

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「小規模事業者における HACCP 導入支援に関する研究」

分担研究報告書

カット野菜の製造過程における検証方法等に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	牧野有希	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	大河内美穂	キューピー株式会社品質保証本部
研究協力者	宮下 隆	キューピー株式会社品質保証本部

研究要旨：都内 6 店舗で販売される計 100 検体のカット野菜製品を対象として、衛生指標菌の定量検出試験を ISO 法に基づき実施した。生菌数は概ね 4～7 対数個オーダー、腸内細菌科菌群数及び大腸菌群数は概ね 2～6 対数個オーダーであった。大腸菌、黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌、及びサルモネラ属菌は全検体で陰性となった。菌叢解析を通じ、当該製品より腸内細菌科菌群及び大腸菌群として検出される優勢菌叢としては *Rahnella* 属、*Serratia* 属、*Buttiauxella* 属、*Hafnia* 属等が同定された。単一原料製品に比べ、複合原料製品は相対的に高い指標菌数分布を示した。販売施設別では、大腸菌群数が最も低値を示す施設（2.45 対数個/g）は、最大値の施設（6.35 対数個/g）に比べ約 3.9 対数個の差異を示し、販売段階での温度管理が当該製品の衛生指標菌の検出状況に大きな影響を及ぼすと推察された。

上記製品のうち、衛生状況が良好と判定された製品の製造施設を訪問し、カットキャベツ製造過程における衛生管理情報の提供を受けると共に、製造工程を通じた微生物挙動を検討した。当該施設では 2 段階の殺菌洗浄処理を採用していた。製造ラインの一次及び二次洗浄殺菌工程前後及び最終製品を対象とする衛生試験を通じ、洗浄殺菌に伴う生菌数の明確な減少が認められたが、大腸菌群数や腸内細菌科菌群数は極めて低値ながらも生菌数と相関的挙動を示さなかった。大腸菌・黄色ブドウ球菌は全工程で陰性を示した。以上より、カット野菜を一例として、非加熱で喫食される形態の非動物性食品の製造工程管理や製品の微生物汚染に関する検証にあたって、大腸菌群を採用する科学的根拠は乏しく、国際整合性を確保する上では大腸菌等を用いる有用性が示された。

A. 研究目的

平成 28 年 12 月に最終取り纏めが行われた、「食品衛生管理の国際標準化に関する検討会」では、今後のわが国における食品安

全確保の在り方として、フードチェーンを構成する食品の製造・加工、調理、販売等を行う全ての食品等事業者を対象に、HACCP による衛生管理手法を取り入れ、更なる安全確保を図ることが示された。その中では、各業態・業種の特長や特徴等を考慮して、コーデックスが定める HACCP7

原則・12 手順を要件とする「HACCP の考え方に基づく衛生管理基準」、及び小規模事業者や一部業種等を対象とした、一般衛生管理を基本とする「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理基準」の二分化を行い、その対応にあたることとなった。特に、後者については、事業者の実情を踏まえ、必要に応じて重要管理点を設定して管理等、弾力的な取り扱いを可能とするものとしている。

こうした弾力的運用は、既に HACCP を導入している米国や欧州等でも認められており、我が国がこのような弾力的運用を採用し、実行していくためには、国内の食品衛生の実情にあわせた検討を行うことが必要不可欠である。

本分担研究では、こうした背景を鑑み、食品製造過程における効果的な HACCP の運用に資する検証方法に関する検討を行うことを目的として、本年度は、カット野菜の衛生状況の検証ならびに、当該製品製造施設における工程管理実態に関する情報整理ならびに同工程での微生物挙動に関する検討を行い、当該食品の製造工程管理にあたっての検証方法を提示することとした。

B. 研究方法

1. 市販カット野菜検体の確保

平成 29 年 11 月から平成 30 年 1 月にかけて、関東地域の食品販売施設（計 6 施設）にて市販される計 100 検体のカット野菜製品を買い上げ、以下の試験に供した。入手後、検体は 10℃以下を保持し、概ね 2 時間以内に当研究所まで搬送した。

2. 検体の前処理

カット野菜検体の容器包装を 70%エタ

ノールを用いて消毒後、余剰水分を滅菌脱脂綿で拭取り、滅菌した鉢で検体の容器包装上端を切除し、検体あたり 25g を計量し、滅菌ストマッカー袋に収納した。同袋に、滅菌緩衝ペプトン水（Buffered Pepton Water (BPW), pH 7.4) 225mL を無菌的に加え、1 分間ストマッキング処理を行い（6.0 ストローク/秒）、これを検体原液とした。

3. 衛生指標菌の定量検出試験

上述の検体原液を用いて、生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数及び黄色ブドウ球菌数を求めた。各試験の実施にあたっては、それぞれ ISO 4833-1:2013、ISO 21528-2:2017、ISO 4832: 2006、ISO 16649-2:2001、ISO 6888-1:1999 を用いた。各試験フローの概要については図 1 に示した。

4. 病原細菌の検出試験

上項 3 を経た検体原液残液を 37℃にて 18 時間培養し、平成 27 年 7 月 29 日付け食安発 0729 第 4 号及び平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 2 号に基づいて、サルモネラ属菌及び腸管出血性大腸菌の定性検出試験を行った。

5. 構成菌叢解析

上項 2 の検体原液 10mL を遠心分離し、沈査より全 DNA を抽出した。これを鋳型として、16S rRNA V5-V6 領域を Ion アダプター配列を含むプライマーを用いて、PCR 増幅後、精製・定量した。その後、混合ライブラリーを作成し、Ion Chef/PGM を用いた ion semi-conductor

pyrosequencing 解析に供した。取得配列データについては、CLC Genomic Workbench を用いて不要配列を除去し、RDP classifier pipeline を介してリード配列の階級付けを行った。

6. カット野菜製造施設における採材協力及び工程管理情報の整理

平成 30 年 2 月にカット野菜製造施設を訪問し、同カテゴリーにおいて国内で最も主要な製品である、カットキャベツを対象とした製造工程に関する情報を整理するとともに、製造ラインを視察し、中間製品等の採材への協力を求めた。採材検体については、採取後速やかに包装を行い、10℃以下の温度帯で当研究所まで 2 時間以内に搬送し、その後、速やかに上項 2~4 に示す微生物試験に供した。

7. 統計解析

販売施設間での指標菌検出成績について、Turkey-Kramer 法を用いて、成績に有意な差異があるかを検証した。単一・複合原料検体間における指標菌数の有意差は、t 検定を用いて解析を行った。

C. 研究結果

1. 市販カット野菜製品における衛生実態

市販カット野菜製品計 100 検体を対象とした衛生指標菌の検出分布状況については図 1 に示した。以下に指標菌種別の状況を概説する。

1) 一般細菌数 (生菌数)

一般細菌は全検体より検出され、検出菌数の幅は $7.9 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^7$ CFU/g、中央値は 1.5×10^6 であった (図 2)。特に販売店

C より購入した、玉ねぎやパクチーを原料とする製品における同菌数中央値は 1.1×10^7 CFU/g と他製品に比べて相対的に高い傾向を示した。実際に Turkey-Kramer 法により、一部施設間で有意な差異を認められた (施設 A vs. C、B vs. C、C vs. D、C vs. F、表 1)。

2) 腸内細菌科菌群数

腸内細菌科菌群は計 96 検体より検出され、陽性検体における検出菌数の幅は $6.0 \times 10^1 \sim 7.6 \times 10^6$ CFU/g、中央値は 3.7×10^3 CFU/g であった ()。特に販売店 C より購入した、玉ねぎやパクチーを原料とする製品における同菌数中央値は 2.6×10^6 CFU/g と他製品に比べて相対的に高い傾向を示した。実際に Turkey-Kramer 法により、一部施設間で有意な差異を認められた (施設 A vs. C、B vs. C、C vs. D、C vs. E、C vs. F、表 1)。

3) 大腸菌群数

大腸菌群は計 95 検体より検出され、陽性検体における検出菌数の幅は $1.0 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^7$ CFU/g、中央値は 1.7×10^3 CFU/g であった (図 2)。腸内細菌科菌群と同様に、販売店 C 由来の、玉ねぎやパクチーを原料とする製品の中央値は 5.5×10^6 CFU/g と、他製品に比べて、相対的に高い傾向を示した。実際に Turkey-Kramer 法により、一部施設間で有意な差異を認められた (施設 A vs. C、B vs. C、C vs. D、C vs. E、C vs. F、表 1)。

4) 大腸菌数及び黄色ブドウ球菌数

大腸菌及び黄色ブドウ球菌は全ての検体

で陰性となった。

5) 病原細菌

腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌はいずれも定性試験により陰性となった。

6) 販売施設別での比較

指標菌検出成績を販売施設別に示した(図3)。3種の検出された指標菌の分布成績から、販売施設A~Cについては、同施設D~Fに比べて相対的に高い数値を示す傾向にあり、大腸菌群数として最大・最小の施設はそれぞれ6.35対数個/g及び2.45対数個/gと約3.9対数個/gの差異を認めた。しかしながら、製品種別を考慮せずに販売施設間の有意差を解析したところ、いずれも有意差は認められなかった。

7) 原料の単一・複合性による比較解析

カット野菜検体について原料が単一であるか、複数の原料を含むかにより大別し、両者における指標菌検出状況を比較したところ、全検体の成績間では有意差がみられなかったものの、複合原料検体は単一原料検体に比べ、各種指標菌数が高い傾向にあった(図4)。販売施設別に、単一原料検体と複合原料検体を比較したところ、施設B、C、D、Fで有意差が認められた(表2)。

2. 菌叢解析

13製品39検体を対象とした菌叢解析では、計521菌属が検出された。このうち、*Escherichia*属は不検出であったが、サルモネラ属由来遺伝子については、培養法では不検出であったものの、計8製品12検体より定量的には僅かながらも検出された

(図5)。

供試検体全体では *Pseudomonas* 属、*Leuconostoc* 属、*Lactococcus* 属、*Plesiocystis* 属等が最も優勢な菌属として同定されたが、これらに続く優勢菌叢として、腸内細菌科菌群や大腸菌群の定義に含まれる、植物性或いは環境常在菌叢の *Rahnella* 属、*Buttiauxella* 属、*Serratia* 属、*Hafnia* 属、*Raoultella* 属、*Pantoea* 属、*Yersinia* 属等が高い占有率をもって検出された(図5；太字は腸内細菌科菌群、下線は大腸菌群に含まれる菌属を指す)。

原料別では、玉ねぎを主原料とする検体で *Plesiocystis* 属が概ね検出されない状況にあったほか、レタスを主原料とする検体では、*Leuconostoc* 属、*Lactococcus* 属及び *Plesiocystis* 属の占有率が相対的に低い数値を示した(データ未載)。

以上の成績より、カット野菜供試検体を構成する菌叢には腸内細菌科菌群及び大腸菌群に属する常在菌叢が多く含まれる実態が明らかとなった。

3. カット野菜製造施設における工程管理に関する情報整理

1) 製造工程管理

平成30年2月に関東地域のあるカット野菜製造施設を訪問し、国内消費量の最も多いカットキャベツ製造工程管理に関する情報を提供いただくと共に、製造工程を通じた衛生指標菌数の挙動を調査した。

当該施設でのカットキャベツ製造工程の概要については図6に記した。同工程では、原料に起因する微生物危害を極力制御するために、二段階の殺菌洗浄工程を設け、その対応にあたっていた。また、殺菌効果を

高めるため、殺菌剤の有効性評価及び関連設備機器の導入等も適時行っていた。

2) 製造工程を通じた微生物挙動

実際に、一次殺菌前、一次殺菌後、二次殺菌前、二次殺菌後、最終製品の別にそれぞれサンプリングを行い、衛生指標菌数を求めたところ、生菌数は、一次及び二次殺菌後には若干の減少を示した(図7)。しかしながら、腸内細菌科菌群数及び大腸菌群数については、これと相反する挙動を示した(図7)。何れの工程においても大腸菌は検出されず、最終製品(カットキャベツ)の生菌数平均値は 4.9×10^3 CFU/g、腸内細菌科菌群、大腸菌群及び大腸菌は不検出であった。一方、ロットは異なるものの、同様の製造工程を経たカットキャベツに他原料を加えた製品については、生菌数平均値が 2.3×10^3 CFU/g、腸内細菌科菌群数が 1.2×10^3 CFU/g、大腸菌群数が 1.1×10^3 CFU/g と、前者に比べて増加傾向を示した(図7)。

以上より、カットキャベツの製造工程を通じた微生物動態として、当該食品を殺菌洗浄工程に供することは、微生物危害の低減に確実に機能していることが示された。一方で、同工程を通じた大腸菌群や腸内細菌科菌群等、食肉等で汎用される代表的な糞便汚染指標菌を当該食品の製造工程管理にあたっての衛生指標として用いる意義はないことが示された。

D. 考察

本研究では、製造環境温度等の安定的確保が行いやすい冬季に、市販流通するカット野菜製品の衛生状況を把握すると共に、衛生環境が確保された製品の製造工程に関

する情報を取り纏め、同工程の微生物挙動に関する知見を得た。

指標菌検出成績の比較として、販売施設Cで購入した玉ねぎやパクチーを原料とする製品検体で特に高値を示したが、販売施設C由来検体が他施設の多くと有意差を示したことから、当該施設における販売工程での温度管理あるいは販売に供した時間経過等に要因があると目された。菌叢解析結果はこれを支持するものであり、販売施設C由来の玉ねぎを主原料とする検体(図5、検体番号10-A~C)では、低温性の大腸菌群に属する *Rahnella* 属が他検体に比べ極めて優勢な状況にあった。*Rahnella* 属菌は土壌に優勢とされており、玉ねぎ等の根菜類を原料とした検体で優勢となった状況は生育環境に依存するものと思われる。

EUでは、カット野菜等の製造基準として、大腸菌を採用している($n=5, c=2; m=100, M=1000$)ほか、店頭販売時の成分規格として、サルモネラ属菌陰性($n=5, c=0, m=0/25g$)を採用している。

わが国で大腸菌群が衛生指標菌として採用された当時は、国内の衛生状況は先進諸国と同等とは言い難く、また経済状況等も現在とは大きく異なっていたことから、その採用には異論がなかったものと思われる。一方、現在のわが国は先進主要国として国際社会に参画する状況となり、衛生実態も産学官の連携や事業者自らによる衛生確保等を通じ、大きく改善されている。

食品の国際貿易が加速的に進む現在、食品安全に係る国際整合性を微生物規格基準やガイドライン等を通じて、如何に反映させうるかは、国際貿易上の大きな課題ともなっており、国際整合性の確保に資する

衛生試験法として、現行の大腸菌群を用いた衛生指標の考え方を多くの食品に適用する科学的根拠は乏しいと考えられる。

食品の製造工程管理に係る国際的な微生物基準の一例として、EU では、カットフルーツ及びカット野菜に対してサルモネラ属菌を、スプラウトに対し腸管出血性大腸菌主要 6 血清型を最終製造製品に適用している。それらの根拠には、健康被害実態が大きく関与していると推察される。日本国内の食中毒被害実態に目を向けると、非加熱のサラダ等による計 8 件の事例のうち、3 件はノロウイルス、同じく 3 件はサルモネラ属菌（うち、1 件はチフス菌）、1 件はエルシニア、その他の病原性大腸菌、その他の細菌となっていた（2010 年 1 月 1 日～2018 年 3 月 18 日；厚生労働省食中毒統計資料による）。ノロウイルスについては、製造加工従事者による二次汚染の可能性が高いと思われる一方、原料等に起因する微生物危害の製造工程管理による低減策を講じる上では、サルモネラ属菌や大腸菌に注視した形で、今後の衛生管理の在り方について議論を行うことは、国際整合性の確保を考える上で必要な事項と思われる。

EU で実施されるサルモネラ属菌に関する検証方法としては、ISO 法もしくは同法との間で妥当性確認が取れたものを採用することとなっている。我が国のサルモネラ属菌検査法については、ISO 法に準じたものであるが、国内では同等性の観点を含めて迅速簡便検査法が検討対象となったことはない。国立医薬品食品衛生研究所が主催する「食品からの微生物標準試験法検討委員会」では、こうした近年の動向変化に

じて、迅速簡便検査法の同等性評価に関しても議論の対象とするべく準備を進めている。来るべき HACCP 法制化に際し、カット野菜・フルーツ等の製造工程管理や製品における微生物危害を検証するためには、今後、迅速簡便な検証方法を見定め、その評価を行うことが必要不可欠と思われる。

E. 結論

喫食前未加熱食品であるカット野菜製品の衛生指標菌検出状況及び製造工程管理に関する情報と細菌挙動に関する知見より、当該食品の微生物成分規格として衛生指標菌としての大腸菌（ β -D-glucuronidase 産生大腸菌）を用いる有意性が示された。また、菌叢解析は製造工程管理指標としての大腸菌やサルモネラ属菌等の適用を支持する結果とも考えられる。その反面、現在、我が国で当該食品の製造工程管理等において用いられている大腸菌群、あるいは乳肉食品の糞便汚染指標として採用されている腸内細菌科菌群を当該食品の製造工程管理や及び微生物基準等に用いる意義は極めて少なく、衛生規範の改訂あるいは製造基準設定等に関する検討が喫緊に必要な課題と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし（投稿予定 1 報）
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

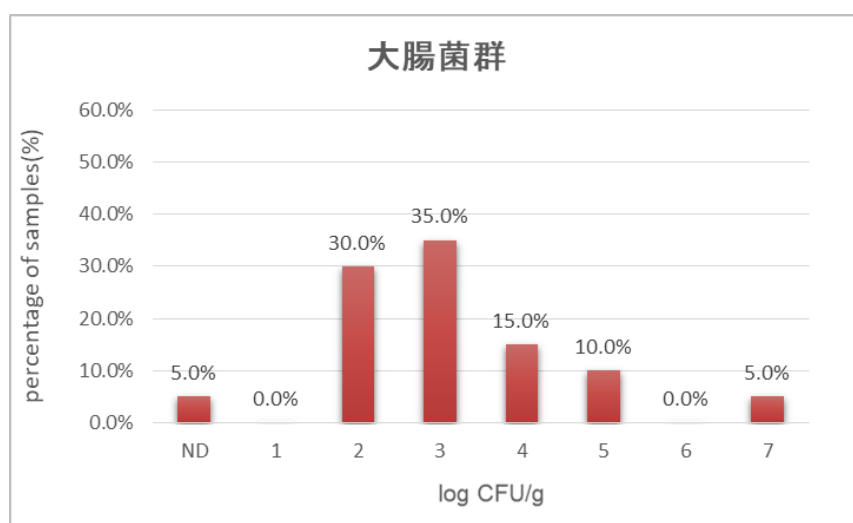
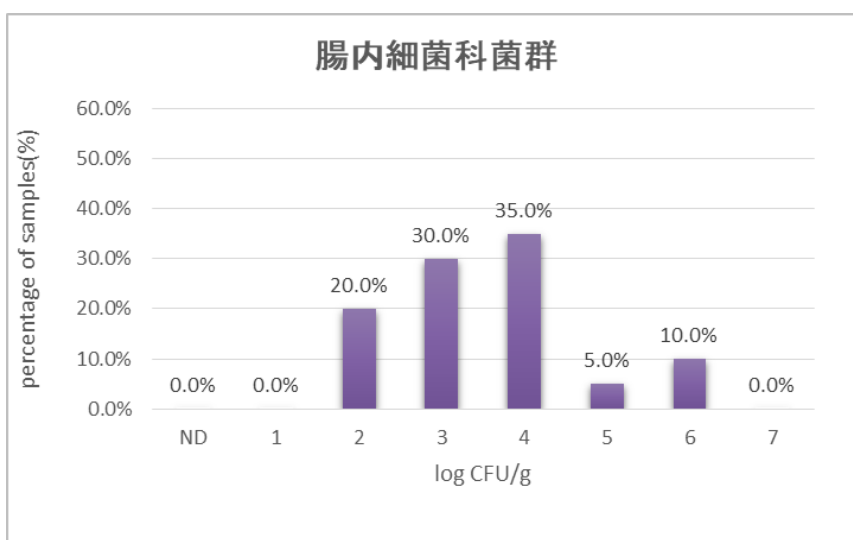
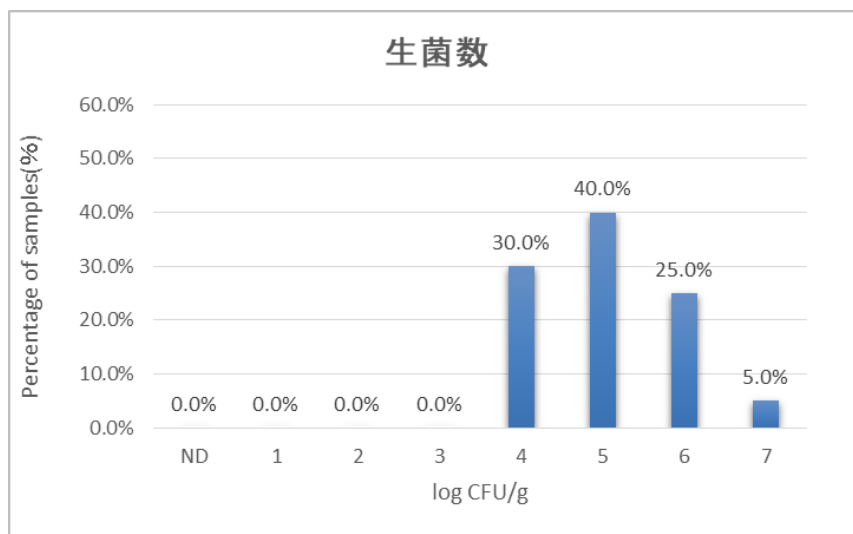


図 2. 市販カット野菜検体における衛生指標菌定量分布成績の概要

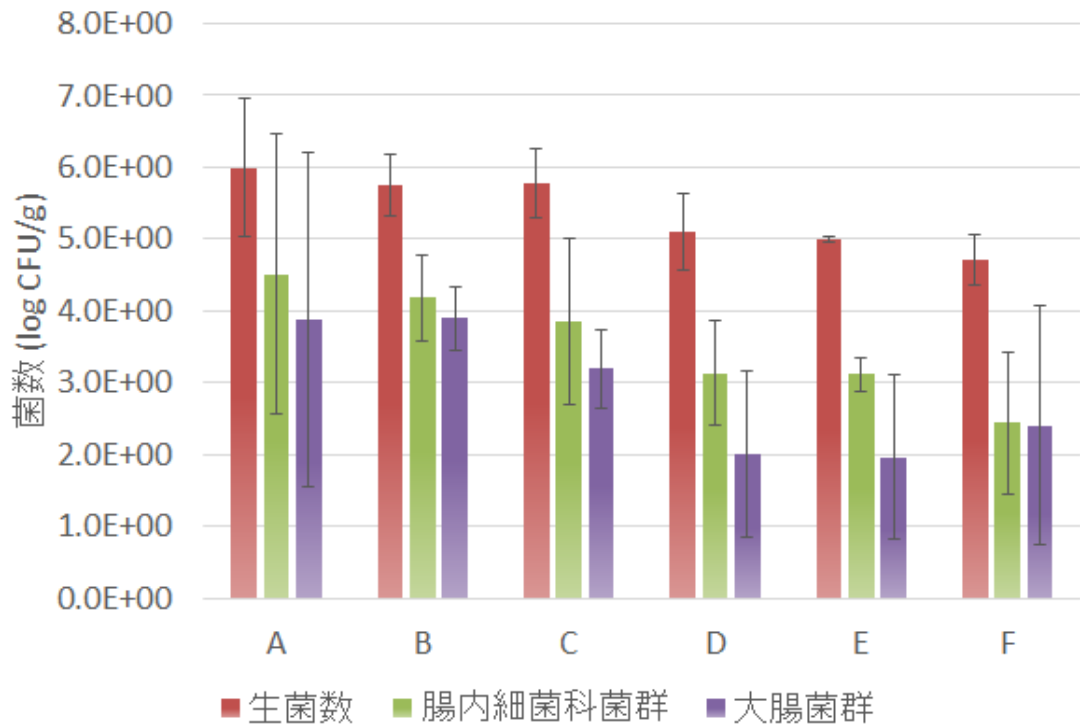


図 3. 市販カット野菜検体の販売施設別指標菌検出状況の比較

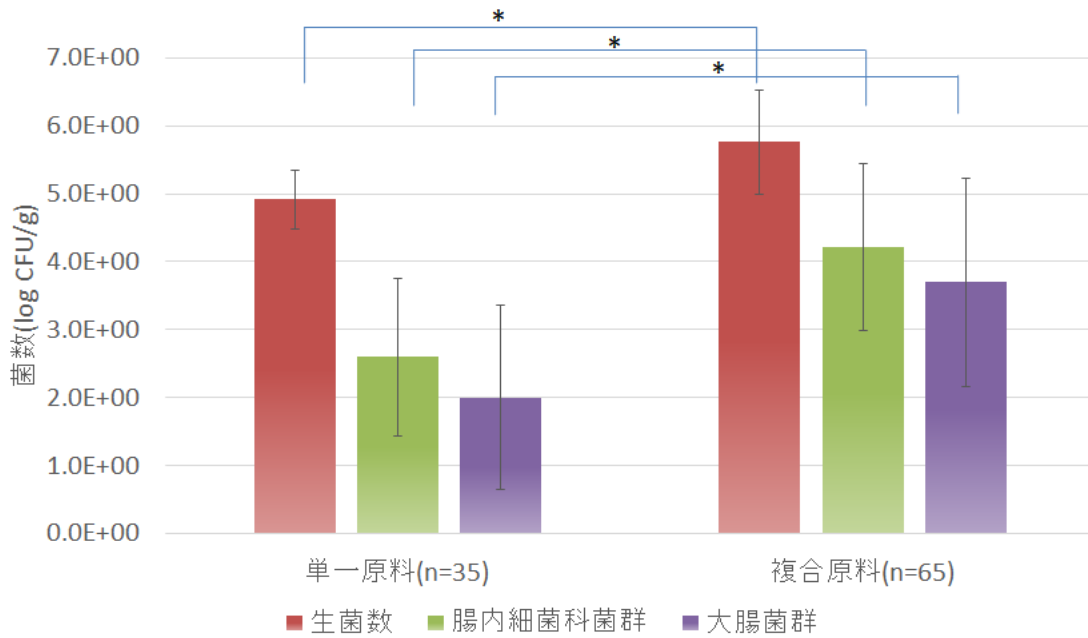


図 4. 市販カット野菜検体の原料構成による指標菌検出状況の比較

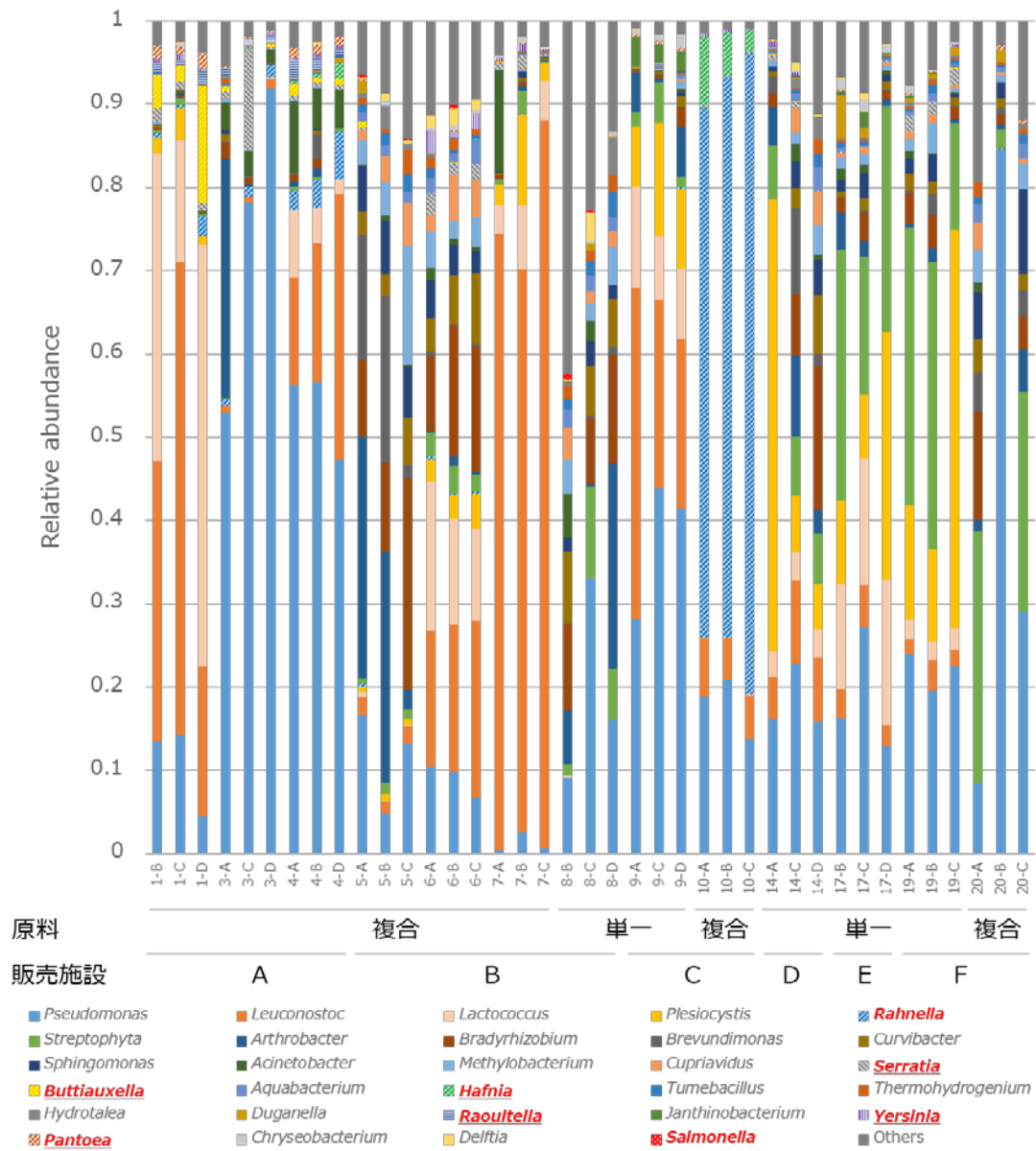


図 5. 市販カット野菜代表検体の構成菌叢解析におけるバーチャート

赤字は腸内細菌科菌群として、下線は大腸菌群として検出されうる菌属を示す。

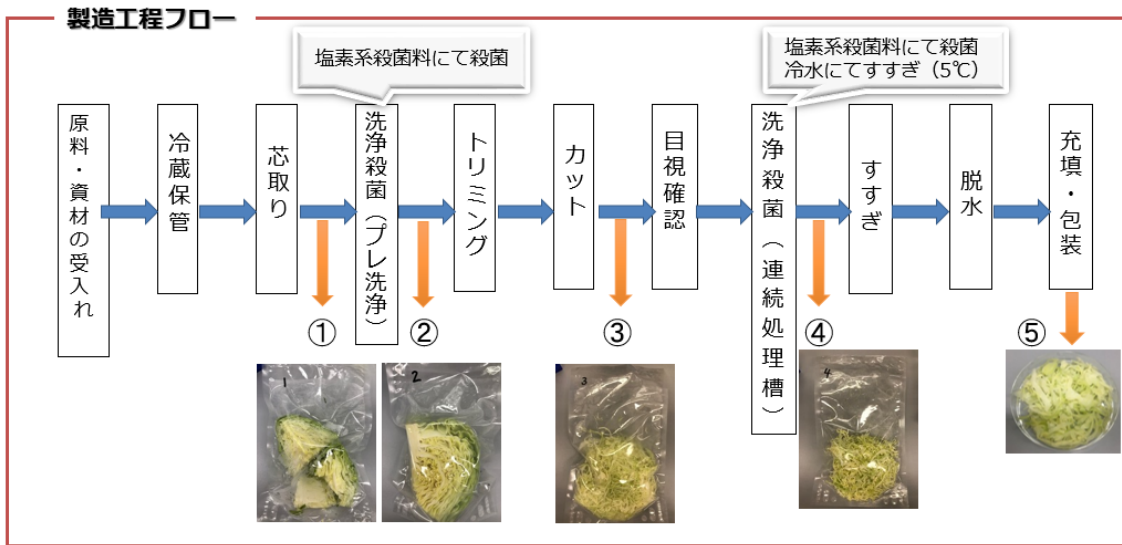


図 6. カットキャベツの製造工程フロー概要

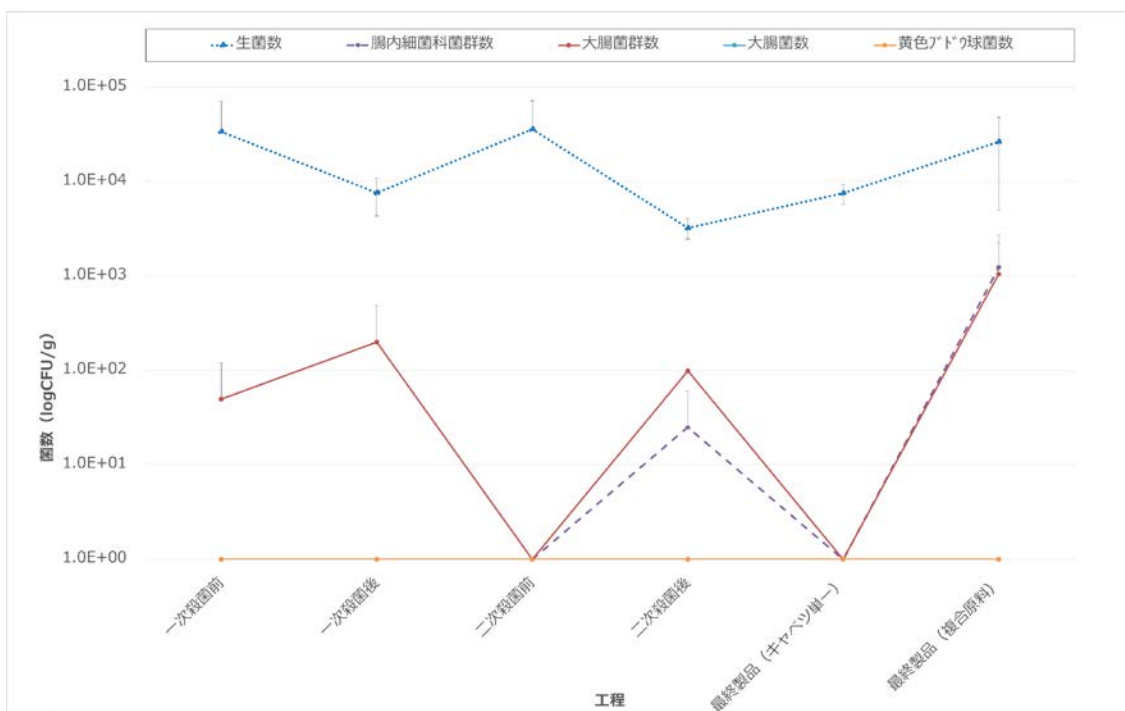


図 7. カットキャベツ製造工程を通じた衛生指標菌の生存挙動

表 1. 市販カット野菜製品検体における衛生指標菌検出成績に係る販売施設別での有意差

販売施設間 比較	生菌数		腸内細菌科菌群数		大腸菌群数	
	q境界値	q値	q境界値	q値	q境界値	q値
A vs. B	905387.8	3423927.4	35369.045	962836	11791.818	2503306.7
A vs. C	3721592.3	3248222.7	1047940.3	136166	2221203.9	354021.03
A vs. D	182030.6	3698264.3	35447.068	175789	11686.212	457039.18
A vs. E	848096.4	5413704.5	34850.045	304475	14246.818	791615.08
A vs. F	757598.3	3698264.3	32159.075	175789	13733.485	457039.18
B vs. C	4626980.1	3248222.7	1083309.4	136166	2232995.7	354021.03
B vs. D	723357.1	3698264.3	70816.113	175789	105.60606	457039.18
B vs. E	57291.4	5413704.5	519	304475	2455	791615.08
B vs. F	147789.5	3698264.3	3209.9701	175789	1941.6667	457039.18
C vs. D	3903623.0	3536217.0	1012493.2	157230	2232890.1	408788.27
C vs. E	4569688.7	5304325.5	1082790.4	272331	2235450.7	708042.06
C vs. F	4479190.6	3536217.0	1080099.4	157230	2234937.4	408788.27
D vs. E	666065.7	5591250.0	70297.113	351578	2560.6061	914078.36
D vs. F	575567.6	3953610.8	67606.143	202984	2047.2727	527743.39
E vs. F	90498.1	5591250.0	2690.9701	351578	513.33333	914078.36

*淡赤色背景箇所は有意と検定されたことを示す。

表 2. 原料の単一・複合性の別に見た、カット野菜検体における指標菌検出成績の有意差

販売施設	生菌数	腸内細菌科菌群数	大腸菌群数
B	0.08221	0.00757	0.10916
C	0.00061	0.00226	0.01162
D	0.00003	0.08974	0.00465
F	0.00388	0.18562	0.34901

*淡赤色背景箇所は単一原料検体と複合原料検体間で有意差ありと検定されたことを示す。