

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行きたい。

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つ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)法およびリポ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カ月前に、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 *ApaI* 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、*ApaI* : a グループ) と Bb (*AscI* : B グループ、*ApaI* : 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、*ApaI* : c) であった（表 5）。

施設 C では 26 株を型別し、Aa (*AscI* : A、*ApaI* : 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 つ切りカッターの歯	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	+	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	+	<10	33	-		51	-
			3a						
包装室	包装機(コンベア入口)	3	+	10	34	-			
			1/2a						
	包装機(コンベア中腹)				35	-			
	重しを押さえる棒(内側)	9	+	10	31	-			
			3a						
	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-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	+	<10	30	-			
			3a						
調味液	20	-							
最終製品	22	+	<10	41	-		54	-	
		1/2a							

\*算出限界はふきとり水で 100 cm<sup>3</sup>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	カッターの歯	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	-				
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	+	40			
	包装機 塩漬みぶな投入部分	18	+	<10	34	-	
	包装機 袋を開ける部分	19	+	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	21	+	60	33	+	10
	包装機 作業台の下				32	+	35
	作業台の下	22	-				
	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 cm<sup>3</sup>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ャリア	12	+ 1/2a,3a	$1.1 \times 10^6$
	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 充填機袋とりアーム	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	$1.1 \times 10^3$
	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(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 cm<sup>3</sup>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

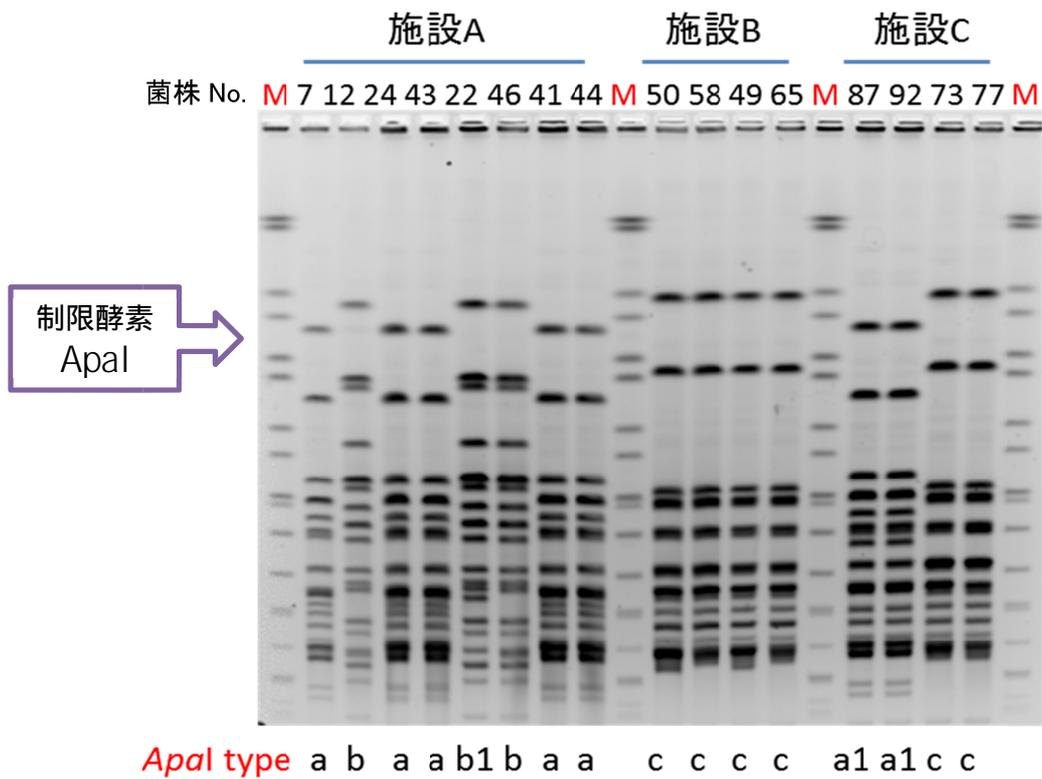
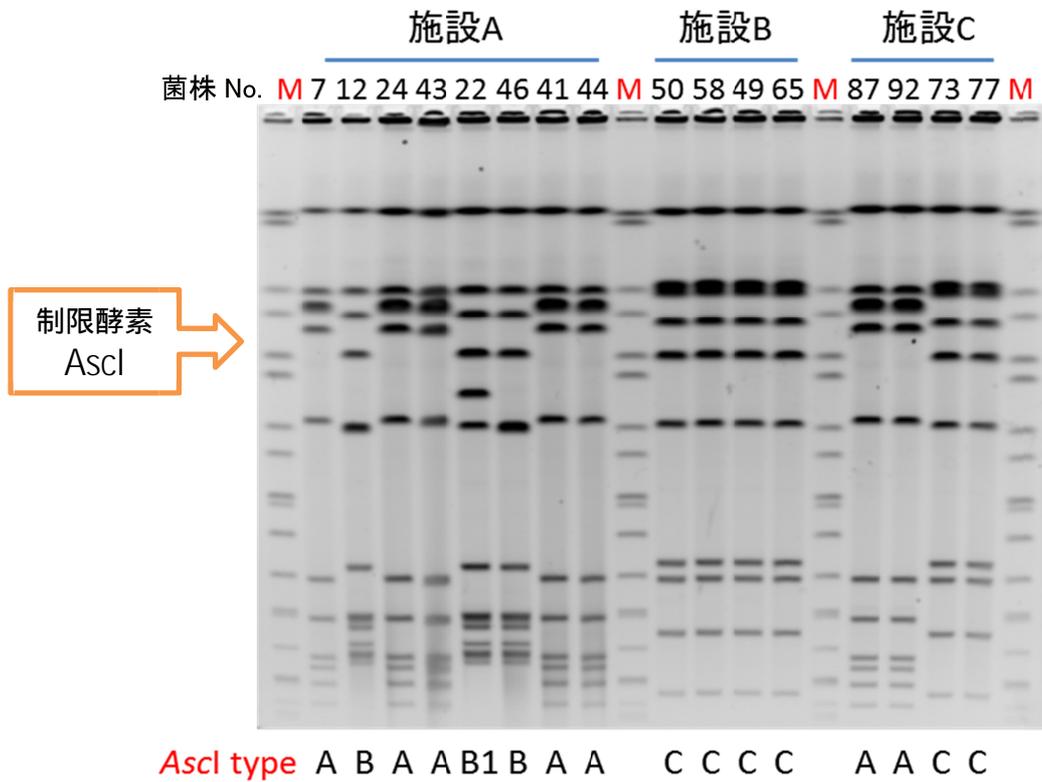
採取場所	検査日	検体 No.	検体名	菌株 No.	血清型	Ribo Group	PEGE profile		
							Ascl	/	Apal
製品	2013.05.21	MH5	市販製品(みぶな)	1	1/2b	II	B2	/	b
	2013.08.19	MH19	市販製品(みぶな)	3	1/2b	II	B	/	b
				7	1/2a	I	A	/	a
	2013.10.07	MH48	市販製品(みぶな)	8,9	1/2a	I			
				10,11	1/2b	III	B	/	b
	2013.10.07	MH49	市販製品(みぶな)	12	1/2b	III	B	/	b
	2014.02.03	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
				33,37	1/2a	I	A	/	a
	2014.06.16	23	調味液廃液	34	3a	I	A	/	a
				35,36	1/2b	II	B	/	b
	2014.06.16	17	包装機袋を回す部分	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
43,45				1/2a	I	A	/	a	
食品	2014.06.16	27	最終製品(みぶな)	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		
							Ascl	/	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		
						Ascl	/	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 冷蔵チャンパー内床	73,74,75	3a	VI	C	/	c
	12	2F 冷蔵チャンパー内 タルキャリアー	76,79 77,78,80	1/2a 3a	IV IV	A C	/	a1 c
		13	2F 冷蔵チャンパー内 床たまり水	81,84,86 82,83,85	1/2a 3a	IV IV	A 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