

2013-27034A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

非動物性の加工食品等における  
病原微生物の汚染実態に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏  
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成26（2014）年3月

非動物性の加工食品等における  
病原微生物の汚染実態に関する研究

研究代表者 朝倉 宏

平成 26 (2014) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究

朝倉 宏

----- 3

### II. 分担ならびに委託研究報告

#### 1. 国内に流通する浅漬け製品の細菌汚染実態・構成細菌叢と流通実態に関する研究

国内流通浅漬け食品の微生物汚染実態に関する研究

朝倉 宏 他

----- 15

野菜浅漬け食品の細菌汚染実態に関する研究

田口 真澄、神吉 政史

----- 35

野菜浅漬け食品の製造過程を通じた微生物挙動に関する研究

朝倉 宏、榊田 和彌

----- 43

国内における漬物の生産・流通実態に関する情報収集

朝倉 宏、倉園 久生

----- 53

#### 2. 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

----- 67

回虫卵検査法としてのストマッカー利用の是非について判断するための試験

公益社団法人 日本食品衛生協会 食品衛生研究所

----- 75

#### 3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研

容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究

百瀬 愛佳 他

----- 87

4. 国内外における食中毒発生動向・食品汚染に関する情報収集

国内外における食中毒発生動向・食品汚染に関する情報収集

窪田 邦宏、春日 文子 他

----- 103

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 139

平成 25 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究分担者

春日 文子 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部  
窪田 邦宏 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部  
杉山 広 国立感染症研究所 寄生動物部  
田口 真澄 大阪府立公衆衛生研究所  
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究協力者

荒川 京子 国立感染症研究所 寄生動物部  
荒木 潤 国立感染症研究所 寄生動物部  
天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部  
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
生野 博 (株)ビー・エム・エル 細菌検査部  
市村 静江 国立感染症研究所 寄生動物部  
江川 智哉 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
荻原 恵美子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部  
神吉 政史 大阪府立公衆衛生研究所  
倉園 久生 帯広畜産大学 畜産学部 共同獣医学課程  
酒井 真由美 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部  
柴田 勝優 国立感染症研究所 寄生動物部  
平 健介 麻布大学生命・獣医学部  
廣井 豊子 帯広畜産大学 畜産学部 共同獣医学課程  
堀内 朗子 日本食品衛生協会 食品衛生研究所  
榊田 和彌 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25年度厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業  
総括研究報告書

非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨:近年では白菜の浅漬けや容器包装詰低酸性食品である「あずきばっとう」等、非動物性食品を介した食中毒が相次いで発生しており、これらの汚染実態を把握し、食の安全確保に必要な基礎的知見を集積することが求められている。本研究では、(1)浅漬け製品における細菌汚染実態、(2)寄生虫汚染実態、(3)容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策の検証、および(4)非動物性食品における微生物汚染実態と関連する食中毒発生状況についての情報調査、を通じ、当該食品に係る微生物リスク把握のための基礎知見の集積を図ることとした。

浅漬け製品における細菌汚染実態として、衛生指標菌数(一般細菌数、大腸菌群数)が一定の割合で検出されると共に、季節性や原材料別の多様性を示す状況を把握した。また、構成細菌叢の比較解析を通じ、原材料別の系統遺伝学的分類がなされ得ることを明らかにした。更に、一部の同一製品からはリステリア・モノサイトゲネスが継続的に検出される状況を把握した。この他、平成25年12月の漬物の衛生規範改正後の、浅漬け製品の製造過程を検証するべく、製造過程の中間製品および施設ふき取り検査を行った。結果として、検体から病原細菌(腸管出血性大腸菌 O157/O26/O111, サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス)は分離されず、衛生指標菌数も製造過程に沿って低減傾向を示すことが明らかとなり、供試製造施設において適切な微生物汚染対策が取られていることを確認した。

寄生虫汚染に関する調査としては、回虫症を始めとする土壌媒介寄生蠕虫症が僅かながら依然として国内で発生する状況を把握した。その感染源としては、国内の非動物性食品ではなく、海外の流行地から輸入される野菜(特に根菜類)が一因となっている可能性が示唆された。また、回虫卵の食品検査法については、試験法の検出感度の比較等が十分に検証されていない実情を踏まえ、試験的に比較検証をはじめることとした。

容器包装詰低酸性食品については、ボツリヌス対策として事業者に求められている指導内容があるが、インターネット検索を通じて、同内容を逸脱する理化学性状(pH)を示す「たくあん」製品が流通する実態を確認した。また、保存試験を通じて、当該製品内でボツリヌス菌は少なくとも9日間は生残することを実証した。

非動物性食品における病原微生物汚染実態と関連する食中毒発生状況に関しては、米国・カナダ・EUの食品回収情報と、アメリカ・EUの食中毒アウトブレイクに関するデータベースより情報を収集し、非動物性食品に起因しうる食中毒リスクとして注視すべき食品と病原体の組み合わせを取りまとめた。サルモネラでは生鮮野菜、生鮮果物、ナッツ類、香辛料等、リステリアでは同様に生鮮野菜や生鮮果物、志賀毒素産生性大腸菌では生鮮野菜が主な高リスク食品と想定され、我が国においても、上述の食品と微生物の組み合わせについては特に汚染実態をはかつていくことが食中毒対策のために重要と考えられた。

来年度に向けては、情報・実証データの融合を図りつつ、本年度の成果をより発展させることで、非動物性食品の微生物リスク管理への応用性を包含した基礎的知見の集積を図っていきたい。

## 研究分担者

春日 文子 (国立医薬品食品衛生研究所)  
窪田 邦宏 (国立医薬品食品衛生研究所)  
杉山 広 (国立感染症研究所)  
田口 真澄 (大阪府立公衆衛生研究所)  
百瀬 愛佳 (国立医薬品食品衛生研究所)

## 協力研究者

荒川 京子 (国立感染症研究所)  
荒木 潤 (国立感染症研究所)  
天沼 宏 (国立医薬品食品衛生研究所)  
五十君 静信 (国立医薬品食品衛生研究所)  
生野 博 ((株) ビー・エム・エル)  
市村 静江 (国立感染症研究所)  
江川 智哉 (国立医薬品食品衛生研究所)  
荻原 恵美子 (国立医薬品食品衛生研究所)  
神吉 政史 (大阪府立公衆衛生研究所)  
倉園 久生 (帯広畜産大学)  
酒井 真由美 (国立医薬品食品衛生研究所)  
柴田 勝優 (国立感染症研究所)  
平 健介 (麻布大学)  
廣井 豊子 (帯広畜産大学)  
堀内 朗子 (日本食品衛生協会)  
榎田 和彌 (国立医薬品食品衛生研究所)  
森嶋 康之 (国立感染症研究所)

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌やボツリヌス菌等、病原微生物の中には人命を脅かすものが少なくない。これ迄の対策は主に動物性食品で進められてきたが、近年では漬物や容器包装詰低酸性食品等に起因する食中毒事例が相次いでおり、汚染実態を把握し、食の安全確保に必要となる基礎的知見を集積することが求められている。

上記食品に関連する O157 等食中毒の危害評価は必要不可欠であるが、これ迄の知見の多くは定性的な汚染実態に留まり、定量的知見は十分とは言い難い。危害性判断に当たっては、従って国内外の情報収集・整理および実態を捉えた定量データの集積が必要となる。

更に食品の製造加工過程では様々な指標菌を用いた衛生管理がなされるが、申請者等の予備調査では動物性食品とは異なり、植物性食品は生育過程を

通じて環境由来の多様な細菌叢を形成し、多くが指標菌として検出される状況であることが明らかになりつつある。従って上記食品に対する適切な指標菌の在り方を議論する為の基礎知見を得ることが、衛生管理を通じた安全確保に必須と考えられる。

また、毒素産生微生物の中でも危害性の高いボツリヌス菌はとりわけ容器包装詰低酸性食品を汚染した際に重篤な食中毒を引き起こす可能性があり、その安全確保にはこれまでも審議が重ねられてきた。流通品から本菌は検出されておらず直ちにその規格基準を設定する状況にはないが、事業者は食中毒を未然に防止する対策に迅速に取り組む必要がある。本研究では流通品の理化性状を調査・検討し、本菌の食品内挙動に関する検討を通じて、今後の対策の在り方を判断するための知見の集積をはかる。

更に、上記食品では細菌に加え、過去には輸入キムチの虫卵汚染が問題となる等、寄生虫も大きな危害因子として捉えられる。特に生野菜では灌漑水の寄生虫(卵)・原虫の他、回虫・蟯虫・テニア科条虫等複数の寄生虫汚染が懸念されており、海外からの輸入量が多いわが国の実態を踏まえると、国内外での寄生虫汚染実態の把握は必須と考えられる。

以上の知見をふまえ、本研究一年目においては、社会的背景より国内流通浅漬け製品を主な対象に選定した上で、微生物の汚染実態に関する調査を行うと共に、衛生管理に関わる諸情報の収集にあたった。寄生虫については、感染事例および食品汚染実態に関する調査を行うと共に、食品検査法に係る検討をおこなった。また、容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策として、当該製品の流通状況を調査し、指導内容への適合性について確認を行った。更に、非動物性食品に関連して発生した食中毒の状況ならびに食品汚染実態に関する情報の収集を行ったので、報告する。

## B. 研究方法

### 1. 野菜浅漬け食品における微生物汚染実態に関する研究

#### 1) 国内流通浅漬けにおける細菌汚染実態調査

平成 25 年度は、関東および関西地方に流通する野菜浅漬け食品を対象として、衛生指標菌(一般細菌数、大腸菌群数、 $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性大腸菌)の分布状況を定量的に把握すると共に、主要病原細菌(腸

管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス)の定量検出を行った。更に、検体の構成細菌叢について、16S rRNAをターゲットとするメタゲノム解析手法を用いて検討した。

## 2) 野菜浅漬け製造工程の実態調査

神奈川県下の浅漬け製造施設の協力を得て、ハクサイおよびキュウリの浅漬けの製造工程における衛生管理状況を調査するため、中間製品ならびに施設ふき取り検体を採取し、上述 1)と同様の細菌試験を行った。

## 3) 漬物の生産・流通実態に関する情報収集

種々の報告書を参考にしつつ、漬物に関する都道府県別の生産量・原材料別の消費量・月別生産量・地域毎の主要漬物の特徴等についてまとめた。

## 2. 寄生虫汚染に関する研究

### 1) 寄生虫症例に関する情報収集

日本臨床寄生虫学雑誌を検索元として、非動物性食品と関連する寄生虫感染症例を検索した。また、臨床検査会社の協力を得て、2000年以降に全国の医療機関で診断された回虫感染の症例を精査し、非動物性食品に関連する症例をとりまとめた。

### 2) ストマッカーを用いた寄生虫卵回収法に関する検証試験

ブタ回虫卵をハクサイ検体に接種し、浮遊法および細菌検査で汎用されるストマッカー法の両者で、回収率を比較した。

## 3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策と食品内挙動に関する研究

インターネット検索により、容器包装詰低酸性食品の流通状況を調査し、その中で、冷蔵流通・保存の表記のない製品を抽出した。抽出製品の一部を購入し、理化学性状や細菌試験を行うと共に、指導内容に逸脱の見られた食品検体については、ボツリヌス菌保存試験を行った。

## 4. 食中毒の発生状況と食品汚染実態に関する情報収集

米国FDA、カナダCFIA、EU RASFFの各データベースより、非動物性食品に関連して発生した食中毒アウトブレイクや食品の回収情報に関する情報を収集し、とりまとめた。各種データはMicrosoft Excelに入力し、Microsoft Access等のデータベースソフト等を

利用して各種の集計、解析を行った。また、それらの中より、サルモネラ、腸管出血性大腸菌、セレウス等による主要アウトブレイク情報を概説した。

## C. 研究成果

### 1. 野菜浅漬け食品における微生物汚染実態に関する研究

#### 1) 国内流通浅漬けにおける細菌汚染実態調査

関東地方の製品より検出された一般細菌数・大腸菌群の平均数値は、それぞれ $2.27E+06$ CFU/g、大腸菌群数の平均値が $6.32E+04$ CFU/gであった。関西地方の検体、計100検体のうち、12検体からはリステリア・モノサイトゲネスが分離された。検出菌数は何れも30CFU/g以下であったが、3製造施設からは通年で本菌が検出され、施設内での常在化が懸念された。いずれの検体も $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性大腸菌は陰性であった。供試検体の構成細菌叢については、門レベルで、3クラスターに大別され、野沢菜と白菜を原材料とする検体の細菌叢は、その他の検体(茄子、キュウリ、大根等)との間で系統遺伝学的に異なることが示された。白菜の浅漬けを実験的に製造した場合には、構成細菌叢の経時的変動が認められ、漬け込み液の性状がその変動要因の一つであることが示された。

#### 2) 野菜浅漬け製造工程の実態調査

ハクサイの浅漬け製造ライン上では、殺菌前の塩漬け工程で衛生指標菌数は、原材料に比べて約 $10^1$ オーダーの低減を示した。続いて実施された次亜塩素酸Naによる殺菌工程を通じて、同菌数は更に減少傾向を認め、最終製品より大腸菌群は検出されなかった。キュウリ浅漬け製造ラインにおいても、同様に衛生規範に則った殺菌工程の適正履行により、最終製品の微生物学的安全性が担保されることが示された。

#### 3) 漬物の生産・流通実態に関する情報収集

漬物の中では塩漬けによるものが減少し、酢漬けによるものが増加傾向にあった。月別生産量としては、年末から4月にかけて増加傾向にあった。漬物出荷金額としては、和歌山県が最も多く、次いで愛知、長野、群馬等が続き、特産物で有名な地域が比較的上位になっている状況が把握された(例:長野県、野沢菜)。世帯あたりの消費量・原材料仕入れ量としては、ダイコン

を原材料とするものが最多であった。

## 2. 寄生虫汚染に関する研究

### 1) 寄生虫症例に関する情報収集

日本臨床寄生虫学会誌 24 巻に掲載された論文は 923 編で、このうち 33 編が国内での日本人の回虫感染事例を報告し、症例数の合計は 139 件であった。興味深い事に報告数・症例数は、2003 年以降に激減していた。しかし 2012 年にも 1 例の報告があった。

BML の資料では、2011 年に 3 件(日本人 1 件、外国人 2 件)の回虫症例を認めた。また同年に鉤虫では 3 件(日本人 1 件、外国人 2 件)の症例を、鞭虫は 3 件(日本人 1 件、外国人 2 件)の症例を認めた。

### 2) 寄生虫卵回収法に関する検証試験

いずれの検査重量においても約 50%の虫卵が回収され、本試験において検査重量を 50 g としても、従来法のデータに不都合が出る危険性は乏しいことが確認された。

## 3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策と食品内挙動に関する研究

インターネット検索を通じて、容器包装詰低酸性食品の包装形態で流通する「たくあん」製品の中で、複数の製品に冷凍保存・流通に関する表示がなされていないことが明らかとなった。これらのうちの一部製品では、pH 値が厚生労働省の通知(平成 20 年 6 月 17 日付、食安基発第 0617003 号、食安監発第 0617003 号)内容を逸脱していた。37℃の保存試験を通じて、ボツリヌス菌は当該食品内で少なくとも 9 日間は生残することを実証した。

## 4. 食中毒の発生状況と食品汚染実態に関する情報収集

米国 FDA の回収情報に基づく情報解析の結果、ナッツ類、スプラウト、コショウ・唐辛子類、カンタロープ、トマト、ゴマ、ハウレンソウ等ではサルモネラ、サラダ、レタスではリステリアとの組み合わせが多く見られた。ハウレンソウ、サラダ、レタスでは大腸菌 O157:H7 との組み合わせが比較的多く報告されていた。また、カナダ CFIA の回収情報に基づく解析結果としては、ナッツ類、スプラウト、

コショウ・唐辛子類、バジル、マンゴー、カンタロープ、カルダモンとサルモネラ菌との組み合わせ、およびサラダ、マッシュルーム、タマネギ、リーキ(西洋ネギ)とリステリアの組み合わせが多く見られた。EU での回収情報からは、特にサルモネラ汚染に関する情報が多くみられ、ハーブおよびスパイス類が最も高い頻度で汚染の報告を受けていた。

米国での非動物性食品に関連して発生したアウトブレイク情報を整理したところ、サルモネラはトマト、アルファルファスプラウト、ペッパーと最も頻繁に関連しており、STEC はレタスとハウレンソウが高い割合で関連性を示した。EU でのアウトブレイクに関しても、同様に品目と病原体の組み合わせで発生頻度に関する情報の整理を行った。

## D. 考察

### 1. 野菜浅漬け食品における微生物汚染実態に関する研究

#### 1) 国内流通浅漬けにおける細菌汚染実態調査

主要病原細菌として試験対象に選定した、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネスは、何れも野菜・果実類への汚染リスクが相対的に高い病原体として国際的に認識されている。同一製造施設の浅漬けから連続してリステリアが検出された状況は、製造過程でリステリアの汚染源が継続して施設を汚染していると想定され、当該施設の衛生管理に係る更なる情報の収集と実証、そして製品中での細菌挙動等が求められよう。また、細菌叢構成の原材料別の分類成績は、衛生指標の在り方を検討する上で、重要な基礎知見となると考える。

#### 2) 野菜浅漬け製造工程の実態調査

衛生指標菌の検出状況ならびに最終製品から当該病原体(由来遺伝子)が検出されなかった結果は、今回調査対象とした製造工程、とりわけ殺菌工程が微生物危害低減に有効に機能していることを示しているといえよう。一方で、それらの成績と、構成細菌叢の関連性については今後検討すべき課題と考える。

#### 3) 漬物の生産・流通実態に関する情報収集

平成23年と24年の月別生産量を比較すると、年末か

ら4月にかけて増加傾向が認められた。一般に食中毒は夏季に増加するが、平成24年度の夏の生産量は前年度と比較しても低い傾向にあった。北海道で発生した漬物による食中毒事例の社会的影響があったためと考えられる。

## 2. 寄生虫汚染に関する研究

### 1) 寄生虫症例に関する情報収集

回虫等の土壌媒介蠕虫の感染要因としては、下肥利用の自家菜園で栽培した無農薬野菜・有機野菜が挙げられる。回虫の症例報告数は2003年以降に大きく減少したがその要因としては、2000年に「日本農林規格」(JAS法)が改正され、その結果、下水処理汚泥や人糞の肥料利用が原則禁止されたことが挙げられる。東京都健康安全研究センターの調査では、国産野菜54検体、輸入野菜274検体のうち、輸入ショウガ(根菜類、中国産)1検体よりブタ回虫含子虫卵が検出されており、輸入野菜が感染源となりうることを示唆している。植物検疫法で土の輸入が禁止されている状況を踏まえると、しかしながら、寄生虫卵の汚染度は極めて軽微と考えられる。

### 2) 寄生虫卵回収法に関する検証試験

虫卵の検出法については、食品衛生検査指針において浮遊法が採用されており、これは食品検査室での汎用性が考慮された結果と考えられた。浮遊法をもとにした土壌等の検査法が検討され、またキムチの寄生虫卵汚染の検査法に浮遊法が選択されたのも、この流れを汲むものである。一方で、キムチの寄生虫卵汚染問題が生じた際の検討では、沈殿法の検出感度が高いという興味深い結果が示された。相反する結論が得られているが、その理由は説明されておらず、いずれの検出法の感度が高いのか、今後の詳細な比較検討が必要である。

## 3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策と食品内挙動に関する研究

通年に流通が認められる「たくあん」製品については、流通・保存での冷蔵表示がない製品が依然として存在する実態が把握された。冷蔵表示の是非については、製造者・販売者の理解に因るところが大きく、より拡大的啓蒙が必要と考えられる。厚生労働省による指導通知内容のうち、pH値に逸脱を

認めた製品が、十分な加熱を経ているか否かについては、調査すべき課題であろうが、検出された指標菌数から想定して、一定の加熱処理は経ていると考えられる。今後は異なる温度帯での保存試験を通じ、当該食品検体におけるボツリヌス菌の挙動を精査すると共に、食品内毒素の定量評価についても併せて検討したい。

## 4. 食中毒の発生状況と食品汚染実態に関する情報収集

米国、カナダ、EUの回収情報から、各国で特に汚染が多い食品と考えられたのは、生鮮野菜(特にスプラウト)、生鮮果物、ナッツ類、ハーブやスパイス、ゴマ等であった。米国・カナダの回収情報の件数は、関連製品の回収情報や追加回収情報等を区別せずに集計したものである。また、回収情報は情報量、記載方法や表現等が異なるため、食品分類が全てのケースで同程度の厳密さで行われている保証はない。従って、今回の集計・解析結果から定量的な判断は困難であり、半定量的な傾向把握に用途を留める必要があると考える。また、米国および欧州でのアウトブレイクの調査報告データにもとづく、原因菌と原因食品の組み合わせ結果は上述した回収情報における傾向と類似した。回収情報には患者はまだ発生していないがルーチン検査で汚染が確認されたことにより発表された情報も含まれることから、アウトブレイクに関連する情報は、回収情報に比べてより実態に即したデータと考えられる。

## E. 結論

### 1. 野菜浅漬け食品における微生物汚染実態に関する研究

#### 1) 国内流通浅漬けにおける細菌汚染実態調査

関東地方に流通する各種野菜浅漬け製品66検体を対象に細菌試験を行った。主要病原微生物ならびにβ-グルクロニダーゼ産生性大腸菌は検出されなかった。一般細菌数や大腸菌群数は一定の汚染を認め、夏季に増加傾向を示した。メタゲノム解析により、浅漬け製品の構成細菌叢は概して原材料と季節に関連性を示すことが明らかとなった。また、製造実験を通じ、保存時間や漬込み液の性状等が構成細菌叢の変動要因となることを明らかにした。関西

地方に流通する野菜浅漬け 100 検体中 12 検体からリステリア・モノサイトゲネスが検出された。菌数は少ないものの 3 製造施設からは通年でリステリアが検出され、それらの血清型は 1/2a、1/2b であった。以上の成績は、浅漬け食品の望ましい衛生管理手法を検討する上で、重要な基礎知見になると考えられる。

## 2) 野菜浅漬け製造工程の実態調査

ある浅漬け製造事業者の協力の下、ハクサイ・キュウリの浅漬け製造過程における衛生指標菌および主要病原細菌の汚染状況を調査した。衛生指標菌は殺菌工程前後で顕著な低減を示し、最終製品の安全性確保に寄与していると想定された。また、原材料から腸管出血性大腸菌関連遺伝子が検出された一方、最終製品から当該遺伝子は検出されなかったことから、現行の衛生規範が微生物リスク低減に有効に機能していることが実証された。

## 3) 漬物の生産・流通実態に関する情報収集

月別・都道府県別の漬物生産量・消費量等に関する情報を整理し、年末～春先にかけての生産量の増加傾向と、原材料別では大根、キュウリ等が大半を占める現状を把握することができた。また、生産・消費量は、各地域の特色ある漬物製品の存在とも関連性が示された。

## 2. 寄生虫汚染に関する研究

### 1) 寄生虫症例に関する情報収集

回虫症を始めとする土壌媒介寄生蠕虫症が、少ないながらも依然として国内で発生しているとの結論が得られた。それらの感染源は、国内の非動物性食品ではなく、海外の流行地から輸入される野菜（特に根菜類）ではないかとの示唆を得た。

### 2) 寄生虫卵回収法に関する検証試験

野菜等から寄生虫卵を検出する方法について文献調査を行ったところ、食品からの虫卵分離にはブラシ等による洗浄を記すものが多く、検出法については沈殿法を記すものが多かった。しかしながら、いずれの分離・検出法が、より高い検出感度に繋がるのかについては、今後の検討すべき課題として挙げられた。ストマッカーを利用した非

動物性食品からの寄生虫卵検出法を構築し、虫卵検出率が従来法と同等であることを示した。

### 3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策と食品内挙動に関する研究

容器包装詰低酸性食品として国内に流通する食品のうち、「たくあん」製品が一年を通じて流通する現状を把握すると共に、厚生労働省による指導内容を逸脱した製造基準を経て、製造・流通される製品が存在することを明らかにした。更に、一部の製品では、ボツリヌス菌の短期保存が確認され、異なる温度帯での検証ならびに食品内毒素挙動について検討が必要と考えられた。

### 4. 食中毒の発生状況と食品汚染実態に関する情報収集

非動物性食品における食中毒リスクとして注視すべき食品と病原体の組み合わせは、サルモネラでは生鮮野菜、生鮮果物、ナッツ類、香辛料等で、具体的な品目としてはナッツ類、スプラウト、コショウ・唐辛子類、カンタロープ、トマト、ゴマ、ホウレンソウ、バジル、マンゴー、カルダモン等であった。リステリアでは同様に生鮮野菜や生鮮果物が多く、品目としてはサラダ、レタス、マッシュルーム、タマネギ、リーキ（西洋ネギ）等であった。大腸菌（STEC、VTEC）では生鮮野菜がリスク要因であり、品目としてはサラダ、スプラウト、ホウレンソウ、レタス、バジル等であった。セレウス菌は米製品やコショウ等香辛料関連製品、ボツリヌスはオリーブ類、A 型肝炎ウイルスはベリー類およびザクロがリスク要因であった。我が国でもこれらの非動物性食品の汚染調査による実態把握が食中毒対策のために重要と考えられる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Chen, S., Ai, L., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, W., Li, Y., Muto, M., Morishima, Y, Sugiyama, H., Xu, X., Zhou, X., Yamasaki, H. (2014)

Molecular detection of *Diphyllobothrium nihonkaiense* in humans, China. Emerging Infectious Diseases. 20: 315-318.

- 2) Chen, F., Li, J., Sugiyama, H., Zhou, D.H., Song, H.Q., Zhao, G.H., Zhu, X.Q. (2013) Genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from the Philippines, Japan and China revealed by sequence analysis of three mitochondrial genes. Mitochondrial DNA. In press.
- 3) Takeda, M., Sugiyama, H., Qian, B.Z. (2013) Two new records of freshwater crabs from china. Journal of Teikyo Heisei University. 24: 1-5.
- 4) Kimura, A., Morishima, Y., Nagahama, S., Horikoshi, T., Edagawa, A., Kawabuchi-Kurata, T., Sugiyama, H., Yamasaki, H. (2013) A coprological survey of intestinal helminthes in stray dogs captured in Osaka Prefecture, Japan. Journal of Veterinary Medical Sciences. 75: 1409-1411.
- 5) Sugiyama, H., Shibata, K., Morishima, Y., Muto, M., Yamasaki, H. (2013) Current status of lung fluke metacercarial infection in freshwater crabs in the Kawane area of Shizuoka Prefecture, Japan. Journal of Veterinary Medical Sciences. 75: 249-253.
- 6) Ilhan, H.D., Yaman, A., Morishima, Y., Sugiyama, H., Muto, M., Yamasaki, H., Hasegawa, H., Lebe, B., Bajin, M.S. (2013) *Onchocerca lupi* infection in Turkey: A unique case of a rare human parasite. Acta Parasitologica. 58: 384-388.
- 7) Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y. (2013) A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 66: 530-533.

#### H. 知的財産権取得状況

該当なし

## II. 分担ならびに委託研究報告

1. 国内に流通する浅漬け製品の細菌汚染実態・構成細菌叢と

流通実態に関する研究

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究  
分担研究報告書

国内流通浅漬け食品の微生物汚染実態に関する研究

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
協力研究者	倉園 久生	帯広畜産大学 畜産学部	共同獣医学課程
協力研究者	梶田 和彌	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨：国内に流通する浅漬け製品については、平成24年度に北海道で発生した腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事例を受けて、衛生規範の見直しが行われたところである。乳肉製品とは異なり、野菜や果実を原材料とする食品には、土壌や水等に由来する様々な微生物叢が含まれることが経験的には知られているが、乳肉製品に比べて病原微生物の汚染実態に関する定量的な知見には乏しい。本研究では、国内（関東）に流通する浅漬け製品を対象として、FAO/WHO の提唱する、野菜・果実類への汚染リスクの懸念される代表的な病原微生物（腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、*Listeria monocytogenes*）と共に、衛生指標菌として一般細菌、大腸菌群、β-グルクロニダーゼ産生性大腸菌の定量検出を試みた。更に、供試検体の構成細菌叢を 16S rRNA をターゲットとするメタゲノム解析を通じて、原材料や季節等との関連性について考察した。平成25年6月～10月の間に収集した計66検体は、上記病原細菌陰性であった。指標菌数として、β-グルクロニダーゼ産生性大腸菌は同じく陰性であったが、検体1gあたりの一般細菌数および大腸菌群数の平均値は、それぞれ  $2.27E+06$ 、 $6.32E+04$  であった。白菜浅漬け検体では、同指標菌数は夏季に上昇傾向が認められた。メタゲノム解析を通じ、構成細菌叢は概ね原材料別に分類され、当該食品の衛生管理向上には、原材料別の対策設定が有効と目された。また、白菜検体では夏季に *Leuconostoc* 科が全体の90%以上を占め、指標菌数の季節性変動との関連性が示唆された。白菜浅漬けの実験的製造・保存試験を通じ、多数の接種 O157 が同検体内で長期的に生残すること、塩漬けにより構成細菌叢は単純化される傾向を示すこと等が明らかとなった。以上の知見を踏まえ、浅漬け食品の衛生管理には、原材料や漬込液の性状、保存期間等を踏まえた対策が有効と考えられた。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌やボツリヌス菌等、毒素産生微生物の中には人命を脅かすものが少なくない。これ迄の対策は主に動物性食品で進められてきたが、近年では漬物や容器包装詰低酸性食品等に起因する食中毒事例が相次いでおり、汚

染実態を把握し、食の安全確保に必要となる基礎的知見を集積することが求められている。

上記食品に関連する O157 等食中毒の危害評価は必要不可欠であるが、これ迄の知見の多くは定性的な汚染実態に留まり、定量的知見は十

分とは言い難い。危害性判断に当たっては、従って国内外の情報収集・整理および実態を捉えた定量データの集積が必要となる。

更に食品の製造加工過程では様々な指標菌を用いた衛生管理がなされるが、申請者等の予備調査では動物性食品とは異なり、植物性食品は生育過程を通じて環境由来の多様な細菌叢を形成し、多くが指標菌として検出される状況であることが明らかになりつつある。従って、上記食品に対する適切な指標菌の在り方を議論する為の基礎知見を得ることが、衛生管理を通じた安全確保に必須と考えられる。

本研究において、本年度は平成 24 年 8 月に北海道において発生した腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒を受けて、その後、衛生規範の改正等が行われている社会的影響の大きさを鑑み、浅漬け食品を対象として、病原微生物汚染実態に係る細菌学的調査を行うと共に、衛生指標菌の定量検出を行った。また、16S rRNA をターゲットとする pyrosequencing 解析(メタゲノム解析)を通じて、これらの検体を構成する細菌叢に関する知見を収集した。更に、白菜の浅漬けを実験的に製造・保存し、添加回収試験を通じて、O157 の食品内挙動と細菌叢変動に関する知見を得たので、報告する。

## B. 材料と方法

### 1. 食品検体の収集と構成

平成 25 年 6 月～10 月の間に東京都および神奈川県内で市販される浅漬け検体、計 66 検体を購入し、以下の試験に供した。当該検体は購入後、速やかにアイスボックスにて試験実施機関に搬入・前処理を行った。購入検体の原材料別構成は以下のとおりである：白菜浅漬け 30 (5 x 6) 検体；茄子浅漬け 18 (3 x 6) 検体；きゅうり浅漬け 6 (1 x 6) 検体；野沢菜浅漬け 6 (1 x 6) 検体；大根浅漬け 6 (1 x 6) 検体。

### 2. 衛生指標菌定量試験

各検体より無菌的に 25g を採材し、約 3 x 3cm 角に細断した後、滅菌ストマック袋 (関東化学) に入れ、緩衝ペプトン水 (Oxoid) 225 ml 加えて、1 分間ストマッキング処理を行った。同懸濁液 100  $\mu$  l を標準寒天培地 (Oxoid)、VRBL 寒天培地 (Oxoid) および TBX 寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ、スパイラルプレーター (Interscience) を用いて塗布し、一般細菌数、大腸菌群数、 $\beta$ -グルクロニダーゼ産生大腸菌の定量を製造メーカーの指示書に従って行った。

### 3. 各種病原細菌の検出

上述の緩衝ペプトン水懸濁液を 37°C で 20 時間培養した後、①腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検出にあたっては、同培養液より全 DNA を抽出し、stx 遺伝子をターゲットとした PCR 反応によるスクリーニングを行った。同反応で陽性が見られた場合には、免疫磁気ビーズを用いた分離培養を行うよう準備を行った。②サルモネラ属菌およびリステリア・モノサイトゲネスの検出については、ISO 法に準拠して実施した。

### 4. メタゲノム解析

上記 2. において調整した緩衝ペプトン水懸濁液 10ml より、PowerFood DNA Extraction kit (MO Bio) を用いて、全 DNA を抽出した。これを鋳型として、16S rRNA 792-1152 領域を PCR 増幅した。増幅産物を定量した後、Ion OneTouch Duo システムを用いてエマルジョン PCR 及び精製をおこなった。その後、サンプルを 318 v2. Chip 上へマニュアルロードし、Ion Torrent PGM 装置 (ライフテクノロジー・ジャパン) で配列解読を行った。

### 5. シーケンスデータ解析

得られたシーケンスデータは、Ion Torrent サーバー上で、シーケンスタグ別に識別した後、fastaq フォーマットで出力した。配列ファイル

は CLC Genomic Workbench v. 6.5 上にインポートし、QC に基づくトリミング処理を行った。In-house 16S rRNA blast 検索を行った後、MetagenomeKIN ソフトウェアを用いて、クラスター解析、主成分分析等を実施した。

#### 6. 白菜浅漬けの実験的製造とこれに伴う 0157 添加回収試験、指標菌・構成細菌叢変動解析

市販白菜より 25g を採材し、約 3 x 3 cm に細分したものを滅菌ストマッカー袋中に入れ、食塩（最終濃度 2%）あるいは市販浅漬けの素（指示書に従って調整）を加えて、4℃にて保存した。保存開始と共に、腸管出血性大腸菌 0157 EDL933-KM 株を  $1.4 \times 10^2$  CFU/g となるよう、同検体に接種または非接種し、0、3、6、12 日間の保存期間を経て、各検体（N=3）に 225ml の緩衝ペプトン水を加え、ストマッカー処理を行った後、以下の試験に供した。

①指標菌としては、一般細菌数および大腸菌群数を項目 2. に準じて求めた。

②0157 の挙動測定には、カナマイシン（30 $\mu$ g/ml）を含むソルビットマッコンキー寒天培地（栄研化学）を用い、発育集落数から食品中の生存菌数を求めた。

③構成細菌叢の変動解析には、項目 4-5. に記載された方法を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. 国内浅漬け製品における主要病原細菌の汚染実態と衛生指標菌の定量検出結果

平成 25 年 6 月～同年 10 月の間に、東京都および神奈川県内で市販されていた野菜浅漬け製品（白菜・茄子・きゅうり・大根・野沢菜）計 66 製品について、主要病原細菌（EHEC、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス）の検出を行ったが、いずれも陰性であった。衛生指標菌の定量結果としては、一般細菌数が平均値として、 $2.27E+06 \pm 5.67E+06$  CFU/g、大腸菌群数の平均値が  $6.32E+04 \pm 2.89E+05$  CFU/

g であり、 $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性大腸菌については何れも陰性であった（表 1）。これらの成績を原材料別に観察したところ、白菜浅漬けでは、同時期に試験に供したその他の原材料浅漬け製品に比べて、有意に高い菌数を認めた（図 1）。

また、白菜検体の一部には、異なる時期の同一製品が含まれており、これらの衛生指標菌数の季節性挙動について検討することとした。結果として、6 月購入検体の一般細菌数・大腸菌群数が  $1.1E+04$ CFU/g および  $9.5E+03$ CFU/g であったのに比べ、8 月購入検体では、 $3.5E+06$ CFU/g および  $5.3E+05$ CFU/g と上昇傾向を示した（図 2）。10 月購入検体では、これに比べて減少傾向を示した（ $7.4E+05$ CFU/g および  $1.1E+04$ CFU/g）（図 2）。

以上より、本研究における供試浅漬け検体では、主要病原細菌は検出されなかったが、指標菌の分布には原材料あるいは季節により差異を示すことが明らかとなった。

#### 2. メタゲノム解析による構成細菌叢解析

上記の調査結果を受けて、①原材料別、あるいは②季節別の指標菌の検出数値変動と、構成細菌叢変動の関連性について検証するため、メタゲノム解析を実施することとした。

##### ①原材料別の構成細菌叢変動

計 66 検体の構成細菌叢ならびに検体間の系統学的関連性について検討するため、メタゲノム解析を実施した。なお、本検討にあたっては、各検体より約 80,000- 100,000 リードを解析に供した。Phylum 階層での系統樹を作成したところ、3つのクラスター（A, B, C）に大別された（図 3）。原材料等の検体情報を加味したところ、野沢菜および白菜（10 月）検体はクラスター A に、茄子、きゅうり、大根検体はクラスター B に、白菜（6 月、8 月）および野沢菜検体はクラスター C に分類されることが明らかとなった。種階層での主成分分析によっても、これら供試

検体は、3 クラスターに大別化される傾向が認められた (図 4)。

以上より、本研究で用いた浅漬け製品は、原材料別に構成細菌叢の共通性を示すことが明らかとなった。

## ②季節別の構成細菌叢変動

異なる時期に購入した白菜の浅漬け製品を対象として、構成細菌叢の比較を行った。月別にそれぞれ 2 検体を無作為に抽出、比較した棒グラフを図 5 に示す。当該製品では気温上昇に伴い、*Leuconostoc* 科が優勢となる一方、*Lactobacillus* 科、*Pseudomonas* 科、腸内細菌科菌群の構成比は顕著に低減を認めた。

以上の成績より、比較対象として用いた白菜浅漬け製品では、気温上昇を認める夏季 (8 月) には、*Leuconostoc* 科細菌が優勢となることが示された。

## 3. 白菜浅漬け中における 0157 挙動と構成細菌叢変動

白菜浅漬けを食塩或いは市販浅漬けの素を用いて実験的に製造し、0157 および指標菌の食品内変動を検討した (図 6)。漬け込み液の種別を問わず、0157 は接種 (製造) 後、12 日目においても、接種時の菌数から顕著な低減を示さず、長期的な生残を示すことが明らかとなった (図 7)。また、指標菌については、0157 添加により、一般細菌数が若干の低減を示したが、非添加群では、穏やかな増加傾向を示した (図 7)。非接種群における大腸菌群の挙動については、市販浅漬けの素で製造された検体では保存 6 日目まで検出されなかったが、12 日目で  $10^1$  オーダーが検出された。一方、食塩で製造された検体では、保存 3 日目で  $10^2$  オーダーが検出された。同検体の製造・保存における細菌叢変動をメタゲノム解析により検討したところ、供試白菜原料は約 80% が *Pseudomonas* 属菌により占められていたが、市販浅漬けの素を使用して製造され

た検体では、0157 接種により *Pseudomonas* 属の経時的減少と *Flavobacterium* 属・*Sphingomonas* 属の経時的増加が認められた (図 8-9)。一方、食塩を用いて製造された検体では、0157 接種の有無に関わらず、*Pseudomonas* 属の更なる優勢化が保存を経るにつれて顕著となった (図 10-11)。

以上より、白菜の浅漬け中において 0157 は長期的に生残しうることが明らかになると共に、製造時の漬け込み液の性状や保存時間により、同検体を構成する細菌叢は大きく変動することが明らかとなった。

## D. 考察

食品の分類については、平成 22-24 年度 厚生労働科学研究「冷凍食品の微生物規格基準に関する研究」において、検討してきたところであるが、この中でも、“野菜・果実類”に関する微生物汚染実態については依然として知見に欠ける部分が多い。また、国内では農林水産省・厚生労働省による汚染実態調査も進められてきたが、試験法として定性法が用いられている現状を踏まえ、本研究では、「野菜浅漬け食品」を対象として、衛生指標菌ならびに主要病原細菌の定量検出を試みた。

主要病原細菌として試験対象に選定した、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネスは、何れも野菜・果実類への汚染リスクが相対的に高い病原体として国際的に認識されている。わが国においては、特に平成 24 年 8 月に北海道で発生した、白菜の浅漬けによる腸管出血性大腸菌 0157 集団食中毒事例を契機として、漬物の衛生管理に対する社会的関心が高まりを見せると共に、原材料の受け入れから製品の販売までの各工程における漬物の取り扱い等の指針を示し、漬物に関する衛生の確保及び向上を図ることを目的として、衛生規範の改正が行われたところである (平成 25 年

12月13日付け食安発1213号第2号)。当該規範では、次亜塩素酸での殺菌処理を一例として提唱し、その具体的条件を定めている。本研究に供試した浅漬け食品検体はいずれも主要病原細菌が陰性であった。野菜全般については、大腸菌の定性陽性率が概ね1%未満であることに加え、本試験で用いた検体製品では次亜塩素酸による殺菌工程の導入されていること、あるいは製造事業者の意識向上・教育の充実化が図られた結果によるものかもしれない。

次亜塩素酸については、一方で有機物存在下では急速に殺菌能力を失うという特性が以前より明らかとなっており、塩素臭が残るため、風味の劣化が懸念されること等も生産者・消費者側からの疑問点として挙げられている。浅漬けを含めた、野菜類の殺菌方法については、代替可能な物質の探索・開発が十分に達成されていないが主因と目されるが、近年では、酸性次亜塩素酸 (Sun et al. 2012. *Prev Nutr Food Sci.* 17(3): 210-216.)・ペルオキシ酢酸 (Vandekinderen et al. 2009. *Food Microbiol.* 26(8): 882-888.)・電解水 (Ganesh et al. 2012. *J Food Sci.* 77(7): 391-396.)、マレイン酸 (Ganesh et al. 2010. *J Food Sci.* 75(9): 574-579.)、あるいはそれらの混合手法 (Durak et al. 2012. *J Food Prot.* 75(7): 1198-1206.)等、多様な手法の開発・検証が研究レベルで進められており、今後もこうした開発・検証が進展することが望まれる。しかしながら、次亜塩素酸等の化学物質による殺菌は原材料の表面に付着する病原微生物に対して広域性効果を示す一方、原材料の内部やカット面に侵入した微生物に対する有効性が低いとされている (Nakanishi et al. 2013. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77(6): 1160-1165.)。これに関連して、Houらはエタノール殺菌および次亜塩素酸による殺菌後に、レタス内部組織中には多様な細菌が生残することを報告しており (*Int J Food Microbiol.* 2013. 162: 260-265.)、0157 やサ

ルモネラが内部へ侵入することが細菌学的あるいは分子生物学的に証明されている実情を踏まえると (Liao et al., 2010. *J Food Sci.* 75(6): 377-382.; Berger et al., 2010. *Environ Microbiol.* 12(9): 2385-2397.)、こうした侵入性微生物に対する実態解明と制御対策等についても今後の取り組むべき課題として想定されよう。更に、今回の検討により明らかにされた構成細菌叢の分布・動態と、細菌の局在との関連性についても、今後検討すべき課題と考える。

## E. 結論

本研究では、関東地方に流通する各種野菜浅漬け製品66検体を対象に細菌試験を行い、主要病原微生物が検出されない実態を把握できた。 $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性大腸菌も同様に陰性であったが、一般細菌数や大腸菌群数は一定の汚染を認めた。これら指標菌数は夏季に増加傾向を示したが、メタゲノム解析により、浅漬け製品の構成細菌叢は概して原材料と季節に依存することが明らかとなった。また、製造実験を通じ、保存時間や漬込み液の性状等が構成細菌叢の変動要因となることを明らかにした。以上の成績は、浅漬け食品の望ましい衛生管理手法を検討する上で、重要な基礎知見になると考えられる。

## F. 健康危険情報

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)

なし

2. 学会発表

朝倉宏、五十君静信、山本茂貴、春日文子。  
カイワレ大根の細菌叢解析. 第156回日本獣