

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）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング

研究分担者 小西 良子（麻布大学 生命・環境科学部）

研究協力者 石崎 直人（麻布大学 生命・環境科学部）

食品の流通のグローバル化に伴い、食中毒微生物を原因とする健康被害を受ける可能性も高くなってきている。これらの危害物質を取り除くためには適切な衛生管理手法が必要となり、最も検体の採取方法が重要となる。これらサンプリング方法は母集団の汚染を出来るだけ正確に反映するために科学的根拠に基づき確立されなければならない。現在 The International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF) が提唱している二階級法や三階級法を基に、微生物の危害度および食品の取り扱い条件による危害度の両者を考慮した微生物の危害度分類を行い、それに対応したサンプリング法が、コーデックス、EU 諸国や米国において実施されている。

本研究では、国際的なサンプリングプランと比べて、日本でのサンプリングプランの妥当性の有無を検討することを目的とする。前年度は代替病原微生物として蛍光ラテックスビーズ（ $10\mu\text{m}$ ）を用いた実験から、1 バッチ（ 1kg ）から 1 検体 25g を $n=6$ 以上は採取しなければ検出が出来ないことが示され、現在、我が国で行われている $n=1$ のサンプリングプランでは、低濃度汚染の病原微生物の検出は困難であることを示唆した。しかし、サンプリングプランの n 数を多く設定した場合では、多大な時間、費用および労力が課されることになる。そこで我々は Price らが提唱したサンプル・プーリング法（プール法、プレンリッチメント法）を応用し、食中毒菌であるサルモネラを対象として食品から検出することが可能か検討をした。その結果、プール法とプレンリッチメント法、何れのサンプリング法を用いても、調理済食品 (ready-to-eat、RTE) であるネギトロではサルモネラの汚染菌量が 10^1CFU/g 以上であれば検出できることが確認された。

A. 研究目的

世界各国において食に起因する健康被害を減少させるために、日常的に衛生検査が実施されている。食中毒微生物の食品における分布は不均一であるため、科学的根拠に基づく母集団の汚染を正しく反映するサンプリングプランが必要となる。衛生管理における微生物のサンプリングプランでは、The International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF) が提唱した 2 階級法と 3 階級法が一般的に使われている。ICMSF の提案している微生物規格の基本的な特徴は、微生物の危害度および食品の取り扱い条件による危害度の両者を考慮した微生物の危害度分類を行い、それに対応したサンプリング法が設定されていることである¹⁾。

コーデックス規格、EU 諸国におけるサンプリングプランは、原則 ICMSF の考え方を基に作られており、種々の食品又は食中毒起因微生物の違いによって、サンプリングプランが設定されている。

EU におけるサルモネラの規格基準は、乳製品や RTE 食品では $n=5$ であり、免疫力などの弱い乳幼児が食べる調製粉乳やベビーフードでは $n=30$ となっており ISO に試験法が記載されている。リステリア モノサイトゲネス (LM) については乳幼児および特別医療目的の RTE 食品においては $n=10$ が設定されている^{2,3)}。

アメリカの FDA (Food and Drug

Administration) と FSIS (Food Safety and Inspection Service) も EU 同様、摂取する人のリスクと食品の種類によって、カテゴリーを分けている。サルモネラのカテゴリー (サンプリングと消費の間に殺菌工程がなく、乳幼児などリスクが高い対象食品) では $n=60$ 、カテゴリー (サンプリングと消費の間に殺菌工程がない食品) では $n=30$ 、カテゴリー (サンプリングと消費の間に殺菌工程がある食品) では $n=15$ が設定され、試験法は Bacteriological Analytical Manual (BAM) に掲載されている。LM については食品の pH や A_w などの特性や喫食者のリスクによって分類され、 $n=5 \sim 60$ であり、FSIS の Laboratory Guidebook に試験法が掲載されている⁴⁻⁶⁾。

一方、我が国の食品衛生法の成分規格に記載されている食肉製品や液卵などのサルモネラ検査のサンプリング法は 25g の $n=1$ である。生ハムやナチュラルチーズなどの RTE 食品で LM が検出された場合は食品衛生法 6 条違反に該当するが、同様に試料量 25g とし $n=1$ で検査が行われている⁷⁾。しかし、この方法で母集団の汚染が正確に反映できているかについては科学的根拠がない。

国際社会との調和を計るには科学的根拠に基づきサンプリングプランの n 数を設定しなければならない。しかし、 n 数が多い場合には多大な時間、費用および労力が課されることになる。これらの欠点を解消するためのサ

ンプリング法として、サンプル・プーリング法が使われる場合があり、現在、プレエンリッチメント法とプール法という2種類の方法が報告されている。プール法とは、n 数分の検体を1つの容器に集め増菌培養する方法である。プレエンリッチメント法とは、n 数分の検体をそれぞれの容器で増菌培養し、各増菌培養液の一部を採取し、1つの選択液体培地で増菌する検査法である。しかし、対象となる食品により、夾雑菌の菌叢に影響を受ける可能性があるため、妥当性の評価が必要となる。

そこで本研究では、代表的な食中毒菌であるサルモネラを RTE 食品のネギトロに接種し、プレエンリッチメント法とプール法の妥当性の評価を目的とした。

B. 研究方法

1. 供試材料

市販ネギトロ：神奈川県の小売店で H26 年 9 月 9 日～12 月 7 日に韓国、フィジ -、台湾産ネギトロを購入した。何れの消費期限も 2 日間であった。

2. 供試菌株

・食中毒菌

Salmonella Infantis1383-1 (鶏肉由来)

・ネギトロ由来夾雑菌

Escherichia coli

Citrobacter braakii

3. サルモネラおよび夾雑損傷菌の作製方法 (損傷度)

食品中に存在する微生物は流通、保管等において何らかの損傷を受けているため、本実験で使用する接種菌については、損傷を与えたサルモネラおよび夾雑菌を用いた。*Salmonella* Infantis 1383-1 を Brain Heart Infusion (BHI) で 35、24h 培養後、ブロックヒーターを用いて、スパイクプロトコール (annex D in draft ISO 16140-2) に基づいて 50、15 分加熱処理を行った⁸⁾。

損傷菌の評価は加熱処理した増菌培養液を DHL 選択培地と SPC 非選択培地を使用して菌数を測定し、それらの相違が 0.5 log CFU 以上であれば損傷菌と判定した。夾雑菌については2菌種を等量混合した後に加熱処理を行い、サルモネラへの処理と同様に実施した。

4. 夾雑菌の分離、同定方法

夾雑菌はネギトロ 10g を用いたサンプリング法の検討時に、DHL 培地と CHS 培地上に高頻度に分離された集落について、アピ 20 (日本ビオメリュー) を用いて同定試験を行った後に、本実験に用いた。

5. プレエンリッチメント法を用いた d サルモネラの検出方法の検討 (10g, n=4)

実験はdサルモネラ摂取量が 10^1 、 10^0 、 10^{-1} CFU/gとした3群でおこなった。それぞれの群でネギトロ10gを6検体採取し、それぞれストマッカー袋に入れた。6つのストマッカー袋のうち1つのストマッカー袋に、1g当たりdサルモネラの菌数をそれぞれ $10^1 \sim 10^{-1}$ CFUに調整し接種した後に、Buffered Peptone Water (BPW)を90mlずつ加えて、37℃、 22 ± 2 時間培養した。培養後、各ストマッカー袋からBPW0.1mlをRV培地、1mlをTT培地に加えて42℃、 22 ± 2 時間培養した。その後、各増菌培養液10μlをDHLとCHSに画線し37℃、 22 ± 2 時間培養しコロニーの有無を確認し、サルモネラと疑われるコロニーについてはサルモネラ免疫O血清を用いて血清学的試験を行った。ネギトロの細菌数は試料原液を用いて標準寒天培地で37℃、48時間培養後、発育した集落数から算出した(図1)。

6．プール法を用いたdサルモネラの検出方法の検討(10g、n=4)

プレエンリッチメント法と同様にサンプリングをした後に、1つの三角コルベンに60gを集めサルモネラを接種し、BPW540mlを加え、37℃、 22 ± 2 時間培養した。以下、サルモネラの確認についてもプレエンリッチメント法と同様に行った(図2)。

7．夾雑菌のサルモネラ検出率への影響についての検討(10g、n=1)

各サンプリング法と同様にネギトロを採取し、1つのストマッカー袋に、1g当たりサルモネラの菌数をそれぞれ $10^0 \sim 10^{-3}$ CFUに調整した後に、夾雑菌も合わせて $10^3 \sim 10^6$ CFUになるようにそれぞれ接種し、プレエンリッチメント法とプール法でサルモネラの検出を行った。

8．ネギトロ25gを用いた各プーリング法によるdサルモネラの検出方法の検討(25g、n=4)

サンプリング量を25gとして10gの場合と同様にdサルモネラを接種し各サンプリング法による検出方法の検討を行った。

C．研究結果

1．dサルモネラおよび夾雑菌の評価

ネギトロに接種するサルモネラ、夾雑菌(*E.coli*、*C.braakii*)の培養液を加熱処理し、それぞれDHL選択培地とSPC非選択培地を用いて菌数の相違を算出し、各表中に損傷度を示した(表1-6)。

2．各サンプリング法を用いたdサルモネラの検出(10g、n=4)

10gを採取した場合のプレエンリッチメント法ではネギトロ中のサルモネラ接種菌量が

$10^1 \sim 10^{-1}$ CFU/g 何れの濃度においても検出することが可能であった。プール法では1回のみ TT 選択増菌培地を用いた場合、 10^0 と 10^{-1} CFU/g でサルモネラを検出することが出来なかった。この検体の細菌数は 9.6×10^3 CFU/g と、他の3回行った検体と比較し約 25 倍高かったため(表 1,2)、ネギトロ中の夾雑菌の汚染量が d サルモネラの検出率に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

3. 夾雑菌のサルモネラ検出率への影響

サルモネラ低濃度汚染ネギトロに夾雑菌を種々の濃度接種し、各サンプリング法でサルモネラの検出率を比較したところ、夾雑菌を 10^3 と 10^5 CFU/g 接種した検体では何れの d サルモネラ接種濃度においても検出をすることが出来たが、 10^0 CFU/g においては、RV 選択増菌培地を用いたプレエンリッチメント法でのみ検出することが出来なかった(表 3,4)。プレエンリッチメント法での不検出が夾雑菌濃度に比例していなかったこと、一度だけの実験であることから、再実験は必要であるが、TT 選択増菌培地では、高濃度の夾雑菌においても d サルモネラの検出に影響がなかったことから、ネギトロに含まれる夾雑菌は、d サルモネラの検出に重大な支障を与えないことが明らかになった。

4. ネギトロ 25g を用いた各サンプリング法

による d サルモネラの検出

(25g, n=4)

ネギトロにおいては夾雑菌の影響がほとんど無いことが明らかになったことから、サンプリング量を 25g に増やし、4 回実験を実施した。各回においてサルモネラ汚染菌量が 10^{-1} CFU/g であれば両サンプリング法において検出できることが確認できた。このことから、ネギトロを食品対象とする場合には、両サンプリングプランには差が無いことが明らかになった。(表 5,6)

D. 考察

食中毒微生物の食品への汚染菌量は極少量であり不均一であるため、科学的根拠に基づくサンプリングプランが必要となる。昨年度我々は、国際的なサンプリングプランと比べて、日本のサンプリングプランの妥当性の有無を検討することを目的として、病原微生物の代替として蛍光ラテックスビーズ ($10\mu\text{m}$) を用い、1 ロットから採取する検体 1kg (バッチという) に一定量を塗布し、食品内での微生物の存在の不均一性がバッチ全体の汚染検出率にどのように反映するかを評価した。この結果、1 バッチ (1kg) から 1 検体 25g を n=6 採取すれば、低度汚染の検体であってもロット全体の汚染を反映できると考察した。

この結果を踏まえて今年度は、RTE 食品のネギトロに食中毒菌のサルモネラを低濃度接

種し、n=6 の場合のサンプリングプランとしてプレエンリッチメント法とプール法の妥当性を評価した。

サンプル量を 10g としたプレ実験においては、プール法の 1 回でのみサルモネラが検出されなかった。この検体の細菌数は $9.6 \times 10^3 \text{CFU/g}$ であり、サルモネラが全ての接種濃度において検出された他の 3 回分の平均細菌数より 25 倍高いことから、夾雑菌の影響があったのではないかと考えた。

Price らは *Pseudomonas* sp、*Proteus* sp、*Citrobacter freundii* などの夾雑菌を脱脂粉乳、乾燥卵白に加え、プール法の検出率が低かったことを報告している⁹⁾。我々はネギトロから高頻度に検出された *E. coli*、*C. braakii* の両夾雑菌をネギトロに高濃度接種し、サルモネラ検出への影響を検討したところ、サルモネラを 10^{-1}CFU/g 、夾雑菌を 10^4CFU/g 接種した検体でのみ、プレエンリッチメント法で検出が出来なかったが、夾雑菌の存在下における両サンプリング法の差異は認められなかった。

次いで、サンプル量を公定法で採用されている 25g として両サンプリング法の妥当性を評価した。その結果、ネギトロ 25g 中のサルモネラ汚染菌量が 10^{-1}CFU/g であれば両サンプリング法でサルモネラを検出できることが確認できた。

我が国では H26 年に非加熱食肉製品及びナ

チュラルチーズ(ソフト及びセミハードに限る。)の成分規格にリステリアの基準値が設定された。基準適合性は、対象となる食品検体 1g 当たり、LM 生菌数が 100 を超えないことを定量試験法により n=5 で評価し、予備試験を行う場合は、3 箇所以上から検体を採取し、計 25g とし定性試験法により生菌の検出の有無を確認し、本試験を行う事となった¹⁰⁾。今後、食品の食中毒菌の衛生検査においては、複数の検体を採取することがより多く採用されることが考えられる。

本研究においてサンプル・プーリング法の有用性が確認されたが、本法を他の食品に適用する際には、夾雑菌の菌叢や菌量などを科学的に把握し、使用する選択増菌培地を数種類用いることにより、効率的かつ簡易に検査が可能になると考えられた。

E. まとめ

食品の輸出入時において食中毒菌などの危害物質に汚染されている可能性のある食品を取り除き、安全な食品を確保するためにはサンプリング方法が重要な位置づけとなる。しかし、日本で実施されている 25g、n=1 のサンプリング方法ではこれが保証されないことが示唆されている。諸外国との整合性を計るには n 数が増えると考えられるが、費用や労力がかかるため、プレエンリッチメント法とプール法の妥当性を検討した。

その結果、何れのサンプリング法を用いても、ネギトロ 25g 中のサルモネラ汚染菌量が 10^{-1} CFU/g であれば検出できることが確認できた。

2014 年にナチュラルチーズなどの成分規格にリステリアの基準値が設定され、定量試験法により n=5 で評価することとなった¹⁰⁾。今後、我が国におけるサンプリング法においてこのような傾向が続くと予想されるため、プーリング法の実用性を多くの食品において実証をする必要性が示唆された。

F. 参考文献

- 1)食品安全管理における微生物学的検査 基準と設定の考え方 ICMSF/編 春日文子/監訳 小久保彌太郎/監訳 島原義臣/監訳 中央法規出版
- 2)Corrigendum to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of November 2005 on microbiological criteria for foodstuff.
- 3)COMMISSION REGULATION (EU) No 209/2013 of 11 March 2013. Amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for sprouts and sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat. Official Journal of the European Union. 12.3.2013.
- 4)BAM:Food Sampling/preparation of Sample Homogenate. April 2003.
- 5)September 2012. FSIS *Salmonella* Compliance

Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products.

6)FSIS Compliance Guidelines:Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. January 2014.

7)食品衛生検査指針 微生物編 厚生労働省 監修 2004 (社)日本食品衛生協会

8)Kirsten Mooijman、ISO and CEN activities for Salmonella、Technical issues workshop 2011 110519

9)W.R.PRICE, R.A.OLSEN, and J.E.HUNTER APPLIED MICROBIOLOGY, Apr. 1972, p. 679-682 Vol.23, No.4 *Salmonella* Testing of pre-enrichment Broth Cultures for Screening Multiple Food Samples

10)厚生労働省医薬食品局食品安全部長：リステリア・モノサイトゲネスの検査について、平成26年11月28日、食安発1128第3号(2014)

G. 研究発表

論文発表

第31回日本棒菌防黴学会学術総会、食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング、石崎直人、小西良子 2014

H. 健康危険情報

なし