

表 12 O26、O157 が分離された牛および分離菌の概要

牛 No.	生産者	品種	性別	月齢	由来	血清型	Stx型	eae	PFGE 型	薬剤感受性
1	G	ホルスタイン	牝	31	唾液	O157:H7	Stx2	+	H	SM,TC
2	A	黒毛和種	牝	30	唾液	O157:H7	Stx2	+	I	(ABPC,SM)
3	B	交雑種(F1)	去勢	24	糞便	O26:H-	Stx1	+	O26L	(ABPC,SM)
					糞便	O157:H7	Stx2	+	J	(ABPC,SM)
4	H	ジャージー	牝	36	糞便	O26:H1	Stx1	+	O26M	ABPC,SM,KM
5	I	黒毛和種	牝	36	糞便	O157:H7	Stx2	+	K-1	SM(ABPC)
6	I	黒毛和種	牝	36	糞便	O157:H7	Stx2	+	K-1	SM (ABPC,KM)
7	J	ホルスタイン	牝	33	糞便	O157:H7	Stx2	+	L	(ABPC,SM,KM)
8	G	交雑種(F1)	牝	25	糞便	O157:H7	Stx2	+	K-2	(SM,KM,NA)
9	K	交雑種(F1)	牝	25	糞便	O157:H7	Stx2	+	M	(ABPC,SM,KM)
10	L	交雑種(F1)	牝	23	糞便	O157:H7	Stx1+Stx2	+	N	(SM)
11	E	ホルスタイン	牝	19	糞便	O157:HNT	Stx1+Stx2	NT	NT	NT
12	E	ホルスタイン	去勢	18	糞便	O157:H7	Stx1+Stx2	+	O	SM,TC(ABPC)
13	A	黒毛和種	牝	29	糞便	O157:H7	Stx2	+	P	(ABPC,SM)
14	M	交雑種(F1)	牝	28	糞便	O157:H7	Stx2	+	Q-1	(ABPC,SM)
15	G	交雑種(F1)	牝	25	外皮	O157:HNT	Stx1+Stx2	NT	NT	NT
16	N	交雑種(F1)	去勢	23	糞便	O157:HNT	Stx1+Stx2	NT	NT	NT
					外皮	O157:HNT	Stx1+Stx2	NT	NT	NT
17	L	交雑種(F1)	牝	27	糞便	O157:H7	Stx2	+	Q-2	(ABPC,SM,KM)

NT:未検査

薬剤感受性：(中間型)を示す。

牛の腸管出血性大腸菌O157、O26保菌状況と枝肉汚染状況に関する調査

新潟県長岡食肉衛生検査センター

牛の直腸内容物、唾液、枝肉、臀部外皮および一部剥皮後の臀部から、腸管出血性大腸菌O157、O26の分離を行った。O157は直腸内容物の6/100件から、枝肉の4/58件から分離された。O26は唾液の1/58から分離され、牛の処理において、O157はより重要な食中毒菌と考えられた。O157が検出された枝肉は、すべて非保菌牛由来のものであり、保菌牛からの間接的な汚染と考えられた。また、定量を行った直腸内容物のO157菌数は、50以下/gであった。

1 目的

と畜場における高度衛生管理の確立のための病原体汚染実態調査として、牛の直腸内容物、唾液、枝肉の汚染実態を腸管出血性大腸菌O157、O26に関して調べ、と畜場におけるHACCP導入を想定した危害分析と現状把握を行った。

2 材料

と畜場に搬入された牛の直腸内容物100件、唾液58件、枝肉58件、臀部外皮33件、一部剥皮後臀部33件を材料とした。定性分離をすべての材料について行い、分離されたO157（直腸内容物由来5件、枝肉由来2件）について定量分離を行った。各材料の採取方法は次のとおり。生前に滅菌綿棒で口腔内を拭き取り唾液を採取し、と殺後に直腸漿膜面を切開し内容物を採取した。拭き取りは滅菌スポンジ（WHIRL-PAK）を用い、後述する増菌培地10mlを含ませ、洗浄後に臀部外皮を、一部剥皮後に臀部を100cm²拭き取り、枝肉は肛門周囲と胸部の各100cm²を拭き取り、材料とした。

3 方法

1) O157の定性分離

直腸内容物1gあるいは唾液1gと50mlのN-mECをサンプリングバッグに入れ、ストマッキングにより均質化した。また、拭き取り材料を入れたWHIRL-PAKには40mlのN-mECを加え、同様に均質化した。それぞれ42°Cで18~24時間、増菌培養後、培養液を免疫磁気ビーズ（ダイナビーズO157）で処理し、CT-SMACとクロモアガーO157に塗抹し、37°Cで18~24時間、分離培養した。疑わしいコロニーをCLIG培地でスクリーニング後、市販免疫血清および生化学的性状試験により同定した。

2) O157の定量分離

試料原液を3枚のCT-SMACにそれぞれ0.3ml、0.3ml、0.4mlをコラージ塗布し、35-37°C、18-24時間培養後、3枚の典型的なコロニー数を合計した。その後、各シャーレから典型的なコロニーを数個釣菌し、定性分離方法に準じて定性を行い、O157と確認された株数から菌数を算出した。

3) O26の定性分離

増菌手順はO157と同一とし、上記1)の培養液を、免疫磁気ビーズ(ダイナビーズO26)で処理後、CT-RMACに塗抹し、37°Cで18~24時間、分離培養した。疑わしいコロニーをTSI、LIM培地でスクリーニング後、市販免疫血清および生化学的性状試験により同定した。

4 成績

1) 分離率

O157は直腸内容物の6/100件(6%)、枝肉の4/58件(6.8%)から分離された。O26は唾液の1/58(1.7%)から分離され、臀部外皮、一部剥皮後臀部からはどちらも分離されなかった(表1)。

2) 直腸内容物のO157菌数

O157の定量分離を行った直腸内容物由来5件および枝肉由来2件はすべて定量限界以下であった。(直腸内容物 50/g 以下、枝肉 0.25/cm² 以下)

3) O157、O26の分離パターン

同一個体に関して直腸内容物、唾液および枝肉から分離を行ったのは58頭(33頭は臀部外皮、一部剥皮後臀部も併せて実施)で、うち11頭のいずれかの材料から菌が分離され、その分離パターンは次のとおりであった。O157が直腸内容物のみから分離されたものが6頭、枝肉のみから分離されたものが4頭(表2)、O26が唾液のみから分離されたものが1頭であった。なお、枝肉からO157が分離された4頭は、同一日に処理されたA農場2頭と、

表1 糞料の腸血性腸O157の分離

	検査数	分離料				
		直腸内容物	唾液	枝肉	肛周囲糞	一部剥皮後臀部
陽数	100	58	58	33	33	
陽数(%)	O57	6 (6.0)	0 (0)	4 (6.8)	0 (0)	0 (0)
	O26	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

別の同一日に処理されたB農場2頭に分かれた。これらから分離された株は農場毎にPFGEおよび薬剤感受性パターンが一致した。

5 考察

表2 腸血性腸O157の分離パターン

	分離料			頭数
	直腸内容物	唾液	枝肉	
	-	-	+	4
	+	-	-	6
合計				10

* 同個体の直腸内容物、唾液、枝肉の分離を行った頭数

1) 保菌と枝肉汚染

直腸内容物および唾液からO157、O26が分離されたが、これらの保菌率に差があり、O26よりもO157の保菌率が高いと考えられた。枝肉についても同様で、O157は分離されたが、O26は分離されなかった。枝肉にO26汚染がなかったのは、保菌牛が極めて少なく汚染源がなかったためと考えられた。牛ではO157の保菌率が高いと考えられることから、枝肉の汚染防止の観点からは、O157はリスクの高い食中毒菌と思われた。

2) 枝肉の汚染経路

O157汚染が分離された枝肉は4頭で、枝肉以外からは分離されなかった。これらは2頭づつ2ロットから分離され、分離株のPFGE型および薬剤感受性がロット毎で一致した。よって、これらは農場由来の保菌牛からの間接的な枝肉汚染と考えられ、O157を保菌する牛は、当該個体の枝肉に汚染をもたらす可能性が

あるのみでなく、他の枝肉に汚染を拡散させる場合もあると考えられた。枝肉のO157汚染が成立するためには、保菌牛の他に汚染経路が必要となる。

汚染経路には手指、器具、機材等が介在し、これらの組み合わせにより、いくつかの汚染経路が存在すると考えられた。当初は一部剥皮時の不適切な作業が枝肉汚染の大きな要因と考えたが、内臓摘出時に消化管を破損し、枝肉に消化管内容物の附着が認められたものが 19/102 頭あり、保菌牛からの直接的な汚染の可能性も考えられた。一方、直腸内容物から 10^5 が検出された6頭に枝肉汚染が無かったことから、作業工程における衛生管理が適切に行われていれば、保菌牛が搬入されても枝肉の汚染防止は十分可能であると思われた。枝肉の主な汚染源は消化管内容物および体表と考えられ、体表洗浄、食道結紮、手指、器具洗浄等の作業工程上の取り扱いが重要である。また、生産段階においても 10^5 保菌レベルの低減化や飼育環境の清浄化が必要と思われた。

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保研究事業)
分担研究報告書
宮崎県都城食肉衛生検査所

と畜場における高度衛生管理の確立のための
病原体汚染実態調査

A.研究目的

と畜場における衛生管理手法についてはすでに Hazard Analysis and Critical Control Point(以下 HACCP)の考え方に基づく手法が導入されているが、運用が完全でないため、食品由来細菌感染症が毎年多数報告されるなど、それらを未然に防ぐ衛生管理が不十分といわれている。また、衛生管理手法が不確実であることが「食品の安全に係るリスクコミュニケーション」(リスクの相互理解、情報共有)が促進されない要因ともなっている。

そこで高度な衛生管理手法の確立を目的として、平成 18 年 4 月から平成 18 年 9 月に宮崎県 M 食肉センターにおいてとちく処理された牛 60 頭の枝肉、口腔及び直腸内容物、さらに外皮、一部剥皮後と体における腸管出血性大腸菌(以下 EHEC)O157、O26 による汚染等実態調査を行った。

B.検査方法

1)菌の検出、同定

枝肉については胸部及び肛門周囲部を、滅菌スポンジ(Nasco WHIRL-PAK、EHEC 用には EC ブイオン(OXOID)10mL を予め添加)で各 10×10cm をふき取り、両者を併せて 1 検体とした。口腔については滅菌綿棒でふ

き取った唾液 1g を検体とし、直腸内容物は直腸を切開し無菌的に 1g を採取し検体とした。

EHEC については、各検体にノボビオシン加 mEC ブイオン(OXOID)を加えて最終培地量 50mL とし、60 秒のストマッカー処理後、42℃で 24 時間培養した。分離には DYNAL 社のビーズシステムを採用した。検出感度を高めるために免疫磁気ビーズ及び添加する培養液を 1.5 倍量とした(混合比率は添付マニュアルに同じ)。O157 分離にはセフェキシム、亜テルル酸カリウム(OXOID)加ソルビトールマッコンキー寒天培地(OXOID)培地及びクロモアガーO157 寒天培地(関東化学)を、O26 分離にはセフェキシム、亜テルル酸カリウム加ラムノースマッコンキー寒天培地を用いた。疑わしいコロニーを O 抗原免疫血清(デンカ生研)でスクリーニングし、生菌凝集が認められたものを CLIG(O157 のみ、KYOKUTO)、TSI(ニッスイ)及び LIM(ニッスイ)培地で培養後、生化学性状を決定した。

菌の同定には、ID テスト EB-20(ニッスイ)を用いた。

2)血清型別試験

免疫血清(デンカ生研)を用いて O 抗原及び H 抗原を決定した。

C.研究結果

1)菌の検出結果

EHEC O157 検査に供した 60 検体の枝肉、口腔及び直腸内容物、さらに外皮、一部剥皮後と体すべて陰性であった。

EHEC O26 検査に供した 60 検体の枝肉、口腔及び直腸内容物、さらに外皮、一部剥皮後と体すべて陰性であった。

D. 考察および結果

とちく処理された牛の EHEC O157、O26 による汚染等の状況はすべて陰性であった。

今後も、衛生管理を徹底するとともに、HACCP に基づき衛生管理水準を高めることが必要であると考えられる。

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

と畜場における高度衛生管理の確立のための病原体汚染実態調査

とちく処理された牛の直腸内容物、口腔内、外皮、一部剥皮後枝肉及び最終洗浄後枝肉について、病原性大腸菌 O157 及び O26 の汚染状況を調査した結果、23 農場中 9 農場から O157 及び O26 が検出された。O157 及び O26 の検出率はそれぞれ直腸内容物で 16.7%、3.3%、外皮で 5.0%、1.7%、一部剥皮後枝肉で 3.3%、0%であった。口腔内と最終洗浄後枝肉からは検出されなかった。調査した分離された O157(15 株)は全てベロ毒素遺伝子を保有していたが、O26(3 株)は 1 株のみの保有であった。同一個体の直腸内容物、外皮及び一部剥皮後枝肉で O157 が分離され、解体処理時の枝肉への二次汚染が示唆された。O157 の保菌状況を踏まえると、牛のと畜場における衛生管理では、直腸内容物等による汚染を防止することは重要である。

岩手大学
岩手県食肉衛生検査所
群馬県食肉衛生検査所
東京都芝浦食肉衛生検査所

新潟県長岡食肉衛生検査センター
静岡県東部食肉衛生検査所
静岡県西部食肉衛生検査所
宮崎県都城食肉衛生検査所

兵庫県食肉衛生検査センター
山形県衛生研究所
○鹿児島県末吉食肉衛生検査所

A. 研究目的

と畜場における微生物制御は、食肉由来食中毒を減らすための重要な最初のステップである。そのための衛生管理手法の1つとして Hazard Analysis and Critical Control Point(以下 HACCP)があり、その基本骨格については国際的に広く受け入れられている。しかし、と畜場におけるHACCPを具体的に検討している研究は少なく、またそのシステムを導入していると畜場は少数であるのが現状である。

そこでHACCPにおける危害分析のためのデータの確立を目的として、平成17年8月から9月に鹿児島県A食肉処理場でとちく処理された牛60頭の直腸内容物、口腔、外皮、一部剥皮後枝肉及び最終洗浄後枝肉における病原性大腸菌 O157(以下、O157)と O26(以下、O26)の保菌実態調査を行った。

B. 検査方法

1) 菌の検出、同定等

直腸内容物は直腸から無菌的に1gを採取し検体とし、口腔については滅菌綿棒でふき取った唾液1gを検体とした。外皮と枝肉は滅菌スポンジ(Nasco WHIRL-PAK、滅菌生理食塩水10mLを予め添加)を使用し10×10cmをふき取った。外皮と一部剥皮後枝肉については肛門周囲部を、最終洗浄後枝肉については胸部及び肛門周囲部をふき取り併せて、1検体とした。

各検体にノボバイオシン加 mEC ブイオン(極東)を加えて最終培地量50mLとし、60秒のストマッカー処理後、42°Cで24時間培養した。分離にはDYNAL社のビーズシステムを採用した。検出感度を高めるために免疫磁気ビーズ及び添加する培養液を1.5倍量とした(混合比率は添付マニュアルに同じ)。O157分離にはTC-SMAC寒天培地(デンカ生研)及びクロモアガーO157寒天培地(関東化学)を、O26分離にはTC-RMAC寒天培地(デンカ生研)を用いた。疑わしいコロニーをO抗原免疫血清(デンカ生研)でスクリーニングし、生菌凝集が認められたものをCLIG(O157のみ、極東)、TSI(O26のみ、栄研)及びLIM(栄研)培地で培養後、生化学性状を決定した。

菌の同定には、IDテストEB-20(ニッスイ)を用いた。

菌が検出された検体については菌数測定を行った。あらかじめ冷蔵保存していた培養前のECブイオンを用い、必要に応じて段階希釈して、0.3ml、0.3ml、0.4mlを3枚の選択培地上に培養し、典型的なコロニーをカウントした。カウントしたコロニーから無作為に5つを選び、免疫血清と生化学性状でO157及びO26と決定されたコロニー数を有効数字と計算し、菌数を算定した。

2) 血清型別試験

免疫血清(デンカ生研)を用いてO抗原及びH抗原を決定した。

3) ペロ毒素(VT)遺伝子の検出並びに毒素型別試験

TaKaRa One Shot PCR Kit (TaKaRa)を用いたPCR法により、VT遺伝子の検出を行った。

4)パルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)によるDNA解析及び各菌株間の比較

分離されたO157とO26について、PFGE法により得られたDNA切断パターンをもとに菌株間の関係を解析した。

C.研究結果

1)菌の検出結果

O157 陽性はそれぞれ60検体中、直腸内容物10検体(16.6%)、口腔0検体(0%)、外皮3検体(5.0%)、一部剥皮後枝肉2検体(3.3%)、最終洗浄後枝肉0検体(0.0%)であった。O26 陽性はそれぞれ60検体中、直腸内容物2検体(3.3%)、外皮1検体(1.7%)であり他の検体からは検出されなかった(表1)。

同一個体の直腸内容物、外皮及び一部剥皮後枝肉からO157が検出された例があった(表2:菌株No. 6~8)。また、同一個体の直腸内容物からO157と外皮からO26が同時に検出された例があった(菌株No. 2、16)。

農場別の保菌状況を見るとO157陽性となったのは全23農場中8農場(34.8%)、O26陽性となったのは2農場(8.7%)であった。1農場では7頭中4頭の牛の直腸内容物からO157が検出された。

菌数の測定が出来たものは直腸内容物O157の10検体中5検体と外皮O157の3検体中1検体であった。菌数はそれぞれ10000~50000cfu/gと24cfu/cm²の数値を示した(菌株No.2、4、6、7、9、15)。

2)血清型別試験結果

分離されたO157は15株中全てがH7で、O26は計3株中1株がH11、残り2株がH-であった(表-2)。

3)ベロ毒素(VT)遺伝子の検出並びに毒素型別試験

VT遺伝子型別では、O157は15株中11株がVT2、4株がVT1及びVT2産生遺伝子を、O26は1株がVT1産生遺伝子を有することが確認された(表-2)。

4)パルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)によるDNA解析及び各菌株間の比較

15株のO157は5グループに分類された。同一農場及び同一個体複数箇所(直腸内容物、外皮及び一部剥皮後枝肉)由来の7株は同じパターンを示した(表-2:菌株No.3~9)。一方で、異なる農場から検出された2株のパターンが一致した例が認められた(菌株No.1、2)。

3株のO26はそれぞれ異なるパターンを示した。

D.考察および結果

とちく処理された牛のO157とO26による汚染等の状況が明らかになった。

今回調査対象となった23農場中9農場からO157とO26が分離され、39.1%と高い検出率を示した。なかでも57.1%(7頭中4頭)の牛に保菌が認められる農場もあり、この農場については追跡調査及びそれを踏まえた現場サイドでの対策が必要であると考えられる。

同一個体の直腸内容物、外皮及び一部

剥皮後枝肉から 同じPFGEパターンを持つ O157 が検出された例があり、当該個体または先行処理された個体の直腸内容物による二次汚染を証明することとなった。

今回調査した結果、健康に重大な被害をもたらすと言われる腸管出血性大腸菌の牛からの検出率は全体で21.7%(60頭中13頭)と高率であることから、食肉への汚染が危惧される。牛のと畜場における衛生管理では、直腸内容物等による汚染を防止することは重要であり、HACCPプランを作成するにあたって、直腸内容物は重大な危害であると考えられる。

表-1 0-157及び0-26の検出状況 (検体数はそれぞれ60)

		直腸内容物	口腔内	外皮	一部剥皮後 枝肉	最終洗浄後 枝肉
0-157	検出数	10	0	3	2	0
	検出率	16.7%	0.0%	5.0%	3.3%	0.0%
0-26	検出数	2	0	1	0	0
	検出率	3.3%	0.0%	1.7%	0.0%	0.0%

表-2 検出された病原性大腸菌の詳細

0-157							
菌株 No.	農場	検体 No.	株の由来	菌数	H抗原	保有VT 遺伝子	PFGEパターン
1	A	1	外皮	ND	7	2	A-1
2	B	6	直腸内容物	22800	7	2	A-1
3		15	直腸内容物	ND	7	2	A-2
4	C	16	直腸内容物	10000	7	2	A-2
5		17	外皮	ND	7	2	A-2
6		直腸内容物	50000	7	2	A-2	
7		18	外皮	24	7	2	A-2
8		一部剥皮後枝肉	ND	7	2	A-2	
9	20	直腸内容物	15200	7	2	A-2	
10	D	31	直腸内容物	ND	7	1&2	B
11	E	32	直腸内容物	ND	7	2	C
12	F	34	直腸内容物	ND	7	2	A-3
13	G	38	直腸内容物	ND	7	1&2	D
14	H	44	一部剥皮後枝肉	ND	7	1&2	E
15		47	直腸内容物	10000	7	1&2	E
0-26							
菌株 No.	農場	検体 No.	株の由来	菌数	H抗原	保有VT 遺伝子	PFGEパターン
16	B	6	外皮	ND	11以外	1	N
17	I	53	直腸内容物	ND	運動-	-	O
18		55	直腸内容物	ND	運動-	-	P

菌数は cfu/g または cfu/cm²

II. 分担研究報告書

II-2. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究

II-2-1. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究

大場秀夫 ((社) 日本冷凍食品協会)

II-2-2. 冷凍食品の細菌汚染に関する研究

大場秀夫 ((社) 日本冷凍食品協会)

II-2-3. 食品冷凍保存における病原細菌の挙動

宮原美知子 (国立医薬品食品衛生研究所)

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進 研究事業）

分担研究者報告書

1. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究者 大場秀夫 社団法人日本冷凍食品協会

研究要旨

1. 冷凍食品の製造における高度衛生管理システムの構築に必要なデータを得るため、昨年度は JOISEasy による文献検索システムを活用して文献の収集を行い、その内容を文献カードとして整理、要約した。今年度はその文献カードの補完をしテーマ別に分類した。その文献カードからキーワードのみを抽出した個票を作成し、それを製造工程に沿ってグループ分けし、グループ毎に説明文を作成した。

2. 現在、国内で生産されている冷凍食品は、前年度にも示したように、年間約 1,500 千トンに達しているが、代表的な冷凍食品の製造工程の危害をさらに検討し、高度衛生管理システムに必要な 4 つの製品分類を抽出した。最終製品について約 1,888 検体の細菌検査結果を検討し、生食用魚介類（イカ等）、加工用魚介類（むきエビ等）、加熱済魚介類類（魚フライ等）、調理品類（畜産フライ類・調理フライ類等）の中で調理品の検体に比較的高い細菌数、生食用魚介類 1 検体に大腸菌群を検出した。本年度は、前年度同様に加工基準のある生食用魚介類に注目し、夏場の製造工程についてイカ類のさしみ製造工程およびほたて貝柱の製造工程における危害を分析した。生食用冷凍鮮魚介類製造工程の各工程において汚染指標細菌である細菌数、大腸菌群、*E. coli* および腸炎ビブリオ等の挙動を検討した。国内原料および輸入原料は比較的汚染菌数は低く、製造工程中のベルトコンベヤー及びカッター工程等で菌数が高くなる傾向がみられたが、許容範囲内であった。これらの製造工程ごとの結果を積み重ねることで各種の冷凍食品の危害分析が実施される。さらに、調理品の中で、特に、コロッケについて危害分析の基本的な問題点にふれた。

3. 冷凍食品のなかで、食中毒発生の原因となる病原細菌はいかなる挙動を示すのかについて検討を行った。病原細菌は腸管出血性大腸菌（EHEC）、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアと赤痢菌についての食品中での挙動を観察した。食品中での冷凍保存試験において、2-3 ヶ月保存によって菌数の低下が見られない病原細菌は EHEC、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアであった。腸炎ビブリオと赤痢菌は徐々に菌数が低下していくが、6 ヶ月後にも一部数%は残存していた。汚染した病原細菌は冷凍された食品中でも長く残存することから、受け入れ時の検査又はその検査法が重要である。

研究協力者

鈴木 徹 (東京海洋大学)

宮原美知子 (国立医薬品食品衛生研究所)

小野一晃 (埼玉県衛生研究所)

前田裕之 (日本水産株式会社)

進藤博且 (株式会社ニチレイフーズ)

山崎健次 (味の素冷凍食品株式会社)

畠山信行 (マルハ株式会社)

真木昌之 (株式会社ニチロ)

佐藤 久 ((財) 日本冷凍食品検査協会)

芦田勝朗 ((財) 日本冷凍食品検査協会)

石村和男 ((社) 日本冷凍食品協会)

原田 眞 ((社) 日本冷凍食品協会)

A. 研究目的

(1) 冷凍食品はその簡便性から家庭、給食及び外食産業において広く利用されており、昨今、食の安全性に対する消費者の関心が高まり、消費者からは食品に対する不安・不信の声が聞かれるに至り、そのため食の安全性の確保のための具体策を示す必要があるとの観点から、冷凍食品の製造についても高度衛生管理システムの構築が必要と考えられる。

このことから、本研究では冷凍食品製造に関連する様々なデータを収集・整理することにより、高度衛生管理システムの構築に必要なデータを冷凍食品製造に携わる人々が容易に利用できるデータベース検索システムの構築を行い、誰でもが本研究で収集した文献の検索が行える CD-ROM を作成することを目的とした。

(2) 冷凍食品の細菌検査

現在、国内で生産・販売されている冷凍食品は年間約 1,500 千トンと推定される

が、これらの主要な最終製品について細菌汚染状況を分析し、さらに、検討することとした。まず、製造 1 週間以内の最終製品について細菌汚染状況を把握するために、細菌数、大腸菌群、*E. coli*、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌および腸炎ビブリオ菌について検査を実施した。2003 年 4 月 1 日～2005 年 3 月 31 日の 1,888 (890+998) 検体について、それらをもとに高度衛生管理システムに必要な製品分類を抽出することにした。これら 2 年間のデータから、生食用、加工用、加熱済および調理品に分類し、このデータを比較した。

1) 生食用イカ類さしみ及びほたて貝柱製造工程

水産冷凍食品の国内生産量は平成 16 年では 84 千トンで冷凍食品全体からみると 5.6%と少ないが、本年度の研究では食品衛生法の規格基準で加工基準が示されている生食用冷凍鮮魚介類の「いかさしみ」を取り上げる。また、生食用冷凍鮮魚介類においては、細菌数、大腸菌群に加えて、腸炎ビブリオ最確数が 100/g 以下 (アルカリペプトン水、TCBS 寒天培地法) に規格基準が定められており、冷凍保存状態においては、腸炎ビブリオの生残推移は重要な問題と考えられる。本年度は「いかさしみ」等及び「ほたて貝柱」の各製造工程における微生物汚染の定量的分析を実施し、その製造工程における微生物危害を把握して制御方法の基礎的検討を行う事を目的とした。

2) 冷凍食品「コロッケ」

調理品「コロッケ」が冷凍食品全体の 10%にあたり、数多く出荷されている。しかし、各工場の製造工程が明らかにされていなかったが、今回は A 工場及び B 工場の

協力を得て、最終製品の細菌検査成績並びにコロックの「バター」の使用中の経時変化と凍結前コロックについて細菌検査を実施した。

(3) 今年度は、冷凍食品中での食中毒起因細菌の動態を中心に検討を行った。このことは、冷凍食品の高度衛生管理をする上での基礎資料として重要であると考えている。

B. 研究方法

(1) 個票の作成

昨年は冷凍食品製造に係わると考えられる文献を JOISEasy の文献検索システムを活用し、国内外において収集した。

その文献から調査項目に該当する必要な事項を簡潔にまとめて記載する事により、文献カードを作成した。本年度はそれを製造工程毎にグループ分けし、更にその文献カードからキーワードのみを抜き出し、個票を作成した。グループ分けした文献カードの特徴を現すために説明文を作成した。

(2) - 1 冷凍食品の細菌検査

1) 検体の採取および試料の調製

冷凍食品最終製品は、冷凍したまま容器包装の表面を 70%アルコール綿でよく拭き、滅菌した器具を用いて開封し、その内容の全体を細切りしたのち、無作為に 25g を無菌的にストマッカー用ポリ袋にとり、滅菌リン酸緩衝希釈水 225 ml を加えて細砕して、これを試料液とした。

2) 細菌数

試料液 (10 倍希釈) から開始し、(1 平板に 30~300 の集落がえられるように滅菌

リン酸緩衝希釈水で段階希釈試料液を調製) その 1 ml を用いて標準寒天培地による混釈平板培養 (平板 2 枚使用) を行い 35.0 度 \pm 1.0 度で 48 時間 \pm 3 時間培養後検体 1 g 当りの細菌数を算出した。

3) 大腸菌群

試料液を 10 倍希釈 (100 倍希釈試料液) し、その 1 ml を用いてデソオキシコレート寒天培地による混釈平板培養 (平板 2 枚を用い平板重層法) を行い、35.0 度 \pm 1.0 度で 20 時間 \pm 2 時間培養後、定型的コロニーを数え、検体 1 g 当りの大腸菌群数を算出した。

4) *E. coli*

試料液を 10 倍希釈 (100 倍希釈試料液) し、その 1 ml をそれぞれ 3 本の EC 醗酵管培地に接種し、恒温水槽を用いて 44.5 度 \pm 0.2 度で 24 時間 \pm 2 時間培養後、醗酵管中にガス発生を認めたものを推定試験陽性とした。また、*E. coli* 陽性検体は、MPN 法 (5 本法) により g あたりの菌数を測定した。

5) 腸炎ビブリオ (生食用冷凍鮮魚介類)

検体 25 g に PBS (3%食塩) 225 ml を入れ、ストマッキング処理をし、検体の 10 倍希釈液を作成し試料とする。次に検体の 10 倍希釈液 1 ml を PBS (3%食塩) 9 ml の入った試験管に入れ、検体の 100 倍希釈液を作成した。検体の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液をアルカリペプトン水 10 ml の入った 3 本の試験管にそれぞれ 1 ml ずつ接種し、また、100 倍希釈液をアルカリペプトン水 10 ml の入った 3 本の試験管に 0.1 ml ずつ接種した。37 \pm 1.0 度、1 夜培養後、各試験管の上層の一白金耳を TCBS 寒天培地に塗抹し、37 \pm 1.0 度、1 夜培養した。判定された腸炎ビブリオから、各段階に希

積した試験管の陽性本数を最確数表にあてはめて、1gあたりの最確数を求めた。

6) 冷凍食品最終製品の細菌数

冷凍食品の最終製品の一般的な細菌数の状況を把握するため、2003年4月1日～2005年3月31日の2年間の主要な工場で製造された最終製品について(2)-2)～6)で示した細菌試験法で検査を実施した。製品検査は、製造日より1週間以内のものを対象とし、工場出荷前の製品とした。検査した結果を関係機関と検討し、表1-1～2にカテゴリー別細菌検査結果を示した。

(2)-2 生食用イカ類さしみ及びほたて貝柱製造工程

1) もんごういかさしみ(前年提示)については、平成18年1月17日、2月20日について製造工程ごとの細菌検査を実施し、1工程中に5検体抽出し危害を調べた。

2) するめいかさしみ(前年提示)については、平成17年8月29日、9月12日および10月18日に製造工程ごとの細菌検査を実施し、低温解凍、洗浄後、細切機裁断後、急速凍結後1工程につき5検体抽出し危害について検討した。

3) ほたて貝柱については、17年8月9日および9月27日に脱殻/内臓除去、一次洗浄、2次洗浄、整列後、選別後毎の検体について、細菌試験法の細菌数、大腸菌群、E. Coli 腸炎ビブリオの細菌検査を実施した。

(2)-3 調理品「コロッケ」

今回は、A社及びB社の協力をえてその基本的な製造工程をまとめた。各社それぞれの手法があるが、製造工程の中ではバターリングと呼ばれる工程が大きな影響をあたえるものとして考えられる。

4) -1 バッター液の保存試験

バター液は-30℃で冷凍し、試用するまで冷凍保管した。測定項目については各温度における細菌数(平板二枚法)およびpHを測定した。

4) -2 冷凍ポテトコロッケサンプリング
具材混合攪拌後、使用中バター及び凍結前コロッケについて上記方法に従って測定した。

4) -3 ポテトコロッケ細菌検査結果

A工場から入手した検査結果及びB工場から入手した検査結果を比較した。

(3) 病原細菌

腸管出血性大腸菌(EHEC)、サルモネラ、リステリア、赤痢菌については保存培地からトリプトソイ培地(TSB)3mlへ接種し36℃(リステリアのみ30℃)での培養を行った。その培養液を滅菌生理食塩水により適宜希釈を行って、実験菌液とした。カンピロバクターについては冷凍保存菌株グリセリン含寒天培地をMuller-Hinton agar上に塗抹し、42℃微好気培養2-3日後出現したコロニーをエーゼで掻き取り、Muller-Hinton培地に懸濁させ、適宜滅菌生理食塩水により10倍希釈を行って実験菌液とした。腸炎ビブリオ保存株はアルカリ性ペプトン水(APW)に懸濁させ、36℃での一晚培養により、滅菌生理食塩水により適宜に10倍希釈を行って実験菌液を作製した。接種菌液については、適当倍の希釈菌液0.1mlをTSAに5枚塗抹を行って、培養後、出現コロニー数により接種菌数を計測した。

接種食品検体は以下のものを使用した。EHEC接種は牛挽肉、サルモネラ、リステ

リアとカンピロバクターは鶏挽肉、赤痢菌にはヤングコーン、そして腸炎ビブリオはスルメイカを使用した。

接種に用いた食品は、未接種検体を増菌培養—選択増菌等を行って、分離寒天平板培地での塗抹を行って、接種菌の有無を確認した。又、接種菌が検出されたかどうかを確認するために、PCRや各種イムノクロマトキットを使用した。PCRのプライマーとして、EHEC検出用としてEVC-1/2プライマーセット(TaKaRa)増幅DNA 171bp,サルモネラ検出用としてSIN-1/2プライマーセット(TaKaRa)増幅DNA 378bp,リステリア検出用には、*prfA*1/2²⁾増幅DNA 467bp,赤痢菌IPA-1/2(TaKaRa)増幅DNA 171bp,カンピロバクター*jejuni/coli*用には16S rRNA³⁾増幅DNA 857bp,腸炎ビブリオはVPD-1/2(TaKaRa)増幅DNA 251bpを使用した。各PCR条件等については販売されているものはその使用説明書に従い、文献が記されているものについてはその条件に従った。また、イムノクロマトキット等の簡易検出用については、サルモネラ用として、Lateral flow system: *Salmonella* test kit(DuPont)を使用した。リステリア検出用として、Lateral flow system: *Listeria* test kit(DuPont)を使用した。カンピロバクター検出用にはCampylobacter test(OXOID)を使用した。ただし、検出法については、冷凍損傷検体から有効である増菌培養法を使って、検出を行った。

C. 研究結果

(1) 文献カード(表1)のグループ分けは、1)原料における微生物汚染(21)、

2)製造工程における微生物汚染(9)、3)製品における微生物汚染(24)、4)流通保管時の菌の消長(9)、5)調理時における微生物の消長(9)、6)冷凍食品の微生物の制御法(31)、7)検査方法の比較(13)、8)食中毒・苦情(8及び1)、9)総説(35)、および10)その他(59)のように行った(表2)。

個票では、文献番号、国名、報告年、調査年、原産国、製造品目、検査対象菌、検査方法、検体数、サンプル量、増菌量、陽性検体数(%)汚染菌数、型別、備考などを項目として適宜使用した(表3及び表4)。

文献カードの説明文は、各グループの特徴が分かるように作成した(表5)。説明文の作成には、グループ分けした文献カードの特徴を現すために説明文を作成した。

(2) 冷凍食品の細菌検査

1) 2003年4月1日～2005年3月31日の過去2年間に蓄積したデータから冷凍食品の規格基準を超えた品目は以下の通りであった(表6-1～2)。

2003.4.1～2004.3.31 (表6-1)

コロッケ 1検体

(生菌数 10^7)

2004.4.1～2005.3.31 (表6-2)

切り身 (ほたて貝柱、1検体)

(大腸菌群陽性)

コロッケ

(生菌数 10^7)

チキンカツ

(生菌数 10^7)

2) 生食用イカ類さしみ及びほたて貝柱

「生食用むきもんごういか」については

昨年と同様に冬期のデータであり、前回のもんごうイカと比較した。細菌数においては 10^2 の範囲であり、得られたデータをしめした (図 1)。

「冷凍するめいか刺身」については、昨年のデータが冬期のものなので、17年8月9日、9月27日および10月18日の計3回にわたって採取した。得られたデータは前年と比較して若干の際は見られたが、範囲内にあり、得られたデータを示した (図 2)。

「生食用はたて貝柱」は、17年8月9日及び9月27日において、各4検体のサンプリングを実施した。整列工程に細菌数の増加が見られ使用器具の洗浄の頻度管理を見直す必要がある。さらに、詳細なデータが必要である。得られたデータを示した (図 3)。

3) 調理品 (コロッケ)

3) - 1 バッター液の保存試験

バター液は -30°C で冷凍し、試用するまで凍結保管した。保存試験の結果は、6時間の細菌数に変化が現れなかった。冷凍食品の規格基準に準じて実施されたもので、製品の質が高かったと考えられる。

3) - 2 冷凍ポテトコロッケサンプリング

各A工場及びB工場から得られたバター混合攪拌後、使用中バター、及び凍結前バターの各サンプルについて実施した。各10検体のサンプルを検討したところ、いずれも低い値の数値がえられた。得られたデータを表7にプロットした。

3) - 3 ポテトコロッケ細菌検査結果

各A工場及びB工場において平成17年4月～平成18年1月に製造された製品の細

菌検査成績を表8に示した。細菌数では9月に 10^5 の細菌汚染が見られた以外は 10^4 以下であり、大腸菌、サルモネラ及びブドウ球菌とも陰性であった。

(3) 牛挽肉には、そのものの一般生菌数が 2.9×10^4 cfu/g であったが、2ヶ月間の冷凍保存中この一般生菌数も接種した EHEC 5.6×10^5 cfu/g 菌数も変動がなかった。

鶏挽肉は一般生菌数が 1.5×10^4 cfu/g であったが、接種カンピロバクターの菌数 2.7×10^4 cfu/g のどちらも2ヶ月間の冷凍保存中変動がほとんどなかった。

サルモネラとリステリアを接種した鶏挽肉の一般生菌数は 8.0×10^3 cfu/g であったが、カンピロバクター接種前例と同様で、一般生菌数に変動はなかった。また、サルモネラとリステリア自体の接種菌数も変動がなかった。これらの実験結果は表1, 2, 3, 4に示すとともに縦軸を対数軸とした図によって結果を表示した。図4, 5, 6, 7参照。

接種腸炎ビブリオは冷凍保存1週間では接種菌数を保ったが、4週間の保存では、菌数が約25%に減少した。2ヶ月間保存では、さらに減少し、約4%にまで減少し、6ヶ月保存では、約1.6%に減少した。けれども、どの検体においても、接種した 600 cfu/g 腸炎ビブリオが4-15個/g生存していた。スルメイカの一般生菌数は6ヶ月保存中にゆっくりと減少し、菌数が約10%になった。この結果は図8に示した。

赤痢菌も冷凍保存によって菌数が減少した。 2.3×10^3 cfu/g 接種した赤痢菌は1週間で約2%まで減少した。3ヶ月以降は4-24個/gの菌数は残存していた。この結果は図9に示した。

D. 考察

(1) 「冷凍食品」に関するすべての分野に細菌汚染のデータがあるわけではなく、冷凍食品の製造工程のほとんどが明らかになっていなかった。本研究によって、2工場の「コロッケ」の製造工程を明らかにした。従って、CD-ROMとして現れる文献のほとんどが何らかの製造工程を各工場別に続けられたと考えられる。

(2) 2003年4月1日～2005年3月31日の2年間の冷凍食品のデータから、4種類の生食用魚介類、加工用魚介類、加熱済魚介類及び調理品類の細菌汚染について検討した。生食用魚介類については、「生食用もんごういか」は冬期データでいずれも前回のデータと一致した。「冷凍するめいか刺身」の今回は冬期データであったが、8月9日～10月18日の計3回にわたって採取し、得られたデータは前年と比較して範囲内に入っており、冬期及び夏期の必要なデータとしては得られたと考えられる。「ほたて貝柱」については、現在、各工程で4検体ずつのサンプリングを実施した。現在までのところ使用器具の洗浄の頻度管理を見直す必要がある。

(3) 食品中での冷凍保存試験において、2・3ヶ月保存によって菌数の低下が見られない病原細菌はEHEC、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアであった。腸炎ビブリオと赤痢菌は徐々に菌数が低下していくが、6ヶ月後にも一部数%は残存していた。

E. 結論

(1) 文献を約200検体収集し、その特徴を明らかにした。さらに、閲覧が可能なような工夫をしたい。

(2) 2003年4月1日～2005年3月31日までの冷凍食品の製造後1週間以内のデータについてそれぞれ4種類のカテゴリについて検討し、生食用魚介類、加工用魚介類、加熱済魚介類及び調理品類をカテゴリとして取り上げた。それらの中で生食用魚介類（ホタテ貝柱）及び調理品類（コロッケ等）に重要な細菌汚染等が明らかとなった。

生食用魚介類については、昨年及び今年度にわたり、「生食用もんごういか」、「冷凍するめいか」及び「ほたて貝柱」検査を実施し、ほたて貝柱に問題があると考えられた。今年度は、生食用魚介類以外に調理品類（コロッケ等）について検討し、A工場及びB工場の基本的な条件について検討した。

(3) 病原細菌

高度衛生管理的観点からは、どの食中毒細菌も汚染していれば、解凍後に増殖して行く危険があることから、解凍後の調理や保存に関しては温度管理を徹底する必要があると考えられる。

世界中から食料品が集められて大量に日本で消費されている。運ばれてくる食料の多くは冷凍形態をとっていることから、受け入れ時の検査法も重要であり、解凍後の衛生管理も注意しなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1) 生食用冷凍鮮魚介類（イカ刺身）の製造工程における細菌汚染：大場秀夫、石村和男、原田 眞、佐藤 久、芦田勝朗、品川那汎：平成17年10月日本衛生学会第90回学術講演会

2) Frozen Pathogenic Bacteria in Food: Michiko Miyahara, Kunihiro Shinagawa

119th AOAC Annual Meeting & Exposition, September 11-15, 2005

3) 食品接種腸炎ビブリオ冷凍保存での動態：宮原美知子、品川邦汎

第26回日本食品微生物学会学術総会

平成17年11月

4) 冷凍食品保存中接種食中毒起因細菌の挙動：日本薬学会第126年会

平成18年3月