塩培地の粉末を三角フラスコに秤量し、蒸留水を加えて溶解した。オートクレーブにて高圧蒸気滅菌（121℃, 15分）後、無菌的に滅菌シャーレに分注し固化させた。卵黄加マンニット食塩培地は、生培地を用事購入して使用した。
- ・普通ブイヨン（液体培地）：普通ブイヨンを三角フラスコに秤量し、蒸留水を加えて溶解した。オートクレーブにて高圧蒸気滅菌（121℃, 15分）後、滅菌済試験管に無菌的に分注した。
- ・滅菌済PBS(-)：試薬瓶（500 mL）にPBSタブレット1つにつき100 mLの蒸留水を加えて、完全に溶けるまで攪拌した。溶解後、オートクレーブ（121℃, 15分）にて高圧蒸気滅菌した。
- ・滅菌済0.9%生理的食塩水：試薬瓶（500 mL）に塩化ナトリウム4.05 gを秤量し、蒸留水450 mLを加えて溶解後、オートクレーブにて高圧蒸気滅菌（121℃, 15分）した。

2.2. 食材

本研究では、白飯（400 g）、紅映梅果汁粉末（福井県産²⁸⁾）、天日塩（塩化ナトリウム99%以上）、穀物酢、クエン酸を用いた。

2.3. 予備試験

2.3.1. 被験菌および培養法

本研究では、被験菌として表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* ATCC1228 株を用いた。増菌培養には普通培地（液体および寒天培地）を用いて、35℃で24～48時間、好気培養した。

にぎりめしに接種するため前日に、普通平板寒天培地上の集落を白金耳で採取し、5 mLの普通培地（液体）に接種し、ボルテクスミキサーでよく攪拌した（推定菌密度＝ 10^{8-9} 個/mL）。この原液から50 μ L採取し、5 mLの普通培地に接種し100倍希釈した（推定菌密度＝ 10^{6-7} 個/mL）。この操作をもう一度繰り返して（10,000倍希釈、推定菌密度＝ 10^{4-5} 個/mL）、35℃で18～24時間、好氣的に静置培養した。この前培養液中の菌密度を計測したところ約 10^8 個/mLだった。前培養液を50 μ L採取し、5 mLの普通培地に接種し（100倍希釈、推定菌密度＝約 10^6 個/mL）、この希釈菌液を白飯100 g当たり1.0 mL接種した（推定菌密度＝ 10^6 個/100 g＝ 10^4 個/g）。

2.3.2. 接種菌量の検討

最初に、本試験で接種する菌量を決定するために、手を洗わない不衛生な状態でにぎりめしを調理した場合、どの程度の細菌が手指から食品に付着するのか検証した。接種菌量を決定するために、不衛生な手指で調理した場合に手指からにぎりめしに付着する菌量を以下の方法で調べた。被験者4名が、洗浄・消毒していない手指で、それぞれ2個ずつ合計8個のにぎりめし（約50 g/個）を調理した。それぞれのにぎりめしの外側から3ヶ所および内側から1ヶ所を無作為に2.0 gずつ秤量・採取し、滅菌バッグに移して、一般生菌数検査²⁷⁾ およびブドウ球菌検査²⁸⁾ の検体として供した。滅菌バッグに滅菌生理食塩水を18 mL加えて（10倍希釈）、破碎ローラーにて破碎したものを10倍希釈破碎原液とした。10倍希釈破碎原液0.1 mLを無菌的にピペッターで採取し、滅菌マイクロチューブ中の滅菌PBS(-) 0.9 mLに加え、ボルテクスミキサーで攪拌した（100倍希釈液）。同様の操作を行い、1,000倍、10,000倍、100,000倍および1,000,000倍の希釈系列を作成した。各希釈液を標

準寒天培地およびマンニット寒天培地にそれぞれ0.1 mLずつ滅菌コンラージ棒にて均一に塗抹接種した。孵卵器内で35℃、48時間培養後、形成した集落数を計測した。

2.3.3. 接種方法の検討

被験菌の白飯への接種方法を、以下の一般生菌数検査法で検討した。

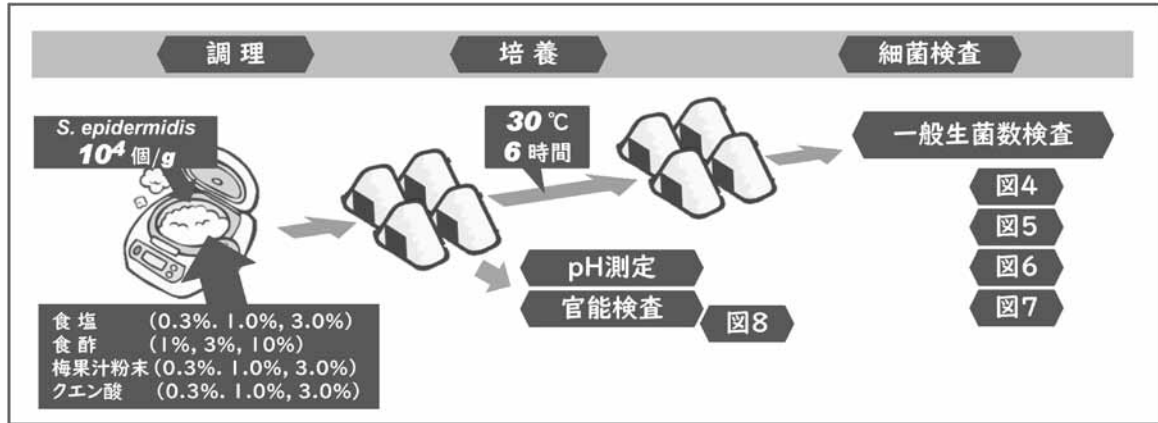
液体培地で培養した前培養液を50 μ L採取し、滅菌生理食塩水5.0 mLが入ったチューブに添加し、攪拌した（100倍希釈、約 10^6 個/mL）。

炊飯後の白飯200 gを滅菌済の金属製ボウルに入れ、中心温度を40℃前後まで冷却した後、前培養した表皮ブドウ球菌の希釈菌液（ 10^6 個/mL）を2.0 mL接種した（推定菌密度＝ 10^4 個/g）。滅菌済の金属製大型スプーンで混ぜ込むように攪拌した後、手指からの常在細菌の二次汚染を予防するためアルコール消毒したラップを用いて、無菌的に、にぎりめし（約50 g/個）を3個調理した。調理直後、各々のにぎりめしの外側4ヶ所から無作為に2.0 gを秤量・採取して、それぞれ滅菌バッグに移して、接種菌量の検討と同様に一般生菌数検査²⁹⁾ およびブドウ球菌検査³⁰⁾ を行った。

2.3.4. 保存温度の検討

にぎりめしの保存温度および保存時間を以下の方法で検討した。白飯200 gに塩化ナトリウムを2.0 g(1%)あるいは、梅果汁粉末を2.0 g(1%)をそれぞれ添加し、均一になるようによく混ぜた。液体培地で培養した前培養液を50 μ L採取し、滅菌生理食塩水5.0 mLが入ったチューブに添加し、攪拌した（100倍希釈、約 10^6 個/mL）。被験菌液2.0 mLを40℃以下に冷ました滅菌ボウル内の白飯200 gに接種し、菌液が均一に広がるようによく混ぜた（約 10^4 個/g）。被験菌を接種した白飯を50 gずつラップで秤量・採取し、計4個のにぎりめしを調理した。これらのにぎりめしを25℃あるいは30℃で0～6時間保存した。0および6時間後に、各にぎりめしから2.0 gずつ4ヶ所、無作為に秤量・採取して、それぞれ滅菌バッグに移して、接種菌量の検討と同様に一般生菌数検査²⁹⁾ を行った。

図1 本試験の実験工程図



2.4. 本試験

予備試験で検討した条件（接種菌量，接種方法および放置時間）で，本試験を行った（図1）．白飯 200 g に食塩（塩化ナトリウム），クエン酸あるいは紅映梅果汁粉末をそれぞれ 0 g (0%)，0.6 g (0.3%)，2.0 g (1%) および 6.0 g (3%)，食酢については 0%，1%，3%，10%（酢酸相当量 0%，0.04%，0.12%，0.4%）をそれぞれ添加し，均一になるようによく混ぜた．液体培地で培養した前培養液を 50 μ L 採取し，滅菌生理食塩水 5.0 mL が入ったチューブに添加し，攪拌した（100 倍希釈，約 10^6 個/mL）．被験菌液 2.0 mL を 40 $^{\circ}$ C 以下まで冷ました滅菌ボウル内の白飯 200 g に接種し，菌液が均一に広がるようによく混ぜた（約 10^4 個/g）．被験菌を接種した白飯を 50 g ずつラップで秤量・採取し，各群 4 個のにぎりめしを調理した．にぎりめしは，30 $^{\circ}$ C で 0～6 時間保存した．0 および 6 時間後に，各のにぎりめしから 2.0 g ずつ 4 か所，無作為に秤量・採取して，それぞれ滅菌バッグに移して，一般生菌数検査²⁹⁾を行った．

2.5. pH 測定

食塩，食酢，クエン酸あるいは梅果汁粉末を添加して調理したにぎりめしの pH を以下の方法で測定した．にぎりめしから 2.0 g を秤量・採取し，滅菌バッグに入れ破碎した．蒸留水を 18 mL 加え，よく混和した（10 倍希釈原液）．簡易型 pH 測定器を用いて，各破碎原液の pH を測定した．

2.6. 官能評価

以下の方法で官能評価を行った．被験者数は，それぞれ，主観的味覚の官能評価は 30 名，客観的評価は 10 名とした．

2.6.1. 主観的味覚

梅パウダー（0.3%，1.0%，3.0%），および食塩（1.0%），食酢（10%），クエン酸（3%）をそれぞれ添加したにぎりめしを試食し，酸味，塩味，甘味について，味の感じる強さを 5 段階（0：酸味／塩味／甘味をまったく感じない，1：酸味／塩味／甘味を少し感じる，2：酸味／塩味／甘味を感じる，3：酸味／塩味／甘味をかなり感じる，4：酸味／塩味／甘味を強く感じる）で評価した．

2.6.2. 客観的指標評価

にぎりめしに添加した食酢，クエン酸，梅果汁粉末の酸味の強さについては，食酢の希釈液（0%，2%，4%，6%，8%，10%）との比較で，食酢相当濃度として 6 段階（0～10%）で評価した．

2.7. 統計処理

2 群間の有意差を， t 検定を用いて検定した． $p=0.05$ 未満の場合，有意差ありとした．

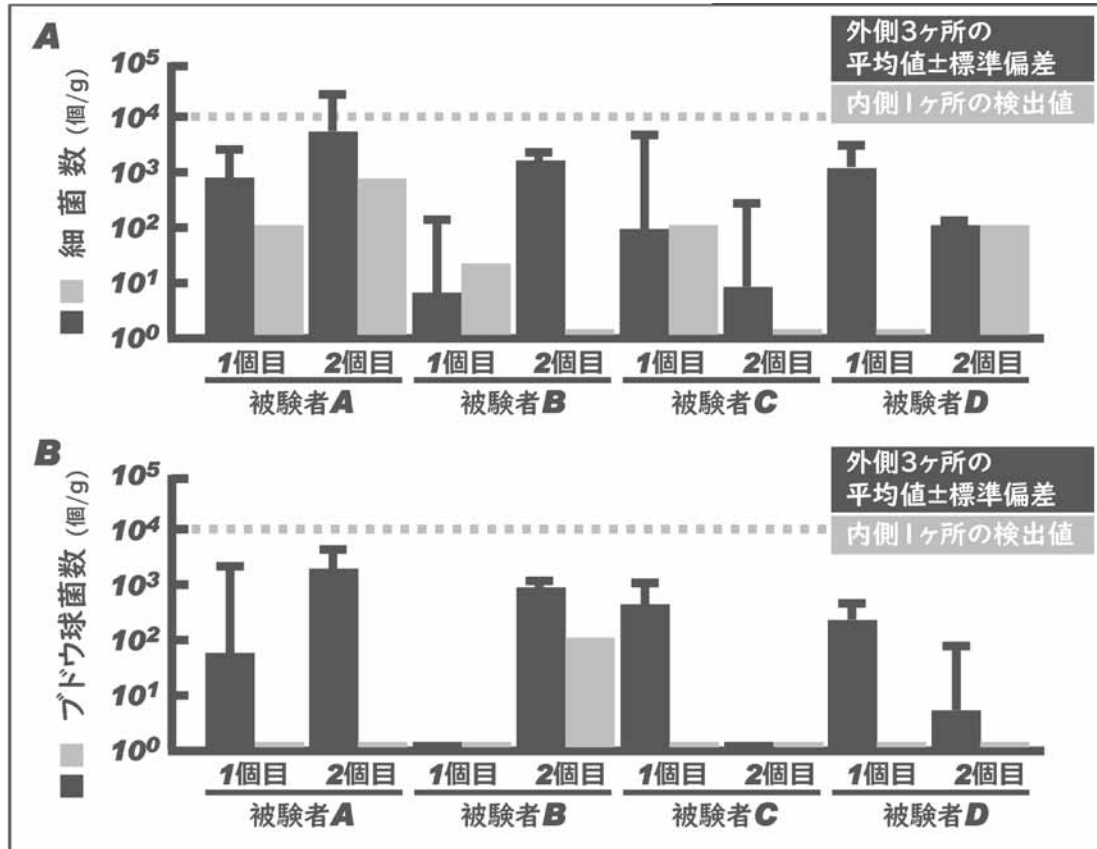
3. 結果と考察

3.1. 予備検討の結果および考察

3.1.1. 接種菌数の検討結果

最初に，本試験で接種する菌量を決定するために，

図2 予備試験の検査成績（不衛生な手指による調理）



手を洗わない不衛生な状態でにぎりめしを調理した場合、どの程度の細菌が手指から食品に付着するのか検証した（図2）。

その結果、4名の被験者間でばらつきはあるが、おおむね外側（3カ所の平均値）で約 $10^1 \sim 10^4$ 個/g、内側からは約 $10^0 \sim 10^3$ 個/gの細菌数が検出された（図2A）。ブドウ球菌も被験者間でばらつきが見られ、外側（3カ所の平均値）で約 $10^0 \sim 10^3$ 個/g 検出されたが、内側からは1人を除いて検出されなかった（図2B）。これらの結果から、最もリスクが高い状況を想定して、本試験で接種する被験菌量を 10^4 個/gと決定した。

細菌数に関しては、にぎりめしを調理する際、手指が触れる可能性がより高い外側（表面）の方が、より多くの細菌が付着することが明らかになったが、内側からも検出される検体も多く、内側がまったく汚染されていないわけではないことも明らかになった。一方、ブドウ球菌に関しては、内側から検出される検体は少なかった。これらの結果から、にぎりめしの調理においては、手指から持ち込まれる二次汚染はほぼ外

側の表面に付着することが明らかになった。したがって、内側から検出される好気性あるいは通性嫌気性の細菌は、調理時の二次汚染ではなく、原材料を一次汚染していて、炊飯時の加熱に抵抗性のある芽胞形成菌、つまりバシラス属のグラム陽性桿菌であると考えられた。バシラス属には、黄色ブドウ球菌と同じ食品内毒素型食中毒の原因菌であるセレウス菌が含まれる。セレウス菌による毒素型食中毒は、主に炒飯やパスタ等、穀類主体の食品を、加熱調理後、室温で長時間放置した後に発生しやすい。加熱調理時に生残した芽胞が、室温放置されている間に増殖し、毒素を産生するためである。したがって、にぎりめしの食中毒対策として黄色ブドウ球菌の二次汚染だけでなく、一次汚染しているセレウス菌に対する対策も必要と考えられる。

3.1.2. 接種方法の検討結果

接種菌数の検討結果より、手指由来でにぎりめしを汚染しているブドウ球菌の多くは、にぎりめしの外側表面に付着していることが明らかになった。しかし、

内部からも芽胞形成菌と考えられる細菌が検出されていることから、にぎりめしの内部に混ざり込んだ耐熱性の細菌の生育を抑制することも衛生上必要であると考えられた。そこで本研究では、被験菌の接種方法として、成形したにぎりめしの表面にだけ接種するのではなく、内部にも均一に接種する方法を検討した。

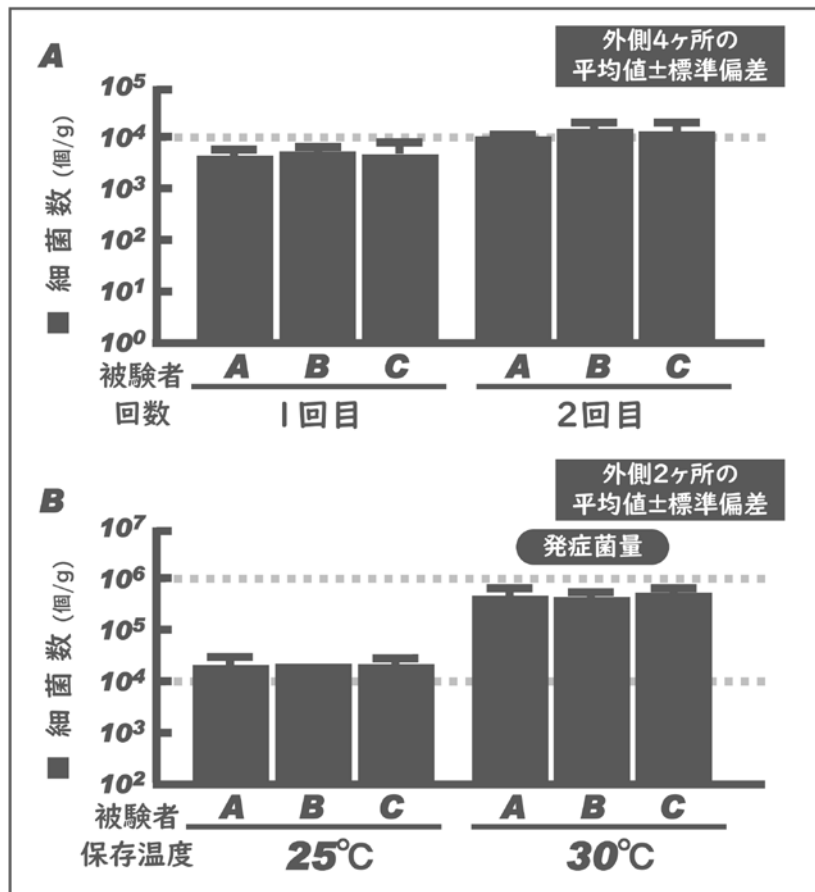
その結果、3個すべてのにぎりめしで約 10^4 個/g 前後の被験菌が検出された (図 3A)。4ヵ所の検体間でもばらつきは小さく、均一に接種されていることが明らかになった。さらに同様の予備試験を2回行ったが、ほぼ同様の検査成績であったため、本試験ではこの接種方法で被験菌を接種することとした。

なお、1回目の検出菌数が2回目の平均菌数より少なかったのは、1回目の接種時の白飯温度が高かった (50°C 以上) ため、接種した菌の一部が死滅してしまったからだと考えられる。そこで、2回目以降は、中心温度計を用いて中心温度を測定し、 40°C 以下になってから接種した (図 3A)。

3.1.3. 保存温度の検討

最後に調理済にぎりめしの保存温度を検討した。保存時の温度は、夏日 (25°C 以上)、および真夏日 (30°C 以上) を想定して、孵卵器の庫内温度をそれぞれ 25°C あるいは 30°C に設定した。夏季に朝6時に調理し、室温で保管され、昼12時に喫食される場合を想定し、6時間保存後、にぎりめしの外側表面2ヵ所から2.0 gを秤量・採取し、細菌数を定量した。その結果、 25°C で保存したところ、3個のにぎりめしの平均細菌数が 2.3×10^4 ($10^{4.6 \pm 0.1}$) 個/gと、6時間後でも接種菌量の 10^4 個/gからほとんど増殖していなかった (図 3B 左)。一方、 30°C で保存した場合は、約 4.4×10^5 ($10^{5.6 \pm 0.1}$) 個/gに達しており、6時間後では食中毒発症菌量である $10^{5.6}$ 個/gを上回る菌量が検出されている検体も見られた (図 3B 右)。これらの結果は、類似の先行研究の成績とほぼ同様な傾向であった³¹⁾。これらの結果から、被験菌の著明な増殖が認められ食中毒発生のリスクが高いと考えられる 30°C で、本試験を実施することとした (図 3B)。

図3 予備試験の検査成績 (A 接種条件 および B 保存温度の検討)



3.2. 本試験の細菌検査成績および考察

3.2.1. 食塩による細菌増殖抑制効果

食塩を添加することで水分活性を低下させ、微生物増殖を抑制する塩蔵法という食品保存法があるが、背景でも述べたようにブドウ球菌属は耐塩性を持つ菌であるため、可食範囲の食塩添加では増殖抑制を期待できない。

実際の検査成績においても、食塩の添加では、食塩濃度1%以下では発症菌量前後(平均細菌数 $10^{6.2}$ 個/g)まで増殖しており、増殖抑制効果は認められなかった(図4)。食塩濃度を可食不可能な3%まで増加させると平均 $10^{5.8}$ 個/gと発症菌量よりは低くなったが、無添加(0%)群(同 $10^{6.3}$ 個/g)と比べて有意差はなく、表

図4 食塩添加による細菌増殖抑制効果およびpH変動

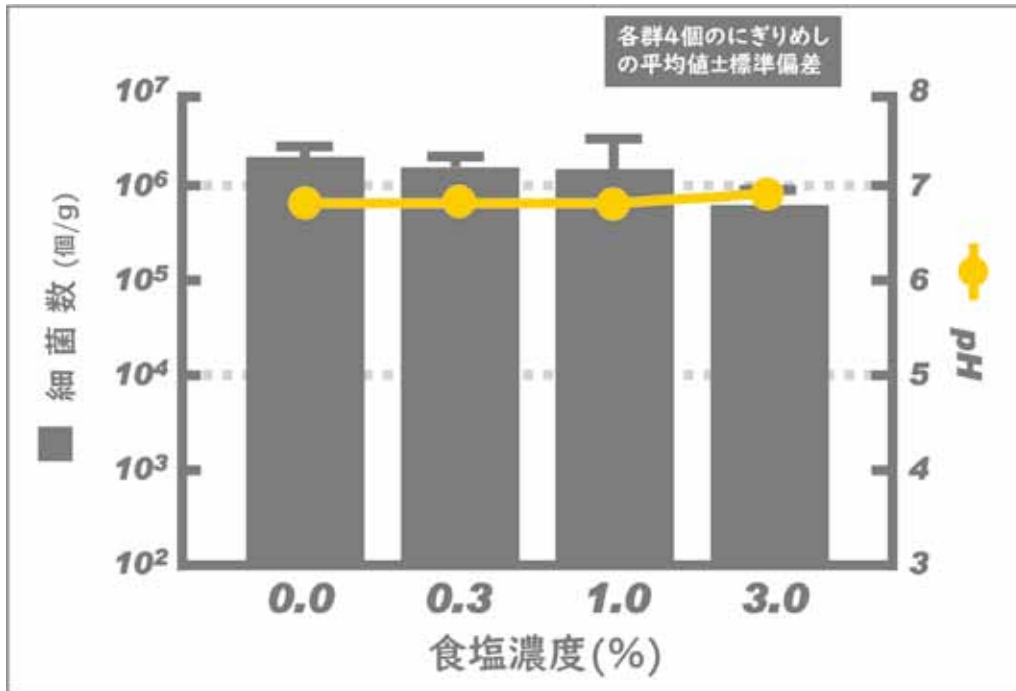
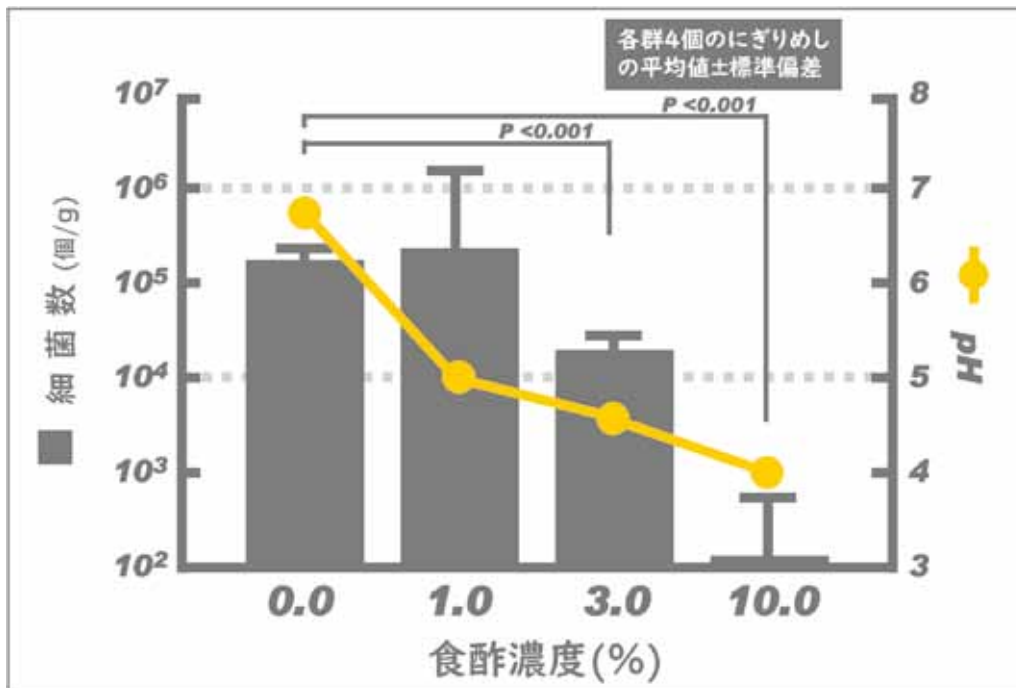


図5 食酢添加による細菌増殖抑制効果およびpH変動



皮ブドウ球菌の増殖を有意に抑制することはできなかった。いずれの濃度でも pH は 6.8 前後の中性 pH であった。

以上の結果から、「伝統的な食塩の添加では、耐塩性のブドウ球菌の増殖は抑制できず、衛生効果もほとんど期待できない」ことが実験的にも明らかにされた。したがって衛生対策の方針として、食塩以外の増殖抑制効果を有する副材料、調味料あるいは食品添加物を検討する必要があると考えられた。

3.2.2. 食酢による細菌増殖抑制効果

pH を低下させることで食品の長期保存を期待する方法として伝統的に用いられてきた方法が食酢による酢漬法である。白飯においては、鮎料理等で用いる酢飯があり、食酢を 10% で添加する調理法（白飯 100 g 当たり食酢 10 g 添加）が一般的である。

市販の食酢液（酢酸濃度 = 4.2%）を添加したにぎりめしでは、食酢 1% 添加群（酢酸濃度 = 0.04%）では、pH 5.0 まで低下していたが、6 時間後の平均細菌数 ($10^{5.3}$ 個/g) は無添加 (0%) 群 ($10^{5.2}$ 個/g) と変わらず増殖抑制効果はまったく認められなかった。食酢 3% 添加群（酢酸濃度 = 0.126%）で pH 5.0 以下となり、細菌数も平均 $10^{4.3}$ 個/g と細菌増殖抑制効果がみられた。

食酢 10% 添加群（酢酸濃度 = 0.42%）では pH 4.0 を下回り、6 時間後の細菌数は平均 $10^{0.4}$ 個/g と接種菌量を大きく下回り強い殺菌作用まで認められた（図 5）。

一般家庭にある食酢（穀物酢）の添加による効果では、一般的な酢飯と同程度の酢酸濃度である 10% 濃度で表皮ブドウ球菌に対する殺菌効果があることが明らかになった。

3.2.3. 紅映梅果汁粉末による細菌増殖抑制効果

梅果汁粉末 0.3% 添加群（平均 $10^{5.7}$ 個/g）では、無添加 (0%) 群（平均 $10^{5.6}$ 個/g）と変わらず細菌増殖抑制効果は認められなかった。梅果汁粉末 1% 添加群では pH 6.0 以下を示し、細菌数も平均 $10^{4.9}$ 個/g と弱い増殖抑制効果がみられた。梅果汁粉末 3% 添加群では pH 4.0 を下回り、細菌数も平均 $10^{2.9}$ 個/g と接種菌量を下回り、増殖抑制効果に加えて、弱いながらも殺菌作用まで認められた。また、梅果汁の濃度依存的に pH も低下していた（図 6）。

3.2.4. クエン酸による細菌増殖抑制効果

梅果汁粉末には主成分としてクエン酸が 100 g あたり 4.1 g 含まれており、強い酸味を呈する。梅パウダー

図 6 梅果汁粉末添加による細菌増殖抑制効果および pH 変動

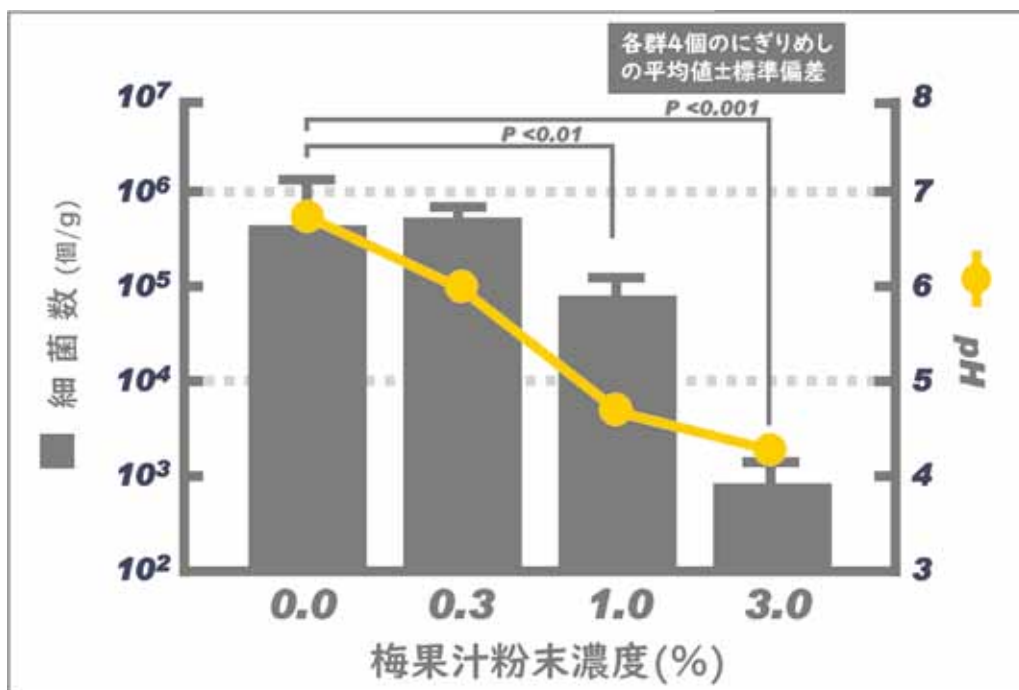
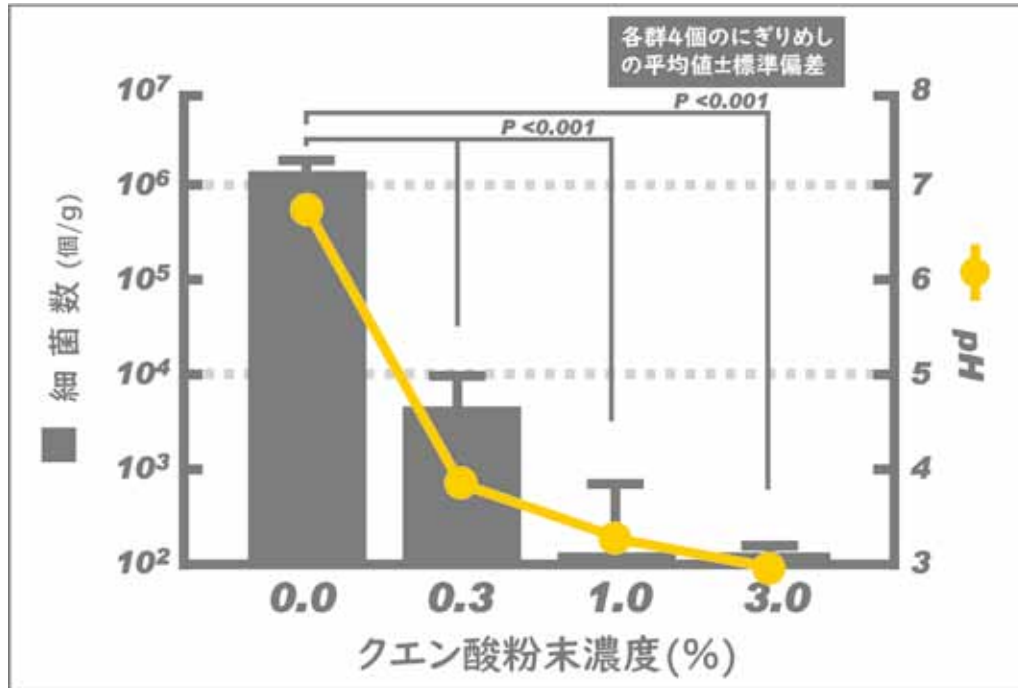


図7 クエン酸添加による細菌増殖抑制効果および pH 変動



の主成分であるクエン酸を添加した場合、0.3% 以上添加すれば pH5.0 を下回り、0.3% 添加群でも強い増殖抑制効果が認められた（平均細菌数 $10^{3.6}$ 個/g）。さらに 1% および 3% 添加群ではより強い殺菌作用（平均細菌数 $=10^{0.3}$ 個/g および $10^{0.0}$ 個/g）が認められた（図7）。

1% 前後に調製したクエン酸液の pH は 2 ～ 3 であり強い酸性を示す。食塩を添加したにぎりめしでは pH6.8 とほぼ中性であるのに対し、クエン酸を添加したにぎりめしは、0.3% 添加でも pH3.8 まで低下しているため、クエン酸が食品の pH に与える影響は大きいものと考えられる。梅果汁粉末にはクエン酸が 100 g あたり 4.1 g 含まれており、実験ではクエン酸添加と同じ傾向を示した。

3.3. 官能評価の成績

梅果汁粉末を添加することで細菌増殖抑制効果がみられたとしても、梅の風味が強すぎてにぎりめし自体の味を変えてしまい食用に耐えられなくなってしまっは本末転倒である。そこで、細菌検査において増殖抑制効果が認められた濃度において、どの程度、にぎりめしの風味が変化しているのか、食用として耐える風味であるのか官能評価により確認した。

3.3.1. 主観的味覚

0.3, 1, 3% 濃度の梅果汁粉末、10% 濃度食酢、3% 濃度クエン酸、1% 濃度食塩のにぎりめしを作成し、無添加にぎりめしの食味と比較した（検査成績の図表なし）。

○酸味：

無添加にぎりめしの酸味度を 0 とし、比較指標とした。梅果汁粉末 0.3%, 1%, 3% 添加群の酸味度はそれぞれ平均 0.4, 0.8, 1.5 と、添加量に依って高くなった。10% 食酢添加群の酸味度は平均 2.7, 3% クエン酸添加群の酸味度は平均 3.8 と、いずれも梅果汁粉末 3% 添加群を大きく上回った。一方、1% 食塩添加群の酸味度は平均 0 で、無添加と同様、酸味を感じなかった。これらの結果より、梅果汁粉末を添加しても、10% 食酢添加群、すなわち酢飯の酸味度よりも低く、少なくとも可食不適なほど強い酸味を呈するわけではないことが明らかになった。

○塩味：

無添加にぎりめしの塩味度を 0 とし、比較指標とした。梅果汁粉末 0.3%, 1% および 3% 添加群の塩味度はすべて平均 0 であった。食酢 10% 添加群およびクエン酸

0, 3% 添加群の塩味度も平均 0 であった。一方、食塩を 1% 添加したにぎりめしの塩味度は 2.3 であった。これらの結果より、食塩を添加したにぎりめし以外ではすべて、無添加のものと比較して塩味が感じられなかった。

○甘味：

無添加にぎりめしの甘味度を 0 とし、比較指標とした。梅果汁粉末 0.3%, 1%, 3% 添加群の甘味度はそれぞれ平均 1.3, 1.0, 0.8 と添加量を増やすと甘味度が低下する傾向が認められた。10% 食酢添加群の甘味度は平均 0.5, 3% クエン酸添加群の甘味度は平均 0.2, 1% 食塩添加群の甘味度は平均 0.7 あった。この結果より、梅果汁粉末を添加したにぎりめしでは、他のにぎりめしよりも若干、甘味度が強くなることが明らかになった。

3.3.2. 客観的指標検査

○食酢濃度相当：

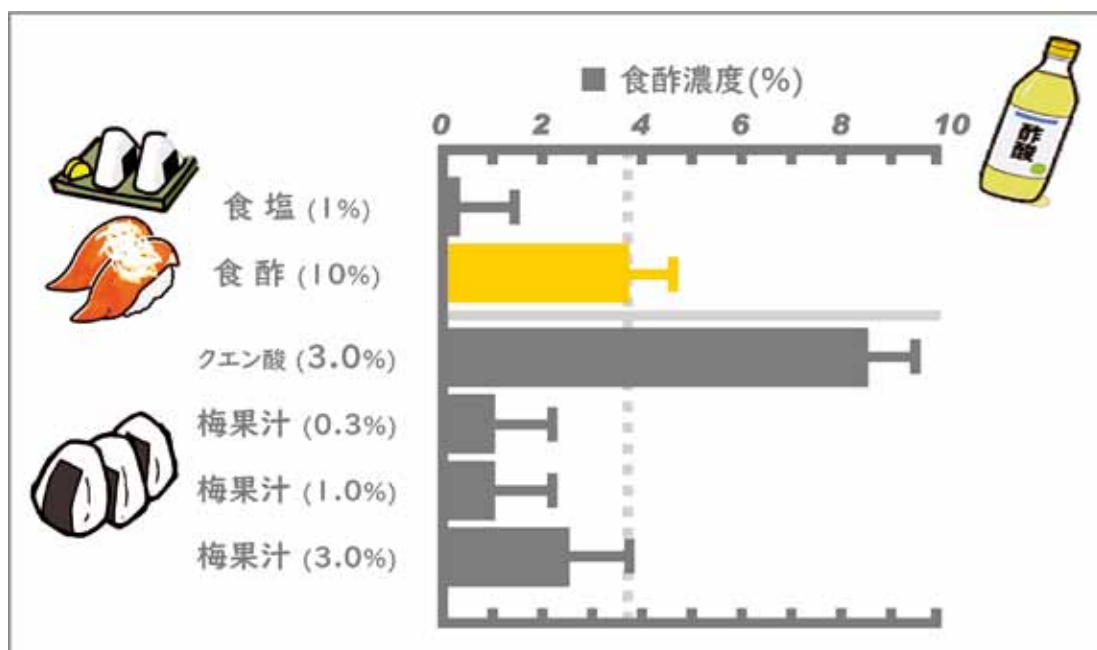
2, 4, 6, 8, 10% 濃度の食酢液を調製し、酸味度の比較指標とした。食酢液を酸味指標としたときの、各にぎりめしの酸味の検査成績を図 8 にしめす。食塩を 1% 添加したにぎりめしの酸味度は、食酢濃度 0 ~ 1% と同程度であった。食酢を 10% 添加したにぎりめし（酢飯）の酸味度は、食酢濃度 3 ~ 4% に相当

した。一方、クエン酸を 3% 添加したにぎりめしでは、食酢濃度 8.5% 相当のかなり強い酸味を呈したことから、クエン酸は食酢より低濃度で酸味を強く呈することがわかった。梅果汁粉末をそれぞれ 0.3%, 1.0%, 3.0% 添加したにぎりめしの酸味度は、それぞれ食酢濃度 1%, 1%, 2% 相当であり、通常のレシピで作成する 10% 食酢を添加した酢飯よりも低い酸味度であり、食用に適さない酸味度ではないことがわかった。

○クエン酸濃度相当：

1%, 2%, 3% 濃度のクエン酸液を調製し、酸味度の比較指標として比較した（検査成績の図表なし）。食塩を 1% 添加したにぎりめしの酸味度は、クエン酸濃度 0% と同程度であった。食酢を 10% 添加したにぎりめし（酢飯）の酸味度は、クエン酸濃度 1% に相当した。一方、クエン酸を 3% 添加したにぎりめしでは、クエン酸濃度 1 ~ 2% 相当であったことから、にぎりめしに添加されたクエン酸は、同濃度の水溶液より薄く感じられるということが分かった。梅果汁粉末をそれぞれ 0.3%, 1.0%, 3.0% 添加したにぎりめしの酸味度は、それぞれクエン酸濃度 0%, 0%, 1% 相当であり、通常のレシピで作成する 10% の食酢を添加した酢飯と同程度以下の酸味度であり、食用に適さない酸味度ではないことがわかった。

図 8 官能検査：酸味の検査成績（食酢相当濃度）



3.4. 全体の考察

微生物増殖抑制効果が食酢、梅果汁粉末、クエン酸で認められたが、その中に1g当たり 10^4 個/gを下回ったものがあり、調理時に接種した表皮ブドウ球菌は 10^4 個/gであるため、6時間保存後の菌数が 10^4 個/gを下回ったものについては、殺菌作用があったと考えられる。主に、食酢10%、梅果汁粉末3%、クエン酸粉末1%および3%で殺菌効果が観察された。通常、有機酸は、水分中では解離して水素イオンを生じる。これらのイオンは細菌の脂質二重層を通過することができない。一方、解離していない有機酸は脂質二重層を通り細菌の細胞内に侵入することが可能となる。細菌の細胞内で有機酸は解離し、細胞内で水素イオンを発生させ、細胞内で水素イオンが増えると、細胞内のpHが低下する。この作用が微生物増殖抑制効果の大きな部分を占めると考えられている³²⁾。有機酸の解離は、有機酸の種類、pHなどにより影響される。実際に、クエン酸を添加したものは、添加した直後（6時間保存前）にすでに殺菌的に作用していた。高濃度の有機酸を添加したことにより、殺菌されたと考えられる。黄色ブドウ球菌は、喫食時間の遅延や保存時の温度上昇によって増殖し、エンテロトキシンをより多く産生しやすくなる。黄色ブドウ球菌が米飯中で 10^{5-6} 個/g程度まで増殖すると、食中毒を発症するのに十分なエンテロトキシンが蓄積されると見積もられている。無添加群では、発症菌量の 10^{5-6} 個/g近くまで増殖し、検体によっては 10^6 個/gを上回るものもあった。梅果汁粉末（1%および3%）やクエン酸（0.3～3%）、食酢（3%および10%）では接種菌量である 10^4 個/gからほとんど増殖せず、あるいは減少しており、いずれにしても発症菌量の 10^{5-6} 個/g以下に増殖が抑制されていたため、食中毒予防効果があると結論することができる。一方、食塩や梅果汁粉末（1%未満）添加群では、 10^6 個/gを上回っているか、届いていなくても誤差範囲内であるため、食中毒予防効果はないと結論して差しつかえないであろう。

本研究の課題の一つとして、増殖抑制効果が観察されたクエン酸、梅果汁粉末を添加することで、にぎりめし自体の食味を変えてしまうことが挙げられる。そこで、官能検査を実施したところ、クエン酸を添加し

たにぎりめしでは酸味を強く感じたモニターが多かった。にぎりめしに本菌の増殖抑制を目的としてクエン酸を添加することは、食べる上で現実的ではないと考えられた。一方、梅果汁粉末添加では、「酸味をあまり感じない」「普通」と感じた被験者が多かった。梅果汁粉末にはクエン酸のほかに糖類、遊離アミノ酸（うま味成分）、ミネラル類を含んでいる。それに加え、クエン酸粉末よりクエン酸含有量が少ないこともあり酸味を強く感じなかったのであろう。

にぎりめしの甘味に関して、酸味を強く感じるほど、甘味を感じなくなる結果となった。梅果汁粉末で顕著な増殖抑制効果を認めた濃度は3%であるが、同じように増殖抑制効果を認めた食酢（10%）、クエン酸（3%）より酸味が弱く、若干の甘味も感じる結果であった。

以上の結果から、結論として、他の保存料と比較しても、梅果汁粉末が優れていると結論した。

謝 辞

本研究を計画・実施するにあたり、小林恭一教授（仁愛女子短期大学・食物栄養専攻）、村中隆司博士（カワイマテリアル株式会社）に、多大な助言・御指導をいただいた。

利益相反

本研究は、本研究に供与していただいた梅果汁粉末を製造・販売しているカワイマテリアル株式会社との産学共同研究として実施した。

また、本研究の成果については、カワイマテリアル株式会社より「Safety Ballの素」の商標で製品化されており、同時に特許庁に特許出願中（出願番号：特願2018-186660、発明の名称：炊飯用粉末調味料及びそれを用いた炊飯方法）である。

参考文献

- 1) 吉田真一、柳雄介編（2002年）ブドウ球菌属『戸田新細菌学 改訂32版』南山堂、471-479.
- 2) 社団法人畜産技術協会（2009年）度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書」10.黄色ブドウ球菌

- https://www.fsc.go.jp/sonota/hazard/H21_10.pdf (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 3) 高麗寛紀 (2013年)『図解入門よくわかる微生物学の基本としくみ』秀和システム, 67-68.
- 4) 小久保彌太郎 (2005年)『現場で役立つ 食品微生物 Q&A』中央法規出版 51
- 5) 株式会社くらし科学研究所 食の安全なるほどレポート「黄色ブドウ球菌は傷口以外にも存在!」
<http://www.kurashikagaku.co.jp/report/index34.html> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 6) 内閣府食品安全委員会 (2011年) ファクトシート: ブドウ球菌食中毒
<https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/09staphylococcal.pdf> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 7) 農林水産省 (2016年) 食品安全に関するリスクプロファイルシート (細菌: 黄色ブドウ球菌)
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/161014_sa.pdf (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 8) 長尾章 (1982年) 黄色ブドウ球菌による食中毒. 食品衛生学雑誌 23:500-501.
- 9) 菅原 恒有, 石井 温義 (1983年) 新鉛温泉で起きた黄色ブドウ球菌による集団食中毒. 食品衛生学雑誌 24:504-505.
- 10) 金子通治, 金丸佳郎, 春日徳彦, 村田和禧, 岡田博志, 石川武臣, 清水利英来住 輝彦 (1984年) おにぎりによるブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 25:450-451.
- 11) 緒方喜久代, 帆足 喜久雄, 林 薫, 川野 重人 (1985年) ホテルのバイキング料理によるブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 26:533.
- 12) 村松絃一 (1986年) キャンプのおにぎりによる黄色ブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 27:594-595.
- 13) 朝倉政弘 (1986年) 文化祭の弁当による黄色ブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 27:602-60.
- 14) 齋藤博 (1987年) おはぎによる黄色ブドウ球菌食中毒 28:411-412.
- 15) 鈴木清 (1990年) 敬老会の折詰弁当によるブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 31:432-435.
- 16) 鈴木清 (1991年) サンドイッチによる黄色ブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 32: 468-470.
- 17) 鈴木清 (1993年) 仕出し弁当による黄色ブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 34:453-455.
- 18) 五十嵐敬司 (1993年) 結婚式場の料理による黄色ブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 34:457-458.
- 19) 小笠原成忠 (1998年) 病院給食による黄色ブドウ球菌食中毒. 食品衛生学雑誌 39:397-398.
- 20) 飲食産業新聞 (2014年) 上田市の仕出し弁当屋の黄色ブドウ球菌による食中毒
<http://www.i-news.co.jp/i-info//2014/ireport/2014-07/140724.html> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 21) 株式会社くらし科学研究所 食の安心なるほどレポート「黄色ブドウ球菌の加熱殺菌は何度, 何分が必要か?」
<http://www.kurashikagaku.co.jp/report/index12.html> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 22) 厚生労働省 (2000年) 雪印乳業食中毒事件の原因究明調査結果について
<https://www.mhlw.go.jp/topics/0012/tp1220-2.html> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 23) 雪印食中毒事件に係る厚生省大阪市原因究明合同専門家会議 (2001年) 雪印乳業食中毒事件の原因究明調査結果について (最終報告) 低脂肪乳等による黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA型食中毒の原因について 食品衛生研究 51:17-91, 2001-02.
- 24) 国立保健医療科学院 (2017年) No.17020 避難所におけるおにぎりが原因となった黄色ブドウ球菌食中毒事例
<https://www.niph.go.jp/h-crisis/archives/103459/> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 25) 株式会社 電通東日本 (2017年) 避難所生活等における食中毒等防止対策に関する調査報告書
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/hyouka/houkoku/files/report24.pdf> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 26) 福井県生産振興課 福井梅
https://www.pref.fukui.lg.jp/doc/nourinbu/majoritem/majoritem_d/fil/fukuiume.pdf (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 27) エコファームみかた 紅映梅について
<https://benichu.net/?mode=f9> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 28) 株式会社カワイマテリアル 若狭の梅 紅映梅果汁パウダー
<https://kawai-m.com/nutrition/> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 29) 厚生労働省監修 (2004年) 汚染指標菌: 細菌数『食品衛生検査指針: 微生物篇』社団法人日本食品衛生協会, 116-123.
- 30) 厚生労働省監修 (2004年) 黄色ブドウ球菌『食品衛生検査指針: 微生物篇』社団法人日本食品衛生協会, 236-248.
- 31) 株式会社くらし科学研究所 食の安全なるほどレポート「「おにぎり」についての黄色ブドウ球菌による食中毒リスクの調査」
<http://www.kurashikagaku.co.jp/report/index10.html> (最新閲覧日: 2021年11月23日)
- 32) 藤井建夫 (2001年)『食品微生物Ⅱ—制御編 食品の保全と微生物』辛書房, 94

