

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
総合研究報告書

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

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：本研究は（１）病原微生物の汚染実態に関する研究、（２）容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策に関する研究、（３）食中毒や食品汚染実態等に関する情報収集より構成され、非動物性食品における病原微生物の汚染実態を把握すると共に当該食品に対して執るべき対策を議論する上での基礎知見の集積を図ることを目的として諸検討を行った。

微生物汚染実態に関する研究としては、浅漬の細菌汚染実態に関する検討の中で、同一製品から継続的にリステリア汚染を示す製品を見出した。同製品の製造施設において環境調査を自治体の協力を得て実施し、汚染箇所の特定並びに除去方法に関する改善指導を実施することで、最終製品での陰性化に成功した。これらの事例より得られた、留意すべき工程や除去方法等に関する情報について、今後同様の事例が発生した際に活用できるよう取り纏めた。また、衛生規範改正に伴う浅漬け製造施設でのパイロットスタディを通じ、原材料の塩蔵及び次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌工程が、病原菌の低減に有効に機能することを実証した。更に、規範改正前後での市販浅漬け製品を対象に指標菌定量及び構成菌叢の比較を行い、規範改正後の供試製品における衛生状況の改善実態を把握した。また、指標菌数と構成菌叢の動態より、浅漬け等の非加熱生鮮野菜加工製品に対する衛生指標菌として大腸菌群は適切ではなく、大腸菌が望ましいと考えられた。更に、漬物製品における真菌・酵母の汚染実態を調査し、複数製品で現行の規範に定められる基準を満たすことが現実的に困難であること、何れも検出数よりも分離された微生物の同定が衛生管理の向上に重要な意義を有すること等を明らかにした。

寄生虫に関しては、回虫・鞭虫・鉤虫等の土壌媒介寄生虫感染事例に関する文献調査及び食品検査機関での検査成績集計を通じ、過去に比べ症例数は激減してはいるが、現在も継続発生がみられる現状を把握した。また、野菜等の虫卵汚染は継続している一方、一般的な国内販流通製品における汚染はほぼないと考えられた。更に北海道産「行者ニンニク」での虫卵検査を行ったが全て陰性を示し、一般流通品におけるエキノコックス汚染危害は低いと考えられた。

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策に関しては、過去の指導内容から理化学性状（pH）に逸脱を示す容器包装詰低酸性食品としてある種の「たくあん」製品が該当する事実を把握し、当該製品中でのボツリヌス菌の生存増殖性を検討した。長期保存試験を通じ、本菌は増殖しないが、芽胞として長期生残する実態を把握した。また、本菌の増殖に求められる窒素源・炭素源等の食品特性に関する情報収集が本菌の食品汚染危害を予測する上で有効と目された。更に、動物愛護の観点から代替法が求められるボツリヌス毒素試験法について、FRET法による定量検出試験を実施し、A型毒素はマウス毒性試験法同等の検出感度を示したが、B型毒素については感度に支障があり、継続した検討が必要と考えられた。

情報収集に関する項目としては、米国・カナダ・欧州での非動物性食品の回収・汚染情報を解析し、当該国における具体的な汚染食品及び病原体を把握した。また、米国・欧州での非動物性食品由来アウトブレイク事例を解析し、これらに関連した食品及び病原体を把握した。更に、欧州での非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と今後の動向に関して、文献調査を行い、複数の規格基準設定に関する提案内容を取り纏めた。また、米国での非動物性食品に関する微生物基準動向として、米国食品医薬品局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」の内容を取り纏めた。

本研究では、白菜浅漬けを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事例や、あずきばっとうによる食餌性ボツリヌス症等を契機として、非動物性の加工食品等における多岐にわたる病原微生物の汚染実態に着目し、実態把握・検証・情報収集という複数の柱から構成された研究班での活動を通じて、複数の事案の解決を行うことができた。一方で、リステリア菌の汚染をモニタリングする製造工程管理の在り方、真菌・酵母に関する衛生規範の基準内容、あるいはボツリヌス毒素の検出法に関する点等は、非動物性食品における望ましい微生物規格基準の在り方を議論する上で必要不可欠であり、今後の検討すべき課題として提示された。

研究代表者	
朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	
春日 文子	国立医薬品食品衛生研究所
窪田 邦宏	国立医薬品食品衛生研究所
杉山 広	国立感染症研究所
田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
廣井 豊子	国立大学法人帯広畜産大学
百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	
天沼 宏	国立医薬品食品衛生研究所
荒川京子	国立感染症研究所
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
生野 博	(株)ビー・エム・エル
太田利子	相模女子大学
荻原恵美子	国立医薬品食品衛生研究所
奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学
賀川千里	国立感染症研究所
神吉政史	大阪府立公衆衛生研究所
倉園久生	国立大学法人帯広畜産大学
小西良子	麻布大学
酒井真由美	国立医薬品食品衛生研究所
柴田勝優	国立感染症研究所
須田貴之	日本食品分析センター
高鳥浩介	NPO 法人カビ相談センター
高鳥美奈子	NPO 法人カビ相談センター
高橋淳子	桐生大学
橋 理人	国立医薬品食品衛生研究所
田中詩乃	NPO 法人カビ相談センター
中村寛海	大阪市立環境科学研究所
林 賢一	(株)日吉
堀内朗子	日本食品衛生協会食品衛生研究所
牧野壮一	京都聖母女学院短期大学
榊田和彌	国立医薬品食品衛生研究所
村松芳多子	高崎健康福祉大学
森嶋康之	国立感染症研究所
山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所
吉村昌徳	日本冷凍食品検査協会

(敬称略、五十音順)

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌やボツリヌス菌等、病原微生物の中には人命を脅かすものが少なくない。これ迄の対策は主に動物性食品で進められてきたが、近年では漬物や容器包装詰低酸性食品等に起因する食中毒事例が相次いでおり、汚染実態を把握し、食の安全確保に必要となる基礎的知見を集積することが求められている。

上述の食品に関連して発生する O157 等の微生物による食中毒の危害評価は必要不可欠であるが、これ迄の知見の多くは定性的な汚染実態に留まり、定量的知見は十分に得られていない。危害性判断に当たっては、従って国内外の情報収集・整理および実態を捉えた定量データの集積が必要となる。

更に食品の製造加工過程では種々の衛生指標菌を用いた衛生管理が行われるが、申請者等の予備調査では動物性食品とは異なり、植物性食品は生育過程を通じて環境由来の多様な細菌叢を形成しており、それらの多くが指標菌として検出される実態も明らかになりつつある。従って、非動物性食品に対する適切な指標菌の在り方を議論する為の基礎知見を得ることが、衛生管理を通じた安全確保に必須と考えられる。この他、漬物の衛生規範において規定される成分規格のうち、カビ及び酵母に関しては、昭和 62 年以降改正が行われていないが、市販製品における汚染実態については不明であることから、その実態を把握・整理すると共に、健康危害性に関する考察を行う必要性が考えられた。

また、毒素産生微生物の中でも危害性の高いボツリヌス菌については、容器包装詰低酸性食品等における汚染が重篤な食中毒へとつながる可能性があることから、その安全確保にはこれまでも審議が重ねられてきた。流通品から本菌は検出されておらず直ちにその規格基準を設定する状況にはないが、事業者は食中毒を未然に防止する対策に迅速に取り組む必要がある。本研究では流通品の理化学性状の調査に加え、本菌の食品内挙動を検討し、今後の対策の在り方を判断するための知見の集積をはかることとした。加えて、ボツリヌス毒素の検出法は動物愛護の高まりを見せる昨今においても、動物を用いた毒性試験が適用されており、代替的試験法の構築を行うべきとの国際的認識があるため、その対応についても、検討すべき課題と考えられた。

上記食品では細菌に加え、過去には輸入キムチの虫卵汚染が問題となる等、寄生虫も非動物性食品を介した危害因子の一つとして捉えられる。特に生野菜では灌漑水の寄生虫(卵)・原虫の他、回虫・蟯虫・テニア科条虫等複数の寄生虫汚染が懸念されており、海外からの輸入食品に依存している、わが国の食実態を踏まえると、国内外での寄生虫汚染実態の把握は必須と考えられる。また、近年では、感染者は激減したものの、国内での感染が確実な症例の報

告もあり、感染源と目される生鮮野菜・果実への虫卵汚染は、現在も継続していると推測される。ただし、感染源となった野菜の種類や症例数の推移等については不明な点が多く、実態把握が求められる。

非動物性食品による食中毒事例は、国外においても顕在化しつつあり、欧米を中心とした海外諸国における当該食品中の病原微生物汚染実態とその対策として制定されている規格基準に関する情報収集は、国内流通食品における実態把握と並行して、取り組み、それらの融合を通じて、より効率の良い知見の集積を図ることとした。

以上の背景をふまえ、本研究では、国内流通浅漬け製品における衛生指標菌の定量検出及び主要病原細菌の検出状況に関する検討を行った。このうち、複数製品で継続的なリステリア汚染を示す製品を見出し、同製品製造施設での環境調査を通じ、汚染箇所の特定と除去方法について検討を行った。漬物の衛生規範改正に伴う浅漬け製品の衛生実態変化を調査すると共に、指標菌のあり方に関して考察した。また、これまで殆ど明らかとなっていなかった、漬物中の真菌・酵母汚染実態を調査し、主要分離菌同定を通じ、健康危害性と今後の衛生規範の在り方に関する考察を行った。寄生虫に関しては、文献検索と臨床・食品検査機関におけるデータ解析を通じ、非動物性食品の喫食を通じた土壌媒介性寄生虫感染症の発生危害性について議論することとした。更に、生鮮野菜等を対象とした寄生虫卵検査法の開発を行った。容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策として、現行の同製品の中で、厚労省が指導する理化学性状から逸脱する製品の有無を調査すると共に、逸脱の認められた製品を対象として、当該菌の生存・増殖性に関する検討を行った。更に、ボツリヌス毒素の定量検出法として、動物毒性試験の代替法として期待される試験法について、検出感度等に関して検討した。情報統計の分野では、欧米での非動物性食品による被害実態、食品汚染実態等の収集・整理を行うと共に、当該国における非動物性食品に対する規格基準をはじめとした衛生対策に関する情報を取り纏めた。

B. 研究方法

1. 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菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

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℃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を用い、CDCの*L. monocytogenes* Pulse Net protocolに準じて実施した。RibotypingはRiboPrinter system(Du Pont)を用い、製造者の指示書に従い、制限酵素はEcoRI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。

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

1. 食品検体の収集と構成

平成 25 年 6 月～10 月の間に東京都および神奈川県内で市販される浅漬け製品、計 66 検体を購入し、以下の試験に供した。当該検体は購入後、速やかにアイスボックスにて試験実施機関に搬入・前処理を行った。購入検体の原材料別構成は以下のとおりである：白菜 30 検体；茄子 18 検体；きゅうり 6 検体；野沢菜 6 検体；大根 6 検体。

2. 衛生指標菌定量試験

各検体より無菌的に 25g を採材し、約 3×3cm 角に細断した後、滅菌ストマック袋（関東化学）に入れ、緩衝ペプトン水（Oxoid）225 ml 加えて、1 分間ストマッキング処理を行った。同懸濁液 100 μl を標準寒天培地（Oxoid）、VRBL 寒天培地（Oxoid）および TBX 寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ、スパイラルプレーター（Interscience）を用いて塗布し、一般細菌数、大腸菌群数、β-グルクロニダーゼ産生大腸菌数を求めた。

3. 各種病原細菌の検出

上述の緩衝ペプトン水懸濁液を 37℃ で 20 時間培養した後、腸管出血性大腸菌（EHEC）の検出にあたっては、同培養液より全 DNA を抽出し、stx 遺伝子をターゲットとした PCR 反応によるスクリーニングを行った。同反応で陽性が見られた場合には、免疫磁気ビーズを用いた分離培養を行うよう準備を行った。サルモネラ属菌およびリステリア・モノサイトゲネスの検出については、ISO 法に準拠して実施した。

4. 菌叢解析

上記 2. にて調整した緩衝ペプトン水懸濁液 10ml より、PowerFood DNA Extraction kit（MO Bio）を用いて、全 DNA を抽出した。これを鋳型として、16S rRNA 792-1152 領域を PCR 増幅した。増幅産物を定量した後、Ion OneTouch Duo システムを用いてエマルジョン PCR 及び精製をおこなった。その後、サンプルを 318 v2. Chip 上へロードし、Ion Torrent PGM 装置で配列解読を行った。

5. データ解析

取得配列データは、Ion Torrent サーバー上で、シーケンスタグ別に識別した後、fastaq フォーマットで出力した。配列ファイルは CLC Genomic Workbench v.6.5 を用いて不要配列を除去した。Blast 検索後、Metagenome@KIN を用いて、階層解析・主成分分析等を実施した。

6. 白菜浅漬けの実験的製造とこれに伴う 0157 添加回収試験、指標菌・構成細菌叢変動解析

市販白菜より 25g を採材し、約 3×3 cm に細断したものを滅菌ストマッカー袋中に入れ、食塩（最終濃度 2%）あるいは市販浅漬けの素（指示書に従って調整）を加えて、4℃ にて保存した。保存開始と共に、腸管出血性大腸菌 0157 EDL933-KM 株を 1.4×10^2 CFU/g となるよう、同検体に接種または非接種し、0、3、6、12 日間の保存期間を経て、各検体（N=3）に 225ml の緩衝ペプトン水を加え、ストマッカー処理を行った後、以下の試験に供した。

指標菌数：一般細菌数および大腸菌群数を項目 2. に準じて求めた。

0157 挙動：カナマイシン（30μg/ml）を含むソルビットマッコキー寒天培地（栄研化学）を用い、発育集落数から食品中の生存菌数を求めた。

菌叢解析：項目 4-5. の記載方法を用いた。

7. 浅漬け検体の比較解析

計 4 製造施設にて製造され、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 検体を購入した。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。各検体に係る指標菌定量検出及び菌叢解析は上述と同様である。

浅漬け製造工程における微生物挙動に関する研究

1. 検体採取

平成 26 年 2 月に神奈川県内の浅漬け製造事業者の協力を得て、同製造施設内でハクサイおよびキュウリの浅漬け工程中より、中間製品および施設ふき取り検体を採取した。計 36 検体について、指標菌の定量検出および主要病原細菌の検出試験に供した。製造ラインの概要および各製造過程の概要は、図 1-3 に記した。

2. 衛生指標菌定量試験

各検体より無菌的に 25g を採材し、約 3×3cm 角に細断後、緩衝ペプトン水 225 ml を用いて懸濁溶液を作成した。同懸濁液 100 μl を標準寒天培地（Oxoid）、VRBL 寒天培地（Oxoid）および TBX 寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ、スパイラルプレーター法により塗布し、一般細菌数、大腸菌群数、β-グルクロニダーゼ産生大腸菌数を求めた。施設拭取り検体については懸濁原液を同様に試験に供した。

3. 各種病原細菌の検出

腸管出血性大腸菌 0157/026/0111 の検出は、「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」（平成 24 年 12 月 17 日付、食安監発 1217 第 1 号）によった。また、サルモネラ属菌およびリステリア・モノサイトゲネスの検出は、ISO6579:2002 および ISO11290:1997 に準じて行った。

4. 構成菌叢解析

各検体より DNA 抽出後、PCR により 16s rRNA 部分領域を増幅した。E-gel および AMPure XP を用いて、増幅断片を精製した後、各検体を等量混合してライブラリーを作成した。同ライブラリーは Ion PGM シーケンサーを用いて解析を進め、得られた配列は、CLC Genomic workbench でトリムを行い、Local blast 検索を行うことで、各検体の構成菌叢に関するデータを取得した。

5. 塩漬けに伴う指標菌及び菌叢動態解析

市販の生鮮白菜を購入し、おにっぱを除去後、十分量の水道水で 2 回洗浄し、同野菜を 25g ずつに裁断した。225ml の食塩水（0、2、10%）に加え、15℃ で 3 日間漬け込みを行った。漬け込み後の検体を、食塩水より取り出し、225ml の緩衝ペプトン水中にて懸濁後、同懸濁液を用い、指標菌（一般細菌数及び大腸菌群数）の測定および菌叢解析を実施した。

漬物の衛生規範に関する実態調査 - 真菌調査

1) 調査および材料

平成 27 年 4 月～12 月の期間に国内で販売されている漬物を購入した。入手地域・入手漬物の種類は別途図表に纏めた。本研究で供試した漬物検

体は国内広域より入手した。それらの多くは、極めて十分に衛生管理された漬物ではなく、その地域で食品として販売されている漬物を対象とした。また漬物の種類は、規範にある材料を広く入手するため計画的に集めるよう心がけた。

2) 試験法

(i) 酵母の試験法(漬物の衛生規範による)

酵母の試験法は真菌であることからポテトデキストロース寒天培地を基本に抗生物質のクロラムフェニコール、プロピオン酸ナトリウム、および塩分として NaCl を添加した培地で試験する。培養方法として塗抹法または混釈法で、平板 3 枚の平均集落数である。

(ii) カビの試験法(漬物の衛生規範による)

カビの試験法はポテト・デキストロース寒天培地を基本に抗生物質のクロラムフェニコールを添加した培地で試験する。培養方法としては塗抹法が用いられており、真菌用培地平板 3 枚の平均集落数と記されている。しかし具体的な培地摂取量が記載されていない

(iii) 漬物の衛生規範(製品の適合要件)

製品(すべての漬物)について「カビおよび産膜酵母が発生していないこと」「異物が混入していないこと」と適合条件が付記されている。また、容器包装に充てん後、加熱殺菌したものにあっては、「カビが陰性であること」「酵母は検体 1g につき 1,000 個以下であること」の 2 要件が示されている。これらの試験方法および適合要件を考慮して入手した 105 試料の漬物について試験を実施した。なお、食品の健康志向から減塩漬物が、どの程度流通しているか、また保存料の有無についても確認した。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 文献調査成績

(i) 症例数

医学中央雑誌データベース(医中誌 Web)を用い、1990 年 1 月から 2015 年 12 月までの原著論文から国内で感染した回虫・鞭虫・鉤虫症例を抽出し、年別症例数を明らかにすると共に、患者の感染源となった汚染野菜の特定を試みた。また、症例数については、臨床検査会社 BML の協力を得て、寄生虫症例の中から、回虫症・鞭虫症・鉤虫症と診断された症例の数について提示を受けた。

(ii) 感染源

各症例の感染源野菜に関しては、論文著者の記述に従い、生野菜、無農薬野菜、有機野菜に分類した。なお本研究では、農薬または化学肥料を使用しない栽培方法によって作られた野菜を「無農薬野菜」と定義した。したがって人糞(いわゆる下肥)のみを

肥料として栽培された野菜は、無農薬野菜とした。また、本研究では、論文著者が「有機野菜」と記述した場合は、その記述をそのまま採用した。

2) 登録検査機関へのアンケート調査

公益財団法人目黒寄生虫館では、食品等から検出された異物の検査依頼および鑑定依頼を受託してきた。検査の委託者は食品製造に携わる企業や食品検査機関の他、学校などの教育機関、地方公共団体、更に一般市民となっている。この異物の検査・鑑定依頼の記録(1990 年~2008 年の 19 年間)を再整理し、非動物性食品における寄生虫の汚染実態を調べた。まず依頼検体をその種類から、非動物性食品、動物性食品、人体・動物および環境由来の 3 つに大別した。次に非動物性食品および動物性食品と判定された検体を、公益財団法人日本適合性認定協会(JAB)の食品分類表を活用した朝倉ら(2013)の分類に従い、10 のカテゴリーに振り分け、異物の検査・鑑定依頼が多い食品群を抽出した。更に非動物性食品から検出された異物を、人体寄生虫とそれ以外に 2 分し、寄生虫種別の検体数を求めた。

厚生労働省の「食品衛生法上の登録検査機関における検査実績」に掲載されている登録検査機関のうち、自主検査件数の多い上位 16 機関と、公益法人目黒寄生虫館に依頼し、2005 年以降、毎年の輸入キムチの寄生虫卵検査の実施件数と陽性件数について、記入式のアンケート調査を行った。

3) 新たな検査方法の確立: ストマッカー法および超音波法の検討

本試験は、ストマッカーや超音波洗浄装置の使用に精通している日本食品衛生協会食品衛生研究所に委託した(試験検査成績書は各年度の報告書に添付したので参照されたい)。検査の対象にはブタ回虫を用いることとし、屠畜場に依頼して自然感染ブタから検出されたブタ回虫を入手した。虫卵を付着させる検体として白菜を選び、試験のつど雌成虫の膈と子宮(遠位端 1cm)から、卵殻表面にタンパク膜が完成した虫卵を分離して、模擬検体(虫卵添加検体)を調製した。

予め、試験条件設定のための予備試験を実施し、ストマッカー法ではストマッカー袋による検査可能な検体重量と洗浄液量について検討し、また超音波法では超音波処理の時間および洗浄容器の洗浄回数等を検討した。更に虫卵の検出操作法である浮遊法と沈殿法についても比較検討を行った。

本試験における、模擬検体の接種回虫卵数は 1,000 個および 200 個の 2 条件とし、いずれの試験法においても各々 5 回の実験を繰り返して回収虫卵数を求めた。得られた値は F 検定で分散を確認し、t 検定で有意差を調べた。

4) 輸入キムチにおける虫卵検査

(i) 被験物質

平成 28 年度 1 月に市販韓国産キムチ 2 点および中国産キムチ 3 点を被験物質とした。各キムチ 100 g を洗浄容器に入れ、500 mL の洗浄液を加えて、10 分間静置後、以下の操作を行った。

(ii) 検査法

検体入の洗浄容器を超音波洗浄し、洗浄液全量をろ過しながら 1L 容の液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。60 分以上静置後、上清約 900 mL を吸引除去した。得られた洗浄液・沈渣部分は 50 mL の遠沈管 2 本に分注した後、液量計の管壁を精製水 50 mL で 2 回洗い、計 200mL 分を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。沈渣を回収後、精製水及び酢酸エチルを加えて激しく混和し、更に遠心分離した。上清除去後、沈渣にシヨ糖比重液 (d=1.27) を加えて混和し、浮遊法にて虫卵の回収操作を行った。顕微鏡下に全視野を観察して虫卵数を求めた。

5) 行者ニンニクにおける虫卵検査

(i) 被験物質

北海道で市販される行者ニンニク計 41 検体を対象とした。感染リスク低減のため、検体は購入後、試験開始まで 7 日間以上、-80 °C で冷凍した。検体は、1L 容洗浄容器に入れ、5 倍量の洗浄液を加えて、約 10 分間静置後、以下の操作を行った。

(ii) 検査法

検体からの虫卵の剥離操作は、5 分間の超音波洗浄によった。超音波洗浄後、洗浄液の全量を 1,000mL 容の円錐型液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。比重液には硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液 (d=1.23 ~ 1.24) を用いた。

3 . 容器包装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試験 (ボツリヌス菌添加/保存試験)

(i) 芽胞液の作製

各供試菌株をクックドミート培地で一晚嫌気培養後、芽胞調製用培地 10 mL に接種し 30 °C で更に一夜培養した。培養液は 80 °C 20 分間の加熱処理後、再び 30 °C で培養した。同加熱処理を翌日および一週間後に繰り返した後、滅菌水で 3 回洗浄した。芽胞形成は、芽胞染色後、鏡検した。

(ii) 栄養型菌液の調製

同上の芽胞液を加熱処理に供した後、卵黄加 CW 寒天培地に塗布し、30 °C で 24 時間嫌気培養した。発育集落を滅菌精製水に懸濁し、栄養型菌液とした。栄養型菌液の菌数は、クロストリジア寒天培地を用いて混釈培養し、黒色集落数を測定し算出した。

(iii) 食品検体への菌液添加

芽胞液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、加熱処理後、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4 °C、25 °C あるいは 30 °C

に保存した。菌液添加日を保存 0 日目とし、15 日、30 日、100 日、180 日、270 日、360 日目に、各保存温度につき 4 検体ずつ食品内の菌数測定に用いた (0 日目、15 日目、30 日目は平成 26 年度の検討)。

栄養型菌液については、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4 °C あるいは 30 °C で保存し、60 日後に食品内菌数を測定した。

また、本菌の発育に必要な栄養素の補充として 20 倍濃縮 BHI broth を検体 1 g あたり 0.25 μ L 添加した。その後、加熱処理した芽胞液を添加し、4 °C または 30 °C で 30 日間保存後、食品内菌数を測定した。

上記の食品内接種にあたっては、封かん強度測定器用ゴムシール (サン科学) を使用した。

(iv) 理化学性状 (pH・酸化還元電位) の測定

ボツリヌス菌非添加の検体を用い、保存試験期間を通じた、理化学性状変動を測定した。検体容器包装外部を 70% エタノールで消毒後、滅菌済みメスを用いて容器包装および検体食品の一部を切開し、pH 電極ならびに酸化還元電位用電極を食品内部に挿入して、pH および酸化還元電位を測定した。

(iv) 生菌数 (一般細菌数) の測定

無菌的に取り出した検体 100 g を細切後、滅菌ペプトン加生理食塩水 100 mL を加え、ストマッカーにて十分混和させ、これを試料原液とした。10 倍希釈液を作成した後、各希釈液 1 mL を標準寒天培地に混釈法により接種し、35 °C で 48 時間培養を行ない、生育集落数を求めた。

(v) クロストリジア属菌数の測定

同上の希釈試料液 1 mL をクロストリジア寒天培地に混釈法にて接種し、35 °C で 48 時間嫌気培養後、生育した黒色集落数を計測した。

2) ボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度範囲に関する検討

クックドミートブイオンを用いて、37 °C で嫌気培養したボツリヌス菌約 10^3 cfu をクックドミートブイオン 10mL に接種し、BIONIX 低酸素培養キット (スギヤマゲン) を用いて、酸素濃度を 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0% に調整した上で、37 °C 下にて最大 1 週間まで培養を継続した。増殖確認は、クロストリジア寒天培地への混釈培養により行った。

3) ボツリヌス毒素定量検出法の検討

(i) マウス毒性試験法 (毒素の *in vivo* 検出法)

精製ボツリヌス A 型毒素および B 型毒素は、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。菌培養液の場合は、クックドミート培地での菌培養液を 3,000 rpm 20 分間遠心し、その遠心上清を 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過し、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。希釈した各試料液を 0.5 mL ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種し 4 日間観察した。陰性対照として、試料液を 100 °C 20 分間加熱処理することで毒素の不活化したもの作製し、同様に 0.5 mL ずつマウス腹腔内に接種し 4 日間観察した。

(ii) *in vitro* 定量検出法

A 型毒素には BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit を、B 型毒素には BoTest™ B/D/F/G

Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用いた。基質反応後は、434 nm 励起光下で 470 nm 及び 526 nm の蛍光強度を測定した。毒素活性は、470 nm と 526 nm の蛍光強度比 (RFU at 526 nm / RFU at 470) より算出した。B 型毒素に関しては必要に応じて事前にトリプシンによる活性化を行った。

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

1. データ収集

回収等に関するデータは米国食品医薬品局 (US FDA: US Food and Drug Administration) のデータベース (<http://www.fda.gov/Safety/Recalls/>)、カナダ食品検査庁 (CFIA: Canadian Food Inspection Agency) のデータベース (<http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newroom/food-recall-warnings/eng/1299076382077/1299076493846>) から各国での非動物性食品の病原微生物汚染に起因する回収等のデータを抽出した。米国 FDA については 2004 年～2013 年、CFIA についても 2004 年～2013 年 (2011 年は CFIA のデータベース移行の影響で半年分) のデータを使用した。これらの回収情報は判断が困難なものも含まれていることから個々の情報の関連づけや統合は行わなかった。また対象製品の食材に関しては研究分担者らが回収情報にもとづき独自に分類を行った。

欧州連合 (EU: European Union) での非動物性食品に関わる病原微生物汚染等の情報に関しては、「食品および飼料に関する早期警告システム (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed)」の 2001 年～2011 年のデータをまとめた報告書 (参考文献 1) が欧州食品安全機関 (EFSA: European Food Safety Authority) より公表されており、これを利用した。

米国での非動物性食品を原因食品とするアウトブレイクについては、米国疾病予防管理センター (US CDC: Centers for Disease Control and Prevention) の食品由来疾患アウトブレイクサーベイランスシステム (FDOSS: Foodborne Disease Outbreak Surveillance System) のアウトブレイクデータを蓄積したアウトブレイク情報データベース (FOOD: Foodborne Outbreak Online Database) (<http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>) から、2006 年～2011 年に発生したサルモネラおよび志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) を病因物質とするアウトブレイクを抽出した。

欧州でのアウトブレイクについては、参考文献 1 の Table 26 (Reported outbreaks associated to FoNAO in the reporting countries in accordance with Directive 2003/99/EC, 2007-2011) にまとめられている 2007～2011 年の欧州の非動物性食品を原因食品とするアウトブレイクのリストを使用した。欧州のアウトブレイクデータの解析においてはサルモネラ、ベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC)、およびセレウス菌を病因物質とするアウトブレイ

クを対象とした。

2. データ集計・解析

各種データは Microsoft Excel に入力し、Microsoft Access 等のデータベースソフト等を利用して各種の集計、解析を行った。

26 年度

2011 年 5、6 月のドイツにおけるフェヌグリーク スプラウトの喫食を原因とする STEC O104 大規模アウトブレイクを受け、欧州委員会 (EC) は EFSA に対し、EU での非動物性食品による食中毒発生の実態、関連するハザードのランク付け、リスク因子、対策の選択肢などについて科学的見解を示すよう要請した。これに対し EFSA は、2013 年 1 月にパート 1 報告書 (参考文献 1) を発表し、さらに 2014 年 3～12 月に、それぞれ異なる果物・野菜類を対象とした 5 報からなるパート 2 報告書 (参考文献 3～7) を表した。パート 2 報告書には EC の要請にもとづき、微生物規格基準 (Microbiological Criteria) の設定に関する EFSA の見解も記載されている。

EFSA はパート 1 報告書において、食品と病原体との間の関連の強さ、患者発生数、疾患実被害、食品の消費量、汚染率などの 7 項目からなる基準に従って、EU における非動物性食品と病原体の組み合わせをランク付けしている。パート 2 報告書が対象とした果物・野菜と病原体の組み合わせ (「サラダ用葉物野菜におけるサルモネラおよびノロウイルス」、「ベリー類におけるサルモネラおよびノロウイルス」、「トマトにおけるサルモネラおよびノロウイルス」、「メロン・スイカにおけるサルモネラ」、「鱗茎野菜・ニンジンにおけるサルモネラ、エルシニア、赤痢菌、およびノロウイルス」) は、このパート 1 報告書のランキング結果にほぼ沿って選出されている。

なおパート 2 報告書において、「ベリー類」はイチゴ、ラズベリー、ブラックベリー、ブルーベリーなど、「鱗茎野菜」はタマネギ、ニンニクなどを主に指している。

本研究では、これらのパート 2 報告書を精査し、微生物規格基準に関する見解を取りまとめた。

なおパート 2 報告書 5 報のうち「サラダ用葉物野菜におけるサルモネラおよびノロウイルス」に関する報告書 (参考文献 3) について、全体の構成を示すため、「目次」の部分の仮訳を資料として添付した (資料 1)。他のパート 2 報告書も同様の構成となっている。

27 年度

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 2 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 3 参照)。そこで、FDA が発表した「農産物の安全に関する最終規則: 必須要件」(資料 4) や関連資料 (資料 5) 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 (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. 研究成果

1. 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菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

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10 CFU/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30 CFU/gおよび10 CFU/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け物から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、汚染箇所を熱湯をかける、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。

3. 分離菌株の遺伝子解析

1) PFGEによる解析

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。

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。

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。

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

えられた。

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。

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。

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

1) 国内浅漬け製品における主要病原細菌の汚染実態と衛生指標菌の定量検出結果

平成 25 年 6 月～同年 10 月の間に、東京都および神奈川県内で市販されていた野菜浅漬け製品（白菜・茄子・きゅうり・大根・野沢菜）計 66 製品について、主要病原細菌（EHEC、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス）の検出を行ったが、いずれも陰性であった。衛生指標菌の定量結果としては、一般細菌数が平均値として、 $2.27E+06 \pm 5.67E+06$ CFU/g、大腸菌群数の平均値が $6.32E+04 \pm 2.89E+05$ CFU/g であり、*-*グルクロニダーゼ産生性大腸菌については何れも陰性であった。これらの成績を原材料別に観察したところ、白菜浅漬けでは、同時期に試験に供した他の原材料浅漬け製品に比べ、有意に高い菌数を認めた。

また、白菜検体の一部には、異なる時期の同一製品が含まれており、これらの衛生指標菌数の季節性挙動について検討することとした。結果として、6 月購入検体の一般細菌数・大腸菌群数が $1.1E+04$ CFU/g 及び $9.5E+03$ CFU/g であったのに比べ、8 月購入検体では $3.5E+06$ CFU/g および $5.3E+05$ CFU/g と上昇傾向を示した。10 月購入検体では、これに比べて減少傾向を示した（ $7.4E+05$ CFU/g 及び $1.1E+04$ CFU/g）。

以上より、本研究における供試浅漬け検体では、主要病原細菌は検出されなかったが、指標菌の分布には原材料あるいは季節により差異を示すことが明らかとなった。

2) 菌叢解析

上記の調査結果を受けて、原材料別、あるいは季節別の指標菌の検出数値変動と、構成細菌叢変動の関連性について検証するため、メタゲノム解析を実施することとした。

(i) 原材料別の構成細菌叢変動

計 66 検体の構成細菌叢ならびに検体間の系統学的関連性について検討するため、メタゲノム解析を実施した。なお、本検討にあたっては、各検体より約 80,000-100,000 リードを解析に供した。Phylum 階層での系統樹を作成したところ、3 つのクラスター（A, B, C）に大別された。原材料等の検体情報を加味したところ、野沢菜および白菜（10 月）検体はクラスター A に、茄子、きゅうり、大根検体はクラスター B に、白菜（6 月、8 月）および野沢菜検体はクラスター C に分類されることが明らかとなった。種階層での主成分分析によっても、これら供試検体は、3 クラスターに大別化される傾向が認められた。以上より、本研究で用いた浅漬け製品は、原材料別に構成細菌叢の共通性を示すことが明らかとなった。

(ii) 季節別の構成細菌叢変動

異なる時期に購入した白菜の浅漬け製品を対象

として、構成細菌叢の比較を行った。月別にそれぞれ 2 検体を無作為に抽出、比較した棒グラフを図 5 に示す。当該製品では気温上昇に伴い、*Leuconostoc* 科が優勢となる一方、*Lactobacillus* 科、*Pseudomonas* 科、腸内細菌科菌群の構成比は顕著に低減を認めた。以上より比較対象として用いた白菜浅漬け製品では気温上昇を認める夏季には *Leuconostoc* 科細菌が優勢となることが示された。

(iii) 白菜浅漬け中の 0157 挙動と構成細菌叢変動

白菜浅漬けを食塩或いは市販浅漬けの素を用いて実験的に製造し、0157 および指標菌の食品内変動を検討した。漬け込み液の種別を問わず、0157 は接種（製造）後、12 日目においても、接種時の菌数から顕著な低減を示さず、長期的な生残を示すことが明らかとなった。また、指標菌については、0157 添加により、一般細菌数が若干の低減を示したが、非添加群では、穏やかな増加傾向を示した。非接種群における大腸菌群の挙動については、市販浅漬けの素で製造された検体では保存 6 日目まで検出されなかったが、12 日目で 10^1 オーダーが検出された。一方、食塩で製造された検体では、保存 3 日目で 10^2 オーダーが検出された。同検体の製造・保存における細菌叢変動を検討したところ、供試白菜原料は約 80% が *Pseudomonas* 属菌により占められていたが、市販浅漬けの素を使用して製造された検体では、0157 接種により *Pseudomonas* 属の経時的減少と *Flavobacterium* 属・*Sphingomonas* 属の経時的増加が認められた。一方、食塩を用いて製造された検体では、0157 接種の有無に関わらず、*Pseudomonas* 属の更なる優勢化が保存を経るにつれて顕著となった。以上より、白菜の浅漬け中において 0157 は長期的に生残しうること、製造時の漬込み液の性状や保存時間により、同検体を構成する細菌叢は大きく変動することが明らかとなった。

(iv) 衛生規範改正前後の市販浅漬け製品における衛生指標菌数の比較

衛生規範改正前後に、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。

生菌数は、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 製品で改正前後で有意な数値変動が認められたが、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、有意な減少を示した。なお、大腸菌については供試検体全てで陰性となった。

乳酸菌数は、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 製品で有意な増加を認めた。一方、製品 No. 2 および No. 3 の乳酸菌数は、改正後に減少を示した。

以上より、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。

(v)衛生規範改正を通じた浅漬検体の菌叢変動

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。

II)大腸菌群に分類される菌属の推定

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。

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*, *Tetragenococcus*, *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。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。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る。改正前後でのこれら 3 菌属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。

浅漬け製造工程における微生物挙動に関する研究

1. ハクサイ・キュウリ浅漬け製品の製造過程における衛生指標菌の挙動成績

平成 26 年 2 月下旬に、神奈川県内の浅漬け製造事業者の協力を得て、同製造施設内でハクサイおよびキュウリの浅漬け製品の間産品および施設内ふきとり検体を採取した。以下に製品別に指標菌の検出状況を報告する。なお、何れの検体も β -グルクロニダーゼ産生大腸菌は陰性であった。

ハクサイの浅漬け

ハクサイ浅漬け製品は、原材料を半割りし、2~5 日間 10% 食塩水中で塩漬後、殺菌工程に供されていた。工程別に指標菌数変動を比較したところ、原材料では一般細菌数が $4.79E+04$ CFU/g、大腸菌群数が $2.99E+03$ CFU/g であったのに対し、塩漬後の中間製品では一般細菌 $4.00E+03$ CFU/g、大腸菌群数が $3.33E+02$ CFU/g とそれぞれ約 10^1 オーダーの低減を示した。引き続き次亜塩素酸 Na を用いた殺菌工程を通じ、両菌数はそれぞれ $8.87E+03$ CFU/g 及び $8.75E+01$ CFU/g へ低減した。刻み・計量・包装工程を経た最終製品では一般細菌数が $5.47E+03$ CFU/g、大腸菌群は陰性を示した。

キュウリの浅漬け

今回供試したキュウリの浅漬け製品については、原材料を裁断せずに殺菌、漬込み、化粧糠をつけて生産されていた。原材料では一般細菌数が $2.94E+05$ CFU/g、大腸菌群数が $2.43E+03$ CFU/g、殺菌工程直後ではそれぞれ $1.29E+04$ CFU/g および $1.67E+01$ CFU/g であった。その後の調味液中での 2 日間の漬込みを通じ、一般細菌数は若干の増加傾向を示したが、大腸菌群は陰性であった。最終製品の一般細菌数・大腸菌群数は概ね同様で、それぞれ $3.83E+03$ CFU/g 及び $5.00E+01$ CFU/g であった。尚、最終製品については化粧糠が付着していたが、通常、喫食前に水道水で化粧糠を洗い落とすと想定されたため、当該検体は、水道水で洗浄し化粧糠を洗い落とした後に、菌数の定量に供した。

2. 主要病原細菌の検出状況

主要病原細菌として腸管出血性大腸菌 0157/026/0111、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネスの検出を試みた。

ハクサイの浅漬け

ハクサイの浅漬け関連検体のうち、増菌培養液を用いて、ベロ毒素(VT)遺伝子の検出を行った。原材料・塩漬後検体の一部は疑陽性反応を示した。しかしながら、分離培養により典型集落は認められず、供試検体は腸管出血性大腸菌 0157/026/0111 陰性と判定された。サルモネラ属菌およびリステリア・モノサイトゲネスについても同様に全ての検体で陰性を示した。

キュウリの浅漬け

キュウリの浅漬け関連検体のうち、上述と同様に、キュウリ原材料および殺菌後の検体の一部で、VT 遺伝子陽性が認められたが、分離培養によって最終的に EHEC 0157/026/0111 は陰性と判定された。サルモネラ属菌及びリステリアについても全てで陰性を示した。

3. 白菜浅漬けの製造工程における菌叢変動

白菜浅漬け製造ラインでの原材料、中間製品(塩漬後、殺菌後)および最終製品検体より、各 2

検体を無作為に抽出し、菌叢解析に供した。最終的に、77科194属が検出された。以下に代表的な菌属に関する工程中の動態を記述する。

(1) *Pseudomonas* 属

Pseudomonas 属は全検体中の28.2%と最も高い占有率を占めた。本属の構成比率は、塩漬け工程で著しく減少したものの、殺菌後は再び上昇傾向を認め(11%)、最終製品での構成比率は5.7%であった。

(2) *Leuconostoc* 及び *Rhizobium* 属

当該菌属は、塩漬け後、それぞれ33.5%及び26.2%の構成比率を示した一方、他の工程ではいずれも5%以下であった。これらの菌属は、葉物野菜から高頻度に検出されることが知られている他、10%以上の食塩を含む、キムチ等の発酵食品からも検出されることが知られている。

(3) *Pedobacter* 属

殺菌工程後の検体からは、*Pedobacter* 属が高頻度(43.9%)に検出された。本属菌は主に植物の根部に棲息するが、ある学術報告では殺菌後のレタス表面から検出されている。本研究における成績は、殺菌工程が野菜表面に付随する細菌の多くを制御することで、白菜内部に侵入・生息していた本属菌の競合的増殖を助長したものと推測される。

(4) *Microcystis* 属

Microcystis 属は、最終製品より最も高頻度(39.8%)に検出された。本属菌は、低温抵抗性を示すことが知られているため、包装後、低温下に保存される最終製品中でも一定数が保持されていると考えられる。

(5) *Escherichia* 及び *Enterobacter* 属

当該菌属の構成比率は、最終製品中でそれぞれ0.04%および0.02%であった。大腸菌群は最終製品から分離培養されていなかったため、本成績は死菌由来核酸のわずかな混入によるものと考えられた。

4. 白菜由来菌叢は塩濃度依存性の変動を示す

Pseudomonas 属菌の構成比率変動と塩漬け込みとの関連性が示唆されたことを受けて、生鮮白菜を原材料として0、2、10%食塩水中で3日間の漬け込み工程を再現し、同工程前後での菌叢及び指標菌数動態を比較することとした。

一般細菌数は食塩濃度に関わりなく、漬込前後で顕著な差異を示さなかったが、大腸菌数は10%食塩水漬込後には、漬け込み前に比べ、有意な菌数低減を示した。菌叢解析を通じて、10%食塩漬込み群では、*Pantoea* 属構成比率が顕著に減少した。上述のパイロットスタディにおいて最も優勢な構成比率を示した *Pseudomonas* 属は、食塩濃度の上昇に伴い、構成比率が高まる傾向を示した。

以上より、食塩濃度は漬込工程における原材料由来の菌叢を左右する重要な決定因子であると共に、同工程は殺菌工程と併せて、浅漬け製造での病原微生物制御に寄与する工程であることが定量的に実証された。

漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

1) 漬物の酵母

供試した105漬物について酵母試験を実施した結果、約60%(60試料)で酵母の検出を確認でき

なかった。残り45試料で酵母の検出を認められた。酵母数をみると 10^2 個/gは15試料、 10^3 個/gは9試料、 10^4 個/gは10試料、 10^4 個/g以上は11試料であった。

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。ただし、本研究で入手した漬物の多くは加熱処理されていない未加熱製品である。それらの漬物中の酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae* であり、漬物のそのものに由来するものと判定した。表6に示したが、7試料において漬物由来とされない種が検出された。

漬物別の酵母検出頻度を図3に示した。酵母は漬物では普遍的にみられるものといえた。

2) 漬物のカビ

105試料の漬物についてカビ試験を実施した。その結果、約70%(75試料)の試料でカビの検出が認められなかった。残り40試料でカビを認めた。カビ数をみると 10^2 個/gは28試料、 10^3 個/gは2試料と少なく、さらに、 10^4 個/g以上の試料は検出されなかった。

漬物の種類別では、からし漬けを除いてカビの検出が認められた。漬物中にはカビの検出頻度は非常に少ないことが確認できた。

本研究の主要な課題はカビ数ではなく、どのような種類のカビが検出されたかが、重要因子である。漬物において検出されたカビは、湿性環境に多いカビで代表的なカビの *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* 等であった。一方、*Aspergillus*, *Eurotium*, *Paecilomyces* 等のように乾性環境に多いカビも確認された。

また、保存料の有無、および食塩濃度も示したが、保存料の有無にかかわらずカビの検出がみられた。さらにカビが検出された試料では、比較的食塩濃度は低値であった。

3) 漬物の食塩濃度

入手した一部の漬物製品の漬物汁について、食塩濃度を測定したところ、試料の多くは1%以下の低塩値を示した。

4) 加熱処理した漬物での事故事例

本研究では市販漬物中にどの程度の酵母、およびカビが検出されるかについて定量試験を実施した。一方、加熱処理した漬物でカビ事故事例が起こった事例も経験した。この事例は、A県とB県の2件で起きた。いずれも地場産業として積極的に販売促進している食品であったが、賞味期限内でカビの発生がみられた。カビの特定を行ったところ、いずれも耐熱性カビ *Neosartorya fischeri* であった。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 食品汚染・症例に関する文献・実態調査臨床症例数

(i) 症例数

文献学的検索で明らかとなった国内感染の土壌媒介寄生虫症例は、1990年から2015年までの26年間に回虫が225例、鞭虫が23例、鉤虫は8例であった。2011年以降の5年間でも、回虫が5例、鞭虫が7例、鉤虫は2例と、土壌媒介寄生虫によ

る症例は発生が続いた。BMLの資料から明らかとなった土壌媒介寄生虫症は、2000年から2015年までの16年間に回虫が272例、鞭虫が283例、鉤虫は215例であった。2011年以降の5年間でも、回虫が34例、鞭虫が45例、鉤虫は9例と、最近も症例の発生が継続し、しかも文献検索による解析結果と比べて症例数は多かった（BMLの資料は国内感染だけでなく輸入症例も含む、また日本人だけでなく外国人の症例も含む）。

(ii) 感染源

文献学的検索で抽出された土壌媒介寄生虫症例256例中、感染源が生野菜の症例は11例、無農薬野菜は14例、有機野菜は7例で、残りは感染源を明らかにすることができなかった。内訳を見ると、生野菜を感染源とする回虫症例は9例、鞭虫症例は2例であり、無農薬野菜を感染源とする回虫症例は14例、有機野菜を感染源とする回虫症例は5例、鞭虫症例および鉤虫症例は各々1例であった。無農薬野菜を感染源とした回虫症例が最も多かった。感染源となった具体的な野菜の種類も特定を試みたが、具体的な野菜名の記述がないか、あるいは野菜の種類別、例えば根菜類との記載のみで、汚染野菜の種類の特定は困難であった。

(iii) 検査機関における検査データの解析

目黒寄生虫館は1990年～2008年の19年間に、合計2,657検体の検査・鑑定依頼を受託していた。このうち非動物食品が175検体(5.9%)、また動物性食品は1,820検体(68.5%)、人体・動物および環境由来は662検体(24.9%)であった。非動物性食品に関する検査・鑑定依頼の件数は最も少なかったが、この中で最も件数の多い検体は、野菜・果実等で83検体(非動物性食品の47.4%)であり、次いで海藻の44検体(25.1%)、更に穀類・いも・豆の32検体(18.3%)の順であった。これらの食品のうち、人体への感染性を持つ寄生虫が検出された検体数は11件で、非動物性食品の検体のうち6.3%を占めるに過ぎなかった。また検出された寄生虫は総てアニサキスであった。その内訳をみると、*Anisakis*属線虫が検出された検体は、米飯、マーガリン、粉末調味料で、各1検体ずつであった。一方、*Pseudoterranova*属線虫が検出された検体は、豆腐(2検体)の他、米飯、パン、ほうれん草、キムチ、白滝、ワカメで各1検体であった。さらに、食品媒介寄生虫の「虫卵」を目的に検査依頼された検体として、キムチ14検体、乾燥ネギ1検体を認めたが、これらは総て寄生虫卵陰性であった。

16の検査機関のうち1機関を除く15機関と目黒寄生虫館において2005年度および2006年度の検査数は、計79件および11件であったが、2007年度から2010年度までは、いずれの検査機関においても検査は実施されていなかった。また2011年度以降2015年度までは、年間に計1件から9件の検査が実施されていた。なお虫卵が検出されたのは、2005年度に実施された1件のみであった。

2) 検査方法に関する検討

検査指針および2005年度厚労科研「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」総括・分担報告書も引用文献として採用した。これらの文献資料を一覧すると、食品汚染の寄生虫卵を検出するプロセ

スは、汚染食品からの虫卵の分離回収操作と、回収虫卵の検出操作の2つから構築されていた。まず、野菜・果物や漬物・キムチ等の汚染食品から虫卵を分離回収するという操作については、いずれも水あるいは界面活性剤等を用いてサンプルの表面をブラシなどで洗う、振り洗いする、超音波を利用するなどの手法がとられていた。しかし中には、単に水で洗うという記述のみのももあり、洗浄プロセスについての詳細な記述と更に比較考察をした成績はなかった。一方、洗浄液については村田らがその組成について比較検討を行い、界面活性剤と消泡剤の併用が回収率の向上に寄与することを示した。

次いで、食品から分離回収した溶液中の虫卵の検出法については、虫卵を比重液に浮遊させて顕微鏡下に観察する浮遊法、あるいは虫卵をより効率的に沈査に集めて顕微鏡下に観察する沈殿法、のいずれかの手法が採用されていた。笛木らは、野菜や土壌の検査では回収沈渣の量が多いため、浮遊法でより効率よく検査ができるとした。また、村田は野菜・果実、有機肥料、栽培土壌及び砂場などの寄生虫卵検査法として浮遊法を採用し、更にキムチの検査法でも浮遊法を採用した。検査指針でも浮遊法が採用されている。一方で、海外の報告では、Klapacが浮遊法を採用していた他は、おおむね沈殿法が用いられていた。浮遊法と沈殿法との比較検討は、キムチおよび犬の糞便を検体としたものがあり、キムチの検査法では沈殿法の検出感度が高いと結論されていた^[7]。一方で犬の糞便については、沈殿法の検出感度が高いとする論文と、浮遊法の検出感度が高いとする論文の両方を認めた。

予備試験の結果、1回の試験に用いる検体重量は、ストマッカー法および超音波法ともに50g、洗浄液量は250mlとし、虫卵の検出操作は沈殿法を用いることとした。また超音波法では、処理時間を5分、洗浄容器の洗浄回数は2回とした。このような条件で、本試験を実施したところ、以下の結果が得られた。

(i) 接種回虫卵数を1,000個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では 1129.6 ± 104.7 (平均±標準偏差)、従来法では 861.2 ± 264.4 、ストマッカー法では 1485.6 ± 398.6 であった。ストマッカー法による回収虫卵数の平均値が、従来法のそれより有意に高い(有意水準5%)との結果を得た。他のデータ間には、有意差を認めなかった。

(ii) 接種回虫卵数を200個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では 133.0 ± 19.4 、従来法では 133.4 ± 34.6 、ストマッカー法では 154.6 ± 48.2 であった。各データ間には、有意差を認めなかった。

3) 輸入キムチ・行者ニンニクでの汚染実態調査

いずれの輸入キムチ検体からも、人体寄生性の寄生虫卵は検出されなかった。なお、キムチ検体#4(韓国産)からは、浮遊時間0.5時間でダニの卵が検出された。また、行者ニンニク41検体について寄生虫卵検査を実施したが、いずれの検体も陰性で、エキノコックスの虫卵は全く検出されなかった。

3. 容器包装結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試験

(a) ボツリヌス菌芽胞液の添加回収試験

a-1) クロストリジウム属菌および一般細菌の食品内動態

試験開始時の A 型菌および B 型菌芽胞添加量は、検体 1 g あたりそれぞれ 418 ± 213 cfu および $1,093 \pm 329$ cfu であった。検体食品内のクロストリジウム属菌の動態は、A 型 B 型いずれの菌型においても保存温度に関係なく、6 ヶ月目まで添加時と同程度の菌数を維持した。その後、減少傾向に転じたが、1 年後にも接種菌は検出された。6 ヶ月目以降の菌数の減少は、4 °C 保存群より保存温度が高い群 (25 °C および 30 °C 保存群) においてより顕著となる傾向が認められた。試験開始時の一般細菌数 (生菌数) は、A 型菌芽胞添加群、B 型菌芽胞添加群、芽胞非添加群でそれぞれ、 406 ± 213 cfu/g、 396 ± 374 cfu/g、 246 ± 136 cfu/g であった。4 °C 保存群の生菌数は芽胞菌添加の有無に関わらず 1 年を通じて開始時とほぼ同等であったが、25 °C および 30 °C 保存群では、検体間での差異はみられるものの、初期菌数からは増加傾向にあった。

a-2) 理化学的性状の経時的変化

保存試験開始時の食品 pH 値は 5.15 ± 0.11 であった。pH 値は保存温度に関係なく、保存期間を通じて概ね 5 ~ 5.5 程度の範囲にあった。酸化還元電位は、試験開始時点で 32.02 ± 7.0 mV で、4 °C および 30 °C 条件下ともに、一旦上昇傾向になったがその後下降し、試験終了時 (1 年後) には開始時点より低い値となった。一般的に、ボツリヌス菌の生育可能な酸化還元電位は -200 mV 程度であると報告されているが、我々は平成 26 年度の検討結果から -200 mV から +200 mV までの広い範囲でボツリヌス菌が良好に生育することを明らかにしており、酸化還元電位についても、当該検体はボツリヌス菌の生育が可能な理化学的性状を有すると考えられた。

(b) ボツリヌス菌栄養型菌液の添加試験

芽胞菌を用いた試験(a)では、検体食品内でボツリヌス菌が長期間維持されているものの、菌の顕著な増殖はみられなかった。そこで、栄養型菌液の添加を行い、「たくあん」製品内でボツリヌス菌の増殖について確認試験を行った。試験開始時の A 型および B 型栄養型菌添加量は、それぞれ 277 ± 41 cfu/g、 419 ± 61 cfu/g であった。60 日間の保存期間中、検体の容器包装に膨張等の変化は見られず、60 日後に保存を終了し菌数の測定を行ったところ、A 型菌添加 4 °C 保存群で 151 ± 45 cfu/g、A 型菌添加 30 °C 保存群で 71 ± 10 cfu/g、B 型菌添加 4 °C 保存群で 157 ± 40 cfu/g、B 型菌添加 30 °C 保存群で 95 ± 21 cfu/g で、いずれの菌型、保存温度においても減少傾向にあり、栄養型菌についても、当該食品検体内で生育・増殖を示さないことが明らかとなった。

(c) ボツリヌス菌芽胞液の添加試験 2-栄養素添加

ボツリヌス菌等は生育・増殖に高タンパク質および高炭水化物を必要とする。今回の対象検体の原材料は大根という、窒素源および炭素源が非常に乏し

いマトリックスであることから、本菌が当該食品内で生育・増殖しなかった一因として、窒素源及び炭素源の不足が考えられた。そこで、当該検体に芽胞液と共に、20 倍濃縮の BHI broth を添加し、ボツリヌス菌の動態を検討した。BHI broth 非添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 非添加 B 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 B 型芽胞液添加群における試験開始時のクロストリジウム属菌は、それぞれ 382 ± 40 cfu/g、 512 ± 112 cfu/g、 308 ± 3 cfu/g、 607 ± 436 cfu/g であった。30 日間の保存期間後のクロストリジウム属菌数は、A 型 B 型いずれの菌型、また保存温度においても、保存試験開始時よりも減少傾向にあり、BHI broth 添加条件下でもボツリヌス菌の増殖は見られなかった。同じ検体および芽胞菌非添加検体での生菌数は、いずれの群も保存試験開始時より若干の増加傾向が見られ、一部例外もあるものの、BHI broth を添加した 30 °C 保存群にその傾向が強かった。

2) ボツリヌス菌の増殖に係る理化学的性状に関する検討

計 9 供試株では、酸素濃度 0.75% 以下で培養 1 日以内に良好な増殖を示し、うち 407 - 1 を除く 8 株は 1.00% でも同 4 日以内に増殖を呈した。一方、CB21 株については、0.50% 以下での増殖を示すにとどまった。また、生存性については、より高い酸素濃度下においても、ヒートショックを行った後には確認された。

3) 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)

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用した迅速・高感度のボツリヌス毒素 *in vitro* 検出法「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」が米国 BioSentinel 社によって開発され、国際的な妥当性確認を行う準備段階にある。本試験では、この「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」と現在の国際的な標準法であるマウス毒性試験法 (*in vivo* 法) を用い、検出感度の比較検討を行った。A 型毒素を用いた場合、マウス毒性試験法での検出最低濃度は 6-10 pM であった。一方、BioSentinel 社の A 型毒素用キットを用いた試験では、陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 pM と動物試験法と同等の成績を示した。また、B 型毒素に対するマウス毒性試験法での検出最低濃度は 30-100 pM であったのに対し、B 型毒素用キット (BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit) で陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 nM と、検出感度の課題が残される結果となった。

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

1. 食品の回収・汚染情報にもとづくリスク分析

1-1. 米国での非動物性食品の回収情報

米国 FDA が発表した 2004 ~ 2013 年の回収情報は合計で約 3,300 件であった。これには食品だけで

なく医薬品や医療機器等の回収情報も含まれている。このうち非動物性食品と分類されるものは約400件であった。米国FDAや以下に記載するカナダCFIAの回収情報の集計件数には、同一事例にかかわる関連回収情報や追加回収情報等が含まれている可能性があるため、件数のみで評価しないよう注意が必要である。

米国FDAの非動物性食品関連の回収情報における対象食品は生鮮野菜が最多となっており(120件)、次いでナッツ類(98件)、生鮮果物(59件)、コショウ・唐辛子等のスパイス(32件)、ゴマ(11件)が多く報告されていた(表1)。生鮮野菜・果物では、具体的にはサラダ、スプラウト、ハウレンソウ、レタス、トマト、カンタローブ、マンゴーが多く報告されていた。

回収の原因病原体として多かったのはサルモネラ(276件)、リステリア(95件)、大腸菌 O157:H7(17件)、ボツリヌス(13件)であった。他にも赤痢菌、大腸菌 O145、A型肝炎ウイルス、腸チフス菌が報告されていた。

回収食品と原因病原体の組み合わせとしては、2004~2013年の10年間で、ナッツ類、スプラウト、コショウ・唐辛子類、カンタローブ、トマト、ゴマ、ハウレンソウではサルモネラとの組み合わせが最も多く、サラダ、レタスではリステリアとの組み合わせが多く見られた。ハウレンソウ、サラダ、レタスでは大腸菌 O157:H7との組み合わせも比較的多く報告されており、ザクロはすべてがA型肝炎ウイルスとの組み合わせであった(表2)。

1-2. カナダでの非動物性食品の回収情報

CFIAがとりまとめた2004~2013年の食品回収情報は合計で約1,400件であった。このうち非動物性食品に分類されるものは約300件であった。CFIAの回収情報における対象食品はナッツ類が最も多く(87件)、生鮮野菜(72件)、ゴマ(37件)、生鮮果物(31件)、コショウ・唐辛子・カレー粉等(23件)が多く報告されていた(表3)。生鮮野菜・果物では、具体的にはサラダ、バジル、スプラウト、ハウレンソウ、レタス、カンタローブ、マンゴーが多く報告されていた。

回収の原因病原体として多かったのはサルモネラ(241件)、リステリア(32件)、ボツリヌス(15件)、大腸菌 O157:H7(11件)であった。他にも赤痢菌、A型肝炎ウイルス、クリプトスポリジウム、サイクロスポラが報告されていた。

回収食品と原因病原体の組み合わせでは、2004~2013年の10年間で、ナッツ類、ゴマ、スプラウト、コショウ・唐辛子類、バジル、マンゴー、カンタローブ、カルダモンではサルモネラとの組み合わせが最も多く、サラダ、マッシュルーム、タマネギ、リーキ(西洋ネギ)ではリステリアとの組み合わせが多く見られた。ナッツ類、レタス、ハウレンソウでは大腸菌 O157:H7との組み合わせも比較的多く報告されており、赤痢菌はニンジンとの組み合わせのみが報告されていた。A型肝炎ウイルスはベリーと、クリプトスポリジウムはパセリと、サイクロスポラはバジルとの組み合わせのみが報告されていた(表4)。

1-3. EUでの非動物性食品の病原微生物汚染情報

EUでの病原微生物汚染情報に関しては参考文献1のTable 30に、2001~2011年に非動物性食品に関連してRASFFに通知があった汚染等の件数が、いくつかの病原微生物ごとに記載されている(表5)。

サルモネラの全通知件数は692件で全体の77%を占め、そのうち「その他のハーブおよびスパイス」が184件、「その他の農産物の混合製品」が111件、「ゴマ種子」が80件、「その他の種子およびナッツ」が73件であった。

大腸菌(病原性および非病原性の両方を含む)は全59件で、そのうち「バジル」が16件、「その他のハーブおよびスパイス」が12件であった。

バチルスは全58件で、そのうち「その他のハーブおよびスパイス」が20件、キノコが13件であった。他にもベリー類ではノロウイルスと、バジル、コリアンダー、ペパーミント、黒コショウではサルモネラとの組み合わせが多く報告されていた。

2. アウトブレイク情報にもとづくリスク分析

2-1. 米国のサルモネラアウトブレイク

2006~2011年のFDOSSのデータから、原因食品が非動物性であると思われるサルモネラアウトブレイクを抽出した。各年(1~12月)について抽出されたアウトブレイクの件数を表6に示す。各年とも110~150件のサルモネラアウトブレイクの報告があり、そのうち非動物性食品によると思われるものは各年15~21件であった。

抽出された非動物性食品によるサルモネラアウトブレイクのリストを表7に示す。アウトブレイクごとに、発生年、サルモネラ血清型、患者数、入院患者数、死亡者数、原因食品、汚染原材料(判明した場合)が示されている。

表7のアウトブレイクを、原因食品の原材料がどの品目グループ(commodity group)に分類されるかに従ってグループ分けした。ここで用いた原材料の品目グループはPainterら(参考文献2)により2009年に提唱されたものである。Painterらは、食品原材料を17の品目グループに分類した。分類はヒエラルヒー構造をとっており、本研究で対象とする非動物性食品は「植物性」の原材料のみを含むものである。Painterらは植物性の原材料を8つの品目グループに分類している。すなわち、穀類・豆類(1)、油脂・砂糖(2)、果物・ナッツ(3)、キノコ類(4)、葉物野菜(5)、根菜(6)、発芽野菜(7)、および、つる性・茎野菜(8)である(カッコ内の番号は本研究で便宜的につけたもの)。以上のうち3~8は農産物、4~8は野菜類と総称される。1~8のそれぞれの品目グループに含まれる品目の代表例が表8に示されている。

表7のアウトブレイクを原因食品の原材料の品目グループ別に従い分類した。原因食品が特定の1つの品目グループの原材料のみを含んでいる場合、アウトブレイクはその品目グループに分類し、2つ以上の品目グループの原材料を含んでいる場合はグループ9(複合食品)に分類した。

各品目グループに分類されたアウトブレイクの

件数は、グループ 1 が 3 件、3 が 23 件、5 が 7 件、6 が 5 件、7 が 15 件、8 が 19 件、および 9 が 30 件で、グループ 2 および 4 に分類されたアウトブレイクはなかった。品目グループごとに、そのグループに分類されたアウトブレイクの件数、合計患者数、合計入院患者数、合計死亡者数を示した(表 9)。表 9 より明らかなように、件数、患者数とも、果物・ナッツを原材料として含む食品を原因とするアウトブレイクが最も多く、次いで、つる性・茎野菜、発芽野菜であった。果物・ナッツおよびつる性・茎野菜の両グループのアウトブレイクを合わせると、件数では全体(特定の 1 つの植物性品目グループを原因食品とするアウトブレイクのすべて)の 58%、患者数では 81%、入院患者数では 89%を占め、死亡者では 100%に関連していた。

次に、品目グループではなく個々の品目のレベルで、どの品目がより多くサルモネラアウトブレイクに関連していたかを調べた。品目グループ 1 は関連するアウトブレイクの件数および患者数が少なかったため対象にしなかった。結果を表 10 に示す。各品目グループで、関連したアウトブレイクの件数が多かった品目のみを示している。関連したアウトブレイクの件数で見ると、果物・ナッツの品目グループではスイカ(4 件)とカンタロープメロン(4 件)が最も多くアウトブレイクと関連しており、次いでピーナッツ製品(3 件)であった。関連した患者数ではピーナッツ製品が最も多かった(1,529 人)。葉物野菜ではレタス(4 件)、根菜ではポテトサラダ(4 件)が最も多く関連しており、発芽野菜ではアルファルファスプラウトが 9 件で最も多く、次いで豆もやし(3 件)であった。つる性・茎野菜ではトマト(12 件)が最も多く関連し、ついでペッパー(5 件)であったが、患者数ではペッパーが最も多くの患者(1,654 人)の原因食品となっていた。

以上より、非動物性原材料としては、トマト、アルファルファスプラウト、ペッパーが最も多く 2006~2011 年の米国のサルモネラアウトブレイクに関連していたことがわかった。患者数に関してはペッパーおよびピーナッツ製品が最も多くのアウトブレイク患者の発生に関連していた。

2-2. 米国の志賀毒素産生性大腸菌(STEC) O157 アウトブレイク

2006~2011 年の FDOSS のデータから、原因食品が非動物性であると思われる STEC O157 および STEC non-O157 アウトブレイクを抽出した。各年(1~12 月)について抽出された件数を表 11 に示す。

原因食品が非動物性であると思われる STEC non-O157 アウトブレイクは件数が 5 件と少なかったため以後の分析は行わなかった。抽出された STEC O157 アウトブレイク 28 件のリストを表 12 に示す。

サルモネラアウトブレイクの場合と同様、表 12 に示した STEC O157 アウトブレイクを原因食品の品目グループにもとづき分類した。その結果、グループ 3(果物・ナッツ)に 5 件、グループ 5(葉物野菜)に 14 件、グループ 6(根菜)に 1 件、グ

ループ 9(複合)に 8 件のアウトブレイクが分類され、グループ 1、2、4、7、および 8 に分類されたアウトブレイクはなかった。品目グループごとに、そのグループに分類されたアウトブレイクの件数、合計患者数、合計入院患者数、合計死亡者数を示したのが表 13 である。この表より、STEC O157 によるアウトブレイクに関連した植物性品目グループとしては葉物野菜が圧倒的に多く、件数で全体の 70%、患者数で 93%を占め、次いで果物・ナッツ(25%と 6.1%)であった。

葉物野菜、果物・ナッツ、および根菜に分類されるいかなる品目が原因食品として、より多く STEC O157 アウトブレイクに関連していたかを調査した。結果を表 14 に示す。

以上より、非動物性原材料としてはレタスが圧倒的に多く 2006~2011 年の米国の STEC O157 アウトブレイクに関連していた。患者数に関してもレタス、次いでホウレンソウが最も多くのアウトブレイク患者の発生に関連していた。

2-3. 欧州のサルモネラアウトブレイク

EFSA 報告書(参考文献 1)の Table 26 には、EU 諸国等(スペインを除く EU 加盟 26 カ国、ノルウェー、スイス)から 2007~2011 年に報告された非動物性食品を原因食品とするアウトブレイクの概要(原因食品の品目カテゴリー、品目、病因物質、血清型、発生年、発生国、エビデンスのレベル、患者数、入院患者数、死亡者数)が記載されている。EU では食品由来アウトブレイクは 2005 年から報告が義務化されている。本研究では、欧州のアウトブレイクデータに関して、サルモネラ、ベロ毒素産生性大腸菌(VTEC)およびセレウス菌を病因物質とするアウトブレイクを対象とした。

Table 26 からサルモネラアウトブレイク事例を抽出した。Table 26 には原因食品が非動物性である 219 件の食品由来アウトブレイク(合計患者数 10,543 人)が記載されており、このうち細菌が病因物質であるアウトブレイクは 141 件、サルモネラが病因物質のアウトブレイクは 37 件(合計患者数 1,340 人)であった。ちなみに同期間に動物性食品を原因食品とするアウトブレイクは合計で 2,065 件(患者数 30,230 人)が報告されていた(このうちサルモネラアウトブレイクは 1,271 件、17,001 人)。

37 件のサルモネラアウトブレイクのうち 32 件のリストを表 15 に示す。37 件のうち 5 件は原因食品の記載に具体性がほとんどなかったためこの表に含めなかった。表 15 で使用されている原因食品の品目カテゴリーは、参考文献 1 において提唱されている分類法(表 16)に従っている。

表 15 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 17 である。件数の多い品目カテゴリー順に記載している。

件数の最も多い品目カテゴリーは発芽野菜(11 件)で、次いで葉物野菜(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、件数で全体の 56%、患者数で 76%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 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. 欧州のベ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、フェヌグreek 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

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（ $n=5, c=0, 25\text{ g}$ 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、ニンジンを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するとしている。

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、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が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者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者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

浅漬液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、冷蔵庫の床の清掃、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 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。

市販浅漬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。

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 (0157/026/0111) 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 0157/026/0111 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。

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、異常な数値とはいえない。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、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コックスの虫卵の検出を試みたが、いずれの検体もエキノコック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、いずれからモ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られる。

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、短時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事から、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。これらからの結果から、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、当該食品中のボツリヌス菌を除去する、ボツリヌス菌の増殖を防止する、または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℃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 1CR 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、カンタローブ、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、カンタローブメロン、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

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。

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。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。

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。

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、麹漬、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られたが、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кок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. 容器包装結核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、カンタローブ、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) 朝倉宏, 五十君静信, 山本茂貴, 春日文子. 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) 高島浩介, 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, 春日文子: 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

