

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 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、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、

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

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

とおけば、合格確率 $P_A(\mu, m, c, nA)$ は、

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

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、 $P(\mu) = \alpha$ となる状況でロット合格確率を一定確率 β 、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 μ_{α} 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、 $P(\mu) = \beta$ となる状況でロット合格確率を一定確率 α 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 μ 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、 $P(\mu) = Q(\mu)/(1-P(\mu))$ とおけば、m を与えた時、

$$(1 - P(\mu))^m \sum_{k=0}^{c-1} {}^m C_k \{Q(\mu)/(1-P(\mu))\}^k \{1 - P(\mu) - Q(\mu)\}^{m-k}$$

は、c と μ_{α} について、できるだけ小さくなるように

$$(1 - P(\mu)) \sum_{k=0}^{c-1} {}^m C_k \{Q(\mu)/(1-P(\mu))\}^k \{1 - P(\mu) - Q(\mu)\}^{m-k}$$

は、c と μ_{α} 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 β 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った寄生虫について、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 n_R に対して、 n_A 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。

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

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	
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 $c = 9$ 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)およびトキソカラ属線虫(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 ・ 50 分間あるいは-18 ・ 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