

平成 30 年度厚生労働行政推進調査事業費（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

生鮮野菜洗浄時における次亜塩素酸ナトリウム使用の評価に関する研究

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	阿部清隆	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	関 享子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：生鮮野菜を非加熱で提供する際には、殺菌剤を用いた洗浄消毒が有効とされるが、その使用方法や微生物低減効果についてはガイドラインや規範等では示されておらず、使用濃度及び処理時間の組み合わせの提示に留まっている。HACCP 制度化が進む現状を見据え、本研究では、特に生鮮野菜の非加熱提供を行う小規模事業者等への参考情報を提供する目的で、生鮮レタスを対象に次亜塩素酸ナトリウムを洗浄消毒に使用した際の微生物汚染低減効果について検討を行った。市販レタス検体について、4 分割した状態或いはその後、剥葉した状態の別では、後者でより次亜塩素酸ナトリウムによる自然汚染指標菌に対する低減効果が示された。また、水槽中で攪拌を行った場合の微生物低減効果は処理時間・有効塩素濃度依存性であったが、静置した状態では不均一性が増大する傾向が認められた。供試レタス検体は大腸菌陰性であったが、過去の食中毒事例等を鑑み、腸管出血性大腸菌 O157 の添加回収試験による同処理を通じた評価についても行った。結果として、当該病原菌の消長は自然汚染衛生指標菌と類似性を示し、100ppm の次亜塩素酸ナトリウム添加水中での 1 分、5 分、10 分浸漬攪拌により、 4.42 ± 0.06 CFU/g の O157 大腸菌はそれぞれ 2.82 ± 0.13 CFU/g、 2.62 ± 0.07 CFU/g、 2.33 ± 0.09 CFU/g に低減した。一方、同時間帯静置処理した際の検出菌数はそれぞれ 2.71 ± 0.25 CFU/g、 2.83 ± 0.34 CFU/g、 2.68 ± 0.29 CFU/g となり、処理時間への依存性は認められなかった。以上より、次亜塩素酸ナトリウムを用いた生鮮野菜等の洗浄殺菌に際しては、上述の規範で示される殺菌条件を参考としつつ、攪拌の実施等により、より効果的な確実な微生物汚染低減を図ることが可能と考えられた。HACCP 制度化を見据えた中においては、各施設での検証が有用であり、その指標としては大腸菌及び生菌数を用いることが適切と思われる。

全確保の在り方として、フードチェーンを

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

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、業態・業種の特性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」、もしくは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、事業者の運用実態等を踏まえ、必要に応じて重要管理点を設定して管理する等、弾力的な取り扱いを可能とするものとして実行性を高めることとしている。

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、我が国がこうした運用方針を採用し、実行していくためには、国内の食品製造に係る実態にあわせた検討を行うことが必要不可欠である。

こうした背景を鑑み、本分担研究では、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、非加熱形態での喫食が想定される生鮮野菜の洗浄時における殺菌剤の使用条件に関する検討を微生物学的観点から実施し、望ましい使用方法等について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 食品検体

関東地域にて店頭販売される、包装されたレタス玉を購入し、10℃以下で当所に輸送後、同日中に下記の試験に供した。

2. 検体調整

レタス検体はアルコールで予め除菌した包丁を用いて芯を含むように正中から4分割を行った。このうち、4分割状態、あるいはその後に葉を一枚ずつ剥離させた状態とし、漬物の衛生規範において、“100ppmの次亜塩素酸ナトリウムを用いて10分間処理すること”の妥当性を科学的に検証するため、以下の各条件で処理を行った。各群の検体数は3、検体重量は約100gとした。

①5L容の水道水中で10分間静置・浸漬（水・静置群）

②5L容の水道水中で攪拌しながら10分間浸漬（水・攪拌群）

③5L容の100 mg/L次亜塩素酸Naを含む水道水中で10分間静置・浸漬（次亜・静置群）

④5L容の100 mg/L次亜塩素酸Naを含む水道水中で攪拌しながら10分間浸漬（次亜・攪拌群）

⑤無洗浄（対照群）（無洗浄群）

有効塩素濃度測定にはハンディ水質計（アクアブ AQ-102、SIBATA）を用いた。また、水温は何れも10℃以下となるよう、氷を用いて調整した。

また、浸漬時間による汚染低減効果評価には、0分間、1分間、5分間、10分間の浸漬時間を採用した。また、次亜塩素酸ナトリウム濃度による汚染低減効果の評価には、0 ppm、25 ppm、50 ppm、100 ppm、200 ppmの次亜塩素酸ナトリウムを用いた。

3. 衛生指標菌の定量検出試験

上項の洗浄を終えた検体を、水切り上で、5分間風乾させた後、アルコール除菌した

包丁を用いて細断した。検体 25 g を計量し、ストマッカー一袋に入れ、225ml の滅菌 PBS を加えて 1 分間ストマッキングした（試料原液）。同試料原液及び 10 倍階段希釈液 0.1 mL を標準寒天培地（日本 BD）、バイオレット胆汁グルコース寒天培地（VRBG, Oxoid）、トリプトン胆汁 X-グルクロニド寒天培地（TBX, Oxoid）に塗抹し、ISO 4833-1:2013、ISO 21528-2:2017、ISO 16649-2:2001 に従い、好気条件下にて培養を行った。群間の有意差算定には、Student's *t*-test を用い、有意水準は 0.05 とした。

4. 病原細菌の検出試験

上項 3 で調整した試料原液残液を、平成 27 年 7 月 29 日付 食安発 0729 第 4 号及び平成 26 年 11 月 20 日付 食安監発 1120 第 2 号に基づき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. 腸管出血性大腸菌の添加回収試験

LB 培地（BD）中で 37℃18 時間好気培養した腸管出血性大腸菌 O157:H7 2 株（NIHS208 株、NIHS407 株）を PBS で 3 回洗浄後、約 5.0logCFU/mL となるよう再懸濁した。同懸濁液 1mL を 4 分割したレタス検体表面に接種し、形状を壊すことなく全体に広がるよう、1 分間手揉みした後、4℃で 1 時間静置した。

浸漬時間による汚染低減効果評価には、0 分間、1 分間、5 分間、10 分間の浸漬時間を採用した。また、次亜塩素酸ナトリウム濃度による汚染低減効果の評価には、0 ppm、100 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを用いた。

被験菌の回収にあたっては、項 2. と同様に試料原液を調整後、クロモアガー-STECH 寒天培地（CHROM Agar）へ直接塗抹を行い、好気培養後に同培地上に発育した定型集落数を求めた。

C. 研究結果

1. 検体形状の違いによる、洗浄を通じた微生物汚染挙動（図 1）

本研究では、四分割後の状態あるいはその後剥葉した状態の市販レタス検体を対象として、まず 10 分間の水浸漬を通じた衛生指標菌数の推移を検討した。

無処理群（対照群）では、生菌数が $5.83 \pm 0.06 \text{CFU/g}$ 、腸内細菌科菌群が $4.54 \pm 0.29 \text{logCFU/g}$ 検出された。*E. coli* は検出されなかった。

4 分割状態の検体を対象とした水・静置群では生菌数が $5.76 \pm 0.35 \text{logCFU/g}$ 、腸内細菌科菌群が $4.04 \pm 1.28 \text{logCFU/g}$ と対照群に比べて低い傾向を示した。また、剥葉状態の検体を対象とした水・静置群では、生菌数が $5.69 \pm 0.17 \text{logCFU/g}$ 、腸内細菌科菌群は $2.75 \pm 2.49 \text{logCFU/g}$ となり、両形状間で統計学的有意差は認められなかったものの、後者では相対的に低い数値となる傾向であった。

4 分割状態の検体を対象とした水・攪拌群では、生菌数が $5.67 \pm 0.40 \text{logCFU/g}$ 、腸内細菌科菌群は $3.15 \pm 2.72 \text{logCFU/g}$ となり、共に有意差は認められなかったが、水・静置群に比べて共に低い傾向を示した。また、剥葉状態の検体では生菌数が $5.53 \pm 0.18 \text{logCFU/g}$ と、対照群に比べ有意に低い数値を示した ($p < 0.05$)。腸内細菌科菌群は $2.93 \pm 1.80 \text{logCFU/g}$ と対照群に比べ

て有意差は認められなかった。

以上より、レタス検体における自然汚染指標菌数は、剥葉処理を前もって行うことで、水浸漬洗浄を通じた菌数低減を促す効果があることが示された。

2. 次亜塩素酸ナトリウム添加による衛生指標菌検出成績への影響 (図 1)

次に次亜塩素酸ナトリウム添加によるレタス検体中の衛生指標菌動態を検討した。

4 分割状態の検体を対象とした次亜・静置群の生菌数及び腸内細菌科菌群数はそれぞれ $4.65 \pm 0.40 \log \text{CFU/g}$ 及び $3.39 \pm 1.30 \log \text{CFU/g}$ となり、前者は対照群及び水・静置群との間で有意差を認めた。また、剥葉状態の検体を対象とした次亜・静置群の生菌数及び腸内細菌科菌群数はそれぞれ $4.65 \pm 0.56 \log \text{CFU/g}$ 及び $2.30 \pm 2.01 \log \text{CFU/g}$ となり、生菌数は対照群、水・静置群、及び水・攪拌群との間で有意差を認めた。

4 分割状態の検体を対象とした次亜・攪拌群では、 $4.00 \pm 0.10 \log \text{CFU/g}$ 及び $2.59 \pm 2.24 \log \text{CFU/g}$ となり、前者は対照群、水・静置群、及び水・攪拌群との間で有意差を認めた。また、剥葉状態の検体を対象とした次亜・攪拌群では、 $4.72 \pm 0.20 \log \text{CFU/g}$ 及び $2.54 \pm 2.24 \log \text{CFU/g}$ となり、生菌数は、対照群、水・静置群、及び水・攪拌群との間で有意差を認めた。

以上より、終濃度 100ppm の次亜塩素酸ナトリウムを用いた 10 分間の浸漬処理は、水道水を用いた場合に比べ、生菌数を有意に低減させる効果があることが示された。一方、腸内細菌科菌群数については特に 4 分割状態の検体を対象とした水・静置

群で高い傾向が認められた。

3. 次亜塩素酸ナトリウム濃度及び処理時間の差異による、自然汚染指標菌の消長
漬物の衛生規範では、100ppm の次亜塩素酸ナトリウムを用いた 10 分間、または 200ppm の同剤を用いた 5 分間の処理が生鮮野菜の洗浄消毒法として例示されている。そこで、本研究では有効塩素濃度として、25ppm、50ppm、100ppm、200ppm の次亜塩素酸ナトリウムを含む水道水 5L 中で、0 分、1 分、5 分、10 分間、レタス検体を攪拌しながら洗浄消毒した場合の生菌数及び腸内細菌科菌群の消長を比較検討することとした。

供試検体中における生菌数は処理前の時点で、 $4.92 \pm 0.41 \log \text{CFU/g}$ であった。処理時間の別では、200ppm の次亜塩素酸ナトリウム処理群において、処理時間 0 分と 10 分の間、1 分と 10 分の間で生菌数に有意差が認められた。その他の濃度群では、有意差は認められなかったものの、処理時間の長さに応じ、生菌数は低減傾向にあった。

腸内細菌科菌群は、無処理群で $3.70 \pm 0.35 \log \text{CFU/g}$ の汚染であった。25ppm 処理群では、処理時間に拠らず全てから同指標菌が検出されたが、50ppm、100ppm、200ppm 処理群では処理時間 1 分でのみ同指標菌が検出され、5 分、10 分処理後には全て陰性となった。

以上の結果より、有効塩素濃度 50ppm・5 分以上の浸漬処理により、当該レタス検体に自然汚染を顕す腸内細菌科菌群は陰性となることが示された。

4. 洗浄処理を通じた、レタス検体における腸管出血性大腸菌 O157 の消長

自然汚染指標菌数の消長成績より、レタス供試検体では剥葉後に浸漬による洗浄消毒処理が微生物汚染低減に有効であることが示された。一方、当該検体では大腸菌が陰性であったこと等を踏まえ、次に本研究では腸管出血性大腸菌 O157:H7 をレタス剥葉検体約 100g 表面に接種し、4℃下で 1 時間保存後、100ppm の次亜塩素酸ナトリウムを含む或いは含まない水道水 5L 中に浸漬し、攪拌または静置した状態で一定時間処理を行った後の、検体 1g 当たりの被験菌数を求めた。結果として、無処理群（対照群）では、 4.42 ± 0.06 CFU/g、水道水で 10 分静置した群では 3.41 ± 0.37 CFU/g、水道水で同時間攪拌した群では 3.11 ± 0.09 CFU/g の被験菌が回収された。100ppm の次亜塩素酸ナトリウム添加群では、特に攪拌群で処理時間に応じた低減が認められ、処理時間 1 分、5 分、10 分で検出された被験菌数はそれぞれ 2.82 ± 0.13 CFU/g、 2.62 ± 0.07 CFU/g、 2.33 ± 0.09 CFU/g であった。一方、静置群では、処理時間 1 分、5 分、10 分でそれぞれ 2.71 ± 0.25 CFU/g、 2.83 ± 0.34 CFU/g、 2.68 ± 0.29 CFU/g となり、顕著な時間依存性は認められず、また群内での Variance も攪拌群に比べて有意に大きい結果となった。

以上より、レタス供試検体での腸管出血性大腸菌 O157 菌数は剥葉状態で次亜塩素酸ナトリウムを含む水道水中で攪拌を行うことにより時間依存的に低減することが示された。

D. 考察

漬物の衛生規範では、原料となる生鮮野菜の殺菌消毒に 100ppm または 200ppm の次亜塩素酸ナトリウムを 5 分または 10 分処理することで、微生物汚染低減を図ることができるとしている。一方で、その科学的根拠となる知見は見出すことができず、現状の野菜等の殺菌処理にあたっての有効性を微生物動態を数値化することは検証方法を含めた HACCP 導入支援に係る知見となるとの考えから、本研究では、レタス検体を対象とした水浸漬法による消毒洗浄処理を通じた微生物挙動に関する検討を行った。

次亜塩素酸ナトリウム濃度並びに処理時間については、攪拌を行う場合において有意な依存性を認めたが、静置した場合には、必ずしもそのような効果は認められなかった。このことは攪拌が殺菌剤の有効成分の浸透及び分布、更には表面付着微生物の物理的遊離等を促す一方、静置した場合にはこうした効果が認められないため、バラツキのある結果を招き、最終的に群間比較により処理条件間での有意差を示すことができなかったものと考えられる。

また、今回は 1 検体毎に水槽を交換し、交叉汚染がない条件下で実施したが、実際の工程では、複数回の連続処理が想定される。この間に水中へ遊離した微生物が再び野菜等に交叉汚染を招く可能性も否定はできないため、洗浄消毒槽を複数設定するか、流水等で十分な洗浄を前処理として行うことも交叉汚染防止の有効な手法と目される。

また、本研究で供した検体では大腸菌は検出されていないが、腸管出血性大腸菌による食中毒がこれまでに複数回発生してい

る実態を踏まえると、生鮮野菜等の衛生指標としては大腸菌を用いることが有用と思われる。食品衛生法で定められる大腸菌は国際的に用いられる大腸菌とは定義がそもそも異なっている他、検証方法も時間と労力を要する点も課題と思われる。現在、これらの衛生指標菌試験法については、食品の別により、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において逐次検討を進めており、更なる検討を重ねて専門家からの意見を集約し、提言を行うことが、国際整合性を担保した我が国の食品の安全確保のかたちを構築する上で有効と思われる。

E. 結論

生鮮レタスの洗浄にあたっては、葉を一枚ずつ剥がす前処理がその後の洗浄を通じた生菌数低減に有効であり、腸管出血性大腸菌の消長試験成績を踏まえると、次亜塩素酸ナトリウムを 100ppm 以上となるよう添加した水中で十分に攪拌しながら洗浄することが微生物汚染低減効果を更に高めることを数値をもって示すことができた。これらの成績は、漬物の衛生規範等で示される洗浄消毒の適切性を担保するものと考えられる。今後も、他の食品等の製造加工等における微生物低減手法の有効性について、実態を踏まえて評価し、数値化することは HACCP 導入推進に資するものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

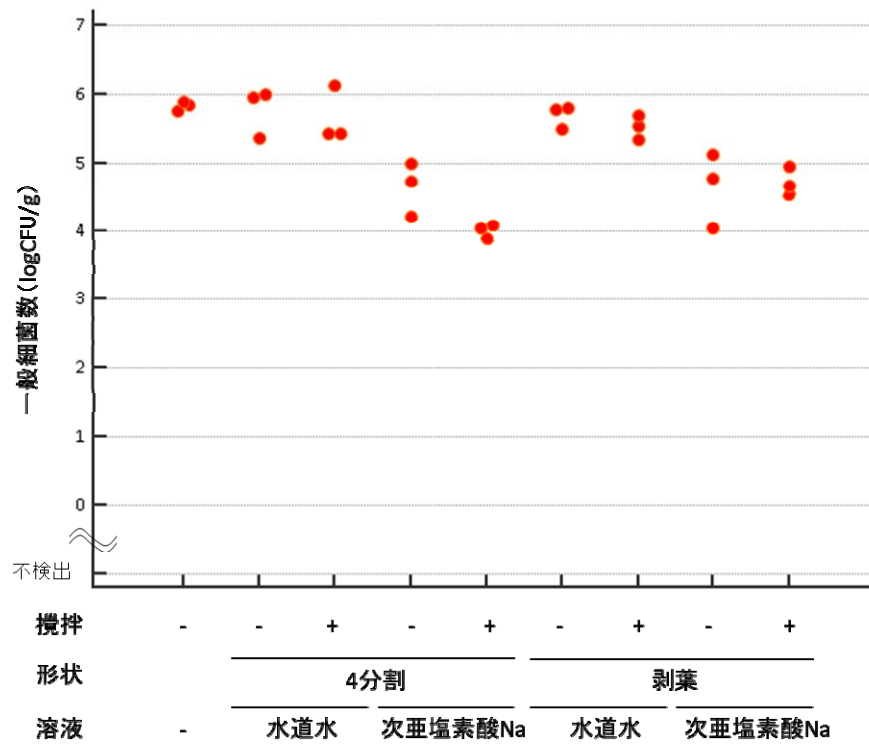
牧野有希、山本詩織、大河内美穂、宮下

隆、朝倉宏. カット野菜における細菌汚染実態について. 日本防菌防黴学会第45回年次大会（平成30年度ポスター発表賞）.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A



B

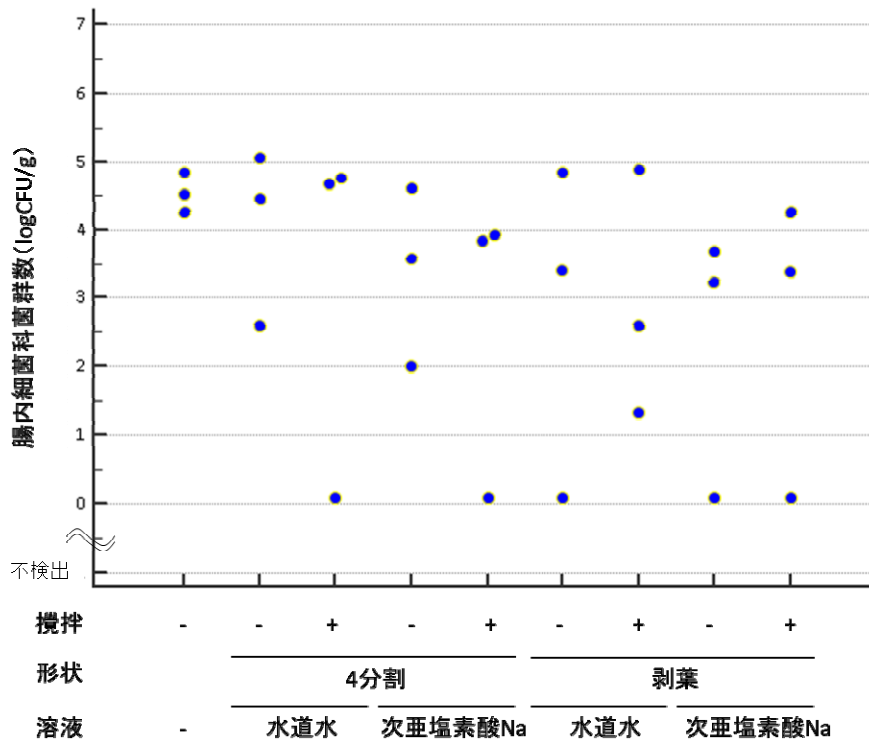
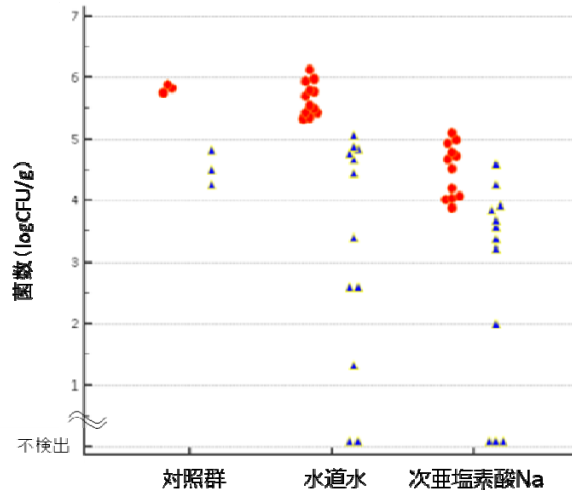
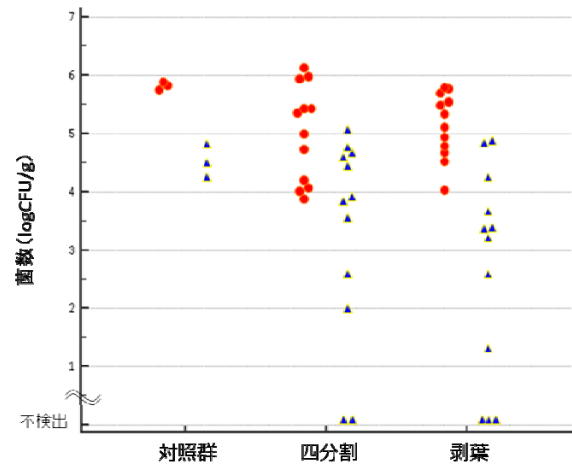


図 1. 洗浄処理を通じた市販レタス検体における衛生指標菌検出状況.
各処理時間は 10 分間、次亜塩素酸ナトリウム濃度は 100ppm とした。

A



B



C

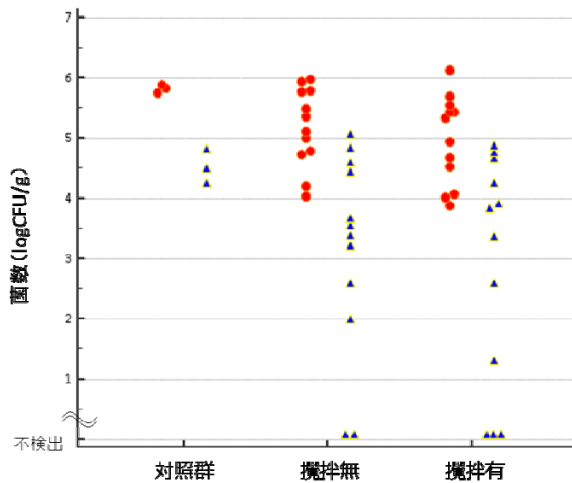
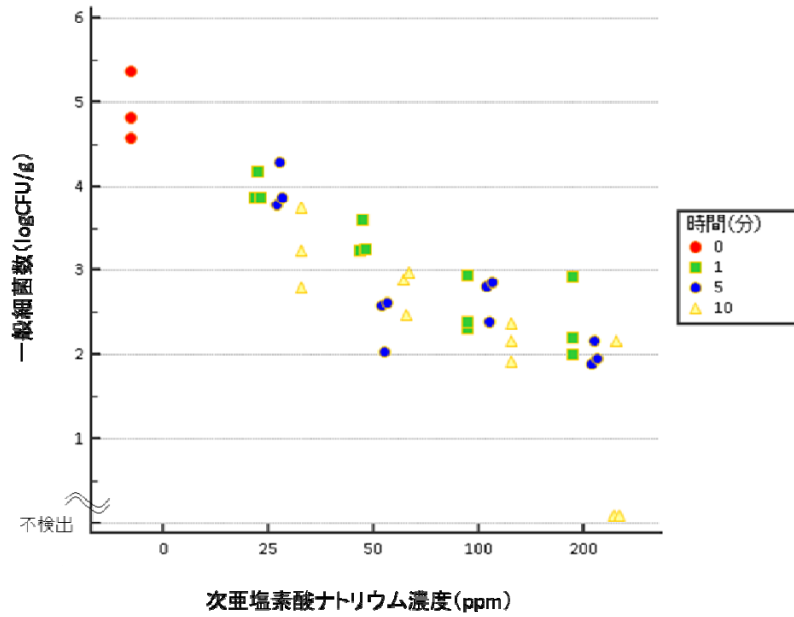


図 2. 洗浄処理を通じた市販レタス検体における衛生指標菌数の検出状況 (比較). 次亜塩素酸 Na の有無 (A)、検体形状の違い (B)、攪拌の有無 (C) による比較を示す。

A



B

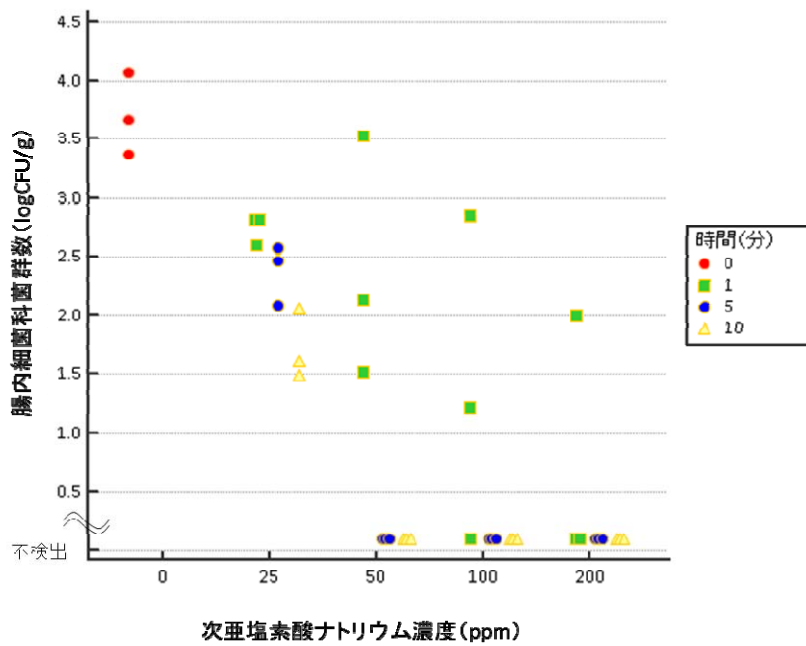


図3. 異なる処理時間、有効塩素濃度条件下での洗浄処理を通じた市販レタス検体における生菌数 (A) 及び腸内細菌科菌群数 (B) の検出状況。

何れも浸漬に際しては攪拌を行い、1分、5分、10分処理後の検体中における両指標菌数を求めた。

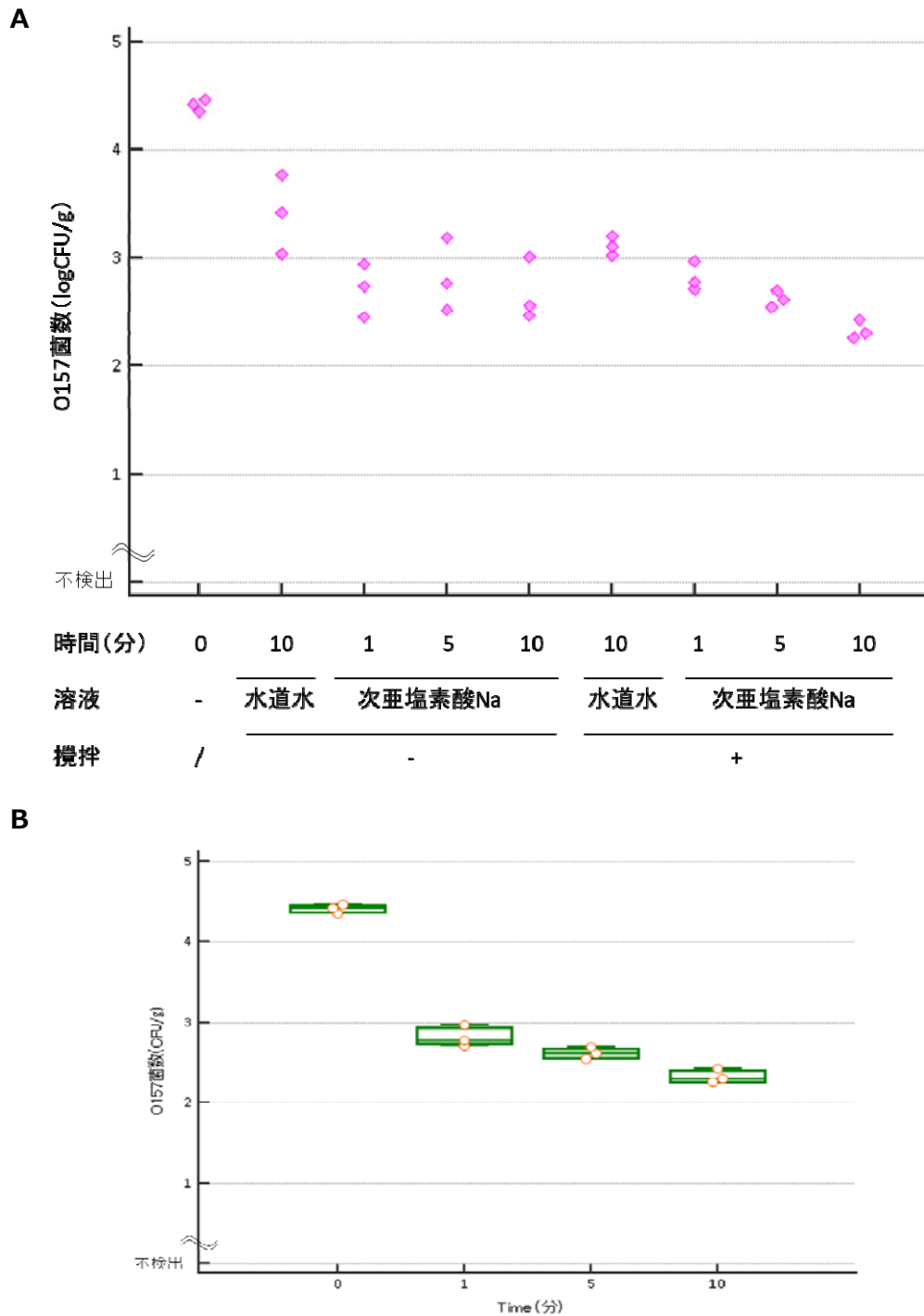


図 4. 異なる処理時間、有効塩素濃度条件下での洗浄処理を通じた市販レタス検体における腸管出血性大腸菌 O157:H7 の消長。

剥葉状態としたレタス検体約 100 g に腸管出血性大腸菌 O157:H7 2 株混合菌液を約 5.0CFU/g となるよう添加し、水道水で 10 分、または次亜塩素酸ナトリウム 100ppm を含む水道水中で 1 分、5 分、10 分浸漬処理（攪拌有、無のに条件）をした後の、検体 1g 当たりの被験菌数を求めた。A は全成績、B は次亜塩素酸添加攪拌群の成績を示す。