

表12. 食品からの寄生虫検出に関する文献一覧

番号	文献情報
[1]	荒川京子ら, ホタルイカの旋尾線虫X型幼虫: 最近の検出状況, 病原微生物検出情報, 25, 117-118, 2004.
[2]	平野敬之ら, 平成16年秋に集団発生した肺吸虫による食中毒事例について, Clin. Parasitol., 17, 60-62, 2006.
[3]	平野敬之ら, ウェステルマン肺吸虫による食中毒事例について(発生概要と原因の寄生虫学的精査), 佐賀衛薬センター報, 29, 43-46, 2006.
[4]	平野敬之ら, ウェステルマン肺吸虫による食中毒事例に関連した疫学調査, 佐賀衛薬センター報, 30, 30-35, 2008.
[5]	椛木奈緒子, アニサキスによる食中毒, 食衛誌, 52, J208-J209, 2011.
[6]	鎌田洋一, <i>Sarcocystis fayeri</i> を含んだ馬肉による食中毒, 食品衛生研究, 61(11), 21-27, 2011.
[7]	清田智子, 刺身定食によるアニサキス食中毒, 食衛誌, 51, J372-J373, 2010.
[8]	小島夫美子ら, 国産加工食品(チャンジャ)より生きた状態で見出されたアニサキス亜科幼虫, Clin. Parasitol., 19, 160-162, 2008.
[9]	倉持聖子ら, マサバにおけるアニサキスの種別と食中毒リスクに関する一考察, 食品衛生研究, 61(5), 43-48, 2011.
[10]	Matsukane, Y., et al., <i>Kudoa septempunctata</i> n. sp. ( <i>Myxosporea: Multivalvulida</i> ) from an aquacultured olive flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) imported from Korea, Parasitol. Res., 107, 865-872, 2010.
[11]	村田理恵ら, 寄生虫が原因と疑われた食品関苦情連事例について, Clin. Parasitol., 19, 106-109, 2008.
[12]	Murata, R., et al., Morphological and molecular characterization of <i>Anisakis larvae</i> (Nematoda: Anisakidae) in <i>Beryx splendens</i> from Japanese waters, Parasitol. Int., 60, 193-198, 2011.
[13]	大西貴弘, <i>Kudoa septempunctata</i> を原因微生物とする食中毒, 食品衛生研究, 61, 13-20, 2011.
[14]	太田伸生ら, 輸入キムチから検出された寄生虫卵, Clin. Parasitol., 17, 67-69, 2006.
[15]	齋藤悦子ら, ヒラメが原因食と推定される集団嘔吐下痢症-兵庫県, 病原微生物検出情報, 32, 369-370, 2011.
[16]	坂本晃子ら, ウェステルマン肺吸虫による食中毒事例について-発生概要と原因に関する疫学調査-, 食品衛生研究, 58(5), 39-42, 2008.
[17]	杉山 広ら, 平成16年秋に集団発生した肺吸虫による食中毒事例. 原因の寄生虫学的精査, Clin. Parasitol., 17, 63-66, 2006
[18]	杉山 広ら, 輸入キムチより検出された回虫様卵の分子同定, Clin. Parasitol., 17, 153-155, 2006.
[19]	杉山 広ら, 市販サワガニを対象とした肺吸虫メタセルカリアの寄生状況調査, Clin. Parasitol., 19, 89-91, 2008.
[20]	Sugiyama, H., et al., Detection of <i>Paragonimus metacercariae</i> in the Japanese freshwater crab, <i>Geothelphusa dehaani</i> , bought at retail fish markets in Japan, Jpn. J. Infect. Dis., 62, 324-325, 2009.
[21]	鈴木 淳, 食品媒介寄生虫症-主に魚介類の生食に起因する寄生虫疾患について, 食衛誌, 27, 64-67, 2010.
[22]	鈴木 淳ら, 都内流通シラウオからの横川吸虫 <i>Metagonimus yokogawai</i> メタセルカリアの検出状況, 食衛誌, 41, 353-356, 2000.
[23]	鈴木 淳ら, 裂頭条虫症の臨床診断と種の同定. DNAを用いた同定の観点から, Clin. Parasitol., 17, 22-24, 2006.
[24]	鈴木 淳ら, マグロに寄生したアニサキスによる食中毒事例とマグロを中心とした魚類のアニサキスの寄生状況, Clin. Parasitol., 18, 18-20, 2007.
[25]	鈴木 淳ら, シメサバによるアニサキス感染事例とマサバにおけるアニサキスの寄生状況, Clin. Parasitol., 20, 64-67, 2009.
[26]	Suzuki, J. et al., Risk factors for human <i>Anisakis</i> infection and association between the geographic origins of <i>Scomber japonicus</i> and anisakid nematodes, Inter. J. Food Microbiol., 137, 88-93, 2010.
[27]	Suzuki, J., et al., Detection and identification of <i>Diphyllobothrium nihonkaiense</i> plerocercoids from wild Pacific salmon ( <i>Oncorhynchus</i> spp.) in Japan, J. Helminth., 84, 434-440, 2010.
[28]	鈴木 淳ら, アニサキス感染事例およびサバ加工食品におけるアニサキスの寄生状況, Clin. Parasitol., 22, 82-84, 2011.
[29]	竹中重幸ら, 馬刺しを原因とする食中毒-福岡県, 病原微生物検出情報, 33, 44-45, 2012.
[30]	梅原梓理ら, 同胞種レベルでみた日本産 <i>Anisakis simplex</i> -感染源の特定に向けた検討, Clin. Parasitol., 19, 114-117, 2009.
[31]	Umehara, A., et al., Molecular identification of <i>Anisakis</i> type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan, Int. J. Food Microbiol., 143, 161-165, 2010.
[32]	山本徳榮ら, 生鮮魚介類に見られる寄生虫類の食品衛生学的調査研究, 埼玉衛研報, 37, 59-68, 2003.

表13. 医中誌検索 (寄生虫) : ヒット数 [引用数]

1. 穀類、いも及び豆類			
シリアル/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
そば/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(豆腐/TH or 豆腐/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
おにぎり/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
2. 野菜、果実、種実類			
(野菜/TH or 野菜/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	36	[0]	
(カット野菜/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL))	0	[0]	
(ジュース/TH or ジュース/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	1	[0]	
(漬物/TH or 漬物/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	1	[0]	
(漬物/TH or キムチ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[2]	
3. きのこと類			
(担子菌門/TH or きのこと/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	4	[0]	
しめじ/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
しいたけ/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
4. 魚介類			
(エビ類/TH or エビ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	50	[0]	
((イカ類/TH or イカ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)) and (DT=2007:2012)	937	[1]	
(イカ類/TH or ホタルイカ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL) and (DT=2007:2012)	6	[1]	
(カニ類/TH or カニ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL) and (DT=2007:2012)	62	[4]	
((魚類/TH or 魚/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)) and (DT=2007:2012)	75	[6]	
(魚類製品/TH or 魚類製品/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	1	[0]	
白魚/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	2	[1]	
鮮魚/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	10	[1]	
(サケ/TH or サケ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	48	[3]	
(サバ属/TH or サバ/AL) and (Anisakis/TH or アニサキス/AL)	63	[3]	
たらこ/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
いくら/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
サビニ/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
スモークサーモン/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	1	[0]	
チャンジャ/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	1	[1]	
5. 肉類			
((食肉/TH or 食肉/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)) and (DT=2007:2012)	80	[1]	
((食肉/TH and プタ/TH) or 豚肉/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL) and (DT=2007:2012)	7	[0]	
レバー/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	14	[0]	
(肉製品/TH or 肉製品/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	1	[0]	
(肉製品/TH or ソーセージ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	3	[0]	
(ニワトリ/TH or ニワトリ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	89	[0]	
6. 卵類			
((卵/TH or 卵/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)) and (DT=2007:2012)	167	[0]	
ゆで卵/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
温泉卵/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
7. 乳類			
粉乳/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
((乳/TH or 乳/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)) and (DT=2007:2012)	87	[0]	
(チーズ/TH or チーズ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(バター/TH or バター/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(アイスクリーム/TH or アイスクリーム/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(ヨーグルト/TH or ヨーグルト/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
乳酸菌飲料/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
8. 菓子類、糖類、油脂類			
(カカオ/TH or チョコレート/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(菓子/TH or 菓子/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(ビスケット/TH or ビスケット/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
せんべい/AL and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
9. 嗜好飲料			
(飲料/TH or 飲料/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	53	[0]	
(飲料水/TH or 飲料水/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	27	[0]	
10. 調味料			
(マヨネーズ/TH or マヨネーズ/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(味噌/TH or 味噌/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(醤油/TH or 醤油/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	0	[0]	
(香辛料/TH or 香辛料/AL) and (寄生虫/TH or 寄生虫/AL)	6	[0]	

表14. 1人当たり食品群別摂取量 - 平均値 (g / day) (概要)

分類表・ 大分類	調査項目	H19		H20		H21		平均 (H19-21)	
		20歳以上	総数	20歳以上	総数	20歳以上	総数	20歳以上	総数
	調査対象者数	7,209	8,885	7,644	9,129	7,377	9,006	7,410	9,007
	総量	2,173.6	2,084.5	2,113.70	2,038.20				
	動物性食品	299.1	323.5	282.6	302.0				
	植物性食品	1,874.5	1,761.0	1,831.0	1,736.20				
1	穀類 <sup>1)</sup>	456.6	445.7	457.0	448.8	452.4	442.2	455.3	445.6
	米・加工品	346.7	337.7	348.1	341.6				
	小麦・加工品	99.9	99.0	98.3	97.3				
1	いも類	57.2	56.3	57.7	56.9	54.5	54.6	56.5	55.9
8(一部)	砂糖・甘味料類	7.0	6.7	6.9	6.7	6.9	6.6	6.9	6.7
1	豆類	60.1	56.0	59.5	56.2	59.3	55.6	59.6	55.9
2	種実類	2.2	2.0	1.9	1.8	2.0	1.9	2.0	1.9
2	野菜類 <sup>2)</sup>	290.1	276.7	295.3	282.8	295.3	280.9	293.6	280.1
	緑黄色野菜	97.7	92.2	98.4	93.4	99.1	93.4	98.4	93.0
	その他の野菜	166.6	160.9	172.1	166.4				
2	果実類	115.0	111.6	121.3	116.8	115.1	113.0	117.1	113.8
3	きのこ類	17.0	16.0	16.0	15.3	16.5	15.6	16.5	15.6
該当なし	藻類	12.1	11.4	10.5	10.0	10.9	10.3	11.2	10.6
4	魚介類	87.2	80.2	84.1	78.5	79.8	74.2	83.7	77.6
5	肉類	78.8	82.6	75.2	77.7	79.9	82.9	78.0	81.1
6	卵類	35.4	35.6	33.2	33.6	34.3	34.3	34.3	34.5
7	乳類	96.6	123.9	89.0	111.2	91.1	115.4	92.2	116.8
8	油脂類	10.0	10.2	9.5	9.5	9.9	9.9	9.8	9.9
8	菓子類	23.3	26.3	25.1	26.8	22.3	24.8	23.6	26.0
9	嗜好飲料類	709.2	634.4	658.1	597.2	715.0	641.6	694.1	624.4
10	調味料・香辛料類	98.5	93.0	99.2	95.3	96.9	92.4	98.2	93.6
該当なし	補助栄養素・特定保健用食	17.2	15.8	14.3	13.2	15.4	14.5	15.6	14.5

調査日: 当該年11月の特定の1日 (日・祝除く)

1) 穀類: 米・加工品、小麦・加工品、その他の穀類・加工品

2) 野菜類: 緑黄色野菜、その他の野菜、野菜ジュース、漬物

3) 補助栄養素・特定保健用食品: 顆粒、錠剤、カプセル、ドリンク状の製品および特定保健用食品

表15. 1人当たり食品群別摂取量 - 全国平均値 (g / day)

調査項目		H19年度	H20年度	H21年度	平均
分類表項目	総量	2,084.5	2,038.2	2,070.9	2,064.5
	動物性食品	323.5	302.0	307.9	311.1
	植物性食品	1,761.0	1,736.2	1,763.0	1,753.4
1	穀類	445.7	448.8	442.2	445.6
1-B-1	米・加工品	337.7	341.6	334.6	338.0
1-B-1	米	332.1	336.4	329.9	332.8
	米加工品	5.6	5.2	4.7	5.2
1-A	小麦・加工品	99.0	97.3	99.4	98.6
	小麦粉類	3.9	3.7	3.8	3.8
	パン類(菓子パンを除く)	32.4	30.7	32.0	31.7
	菓子パン類	5.8	5.7	5.1	5.5
1-A, 1-B-1	うどん, 中華めん類	36.9	38.7	38.9	38.2
	即席中華めん	4.2	4.6	4.3	4.4
1-A, 1-B-1	パスタ類	10.8	8.9	10.6	10.1
	その他の小麦加工品	5.1	4.9	4.7	4.9
1-A, 1-B-1	その他の穀類・加工品	8.9	10.0	8.2	9.0
1-A	そば・加工品	6.4	6.8	5.8	6.3
	とうもろこし・加工品	0.5	0.4	0.4	0.4
	その他の穀類	2.0	2.8	1.9	2.2
1	いも類	56.3	56.9	54.6	55.9
	いも・加工品	54.3	55.0	52.6	54.0
	さつまいも・加工品	7.1	7.5	6.7	7.1
	じゃがいも・加工品	28.0	26.4	26.5	27.0
	その他のいも・加工品	19.2	21.2	19.4	19.9
	でんぷん・加工品	2.0	1.9	2.0	2.0
8	砂糖・甘味料類	6.7	6.7	6.6	6.7
1	豆類	56.0	56.2	55.6	55.9
	大豆・加工品	54.4	54.8	54.0	54.4
	大豆(全粒)・加工品	1.3	1.5	1.3	1.4
1-B-1	豆腐	35.7	35.2	34.2	35.0
1-B-1	油揚げ類	7.1	7.7	7.5	7.4
1-B-2	納豆	6.4	6.2	6.1	6.2
1-B-1	その他の大豆加工品	3.9	4.2	4.8	4.3
	その他の豆・加工品	1.6	1.4	1.6	1.5
2-A-1	種実類	2.0	1.8	1.9	1.9
2	野菜類	276.7	282.8	280.9	280.1
	緑黄色野菜	92.2	93.4	93.4	93.0
2-B-1	トマト	14.6	15.7	19.2	16.5
2-B-1	にんじん	20.0	19.4	19.4	19.6
2-B-1	ほうれん草	18.8	18.2	16.5	17.8
2-B-1	ピーマン	3.7	3.9	3.5	3.7
2-B-1	その他の緑黄色野菜	35.0	36.2	34.7	35.3
	その他の野菜	160.9	166.4	165.3	164.2
2-B-1	キャベツ	21.9	23.9	23.7	23.7
2-B-1	きゅうり	10.1	8.8	10.2	9.7
2-B-1	大根	34.5	37.6	33.7	35.3
2-B-1	たまねぎ	30.8	29.4	29.5	29.9
2-B-1	はくさい	17.5	20.7	21.8	20.0
2-B-1	その他の淡色野菜	46.1	45.9	44.8	45.6
2-B-1	野菜ジュース	10.5	8.4	9.3	9.4
2-B-3	漬け物	13.2	14.6	12.9	13.6
	葉類漬け物	3.8	5.1	4.5	4.5
	たくあん・その他の漬け物	9.5	9.5	8.4	9.1
2	果実類	111.6	116.8	113.0	113.8
	生果	97.2	105.6	99.3	100.7
2-B-1	いちご	0.1	0.1	0.1	0.1
2-B-1, 2-B-4	柑橘類	29.2	25.3	26.4	27.0
2-B-1	バナナ	12.6	17.1	15.0	14.9
2-B-1	りんご	23.3	23.4	22.2	23.0
2-B-1	その他の生果	32.1	39.8	35.7	35.9
2-B-2	ジャム	1.2	1.2	1.2	1.2
2-B-1	果汁・果汁飲料	13.1	10.0	12.4	11.8
3	きのこ類	16.0	15.3	15.6	15.6
該当なし	藻類	11.4	10.0	10.3	10.6
4	魚介類	80.2	78.5	74.2	77.6
	生魚介類	51.2	48.4	47.0	48.9
4-B-1	あじ, いわし類	11.0	10.6	10.3	10.6
4-B-1	さけ, ます	4.2	4.3	4.4	4.3
4-B-1	たい, かれい類	6.6	5.3	5.6	5.8
4-B-1	まぐろ, かじき類	5.4	4.8	5.2	5.1
4-B-1	その他の生魚	9.2	8.8	8.3	8.8
4-B-1	貝類	3.5	3.5	3.8	3.6
4-B-1	いか, たこ類	5.9	5.5	4.9	5.4
4-B-1	えび, かに類	5.4	5.4	4.6	5.1
4-A, 4-B-2, 4-B-4	魚介加工品	29.0	30.1	27.3	28.8
4-B-3	魚介(塩蔵, 生干し, 乾物)	16.2	17.5	15.1	16.3
4-B-3	魚介(缶詰)	2.0	1.9	2.3	2.1
4-B-3	魚介(佃煮)	0.3	0.3	0.2	0.3
4-B-3	魚介(練り製品)	9.9	9.8	8.9	9.5
4-B-3	魚介(ハム, ソーセージ)	0.7	0.6	0.7	0.7
5	肉類	82.6	77.7	82.9	81.1
	畜肉	59.6	55.9	59.1	58.2
5-B-1	牛肉	15.6	13.5	14.1	14.4
5-B-1	豚肉	31.3	31.2	31.7	31.4
5-A, 5-B-2	ハム, ソーセージ類	12.3	11.0	13.0	12.1
5-B-1	その他の畜肉	0.3	0.3	0.3	0.3
5-B-1	鳥肉	21.2	19.4	22.2	20.9
5-B-1	鶏肉	21.2	19.3	22.1	20.9
5-B-1	その他の鳥肉	0.0	0.1	0.1	0.1
	肉類(内臓)	1.8	2.3	1.5	1.9
	その他の肉類	0.0	0.0	0.1	0.0
	鯨肉	0.0	0.0	0.1	0.0
	その他の肉・加工品	0.0	0.0	0.0	0.0
6	卵類	35.6	33.6	34.3	34.5
7	乳類	123.9	111.2	115.4	116.8
	牛乳・乳製品	123.9	111.2	115.3	116.8
7-B-1, 7-B-2	牛乳	90.9	82.7	84.1	85.9
7-B-2, 7-B-3	チーズ	2.4	2.0	2.3	2.2
7-B-3	発酵乳・乳酸菌飲料	22.3	19.9	21.3	21.2
7-A-1, 7-B-2	その他の乳製品	8.3	6.6	7.6	7.5
7-B-1	その他の乳類	0.0	0.0	0.1	0.0
8	油脂類	10.2	9.5	9.9	9.9
7-A-2	バター	1.0	0.9	0.9	0.9
	マーガリン	1.1	1.0	1.1	1.1
	植物性油脂	7.9	7.5	7.8	7.7
	動物性油脂	0.1	0.1	0.1	0.1
	その他の油脂	0.0	0.0	0.0	0.0
8	菓子類	26.3	26.8	24.8	26.0
8-A-1, 8-B-1	和菓子類	11.2	12.4	10.5	11.4
8-B-2	ケーキ・ペストリー類	6.6	6.5	6.3	6.5
8-A-2	ビスケット類	1.5	1.7	1.6	1.6
	キャンディー類	0.3	0.3	0.3	0.3
8-A-2, 8-B-1	その他の菓子類	6.6	5.8	6.1	6.2
9	嗜好飲料類	634.4	597.2	641.6	624.4
	アルコール飲料	99.7	97.6	99.0	98.8
	日本酒	10.5	12.1	10.8	11.1
	ビール	61.5	56.5	61.2	59.7
	洋酒・その他	27.6	29.1	27.0	27.9
	その他の嗜好飲料	534.7	499.6	542.7	525.7
9-A, 9-B	茶	304.6	299.5	308.6	304.2
9-B	コーヒー・ココア	126.0	118.8	127.1	124.0
9-A	その他の嗜好飲料	104.1	81.2	107.0	97.4
10	調味料・香辛料類	93.0	95.3	92.4	93.6
	調味料	92.7	95.0	92.1	93.3
10-A-1	ソース	2.0	1.9	1.9	1.9
10-A-2	しょうゆ	16.0	16.0	15.2	15.7
	塩	1.4	1.3	1.3	1.3
10-A-1	マヨネーズ	3.4	2.8	3.3	3.2
10-A-2	味噌	11.6	11.7	11.1	11.5
10-A-1	その他の調味料	58.4	61.4	59.4	59.7
10-B	香辛料・その他	0.3	0.3	0.3	0.3
該当なし	補助栄養素・特定保健用食品	15.8	13.2	14.5	14.5

表16. プリンを原因食品として発生した食中毒事例

・国内発生事例(厚生労働省食中毒統計より抽出)				
発生年月	発生場所	原因施設	摂食者数	患者数
2007年7月	鹿児島県	飲食店	不明	43
2006年6月	鹿児島県	保育所	80	69
2005年9月	大阪府	飲食店	13	10
2004年9月	愛知県	飲食店	14	12
2004年9月	北海道	製造所	不明	71
2003年6月	京都府	飲食店	31	28
・海外発生事例(PubMed検索により抽出)				
国	患者数	原因	文献	
アメリカ	133名	ブレンダー汚染	Foodborne Pathog Dis. 2010.7:1083-8.	
ドイツ	死者6名	不明	Gesundheitswesen. 2005. 67: 845-52.	
オーストラリア	28名	不明	Commun Dis Intell. 2002. 26: 562-7.	

表17. 焼き鳥におけるウェルシュ菌汚染調査結果

検体	一般生菌数	ウェルシュ菌	<i>cpe</i> 陽性*
	(CFU/g)	(CFU/g)	
A	$1 \times 10^1$	$5 \times 10^1$	-
B	$2 \times 10^1$	$5 \times 10^1$	-
C	$2.5 \times 10^1$	$3 \times 10^1$	-
D	$1 \times 10^1$	$7 \times 10^1$	-
E	$4 \times 10^1$	$2 \times 10^2$	-
F	$3 \times 10^1$	$6 \times 10^1$	-
G	$4 \times 10^1$	$3 \times 10^1$	-
H	$2 \times 10^1$	$2 \times 10^2$	-
I	$6 \times 10^1$	$5 \times 10^2$	-
J	$2 \times 10^1$	$3 \times 10^2$	-
平均	$2.8 \times 10^1$	$1.5 \times 10^2$	-

\* *cpe*遺伝子の検出はPCR法により行った。

## 野菜類における衛生指標菌の定量的検証

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  
協力研究者 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

食品-微生物対照表を整理する中で、野菜類については、国内の汚染実態・食中毒発生が共に確認されているものの、対応する規格基準が明確でないものとして取り上げられた。当該食品群の評価にあたっては、植物・土壌由来細菌叢による影響も懸念されることから、本研究では、計 6 品目の生野菜（レタス・ホウレンソウ・シイタケ・カイワレ・ニンジン・トマト、各 3 検体）を対象として、衛生指標菌試験法（一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、E.coli 試験法）による定量検出を行い、各試験法における定量値の比較を行った。更に、腸内細菌科菌群試験法で優勢な発育を示す細菌叢の構成を 16S rRNA 遺伝子配列に基づく遺伝的手法により同定した。一般細菌数については、発芽野菜であるカイワレ検体、葉物野菜であるレタス、ホウレンソウ検体で高い数値を示したが、葉物野菜における腸内細菌科菌群試験法結果は大腸菌群に比べ、一致性を欠いた。また、シイタケおよびトマト検体は総じて低い汚染結果を示した。ニンジン検体では、総じてやや低い汚染度であったが、腸内細菌科菌群数値は不均衡性を示した。遺伝的細菌種同定を通じ、レタス・ホウレンソウ検体では *Pseudomonas* 属菌が優勢に発育を示した一方、大腸菌群試験法により検出された *Enterobacter* 属菌は検出されなかった。また、ニンジン検体では *Enterobacter* 属菌のみが、カイワレ検体では *Enterobacter* 属菌および *Pantoea* 属菌が検出される等、発育構成菌叢は、検体・品目により多様性を顕した。以上の成績は、野菜を対象とする衛生検査において、腸内細菌科菌群試験法を用いる優位性は必ずしも高くなく、菌叢の把握が衛生指標菌設定の一手法として有用であることを示唆している。

### A. 研究目的

病原微生物の食品衛生上の制御を目的として、これまでに作成した食品・微生物対照表の作成を通じて、「国内の汚染実態・食中毒発生が共に確認されているものの、対応する規格基準が明確でない食品・微生物の組み合わせ」を抽出した。その中で、生野菜がこれに該当することが明らかとなり、その規格基準について検討する上では衛生指標菌に関する情報の整理が必要と考えられた。

着目した。

海外の規格基準に目を向けると、EU では食品の微生物規格の中で、“発芽野菜、カット前の果実・野菜、および未殺菌処理の果実・野菜ジュース”を RTE 食品と捉え、サルモネラを監視対象に基準値の設定を行っている（ $m=0/25g$ ,  $n=5$ ,  $c=0$ ）また、その中で“カット前の果実・野菜および未殺菌処理の果実・野菜ジュース”については特に製造基準も設定しており、製造工程終点に大腸菌を衛生指標菌とした製造基準を設

けている (m=100, M=1000, n=5, c=2)。

周知の通り、国内における衛生試験法は個別対応型の設定がなされるケースが多くみられ、国際的整合性も未だ十分はかられているとはいえない状況にある。

上述の生野菜については、RTE 食品として捉えるべき範疇の設定が食習慣等に大きく影響を受けることが想定されるが、現状での食品汚染状況等を踏まえて、衛生管理にあたって衛生指標菌試験法における汚染定量の比較検証は、当該食品に対する規格基準設定を考える上で、必要不可欠な事項であると考えられた。

本研究では、こうした背景をもとに、代表的な野菜検体(レタス、ホウレンソウ、シイタケ、カイワレ、ニンジン、トマト)について、一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、E.coli の各試験法による汚染定量値を求め、比較を行うこととした。更に、腸内細菌科菌群試験法の中で用いられる VRBG 培地上で発育する集落の中で代表的なものを選択し、その細菌種を 16S rRNA 配列を基に遺伝的に同定することで、同試験法において優勢な発育を示す細菌叢に関する知見をえたので、報告する。

## B. 研究方法

### 1. 検体

本研究では、2011年11月30日～12月5日の期間に東京都内のスーパー2店舗で、レタス、ホウレンソウ、シイタケ、カイワレ、ニンジン、トマトとして市販されていた6品目について、それぞれ3検体を購入し、試験に供した。

### 2. 衛生指標菌試験法

上記検体 25g に対して、225ml の緩衝ペプトン水 (pH7.4) (Oxoid) を加え、ストマッカーバック内で十分に攪拌することで、検体を破碎し、懸濁液を調整した。一般細菌数の測定には、そのうち 1ml を普通寒天培地 (BD) と混しゃくし、培養に供した。

このほか、腸内細菌科菌群試験法については、国立医薬品食品衛生研究所「食品からの微生物試験法検討委員会」において、検討された試験法である NIHSJ-16-ST1 に準じて、大腸菌群については、同 NIHSJ-13-ST1、E.coli は NIHSJ-10-ST1 に準じた試験を実施した。

### 3. 16S rRNA 配列の決定と細菌種同定

選択集落について、以下のプライマーを用いたコロニーPCRにより、16S rRNA 配列を増幅した (5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3')。同増幅断片については、同一プライマーを用いた Cycle sequencing により、塩基配列を決定した。得られた配列情報は、Blastn 照合を通じて、相同性検索を行い、99%以上の一致率を示したものを同定細菌種とした。これにより、複数の細菌種が同定された集落については、別途 API-20E を用いた生化学性状試験に供し、以て最終的な菌種の同定を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では、ヒト臨床情報を包含しておらず、倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

1. 衛生指標菌試験法による定量結果の比較  
概してレタス、ホウレンソウ等葉物野菜、および発芽野菜であるカイワレ検体では高い汚染菌数を示した。各検体品目の特徴は以下に述べる (図 1)。

### ①レタス (検体番号 1-3)

検体 1-3 の平均値は、一般生菌が  $1.87 \times 10^6$ 、腸内細菌科菌群が  $7.93 \times 10^5$ 、大腸菌群が  $4.45 \times 10^5$ 、E.coli が  $6.57 \times 10^1$  であった。このうち、大腸菌群試験法および E.coli 試験法で陽性を示した菌株については、生化学性状により同定を試み、

いずれも *Enterobacter* 属菌であることが明らかとなった。

#### ②ハウレンソウ (検体番号 4-6)

検体 4-6 の平均値は、一般生菌が  $7.27 \times 10^6$ 、腸内細菌科菌群が  $2.0 \times 10^1$ 、大腸菌群が  $4.68 \times 10^5$ 、*E.coli* が  $3.2 \times 10^0$  であり、腸内細菌科菌群の定量値の低さが着目すべき点であった。先のレタス検体と同様に、*E.coli* 試験法陽性株として *Enterobacter* 属菌が分離された。

#### ③シイタケ (検体番号 7-9)

検体 7-9 の平均値は、一般生菌が  $1.90 \times 10^4$  と相対的に低く、大腸菌群も同様に  $6.67 \times 10^3$ 、*E.coli* が  $3.0 \times 10^0$  と低値を示した。腸内細菌科菌群として検出された菌数は、大腸菌群よりも低い、 $1.33 \times 10^1$  であった。

#### ④カイワレ (検体番号 10-12)

検体 10-12 の平均値は、一般生菌が  $1.11 \times 10^7$ 、腸内細菌科菌群が  $5.47 \times 10^6$ 、大腸菌群が  $5.08 \times 10^5$ 、*E.coli* が  $1.10 \times 10^3$  と試験品目の中では最も高い値を示した。腸内細菌科菌群の定量値は、一般生菌数と大腸菌群数の間にあった。*E.coli* 試験法陽性株として *Enterobacter* および *Klebsiella* 属菌が検出された。

#### ⑤ニンジン (検体 13-15)

検体 13-15 の平均値は、一般生菌が  $1.55 \times 10^5$ 、腸内細菌科菌群が  $9.85 \times 10^5$ 、大腸菌群が  $2.95 \times 10^4$ 、*E.coli* が  $1.27 \times 10^1$  であり、腸内細菌科菌群試験法の定量値が最も高い結果となった。*E.coli* 試験法陽性株として *Enterobacter* 属菌が検出された。

#### ⑥トマト (検体番号 16-18)

検体 16-18 の平均値は、一般生菌が  $1.97 \times 10^3$ 、大腸菌群が  $1.67 \times 10^3$ 、*E.coli* が  $3.00 \times 10^0$  と総じて低く、腸内細菌科菌群では  $1.33 \times 10^1$  と最も低い検出値を示した。

## 2. 腸内細菌科菌群により優勢発育を示す細菌種の同定

上述のとおり、腸内細菌科菌群試験法によって得られた検出値は、その他の衛生指標菌試験法のそれに比べて、低い傾向にあったことから、腸内細菌科菌群試験法によって優勢に発育する細菌叢についての情報を得ることを目的に、VRBG 培地上で発育する典型的・非典型的集落よりそれぞれ 5 集落を釣菌し、全 DNA を抽出した。これらについて、16S rRNA 部分配列を PCR 法により増幅し、同増幅断片の塩基配列を解読し、Blastn を通じた相同性解析により細菌種の同定を試みた。以下に品目別の特徴を述べる。

#### ①レタス

検体番号 1 および 2 を対象とした試験において、VRBG 培地上での発育を示した典型的および非典型的集落各 10 集落の構成は、典型集落が全て *Pseudomonas* 属菌であったのに対し、非典型集落は *Pseudomonas* 属菌 (n=4)、*Stenotrophomonas maltophilia* (n=4)、*Delftia* 属菌 (n=1)、*Citrobacter freundii* (n=1) から構成されていた (図 2)。

#### ②ハウレンソウ

検体番号 4 および 5 対象とした試験において、VRBG 培地上での発育を示した典型的および非典型的集落各 10 集落の構成は、典型集落が *Pantoea* 属菌 (n=7)、*Pseudomonas* 属菌 (n=2)、*Agrobacterium tumefaciens* (n=1) であり、非典型集落は *Pseudomonas* 属菌 (n=5)、*Agrobacterium tumefaciens* (n=4)、*Pantoea* 属菌 (n=1) であった (図 3)。

#### ③シイタケ

検体番号 7 からは、2 つの典型的集落のみが検出され、これらはいずれも *Enterobacter* 属菌であることが示された (図 4)。

#### ④カイワレ

検体番号 10 および 11 から検出された、典型集落は *Enterobacter* 属菌 (n=5) および *Pantoea agglomerans* (n=5) であり、非典型集落は全て *Enterobacter* 属菌 (n=5) により構成された (図



5)。本検体品目では、培地上に発育した集落の多くが交差していたため、定数（検体あたり典型・非典型集落数として5つを対象とする）を用いることができなかった。

#### ⑤ニンジン

検体番号13および14から検出された典型集落はいずれも *Enterobacter* 属菌であり (n=10)、非典型集落は同上2検体より計5集落を釣菌し、同定に供したが、同様に *Enterobacter* 属菌であった (図6)。

#### ⑥トマト

検体番号18より検出されたのは、4つの典型集落のみであり、これらはいずれも *Pantoea* 属菌であった (図4)。

以上の結果を踏まえ、図7に、衛生指標菌分類体系における検出細菌種の位置づけを表記した。

### D. 考察

本研究では野菜を対象として、複数の衛生指標菌試験法によって得られる定量値の比較を行うと共に、特に検体・品目間で多様性を示した腸内細菌科菌群試験法において優勢に発育する細菌叢の構成を遺伝的手法により解析した。

品目別の定量値比較を通じて、本試験に供した葉物野菜あるいは芽物野菜の汚染菌数は総じて高い一方、供試したきのこ類（しいたけ）或いはトマトの汚染菌数は低い値を示すことが明らかとなった。これらの汚染菌数の違いは、土壌に由来すると推察され、実際に腸内細菌科菌群試験法を通じて優勢な発育を示す細菌種の同定を行うことで、① *Agrobacterium* 属菌のような腸内細菌科菌群に属さない菌叢、或いは②腸内細菌科菌群に（一部）属する *Pseudomonas* や *Pantoea* 属菌等が優勢菌叢を構成する検体については、本来の検出対象とする菌叢の発育を阻害あるいは培地上での発育をカバーしてしまうことで、その検出に支障を及ぼすことが明らかとなった。一方で、シイタケやトマトのような

汚染菌数が総じて低い検体については、*Enterobacter* 属菌も検出の範疇に入っており、試験法の有意性をはかる上では、構成菌叢と菌数の両面から検討する必要があると思われる。

冒頭で述べたとおり、EUではRTE野菜食品に対してサルモネラや大腸菌を衛生指標菌として設定しており、腸内細菌科菌群試験法は使用すべきでないとの報告もある。今回の結果はその菌叢の構成がその根拠として存在することを明確にした。菌叢構成解析にはメタゲノムをはじめとして、現在数多くの分子生物学的ツールが活用可能であり、鶏肉・豚肉 (Poult Sci. 2012. 91: 208-14.; J Food Sci. 2011. 76:27-33.; Food Microbiol. 2006.23: 607-11.) や魚介類 (Int J Food Microbiol. 2007. 117: 68-75.) における菌叢は、今回認められた野菜におけるそれとは大きく異なっているようである。検出結果に影響を及ぼす母体の構成を知る、こうした試みは、食品における衛生指標菌設定のための基礎情報として活用できるであろう。

### E. 結論

国内で流通する生野菜を検体として、複数の衛生試験法による定量検出結果の比較を行った。試験法に因らず、葉物・芽物野菜は高い汚染度であったのに対し、トマト・シイタケ検体は低い汚染を示した。また、複数の検体では、腸内細菌科菌群による定量値が大腸菌群のそれよりも大きく下回る等、検出範囲との不一致性が認められた。腸内細菌科菌群試験法において優勢発育を示す集落の細菌種構成を遺伝的に同定したところ、土壌・植物由来の菌叢の割合が高い、或いは混在している検体では特にこの不一致性が顕著に認められることが明らかとなり、腸内細菌科菌群試験法を野菜検体に対して用いる優位性は高いとはいえないことが示された。衛生指標菌の設定にあたり、菌叢を知ることは一手法として有用と目される。

F. 健康危険情報  
(総括報告書にまとめて記載)  
該当なし

3.その他  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

・ Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. (2012)  
General stress sigma factor RpoS influences time  
required to enter the viable but non-culturable  
state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol.*  
In press.

2. 学会発表

なし

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

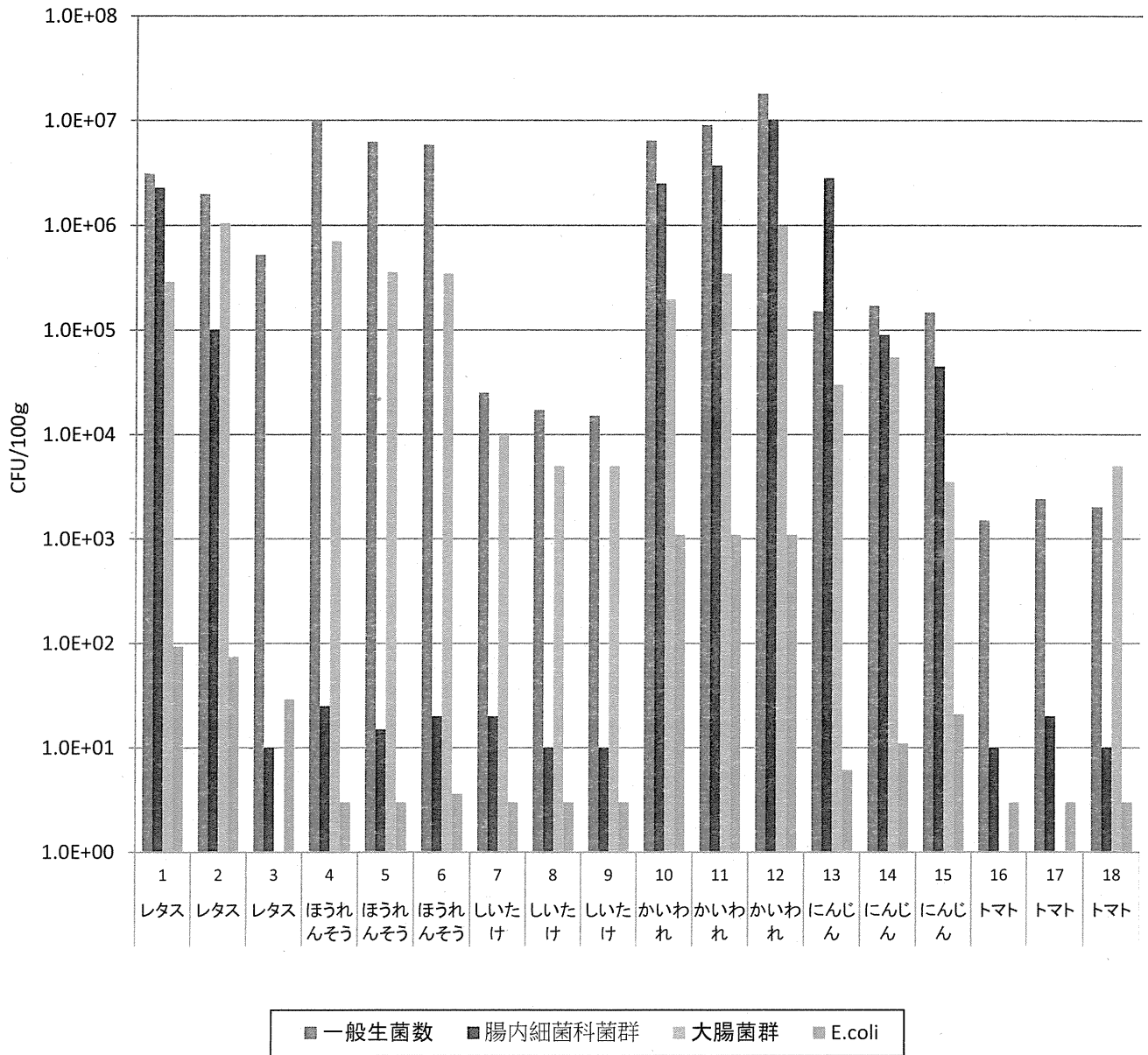


図1. 各種生野菜検体における衛生指標菌の検出結果

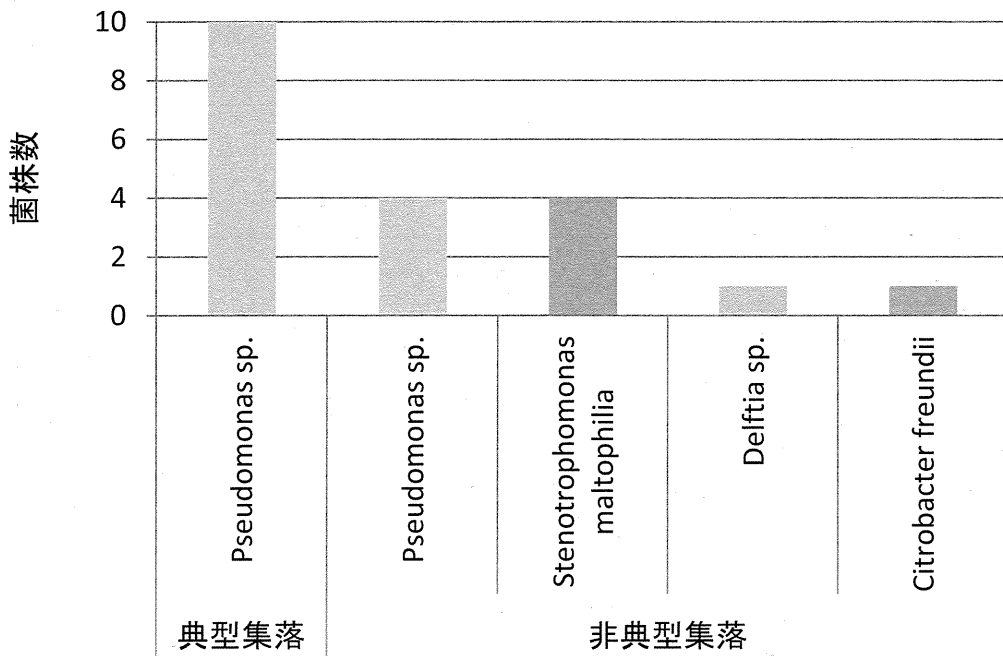


図2. レタスにおける優勢発育菌叢構成  
VRBG培地上で発育した典型・非典型集落を無作為に釣菌し、  
遺伝的細菌種同定へ供した。

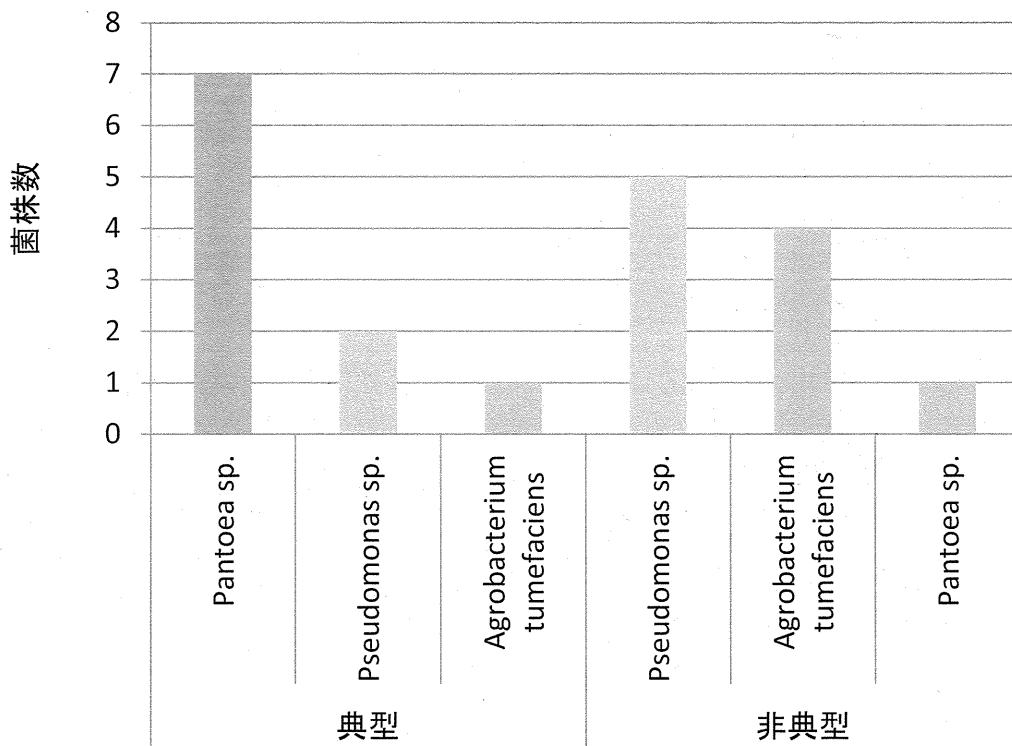


図3. レタスにおける優勢発育菌叢構成  
VRBG培地上で発育した典型・非典型集落を無作為に釣菌し、  
遺伝的細菌種同定へ供した。

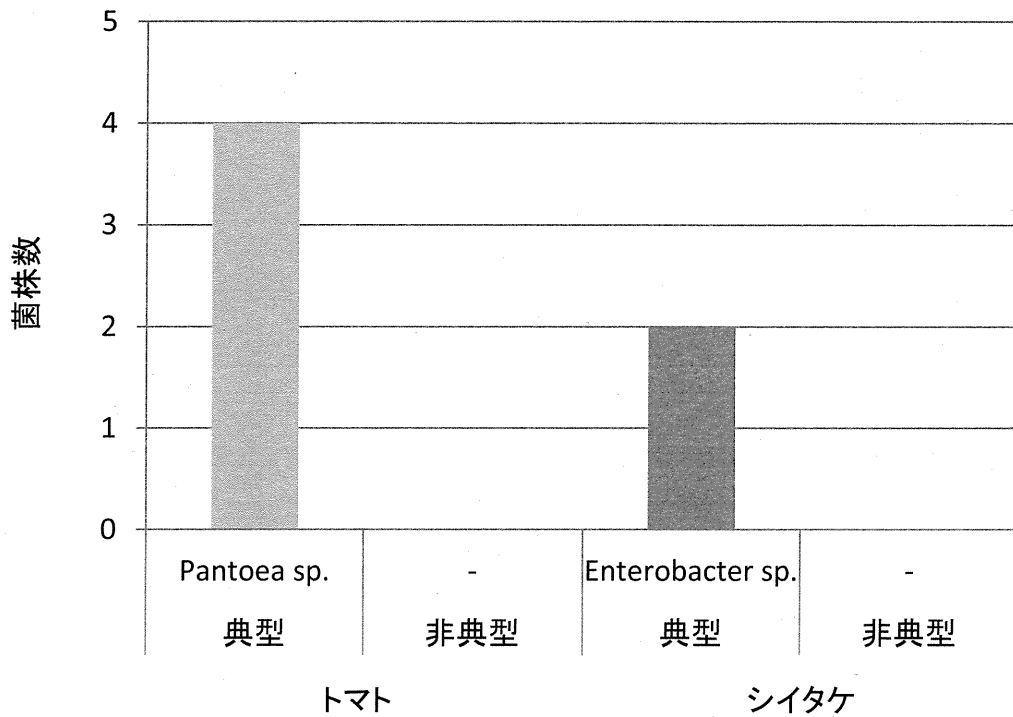


図4. トマトおよびシイタケにおける優勢発育菌叢構成  
VRBG培地上で発育した典型・非典型集落を無作為に釣菌し、  
遺伝的細菌種同定へ供した。

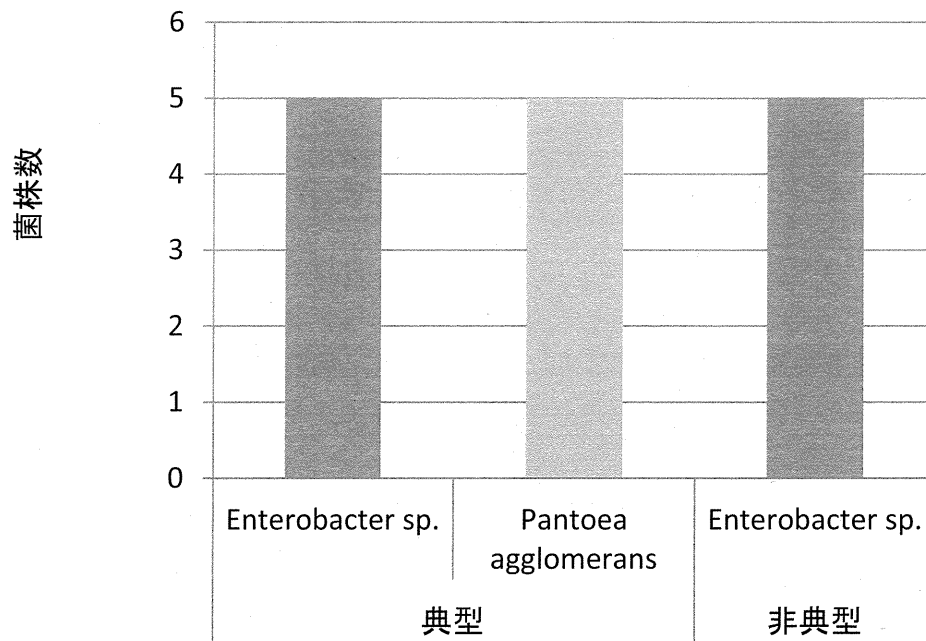


図5. カイワレにおける優勢発育菌叢構成  
VRBG培地上で発育した典型・非典型集落を無作為に釣菌し、  
遺伝的細菌種同定へ供した。

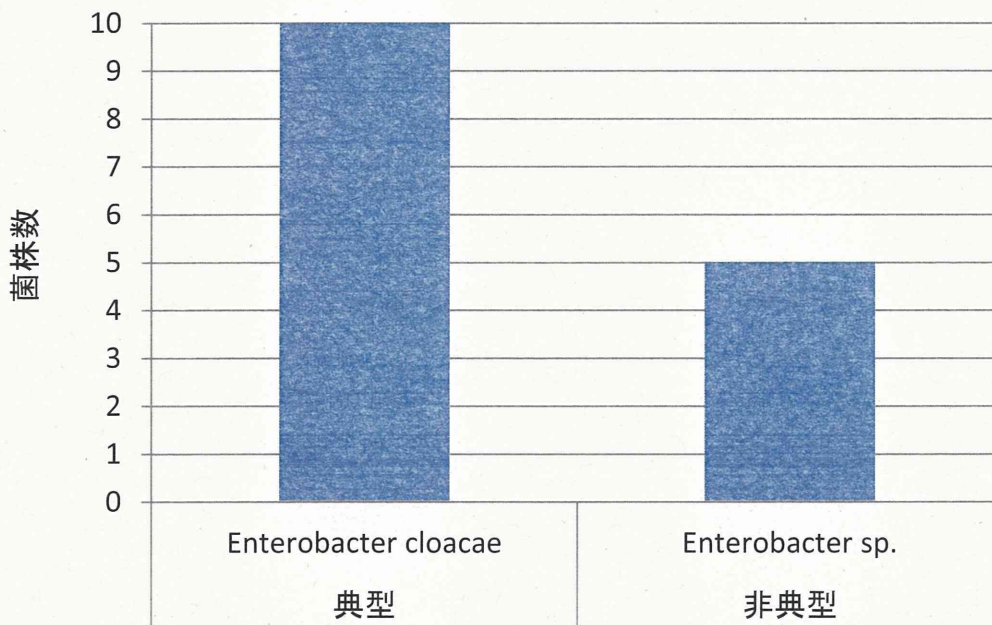


図6. ニンジンにおける優勢発育菌叢構成  
VRBG培地上で発育した典型・非典型集落を無作為に釣菌し、  
遺伝的細菌種同定へ供した。

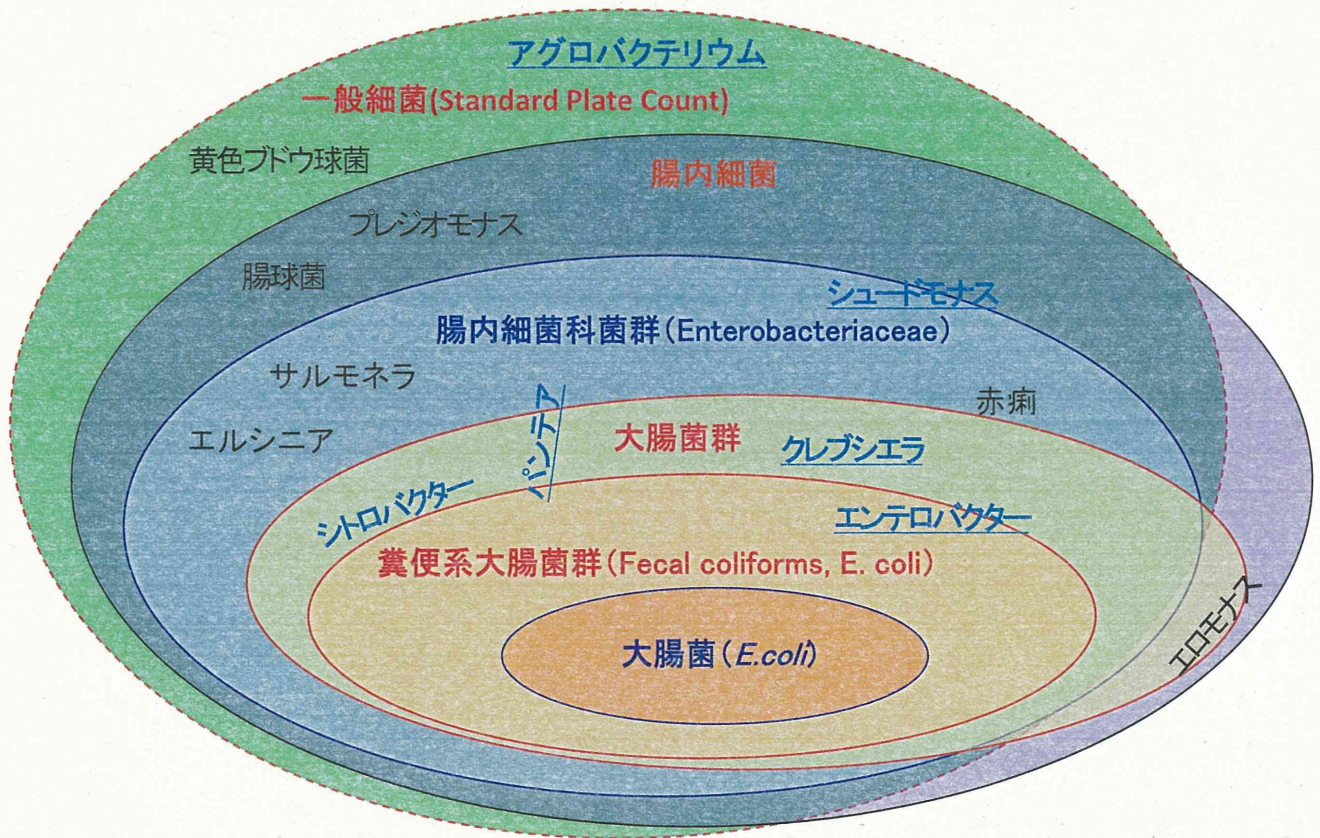


図7. 野菜から分離された主な菌叢の、衛生指標菌分類体系における位置づけ

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

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1gあたりの平均値は、一般生菌数が $1.0 \times 10^7$ 、大腸菌群が $3.4 \times 10^6$ 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。これらをスバ

イラルプレーター (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 ( $\beta$ -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  $\mu$ 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 $\mu$ 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 GCGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGGC 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 $\mu$ 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  $1.0 \times 10^7$  CFU/g、大腸菌群数は  $3.4 \times 10^6$  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、 $5.0$ - $9.9 \times 10^6$  CFU/g 及び  $1.0$ - $4.9 \times 10^5$  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、 $1.0$ - $4.9 \times 10^7$  CFU/g および  $1.0$ - $4.9 \times 10^6$  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  $1.0$ - $4.9 \times 10^7$  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、倫理面の問題はない。

#### 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、過去に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/kyasai/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して解釈される。

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増大する恐れがある。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