

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**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

平成 27 (2015) 3 月

**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

平成27(2015)年 3月

目次

・ 総括研究報告

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

朝倉 宏

3

・ 分担ならびに委託研究報告

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汚染実態とその改善に関する研究

田口 真澄、朝倉 宏 他

15

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

朝倉 宏 他

27

2. 寄生虫による汚染に関する研究

寄生虫による汚染に関する研究

杉山 広 他

35

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策に関する研究

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

廣井 豊子、朝倉 宏 他

55

4. 非動物性食品における食品汚染・食中毒発生等に関する情報調査研究

欧州連合（EU）における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

窪田 邦宏、春日 文子 他

65

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

77

平成 26 年度 研究分担者・研究協力者

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

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・エル細菌検査部

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

柴田勝優 国立感染症研究所

高鳥浩介 NPO 法人かび相談センター

橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所

中村寛海 大阪市立環境科学研究所

林 賢一 滋賀県衛生科学センター

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

榎田和彌 国立医薬品食品衛生研究所

森嶋康之 国立感染症研究所

(敬称略、五十音順)

平成 26 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
総括研究報告書

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(細菌・寄生虫)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研究、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と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する。

微生物汚染実態に関する研究としては、昨年より実施してきた、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・モノサイトゲネス(以下 LM) 陽性を示す検体が見出されたことを受け、当該検体の製造施設事業者とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者に協力を求め、製造環境調査を行った。平成 26 年 6 月～平成 27 年 1 月に 3 施設について製造環境からの LM 検出を試みた。その結果、3 施設ともに冷蔵庫、包装室の床の溜り水、製品充填機周辺から LM が検出され、汚染箇所が特定された。分離株の遺伝子型別は分離時期に関わらず、施設毎に類似しており、各施設内での持続 LM 汚染が推察された。行政担当者の指導のもとに改善方法が検討され、複数回の調査を行った 2 施設では最終製品から LM が検出されない状況へと改善された。また、昨年度に実施した、衛生的な浅漬製造施設でのパイロットスタディにおいて採取した中間製品を菌叢解析に供し、塩漬と殺菌工程を通じた菌叢の顕著な変動が確認され、同工程の有効性が改めて実証された。更に、衛生規範改正後の浅漬検体における指標菌検出状況を改正前と比較したところ、顕著な生菌数と大腸菌群数の低下が認められ、同規範の有効性が確認された。

寄生虫に関する検討としては、昨年度の回虫症に続いて文献資料の検索に取り組み、最近の鉤虫症と鞭虫症の発生状況の詳細を調べた。その結果、鉤虫症と鞭虫症も少数ながら実際に日本国内で発生している事実が分かった。土壌媒介寄生蠕虫の感染源となる非動物性食品の特定は重要であり、その作業を効率的に実施するため、今年度は超音波を用いた非動物性食品の寄生虫卵検査法を構築して検討し、従来法と同等の虫卵回収率を示しつつ、効率的に検出できることを明らかにした。

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策としては、昨年度の検討で指導内容(pH)を逸脱していることが明らかとなった「たくあん」製品を検体として保存実験を行なった。4 °C および 30 °C での保存試験では、経時的な pH、酸化還元電位値の上昇が見られた。ボツリヌス菌は、保存初期 15 日目で減少したが、その後は維持あるいは微細な上昇傾向も見られ、さらに継続して、長期的な保存試験の必要性があると思われた。また、クロストリジア属菌の発育を許容する酸化還元電位幅は約 -200 ~ +200mV の広範囲に及ぶことが明らかとなり、同値をボツリヌス菌の発育阻止する理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

情報収集に関する項目では、欧州食品安全機関(EFSA)が 2014 年に発表した一連の報告書を中心に文献調査を行い、1) 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設定すべきである、2) カット済み果物・野菜等を対象とした大腸菌に関する工程衛生規格基準は、サラダ用葉物野菜の加工工程における適正農業規範、適正衛生規範、適正製造規範、HACCP 実施の評価の指標となる、3) 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、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、等の科学的見解を把握した。

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 帯広畜産大学

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)ピー・エム・エル細菌検査部

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

柴田勝優 国立感染症研究所

高鳥浩介 NPO 法人かび相談センター

橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所

中村寛海 大阪市立環境科学研究所

林 賢一 滋賀県衛生科学センター

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

榎田和彌 国立医薬品食品衛生研究所

森嶋康之 国立感染症研究所

(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。

上記食品に関連する O157 等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、定量的知見は十分とはいえない。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様々な指標菌を用いた衛生管理がなされるが、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、多くが指標菌として検出される状況であることが明らかになりつつある。従って上記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。

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はとりわけ容器包装詰低酸性食品を汚染した際に重篤な食中毒を引き起こす可能性があり、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を調査・検討し、本菌の食品内挙動に関する検討を通じて、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。

更に、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、寄生虫も大きな危害因子として捉えられる。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、海外からの輸入量が多いわが国の実態を踏まえると、国内外での寄生虫汚染実態の把握は必須と考えられる。

以上の知見をふまえ、本研究二年目においては、昨年度の国内流通浅漬け製品に関する細菌汚染実態調査をより発展させるべく、リステリアが継続的に検出された製品の製造施設への立ち入り調査を行い、衛生改善に関する検討を行った。また、菌叢動態の視点から、同食品の製造工程を調査し、改正された衛生規範の微生物制御に対する有効性に関する検討を行った。寄生虫について、本年度は、回虫症の国内発生状況を調査すると共に、超音波を用いた寄生虫卵検査法に関する検討を行った。また、容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策として、厚生労働省の指導内容にそぐわない製品を対象に長期保存試験を行い、ボツリヌス菌の生存挙動を検討した。更に、欧州連合(EU)における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態に関する情報収集を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態と改善措置に関する研究

1) 施設調査

3社(A、B、C社)の製造施設とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者に協力を求め、平成26年6,7,8,11月および平成27年1月に製造環境の検証を行った。

施設のふきとり材料等は、合計102検体を採取しリステリア・モノサイトゲネス(以下、LM)の検出を試みた。LMの検出はISO 11290-1(2004)及びISO 11290-2(2004)に準拠し、定性試験および定量試験を行った。

2) 分離菌株の遺伝子解析

本年度実施した3施設から分離したLM53株および施設A、施設Bの昨年度に市販製品から検出したLM11株の合計64株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による解析を行った。また、リボプリンターシステムによる解析も併せて実施した。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

1) 検体

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、同施設内で白菜の浅漬け製造ラインより採材した原材料、中間製品(塩漬け後、殺菌後)および最終製品各2検体を菌叢解析に供した。

2) 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。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配列を取得した。取得データは、トリミング後、blast検索を通じ、各検体の構成菌叢に関するデータを得た。

3) 食塩漬け込みに伴う指標菌と菌叢変動

都内で市販される生鮮白菜を購入し、十分量の水道水で2回洗浄後、汚染のないように、同野菜を25gづつに裁断した。225mlの食塩水(0,2,10%)に加え、15で3日間漬込みを行った。漬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させた後、同懸濁液を用いて、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。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

文献学的な一次資料として、日本臨床寄生虫学会誌(1990年/第1巻~2014年/第25巻の25年間/25巻)を用いた。これを通覧して、鉤虫および鞭虫感染の報告数・症例数をカウントした。また両症例の原因として推定・議論された感染源について、論文

から情報の抽出を試みた。さらに回虫症と同様に、臨床検体の検査会社であるBMLに依頼し、2000年以降に全国の医療機関で診断された鉤虫および鞭虫の症例数について提示を受けた。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法・ストマッカー法による成績との比較

昨年度に引き続き、日本食品衛生協会食品衛生研究所に委託して本検討を実施した(試験検査成績書は本報告書の末尾に添付したので参照されたい)。被検物質には、屠畜場から入手した自然感染ブタ由来の豚回虫を選んだ。豚回虫卵を接種する野菜には白菜を用い、雌成虫に由来するタンパク膜が完成した虫卵から虫卵液を調製し、模擬検体(虫卵接種検体)の調製を行った。また予備試験を繰り返して、超音波処理の最適時間および洗浄容器のリンス回数を設定し、寄生虫卵の検出方法としての超音波法を構築した。その上で本試験を実施し、従来法及びストマッカー法で得た成績と相互に比較した。なお超音波法では、従来法と同様、1回の検体処理量に100g以上の試料を用いることが可能であるが、ストマッカー法との比較にあたり、白菜重量は50g、洗浄液量は250mlとして本試験を実施し、沈殿法により回収虫卵数を求めた。また接種する回虫卵は1,000個および200個の2条件を選択し、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検定で分散を見極め、t検定で有意差を調べた。

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) 検体

昨年度調査で厚生労働省の指導内容(平成20年6月17日付食安基発第0617003号および食安監発第0617003号)にある理化学基準(pH<4.6)を逸脱していた「たくあん」製品を保存試験用検体とした。

2) 供試菌株

ボツリヌスA型菌として、62A, 33A, 36A, CB21, Renkon1の5菌種を、ボツリヌスB型菌としてOkra, NH-2, 67B, 326-5, 407-1の5菌種を用いた。

3) 保存試験

ボツリヌス菌芽胞液(A型菌5種混合あるいはB型菌5種混合)を、80°C20分間の加熱処理後、検体1gあたり 10^3 cfu前後となるように検体に接種し、0日~360日保存した。保存温度は、4、25、30とした(N=4)。但し、陰性対照(芽胞未接種検体)の保存温度は4と30とした。

4) 理化学性状の測定

芽胞液未接種の検体を用い、経時的に食品内理化学性状としてpH及び酸化還元電位を測定した。

5) 一般細菌数及びクロストリジウム属菌数の測定

検体100gを無菌的に取り、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試料原液とした。10 倍段階希釈列を作成後、懸濁希釈液 1 mL を、標準寒天培地あるいはクロストリジア寒天培地を用いて混釈培養を行い、一般細菌数およびクロストリジア菌数を求めた。

II. 酸化還元電位幅に関する検討

1) 菌株および培地

Clostridium butylicum 2 株 (No.15, 8501) を発育試験に供した。いずれも、チオグリコール酸培地中で嫌気下で培養した。

2) 電気培養装置を用いた発育試験

電気培養装置を用いた上述菌株の発育試験を行なうため、作用極槽に 2mM メチルピオロゲン (MV) を添加チオグリコール酸培地 250ml を加え、対極槽には MV を含まない同培地を加えた。窒素通気後、定電位電解を行い、設定電位で安定後、定常期の *C. butylicum* (上述) 約 5×10^6 cfu を接種し、一定時間ごとに濁度を測定した。なお、上記培養は、 $-0.6V \sim +0.6V$ の電位設定で通電を行い、上記細菌により還元された MV を電氣的に酸化しながら培養を行なった。

4. 欧州連合 (EU) における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

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。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 (文献 2) 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。他のパート 2 報告書も同様の構成となっている。

C. 研究成果

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態と改善措置に関する研究

1) 施設 A の調査成績

1 回目の調査では、冷蔵庫床のたまり水、製品充填機や作業台のふき取り、さらに最終製品であるみぶなの漬物からも LM が検出された。

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 LM を検出したが、前回と同じ場所の検体 No.1 と 8 の定量試験での菌数は減少しており、製品から LM は検出されなかった。検体 No.8、9 では血清型 3b が検出されたが、この血清型は 1 回目のいずれの検体からも検出されていなかった。

本施設では、1 回目の調査の後、汚染箇所に熱湯をかける、スチームクリーナーで蒸気をあてるなどの対策を実施しており、熱を加える事で菌数を減少させることができた。

2) 施設 B の調査成績

1 回目の調査では、冷蔵庫床のふき取りや製品充填機のふき取り、さらに中間製品や最終製品である茄子の漬物からも LM が検出された。

2 回目の調査では、15 検体中 4 検体から LM を検出したが、前回と同じ場所の検体の定量試験での菌数は減少しており、製品から LM は検出されなかった。そして 3 回目の調査では、13 検体とも陰性であった。本施設では、作業終了時のブラシによるこすり洗いを徹底する、冷蔵庫の床を週に一度清掃する等の対策で、LM 陰性化に成功した。

3) 施設 C の調査成績

平成 26 年 7 月に調査を行った。他の 2 施設と異なり下処理室での LM 検出が認められた。その他は床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。本施設の 2 回目の調査はまだ行っていない。

4) PFGE 法による解析

制限酵素 *AscI* では A、B グループ (B, B1, B2) 、C の 3 つに型別された。制限酵素 *ApaI* では a グループ (a, a1) 、b、c の 3 つに型別された。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 26 株の合計 34 株を型別し、Aa (*AscI* : A、*ApaI* : a グループ) と Bb (*AscI* : B グループ、*ApaI* : b) の 2 つに分かれた。施設 B では平成 25 年度分離株 3 株と平成 26 年度分離株 21 株の合計 24 株を型別し、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。

5) リボプリンターシステムによる解析

施設 A では、Ribogroup が A,B,C,D,E に型別され、多様な型が存在していた。そのうち、Ribogroup A と B が施設を持続汚染していると考えられた。施設 B では、検体採取時期が異なっても同じ Ribogroup 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、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。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

1) 白菜浅漬けの製造工程中の菌叢変動

昨年度、採材した白菜浅漬け製造ラインでの原材料、中間製品（10%食塩水での塩漬け後、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、18361-104969 リードが得られ、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（図 1）。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焼く 5.7%であった（図 1）。

(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で、その他の工程ではいずれも 5%以下であった（図 1）。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（図 1）。本属は、主に植物の根部に棲息することが知られているが、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（図 1）。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（図 1）。こうした構成比率は、当該細菌の生存を直接的に示すものではなく、死菌からの影響も受ける。実際に、昨年度の成績として、大腸菌群が最終製品から分離培養され

なかった結果から、これらは既に死滅しており、死菌由来核酸のわずかな混入がこうした成績へとつながったと目される。

2) 白菜由来菌叢は漬け込み過程での食塩濃度により影響を受ける

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および指標菌数に係る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、漬け込み前後で顕著な差異を示さなかったが、大腸菌数については、10%食塩水漬け込み群においてのみ、漬け込み前検体に比べ、有意な菌数低減を認めた（図 2）。菌叢解析を通じて、10%食塩漬け込み群では、*Pantoea* 属構成比率が顕著に減少することが認められ（図 3）、大腸菌群数変動との関連性が示唆された。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* 属については、食塩濃度が高くなるにつれて、その構成比率が高まる傾向であることが明らかとなった（図 3）。

以上の成績より、食塩濃度は漬け込み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あわせて、浅漬け製造における病原微生物制御に寄与する工程であることが改めて明らかとなった。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

日本臨床寄生虫学会誌計 25 巻に掲載された論文は 950 編で、このうち日本で感染した鉤虫症および鞭虫症の論文数（および症例数）は、それぞれ 2 編（2 例）および 1 編（1 例）であった。

BML の資料では、鉤虫症例はその数が 2002 年までは二桁であったが、2003 年以降は一桁となり、2013 年および 2014 年は症例がゼロとなった。鞭虫症例は鉤虫症例と比較してやや多いが、2005 年以降はおおむね一桁でその数が推移した。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法、ストマッカー法による成績との比較

予備試験の結果から、超音波処理時間は 5 分、洗浄容器のリンス回数は 2 回とした。また回収虫卵数に関しては、以下の結果を得た。

(1) 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 \pm 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。その他のデータ間には有意差を認めなかった。

(2) 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. 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. 保存試験（ボツリヌス菌添加回収試験）

1) 芽胞液未接種群での理化学性状の経時的变化

供試検体の pH 値は保存試験開始時で 5.15 ± 0.11 、15 日目では 5.5 前後に上昇し、30 日目まで維持された。酸化還元電位については、試験開始時には 32.02 ± 3.56 mV であり、その後上昇傾向にあった。保存温度による当該値の差異は認められなかった。

2) 芽胞液未接種群での一般細菌及びクロストリジア属菌の検出状況

芽胞未接種群における保存試験開始時の一般細菌数は 246 ± 136 cfu/g で、クロストリジア属菌は検出限界以下であった。保存期間が長くなるにつれて、一般細菌数は増加傾向にあった。一般細菌数が大きく増加した検体においても、検体の容器包装の密閉状態は保たれており、ガス産生等外見上の大きな変化はみられなかった。

3) 芽胞液接種群での一般細菌およびクロストリジア属菌の検出状況

A・B 型菌芽胞接種群の食品内動態については、4 では保存期間の長期化に伴い減少傾向を認めしたが、25 下で 30 日間保存した検体では、A 型菌芽胞接種群で 15 日目と同等に維持或は微増を示した。30 °C 下では B 型菌芽胞接種群が 30 日目に同等レベルに維持或は微増した。保存温度により差異はあるものの、芽胞接種群では保存期間が長くなるにつれて一般細菌数は上昇傾向にあった。

II. 酸化還元電位の検討

電気培養装置を用いて、嫌気下で酸化還元電位の安定化をはかった上で、*C. butylicum* の発育試験を行なった。結果として、供試菌株は、 -200 mV ~ $+200$ mV の範囲において良好な発育を認めた。

4. 欧州連合 (EU) における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

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 加盟国及びノルウェー、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

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

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での大腸菌汚染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係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

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

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

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。

D. 考察

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態と改善措置に関する研究

3つの製造施設を調査した結果、施設 A では多様な型の LM が検出されたが、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るというように、施設ごとに特徴が認められた。

施設 A と施設 B の 2 施設では、昨年度の市販製品調査からも複数回 LM を検出しており、持続的な LM 汚染が認められていた。両施設ともに 1 回目の施設調査において、冷蔵庫や包装室の床のたまり水、そして製品充填機の拭き取り検体から LM が検出された。LM 汚染の箇所が明らかになったことから、当該施設を管轄する行政の食品衛生担当者 と施設側とが具体的に改善案を検討することが可能になり、改善に向けての作業が行われた。

その結果、2 度目の調査時には製品からの検出は認められず、他のふき取り箇所も大幅な菌数減少が認められた。本研究班の調査をきっかけとして、施設の衛生対策の改善が計られ、その成果が現れたものと考えられた。

施設のふき取り調査の回数以上に、行政の担当

者が施設と連絡を取り合っていたことで、施設側の LM 対策についての理解が深まり、LM の陰性化が実現したと考えられる。来年度はこれらの施設で実施された洗浄方法を参考として、関連製造施設における望ましい洗浄のあり方に関する知見を集積し、衛生管理に資するマニュアル作成の一助となりうる根拠の創出を図りたい。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究
葉物野菜は、その代謝・生理機構の多様性から、広範にわたる病原細菌の汚染が懸念されている。その中において、白菜は特に外表面のみならず、内部へも汚染が懸念されるため、原材料からの病原細菌をどのように抑えるかが衛生管理上での重要な課題といえる。

本研究では、昨年度の研究において実施した白菜浅漬け製造ラインでの指標菌数動態成績として、塩漬け及び殺菌工程を通じた指標菌数の著減の原因を探るべく、菌叢解析を実施し、その中で特に白菜由来の細菌の制御に資する、漬け込み工程での食塩濃度に関する知見を得ることとした。

本研究において検討した浅漬け製造ラインでの菌叢動態に係る成績は、改正された衛生規範中に盛り込まれている、殺菌工程の有効性と必然性を改めて指示する結果となった。また、塩漬け工程中で用いる食塩濃度に関する知見は、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。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

日本臨床寄生虫学会誌に報告された症例および BML が診断した症例から、回虫と同様に鉤虫および鞭虫の感染も、少数ではあるが最近でも継続して我が国で発生していることが確認された。なお、2014 年に日本臨床寄生虫学会誌に報告された鉤虫症例は、鞭虫および回虫にも同時に感染していた(3 種類の土壌媒介寄生蠕虫に重複して感染)。患者は 84 歳の女性で、無農薬野菜の栽培に従事していることが論文に記されており、自身が栽培した野菜に付着する虫卵を経口的に摂取して、継続的に感染していた可能性が示唆された。なお土壌媒介寄生蠕虫の症例数の経年推移は、BML の資料を見る限り、虫種を問わずに相互に類似していた。従って自家菜園の下肥利用を背景とするなど、3 種類の土壌媒介寄生蠕虫の感染経路や原因食品は、基本的には同様でないかと判断された。この点については今後のさらなる検証が必要と考えている。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法、ストマッカー法による成績との比較

検体からの寄生虫卵検出については、野菜表面をブラシでこする従来法が定着している。しかし多量の検体を効率的に処理する方法の開発が必要となり、昨年度はストマッカー使用の是非を検討した。その結果、ストマッカーの使用により、検体からの虫卵分離に要する時間が短縮され、また回収虫卵数は従来法よりも有意に多くなることが明らかとなった。しかしストマッカー処理の過程で、検体である野菜由来の微細な破片が多数発生し、これが虫卵計数用の試料に混入して、顕微鏡下の虫卵計数作業に障害を与え、顕微鏡観察に予想外の長時間が必要となることが判明した。そこで微細な破片を発生させない効率的な虫卵回収の方法として、新たに超音波法を検討することになった。

超音波法に関する予備試験の結果、5 分間の超音波処理で虫卵回収数は最大となることが分かった。また洗浄容器のリンスは 2 回とした。この条件で本試験を実施し、超音波法、従来法およびストマッカー法による試験結果を相互に比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意な差を認めなかった。

虫卵回収数に有意な差がない場合、検査の過程における作業をいくつか選び、その優劣に応じてスコアを与え、スコア合計に基づいて各試験法の優劣を総合的に判断する手法が採用される。このような定量分析の手法を、本検討にも適用した。すなわち、回収虫卵数のほか、1 回の検査に使用可能な検体重量(検体重量)、各試験法に必要な処理時間(処理時間)、虫卵計数のための顕微鏡観察時間(観察時間)の計 4 項目を選定し、各項目についてスコアを与えて、各試験法のスコア合計を求めた。その結果、スコアの合計は超音波法、ストマッカー法、従来法の順となった。すなわち、超音波法は多数の検体から最も効率的に寄生虫卵を分離できる方法であることが分かった。超音波法は従来法に代替する非動物性食品(野菜)からの寄生虫卵検査法として、推奨されるべき方法と考えられ、今後予定している非動物性食品の寄生虫卵汚染の実態調査では、本法も活用して多数の検体を処理し、我が国で流行が続く土壌媒介寄生蠕虫症の感染源を明らかにしたい。

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) 保存試験

平成 25 年度の本分担研究の検討から、常温保存・流通の容器包装詰製品の中に、厚生労働省により当該製品に対して指導通知されている理化学性状(pH < 4.6)を逸脱している製品が含まれていることが明らかになり、同製品を検体として保存試験

を実施することとした。ポツリヌス菌未接種群では、保存期間が長くなるに連れて、pH、酸化還元電位の上昇傾向がみられ、容器包装未開封の製品であっても、その理化学性状が安定でない事が示された。未開封の芽胞未接種群における一般細菌数は、保存期間が長くなるにつれて増加傾向にあり、この一般細菌数増加は理化学性状の変化に関連している可能性が考えられる。また供試検体では、たくあん(大根)と共に、漬込み液も容器包装詰されている。検体の包装後加熱処理の有無は表示されていない。これらが一般細菌数の変動に及ぼす影響も懸念されることから、こうした情報の収集も今後必要な事項と思われる。

ポツリヌス菌は接種後 15 日目には菌数の減少を認めたと、その後は(温度や菌型によって異なるものの) 15 日目時点の菌数を維持或は微増しており、さらに継続した検討が必要と考えられた。また、先にも述べたが、検体の包装後加熱処理の有無は衛生的観点からも重要であるが、さらに、芽胞形成菌にとっては発芽刺激になりうる事から、留意すべき点と考える。本試験では 80 °C 20 分間の加熱処理後の芽胞液を用いて行なっているが、栄養体接種での食品内挙動も今後検討していきたい。

2) 酸化還元電位の検討

本研究では、広い酸化還元電位幅において、クロストリジウム属菌 (*C. butylicum*) の発育を許容するとの知見を得た。この電位幅は、大気中における食品の多くが含まれると想定されることから、食品中におけるポツリヌス菌の増殖を制御するための理化学指標として、酸化還元電位を用いる意義は必ずしも大きいとは言いがたいといえよう。現行の指導内容に含まれる理化学性状は、pH と水分活性があるが、容器包装詰低酸性食品においては、酸素濃度あるいは酸価といった理化学性状もポツリヌス菌の発芽・発育に関わる影響因子であることから、次年度に向けた課題として検討を視野に入れていきたい。

食品内での菌増殖に伴い、本菌がヒト健康危害の高いポツリヌス神経毒素を産生する事も懸念される。ポツリヌス毒素の定量試験は未だマウスアッセイにより行なわれているが、近年では、PCR-ELISA、イムノクロマト、FRET 等の手法を用いた検出キットの開発も海外では進められている。来年度にはこうしたアッセイ系に着目し、動物代替手法としての有用性を検討したい。

4. 欧州連合 (EU) における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

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

年のフェヌグリースプラウトによる腸管出血性大腸菌 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。

E. 結論

1. 細菌汚染実態に関する研究

野菜浅漬け食品の製造施設におけるリステリア汚染実態とその改善に関する研究

本年度の施設調査において、冷蔵庫や包装室の床のたまり水、そして製品充填機の拭き取り検体から LM が検出され、汚染箇所が明らかになった。本年度の施設調査の結果および成果を元に、汚染除去効果の検証を行い、今後の衛生対策に反映させて行きたい。

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

漬物の製造で伝統的に用いられる、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することが明らかとなった。また、衛生規範に盛り込まれた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る。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 回虫汚染に関する情報収集

土壌媒介蠕虫症として鉤虫症および鞭虫症は、少数ながら現在も日本国内で発生しているとの結論を得た。

2) 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法、ストマッカー法による成績との比較

超音波を利用した非動物性食品からの寄生虫卵検出法を構築し、従来法およびストマッカー法で得

られた結果と比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意差を認めなかった。さらにスコア定量分析を行ったところ、超音波法が最も高いスコアを得たことから、試験法として推奨されるべきものと考えられた。

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

本研究では、厚生労働省による指導内容を逸脱した容器包装詰低酸性食品を用い、ボツリヌス菌添加保存試験を行い、菌量の一部保持されていることが確認され、更に長期の保存試験が必要と考えられた。また、酸化還元電位を容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策の理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

4. 欧州連合(EU)における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

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報告書を精査することで、EFSAが特定の組み合わせ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を把握できた。食品流通の世界的拡大に鑑み、EUを始めとする国際的な動向を注視していくことの必要性が示唆される。また、我が国においても非動物性食品の汚染実態の把握が食中毒対策のために重要と考えられる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文

1) 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. 印刷中.

2) 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. わが国における土壌媒介寄生虫症,特に回虫症の発生とその汚染源の文献的および検査機関データに基づく調査. 食品衛生研究 65(4), 印刷中.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 高鳥浩介、朝倉宏. 農産物の生食のリスクとその制御. 第41回日本防菌防黴学会年次大会シンポジウム.

H. 知的財産権取得状況

該当なし

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
「非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：細菌汚染実態に関する研究

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：

平成 25 年度に実施した市販浅漬の培養検査で、複数の製造施設の検体から *Listeria monocytogenes* (以下 LM) が検出された。本年度は浅漬製造施設とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者に協力を求め、製造環境の検証を行った。

平成 26 年 6,7,8,11 月および平成 27 年 1 月に 3 施設 (A、B、C 社) について製造環境のふきとり材料等 102 検体を採取し、LM の検出を試みた。その結果、3 施設ともに冷蔵庫や包装室の床のたまり水、そして製品充填機の拭き取り検体から LM 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では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ることが推察された。そして行政担当者の指導のもとに改善方法の検討が行われ、複数回の調査を行った 2 施設では成果が認められた。

A．研究目的

近年、サラダや漬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。しかし、それら食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非動物性食品中の、病原菌を含む細菌数を定量し、食品ごとのデータを解析して食品の衛生管理基準の策定に役立てるための実態調査を行なうこととした。

昨年度は市販の野菜浅漬における細菌汚染実態調査を行い、一部の製品において、*Listeria monocytogenes* (以下 LM) が継

続的に検出される実態を把握した。

そこで、本年度は浅漬の衛生対策に役立てることを目的として、これらの汚染が認められた製造施設への立ち入り調査を、管轄自治体の協力を得て行い、同製造環境の検証を行ったので報告する。

B．研究方法

1) 施設調査

3 社 (A、B、C 社) の製造施設とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者に協力を求め、平成 26 年 6,7,8,11 月および平成 27 年 1 月に製造環境の検証を行った。

施設のふきとり材料等は、合計 102 検体を採取し LM の検出を試みた。LM の検出は ISO 11290-1 Amendment 1 (2004)及び ISO 11290-2 Amendment 1 (2004)に準拠し、定性試験および定量試験を行った。

2) 分離菌株の遺伝子解析

本年度実施した 3 施設から分離した LM 53 株および施設 A、施設 B の昨年度に市販製品から検出した LM 11 株の合計 64 株についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析を行った。

そして、リボプリンターシステム (Dupont) による解析も併せて実施した。

C. 研究結果

1) 施設 A の調査成績 (表 1、図 2)

平成 26 年 6 月に 1 回目、平成 27 年 1 月に 2 回目の調査を行った。みぶな浅漬の製造工程の概略を図 1 に示した。

1 回目の調査では、冷蔵庫床のたまり水、製品充填機や作業台のふき取り、さらに最終製品であるみぶなの漬物からも LM が検出された。

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 LM を検出したが、前回と同じ場所の検体 No.1 と 8 の定量試験での菌数は減少しており、製品から LM は検出されなかった。検体 No.8、9 では血清型 3b が検出されたが、この血清型は 1 回目のいずれの検体からも検出されていなかった。

本施設では、1 回目の調査の後、汚染箇所に熱湯をかける、スチームクリーナーで蒸気をあてるなどの対策を実施しており、熱を加える事で菌数を減少させることができた。

2) 施設 B の調査成績 (表 2、図 3)

平成 26 年 6 月に 1 回目、8 月に 2 回目、11 月に 3 回目の調査を行った。茄子浅漬

の製造工程の概略を図 1 に示した。

1 回目の調査では、冷蔵庫床のふき取りや製品充填機のふき取り、さらに中間製品や最終製品である茄子の漬物からも LM が検出された。

2 回目の調査では、15 検体中 4 検体から LM を検出したが、前回と同じ場所の検体の定量試験での菌数は減少しており、製品から LM は検出されなかった。そして 3 回目の調査では、13 検体とも陰性であった。

本施設では、作業終了時のブラシによるこすり洗いを徹底する、冷蔵庫の床を週に一度清掃する等の対策で、LM 陰性化に成功した。

3) 施設 C の調査成績 (表 3、図 4)

平成 26 年 7 月に調査を行った。他の 2 施設と異なり下処理室での LM 検出が認められた。その他は床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。本施設の 2 回目の調査はまだ行っていない。

4) PFGE 法による解析 (表 4、図 5)

制限酵素 *AscI* では A、B グループ (B,B1,B2)、C の 3 つに型別された。制限酵素 *ApaI* では a グループ (a,a1)、b、c の 3 つに型別された。

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 26 株の合計 34 株を型別し、Aa (*AscI*: A、*ApaI*: a グループ) と Bb (*AscI*: B グループ、*ApaI*: b) の 2 つに分かれた。

施設 B では平成 25 年度分離株 3 株と平成 26 年度分離株 21 株の合計 24 株を型別し、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。

5) リボプリンターシステムによる解析

施設 A では、Ribogroup が A,B,C,D,E に型別され、多様な型が存在していた。そのうち、Ribogroup A と B が施設を持続汚染していると考えられた(図6)。

施設 B では、検体採取時期が異なっても同じ Ribogroup 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(図7)。

施設 C では、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(図8)。

D. 考察

3つの製造施設を調査した結果、施設 A では多様な型の LM が検出されたが、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るというように、施設ごとに特徴が認められた。

施設 A と施設 B の2施設では、昨年度の市販製品調査からも複数回 LM を検出しており、持続的な LM 汚染が認められていた。両施設ともに1回目の施設調査において、冷蔵庫や包装室の床のたまり水、そして製品充填機の拭き取り検体から LM が検出された。LM 汚染の箇所が明らかになったことから、当該施設を管轄する行政の食品衛生担当者と施設側とが具体的に改善案を検討することが可能になり、改善に向けての作業が行われた。

その結果、2度目の調査時には製品からの検出は認められず、他のふき取り箇所も大幅な菌数減少が認められた。本研究班の調査をきっかけとして、施設の衛生対策の改善が計られ、その成果が現れたものと考えられた。

施設のふき取り調査の回数以上に、行政の担当者が施設と連絡を取り合っていたことで、施設側の LM 対策についての理解

が深まり、LM の陰性化が実現したと考えられる。来年度はこれらの施設で実施された洗浄方法を参考として、関連製造施設における望ましい洗浄のあり方に関する知見を集積し、衛生管理に資するマニュアル作成の一助となりうる根拠の創出を図りたい。

E. 結論

本年度の施設調査において、冷蔵庫や包装室の床のたまり水、そして製品充填機の拭き取り検体から LM が検出され、汚染箇所が明らかになった。本年度の施設調査の結果および成果を元に、汚染除去効果の検証を行い、今後の衛生対策に反映させていきたい。

F. 研究発表

(口頭発表)

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 高鳥浩介、朝倉宏：農産物の生食のリスクとその制御、第41回日本防菌防黴学会年次大会 シンポジウム。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

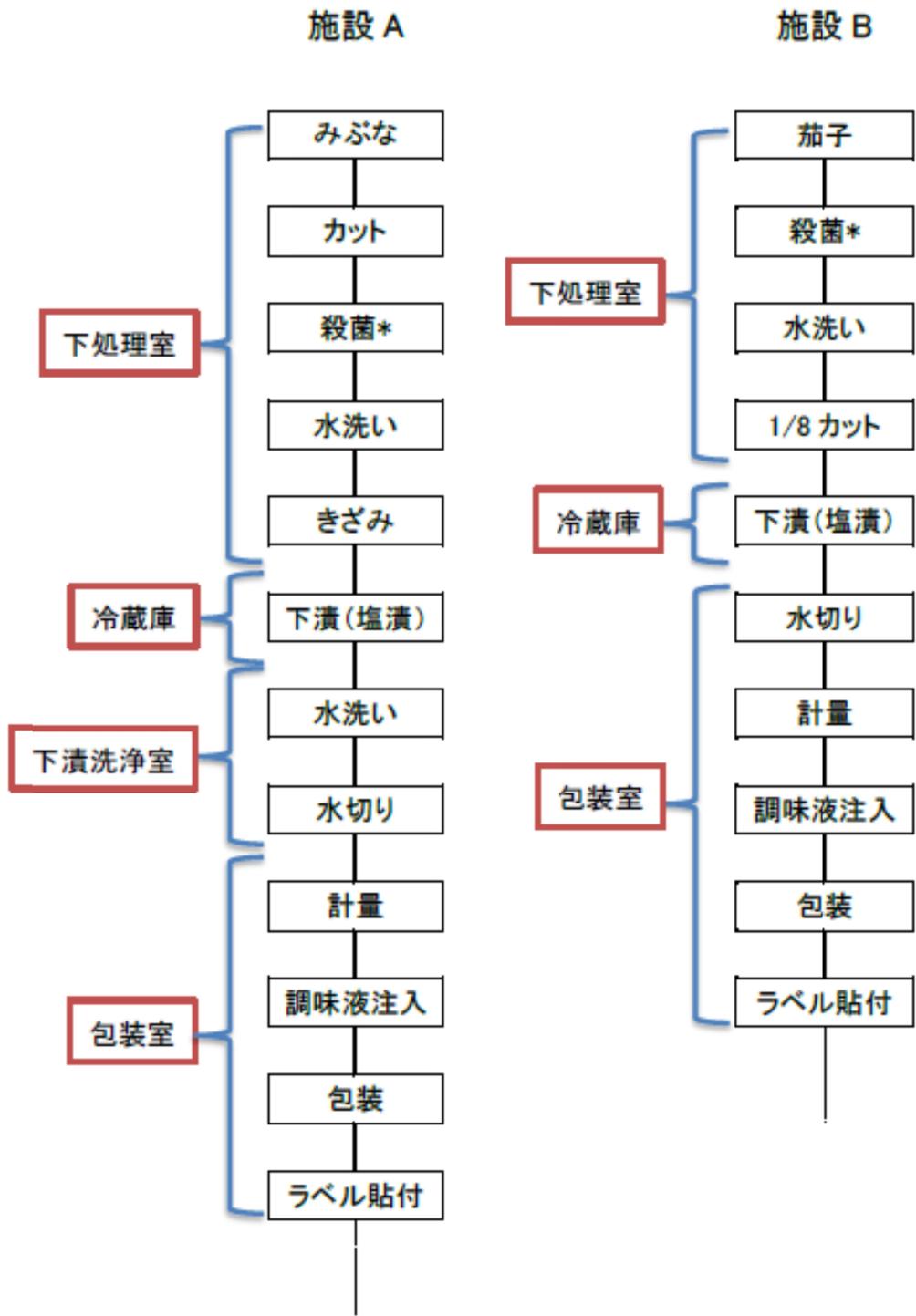


図 1 施設 A、B の浅漬製造工程

表 1 施設 A の *Listeria monocytogenes* 検出検体

No.	採取場所	検体名	1回目調査		2回目調査	
			定量試験 (菌数)	分離株の 血清型	定量試験 (菌数)	分離株の 血清型
1	冷蔵庫	冷蔵室床たまり水	90 CFU/mL	1/2a, 1/2b	<10 CFU/mL	1/2a
2	包装室	作業台のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a, 1/2b	陰性	
3	包装室	計量容器のふきとり	<10 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	陰性	
4	包装室	製品充填機のふきとり	40 CFU/100cm ²	1/2a	/	
5	包装室	製品充填機のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a		
6	包装室	製品充填機のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a	陰性	
7	包装室	充填後の廃液	60 CFU/mL	1/2a, 1/2b, 3a	/	
8	包装室	充填機の下の方ふきとり	60 CFU/100cm ²	1/2a, 1/2b, 3a		
9	包装室	作業台の下の方ふきとり	/		35 CFU/100cm ²	3b
10	製品	最終製品(みぶな)			50 CFU/g	1/2a, 1/2b, 3a

* 算出限界はふきとり水で 100 cm²中 10 CFU(2 回目調査は 5CFU)、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 10 CFU である。

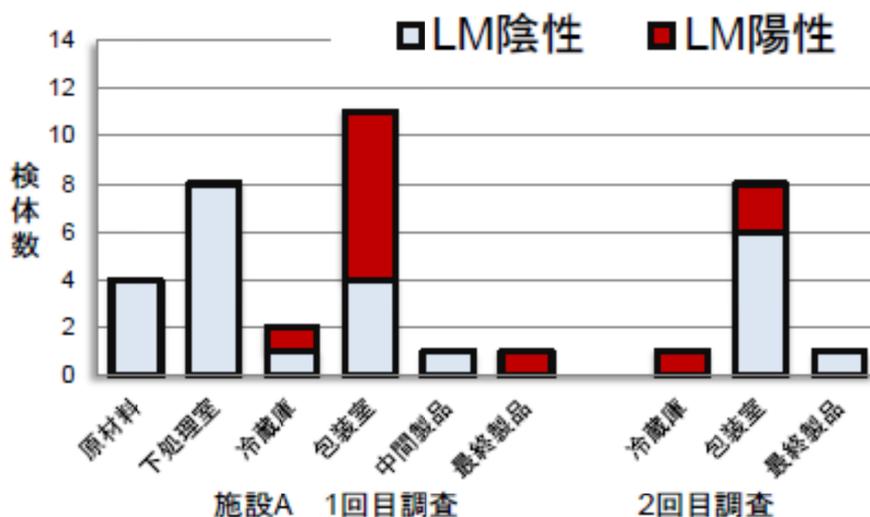


図 2 施設 A の製造環境調査

表 2 施設 B の *Listeria monocytogenes* 検出検体

No.	採取場所	検体名	1回目調査		2回目調査		3回目調査
			定量試験 (菌数)	分離株の 血清型	定量試験 (菌数)	分離株の 血清型	
1	冷蔵庫	冷蔵室床のふきとり	30 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	<10 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	陰性
2	冷蔵庫	下漬容器外側面のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a			
3	包装室	作業台のふきとり	<10 CFU/100cm ²	3a	陰性		陰性
4	包装室	下漬時使用器具のふきとり	10 CFU/100cm ²	3a	陰性		
5	包装室	製品充填機のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a	陰性		
6	包装室	製品充填機のふきとり	180 CFU/100cm ²	1/2a	<10 CFU/100cm ²	3a	陰性
7	包装室	製品充填機のふきとり	50 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	陰性		陰性
8	包装室	製品充填機のふきとり	760 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	<10 CFU/100cm ²	1/2a	陰性
9	包装室	充填機の下の水	40 CFU/mL	1/2a, 3a	30 CFU/mL	1/2a	陰性
10	中間製品	計量前の塩漬茄子	<10 CFU/g	3a			
11	製品	最終製品(茄子)	<10 CFU/g	1/2a	陰性		陰性

* 算出限界はふきとり水で 100 cm²中 10 CFU、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 10 CFU である。

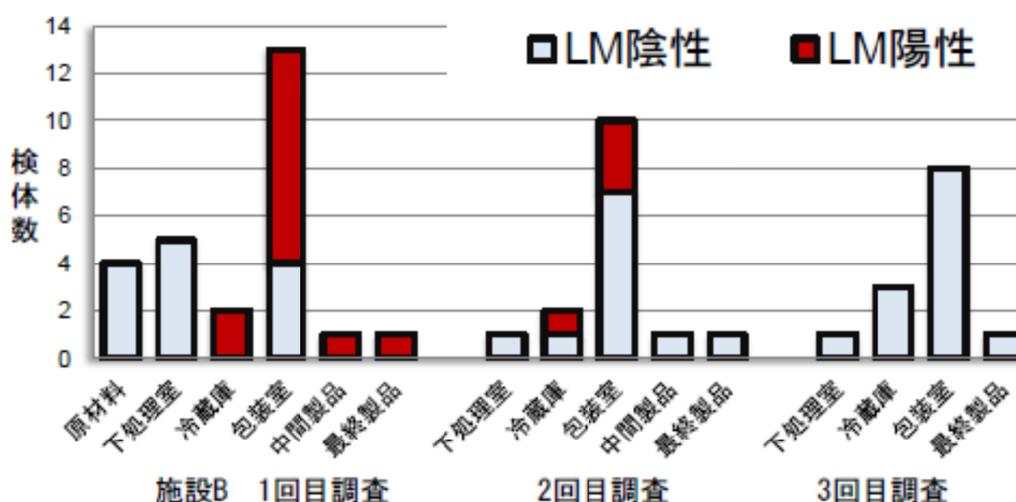


図 3 施設 B の製造環境調査

表 3 施設 C の *Listeria monocytogenes* 検出検体

No.	採取場所	検体名	定量試験 (菌数)	分離株の 血清型
1	下処理室	まな板のふきとり	98 CFU/100cm ²	1/2a
2	下処理室	床の水	<1 CFU/mL	1/2a
3	冷蔵庫	冷蔵庫床たまり水	<1 CFU/mL	3a
4	冷蔵庫	冷蔵庫床のふきとり	1.1×10^6 CFU/100cm ²	1/2a, 3a
5	冷蔵庫	冷蔵庫床たまり水	78 CFU/mL	1/2a, 3a
6	包装室	製品充填機たまり水	<1 CFU/mL	1/2a
7	包装室	製品充填機のふきとり	1.1×10^3 CFU/100cm ²	1/2a
8	製品	最終製品(白菜)	<10 CFU/g	1/2a

* 算出限界はふきとり水で 100 cm²中 1 CFU、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 1 CFU である。

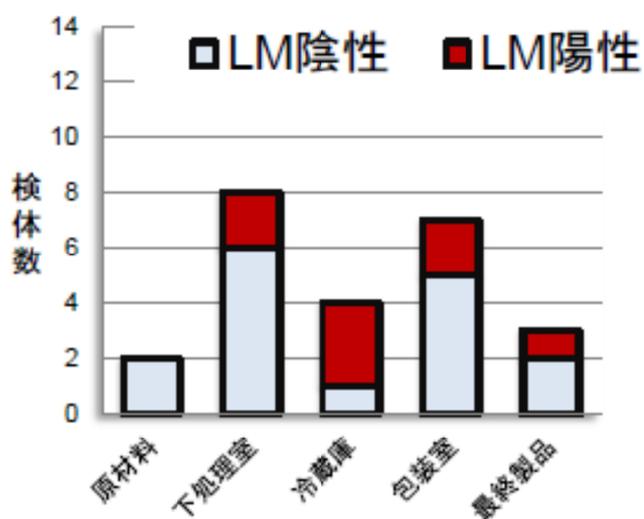


図 4 施設 C の製造環境調査

表 4 分離株の遺伝子型別(PFGE profile)

施設	採取場所(検体数)	分離株の血清型	PEGE profile	
			Asc I	Apa I
A	2013 年度製品(2),包装室(6),最終製品(1)	1/2a	A	a
	包装室(3),最終製品(1)	3a		
	冷蔵庫(1)	1/2a	A	a1
	2013 年度製品(3),包装室(2),最終製品(1)	1/2b	B	b
	2013 年度製品(1), 包装室(1)	1/2b	B2	b
	冷蔵庫(1)	1/2b	B1	b
B	2013 年度製品(3),冷蔵庫(3),包装室(7),最終製品(1)	1/2a	C	c
	冷蔵庫(2),包装室(5),中間製品(1)	3a		
C	下処理室(2),冷蔵庫(2),包装室(2),最終製品(1)	1/2a	A	a1
	冷蔵庫(3)	3a		

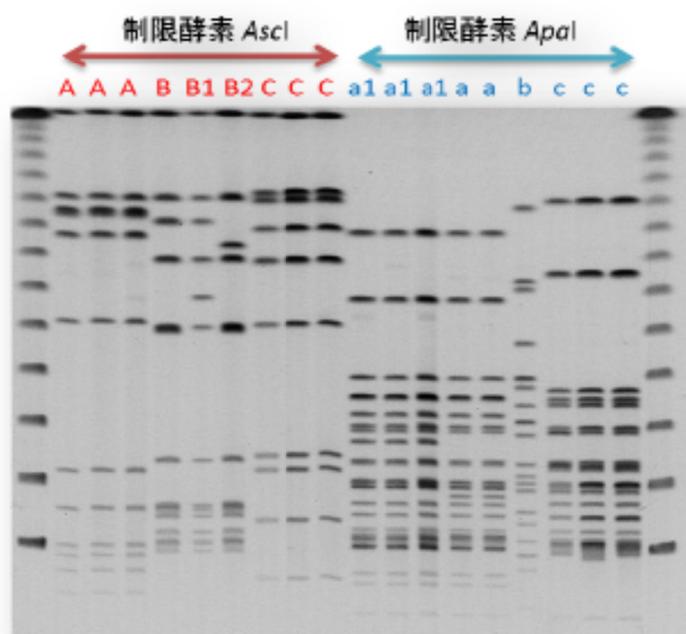


図 5 *Listeria monocytogenes* の PFGE profile

No.	Sampling date	Serotype	Dupont ID	Ribogroup	Source	RiboPrint™ Pattern				
						1 kbp	5	10	15	50
1	May/21/2013	1/2b	DUP-1052	A	Final product (Mibuna)					
3	Aug/19/2013	1/2b	DUP-1052		Final product (Mibuna)					
17	Feb/03/2014	1/2b	DUP-1052		Final product (Mibuna)					
31	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		Bottom of packaging device					
35	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		bucket for excessive liquid seasoning					
36	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		bucket for excessive liquid seasoning					
40	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		bench on which measuring cup stands					
46	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052	Final product (Mibuna)						
8	Oct/07/2013	1/2a	DUP-20226	B	Final product (Mibuna)					
7	Oct/07/2013	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
9	Oct/07/2013	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
16	Feb/03/2014	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
24	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
25	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
26	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
28	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
30	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Bottom of packaging device					
32	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Bottom of packaging device					
33	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bucket for excessive liquid seasoning					
37	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bucket for excessive liquid seasoning					
38	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bench on which measuring cup stands					
39	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bench on which measuring cup stands					
42	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Measuring cup					
43	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
45	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
27	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226	Packaging device (opener)						
44	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	Final product (Mibuna)						
29	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	Bottom of packaging device						
41	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	Measuring cup						
34	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	bucket for excessive liquid seasoning						
11	Oct/07/2013	1/2b	DUP-18596	C	Final product (Mibuna)					
12	Oct/07/2013	1/2b	DUP-18596		Final product (Mibuna)					
10	Oct/07/2013	1/2b	DUP-18596		Final product (Mibuna)					
21	Jun/16/2014	1/2a	DUP-1045	D	Sloppy floor in cold room					
23	Jun/16/2014	1/2a	DUP-1045		Sloppy floor in cold room					
22	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1043	E	Sloppy floor in cold room					

図 6 施設 A 由来株のリボプリンター解析

No.	Sampling date	Source	Serotype	Dupont ID	Ribogroup	RiboPrint™ Pattern				
						1 ktp	5	10	15	50
4	2013.8.19	Final product (egg plant)	1/2a	DUP-20237	A					
6	2013.10.7	Final product (egg plant)	1/2a	DUP-20237	A					
14	2013.10.15	Final product (Napa cabbage)	1/2a	DUP-20237	A					
47	2014.06.30	Scale device	3a	DUP-20237	A					
48	2014.06.30	Conveyor on packaging device	1/2a	DUP-16619	A					
49	2014.06.30	Pickle-tub cover of pre-pickled tank	3a	DUP-16619	A					
50	2014.06.30	Filling nozzle of liquid filling device	1/2a	DUP-16619	A					
52	2014.06.30	salt-soaked egg plant	3a	DUP-20237	A					
53	2014.06.30	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	1/2a	DUP-20237	A					
54	2014.06.30	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	3a	DUP-16619	A					
55	2014.06.30	Outer surface of pre-pickling tank in cold room	1/2a	DUP-16619	A					
56	2014.06.30	Post-packaging conveyer	1/2a	DUP-16619	A					
57	2014.06.30	Post-packaging conveyer	3a	DUP-16619	A					
58	2014.06.30	Final product (egg plant)	1/2a	DUP-20237	A					
59	2014.06.30	Sloping floor close to packaging machine	1/2a	DUP-16619	A					
60	2014.06.30	Sloping floor close to packaging machine	3a	DUP-16619	A					
61	2014.06.30	Packaging device (sealing after liquid filling)	1/2a	DUP-20237	A					
62	2014.06.30	Packaging device (sealing after liquid filling)	3a	DUP-16619	A					
63	2014.08.18	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	3a	DUP-20237	A					
64	2014.08.18	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	1/2a	DUP-16619	A					
65	2014.08.18	Filling nozzle of liquid filling device	3a	DUP-16619	A					
66	2014.08.18	Post-packaging conveyer	1/2a	DUP-16619	A					
67	2014.08.18	Sloppy floor close to packaging machine	1/2a	DUP-16619	A					

図 7 施設 B 由来株のリボプリンター解析

No.	Sampling date	Serotype	Dupont ID	Ribogroup	Source	RiboPrint™ Pattern
						1 kb 5 10 15 50
68	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Chopping board	
69	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Chopping board	
70	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Chopping board	
71	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Floor close to vacuum-packaging device	
72	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Floor close to vacuum-packaging device	
73	Jul/24/2014	3a	DUP-16619	A	Floor inside cold chamber	
74	Jul/24/2014	3a	DUP-16619	A	Floor inside cold chamber	
75	Jul/24/2014	3a	DUP-16619	A	Floor inside cold chamber	
76	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Barrel inside cold chamber	
77	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Barrel inside cold chamber	
78	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Barrel inside cold chamber	
79	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Barrel inside cold chamber	
80	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Barrel inside cold chamber	
81	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
82	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
83	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
84	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
85	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
86	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
87	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
88	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
89	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
90	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
91	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
92	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Final product (Napa cabbage)	
93	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Final product (Napa cabbage)	

図 8 施設 C 由来株のリボプリンター解析

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究」

分担研究報告書

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

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
協力研究者	榊田和彌	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
協力研究者	倉園久生	国立大学法人帯広畜産大学	畜産学部 共同獣医学課程
協力研究者	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨：昨年度末に、浅漬け製造施設においてパイロットスタディを実施し、中間製品および施設ふき取り検体などを採取して、製造工程を通じた指標菌の動態に関する知見を得た。本年度は同検体を構成する菌叢を明らかにすることで、個々の工程が顕す病原細菌の制御効果に関する考察を行なうこととした。白菜の浅漬け製造ラインより採取した原材料、中間製品（塩漬け後および殺菌後）、最終製品より各 2 検体を 16s rRNA pyrosequencing 解析に供した。結果として、各検体の構成菌叢は著しい変動を顕し、特に塩漬け工程での腸内細菌科菌群の著減を認めた。その後の殺菌工程後検体では更にその構成比率は低減を示したことから、同 2 工程の導入が、供試製造工程において微生物制御に有効に機能していると考えられた。市販白菜（原材料）を異なる塩濃度で 2 日間漬け込んだところ、10% 食塩を用いた場合に有意な大腸菌群数の低下が認められたが、0.2% 食塩での漬け込みにより同指標菌数は明らかな低下を示さなかった。漬け込み工程における食塩濃度に依存して、*Pseudomonas* 属菌の比率は大きく変動を示した。

A. 研究目的

2012 年 8 月に白菜の浅漬けを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事例では、患者 169 人、死者 8 人を数え、社会的な問題となった他、非動物性食品における微生物危害性が改めて認識されたところである。こうした事態を受けて、厚生労働省では、同年 12 月に漬物の衛生規範を改正し、原材料の次亜塩素酸による殺菌または加熱を盛り込むと共に、製造工程に

係る管理運営基準の策定と運営もしくは HACCP 方式の導入を指導する内容を発行している。衛生規範は周知のとおり、製造事業者の意識・意欲に依存するところがあるが、昨年度実施した浅漬け製造施設でのパイロットスタディにおいて、調査対象施設では同規範が遵守され、塩漬けと殺菌工程を通じた、指標菌の低減を確認したところである。本年度は、その結果が病原細菌の制御に資することを更に裏付ける目的で、白菜の浅漬け製造ラインにおける原材料、

中間製品および最終製品を対象として、構成菌叢を調査したので、報告する。

B. 研究方法

1. 検体

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、同施設内で白菜の浅漬け製造ラインより採材した原材料、中間製品（塩漬け後、殺菌後）および最終製品各 2 検体を菌叢解析に供した。

2. 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。

3. 食塩漬け込みに伴う指標菌と菌叢変動
店頭で市販される生鮮白菜を購入し、十分量の水道水で 2 回洗浄後、汚染のないように、同野菜を 25g づつに裁断した。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させた後、同懸濁液を用いて、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。

C. 研究結果

1. パイロットスタディにおける白菜浅漬

けの製造工程中の菌叢変動

昨年度、採材した白菜浅漬け製造ラインでの原材料、中間製品（10%食塩水での塩漬け後、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、18361-104969 リードが得られ、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（図 1）。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焼く 5.7%であった（図 1）。

（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で、その他の工程ではいずれも 5%以下であった（図 1）。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（図 1）。本属は、主に植物の根部に棲息することが知られているが、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(図1)。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(図1)。こうした構成比率は、当該細菌の生存を直接的に示すものではなく、死菌からの影響も受ける。実際に、昨年度の成績として、大腸菌群が最終製品から分離培養されなかった結果から、これらは既に死滅しており、死菌由来核酸のわずかな混入がこうした成績へとつながったと目される。

2. 白菜由来菌叢は漬け込み過程での食塩濃度により影響を受ける

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および指標菌数に係る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、漬け込み前後で顕著な差異を示さなかったが、大腸菌数については、10%食塩水漬け込み群においてのみ、漬け込み前検体に比べ、有意な菌数低減を認めた(図2)。菌叢解析を通じて、10%食塩漬け込み群では、*Pantoea* 属構成比率が顕著に減少することが認められ(図3)。大腸菌群数変動との関連性が示唆された。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* 属については、食塩濃度が高くなるにつれて、その構成比率が高まる

傾向であることが明らかとなった(図3)。

以上の成績より、食塩濃度は漬け込み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あわせて、浅漬け製造における病原微生物制御に寄与する工程であることが改めて明らかとなった。

D. 考察

葉物野菜は、その代謝・生理機構の多様性から、広範にわたる病原細菌の汚染が懸念されている。その中であって、白菜は特に外表面のみならず、内部へも汚染が懸念されるため、原材料からの病原細菌をどのように抑えるかが衛生管理上での重要な課題といえる。

本研究では、昨年度の研究において実施した白菜浅漬け製造ラインでの指標菌数動態成績として、塩漬け及び殺菌工程を通じた指標菌数の著減の原因を探るべく、菌叢解析を実施し、その中で特に白菜由来の細菌の制御に資する、漬け込み工程での食塩濃度に関する知見を得ることとした。

本研究において検討した浅漬け製造ラインでの菌叢動態に係る成績は、改正された衛生規範中に盛り込まれている、殺菌工程の必然性を改めて指示する結果となった。また、塩漬け工程中で用いる食塩濃度に関する知見は、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。

E. 結論

漬物製造で用いられる、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が明らかとなった。また、衛生規範に盛り込まれた、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る。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 印刷中.

2. 学会発表

高鳥浩介、朝倉宏. 農産物の生食のリスクとその制御. 第41回日本防菌防黴学会年次大会 シンポジウム.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

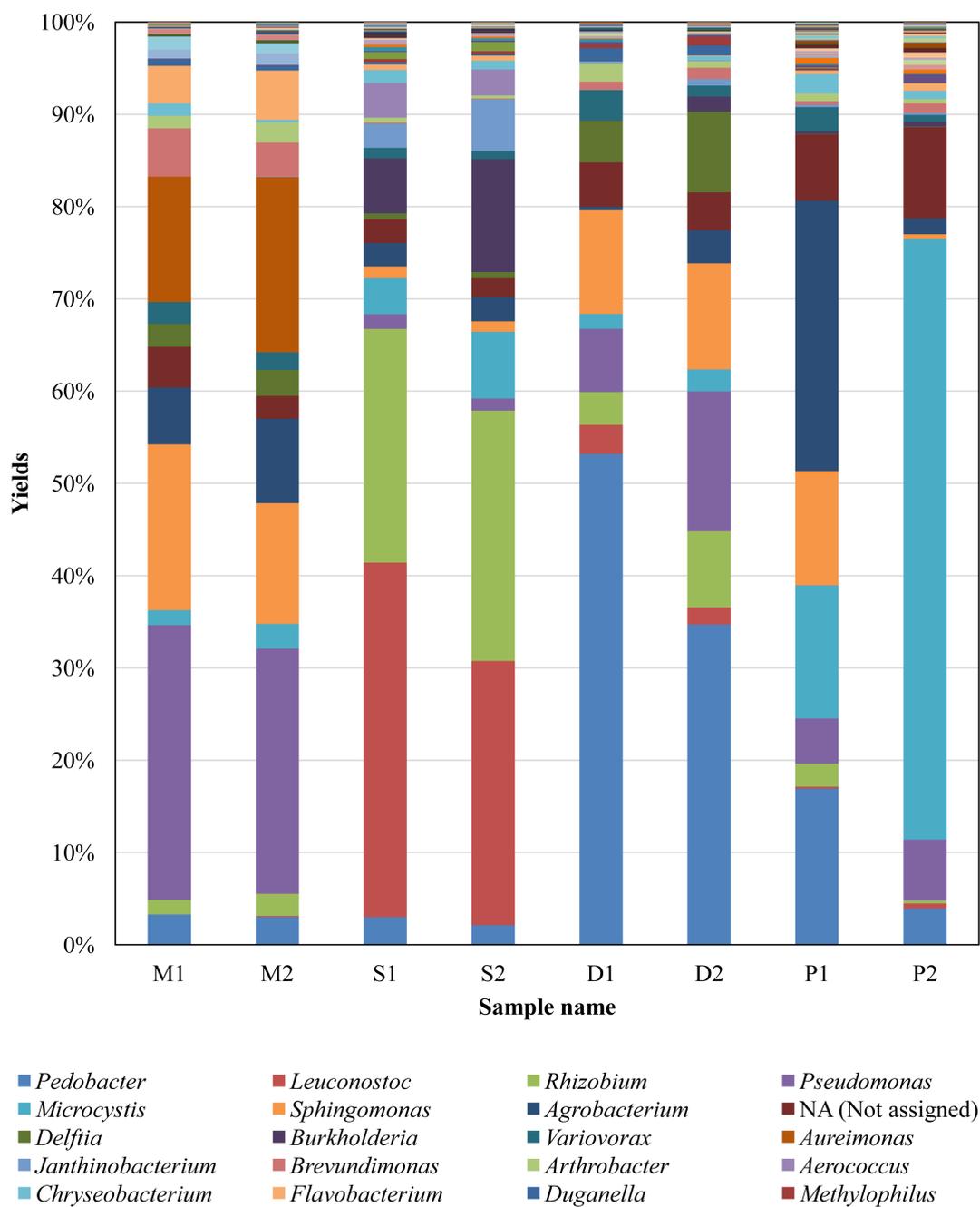


図1 . 白菜浅漬けの製造工程を通じた菌叢変動

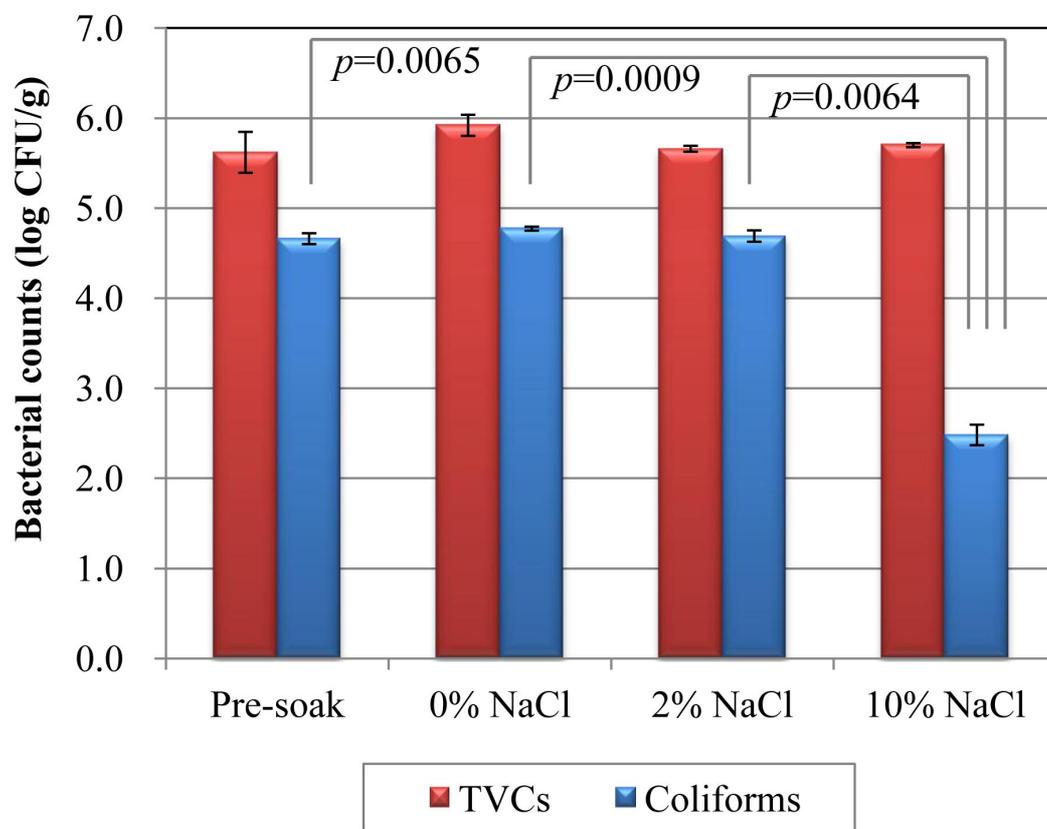


図 2 . 異なる食塩濃度で漬け込みを行った際の白菜由来指標菌数の変動

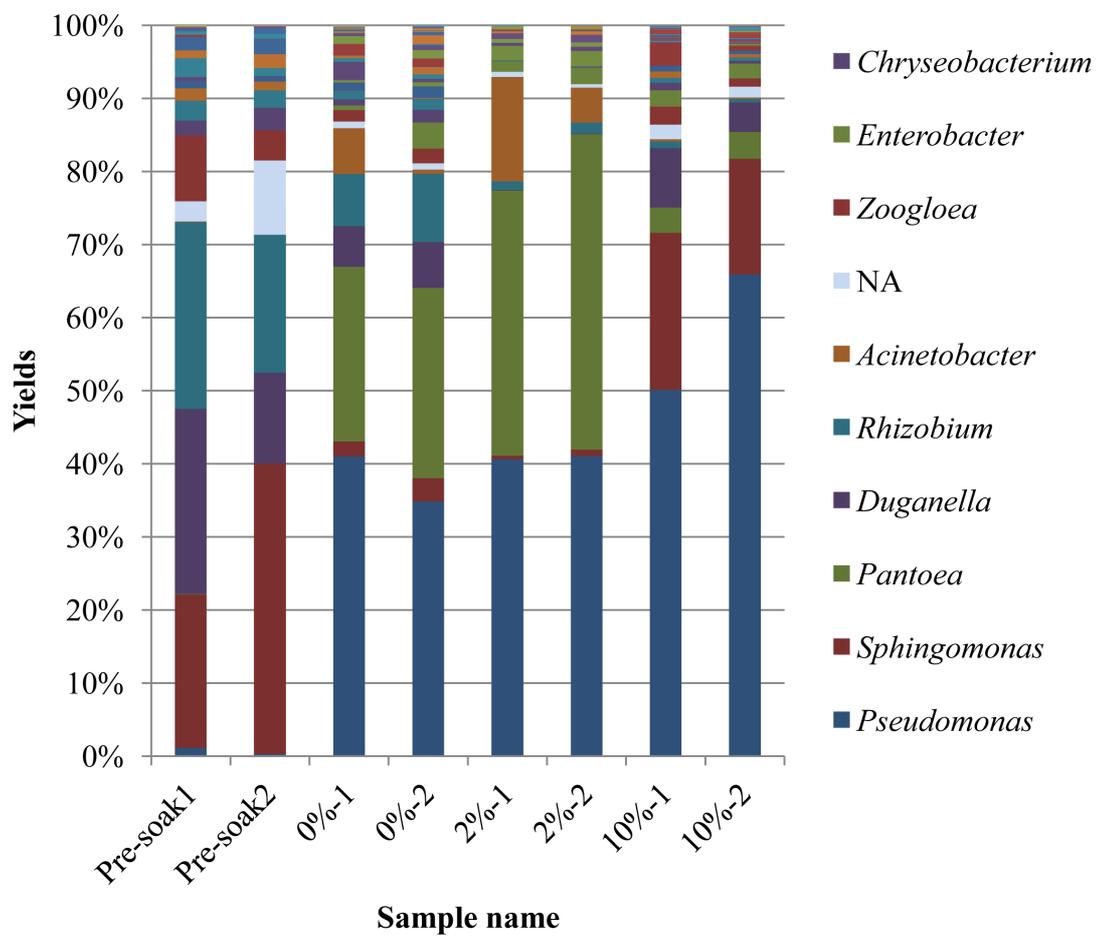


図3. 異なる食塩濃度で漬け込みを行った際の白菜由来菌叢の変動

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究
分担研究報告書

寄生虫による汚染に関する研究

研究分担者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	荒川京子	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	柴田勝優	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	賀川千里	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	堀内朗子	日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	生野 博	(株)ビー・エム・エル細菌検査部

研究要旨：我が国ではかつて国民の半数以上が回虫・鉤虫・鞭虫という土壌媒介寄生蠕虫に感染していたが、現在では感染者は激減した。しかしながら、土壌媒介寄生蠕虫による国内感染は、少数ながらも発生が継続しており、しかも感染経路あるいは原因食品等については推定の域を出ない事例が多い。そこで本年度は、昨年度の回虫症に続いて文献資料の検索に取り組み、最近の鉤虫症と鞭虫症の発生状況の詳細を調べた。その結果、鉤虫症と鞭虫症も少数ながら実際に日本国内で発生している事実が分かった。しかし原因食品や感染経路を明らかにすることはできなかった。土壌媒介寄生蠕虫の感染源となる非動物性食品の特定は重要であることから、その作業を効率的に実施するため、今年度は超音波を用いた非動物性食品の寄生虫卵検査法を構築して検討した。その結果、本法による虫卵回収数は従来法と同等であったが、虫卵を効率的に検出できる方法であることが明らかとなった。

1. 非動物性食品を感染源とする寄生虫症例、特に鉤虫および鞭虫症例の発生状況に関する文献資料の検索

A. 研究目的

回虫・鉤虫・鞭虫は野菜等を感染源とする食品媒介寄生蠕虫であり、土壌媒介寄生蠕虫とも呼ばれる。我が国ではかつて国民の半数

以上が土壌媒介寄生蠕虫に感染していたが、現在では感染者は激減した。しかしながら、土壌媒介寄生蠕虫の国内症例はゼロにはなっていない。そこで昨年度は回虫症に的を絞って文献資料の検索等を行い、本症の発生状況

の詳細把握に努める共に、その感染経路や原因食品について推定した。今年度は、回虫以外の土壌媒介寄生蠕虫である鉤虫および鞭虫について文献検索を行い、発生状況の詳細を調べた。

B. 研究方法

文献学的な一次資料として、日本臨床寄生虫学会誌（1990年/第1巻～2014年/第25巻の25年間/25巻）を用いた。これを通覧して、鉤虫および鞭虫感染の報告数・症例数をカウントした。また両症例の原因として推定・議論された感染源について、論文から情報の抽

表1. 鉤虫, 鞭虫の症例数: 日本臨床寄生虫学会誌における報告数とビー・エム・エル(BML)での検査数

年	日本臨床寄生虫学会誌						BML	
	巻	文献総数	鉤虫症文献数	鉤虫症症例数	鞭虫症文献数	鞭虫症症例数	鉤虫症症例数	鞭虫症症例数
1990	1	59	0	0	0	0	-	-
1991	2	44	1	1	0	0	-	-
1992	3	56	0	0	0	0	-	-
1993	4	69	0	0	0	0	-	-
1994	5	64	0	0	0	0	-	-
1995	6	59	0	0	0	0	-	-
1996	7	33	0	0	0	0	-	-
1997	8	39	0	0	0	0	-	-
1998	9	35	0	0	0	0	-	-
1999	10	41	0	0	0	0	-	-
2000	11	36	0	0	0	0	20 (5)	23 (13) *
2001	12	42	0	0	0	0	25 (25)	24 (17)
2002	13	31	0	0	0	0	33 (32)	29 (23)
2003	14	26	0	0	0	0	9 (8)	17 (12)
2004	15	26	0	0	0	0	9 (8)	13 (10)
2005	16	26	0	0	0	0	9 (9)	9 (4)
2006	17	31	0	0	0	0	0	4 (0)
2007	18	19	0	0	0	0	0	7 (2)
2008	19	39	0	0	0	0	5 (4)	10 (3)
2009	20	29	0	0	0	0	2 (0)	8 (1)
2010	21	33	0	0	0	0	2 (1)	7 (2)
2011	22	21	0	0	0	0	1 (0)	7 (0)
2012	23	32	0	0	0	0	2 (1)	13 (4)
2013	24	33	0	0	0	0	0	3 (0)
2014	25	27	1	1	1	1	0	9 (3)
合計		950	2	2	1	1	117 (93)	183 (94)

* : 日本人 (外国人)

出を試みた。さらに回虫症と同様に、臨床検体の検査会社であるBMLに依頼し、2000年以降に全国の医療機関で診断された鉤虫および鞭虫の症例数について提示を受けた。

日本臨床寄生虫学会誌計25巻に掲載された論文は950編で、このうち日本で感染した鉤虫症および鞭虫症の論文数(および症例数)は、それぞれ2編(2例)および1編(1例)であった。

C. 研究結果

BMLの資料では、鉤虫症例はその数が2002年までは二桁であったが、2003年以降は一桁となり、2013年および2014年は症例がゼロとなった。鞭虫症例は鉤虫症例と比較してやや多いが、2005年以降はおおむね一桁でその数が推移した。

D. 考察

日本臨床寄生虫学会誌に報告された症例およびBMLが診断した症例から、回虫と同様に鉤虫および鞭虫の感染も、少数ではあるが最近でも継続して我が国で発生していることが確認された。なお、2014年に日本臨床寄生虫学会誌に報告された鉤虫症例は、鞭虫および回虫にも同時に感染していた(3種類の土壤媒介寄生蠕虫に重複して感染)。患者は84歳の女性で、無農薬野菜の栽培に従事していることが論文に記されており、自身が栽培した野菜に付着する虫卵を経口的に摂食して、継続的に感染していた可能性が示唆された。なお土壤媒介寄生蠕虫の症例数の経年推移は、BMLの資料を見る限り、虫種を問わずに相互に類似していた。従って自家菜園の下肥利用を背景とするなど、3種類の土壤媒介寄生蠕虫の感染経路や原因食品は、基本的には同様でないかと判断された。この点については今後のさらなる検証が必要と考えている。

E. 結論

土壤媒介蠕虫症として鉤虫症および鞭虫症は、少数ながら現在も日本国内で発生しているとの結論を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. わが国における土壤媒介寄生虫症、特に回虫症の発生とその汚染源の文献的および検査機関データに基づく調査. 食品衛生研究 65(4), 印刷中, 2015.

2. 学会発表 なし.

2. 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：超音波法の構築と従来法、ストマッカー法による成績との比較

A. 研究目的

現在、我が国で流通する非動物性食品の土壤媒介寄生蠕虫卵汚染の程度は、昨年度および今年度実施の文献調査の結果からも、相当に低いと推定された。従って虫卵の検出にあたっては、多量の検体を効率的に処理する方法の開発が必要と考えられた。そこで昨年度は、食品細菌の検査分野で汎用されるストマッカーの導入を検討し、得られた検査結果について、食品衛生検査指針に記載の従来法による成績と比較した。今年度はさらに超音波法の導入を試み、試験条件を検討するとともに、得られた検査結果について、従来法およびストマッカー法による成績と比較した。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、日本食品衛生協会食品衛生研究所に委託して本検討を実施した(試験検査成績書は本報告書の末尾に添付したので参照されたい)。被検物質には、屠畜場から入手した自然感染ブタ由来の豚回虫を選んだ。豚回虫卵を接種する野菜には白菜を用い、雌成虫に由来するタンパク膜が完成した虫卵から虫卵液を調製し、模擬検体(虫卵接種検体)の調製を行った。また予備試験を繰り返して、超音波処理の最適時間および洗浄容器のリンス回数を設定し、寄生虫卵の検出方法としての超音波法を構築した。その上で本試験を実施し、従来法およびストマッカー法で得た成績と相互に比較した。なお超音波法では、従来法と同様、1回の検体処理量に100g以上の試料を用いることが可能であるが、ストマッカー法との比較にあたり、白菜重量は50g、洗浄液量は250mlとして本試験を実施し、沈殿法により回収虫卵数を求めた。また接種する回虫卵は1,000個および200個の2条件を選択し、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検定で分散を見極め、t検定で有意差を調べた。

C. 研究結果

予備試験の結果から，超音波処理時間は5分，洗浄容器のリンス回数は2回とした．また回収虫卵数に関しては，以下の結果を得た．

(1) 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．その他のデータ間には，有意差を認めなかった(表2)．

(2) 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(表3)．

表2. 超音波法と従来法，ストマッカー法による虫卵回収数(接種虫卵数1000個/50g)

試験法	回収虫卵数(個)					平均±SD	t検定: P(T<=t) 両側	
	1031	1032	1263	1210	1112		超音波法	従来法
超音波法	1031	1032	1263	1210	1112	1129.6 ± 104.7	-	-
従来法	854	469	1074	777	1132	861.2 ± 264.4	0.07	-
ストマッカー法	1505	1813	1670	1640	800	1485.6 ± 398.6	0.11	0.02*

表3. 超音波法と従来法，ストマッカー法による虫卵回収数(接種虫卵数200個/50g)

試験法	回収虫卵数(個)					平均±SD	t検定: P(T<=t) 両側	
	160	110	131	143	121		超音波法	従来法
超音波法	160	110	131	143	121	133.0 ± 19.4	-	-
従来法	122	151	185	107	102	133.4 ± 34.6	0.983	-
ストマッカー法	71	187	181	156	178	154.6 ± 48.2	0.380	0.447

D. 考察

検体からの寄生虫卵検出については，野菜表面をブラシでこする従来法が定着している．しかし多量の検体を効率的に処理する方法の開発が必要となり，昨年度はストマッカー使用の是非を検討した．その結果，ストマッカーの使用により，検体からの虫卵分離に要する時間が短縮され，また回収虫卵数は従来法よりも有意に多くなることが明らかとなった．しかしストマッカー処理の過程で，検体である野菜由来の微細な破片が多数発生し，これが虫卵計数用の試料に混入して，顕微鏡下の虫卵計数作業に障害を与え，顕微鏡観察に予想外の長時間が必要となることが判明した．そこで微細な破片を発生させない効率的な虫卵回収の方法として，新たに超音波法を検討することになった．

超音波法に関する予備試験の結果，5分間の超音波処理で虫卵回収数は最大となること

が分かった．また洗浄容器のリンスは2回とした．この条件で本試験を実施し，超音波法，従来法およびストマッカー法による試験結果を相互に比較した．その結果，超音波法は他の試験法との間に，回収虫卵数で有意な差を認めなかった．

虫卵回収数に有意な差がない場合，検査の過程における作業をいくつか選び，その優劣に応じてスコアを与え，スコア合計に基づいて各試験法の優劣を総合的に判断する手法が採用される．このような定量分析の手法を，本検討にも適用した．すなわち，回収虫卵数のほか，1回の検査に使用可能な検体重量(検体重量)，各試験法に必要な処理時間(処理時間)，虫卵計数のための顕微鏡観察時間(観察時間)の計4項目を選定し，各項目についてスコアを与えて，各試験法のスコア合計を求めた(表4)．その結果，スコアの合計は超音波法，ストマッカー法，従来法の順とな

った。すなわち，超音波法は多数の検体から最も効率的に寄生虫卵を分離できる方法であることが分かった。超音波法は従来法に代替する非動物性食品（野菜）からの寄生虫卵検査法として，推奨されるべき方法と考えられ，

今後予定している非動物性食品の寄生虫卵汚染の実態調査では，本法も活用して多数の検体を処理し，我が国で流行が続く土壌媒介寄生蠕虫症の感染源を明らかにしたいと考えている。

表4 超音波法と従来法，ストマッカー法のスコアによる定量分析

検査法	回収虫卵数	検体重量	処理時間	観察時間	スコア合計
超音波法	2	3	2	3	10
従来法	1	3	1	2	7
ストマッカー法	3	1	3	1	8

各項目について以下の基準により1~3までのスコアを与え，その合計を算出した。

- 回収虫卵数：数値の最も高いものを3，最も低いものを1，中間のものを2とした。
- 検体重量：処理可能な検体重量の最も多いものを3とし，最も低いものを1とした。
- 処理時間：顕微鏡観察前までの作業時間が最も短いものを3とし，以下同上。
- 観察時間：顕微鏡観察の時間が最も短いものを3とし，以下同上。
- なお同位のものには（例：検体重量），同じスコアを与えた。

E. 結論

超音波を利用した非動物性食品からの寄生虫卵検出法を構築し，従来法およびストマッカー法で得られた結果と比較した。その結果，超音波法は他の試験法との間に，回収虫卵数で有意差を認めなかった。さらにスコア定量分析を行ったところ，超音波法が最も高いスコアを得たことから，試験法として推奨されるべきものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表および学会発表共になし。

試験目的

本試験は、回虫卵検査法として超音波利用の是非について判断することを目的に実施した。まず、超音波法による試験条件設定のための検討を行い、次いで、設定した条件による超音波法と、従来法およびストマッカー法の3種類の方法により回収虫卵数を求めて比較した。

試験方法

1. 試験項目

回虫卵検査法としての超音波利用の是非について判断するための試験

2. 被験物質

名称 : ブタ回虫
受領日 : 2013年11月26日(受付番号 AA13-13-05803 で受領)
提供者 : 国立感染症研究所 寄生動物部

3. 試薬

消泡剤添加 0.5% Tween80・クエン酸緩衝液(洗浄液): 自家製
0.1M クエン酸溶液 614.5mL : 自家製
0.2M リン酸二ナトリウム溶液 385.5mL : 自家製
Tween80 5g : 関東化学
Antifoam A 150 μ L : SIGMA
酢酸エチル : 和光純薬
Sigmacote® : SIGMA

4. 使用器具

4.1. 回虫卵懸濁液作製用器具

眼科剪刀
ピンセット
5mL ポリスチレンラウンドチューブ
マイクロピペット(チップ: 200 μ L , 1,000 μ L)
ボルテックスミキサー(VTM-252): 和光純薬
: Sigmacote でコーティング

4.2. 各試験法で使用した器具

4.2.1. 共通器具

茶漉し(6cm , メッシュ#40)
メッシュ(10cm , 目開き 180 μ m , 線径 125 μ m)
円錐型液量計(500mL , 1,000mL)
遠沈管(15mL , 50mL)
スポイト

スライドガラス
カバーガラス
アスピレーター
遠心分離機 (5930): クボタ
顕微鏡 (BX51): オリンパス

4.2.2. 超音波法

超音波洗浄水槽：ダルトン（発振器：東京超音波技研製，型番 UP-305，出力 700W，周波数 27kHz）

洗浄容器：広口ねじ口瓶 1000mL：デュラン

4.2.3. 従来法

洗浄容器：ステンレス製バット

洗浄器具：歯ブラシ

4.2.4. ストマッカー法

洗浄機器：ストマッカー（Pro・media SH- M）：エルメックス

洗浄容器：ストマッカー袋（細菌検査用ポリ袋 400mL）：オルガノ

5. 回虫卵接種野菜（検体）の調製

虫卵を接種する野菜として白菜を選定し，下記の操作により検体を調製した．

5.1. 回虫卵を，ブタ回虫のメス成虫の膈と子宮より採取し，はさみで細切したのち，精製水に懸濁した．得られた回虫卵懸濁液の 10 μ L または 20 μ L をスライドガラス上に取り，カバーガラスを掛けて顕微鏡下に虫卵数を計数し，その数を基に検体の調製に必要な虫卵の懸濁液量を求めた．

5.2. 白菜はざく切りにして全体を混ぜ合わせ，所定の重量を秤量してトレイに重ならないように広げ，所定の虫卵数となるよう回虫卵懸濁液を滴下して室温で自然乾燥させた．乾燥させた検体はトレイごと密閉して，試験当日まで冷蔵保管した．

6. 超音波法の試験条件設定

6.1. 超音波処理時間の検討

超音波洗浄装置を用いて検体から回虫卵を回収するために至適な超音波処理時間について，検討を行った．

検体 100g（回虫卵 1000 個接種）と洗浄液 500mL を洗浄容器に入れた．

約 10 分間検体を洗浄液に浸したのち，超音波処理を行った．超音波処理時間として 0，1，3，5，7，10，15 分の 6 群を設定した．

超音波処理後，洗浄液の全量を液量計に移し，30 分間静置したのち，上清 400 mL をアスピレーターで吸引除去した．

3) で残った洗浄液（100mL）を 50mL 遠沈管に分注した．液量計の管壁を精製水 50mL で洗い，50mL 遠沈管に移した．管壁の洗いは 2 回行った．

これら 50 mL 遠沈管（計 4 本）を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した．

上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣を 15mL 遠沈管に移した。さらに精製水で 50mL 遠沈管の管壁を洗い、これを 15mL 遠沈管に加えた。

6) を 2000 回転で 5 分間遠心分離した。

上清を吸引除去した後、8 ml の洗浄液で沈渣を再浮遊し、これに酢酸エチルを 2mL ずつ加えて密栓し、1 分間激しく振とうした。

8) を 2000 回転で 5 分間遠心分離した。

沈渣を残して上清を吸引除去し、管壁に付着した浮遊層の残渣を綿棒でふき取った。

得られた沈渣（回収沈渣）を少量の洗浄液に再浮遊させ、顕微鏡下に全量を観察し、虫卵数を求めた。

6.2. 洗浄容器のリンス回数の検討

洗浄容器の壁面等に虫卵が付着して、回収虫卵数の低下を招く可能性があることから、洗浄容器のリンス回数について検討を行った。

検体（回虫卵 1000 個）100g と洗浄液 500mL を洗浄容器に入れた。

10 分間検体を洗浄液に浸したのち軽く攪拌し、5 分間超音波処理を行った。

洗浄液全量を液量計に移したのち、容器に新たに洗浄液 250mL を入れ、手で容器を回しながら検体をリンスした。リンスは合計 3 回実施し、各回の洗浄液は各々別の液量計に採取した。

3) の液量計を 30 分間静置したのち、洗浄液の上清をアスピレーターで吸引除去して 100 mL とし、2 本の 50mL 遠沈管に移した。液量計はそれぞれの管壁を精製水 50mL で 2 回洗って遠沈管に加えた。

4) を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。

上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣を 15ml 遠沈管に集め、さらに水で各 50mL 遠沈管に付着した沈渣を洗い、これも遠沈管に加えた。

遠沈管を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。

回収沈渣を少量の洗浄液に再浮遊させ、顕微鏡下に全量を観察し、虫卵数を求めた。

7. 超音波法と、従来法およびストマッカー法の比較

7.1. 回収虫卵数の比較

超音波法と、従来法およびストマッカー法により虫卵回収を試み、回収虫卵数を比較した。ストマッカー法と従来法の操作は、本研究所発行の試験検査成績書(2014 年 2 月 27 日発行、AA13-13-05803 号)記載の方法に準拠した。いずれの試験法においても、検体重量は 50g、接種虫卵数は 1000 個または 200 個、洗浄液量は 250mL とした。試験数は各々 5 回 (n=5) とした。得られた値は F 検定により分散を見極め、t-検定で有意差を調べた。

また、検体とした白菜に回虫卵の付着がないことを確認するため、無処理の白菜 50g を超音波法にて検査した。

7.2. 回収された沈渣の量と性状の比較

各試験法における回収沈渣の量と性状を比較するため、白菜 50g を超音波法および従来法、ストマッカー法でそれぞれ処理した。沈渣の重量は秤量し、性状を顕微鏡下に観察した。試

験数は各々2回 ($n=2$) とした .

試験結果

1. 超音波処理時間の検討

超音波処理の時間を0分から15分に設定し、虫卵の回収に最も有効な超音波処理時間について検討した。その結果、5分処理において最も回収虫卵数が多かったことから、本試験における超音波処理時間は5分間とした。なお、無処理群を除き、いずれの処理時間においても卵殻が破損された回虫卵がごく少数認められた。

表1 超音波処理時間と回収虫卵数

処理時間 (分)	回収虫卵数 (破損数)
0	336 (0)
1	70 (2)
3	654 (4)
5	935 (5)
7	206 (9)
10	97 (3)
15	256 (2)

2. 洗浄容器のリンス回数の検討

虫卵の回収に有効な洗浄容器のリンス回数について検討を行った。その結果、2回のリンスで虫卵総数の96%が回収できたことから、リンスの回数は2回とした(表2)。

表2 洗浄容器のリンス回数と回収虫卵数

リンス回数 (回目)	回収虫卵数 (個)	累積回収数 (個)	累積回収率 (%)
0	192	192	26
1	436	628	86
2	72	700	96
3	28	728	100

3.3 種類の試験法による回収虫卵数の比較

3.1. 接種虫卵数 1000 個での検討

1. および 2. により設定した条件で超音波法を実施し、回収虫卵数を従来法およびストマッカー法によるものと比較した。その結果、回収虫卵数はストマッカー法が最も多かった(表3)。超音波法と従来法、超音波法とストマッカー法による回収虫卵数の有意差検定を行ったところ、 $P(T \leq t)$ の両側は各々0.07, 0.11 が得られて0.05以上となり、有意水準5%で有意差は認められなかった。一方、従来法とストマッカー法については、 $P(T \leq t)$ の両側が0.02で0.05以下となり、有意水準5%で有意差が認められた。なお無処理の白菜からは、虫卵は検出されなかった。

表3 3種の回収法による回収虫卵数

試験法	回収虫卵数 (個)						t 検定: $P(T \leq t)$ 両側	
	平均 ± SD						超音波法	従来法
超音波法	1031	1032	1263	1210	1112	1130 ± 105	-	-
従来法	854	469	1074	777	1132	861 ± 264	0.07	-
ストマッカー法	1505	1813	1670	1640	800	1486 ± 399	0.11	0.02*

*: 有意水準5%で有意差あり

3.2. 接種虫卵数 200 個での検討

より少数(約200個)の回虫卵接種検体について、回収虫卵数を比較した。超音波法および従来法、ストマッカー法のいずれにおいても、有意水準5%での有意差は認められなかった(表4)。

表4 3種の回収法による回収虫卵数

試験法	回収虫卵数 (個)						t 検定: $P(T \leq t)$ 両側	
	平均 ± SD						超音波法	従来法
超音波法	160	110	131	143	121	133 ± 19	-	-
従来法	122	151	185	107	102	133 ± 35	0.98	-
ストマッカー法	71	187	181	156	178	155 ± 48	0.38	0.45
添加回虫卵数	181	241	181	213	135	190 ± 40		

4. 各試験法により回収された沈渣の量と性状の比較

各試験法により回収された沈渣の量と性状を比較した(表5)。従来法ではメッシュを使用しないため粒子状の沈渣の混入を認めたが、その量は検体ごとにばらつきがあった。ストマッカー法では沈渣の重量は従来法の2分の1以下であったが、メッシュを通過する微細な沈渣が多く、その結果として肉眼的に認める沈渣の容量は最大となった(図1および2)。超音波法では沈渣量が最少となった。

各試験法により回収され沈渣を顕微鏡下に観察したところ、超音波法と従来法では沈渣に夾雑物が少ないのに対し、ストマッカー法では夾雑物が多数認められた(図3)。

表5 3種の回収虫卵方法による検体沈渣量の比較

試験数	超音波法	従来法	ストマッカー法
1	0.02	0.18	0.04
2	0.01	0.07	0.06
平均	0.01	0.13	0.05

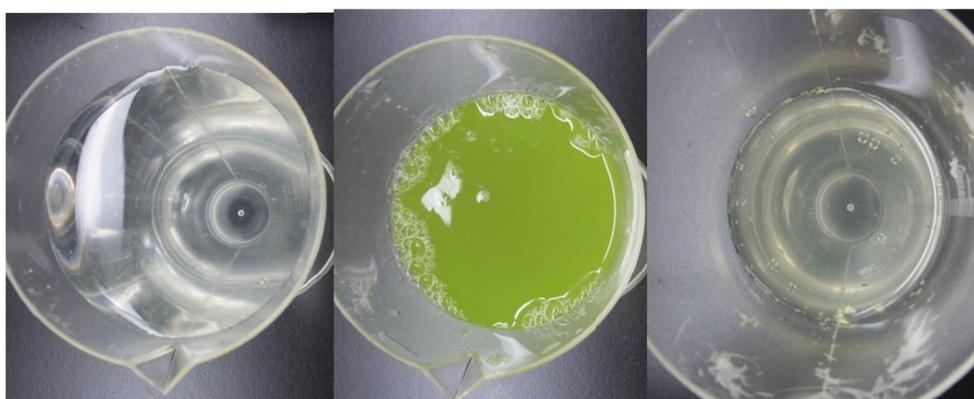


図1 3方法の回収洗浄液の性状(肉眼所見1)
(左, 超音波法; 中, ストマッカー法; 右, 従来法)

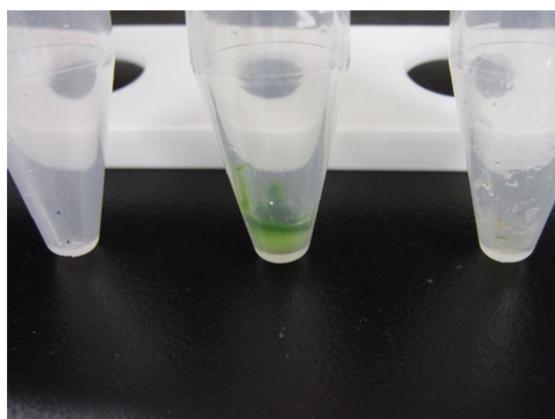


図2 3方法の検体沈渣の性状(肉眼所見2)
(左, 超音波法; 中, ストマッカー法; 右, 従来法)

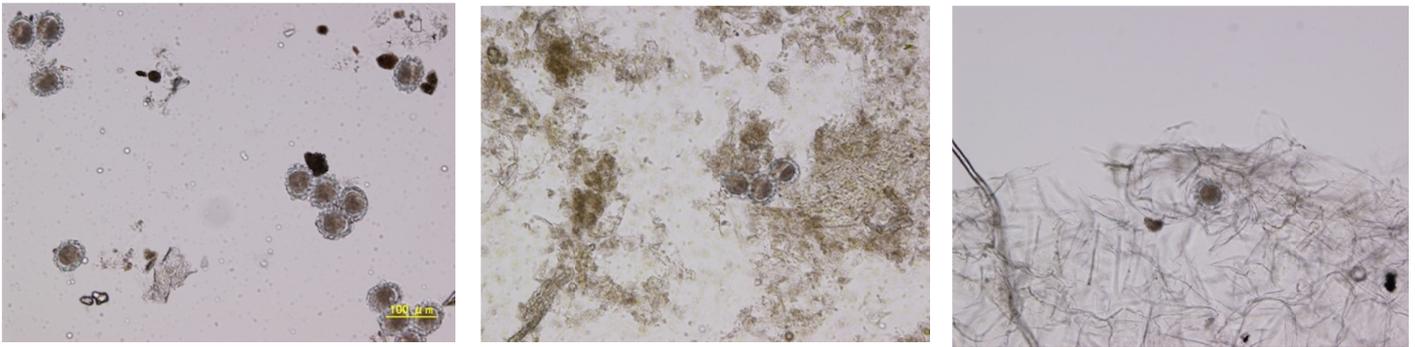


図3 3方法の検体沈渣の性状(顕微鏡所見) (×100)
(左, 超音波法; 中, ストマッカー法; 右, 従来法)

まとめ

回虫卵検査法として超音波利用の是非について判断するため、試験条件について虫卵回収数を指標に検討を行った。その結果、今回用いた機種では、5分間の超音波処理の後、洗浄容器を2回リンスすることにした。その上で超音波法による本試験を実施し、同時に実施した従来法およびストマッカー法による試験結果と相互に比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意な差を認めなかった（接種回虫卵数が1,000個及び200個の場合共に）。なお接種回虫卵数を1,000個とした場合に、ストマッカー法による回収虫卵数が、従来法のそれより有意に高いとの結果を得た。

試験検査区分責任者： 小高 秀正 印

平成 26 年度厚生労働省科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究

分担研究報告書

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

研究分担者	廣井豊子	国立大学法人帯広畜産大学	畜産衛生学研究部門	食品衛生学分野
協力研究者	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学	畜産衛生学研究部門	食品衛生学分野
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	
協力研究者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	
協力研究者	倉園 久生	国立大学法人帯広畜産大学	畜産衛生学研究部門	食品衛生学分野

研究要旨

国内に流通する容器包装詰低酸性食品については、平成 20 年 6 月 17 日付食安基発第 0617003 号及び食安監発第 0617003 号において、ボツリヌス対策に係る指導通知が出されている。しかしながら、平成 22 年のボツリヌス食中毒対策状況に関するフォローアップ調査で、指導内容を逸脱する製品の流通がみられた。この結果をうけ、昨年度の本分担研究では、通年で流通する「たくあん」製品を対象に、低温流通・保存の製品表示の有無、衛生指標菌検出状況および理化学性状 (pH、酸化還元電位) に関する調査を行ない、低温流通・保存が表示されず流通する 9 製品中 2 製品で pH が 4.6 を超えており、指導内容を逸脱している状態であることを確認した。本年度は、昨年度の検討で指導内容を逸脱していた製品を検体として用い、保存実験を行なった。使用した検体の pH は、昨年同様依然、指導内容を逸脱している状態で改善は見られていなかった。ボツリヌス菌芽胞液未接種群での 4℃ および 30℃ での保存試験では、保存期間にともない、pH、酸化還元電位の上昇傾向が見られた。ボツリヌス菌芽胞液添加群での保存試験では、保存初期 15 日目で菌数の減少がみられたが、その後は維持あるいは微細な上昇傾向も見られ、さらに継続して、長期的な保存試験の必要性があると思われた。また、クロストリジア属菌の発育を許容する酸化還元電位幅に関する知見を得るため、電気培養装置を用いた検討を行なったところ、約-200~+200mV の範囲で発育が認められた。当該範囲は大気中における多くの食品が含まれることから、酸化還元電位をボツリヌス菌の発育阻止する理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

A. 研究目的

市場に流通する食品は、原材料や産地の多様化に加え、その容器包装形態にも近年、多様化の傾向がみられる。その中で、容器包装に密閉した常温流通食品は、その利便性から様々な原材

料に適用され、これに包含される食品としては、120℃ 4 分間以上または同等の加熱加圧殺菌がなされている「レトルトパウチ食品 (容器包装詰加圧加熱殺菌食品) のほか、pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超えるものであって

120℃ 4 分間に満たない条件で殺菌を行う、いわゆる「容器包装詰低酸性食品」等が含まれる。レトルトパウチ食品に比べ、容器包装詰低酸性食品では、常温保存/放置により、ボツリヌス菌等のヒト健康危害の高い病原微生物の食品内増殖を招く恐れがあることが報告されており、実際に平成 11 年には千葉県内では家庭内で誤って常温保存された要冷蔵容器包装詰食品の喫食により、ボツリヌス食中毒が発生している。こうした事態を踏まえ、厚生労働省では、平成 14-16 年度厚生労働科学研究「容器包装詰低酸性食品ボツリヌス食中毒に対するリスク評価」を通じて、関連食品における汚染実態や食品内挙動、および海外のボツリヌス食中毒に関する情報収集を行なって来た。その後開催された、厚生労働省 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会（平成 19 年 6 月 26 日開催）では、上記研究課題の成果並びにコーデックス委員会をはじめとした海外諸国の対応状況を鑑み、国内に流通する当該食品の原材料の処理および製造における管理措置として、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とし、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こと、②冷蔵（10℃ 以下）保存、③適切な常温流通期間の設定を行なうよう、通知が出された（平成 20 年 6 月 17 日付、食安基発第 0617003 号、食安監発第 0617003 号）。

その後、平成 24 年 7 月 27 日に開催された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会では、平成 22 年 7～8 月に食品等事業者団体（45

団体）を通じて、ボツリヌス食中毒対策状況についてフォローアップ 調査を行なった結果が開示された。平成 22 年の通知時点または調査時点では、計 59 品目の食品が容器包装詰低酸性食品に該当するとの報告がなされ、このうち、①120℃ で 4 分間または同等以上の条件で加熱殺菌を行なっていた食品は 12 品目、②10℃ 以下の冷蔵条件で流通されていた食品が 6 品目、③pH を 4.6 以下に調整していた食品が 1 品目、④水分活性を 0.94 以下としていた食品が 5 品目、⑤ボツリヌス菌もしくは代換となる指標菌の接種試験を行なっていた食品が 21 品目、⑥対策の改善が必要だと考えられていた食品が 14 品目であった（うち、2 品目は部会開催時において既に 120℃ で 4 分間と同等以上の殺菌を実施するよう改善が図られたほか、5 品目は販売中止となっていた。）以後、十分な対応が取られていない可能性がある食品等事業者が含まれる団体については、厚生労働省担当者による危害性の個別周知を図っているが、その後の流通状況を踏まえた調査は行っていない。前回の調査より 3 年間が経過していることから、現在における対応状況を把握することが求められている。本分担研究では、こうした背景から、平成 25 年度にインターネットを通じて購入可能な容器包装詰低酸性食品の情報を収集するとともに、厚生労働省による指導内容の対応状況について検証を行なった。その結果、容器包装詰低酸性食品として国内に流通する食品のうち、「たくあん」製品が一年を通じて流通している現状を把握するとともに、厚生労働省による指導内容を逸脱した製造基準を経て、製造・流通される製品が存在する事を明らかにした。さらに一部の製品では、ボツリヌス菌の短

期保存が確認された。この結果をふまえ、平成26年度には、ボツリヌス菌芽胞液の添加保存実験を3つの異なる温度帯で長期的に行なうとともに、ボツリヌス菌の増殖を許容する酸化還元電位の幅の調査を行なった。

B. 材料と方法

1. 保存試験（ボツリヌス菌添加回収試験）

1. 供試検体（食品）

平成25年度の本分担研究の検討結果で、容器包装詰食品で常温流通にもかかわらず、理化学性状が厚生労働省 指導内容(平成20年6月17日付食安基発第0617003号および食安監発第0617003号)で定める基準を逸脱していた(pH4.6超)「たくあん」製品1種を本年度の検体とし、大手インターネットサイト(楽天市場 www.rakuten.co.jp およびアマゾン www.amazon.co.jp)を通じて購入した。

2. 供試菌株

平成25年度と同様に、ボツリヌスA型菌として、62A, 33A, 36A, CB21, Renkon1の5菌種を、ボツリヌスB型菌として Okra, NH-2, 67B, 326-5, 407-1の5菌種を用いた。

3. 試薬および培地等

1) クックドミート培地

ブドウ糖 0.6g、可溶性デンプン 0.4gを精製水200mLに加熱溶解させた。クックドミート培地(Difco)1gと、上記のブドウ糖可溶性デンプン水溶液10mLをスクリー栓付き試験管(18mm x 180mm)に分注後、121°C 15分間オートクレーブした。オートクレーブ後は、冷水にて急冷させた。

2) 芽胞調整用培地

トリプチケースペプトン (BD バイオサイエンス) 50g、ペプトン (BD バイオサイエンス) 5g およびメルカプト酢酸ナトリウム (関東化学) 1gを精製水1,000mLに溶解、pHを7.0に調整後、121°C 15分間オートクレーブした。

3) ペプトン加生理食塩水

ペプトン (BD バイオサイエンス) 1g および塩化ナトリウム 8.5gを精製水1,000mLに溶解、pHを7.0に調整後、121°C 15分間オートクレーブした。

4) クロストリジア培地

クロストリジア培地(日水)46.9gを精製水1,000mLに溶解後、121°C 15分間オートクレーブし、使用直前まで加温保存した。

5) 標準寒天培地

標準寒天培地(日水)23.5gを精製水1,000mLに溶解後、121°C 15分間オートクレーブし、使用直前まで加温保存した。

6) pHメーター

堀場製 LAQUA F21を用い、pH測定用電極として#9680を、酸化還元電位測定用電極として#9300-10Dを使用した。

4. 方法

1) 芽胞液の調製

各供試菌株をクックドミート培地で一晚嫌気培養後、芽胞調整用培地10mLに接種し、30°Cで一晩培養した。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、ウイルツ芽胞染色キット(武藤化学(株))を用いて芽胞染色後、顕微鏡下で観察する事で確認した。作製した芽胞液は、試料保存容器に分注後、-80°Cに保存した。芽胞菌数は、凍結融解後、クロストリジア寒天培地を

用いて混釈培養し、黒色コロニー数を測定し算出した。

2) 保存試験

ボツリヌス菌芽胞液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、80°C 20 分間の加熱処理後、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように接種した。芽胞液接種時には、検体の容器包装の密閉性を保つため、封かん強度測定器用ゴムシール (サン科学) を使用した。芽胞液接種後の保存期間は 0 日、15 日、30 日、90 日、120 日、180 日、360 日とし、保存温度は、4 °C、25 °C、30 °C とした。(実験開始日を保存期間 0 日とする。現在、継続試験中である。) 本試験には、各保存期間、各保存温度につき 4 検体を供した。陰性対照として、芽胞液未接種の検体を芽胞菌接種検体と同様に保存試験に供した。ただし、陰性対照群の保存温度は 4 °C と 30 °C とした。

3) 理化学性状の測定

芽胞液未接種の検体を用い、経時的に食品内理化学性状の測定を行なった。検体の容器包装を外部から 70%エタノールで消毒後、使い捨て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た。pH 電極ならびに酸化還元電位用電極を検体内部に挿入し、pH および酸化還元電位を測定した。

4) 一般細菌数の測定

検体 100 g を無菌的に取り、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試料原液 (検体の 2 倍希釈液) とした。試料原液は、さらにペプトン加生理食塩水を加え 10 倍希釈液を作成し、その後さらに 10 倍段階希釈した。各試料液 1 mL を標準寒天培地に

混釈し、35°C で 48 時間培養を行ない、コロニーを計測し、検体 1 g あたりの菌数を求めた。混釈培地は各段階希釈液に対して 2 枚作製した。培養の陰性対照として、検体希釈に用いたペプトン加生理食塩水 1 mL を培地に混釈し、同様に操作、培養を行なった。

5) クロストリジア数の測定

一般細菌数測定時に作成した 10 倍段階希釈試料液を使用した。各試料液 1 mL をクロストリジア寒天培地に混釈し培地を重層後、35°C で 48 時間嫌気培養を行なった。生育した黒色コロニー数を計測し、検体 1 g あたりの菌数を求めた。混釈培地は各段階希釈液に対して 2 枚作製した。

II. 酸化還元電位幅に関する検討

1) 菌株および培地

Clostridium butylicum 2 株 (No.15, 8501) を発育試験に供した。いずれも、チオグリコール酸培地中で嫌気下で培養した。

2) 電気培養装置を用いた発育試験

電気培養装置を用いた上述菌株の発育試験を行なうため、作用極槽に 2mM メチルピオロゲン (MV) 添加チオグリコール酸培地 250ml を加え、対極槽には MV を含まない同培地を加えた。窒素通気後、定電位電解を行い、設定電位で安定後、定常期の *C. butylicum* (上述) 約 5×10^6 cfu を接種し、一定時間ごとに濁度を測定した。なお、上記培養は、-0.6V ~ +0.6V の電位設定で通電を行い、上記細菌により還元された MV を電氣的に酸化しながら培養を行なった。

C. 研究結果

I. 保存試験（ボツリヌス菌添加回収試験）

1) 芽胞液未接種群での理化学性状の経時的変化（表 1）

保存試験開始時における芽胞液未接種群 4 検体の pH は 5.15 ± 0.11 であった。保存期間 15 日目で pH は 5.5 前後に上昇し 30 日目まで維持された。15 日目、30 日目いずれにおいても、保存温度（4℃と 30℃）の間には、有為な差は見られなかった。保存試験開始時点の 4 検体の酸化還元電位は 32.02 ± 3.56 mV で、保存した期間が長くなるに従い酸化還元電位は上昇傾向にあった。15 日目、30 日目いずれにおいても、保存温度（4℃と 30℃）の間には、有為な差は見られなかった。

2) 芽胞液未接種群での一般細菌およびクロストリジア属菌の検出状況（表 1）

保存試験開始時点の芽胞液未接種群 4 検体の一般細菌数は、 246 ± 136 cfu/g で、クロストリジア属菌は検出されなかった。検体間にばらつきがみられるものの、保存した期間が長くなるに連れて一般細菌数は上昇傾向にあった。一般細菌数が大きく上昇した検体においても、検体の容器包装の密閉状態は保たれており、ガス産生等外見上の大きな変化はみられなかった。

3) 芽胞液接種群での一般細菌およびクロストリジア属菌の検出状況（表 2）

A 型菌および B 型菌芽胞液接種量は、検体 1 g あたりそれぞれ 418 ± 213 cfu、 $1,093 \pm 329$ cfu であった。4℃に保存した検体でのクロストリジア属菌数は、A 型 B 型いずれの菌型接種群においても、保存期間が長くなるにつれ菌量が減少傾向にあった。25℃に保存した検体では、15 日

目では A 型 B 型いずれの菌型接種群においても菌量は減少傾向にあった。30 日目では、A 型菌芽胞接種群で 15 日目と同等レベルに維持或は軽微ながらも増加傾向、B 型菌芽胞接種群では継続して減少傾向にあった。30℃に保存した検体では、25℃同様、15 日目では A 型 B 型いずれの菌型芽胞接種群においても菌量は減少傾向にあった。30 日目では、A 型菌芽胞接種群では継続して減少傾向にあり、B 型菌芽胞接種群で 15 日目と同等レベルに維持或は軽微ながらも増加傾向にあった。

保存試験開始時点の一般細菌数は、A 型菌芽胞接種群、B 型菌芽胞接種群でそれぞれ 406 ± 213 cfu/g、 396 ± 374 cfu/g で、芽胞未接種群（表 1）と同等であった。保存温度により程度の差はあるものの、A 型菌芽胞接種群、B 型菌芽胞接種群いずれにおいても、保存した期間が長くなるに連れて一般細菌数は上昇傾向にあった。

II. 酸化還元電位の検討

本研究では、電気培養装置を用いて酸化還元電位の安定化をはかり、*C. butylicum* の発育試験を行なった。結果として、供試菌株は、 -200 mV ～ $+200$ mV の範囲において良好な発育を認めた（図 1）。

D. 考察

I. 保存試験

平成 25 年度の本分担任研究の検討から、常温保存・流通の容器包装詰製品の中に、厚生労働省により当該製品に対して指導通知されている理化学性状（pH < 4.6）を逸脱している製品が含まれていることが明らかになり、その逸脱していた製品を今年度の検体として入手した。製

品のロットは昨年度の検討に用いたものと異なるが、昨年同様、理化学性状 (pH < 4.6) は依然、逸脱している状態で改善は見られなかった。ボツリヌス菌未接種群の保存試験では、保存期間が長くなるに連れて、pH、酸化還元電位の上昇傾向がみられ、容器包装未開封の製品であっても、その理化学性状が安定でない事が示された。未開封の芽胞菌未接種群における一般細菌数は、保存期間が長くなるに連れて増加傾向にあり、この一般細菌数増加は理化学性状の変化に関連している可能性が考えられる。また本製品では、たくあん(大根)本体だけでなく、製品製造時に使用したと考えられる漬け込み液もたくあんと共に容器包装詰されている。検体の包装後加熱処理の有無は表示されておらず不明であり、加熱処理の有無とその条件、漬け込み液の成分と量なども、保存期間中の理化学性状の変化、一般細菌数の変化に影響している可能性が考えられる。

芽胞接種群の保存試験では、A型菌、B型菌いずれの菌型においても、保存短期間(15日)では菌数の減少がみられたが、その後の検体中の菌数は、温度や菌型によって異なるものの、15日目時点の菌数を維持或は軽微な上昇傾向がみられるものもあり、さらに継続した検討が必要と考えられた。また、先にも述べたが、検体の包装後加熱処理の有無は衛生的観点からも重要であるが、さらに、芽胞形成菌にとっては発芽刺激になりうる事から、留意すべき点であると考えられる。本試験では、80℃20分間の加熱処理後の芽胞液を用いて行なっているが、栄養体接種での食品内挙動も精査したい。

II. 酸化還元電位の検討

本研究では、広い酸化還元電位幅において、ク

ロストリジウム属菌(*C. butylicum*)の発育を許容するとの知見を得た。この電位幅は、大気中における食品の多くが含まれると想定されることから、食品中におけるボツリヌス菌の増殖を制御するための理化学指標として、酸化還元電位を用いる意義は必ずしも大きいとはいえないといえよう。現行の指導内容に含まれる理化学性状は、pHと水分活性があるが、容器包装詰低酸性食品においては、酸素濃度あるいは酸価といった理化学性状もボツリヌス菌の発芽・発育に関わる影響因子であることから、次年度に向けた課題として検討を視野に入れていきたい。

食品内での菌増殖に伴い、本菌がヒト健康危害の高いボツリヌス神経毒素を産生する事も懸念される。ボツリヌス毒素の定量試験は未だマウスアッセイにより行なわれているが、近年では、PCR-ELISA、イムノクロマト、FRET等の手法を用いた検出キットの開発も海外では進められている。来年度にはこうしたアッセイ系の有効性評価についても検討を行なうとともに、同毒素定量を通じて、食品内のボツリヌス菌による危害性の動態を精査すべきと考える。

E. 結論

本研究では、厚生労働省による指導内容を逸脱した容器包装詰低酸性食品を用い、ボツリヌス菌添加保存試験を行い、菌量の一部保持されていることが確認され、更に長期の保存試験が必要と考えられた。また、酸化還元電位を容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策の理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

・ Momose Y, Asakura H, Kitamura M, Okada Y, Ueda Y, Hanabara Y, Sakamoto T, Matsumura T, Iwaki M, Kato H, Shibayama K, Igimi S. Food-borne botulism in Japan in March 2012. Int J Infect Dis. 2014 Jul;24:20-2.

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

なし

表 1 芽胞液未接種群での理化学性状とクロストリジア属菌数および一般細菌数

菌型	保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	pH		酸化還元電位		一般細菌数		クロストリジア属菌数			
				pH	mean ± SD	mV	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD		
None	0		9	5.18	5.15 ± 0.11	35.2	32.0 ± 7.0	96	246 ± 136	<2	< 2		
			10	5.00		39.4		214		<2			
			11	5.24		30.5		248		<2			
			12	5.20		23.0		425		<2			
	15	4		37	5.66	5.53 ± 0.12	54.6	47.6 ± 17.8	457	389 ± 118	<2	< 2	
				38	5.38		58.1		415		<2		
				39	5.50		56.5		215		<2		
				40	5.59		21.0		467		<2		
		30			41	5.48	5.51 ± 0.15	51.3	53.1 ± 25.8	31,500	53,181 ± 73,290	<2	< 2
					42	5.74		89.7		162,000		<2	
					43	5.39		40.0		11,400		<2	
					44	5.45		31.2		7,825		<2	
	30	4		69	5.48	5.43 ± 0.12	79.6	69.6 ± 9.8	8,805	2,756 ± 4,036	<2	< 2	
				70	5.27		75.1		510		<2		
				71	5.55		65.9		920		<2		
				72	5.42		57.6		790		<2		
		30			73	5.37	5.42 ± 0.07	62.6	57.4 ± 11.1	3,550	9,258 ± 4,820	<2	< 2
					74	5.44		67.6		7,080		<2	
					75	5.36		41.9		14,000		<2	
					76	5.52		57.6		12,400		<2	

表 2 芽胞液接種群でのクロストリジア属菌数および一般細菌数

菌型	保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	一般細菌数		クロストリジア属菌数		菌型	保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	一般細菌数		クロストリジア属菌数				
				cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD					cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD			
A	0		1	211	406 ± 213	406	418 ± 213	B	0		5	236	1,413	396 ± 374	1,413	1,093 ± 329		
			2	353		665					876							
			3	350		146					750							
			4	710		453					1,333							
	4	13	192	13	192	72	213 ± 102		4	25	359	25	359	842	235 ± 83	842	686 ± 140	
				14	311	207						711						
				15	215	300						689						
				16	182	273						503						
		25	1,290	3,260	17	1,290	171		220 ± 119	15	25	1,295	29	1,295	480	1,611 ± 1,137	480	588 ± 328
					18	3,260	75						270					
					19	1,238	315						555					
					20	850	320						1,045					
	30	563	910	21	563	360	290 ± 95		30	33	563	33	563	630	1,603 ± 1,914	630	509 ± 236	
				22	910	185						610						
				23	480	380						640						
				24	924	235						155						
	30	4	795	45	795	184	1,015 ± 726		4	57	3,750	57	3,750	264	1,937 ± 2,019	264	239 ± 99	
				46	891	102						232						
				47	332	28						110						
				48	2,040	234						348						
		25	1,000	885	49	1,000	354		861 ± 109	30	25	15,100	61	15,100	432	13,858 ± 9,558	432	322 ± 175
					50	885	230						290					
					51	814	106						87					
					52	745	440						477					
30		18,300	17,300	53	18,300	60	28,150 ± 15,882	30	65	40,500	65	40,500	356	12,171 ± 19,115	356	612 ± 351		
				54	17,300	118					330							
				55	51,300	72					1,080							
				56	25,700	102					682							

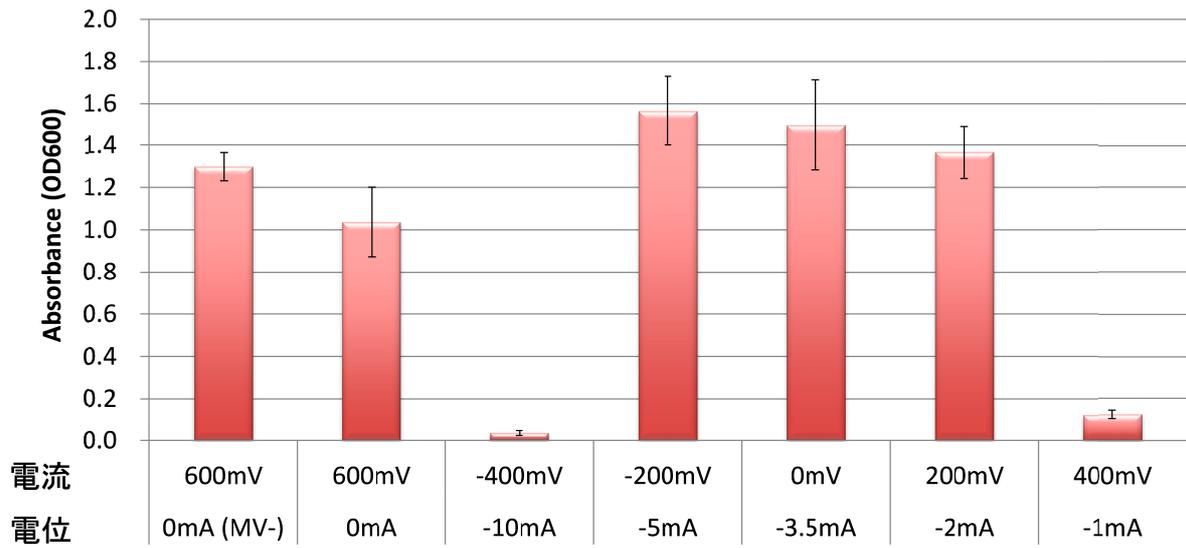


図 1. *C. butylicum* の発育を許容する酸化還元電位幅に関する検討

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究」

分担研究報告書

欧州連合（EU）における非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と動向

研究分担者 窪田邦宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室長
研究分担者 春日文字 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部部长
研究協力者 天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨：食中毒を起こす病原微生物には腸管出血性大腸菌、ボツリヌス菌、リステリア、サルモネラ等、命に関わる重篤な症状を呈するものが数多くある。これらの病原微生物の食品汚染実態調査や各種規制をはじめとする対策は主に動物性食品を対象として進められてきたが、非動物性食品においてもこれらの病原微生物による被害が数多く報告されている。非動物性食品を原因食品とする病原微生物アウトブレイクや非動物性食品の汚染の実態についてはこれまで詳細な解析が十分には行われていない。本研究ではこれらへの対策を含めた関連の事項について国内外の情報を収集、解析し、これにより非動物性食品の喫食におけるリスクの把握と安全対策の検討に資することを目的とした。

本年度は欧州連合（EU）における非動物性食品（果物・野菜等）に関する微生物規格基準の実態と今後の動向を把握するため、欧州食品安全機関（EFSA: European Food Safety Authority）が 2014 年に発表した一連の報告書を中心に文献調査を行った。その結果、「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」を対象とした報告書（5 報）において、EFSA は以下の科学的見解を示していることを把握した。すなわち、1）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設定すべきである、2）カット済み果物・野菜等を対象とした大腸菌に関する現行の工程衛生規格基準は、サラダ用葉物野菜の加工工程における適正農業規範、適正衛生規範、適正製造規範、危害分析重要管理点方式（HACCP）の実施の評価の指標となる、3）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、4）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良い、5) 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、6) 同様に、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、である。

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・加工時の衛生管理状況が欧州とは異なるが、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。

A. 研究目的

食中毒を起こす病原微生物には腸管出血性大腸菌、ボツリヌス菌、リステリア、サルモネラ等、命に関わる重篤な症状を呈するものが数多くある。これらの病原微生物の食品汚染実態調査や各種規制をはじめとする対策は主に動物性食品を対象として進められてきたが、非動物性食品においてもこれらの病原微生物による被害が数多く報告されている。最近でも国内では2012年8月に札幌市で患者169人、死者8人が発生した、白菜の浅漬の喫食に起因する腸管出血性大腸菌O157感染アウトブレイクが、2012年3月には容器包装詰低酸性食品の「あずきぱっとう」の喫食によるボツリヌスアウトブレイクが発生している。2014年には静岡市の祭りの会場で販売された冷やしキュウリの喫食により患者500人、入院患者100人以上の大規模な大腸菌O157アウトブレイクも発生した。海外でも、米国では2011年にカンタロープメロンの喫食により、患者146人、死亡者30人、流産1人が発生する大規模リステリア症アウトブレイクが、同じく2011年にパパイヤの喫食に関連して106人が発症するサルモネラアウトブレイクが発生している。他に

も2009年にはスプラウトの喫食に起因し235人が発症したサルモネラアウトブレイクが、2008年には患者1,400人以上、死亡者2人が発生した唐辛子等の喫食によるサルモネラアウトブレイクがそれぞれ報告されている。特に規模が大きいものとしては2008~2009年に発生したピーナッツバターおよびピーナッツ含有製品の喫食に起因するサルモネラアウトブレイクがあげられ、このアウトブレイクでは全米およびカナダで700人以上が発症し、9人の死亡に関連しているとされた。この事例では多数の会社が原材料として当該汚染元企業から汚染の可能性のあるピーナッツ加工品を購入しており、それを使用して製造した製品が多岐にわたっていたことから、200社以上が17カテゴリー、2,100種類以上の製品を自主回収するという米国史上最大規模の回収となった。当該回収対象製品の一部は日本にも輸入されていた。

最近では食品流通範囲の拡大により、食品汚染による食中毒アウトブレイクが発生した場合にその被害が広範囲にわたることが多くなっている。さらに、食品原材料が海外で汚染され、その後輸入されるケースも増加しており、特に発芽野菜や生鮮果物・野菜等の加熱工程を経ずに喫食される

もの場合には、被害が遠く離れた他国で発生する可能性もある。また、汚染した食材を旅行者等が喫食し、帰国した後に発症することも考えられる。

2011年5～6月にはドイツを中心としてフェヌグリークスプラウトの喫食を原因とする腸管出血性大腸菌 O104 大規模アウトブレイクが発生し、4,000人近い患者と46人の死亡者が生じた。これを受け、欧州委員会（EC）は欧州食品安全機関（EFSA: European Food Safety Authority）に対し、欧州連合（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(文献1)を発表し、さらに2014年3～12月に、個々に異なる果物・野菜類を対象とした5報からなるパート2報告書(文献2～6)を発表した。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。これらの見解は我が国での果物・野菜類を対象とした微生物規格基準にも参考になると考え、本研究では、これら5報の EFSA パート2報告書に示された微生物規格基準に関する見解を取りまとめることを目的とした。

B. 研究方法

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。

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(文献2)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。他のパート2報告書も同様の構成となっている。

C. 研究結果

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

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良い。

「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。

D. 考察

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腸管出血性大腸菌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。

E. 結論

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。食品流通の世界的拡大に鑑み、EU を始めとする国際的な動向を注視していくことの必要性が示唆される。

また我が国においても非動物性食品の汚染実態の把握が食中毒対策のために重要であると考えられる。

文献：

- 1) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations)

EFSA Journal 2013;11(1):3025

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3025.pdf>

- 2) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella* and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads)

EFSA Journal 2014;12(3):3600

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3600.pdf>

- 3) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella* and Norovirus in berries)

EFSA Journal 2014;12(6):3706

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3706.pdf>

- 4) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella* and Norovirus in tomatoes)

EFSA Journal 2014;12(10):3832

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3832.pdf>

5) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella* in melons)
EFSA Journal 2014;12(10):3831
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3831.pdf>

6) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* and Norovirus in bulb and stem vegetables, and carrots)
EFSA Journal 2014;12(12):3937
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3937.pdf>

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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、大阪府堺市、2014年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(資料)

非動物性食品中の病原体がもたらすリスクに関する科学的意見(パート2: サラダとして生で喫食される葉物野菜におけるサルモネラおよびノロウイルス)【文献2】

欧州食品安全安全機関・生物学的ハザードに関する科学パネル

目次(仮訳)

- ・ 要旨
- ・ 概要
- ・ 目次
- ・ 欧州委員会(EC)から提示された背景
- ・ EC から提示された付託事項
- ・ 非動物性食品中の病原微生物によるリスクについての付託事項 3 ~ 5 の明確化
 - EC から提示された背景
 - EC から提示された付託事項

- ・ リスク評価：
 1. イントロダクション
 2. サラダ用葉物野菜の生産
 - 2.1. 葉物野菜の定義
 - 2.1.1. 種子と苗の生産
 - 2.2. レタス類の生産システムの説明
 - 2.2.1. 露地栽培
 - 2.2.2. ビニールハウス栽培
 - 2.2.3. その他の栽培方法
 - 2.2.4. 水源と灌漑システム
 - 2.2.5. 様々な種類の肥料(有機、厩肥、堆肥)
 - 2.2.6. 収穫
 - 2.2.7. 冷却
 - 2.3. EUにおける葉物野菜生産・流通の現状
 - 2.4. 米国とEUにおける生産システムと生産方法の比較
 3. 農業生産時における微生物汚染のリスク要因
 - 3.1. 環境要因

- 3.1.1. 葉物野菜への病原体の付着、生残、侵入に関連する因子
- 3.1.2. 農地および隣接地の状態
- 3.1.3. 天候条件
- 3.1.4. 保菌動物との接触
- 3.2. 有機物関連（厩肥、スラリー、堆肥、汚水処理、汚泥、下水）
- 3.3. 生産時の水使用
- 3.4. 設備
- 3.5. 作業員の健康、衛生、研修
- 3.6. 結論
- 4. 葉物野菜の加工工程の概要
- 5. 加工処理時における微生物汚染のリスク要因
 - 5.1. 環境要因
 - 5.2. 水源（洗浄水）
 - 5.3. 設備
 - 5.4. 作業員の健康、衛生、研修
 - 5.5. 結論
- 6. 葉物野菜の流通、小売、食品提供、および家庭内や流通過程での取扱いの概要
- 7. 葉物野菜の流通、小売、食品提供、および家庭内や流通過程での取扱いにおける微生物汚染のリスク要因
 - 7.1. 水源（洗浄水）
 - 7.2. 設備
 - 7.3. 作業員の健康、衛生
 - 7.4. 結論
- 8. 葉物野菜でのサルモネラ検出および定量化のための分析法
 - 8.1. 葉物野菜でのサルモネラ検出および定量化の方法の標準化
- 9. 葉物野菜のサルモネラ汚染率および汚染レベルのデータ
- 10. 葉物野菜でのノロウイルス検出および定量化のための分析法
 - 10.1. 葉物野菜でのノロウイルス検出および定量化の方法の標準化
- 11. 葉物野菜のノロウイルス汚染率のデータ
- 12. 葉物野菜中のサルモネラ、ノロウイルスがもたらすヒトに対するリスクの低減策
 - 12.1. 一般的なリスク低減策
 - 12.1.1. 環境
 - 12.1.2. 厩肥、下水、汚泥

- 12.1.3. 水
 - 12.1.3.1. 一次生産における水
 - 12.1.3.2. 加工工程における洗浄水
- 12.1.4. 設備
- 12.1.5. 作業員
- 12.1.6. 最終製品
- 12.1.7. 作業員の研修および教育
- 12.1.8. 消費者
- 12.2. サルモネラ汚染に特化したリスク低減策
- 12.3. ノロウイルス汚染に特化したリスク低減策
 - 12.3.1. 下水と汚泥
 - 12.3.2. 水
 - 12.3.3. 設備
 - 12.3.4. 作業員
 - 12.3.5. 最終製品
 - 12.3.6. 結論
- 13. 葉物野菜での指標細菌としての大腸菌
- 14. 葉物野菜の大腸菌汚染率のデータ
- 15. 葉物野菜についての微生物規格基準
 - 15.1. 葉物野菜の一次生産における食品安全の保証
 - 15.1.1. 葉物野菜の一次生産、加工および販売時における最重要の予防策
 - 15.2. 微生物規格基準についてのイントロダクション
 - 15.2.1. 葉物野菜の一次生産における衛生規格基準
 - 15.2.2. 葉物野菜についての加工衛生規格基準
 - 15.2.3. 葉物野菜についての食品安全規格基準
- 結論および推奨事項
- 引用文献
- 付属資料
- 用語解説

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Masuda K, Yamamoto S, <u>Kubota K</u> , Kurazono H, Makino S, <u>Kasuga F</u> , Igimi S, <u>Asakura H</u> .	Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture	J. Food Safety	35	印刷中	2015
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. <u>Momose Y</u> , <u>Asakura H</u> ,	わが国における土壌媒介寄生虫症, 特に回虫症の発生とその汚染源の文 献的および検査機関データに基づく 調査.	食品衛生研究	65	印刷中	2015