

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）

「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

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

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	榊田和彌	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	国立大学法人帯広畜産大学	畜産学部 共同獣医学課程
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

研究要旨：昨年度末に、浅漬け製造施設においてパイロットスタディを実施し、中間製品および施設ふき取り検体などを採取して、製造工程を通じた指標菌の動態に関する知見を得た。本年度は同検体を構成する菌叢を明らかにすることで、個々の工程が顕す病原細菌の制御効果に関する考察を行なうこととした。白菜の浅漬け製造ラインより採取した原材料、中間製品（塩漬け後および殺菌後）、最終製品より各 2 検体を 16s rRNA pyrosequencing 解析に供した。結果として、各検体の構成菌叢は著しい変動を顕し、特に塩漬け工程での腸内細菌科菌群の著減を認めた。その後の殺菌工程後検体では更にその構成比率は低減を示したことから、同 2 工程の導入が、供試製造工程において微生物制御に有効に機能していると考えられた。市販白菜（原材料）を異なる塩濃度で 2 日間漬け込んだところ、10% 食塩を用いた場合に有意な大腸菌群数の低下が認められたが、0.2% 食塩での漬け込みにより同指標菌数は明らかな低下を示さなかった。漬け込み工程における食塩濃度に依存して、*Pseudomonas* 属菌の比率は大きく変動を示した。

A. 研究目的

2012 年 8 月に白菜の浅漬けを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事例では、患者 169 人、死者 8 人を数え、社会的な問題となった他、非動物性食品における微生物危害性が改めて認識されたところである。こうした事態を受けて、厚生労働省では、同年 12 月に漬物の衛生規範を改正し、原材料の次亜塩素酸による殺菌または加熱を盛り込むと共に、製造工程に

係る管理運営基準の策定と運営もしくは HACCP 方式の導入を指導する内容を発行している。衛生規範は周知のとおり、製造事業者の意識・意欲に依存するところがあるが、昨年度実施した浅漬け製造施設でのパイロットスタディにおいて、調査対象施設では同規範が遵守され、塩漬けと殺菌工程を通じた、指標菌の低減を確認したところである。本年度は、その結果が病原細菌の制御に資することを更に裏付ける目的で、白菜の浅漬け製造ラインにおける原材料、

中間製品および最終製品を対象として、構成菌叢を調査したので、報告する。

B. 研究方法

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。E-gel および AMPure XP を用いて、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解析を進め、得られた配列は、CLC Genomic workbench でトリムを行い、Local blast 検索を行うことで、各検体の構成菌叢に関するデータを取得した。

3. 食塩漬け込みに伴う指標菌と菌叢変動
店頭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 日間漬け込みを行った。漬け込み後の検体を、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。

C. 研究結果

1. パイロットスタディにおける白菜浅漬

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。

D. 考察

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。その中であって、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。

E. 結論

漬物製造で用いられる、伝統的な塩漬け工程は、原材料における病原細菌の汚染制御に有効に機能してい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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 学会発表

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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

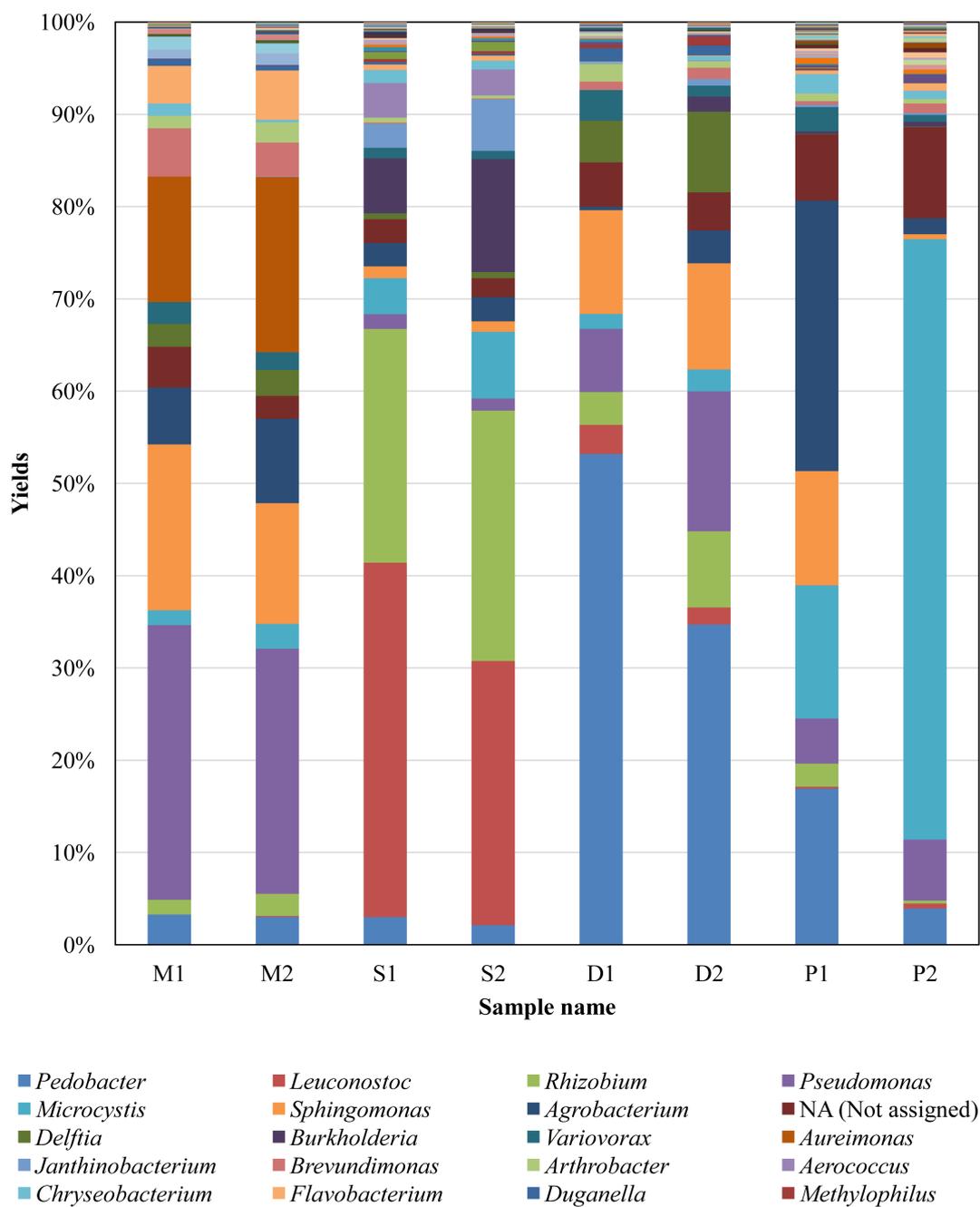


図 1 . 白菜浅漬けの製造工程を通じた菌叢変動

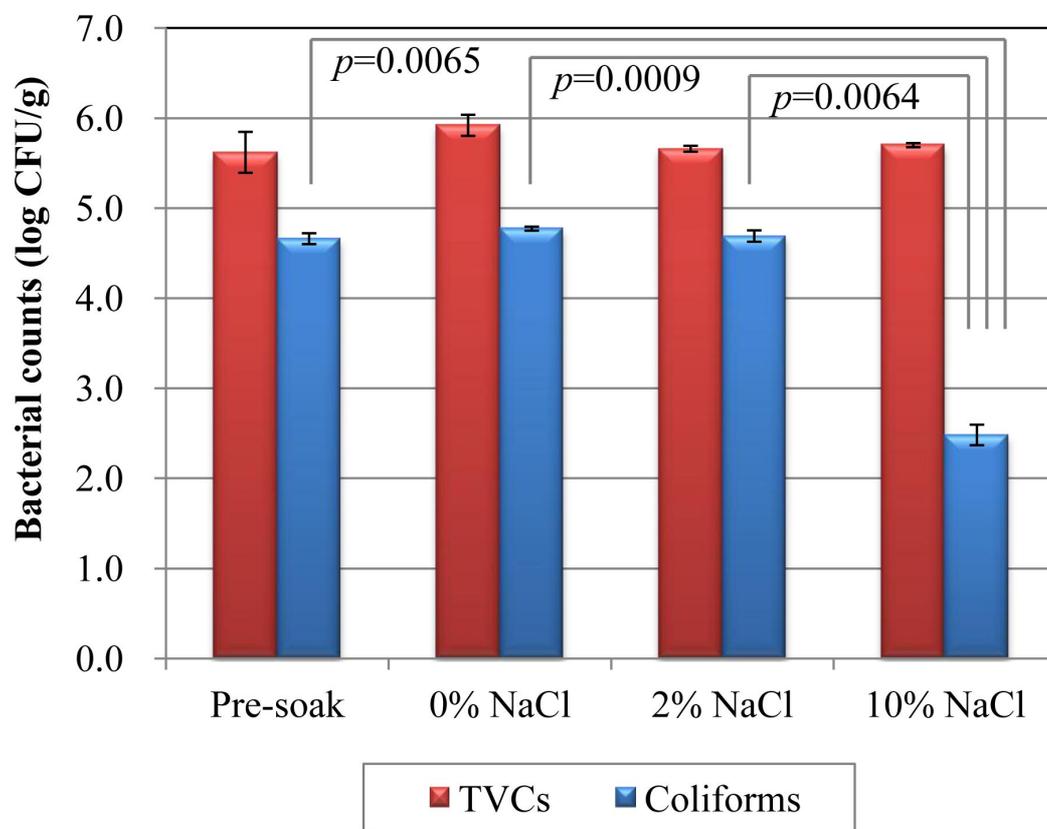


図2. 異なる食塩濃度で漬け込みを行った際の白菜由来指標菌数の変動

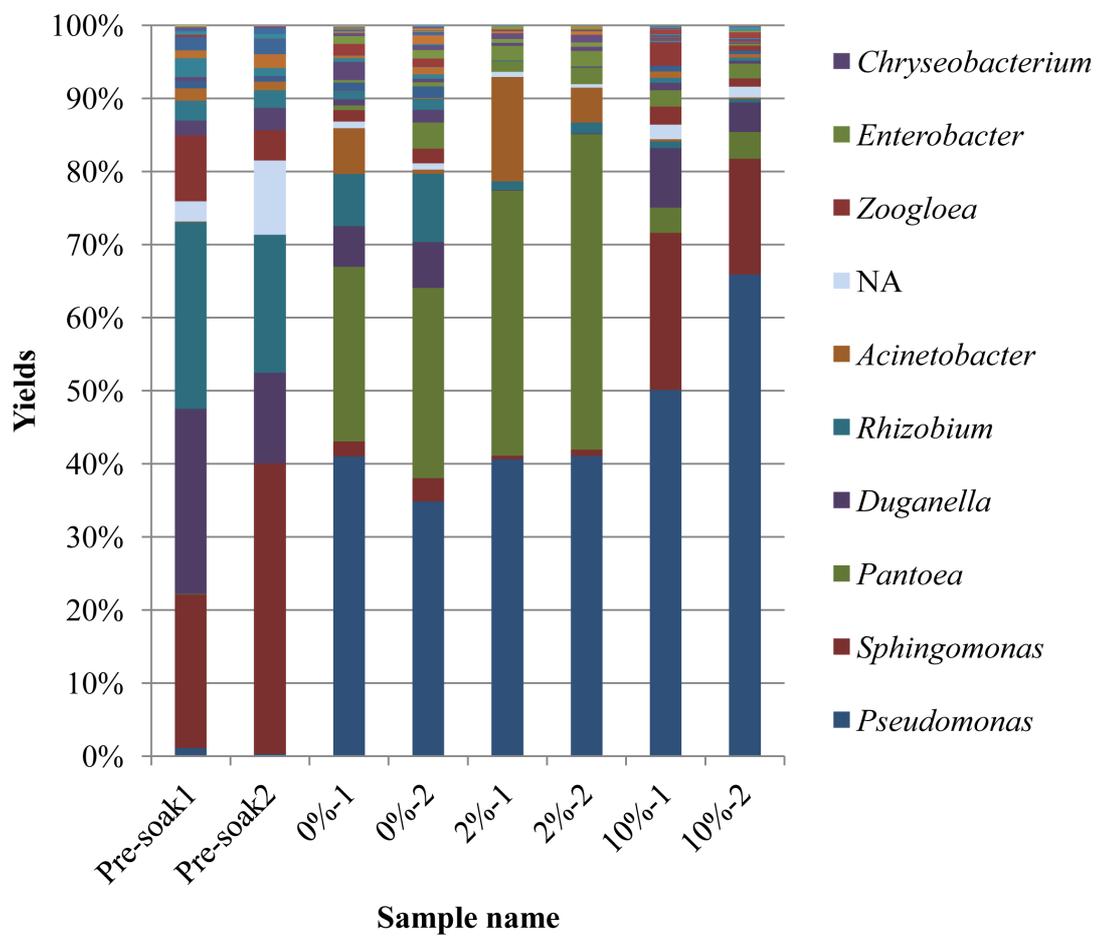


図3. 異なる食塩濃度で漬け込みを行った際の白菜由来菌叢の変動