

2) 参考とした試験方法

試験項目の測定にあたっては、ISO 規格の方法及び食品からの微生物検査標準法(NIHSJ)案の方法を参考として実施した(表-1 参照)。

表-1 参考とした試験方法

試験項目	参考とした試験方法
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2:2004 の方法
Presumptive <i>Escherichia coli</i>	ISO 7251:2005 の方法
黄色ブドウ球菌	NIHSJ-03-ST3 の方法
サルモネラ	NIHSJ-01-ST4(080930)の方法
腸炎ビブリオ	NIHSJ-06-ST2 の方法*1
生菌数	—*2

*1 ただし、培養温度は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ とした。

*2 標準寒天培地法(培養条件： $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ， 24 ± 2 時間)

3) 試験手順

① 検体表面温度の測定

秤量時の検体の表面温度を、赤外放射温度計(testo830-T1)を用いて測定した。

なお、冷凍食品については、秤量前に室温で解凍を行った。

② 試料液の調製

検体 25g を無菌的に秤量し、滅菌緩衝ペプトン水(BPW) [Merck] 225ml を加えた後、ストマツカーを用いて 1 分間攪拌・混合して試料原液を調製した。また、適宜 BPW を用いて試料原液の 10 倍段階試料液を調製した。

③ *Enterobacteriaceae* の測定

試料原液及び 10 倍段階希釈液 1ml をそれぞれ 2 枚のシャーレに分注した後、バイオレット・レッド・胆汁酸ブドウ糖 (VRBD) 寒天培地 [Merck] 約 10ml を注ぎ、静かに混合した。固化後、同培地約 15ml を加えて重層し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 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。

典型及び非典型集落の任意の 5 集落をそれぞれ釣菌し、普通寒天平板培地 [Merck] に画線塗抹後、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養した。培養後、分離された集落についてオキシダーゼ試験を実施した。オキシダーゼ陰性の集落をブドウ糖・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 ± 2 時間培養した。培養後、培地が黄変した場合をブドウ糖分解陽性と判定し、典型及び非典型集落のそれぞれについて陽性率を算出した。

それぞれの陽性率を乗じた典型及び非典型集落数を加算し、検体 1g 当たりの *Enterobacteriaceae* を算定した。

④ Presumptive *Escherichia coli* の測定

試料原液 10ml を 2 倍濃度のラウリル硫酸ブイヨン (LSB) 発酵管 [Merck] 3 本にそれぞれ接種した。また、試料原液及び 10 倍段階希釈液 1ml を普通濃度の LSB 発酵管 3 本にそれぞれ接種し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で $24 \sim 48 \pm 2$ 時間培養した。培養後、ガス発生及び／又は混濁を認めた発酵管について、培養液の 1 白金耳量を EC 発酵管 [Merck] に接種し、 $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (恒温水槽を使用) で $24 \sim 48 \pm 2$ 時間培養した。培養後、ガス発生を認めた EC 発酵管について、培養液の 1 白金耳量を $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保温したペプトン水 [Oxoid] に接種し、 $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (恒温水槽を使用) で 48 ± 2 時間培養した。培養後のペプトン水にインドール試薬 [Merck] 0.5ml を加え、1 分後以内に赤変したものをインドール試験陽性と判定した。

EC 発酵管でガスを発生し、インドール試験陽性となった発酵管を陽性と判定した。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 1g 当たりの Presumptive *Escherichia coli* を算定した。

⑤ 黄色ブドウ球菌の測定

試料原液 0.1ml をそれぞれ 2 枚のベアド・パーカー寒天生培地 [OXOID] に分注、塗抹した後、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養した。培養後、出現した定型的集落を 1 平板につき任意に 2~5 個ずつ釣菌し、トリプトソイ寒天平板培地 [栄研化学] に画線塗抹後、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 3 時間培養した。分離された集落についてコアグラゼ試験、グラム染色及び形態観察を実施した。

⑥ サルモネラの測定

検体 25g を無菌的に秤量し、滅菌緩衝ペプトン水 (BPW) [Merck] 225ml を加えた後、ストマッカーを用いて 1 分間攪拌・混合した。 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18 ± 2 時間培養した後、培養液の 0.1ml をラパポート・バシリアディスブロス [OXOID] に接種した。また、培養液の 1ml をテトラチオネート液体培地 [OXOID] に接種した。それぞれの培地を $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (恒温水槽を使用) で 22 ± 2 時間培養した。培養後、キシロース・リシン・デオキシコレート寒天培地 [Merck] 及びクロモアガーサルモネラ [CHROMagar] に画線塗抹後、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 3 時間培養した。培養後、サルモネラの典型的集落を 1 平板につき任意に 3 個ずつ釣菌して、表-2 に示した生化学的性状試験を実施し、サルモネラか否かを判定した。サルモネラと判定された分離株についてサルモネラ免疫血清を用いて O 抗原血清型を決定した。

表-2 サルモネラの生化学的性状試験

使用培地	試験項目	サルモネラの性状
TSI 寒天培地 [栄研化学]	糖の分解	斜面部: 赤 (非分解), 高層部: 黄 (分解)
	硫化水素産生	+
	ガス産生	+
LIM 培地 [日水製薬]	リジン脱炭酸試験	+
	インドール試験	-
	運動性	+

⑦ 腸炎ビブリオの測定

検体 25g を無菌的に秤量し、滅菌アルカリペプトン水 (APW) [OXOID] を加えた後、ストマッカーを用いて1分間攪拌・混合した。37±1℃で24±3時間培養した後、培養液の1白金耳量を TCBS 寒天平板培地 [OXOID] に画線塗抹後、37±1℃で24±3時間培養した。培養後、腸炎ビブリオと推定される集落について表-3 に示した生化学的性状試験を実施し、腸炎ビブリオか否かを判定した。

表-3 腸炎ビブリオの生化学的性状試験

培地	試験項目	腸炎ビブリオの性状
2%食塩添加 TSI 寒天培地 [栄研化学]	糖の分解	斜面部：赤(非分解) 高層部：黄(分解)
	硫化水素産生	—
	ガス産生	—
2%食塩添加 LIM 培地 [日水製薬]	リジン脱炭酸試験	+
	インドール試験	+
	運動性	+
Nutrient Broth [DIFCO]	耐塩性試験	発育：—
8%食塩添加 Nutrient Broth [DIFCO]	耐塩性試験	発育：+
2%食塩添加 VP 半流動培地 [栄研化学]	VP 試験	—
2%食塩添加普通寒天培地 [DIFCO]	チトクローム・オキシダーゼ試験	+

⑧ 生菌数の測定

試料原液及び10倍段階希釈液 1ml をそれぞれ2枚のシャーレに分注した後、標準寒天培地 [栄研化学] 約 15ml を注ぎ、静かに混合した。37±1℃で24±2時間培養した後、出現した集落数を測定し、希釈倍数を乗じて検体 1g 当たりの生菌数を算定した。

4 調査結果

購入検体の情報、販売時温度及び検体秤量時の表面温度の測定結果を表-4 に示した。
また、微生物試験の結果を表-5 に示した。

表-4-1 購入検体の情報、販売時温度及び検体秤量時の表面温度の測定結果(冷凍食品)

区分	No.	名称	凍結前 加熱	採取前 加熱	販売時 温度	表示保存 温度	秤量時 表面温度	表示	原産国
そう菜 (飲茶)	1	ぎょうざ	有	要	-20℃	-18℃以下	-4.0℃	冷凍食品	国産
	2	しゅうまい	有	要	-20℃	-18℃以下	-9.0℃	冷凍食品	国産(広島県)
	3	水餃子	有	要	-24℃	-18℃以下	-7.5℃	冷凍食品	国産
	4	肉まん	有	要	-20℃	-18℃以下	-7.0℃	冷凍食品	中華人民共和国産
	5	しゅうまい	有	要	-20℃	-18℃以下	-5.0℃	冷凍食品	国産(北海道)
	6	春巻	有	要	-20℃	-18℃以下	-2.5℃	冷凍食品	国産(福岡県)
	7	肉だんご	有	要	-20℃	-18℃以下	-6.0℃	冷凍食品	国産(大阪府)
	8	ハンバーグ	有	要	-20℃	-18℃以下	-1.5℃	冷凍食品	国産(大阪府)
そう菜 (その他)	9	鶏から揚げ	有	要	-20℃	-18℃以下	-6.0℃	冷凍食品	タイ産
	10	ピザ	無	要	-20℃	-18℃以下	-3.5℃	冷凍食品	記載無し
	11	つくね	有	要	-24℃	-18℃以下	-4.0℃	冷凍食品	国産(大阪府)
	12	オムレツ	有	要	-19℃	-18℃以下	-9.5℃	冷凍食品	国産(福岡県)
	13	ひじき煮	記載無し	不要	-20℃	-18℃以下	-6.0℃	冷凍食品	中華人民共和国産
	14	豚しょうが焼き	無	要	-19℃	-18℃以下	-11.0℃	冷凍食品	国産
	15	牛肉の甘辛煮	無	要	-19℃	-18℃以下	-5.0℃	冷凍食品	国産
	16	ハンバーグ	有	要	-24℃	-18℃以下	-10.0℃	冷凍食品	記載無し
洋生菓子	17	竜田揚げ	有	要	-26℃	-18℃以下	-8.0℃	冷凍食品	国内産(宮崎)
	18	チーズワッフル	記載無し	不要	-20℃	-18℃以下	-7.5℃	冷凍食品	国産(福岡県)
	19	ショートケーキ	記載無し	不要	-24℃	-18℃以下	-11.0℃	冷凍食品	記載無し
	20	フォンダンショコラ	記載無し	不要	-24℃	-18℃以下	-5.0℃	冷凍食品	記載無し
	21	レアチーズケーキ	記載無し	不要	-24℃	-18℃以下	-6.5℃	冷凍食品	国産(東京都)
	22	ロールケーキ	記載無し	不要	-25℃	-18℃以下	-1.5℃	冷凍食品	記載無し

表-4-2 購入検体の情報、販売時温度及び検体秤量時の表面温度の測定結果(冷凍食品)

区分	No.	名称	凍結前 加熱	摂取前 加熱	販売時 温度	表示保存 温度	秤量時 表面温度	表示	原産国
魚介類 (生食用)	23	くじら刺身	無	不要	-23℃	-18℃以下	-2.0℃	冷凍食品	国産(千葉県産)
	24	ボイルえび	記載無し	不要	-23℃	-18℃以下	-14.0℃	冷凍食品	タイ産
	25	スモークモントワト	記載無し	不要	-24℃	-18℃以下	-6.5℃	冷凍食品	中国産
	26	ほたて貝柱	無	不要	-24℃	-18℃以下	-8.0℃	冷凍食品	国産(北海道産)
	27	甘えび	記載無し	不要	-20℃	-18℃以下	-0.5℃	冷凍食品	タイ産
	28	むきえび	無	要	-23℃	-18℃以下	-5.5℃	冷凍食品	タイ産
	29	むきえび	無	要	-24℃	-18℃以下	-3.0℃	冷凍食品	記載無し
	30	からすかれい切り身	記載無し	要	-24℃	-18℃以下	-4.5℃	冷凍食品	中国産
	31	いか	無	要	-24℃	-18℃以下	-2.0℃	冷凍食品	中国産
	32	子持ちからふとししやも	無	要	-24℃	-18℃以下	-3.5℃	冷凍食品	中国産
揚げ物 (原材料：肉)	33	鯖フィレーレ	無	要	-20℃	-18℃以下	0.5℃	冷凍食品	中国産
	34	豚カツ	無	要	-24℃	-18℃以下	-2.0℃	冷凍食品	記載無し
	35	ローストンカツ	無	要	-24℃	-18℃以下	-2.0℃	冷凍食品	記載無し
	36	チキンカツ	無	要	-24℃	-18℃以下	-7.5℃	冷凍食品	記載無し
	37	ささみチーズフライ	無	要	-24℃	-18℃以下	-3.0℃	冷凍食品	中国産
	38	ささみの竜田揚げ	無	要	-20℃	-18℃以下	-2.5℃	冷凍食品	中国産
揚げ物 (原材料：魚)	39	えびフライ	無	要	-23℃	-18℃以下	-1.0℃	冷凍食品	タイ産
	40	あじフライ	無	要	-20℃	-18℃以下	-2.5℃	冷凍食品	国産(島根県)

表-4-3 購入検体の情報，販売時温度及び検体秤量時の表面温度の測定結果(チルド温度帯販売食品)

区分	No.	名称	凍結前 加熱	摂取前 加熱	販売時 温度	表示保存 温度	秤量時 表面温度	表示	原産国
そう菜 (飲茶)	1	ぎょうざ	-	要	4℃	0℃～10℃	6.5℃	チルドぎょうざ	記載無し
	2	しゅうまい	-	要	4℃	0℃～10℃	9.5℃	チルドしゅうまい	記載無し
	3	水餃子	-	要	4℃	10℃以下	8.5℃	チルドぎょうざ	国産
	4	肉まん	-	要	4℃	10℃以下	7.5℃	そうざい(肉まん)	国産
	5	しゅうまい	-	要	2℃	1℃～10℃	9.5℃	チルドしゅうまい	記載無し
	6	春巻	-	要	7℃	4℃以下	8.5℃	はるまき	記載無し
そう菜 (その他)	7	ミートボール	-	不要	4℃	10℃以下	7.0℃	チルドミートボール(チキン)	記載無し
	8	チキンハンバーグ	-	不要	4℃	10℃以下	7.5℃	チルドハンバーグ(チキン)	記載無し
	9	から揚げ	-	要	4℃	4℃以下	9.5℃	そうざい	記載無し
	10	ピザ	-	要	4℃	10℃以下	7.0℃	ピザ	記載無し
	11	肉だんご	-	要	0℃	10℃以下	10.5℃	肉団子	記載無し
	12	オムレツ	-	要	2℃	10℃以下	10.0℃	記載無し	記載無し
	13	ひじき煮	-	記載無し	7℃	10℃以下	9.5℃	そうざい	記載無し
	14	豚しょうが焼	-	要	2℃	10℃以下	10.5℃	そうざい(豚しょうが焼)	記載無し
	15	牛カルビ焼肉	-	要	2℃	10℃以下	11.0℃	そうざい(牛カルビ焼肉)	記載無し
	16	ハンバーグ	-	要	5℃	10℃以下	7.5℃	そうざい(ハンバーグ)	記載無し
洋生菓子	17	竜田揚げ	-	要	0℃	4℃以下	6.5℃	記載無し	記載無し
	18	ワッフルサンド	-	不要	3℃	10℃以下	10.5℃	洋生菓子	記載無し
	19	シフォンケーキ	-	不要	2℃	10℃以下	8.0℃	洋生菓子	記載無し
	20	ベルギーショコラ	-	不要	4℃	記載無し	8.5℃	洋生菓子	記載無し
	21	チーズスフレ	-	不要	6℃	10℃以下	8.0℃	洋生菓子	記載無し
	22	レアチーズケーキ	-	不要	4℃	10℃以下	7.5℃	洋生菓子	記載無し
	23	ロールケーキ	-	不要	6℃	10℃以下	10.0℃	洋生菓子	記載無し

表-4-4 購入検体の情報、販売時温度及び検体秤量時の表面温度の測定結果(チルド温度帯販売食品)

区分	No.	名称	凍結前 加熱	採取前 加熱	販売時 温度	表示保存 温度	秤量時 表面温度	表示	原産国
魚介類 (生食用)	24	くじら刺身	-	不要	2℃	10℃以下	9.5℃	記載無し	記載無し
	25	サラダえび	-	不要	2℃	4℃以下	9.0℃	サラダえび	記載無し
	26	ステーキモントラウト	-	不要	1℃	10℃以下	5.5℃	記載無し	記載無し
	27	ほたて貝柱	-	不要	1℃	10℃以下	3.5℃	記載無し	北海道産
	28	甘えび	-	不要	0℃	4℃以下	9.5℃	生食用鮮魚介類 (甘えび尾付きむき)	タイ産
	29	むきえび	-	要	2℃	10℃以下	8.0℃	記載無し	記載無し
	30	むきえび	-	要	0℃	10℃以下	4.5℃	むきえび(解凍)	記載無し
魚介類 (加熱用)	31	からすかれい切身	-	要	1℃	10℃以下	3.0℃	記載無し	記載無し
	32	いかねぎ塩	-	要	2℃	10℃以下	6.5℃	魚介類加工品(いかネギ塩)	記載無し
	33	子持ちからふとしししゃも	-	要	1℃	10℃以下	7.0℃	子持ちしししゃも 3L 12尾	国産(茨城県)
	34	さば旨味漬	-	要	2℃	10℃以下	9.5℃	さば旨味漬	記載無し
	35	豚肉ヒレカツ用	-	要	1℃	4℃以下	9.5℃	記載無し	記載無し
	36	ヒレかつ衣付き	-	要	2℃	4℃以下	7.5℃	惣菜半製品	記載無し
	37	ステーキクチキン	-	要	-2℃	10℃以下	9.5℃	そうざい(揚げ物)	記載無し
揚げ物 (原材料:肉)	38	若鶏チキンカツ	-	要	2℃	10℃以下	10.5℃	記載無し	国産
	39	ササミチーヅカツ	-	要	0℃	4℃以下	8.5℃	記載無し	記載無し
	40	若どりむねスパイス	-	要	6℃	4℃以下	6.5℃	記載無し	記載無し
	41	えびフライ	-	要	0℃	4℃以下	8.0℃	チルドフライ(エビ)	記載無し
揚げ物 (原材料:魚)	42	あじフライ	-	要	0℃	4℃以下	7.5℃	チルドフライ(アジ)	記載無し

表-5-1 微生物試験結果(冷凍食品)

区分	No.	名称	Enterobacteriaceae (/g)	Presumptive <i>E. coli</i> (/g)	黄色ブドウ 球菌(/g)	サルモネラ (/25 g)	腸炎ビブリオ (/25 g)	生菌数 (/g)
そう菜 (飲茶)	1	ぎょうざ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	2	しゅうまい	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	3	水餃子	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.7×10 ²
	4	肉まん	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	5	しゅうまい	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	6	春巻	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	50
そう菜 (その他)	7	肉だんご	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.1×10 ²
	8	ハンバーグ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	9	鶏から揚げ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	10	ピザ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	5.7×10 ²
	11	つくね	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	9.6×10 ²
	12	オムレツ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	13	ひじき煮	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	9.5×10 ²
	14	豚しょうが焼き	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.8×10 ²
	15	牛肉の甘辛煮	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	50
	16	ハンバーグ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
洋生菓子	17	竜田揚げ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	18	チーズワッフル	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	19	ショートケーキ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	20	フォンダンショコラ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.4×10 ²
	21	レアチーズケーキ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.9×10 ²
	22	ロールケーキ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10

表-5-2 微生物試験結果(冷凍食品)

区分	No.	名称	Enterobacteriaceae (/g)	Presumptive <i>E. coli</i> (/g)	黄色ブドウ 球菌(/g)	サルモネラ (/25 g)	腸炎ビブリオ (/25 g)	生菌数 (/g)
魚介類 (生食用)	23	くじら刺身	2.4×10 ²	<0.3	<100	陰性	陰性	4.4×10 ³
	24	ポイルえび	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	25	スモークサモントウト	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	26	ほたて貝柱	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	2.2×10 ²
	27	甘えび	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	28	むきえび	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.8×10 ³
	29	むきえび	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	4.5×10 ⁵
	30	からすかれい切り身	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	31	いか	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.1×10 ⁴
	32	子持ちからふと ししやも	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.5×10 ³
揚げ物 (原材料：肉)	33	鯖フライ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	60
	34	豚カツ	1.5×10 ²	<0.3	<100	陰性	陰性	6.7×10 ³
	35	ローストンカツ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.0×10 ³
	36	チキンカツ	1.7×10 ²	2.3	<100	陰性	陰性	2.5×10 ⁴
	37	ささみチーズフライ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.5×10 ²
	38	ささみの竜田揚げ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	50
	39	えびフライ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.5×10 ³
揚げ物 (原材料：魚)	40	あじフライ	<40	<0.3	<100	陰性	陰性	2.1×10 ³

表-5-3 微生物試験結果(チルド温度帯販売食品)

区分	No.	名称	Enterobacteriaceae (/g)	Presumptive <i>E. coli</i> (/g)	黄色ブドウ球菌(/g)	サルモネラ (/25 g)	腸炎ビブリオ (/25 g)	生菌数 (/g)
そう菜 (飲菜)	1	ぎょうざ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	2	しゅうまい	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	3	水餃子	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	4	肉まん	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	3.7×10 ²
	5	しゅうまい	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	6	春巻	<40	<0.3	<100	陰性	陰性	1.8×10 ⁴
そう菜 (その他)	7	ミートボール	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	8	チキンハンバーグ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	9	から揚げ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	90
	10	ピザ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.4×10 ⁷
	11	肉だんご	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	12	オムレツ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.9×10 ²
	13	ひじき煮	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	14	豚しょうが焼	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	15	牛カルビ焼肉	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	16	ハンバーグ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	17	竜田揚げ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
洋生菓子	18	ワッフルサンド	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	19	シフォンケーキ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<40
	20	ベルギーショコラ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	21	チーズスフレ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	22	レアチーズケーキ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	4.1×10 ³
	23	ロールケーキ	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10

表-5-4 微生物試験結果(チルド温度帯販売食品)

区分	No.	名称	Enterobacteriaceae (/g)	Presumptive <i>E. coli</i> (/g)	黄色ブドウ 球菌(/g)	サルモネラ (/25 g)	腸炎ビブリオ (/25 g)	生菌数 (/g)
魚介類 (生食用)	24	くじら刺身	3.6×10^2	<0.3	<100	陰性	陰性	2.7×10^4
	25	サラダえび	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	9.5×10^3
	26	ステーキモトアウト	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	1.0×10^2
	27	ほたて貝柱	1.3×10^3	0.36	<100	陰性	陰性	7.6×10^3
	28	甘えび	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	2.3×10^2
	29	むきえび	2.1×10^2	<0.3	<100	陰性	陰性	4.8×10^5
	30	むきえび	<10	<0.3	<100	陰性	陽性	6.0×10^5
	31	からすかれい切身	<40	<0.3	<100	陰性	陰性	7.0×10^2
	32	いかねぎ塩	<40	<0.3	<100	陰性	陰性	1.2×10^4
	33	子持ちからふと ししやも	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	4.0×10^4
揚げ物 (原材料：肉)	34	さば旨味漬	90	<0.3	<100	陰性	陰性	2.5×10^4
	35	豚肉ヒレカツ用	5.4×10^4	0.92	<100	陰性	陰性	1.7×10^7
	36	ヒレかつ衣付き	5.6×10^4	<0.3	<100	陰性	陰性	1.0×10^8
	37	ステーキチキン	<10	<0.3	<100	陰性	陰性	<10
	38	若鶏チキンカツ	6.4×10^2	24	<100	陰性	陰性	5.2×10^3
	39	ササミチーズカツ	9.5×10^2	<0.3	<100	陽性(O7群)	陰性	1.3×10^5
	40	若どりむねスパイス	1.1×10^4	1.1×10^3	<100	陽性(O7群)	陰性	6.4×10^4
	41	えびフライ	6.0×10^5	<0.3	<100	陰性	陰性	5.5×10^5
揚げ物 (原材料：魚)	42	あじフライ	9.0×10^4	0.74	<100	陰性	陰性	8.0×10^7

以 上

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）
分担研究報告書

「冷凍食品の安全性確保に関する研究」

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

分担研究者	小沼博隆	東海大学海洋学部
協力研究者	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
	増田高志	静岡県西部食肉衛生検査所
	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

研究要旨

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の挙動を把握することを目的として、市販のチルドギョーザに *Staphylococcus aureus*、*Esherichia coli*、*Salmonella* Typhimurium および *Listeria monocytogenes* を接種後、-15、-5、0、5、10、15℃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。菌を接種しない検体についても同様に一般生菌数の測定を行うとともに、保存後の微生物叢を確認するため菌種の同定を行った。

その結果、接種した試験菌の多くが 10℃以上で増殖し、5℃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。

A. 研究目的

現在、市場には冷凍あるいはチルドなど低温で流通する食品が多くみられる。このため、低温での食品保存による微生物挙動を把握することは食品衛生上、重要である。平成 20 年度に実施した予備的な低温保存試験をもとに、本研究では市販食品に食中毒起因菌や衛生指標菌を接種して、冷蔵・冷凍の流通温度帯での微生物挙動について調査し、冷凍流通食品における各種病原体を対象とした微生物規格の設定や適切な温

度管理と消費期限設定に関する基礎データの作成を目的とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株及び使用培地

Staphylococcus aureus ATCC6538P、*Esherichia coli* ATCC25922、*Salmonella* Typhimurium ATCC13311 および *Listeria monocytogenes* ATCC19115 の 4 菌種を用い、Brain Heart Infusion (BHI, Difco) にて 37℃、24 時間培養したものを PBS(-) (日

水製薬)で調製し、供試した。また、*E. coli* 標準株 ATCC25922 と比較するため、*E. coli* 臨床分離株 (*E. coli* O157:H7) を使用した。選択分離培地はそれぞれ CHROMagar Staph aureus (CHROMagar 社)、Chromocult Coliform Agar ES (Merck 社)、CHROMagar Salmonella (CHROMagar 社)、CHROMagar Listeria (CHROMagar 社) を使用した。一般生菌数は標準寒天培地 (日水製薬) により測定した。

2. 食品

試験品として 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°C 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) であり、本研究では解凍直後の製品を使用した。

3. 試験法

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。なお、BHI 中において 2 菌種間で増殖阻害がないことを予め確認した。

検体は、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 10^4 cfu/g 接種して菌液を食品になじませて作製した。それぞれの検体を、-15、-5、0、5、10、15°C 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)。菌を接種しない検体についても同様に試料を調製し、一般生菌数を測定した。菌数測

定は、接種菌については選択分離培地による寒天平板塗抹法、一般生菌数については混釈培養法により実施した。なお、測定時の検体調製には Buffered Peptone Water (BPW、Merck) を使用し、10 倍希釈試料液を作製後、損傷菌の蘇生のため $20 \pm 2^\circ\text{C}$ で 1 時間 ± 5 分置いた。また、接種食品は上記の 4 菌種が陰性であることを確認した。

4. 食品由来微生物叢の同定

菌を接種していない検体において、一般生菌数を測定した標準寒天培地から単独集落を純培養し、グラム染色 (日水製薬) を施すとともに、BD BBLCRISTAL (Becton Dickinson) を用いて菌種の同定を行った。また、*Bacillus cereus* については PCR 法によりセレウリド合成酵素遺伝子 *ces* および下痢原性毒素をコードする遺伝子 *nhe* の検出を試みた。

5. *E. coli* 標準株と臨床分離菌株の増殖性の比較

E. coli 標準菌株 (ATCC25922) と臨床分離菌株 (*E. coli* O157:H7) を BHI に接種して 10°C で保存し、経時的に菌数測定した。

C. 研究結果

1. 低温保存による微生物挙動

S. aureus (図 1.1) 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 (図 1.2) 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 (図 1.3) 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 (表 1)。

L. monocytogenes (図 1.4) 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 (表 2.1 および 2.2)。菌を接種していない検体では、試験開始時には検出限界 (<300cfu/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 (図 2.3)。

2. 食品由来微生物叢の同定

分離菌の多くがグラム陽性有芽胞桿菌であり、*Bacillus cereus*、*B. subtilis*、*B. circulans*、*B. licheniformis* 等と同定された。*B. cereus* と同定された菌は、セレウリド合成酵素遺伝子 *ces* は保有していなかったものの、下痢原性毒素をコードする遺伝子 *nhe* を保有していた。その他、*Aerococcus viridans* 等が分離された。

3. *E. coli* 標準株と臨床分離菌株の増殖性の比較

本実験で使用した *E. coli* 標準菌株

(ATCC25922) と臨床分離菌株 (*E. coli* O157:H7) の 10°C における菌数変化を経時的に確認したところ、臨床分離菌株では明らかな増殖がみられたものの、ATCC25922 株は顕著な減少がみられた (図 3)。

D. 考察

現在の商業的な食品流通において、チルド食品と称される食品の保存温度は 10°C 以下に設定されている場合が多いが、本研究により 5°C と 10°C で微生物の発育に明確な差がみられ、10°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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°C や 5°C で菌数の減少がみられ菌体の損傷が示唆されたが、-15°C では菌数が安定していた。すなわち、-15°C などのより低い冷凍温度帯では微生物の増殖は阻止されるが、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。

本実験では *E. coli* 標準株を食品に接種し 10℃で保存した際に菌数の明らかな減少がみられた。一般に病原性大腸菌は 7℃以上で増殖が可能といわれており、臨床分離菌株では 10℃で明らかな増殖がみられた。10℃で菌数が減少したのは本実験に用いた菌株 (ATCC25922) の特性と思われる。

また、*Salmonella* Typhimurium において 10℃保存で 14 日目に菌数の減少がみられたが、BPW に懸濁した試料を 5℃で保管することにより、7 日目と同等の菌数が得られたことから、保存による本菌の損傷の可能性が考えられた。

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。

E. 結論

市販食品に食中毒起因菌等の細菌を接種した低温保存試験により、冷蔵温度帯においても菌種や保存温度によって菌の増殖が認められた。また、冷凍温度帯では菌の増殖は阻止されるが、死滅することなく生残性が確認された。現在、日本の食品の微生物規格基準は衛生指標菌を対象としたものが多いが、今後は病原細菌等の事故発生を引き起こす菌を対象とした安全性規格基準の設定についても検討が必要であると思われる。さらに一貫した低温管理や適切な消費期限の設定についても検討していく必要がある。

F. 研究発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

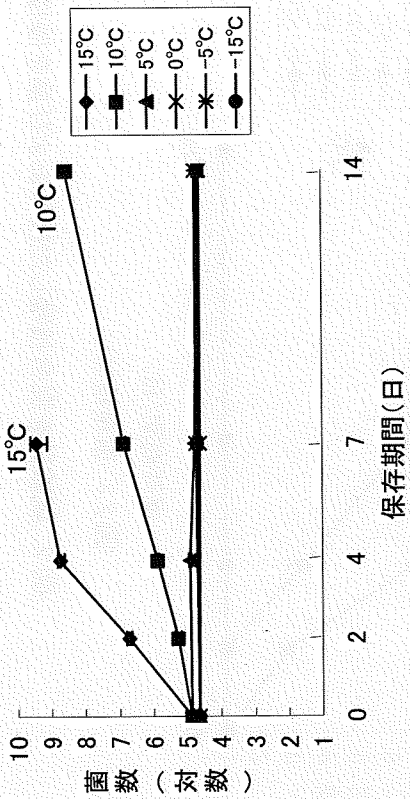


図 1.1 *S. aureus*

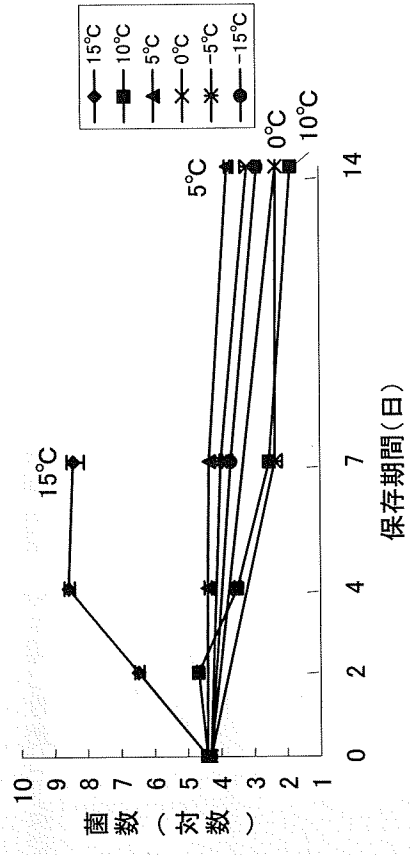


図 1.2 *E. coli*

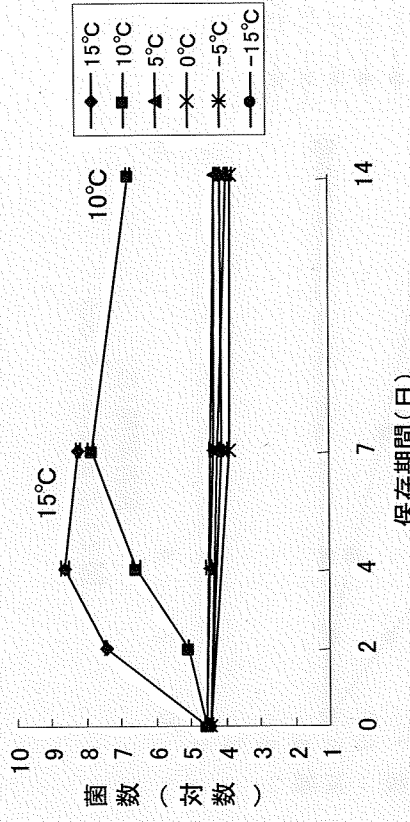


図 1.3 *Salmonella Typhimurium*

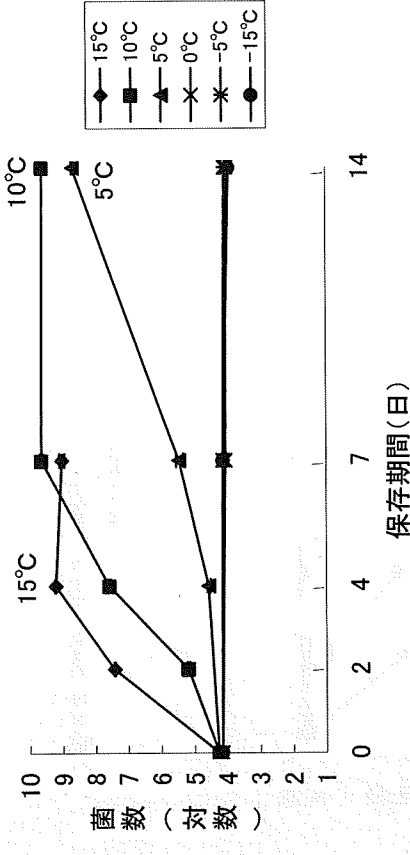


図 1.4 *L. monocytogenes*

図 1. 接種した各試験菌の微生物挙動

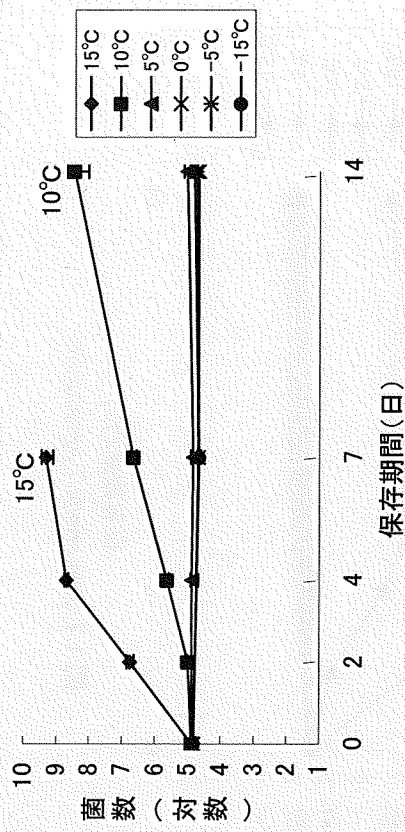


図 2.1 *S. aureus* + *E. coli*

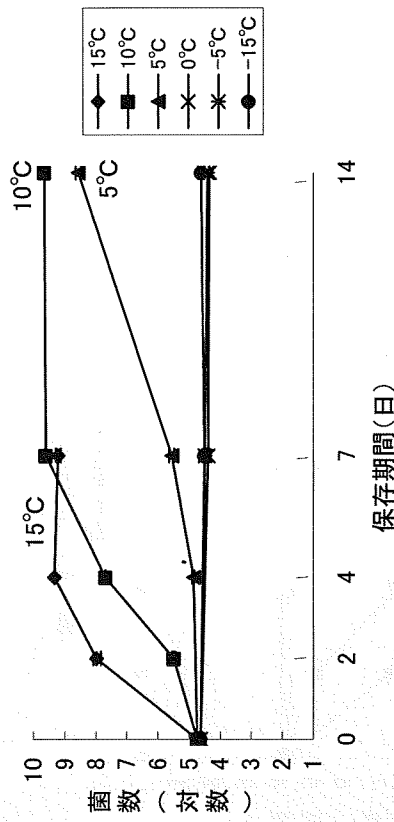


図 2.2 *Salmonella* Typhimurium + *L. monocytogenes*

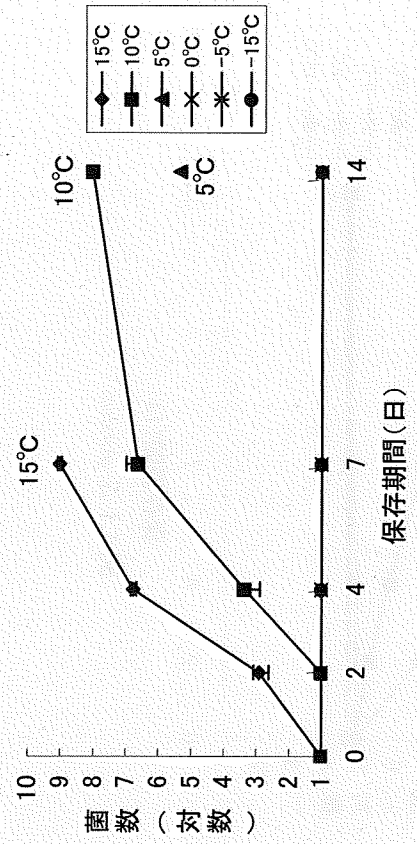


図 2.3 菌接種なし

図 2. 試験菌を混合接種した検体および菌を接種しなかった検体における一般生菌数の挙動

表1. *Salmonella* Typhimurium の菌数変化(10°C、14日目～)

7日目測定時:平均 7.0E+07 cfu/g

	希釈1時間後(*1)	5°C、1～2日保管後(*2)
サンプル1	4.8E+06	1.3E+07
サンプル2	5.6E+06	5.5E+07
サンプル3	5.9E+06	4.4E+07
サンプル4	6.5E+06	5.4E+06
サンプル5	8.7E+06	1.3E+07

(*1)希釈1時間後とは、チルドギョーザ25gをBPW225mlで10倍希釈し、
損傷回復のために20±2°C、1時間±5分おいた後に測定した菌数

(*2)5°C、1～2日保管後とは、上記の10倍希釈試料液を5°Cで保管し、
1～2日後に再測定した菌数

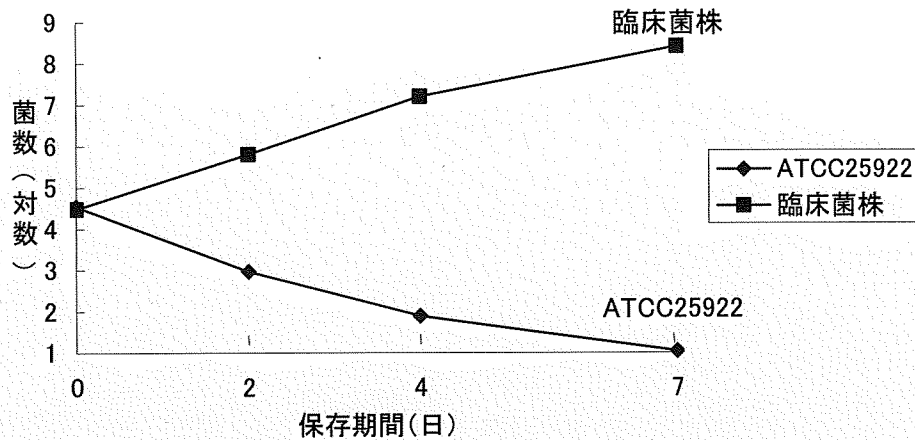


図3. *E. coli* ATCC25922 および *E. coli* O157:H7(臨床菌株)の
BHI10°C保存中での菌数変化

「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

報告書

平成21年9月

MRI 株式会社 **三菱総合研究所**

— 目 次 —

1. 調査の概要	81
1. 1 調査の背景	81
1. 2 調査の目的	81
2. アメリカにおける冷凍食品の微生物規格基準	82
2. 1 アメリカにおける冷凍食品に特化した微生物規格基準の概要	82
2. 2 調査方法	84
2. 3 調査結果	84
(1) CID の概要 ¹⁾	84
(2) CID における冷凍食品の微生物規格基準の策定理由	85
(3) CID における冷凍食品の微生物規格基準と原材料に関する連邦規則との関係	86
3. 韓国における冷凍食品の微生物規格基準	88
3. 1 微生物規格基準の概要	88
3. 2 調査方法	90
3. 3 調査結果	90