

平成 26 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：本研究は、(1) 病原微生物(細菌・寄生虫)の汚染実態に関する研究、(2) 容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策に関する研究、(3) 食中毒や食品汚染実態等に関する情報収集研究、より構成され、非動物性食品における病原微生物の汚染実態を把握すると共に当該食品に対してとるべき対策を議論する上での基礎知見の集積を図ることを目的とする。

微生物汚染実態に関する研究としては、昨年より実施してきた、浅漬の細菌汚染実態に関する検討の中で、同一製品から継続的にリステリア・モノサイトゲネス(以下 LM) 陽性を示す検体が見出されたことを受け、当該検体の製造施設事業者とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者に協力を求め、製造環境調査を行った。平成 26 年 6 月～平成 27 年 1 月に 3 施設について製造環境からの LM 検出を試みた。その結果、3 施設ともに冷蔵庫、包装室の床の溜り水、製品充填機周辺から LM が検出され、汚染箇所が特定された。分離株の遺伝子型別は分離時期に関わらず、施設毎に類似しており、各施設内での持続 LM 汚染が推察された。行政担当者の指導のもとに改善方法が検討され、複数回の調査を行った 2 施設では最終製品から LM が検出されない状況へと改善された。また、昨年度に実施した、衛生的な浅漬製造施設でのパイロットスタディにおいて採取した中間製品を菌叢解析に供し、塩漬と殺菌工程を通じた菌叢の顕著な変動が確認され、同工程の有効性が改めて実証された。更に、衛生規範改正後の浅漬検体における指標菌検出状況を改正前と比較したところ、顕著な生菌数と大腸菌群数の低下が認められ、同規範の有効性が確認された。

寄生虫に関する検討としては、昨年度の回虫症に続いて文献資料の検索に取り組み、最近の鉤虫症と鞭虫症の発生状況の詳細を調べた。その結果、鉤虫症と鞭虫症も少数ながら実際に日本国内で発生している事実が分かった。土壌媒介寄生蠕虫の感染源となる非動物性食品の特定は重要であり、その作業を効率的に実施するため、今年度は超音波を用いた非動物性食品の寄生虫卵検査法を構築して検討し、従来法と同等の虫卵回収率を示しつつ、効率的に検出できることを明らかにした。

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策としては、昨年度の検討で指導内容(pH)を逸脱していることが明らかとなった「たくあん」製品を検体として保存実験を行なった。4 °C および 30 °C での保存試験では、経時的な pH、酸化還元電位値の上昇が見られた。ボツリヌス菌は、保存初期 15 日目で減少したが、その後は維持あるいは微細な上昇傾向も見られ、さらに継続して、長期的な保存試験の必要性があると思われた。また、クロストリジア属菌の発育を許容する酸化還元電位幅は約 -200 ~ +200mV の広範囲に及ぶことが明らかとなり、同値をボツリヌス菌の発育阻止する理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

情報収集に関する項目では、欧州食品安全機関(EFSA)が 2014 年に発表した一連の報告書を中心に文献調査を行い、1) サラダ用葉物野菜の一次生産過程に大腸菌に関する衛生規格基準を設定すべきである、2) カット済み果物・野菜等を対象とした大腸菌に関する工程衛生規格基準は、サラダ用葉物野菜の加工工程における適正農業規範、適正衛生規範、適正製造規範、HACCP 実施の評価の指標となる、3) サラダ用の丸ごとの葉物野菜、ベビーリーフ、マルチリーフ、丸ごとのトマト、丸ごとのメロン・スイカにサルモネラに関する食品安全規格基準を設定することを検討してもよい、等の科学的見解を把握した。

研究代表者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

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

廣井 豊子 帯広畜産大学

協力研究者

天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所

荒川京子 国立感染症研究所

五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

生野 博 (株)ピー・エム・エル細菌検査部

奥村香世 国立大学法人帯広畜産大学

賀川千里 国立感染症研究所

神吉政史 大阪府立公衆衛生研究所

倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学

柴田勝優 国立感染症研究所

高鳥浩介 NPO 法人かび相談センター

橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所

中村寛海 大阪市立環境科学研究所

林 賢一 滋賀県衛生科学センター

堀内朗子 日本食品衛生協会食品衛生研究所

牧野壮一 京都聖母女学院短期大学

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

(敬称略、五十音順)

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いえない。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学性状を調査・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、本研究二年目においては、昨年度の国内流通浅漬け製品に関する細菌汚染実態調査をより発展させるべく、リステリアが継続的に検出された製品の製造施設への立ち入り調査を行い、衛生改善に関する検討を行った。また、菌叢動態の視点から、同食品の製造工程を調査し、改正された衛生規範の微生物制御に対する有効性に関する検討を行った。寄生虫について、本年度は、回虫症の国内発生状況を調査すると共に、超音波を用いた寄生虫卵検査法に関する検討を行った。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、厚生労働省の指導内容にそぐわない製品を対象に長期保存試験を行い、ボツリヌス菌の生存挙動を検討した。更に、欧州連合(EU)における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と今後の動態に関する情報収集を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態と改善措置に関する研究

1) 施設調査

3社(A、B、C社)の製造施設とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者に協力を求め、平成26年6,7,8,11月および平成27年1月に製造環境の検証を行った。

施設のふきとり材料等は、合計102検体を採取しリステリア・モノサイトゲネス(以下、LM)の検出を試みた。LMの検出はISO 11290-1(2004)及びISO 11290-2(2004)に準拠し、定性試験および定量試験を行った。

2) 分離菌株の遺伝子解析

本年度実施した3施設から分離したLM53株および施設A、施設Bの昨年度に市販製品から検出したLM11株の合計64株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による解析を行った。また、リボプリンターシステムによる解析も併せて実施した。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

1) 検体

平成26年2月に神奈川県内の浅漬け製造事業者の協力を得て、同施設内で白菜の浅漬け製造ラインより採材した原材料、中間製品(塩漬け後、殺菌後)および最終製品各2検体を菌叢解析に供した。

2) 菌叢解析

各検体よりDNA抽出後、PCRにより16s rRNA部分領域を増幅した。増幅断片を精製した後、各検体を等量混合してライブラリーを作成した。同ライブラリーはIon PGMシーケンサーを用いて配列を取得した。取得データは、トリミング後、blast検索を通じ、各検体の構成菌叢に関するデータを得た。

3) 食塩漬け込みに伴う指標菌と菌叢変動

都内で市販される生鮮白菜を購入し、十分量の水道水で2回洗浄後、汚染のないように、同野菜を25gづつに裁断した。225mlの食塩水(0,2,10%)に加え、15で3日間漬込みを行った。漬込み後の検体を食塩水より取り出し、225mlの緩衝ペプトン水中にて懸濁させた後、同懸濁液を用いて、指標菌(一般細菌数及び大腸菌群数)の測定および菌叢解析を実施した。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

文献学的な一次資料として、日本臨床寄生虫学会誌(1990年/第1巻~2014年/第25巻の25年間/25巻)を用いた。これを通覧して、鉤虫および鞭虫感染の報告数・症例数をカウントした。また両症例の原因として推定・議論された感染源について、論文

から情報の抽出を試みた。さらに回虫症と同様に、臨床検体の検査会社であるBMLに依頼し、2000年以降に全国の医療機関で診断された鉤虫および鞭虫の症例数について提示を受けた。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法・ストマッカー法による成績との比較

昨年度に引き続き、日本食品衛生協会食品衛生研究所に委託して本検討を実施した(試験検査成績書は本報告書の末尾に添付したので参照されたい)。被検物質には、屠畜場から入手した自然感染ブタ由来の豚回虫を選んだ。豚回虫卵を接種する野菜には白菜を用い、雌成虫に由来するタンパク膜が完成した虫卵から虫卵液を調製し、模擬検体(虫卵接種検体)の調製を行った。また予備試験を繰り返して、超音波処理の最適時間および洗浄容器のリンス回数を設定し、寄生虫卵の検出方法としての超音波法を構築した。その上で本試験を実施し、従来法及びストマッカー法で得た成績と相互に比較した。なお超音波法では、従来法と同様、1回の検体処理量に100g以上の試料を用いることが可能であるが、ストマッカー法との比較にあたり、白菜重量は50g、洗浄液量は250mlとして本試験を実施し、沈殿法により回収虫卵数を求めた。また接種する回虫卵は1,000個および200個の2条件を選択し、各々5回の実験を繰り返して回収虫卵数を求めた。得られた値はF検定で分散を見極め、t検定で有意差を調べた。

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

1) 検体

昨年度調査で厚生労働省の指導内容(平成20年6月17日付食安基発第0617003号および食安監発第0617003号)にある理化学基準(pH<4.6)を逸脱していた「たくあん」製品を保存試験用検体とした。

2) 供試菌株

ボツリヌスA型菌として、62A, 33A, 36A, CB21, Renkon1の5菌種を、ボツリヌスB型菌としてOkra, NH-2, 67B, 326-5, 407-1の5菌種を用いた。

3) 保存試験

ボツリヌス菌芽胞液(A型菌5種混合あるいはB型菌5種混合)を、80°C20分間の加熱処理後、検体1gあたり 10^3 cfu前後となるように検体に接種し、0日~360日保存した。保存温度は、4、25、30とした(N=4)。但し、陰性対照(芽胞未接種検体)の保存温度は4と30とした。

4) 理化学性状の測定

芽胞液未接種の検体を用い、経時的に食品内理化学性状としてpH及び酸化還元電位を測定した。

5) 一般細菌数及びクロストリジウム属菌数の測定

検体100gを無菌的に取り、ペプトン加生理食塩

水 100 mL を加え、ストマッカーにて十分混和させ試料原液とした。10 倍段階希釈列を作成後、懸濁希釈液 1 mL を、標準寒天培地あるいはクロストリジア寒天培地を用いて混釈培養を行い、一般細菌数およびクロストリジア菌数を求めた。

II. 酸化還元電位幅に関する検討

1) 菌株および培地

Clostridium butylicum 2 株 (No.15, 8501) を発育試験に供した。いずれも、チオグリコール酸培地中で嫌気下で培養した。

2) 電気培養装置を用いた発育試験

電気培養装置を用いた上述菌株の発育試験を行なうため、作用極槽に 2mM メチルピオロゲン (MV) を添加チオグリコール酸培地 250ml を加え、対極槽には MV を含まない同培地を加えた。窒素通気後、定電位電解を行い、設定電位で安定後、定常期の *C. butylicum* (上述) 約 5×10^6 cfu を接種し、一定時間ごとに濁度を測定した。なお、上記培養は、 $-0.6V \sim +0.6V$ の電位設定で通電を行い、上記細菌により還元された MV を電氣的に酸化しながら培養を行なった。

4. 欧州連合 (EU) における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

EFSA はパート 1 報告書において、食品と病原体との間の関連の強さ、患者発生数、疾患実被害、食品の消費量、汚染率などの 7 項目からなる基準に従って、EU における非動物性食品と病原体の組み合わせをランク付けしている。パート 2 報告書が対象とした果物・野菜と病原体の組み合わせ (「サラダ用葉物野菜におけるサルモネラおよびノロウイルス」、「ベリー類におけるサルモネラおよびノロウイルス」、「トマトにおけるサルモネラおよびノロウイルス」、「メロン・スイカにおけるサルモネラ」、「鱗茎野菜・ニンジンにおけるサルモネラ、エルシニア、赤痢菌、およびノロウイルス」) は、このパート 1 報告書のランキング結果にほぼ沿って選出されている。なお、パート 2 報告書において、「ベリー類」はイチゴ、ラズベリー、ブラックベリー、ブルーベリーなど、「鱗茎野菜」はタマネギ、ニンニクなどを主に指している。これらのパート 2 報告書を精査し、微生物規格基準に関する見解を取りまとめた。

なおパート 2 報告書 5 報のうち「サラダ用葉物野菜におけるサルモネラおよびノロウイルス」に関する報告書 (文献 2) について、全体の構成を示すため、「目次」の部分の仮訳を資料として添付した。他のパート 2 報告書も同様の構成となっている。

C. 研究成果

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態と改善措置に関する研究

1) 施設 A の調査成績

1 回目の調査では、冷蔵庫床のたまり水、製品充填機や作業台のふき取り、さらに最終製品であるみぶなの漬物からも LM が検出された。

2 回目の調査では、主に 1 回目の検出箇所から検体を採取し、10 検体中 3 検体から LM を検出したが、前回と同じ場所の検体 No.1 と 8 の定量試験での菌数は減少しており、製品から LM は検出されなかった。検体 No.8、9 では血清型 3b が検出されたが、この血清型は 1 回目のいずれの検体からも検出されていなかった。

本施設では、1 回目の調査の後、汚染箇所に熱湯をかける、スチームクリーナーで蒸気をあてるなどの対策を実施しており、熱を加える事で菌数を減少させることができた。

2) 施設 B の調査成績

1 回目の調査では、冷蔵庫床のふき取りや製品充填機のふき取り、さらに中間製品や最終製品である茄子の漬物からも LM が検出された。

2 回目の調査では、15 検体中 4 検体から LM を検出したが、前回と同じ場所の検体の定量試験での菌数は減少しており、製品から LM は検出されなかった。そして 3 回目の調査では、13 検体とも陰性であった。本施設では、作業終了時のブラシによるこすり洗いを徹底する、冷蔵庫の床を週に一度清掃する等の対策で、LM 陰性化に成功した。

3) 施設 C の調査成績

平成 26 年 7 月に調査を行った。他の 2 施設と異なり下処理室での LM 検出が認められた。その他は床たまり水や製品充填機のふき取り、そして最終製品の白菜の漬物から LM が検出された。本施設の 2 回目の調査はまだ行っていない。

4) PFGE 法による解析

制限酵素 *AscI* では A、B グループ (B, B1, B2) C の 3 つに型別された。制限酵素 *ApaI* では a グループ (a, a1) b、c の 3 つに型別された。施設 A では平成 25 年度分離株 8 株と平成 26 年度 6 月の分離株 26 株の合計 34 株を型別し、Aa (*AscI* : A、*ApaI* : a グループ) と Bb (*AscI* : B グループ、*ApaI* : b) の 2 つに分かれた。施設 B では平成 25 年度分離株 3 株と平成 26 年度分離株 21 株の合計 24 株を型別し、全て Cc (*AscI* : C、*ApaI* : c) であった。施設 C では 26 株を型別し、Aa (*AscI* : A、*ApaI* : a グループ) と Cc の 2 つに分かれた。

5) リボプリンターシステムによる解析

施設 A では、Ribogroup が A,B,C,D,E に型別され、多様な型が存在していた。そのうち、Ribogroup A と B が施設を持続汚染していると考えられた。施設 B では、検体採取時期が異なっても同じ Ribogroup が検出されており、同一のグループが持続して施設を汚染していたと考えられた。施設 C では、2つのグループが施設を広く汚染していると考えられた。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

1) 白菜浅漬けの製造工程中の菌叢変動

昨年度、採材した白菜浅漬け製造ラインでの原材料、中間製品（10%食塩水での塩漬け後、殺菌後）および最終製品検体より、各 2 検体を無作為に抽出し、菌叢解析に供した。最終的に、18361-104969 リードが得られ、77 科 194 属が検出された。以下に代表的な菌属に関する工程中の動態を記述する。

(1) *Pseudomonas* 属

Pseudomonas 属は全検体中の 28.2%と最も高い占有率を占めた（図 1）。本属の構成比率は、塩漬け工程で著しく減少したものの、殺菌後は再び上昇傾向を認め（11%）、最終製品での構成比率は焼く 5.7%であった（図 1）。

(2) *Leuconostoc* 及び *Rhizobium* 属

当該菌属は、塩漬け後、それぞれ 33.5%及び 26.2%の構成比率を示した一方で、その他の工程ではいずれも 5%以下であった（図 1）。これらの菌属は、葉物野菜から高頻度に検出されることが知られている他、10%以上の食塩を含む、キムチ等の発酵食品からも検出されることが知られている。

(3) *Pedobacter* 属

殺菌工程後の検体からは、*Pedobacter* 属が高頻度（43.9%）に検出された（図 1）。本属は、主に植物の根部に棲息することが知られているが、ある学術報告では殺菌後のレタス表面から検出されている。本研究における成績は、殺菌工程が野菜表面に付随する細菌の多くを制御することで、白菜内部に侵入・生息していた本属菌の競合的増殖を助長したものと推測される。

(4) *Microcystis* 属

Microcystis 属は、最終製品より最も高頻度（39.8%）に検出された（図 1）。本属菌は、低温抵抗性を示すことが知られているため、包装後、低温下に保存される最終製品中でも一定数が保持されていると考えられる。

(5) *Escherichia* 及び *Enterobacter* 属

当該菌属の構成比率は、最終製品中でそれぞれ 0.04%および 0.02%であった（図 1）。こうした構成比率は、当該細菌の生存を直接的に示すものではなく、死菌からの影響も受ける。実際に、昨年度の成績として、大腸菌群が最終製品から分離培養され

なかった結果から、これらは既に死滅しており、死菌由来核酸のわずかな混入がこうした成績へとつながったと目される。

2) 白菜由来菌叢は漬け込み過程での食塩濃度により影響を受ける

Pseudomonas 属菌の構成比率変動と塩漬け込みとの関連性が示唆されたことを受けて、生鮮白菜を原材料として 0、2、10%食塩水中で 3 日間の漬け込み工程を再現し、同工程前後での菌叢および指標菌数に係る動態を比較することとした。

一般細菌数は食塩濃度に関わりなく、漬け込み前後で顕著な差異を示さなかったが、大腸菌数については、10%食塩水漬け込み群においてのみ、漬け込み前検体に比べ、有意な菌数低減を認めた（図 2）。菌叢解析を通じて、10%食塩漬け込み群では、*Pantoea* 属構成比率が顕著に減少することが認められ（図 3）、大腸菌群数変動との関連性が示唆された。パイロットスタディにおいて最も優勢な構成比率を示した *Pseudomonas* 属については、食塩濃度が高くなるにつれて、その構成比率が高まる傾向であることが明らかとなった（図 3）。

以上の成績より、食塩濃度は漬け込み工程における原材料由来の菌叢を左右する重要な決定因子であると共に、同工程は殺菌工程とあわせて、浅漬け製造における病原微生物制御に寄与する工程であることが改めて明らかとなった。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

日本臨床寄生虫学会誌計 25 巻に掲載された論文は 950 編で、このうち日本で感染した鉤虫症および鞭虫症の論文数（および症例数）は、それぞれ 2 編（2 例）および 1 編（1 例）であった。

BML の資料では、鉤虫症例はその数が 2002 年までは二桁であったが、2003 年以降は一桁となり、2013 年および 2014 年は症例がゼロとなった。鞭虫症例は鉤虫症例と比較してやや多いが、2005 年以降はおおむね一桁でその数が推移した。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法、ストマッカー法による成績との比較

予備試験の結果から、超音波処理時間は 5 分、洗浄容器のリンス回数は 2 回とした。また回収虫卵数に関しては、以下の結果を得た。

(1) 接種回虫卵数を 1,000 個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では 1129.6 ± 104.7 (平均 \pm 標準偏差)、従来法では 861.2 ± 264.4 、ストマッカー法では 1485.6 ± 398.6 であった。ストマッカー法による回収虫卵数の平均値が、従来法のそれより有意に高い（有意水準 5%）との結果を得た。その他のデータ間には有意差を認めなかった。

(2) 接種回虫卵数を 200 個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では 133.0 ± 19.4 、従来法では 133.4 ± 34.6 、ストマッカー法では 154.6 ± 48.2 であった。各データ間には有意差を認めなかった。

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

1. 保存試験（ボツリヌス菌添加回収試験）

1) 芽胞液未接種群での理化学性状の経時的变化

供試検体の pH 値は保存試験開始時で 5.15 ± 0.11 、15 日目では 5.5 前後に上昇し、30 日目まで維持された。酸化還元電位については、試験開始時には 32.02 ± 3.56 mV であり、その後上昇傾向にあった。保存温度による当該値の差異は認められなかった。

2) 芽胞液未接種群での一般細菌及びクロストリジア属菌の検出状況

芽胞液未接種群における保存試験開始時の一般細菌数は 246 ± 136 cfu/g で、クロストリジア属菌は検出限界以下であった。保存期間が長くなるにつれて、一般細菌数は増加傾向にあった。一般細菌数が大きく増加した検体においても、検体の容器包装の密閉状態は保たれており、ガス産生等外見上の大きな変化はみられなかった。

3) 芽胞液接種群での一般細菌およびクロストリジア属菌の検出状況

A・B 型菌芽胞接種群の食品内動態については、4 では保存期間の長期化に伴い減少傾向を認めしたが、25 下で 30 日間保存した検体では、A 型菌芽胞接種群で 15 日目と同等に維持或は微増を示した。30 °C 下では B 型菌芽胞接種群が 30 日目に同等レベルに維持或は微増した。保存温度により差異はあるものの、芽胞接種群では保存期間が長くなるにつれて一般細菌数は上昇傾向にあった。

II. 酸化還元電位の検討

電気培養装置を用いて、嫌気下で酸化還元電位の安定化をはかった上で、*C. butylicum* の発育試験を行なった。結果として、供試菌株は、 -200 mV ~ $+200$ mV の範囲において良好な発育を認めた。

4. 欧州連合 (EU) における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

1) 「サルモネラ対策」としての微生物規格基準

1-1. 公衆衛生リスク (EU 加盟国及びノルウェー、スイスでの非動物性食品による最近のサルモネラアウトブレイク発生の状況)

パート 1 報告書の Table 26 に示されたデータを以下に記載する。

「サラダ用葉物野菜」: 2007~2011 年にサラダ用葉物野菜を原因とするサルモネラアウトブレイクが 7 件発生している。

「ベリー類」: 2007~2011 年にラズベリージュ

スを原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

「トマト」: 2007~2011 年にトマトを原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

「メロン・スイカ」: 2007~2011 年にスイカを原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

「鱗茎野菜・ニンジン」: 2007~2011 年に鱗茎野菜 (タマネギ) を原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

1-2. 一次生産への大腸菌衛生規格基準 (Hygiene Criteria) 設定の提案

以下は、パート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネル (生物学的ハザードに関する科学パネル) の見解である。

「サラダ用葉物野菜」: サラダ用葉物野菜の一次生産過程に大腸菌に関する衛生規格基準を EU レベルで設定すべきである。

「ベリー類」, 「トマト」, 「メロン・スイカ」, 「鱗茎野菜・ニンジン」: 当該果物・野菜の一次生産過程に大腸菌に関する衛生規格基準を EU レベルで設定する妥当性は評価不能である (当該果物・野菜の大腸菌汚染に関するデータの不足のため)。

1-3. 工程衛生規格基準

1-3-1. EU の現行の工程衛生規格基準

カット済みの RTE (ready-to-eat: そのまま喫食可能) 果物・野菜、および未殺菌の果物・野菜ジュースに、大腸菌に関する工程衛生規格基準 ($n=5$, $c=2$, $m=100$ cfu/g, $M=1,000$ cfu/g) が設定されている (EC 規則 No 2073 / 2005)。

パート 2 報告書が対象とする果物・野菜類のすべてにこの基準が適用されると考えられる。

1-3-2. EFSA による評価と提案

以下は、パート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルによる評価と提案である。

「サラダ用葉物野菜」: 大腸菌に関する現行の工程衛生規格基準は、適正農業規範 (GAP)、適正衛生規範 (GHP)、適正製造規範 (GMP)、危害分析重要管理点方式 (HACCP) の実施の評価指標となる。

「ベリー類」, 「トマト」, 「メロン・スイカ」, 「鱗茎野菜・ニンジン」: 当該果物・野菜類のカット済み製品および未殺菌ジュースの大腸菌汚染についてデータが不足または欠損しているため、現行の工程衛生規格基準の妥当性は評価不能である。

「ベリー類」: 冷凍の丸ごとのベリー類に大腸菌に関する工程衛生規格基準を EU レベルで設定する妥当性は評価不能である (冷凍の丸ごとのベリー類での大腸菌汚染データが欠損しているため)。

1-4. 食品安全規格基準 (Food Safety Criteria)

1-4-1. EU の現行の食品安全規格基準

カット済みの RTE 果物・野菜および未殺菌の果物・野菜ジュースに、サルモネラに関する食品安全

規格基準 (n = 5, c = 0, 25 g 中にサルモネラ不在) が設定されている (EC 規則 No 2073 / 2005)。

パート 2 報告書が対象とする果物・野菜類のすべてにこの基準が適用されると考えられる。

1-4-2. EFSA による評価と提案

以下はパート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルによる評価と提案である。

「サラダ用葉物野菜」: サラダ用の丸ごとの葉物野菜、ベビーリーフ、マルチリーフにサルモネラに関する食品安全規格基準を設定することを検討してもよい。

「ベリー類」: 生鮮および最低限の加工をしたベリー類 (冷凍を含む) にサルモネラに関する食品安全規格基準を設定することについては、その妥当性のエビデンスが不足している。

「トマト」, 「メロン・スイカ」: 丸ごとのトマト、丸ごとのメロン・スイカにサルモネラに関する食品安全規格基準を設定することを検討してもよい。

「鱗茎野菜・ニンジン」: データ不足のため、鱗茎野菜・ニンジンにサルモネラに係る食品安全規格基準を設定する公衆衛生上の効果は評価不能である。

2) 「ノロウイルス対策」としての微生物規格基準

サルモネラ対策としての大腸菌衛生規格基準、大腸菌工程衛生規格基準は、大腸菌が糞便汚染指標となることから、同時にノロウイルス対策としての側面もある。以下ではノロウイルスに特化した対策について触れる。なお、メロン・スイカとノロウイルスの組み合わせはパート 2 報告書の対象ではない。

2-1. 公衆衛生リスク (EU 加盟国およびノルウェー、スイスでの非動物性食品による最近のノロウイルスアウトブレイク発生の状況)

パート 1 報告書の Table 26 に示されたデータを以下に記載する。

「サラダ用葉物野菜」: 2007~2011 年にサラダ用葉物野菜を原因とするノロウイルスアウトブレイクが 24 件発生している。

「ベリー類」: 2007~2011 年に、イチゴ、ラズベリー、その他のベリー類を原因とするノロウイルスアウトブレイクが、それぞれ 1 件、27 件、1 件発生している。

「トマト」: 2007~2011 年にトマトを原因とするノロウイルスアウトブレイクが 1 件発生している。

「メロン・スイカ」: 2007~2011 年にメロン・スイカを原因とするノロウイルスアウトブレイクは発生していない。

「鱗茎野菜・ニンジン」: 2007~2011 年に鱗茎野菜、ニンジン を原因とするノロウイルスアウトブレイクが、それぞれ 2 件、1 件発生している。

2-2. 一次生産へのノロウイルス衛生規格基準の設定

以下はパート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルの見解である。

「ベリー類」: ラズベリーおよびイチゴの一次生産にノロウイルス衛生規格基準を EU 全域で設定する妥当性は、現時点では評価不能である。

2-3. ノロウイルス工程衛生規格基準の設定

以下はパート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルの見解である。

「ベリー類」: 冷凍ラズベリー、冷凍イチゴへのノロウイルス工程衛生規格基準の設定に向けて必要な各種データを収集することは、公衆衛生上の重要性に鑑み、最優先の課題である。

2-4. ノロウイルス食品安全規格基準の設定

以下はパート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルの見解である。

「サラダ用葉物野菜」, 「トマト」, 「鱗茎野菜・ニンジン」: 汚染データの不足、検出方法上の問題等により、当該果物・野菜類にノロウイルス食品安全規格基準を設定することは困難である。

「ベリー類」: 公衆衛生上の重要性に鑑み、冷凍ラズベリー、冷凍イチゴのノロウイルス汚染についてリスク評価のためのデータを収集し、これらの食品にノロウイルス食品安全規格基準を設定することは優先度が高い。ラズベリー、イチゴ以外の生鮮、冷凍ベリー類については、ノロウイルス食品安全規格基準の設定を支持する疫学的、微生物学的データが欠損している。

D. 考察

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態と改善措置に関する研究

3つの製造施設を調査した結果、施設 A では多様な型の LM が検出されたが、施設 B では同一の型が持続して検出され、そして施設 C では 2 種類の型が検出されるというように、施設ごとに特徴が認められた。

施設 A と施設 B の 2 施設では、昨年度の市販製品調査からも複数回 LM を検出しており、持続的な LM 汚染が認められていた。両施設ともに 1 回目の施設調査において、冷蔵庫や包装室の床のたまり水、そして製品充填機の拭き取り検体から LM が検出された。LM 汚染の箇所が明らかになったことから、当該施設を管轄する行政の食品衛生担当者 と施設側とが具体的に改善案を検討することが可能になり、改善に向けての作業が行われた。

その結果、2 度目の調査時には製品からの検出は認められず、他のふき取り箇所も大幅な菌数減少が認められた。本研究班の調査をきっかけとして、施設の衛生対策の改善が計られ、その成果が現れたものと考えられた。

施設のふき取り調査の回数以上に、行政の担当

者が施設と連絡を取り合っていたことで、施設側の LM 対策についての理解が深まり、LM の陰性化が実現したと考えられる。来年度はこれらの施設で実施された洗浄方法を参考として、関連製造施設における望ましい洗浄のあり方に関する知見を集積し、衛生管理に資するマニュアル作成の一助となりうる根拠の創出を図りたい。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究
葉物野菜は、その代謝・生理機構の多様性から、広範にわたる病原細菌の汚染が懸念されている。その中において、白菜は特に外表面のみならず、内部へも汚染が懸念されるため、原材料からの病原細菌をどのように抑えるかが衛生管理上での重要な課題といえる。

本研究では、昨年度の研究において実施した白菜浅漬け製造ラインでの指標菌数動態成績として、塩漬け及び殺菌工程を通じた指標菌数の著減の原因を探るべく、菌叢解析を実施し、その中で特に白菜由来の細菌の制御に資する、漬け込み工程での食塩濃度に関する知見を得ることとした。

本研究において検討した浅漬け製造ラインでの菌叢動態に係る成績は、改正された衛生規範中に盛り込まれている、殺菌工程の有効性と必然性を改めて指示する結果となった。また、塩漬け工程中で用いる食塩濃度に関する知見は、その後の水洗浄工程を経て、最終食塩濃度が約 2%前後に調節できることを考えると、衛生管理上での実効性を伴う応用制御手法と考えられ、昨今の減塩嗜好にも対応できるものと思われる。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

日本臨床寄生虫学会誌に報告された症例および BML が診断した症例から、回虫と同様に鉤虫および鞭虫の感染も、少数ではあるが最近でも継続して我が国で発生していることが確認された。なお、2014 年に日本臨床寄生虫学会誌に報告された鉤虫症例は、鞭虫および回虫にも同時に感染していた(3 種類の土壌媒介寄生蠕虫に重複して感染)。患者は 84 歳の女性で、無農薬野菜の栽培に従事していることが論文に記されており、自身が栽培した野菜に付着する虫卵を経口的に摂取して、継続的に感染していた可能性が示唆された。なお土壌媒介寄生蠕虫の症例数の経年推移は、BML の資料を見る限り、虫種を問わずに相互に類似していた。従って自家菜園の下肥利用を背景とするなど、3 種類の土壌媒介寄生蠕虫の感染経路や原因食品は、基本的には同様でないかと判断された。この点については今後のさらなる検証が必要と考えている。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法、ストマッカー法による成績との比較

検体からの寄生虫卵検出については、野菜表面をブラシでこする従来法が定着している。しかし多量の検体を効率的に処理する方法の開発が必要となり、昨年度はストマッカー使用の是非を検討した。その結果、ストマッカーの使用により、検体からの虫卵分離に要する時間が短縮され、また回収虫卵数は従来法よりも有意に多くなることが明らかとなった。しかしストマッカー処理の過程で、検体である野菜由来の微細な破片が多数発生し、これが虫卵計数用の試料に混入して、顕微鏡下の虫卵計数作業に障害を与え、顕微鏡観察に予想外の長時間が必要となることが判明した。そこで微細な破片を発生させない効率的な虫卵回収の方法として、新たに超音波法を検討することになった。

超音波法に関する予備試験の結果、5 分間の超音波処理で虫卵回収数は最大となることが分かった。また洗浄容器のリンスは 2 回とした。この条件で本試験を実施し、超音波法、従来法およびストマッカー法による試験結果を相互に比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意な差を認めなかった。

虫卵回収数に有意な差がない場合、検査の過程における作業をいくつか選び、その優劣に応じてスコアを与え、スコア合計に基づいて各試験法の優劣を総合的に判断する手法が採用される。このような定量分析の手法を、本検討にも適用した。すなわち、回収虫卵数のほか、1 回の検査に使用可能な検体重量(検体重量)、各試験法に必要な処理時間(処理時間)、虫卵計数のための顕微鏡観察時間(観察時間)の計 4 項目を選定し、各項目についてスコアを与えて、各試験法のスコア合計を求めた。その結果、スコアの合計は超音波法、ストマッカー法、従来法の順となった。すなわち、超音波法は多数の検体から最も効率的に寄生虫卵を分離できる方法であることが分かった。超音波法は従来法に代替する非動物性食品(野菜)からの寄生虫卵検査法として、推奨されるべき方法と考えられ、今後予定している非動物性食品の寄生虫卵汚染の実態調査では、本法も活用して多数の検体を処理し、我が国で流行が続く土壌媒介寄生蠕虫症の感染源を明らかにしたい。

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

1) 保存試験

平成 25 年度の本分担研究の検討から、常温保存・流通の容器包装詰製品の中に、厚生労働省により当該製品に対して指導通知されている理化学性状(pH < 4.6)を逸脱している製品が含まれていることが明らかになり、同製品を検体として保存試験

を実施することとした。ポツリヌス菌未接種群では、保存期間が長くなるに連れて、pH、酸化還元電位の上昇傾向がみられ、容器包装未開封の製品であっても、その理化学性状が安定でない事が示された。未開封の芽胞未接種群における一般細菌数は、保存期間が長くなるにつれて増加傾向にあり、この一般細菌数増加は理化学性状の変化に関連している可能性が考えられる。また供試検体では、たくあん(大根)と共に、漬込み液も容器包装詰されている。検体の包装後加熱処理の有無は表示されていない。これらが一般細菌数の変動に及ぼす影響も懸念されることから、こうした情報の収集も今後必要な事項と思われる。

ポツリヌス菌は接種後 15 日目には菌数の減少を認めたと、その後は(温度や菌型によって異なるものの) 15 日目時点の菌数を維持或は微増しており、さらに継続した検討が必要と考えられた。また、先にも述べたが、検体の包装後加熱処理の有無は衛生的観点からも重要であるが、さらに、芽胞形成菌にとっては発芽刺激になりうる事から、留意すべき点と考える。本試験では 80 °C 20 分間の加熱処理後の芽胞液を用いて行なっているが、栄養体接種での食品内挙動も今後検討していきたい。

2) 酸化還元電位の検討

本研究では、広い酸化還元電位幅において、クロストリジウム属菌 (*C. butylicum*) の発育を許容するとの知見を得た。この電位幅は、大気中における食品の多くが含まれると想定されることから、食品中におけるポツリヌス菌の増殖を制御するための理化学指標として、酸化還元電位を用いる意義は必ずしも大きいとは言い難いといえよう。現行の指導内容に含まれる理化学性状は、pH と水分活性があるが、容器包装詰低酸性食品においては、酸素濃度あるいは酸価といった理化学性状もポツリヌス菌の発芽・発育に関わる影響因子であることから、次年度に向けた課題として検討を視野に入れていきたい。

食品内での菌増殖に伴い、本菌がヒト健康危害の高いポツリヌス神経毒素を産生する事も懸念される。ポツリヌス毒素の定量試験は未だマウスアッセイにより行なわれているが、近年では、PCR-ELISA、イムノクロマト、FRET 等の手法を用いた検出キットの開発も海外では進められている。来年度にはこうしたアッセイ系に着目し、動物代替手法としての有用性を検討したい。

4. 欧州連合 (EU) における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

パート 1 報告書によると、EU において、2007 ~ 2011 年に原因食品が確認された食品由来疾患アウトブレイクの 10% が非動物性食品を原因とするものであった。しかしながら、欧州においては、2011

年のフェヌグリースプラウトによる腸管出血性大腸菌 O104:H4 アウトブレイク、また 2012 年の輸入冷凍イチゴによるノロウイルスアウトブレイクといった大規模アウトブレイクが相次いで発生している。

EU では、カット済みの RTE 果物・野菜および未殺菌の果物・野菜ジュースを対象に、大腸菌工程衛生規格基準およびサルモネラ食品安全規格基準が設定されている。本研究でとり上げた EFSA のパート 2 報告書では、多くの果物・野菜類について、データ不足からこれらの現行の微生物規格基準の妥当性の判断を控えているが、一方、いくつかの果物・野菜類(「サラダ用葉物野菜」、「特定の冷凍ベリー類」など)については、新たな規格基準の設定に向けた取り組みを提案している。

我が国では果物・野菜に関する食習慣、嗜好性や果物・野菜の生産・加工時の衛生管理状況が欧州とは異なると考えられるので、EFSA による見解が直接参考になるわけではないが、食品の世界的な流通の状況に鑑み、EU をはじめとする国際的な動向を注視して行く必要があると考えられる。

E. 結論

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態とその改善に関する研究

本年度の施設調査において、冷蔵庫や包装室の床のたまり水、そして製品充填機の拭き取り検体から LM が検出され、汚染箇所が明らかになった。本年度の施設調査の結果および成果を元に、汚染除去効果の検証を行い、今後の衛生対策に反映させて行きたい。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

漬物の製造で伝統的に用いられる、塩漬け工程は、原材料における病原細菌の汚染制御に有効に機能することが明らかとなった。また、衛生規範に盛り込まれた次亜塩素酸を用いた殺菌工程は、大腸菌群等の病原細菌の低減に寄与していることが明らかとなり、両工程の併用は、浅漬け製品の微生物危害を予防するための応用的な制御手法と考えられる。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

土壌媒介蠕虫症として鉤虫症および鞭虫症は、少数ながら現在も日本国内で発生しているとの結論を得た。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法、ストマッカー法による成績との比較

超音波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、従来法およびストマッカー法で得

られた結果と比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意差を認めなかった。さらにスコア定量分析を行ったところ、超音波法が最も高いスコアを得たことから、試験法として推奨されるべきものと考えられた。

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

本研究では、厚生労働省による指導内容を逸脱した容器包装詰低酸性食品を用い、ボツリヌス菌添加保存試験を行い、菌量の一部保持されていることが確認され、更に長期の保存試験が必要と考えられた。また、酸化還元電位を容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策の理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

4. 欧州連合(EU)における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

種々の果物・野菜と病原微生物の組み合わせを対象としたEFSA報告書を精査することで、EFSAが特定の組み合わせについて新たな微生物規格基準の設定に向けた取り組みを提案していることを把握できた。食品流通の世界的拡大に鑑み、EUを始めとする国際的な動向を注視していくことの必要性が示唆される。また、我が国においても非動物性食品の汚染実態の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

1) Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S, Asakura H. (2015) Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. J. Food Safety. 印刷中.

2) 杉山 広, 荒川京子, 柴田勝優, 川上 泰, 森嶋康之, 山崎 浩, 荒木 潤, 生野 博, 朝倉 宏. わが国における土壌媒介寄生虫症,特に回虫症の発生とその汚染源の文献的および検査機関データに基づく調査. 食品衛生研究 65(4), 印刷中.

2. 学会発表

- 1) 田口真澄、神吉政史、中村寛海、朝倉 宏：浅漬からの *Listeria monocytogenes* 検出、第108回日本食品衛生学会、2014年12月、金沢
- 2) 中村寛海、田口真澄、井口 純、西川禎一：食品製造施設における自由生活性アメーバおよび *Listeria monocytogenes* の分布、第88回日本細菌学会総会、2015年3月、岐阜
- 3) 高鳥浩介、朝倉宏. 農産物の生食のリスクとその制御. 第41回日本防菌防黴学会年次大会シンポジウム.

H. 知的財産権取得状況

該当なし