

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) と食品衛生上の *E. coli* (大腸菌) 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 が用いられることが多い。そのため、将来的には国内の衛生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 法による衛生指標菌の検出を行った。試験対象菌には、初年度は、現在の冷凍食品の規格基準に定められている coliforms、presumptive *E. coli* 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 に替わって衛生指標菌として広く用いられている Enterobacteriaceae の3種を選択した。2年度及び最終年度には、衛生指標菌から presumptive *E. coli* と Enterobacteriaceae の2種、病原体である *Salmonella*、*S. aureus* 及び *V. parahaemolyticus* の3種について調査した。

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. 1. presumptive *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 3.2×10³/g (ISO4832)であった。

1. 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 3.1×10³/g

(ISO21528-2)であった。

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

純培養標準菌株を普通ブイヨンにて一夜培養し、0.05%Tween80 含有 BPW にて段階希釈し 121°C15 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

初年度は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。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 年次は、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、凍結食品 165 検体の計 364 検体について調査を行った。検体は全て -10°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。購入検体の保管・懸濁液の作成は初年度と同様に行った。また、予備的調査として、-5°C から 5°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。最終年度は、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。

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±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、 $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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 ± 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 ± 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、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 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。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 ± 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 ± 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。

2. 6. *S. 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 ± 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 ± 3 時間培養した。コアグラゼ試験、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ゼ陽性であれば、黄色ブドウ球菌陽性とした。

2. 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 ± 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 ± 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 ± 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. 8. *V. 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. 9. 衛生指標菌選択培地上の集落同定

初年度の研究において、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、2年次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(日本ビオメリュー)を用いて菌種の同定を行った。

2. 10. 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。2007年度は合

計1,013検体を、2008年度は合計640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)、加熱済調理品(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、検討した。試験項目は一般生菌数、E. coli、大腸菌群、ブドウ球菌、サルモネラ及び腸炎ビブリオであった。

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、衛生指標菌及び病原体は菌が検出されたものを陽性とし、各試験法の検出限界以下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・凍結食品及びチルド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. 検査法の設定及び予備試験

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1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、標準株を用いた添加試験を行った。その結果、大腸菌を添加して行った coliforms と presumptive *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(平成19年度報告書p.83表2)。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ため、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ないと判断した。

2. 汚染実態調査

2. 1. 初年度結果 (平成 19 年度)

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平成 19 年度報告書 p. 88-89. 表 7 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 (平成 19 年度報告書 p. 86. 表 5)。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では、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 (平成 19 年度報告書 p. 90, 92. 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 ($p < 0.05$ 、平成 19 年度報告書 p. 90-92. 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、各カテゴリーの食品について凍結前加熱の有無で分類した結果を表 6 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、飲茶類の 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。

2. 2. 2年度結果（平成20年度）

市販の冷凍食品およ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、平成20年度報告書 p. 14. 表3及び p. 21-23. 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 共に凍結食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（平成20年度報告書 p. 14. 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食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食品の揚げ物で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食品及び冷凍食品の分離率に差は見られなかったが、飲茶類では凍結食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食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* の分離率が凍結食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、presumptive *E. coli* の分離率が凍結食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」 $p < 0.05$ ）。

2. 3. 最終年度結果（平成21年度）

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、平成21年度分担報告書 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（ $p < 0.05$ 、平成21年度分担報告書 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（平成21年度分担報告書 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（平成21年度分担報告書 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

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(平成 21 年度分担報告書 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($p < 0.05$ 、平成 21 年度分担報告書 図 5)。

3. 衛生指標菌選択培地上の集落同定

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 1-4 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 1)。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 2)。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 3)、非典型集落 8 株のうち 6 株が Enterobacteriaceae であった(図 4)。

4. 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 2007 年度の微生物汚染調査の結果、大腸菌群が 333 検体中 7 検体(2.1%)から、サルモネラが 368 検体中 4 検体(1.1%)から検出された。E. coli は 627 検体、ブドウ球菌は 322 検体、腸炎ビブリオは 51 検体から全く検出されなかった。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く、全体を通じて規格違反となる検体は見られなかった(平成 20 年度報告書 p. 19. 表 6)。2008 年度の調査では 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。(平成 21 年度分担報告書 表 3)

D. 考察

今回の調査により、一般に流通している凍結食品やチルド食品の衛生指標菌汚染率が、規格基準のある冷凍食品よりも高い傾向にあることが示された。凍結食品においては、黄色ブドウ球菌の汚染状況も冷凍食品よりも高い傾向が示された。これらの食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まず、冷凍食品は定められた規格基準を逸脱しないように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など、製造工程に工夫がなされているためであると思われる。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、凍結食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、食品群の分類に注意が必要な場合があると思われた。また、肉を原料に含む揚げ物類において、チルド食品と冷凍食品の Enterobacteriaceae の検出率に有意差がみられたが、冷凍食品は凍結直前未加熱の表示がある製品でも肉部分は加熱済みであることが多い一方、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、チルド食品では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。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。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は全体的に一般生菌数、病原体分離率ともに低く、冷凍食品か否かに関わらず適切な衛生管理がなされていることが示唆された。

また、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、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ことから、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。

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。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つ

た。更に、国内で一般に流通しているチルド食品においても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。また、今回用いた国際的標準試験法である ISO 法については、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

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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（食の安心・安全確保推進研究事業）

分担総合研究報告

冷凍食品・冷凍流通食品・チルド食品の微生物汚染状況の把握

研究分担者	小沼博隆	東海大学海洋学部水産学科
研究協力者	杉山寛治・飯田奈都子	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食物栄養学科
	増田高志	静岡県西部食肉衛生研究所
	小澤一弘・森田妃美子・紅林知恵美	株式会社中部衛生検査センター

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的な研究として冷凍食品・冷凍流通食品・チルド食品の微生物汚染状況を把握することを目的とした。3年間で様々な流通温度帯や食品群に対して合計 406 検体の検体について、微生物汚染状況を調査した。結果としては冷凍流通食品・チルド食品が冷凍食品に比して高い汚染状況であった。また食品群によっても微生物汚染状態が異なるため、その点を考慮した新しい規格基準が必要であると思われる。

A. 研究目的

現在、国内において冷凍状態で流通している食品には、食品衛生法により規定されている冷凍食品の他に、 -15°C 以上の温度で冷凍され販売されている冷凍流通食品や販売時に冷蔵されるフローズンチルド食品、 -5°C から 10°C までの温度帯で販売されるチルド食品など多種多様な形態の食品群が混在している。しかし、これらの食品群の中でも冷凍食品のみに保存基準や成分規格が存在しているのに対し他の冷凍温度帯あるいはチルド温度帯で流通している食品群については特に規定された規格基準は定められていない。また国内の冷凍食品についてはその内容や製造量に統計があるものの、その他の冷凍流通食品やチルド食品については流通実態および微生物汚染状況の調査が行われていないのが現状である。本研究では規格基準再検討のための基礎的なデータとして、それぞれの流通温度帯および食品群に対しての微生物汚染実態調査を行い傾向を把握することを目的とした。

B. 研究方法

1) 検査対象・購入・輸送・保管方法

3年間の微生物汚染実態調査において平成 19

年度は加熱用揚げ物類 34 検体(冷凍食品 22 検体、冷凍流通食品 12 検体)および加熱用飲茶類 56 検体(冷凍食品 33 検体、冷凍流通食品 6 検体、チルド食品 17 検体)の 90 検体についてそれぞれ 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。

平成 20 年度は加熱用揚げ物類 124 検体(冷凍食品 65 検体、冷凍流通食品 59 検体)と加熱用飲茶類 17 検体(冷凍食品 8 検体、冷凍流通食品 9 検体)および魚介類 15 検体(冷凍食品 7 検体、冷凍流通食品 8 検体)の合計 156 検体についてそれぞれ ISO 法による presumptive *E. coli*/Enterobacteriaceae の検査、告示法による SPC の測定、および NIHSJ 法による黄色ぶどう球菌・サルモネラ属菌・腸炎ビブリオの検査を行った。

平成 21 年度は冷凍食品 79 検体、チルド食品 53 検体、冷凍流通食品 28 検体の合計 160 検体を対象とした。内訳は冷凍食品、チルド食品、冷凍流通食品を含め、揚げ物・魚介類・惣菜類・洋生菓子類の 카테고리ごとにそれぞれ 40 検体ずつ選択した。検査項目に関しては平成 20 年度と同様の検査を行った。

3年間で合計406検体の微生物汚染調査を行ったが内訳をまとめると下記の通りである。
※1 平成19年および20年度は加熱用飲茶類

2) 検査項目および検査方法

各試験項目に対してISOの規格及び微生物検査法(NIHSJ)の試験法を用いた。

試験項目	検査方法
Enterobacteriaceae	ISO21528-2
Presumptive Echerichia coli	ISO7251
黄色ぶどう球菌	NIHSJ-03-ST3
サルモネラ属菌	NIHSJ-01-ST4
腸炎ビブリオ	NIHSJ-06-ST2
生菌数	標準寒天平板培地法*

*食品衛生検査指針2004

C. 結果と考察

過去3年間のデータを通して見る限り、冷凍食品と冷凍流通食品及びチルド食品に目立った有意差は見られなかった。しかし、揚げ物冷凍流通食品等において一般生菌数が規格基準値(3.0×10^6 cfu/g)に迫る値を検出したことから、これらの食品が、規格基準の定められていない中で広く流通しているということは少なからず問題であるといえる。

本研究に使用した食品は、ほとんどが凍結前加熱処理の施されていないものである。冷凍食品の保存及び流通温度が -18°C という微生物の繁殖が抑えられる状況下であることを鑑みるに、原材料の微生物汚染が検査結果に影響していると考えられることは、これまでの報告で述べた通りである。

日本の冷凍食品消費量における輸入量の割合はおよそ4割であり、輸入冷凍食品の約6割を中国産が占めている(社団法人日本冷凍食品協会)。食糧自給率が低い我が国において、食品は輸入に頼らざるを得ない。そのため残留農薬に関しては、ポジティブリスト制度への移行に伴う規制強化、また、農薬に限らずとも各メーカーでは原料や製品の安全性の検査、更に輸出入時におけるそれぞれの政府機関での検査など、様々に審査がなされている。それでも事故が起こるのであるから、規格基準のない食品による微生物汚染による大量の食中毒事故がいつ起きても不思議ではない。従って流通販売される食品が確かに安全なものであると証明するためにも、冷凍食品同様に冷蔵あるいは冷凍温度帯で流通される食品にも、何らかの基準を設けて管理する方が有益であると考えられる。

冷凍食品及び冷凍流通食品、チルド食品は、その利便性から消費量は年々増加している。

	調査年	揚げ物	魚介類	※1 惣菜類	洋生菜
冷凍食品	H19	22	—	33	—
	H20	65	7	8	—
	H21	20	20	19	20
冷凍流通食品	H19	12	—	6	—
	H20	59	8	9	—
	H21	9	8	11	—
チルド食品	H19	—	—	17	—
	H20	—	—	—	—
	H21	11	12	10	20
合計		198	55	113	40

また、野菜や果物から今回の研究にも用いた揚げ物類などの加工食品まで種類は豊富であり、加熱調理後に喫食するものから自然解凍で済むものなど、調理方法も多様化している。保存方法や保存温度帯も、食品によって大きな差がある。それらの現状を踏まえ、冷凍流通食品及びフローズンチルド食品、チルド食品は、保存及び流通温度帯が冷凍食品よりも高いことを考慮して基準を設けるのが妥当であると考えられる。本研究において微生物汚染状況の高かった冷凍前加熱処理の施されていない食品に関しては、特に慎重にならざるを得ない。

おそらく基準を設定しても、それに該当しないような食品群が出現する可能性は否定出来ないが、今回の微生物汚染調査の結果からは生産から喫食までの過程の中で冷凍あるいは冷蔵流通および生産されている食品には何らかの基準を設定した方が様々な企業努力や自主的な衛生管理が期待され、全体的な微生物汚染が制御されると思われる。また惣菜類、肉類、魚介類、揚げ物等など食品群別に規格基準の数値を設定する方が現実的かつ実用的であると思われる。

D. 研究発表

論文発表および学会発表共になし。

E. 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

「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ため、予備的な低温保存試験をもとに、市販のチルドギョーザに *Staphylococcus aureus*、*Esherichia coli*、*Salmonella* Typhimurium および *Listeria monocytogenes* を接種して -15、-5、0、5、10、15℃ で保存し、接種菌の菌数および一般生菌数を 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℃ 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、低温における微生物挙動を把握することは食品衛生上、重要である。本研究では、予備的な低温保存試験をもとに、市販食品に食中毒起因菌等を接種し、流通温度帯での微生物挙動について把握した。

B. 研究方法

1. 供試菌株及び使用培地

Staphylococcus aureus ATCC6538P、*Salmonella* Typhimurium ATCC13311、

Listeria monocytogenes ATCC19115 および *Esherichia coli* ATCC25922 の 4 菌株を用い、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* 標準菌株 ATCC25922 と比較するため、*E.coli* 臨床分離菌株 (*E.coli* O157:H7) を使用した。選択分離培地は CHROMagar Staph aureus、CHROMagar Salmonella、CHROMagar Listeria (以上 CHROMagar)、Chromocult Coliform Agar ES (Merck) 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. 試験法

2.1 予備試験

滅菌豚挽き肉 25g に *L. monocytogenes* を 10^4 cfu/g 接種後、-15、-5、0、5、10、15°C で保存し、経時的に菌数測定した (n=3)。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。

2.2 本試験

供試菌株は *S. aureus* と *E. coli*、*S. Typhimurium* と *L. monocytogenes* の 2 菌種ずつの組合せによる混合接種とした。

検体は、チルドギョーザ 2 個 (約 25g) に各試験菌を 10^4 cfu/g 接種して菌液を食品になじませて作製し、-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。測定時の検体調製は予備試験と同様に行った。

3. 食品汚染微生物叢の同定

菌を接種していない検体の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、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。

4. *E. coli* 標準菌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

1.1 予備試験

L. monocytogenes は、5°C 以上で増殖がみられ、温度が高くなるにつれて増殖速度が速くなる傾向がみられた。0°C では 42 日後に 1 オーダー増加したが、-5°C では菌数の変化はあまりみられなかった。-15°C では 7 日後 1 オーダー減少し菌の損傷が考えられたが、その後菌数の変化はなかった。

1.2 本試験

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。

S. Typhimurium は 15°C 及び 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が、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。菌を添加していない検体では、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℃以下では保存期間を通して検出限界以下であった。

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、*B. cereus*、*B. subtilis*、*B. circulans*、*B. licheniformis*等と同定された。*B. cereus*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。

3. *E. coli* 菌株による増殖性の比較

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℃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が、ATCC25922 株は顕著な減少がみられた。

D. 考察

現在の食品流通において、チルド食品と称される食品の保存温度は10℃以下に設定されている場合が多いが、本試験により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、低温増殖性細菌の存在が推察された。0℃以下では、グラム陽性菌である *S. aureus* および *L. monocytogenes* は0～-15℃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 *S. Typhimurium* は0℃や-5℃で菌数の減少が見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る必要があると思われた。

本試験では *E. coli* 標準菌株を食品に接種し10℃で保存した際に菌数の減少がみられた。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、*S. 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。

食品微生物叢として *Bacillus* 属が高率に分離され、凍結前に加熱処理されている製品ではあるが、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添加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。

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
東京 2009 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

国際食品微生物規格委員会

ICMSF

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



2006年

本書は、国際食品微生物規格委員会 (ICMSF) の許可を得て、平成 21 年度内閣府食品安全委員会食品健康影響評価技術研究「定量的リスク評価の有効な実践と活用のための数理解析技術の開発に関する研究(課題番号 0805:主任研究者 春日文子)」の補助金により翻訳、また平成 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)「冷凍食品の安全性確保に関する研究(H19-食品-一般-013)」により印刷したものであり、翻訳に関する責任は、春日が負うものである。

なお、源 竜弥氏により、本書の内容をよりわかりやすくイラスト化されたものが、ICMSF の HP に公開されているので、そちらも参照されたい。

http://www.icmsf.iit.edu/main/articles_papers.html

(平成 22 年 3 月 12 日)

ICMSF の委員

(訳注：2006年現在)

Dr. Martin Cole (会長)

National Center for Food Safety and Technology, 米国

Prof. Lone Gram (事務局長)

Danish Institute of Fisheries Research, デンマーク

Dr. Jeffrey Farber (会計担当)

Health Canada, カナダ

Dr. Lucia Anelich

Consumer Goods Council of South Africa, 南アフリカ

Dr. Robert Buchanan

U.S. Food and Drug Administration, 米国

Dr. Jean-Louis Cordier

Nestle Nutrition, スイス

Dr. Susanne Dahms

Shering Ag. ドイツ

Dr. Russ Flowers

Silliker Group Corporation, 米国

Prof. Bernadette Franco

Universidade de Sao Paulo, ブラジル

Prof. Leon Gorris

Unilever, イギリス

Dr. Fumiko Kasuga

National Institute of Health Sciences, 日本

Dr. Anna Lammerding
Public Health Agency of Canada, カナダ

Dr. Morris Potter
Food and Drug Administration, 米国

Dr. Katherine Swanson
Ecolab, 米国

Dr. Paul Teufel
Institute for Hygiene and Food Safety, ドイツ

Dr. Xiumei Liu
Institute of Nutrition and Food Safety, 中国

Prof. Marcel Zwietering
Wageningen University, オランダ

ICMSF

国際食品微生物規格委員会 (ICMSF) は、食品の微生物学的安全性の評価と管理に関して、政府および産業界に対して時宜を得た科学に基づく指針を提供するために1962年に設立された専門家グループである。その主たる成果としては書籍、科学論文およびその他の公表されている文書がある。ICMSF は国際微生物学連合 (IUMS) および国連の世界保健機関 (WHO) とも連携している。2006年現在では ICMSF の委員は 10ヶ国からの 17名であり、その下に以下のような 3つの活動的な小委員会がある：LAS (ラテンアメリカ小委員会)、SEAS (東南アジア小委員会) および中国-NEAS (中国北東アジア小委員会)。

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)

1. 緒言
2. 適正規範と HACCP
3. 公衆衛生目標の設定 - 保護の適正水準 (ALOP) の概念
4. 摂食時安全目標値 (FSO)
5. 達成目標値 (PO)
6. FSO、PO および微生物規格 (MC) の違い
7. FSO 設定の責任
8. PO の設定
9. FSO 遵守の責任
10. FSO を満たす
11. すべての FSO が可能であるわけではない
12. 結びの言葉
13. さらに学びたい人のための参考文献