

品目によるアウトブレイクの件数が多いかをまとめた。表 15 のアウトブレイクのうち、品目カテゴリーの記載はあるが品目の記載のないもの、原因食品として 2 種類の品目の記載があるものは除外した。表 18 に結果を示す。件数の多い順（同じ場合は患者数の多い順）に示した。豆もやし（4 件）、アルファルファスプラウト（4 件）を原因食品とするサルモネラアウトブレイクが最も多く報告され、次いでレタス（3 件）、ベビースピナッチ（2 件）、緑豆もやし（2 件）、マッシュポテト（2 件）、ポテトサラダ（2 件）の順であった。患者数では、豆もやし（275 人）、レタス（231 人）、ベビースピナッチ（189 人）の順でより多くの患者発生に関連していた。

2-4. 欧州のペロ毒素産生性大腸菌（VTEC）アウトブレイク

参考文献 1 の Table 26 には 2007～2011 年に発生した非動物性食品を原因食品とする VTEC アウトブレイクとして 7 件が記載されている。このうち、原因食品の品目に関する具体的な記述がない 1 件を除いた 6 件のアウトブレイクについて、概要を表 19 に示す。表 19 のアウトブレイクのうち、フェスグリークスプラウトを原因食品とした VTEC（STEC）O104:H4 による 3 件のアウトブレイクは、実質的にはドイツで起きた 1 件の大規模アウトブレイクとみなせる。英国で発生し患者数が 250 人に及んだ、生鮮セイヨウネギ、ポテトの家庭での取り扱いを原因とする VTEC O157 アウトブレイクは、これらの野菜に付着していた土壌が感染源であるとされている。

2-5. 欧州のセレウス菌（*Bacillus cereus*）アウトブレイク

参考文献 1 の Table 26 には 2007～2011 年に発生した非動物性食品を原因食品とするセレウス菌アウトブレイクとして 49 件が記載されている。このうち、原因食品の品目に関する具体的な記述がない 7 件を除いた 42 件のアウトブレイクについて、概要を表 20 に示す。表 20 のアウトブレイクを品目カテゴリーごとにまとめ、合計のアウトブレイク件数、患者数を示したのが表 21 である。件数の多い品目カテゴリー順に記載してある。

アウトブレイク件数の最も多い品目カテゴリーは「その他の加工製品、ソース、ドレッシング、ピューレ、スープ、ペースト、シロップ（缶詰め、びん詰めを含む）」（31 件）で、次いで「スパイスおよびハーブ乾燥粉」（7 件）であった。これら 2 カテゴリーのアウトブレイクをあわせると、件数で全体（42 件）の 90%、患者数で全体（910 人）の 94%を占めていた。

次に、品目カテゴリーではなく品目レベルで、どの品目によるアウトブレイクの件数が多いかをまとめた。表 20 のアウトブレイクのうち、品目カテゴリーの記載はあるが品目の記載のないもの、および原因食品として 2 種類の品目の記載があるものは除外した。その結果を表 22 に示した。件数の多い順（件数が同じ場合は患者数の多い順）に、上位 7 位までの品目を示した。

非動物性食品を原因食品とするセレウス菌アウ

トブレイクでは、具体的な原因食品として「ライス、白飯、チャーハン」が圧倒的に多く（18 件、患者数 236 人）、件数で全体（38 件）の 47%、患者数で全体（758 人）の 31%を占めていた。次いで、コショウ（2 件、164 人）、ターメリック/クルクマ（2 件、23 人）の順であった。

26 年度：EU における非動物性食品に関する微生物規格規準の実態と動向

1. 「サルモネラ対策」としての微生物規格基準

1-1. 公衆衛生リスク（EU 加盟国およびノルウェー、スイスでの非動物性食品による最近のサルモネラアウトブレイク発生の状況）

パート 1 報告書の Table 26 に示されたデータを以下に記載する。

「サラダ用葉物野菜」：2007～2011 年にサラダ用葉物野菜を原因とするサルモネラアウトブレイクが 7 件発生している。

「ベリー類」：2007～2011 年にラズベリージュースを原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

「トマト」：2007～2011 年にトマトを原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

「メロン・スイカ」：2007～2011 年にスイカを原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

「鱗茎野菜・ニンジン」：2007～2011 年に鱗茎野菜（タマネギ）を原因とするサルモネラアウトブレイクが 1 件発生している。

1-2. 一次生産への大腸菌衛生規格基準（Hygiene Criteria）設定の提案

以下は、パート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネル（生物学的ハザードに関する科学パネル）の見解である。

「サラダ用葉物野菜」：サラダ用葉物野菜の一次生産過程に大腸菌に関する衛生規格基準を EU レベルで設定すべきである。

「ベリー類」、「トマト」、「メロン・スイカ」、「鱗茎野菜・ニンジン」：当該果物・野菜の一次生産過程に大腸菌に関する衛生規格基準を EU レベルで設定する妥当性は評価不能である（当該果物・野菜の大腸菌汚染に関するデータの不足のため）。

1-3. 工程衛生規格基準（Process Hygiene Criteria）

1-3-1. EU の現行の工程衛生規格基準

カット済みの RTE（ready-to-eat：そのまま喫食可能）果物・野菜、および未殺菌の果物・野菜ジュースに、大腸菌に関する工程衛生規格基準（ $n=5$ 、 $c=2$ 、 $m=100$ cfu/g、 $M=1,000$ cfu/g）が設定されている（EC 規則 No 2073 / 2005）。

パート 2 報告書が対象とする果物・野菜類のすべてにこの基準が適用されると考えられる。

1-3-2. EFSA による評価と提案

以下は、パート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルによる評価と提案である。

「サラダ用葉物野菜」：大腸菌に関する現行の工

程衛生規格基準は、適正農業規範 (GAP)、適正衛生規範 (GHP)、適正製造規範 (GMP)、危害分析重要管理点方式 (HACCP) の実施の評価の指標となる。

「ベリー類」、「トマト」、「メロン・スイカ」、「鱗茎野菜・ニンジン」：当該果物・野菜類のカット済み製品および未殺菌ジュースの大腸菌汚染についてデータが不足または欠損しているため、現行の工程衛生規格基準の妥当性は評価不能である。

「ベリー類」：冷凍の丸ごとのベリー類に大腸菌に関する工程衛生規格基準を EU レベルで設定する妥当性は評価不能である (冷凍の丸ごとのベリー類について大腸菌汚染に関するデータが欠損しているため)。

1-4. 食品安全規格基準 (Food Safety Criteria)

1-4-1. EU の現行の食品安全規格基準

カット済みの RTE 果物・野菜および未殺菌の果物・野菜ジュースに、サルモネラに関する食品安全規格基準 (n=5, c=0, 25 g 中にサルモネラ不在) が設定されている (EC 規則 No 2073 / 2005)。

パート 2 報告書が対象とする果物・野菜類のすべてにこの基準が適用されると考えられる。

1-4-2. EFSA による評価と提案

以下は、パート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルによる評価と提案である。

「サラダ用葉物野菜」：サラダ用の丸ごとの葉物野菜、ベビーリーフ、マルチリーフにサルモネラに関する食品安全規格基準を設定することを検討してもよい。

「ベリー類」：生鮮、および最低限の加工をしたベリー類 (冷凍を含む) にサルモネラに関する食品安全規格基準を設定することについては、その妥当性のエビデンスが不足している。

「トマト」、「メロン・スイカ」：丸ごとのトマト、丸ごとのメロン・スイカにサルモネラに関する食品安全規格基準を設定することを検討してもよい。

「鱗茎野菜・ニンジン」：データ不足のため、鱗茎野菜・ニンジンにサルモネラに関する食品安全規格基準を設定する公衆衛生上の効果は評価不能である。

2. 「ノロウイルス対策」としての微生物規格基準

サルモネラ対策としての大腸菌衛生規格基準、大腸菌工程衛生規格基準は、大腸菌が糞便汚染の指標となることから、同時にノロウイルス対策としての側面もある。以下では、ノロウイルスに特化した対策について触れる。なお、メロン・スイカとノロウイルスの組み合わせはパート 2 報告書の対象ではない。

2-1. 公衆衛生リスク (EU 加盟国およびノルウェー、スイスでの非動物性食品による最近のノロウイルスアウトブレイク発生状況)

パート 1 報告書の Table 26 に示されたデータを以下に記載する。

「サラダ用葉物野菜」：2007～2011 年にサラダ用葉物野菜を原因とするノロウイルスアウトブレイクが 24 件発生している。

「ベリー類」：2007～2011 年に、イチゴ、ラズ

ベリー、その他のベリー類を原因とするノロウイルスアウトブレイクが、それぞれ 1 件、27 件、1 件発生している。

「トマト」：2007～2011 年にトマトを原因とするノロウイルスアウトブレイクが 1 件発生している。

「メロン・スイカ」：2007～2011 年にメロン・スイカを原因とするノロウイルスアウトブレイクは発生していない。

「鱗茎野菜・ニンジン」：2007～2011 年に鱗茎野菜、ニンジン原因とするノロウイルスアウトブレイクが、それぞれ 2 件、1 件発生している。

2-2. 一次生産へのノロウイルス衛生規格基準の設定について

以下はパート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルの見解である。

「ベリー類」：ラズベリーおよびイチゴの一次生産にノロウイルス衛生規格基準を EU 全域で設定する妥当性は、現時点では評価不能である。

2-3. ノロウイルス工程衛生規格基準の設定について

以下はパート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルの見解である。

「ベリー類」：冷凍ラズベリー、冷凍イチゴへのノロウイルス工程衛生規格基準の設定に向けて必要な各種データを収集することは、公衆衛生上の重要性に鑑み、最優先の課題である。

2-4. ノロウイルス食品安全規格基準の設定について

以下はパート 2 報告書に示された EFSA BIOHAZ パネルの見解である。

「サラダ用葉物野菜」、「トマト」、「鱗茎野菜・ニンジン」：汚染データの不足、検出方法上の問題等により、当該果物・野菜類にノロウイルス食品安全規格基準を設定することは困難である。

「ベリー類」：公衆衛生上の重要性に鑑み、冷凍ラズベリー、冷凍イチゴのノロウイルス汚染についてリスク評価のためのデータを収集し、これらの食品にノロウイルス食品安全規格基準を設定することは優先度が高い。ラズベリー、イチゴ以外の生鮮、冷凍ベリー類については、ノロウイルス食品安全規格基準の設定を支持する疫学的、微生物学的データが欠損している。

27 年度：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、再使用の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、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した少なくとも 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、栽培期間又は 1 年の、収穫期にできる限り近い時期に採取した少なくとも 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た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。これらの方法の何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。発芽野菜のみに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。
- 使用済み灌漑水、発芽野菜、および（または）環境検体検査が陽性の場合には改善措置を取る。

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事を奨励している。

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し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、および他の類似の構造物、また、トイレや手洗い設備等を対象としている。

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・真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

食品製造施設から分離される *L. monocytogenes* には persistent strain と呼ばれる施設定着株が存在することが知られている。本研究に於いても分離菌株の遺伝学的解析により施設 A では 2 グループの *L. monocytogenes* が持続して検出され、施設 B では同一の型が持続して検出され、そして施設 C では 2 種類の型が検出されていることが判明し、それぞれの施設の persistent strain と考えられた。

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、下漬をする冷蔵庫の床と製品充填機周辺から persistent strain と想定される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、我々は次に本菌の除去を目的とした対策について検討を行うこととした。

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 では現場に応じた洗浄・消毒の作業手順書の作成を指導した。手順書に従って器具洗浄に適したブラシの活用、冷蔵室の床の清掃、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、施設の衛生対策が改善された。本施設では施設調査を実施するたびに汚染が減少しており、我々の指導によって従業員の問題意識が向上し、さらに十分な洗浄が行われることに繋がったと考えられた。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。

日本では、非加熱食肉製品とナチュラルチーズに *L. monocytogenes* が検体 1g 当たり 100 以下でなければならないという基準値が平成 26 年 12 月に通知されたところであるが、浅漬については当該規格基準の対象外として位置づけられる。

本研究の市販製品調査で認められた *L. monocytogenes* 菌数は最も多いもので 30CFU/g であった。食品内での *L. monocytogenes* 増殖を抑制するには、コールスローを対象とした研究で pH が 6 以下かつ 15°C 以下の保存条件が必要という報告がある。本研究の浅漬の pH、および短期間で消費される食品であることを考慮すると、適切な温度管理下での保存により、増殖は認められず菌数は低いレベルに保たれると考えられる。このことから本研究での *L. monocytogenes* 検出は直ちに消費者に健康被害を及ぼすものではないと思われる。しかし本研究の結果は、浅漬製造業者は自らの製品に *L. monocytogenes* が混入する危害を想定した上で施設環境の清浄化を測る必要性を提唱するものであり、こうした目標達成には、製造工程における *L. monocytogenes* の潜在的汚染箇所を評価するための、環境モニタリングプログラムの設計が重要であると考えられる。

②市販浅漬け食品における細菌汚染実態と衛生指標菌に関する研究

食品の分類については、平成 22-24 年度 厚生労働科学研究「冷凍食品の微生物規格基準に関する研究」において、検討してきたところであるが、この中でも、「野菜・果実類」に関する微生物汚染実態については依然として知見に欠ける部分が多い。また、国内では農林水産省・厚生労働省による汚染実態調査も進められてきたが、試験法として定性法が用いられている現状を踏まえ、本研究では、「野菜浅漬け食品」を対象として、衛生指標菌ならびに主要病原細菌の定量検出を試みた。

主要病原細菌として試験対象に選定した、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネスは、何れも野菜・果実類への汚染リスクが相対的に高い病原体として国際的に認識されている。わが国においては、特に平成 24 年 8 月に北海道で発生した、白菜の浅漬けによる腸管出血性大

腸菌 0157 集団食中毒事例を契機として、漬物の衛生管理に対する社会的関心が高まりを見せると共に、原材料の受け入れから製品の販売までの各工程における漬物の取り扱い等の指針を示し、漬物に関する衛生の確保及び向上を図ることを目的として、衛生規範の改正が行われたところである（平成 25 年 12 月 13 日付け食安発 1213 号第 2 号）。当該規範では、次亜塩素酸での殺菌処理を一例として提唱し、その具体的条件を定めている。本研究に供試した浅漬け食品検体はいずれも主要病原細菌が陰性であった。野菜全般については、大腸菌の定性陽性率が概ね 1% 未満であることに加え、本試験で用いた検体製品では次亜塩素酸による殺菌工程の導入されていること、あるいは製造事業者の意識向上・教育の充実化が図られた結果によるものかもしれない。

次亜塩素酸については、一方で有機物存在下では急速に殺菌能力を失うという特性が以前より明らかとなっており、塩素臭が残るため、風味の劣化が懸念されること等も生産者・消費者側からの疑問点として挙げられている。浅漬けを含めた、野菜類の殺菌方法については、代替可能な物質の探索・開発が十分に達成されていないが主因と目されるが、近年では、酸性次亜塩素酸・ペルオキシ酢酸・電解水、マレイン酸、あるいはそれらの混合等、多様な溶媒を用いた手法が研究レベルで検討されており、今後も更なる開発検証の進展が望まれる。しかしながら、次亜塩素酸等の化学物質による殺菌は原材料の表面に付着する病原微生物に対して広域性効果を示す一方、原材料の内部やカット面に侵入した微生物に対する有効性は低いとされる。これに関連して、Houらはエタノール殺菌および次亜塩素酸による殺菌後に、レタス内部組織中には多様な細菌が生残することを報告しており、0157 やサルモネラが内部へ侵入することが細菌学的あるいは分子生物学的に証明されている実情を踏まえると、こうした侵入性微生物に対する実態解明と制御対策等についても今後の取り組むべき課題として想定されよう。更に、今回の検討により明らかにされた構成細菌叢の分布・動態と、細菌の局在との関連性についても、今後検討すべき課題と考える。

衛生規範改正前後に流通した浅漬け製品の衛生状況に関する比較解析では、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、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えず、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。菌叢解析結果より、供試製品での優勢菌叢は、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。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と、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。

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。

③浅漬け製造工程における微生物挙動に関する研究

平成25年12月に改正された漬物の衛生規範では、殺菌工程に関する明文化がなされた。すなわち、原材料の製造にあたっては、次亜塩素酸 Na 100ppm で10分もしくは200ppm で5分以上の殺菌条件が盛り込まれ、腸管出血性大腸菌をはじめとする病原微生物の汚染制御に資すると目される対策がなされているところである。しかしながら、野菜や果実には、乳肉製品に比べて、多様な微生物叢が含まれており、それらの相互作用や、局在(分布)の多様性等も相まって、塩素消毒の有効性を実証するには、製造現場での検証作業が必要と考えられた。こうした背景を元に、本研究では、ハクサイおよびキュウリの浅漬けを対象として、それらの製造過程を通じた衛生指標菌および主要病原細菌の挙動を捉え、現行の製造基準に関する衛生学的知見を収集することとした。

衛生指標菌の検出結果は、いずれの製品についても、概ね殺菌工程が有効に作用していることを示していた。ハクサイの浅漬けについては、協力製造事業者では、殺菌工程に先立ち、塩漬け工程を自主的に加えることで、その後の塩素殺菌効果の向上と、食塩による主要病原細菌の生存抑制を果たしていた。本研究において認められた指標菌の定量結果は、

その目標達成を概ね裏付けるものであった。同工程を通じた構成菌叢の変動については、興味深く更なる検討が必要と考える。

また、病原細菌としては、殺菌前の検体の一部で VT 遺伝子が検出されたが、最終的に EHEC の主要血清型 (O157/O26/O111) については陰性と結論付けられた。培養液より他血清型の EHEC 分離も試みたが該当菌株は分離されなかった。原材料等には EHEC を含め腸管病原細菌の付着も懸念されるが、野菜等における汚染菌数は食肉製品のそれに比べ相対的に少ないと想定される。遺伝子スクリーニングの成績から、極めて少数の非 O157/O26/O111 血清型の EHEC もしくは一次的に VT 遺伝子を保有する類縁菌の汚染可能性を否定することはできない。

製造工程における指標菌動態の原因を探るべく行った菌叢動態解析により、原材料由来細菌制御にあたり、塩漬け工程において望ましい食塩濃度に関する知見を得た。同知見は、その後の水洗浄工程を経て、最終食塩濃度が約2%前後に調節できることを考えると、衛生管理上での実効性を伴う応用制御手法と考えられ、昨今の減塩嗜好にも対応できるものと思われる。加えて、殺菌工程後の中間製品に係る構成菌叢は腸内細菌科菌群の比率を低減させる上で有効に機能していると想定される結果を得た。

④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、麹漬、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、異常な数値とはいいがたい。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°C、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。

目黒寄生虫館が実施した異物の検査・鑑定の結果(19年間)を検索したが、日本国内で発生を続ける回虫症など土壤媒介寄生虫症の有力な感染源

を見出すことはできなかった。非動物性食品へのアニサキスの汚染例が見られたが、これは食品の処理・調理の過程における交差汚染が原因と考えられた。

東京都健康安全研究センターでは、市場に流通する野菜の寄生虫汚染を継続的に調査している。直近の検査成績(村田ら, 2013)では、国産野菜 54 検体、輸入野菜 274 検体について検査したと記している。その結果、国内野菜は総て陰性であったが、輸入野菜のショウガ(根菜類, 中国産)1検体からブタ回虫の含子虫卵(運動性あり)が検出された。この成績は、特に JAS 法改正以降、国内発生の土壤媒介寄生虫症の感染源として、海外の流行地から輸入される野菜が重要であるとの示唆に一致するものと考えられた。生姜を長期間生食し続けた回虫症例も報告されていることから、特に根菜類には注意が必要と考えられた。ただし、植物検疫法で土の輸入が禁止されており、根菜類は十分洗浄された状態で輸入されていることから、たとえ寄生虫卵による汚染があっても、その程度は極めて軽微なものと考えられた。

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、供試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える。

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、短期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ことから、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℃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℃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であり、具体的には、[1] 中心部温度を120℃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℃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. 国外における非動物性食品の病原微生物汚染の実態とその対策に関する調査

25 年度：国外における食中毒発生動向・食品汚染に関する情報収集

1. 食品の回収・汚染情報にもとづくリスク分析

米国、カナダ、EU における回収および汚染情報から、非動物性食品の品目ごとに汚染実態の把握を試みた。非動物性食品のうち、各国で特に汚染が多い食品と考えられたのは、生鮮野菜 (特にスプラウト)、生鮮果物、ナッツ類、ハーブやスパイス、ゴマ等であった。サルモネラ汚染はナッツ類、スプラウト、コショウ・唐辛子類、カンタロープ、トマト、ゴマ、ハウレンソウ、バジル、マンゴー、カルダモン等で、リステリア汚染はサラダ、レタス、マッシュルーム、タマネギ、リーキ (西洋ネギ) 等で、大腸菌 O157:H7 汚染はサラダ、ハウレンソウ、レタス、ナッツ類、バジル等で多く報告されていた。ボツリヌスはオリーブ類で、A 型肝炎ウイルスはベリー類やザクロで報告されていた。これらの組み合わせ

せはいずれも実際に各国で大規模なアウトブレイクが最近発生しており、その影響が世界規模であることが多いことから特に注意が必要である。

本研究において米国およびカナダでの回収情報の件数は、関連製品の回収情報や追加回収情報等を除外せずそのまま集計したものである。このため、例えば、米国での 2009 年の大規模サルモネラアウトブレイクに関連するピーナッツ製品の回収のような事例においてその影響が見られる (表 1)。また、回収情報はそれぞれ情報量、記載方法や表現等が異なるため、食品分類が全てのケースで同程度の厳密さで行われている保証はない。これらのことから今回の集計・解析結果から定量的な判断をすることは困難であり、あくまでもどのような非動物性食品の汚染が報告されているか、またその場合の汚染病原体が何であるかの半定量的な傾向把握に留める必要があると考える。

2. アウトブレイク情報にもとづくリスク分析

米国および欧州でのアウトブレイクの調査報告データにもとづき、非動物性食品の喫食に起因するアウトブレイクについて原因食品および原因病原体を集計し、解析を行った。サルモネラアウトブレイクの原因食品としてはスプラウト、トマト、レタス、スイカ、カンタロープメロン、コショウ・唐辛子類が多く報告されていた。STEC (VTEC) による非動物性食品関連アウトブレイクの原因食品で多かったのはスプラウト、レタス、ハウレンソウ等であった。セレウス菌による非動物性食品関連アウトブレイクの原因食品では、米製品、コショウ等香料関連が多かった。

アウトブレイクにおける原因菌と原因食品の組み合わせの結果は上述した回収・汚染情報における傾向と似ていた。アウトブレイク発生により多数の関連回収情報が報告されるため、その結果は当然ともいえる。しかし、回収・汚染情報には患者はまだ発生していないがルーチン検査で汚染が確認されたことにより発表された情報も含まれることから、非動物性食品の喫食による食中毒への対策において注視すべき食品の品目と病原体の組み合わせを把握する際に、より実態に即したデータであると考えられる。

26 年度：EU における非動物性食品に関する微生物規格規準の実態と動向

EFSA のパート 1 報告書によると、EU において、2007~2011 年に原因食品が確認された食品由来疾患アウトブレイクの 10% が非動物性食品を原因とするものであった。しかしながら、欧州においては、2011 年のフェヌグリークスプラウトによる STEC O104:H4 アウトブレイク、また 2012 年の輸入冷凍イチゴによるノロウイルスアウトブレイクといった大規模アウトブレイクが相次いで発生している。

EU では、カット済みの RTE 果物・野菜および未殺菌の果物・野菜ジュースを対象に、大腸菌工程衛生規格基準およびサルモネラ食品安全規格基準が設定されている。本研究でとり上げた EFSA のパート 2 報告書では、多くの果物・野菜類について、

データ不足からこれらの現行の微生物規格基準の妥当性の判断を控えているが、一方、いくつかの果物・野菜類（「サラダ用葉物野菜」、「特定の冷凍ベリー類」など）については、新たな規格基準の設定に向けた取り組みを提案している。

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、衛生管理状況が欧州とは異なると考えられるので、EFSAによる見解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に鑑み、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。

27年度：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」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、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

市販の浅漬 100 検体を対象として、食中毒菌を含む細菌数の定量試験を実施し、汚染状況の把握を行った。全ての検体から腸管出血性大腸菌およびサルモネラは検出されなかったが、12 検体から *L. monocytogenes* が検出された。

そこで陽性検体製造の 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 施設ともに冷蔵庫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。

② 市販浅漬け食品における細菌汚染実態と衛生指標菌に関する研究

本研究では、関東地方に流通する各種野菜浅漬け製品を対象に細菌試験を行い、主要病原微生物が検出されない実態を把握できた。β-グルクロニダーゼ産生性大腸菌も同様に陰性であったが、一般細菌数や大腸菌群数は一定の汚染を認めた。これら指標菌数は夏季に増加傾向を示した。浅漬け製品の構成細菌叢は概して原材料と季節に依存することが明らかとなった。また、製造実験を通じ、保存時間や漬込み液の性状等が構成細菌叢の変動要因となることを明らかにした。衛生規範改正を通じ、市販浅漬け供試製品では衛生状況の改善が確認された。その一方、生鮮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、大腸菌群等は不適であり、大腸菌を使用する利点が想定され、その検証の必要性が提唱された。

③ 浅漬け製造工程における微生物挙動に関する研究

ある浅漬け製造事業者の協力の下、ハクサイ・キュウリの浅漬け製造工程における衛生指標菌および主要病原細菌の検出状況を確認した。衛生指標菌は殺菌工程前後で顕著な低減を示し、最終製品の安全性確保に寄与していると想定された。菌叢解析を通じ、伝統的な塩漬け工程は原材料における病原細菌の汚染制御に有効に機能していること、次亜塩素酸を用いた殺菌工程は、大腸菌群等の病原細菌の低減に寄与していることが明らかとなり、両工程の併用は、浅漬け製品の微生物危害を予防するための応用的な制御手法と考えられた。以上より、現行の衛生規範は微生物リスク低減に有効に機能していることが実証された。

④ 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、その原因を知ることが、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、本研究班で開発した超音波法を用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。本法は迅速性・簡易性に優れており、今後の条件検討等を通じて、食品検査への応用が期待される。

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

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. 国外における非動物性食品の病原微生物汚染の実態とその対策に関する調査

25 年度：国外における食中毒発生動向・食品汚染に関する情報収集

非動物性食品における食中毒リスクとして注視すべき食品と病原体の組み合わせは、サルモネラでは生鮮野菜、生鮮果物、ナッツ類、香辛料等で、具体的な品目としてはナッツ類、スプラウト、コショウ・唐辛子類、カンタロープ、トマト、ゴマ、ホウレンソウ、バジル、マンゴー、カルダモン等であった。リステリアでは同様に生鮮野菜や生鮮果物が多く、品目としてはサラダ、レタス、マッシュルーム、タマネギ、リーキ（西洋ネギ）等であった。大腸菌（STEC、VTEC）では生鮮野菜がリスク要因であり、品目としてはサラダ、スプラウト、ホウレンソウ、レタス、バジル等であった。セレウス菌では米製品やコショウ等香辛料関連製品、ボツリヌスではオリーブ類、A 型肝炎ウイルスではベリー類およびザクロがリスク要因であった。

今回の回収件数のデータは重複等のバイアスが大きく、定量的に扱い、数理解析によりリスクの数値化を可能にするデータではない。しかしながら、上述した非動物性食品は、回収・汚染情報で実際に当該食品の病原体による汚染が確認されたものであり、さらに実際に食中毒被害が起きたものが含まれることから、これらの食品や病原体のリストは実際の汚染状況に即したリスク要因であると考えられることができる。

26 年度：EU における非動物性食品に関する微生物規格規準の実態と動向

種々の果物・野菜と病原微生物の組み合わせを対象とした EFSA 報告書（5 報）を精査することにより、EFSA が特定の組み合わせ（例えば、「サラダ用葉物野菜」と大腸菌、および「特定の冷凍ベリー類」とノロウイルス）について新たな微生物規格基準の設定に向けた取り組みを提案していることが把握できた。

27 年度：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、包括的な内容となっている。我が国でも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。

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) Momose Y, Asakura H, Kitamura M, Okada Y, Ueda Y, Hanabara Y, Sakamoto T, Matsumura T, Iwaki M, Kato H, Shibayama K, Igimi S. (2014) Food-borne botulism in Japan in March 2012. *Int J Infect Dis.* 24:20-22.
- 5) 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.
- 6) 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, 春日文字, 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, 春日文字, 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) 朝倉宏, 五十君静信, 山本茂貴, 春日文字. カイワレ大根の細菌叢解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 2013年9月、岐阜.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 高鳥浩介, 朝倉宏: 農産物の生食のリスクとその制御. 日本防菌防黴学会第41年次大会. 2014年11月、東京.
- 7) 勢戸和子, 神吉政史, 原田哲也, 田口真澄: 大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較, 第17回腸管出血性大腸菌出血性大腸菌感染症研究会、2013年7月、つくば.
- 8) Sugiyama H. Foodborne parasitic helminthiasis in Japan: an update. 中国畜産獣医学会家畜寄生虫学分会第12次学術検討会. Zhengzhou, China. 2013年11月、中国.
- 9) 窪田邦宏, 天沼 宏, 荻原恵美子, 酒井真由美, 春日文字: 欧米における非動物性食品の病原微生物による汚染の状況. 第35回日本食品微生物学会学術総会. 2014年9月、大阪.

H. 知的財産権取得状況

該当なし

II. 分担総合研究報告

平成 25-27 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」

分担総合研究報告書

分担課題名：細菌汚染実態に関する研究

浅漬けにおける細菌汚染実態と製造施設環境調査に関する研究

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：近年、野菜や果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。日本では野菜の浅漬を原因食とする腸管出血性大腸菌 O157 の大規模な食中毒事件発生がみられるが、市販製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、市販の浅漬 100 検体を対象として、食中毒菌を含む細菌数の定量試験を実施し、汚染状況の把握を行った。全ての検体から腸管出血性大腸菌およびサルモネラは検出されなかったが、12 検体から *Listeria monocytogenes* が検出された。供試検体の製造施設は計 55 施設であったが、*L. monocytogenes* が検出されたのはその中の 5 施設の製品であった。

そこで陽性検体製造の 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、さらに、市販製品分離株の遺伝子型とも一致していたことから、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。

A. 研究目的

野菜や果物などの非動物性食品は様々な調理方法で喫食されており、人々の生活には欠かせない食品である。しかし、大規模な食中毒事件の原因食となる場合があり、日本では 2012 年 8 月に野菜浅漬を原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事件が発生し、169 名の患者のうち 8 名が死亡した。この事件を調査したところ、原材料の消毒に使用する塩素濃度の維持管理や施設設備管理の不備等の問題点が確認された。厚生労働省は同様の食中毒の再発防止を図るために「漬物の衛生規

範」を改正し、原材料の冷蔵保管ならびに消毒の徹底等を中心として関係事業者に指導するように都道府県等に通知した。しかしその後も、2014 年 8 月に花火大会の露店で販売された「冷やしキュウリ」を原因食品とする、510 名もの患者数を出した腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事件が発生するなど、更なる食中毒再発防止の対策が求められている。

浅漬の多くは、生鮮野菜を食塩、しょう油、アミノ酸液、食酢、酸味料等を主とする調味液に短期間漬け込み、発酵させない状態で市販されており、手軽に野菜を摂食

できる Ready-to-eat 食品として消費者に好まれている。「漬物の衛生規範」では浅漬の製品は大腸菌と腸炎ビブリオがいずれも陰性であることとされており、製品管理には両菌の試験は必須である。しかし、他の食中毒菌については、定性試験は実施されているが、定量的な試験成績の報告は少ない。

そこで本研究では市販の浅漬中の食中毒菌を含む細菌数の定量試験を実施し、汚染状況の把握を行った。結果として、複数の検体から *Listeria monocytogenes* が検出され、当該製品の製造施設での環境調査を実施すると共に、本菌制御に向けた環境改善に関する検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 市販野菜浅漬の細菌汚染実態把握

1) 試験材料

2013年5月に10検体、8月に30検体、10月に30検体、2014年2月に30検体の合計100検体を大阪府内の小売店舗で購入した。検体の原材料区分は、果菜類が23検体、葉菜類が57検体、根菜類が19検体、混合が1検体であった(表1)。各検体は購入後、大阪府立公衆衛生研究所に冷蔵状態で輸送し、速やかに試験に供した。

2) 細菌検出試験

試験項目は各検体の pH と、衛生指標菌(一般細菌、大腸菌群、 β -グルクロニダーゼ産生大腸菌)の定量試験、ならびに生鮮野菜に関連する主要食中毒細菌である腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、*L. monocytogenes* の定性試験を実施した。*L. monocytogenes* については、定量試験も行った。

衛生指標菌の菌数測定は、検体 25g に buffered peptone water (BPW) を 225mL 加え、30 秒間ストマッカー処理を行った試料液を BPW で希釈し、スパイラルプレーターを用いて平板培地に塗抹し、培養後、機器メーカーの指示書に従って集落数を数えて計算を行った。平板培地は、一般細菌数測定には標準寒天培地、大腸菌群数測定には Violet Red Bile Lactose 寒天培地 (VRBL)、 β -グルクロニダーゼ産生大腸菌数測定にはトリプトン胆汁酸 X-グルクロニド培地 (TBX) を使用した。

腸管出血性大腸菌の定性試験は上記の BPW 液を 37°C で 20 時間培養し、培養液中の VT 遺伝子を Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット(栄研化学)にて検索し、陰性の場合には検出せずとした。サルモネラ属菌の定性試験は ISO 6579:2002 に準拠し

て行い、*L. monocytogenes* の定性および定量試験は ISO 11290-1 および ISO 11290-2:2004 に準拠して行った。

3) *L. monocytogenes* の血清型別

リステリア型別用免疫血清(デンカ生研)を用いて、O 抗原と H 抗原の組み合わせで血清型別を行った。

2. 製造施設の調査

3社(A、B、C社)に施設調査の協力を求め、その地域を管轄する行政の食品衛生担当者とともに製造環境の検証を行った。施設Aは2回(2014年6月16日と2015年1月13日)、施設Bは3回(2014年6月30日、8月18日、11月4日)、施設Cは1回のみ(2014年7月24日)実施した。

検査材料として、施設の機械・器具類と床のふき取り材料、および食品(原材料、中間製品、最終製品)の合計115検体(施設A:37検体、施設B:54検体、施設C:24検体)を採取し *L. monocytogenes* の検出を定性試験および定量試験で行った。

3. *L. monocytogenes* 分離菌株の遺伝子解析

施設Aは市販製品からの分離株および2014年6月施設調査での分離株の36株、施設Bは市販製品からの分離株および施設調査での分離株23株、施設Cは26株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による解析と Ribotyping を行った。

PFGEの制限酵素は *ApaI* および *AscI* を使い、CDCの *L. monocytogenes* Pulse Net protocol に準じて実施した。Ribotypingは RiboPrinter system (Du Pont) を使い、製造者の指示書に従い、制限酵素は *EcoR I* を使用し、各菌株の ribotyping pattern を得た。菌株の同一性評価は Dupont ID を指標として行った。

C. 研究結果

1. 市販野菜浅漬の細菌汚染実態把握

10月と2月の60検体について、pH値を測定・比較したところ、最低値は3.0、最高値は6.4であり、最頻値は5.2であった。

一般細菌数は季節により変動が見られ、8月は 10^4 CFU/g オーダーの製品が多く、10月は 10^2 CFU/g、2月は 10 CFU/g 未満のものが多く見られた(表2)。大腸菌群数は全体的に少なく、10 CFU/g を超える検体は8検体のみであり、130 CFU/g が最大値であった(表2)。 β -グルクロニダーゼ産生大腸菌数は全て 10CFU/g 未満であり、腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌も全ての検体で陰性であった(表3,4,5,6)。

一方、*L. monocytogenes* 検出は 12 検体で認められた。定量試験により菌数を測定できたのはわずかに 2 検体のみであり、それぞれ 30CFU/g および 10CFU/g であった。他の 10 検体は定性試験でのみ検出された(表 7)。*L. monocytogenes* の血清型は、1/2a のみ検出は 6 検体、1/2b のみ検出は 3 検体、1/2a および 1/2b 検出は 2 検体、3c のみ検出は 1 検体であった。試験した 100 検体の製造施設は計 55 施設であったが、そのうち 5 施設で製造された検体から *L. monocytogenes* が検出され、3 施設では異なる試験月の検体から複数回検出された。なお、これら *L. monocytogenes* 陽性検体の pH 値は、4.4~6.0 であり、一般細菌数および大腸菌群数は、本菌陰性検体の数値に比べて異なる事はなかった。

2. 製造施設の調査

1) 3 施設の 1 回目調査

施設 A の製造工程は、下処理室、冷蔵室、下漬洗浄室、包装室の 4 つのゾーンに分かれていた(図 1)。原材料の殺菌は電解次亜水(pH8.8、残留塩素 50ppm、10 分間処理)を使用していた。最初の調査では 27 検体採取し、冷蔵室床のたまり水、包装機や作業台のふき取り、さらに最終製品であるみぶなの浅漬からも *L. monocytogenes* が検出された。

施設 B の製造工程は、処理室、冷蔵室、包装室の 3 ゾーンであった(図 1)。原材料の殺菌は微酸性次亜塩素酸水溶液(pH6.5、残留塩素 30ppm、2 分間処理)を使用していた。最初の調査では計 26 検体を採取し、冷蔵室床のふき取りや包装機のふき取り、さらに中間製品や最終製品である茄子の浅漬からも *L. monocytogenes* が検出された。

施設 C では他の 2 施設と異なり下処理室での LM 検出が認められた(表 8)。その他は床の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 LM が検出された(図 2)。本施設の 2 回目の調査は行っていない。

2) 施設 A、B の改善に向けた調査

施設 A では 1 回目の調査の後、汚染箇所から熱湯をかける、スチームクリーナーで蒸気をあてるなどの対策を実施するよう、指導にあたった。

その後の 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(表 9)。

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 回目の調査では、いずれの検体からも検出されておらず、分離箇所も限定的であった。

施設 B の 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 10)。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(図 3)。

3. 分離菌株の遺伝子解析

1) PFGE 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 4 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 (Ascl : A、Apal : a グループ) と Bb (Ascl : B グループ、Apal : b グループ) に大別された。(表 11)。

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 (Ascl : C、Apal : c) であった(表 12)。

施設 C では 26 株を型別し、Aa (Ascl : A、Apal : a グループ) と Cc の 2 つに分かれた(表 13)。

2) 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 11、図 5)。

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 12、図 6)。

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 13、図 7)。

D. 考察

食品製造施設から分離される *L. monocytogenes* には persistent strain と呼ばれる施設定着株が存在することが知られている。本研究に於いても分離菌株の遺伝学的解析により施設 A では 2 グループの *L. monocytogenes* が持続して検出され、施設 B では同一の型が持続して検出され、そして施設 C では 2 種類の型が検出されていることが判明し、それぞれの施設の persistent strain と考えられた。

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 persistent strain と想定される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、我々は次に本菌の除去を目的とした対策に

ついて検討を行うこととした。

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 では現場に応じた洗浄・消毒の作業手順書の作成を指導した。手順書に従って器具洗浄に適したブラシの活用、冷蔵室の床の清掃、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、施設の衛生対策が改善された。本施設では施設調査を実施するたびに汚染が減少しており、我々の指導によって従業員の問題意識が向上し、さらに十分な洗浄が行われることに繋がったと考えられた。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。

日本では、非加熱食肉製品とナチュラルチーズに *L. monocytogenes* が検体 1g 当たり 100 以下でなければならないという基準値が平成 26 年 12 月に通知されたところであるが、浅漬については当該規格基準の対象外として位置づけられる。

本研究の市販製品調査で認められた *L. monocytogenes* 菌数は最も多いもので 30CFU/g であった。食品内での *L. monocytogenes* 増殖を抑制するには、コールスローを対象とした研究で pH が 6 以下かつ 15°C 以下の保存条件が必要という報告がある。本研究の浅漬の pH、および短時間で消費される食品であることを考慮すると、適切な温度管理下での保存により、増殖は認められず菌数は低いレベルに保たれると考えられる。このことから本研究での *L. monocytogenes* 検出は直ちに消費者に健康被害を及ぼすものではないと思われる。しかし本研究の結果は、浅漬製造業者は自らの製品に *L. monocytogenes* が混入する危害を想定した上で施設環境の清浄化を測る必要性を提唱するものであり、こうした目標達成には、製造工程における *L. monocytogenes* の潜在的汚染箇所を評価するための、環境モニタリングプログラムの設計が重要であると考えられる。

E. 結論

市販の浅漬 100 検体を対象として、食中毒菌を含む細菌数の定量試験を実施し、汚染状況の把握を行った。全ての検体から腸管出血性大腸菌およびサルモネラは検出されなかったが、12 検体から *L. monocytogenes* が検出された。

そこで陽性検体製造の 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 施設ともに冷蔵庫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 E, Igimi S. (2016) Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety*. doi: 10.1111/jfs.12256

(口頭発表)

- 1) 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄：大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較、第 17 回腸管出血性大腸

菌出血性大腸菌感染症研究会、2013 年 7 月、つくば

- 2) 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
- 3) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 浅漬検体の原材料区分

浅漬検体の原材料区分		検体数
果菜類	なす	15
	きゅうり	4
	白うり	3
	きゅうり、なす	1
葉菜類	白菜	19
	野沢菜	16
	みぶな	15
	たかな	4
	日の菜	1
	菜の花	1
	キャベツ	1
根菜類	大根	7
	かぶ	6
	赤カブ	3
	長いも	1
	レンコン	1
	ゴボウ	1
混合	みぶな、大根	1
合計		100

表 2 市販浅漬の生菌数および大腸菌群数

	試験月 (月-年)	検体数	グループ(CFU/g)					
			<10	10 ¹ - 10 ²	10 ² - 10 ³	10 ³ - 10 ⁴	10 ⁴ - 10 ⁵	>10 ⁵
生菌数	5月-2013	10			4	2	4	
	8月-2013	30	2	6	3	8	10	1
	10月-2013	30	2	8	10	6	2	2
	2月-2014	30	17	2	7	2	2	
	合計	100	21	16	24	18	18	3
大腸菌 群数	5月-2013	10	8	2				
	8月-2013	30	29		1			
	10月-2013	30	25	4	1			
	2月-2014	30	30					
	合計	100	92	6	2			

表 3 2013年5月の成績 (検体 1g あたりの菌数)

検体 番号	検体名	細菌数 (生菌数)	大腸菌 群数	β-グルクロニダーゼ 産生大腸菌数	VT 遺伝子	サルモ ネラ	リステリア	備考
MH1	きゅうり	840	40	-	-	-	-	
MH2	野沢菜	6.0 X 10 ⁴	-	-	-	-	-	
MH3	茄子	3.1 X 10 ³	-	-	-	-	-	
MH4	白菜	2.1 X 10 ⁴	-	-	-	-	-	
MH5	壬生菜	180	-	-	-	-	+	血清型 1/2b
MH6	きゅうり	240	-	-	-	-	-	
MH7	白菜	4.4 X 10 ⁴	-	-	-	-	+	血清型 1/2a
MH8	野沢菜	2.1 X 10 ⁴	-	-	-	-	-	
MH9	野沢菜	960	-	-	-	-	-	
MH10	白菜	9.4 X 10 ³	20	-	-	-	-	