

201522010A

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27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28（2016）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 28 (2016) 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. 細菌・真菌汚染実態に関する研究

浅漬け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

田口 真澄、朝倉 宏 他

----- 21

衛生規範改正前後に市販流通する浅漬け製品の衛生実態に関する研究

朝倉 宏 他

----- 33

漬物の衛生規範に関する実態調査－真菌調査－

高鳥 浩介 他

----- 43

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

----- 51

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策に関する研究

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

廣井 豊子 他

----- 73

4. 非動物性食品における食品汚染・食中毒発生等に関する情報調査研究

米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

窪田 邦宏、春日 文子 他

----- 97

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 121

平成 27 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

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 国立大学法人帯広畜産大学

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)ビー・エム・エル細菌検査部

太田利子 相模女子大学

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

小西良子 麻布大学

柴田勝優 国立感染症研究所

須田貴之 日本食品分析センター

高鳥浩介 NPO 法人カビ相談センター

高鳥美奈子 NPO 法人カビ相談センター

高橋淳子 桐生大学

橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所

田中詩乃 NPO 法人カビ相談センター

中村寛海 大阪市立環境科学研究所

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

柳田和彌 国立医薬品食品衛生研究所

村松芳多子 高崎健康福祉大学

森嶋康之 国立感染症研究所

山本詩織 国立医薬品食品衛生研究所

吉村昌徳 日本冷凍食品検査協会

(敬称略、五十音順)

I. 総括研究報告

平成27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、初年度・昨年度と継続して実施してきた、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)汚染を示す製品の製造施設における改善指導内容を取り纏め、今後同様の事例が発生した際のマニュアルとしての活用案を作成した。また、衛生規範改正前後における市販浅漬け製品を対象として、衛生指標菌数及び構成菌叢に関する比較解析を行い、同改正後の供試製品における衛生状況が改善された実態を把握した。指標菌数に加え、構成菌叢の変動を明らかにすることで、製造工程の改善による製品への微生物学的影響を図ることができた。更に、浅漬けを含む漬物製品全般について、衛生規範における成分規格対象となっている真菌及び酵母を対象とした汚染実態調査を実施した。結果として、供試市販製品の約4割で酵母を認め他、一部では漬物由来とは想定し難い酵母種も確認され、産膜酵母等の汚染源になりうると目された。真菌は、約3割の供試製品より検出され、日和見感染真菌として知られる *Exophiala* 等も検出された。近年の減塩嗜好を背景として、市販流通する漬物製品に関しては、今後も衛生管理実態の把握と改善指導が必要と思われる。また、真菌や酵母については、衛生規範の成分規格に合致しない製品も一定の割合で認められると共に、汚染による健康危害も想定されるため、漬物の衛生管理及び試験法等をはじめとして、衛生規範の部分的見直しも必要と思われる。

寄生虫に関する検討としては、回虫・鞭虫・鉤虫等の土壌媒介寄生虫感染事例に関する文献調査を行い、過去に比べ激減してはいるものの現在も継続的発生がみられる現状を把握した。野菜等における虫卵汚染は確実に継続しているが、国内の市販流通製品における汚染はほぼないと考えられた。また、北海道で発生の認められる、4類感染症のエキノコックスに着目し、生食されることもある「行者ニンニク」を対象に虫卵検査を行ったが、全て陰性の結果を示し、一般流通品における汚染危害は低いと考えられた。

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策に関しては、指導内容(pH)を逸脱していた「たくあん」におけるボツリヌス菌の長期挙動を検討し、増殖はしないが、芽胞として長期生残する実態を把握した。また、本菌は窒素源・炭素源の豊富な豆製品では速やかな発芽・増殖を認め、食品の炭素・窒素源に関する情報収集が本菌の食品内増殖性を予測する上で有効と目された。更に、動物愛護の観点から、代替法が求められている、ボツリヌス毒素試験法について、FRET法による定量検出を実施し、マウス毒性試験法との比較検討を行った。A型毒素は同等の感度・精度を示したが、B型毒素の検出感度は後者が優勢であり、継続した検討が必要と考えられた。

情報収集に関する項目では、米国にて2015年11月にUSFDAにより最終規則化された、「農産物の安全に関する最終規則」について関連資料を調査した。その結果、本規則では「農業用水の品質と検査」、「動物由来の生物学的土壌改良材」、「発芽野菜の生産」、「家畜や野生動物による汚染」、「健康と衛生の重要性についての研修」及び「農場の設備、道具、建物」に関する要件が重要項目として挙げられていることを把握し、それらの要点を和訳・集約した。同規則では、Farm-to-Folkの基本に沿った内容であり、加熱処理を経ない発芽野菜をはじめとする生鮮食品に関しても細かな基準が定められていた。我が国においても、加熱処理を経ずに喫食される食品に関しては、特に一次生産段階での汚染対策を含めた包括的対応が求められよう。

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)ビー・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

小西良子 麻布大学

柴田勝優 国立感染症研究所

須田貴之 日本食品分析センター

高鳥浩介 NPO 法人カビ相談センター

高鳥美奈子 NPO 法人カビ相談センター

高橋淳子 桐生大学

橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所

田中詩乃 NPO 法人カビ相談センター

中村寛海 大阪市立環境科学研究所

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

村松芳多子 高崎健康福祉大学

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な基礎的知見を集積することが求められている。

上述の食品に関連して発生する O157 等の微生物による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、定量的知見は十分に得られていない。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種々の衛生指標菌を用いた衛生管理が行われるが、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ており、それらの多くが指標菌として検出される実態も明らかになりつつある。従って、非動物性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。この他、漬物の衛生規範において規定される成分規格のうち、カビ及び酵母に関しては、昭和 62 年以降改正が行われていないが、市販製品における汚染実態については不明であることから、その実態を把握・整理すると共に、健康危害性に関する考察を行う必要性が考えられた。

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については、容器包装詰低酸性食品等における汚染が重篤な食中毒へとつながる可能性があることから、その安全確保にはこれまでも審議を重ねられてきた。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の調査に加え、本菌の食品内挙動を検討し、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こととした。加えて、ボツリヌス毒素の検出法は動物愛護の高まりを見せる昨今においても、動物を用いた毒性試験が適用されており、代替的試験法の構築を行うべきとの国際的認識があるため、その対応についても、検討すべき課題である。

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、寄生虫も非動物性食品を介した危害因子の一つとして捉えられる。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、海外からの輸入食品に依存している、わが国の食実態を踏まえると、国内外での寄生虫汚染実態の把握は必須と考えられる。また、近年では、感染者は激減したものの、国内での感染が確実な症例の報

告もあり、感染源と目される生鮮野菜・果実への虫卵汚染は、現在も継続していると推測される。ただし、感染源となった野菜の種類や症例数の推移等については不明な点が多く、実態把握が求められる。

非動物性食品による食中毒事例は、国外においても顕在化しつつあり、欧米を中心とした海外諸国における当該食品中の病原微生物汚染実態とその対策として制定されている規格基準に関する情報収集は、国内流通食品における実態把握と並行して、取り組み、それらの融合を通じて、より効率の良い知見の集積を図ることとした。

以上の背景をふまえ、本研究最終年度では、これまでに検討を進めてきた、国内流通浅漬け製品のうち、リステリア汚染製品の製造施設での環境調査成績から得られた菌株の性状解析を行うことで、汚染の持続性等に関する検討を行った他、当該菌の施設汚染除去に際して用いた手法を取り纏め、今後同様の事例が発生した際のマニュアルとしての活用策を講じることとした。また、衛生規範改正に伴う市販浅漬け製品の衛生実態を把握するため、同規範改正前後に流通した複数の同一製品を対象として、各種指標菌汚染実態ならびに構成菌叢解析に係る検討を行った。また、漬物の衛生規範の成分規格として、カビ・酵母についても対象とされているが、それらの汚染実態は不明であることから、その検討を行い、汚染原因となった同微生物の特性から、ヒト健康危害への影響について考察した。

寄生虫に関しては、医学中央雑誌に掲載された文献をもとに、検索用のデータベースを構築し、回虫症の国内発生状況を調査すると共に、本研究班で改良を進めてきた超音波法による寄生虫卵検査法に関する検討を輸入キムチ及び北海道産「行者ニンニク」市販品を対象に行った。また、輸入キムチにおける虫卵検査実施状況と検査結果について、アンケート調査を食品検査機関に対して実施した。

加えて、本研究班では、容器包装詰低酸性食品(たくあん)におけるボツリヌス菌の生存挙動を長期的に検討すると共に、ボツリヌス毒素の検出にあたって、FRET法を用いた蛍光検出法の感度・精度に関して、現在実施されている動物毒性試験との比較検討を行い、今後の代替的利用法について考察した。更に、米国における農産物の安全に関する最終規則に関する情報を抽出し、今後の非動物性食品に対する規格基準及び衛生管理体制の在り方について考察を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 細菌汚染実態に関する研究

①浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

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。B社については、平成25年度に小売店で購入し検査した野菜浅漬けのうち同社製品は計7検体あり、うち3検体から*L. monocytogenes*が検出されていた。同社には複数の包装ラインがあるが、*L. monocytogenes*が検出された3検体は容器の形状が同じであり、同一の包装ラインで製造されたものであったことから、この包装ラインについて複数回の調査を行った。

施設のふきとり材料等は、合計115検体を採取し*L. monocytogenes*の検出を試みた。*L. monocytogenes*の検出はISO 11290-1 Amendment 1 (2004)及びISO 11290-2 Amendment 1 (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

3施設から分離した*L. monocytogenes*72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*L. monocytogenes*13株の合計85株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法およびリポプリンターシステム(Dupont)による解析を実施した。

②衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

1) 浅漬け検体

計4製造施設において製造され、東京都内で市販される、8製品を対象として、改正前(2013年2月)及び改正後(2015年3月)に、各製品6検体を入手した(計96検体)。なお、各製品の主原料となる野菜は、白菜・茄子・胡瓜・大根・野沢菜である。何れの製品についても、販売店で直接購入し、10℃以下で所属機関に移送、試験に供した。

2) 衛生指標菌の定量検出

検体10gを採材し、滅菌鉢を用いて細切後、90mLの緩衝ペプトン水を含む滅菌ストマッカー袋に加えた。6ヒトストローク/秒の速度で1分間ホモゲナイズした後、100μLを標準寒天培地、VRBL寒天培地、MRS寒天培地に塗布し、一般生菌数、大腸菌群数、乳酸菌数をそれぞれ求めた。また、同懸濁液1mLを別途、TBX寒天培地に混釈法により接種し、大腸菌の定量検出をあわせて行った。

3) 16S rRNA pyrosequencing 解析

上述の検体懸濁液10mLを21,500 x gにて10分間遠心分離後、上清を捨て、沈査を得た。同沈査より、PowerFood DNA Extraction Kit(MO BIO)を用いてDNA抽出を行った。得られたDNA溶液を鋳型として、16S rRNA部分領域をPCR増幅し、精製・濃度定量を経て、Ion Chef/Ion PGM systemを用いたPyrosequencingに供した。

4) 菌叢データ解析

出力データより、検体別分類・不要配列を除去した後、RDP classifier を通じて、各検体における構成菌叢に関するデータを得た。バーチャート作成等には METAGENOME@KIN を用いた。

③漬物の衛生規範に関する実態調査—真菌調査—

1) 調査および材料

平成 27 年 4 月～12 月の期間に国内で販売されている漬物入手した。入手地域・入手漬物の種類は別途図表に纏めた。本研究で供試した漬物検体は国内広域より入手した。それらの多くは、極めて十分に衛生管理された漬物ではなく、その地域で食品として販売されている漬物を対象とした。また漬物の種類は、規範にある材料を広く入手するため計画的に集めるよう心がけた。

2) 試験法

(i) 酵母の試験法（漬物の衛生規範による）

酵母の試験法は真菌であることからポテトデキストロース寒天培地を基本に抗生物質のクロラムフェニコール、プロピオン酸ナトリウム、および塩分として NaCl を添加した培地で試験する。培養方法として塗抹法または混釈法で、平板 3 枚の平均集落数である。

(ii) カビの試験法（漬物の衛生規範による）

カビの試験法はポテト・デキストロース寒天培地を基本に抗生物質のクロラムフェニコールを添加した培地で試験する。培養方法としては塗抹法が用いられており、真菌用培地平板 3 枚の平均集落数と記されている。しかし具体的な培地摂取量が記載されていない

(iii) 漬物の衛生規範（製品の適合要件）

製品（すべての漬物）について「カビおよび産膜酵母が発生していないこと」「異物が混入していないこと」と適合条件が付記されている。また、容器包装に充てん後、加熱殺菌したものにあっては、「カビが陰性であること」「酵母は検体 1g につき 1,000 個以下であること」の 2 要件が示されている。これらの試験方法および適合要件を考慮して入手した 105 試料の漬物について試験を実施した。なお、食品の健康志向から減塩漬物が、どの程度流通しているか、また保存料の有無についても確認した。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 文献調査成績

(i) 症例数

医学中央雑誌データベース（医中誌 Web）を用い、1990 年 1 月から 2015 年 12 月までの原著論文から国内で感染した回虫・鞭虫・鉤虫症例を抽出し、

年別症例数を明らかにすると共に、患者の感染源となった汚染野菜の特定を試みた。また、症例数については、臨床検査会社 BML の協力を得て、寄生虫症例の中から、回虫症・鞭虫症・鉤虫症と診断された症例の数について提示を受けた。

(ii) 感染源

各症例の感染源野菜に関しては、論文著者の記述に従い、生野菜、無農薬野菜、有機野菜に分類した。なお本研究では、農薬または化学肥料を使用しない栽培方法によって作られた野菜を「無農薬野菜」と定義した。したがって人糞（いわゆる下肥）のみを肥料として栽培された野菜は、無農薬野菜とした。また、本研究では、論文著者が「有機野菜」と記述した場合は、その記述をそのまま採用した。

2) 登録検査機関へのアンケート調査

厚生労働省の「食品衛生法上の登録検査機関における検査実績」に掲載されている登録検査機関のうち、自主検査件数の多い上位 16 機関と、公益法人目黒寄生虫館に依頼し、平成 17 年以降、毎年の輸入キムチの寄生虫卵検査の実施件数と陽性件数について、記入式のアンケート調査を行った。

3) 輸入キムチにおける虫卵検査

(i) 被験物質

平成 28 年度 1 月に市販韓国産キムチ 2 点および中国産キムチ 3 点を被験物質とした。各キムチ 100 g を洗浄容器に入れ、500 mL の洗浄液を加えて、10 分間静置後、以下の操作を行った。

(ii) 検査法

検体入の洗浄容器を超音波洗浄し、洗浄液全量をろ過しながら 1L 容の液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。60 分以上静置後、上清約 900 mL を吸引除去した。得られた洗浄液・沈渣部分は 50 mL の遠沈管 2 本に分注した後、液量計の管壁を精製水 50 mL で 2 回洗い、計 200mL 分を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。沈渣を回収後、精製水及び酢酸エチルを加えて激しく混和し、更に遠心分離した。上清除去後、沈渣にショ糖比重液（ $d=1.27$ ）を加えて混和し、浮遊法にて虫卵の回収操作を行った。顕微鏡下に全視野を観察して虫卵数を求めた。

4) 行者ニンニクにおける虫卵検査

(i) 被験物質

北海道で市販される行者ニンニク計 41 検体を対象とした。感染リスク低減のため、検体は購入後、試験開始まで 7 日間以上、 -80°C で冷凍した。検体は、1L 容洗浄容器に入れ、5 倍量の洗浄液を加えて、約 10 分間静置後、以下の操作を行った。

(ii) 検査法

検体からの虫卵の剥離操作は、5 分間の超音波洗浄によった。超音波洗浄後、洗浄液の全量を 1,000mL 容の円錐型液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。

比重液には硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液 (d=1.23~1.24) を用いた。

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) ボツリヌス菌の食品内動態試験 (ボツリヌス菌添加/保存試験)

(i) 芽胞液の作製

各供試菌株をクックドミート培地で一晚嫌気培養後、芽胞調製用培地 10 mL に接種し 30 ° C で更に一夜培養した。培養液は 80 ° C 20 分間の加熱処理後、再び 30 ° C で培養した。同加熱処理を翌日および一週間後に繰り返した後、滅菌水で 3 回洗浄した。芽胞形成は、芽胞染色後、鏡検した。

(ii) 栄養型菌液の調製

同上の芽胞液を加熱処理に供した後、卵黄加 CW 寒天培地に塗布し、30 ° C で 24 時間嫌気培養した。発育集落を滅菌精製水に懸濁し、栄養型菌液とした。栄養型菌液の菌数は、クロストリジア寒天培地を用いて混釈培養し、黒色集落数を測定し算出した。

(iii) 食品検体への菌液添加

芽胞液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、加熱処理後、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4 ° C、25 ° C あるいは 30 ° C に保存した。菌液添加日を保存 0 日目とし、15 日、30 日、100 日、180 日、270 日、360 日目に、各保存温度につき 4 検体ずつ食品内の菌数測定に用いた (0 日目、15 日目、30 日目は平成 26 年度の検討)。

栄養型菌液については、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4 ° C あるいは 30 ° C で保存し、60 日後に食品内菌数を測定した。

また、本菌の発育に必要な栄養素の補充として 20 倍濃縮 BHI broth を検体 1 g あたり 0.25 μ L 添加した。その後、加熱処理した芽胞液を添加し、4 ° C または 30 ° C で 30 日間保存後、食品内菌数を測定した。

上記の食品内接種にあたっては、封かん強度測定器用ゴムシール (サン科学) を使用した。

(iv) 理化学性状 (pH・酸化還元電位) の測定

ボツリヌス菌非添加の検体を用い、保存試験期間を通じた、理化学性状変動を測定した。検体容器包装外部を 70% エタノールで消毒後、滅菌済みメスを用いて容器包装および検体食品の一部を切開し、pH 電極ならびに酸化還元電位用電極を食品内部に挿入して、pH および酸化還元電位を測定した。

(iv) 生菌数 (一般細菌数) の測定

無菌的に取り出した検体 100 g を細切後、滅菌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、これを試料原液とした。10 倍希釈液を作成した後、各希釈液 1 mL を標準寒天培地に混釈法により接種し、35 ° C で 48 時間培養を行ない、生育集落数を求めた。

(v) クロストリジア属菌数の測定

同上の希釈試料液 1 mL をクロストリジア寒天培地に混釈法にて接種し、35 ° C で 48 時間嫌気培養後、生育した黒色集落数を計測した。

2) ボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度範囲に関する検討

クックドミートブイオンを用いて、37 ° C で嫌気培養したボツリヌス菌約 10^3 cfu をクックドミートブイオン 10 mL に接種し、BIONIX 低酸素培養キット (スギヤマゲン) を用いて、酸素濃度を 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0% に調整した上で、37 ° C 下にて最大 1 週間まで培養を継続した。増殖確認は、クロストリジア寒天培地への混釈培養により行った。

3) ボツリヌス毒素定量検出法の検討

(i) マウス毒性試験法 (毒素の *in vivo* 検出法)

精製ボツリヌス A 型毒素および B 型毒素は、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。菌培養液の場合は、クックドミート培地での菌培養液を 3,000 rpm 20 分間遠心し、その遠心上清を 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過し、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。希釈した各試料液を 0.5 mL ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種し 4 日間観察した。陰性対照として、試料液を 100 ° C 20 分間加熱処理することで毒素の不活化したもの作製し、同様に 0.5 mL ずつマウス腹腔内に接種し 4 日間観察した。

(ii) *in vitro* 定量検出法

A 型毒素には BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit を、B 型毒素には BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用いた。基質反応後は、434 nm 励起光下で 470 nm 及び 526 nm の蛍光強度を測定した。毒素活性は、470 nm と 526 nm の蛍光強度比 (RFU at 526 nm / RFU at 470) より算出した。B 型毒素に関しては必要に応じて事前にトリプシンによる活性化を行った。

4. 米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

米国で 2011 年に 1 月に成立した FSMA を実施に移すために 2015 年 11 月に最終規則化された「農産物の安全に関する規則 (Produce Safety rule)」やその関連資料を調査することで米国における非動物性食品 (果物・野菜等) に関する微生物基準の動向の把握を試みた。

C. 研究成果

1. 細菌汚染実態に関する研究

① 浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

1) 施設 B の調査成績

平成 26 年 6 月 30 日に 1 回目、8 月 18 日に 2 回目、11 月 4 日に 3 回目の調査を行った。施設のゾーニング等は、入室時の足洗い消毒槽とエアシャワーを設置し、原料保管冷蔵庫、下処理室、仕込み室、冷蔵下漬け室 (冷蔵室)、包装室など作業区域ごとに区画されていた。原材料の殺菌はコンベア式バブリング洗浄殺菌機 (残留塩素 30ppm、pH6.5、2 分間) を使用していた。

1 回目の調査では、冷蔵室や包装室が *L. monocytogenes* に汚染されていることが明らかになった。なかでも、食品に直接接触する重石板を押さえるパイプ棒の内部（検体 No.9）と計量後の個装品に調味液を充填するノズル（検体 No.10）から *L. monocytogenes* が検出されたことから、機械・器具類の汚染が最終製品への汚染につながっていると考えられた。機械・器具類の洗浄方法は水洗いのみであり、こすり洗いの必要性を認識していなかったことから、特に包装機に関連する器具の形状に適したブラシを用いた日常的なこすり洗いおよび次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた浸漬・噴霧消毒の実施を指導した。

その後の 2 回目の調査では、製品から *L. monocytogenes* は検出されず、汚染箇所や菌数は顕著な低減を示したものの、前回菌数が多かった包装機の調味液充填ノズルと、スライダークからの *L. monocytogenes* 検出は続いていた（検体 No.36、38）。また、下漬けを行う冷蔵室の床は常に濡れており、床の洗浄消毒が不十分な状況であったことから、冷蔵室の床を含め、施設内のこすり洗いの更なる徹底と次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒を指導した。

11 月に実施した 3 回目の調査では、いずれの施設環境および食品検体も *L. monocytogenes* は陰性を示した。この調査の 1 ヶ月前に、行政の食品衛生担当者が洗浄度をその場で確認できる ATP ふき取り検査を実施し、効果的な洗浄方法や洗浄・消毒の作業手順書作成を具体的に指導していた。その結果 11 月の調査時には現場に応じた洗浄・消毒の作業手順書が作成されており、指導に従って下漬時使用器具の内部洗浄に適したブラシが活用され、冷蔵室の床の清掃も実施されるようになっていた。そして包装機の調味液充填ノズルの分解洗浄消毒、コンベアベルトなどへの次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた消毒が実施されており、施設の衛生対策が改善された。

2) 施設 A および施設 C の調査成績

施設 A は、平成 26 年 6 月に 1 回目、平成 27 年 1 月に 2 回目の調査を行った。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 *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* を検出したが、前回と同じ場所の検体 No.33 と 36 の定量試験での菌数は減少しており、製品から *L. monocytogenes* は検出されなかった。検体 No.32、33 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、

汚染箇所を熱湯をかける、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。

施設 C は平成 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 *L. monocytogenes* 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け物から *L. monocytogenes* が検出された。本施設の 2 回目の調査は行っていない。

3) PFGE 法による解析

制限酵素 *AscI* では A、B グループ (B, B1, B2 : 互いに 1 band から 3 band 異なる)、C の 3 つに型別された。制限酵素 *Apal* では a グループ (a, a1 : 2 band 異なる)、b グループ (b, b1 : 1 band 異なる)、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 25 株の合計 33 株を型別し、Aa (*AscI* : A、*Apal* : a グループ) と Bb (*AscI* : B グループ、*Apal* : b グループ) に大別された。施設 B では平成 25 年度分離株 2 株と平成 26 年度分離株 20 株の合計 22 株を型別し、血清型に関わらず全て Cc (*AscI* : C、*Apal* : c) であった。施設 C では 26 株を型別し、Aa (*AscI* : A、*Apal* : a グループ) と Cc の 2 つに分かれた。

4) リボプリンターシステムによる解析

施設 A では 36 株が計 5 型 (I, II, III, IV, V) に分類され多様な型が存在していたことが判明した。そのうち、グループ I と II が施設を持続汚染していたと考えられた。施設 B 由来の 23 株は、採取時期が異なるにも関わらず、同じグループ (VI) を示し、施設 A に比べて、高い持続性を以て施設汚染を示したものと考えられた。施設 C では、グループ IV と VI の 2 型の菌株が施設を汚染の主体として存在したと考えられた。

②衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

1) 衛生指標菌数の動態比較

2013 年 12 月の衛生規範改正前 (2013 年 2 月) および改正後 (2015 年 2 月) に、4 施設にて製造された、計 8 種・96 検体の浅漬け製品を対象として、衛生指標菌数を直接塗抹法により求めた。

生菌数については、検体全体を対象とした改正前後での比較により有意差は認められず、改正前の平均生菌数は 2.52×10^6 CFU/g、改正後の同数値は 2.05×10^6 CFU/g であった。製品別では、計 5 製品では改正前後で有意差を以て数値の変動が認められた ($p < 0.05$) が、残り 3 製品の同数値は改正前後で有意差を認めなかった。

大腸菌群数については、製品全体での平均値が改

正前で 1.77×10^3 CFU/g、改正後では 2.57×10^4 CFU/g と若干上昇傾向にあった。しかしながら、製品別比較を通じ、同上の数値は製品 No. 5 に大きく依存しており、他の 6 製品 (製品 No. 1, 2, 3, 4, 7, 8) について、製品別に改正前後間での同菌数比較を行ったところ、有意な減少傾向を認めた。なお、大腸菌については本研究で供試した全ての検体で陰性となった。

乳酸菌数は、改正前検体の平均値が 3.17×10^5 CFU/g であったのに対し、改正後には 9.93×10^5 CFU/g と増加傾向を示した。製品別では計 4 製品 (製品 No. 5, 6, 7, 8) で有意な増加を認めた。一方、製品 No. 2 および No.3 中の乳酸菌数は、改正後に減少を示した。

以上より、衛生規範の改正を通じて、供試対象とした市販浅漬け製品における各種衛生指標菌数は顕著に変動したことが明らかとなった。

2) 衛生規範改正を通じた、市販浅漬け製品の構成菌叢変動

(i) 優勢菌叢の変動

衛生規範改正前における優勢構成菌叢は、*Roseateles* spp. (平均構成比 40.56%)、*Leuconostoc* spp. (同 19.72%)、*Rhizobium* spp. (6.71%)、*Sphingomonas* spp. (同 6.59%)、*Methylobacterium* spp. (同 3.28%) 等であった。一方、同規範改正後における各製品の優勢菌叢については、*Leuconostoc* spp. (同 32.52%)、*Lactobacillus* spp. (同 23.60%)、*Buttiauxella* spp. (同 11.20%)、*Pseudomonas* spp. (同 5.87%)、*Sphingomonas* spp. (同 5.47%) 等となり、何れの製品においても、最も優勢となる菌叢については改正前後で異なっていた。

(ii) 大腸菌群に分類される菌叢の検証

大腸菌群に属すると推察される菌属として、供試検体より検出されたものは、*E. coli* の他、*Klebsiella*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* spp. 等であった。大腸菌群は、更に糞便由来または非糞便 (環境) 由来とする細分類の他、病原性を指標とした識別も学術的には行われている。製品別に見た、改正前後での構成菌叢比較を通じ、製品 No. 5 では、*Buttiauxella* spp. の構成比が、改正前の 2.02×10^{-2} % から改正後には 83.19% にまで急激に増加している実態が把握された。

(iii) 乳酸菌構成比の変動

構成菌叢解析を通じ、供試検体において乳酸菌として検出された菌属としては、*Aerococcus*, *Carnobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* spp. 等が含まれると想定された。漬物製品一般にお

いて高頻度に検出される乳酸菌としては、*Lactobacillus* spp. や *Leuconostoc* spp. が知られている。浅漬け製品を構成する乳酸菌に該当する菌叢の構成比は、全検体では改正前で 25.40% であったが、改正後には 57.00% と増加傾向にあった。製品別での比較により、計 4 製品 (製品 No. 3, 4, 6, 7) では改正後に有意な乳酸菌に該当する菌属構成比の増加が確認された。一方、製品 No. 2 及び No. 5 では改正後の乳酸菌構成比率は改正前に比べ、減少傾向にあった。

(iv) 主要食中毒起因菌の構成比変動

EHEC, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* は生鮮野菜・果実に起因する細菌性食中毒の主たる原因菌として知られている。改正前後でのこれら 3 菌属 (種) の構成比比較を行ったところ、*Salmonella* spp. については、衛生規範改正前の製品 No. 5 より検出され、その構成比は、 2.23×10^{-3} % であったが、改正後検体は何れも陰性を示した。また、*Listeria* spp. については、改正前の 3 製品 (No. 2, 5, 7) より検出され、その構成比はそれぞれ 1.42×10^{-3} %, 1.05×10^{-2} %, 2.15×10^{-3} % であり、改正後検体での同菌由来遺伝子は製品 No. 5 の 1 検体のみから認められた。

③ 漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

1) 漬物の酵母

供試した 105 漬物について酵母試験を実施した結果、約 60% (60 試料) で酵母の検出を確認できなかった。残り 45 試料で酵母の検出を認められた。酵母数をみると 10^2 個/g は 15 試料、 10^3 個/g は 9 試料、 10^4 個/g は 10 試料、 10^4 個/g 以上は 11 試料であった。

漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麴漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。ただし、本研究で入手した漬物の多くは加熱処理されていない未加熱製品である。それらの漬物中の酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae* であり、漬物のそのものに由来するものと判定した。表 6 に示したが、7 試料において漬物由来とされない種が検出された。

漬物別の酵母検出頻度を図 3 に示した。酵母は漬物では普遍的にみられるものといえた。

2) 漬物のカビ

105 試料の漬物についてカビ試験を実施した。その結果、約 70% (75 試料) の試料でカビの検出が認められなかった。残り 40 試料でカビを認めた。カビ数をみると 10^2 個/g は 28 試料、 10^3 個/g は 2 試料と少なく、さらに、 10^4 個/g 以上の試料は検出されなかった。

漬物の種類別では、からし漬けを除いてカビの検出が認められた。漬物中にはカビの検出頻度は

非常に少ないことが確認できた。

本研究の主要な課題はカビ数ではなく、どのような種類のカビが検出されたかが、重要因子である。漬物において検出されたカビは、湿性環境に多いカビで代表的なカビの *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* 等であった。一方、*Aspergillus*, *Eurotium*, *Paecilomyces* 等のように乾性環境に多いカビも確認された。

また、保存料の有無、および食塩濃度も示したが、保存料の有無にかかわらずカビの検出がみられた。さらにカビが検出された試料では、比較的食塩濃度は低値であった。

3) 漬物の食塩濃度

入手した一部の漬物製品の漬物汁について、食塩濃度を測定したところ、試料の多くは1%以下の低塩値を示した。

4) 加熱処理した漬物での事故事例

本研究では市販漬物中にどの程度の酵母、およびカビが検出されるかについて定量試験を実施した。一方、加熱処理した漬物でカビ事故事例が起こった事例も経験した。この事例は、A 県と B 県の 2 件で起きた。いずれも地場産業として積極的に販売促進している食品であったが、賞味期限内でカビの発生がみられた。カビの特定を行ったところ、いずれも耐熱性カビ *Neosartorya fischeri* であった。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 食品汚染・症例に関する文献・実態調査

(i) 臨床症例数

国内感染の土壌媒介寄生虫症例としては、1990 年から 2015 年までの 26 年間に回虫が 225 例、鞭虫が 23 例、鉤虫は 8 例であった。2011 年以降の 5 年間でも、回虫が 90 例、鞭虫が 7 例、鉤虫は 2 例と、土壌媒介寄生虫症例は発生が続いていた。BML の資料から明らかとなった土壌媒介寄生虫症は、2000 年から 2015 年までの 16 年間に回虫が 272 例、鞭虫が 283 例、鉤虫は 215 例であった。2011 年以降の 5 年間でも、回虫が 34 例、鞭虫が 45 例、鉤虫は 13 例と、最近も症例の発生が継続し、しかも文献検索結果と比べて症例数は多かった。

(ii) 原因食品の特定

文献検索で抽出された土壌媒介寄生虫症例 256 例中、感染源が生野菜の症例は 11 例、無農薬野菜は 14 例、有機野菜は 7 例で、残りは感染源を明らかにすることができなかった。内訳を見ると、生野菜を感染源とする回虫症例は 9 例、鞭虫症例は 2 例であり、無農薬野菜を感染源とする回虫症例は 14 例、有機野菜を感染源とする回虫症例は 5 例、鞭虫症例および鉤虫症例は各々 1 例であった。寄生

虫の種類を問わず、無農薬野菜を感染源とした症例が最も多かった。

感染源となった具体的な野菜の種類も特定を試みたが、具体的な野菜名の記述がない論文、あるいは複数の野菜名を単に列記しただけの論文ばかりで、汚染野菜の種類の特定は困難であった。

2) 登録検査機関へのアンケート調査

15 機関及び目黒寄生虫館から回答が得られた。2005~2006 年度の寄生虫 (卵) 検査数は、計 90 件であったが、2007 年度~2010 年度は、何れの検査機関においても検査は実施されておらず、2011~2015 年度では、年間計 1~9 件の検査が実施されていた。なお虫卵が検出されたのは、2005 年度に実施された 1 件のみであった。

3) 輸入キムチ・行者ニンニクでの汚染実態調査

いずれの輸入キムチ検体からも、人体寄生性の寄生虫卵は検出されなかった。なお、キムチ検体#4 (韓国産) からは、浮遊時間 0.5 時間でダニの卵が検出された。また、行者ニンニク 41 検体について寄生虫卵検査を実施したが、いずれの検体も陰性で、エキノコックスの虫卵は全く検出されなかった。

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) ボツリヌス菌の食品内動態試験

(a) ボツリヌス菌芽胞液の添加回収試験

a-1) クロストリジウム属菌および一般細菌の食品内動態

試験開始時の A 型菌および B 型菌芽胞添加量は、検体 1 g あたりそれぞれ 418 ± 213 cfu および $1,093 \pm 329$ cfu であった。検体食品内のクロストリジウム属菌の動態は、A 型 B 型いずれの菌型においても保存温度に関係なく、6 ヶ月目まで添加時と同程度の菌数を維持した。その後、減少傾向に転じたが、1 年後にも接種菌は検出された。6 ヶ月目以降の菌数の減少は、4 °C 保存群より保存温度が高い群 (25 °C および 30 °C 保存群) においてより顕著となる傾向が認められた。試験開始時の一般細菌数 (生菌数) は、A 型菌芽胞添加群、B 型菌芽胞添加群、芽胞非添加群でそれぞれ、 406 ± 213 cfu/g、 396 ± 374 cfu/g、 246 ± 136 cfu/g であった。4 °C 保存群の生菌数は芽胞菌添加の有無に関わらず 1 年を通じて開始時とほぼ同等であったが、25 °C および 30 °C 保存群では、検体間での差異はみられるものの、初期菌数からは増加傾向にあった。

a-2) 理化学的性状の経時的変化

保存試験開始時の食品 pH 値は 5.15 ± 0.11 であった。pH 値は保存温度に関係なく、保存期間を通じて概ね 5~5.5 程度の範囲にあった。酸化還元電位は、試験開始時点で 32.02 ± 7.0 mV で、4 °C および 30 °C 条件下ともに、一旦上昇傾向になったがその後下降し、試験終了時 (1 年後) には開始時点より低い値となった。一般的に、ボツリヌス菌の生育可能な酸化還元電位は -200 mV 程度であると報告されているが、我々は平成 26 年度の検討結果から

-200 mV から+200 mV までの広い範囲でボツリヌス菌が良好に発育することを明らかにしており、酸化還元電位についても、当該検体はボツリヌス菌の生育が可能な理化学性状を有すると考えられた。

(b) ボツリヌス栄養型菌液の添加試験

芽胞菌を用いた試験(a)では、検体食品内でボツリヌス菌が長期間維持されているものの、菌の顕著な増殖はみられなかった。そこで、栄養型菌液の添加を行い、「たくあん」製品内でボツリヌス菌の増殖について確認試験を行った。試験開始時のA型およびB型栄養型菌添加量は、それぞれ 277 ± 41 cfu/g、 419 ± 61 cfu/g であった。60日間の保存期間中、検体の容器包装に膨張等の変化は見られず、60日後に保存を終了し菌数の測定を行ったところ、A型菌添加 4°C 保存群で 151 ± 45 cfu/g、A型菌添加 30°C 保存群で 71 ± 10 cfu/g、B型菌添加 4°C 保存群で 157 ± 40 cfu/g、B型菌添加 30°C 保存群で 95 ± 21 cfu/g で、いずれの菌型、保存温度においても減少傾向にあり、栄養型菌についても、当該食品検体内で発育・増殖を示さないことが明らかとなった。

(c) ボツリヌス菌芽胞液の添加試験 2-栄養素添加

ボツリヌス菌等は発育・増殖に高タンパク質および高炭水化物を必要とする。今回の対象検体の原材料は大根という、窒素源および炭素源が非常に乏しいマトリックスであることから、本菌が当該食品内で発育・増殖しなかった一因として、窒素源及び炭素源の不足が考えられた。そこで、当該検体に芽胞液と共に、20倍濃縮のBHI brothを添加し、ボツリヌス菌の動態を検討した。BHI broth 非添加A型芽胞液添加群、BHI broth 添加A型芽胞液添加群、BHI broth 非添加B型芽胞液添加群、BHI broth 添加B型芽胞液添加群における試験開始時のクロストリジア属菌は、それぞれ 382 ± 40 cfu/g、 512 ± 112 cfu/g、 308 ± 3 cfu/g、 607 ± 436 cfu/g であった。30日間の保存期間後のクロストリジア属菌数は、A型B型いずれの菌型、また保存温度においても、保存試験開始時よりも減少傾向にあり、BHI broth 添加条件下でもボツリヌス菌の増殖は見られなかった。同じ検体および芽胞菌非添加検体での生菌数は、いずれの群も保存試験開始時より若干の増加傾向が見られ、一部例外もあるものの、BHI brothを添加した 30°C 保存群にその傾向が強かった。

2) ボツリヌス菌の増殖にかかる理化学的性状に関する検討

計9供試株では、酸素濃度0.75%以下で培養1日以内に良好な増殖を示し、うち407-1を除く8株は1.00%でも同4日以内に増殖を呈した。一方、CB21株については、0.50%以下での増殖を示すにとどまった。また、生存性については、より高い酸素濃度下においても、ヒートショックを行った後には確認された。

3) ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量的検出法の探索 (マウス毒性試験法との比較検討)

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用した迅速・高感度のボツリヌス毒素 *in vitro* 検出法

「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」が米国 BioSentinel 社によって開発され、国際的な妥当性確認を行う準備段階にある。本試験では、この「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」と現在の国際的な標準法であるマウス毒性試験法 (*in vivo* 法) を用い、検出感度の比較検討を行った。A型毒素を用いた場合、マウス毒性試験法での検出最低濃度は6-10 pM であった。一方、BioSentinel社のA型毒素用キットを用いた試験では、陰性対照と有意差があった最低濃度は10 pM と動物試験法と同等の成績を示した。また、B型毒素に対するマウス毒性試験法での検出最低濃度は30-100 pM であったのに対し、B型毒素用キット (BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit) で陰性対照と有意差があった最低濃度は10 nM と、検出感度の課題が残される結果となった。

4. 米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

「農産物の安全に関する最終規則」は、人が喫食する果物や野菜について、それらの安全な栽培、収穫、包装、および保存に関する科学的な基準を初めて規定したものである。以下は、当該最終規則に定められた重要項目の概略である。

1) 農業用水

病原菌を伴う可能性がある糞便汚染を検出するため、農業用水の品質と検査の要件が規定されている。

1-1. 水質

最終規則は農業用水の微生物学的品質に関して2セットの基準を設定しており、これらはいずれも糞便汚染の指標となり得る大腸菌 (generic *E. coli*) についてのものである。

潜在的に危険性のある微生物が存在した場合、それらが直接的または間接的に農産物に移行する可能性が高い農業用水には大腸菌が検出されてはならないとしている。このような用水の例としては、収穫時および収穫後に手指を洗うための水、食品が接触する表面に用いる水、収穫時または収穫後に農産物と直接接触する水 (製氷用の水を含む)、発芽野菜の灌漑用の水などが挙げられる。これらの用水に大腸菌が検出された場合はその使用を直ちに中止し、再使用前に改善措置を取らなければならないとしている。本最終規則はこれらの用水として未処理の表層水を使用することを禁止している。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる水に関する数的基準は幾何平均値 (geometric mean: GM) と統計学的閾値 (statistical threshold: STV) よりなる。当該水検体100 mlあたりの大腸菌生菌数 (CFU) は、GMが126以下、STVが410以下でなければならないとしている。

当該水がこれらの基準を満たさなかった場合は、実行可能な限りできるだけ速やかに (遅くとも翌年中に) 改善措置を取らなければならないとしており、当初、農業用水が微生物基準を満たさなかった農家は、いくつかの選択肢 (省略) のいずれかを実施す

ることにより、基準がクリアされ、当該水を使用できるようになるとしている。

1-2. 検査

最終規則では、検査の頻度が水源の種類（すなわち、表層水か地下水か）にもとづき規定されている。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いるために、外的要因の影響を最も受け易いと考えられる未処理の表層水を検査する場合は、農場は初期調査として、2~4年をわたり収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも20検体を検査しなければならない。農場はこの初期調査の結果からGM値とSTV値（これら2つの値は「微生物学的水質指標」と呼ばれる）を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断するとしている。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる未処理の地下水に関しては、農場は初期調査として、栽培期間または1年の、収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも4検体を検査しなければならない。農場は初期調査結果からGM値とSTV値を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断するとしている。

大腸菌が検出されてはならない水として一部の目的に使用される未処理の地下水に関しては、農場は初期検査として、栽培期間または1年間にわたりこれらの水を少なくとも4回検査しなければならないとしている。農場はその結果にもとづき、これらの水が当該の目的に使用可能かどうかを判断しなければならない。以下の場合、農業用水は検査の必要がないとしている。

- ・ 最終規則に規定される諸要件を満たす公共水道または水源から受水する水（ただし、当該の水が関連の要件を満たしていることを示す検査結果またはコンプライアンス証明書を農場が保有していることが必要）
- ・ 最終規則の水処理要件に従って処理された水

2) 生物学的土壌改良材

2-1. 家畜ふん (Raw Manure)

FDAは、汚染リスクの最小化のために土壌改良材としての家畜ふんの施肥と収穫との間に何日間置くことが必要かについて、リスク評価および広範な研究を行っている。

現時点では、FDAは、農家が米国農務省 (USDA) の National Organic Program に示された基準に従うことに反対していない。この基準は、家畜ふんの施肥と収穫との間に、土壌と接する作物については120日、接しない作物については90日の期間をおくことを呼びかけている。

最終規則によると、家畜ふんなどの未処理の動物性生物学的土壌改良材は、施肥時に農産物にふれず、また、施肥後に農産物に触れる可能性を最小化するような方法で施肥しなければならない。

2-2. 完熟堆肥 (Stabilized Compost)

最終規則には、家畜ふんなどの生物学的土壌改良材を熟成処理する工程について、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、サルモ

ネラ属菌 (*Salmonella* spp.)、糞便系大腸菌群、大腸菌 0157:H7 などの菌数の検出上限を規定する微生物学的基準が設定されている。最終規則にはこれらの基準に適合した科学的に裏付けのある堆肥作成法として2つの例が示されている。これらの方法のいずれかによって作成した完熟堆肥は、施肥時および施肥後に農産物に触れる可能性が最小になるような方法で施肥しなければならないとしている。

3) 発芽野菜

発芽野菜は食品由来疾患アウトブレイクにしばしば関連してきた。発芽野菜は、その栽培に必要な高温多湿で栄養豊かな環境条件により、危険な微生物に特に汚染され易い。

米国では1996年から2014年までの間に、発芽野菜に関連して、アウトブレイク43件、患者2,405人、入院患者171人、死亡者3人が発生した。この中には、米国では初めての報告であった発芽野菜によるリステリアアウトブレイクも含まれている。

発芽野菜にのみ適用される要件には以下が含まれる。

- ・ 発芽に用いる種子や豆を処理すること（または、種子（豆）生産業者、流通業者、供給業者などによる事前の処理とその記録に頼ること）に加え、さらに、それらに危険な微生物が付着・侵入しないような対策をとる。
- ・ 特定の病原体について、生産バッチごとの使用済み灌漑水、またはバッチごとの栽培中の発芽野菜を検査する。これらの検査結果が陰性であることが確認される迄、販売できない。
- ・ リステリア属菌またはリステリア・モノサイトゲネスの存在について、発芽野菜の栽培、収穫、包装、および保管に係わる環境の検査を行う。
- ・ 使用済灌漑水、発芽野菜及び（又は）環境検体の検査が陽性だった場合は改善措置を取る。

4) 家畜および野生動物

最終規則は、飼育動物（家畜など）や種々の目的のための作業動物に依存する農場について、最終規則の遵守可能性に懸念を示している。最終規則では、これらの動物に対して、農場に侵入する野生動物（シカや野生のブタ）と同様の規程が設定されている。農家は、汚染の可能性がある農産物を特定し、それらを収穫しないよう、合理的に判断して必要と考えられるあらゆる対策を取らなければならないとしている。

少なくとも、すべての農場は、収穫方法によらず、栽培区域および収穫予定のすべての農産物を目視検査しなければならない。

さらに、最終規則は、一定の状況下では農場が栽培期間中に追加の調査を行うことを求めている。もしこの調査で動物による汚染の可能性を示す有意な証拠が見つかった場合、農場は、後の収穫時に役立つと考えられる対策をとらなければならない。そのような対策の一例として、汚染区域を示す旗を設置することが挙げられる。

最終規則は家畜等の放牧と農産物の収穫との間

に待機期間を置くことを求めているが、FDA は、農家が生産物と生産慣習に応じて、そのような期間の設置を自主的に検討することを奨励している。

農場は、野外の栽培区域から動物を排除したり、動物の生息域を破壊したり、栽培区域または排水区域の境界を明示したりする必要はない。本規則のどの条項も、このような行為を強制している、または奨励していると解釈してはならないとしている。

5) 作業者の研修、健康、および衛生

最終規則では、作業者の健康と衛生に関して以下の諸要件が規定されている。

- ・ 発症もしくは感染した作業者による農産物および食品接触表面の汚染を防ぐため、作業者に、農産物や食品接触表面を汚染する可能性がある健康状態の場合はその旨を監督者に連絡するよう指導するなどの対策をとる。
- ・ 農産物または食品接触表面を取り扱ったり触れたりする場合は、衛生慣習に従う。一例を挙げると、トイレの使用後などの際は手指をよく洗い、乾かす。
- ・ 例えば、トイレや手洗い設備を訪問者に利用可能にして、訪問者が農産物および（または）食品接触表面を汚染させないよう対策をとる。

農産物および（または）食品接触表面を取り扱う農場作業員およびその監督者は、健康や衛生の重要性などの特定の課題について研修を受けなくてはならないとしている。

農産物および（または）食品接触表面を取り扱う農場作業員およびその監督者は、また、担当業務の遂行に必要な研修、教育を受講し、さらに経験を有していなければならない。これは教育と、実地研修、または現在の担当業務に関連した仕事への就労経験との組み合わせでも良いとしている。

6) 設備、道具および建物

最終規則は、設備、道具および建物が不適切な衛生下に農産物の汚染の原因になることを防ぐために、これらについての基準を設定している。最終規則はここで、温室や発芽室、及び他の類似の構造物、また、トイレや手洗い設備などを対象としている。

農産物および食品接触表面の汚染を防ぐために必要な対策としては、設備や道具の適切な保管、維持、および洗浄などが挙げられている。

7) 適用除外項目

以下に記載するものは本最終規則の対象から除外されるとしている。

- ・ 「生、またはそのまま食べられる農業製品」に当てはまらない農産物。
- ・ 生で食べることがほとんどないと FDA が特定した以下の農産物：アスパラガス、インゲン豆、赤カブ、甜菜、カシュー、ヒヨコ豆、カカオ豆、コーヒー豆、スイートコーン、クランベリー、デーツ、ナス、イチジク、セイヨウワサビ、ヘーゼルナッツ、オクラ、ピーナッツ、ペパーミ

ント、ジャガイモ、カボチャ、サツマイモなど。

- ・ 食用の穀類：オオムギ、デントコーン、フリントコーン、オート麦、米、ライ麦、小麦、ソバ、油糧種子（綿実、亜麻仁、菜種、大豆、ヒマワリの種）など。
- ・ 生産者個人が、または生産農場で消費することを目的とした農産物。
- ・ 農産物の過去 3 年間の平均の年間売上高が 25,000 ドル以下の農場。

また、公衆衛生上重要な微生物の量を的確に減少させる商業的加工工程を経る農産物も一定条件下に適用除外の対象になるとしている。さらに条件付き適用除外、およびその場合に農場に課される要件も示されている。

D. 考察

1. 細菌汚染実態に関する研究

① 浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

これまでの *L. monocytogenes* 症事例における汚染源の調査結果から、本菌は原材料から持ち込まれるというよりはむしろ製造・加工工程で食品を汚染していると考えられている。本研究で複数回調査した施設 A および B においても、下漬をする冷蔵室の床と製品充填機周辺から施設に特有な菌株が持続的に分離され、これらの環境の洗浄が不十分であることが判明した。本菌は環境下で速やかにバイオフィルム形成を果たすが、同形質は多くの物理・化学的処理に抵抗性を示すため、製造環境に定着した場合は除去が難しいと言われている。

L. monocytogenes の除去に際して、施設 A では継続的な加熱処理を行なうことで、菌数の減少に成功した。しかし、熱湯の取扱は施設内の温度を上昇させる弊害があり、それ以外にも作業員の危険を伴うため注意が必要である。スチームクリーナーで蒸気を機械にあてる方法も、エアロゾルを発生させて *L. monocytogenes* を飛散させる可能性があることから、加熱処理は限定的に用いるほうがより効果的とも考えられる。

施設 B では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い具体的な改善方法を提示したことで、施設側の理解が深まり、*L. monocytogenes* の陰性化が実現したと考えられる。今後も機械・器具類の洗浄が適切に行われているかどうかの検証のためには定期的な製造環境モニタリングが必要と考えられた。

② 衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

本研究では、2013 年に改正された漬物の衛生規範に従って製造された市販浅漬け製品に加え、同規範改正以前に流通した、同一製品を対象として、衛生規範改正前後における市販浅漬け製品の衛生状

況に関する実態調査を行った。

衛生指標菌数の比較検討を通じ、大腸菌群については複数製品で減少傾向が認められ、乳酸菌数については反対に増加傾向を示す製品が複数認められた。生菌数については明確な変動は認められなかった他、大腸菌については全ての供試検体で陰性を示した。これらの成績を勘案すると、衛生規範改正に伴い、供試製品については、衛生状況の改善が図られたと考えられる。その一方、同規範改正を通じた比較検討成績は、浅漬けをはじめとする非動物性食品の製造工程における衛生指標として、生菌数や大腸菌群を用いる意義は必ずしも高いとは言い難く、欧州等で報告されているように、大腸菌を用いた衛生管理を行う必然性を提唱していると目される。その導入にあたっては、更なる検証データの集積が必要と考えられる。

菌叢解析の結果より、供試製品における優勢菌叢は、衛生規範の改正前後で大きな変動を示したことが明らかとなり、指標菌動態との関連性も認められた。改正前に優勢菌叢として同定された、*Roseateles* spp, *Rhizobium* spp, *Sphingomonas* spp. 等は、生鮮野菜・果実より高頻度に分離されているが、これらは薬剤耐性菌としての報告もある他、疾病との関連性も示唆されている。これらの構成比の低減は従って、微生物危害の低減につながるものと示唆され、衛生規範改正に伴う、製品の衛生状況改善が果たされたものと考えられる。

一方、大腸菌群に属する *Buttiauxella* spp. については、1 製品 (No. 5) において優勢な構成比を示した。当該菌は、非糞便性の非病原細菌であり、土壌や植物、水等の環境由来細菌として知られる。製品 No. 5 は改正後に大腸菌群数を増加させていたが、菌叢解析の成績より、同数値の増加は、病原性を有する大腸菌群によるものではないと目された。

乳酸菌数は、改正後の複数製品において増加を認めたが、これに呼応した形で乳酸菌に含まれる菌叢の構成比も増加傾向を示した。乳酸菌はバイオフィーム形成等を介して、酸等の環境ストレスに抵抗性を示す他、一部の乳酸菌については、0.04%以上の次亜塩素酸ナトリウムに対して抵抗性を示すことも知られている。衛生規範改正に伴う、次亜塩素酸ナトリウムの使用励行が、結果として乳酸菌の生残に有効に機能していることが示唆された。

本研究における成績は、衛生規範改正に伴う浅漬け製品の衛生状況の改善を確認できた一方、HACCP 導入に向けて求められる衛生管理上、必要不可欠な衛生指標の在り方に関する課題も提起された。欧州では生鮮野菜の製造衛生管理上、大腸菌を用いることが近年提唱されており、今後、我が国においても、生鮮野菜或いは軽度の加工を行う植物性食品の製造基準等の在り方を議論・整理する必要がある。

③漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

市販される漬物中に、どの程度の真菌(酵母、カビ)が検出されるかについて調査を実施した。検出結果から、多くの漬物製品において、酵母やカビが全く陰性であるとはいえないことが明確になった。酵母数をみると 10^2 個/g~ 10^4 個/g 以上と漬物中の酵母検出数は多様であった。漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麴漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。酵母数の多い漬物からは *Saccharomyces cerevisiae* が検出された。以上の結果からわかるように、加熱しない限り漬物由来の酵母は存在するものであり、異常な数値とは言いがたい。むしろ問題は、漬物由来以外の酵母の検出数である。漬物由来とされない酵母の検出種に *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus* が確認された。つまり製造工程での汚染も考えられ、こうした酵母の種によって産膜酵母などが汚染されることもあるため、施設環境(空調等)や漬物原料等における衛生改善が求められる。

カビについては、約 30%の検体より検出された。一般にカビ数は食品中では少ない。その理由としては、細菌とは異なる分裂様式(発芽による菌糸伸長)をとるためと考えられる。そのため、時間経過によってもカビ数は少ないことが多い。ただし、少ないからといってカビを問題視しないことはあってはならない。

本研究を通じて、今後検討すべき重要な課題としては、どのようなカビ種が検出され、確認されるかを把握する必要があると思われる。すなわち検出されるカビの同定を通じ、汚染源を特定できることが多いからである。食品に添加された保存料の有無、および漬物汁中の食塩濃度から判断しても、保存料の有無に関係なくカビが検出され、食塩濃度も低いことが明らかとなった。今回、検出されたカビは、湿性環境にみられる代表的な *Fusarium*, *Acremonium*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Paecilomyces* 等であり、中でも特に多かったカビ種を確認したところ、空中由来であった。これらは従って製造工程中に食品に混入したものと考えられる。

また、本研究課題の病原微生物の観点からカビ種を判断すると、*Exophiala*, *Acremonium*, *Fusarium* など日和見感染カビも少なからず確認された。カビの発生事故品や異物やカビ数も重要であるが、漬物の低塩化及び加熱処理食品として市場に広く出回ることなどを考慮していくと今後は、このような特定カビに注視しながら漬物の衛生規範を検討することも必要であると提言したい。

加熱処理した漬物での事故事例を経験した。この2事例は同様の過程で発生されていることから、今後漬物の加熱加工する場合の大切な教訓となる。いずれも地場産業として販売を促している食品であ

ったが、耐熱性カビ *Neosartorya fischeri* であった。これは 60-70℃、15-30 分加熱程度では死滅しないカビであるため、加工工程処理をどのように指導するか等も含めて、漬物の衛生規範で重要といえる事例であった。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

文献学的検索により、回虫・鞭虫・鉤虫に感染する症例は、最近でも少数ながら継続して国内発生していることが確認された。感染源となる野菜の虫卵汚染は、現在でも継続していることが強く示唆された。BML の資料からは、更に多数の土壤媒介寄生虫症例が我が国で診断される事実が示された。ただし BML の症例は、国内感染事例だけでなく、輸入症例も含む。特に熱帯地方の発展途上国では、野菜における土壤媒介寄生虫の虫卵汚染は高度で、これを喫食して感染する機会にも恵まれている。このような状況を背景に、土壤媒介寄生虫に海外で感染し、輸入症例として受診する患者が多い事に、我が国の医療関係者は留意すべきである。

今回の検討で、感染源となった野菜の名前を特定することも試みたが、具体的な野菜の名前を記述していない論文ばかりであった。文献学的検索を今後継続しても、感染源となった野菜を特定することは容易でないと考えられた。患者と面談して、直接に聞き取る工夫ができないか、今後検討する必要がある。

2005 年 11 月に中国と韓国との間で発生したキムチの寄生虫卵汚染に関する問題を契機として、我が国でも輸入キムチの寄生虫卵検査が実施された。その結果、一部のキムチ検体から回虫(人体寄生性)を始めとする寄生虫卵が検出された。しかしその後、検査の結果を目にすることがなくなった。本アンケート調査から、輸入キムチの検査が実際に実施されなくなったからではないかと考えられた。しかし 2011 年度以降は、少数であっても検査が継続して実施されていることも分かった。土壤媒介寄生虫の感染事例は最近でも発生しており、中には感染源として輸入キムチを示唆する報告も認める。従って輸入キムチを対象とした寄生虫卵検査は、感染源の特定や予防法の策定とも関連する。検査を実施して、陰性であってもその成績を記録することは、今後も重要な課題になると考えられた。

最近 5 年間に一部検査機関ではキムチの寄生虫卵検査が実施されていた。しかし、虫卵の検出例は認められず、中国・韓国産の輸入キムチを対象に寄生虫卵検査を実施し、汚染状況を調べた。その結果、回虫等の人体寄生性の虫卵は検出されなかったが、ダニの卵が検出された。今回実施した超音波法によるキムチの検査法は、人体寄生性の寄生虫卵検出にも適用可能と考えられた。

キムチは様々な原材料より構成されており、高脂

質であり、微細な夾雑物も多い。平成 17 年に厚労省からキムチの検査法が通知されたが、その検査法では脂質や夾雑物の除去が十分に行うことができないことが従来より指摘されてきた。また我々が実施した超音波法(浮遊法)によっても、キムチからの虫卵検出には多くの時間が必要なことが改めて確認された。検査を効率的に進めるためにも、寄生虫卵を残したまま、キムチの残渣だけを効率的に除去する方法について、今後更に検討を進める必要がある。

本研究班では、非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法として超音波法を構築し、多数の検体から効率的に寄生虫卵が分離できることを示してきた。当該法を用いて、北海道東部で栽培された(あるいは野生の)行者ニンニクを対象として寄生虫卵の検査を実施した。特に、感染症法で 4 類に規定されるエキノкокスの虫卵の検出を試みたが、いずれの検体もエキノкокス虫卵陰性を示した。本症はキタキツネやエゾヤチネズミを媒介して環境への汚染拡大が懸念されている。今回は検査数が限られており、食品汚染実態の正確な把握には至っていないが、今後は、検体数を増やして、検査を継続したいと考えている。実際に、今回供試した行者ニンニク検体には砂泥の付着が肉眼的にも多く認められており、汚染の危険性を否定できる段階にはないといえよう。

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) ボツリヌス菌の食品内動態

平成 20 年に通知された指導内容を逸脱していた「たくあん」製品を用いて菌の添加/長期保存試験を行った。本試験では、計 72 個の「たくあん」製品を菌非添加検体として用いたが、いずれからもクロストリジウム属菌は検出されず、ボツリヌス菌の原材料への汚染はなかったと考えられた。しかし、食品内のボツリヌス菌動態の検討結果から、原材料がボツリヌス菌芽胞に汚染された場合、長期にわたりボツリヌス芽胞数が初期濃度で維持される可能性が示唆された。ボツリヌス菌の場合、乳児等の一部のグループを除き、菌が増殖し毒素を産生する状況でない限りヒトへの健康危害はないと考えられるが、芽胞菌数が減少せず食品内で長期維持されることは留意すべき点であると考えられる。

本試験では、「たくあん」検体の pH 値および酸化還元電位がボツリヌス菌の発育が可能な条件下にあったにもかかわらず、添加菌は食品内で増殖しなかった。その理由として発育に必要な窒素源および炭素源の不足を考え、BHI broth 存在下でのボツリヌス菌の添加試験も行ったが、同様に食品内での増殖は見られなかった。しかしながら、炭素源および窒素源が豊富な「煮豆」製品を用いた検討では、短時間でガス産生を伴うボツリヌス菌の顕著な増加が確認された。BHI broth を添加した「たくあん」

製品においてボツリヌス菌の発育がみられなかったのは、(1) BHI broth の添加量が不十分であった(2) BHI broth は糖含量があまり高くない事から、炭素源が不足状態であった、などの可能性に加え、BHI broth 添加群で生菌数の増殖がよい傾向にあったことから(3) 検体内に存在する一般細菌等により添加した栄養素が消費され、ボツリヌス菌の発育より先に一般細菌の発育が促進してしまった可能性も考えられた。検体内に存在する一般細菌に関しては、ボツリヌス菌の増殖が顕著であった「煮豆」製品では、生菌数は検出されず、共存菌はなかったと考えられる。「煮豆」製品に関しては、ボツリヌス菌が容易に増殖する事は既に報告され、平成 20 年の厚生労働省の指導通達後、ボツリヌス対策として「120 ° C 4 分間の加熱と同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行っている」と平成 22 年のフォローアップ調査で回答している。今回、用いた「煮豆」製品から生菌数が検出されなかった理由としては、120 ° C 4 分間の加熱と同等以上であったかどうかは本試験だけでは判定できないが、少なくとも一般細菌が死滅する程度の加熱殺菌は実施されていたからだと考えられた。これらかの結果から、ボツリヌス菌の食品内増殖については、競合する他菌の有無の影響や食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集、更なる検討が必要と考えられた。

平成 20 年に通達されたボツリヌス対策では、背景でも述べたように、①当該食品中のボツリヌス菌を除去する、②ボツリヌス菌の増殖を防止する、または③ボツリヌス毒素の産生を防止する、のいずれかをとることとしており、具体的には、[1] 中心部温度を 120 ° C 4 分間加熱する方法またはこれと同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行なう。[2] 冷蔵 (10 ° C 以下) 条件で流通保存することとし、容器包装にその旨を明記する。[3] pH を 4.6 以下に調整し、菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生を防止する。[4] 水分活性を 0.94 以下にし、菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生を防止する。などがあり、これらの措置は容器包装詰低酸性食品を取り扱う業界団体の責任において講じる事となっている。上記のうち[2]以外は、当該製品の外観からではどの措置がなされているのか判別できない。対策未実施製品があった場合は、本研究のように「市場品を用いた調査/検討の実施」、あるいは事故発生により違反が判明する状態である。市場に出回っている「煮豆」製品の中には、加熱処理済みである旨を記載しているものも見受けられたことから、当該食品を扱う業界団体には指導内容の遵守に加え、自主的に対策内容の表記を行う団体/企業が増える事を期待したい。

2) ボツリヌス菌増殖を許容する酸素濃度

ボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度条件については、概ね 0.75%以下であることが示された。真空包装食品におけるボツリヌス菌の発育ならびに毒素産生に関する点では、Kasai らが包装米飯において 5%以下の酸素濃度で発育・毒素産生リスクがあると報告している。本研究では、食品マトリックスを用いた検討は行っていない他、実際の食品に

あつては、他菌による酸素濃度への影響あるいは食品マトリックスに含まれる栄養組成がボツリヌス菌の栄養要求性を満たすかどうかといった点も考慮する必要があると考えられる。本研究により得られた結果からは、少なくとも 1%以下の酸素濃度を有する食品に対しては、ボツリヌス菌の増殖リスクがあると想定され、一定濃度以上の酸素を均一に含む食品製造が本菌汚染リスクの低減には有効と思われた。

3) ボツリヌス毒素に対する FRET 定量法の検証

ボツリヌス毒素の検出法・定量法としては、体重 20 g 前後のアルビノマウス (*ddY* 系あるいは *ICR* 系)を用いたマウス毒性試験法がゴールドスタンダード法として位置づけられており、我が国においても公定法として採用されている。マウス毒性試験法は検出感度が高く、LD₅₀ 値を 1U とし、ボツリヌス毒素量表記の基準となっている。しかしながら、同法の実施にあたっては、施設や動物倫理等、多くの課題があるため、一般的な食品検査機関では実行できる状態にない。このような背景から、代替法の構築が社会的に求められており、これまでに毒素タンパク質に対する抗原抗体反応を検出原理とした ELISA 法やその改良法 PCR-ELISA 法等が開発されているが、現時点では、検出感度においてマウス毒性試験法と同等性が担保される方法は存在しない。また、毒素遺伝子の検出を原理とした PCR 法も開発されているが、試料に混在する食品成分による PCR 反応阻害などの問題点に加え、毒素遺伝子の存在と毒素産生が一致しない場合もあり、あくまでも補助的な使用に留まっている。近年、米国 BioSentinel 社によって開発された蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用したボツリヌス毒素検出法は、毒素の作用本体であるエンドペプチダーゼ活性を検出原理としており、毒素の基質の一部に 2 種の蛍光色素を標識したものをを用いる。検出原理として毒素活性を検出対象としている点において、マウス毒性試験法と同じであり、他法と比してマウス毒性試験法とのよい相関性が期待できるのではないかと考え、本研究では同法の検出感度に関し、マウス毒性試験法との比較検討を行った。結果として、A 型毒素に対する検出感度は同等性が確認され、マウス毒性試験法の代替法としての可能性を期待させる結果であったが、B 型毒素に対する検出感度には大きな差がみられた。今後、検査試料の前処理方法等について、更なる検討が必要と思われる。

4. 米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

FSMA を実施に移すために必要な規則の一部として 2015 年 11 月に最終規則化された「農産物の安全に関する規則 (Produce Safety rule)」では、「農業用水の品質と検査」、「動物由来の生物学的土壌改良材」、「発芽野菜の生産」、「家畜や野生動物による汚染」、「健康と衛生の重要性についての研修」、および「農場の設備、道具、建物」に関する要件が重要項目として挙げられている。これらの項目からも

理解できるように、食品微生物汚染対策として、農業用水を始めとする農場における重要管理点に関連する項目が中心となっており、一次生産段階から喫食段階まで（Farm-to-Fork）の包括的対策の基本に沿った内容といえる。特に生のまま喫食することが多い発芽野菜に対する規則が細かく決められており、米国だけでなく欧州でも多数の患者が発生したことから特に関心が高いことが示唆される。

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・加工時の慣習、衛生管理状況が米国とは異なると考えられるので、米国での規則制定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、および FSMA が米国への輸入食品にも適用されることに鑑み、米国、欧州連合（EU）をはじめとする国際的な動向を今後も注視して行く必要があると考えられる。

E. 結論

1. 細菌・真菌等の汚染実態に関する研究

①浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

浅漬製造施設の協力を得て、製造環境の改善に向けた調査を行った。何れの施設も冷蔵室や包装室の床のたまり水、そして製品包装機の拭き取り検体からリステリア菌が検出され、汚染箇所が特定された。分離株の遺伝子型別を通じ、各施設での本菌汚染が持続的なものであったことが推察された。複数回の調査ならびに改善指導を行った A、B 社では、本菌対策に関する理解が深まり、製品での陰性化が実現した。本報告書では、今後同様の事例が発生した際の参考資料として活用できるよう、その除去法を取り纏めた。

浅漬製造施設では製品に *L. monocytogenes* が混入する可能性のある場所の管理状態を評価するための、モニタリングプログラムの設計が重要であり、その実行が消費者の健康被害を防ぐことにつながると考えられた。汚染除去に際しての情報と共に、本研究の結果を今後の衛生対策に反映させたい。

②衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

本研究では、市販浅漬け計 8 製品 96 検体を対象として、衛生規範改正前後での衛生状況の比較を目的として、各種衛生指標菌の定量検出及び構成菌叢を比較した。同成績により、衛生規範の改正後に市販される供試浅漬け製品については、微生物危害の低減が図られたことが実証された。また、指標菌動態と構成菌叢の併用を通じ、野菜等を原材料とする食品の製造工程における衛生管理には、大腸菌群等は不適であり、大腸菌を使用する利点が挙げられた。

③漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

国内に流通する多様な漬物について真菌・酵母の定量検出を行い、以下の知見を得た。

(1) 漬物の酵母試験結果: 約 40% の試料より酵母が検出された。酵母数としては $10^2 \sim 10^4$ 個/g 以上であった。漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麴漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった（但し、供試検体の多くは非加熱製品）。検出された酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae* であったが、一部検体からは漬物由来といえない酵母種が検出された。後者は、産膜酵母等の汚染源となるため、漬物の加工工程における衛生規範見直しが求められる。

(2) 漬物のカビ試験結果: 約 30% の検体よりカビが検出された。カビ数をみると 10^2 個/g 程度と多いとは言えなかったが、本規範で重要な問題点はカビ種である。カビ種の確認により、空中、原料、水系由来に分けることができ、その原因を知るとは、今後の衛生規範の在り方を考える上で重要な知見となり得ると思われた。日和見感染カビである *Exophiala* が確認されたことから、カビ種の特定は極めて重要であり、今後の衛生規範改正で検討が望まれる。

(4) 加熱処理した漬物での事故事例: 加熱処理した漬物でカビ事故事例が起こった事例を経験した。2 件で、いずれも地場産業として販売している食品であった。それらの試料から耐熱性カビが確認された。製造環境で重要な加工工程における衛生規範の指導事例の一つといえた。

(5) 漬物の真菌調査から近年の漬物は低塩あるいは加熱加工品であることによる真菌事故例が今後危惧され、漬物の衛生管理及び試験法等の衛生規範の見直しが求められる。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

回虫症、鞭虫症および鉤虫症は、現在も日本国内で発生しており、感染源となる野菜の虫卵汚染も低頻度ながらも継続している実態を把握した。感染源に関しては無農薬野菜あるいは有機野菜とするものも認められたが、具体的な野菜の種類に関しては特定が困難であった。キムチの寄生虫卵検査は、2011 年度以降も検査機関で実施されているが、虫卵は 2005 年度に 1 機関において 1 検体から検出されただけであり、通常の食品における汚染頻度は低いものと想定された。中国および韓国原産の輸入キムチ計 5 検体について寄生虫卵検査を行ったが、人体寄生性の虫卵は検出されなかった。同様に、北海道で市販される行者ニンニク 41 検体を対象に寄生虫卵検査を行ったが、いずれの検体も陰性で、エキノコックス虫卵も検出されなかった。

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌