

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	橋 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、100 μ L 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 - 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^{-30} %, 1.05×10^{-20} %, 2.15×10^{-30} %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。

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 以下の場合は有意差があると判定した (太字で示す)。

表 2 . 衛生規範改正前後間での、主要乳酸菌構成比率の比較 .

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 (%)		平均値± SD (%)		
1	白菜	A	3.25E+00	± 2.51E+00	7.94E-01	± 2.57E-01	0.07011
2	白菜	A	4.26E+01	± 1.21E+01	1.65E+01	± 3.63E+00	0.00885
3	胡瓜	A	6.63E-01	± 3.72E-01	8.45E+01	± 9.17E+00	0.00203
4	茄子	A	5.13E-01	± 4.50E-01	7.52E+01	± 8.97E+00	0.00021
5	茄子	A	9.66E+01	± 9.29E-01	1.00E+01	± 3.39E+00	0.00001
6	茄子	B	6.28E+00	± 2.93E+00	9.89E+01	± 5.12E-01	0.00000
7	大根	C	1.92E+01	± 9.20E-01	9.67E+01	± 7.85E-01	0.00000
8	野沢菜	D	3.00E+01	± 2.76E+01	8.03E+01	± 2.18E+01	0.06713
平均値(%)			2.54E+01	± 3.23E+01	5.70E+01	± 4.04E+01	0.00522

*採材時期の違いによる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 以下の場合は有意差があると判定した (太字で示す)。

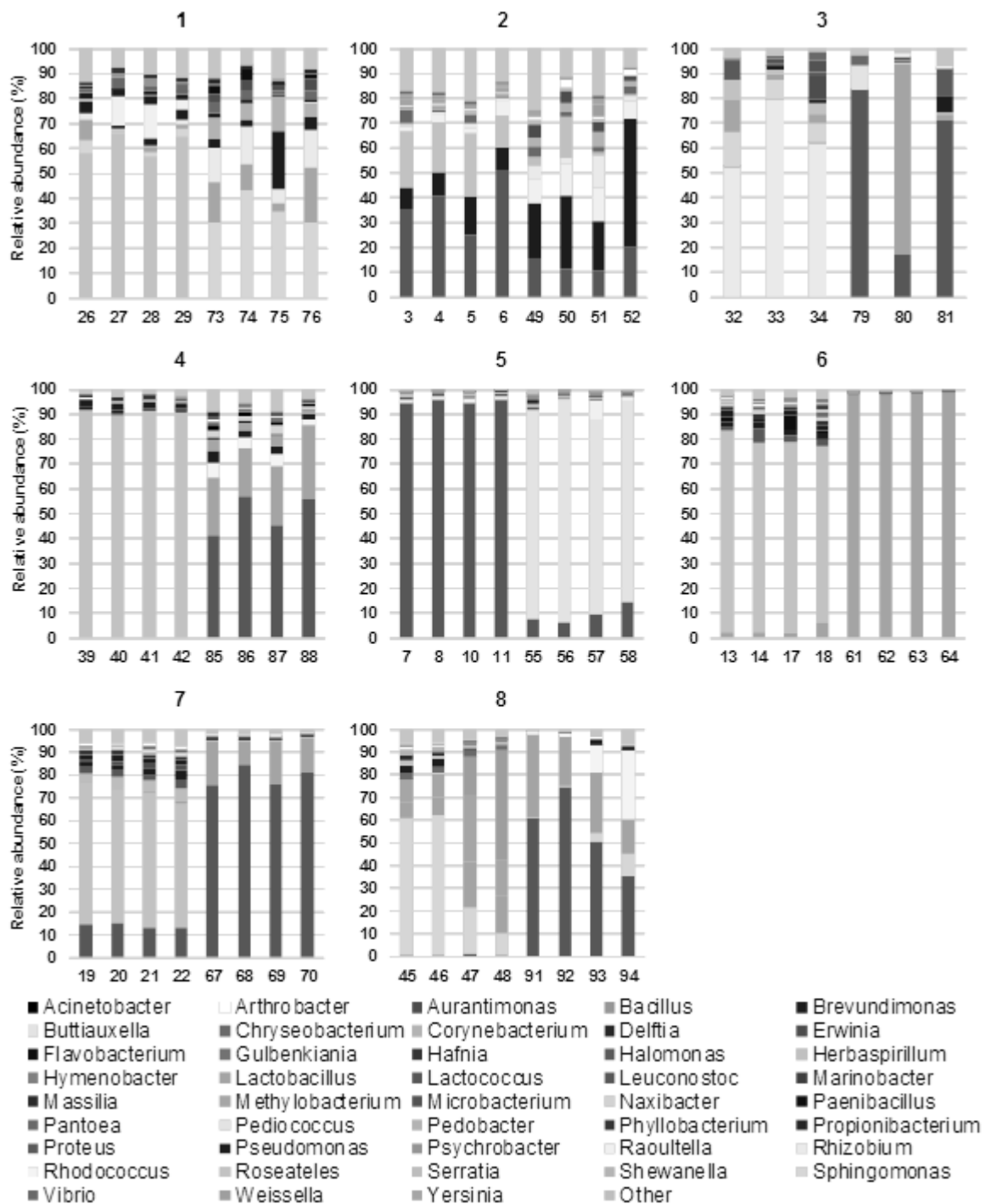


図1. 衛生規範改正前後間での市販浅漬け製品構成菌叢の比較.

各製品について、衛生規範改正前後で各3検体を無作為に抽出し、16s rRNA pyrosequencing 解析に供し、構成菌叢を同定した成績(属レベル)を示す。各製品より上位15菌属を比較対象とし、グラフ作成にあたった。