

200837028A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

## 冷凍食品の安全性確保に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 春日 文子

平成21（2009）年3月

# 冷凍食品の安全性確保に関する研究

主任研究者 春日 文子

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

冷凍食品の安全確保に関する研究.....	1
春日 文子	

### II. 分担ならびに委託研究報告

#### 1. 微生物汚染実態調査

1-1. 冷凍食品及び凍結品の汚染実態調査.....	7
小沼 博隆、岡田 由美子 他	
1-2. 「冷凍食品の安全性確保に関する研究」における冷凍流通食品の微生物汚染実態調査...25	
小沼 博隆 他	
1-3. 「冷凍食品の安全性確保に関する研究」冷凍流通食品の微生物汚染実態調査.....33	
財団法人 日本食品分析センター	
1-4. 「冷凍食品の安全性確保に関する研究」冷凍流通食品の微生物汚染実態調査.....47	
財団法人 日本冷凍食品検査協会	
2. 「冷凍食品の安全性確保に関する研究」におけるリステリアを用いた低温保存試験.....59	
(中間報告)	
小沼 博隆 他	
3. 「冷凍食品の安全性確保に関する研究」における海外の食品微生物規格基準調査.....63	
株式会社 三菱総合研究所	
4. 食品安全の数的指標ならびに微生物汚染の確率分布を前提とした規格基準設定理論の整理.....121	

平成 20 年度 分担研究者・協力研究者

分担研究者

- 小沼 博隆 東海大学海洋学部水産学科  
 岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究協力者 五十音順

- 浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所  
 飯田 奈都子 静岡県環境衛生科学研究所 微生物部  
 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
 池本 尚人 サントリー商品開発センター飲料開発設計部  
 井原 直人 日本水産株式会社  
 宇田川 藤江 財団法人日本食品分析センター微生物部  
 小笠原 義博 イオン株式会社品質管理部  
 小澤 一弘 株式会社中部衛生検査センター  
 片山 博視 株式会社ニチレイフーズ品質保証部  
 黒瀬 直孝 株式会社生活品質科学研究所関西検査センター  
 国分 公男 株式会社生活品質科学研究所食品サポート統括部  
 小暮 実 中央区保健所生活衛生課  
 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部  
 笹尾 直邦 株式会社ニチレイ 品質保証部 食品安全センター  
 信原 篤廣 キューピー研究所 基盤技術センター 微生物研究室  
 佐藤 篤志 株式会社ニチレイ 品質保証部  
 澤田 千尋 財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター  
 島原 義臣 株式会社ニチレイ品質保証部食品安全センター  
 進藤 博且 株式会社ニチレイフーズ品質保証部  
 椛谷 康一 サラヤ株式会社バイオケミカル研究所  
 杉山 恵 株式会社三菱総合研究所社会システム研究本部  
 竹村 壘 財団法人日本冷凍食品検査協会関西事業所  
 田中 廣行 財団法人 日本食品分析センター 微生物部  
 藤平 幸男 株式会社アクセス商品本部食品安全管理部  
 豊留 敏郎 財団法人日本冷凍食品検査協会技術部  
 長田 共未 財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター  
 西村 知行 イオン株式会社品質管理部  
 長谷川 専 株式会社三菱総合研究所社会システム研究本部  
 花岡 頼子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
 原田 眞 財団法人日本冷凍食品検査協会  
 増田 高志 静岡県環境衛生科学研究所微生物部  
 源 竜弥 ㈱町田子防衛生研究所  
 三輪 憲永 東海大学短期大学部  
 武藤 憲永 株式会社イトーヨーカ堂 QC 室  
 森田 裕之 SGS ジャパン株式会社  
 山口 健太郎 株式会社三菱総合研究所社会システム研究本部  
 山田 彰一 日本水産株式会社食品分析センター技術開発課  
 山本 健 社団法人日本冷凍食品協会品質管理部  
 横山 和弘 イオン商品調達株式会社ステーブル調達統括部  
 吉田 朋高 財団法人 食品分析開発センターSUNATEC

I. 総括研究報告

平成20年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
総括研究報告書

冷凍食品の安全性確保に関する研究

研究代表者 春日 文子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部室長

研究要旨：

冷凍食品の安全性確保のために冷凍食品の規格基準のあり方を再検討するための基礎研究として、本研究では、冷凍食品ならびに他の低温度帯で保存され流通する食品の実態ならびに微生物汚染状況を把握し、さらに科学的な規格基準設定の理論を構築することを目的としている。暫定的に、冷凍食品以外の『冷凍流通食品』を「冷凍状態で出荷され、流通過程で保存温度条件が変更され、冷凍・冷蔵・常温で販売される食品」と定義し、凍結品やフローズンチルド食品、解凍後常温販売食品等を含むものとした。昨年度研究において実施した冷凍流通食品の流通実態把握と限定的な微生物汚染実態調査の結果に基づき、本年度は、1) 集中的な微生物汚染実態調査を実施するとともに、2) 冷凍保存試験の条件検討と予備試験、3) 海外の食品微生物規格調査、そして4) 微生物汚染の確率分布を前提とした規格基準設定理論の整理を行った。

微生物規格を持つ冷凍食品と規格のない凍結品について、一般生菌数と2種の衛生指標菌、presumptive *Escherichia coli* (推定大腸菌) 及び *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科)、3種の病原菌、*Staphylococcus aureus*、*Salmonella* 及び *Vibrio parahaemolyticus* の汚染状況を調査した。検査は国際的な標準法である ISO 法或いは国際的標準法と同等の試験法に従って行い、昨年度の本研究で汚染率が高い傾向を示した魚介類、揚げ物、飲茶類を対象とした。その結果、凍結品の一般生菌数が、冷凍食品の微生物規格に当てはめた場合違反となるレベルを示すものがあった。また、*Enterobacteriaceae* の汚染率は飲茶類において凍結品が冷凍食品よりも有意に高く、presumptive *E. coli* の分離率は揚げ物類と飲茶類で凍結品が冷凍食品よりも有意に高い結果を示した。魚介類では、*S. aureus* の分離率が凍結品で冷凍食品よりも有意に高かった。

次に、低温発育菌であるリステリアを用いて冷凍および冷蔵温度帯での予備保存試験を行った。滅菌豚挽き肉中に添加した菌は、5～15℃の範囲では、温度が高くなるにつれて増殖速度が速くなる傾向があった。一方、0℃および-5℃では7日後でも菌数の変化はあまりみられず、-15℃では7日後に減少し、菌の損傷を示唆した。

コーデックス、EU、イギリス、スイス、オーストラリア、NZ、アメリカ、韓国を対象とし、冷凍食品および関連食品の規格基準の調査を行った。多くの国、地域において、食品群別に微生物規格が設定され、冷凍食品に特化した規格は限られていた。また病原体の規格を持つところが多かった。規格の適用箇所も、製造工程や店頭販売時などのように、規定されていた。

コーデックス委員会では、喫食時の安全目標値 FSO と、フードチェーンのより上流において FSO を満たすような目標値 PO、さらにそれら目標値を担保するような食品規格基準の設定の枠組みが提示され、具体的な設定のあり方が議論されている。また、確率論に基づくサンプリングプランを微生物規格基準に含む考え方もある。本研究では、これらの概念を先駆的にまとめた ICMSF による Microorganisms in Foods No. 7 を理解して整理することにより、冷凍食品を例として、微生物汚染の確率分布を前提とした規格基準設定理論を構築するための準備とした。

規格基準の適用されない類似の食品が類似の温度帯で流通している状況は、科学的に正当化されにくいと考えられる。冷凍食品とその他の冷凍流通食品とは、基本的に同じ方針で扱われることが妥当であると考えられ、食品微生物規格について、海外の最新動向も参照しつつ、再検討することが必要である。

#### 分担研究者

小沼博隆 東海大学海洋学部水産学科教授  
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部主任研究官

### A. 研究目的

現在、わが国において、冷凍状態で出荷された後、低温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、 $-15^{\circ}\text{C}$ 以上の温度で冷凍されている食品や、いわゆるフローズンチルド品など、販売までの時点で温度帯と期限設定を変更される多様な食品がある。これらの食品のうち、保存基準と成分規格が定められているのは冷凍食品のみであり、他の冷凍温度帯で流通する食品については、特に定められた規格基準はなく、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。

一昨年、冷凍パン生地への冷凍食品成分規格適用の変更について食品安全委員会に諮問が行われた際、食品安全委員会からは、冷凍食品全体についても規格の変更を含む再検討を行うよう答申があった。しかし冷凍流通食品の微生物汚染状況によっては、将来、冷凍流通食品全体の規格基準を考え直す必要が出てくると考えられた。

そこで、本研究は、冷凍食品の規格基準再検討のための基礎研究として、該当食品の流通実態と微生物汚染状況を把握し、さらに科学的な規格基準設定の理論を構築することを目的としている。昨年度に実施した冷凍流通食品の流通実態把握と限定的な微生物汚染実態調査の結果に基づき、本年度は、1) 集中的な微生物汚染実態調査、2) 冷凍保存試験の条件検討と予備試験、3) 海外の食品微生物規格調査、そして 4) 微生物汚染の確率分布を前提とした規格基準設定理論の整理を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 冷凍食品および凍結品の汚染状況検査

研究分担者と研究協力者、委託調査機関が分担して、一般の小売店で購入した、冷凍食品 199 検体、凍結品 165 検体の計 364 検体について検査を行った。内訳は、魚介類 116 検体、揚げ物類 141 検体及び飲茶類 107 検体である。検体は全て $-10^{\circ}\text{C}$ 以下で流通しているものとしたが、一部、予備的にチルド流通食品についても調査した。

衛生指標菌については、昨年度の本研究で作成した ISO7251 (presumptive *E. coli* の MPN 検出法) 及び ISO21528-2 (Enterobacteriaceae の colony count 検出法) の日本語マニュアル、工程チェックシート及びサブワークシートを用

いた。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 (2007) を参照した。一般生菌数に関しては、基本的に告示法に基づきつつ検体希釈水と希釈倍率を ISO 法に準じた形で試験した。病原菌については、現在厚生労働科学研究費補助金 食の安心安全総合研究事業「食中毒菌の標準試験法に関する研究」班で検討している、国際的標準法と同等の試験法である NIHSJ-01 (*Salmonella*)、NIHSJ-03 (*S. aureus*)、NIHSJ-06 (*V. parahaemolyticus*) を用いた。

## 2. 冷凍保存試験の条件検討と予備試験

滅菌豚挽き肉 25g に *Listeria monocytogenes* (ATCC19115) を  $10^6$ cfu/g 添加し、-15、-5、0、5、10、15°C の温度帯で保存した。予備試験による調整を経て、温度帯によって 7~42 日間保存後、菌数を測定する (n=3) 実験計画を設定した。菌数測定は、ISO11290-2:1998/Amd.1 2004(E) を基礎とする NIHSJ-09-ST1 法に準じて行ったが、検体の調整には BPW(MERCK)、選択分離培養にはクロモアガー・リステリア培地 (CHROMagar) を用いた。

## 3. 海外の食品微生物規格調査

### 3-1. 調査対象国・機関

調査対象国・機関は、表 1 に示す 8ヶ国・機関とした。なお、オーストラリアとニュージーランド (以下、NZ) については同一の規格基準が適用されるため、一体的に取り扱うものとした。

表 1 調査対象国・機関

分類	調査対象国・機関
国際機関	CODEX
欧州	EU
	イギリス
	スイス
オセアニア	オーストラリア
	NZ

北米	アメリカ
アジア	韓国

### 3-2. 調査内容

各国政府の公開資料をもとに、以下の 2 点について調査を実施した。

- ・微生物規格基準のある食品の分類ならびにフードチェーンにおける適用箇所、規格基準の位置づけ (規制のための規格基準 (Mandatory) であるか自主規格基準 (Voluntary) であるか)
- ・冷凍食品に特化した規格基準の有無について

## 4. 食品安全の数的指標ならびに微生物汚染の確率分布を前提とした規格基準設定理論の整理

摂食時安全目標値 FSO や達成目標値 PO と関係付け、さらに微生物汚染の確率分布を考慮に入れながら食品微生物規格を設定する理論を整理するために、毎月、研究分担者や研究協力者とともに、国際食品微生物規格委員会 (International Commission for Microbiological Specifications for Foods: ICMSF) 作成による Microorganisms in Food No.7 の輪読会を開き、内容を理解しつつ、要点をまとめた。

## C. 研究結果

### 1. 冷凍食品および凍結品の汚染状況検査

衛生指標菌の汚染率は presumptive *E. coli* 及び Enterobacteriaceae 共に凍結品で冷凍食品よりも高い分離率を示し、presumptive *E. coli* については有意な差がみられた。食品カテゴリー別に見た汚染状況では、揚げ物類と飲茶類の一般生菌数は冷凍食品よりも凍結品で高い傾向が示され、冷凍食品の微生物規格に当てはめた場合に違反となる検体も凍結品の揚げ物で 3 検体、同じく飲茶で 1 検体みられた。Enterobacteriaceae については、魚介類と揚げ

物類では凍結品及び冷凍食品の分離率に差は見られなかったが、飲茶類では凍結品からの分離率が冷凍食品よりも有意に高かった ( $p<0.01$ )。Presumptive *E. coli* においては、揚げ物類と飲茶類で凍結品からの分離率が冷凍食品よりも有意に高い結果を示した (揚げ物類  $p<0.01$ 、飲茶類  $p<0.05$ )。魚介類では差は見られなかった。病原菌については、魚介類からの *S. aureus* の分離率が凍結品で有意に高かった ( $p<0.05$ )。また、揚げ物類を原料により「肉を含むもの」「魚介類を含むもの」「その他」の3種類に分類して結果を集計すると、「肉を含むもの」と「その他」の2カテゴリーにおいて、推定大腸菌の分離率が凍結品で冷凍食品よりも有意に高い結果が示された (「肉を含むもの」  $p<0.01$ 、「その他」  $p<0.05$ )。また、冷凍温度帯で流通され、冷凍食品や凍結品よりも高い温度帯で販売されるチルド食品の試験的調査の結果からは、和洋生菓子以外の3カテゴリー、魚介類及びその加工品、肉類及びその加工品及び飲茶類からは比較的高い汚染率で衛生指標菌が分離されていた。

社団法人日本冷凍食品協会ならびに財団法人日本冷凍食品検査協会による2007年度の微生物汚染状況の検査の結果、1,013検体中大腸菌群が加工用水産品で7検体、サルモネラが非加熱調理品で4検体から検出された。尚、加熱済調理品並びに無加熱調理品では問題のあるものはなかった。

(小沼・岡田他分担研究報告書、小沼他分担研究報告書、財団法人日本食品分析センター委託報告書、財団法人日本冷凍食品検査協会委託報告書)

## 2. 冷凍保存試験の条件検討と予備試験

滅菌豚挽き肉 25g に  $10^6$ cfu/g 添加した *Listeria monocytogenes* の菌数は、5°Cでは4日後  $10^5$ cfu/g、7日後  $10^6$ cfu/g と増加し、10°Cでは2日後  $10^5$ cfu/g、4日後  $10^7$ cfu/g、7日後  $10^8$ cfu/g と増加していた。15°Cでは2日後

$10^8$ cfu/g、4日後  $10^9$ cfu/g と増加し、7日後も  $10^9$ cfu/g であった。0°Cおよび-5°Cでは7日後も  $10^6$ cfu/g と初期菌数から変化はなかったが、-15°Cでは7日後  $10^8$ cfu/g と減少していた。

(小沼他分担研究報告書)

## 3. 海外の食品微生物規格調査

調査対象とした8ヶ国・機関においては、概ね肉・肉製品、乳・乳製品、卵・卵製品、水産品、果実・野菜・これらの製品、乳幼児・特定医療目的の食品、飲用水を中心に微生物規格基準が規定されていた。

微生物規格基準の適用箇所は、食品安全規格基準として設定されている規格基準については店頭販売時、衛生工程規格基準として設定されている規格基準については製造工程終点 (最終製品) とされているものが多かった。

各調査対象国・機関の微生物規格基準の位置づけ (拘束力) は、国際機関である Codex の微生物規格基準や、EU の飲用水以外の食品に関する衛生工程規格基準および飲用水に関する微生物規格基準については、加盟各国の自由裁量の余地を残す自主規格基準となっていた。また、アメリカの政府等の調達仕様である CID も調達主体が共通に使用する自主規格基準という位置づけである。これらを除く微生物規格基準は規制のための規格基準となっている。なお、EU の飲用水以外の食品に関する食品安全規格基準は Regulation として規定されており、EU 加盟国における国内法の制定を必要とすることなく適用される規格基準となっている。

冷凍食品に特化した規格基準を有する国は、8ヶ国・機関のうち、アメリカと韓国の2ヶ国のみであった。アメリカでは、個別の冷凍食品品目が自主規格基準である CID に位置づけられている。一方、韓国では規制のための規格基準において冷凍食品という食品分類が設定されて、その規格基準が規定されている。

(三菱総合研究所委託報告書 (委託内容指示 :

春日))

#### 4. 食品安全の数的指標ならびに微生物汚染の確率分布を前提とした規格基準設定理論の整理

食品微生物規格を、摂食時安全目標値 FSO や達成目標値 PO と関係付けつつ、さらに微生物汚染の確率分布を考慮に入れながら設定する基礎理論を整理した。

(春日・岡田他分担研究報告書)

### D. 考察

#### 1. 冷凍食品および凍結品の汚染状況検査

今回の調査の結果、国内で一般に流通している凍結品の衛生指標菌と黄色ブドウ球菌の汚染状況が冷凍食品よりも高い傾向が示された。中でも肉を原料に含む揚げ物類で、推定大腸菌の検出率に大きな差がみられ、凍結品の汚染が原料に由来する可能性が示唆された。冷凍食品では定められた規格基準を逸脱しないように製造工程に工夫がなされている上、製造後出荷前に微生物検査を行うことが可能であるため、検査結果が規格基準に合致する製品のみを出荷しているとも考えられる。一方で、餃子などでは、冷凍食品には製造工程において加熱処理がなされるものが多く、凍結品ではいわゆる生餃子であることが多いなど、必ずしも同一食品群とは分類できない場合があることについても今後検討が必要と思われた。しかし、冷凍食品の規格基準の適用されない、内容的にも類似する凍結品が、類似の冷凍温度帯で流通している状況は、科学的に正当化されにくいと考えられる。冷凍食品とその他の冷凍流通食品とは、基本的に同じ方針で扱われることが妥当であると考えられ、微生物規格について今後の再検討が必要である。

#### 2. 冷凍保存試験の条件検討と予備試験

冷蔵温度帯では温度が高くなるにつれて *L. monocytogenes* の増殖速度が速くなる傾向が

あった。一方、 $-15^{\circ}\text{C}$ では、保存食品中の *L. monocytogenes* は損傷を受けて見た目の菌数が減少することが示唆された。

#### 3. 海外の食品微生物規格調査

調査対象とした国・地域の多くでは、冷凍食品に特化した微生物規格は設定されておらず、食品群を大きく原材料によって分類し、それぞれに病原菌を含む微生物規格が設けられていた。また、微生物規格の適用箇所も店頭販売時、製造工程終点などと明示されている国が多かった。これらの現状は、今後、わが国の食品微生物規格基準を新たに設定する場合や見直す際、参照できるものと考えられる。

#### 4. 食品安全の数的指標ならびに微生物汚染の確率分布を前提とした規格基準設定理論の整理

FSO や PO、PC の概念は、コーデックス委員会で定義が合意されたものの、それらの数的指標と連結して実際の食品微生物規格基準が設定された事例は、世界的にもまだ少ない。さらに、微生物汚染の確率分布を前提としたサンプリングプラン理論は、わが国の微生物規格にはほとんど取り入れられていない。今年度輪読の対象とした成書はこれら理論の基礎を示しており、参考になった。現在、国際学会でも、数的指標に基づく規格基準設定の具体化に関するシンポジウムやサンプリングプランに関するワークショップなどが開催されており、最新の国際動向をタイムリーに把握することが、わが国の食品微生物規格基準の将来を考える上で必須であると考えられる。

### E. 結論

- 国内で一般に流通している凍結品の衛生指標菌と黄色ブドウ球菌の汚染状況が冷凍食品よりも高い傾向が示された。現状では、冷凍品における微生物規格基準の存在が、その

微生物汚染の制御に有益に関与していると思われた。一方、規格基準の適用されない類似の食品が類似の温度帯で流通している状況は、科学的に正当化されにくいと考えられる。冷凍食品とその他の冷凍流通食品とは、基本的に同じ方針で扱われることが妥当であると考えられ、微生物規格について今後の再検討が必要である。

- 海外の食品微生物規格には、主要原材料による規格基準設定対象の食品分類法、病原体の規格、規格適用箇所の規定など、わが国の冷凍食品の規格には含まれていない事項が認められた。
- 次年度は、冷凍保存試験を継続するとともに、更に多くのチルド食品や、冷凍温度帯で流通した後に常温で販売される食品群についてもその汚染実態を把握する。また、FSOなどの数的指標と連携させた微生物規格のあり方、確率論に基づくサンプリングプランを含めた微生物規格について、国際動向の情報収集ならびに事例研究を行う。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

春日文子

国際的な微生物規格基準設定の考え方

食品微生物学会雑誌、25 (1)、13-17、2008

### 2. 学会発表

岡田由美子、小沼博隆、五十君静信、関 龍雄、澤田千尋、森 久子、坂口真理、田中廣行、宇田川藤江、小澤一弘、三輪憲永、増田高志、原田哲也、春日文子 冷凍食品及び凍結食品の微生物汚染実態調査 第146回日本獣医学会 宮崎 2008年9月

岡田由美子 冷凍食品の流通実態と安全性確保への展望 第30回日本食品微生物学会学術セミナー 静岡 2008年10月

Fumiko Kasuga

Risk Assessment & Risk Management Activities in Japan

Conference on Current and Innovative Approaches in Microbiological Food Safety Management, October 21, 2008, New Delhi, India

森久子、岡田由美子、坂口真理、関龍雄、澤田千尋、齋藤利江、小沼博隆、五十君静信、春日文子 ISO法に基づく汚染指標菌検出法の検討及び冷凍流通食品の汚染実態調査 (1) 第29回日本食品微生物学会 広島 2008年11月

坂口真理、岡田由美子、森久子、関龍雄、澤田千尋、永田朝美、小沼博隆、五十君静信、春日文子 ISO法に基づく汚染指標菌検出法の検討及び冷凍流通食品の汚染実態調査 (2) 第29回日本食品微生物学会 広島 2008年11月

春日文子

ICMSFによる微生物規格基準設定の考え方 第29回日本食品微生物学会学術総会シンポジウム、広島、2008年11月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## II. 分担ならびに委託研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

冷凍食品及び凍結品の汚染実態調査

研究分担者	小沼博隆	東海大学海洋学部水産学科
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	田中廣行	財団法人日本食品分析センター
	宇田川藤江	財団法人日本食品分析センター
	豊留敏郎	財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター
	沢田千尋	財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター
	長田共未	財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター
	竹村 塁	財団法人日本冷凍食品検査協会関西事業所
	原田 眞	財団法人日本冷凍食品検査協会
	山本 健	社団法人日本冷凍食品協会
	三輪憲永	東海大学短期大学
	増田高志	静岡県環境衛生科学研究所
	飯田奈都子	静岡県環境衛生科学研究所
	小澤一弘	株式会社中部衛生検査センター

研究要旨

様々な温度帯や流通形態の冷凍流通食品の微生物汚染実態を把握する目的で、 $-15^{\circ}\text{C}$ 以下で流通し、微生物規格を持つ冷凍食品と、同様の温度で流通しているものの規格のない凍結品について、一般生菌数と2種の汚染指標菌、presumptive *Escherichia coli*（推定大腸菌）及び Enterobacteriaceae（腸内細菌科）、3種の病原菌、*Staphylococcus aureus*、*Salmonella* 及び *Vibrio parahaemolyticus* の汚染状況を調査した。検査は国際的な標準法である ISO 法或いは国際標準法と同等の試験法に従って行い、昨年度の本研究で汚染率が高い傾向を示した魚介類、揚げ物、飲茶類の3カテゴリーの調査を実施した。その結果、揚げ物類と飲茶類で凍結品の一般生菌数が冷凍食品の微生物規格に当てはめた場合違反となるレベルを示した。また、Enterobacteriaceae の汚染率は飲茶類において凍結品が冷凍食品よりも有意に高く、presumptive *E. coli* の分離率は揚げ物類と飲茶類で凍結品が冷凍食品よりも有意に高い結果を示した。魚介類では、*S. aureus* の分離率が凍結品で冷凍食品よりも有意に高かった。

A. 研究目的

（清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品、魚肉ねり  
「冷凍食品」とは「製造し、又は加工した食品 製品、ゆでだこ及びゆでがにを除く）及び切り

身又はむき身にした鮮魚類（生かきを除く）を凍結させたものであって、容器包装に入れられたもの」（昭和34年厚生省告示より）

であるが、現在国内では冷凍食品以外にもほぼ冷凍食品と同様の温度帯で流通、販売されているが「冷凍食品」の表示がない食品、冷凍食品の流通規格である $-15^{\circ}\text{C}$ 以下よりも高い $-10^{\circ}\text{C}$ 程度で販売される食品など、様々な冷凍流通食品が販売されている。また、スーパーマーケット等の小売店において冷蔵あるいは室温で販売されている食品にも、流通時には凍結状態で輸送され、販売までの時点で温度帯と期限設定を変更されるものが数多くみられる。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。本研究では、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。昨年度の本研究では、様々な食品群についてその汚染実態の傾向を明らかにする目的で、冷凍食品と凍結品のうち、加熱用及び生食用魚介類、加熱用及び生食用野菜果物類、飲茶類、揚げ物類の7カテゴリーについて、coliforms、Enterobacteriaceae及びpresumptive *E. coli*の3種の衛生指標菌の汚染実態の調査を行った。その結果、加熱用魚介類及び飲茶類で凍結品の衛生指標菌汚染率が冷凍食品よりも高い傾向が示され、また、揚げ物類では冷凍食品、凍結品共に高い汚染率を示した。そこで本年度は、冷凍食品と凍結品の魚介類、飲茶類及び揚げ物類を対象を限定してそれぞれ100検体以上の検体数について、衛生

指標菌2種（Enterobacteriaceae及びpresumptive *E. coli*）に3種の病原体（*Salmonella*、*Staphylococcus aureus*、*Vibrio parahaemolyticus*）を加えた汚染実態調査を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 冷凍食品および凍結品の汚染状況検査

#### 1. 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199検体、凍結品165検体の計364検体について調査を行った（表1）。検体は全て $-10^{\circ}\text{C}$ 以下で流通しているものとした。内訳は、魚介類116検体、揚げ物類141検体及び飲茶類107検体であった。購入検体は試験開始まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保管し、開始数時間前に試験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。また、予備的調査として、 $-5^{\circ}\text{C}$ から $5^{\circ}\text{C}$ で販売されているいわゆるチルド品について、24検体を一般のスーパーマーケットで購入し、衛生指標菌の汚染状況について調査を行った（表2）。なお、各検体の詳細については、調査を実施した試験機関毎の報告書と表4-1及び5-1に示した。

#### 2. 1 検査法

衛生指標菌については、昨年度の本研究で作成したISO7251（presumptive *E. coli*のMPN検出法）及びISO21528-2（Enterobacteriaceaeのcolony count検出法）の日本語マニュアル、工程チェックシート及びサブワークシートを用

いた。コロニー数の算出法等、微生物試験の一般的な事項については ISO7218 (2007) を参照した。病原菌については、現在厚生労働科学研究費補助金「食の安心安全総合研究事業「食中毒菌の標準試験法に関する研究」班で検討している国際的標準法と同等の試験法である NIHSJ-01 (*Salmonella*)、NIHSJ-03 (*S. aureus*)、NIHSJ-06 (*V. parahaemolyticus*) を用いた。

## 2. 2 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、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$  の孵卵器で 24 及び  $48 \pm 2$  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、 $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$  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  $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$  24~48 $\pm 2$  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  $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に保持したペプトン水 (Oxoid) に接種し、恒温水槽内で  $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で  $48 \pm 2$  時間培養した。培養終了後、インドール試薬 (Merck) 0.5 ml 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. 3 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、 $45^\circ\text{C}$  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) 10 ml

を注いで混和した。固化したのち 15 ml の同培地を重層し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $24 \pm 2$  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  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $24 \pm 2$  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 (日本) 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、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $24 \pm 2$  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. 4 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。

## 2. 5 *Staphylococcus aureus* の試験法

滅菌ピペットを用い、前項で記載した検体懸濁液 0.1 ml をベアードパーカー培地 2 枚にそれぞれ接種する。必要があれば、以下 10 倍希釈液も同様に接種し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $48 \pm 3$  h 培養した。24 時間ごとに観察し、周囲に透明帯が存在する、黒あるいは灰色で、光沢のある隆起した円形の定型的コロニーを算出した。確認試験のため、ベアードパーカー上に発育したブドウ球菌を疑う集落を 1 平板につき 2~5 個釣菌し、非選択性のトリプトケースソイ寒天平板培地に塗抹、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $24 \pm 3$  時

間培養した。コアグラーゼ試験、ラテックス凝集反応試験及びグラム染色を実施して、グラム陽性球菌でコアグラーゼ陽性であれば、黄色ブドウ球菌陽性とした。

#### 2. 6 *Salmonella* の試験法

前項で記載した検体懸濁液を  $37\pm 1^\circ\text{C}$  で  $18\pm 2$  時間一次培養した。その後、一次増菌液を RV プロスに 0.5mL、TT プロスに 0.5mL 接種し、 $42\pm 0.5^\circ\text{C}$  で  $22\pm 2$  時間培養した。二次増菌培養後に、XLD 寒天培地及び XLD 寒天培地に相補的な培地（クロモアガーサルモネラ培地）に白金耳で塗抹し、 $37\pm 1^\circ\text{C}$  で  $24\pm 3$  時間培養した。培養終了後、典型的集落の出現がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。

なお、XLD 寒天培地上のサルモネラ属菌の典型的集落は、周辺が透明で中心が黒色のコロニーである。確認試験としては、糖分解性・硫化水素産生性、リシン脱炭酸試験、インドール反応を行い、非典型的な場合には生化学性状試験としてオキシダーゼ試験、クエン酸分解試験、VP 試験を定法に従って行った。

#### 2. 7 *Vibrio parahaemolyticus* の試験法

検体25g に2%NaCl 加アルカリペプトン水 (pH8.6~8.8) (APW) 225ml を入れ、ストマッキング処理した試料を、 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 、16~18 時間培養後、上層の1~2白金耳をTCBS寒天培地に塗抹し、 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 、16~18 時間培養した。出現した培地上の腸炎ビブリオと推定される集落について、同定試験を実施した。腸炎ビブリオと推定される集落を普通寒天斜面、TSI 寒天、LIM 培地に接種し、 $35\pm 1^\circ\text{C}$  で18~24 時間培養後、TSI 寒天およびLIM 培地の性状が典型的であった場合は、更に耐塩性試験、VP 試験

およびオキシダーゼ試験を行い、典型的なものを腸炎ビブリオと同定した。

#### 2. 8 衛生指標菌選択培地上の集落同定

昨年度の本研究において、ISO法で用いられている選択分離培地上の典型集落及び非典型集落の鑑別が比較的困難であったことから、今年度のチルド食品の検査の一部で、coliforms の選択培地であるVRB培地及び Enterobacteriaceae の選択培地であるVRBD培地上の典型集落及び非典型集落を単離し、API Rapid 20E(日本ビオメリユー)を用いて菌種の同定を行った。

#### 2. 9 冷凍食品の微生物汚染調査

社団法人日本冷凍食品協会ならびに財団法人日本冷凍食品検査協会では、国内で生産され流通する冷凍食品を任意に抽出、微生物汚染状況の検査を行っている。2007年度は1,013検体を調査し、それらを生食用水産食品(切身いか等)、加工用水産品(むきえび等)、加熱調理品(コロッケ、魚フライ等)、非加熱調理品(コロッケ、魚フライ等)、無加熱調理品に分類し、検討した(表6)。試験項目は一般生菌数、E. coli、大腸菌群、ブドウ球菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ及びクロストリジウムとした。

#### 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、2種の衛生指標菌及び3種の病原体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品からの検出結果の統計処理は、StatView

ver4.0を用いて $\chi^2$ 検定を行った。

### C. 研究結果

市販の冷凍食品および凍結品における衛生指標菌及び病原菌の汚染状況を集計したところ、表3及び図1-6に示す結果が得られた。衛生指標菌の汚染率は presumptive *E. coli* 及び Enterobacteriaceae 共に凍結品で冷凍食品よりも高い分離率を示し、presumptive *E. coli* については有意な差がみられた(表3)。食品カテゴリー別に見た汚染状況では、揚げ物類と飲茶類の一般生菌数は冷凍食品よりも凍結品で高い傾向が示され、冷凍食品の微生物規格に当てはめた場合に違反となる検体も凍結品の揚げ物で3検体、同じく飲茶で1検体みられた。Enterobacteriaceaeについては、魚介類と揚げ物類では凍結品及び冷凍食品の分離率に差は見られなかったが、飲茶類では凍結品からの分離率が冷凍食品よりも有意に高かった ( $p < 0.01$ )。presumptive *E. coli* においては、揚げ物類と飲茶類で凍結品からの分離率が冷凍食品よりも有意に高い結果を示した(揚げ物類  $p < 0.01$ 、飲茶類  $p < 0.05$ )。魚介類では差は見られなかった。病原菌については、魚介類からの *S. aureus* の分離率が凍結品で有意に高かった ( $p < 0.05$ )。また、揚げ物類を原料により「肉を含むもの」「魚介類を含むもの」「その他」の3種類に分類して結果を集計すると、「肉を含むもの」と「その他」の2カテゴリーにおいて、推定大腸菌の分離率が凍結品で冷凍食品よりも有意に高い結果が示された(「肉を含むもの」 $p < 0.01$ 、「その他」 $p < 0.05$ )。なお、各検体における個別の汚染状況の結果は、調査を実施した試験機関毎の報告書と表4-2及び5-2に示した。衛生指標菌の選択分離培地上の典型及び非典型集落

の同定結果は図7-10に示した。VRB培地上の典型集落49株のうち61%が coliforms に属し、33%は乳糖分解酵素を持つものの乳糖を取り込む酵素を持たない乳糖非分解菌であり、4%は完全な乳糖非分解菌であった(図7)。また、同培地上の非典型集落10株のうち1株は乳糖分解細菌であった(図8)。一方、VRBD培地上の典型集落52株のうち、Enterobacteriaceaeに属さないものは2株のみであったものの(図9)、非典型集落8株のうち6株が Enterobacteriaceae であった(図10)。

社団法人日本冷凍食品協会ならびに財団法人日本冷凍食品検査協会による2007年度の微生物汚染状況の検査の結果、1,013検体中大腸菌群が加工用水産品で7検体、サルモネラが非加熱調理品で4検体から検出された。尚、加熱済調理品並びに無加熱調理品では問題のあるものはなかった。(表6)

### D. 考察

今回の調査の結果、国内で一般に流通している凍結品の衛生指標菌と黄色ブドウ球菌の汚染状況が冷凍食品よりも高い傾向が示された。中でも肉を原料に含む揚げ物類で、推定大腸菌の検出率に大きな差がみられ、凍結品の汚染が原料に由来する可能性が示唆された。凍結品が冷凍食品よりも微生物汚染状況が高い結果を示した原因として考えられる点は、第1に、冷凍食品は定められた規格基準を逸脱しないように製造工程に工夫がなされているためであると思われる。また、冷凍食品は保存性に優れているため品質保持期限が長く、製造後出荷前に微生物検査を行うことが可能であるため、検査結果が規格基準に合致する製品のみを出荷しているとも考えられる。一方で、餃子などあ

る種の食品カテゴリーでは、冷凍食品に分類されるものは製造工程において加熱処理がなされるものが多く、凍結品では加熱処理がなされないいわゆる生餃子であることが多いなど、食品カテゴリーに特有の条件がみられ、必ずしも同一食品群とは分類できない場合があることについても今後検討が必要と思われた。また、冷凍温度帯で流通され、冷凍食品や凍結品よりも高い温度帯で販売されるチルド食品の試験的調査の結果からは、和洋生菓子以外の3カテゴリー、魚介類及びその加工品、肉類及びその加工品及び飲茶類からは比較的高い汚染率で衛生指標菌が分離されていた。以上の結果から、冷凍食品における微生物規格基準の存在が、その微生物汚染の制御に有益に関与していると思われた。今後は更に多くのチルド食品や、冷凍温度帯で流通され、常温で販売される食品群についてもその汚染実態を把握していく予定である。また、ISO法で用いられる衛生指標菌の選択分離培地上の非典型集落と判断されたものを個別に同定した結果、対象となる菌が比較的多く含まれており、これらの培地上での典型・非典型集落の鑑別が容易ではないことが示された。

#### E. 結論

今回の調査の結果、国内で一般に流通している凍結品の衛生指標菌と黄色ブドウ球菌の汚染状況が同様の流通形態を持つ冷凍食品よりも高い傾向が示され、冷凍食品における微生物規格基準の存在がその微生物汚染の制御に有効に働いている可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

食品からの菌の検出状況に関しては随時、厚生労働省担当官に連絡を行った。

#### G. 研究発表

岡田由美子、小沼博隆、五十君静信、関 龍雄、澤田千尋、森 久子、坂口真理、田中廣行、宇田川藤江、小澤一弘、三輪憲永、増田高志、原田哲也、春日文子 冷凍食品及び凍結品の微生物汚染実態調査 第146回日本獣医学会 宮崎 2008年9月

岡田由美子 冷凍食品の流通実態と安全性確保への展望 第30回日本食品微生物学会学術セミナー 静岡 2008年10月

森久子、岡田由美子、坂口真理、関龍雄、澤田千尋、齋藤利江、小沼博隆、五十君静信、春日文子 ISO法に基づく汚染指標菌検出法の検討及び冷凍流通食品の汚染実態調査(1) 第29回日本食品微生物学会 広島 2008年11月

坂口真理、岡田由美子、森久子、関龍雄、澤田千尋、永田朝美、小沼博隆、五十君静信、春日文子 ISO法に基づく汚染指標菌検出法の検討及び冷凍流通食品の汚染実態調査(2) 第29回日本食品微生物学会 広島 2008年11月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 冷凍食品及び凍結品 検体

食品カテゴリー		検体数
冷凍食品	魚介類	71
	揚げ物	73
	飲茶類	55
計		199
凍結品	魚介類	45
	揚げ物	68
	飲茶類	52
計		165

表2. チルド食品 検体

食品カテゴリー	検体数
魚介類及びその加工品	8
肉類及びその加工品	6
和洋生菓子	6
飲茶類	4
計	24

表 3. 冷凍食品及び凍結品からの衛生指標菌分離率

食品カテゴリー	検体数	陽性検体数 (%)	
		presumptive <i>E. coli</i>	Enterobacteriaceae
冷凍食品	199	8 (4.0) <sup>a</sup>	78(39.2)
凍結品	165	25(15.2) <sup>a</sup>	75(45.5)
合計	364	33(9.1)	153(42.0)

a : p value<0.0001