

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 (図 6) 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。

## II. 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

ボツリヌス菌の増殖に求められる酸素濃度条件に関して検討を行った。結果として食品マトリックス内でボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度は概ね 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 (J Food Prot. 2005. 68: 1005-11)。本研究においては、食品マトリックスを用いた検討は行っていない他、実際の食品にあっては、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有効と思われた。

## III. 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)

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、日本においてもマウス毒性試験法が公定法に採用されている。マウス毒性試験法は検出感度が高く、この方法で測定された LD50 値を 1 U とし、ボツリヌス毒素量表記の基準となっている。しかしながらマウス毒性試験法は動物実験であることから、施設、動物倫理などの多くの面から制約があり、食品の安全性を試験する方法としてこのマウス毒性試験法が一般検査機関で実行できる状態にないのが現状である。このような背景から、マウス毒性試験法の代替法となる、動物を使用せず、かつ、通常の検査施設で実施可能な高感度なボツリヌス毒素の定量的検出法が必要とされている。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 等の *in vitro* ボツリヌス毒素の検出法が開発されているが、現時点では、検出感度の点でマウス毒性試験法に勝る方法はない。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、PCR 法などの毒素遺伝子検出法は補能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。検出原理がマウス毒性試験法と同じであ

ることから、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、この蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用したボツリヌス毒素の *in vitro* 定量的検出法とマウス毒性試験法の感度の比較検討を行った。精製ボツリヌス A 型毒素を用いた場合、検出感度は両試験法で同等程度であり、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 型毒素を用いた場合は大きな差がみられた。予備実験的に、菌培養上清を用いた検討やトリプシンによる B 型毒素活性化処理、同社の Immunoprecipitation Kit を用いた精製/濃縮操作等も行ったが、現在の時点では感度の相違は改善できなかった。検査試料の前処理等についてのさらなる検討が必要と感じられた。

## F. 結論

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。前者については、平成 20 年に通知された指導内容を逸脱した「たくあん」製品にボツリヌス芽胞菌を添加し、経時的に食品内の菌数(クロストリジウム属菌及び生菌数)と理化学的性状値を測定した。用いた「たくあん」製品は、保管温度に関わらず 1 年間の保管期間を通して食品内 pH および酸化還元電位はボツリヌス菌の発育可能範囲であった。A 型・B 型芽胞菌の添加後、6 ヶ月目迄は添加時と同等の菌数が食品内に維持され、その後減少傾向が見られたが 1 年後においても菌は検出可能であった。さらに、「たくあん」製品に対しボツリヌス菌(栄養体)添加/保存試験を行いボツリヌス菌の食品内動態を検討したが、ボツリヌス菌の発育は認められなかった。「たくあん」製品とは異なり、菌の発育に必

要な窒素源・炭素源が豊富な「煮豆」製品にボツリヌス菌芽胞を添加し 30 °C で保存したところ、1 週間で容器の膨張が見られ、ガス産生を伴ったボツリヌス菌の顕著な増加が確認された。以上の成績より、ボツリヌス菌の食品内増殖については、食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集が必要と考えられた。

ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量法探索としては、共鳴エネルギー転移を利用した BioSentinel 社製（米国）の BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用い、マウス毒性試験法との感度の比較検討した。A 型毒素についてはマウス毒性試験法と同等の高い検出感度を示したが、B 型毒素の検出感度は、マウス毒性試験法に比べて低く、今後も継続した改良と検討が必要と考えられた。

#### G. 健康危害情報

なし

#### H. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

#### I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1: ボツリヌス菌芽胞液添加群でのクロストリジウム属菌数および生菌数

A型菌						B型菌								
保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	生菌数		クロストリジア属菌数		保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	生菌数		クロストリジア属菌数		
			cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD				cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD	
0		1	211	406 ± 213	406	418 ± 213	0		5	236	396 ± 374	1,413	1,093 ± 329	
		2	353		665				876					
		3	350		146				750					
		4	710		453				1,333					
4		13	192	225 ± 59	72	213 ± 102	4		25	359	235 ± 83	842	686 ± 140	
		14	311		207				711					
		15	215		370				689					
		16	182		273				503					
	15	25	17	1,290	1,660 ± 1,085	171	220 ± 119	15	25	28	181	1,611 ± 1,137	480	588 ± 328
			18	3,260		75				270				
			19	1,238		315				555				
			20	850		320				1,045				
30		21	563	719 ± 231	360	290 ± 95	30	30	33	563	1,603 ± 1,914	630	509 ± 236	
		22	910		185				610					
		23	480		380				640					
		24	924		235				155					
30	4	45	795	1,015 ± 726	184	137 ± 91	30	4	57	3,750	1,937 ± 2,019	264	239 ± 99	
		46	891		102				232					
		47	332		28				110					
		48	2,040		234				348					
	25		49	1,000	861 ± 109	230	283 ± 146	30	25	61	15,100	13,858 ± 9,558	432	322 ± 175
			50	885		106				290				
			51	814		106				87				
			52	745		440				477				
30		53	18,300	28,150 ± 15,882	60	88 ± 27	30	30	65	40,500	12,171 ± 19,115	356	612 ± 351	
		54	17,300		118				330					
		55	51,300		72				1,080					
		56	25,700		102				682					
100	4	77	240	530 ± 288	260	253 ± 85	100	4	89	250	865 ± 719	280	343 ± 95	
		78	850		370				1,360					
		79	690		190				360					
		80	340		190				470					
	25		81	11,050	11,695 ± 8,827	320	245 ± 62	100	25	93	13,360	6,038 ± 5,057	30	763 ± 879
			82	12,950		270				240				
			83	22,150		210				1,990				
			84	630		180				790				
30		86	1,225	6,839 ± 7,120	390	394 ± 110	30	30	97	255	2,671 ± 4,067	510	306 ± 174	
		87	11,900		325				325					
		88	14,000		550				305					
		207	230		310				85					
180	4	109	280	420 ± 145	482	467 ± 245	180	4	121	305	1,103 ± 804	1,730	1,156 ± 674	
		110	420		682				1,410					
		111	360		584				183					
		112	620		120				1,300					
	25		113	16,800	13,728 ± 8,728	154	385 ± 181	180	25	125	1,820	3,800 ± 2,124	593	1,028 ± 704
			114	15,300		485				800				
			115	21,550		334				642				
			116	1,260		565				2,075				
30		117	12,000	4,735 ± 5,360	840	488 ± 384	30	30	129	5,545	10,171 ± 15,713	342	693 ± 426	
		118	5,560		209				1,303					
		119	720		796				654					
		120	660		106				472					
270	4	141	260	515 ± 180	100	391 ± 348	270	4	154	324	435 ± 123	510	492 ± 157	
		142	580		520				515					
		143	540		119				280					
		144	680		825				391					
	25		145	1,690	8,835 ± 14,344	171	93 ± 88	270	25	158	1,815	2,670 ± 814	110	293 ± 236
			146	1,825		168				530				
			148	1,475		22				70				
			149	30,350		12				460				
30		150	36,600	9,853 ± 17,835	52	41 ± 26	30	30	161	3,615	1,576 ± 528	50	118 ± 83	
		151	590		26				60					
		152	860		14				230					
		153	1,360		71				130					
360	4	174	869	667 ± 346	67	51 ± 30	360	4	186	326	621 ± 265	331	431 ± 121	
		175	323		44				323					
		176	1,047		11				518					
		177	429		80				553					
	25		178	3,310	2,178 ± 966	8	22 ± 15	360	25	189	896	1,814 ± 1,227	10	136 ± 194
			179	2,410		12				418				
			180	2,010		28				109				
			181	980		40				6				
30		182	1,280	1,308 ± 458	12	20 ± 11	360	30	194	1,400	1,416 ± 428	48	85 ± 70	
		183	1,930		36				75					
		184	1,190		12				31					
		185	830		20				187					

表2: 芽胞液非添加群での理化学的性状値とクロストリジウム属菌数および生菌数

保存 期間	温度 (°C)	ID	pH		酸化還元電位		生菌数		クロストリジウム属菌数	
			pH	mean ± SD	mV	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD
0		9	5.18	5.15 ± 0.11	35.2	32.0 ± 7.0	96	246 ± 136	<2	<2
		10	5.00		39.4		214		<2	
		11	5.24		30.5		248		<2	
		12	5.20		23.0		425		<2	
15	4	37	5.66	5.53 ± 0.12	54.6	47.6 ± 17.8	457	389 ± 118	<2	<2
		38	5.38		58.1		415		<2	
		39	5.50		56.5		215		<2	
		40	5.59		21.0		467		<2	
	30	41	5.48	5.51 ± 0.15	51.3	53.1 ± 25.8	31,500	53,181 ± 73,290	<2	<2
		42	5.74		89.7		162,000		<2	
		43	5.39		40.0		11,400		<2	
		44	5.45		31.2		7,825		<2	
30	4	69	5.48	5.43 ± 0.12	79.6	69.6 ± 9.8	8,805	2,756 ± 4,036	<2	<2
		70	5.27		75.1		510		<2	
		71	5.55		65.9		920		<2	
		72	5.42		57.6		790		<2	
	30	73	5.37	5.42 ± 0.07	62.6	57.4 ± 11.1	3,550	9,258 ± 4,820	<2	<2
		74	5.44		67.6		7,080		<2	
		75	5.36		41.9		14,000		<2	
		76	5.52		57.6		12,400		<2	
100	4	101	4.99	5.26 ± 0.20	43.3	43.9 ± 5.7	130	380 ± 278	<2	<2
		102	5.47		51.7		160		<2	
		103	5.32		37.9		690		<2	
		104	5.24		42.8		540		<2	
	30	105	5.11	5.19 ± 0.39	43.9	40.4 ± 12.7	8,535	4,004 ± 3,245	<2	<2
		106	5.09		22.4		3,160		<2	
		107	5.74		42.9		3,490		<2	
		108	4.82		52.3		830		<2	
180	4	133	5.35	5.27 ± 0.13	41.7	38.3 ± 11.2	290	310 ± 59	<2	<2
		134	5.20		45.1		240		<2	
		135	5.40		44.8		330		<2	
		136	5.13		21.6		380		<2	
	30	137	4.96	5.22 ± 0.22	19.8	20.8 ± 3.0	200	15,260 ± 28,700	<2	<2
		138	5.11		18.1		1,660		<2	
		139	5.42		20.3		58,300		<2	
		140	5.39		25.1		880		<2	
270	4	166	5.59	5.32 ± 0.19	14.9	18.5 ± 12.4	128	205 ± 69	<2	<2
		167	5.24		17.9		166		<2	
		168	5.27		35.4		271		<2	
		169	5.16		5.9		253		<2	
	30	170	5.09	5.08 ± 0.09	10.2	24.5 ± 10.2	250	1,049 ± 856	<2	<2
		171	5.20		29.0		2,215		<2	
		172	5.03		24.9		1,120		<2	
		173	5.00		33.7		610		<2	
360	4	198	5.50	5.40 ± 0.15	20.5	4.5 ± 19.5	90	214 ± 138	<2	<2
		199	5.34		21.8		111		<2	
		200	5.53		-15.6		274		<2	
		201	5.22		-8.9		380		<2	
	30	202	4.83	5.19 ± 0.57	24.3	19.5 ± 15.9	16	6,973 ± 13,818	<2	<2
		203	4.95		37.5		65		<2	
		204	4.93		16.6		109		<2	
		205	6.05		-0.5		27,700		<2	

表3: 栄養型菌添加/保存試験でのクロストリジウム属菌数 (cfu/g of food)

菌型	試験開始時	保存温度	60日後
A	277 ± 41	4 °C	151 ± 45
		30 °C	71 ± 10
B	419 ± 61	4 °C	157 ± 40
		30 °C	95 ± 21

表4: 栄養型菌添加/保存試験での生菌数 (cfu/g of food)

菌型	試験開始時	保存温度	60日後
非添加	634 ± 233	4 °C	1,132 ± 240
		30 °C	1,332 ± 299
A	709 ± 216	4 °C	1,478 ± 595
		30 °C	2,882 ± 1,001
B	486 ± 119	4 °C	798 ± 161
		30 °C	1,169 ± 368

表5: 栄養型菌添加/保存試験理での食品内理化学的性状値

	保存温度	pH	酸化還元電位
試験開始時		5.17 ± 0.10	32.8 ± 7.2
60日後	4 °C	5.25 ± 0.04	35.6 ± 6.2
	30 °C	5.27 ± 0.13	37.4 ± 7.9

表6: BHI broth添加試験でのクロストリジウム属菌数 (cfu/g of food)

菌型	BHI添加	試験開始時	保存温度	30日後
A	-	382 ± 40	4 °C	310 ± 255
			30 °C	125 ± 7
	+	512 ± 112	4 °C	207 ± 49
			30 °C	150 ± 95
B	-	308 ± 3	4 °C	202 ± 42
			30 °C	120 ± 11
	+	607 ± 436	4 °C	113 ± 34
			30 °C	61 ± 14

表7: BHI broth添加試験での生菌数 (cfu/g of food)

菌型	BHI添加	試験開始時	保存温度	30日後
非添加	-	465 ± 131	4 °C	298 ± 113
			30 °C	1,098 ± 513
	+	420 ± 173	4 °C	660 ± 580
			30 °C	1,365 ± 290
A	-	1,046 ± 103	4 °C	2,320 ± 1,372
			30 °C	5,878 ± 6,537
	+	659 ± 353	4 °C	2,013 ± 2,190
			30 °C	2,363 ± 1,405
B	-	939 ± 301	4 °C	2,293 ± 2,097
			30 °C	1,580 ± 1,153
	+	1,170 ± 353	4 °C	957 ± 337
			30 °C	5,087 ± 1,227

表8: BHI broth添加試験での理化学的性状値

		保存温度	BHI添加	pH	酸化還元電位
試験開始時			-	5.11 ± 0.04	38.4 ± 11.0
			+	5.20 ± 0.15	23.0 ± 14.0
30日後	4 °C		-	5.29 ± 0.07	38.9 ± 14.1
			+	5.35 ± 0.54	25.1 ± 7.9
	30 °C		-	5.40 ± 0.03	43.1 ± 0.6
			+	5.42 ± 0.07	38.7 ± 4.6

表9: 主な豆類および野菜類のタンパク質、脂質、炭水化物量

		食品100 gあたりの成分量 (g)			食品100 gあたりの成分量 (g)			
		タンパク質	脂質	炭水化物	タンパク質	脂質	炭水化物	
豆類	大豆: 黄大豆 全粒 ゆで	0.148	0.098	0.084	ブコロー 生	0.043	0.005	0.052
	大豆: ぶどう豆 *	0.141	0.094	0.370	トウモロコシ ゆで	0.035	0.017	0.186
	えだまめ ゆで	0.115	0.061	0.089	たけのこ ゆで	0.035	0.002	0.055
	レンズ豆 全粒 ゆで	0.112	0.008	0.291	エリンギ ゆで	0.032	0.005	0.065
	ひよこまめ 全粒 ゆで	0.095	0.025	0.274	カリフラワー ゆで	0.027	0.001	0.051
	あおえんどう 全粒 ゆで	0.092	0.010	0.252	かぼちゃ ゆで	0.019	0.001	0.133
	あずき 全粒 ゆで	0.089	0.010	0.242	じゃがいも 蒸し	0.015	0.001	0.197
	いんげんまめ 全粒 ゆで	0.085	0.010	0.248	ごぼう ゆで	0.015	0.002	0.137
	そらまめ: お多福豆	0.079	0.012	0.522	さといも 蒸し	0.015	0.001	0.134
	にんにく 生	0.064	0.009	0.275	レンコン ゆで	0.013	0.001	0.161
	クワイ ゆで	0.062	0.001	0.272	さつまいも 蒸し	0.012	0.002	0.319
	甘ぐり	0.049	0.009	0.485	オリーブ	0.010	0.150	0.045
	ぎんなん ゆで	0.046	0.015	0.358	にんじん ゆで	0.007	0.001	0.085
	やまいも 生	0.045	0.005	0.226	だいこん 生	0.005	0.001	0.041

\* ぶどう豆 = 黒大豆 全粒 ゆで

日本食品標準成分表2015年版より抜粋

**表10：異なる酸素濃度条件下におけるボツリヌス菌の発育状況**

酸素濃度 (%)	A型菌株					B型菌株				
	62A	33A	36A	CB21	Renkon1	Okra	NH-2	67B	326-5	407-1
0.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.75	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
1.00	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図1: ボツリヌス菌芽胞液添加群でのクロストリジウム属菌の食品内動態 (菌数の経時的変動)

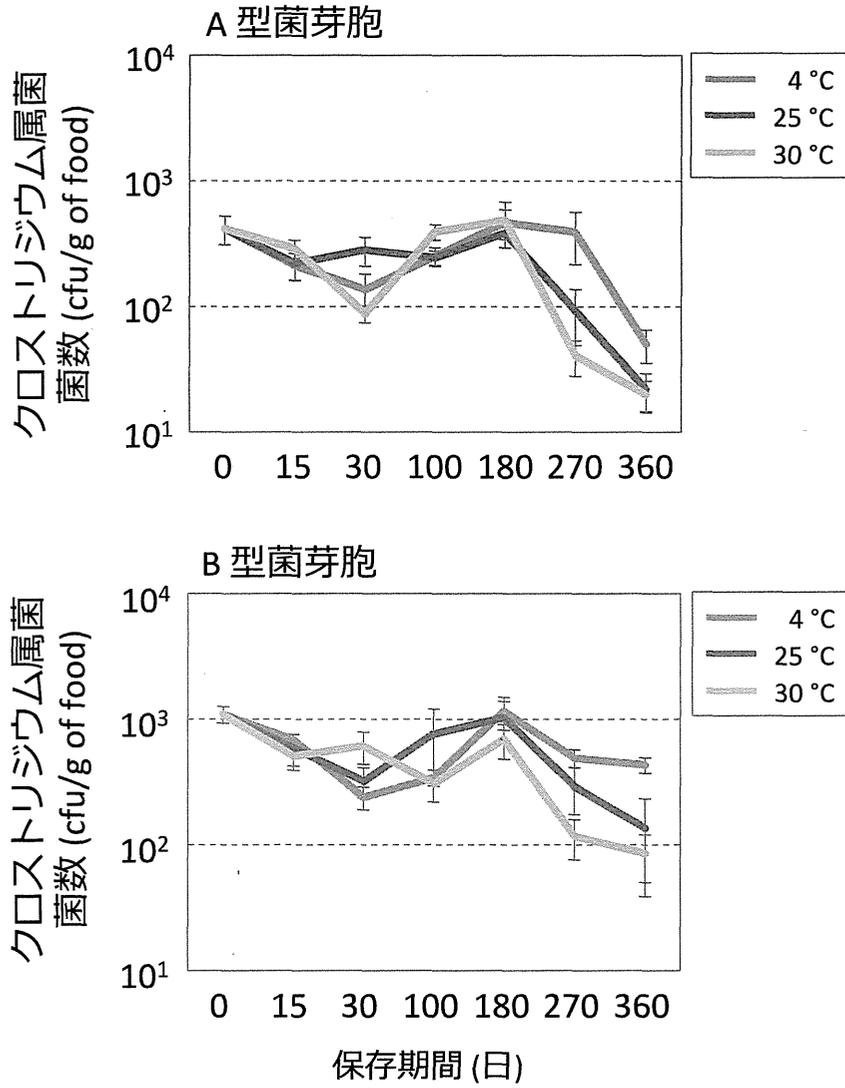


図2: ポツリヌス菌芽胞液添加試験での一般細菌の食品内動態 (生菌数の経時的変動)

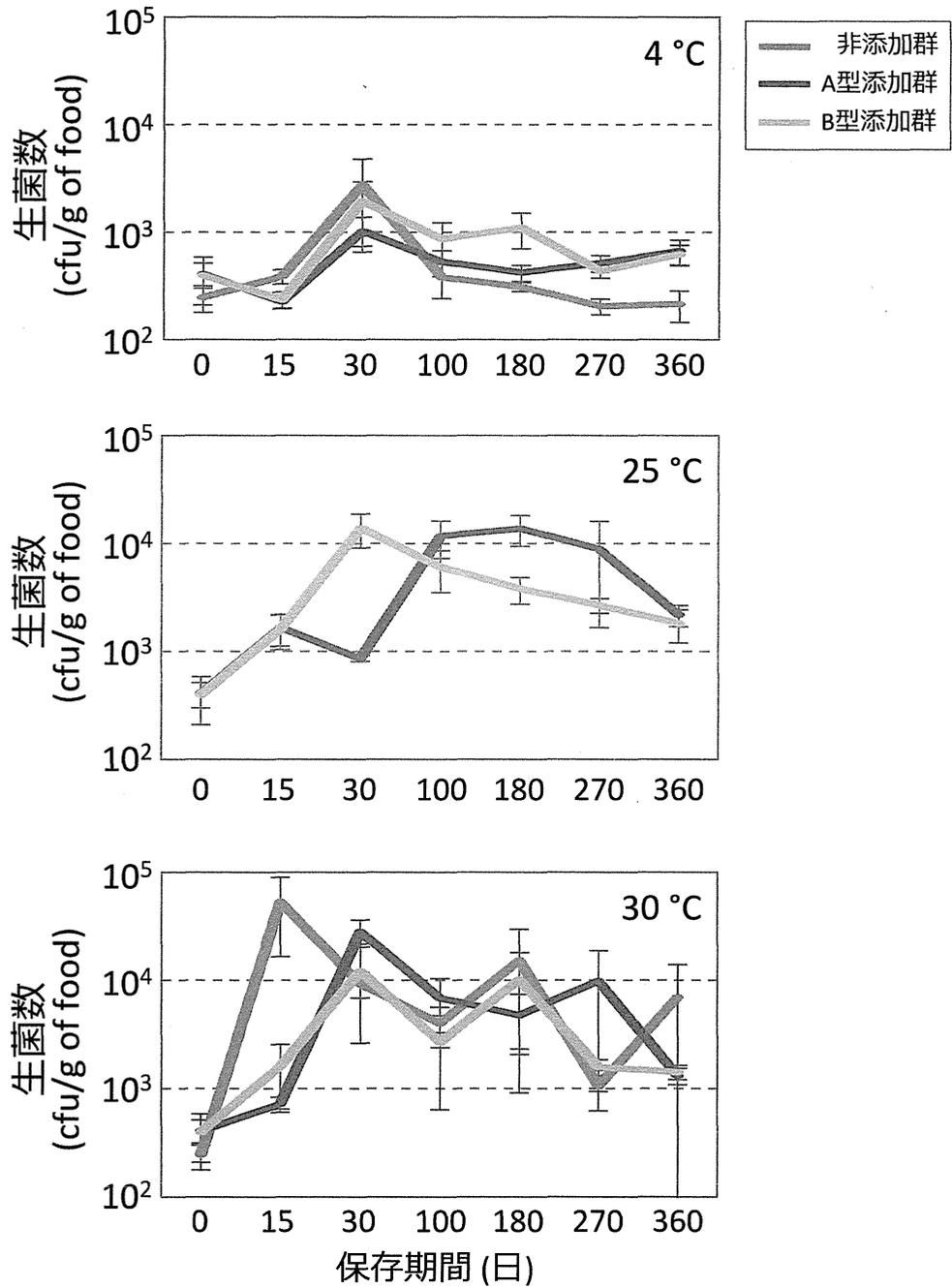


図3: ボツリヌス菌芽胞液添加試験での食品内pH値および酸化還元電位の経時的変化

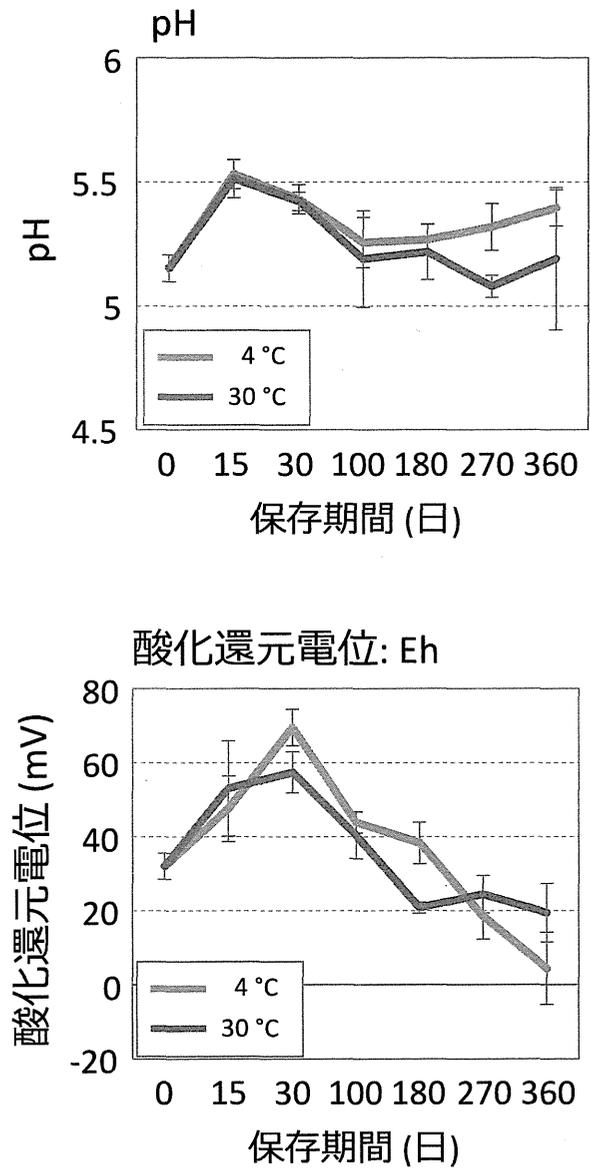


図5: FRETを利用した*in vitro* ボツリヌス毒素検出法

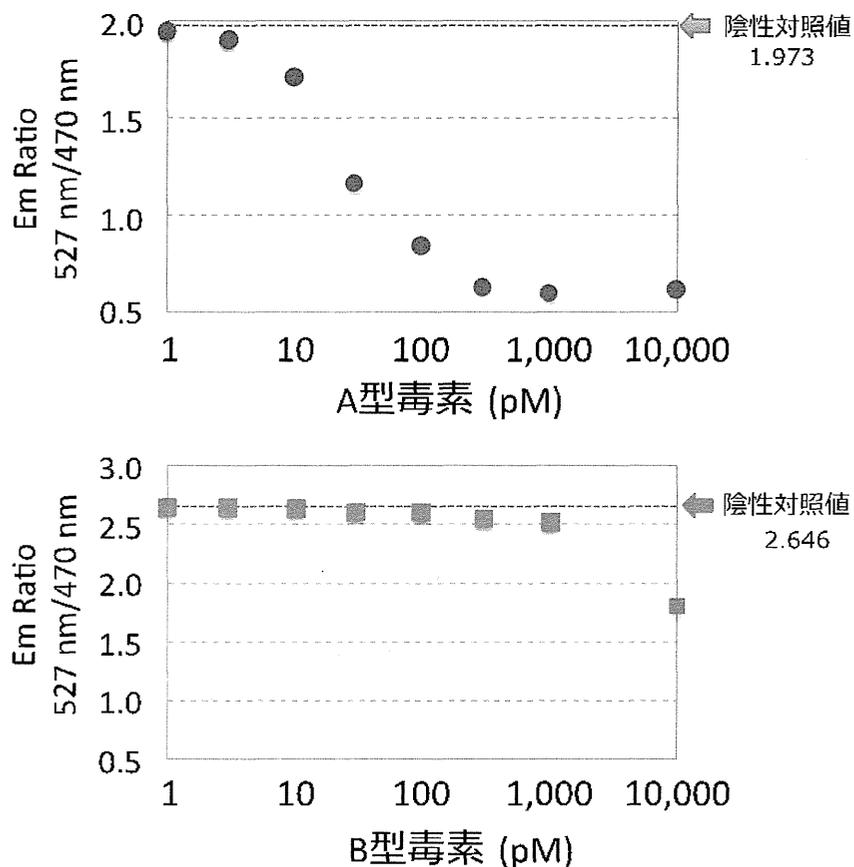
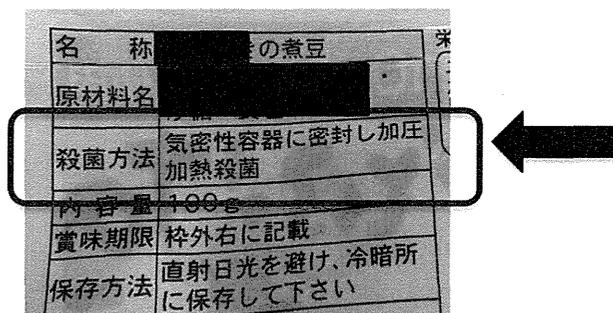


図6: 殺菌方法の表示がある容器包装詰「煮豆」製品



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

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

研究分担者 窪田邦宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室長  
研究分担者 春日文子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部部长  
研究協力者 天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨：食中毒を起こす病原微生物には腸管出血性大腸菌、ボツリヌス菌、リステリア、サルモネラ等、命に関わる重篤な症状を呈するものが数多くある。これらの病原微生物の食品汚染実態調査や各種規制をはじめとする対策は主に動物性食品を対象として進められてきたが、非動物性食品（果物・野菜等）においてもこれらの病原微生物による被害が数多く報告されている。非動物性食品を原因食品とする病原微生物アウトブレイクや非動物性食品の汚染の実態についてはこれまで詳細な解析が十分には行われていない。本研究ではこれらへの対策を含めた関連の事項について国内外の情報を収集、解析し、これにより非動物性食品の喫食におけるリスクの把握と安全対策の検討に資することを目的とした。

本年度は米国における非動物性食品に関する微生物基準の動向を把握するため、米国で 2011 年 1 月に成立した食品安全近代化法（FSMA: Food Safety Modernization Act）を実施に移すために 2015 年 11 月に米国食品医薬品局（US FDA: US Food and Drug Administration）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、関連各種資料の調査を行った。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」、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とがわかった。

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、米国や欧州連合（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。

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た。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む Farm-to-Fork 全体にわたる包括的な対応が望まれる。

#### A. 研究目的

食中毒を起こす病原微生物には腸管出血性大腸菌、ボツリヌス菌、リステリア、サルモネラ等、命に関わる重篤な症状を呈するものが数多くある。これらの病原微生物の食品汚染実態調査や各種規制をはじめとする対策は主に動物性食品を対象として進められてきたが、非動物性食品においてもこれらの病原微生物による被害が数多く報告されている。最近でも国内では2012年8月に札幌市で患者169人、死者8人が発生した、白菜の浅漬けの喫食に起因する腸管出血性大腸菌 O157 感染アウトブレイクが、2012年3月には容器包装詰低酸性食品の「あずきばっとう」の喫食によるボツリヌスアウトブレイクが発生している。2014年には静岡市の祭りの会場で販売された冷やしキュウリの喫食により患者500人、入院患者100人以上の大規模な大腸菌 O157 アウトブレイクも発生した。海外でも、米国では2011年にカンタロープメロンの喫食により、患者146人、死亡者30人、流産1人が発生する大規模リステリア症アウトブレイクが、同じく2011年にパパイヤの喫食に関連して106人が発症するサルモネラアウトブレイクが発生している。他にも2009年にはスプラウトの喫食に起因し235人が発症したサルモネラアウトブレイクが、2008年には患者1,400人以上、死亡者2名が発生した唐辛子等の喫食によるサルモネラアウトブレイクがそれぞれ報告されている。特に規模が大きいものとしては2008～2009年に発生したピーナッツバタ

ーおよびピーナッツ含有製品の喫食に起因するサルモネラアウトブレイクが挙げられ、このアウトブレイクでは全米およびカナダで700人以上が発症し、9人の死亡に関連しているとされた。この事例では多数の会社が原材料として当該汚染元企業から汚染の可能性のあるピーナッツ加工品を購入しており、それを使用して製造した製品が多岐にわたっていたことから、200社以上が17カテゴリー、2,100種類以上の製品を自主回収するという米国史上最大規模の回収となった。当該回収対象製品の一部は日本にも輸入されていた。

最近では食品流通範囲の拡大により、食品汚染による食中毒アウトブレイクが発生した場合にその被害が広範囲にわたることが多くなっている。さらに、食品原材料が海外で汚染され、その後輸入されるケースも増加しており、特に発芽野菜や生鮮果物・野菜等の加熱工程を経ずに喫食されるもの場合には、被害が遠く離れた他国で発生する可能性もある。また、汚染した食材を旅行者等が喫食し、帰国した後に発症することも考えられる。

2011年5～6月にはドイツを中心としてフェヌグリークスプラウトの喫食を原因とする腸管出血性大腸菌 O104 大規模アウトブレイクが発生し、4,000人近い患者と46人の死亡者が生じた。

米国では食品安全対策の強化による消費者保護を目的として食品安全近代化法 (FSMA: Food Safety Modernization Act、資料1参照) が2011年に1月に成立し、

それを実施に移すために「農産物の安全に関する規則(Produce Safety rule)」が2015年11月に最終規則化された(資料2参照)。本年度は、米国食品医薬品局(US FDA: US Food and Drug Administration)が刊行した「農産物の安全に関する最終規則: 必須要件」(資料3)や関連資料(資料4)を中心に文献調査を行うことで、米国における非動物性食品の微生物基準の動向を把握することを目的とした。

## B. 研究方法

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(資料3、4)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. 研究結果

「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による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年に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。農場はこの初期調査の結果から 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 O157: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まで、発芽野菜は販売できない。
- ・ 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。

- ・ 使用済み灌漑水、発芽野菜、および（または）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）と同様の規準が設定されている。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に対策をとる。

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、およ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っている。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

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

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む Farm-to-Fork 全体にわたる包括的な対応が望まれる。

#### 参考文献：

- 1) US FDA  
KEY REQUIREMENTS: Final Rule on Produce Safety  
<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/FSMA/UCM472887.pdf>
- 2) US FDA  
FSMA に関する Q and A  
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm247559.htm>
- 3) US FDA