

2009390/2A

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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 春日 文子

平成22（2010）年5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 22 (2010) 年 5 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. 冷凍食品及び凍結食品の汚染実態調査 -----	9
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 ---	41
財団法人 日本冷凍食品検査協会	
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 ---	57
財団法人 日本食品分析センター	
2. 冷蔵・冷凍温度帯での食品保存による食中毒起因菌を含めた微生物挙動の研究 -----	71
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-----	79
株式会社 三菱総合研究所	
4. 国際的な微生物規格基準設定に関する最新の知見の整理 -----	91
春日 文子、岡田 由美子 他	
4-1. サンプルングプラン勉強会資料 -----	93
4-2. ICMSF について -----	105
4-3. Establishment of FSO for <i>Staphylococcus aureus</i> in pre-cooked frozen shrimps -----	121
4-4. 摂食時安全目標値と達成目標値の理解と活用のための簡易ガイド (国際食品微生物規格委員会、ICMSF) -----	143

平成 21 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

鈴木 剛 財団法人日本冷凍食品検査協会  
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  
三山 九美 財団法人日本冷凍食品検査協会東京検査所  
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  
三輪 憲永 東海大学短期大学  
増田 高志 静岡県西部食肉衛生研究所  
杉山 寛治 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  
森田 妃美子 株式会社中部衛生検査センター  
紅林 知恵美 株式会社中部衛生検査センター  
山本 健 社団法人冷凍食品協会  
山本 宏樹 社団法人冷凍食品協会  
朝川 良徳 財団法人日本冷凍食品検査協会  
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  
齋藤 文一 財団法人日本食品分析センター  
浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所  
池本 尚人 サントリー商品開発センター飲料開発設計部  
指原 信廣 キューピー研究所基盤技術センター微生物研究室  
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  
梶谷 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  
豊福 肇 国立保健医療科学院研修企画部  
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  
源 竜弥 株式会社町田予防衛生研究所  
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
Natalia Gomez Tome IFR (Institute of Food Research), Norwich, UK  
呉 銀倞 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
花岡 頼子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

(敬称略、目次順)

# I. 総括研究報告

平成21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。現在、保存基準や成分規格を持つのは、 $-15^{\circ}\text{C}$ 以下で保存される「冷凍食品」のみである。本研究では暫定的に、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、「冷凍食品」の保存基準である $-15^{\circ}\text{C}$ 以上の温度で凍結されている「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。一年次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、二年次研究において実施した冷凍流通食品の微生物汚染実態調査、冷凍保存試験の条件検討と予備試験、海外の食品微生物規格調査、そ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の整理の結果に基づき、最終年度である本年度は、1) フローズンチルド食品の微生物汚染実態調査、2) 細菌添加後の低温保存試験、3) 海外の食品微生物規格の背景に関する調査、そして4) 国際的な微生物規格基準設定に関する最新の知見の整理を行った。

1) 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、 $-5^{\circ}\text{C}$ から $10^{\circ}\text{C}$ の範囲で販売されているチルド食品について、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。その結果、魚介類と揚げ物類における *Enterobacteriaceae* の分離率と、揚げ物類における presumptive *E. coli* の分離率がチルド食品で冷凍食品よりも有意に高い結果を示した。一方、病原体の分離はほとんど見られず、その分離率には冷凍食品とチルド食品の間に有意差は見られなかった。

2) 市販のチルドギョーザに *Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Salmonella* Typhimurium および *Listeria monocytogenes* を接種後、 $-15\sim 15^{\circ}\text{C}$ で保存し、接種菌の菌数及び一般生菌数を14日目まで経時的に測定した。その結果、接種した試験菌の多くが $10^{\circ}\text{C}$ 以上で増殖し、 $5^{\circ}\text{C}$ でも増殖する菌がみられた。冷凍温度帯では菌の増殖はないが、菌数の減少は顕著でなく、特にグラム陽性菌で生残性が高かった。一般生菌数は試験開始時には検出限界以下であったが、保存温度が高いほど短期間で

増殖がみられ、微生物叢として *Bacillus* 属菌が高率に分離された。

3) 昨年度、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、韓国を対象として冷凍食品および関連食品の規格基準の調査を行ったうち、アメリカの民生品目記述票(CID)と韓国にのみ、冷凍食品に特化した微生物規格があった。そこで、それら2ヶ国での冷凍食品規格設定の背景について調査した。しかし韓国では、設定時期が古く、その経緯が不明であった。アメリカでは、冷凍食品の主要な組成について、連邦法が規定している限定された品目の規格に当てはめ、そこからCIDとしての規格を設定していた。

4) 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 MC 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。そこで本研究では、最近新たにコーデックス規格として合意された、乳幼児用粉ミルクの *Cronobacter sakazakii* と *Salmonella* の規格設定の根拠となった、FAO/WHO 専門調査会の報告書を分析した。また、冷凍むきエビの加工過程とそこで起こりうる汚染を対象とし、FSO と各工程での PO の設定のシナリオを考案し、リスク評価とそれら目標値との関連に関する事例研究を行った。

冷凍食品とその他の低温流通食品を比較した場合、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。したがって、現在の「冷凍食品」のみに、食材の内容を問わず、汚染指標菌を対象とした微生物規格が設定される論理的必然性は小さいと考えられる。それら食品は、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るが、その他の食品も含め、コーデックス委員会等国際動向を見据え、食品微生物規格設定の対象食品群の分類法、対象微生物の選定法、規格適用箇所の規定法、規制のための規格であるか自主基準のための規格であるかの選択法、そして微生物の確率分布を考慮した規格の設定法を総合的に検討する必要があると考えられた。

#### 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。

平成 17 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、今後冷凍パン生地以外の冷凍食品の成分規格を見直す場合には、冷凍食品の規格基準全体の考え方について整理するよう答申があった。しかし冷凍流通食品の微生物汚染状況によっては、将来、「冷凍食品」に限らず、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。一年次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、二年次研究において実施した冷凍流通食品の微生物汚染実態調査、冷凍保存試験の条件検討と予備試験、海外の食品微生物規格調査、そ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の整理の結果に基づき、最終年度である本年度は、1) フローズンチルド食品の微生物汚染実態調査、2) 細菌添加後の低温保存試験、3) 海外の食品微生物規格の背景に関する調査、そして4) 国際的な微生物規格基準設定に関する最新の知見の整理を行った。

## B. 研究方法

### 1. フローズンチルド食品の微生物汚染実態調査

研究分担者と研究協力者、委託調査機関が分担して、一般のスーパーマーケット等小売店で購入した冷凍食品 204 検体、チルド食品 192 検体、凍結食品 15 検体の計 411 検体について調査を行った。内訳は、魚介類 105 検体、揚げ物類 136 検体及び惣菜類 79 検体、洋生菓子類 79 検体及び果実類 12 検体であった。

衛生指標菌については、本研究の初年度で作成した 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。病原菌については昨年度と同様に、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. 細菌添加後の低温保存試験

1 検体あたりチルドギョーザ 2 個分 (約 25g) を用いた。本製品は加熱処理後・18℃以下の冷凍状態で流通し、小売店で包装・解凍して冷蔵販売されている食品 (いわゆるフローズンチルド食品) である。供試菌株は *S. aureus* と *E. coli*、*Salmonella* Typhimurium と *L. monocytogenes* の 2 菌種ずつの組合せによる混合接種とした。チルドギョーザ 2 個を無菌的にフィルター付ストマッカー袋に入れ、各試験菌を 10<sup>4</sup> cfu/g 接種して菌液を食品になじませ、それぞれの検体を、-15、-5、0、5、10、15℃で保存した後、接種菌の菌数及び一般生菌数を測定した (n=3)。

### 3. 海外の食品微生物規格の背景に関する調査

冷凍食品に特化した微生物規格基準を設定しているアメリカ、韓国を対象として、関連ウェブサイトや関連文献の調査を行うとともに、USDA の担当者とメールでのヒアリング調査を行い、冷凍食品の微生物規格基準ならびにフードチェーンにおける適用箇所、当該規格基準を定めた背景、理由について調査した。

### 4. 国際的な微生物規格基準設定に関する最新の知見の整理

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、研究分担者や研究協力者とともに、乳幼児粉ミルクにおける *Cronobacter sakazakii* と *Salmonella* に関する FAO/WHO 専門家会議の報告書を検討し、要点をまとめるとともに、FSO 等数的指標の概念を最初に提唱した国際食品微生物規格委員会 (International Commission for Microbiological Specifications for Foods: ICMSF) の考え方に



についても整理した。

また、事例研究として、冷凍むきエビの加工過程とそこで起こりうる汚染を対象とし、FSOと各工程での目標値POの設定のシナリオを考案し、リスク評価とそれら目標値との関連を例示した。

## C. 研究結果

### 1. フローズンチルド食品の微生物汚染実態調査

冷凍食品全 204 検体とチルド食品全 192 検体の結果を比較すると、衛生指標菌の汚染率で Enterobacteriaceae がチルド食品で冷凍食品よりも有意に高い分離率を示した ( $p < 0.05$ )。病原菌の分離率には、差は見られなかった。食品カテゴリー別に見た汚染状況では、魚介類と揚げ物類の Enterobacteriaceae の分離率と(両者とも  $p < 0.01$ )、揚げ物類の presumptive *E. coli* の分離率が ( $p < 0.05$ )、チルド食品で冷凍食品よりも有意に高い結果が得られた。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」において、Enterobacteriaceae の分離率がチルド食品で冷凍食品よりも有意に高い結果が示された ( $p < 0.05$ )。

一般生菌数は、全食品カテゴリーにおいて冷凍食品よりもチルド食品で高い傾向が見られた。また、冷凍食品・チルド食品ともに惣菜類と洋生菓子類の生菌数が極めて低い傾向にあった。また、Enterobacteriaceae について一般生菌数と同様に、各検体の分離菌数の分布状況を示したところ、いずれの食品カテゴリーにおいても冷凍食品よりもチルド食品で高い傾向が見られた。

病原菌については、魚介類の冷凍食品から黄色ブドウ球菌が、チルド食品から腸炎ビブリオが、揚げ物類の冷凍食品からサルモネラが、チルド食品からサルモネラと黄色ブドウ球菌がそ

れぞれ少数分離された。惣菜類、洋生菓子類及び果実類からは病原菌は検出されなかった。

(小沼・岡田他分担研究報告書、小沼ほか分担研究報告書、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. 細菌添加後の低温保存試験

チルドギョーザに病原体を接種して低温で保存した結果、*S. aureus* は 15°C および 10°C で増殖がみられた。5°C 以下では冷凍温度帯も含めて菌数は接種菌量のまま安定していた。

*E. coli* は 15°C で増殖がみられたが、10°C および 0°C では菌数が明らかに減少した。一方で、5°C での菌数は比較的安定していた。冷凍温度帯では若干の菌数減少がみられた。

*Salmonella* Typhimurium は 15°C および 10°C で増殖がみられ、5°C 以下では菌数の変化はほとんどみられなかった。10°C で 14 日間保存した場合は 7 日目と比較して菌数が減少した。しかし BPW により調製した 10 倍希釈試料液を 5°C で 1~2 日保管したものについて、再度菌数を測定すると 7 日目の結果に近い菌数が認められた。

*L. monocytogenes* は 15°C、10°C および 5°C で増殖がみられ、0°C 以下では菌数の減少はほとんどみられなかった。

一般生菌数は、混合接種したいずれかの菌種とほぼ同様の挙動を示した。菌を接種していない検体では、試験開始時には検出限界 ( $< 300\text{cfu/g}$ ) 以下であったが、保存温度が高いほど、短期間で菌数の増加がみられ、5°C で保存した検体においても一部で増殖が認められた。0°C 以下では保存期間を通して検出限界以下であった。

(小沼他分担研究報告書)

### 3. 海外の食品微生物規格の背景に関する調査

昨年度調査により冷凍食品に特化した微生物

規格を有することがわかったアメリカの民生品目記述票(CID)と韓国に対して、冷凍食品規格設定の背景について調査した。しかし韓国では、設定時期が古く、その経緯が不明であった。

アメリカの CID は豊富な知識・知見を有する政府部門の専門家によって起草される。新たな CID を策定し始めるときには、微生物分析や化学分析を含める必要があるか否かを含めて調査が行われる。同時に市場調査・分析を実施し、利用者ニーズを把握する。CID の案が起草されると、全ての利害関係者にレビューとコメントを求めて当該案をメールで送付する。コメントが得られた場合、コメントを受け入れるか否かを検討し、適宜、最終的な CID に反映される。最終的な CID が了承されると、当該 CID は全ての利害関係者にメールで送付されるとともに、インターネット上に掲載・公開される。CID は 5 年ごと、あるいは市場の求めに応じて見直しが行われる。食品の CID における微生物要件は主に当該食品の原材料の微生物規格基準に基づいて策定されている。冷凍食品の主要な組成について、基本的には、連邦法が規定している限定された品目の規格に当てはめ、そこから CID としての規格を設定していた。

(三菱総合研究所委託報告書 (委託内容指示：春日))

#### 4. 国際的な微生物規格基準設定に関する最新の知見の整理

ICMS の考え方、ならびに乳幼児粉ミルクにおける *Cronobacter sakazakii* と *Salmonella* に関する FAO/WHO 専門家会議の報告書を詳細に検討し、要点をまとめた。*Cronobacter sakazakii* に対するサンプリングプラン適用による相対リスク低減、*Cronobacter sakazakii* の指標としての Enterobacteriaceae のサンプリングプラン、製造管理やロットの不合格判定の変更によってサンプリングプランが及ぼす累加的な影響についての考察などについて、整理

した。

また、事例研究として、冷凍むきエビの加工過程とそこで起こりうる汚染を対象とし、FSO と各工程での目標値 PO の設定のシナリオを考案し、リスク評価とそれら目標値との関連を例示した。

(春日・岡田他分担研究報告書ならびに Natalia Gomez-Tome 協力研究報告書)

#### D. 考察

##### 1. フローズンチルド食品の微生物汚染実態調査

今回の調査の結果、国内で一般に流通しているチルド食品の衛生指標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、Enterobacteriaceae の検出率に有意差がみられた。冷凍食品は品質の安定化や微生物規格遵守のため、原材料にブランチング等軽度の加熱処理を施すことが多いと思われる一方、チルド食品は生肉に衣をつけたタイプの揚げ物類がしばしば見られ、食品原料由来の汚染がそのまま製品に反映されていることが分離率の差をもたらした一因と思われた。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た。一方で、冷凍食品とチルド食品からの病原体分離状況に差は見られなかった。特に非加熱喫食製品の多い惣菜類や洋生菓子類で全体的に一般生菌数、病原体分離率ともに低く、適切な衛生管理がなされていることが示された。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。これらの知見を元に、今後は冷凍流通食品やその他の食品群について、科学的根拠に基づく微生物規格等の設定を考えていく必要があると思われた。

## 2. 細菌添加後の低温保存試験

チルド食品と称される食品の保存温度は10℃以下に設定されている場合が多いが、本研究により5℃と10℃で微生物の発育に明確な差がみられ、10℃においては食中毒起因菌を含め食品汚染微生物が増殖する可能性が示唆された。また、*L. monocytogenes*は5℃でも増殖がみられた。さらに試験菌を接種しなくとも時間の経過とともに一般生菌数が増加した検体があり、食品微生物叢に含まれる低温増殖性細菌の存在が推察された。

一方、冷凍温度帯での微生物学的な実験では、保存温度が-1～-5℃など高い場合は比較的短期間に菌数が減少するのに対し、-15℃以下ではほとんど変化がみられないとされる。また菌種によっても異なりグラム陽性菌はグラム陰性菌より死滅しにくいことが知られている。本研究において接種したグラム陽性菌である *S. aureus* および *L. monocytogenes* は0～15℃の温度帯で比較的菌数が安定し、一方でグラム陰性菌の *E. coli* および *Salmonella Typhimurium* は0℃や5℃で菌数の減少がみられ菌体の損傷が示唆されたが、-15℃では菌数が安定していた。すなわち、-15℃などのより低い冷凍温度帯では微生物の大部分はほとんど死滅することなく食品の製造直後の状態を維持していると考えられた。

また、食品中の微生物叢の同定により、グラム陽性有芽胞桿菌が存在していたことが明らかとなった。本製品は凍結前において加熱処理されている食品ではあるが、その加熱温度は芽胞菌が残存するような条件であったと推測された。

## 3. 海外の食品微生物規格の背景に関する調査

CID における冷凍食品の微生物規格基準は、基本的には、連邦法が規定している限定された品目の規格に当てはめて設定されるとは言うものの、必ずしもその原材料に係る連邦規則での微生物規格基準がそのまま反映されたものにはなっていない。その理由としては、CID の微生物

規格基準は政府部門の専門家によって起草され、利害関係者からのコメントを反映するといったプロセスを通じて策定されるためであると考えられる。すなわち、こうした策定プロセスの中で、原材料の微生物規格基準をベースにしながらも、専門家の最新の知見や利害関係者への商業的配慮等が反映されているものと考えられる。

## 4. 国際的な微生物規格基準設定に関する最新の知見の整理

FSO や PO、PC など食品安全の数的指標の概念は、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。これら理論の基礎を示し、昨年度輪読の対象とした成書に加え、本年度は新たにコーデックスの微生物規格が適用された乳児用粉ミルクに関して、その背景となった FAO/WHO 専門家会議の報告書を調査した。また、イギリスからの招へい研究者とともに、FSO 設定に関する事例研究を行った。

コーデックス委員会食品衛生部会 (CCFH) では、数的指標との関連において食品の微生物規格 (Microbiological Criteria, MC) を策定することを想定し、MC の一般原則とガイドラインの文書を見直すことを決定し、来年度早々にも、日本が副議長ならびに事務局を務めて、その見直しに関する作業を行うこととなった。冷凍食品の微生物規格についても、これら国際動向を見据え、国際的な流れと矛盾しない形での新たな策定を考える必要がある。

## E. 結論

- 微生物汚染実態を考慮すると、冷凍流通食品のうち、現在の「冷凍食品」のみに、食材の

内容を問わず、汚染指標菌を対象とした微生物規格基準が設定される論理的必然性は小さいと考えられる。

- わが国でもコーデックス委員会等国际動向を見据えた微生物規格基準設定の理論的準備を早急に行う必要がある。
- 今後の微生物規格基準において、以下の点を考慮する必要があると思われ、これらに関してさらなる研究が必要である。
  - 規格基準を適用しようとする食品（群）の決め方（食品の分類の考え）
  - 規格基準を適用しようとする段階（フードチェーンにおける段階）
  - 規格基準の設定の目的（食品安全の規制のための規格基準であるか、工程管理のための自主基準であるか）
  - 規格基準に使用する微生物（病原体であるか、衛生指標菌であるか）
  - 微生物汚染の分布を考慮したサンプリングプラン
  - [他の研究班で検討が進められている] 微生物試験法

## 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報告を行った。しかし、全て、微生物規格の適用されない食品であり、また消費期限が短いため試験結果が出た時には既に消費期限が過ぎており、一般への警告や回収が必要となる事例はなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

春日文子

微生物規格基準設定の考え方の国際動向  
獣医公衆衛生研究、5-8、11 (2)、2009

### 2. 学会発表

岡田由美子、小沼博隆、五十君静信、豊留達

郎、澤田千尋、竹村 壘、長田共未、田中廣行、宇田川藤江、小澤一弘、三輪憲永、増田高志、飯田奈都子、春日文子

冷凍状態で流通される食品の微生物汚染実態調査

第148回日本獣医学会 鳥取 2009年9月

竹村 壘、長田共未、岡田由美子、豊留達郎、澤田千尋、齋藤利江、小沼博隆、五十君静信、春日文子

冷凍食品及びその他の冷凍流通食品の汚染実態調査

日本食品微生物学会30周年記念学術総会、2009年10月21日、東京都

飯田奈都子、小澤一弘、三輪憲永、増田高志、杉山寛治、川森文彦、廣井みどり、森田妃美子、小沼博隆、岡田由美子、春日文子

冷凍流通食品の微生物汚染実態調査および流通温度帯におけるリステリアの挙動

日本食品微生物学会30周年記念学術総会、2009年10月21日、東京都

春日文子

食品の微生物規格基準設定の国際動向について

平成21年度全国食肉衛生検査所協議会第20回北海道・東北ブロック大会学術講演、2009年10月22日、福島市

## 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

冷凍食品及び凍結食品の汚染実態調査

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	鈴木 剛	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
	三山九美	財団法人日本冷凍食品検査協会東京検査所
	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
	三輪憲永	東海大学短期大学
	増田高志	静岡県西部食肉衛生研究所
	杉山寛治	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
	森田妃美子	株式会社中部衛生検査センター
	紅林知恵美	株式会社中部衛生検査センター
	山本 健	社団法人冷凍食品協会
	山本宏樹	社団法人冷凍食品協会
	朝川良徳	財団法人日本冷凍食品検査協会

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、 $-5^{\circ}\text{C}$ から  $10^{\circ}\text{C}$ の範囲で販売されているチルド食品について、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。微生物試験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、昨年度の本研究において冷凍食品と同様の温度帯で販売されながら規格のない凍結食品について調査した魚介類、揚げ物、飲茶類の 3 カテゴリーと、洋生菓子類及び果実類の計 5 カテゴリーについて調査を実施した。その結果、魚介類と揚げ物類における *Enterobacteriaceae* の分離率と、揚げ物類における presumptive *E. coli* の分離率がチルド食品で冷凍食品よりも有意に高い結果を示した。一方、病原体の分離はほとんど見られず、その分離率には冷凍食品とチルド食品の間に有意差は見られなかった。

## A. 研究目的

「冷凍食品」とは「製造し、又は加工した食品（清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品、魚肉ねり製品、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）と規定されたものであり、製品の微生物規格基準と、 $-15^{\circ}\text{C}$ 以下の流通温度の規格が設定され、表示に「冷凍食品」と明示することが義務付けられている。しかしながら、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、流通時には冷凍状態で運搬され、スーパーマーケット等の小売店において販売時に $-5^{\circ}\text{C}$ から $10^{\circ}\text{C}$ の範囲（チルド温度帯）で販売される食品（いわゆるフローズンチルド食品）など、様々な冷凍流通食品が販売されている。これらには保存温度帯変更時に品質保持期限の設定も変更されるものが数多くみられる。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、同様の温度帯で流通販売される冷凍流通食品（以下凍結食品とする）や販売時にチルド温度帯で販売されている食品（以下チルド食品とする）の微生物汚染実態を調査し、比較検討した。初年度には、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、冷凍食品と凍結食品のうち、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食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、凍結食品共に高い汚染率を示した。続く次年度には、魚介類、飲茶類及び揚げ物類を対象を限定して冷凍食品199検体、凍結食品165検体の計364検体について、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。その結果、凍結食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た。最終年度である本年度は、冷凍食品と、同様の食品カテゴリーに属し $-5^{\circ}\text{C}$ から $10^{\circ}\text{C}$ で販売されているチルド食品について昨年度と同様の調査を実施し、その汚染実態の把握に努めた。

## B. 研究方法

### 1. 冷凍食品および凍結食品の汚染状況検査

#### 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204検体、チルド食品192検体、凍結食品15検体の計411検体について調査を行った（表1）。内訳は、魚介類105検体、揚げ物類136検体及び惣菜類79検体、洋生菓子類79検体及び果実類12検体であった。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。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 2-1 に示した。

## 1. 2 検査法

衛生指標菌については、初年度の本研究で作成した IS07251 (presumptive *E. coli* の MPN 検出法) 及び IS021528-2 (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 IS07218 (2007) を参照した。病原菌については昨年度の本研究と同様に、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。

## 1. 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ヨン (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) 0.5ml 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。

## 1. 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、 $45^{\circ}\text{C}$  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) 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、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  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、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  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。

## 1. 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。

## 1. 6 *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 0.1ml 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  $48\pm 3$  時間培養した。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ラーゼ陽性であれば、黄色ブドウ球菌陽性とした。

#### 1. 7 *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 ブロスに 0.5ml、TT ブロスに 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。

#### 1. 8 *Vibrio parahaemolyticus* の試験法

検体 25g に 2%NaCl 加アルカリペプトン水 ( $\text{pH}8.6\sim 8.8$ ) (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。

#### 1. 9 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 ( $10\text{cfu/g}$ ) 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・チルド食品及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  $\chi^2$  検定を行った。

#### 2. 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し、告示法を用いた微生物汚染状況の検査を行っており、その結果について情報提供を受けた。2008 年度は計 640 検体を調査しており、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）、加熱済調理品（コロッケ、チキンフライ等）、非加熱調理品（コロッケ、かきフライ等）、

無加熱調理品に分類し、検討した。試験項目は一般生菌数、E. coli、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラ及び腸炎ビブリオとした。

## C. 研究結果

### 1. 冷凍食品および凍結食品の汚染状況検査

市販の冷凍食品・チルド食品及び凍結食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、図1から図5に示す結果が得られた。冷凍食品全204検体とチルド食品全192検体の結果を比較すると、衛生指標菌の汚染率でEnterobacteriaceaeがチルド食品で冷凍食品よりも有意に高い分離率を示した( $p < 0.05$ 、図1)。病原菌の分離率には、差は見られなかった。食品カテゴリー別に見た汚染状況では、魚介類と揚げ物類のEnterobacteriaceaeの分離率と(両者とも $p < 0.01$ )、揚げ物類のpresumptive E. coliの分離率が( $p < 0.05$ )、チルド食品で冷凍食品よりも有意に高い結果が得られた(図2)。病原菌については、魚介類の冷凍食品から黄色ブドウ球菌が、チルド食品から腸炎ビブリオが、揚げ物類の冷凍食品からサルモネラが、チルド食品からサルモネラと黄色ブドウ球菌がそれぞれ少数分離された。惣菜類、洋生菓子類及び果実類からは病原菌は検出されなかった。一般生菌数は、全食品カテゴリーにおいて冷凍食品よりもチルド食品で高い傾向が見られた(図3)。また、冷凍食品・チルド食品ともに惣菜類と洋生菓子類の生菌数が極めて低い傾向にあった。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は、チルド食品では魚介類で1検体、揚げ物で6検体、惣菜類で1検体みられた。また、冷凍食品においても魚介類の2検体が、一般生菌数が規格違反となる数値を示した。なお、本研究では一般生菌数は告示法本来のリン酸緩衝液を用いず、他

の試験法に合わせてISO法で規定されているBuffered Peptone Waterを用いているため、その結果はあくまで参考値とした。また、Enterobacteriaceaeについて一般生菌数と同様に、各検体の分離菌数の分布状況を示したところ、いずれの食品カテゴリーにおいても冷凍食品よりもチルド食品で高い傾向が見られた(図4)。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」において、Enterobacteriaceaeの分離率がチルド食品で冷凍食品よりも有意に高い結果が示された( $p < 0.05$ 、図5)。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に示した。

### 2. 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による2008年度の微生物汚染状況の検査の結果、E. coliが421検体中1検体(0.2%)、大腸菌群が189検体中2検体(1%)から検出された。黄色ブドウ球菌は233検体、サルモネラは261検体、腸炎ビブリオは25検体から全く分離されなかった。冷凍食品の規格違反となる検体は、一般生菌数で1検体、E. coliで1検体、大腸菌群で2検体であり、食品内訳はアジフライ、むきエビ(一般生菌数と大腸菌群の両方で違反)、鮭であった。(表2)

## D. 考察

今回の調査の結果、国内で一般に流通しているチルド食品の衛生指標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、Enterobacteriaceaeの検出率に有意差がみられた。冷凍食品は品質の安

定化や微生物規格遵守のため、原材料にブラッシング等軽度の加熱処理を施すことが多いと思われる一方、チルド食品は生肉に衣をつけたタイプの揚げ物類がしばしば見られ、食品原料由来の汚染がそのまま製品に反映されていることが分離率の差をもたらした一因と思われた。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た。一方で、冷凍食品とチルド食品からの病原体分離状況に差は見られなかった。特に非加熱喫食製品の多い惣菜類や洋生菓子類で全体的に一般生菌数、病原体分離率ともに低く、適切な衛生管理がなされていることが示された。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。これらの知見を元に、今後は冷凍流通食品やその他の食品群について、科学的根拠に基づく微生物規格等の設定を考えていく必要があると思われる。

#### E. 結論

今回の調査の結果、国内で一般に流通しているチルド食品の衛生指標菌汚染状況が同様の食品カテゴリーに属する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報告を行った。

#### G. 研究発表

学会発表

岡田由美子、小沼博隆、五十君静信、豊留達郎、澤田千尋、竹村 壘、長田共未、田中廣行、宇田川藤江、小澤一弘、三輪憲永、増田高志、飯田奈都子、春日文子 冷凍状態で流通される食品の微生物汚染実態調査 第148回日本獣医学会 鳥取 2009年9月

竹村 壘、長田共未、岡田由美子、豊留達郎、澤田千尋、齋藤利江、小沼博隆、五十君静信、春日文子 冷凍食品及びその他の冷凍流通食品の汚染実態調査 第30回日本食品微生物学会 東京 2009年10月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 冷凍食品・チルド食品及び凍結食品 検体

食品カテゴリー		検体数
冷凍食品	魚介類	50
	揚げ物	46
	惣菜類	72
	洋生菓子類	30
	果実類	6
計		204
チルド食品	魚介類	48
	揚げ物	31
	惣菜類	58
	洋生菓子類	49
	果実類	6
計		192
凍結食品	魚介類	7
	揚げ物	2
	惣菜類	6
計		15