

201234008A

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のための
微生物規格基準設定に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 春日 文子

平成25(2013)年3月

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のための
微生物規格基準設定に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 春日 文子

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

冷凍食品の安全性確保のための微生物規格基準設定に関する研究

春日 文子

----- 3

II. 分担ならびに委託研究報告

1. 市販カイワレ大根における各種衛生指標菌の定量化と細菌叢構成に関する研究

朝倉 宏 他

----- 13

2. 冷凍食品の安全性確保のための微生物規格基準設定に関する研究

椿 広計

----- 29

3. 冷凍食品の安全性確保のための微生物規格基準設定に関する研究

大西 俊郎

----- 33

4. 寄生虫による汚染に関する研究

寄生虫による汚染に関する研究

杉山 広 他

----- 37

平成 24 年度 海外の輸入食品における寄生虫および微生物の規格基準に関する調査

株式会社 三菱総合研究所

----- 55

平成 24 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

春日 文子 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

研究分担者

椿 広計 統計数理研究所 データ科学研究系

大西 俊郎 九州大学大学院 経済学研究院

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

杉山 広 国立感染症研究所 寄生動物部

研究協力者

五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

柴田 勝優 国立感染症研究所 寄生動物部

鈴木 淳 東京都健康安全研究センター

平 健介 麻布大学生命 獣医学部

武藤 麻紀 国立感染症研究所 寄生動物部

長谷川 専 株式会社 三菱総合研究所

百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

森嶋 康之 国立感染症研究所 寄生動物部

(敬称略、五十音順)

I. 総括研究報告

平成 24 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のための微生物規格基準設定に関する研究

研究代表者 春日 文子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部長

研究要旨：

発芽野菜の危害性を考慮し、平成 24 年 6 月から 9 月にかけて東京都内で購入したカイワレ大根、計 180 検体について、一般生菌・大腸菌群・β-グルクロニダーゼ産生大腸菌の定量検出を行った。検体 1g あたりの平均汚染菌数は一般生菌が 1.0×10^7 、大腸菌群が 3.4×10^6 であった。何れの検体からもβ-グルクロニダーゼ産生大腸菌は検出されず、PCR 法によっても腸管出血性大腸菌・サルモネラは検出されなかった。検体情報を整理することで 6 月に比べ 7・9 月の検体は高い汚染分布を示すことを明らかにした。遺伝学的解析手法を通じて、当該食品の構成細菌叢は季節と相関性を示しつつ、大きく変動することを示した。その多くが一般細菌・大腸菌群として算定される実情を踏まえ、当該食品の衛生管理に適した指標菌の設定について改めて検討する必要があると考えられる。

食品安全のための抜取検査による保証についての理論的検討において、今年度は、特に菌数の分布に一般離散分布を想定した際、安全基準を基に設計された 2 クラス抜取検査では検出力が低下する問題を 3 クラス抜取検査によってどのように改善できるかの数理的検討を行った。また、具体的に頻度分布としてのポアソン分布を想定した確率計算に基づく数値的検討を行った。その結果、必ず全ての食品ロットが満たすべき安全基準以外に、平成 23 年度にサーベイした赤尾洋二の圧縮限界を設ける 3 クラス抜取検査を所定の手続きで設計することで、抜取検査の OC (Operating Characteristic) 曲線を改善できることが示された。

さらに、サンプリングプランを実装することを意識して、サンプリングプランの構築・評価という一連のスキームを統計学的見地から考察した。その結果、スキームを次の 5 つのフェーズに分けた：(1) 汚染濃度のモデリング、(2) データに基づくパラメータ推定、(3) OC 曲線（臨界値 vs ロット合格率）の描画、(4) 推定値と真値のずれによる OC 曲線のずれを定量化、(5) ロット合格率の確率分布の評価。また、簡単なサンプリングプランについて上記のフェーズのそれぞれを数理ソフトウェア上で表現した。

我が国は食品の輸入量が多く、輸入食品由来の寄生虫による感染症が注視されることから、植物防疫・動物検疫に関連する法令等について、国際比較した。その結果、輸入食品に対する我が国の検疫・検査は、諸外国・国際機関の規定・対応と概ね同等であることが明らかとなった。「冷凍」という手段で食品媒介寄生虫を殺滅する条件について、文献調査を行い、肺吸虫および猫回虫を用いた実験で確認した。その結果、 -20°C 以下・7 日間以上であれば、多くの食品媒介寄生虫が殺滅されることを確認した。深海魚のキンメダイや魚の加工食品から人体寄生種のアニサキスを多数検出した。種々の食品に食品媒介寄生虫の汚染を認めるが、冷凍の応用と関連法規の整備で感染の予防を図ることが可能ではないかと期待された。

研究分担者	
椿 広計	統計数理研究所データ科学研究系 教授
大西 俊郎	九州大学大学院経済学研究院 准教授
朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 室長
杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官

A. 研究目的

昨年度の研究では、野菜類における各種衛生指標菌の汚染実態を小規模な検討により調査した。結果として、発芽野菜であるカイワレ大根はその他の供試野菜（葉物野菜・根物野菜）に比べ、衛生指標菌の汚染度が高く、推定大腸菌も陽性を示したことから、本年度はより多検体を用いた調査研究を行うと共に、危害性に係る情報の収集ならびに指標菌としての適合性に関する考察を行うことを目的とした。

微生物起因の食中毒リスクを低減するためには、菌数と重篤な食中毒発生事象に関する用量反応関係の把握と共に、菌数を対象とした抜取検査の設計が大きな問題となっている。この際、公衆衛生学上許容できないイベントリスク（重篤な食中毒を発症させる確率が一定確率以上となる）を与える菌数を非許容菌数 nR とし、抽出した m ロット中この非許容菌数以上となるロットが1件でもあれば不合格とする。これが食品安全分野で国民からその実行を許容される2クラス抜取検査方式となる。しかし、この2クラス抜取検査方式は、同一検出力を確保するために必要なロット数が大きくなり、統計的には合理的な方法と言えない。このため、国民から許容される3クラス抜取検査方式を用いることが検出力向上あるいはロットサイズ削減のために必要となる。そこで、この方式の検出力を

上げるために社会的に許容される菌数 nA を定め($nA < nR$)、この許容菌数より多い菌数となるロットが c 件あったら不合格とする3クラス抜取検査を設計することとした。

我が国は食品の輸入量が多い。しかも輸入食品由来の寄生虫による感染症が注視されている。そこで動植物検疫に関連する法令である「植物防疫法」および「家畜伝染病予防法」を選択し、国際機関や諸外国の関連法令と比較して、輸入食品の安全性に係わる問題点を考察した。冷凍という手段で食品媒介寄生虫による健康被害が効果的に防止できるのか、文献調査を継続した。また、食中毒事故の発生が目立つ肺吸虫と、症例の多発が懸念される猫回虫を対象に、冷凍による感染予防が成立するかを検討した。食品寄生蠕虫の汚染実態の詳細を知るため、昨年度に検査対象としたサバと同一海域で漁獲された深海魚のキンメダイを検索し、サバ由来の虫種とは異なる人体寄生性のアニサキスが多数検出されることを示した。魚の加工食品も検査し、アニサキスの寄生を証明した。

B. 研究方法

1. 市販カイワレ大根における各種衛生指標菌の定量化と細菌叢構成に関する研究

カイワレ大根における細菌汚染に関する文献調査は医中誌 Web を用いて行った。試験にあたっては、東京都内で平成24年6月より9月にかけて、計180検体のカイワレ大根を購入し、一般細菌・大腸菌群・ β -グルクロニダーゼ産生大腸菌の定量的検出をスパイラル法により行った。腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検出は、PCR法により行った。生産地・購入日時等の情報を各検体に適合させ、得られたデータの解析に供した。細菌叢に係る知見の収集には、PCR-DGGE法ならびに16S rRNA配列を対象としたPyrosequencing法を用いた。

2.3 クラス抜取検査方式の Operating Characteristics 評価ならびに nR に対して c、nA を定める方法

菌数 N がある離散確率分布に従っているとすると、3 クラス検査方式の合格確率は、抽出した m サンプルすべての菌数が nR 未満かつ、m サンプル中 c 個未満のサンプルの菌数 nA 未満となる確率となる。

そこで、期待値 μ の一般的な離散分布において、

$$P(\mu) = \Pr(N \geq nR),$$

$$Q(\mu) = \Pr(nA < N < nR)$$

とおけば、合格確率 $PA(\mu, m, c, nA)$ は、

$$\begin{aligned} P_A(\mu, m, c, nA) &= \\ & (1 - P(\mu))^m \sum_{k=0, \dots, c-1} m C_k \{Q(\mu)/(1-P(\mu))\}^k \\ & \times \{(1-P(\mu)-Q(\mu))/(1-P(\mu))\}^{m-k} \\ & = \sum_{k=0, \dots, c-1} m C_k Q(\mu)^k \{1-P(\mu)-Q(\mu)\}^{m-k} \end{aligned}$$

となる。本研究は、サンプルの母菌数分布が期待値 μ のポアソン分布に従うとし、nR が用量反応関係より定められていると仮定して、上記の確率評価方法を用いて 3 クラス抜取検査方式を設計した。

nR に対して c、nA を定める方法としては、規準型計数抜取検査方式の設計理論の導出ロットの合否判定に対する合理的な要請は、期待値 μ のポアソン分布の下で、nR 以上の菌数となるサンプルが確率 α 、例えば、1/10 以上となるロットを棄却すべきロットとして、 $P(\mu \alpha) = \alpha$ となる状況でロット合格確率を一定確率 δ 、例えば 0.05 以下に抑えることである。この条件を満たす μ を $\mu \alpha$ と記すこととする。一方、nR 以上の菌数となるサンプルが確率 β 、例えば 1/100000 以下となるロットを受容すべきロットとして、 $P(\mu \beta) = \beta$ となる状況でロット合格確率を一定確率 ε 以上、例えば 0.95 以上

にする必要がある。

規準型抜取検査方式設計方針は、この $\mu \alpha$ という期待値に対して、上記の制約条件を満たす 3 クラス検査方式の中で、nR が与えられたとき、最もサンプル抽出数 m の小さくなる c、nA の組み合わせを求めることとなる。

従って、 $\gamma(\mu) = Q(\mu)/(1-P(\mu))$ とおけば、m を与えた時、

$$(1-\alpha)^m \sum_{k=0, \dots, c-1} m C_k \gamma(\mu \alpha)^k \{1-\gamma(\mu \alpha)\}^{m-k}$$

は、c と γ について、できるだけ小さくなるように

$$(1-\beta)^m \sum_{k=0, \dots, c-1} m C_k \gamma(\mu \beta)^k \{1-\gamma(\mu \beta)\}^{m-k}$$

は、c と γ についてできるだけ大きくなるような検査方式を設計した上で、合格率に関する確率的制約、すなわち δ と ε に関する要請が満たされなければならない。この、制約付き最適化問題は、多目的最適化問題であり一意解をもつわけではない。本年度は許容すべき水準のみを規定する検査方式を実際に設計することとした。

3. 寄生虫による汚染に関する研究

3-1. 輸入食品の寄生虫・微生物汚染の検出に係る関連法規の国際比較

コーデックス委員会、欧州連合、アメリカ合衆国、オーストラリア、ニュージーランド、および韓国の「植物防疫法」および「家畜伝染病予防法」関連の法令等を収集し、輸入食品に関する監視等の情報を抽出して国際比較した。

3-2. 寄生原虫・寄生蠕虫の冷凍耐性に関する調査・研究

国際食品微生物規格委員会が食品の衛生管理における危害要因とした病原体のうち、昨年度

は感染予防のための冷凍条件を抽出できなかつた寄生虫について、感染予防に有効な食品等の冷凍条件を抽出した。また、肺吸虫の中間宿主であるサワガニおよび猫回虫の待機宿主となるニワトリの肉を冷凍処理し、マウスを用いた感染実験を行い、感染予防が可能となる冷凍条件を検討した。

3-3. 寄生虫による食品汚染に関する調査研究

サバと同一海域で漁獲された深海魚のキンメダイ、および魚の加工食品を検査してアニサキスを探した。

C. 研究結果

1. 市販カイワレ大根における各種衛生指標菌の定量化と細菌叢構成に関する研究

供試検体における各種衛生指標菌の数値を算定したところ、検体 1g あたりの平均値は、一般生菌数が 1.0×10^7 、大腸菌群が 3.4×10^6 であった。何れの検体からも β -グルクロニダーゼ産生大腸菌は検出されず、PCR 法によっても、腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌由来遺伝子は検出されなかった。生産農場別ではこれらの数値に有意な差異は認められなかったが、汚染分布を月別に比較したところ、6月に比べて7・9月に供した検体では菌数の増加傾向を認めた。農場・月毎に代表検体を抽出し、PCR-DGGE 法に供したところ、6月の検体と7月の検体の間では異なる群集構造をとることが示された。

(朝倉分担研究報告書)

2. 3 クラス抜取検査方式の Operating Characteristics 評価ならびに nR に対して c、nA を定める方法

許容すべき水準（抜取検査方式でいう AQL; Acceptable Quality Level）のみを設定することだけを規定する抜取検査方式を採用すると、c と γ について、下記の合格確率を一定確率 ε 以

上とすることが問題になる。

$$(1-\beta)^m \sum_{k=0, \dots, c-1} {}_m C_k \gamma (\mu\beta)^k \{1-\gamma(\mu\beta)\}^{m-k}$$

本来は、AQL は n_R と共に社会的に設定する必要があるが、これを n_R との関係性、すなわち上記 β を設定することで便宜的に定めることも可能である。

ここで、サンプル数 m を 10、AQL の受容確率 ε を 95% 以上に設定すると、この制約を満たす c と最小の n_A との組み合わせは表 1 のようになる。この種の作業を m を変動させ、包括的に行う事で所望の抜取検査方式を設計することが可能となる。

表 1 $n_R=1000$ 、 $m=10$ 、 $\mu_{0.99999}=868$ 、 $\varepsilon=0.95$ としたときの c と $\max n_A$ 、並びに $\mu=1000$ に対する棄却確率 δ

C	n_A	δ
1	945	1.00
2	921	1.00
3	908	1.00
4	899	1.00
5	891	1.00
6	883	1.00
7	876	1.00
8	868	1.00
9	860	1.00
10	849	1.00

この方式は $c \geq 9$ では、AQL である 868 よりも閾値 n_A が低くなり、品質機能展開の提唱者として国際的にも著名な赤尾洋二（山梨大学名誉教授）が 1958 年に提唱し、2000 年代以降国際的にも検討が開始された圧縮限界を有する計数検査と類似の構造を持つことは、興味深い。社会的説明においても n_A という第 2 の閾値が十分小さくなっていることは δ が十分 0 に近い限り

説明しやすいものと思われる。

(杉山分担研究報告書)

2 階級サンプリングプランを例として、5 つのフェーズに分解し、それぞれ数理ソフトウェア上で表現した。

1. 汚染濃度のモデリング
2. データに基づくパラメータ推定
3. OC 曲線の描画
4. OC 曲線のずれを定量化
5. ロット合格率の確率分布の評価
(椿・大西分担研究報告書)

3. 寄生虫による汚染に関する研究

3-1. 輸入食品の寄生虫・微生物汚染の検出に係る関連法規の国際比較

諸外国における輸入食品に対する検疫・検査は、我が国の対応と概ね同等であることが、動植物検疫に関連する法令等の比較により明らかとなった。(三菱総合研究所委託報告書・参照)

3-2. 寄生原虫・寄生蠕虫の冷凍耐性に関する調査・研究

肉胞子虫(フェイヤー肉胞子虫)およびトキシカラ属線虫(猫回虫)に関して、学術文献から冷凍条件を抽出し、一覧表に追加した。ナナホシクドア、無鉤条虫、ウェステルマン肺吸虫についても、冷凍条件を明らかにした。

ウェステルマン肺吸虫陽性サワガニを -35°C で50分間冷凍しただけでは、回収メタセルカリアを投与されたマウスは感染した。宮崎肺吸虫陽性サワガニを -18°C で200分間冷凍すれば、マウスへの感染が予防された。猫回虫感染鶏の肉を -25°C で0.5日間冷凍すれば、回収幼虫を投与されたマウスの感染が予防された。

3-3. 寄生虫による食品汚染に関する調査研究

キンメダイからは、サバ由来の虫種とは異なる人体寄生性のアニサキスが多数検出された。チャンジャ(タラの内臓の発酵食品)からアニサキス多数を検出した。さつま揚げからアニサキスの遺伝子が検出された。

D. 考察

1. 市販カイワレ大根における各種衛生指標菌の定量化と細菌叢構成に関する研究

今回供試したカイワレ大根は、概ね衛生規範で示される範囲を超える高菌数の指標菌を含む一方で、サルモネラ・大腸菌は陰性を示すという矛盾を抱えることが明らかとなった。当該指標菌の数値は季節変化に応じて変動する事象は、構成細菌叢と関連性を示しうると想定された。今後は、当該食品に関わる細菌叢を病原微生物の挙動と併せて捉えることで、衛生管理の改善に資する基礎的知見の集積に努めたい。

2. 3 クラス抜取検査方式の Operating Characteristics 評価ならびに nR に対して c、nA を定める方法

ロットから10サンプルを抽出し1000個以上の菌が含まれるサンプルが1個でもあれば不合格とする2クラス抜取検査で用いる安全基準に加えて、全サンプルが849~999個の菌を含んだ場合には不合格といった、新たな判定基準を追加する3クラス抜取検査方式を用いることは、抜取検査の性能を改善するという意味で、統計的には合理的である。

加えて、公衆衛生上の目標となる1000と共に、食品安全管理上の業者目標793(圧縮限界)が明確に意識されることになるという意味でも有用と考える。

更に、10サンプルの内半数の5個以上が891~999個の菌を含んだ場合には不合格といった、判定基準を追加する3クラス抜取検査方式は更に消費者危険を小さくすることが可能であるが、生産者側からするとその達成を確実にすることは難しいこと、第2の限界が若干上がることについての消費者の不安という2点を十分議論する必要はある。

3. 寄生虫による汚染に関する研究

3-1. 輸入食品の寄生虫・微生物汚染の検出に係る関連法規の国際比較

動物検疫だけで輸入食品の寄生虫汚染を防ぐのは困難があり、食品衛生法に則して寄生虫に係る食品の管理手段を検討し、食品の安全性を担保する必要があると考えられた。

3-2. 寄生原虫・寄生蠕虫の冷凍耐性に関する調査・研究

赤痢アメーバと蟯虫については、引き続き文献資料から、感染防止に有効な汚染食品の冷凍条件を調べる必要が残された。肺吸虫と猫回虫の感染が冷凍により予防されることが確認された。

3-3. 寄生虫による食品汚染に関する調査研究

キンメダイや魚の加工食品からアニサキスが検出され、種々の食品にアニサキスの汚染があることが確認された。

E. 結論

発芽野菜であるカイワレ大根の衛生検査にあたっては、一般細菌・大腸菌群を指標菌として用いる優位性は必ずしも高いとはいえず、構成細菌叢の把握が望ましい衛生指標菌を設定するにあたって重要な知見を提供すると期待される。

微生物に関する研究と統計科学を適切にリンクさせることが必要である。食品および微生物の特徴に応じたサンプリングプランの設定を行う必要がある。

種々の食品に寄生虫の汚染はあるが、冷凍の応用と関連法規の整備で寄生虫感染の予防を図ることが期待された。肺吸虫の感染を予防するためのサワガニの冷凍条件として、 $-80^{\circ}\text{C} \cdot 50$ 分間あるいは $-18^{\circ}\text{C} \cdot 100$ 分間処理が有効であると再確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asakura H, Momose Y, Ryu CH, Kasuga F, Yamamoto S, Kumagai S, Igimi S. (2013) *Providencia alcalifaciens* causes barrier dysfunction and apoptosis in tissue cell culture: potent role of lipopolysaccharides on diarrheagenicity. *Food Addit Contam. in press*.
2. Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino S, Igimi S, Yamamoto S. (2012) Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. *Biochem Biophys Res Commun.* 426 (4): 654-658.2.
3. Sugiyama, H., Shibata, K., Morishima, Y., Muto, M., Yamasaki, H., Kawakami, Y. Current status of lung fluke metacercarial infection in freshwater crabs in the Kawane area of Shizuoka Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 75, in press, 2013.
4. 杉山 広. 生食による寄生虫感染症のリスク、In 生食のおいしさとリスク (一色賢司編). エヌ・ティ・エス、印刷中、東京、2013.
5. 杉山 広. 食品による寄生動物感染症 7. 蠕虫感染症 (2) 肺吸虫. *日本防菌防黴学会誌*, 41, 165-171, 2013.
6. Sugiyama, H., Singh, T.S. and Rangsiruji, A. *Paragonimus* (Chapter. 39). In *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*, (Liu, D.-Y., ed.), pp. 421-433, CRC press, Boca Raton, 2012.
7. Taira, K., Saitoh, Y., Okada, N., Sugiyama, H., Kappel, C.M.O. Tolerance to low temperatures of

Toxocara cati larvae in chicken muscle tissue. Veterinary Parasitology 189、
383-386、 2012

8. 杉山 広、柴田勝優、森嶋康之、山崎 浩、川上 泰. 肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ冷凍条件の検討. Clinical Parasitology 23、 57-59、 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

II. 分担ならびに委託研究報告

市販カイワレ大根における各種衛生指標菌の定量化と細菌叢構成に関する研究

研究分担者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
協力研究者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

本研究班では、微生物危害性の観点から様々な食品の分類に関する体系的整理を行ってきた。昨年度に行った野菜類に関する衛生指標菌検出状況を踏まえ、本年度は、発芽野菜であるカイワレ大根の各種指標菌汚染実態をより精査する試みを行った。平成 24 年 6 月から 9 月にかけて東京都内で購入したカイワレ大根、計 180 検体を対象として、一般生菌・大腸菌群・β-グルクロニダーゼ産生大腸菌の定量を行った。検体 1 g あたりの平均値は、一般生菌数が 1.0×10^7 、大腸菌群が 3.4×10^6 であった。何れの検体からも β-グルクロニダーゼ産生大腸菌は検出されず、PCR 法によっても、腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌由来遺伝子は認められなかった。生産農場別ではこれらの数値に有意な差異は認められなかったが、汚染分布を月別に比較したところ、6 月に比べて 7・9 月に供した検体では菌数の増加傾向を認めた。農場・月毎に代表検体を抽出し、PCR-DGGE 法に供したところ、6 月・7 月の検体の間では異なる群集構造をとることが示された。このような季節性の変動を顕す細菌叢の一部についてはメタゲノム解析を通じて同定された。以上の成績より、今回供試したカイワレ大根は、概ね衛生規範で示される範囲を超える高菌数の指標菌を含む一方、サルモネラ・大腸菌は陰性を示すという矛盾を抱えることが明らかとなった。こうした季節性の菌数変化は構成細菌叢とも連動していたが、それらの多くは一般細菌や大腸菌群として算出される現状を踏まえ、当該食品に関わる細菌叢を病原微生物の挙動と併せて捉えることで、望ましい衛生指標菌の設定について改めて検討する必要があると考えられる。

A. 研究目的

本研究班では、これまで微生物危害性を主眼においた食品分類の体系化をはかってきた。その過程では、特に国内の食中毒発生状況に着目して、情報が不足すると考えられる項目（食品種-病原体）について、更なる情報収集・整理ならびに実験的検証を行い、国内における食品の微生物危害性に係る実態をより詳細に捉えるべく検討を進めてきた。

野菜類は国際的にも多くの汚染実態と食中毒

事例が近年では報告されている一方、国内におけるその汚染実態は、主に定性的な知見に留まっている。こうした状況を鑑み、昨年度の分担研究では、野菜類における各種衛生指標菌の汚染実態を小規模な検討により調査し、食肉等に代表される、腸内細菌科菌群を衛生指標菌として適用することは必ずしも望ましくないとの結論を得た。更に、発芽野菜であるカイワレ大根は他の供試野菜（葉物野菜・根物野菜）に比べて、複数の代表的な衛生指標菌の汚染度が高く、推定大腸菌も陽性を示した。

2011 年初夏には発芽野菜がドイツを中心とするヨーロッパで発生した腸管出血性大腸菌による大規模食中毒事例の原因食品として推定されたこと、そして同じく発芽野菜であるカイワレ大根は 1996 年にわが国を震撼させた、腸管出血性大腸菌 O157 による大規模集団食中毒の原因食品と目されたこと等を背景として、本年度は国内に流通する発芽野菜、とりわけ国内では最も消費量が多いカイワレ大根を対象として、一般細菌・大腸菌群・大腸菌の汚染分布を定量的に検討することとした。更に、当該検体の指標菌汚染分布と生産地の気候或いは構成細菌叢の変動との関連性について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 文献検索

平成 24 年 4 月 1 日～5 月 31 日の期間、医中誌 Web (<http://www.jamas.or.jp>)を用いて、文献検索を行った。検索には、(ダイコン/TH or カイワレ大根/AL) 、(ダイコン/TH or カイワレ/AL) and (細菌/TH or 細菌/AL)、(かいわれ/AL and (細菌/TH or 細菌/AL)の各用語を用いた。検索された文献の中で、特に当該食品における細菌汚染実態に関する文献の抽出をおこなった(表 1)。

2. 供試検体ならびに試料調整

2012 年 6 月から 9 月にかけて、東京都内で市販されている、カイワレ大根、計 180 検体を購入し、冷蔵条件下で実験室まで速やかに輸送した。これらは 25 g ずつ滅菌ストマッカー袋に採材し、225ml の緩衝ペプトン水を加えた後、ブレンダーを用いて(1 分間・6.0 ストローク/秒)、懸濁溶液を調整した。

3. 各種衛生指標菌の定量的検出

上記懸濁液を原液として、緩衝ペプトン水を用い 10 倍段階希釈列を作成した。これらをスプ

イラルプレート (Interscience) を用いて、標準寒天培地 (一般細菌数用培地、栄研化学)・デソキシコレート培地 (大腸菌群用培地、栄研化学)・TBX 培地 (β -グルクロニダーゼ産生性大腸菌用培地、メルク) に塗布した。44°C (TBX 培地) もしくは 37°C (その他) にて 22 時間培養後、発育した集落を計数し、検体 1 g 中に含まれる菌数を算定した。また、2 農場由来検体、計 20 検体については、上記培地に加え、VRBG 培地 (腸内細菌科菌群用培地、栄研化学)・VRBL 培地 (大腸菌群用培地、Oxoid) による計数を併せて実施した。VRBL および TBX 培地については、集落の色調を考慮してその算定にあたった。供試検体における汚染状況等については表 2 に列挙した。

4. 腸管出血性大腸菌・サルモネラ属菌由来遺伝子の PCR 検出

検体懸濁原液 1ml を 17,900 x g にて 5 分間遠心し、得られたペレットを 50 μ l の PrepMan Ultra (ライフテクノロジー) に再懸濁させた。95°C にて 10 分間加熱した後、同 1 μ l を鋳型として腸管出血性大腸菌 (EHEC) およびサルモネラ属菌由来遺伝子の PCR 検出 (*stx* および *stn*) を常法に従って行った。用いたプライマー配列は以下のとおりである。

stx 遺伝子(forward: 5'-GAACG AAATAATTTATA TGT-3',reverse: 5'-TTTGATTGTTACAGTCAT-3')
stn 遺伝子(forward: 5'-CTTTGGTCGTAAAATAA GGCG-3',reverse: 5'-TGCCCAAAGCAGAGAGA TTC-3')

5. PCR-DGGE 法

上記項目において測定した指標菌汚染数値をもとに、6 月と 7 月に採材した検体より計 16 検体をランダムに抽出した。同検体懸濁原液 10ml より、DNeasy Tissue kit (キアゲン) を用いて細菌由来 DNA を精製した。GC-クランプを含むプ

ライマーセット (Forward: 5'-CGCCCGCCGCGC GCGGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGGC CTACGGGAGGCAGCAG-3', reverse: 5'-ATTAC CGCGGCTGCTG-3') を用いて 16S rRNA V3 領域を PCR 増幅した後、400 ng の増幅産物を変性グラジエントゲル中で D-Code システム (バイオラッド) を用いて泳動した。SYBR Gold 染色によりバンドを可視化した後、FingerPrinting II ソフトウェア (バイオラッド) を用いて、UPGMA 法に基づく系統樹作成に供した。

6. 気象情報の収集

供試検体の生産地における月別平均最高/最低気温情報については、気象庁ウェブサイト (<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>) より入手した。

7. 細菌叢解析

上述 (項目 2.) の検体懸濁原液 10ml より DNA Tissue Isolation kit (キアゲン) を用いて細菌由来 DNA の抽出を行った。バーコードおよび Roche FLX+対応タグ配列を含むプライマーセットを用いて、16S rRNA V3-V4 領域を増幅した。増幅産物はカラム精製によりダイマーを除去した後、各 1 μ g を混合し、次世代シーケンサー Roche FLX+を用いた Pyrosequencing に供した。得られた配列はバーコードによりサンプル別に区分し、RDP Classifier データベースを用いて菌属の分類を行った。

C. 研究結果

1. カイワレ大根の細菌汚染に関する文献情報

カイワレ大根における細菌汚染の状況を把握する目的で、まず文献検索により情報収集を行うこととした。表 1 に挙げた複数の文献情報より、発芽野菜に含まれる一般細菌数および大腸菌群数は、概ね 10^7 - 10^8 CFU/g であり、推定大腸

菌 (E.coli) も一定の割合で検出される状況を把握することができた。

2. 市販カイワレ大根における大腸菌・大腸菌群・一般細菌数の定量的検出結果

上述のごとく、高濃度汚染実態が想定される状況を踏まえ、2012 年 6 月から 9 月にかけて、東京都内で市販されていたカイワレ大根、計 180 検体について、一般細菌数・大腸菌群数・大腸菌数を求めた。全体の成績は図 1 ならびに表 2 のとおりである。全検体での平均値として、一般細菌数は 1.0×10^7 CFU/g、大腸菌群数は 3.4×10^6 CFU/g を数えた。TBX 培地を用いた試験法により大腸菌はいずれの検体からも検出されなかった。

また、2 農場由来の計 20 検体については、大腸菌群の検出培地の比較を行うため、VRBL 培地とデソキシコレート培地を用いて数値の比較を行ったが、両培地間で計数に有意な差異は認められなかった (図 2)。

以上より、国内に流通するカイワレ大根は、総じて高い衛生指標菌汚染を示すことが明らかとなった。

3. 農場・気温変化と指標菌動態の関連性

本研究で供した検体は、計 5 農場で生産されていたが、農場間で、一般細菌数・大腸菌群数の数値には有意な差異を認めなかった (図 3)。

また、季節変化に伴う気温変動は、微生物の食品内挙動の大きな環境要因となりうるとの考えから、月別に数値を比較したのが図 4 である。6 月に供した検体の数値分布は、一般細菌数・大腸菌群数でそれぞれ、 5.0 - 9.9×10^6 CFU/g 及び 1.0 - 4.9×10^5 CFU/g をピークとしていたが、7 月の検体におけるピークは、 1.0 - 4.9×10^7 CFU/g および 1.0 - 4.9×10^6 CFU/g へと上昇傾向を示した。9 月の検体においても同様に一般細菌数・大腸菌群数の分布ピークは 1.0 - 4.9×10^7 CFU/g

ならびに $5.0-9.9 \times 10^6$ CFU/g に位置した。

生産地における気温変動については、図 4 に記した。農場 A の属する地域の 6 月の最高/最低気温は 27.6/22.2°C であったが、7 月では 35.1/26.1°C を示す等、7 月以降に急激な気温上昇が認められた。全体を通じ、6 月の日中最高/最低気温は、18.7-27.2°C および 15.7-20.9°C であったのに対し、7・9 月における同気温は最高 31.3-35.1°C /最低 23.8-26.3°C の範囲で推移していた。

以上より、市販カイワレ大根における衛生指標菌の数的分布は、気温等の環境要因と関連しうると考えられた。

4. 生産農場・気温変化と細菌叢構成の関連性

指標菌数値変動と細菌叢変動との関連性について検討するため、3 農場 (A-D) で 6-7 月に生産された計 16 検体を対象に、当該食品に含まれる細菌叢の構成 (多様性) を検討することとした。16S rRNA PCR-DGGE 法を用いた系統解析により、上記検体は 2 群集 (I および II) に大別された (図 5)。興味深いことに検体 #69-70 を除き、群集 I は 6 月に生産された検体 (n=7) から構成され、7 月の検体は何れも群集 II に分類された (図 5)。また、同一月に生産された検体の中では、同一農場由来のものがより高い相同性を示す傾向が認められた (図 5)。

以上より、カイワレ大根の構成細菌叢は生産地・季節性と一定の関連性を示しつつ、変動をすると想定された。

5. Pyrosequencing による細菌叢分類

細菌叢に関してより詳細な知見を得るため、6 月および 7 月に採取した、3 農場 (A-C) 由来の計 6 サンプル中を対象として、16S rRNA をターゲットとする次世代シーケンス解析に供し、個々のサンプルに含まれる細菌属の分類を行った。結果を表 3 に示す。全体としては *Duganella*

属 (平均 18.4%)、*Pseudomonas* 属 (同 11.9%)、*Acinetobacter* 属 (同 9.5%) 等の環境由来細菌が多勢を占めていた。6 月と 7 月のサンプル間では、農場 A のサンプルでは、*Acinetobacter* 属 (3.8% から 21.7%)・*Cryseobacterium* 属 (15.4% から 38.8%) へと増加した。農場 B のサンプルでは、*Acinetobacter* 属 (6.4% から 15.5%)・*Pseudomonas* 属 (2.2% から 17.2%) が増加を示す一方、*Cryseobacterium* 属は 9.5% から 2.9% へ減少した。農場 C のサンプルでは、*Pseudomonas* 属が 12.6% から 23.5% へ増加したのに対し、*Shinella* 属は 10.7% から 2.4% へと減少を示した。

以上のように、季節或いは農場によって、国内に流通するカイワレ大根の構成細菌叢は大きく変動することが明らかとなった。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト臨床情報を包含しておらず、またゲノム情報は分離菌株に関するもののみであるため、倫理面の問題は無い。

D. 考察

本研究では、カイワレ大根における指標菌汚染分布を定量的に確認し、一般的な野菜に比べ、総じて高い菌数分布を示すことを明らかにした。また、今回供した検体において、大腸菌は何れも陰性であった。表 1 に列挙した、過去の細菌検出データでは、一定の割合で大腸菌汚染が報告されている。しかしながら、それらの大腸菌の定義は、食品衛生上用いられる、推定大腸菌であり、本研究で用いた試験法の成績とは異なる。並行して実施した PCR 法の結果として、大腸菌 (*E.coli*) およびサルモネラ属菌由来遺伝子が全検体で陰性であったことを踏まえると、一般細菌数や大腸菌群等と同様に、推定大腸菌もカイワレ大根に適した衛生指標菌とは成り難いと考えられる。その他の野菜類を含め、非動物性食品に対する指標菌の設定については、したがって今後更なる検討を行う必要があるとい

えよう。

季節性と相関性を示すと目された指標菌挙動については、細菌叢構成を含めて、今後も精査すべきと考える。食品を構成する細菌叢は、特に動物性食品では、製造・加工・流通・保存工程等における二次汚染に基づくことが多いが、野菜等、非動物性食品については、生育過程において水や土壌等、多様な環境からの汚染が生じる。

1995年以降、発芽野菜に関わる食中毒報告が国際的に増加傾向にある事態を踏まえ、1997年に米国FDA/CFSANは微生物危害要因についての実態調査を行った。1999年には、USDA傘下に位置づけられるThe National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF)は、病原性大腸菌とサルモネラ属菌が発芽野菜において最も健康危害が懸念される病因であり、この他に赤痢・リステリア・セレウス菌等も汚染が危惧される病原体であることを報告している。その後、2003年にはコーデックス委員会が生鮮野菜・果実に関する衛生実施規範を策定しており、その概要については、日本施設園芸協会が「生鮮野菜衛生管理ガイド」として作成し、国内生産現場への普及活動が展開された。国内ではその後、平成23年に農林水産省が生鮮野菜を衛生的に保ち、食中毒事件が発生しないよう、水や家畜糞堆肥の管理、手洗い等、衛生上の注意すべき点をまとめた、「栽培から出荷までの野菜の衛生管理指針」(http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouankome/k_yasai/pdf/sisin.pdf)を策定し、生産段階における衛生向上に努めるべく、指導にあたっている。

上述のコーデックス委員会の策定した規範には、発芽野菜に特化した付属書を設け、制御管理にあたっては、特に種子の取り扱いに注意すべきことを喚起している。

発芽野菜の生産者に供給される種子の多くは、粗飼料生産用または放牧地用に生産されるもの

であり、この場合、発芽野菜生産用の種子の微生物汚染を防止するために必要な Good Agricultural Practices (GAP,適正農業規範)が履行されず、特に天然肥料や汚染された灌漑用水が誤用される結果、種子は畑あるいは収穫、貯蔵、輸送中に汚染される可能性があると解釈される。

生産現場では発芽を促す過程で、種子を2日から10日の間、温暖・湿潤状態に保つが、こうした条件下では、汚染微生物の急速な増殖を顕し、ヒトの健康危害をもたらす危険性が增大する恐れがある。種子の微生物汚染防除に関しては、複数の手法を組み合わせた方法が応用的に有効とされているが、現在のところ種子が病原微生物フリーであることを保証しうる処理方法は存在しない。

上述の種子に加えて、生産段階で使用する水も考慮すべき汚染源と考えられる。十分に発育したカイワレ大根の根部に、O157汚染水を浸漬することで、当該菌はカイワレ大根の芽部(可食部)に到達するという報告もある。

発芽野菜は発育過程で微生物の急激な増殖を招くことも実証されている。本研究において検出された、一般細菌数の数値は、衛生規範で定められる、「 10^6 個/g以下」を大きく上回っているおり、当該食品に対する衛生管理について改めて検討する必要性を提唱するものである。同数値に含まれる細菌種の構成を更に精査し、病原微生物の定量的検出をはかることは、当該食品に対して適用すべき指標菌の在り方を考える上での重要な糸口となるものと期待される。

E. 結論

本研究では、国内に流通するカイワレ大根を対象として、各種衛生指標菌の定量化を行い、衛生規範で定められる数値を逸脱したものが多くを占めるという実態を把握する一方、最も汚染が懸念される大腸菌・サルモネラが陰性であるという矛盾を明らかにした。更に、これら指標菌数値は気

候と一定の関連性を示すと共に、細菌叢構成は生産農場・季節に応じて変動することが明らかとなった。これらの成績を踏まえると、当該食品の構成細菌叢に係る、より詳細な知見の集積が、真の衛生管理に寄与するものと考えられる。

F. 健康危険情報

(総括報告書にまとめて記載)

なし

G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- ・ Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino S, Igimi S, Yamamoto S. (2012) Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. *Biochem Biophys Res Commun.* 426 (4): 654-658.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

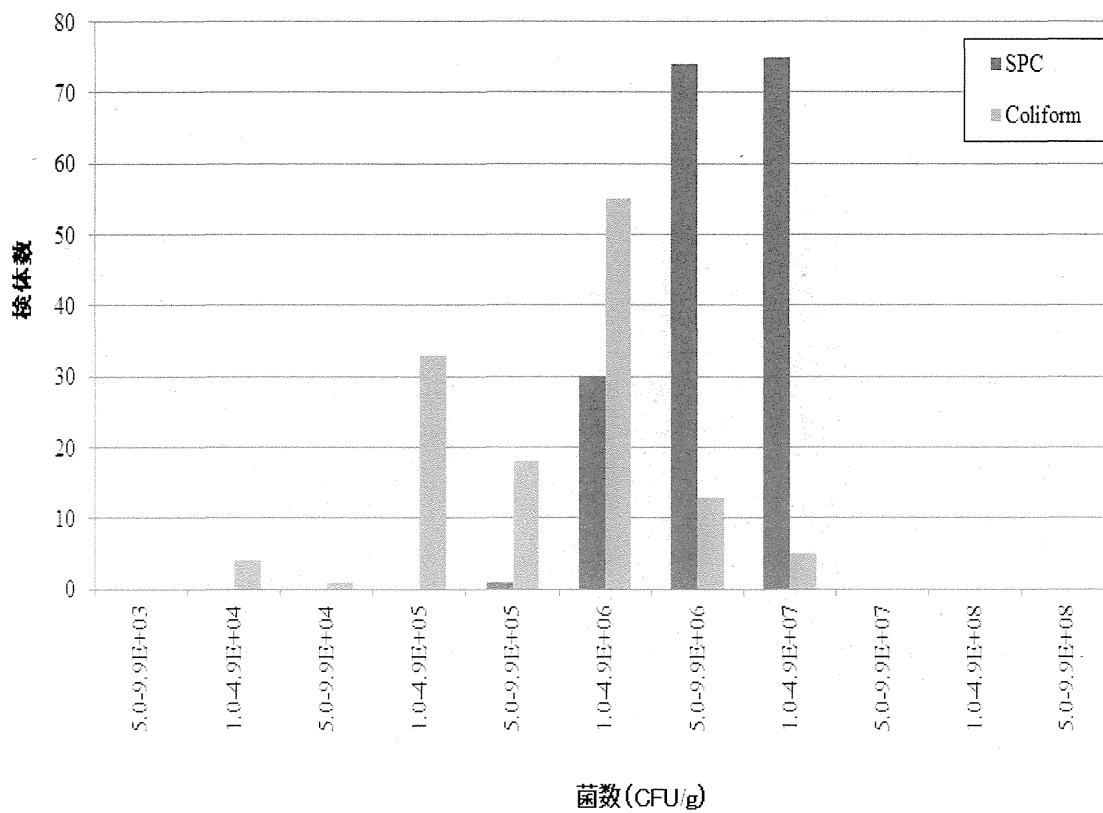


図1. カイワレ大根 180検体における一般細菌 (SPC) ・大腸菌群 (Coliform) 汚染分布