

され、販売までの時点で温度帯と期限設定を変更される食品は数多い。しかしながら流通及び販売時の温度が定められ、微生物の規格基準が設定されているものは「冷凍食品」に限られており、その他の冷凍流通食品については変更後の期限等についての責任者もあいまいとなっている。今回、冷凍流通食品の安全性確保に関する研究を実施するにあたり、冷凍流通食品の食品衛生上の問題点を明らかにし、その安全性の向上に資することを目的として、冷凍食品とそれ以外の冷凍流通食品(以下凍結品とする)の微生物汚染実態を調査し、比較検討した。

また、現在国内で消費される食品の約6割は輸入食品であり、これらの食品汚染細菌や残留農薬等による汚染は大きな社会問題となっているが、有害物質検出時のデータの信頼性確保のために国際的に認知された試験法を採用することが必要となる。すでにカンピロバクター、サルモネラなどの食中毒細菌では国際的な公定法を取り入れた新しい国内公定法の策定に向けて準備が進められている。また、現在我が国では食品汚染の指標として coliforms (大腸菌群：グラム陰性で無芽胞の桿菌で乳糖を分解して酸とガスを産生し、好気性又は通性嫌気性の菌、食品衛生検査指針 2004 年版より) と食品衛生上の *E. coli* (糞便系大腸菌群：大腸菌群の内 EC 培地中で 44.5°C で発育し、乳糖を分解してガスを産生するもの、食品衛生検査指針 2004 年版より) が用いられているが、国際的には coliforms よりも更に幅広い菌種を含む Enterobacteriaceae (腸内細菌科) が用いられることが多い。そのため、将来的には国内の食品汚染指標菌の規格基準や検査法の見直しが必要とな

る可能性が高い。以上の理由から、今回の研究では第 1 に現在国際的な標準的微生物検出法である ISO 法と現行の告示法の分離成績を比較検討し、その後食品検体からの ISO 法による汚染指標菌の検出を行った。試験対象菌には、現在の冷凍食品の規格基準に定められている coliforms、presumptive *E. coli* (推定大腸菌：糞便系大腸菌群とほぼ同じだが、培養温度は 44°C でインドール産生、乳糖を分解してガスを産生するもの) の 2 種と、国内では規格基準に用いられていないものの国際的には coliforms に替わって食品汚染指標菌として広く用いられている Enterobacteriaceae の 3 種を選択した。

B. 研究方法

1. 検査法の設定及び予備試験

日本工業規格より購入した ISO4831(coliforms の MPN 検出法)、ISO4832(coliforms の colony count 検出法)、ISO7251(presumptive *E. coli* の MPN 検出法)、ISO21528-1(Enterobacteriaceae の MPN 検出法) 及び ISO21528-2(Enterobacteriaceae の colony count 検出法)について日本語マニュアル、公定チェックシート及びサブワークシートを作成した。それらに基づき、研究室保有株である指標菌として *E. coli* JCM1964 株、腸内細菌科に属する *Enterobacter sakazakii* ATCC29004 株と *Leclarcia adecarboxylata* JCM1667 株を用いて、現在の国内における公定法である告示法と今回日本語マニュアルを作成した ISO 法を平行して添加試験を行い、分離率の比較検討を行った。コロニー数の算出法等、微生物

試験の一般的事項については ISO7218 (2006) を参照した。

(1) *E. coli* の添加試験 (ISO4831、ISO4832、ISO7251)

純培養標準菌株を普通ブイオンにて一夜培養し、緩衝ペプトン水(BPW)にて段階希釈し 121°C 15 分間オートクレーブ滅菌処理した冷凍ギョーザと冷凍大根おろし各 25g に添加した。滅菌ストマッカー袋に秤量し、BPW を 225ml 加えた後希釈した菌液を添加し、1 分間ストマッキングし、後述の ISO 法に従って菌の回収を行った。また、参考としてデソキシコレート培地で 37°C 24±2 時間培養により大腸菌群数の測定も実施した。添加菌量は低濃度添加理論値が 6.48/g (ISO4831、ISO7251)、高濃度添加理論値が 3.2×10^3 /g (ISO4832) であった。

(2) *E. sakazakii* の添加試験 (ISO21582-1、ISO21582-2)

純培養標準菌株を普通ブイオンにて一夜培養し、BPW にて段階希釈し 121°C 15 分間オートクレーブ滅菌処理した冷凍ギョーザと冷凍大根おろし各 25g に添加した。滅菌ストマッカー袋に秤量し、BPW を 225ml 加えた後希釈した菌液を添加し、1 分間ストマッキングし、後述の ISO 法に従って菌の回収を行った。また、参考としてデソキシコレート培地で 37°C 24±2 時間培養により大腸菌群数の測定も実施した。添加菌量は低濃度添加理論値が 4.68/g (ISO21582-1)、高濃度添加理論値が 3.1×10^3 /g (ISO21528-2) であった。

(3) *L. adecarboxylata* の添加試験 (ISO4832、ISO21582-2)

純培養標準菌株を普通ブイオンにて一夜培養し、0.05% Tween80 含有 BPW にて段

階希釈し 121°C 15 分間オートクレーブ滅菌処理した冷凍ギョーザ 25g に添加した。滅菌ストマッカー袋に秤量し、BPW を 225ml 加えた後希釈した菌液を添加し、1 分間ストマッキングし、ISO 法に従って菌の回収を行った。

2. 冷凍食品および凍結食品の汚染状況検査

2. 1. 検体

一般のスーパーマーケット等小売店で購入した、冷凍食品 148 検体、凍結食品 38 検体及びチルド品 17 検体の計 203 検体について調査を行った (表 1)。購入検体は試験開始まで -20°C で保管し、開始数時間前に鉢での採取が可能な状態まで解凍した。各検体を開封し、赤外放射温度計 (testo830-T1) を用いて表面温度を測定後、25g を無菌的に秤量・切断して Buffered Peptone Water (以後 BPW, Merck) 225ml とともにフィルター付ストマッカー袋に入れ、ストマッカーにかけて懸濁液を作成した。

2. 2 coliforms の試験法

前項で記載した検体懸濁液 1 ml 及びその 10 倍段階希釈液を各 2 枚のシャーレに分注後、45°C に保持したバイオレット・レッド・胆汁酸寒天培地 (以下 VRB 培地、Merck) 約 15 ml を注いで混和した。固化したのち 4 ml の VRB 培地を重層して 37±1°C で 24±2 時間培養した。典型的コロニー数を計測し、非典型コロニーは計測後任意に選択したコロニー 5 個を釣菌し、ダーラム管を含む BGLB 発酵管 (Merck) に接種後、37±1°C で 24±2 時間培養して確認試験を

行った。培養後、BGLB 発酵管でガス産生を認めた集落数から陽性率(ガス産生を認めた集落数÷BGLB 発酵管に接種した集落数)を算出した。典型集落数及び陽性率を乗じた非典型集落数を加算した後、希釈倍数を乗じて検体 1 g 当たりの coliforms 菌数を算定した。また、選択培地上のいくつかの非典型集落について、API Rapid20E (日本ビオメリュー) を用いた菌種の同定を行った。

2. 3 presumptive *E. coli* の試験法

前項で記載した検体懸濁液 10 ml を、ダーラム管を含む同量の 2 倍濃度ラウリル硫酸ブイオン(以後 LSB 発酵管、Merck) 3 本に接種した。また、検体懸濁液及びその 10 倍段階希釈液 1 ml を通常濃度の LSB 発酵管 3 本に接種し、37±1°C の孵卵器で 24~48±2 時間培養した。2 倍濃度ではガス産生、通常濃度ではガス産生又は培地の混濁を示した試験管について、培養液 1 白金耳を、44±0.5°C に保持したダーラム管を含む EC 培地(以後 EC 発酵管、Merck) に接種し、恒温水槽中で 44±0.5°C 24~48±2 時間培養した。培養後、ガス産生を示した EC 発酵管について、培養液 1 白金耳を 44±0.5°C に保持したペプトン水(Oxoid) に接種し、恒温水槽内で 44±0.5°C で 48±2 時間培養した。培養終了後、インドール試薬(Merck) 0.5ml を加え、1 分後以内に赤変したものをインドール陽性とした。次に、陽性と判定した発酵管数の組み合わせから、最確数(MPN)表を用いて検体 1 g 当たりの Presumptive *E. coli* コロニー数を算出した。

2. 4 Enterobacteriaceae の試験法

前項で記載した検体懸濁液 1 ml 及びその 10 倍段階希釈液を各 2 枚のシャーレに分注後、45°C に保持したバイオレット・レッド・胆汁酸ブドウ糖寒天培地(以下 VRBD 培地、Merck) 10ml を注いで混和した。固化したのち 15 ml の同培地を重層し、37±1°C で 24±2 時間培養した後、出現した集落数を典型と非典型に区分して測定した。任意の典型及び非典型コロニーを各 5 個釣菌し、普通寒天培地(Merck) に画線培養して 37±1°C で 24±2 時間培養した。分離されたコロニーについてオキシダーゼ試験(日水)を実施した。オキシダーゼ陰性の集落を中試験管内のブドウ糖・カゼインペプトン寒天高層培地(Merck) に穿刺し、37±1°C で 24±2 時間培養した。培養後、穿刺線周辺の培地が黄変したものをブドウ糖分解陽性とし、典型及び非典型コロニーそれぞれの陽性率を算出した。各陽性率に典型及び非典型集落数を加算し、検体 1 g 当たりの *Enterobacteriaceae* コロニー数を算出した。また、選択培地上のいくつかの非典型集落について、API Rapid20E (日本ビオメリュー) を用いた菌種の同定を行った。

2. 5 一般生菌数の試験法

参考値として各検体の一般生菌数を、基本的に告示法に基づくが検体希釈水と希釈倍率を ISO 法に準じた形で試験した。

3. 結果の判定と統計処理

検出結果は現行の冷凍食品の規格基準に準拠し、3 種の汚染指標菌いずれも菌が検出されたものを陽性とし、検出限界(10cfu/g)未満だったものを陰性とした。

一般生菌数については冷凍食品にあてはめた場合の各カテゴリーでの規格基準の値を超えているものを陽性と判定した。冷凍食品および凍結食品からの検出結果の統計処理は、StatView ver4.0を用いて χ^2 検定を行った。

C. 研究結果

1. 指標菌検出法の検討

今回3種の指標菌検出法についてISO法の日本語マニュアル等を作成し、使用する培地類や試験期間等について現行の国内公定法である告示法との比較を行ったところ、表2に示す相違点が挙げられた。またそれらの検出法について、市販冷凍食品からの分離試験及び標準株を用いた添加試験を行った。その結果、coliformsと*E. coli*の分離法については現行の国内公定法である告示法による結果と整合性が見られた(表3)。Enterobacteriaceaeについては現時点では国内で食品汚染指標としての規格基準に用いられていないため告示法が制定されておらず、ISO法のみで試験した。また、大腸菌とEnterobacteriaceaeの一種である*E. sakazakii*については理論値とほぼ一致した結果が得られ、一方別種のEnterobacteriaceaeである*L. adecarboxylata*については当初理論値と一致した結果が得られなかったが、段階希釈時の自己凝集を防ぐため希釈液に界面活性剤を添加したところ、理論値と矛盾のない結果が得られた(表4)。

2. 食品の微生物汚染状況調査

これらの予備試験の結果より、今回の研究における試験法として、ISO法に基づく

試験法を行うことに問題がないと判断し、市販の冷凍食品および凍結食品におけるこれら指標菌の汚染状況調査を行った。予測される汚染菌数に合わせ、coliformsとEnterobacteriaceaeについてはcolony count法(ISO4832及びISO21528-2)を採用した。加熱用魚介類からの分離結果を表5に示した。生食用野菜果物、加熱用野菜、生食用魚介類、揚げ物類及び飲茶類からの分離結果は他の分担及び協力研究報告書に示した。試験の結果、冷凍食品148検体中33検体(30%)からcoliformsが、5検体(3.4%)からpresumptive *E. coli*が、34検体(31%)からEnterobacteriaceaeが分離された(表6)。但し、本研究班では告示法と異なるISO法を用いているため、この検査結果が直接、微生物規格違反を意味するものではない。一方凍結食品においては、38検体中18検体(41.9%)からcoliformsが、4検体(10.5%)からpresumptive *E. coli*が、17検体(39.5%)からEnterobacteriaceaeが検出された。これらの結果について有意差検定を行ったところ、coliformsとEnterobacteriaceaeの分離率が凍結食品において冷凍食品よりも優位に高い結果が示された($p<0.01$)。チルド食品からは今回調査した指標菌は分離されなかった。食品カテゴリーごとの分離率を図1~3に示す。coliformsとEnterobacteriaceaeに関して冷凍、凍結を問わず、揚げ物で高い陽性検体率を示した(図1及び3)。加熱用魚介類は今回調べた3指標菌のいずれもが凍結食品で冷凍食品よりも高い陽性検体率を示したが、有意な差は見られなかった。一方、飲茶類では3指標菌ともに凍結食品で冷凍食品よりも有意に高い陽性率を示した

($p < 0.05$ 、図 1-3)。加熱用野菜類 40 検体からは今回調べた指標菌は検出されなかった。生食用野菜果物でも冷凍及び凍結食品における検出率に差は見られなかった。生食用魚介類については現時点では検体数が少ないため、統計処理は行わなかった。また、各カテゴリーの冷凍及び凍結食品について、更に凍結前加熱の有無で分類した結果を表 7 に示した。その結果、一般生菌数については、ほぼ全検体で冷凍食品の場合の規格基準内の数値を示していたが、生食用魚介類の凍結食品 5 検体のうち 1 検体のみ、冷凍食品の場合の規格基準を超える菌数が分離された。また、揚げ物類の 2 検体で 3×10^5 cfu/g の結果を示し、冷凍食品の場合の規格基準を超えている可能性があった。また、coliforms の選択培地である VRB 寒天平板及び Enterobacteriaceae の選択培地である VRBD 寒天からは濃色極小及び極淡(半透明)色の非典型集落が多数形成され、*Acinetobacter* 属又は *Pseudomonas* 属及び *Photobacterium* 属と同定された。また、典型集落の確認試験で純培養した集落で、赤色集落があり、*Serratia marcescens* と同定された。以上の結果から、今回調査した範囲では非典型コロニー中に分離対象となる菌種は見られなかった。

D. 考察

1. 本研究により、国際的な標準法として扱われている ISO 法による食品汚染指標菌の分離法が、現在わが国で行われている告示法との間に分離率の大きな違いは見られず、互換性のある方法といえることが示された。一方で最終的な判定までの検査期間

の延長など、ISO 法を導入する上での問題点も明らかにされた。

2. 今回の調査により、一般に流通している冷凍食品 148 検体中 33 検体(22.3%)から coliforms が、5 検体(3.4%)から presumptive *E. coli* が、34 検体(23%)から Enterobacteriaceae が分離された。一方冷凍食品以外の凍結食品からは、38 検体中 18 検体(47.4%)から coliforms が、4 検体(10.5%)から presumptive *E. coli* が、17 検体(44.7%)から Enterobacteriaceae が検出された。3 種の指標菌で凍結食品における分離率が冷凍食品のものよりも有意に高い結果を示したのは、飲茶類のみであった。揚げ物類は coliforms と Enterobacteriaceae の分離率が 60%以上と大変高かった。一方加熱用野菜類では全く今回調べた指標菌が分離されず、食品カテゴリーによる汚染率が大きく異なることが示された。但し、本研究班では告示法と異なる ISO 法を用いているため、今回の検査結果が直接、微生物規格違反を意味するものではない。

E. 結論

国際的標準試験法である ISO 法を用いた調査の結果、国内で一般に流通している冷凍食品及び凍結食品の 30%以上から食品汚染指標菌が分離され、特に揚げ物類で凍結食品の汚染率が冷凍食品よりも有意に高かった。また、今回用いた ISO 法は検出感度が優れているものの、判定までの試験期間が長い等の問題点も見られ、その適用には現行の告示法との更に詳細な比較検討が必要であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 検体

食品カテゴリー		摂食前加熱	検体数
冷凍食品	魚介類	要	15
	魚介類	不要	1
	揚げ物	要	22
	飲茶類	要	33
	野菜	要	40
	野菜・果物	不要	37
計			148
凍結食品	魚介類	要	8
	魚介類	不要	5
	揚げ物	要	12
	飲茶類	要	6
	野菜	要	7
計			38
その他 (チルド) 飲茶類		要	17

表 2. ISO 法と告示法の相違点

対象微生物	試験法	
	ISO4832	告示法
coliforms		
希釈水の種類	緩衝ペプトン水(BPW)	リン酸緩衝希釈水(PB)
培地の種類	VRB 寒天	デソキシコーレイト寒天
培養温度と時間	37°C24±2 時間	35°C20±2 時間
確認試験	非典型集落のみ BGLB ガス産生の確認	EMB、LB、グラム染色で確認
試験日数	最短 2 日 最長 3 日	最短 2 日 最長 5 日
<i>E. coli</i>	ISO7251	告示法
希釈水の種類	緩衝ペプトン水(BPW)	リン酸緩衝希釈水(PB)
培地の種類	ラウリル硫酸ブイオン(LSB)・ECブイオン	ECブイオン
培養温度と時間	LSB : 37°C24±2~48±2 時間 EC : 44±0.5°C24±2~48±2 時間	44.5±0.2°C24±2 時間
確認試験	ペプトン水に継代培養後インドール試験	EMB、LB、グラム染色で確認
試験日数	最短 3 日 最長 7 日	最短 2 日 最長 5 日

表 3. ISO 法と告示法による指標菌分離状況 (cfu/g)

試験法	検体	
	大根おろし	餃子
ISO4832 (coliforms)	<100(0)	<100(0)
ISO21582-2(Enterobacteriaceae)	<100(0)	<100(2)
DESO 法(大腸菌群告示法準拠)	<100(0)	<100(2)
ISO7251(presumptive <i>E.coli</i> : MPN3 本 3 段階)	<0.3	4.3
EC 法(糞便系大腸菌群告示法準拠 : MPN3 本 3 段階)	<0.3	4.3
生菌数(BPW 希釈・37℃培養)	4.4E+02	6.3E+02
生菌数(PB 希釈・35℃培養)	5.8E+02	5.8E+02

表 4. 標準株添加試験結果 (cfu/g)

接種菌 試験法	測定値	理論値	回収率(%)
接種検体			
<i>E. coli</i>			
ISO4831			
大根おろし	9.3 (0.97)	6.48 (0.81)	119.8
餃子	1.2E+01 (1.08)	6.48 (0.81)	133.3
ISO4832			
大根おろし	2.4E+03 (3.38)	3.2E+03 (3.51)	96.3
餃子	2.6E+03 (3.41)	3.2E+03 (3.51)	97.2
ISO7251			
大根おろし	9.3 (0.97)	6.48 (0.81)	119.8
餃子	1.2E+01 (1.08)	6.48 (0.81)	133.3
<i>E. sakazakii</i>			
ISO21582-1			
大根おろし	1.5 (0.18)	4.68 (0.67)	26.7
餃子	4.3 (0.63)	4.68 (0.67)	94
ISO21582-2			
大根おろし	2.4E+03 (3.38)	3.1E+03 (3.49)	96.8
餃子	2.1E+3 (3.32)	3.1E+03 (3.49)	95.1
<i>L. adecarboxylata</i>			
ISO4832			
餃子	5.6 E+02 (2.748)	6.3 E+02 (2.799)	98.2
ISO21528-2			
餃子	6.6 E+02 (2.820)	6.3 E+02 (2.799)	100.7
(参考) デソキシコレート培地			
餃子	7.3 E+02 (2.863)	6.3 E+02 (2.799)	102.3

表 5. 加熱用魚介類からの指標菌検出状況 (単位は全て cfu/g)

No.	検体	ISO4832	ISO7251				算出菌数	SO21582- 37°C24hr	生菌数 37°C24hr	大腸菌群 (DESO)	備考
			10 ⁻¹ ×10ml	10 ⁻¹ ×1ml	10 ⁻² ×1ml						
1	花咲いか	<10	0	0	0	<0.3	<10	<300(15)	-		
2	カットやりいか	<10	0	0	0	<0.3	<10	<300(260)	-		
3	シーフードミックス	<10	0	0	0	<0.3	<10	9.5E+04	-		
4	むきえび	<10	0	0	0	<0.3	<10	8.6E+04	<10		
5	殻付エビ	9.4E+02	3	3	0	24	9.0E+02	1.6E+04	5.9E+02		
6	シーフードミックス	<10	0	0	0	<0.3	<10	9.5E+03	<10		
7	子持ちシシャモ	<40	0	0	0	<0.3	<40	2.1E+05	<40		
8	冷凍ポイルイタヤ	8.6E+01	0	0	0	<0.3	1.1E+02	6.0E+03	<40		
9	シーフードミックス	<10	0	0	0	<0.3	<10	1.3E+05	<10		
10	あじ文化干し	<40	0	0	0	<0.3	<10	<300(35)	<10		
11	パーナ貝	<40	0	0	0	<0.3	<40	<300(180)	<10		
12	シーフードミックス	<40	0	0	0	<0.3	<10	<300(135)	<10		
13	真いか一夜干し	<40	0	0	0	<0.3	<40	5.3E+03	<10		
14	ホタテのムニエル	<10	0	0	0	<0.3	<40	<300(260)	<10		
15	かれいのムニエル	1.9E+03	0	0	0	<0.3	1.6E+03	9.0E+04	2.3E+02		
16	冷凍のぼし海老	<10	1	0	0	0.36	<10	8.7E+03	<10	冷凍食品表示なし	
17	冷凍かわえび	<40	3	1	0	4.3	3.6E+01	1.7E+05	<40	冷凍食品表示なし	
18	冷凍ポイルほたて	<10	3	2	1	15	<10	1.1E+04	<10	冷凍食品表示なし	
19	冷凍かき2L(加熱調理用)	<10	0	0	0	<0.3	<40	9.8E+02	<10	冷凍食品表示なし	
20	冷凍イシモチ	<10	0	0	0	<0.3	<10	1.0E+04	<10	冷凍食品表示なし	
21	イカステーキ	<40	0	0	0	<0.3	9.5E+01	1.1E+06	<40	冷凍食品表示なし	
22	ホワイトえび	8.6E+01	0	0	0	<0.3	1.3E+03	1.4E+06	8.4E+02	冷凍食品表示なし	
23	魚介類加工品(むきえび)	9.4E+02	0	0	0	<0.3	8.8E+02	1.3E+06	-	冷凍食品表示なし	

ISO4832:coliform検出法

ISO7251: presumptive E. coli検出法

ISO21528-2:Enterobacteriaceae検出法

表6. 冷凍食品、凍結食品及びチルド食品からの汚染指標菌分離率

食品カテゴリー	検体数	陽性検体数 (%)		
		coliform	presumptive <i>E. coli</i>	Enterobacteriaceae
冷凍食品	148 ^a	33(30)	5 (3.4)	34(31) ^b
凍結食品	38 ^a	18(41.9)	4(10.5)	17(39.5) ^b
チルド食品	17	0(0)	0 (0)	0 (0)
合計	203	51(25.1)	9(4.4)	51(25.1)

a : p value=0.002, b: p value=0.0073

表 7. 凍結前加熱の有無で分類した各食品カテゴリーでの汚染指標菌陽性検体数

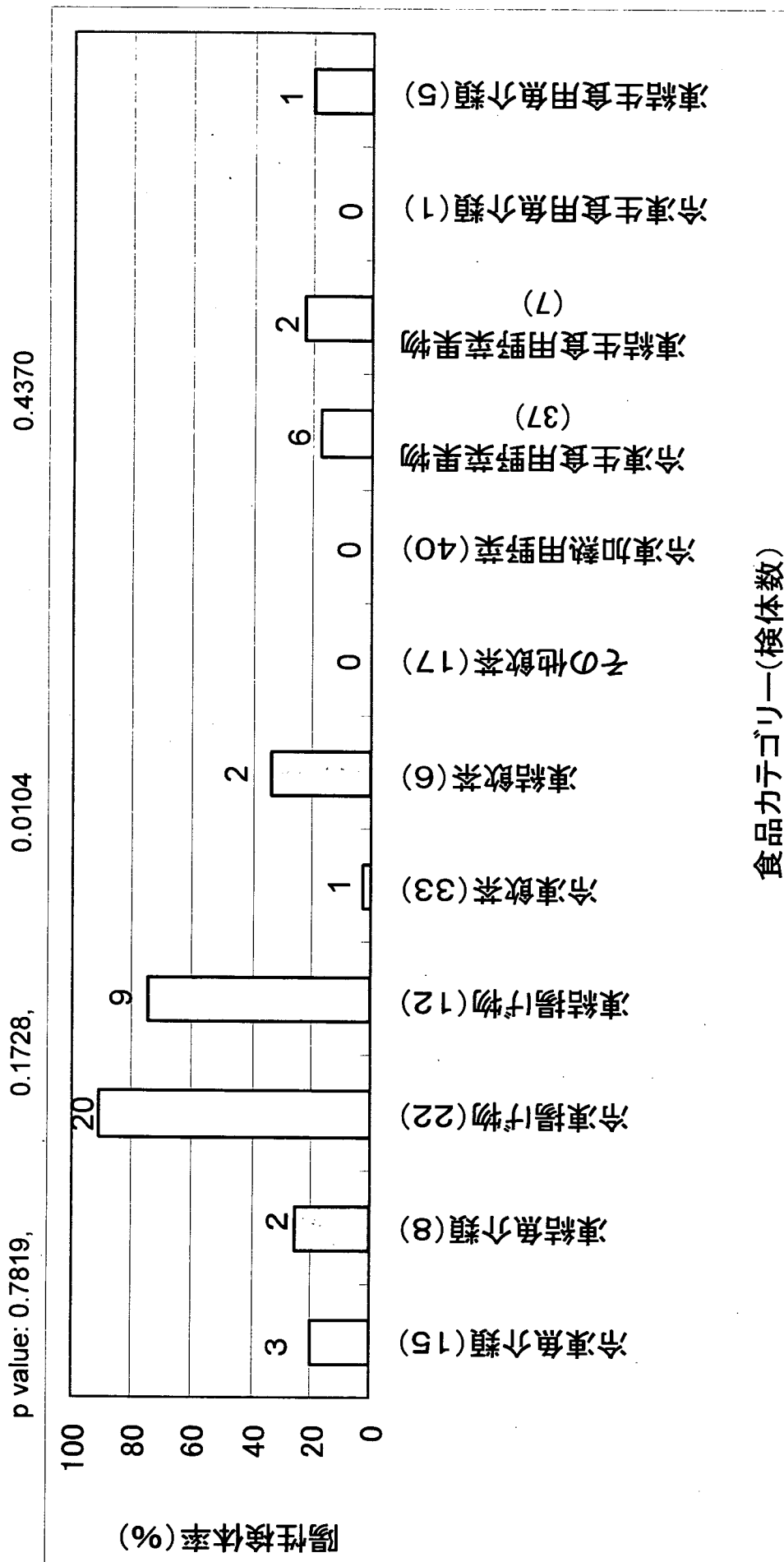
食品カテゴリー	凍結前加熱	検体数	coliforms	<i>E. coli</i>	Enterobacteriaceae	生菌数(cfu/g)											
						0	<10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷				
冷凍加熱用魚介類	あり	1	1	0	1	0		1									
	なし	13	7	1	6	2		2	2	3	4	1					
	不明	1	0	0	0				1								
凍結加熱用魚介類	あり	1	0	1	0												
	なし	5	2	1	3				1	1	1						2
	不明	2	2	1	2											1	1
冷凍加熱用揚げ物	あり	1	0	0	0			1									
	なし	21	18	2	19				1	3	9	4	2*				
	不明	0															
凍結加熱用揚げ物	あり	0															
	なし	3	3	1	2						2	1					
	不明	9	6	0	6					2	4	1	2				
冷凍加熱用飲茶	あり	29	0	0	0			14	2	13							
	なし	4	1	0	1						1	1	1				
	不明	0															
凍結加熱用飲茶	あり	0															
	なし	0															
	不明	6	2	1	1			1	1	1	1	1	1				1
その他飲茶	あり	1	0	0	0												
	なし	0															
	不明	16	0	0	0			11	1	3	1						

表 7. 続き

食品カテゴリー	凍結前加熱	検体数	coliforms	E. coli	Enterobacteriaceae	生菌数(cfu/g)											
						0	<10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷				
冷凍加熱用野菜	あり	0															
	なし	40	0	0	0				10	18	7	3					
	不明	0															
冷凍生食用野菜果物	あり	4	2	0	3						4						
	なし	13	3	1	3				2	3	3	1					
	不明	18	1	1	1				4	2							
凍結生食用野菜果物	あり	0															
	なし	0															
	不明	9	2	0	2				1	2	1						
冷凍生食用魚介類	あり	0															
	なし	0															
	不明	1	0	0	0												
凍結生食用魚介類	あり	0															
	なし	0															
	不明	5	1	0	1				2	1							1

* : >3×10⁵

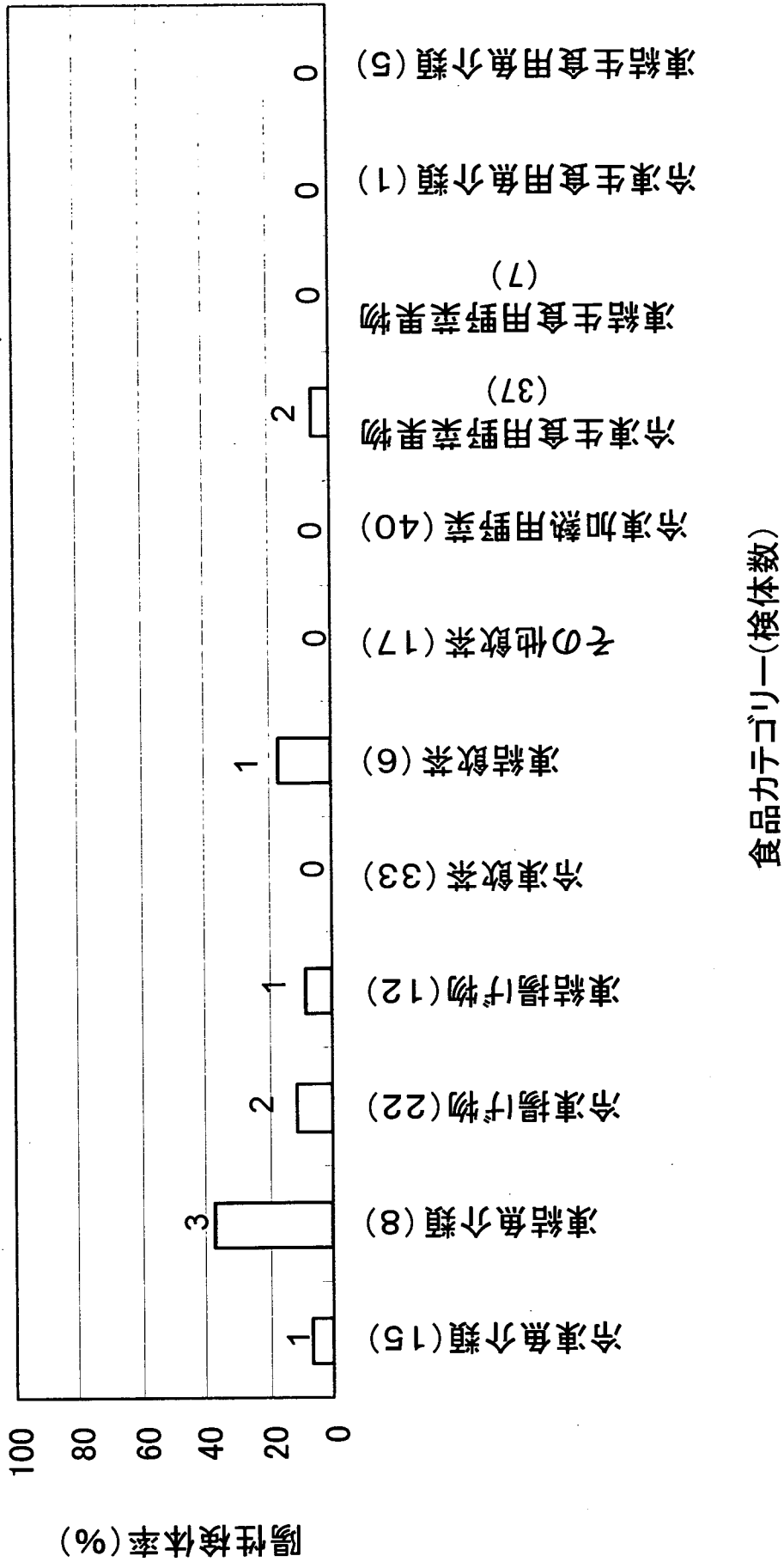
図1. coliformsの分離状況



白: 冷凍食品、灰色: 凍結食品
 棒グラフ上の数字は陽性検体数
 P value: 冷凍食品と凍結食品の陽性率検定結果

図2. presumptive *E. coli* の分離状況

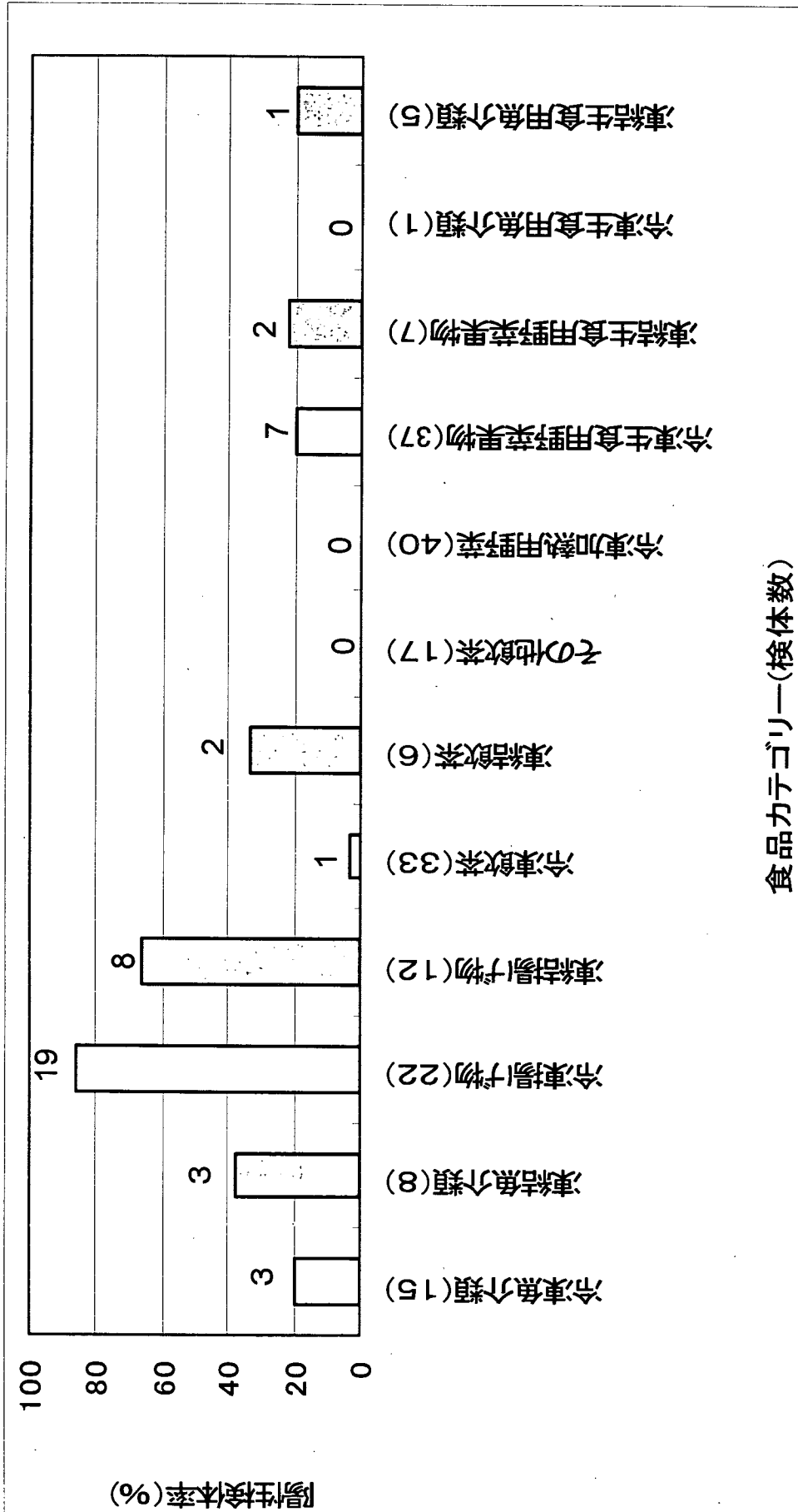
p value: 0.0632, 0.9407, 0.0175, 0.529



白: 冷凍食品、灰色: 凍結食品
 棒グラフ上の数字は陽性検体数
 P value: 冷凍食品と凍結食品の陽性率検定結果

図3. Enterobacteriaceaeの分離状況

p value: 0.3627, 0.1747, 0.0104, 0.5615



白: 冷凍食品、灰色: 凍結食品
 棒グラフ上の数字は陽性検本数
 P value: 冷凍食品と凍結食品の陽性率検定結果

冷凍食品の安全性確保に関する研究

分担研究者	小沼博隆	東海大学海洋学部水産学科
協力研究者	増田高志	静岡県環境衛生科学研究所
	原田哲也	静岡県環境衛生科学研究所
	三輪憲永	東海大学短期大学部
	小澤一弘	株式会社中部衛生検査センター

研究要旨；冷凍食品ならびに冷凍流通品の微生物汚染状況を把握するため、加熱用揚げ物類 34 検体と加熱用飲茶類 56 検体について、ISO 法による coliforms・presumptive *E.coli*・Enterobacteriaceae および告示法による SPC の検査を行った。coliforms は揚げ物類 29 検体、飲茶類 3 検体、presumptive *E.coli* は揚げ物類 3 検体、飲茶類 1 検体、Enterobacteriaceae は揚げ物類 27 検体、飲茶類 3 検体で陽性であった。SPC については、揚げ物類 2 検体が $>3.0 \times 10^5$ であり、規格基準 (3.0×10^6) から逸脱する可能性が示唆された。揚げ物類については、ほとんどの製品で冷凍あるいは凍結前に加熱処理がされていないため、原材料の微生物汚染が各検査結果に影響したと考えられた。

A. 研究目的

現在、わが国において冷凍状態で流通する食品の中には食品衛生法に規定される冷凍食品のほかに、 -15°C 以上の温度で冷凍されている食品や販売時に冷蔵されるフローゾンチルド食品など、多種多様である。しかし冷凍食品以外の冷凍温度帯で販売される食品については特に定められた基準はなく、流通実態および微生物学的衛生状態についても系統的な調査が行われていないのが現状である。そこで今回は冷凍流通食品の微生物汚染実態調査を行い、将来、冷凍食品の定義の見直しも含め、冷凍流通食品全体の規格基準を考え直す際の科学的知見の収集を本研究の目的とした。

B. 研究方法

加熱用揚げ物類 34 検体(冷凍食品 22 検体、冷凍流通食品 12 検体)【表 1】および加熱用飲茶類 56 検体(冷凍食品 33 検体、冷凍流通品 6 検体、その他 17 検体)【表 3】について、冷凍食品ならびに規格基準の定められていない冷凍流通品(様々な冷蔵・冷凍温度帯で流通)を対象

として国際的食品検査法の一つである ISO 法および告示法を用いて、微生物汚染状況を調査

した。商品名、加熱処理の有無、製品表示等を記録した後、冷蔵庫内で半解凍し表面温度を赤外放射温度計(tes 社製 Quicktemp850-2)にて測定後、微生物検査を行った。今回はそれぞれの検体に対して coliforms・presumptive *E.coli*・Enterobacteriaceae および SPC について調査した。coliforms は ISO4832 法、presumptive *E.coli* は ISO7251 法、Enterobacteriaceae は ISO21528-2 法、SPC については告示法に従った。なお、SPC の測定は培養条件を 24 時間 37°C とした。

C. 研究結果【表 2 および表 4】

coliforms は揚げ物冷凍食品 20 検体(90.9%)、揚げ物冷凍流通品 9 検体(75.0%)、飲茶冷凍食品 1 検体(3.0%)、飲茶冷凍流通品 2 検体(33.3%)から検出され、presumptive *E.coli* については揚げ物冷凍食品 2 検体(9.1%)、揚げ物冷凍流通品 1 検体(8.3%)、飲茶冷凍流通品 1 検体(16.7%)

から検出された。さらに、Enterobacteriaceae は揚げ物冷凍食品 19 検体(86.4%)、揚げ物冷凍流通品 8 検体(66.7%)、飲茶冷凍食品 1 検体(3.0%)、飲茶冷凍流通品 2 検体(33.3%)から検出された。一般生菌数は揚げ物冷凍食品 2 検体で $>3.0 \times 10^5$ となり、規格基準(3.0×10^6)を超える可能性が示された。

D.E 考察および結論

加熱用揚げ物類ならびに加熱用飲茶類は、食肉あるいは魚介類など比較的微生物汚染度の高いものが原材料として使用されている。今回検体とした加熱用揚げ物類は、ほとんどが冷凍前に加熱処理されておらず、原材料の微生物汚染が検査結果に大きく影響したと考えられる。一方、加熱用飲茶類については凍結前加熱処理が行われていた検体が多く、低い微生物汚染度であった。

加熱用揚げ物類では冷凍食品と冷凍流通品で微生物汚染度に差はなく、各検査項目とも類似する傾向がみられた。一方、加熱用飲茶類では飲茶冷凍食品に比べ、飲茶冷凍流通品の方が高い汚染度を示す検体の割合が大きかった。しかし、供試検体が飲茶冷凍食品 33 検体に対し飲茶冷凍流通品が 6 検体であったため、さらなる検体について今後、追加する必要がある。

F. 研究発表

論文発表および学会発表共になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし。

表1 揚げ物類検体一覧

No.	商品名	凍結前 加熱	摂取前 加熱	表示保存 温度℃	秤量時表 面温度℃	表示	原産国
1	豚ロース串カツ	無	要	-18℃以下	7.0	冷凍食品	中国
2	ホタテ貝柱串カツ	無	要	-18℃以下	0.0	冷凍食品	中国
3	うずら卵串カツ	無	要	-18℃以下	0.5	冷凍食品	中国
4	イカ身串カツ	無	要	-18℃以下	1.0	冷凍食品	中国
5	メンチカツ	無	要	-18℃以下	3.0	冷凍食品	
6	ハムカツ	無	要	-18℃以下	3.0	冷凍食品	
7	メンチカツ	無	要	-18℃以下	2.5	冷凍食品	
8	ハムフライ	無	要	-18℃以下	2.0	冷凍食品	
9	カニクリームコロッケ	無	要	-18℃以下	3.5	冷凍食品	
10	海老クリームコロッケ	無	要	-18℃以下	0.0	冷凍食品	
11	オニオンフライ	無	要	-18℃以下	0.0	冷凍食品	中国
12	ホタテホワイトソースコロッケ	無	要	-18℃以下	-1.5	冷凍食品	
13	コーンホワイトソースコロッケ	無	要	-18℃以下	-0.5	冷凍食品	
14	クノーデル	無	要	-18℃以下	0.0	冷凍食品	
15	オニオンフライ	無	要	-18℃以下	1.5	冷凍食品	中国
16	ミートコロッケ	無	要	-18℃以下	0.0	冷凍食品	
17	牛肉コロッケ	無	要	-18℃以下	-2.0	冷凍食品	
18	野菜コロッケ	無	要	-18℃以下	-3.0	冷凍食品	
19	さつまいもコロッケ	無	要	-18℃以下	1.0	冷凍食品	中国
20	冷凍コロッケ	無	要	-18℃以下	-3.5	冷凍食品	
21	冷凍コロッケ	無	要	-18℃以下	-3.5	冷凍食品	
22	フライ	有	要	-18℃以下	0.5	冷凍食品	中国
23	はんぺんフライ	記載なし	要	-18℃以下	1.0	記載なし	
24	カニ爪フライ	記載なし	要	-18℃以下	0.0	そうざい半製品	
25	ハッシュポテト	記載なし	要	-5℃以下	-2.5	そうざい半製品	中国
26	牛肉コロッケ	記載なし	要	-5℃以下	-3.0	そうざい半製品	
27	ビーフコロッケ	記載なし	要	-5℃以下	-1.0	そうざい半製品	
28	カニクリームコロッケ	記載なし	要	-5℃以下	-5.5	そうざい半製品	
29	メンチカツ	記載なし	要	-5℃以下	0.5	そうざい半製品	
30	ミニ豚串カツ	記載なし	要	-5℃以下	-0.5	そうざい半製品	中国
31	ほたてフライ	記載なし	要	-10℃以下	0.5	そうざい半製品	
32	牛肉コロッケ	記載なし	要	-5℃以下	-1.0	そうざい半製品	
33	グラタンコロッケ	記載なし	要	記載なし	0.0	そうざい半製品	
34	グラタンコロッケ	記載なし	要	記載なし	-3.5	そうざい半製品	