

対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究

ボツリヌス菌の食品内動態及び食品内毒素の *in vitro* 定量的検出方法の探索を行った。ある「たくあん」製品におけるボツリヌス菌の増殖は認められなかったが、生存は長期的に認められ、食品汚染時のリスク低減を目的として、継続的な調査が必要と考えられた。また、食品の特性として、本菌の増殖には窒素源・炭素源が必要であるため、これらの栄養特性の精査を根拠とした、食品の危害分類の可能性が示唆された。ボツリヌス毒素検出法として、FRET法による検討を進め、動物毒性試験法との比較を行った。A型毒素については同等の検出感度を示したが、B型毒素については改善の余地があることが明らかとなった。

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

本最終規則は Farm-to-Fork 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始めとする生鮮食品に関しても細かく基準が定められている。灌漑に使用する用水や堆肥に関する規定から現場作業者の意識啓蒙活動に関する規定まで含まれており、包括的な内容となっている。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、一次生産段階における汚染対策を含め、Farm-to-Fork 全体に亘る包括的な対応が望まれる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Kanki M, Naruse H, Taguchi M, Kumeda Y. (2015) Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. *Int J Food Microbiol.* 211: 18-22.
- 2) 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.* 35: 458-465.
- 3) Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S. (2016) Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety.* doi: 10.1111/jfs.12256
- 4) 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。(2015) わ

が国における土壌媒介寄生中症、特に回虫症の発生とその汚染源の文献的および検査期間データに基づく調査。食品衛生研究。65: 37-41.

- 5) 堀内朗子、荒川京子、秋庭達也、吉田建介、平田史子、松本奈保子、丸山弓美、奥津敬右、朝倉宏、杉山広。(2015) ストマッカーを利用した野菜等の回虫卵検査法の検討。食品衛生研究。65:45-50.
2. 学会発表
 - 1) 橘理人、吉村昌徳、山本詩織、春日文子、五十君静信、朝倉宏：衛生規範改正前後における市販浅漬け製品の指標菌数ならびに菌叢動態に関する比較検討。第42回日本防菌防黴学会総会。2015年9月、大阪。
 - 2) 吉村昌徳、磯陽子、橘理人、須田貴之、小西良子、春日文子、五十君静信、朝倉宏：芽物野菜の種子における微生物汚染と、発育に応じた菌叢動態に関する検討。第42回日本防菌防黴学会総会。2015年9月、大阪。
 - 3) 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。
 - 4) 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。

H. 知的財産権取得状況

該当なし

II. 分担研究報告

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
「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

分担課題名：細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株の性状と汚染除去法に関する研究」

研究分担者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部
研究協力者 神吉政史 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部
研究協力者 中村寛海 大阪市立環境科学研究所 調査研究課
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：

平成 25 年度に実施した市販浅漬の培養検査で *Listeria monocytogenes* が検出された浅漬製造の 3 施設（A、B、C 社）とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者の協力を得て、製造環境の改善に向けた調査を行った。その結果 3 施設ともに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 *L. monocytogenes* が検出され、汚染箇所が明らかになった。分離株の遺伝子型別を通じ、施設毎に類似した遺伝子型が確認され、施設内で本菌による汚染が持続していたと推察された。複数回の調査ならびに改善指導を行った A、B 社では、*L. monocytogenes* 対策についての理解が深まり、製品の *L. monocytogenes* 陰性化が実現した。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、モニタリングが実行されること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。この結果を今後の衛生対策に反映させていきたい。

A. 研究目的

近年、サラダや漬物などの非動物性食品を原因食とする食中毒事件が多く発生している。しかし、それら食品の定量的な細菌汚染実態は十分に把握されていない。そこで本研究では市販の非動物性食品中の、病原菌を含む細菌数を定量し、食品ごとのデータを解析して食品の衛生管理基準の策定に役立てるための実態調査を行なうこととした。

平成 25 年度は市販の野菜浅漬における細菌汚染実態調査を行い、一部の製品において、*L. monocytogenes* が継続的に検出される実態を把握した。

平成 26 年度は浅漬の衛生対策に役立てることを目的として、これらの汚染が認められた製造施設への立ち入り調査を、管轄自治体の協力を得て行い、同製造環境の検証を行った。

今年度は製造環境が改善された 1 施設

(施設 B) の調査経過の詳細を主に報告する。合わせて本研究で分離された *L. monocytogenes* の菌株解析成績についても報告する。

B. 研究方法

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)法およびリボプリンターシステム(Dupont)による解析を実施した。

C. 研究結果

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(表1)。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ヵ月前に、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（表 2）。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。

施設 C は平成 26 年 7 月に調査を行った（表 3）。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 1band 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。B2 以外の電気泳動パターンを図 1 に示す。

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。（表 4）。

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（表 5）。

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（表 6）。

4) リボプリンターシステムによる解析

施設 A では 36 株の Ribogroup が I,II,III,IV,V に型別され、多様な型が存在していた。そのうち、Ribogroup I と II が施設を持続汚染していると考えられた（表 4）。

施設 B の 23 株では、検体採取時期が異なっても同じ Ribogroup VI 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（表 5）。

施設 C では、Ribogroup IV と VI の 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（表 6）。

D. 考察

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ーム形成を果たすが、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、それ以外にも作業者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。

E. 結論

浅漬製造の3施設（A、B、C社）の協力を得て、製造環境の改善に向けた調査を行った。その結果3施設ともに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 *L. monocytogenes* が検出され、汚染箇所が明らかになった。分離株の遺伝子型別を通じ、施設毎に類似した遺伝子型が確認され、施設内で本菌による汚染

が持続していたと推察された。複数回の調査ならびに改善指導を行ったA、B社では、*L. monocytogenes* 対策についての理解が深まり、製品の *L. monocytogenes* 陰性化が実現した。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、モニタリングが実行されること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。この結果を今後の衛生対策に反映させて行きたい。

F. 研究発表

（誌上発表）

- 1) Kanki M, Naruse H, Taguchi M, Kumeda Y. (2015) Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. *Int. J. Food Microbiol.* 211,18-22.
- 2) Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S. (2016) Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety*. doi: 10.1111/jfs.12256

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 施設 B の *L. monocytogenes* 調査成績

場所	検体名	1 回目			2 回目			3 回目	
		検体 No.	検出	菌数*	検体 No.	検出	菌数	検体 No.	検出
下処理室	壁部分の床の水	12	—						
	8 つ切りカッターの菌	17	—						
	カッター横の排水溝周り	18	—						
	床のホースの外側	19	—						
	下漬前タンク 上部内壁	25	—		27	—			
冷蔵室	床	15	+	30	28	+	<10	43	—
			1/2a,3a			1/2a,3a			
	下漬タンク 外側	16	+1/2a	10	29	—			
	下漬タンク 内壁	7	—						
	下漬タンク 水抜き部分	8	—						
	重し板(合成樹脂製)	6	—				45	—	
	重し板(ステンレス製)						42	—	
	コンテナ	4	—						
	ザル	5	—						
	計量器の上皿	1	—		32	—	52	—	
	計量器を置く作業台	2	+3a	<10	33	—	51	—	
包装室	包装機(コンベア入口)	3	+1/2a	10	34	—			
	包装機(コンベア中腹)				35	—			
	重しを押さえる棒(内側)	9	+3a	10	31	—			
	重しを押さえる棒(外側)						44	—	
	包装機 (調味液充填ノズル)	10	+	180	36	+	<10	46,47	—
			1/2a			3a			
	包装機(ヒートシート部分)	24	+	50	37	—	53	—	
			1/2a,3a						
	包装機(スライダ一部分)	21	+	760	38	+	<10	48	—
			1/2a,3a			1/2a			
	包装後に乗るコンベア				39	—	49	—	
	包装機の下床	23	+	40	40	+	30	50	—
			1/2a,3a			1/2a			
食品	原材料 茄子(洗浄前)	13	—						
	原材料 茄子(洗浄後)	14	—						
	カット後茄子	26	—						
	下漬終了後の茄子	11	+3a	<10	30	—			
	調味液	20	—						
	最終製品	22	+1/2a	<10	41	—		54	—

*算出限界はふきとり水で 100 cm³中 10 CFU、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 10 CFU である。

表 2 施設 A の *L. monocytogenes* 調査成績

場所	検体名	1回目			2回目		
		検体 No.	検出	菌数*	検体 No.	検出	菌数
下処理室	カッターの菌	3	—				
	カットしたみぶながはいるタンク	4	—				
	みぶなの根本を切るまないた	10	—				
	シャワーコンベアの洗浄中の水	11	—				
	シャワーコンベアの排水	12	—				
	カットしたみぶなを上げる台	13	—				
	カットしたみぶなを上げる台の下 の水	14	—				
	塩漬タンク内の水（使用前）	16	—				
冷蔵室	床	9	+	90	36	+	<10
	塩漬タンクの上澄液	8	—			1/2a	
下漬洗浄 室	塩漬みぶなを洗った水の廃液	7	—				
	計量カップを置く台	24	+	10	28	—	
包装室	計量カップ	25	+	<10	29	—	
	包装機 袋を回す部分	17	+1/2a	40			
	包装機 塩漬みぶな投入部分	18	+1/2a	<10	34	—	
	包装機 袋を開ける部分	19	+1/2a	10	31	—	
	包装機 調味液注入口				30	—	
	調味液廃液	23	+	60	35	—	
	包装機の下 の床	21	+	60	33	+3b	10
	包装機 作業台の下 作業台の下 の床	22	—		32	+3b	35
	計量前のみぶなが浸かっていた 塩水	26	—				
	食品	原材料みぶなの根本、葉	1,2	—			
洗って水を切ったみぶな		6	—				
塩漬時使用する氷		15	—				
塩漬したみぶな		5	—				
しょうがと唐辛子		20	—				
最終製品		27	+	50	37	—	

*算出限界はふきとり水で 100 cm³中 10 CFU(2 回目調査は 5CFU)、食品検体で

1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 10 CFU である。

表 3 施設 C の *L. monocytogenes* 調査成績(調査日 2014.07.24)

場所	検体名	検体 No.	検出	菌数*
	1F 塩漬け用シンク内塩水	1	-	
	1F 下準備用まな板	2	+1/2a	98
	1F 製造所内真空パック機横床	3	+1/2a	<10
	1F かぶらアク抜き用水	4	-	
下処理室	1F フードスライサー回転軸(根菜用)	5	-	
	1F フードスライサーベルト(根菜用)	6	-	
	1F 洗浄機(葉物用)金網ベルト	7	-	
	1F かぶらの皮(廃棄分)	8	-	
	1F きざみかぶら用スライサー刃	9	-	
	2F 冷蔵チャンバー内床	10	+3a	<10
冷蔵室	2F 冷蔵チャンバー内コンテナ	11	-	
	2F 冷蔵チャンバー内タルキヤリー	12	+1/2a,3a	1.1×10^6
	2F 冷蔵チャンバー内床たまり水	13	+1/2a,3a	78
	2F 作業台	14	-	
	2F 充填機袋とリアーム	15	-	
	2F 充填機投入口	16	-	
包装室	2F 充填機本体	17	+1/2a	
	2F 調味液	18	-	
	2F 充填機本体かど	19	+1/2a	1.1×10^3
	2F ターンテーブル(充填前漬物入れるカップ置き)	20	-	
	2F 充填前漬物入れるカップすすぎ水	21	-	
	最終製品(かぶら漬)	22	-	
食品	最終製品(〇〇漬)	23	-	
	最終製品(白菜漬)	24	+1/2a	<10

*算出限界はふきとり水で 100 cm³ 中 1 CFU、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 1 CFU である。

表 4 施設 A 分離 *L. monocytogenes* の解析成績

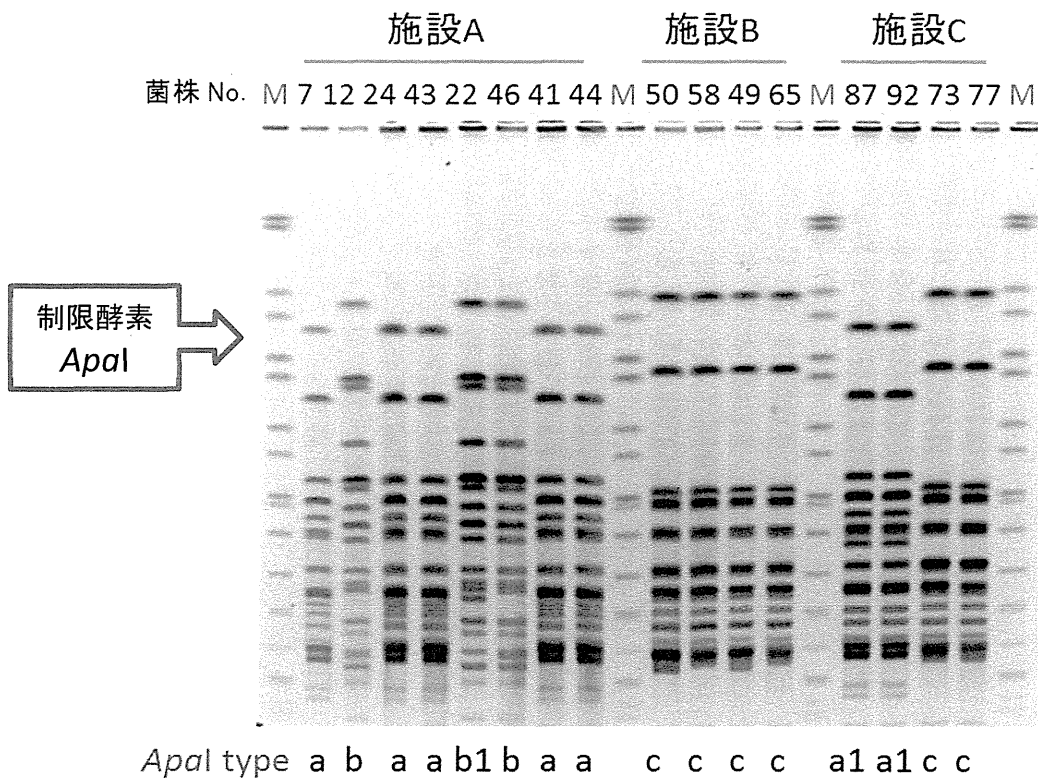
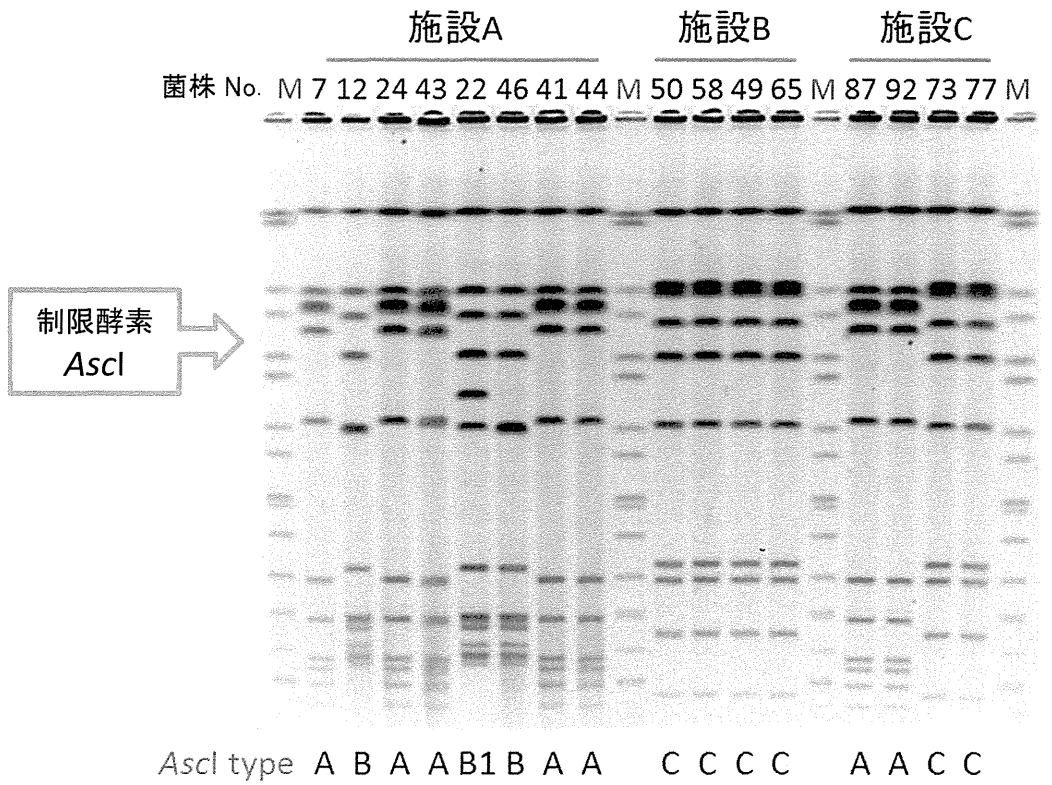
採取場所	検査日	検体 No.	検体名	菌株 No.	血清型	Ribo Group	PEGE profile		
							AscI	/	Apal
製品	2013.05.21	MH5	市販製品(みぶな)	1	1/2b	II	B2	/	b
	2013.08.19	MH19	市販製品(みぶな)	3	1/2b	II	B	/	b
				7	1/2a	I	A	/	a
	2013.10.07	MH48	市販製品(みぶな)	8,9	1/2a	I			
				10,11	1/2b	III	B	/	b
	2013.10.07	MH49	市販製品(みぶな)	12	1/2b	III	B	/	b
	2014.02.03	MH85	市販製品(みぶな)	16	1/2a	I	A	/	a
17				1/2b	II				
冷蔵室	2014.06.16	9	冷蔵室内の床	21,23	1/2a	IV	A	/	a1
				22	1/2b	V	B1	/	b1
包装室	2014.06.16	24	計量カップを置く台	38,39	1/2a	I	A	/	a
				40	1/2b	II	B	/	b
	2014.06.16	23	調味液廃液	33,37	1/2a	I	A	/	a
				34	3a	I	A	/	a
	2014.06.16	17	包装機袋を回す部分	35,36	1/2b	II	B	/	b
				24,25	1/2a	I	A	/	a
	2014.06.16	25	計量カップ	42	1/2a	I	A	/	a
				41	3a	I	A	/	a
	2014.06.16	19	包装機袋を開ける部分	27,28	1/2a	I	A	/	a
	2014.06.16	18	包装機みぶな投入部分	26	1/2a	I	A	/	a
30,32				1/2a	I	A	/	a	
2014.06.16	21	包装機の下の床	29	3a	I	A	/	a	
			31	1/2b	II	B2	/	b	
食品	2014.06.16	27	最終製品(みぶな)	43,45	1/2a	I	A	/	a
				44	3a	I	A	/	a
				46	1/2b	II	B	/	b
14 検体				36 株					

表 5 施設 B 分離 *L. monocytogenes* の解析成績

採取 場所	検査日	検体 No.	検体名	菌株 No.	血清 型	Ribo Group	PEGE profile		
							AscI	/	Apal
製品	2013.08.19	MH23	市販製品(茄子)	4	1/2a	VI	C	/	c
	2013.10.07	MH42	市販製品(茄子)	6	1/2a	VI			
	2013.10.15	MH62	市販製品(白菜)	14	1/2a	VI	C	/	c
冷蔵室	2014.06.30	16	冷蔵中の下漬タンク外側	55	1/2a	VI	C	/	c
	2014.06.30	15	冷蔵室の床	53	1/2a	VI	C	/	c
				54	3a	VI	C	/	c
				64	1/2a	VI	C	/	c
	2014.08.18	28		63	3a	VI	C	/	c
包装室	2014.06.30	2	計量器を置く作業台	47	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	3	包装機(コンベア)	48	1/2a	VI	C	/	c
	2014.06.30	9	下漬の重しを押さえる棒	49	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	10	包装機	50	1/2a	VI	C	/	c
	2014.08.18	36	(調味液充填ノズル)	65	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	24	包装機 (ヒートシート部分)	61	1/2a	VI	C	/	c
				62	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	21	包装機(スライダー)	56	1/2a	VI	C	/	c
				57	3a	VI	C	/	c
	2014.08.18	38	包装機(スライダー)	66	1/2a	VI	C	/	c
	2014.06.30	23	包装機の下 の床	59	1/2a	VI	C	/	c
				60	3a	VI	C	/	c
	2014.08.18	40		67	1/2a	VI	C	/	c
食品	2014.06.30	11	中間製品 (下漬後の茄子)	52	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	22	最終製品(茄子)	58	1/2a	VI	C	/	c
18 検体				23 株					

表 6 施設 C 分離 *L. monocytogenes* の解析成績

採取場所	検体 No.	検体名	菌株 No.	血清型	Ribo Group	PEGE profile		
						AscI	/	Apal
下処理室	2	1F 下準備用まな板	68,69,70	1/2a	VI	A	/	a1
	3	1F 製造所内 真空パック機横床	71,72	1/2a	VI	A	/	a1
冷蔵室	10	2F 冷蔵チャンバー内床	73,74,75	3a	VI	C	/	c
	12	2F 冷蔵チャンバー内	76,79	1/2a	IV	A	/	a1
		タルキヤリー	77,78,80	3a	IV	C	/	c
13	2F 冷蔵チャンバー内 床たまり水	81,84,86 82,83,85	1/2a 3a	IV IV	A C	/ /	a1 c	
包装室	17	2F 充填機本体	87,88	1/2a	IV	A	/	a1
	19	2F 充填機本体かど	89,90,91	1/2a	IV	A	/	a1
食品	24	最終製品(白菜)	92,93	1/2a	IV	A	/	a1
8 検体			26 株					



M : *Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain

図1 *Listeria monocytogenes* の PEGE profile

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）

「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

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

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
研究協力者	吉村昌徳	日本冷凍食品検査協会関西事業所
研究協力者	須田貴之	日本食品分析センター大阪支所
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	橘 理人	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	小西良子	麻布大学 生命・環境科学部
研究協力者	倉園久生	帯広畜産大学 畜産衛生学専攻
研究協力者	牧野壮一	京都聖母女学院短期大学
研究協力者	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：本研究では、衛生規範の改正前後に市販された同一の浅漬け計8製品を対象として、衛生指標菌汚染実態ならびに構成菌叢に関する比較検討を行った。改正前後で各製品6検体（計96検体）を対象に指標菌数の比較を行ったところ、7製品で改正後に有意な大腸菌群数の低下を認めた。これに対し、乳酸菌数については、7製品を除き改正後に有意な増加を示した。大腸菌については何れの製品もサンプリング時期に関わらず、陰性であった。16S rRNA pyrosequencing法による菌叢解析の結果として、計6製品では、改正後検体において *Roseateles* 属菌の構成比率に明瞭な減少を認めると共に、4製品では改正後に *Leuconostoc* 属菌の構成比率の上昇を認める等、改正前後で構成菌叢の顕著な変動を示す製品が多数を占めた。規範の改正を通じ、大腸菌群数の増加を示した1製品については、優勢菌叢が *Leuconostoc* 属より *Buttiauxella* 属へと変動を認めた。後者については、大腸菌群に分類されることから、規範改正後における同菌数の増加は、本属菌によるものと推察された。本研究の成績より、衛生規範の改正に伴い、供試製品の細菌学的衛生状況は改善されたことが実証された。また、大腸菌群には複数の植物性常在菌叢が含まれることから、浅漬け等、原材料由来菌叢を包含する非動物性食品に係る衛生指標としては望ましくはなく、大腸菌等がこれに代わり得るものと想定された。

A. 研究目的

非動物性の加工食品の中で、浅漬けについては、北海道で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事例をはじめとして、サルモネラ属菌やリステリア・モノサイトゲネス等の病原細菌による食品汚染ならびに食中毒発生事例が報告されている。

生鮮野菜あるいは軽度の加工調理野菜は、植物が元来保有する栄養成分の摂取が図ら

れることがメリットとして認識されてきたため、その消費量も増加傾向にあるが、これに応じて当該食品の喫食に伴う食中毒事例も増加傾向にあり、その対策が求められている。

2012年に発生した白菜の浅漬けを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事例を契機として、厚生労働省

では、漬物の衛生規範を改正し、同食品の製造工程における衛生管理対策が周知されてきた。本研究班では、これまでに衛生規範改正直後に、浅漬け製造施設の協力を得て、製造工程の実態検証に係るパイロットスタディを行い、塩素消毒及び塩蔵工程が病原細菌汚染制御に有効に機能する実態を検証してきた。しかしながら、同施設の規範前の衛生管理実態については不明である他、改正を通じた市販製品の衛生実態についても不明であることから、本研究最終年度では、衛生規範前後に流通した、計 8 製品・96 検体の市販浅漬け製品を対象に、主要指標菌の定量及び構成菌叢解析を行い、衛生状況に関する比較検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

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、滅菌鋏を用いて細切後、90mL の緩衝ペプトン水（BPW）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（Violet Red Bile Lactose）寒天培地、MRS

寒天培地（何れも Oxoid）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（メルクーミリポア）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、799f/1115r プライマーを用いて 16S rRNA 部分領域を PCR 増幅し、E-gel Size Select 及び AMPure XP を用いて精製した。DNA 濃度を定量後、計 48 検体より抽出した PCR 増幅産物を混合し、Ion Chef/ Ion PGM system (Thermo Fisher Scientific) を用いた Pyrosequencing に供した。

4. 菌叢データ解析

出力された fastaq ファイルについて、検体別に分離・不要配列除去後、fasta ファイルに変換し、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。バーチャートの作成等においては、METAGENOME@KIN (ワールドヒュージョン) を用いた。

C. 結果

1. 衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品における衛生指標菌の動態比較
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 種の浅漬け製

品を対象として、製品・サンプリング時期の別にそれぞれ6検体（計96検体）における衛生指標菌数を直接塗抹法により求め、改正前後での各製品の衛生状況に関する知見の収集をはかった。サンプリング時期別の比較成績概要については、表1に記す。

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、製品別での比較を通じ、同数値の多くは製品 No. 5 に因るものであることが明らかとなり、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を比較検討したところ、有意差をもって減少傾向を示した ($p < 0.05$)。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。

乳酸菌数については、改正前の平均値が 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）において有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。一方、製品 No. 2 および No. 3 における乳酸菌数は、改正後に減少を示した。

以上の結果より、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.（6.59%）、*Methylobacterium* spp.（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.（32.52%）、*Lactobacillus* spp.（23.60%）、*Buttiauxella* spp.（11.20%）、*Pseudomonas* spp.（5.87%）、*Sphingomonas* spp.（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（図1）。

(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. 等があった。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（図1）。

(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*, *Tetragenococ*

cus, *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 (Saeedi et al., 2015)。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 (表 2)。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 (De Roever 1998)。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 (データ未載)。

D. 考察

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。

衛生指標菌数に関する検討を通じ、大腸菌群については複数製品において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。改正前に優勢菌叢として同定された、*Roseateles* spp., *Rhizobium* spp., 及び *Sphingomonas* spp. については、生鮮野菜・果実より高頻度に分離されている (Enya et al. 2007) 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 (Lai et al., 2001; Kilic et al., 2007)。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。当該菌については、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 (Coats and Rumpho, 2014; Balzer et al., 2010)。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ルム形成等を介して、酸等の環境ストレスに抵抗性を示す (Kubota et al., 2009) 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 (Arioli et al., 2013) 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。

漬物の衛生規範改正に伴う製造工程管理の在り方を考える上では、HACCP 導入についても考慮する必然性がある。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、同基準の設定については、今後の我が国における生鮮野菜あるいは軽度の加工を行う非動物性食品の製造基準の在り方を議論・整理する必要があるだろう。

E. 結論

本研究では、市販浅漬け計 8 製品を対象として、衛生規範改正前後での衛生状況の比較を行うため、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

・Asakura H, Tachinaba M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S. Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety*. In press. doi: 10.1111/jfs.12256

2. 学会発表

・橘理人、吉村昌徳、山本詩織、春日文子、五十君静信、朝倉宏. 衛生規範改正前後における市販浅漬け製品の指標菌数ならびに菌叢動態に関する比較検討. 第 42 回日本防菌防黴学会総会. 2015 年 9 月. 大阪.

・吉村昌徳、磯陽子、橘理人、須田貴之、小西良子、春日文子、五十君静信、朝倉宏. 芽物野菜の種子における微生物汚染と、発育に応じた菌叢動態に関する検討. 第 42 回日本防菌防黴学会総会. 2015 年 9 月. 大阪.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- Arioli S, Elli M, Ricci G, Mora D. 2013. Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *Int. J. Food Microbiol.* 163:1-5.
- Balzer M, Witt N, Flemming HC, Wingender J. 2010. Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Sci. Technol.* 61:1105-11.
- Coats VC, Rumpho ME. 2014. The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Front Microbiol.* 23:368.
- De Roever C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control.* 9:321-47.
- Enya J, Shinohara H, Yoshida S, Tsukiboshi T, Negishi H, Suyama K, Tsushima S. 2007. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microb. Ecol.* 53:524-36.
- Kilic A, Senses Z, Kurekci AE, Aydogan H, Sener K, Kismet E, Basustaoglu AC. 2007. Nosocomial outbreak of *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in a hemato/oncology unit. *Jpn J Infect Dis.* 60:394-6.
- Kubota H, Senda S, Tokuda H, Uchiyama H, Nomura N. 2009. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiol.* 26:592-7.
- Lai CC, Teng LJ, Hsueh PR, Yuan A, Tsai KC, Tang JL, Tien HF. 2004. Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 38:149-53.
- Saeedi M, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Yazdi FT. 2015. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Winter Salad (Local Pickle) during Fermentation Using 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *J. Food Safety.* 35:287-94.

表 1. 衛生規範改正前後間での市販浅漬け製品における衛生指標菌数の比較.

生菌数							
No.	主原料	施設	衛生規範改正前		衛生規範改正後		p 値*
			平均値±SD (CFU/g)		平均値±SD (CFU/g)		
1	白菜	A	4.47E+03	± 1.20E+03	4.25E+03	± 6.60E+02	0.35409
2	白菜	A	1.27E+04	± 1.90E+03	8.31E+03	± 4.88E+03	0.04217
3	胡瓜	A	5.10E+05	± 1.12E+06	3.72E+03	± 5.34E+02	0.16013
4	茄子	A	7.67E+02	± 3.34E+02	3.70E+03	± 8.05E+02	0.00005
5	茄子	A	1.85E+07	± 6.28E+06	1.34E+07	± 2.92E+06	0.05596
6	茄子	B	2.33E+02	± 2.16E+02	6.93E+04	± 7.92E+04	0.04290
7	大根	C	7.81E+03	± 7.70E+03	3.75E+04	± 1.92E+04	0.01100
8	野沢菜	D	1.10E+06	± 1.28E+06	2.90E+06	± 1.74E+06	0.03589
平均菌数(CFU/g)			2.52E+06	± 6.48E+06	2.05E+06	± 4.57E+06	0.34153

大腸菌群数							
No.	主原料	施設	衛生規範改正前		衛生規範改正後		p 値*
			平均値±SD (CFU/g)		平均値±SD (CFU/g)		
1	白菜	A	2.71E+03	± 1.26E+03	1.67E+01	± 4.08E+01	0.00162
2	白菜	A	8.58E+02	± 2.87E+02	2.00E+02	± 3.03E+02	0.00159
3	胡瓜	A	4.03E+02	± 2.50E+02	0.00E+00	± 0.00E+00	0.00541
4	茄子	A	2.00E+02	± 7.07E+01	0.00E+00	± 0.00E+00	0.00048
5	茄子	A	5.97E+03	± 4.27E+03	2.06E+05	± 7.26E+04	0.00054
6	茄子	B	1.26E+02	± 1.99E+02	0.00E+00	± 0.00E+00	0.09153
7	大根	C	1.17E+02	± 7.53E+01	1.67E+01	± 4.08E+01	0.01099
8	野沢菜	D	3.78E+03	± 2.38E+03	5.00E+01	± 5.48E+01	0.00603
平均菌数(CFU/g)			1.77E+03	± 2.64E+03	2.57E+04	± 7.27E+04	0.01349

乳酸菌数							
No.	主原料	施設	衛生規範改正前		衛生規範改正後		p 値*
			平均値±SD (CFU/g)		平均値±SD (CFU/g)		
1	白菜	A	6.25E+05	± 1.96E+05	5.93E+05	± 3.41E+05	0.42258
2	白菜	A	4.00E+05	± 1.95E+05	1.70E+05	± 4.85E+04	0.01660
3	胡瓜	A	5.55E+03	± 2.24E+03	2.50E+02	± 1.05E+02	0.00107
4	茄子	A	1.93E+02	± 9.03E+01	2.83E+02	± 4.31E+02	0.31808
5	茄子	A	4.39E+05	± 3.07E+05	4.40E+06	± 1.41E+06	0.00038
6	茄子	B	8.22E+03	± 1.03E+04	1.65E+05	± 1.43E+05	0.02173
7	大根	C	1.06E+05	± 6.88E+04	7.44E+05	± 2.05E+05	0.00016
8	野沢菜	D	9.52E+05	± 6.88E+05	1.86E+06	± 7.15E+05	0.02398
平均菌数(CFU/g)			3.17E+05	± 4.22E+05	9.93E+05	± 1.52E+06	0.00227

*採材時期の違いによる数値の有意差を求めるため、本研究では *t* 検定を用い、*p* 値が 0.05 以下の場合を有意差があると判定した (太字で示す)。