

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 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

平成 28 (2016) 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 28 (2016) 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・真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

21

衛生規範改正前後に市販流通する浅漬け製品の衛生実態に関する研究

朝倉 宏 他

33

漬物の衛生規範に関する実態調査 - 真菌調査 -

高鳥 浩介 他

43

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

51

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 他

73

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

米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

窪田 邦宏、春日 文子 他

97

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

121

平成 27 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

太田利子 相模女子大学

奥村香世 国立大学法人帯広畜産大学

賀川千里 国立感染症研究所

神吉政史 大阪府立公衆衛生研究所

倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学

小西良子 麻布大学

柴田勝優 国立感染症研究所

須田貴之 日本食品分析センター

高鳥浩介 NPO 法人カピ相談センター

高鳥美奈子 NPO 法人カピ相談センター

高橋淳子 桐生大学

橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所

田中詩乃 NPO 法人カピ相談センター

中村寛海 大阪市立環境科学研究所

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

村松芳多子 高崎健康福祉大学

森嶋康之 国立感染症研究所

山本詩織 国立医薬品食品衛生研究所

吉村昌徳 日本冷凍食品検査協会

(敬称略、五十音順)

平成27年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
総括研究報告書

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、初年度・昨年度と継続して実施してきた、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)汚染を示す製品の製造施設における改善指導内容を取り纏め、今後同様の事例が発生した際のマニュアルとしての活用案を作成した。また、衛生規範改正前後における市販浅漬け製品を対象として、衛生指標菌数及び構成菌叢に関する比較解析を行い、同改正後の供試製品における衛生状況が改善された実態を把握した。指標菌数に加え、構成菌叢の変動を明らかにすることで、製造工程の改善による製品への微生物学的影響を図ることができた。更に、浅漬けを含む漬物製品全般について、衛生規範における成分規格対象となっている真菌及び酵母を対象とした汚染実態調査を実施した。結果として、供試市販製品の約4割で酵母を認め、一部では漬物由来とは想定し難い酵母種も確認され、産膜酵母等の汚染源になりうると目された。真菌は、約3割の供試製品より検出され、日和見感染真菌として知られる *Exophiala* 等も検出された。近年の減塩嗜好を背景として、市販流通する漬物製品に関しては、今後も衛生管理実態の把握と改善指導が必要と思われる。また、真菌や酵母については、衛生規範の成分規格に合致しない製品も一定の割合で認められると共に、汚染による健康危害も想定されるため、漬物の衛生管理及び試験法等をはじめとして、衛生規範の部分的見直しも必要と思われる。

寄生虫に関する検討としては、回虫・鞭虫・鉤虫等の土壌媒介寄生虫感染事例に関する文献調査を行い、過去に比べ激減してはいるものの現在も継続的発生がみられる現状を把握した。野菜等における虫卵汚染は確実に継続しているが、国内の市販流通製品における汚染はほぼないと考えられた。また、北海道で発生の認められる、4類感染症のエキノコックスに着目し、生食されることもある「行者ニンニク」を対象に虫卵検査を行ったが、全て陰性の結果を示し、一般流通品における汚染危害は低いと考えられた。

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策に関しては、指導内容(pH)を逸脱していた「たくあん」におけるボツリヌス菌の長期挙動を検討し、増殖はしないが、芽胞として長期生残する実態を把握した。また、本菌は窒素源・炭素源の豊富な豆製品では速やかな発芽・増殖を認め、食品の炭素・窒素源に関する情報収集が本菌の食品内増殖性を予測する上で有効と目された。更に、動物愛護の観点から、代替法が求められている、ボツリヌス毒素試験法について、FRET法による定量検出を実施し、マウス毒性試験法との比較検討を行った。A型毒素は同等の感度・精度を示したが、B型毒素の検出感度は後者が優勢であり、継続した検討が必要と考えられた。

情報収集に関する項目では、米国にて2015年11月にUSFDAにより最終規則化された、「農産物の安全に関する最終規則」について関連資料を調査した。その結果、本規則では「農業用水の品質と検査」、「動物由来の生物学的土壌改良材」、「発芽野菜の生産」、「家畜や野生動物による汚染」、「健康と衛生の重要性についての研修」及び「農場の設備、道具、建物」に関する要件が重要項目として挙げられていることを把握し、それらの要点を和訳・集約した。同規則では、Farm-to-Folkの基本に沿った内容であり、加熱処理を経ない発芽野菜をはじめとする生鮮食品についても細かな基準が定められていた。我が国においても、加熱処理を経ずに喫食される食品に関しては、特に一次生産段階での汚染対策を含めた包括的対応が求められよう。

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)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
小西良子	麻布大学
柴田勝優	国立感染症研究所
須田貴之	日本食品分析センター
高鳥浩介	NPO 法人カビ相談センター
高鳥美奈子	NPO 法人カビ相談センター
高橋淳子	桐生大学
橘 理人	国立医薬品食品衛生研究所
田中詩乃	NPO 法人カビ相談センター
中村寛海	大阪市立環境科学研究所
堀内朗子	日本食品衛生協会食品衛生研究所
牧野壮一	京都聖母女学院短期大学
榊田和彌	国立医薬品食品衛生研究所
村松芳多子	高崎健康福祉大学
森嶋康之	国立感染症研究所

(敬称略、五十音順)

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

以上の背景をふまえ、本研究最終年度では、これまでに検討を進めてきた、国内流通浅漬け製品のうち、リステリア汚染製品の製造施設での環境調査成績から得られた菌株の性状解析を行うことで、汚染の持続性等に関する検討を行った他、当該菌の施設汚染除去に際して用いた手法を取り纏め、今後同様の事例が発生した際のマニュアルとしての活用策を講じることとした。また、衛生規範改正に伴う市販浅漬け製品の衛生実態を把握するため、同規範改正前後に流通した複数の同一製品を対象として、各種指標菌汚染実態ならびに構成菌叢解析に係る検討を行った。また、漬物の衛生規範の成分規格として、カビ・酵母についても対象とされているが、それらの汚染実態は不明であることから、その検討を行い、汚染原因となった同微生物の特性から、ヒト健康危害への影響について考察した。

寄生虫に関しては、医学中央雑誌に収載された文献をもとに、検索用のデータベースを構築し、回虫症の国内発生状況を調査すると共に、本研究班で改良を進めてきた超音波法による寄生虫卵検査法に関する検討を輸入キムチ及び北海道産「行者ニンニク」市販品を対象に行った。また、輸入キムチにおける虫卵検査実施状況と検査結果について、アンケート調査を食品検査機関に対して実施した。

加えて、本研究班では、容器包装詰低酸性食品(たくあん)におけるボツリヌス菌の生存挙動を長期的に検討すると共に、ボツリヌス毒素の検出にあたって、FRET法を用いた蛍光検出法の感度・精度に関して、現在実施されている動物毒性試験との比較検討を行い、今後の代替的利用法について考察した。更に、米国における農産物の安全に関する最終規則に関する情報を抽出し、今後の非動物性食品に対する規格基準及び衛生管理体制の在り方について考察を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 細菌汚染実態に関する研究

浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

1) 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。B社については、平成25年度に小売店で購入し検査した野菜浅漬けのうち同社製品は計7検体あり、うち3検体から*L. monocytogenes*が検出されていた。同社には複数の包装ラインがあるが、*L. monocytogenes*が検出された3検体は容器の形状が同じであり、同一の包装ラインで製造されたものであったことから、この包装ラインについて複数回の調査を行った。

施設のふきとり材料等は、合計115検体を採取し*L. monocytogenes*の検出を試みた。*L. monocytogenes*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

3施設から分離した*L. monocytogenes* 72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*L. monocytogenes* 13株の合計85株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法およびリポプリンターシステム(Dupont)による解析を実施した。

衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

1) 浅漬け検体

計4製造施設において製造され、東京都内で市販される、8製品を対象として、改正前(2013年2月)及び改正後(2015年3月)に、各製品6検体を入手した(計96検体)。なお、各製品の主原料となる野菜は、白菜・茄子・胡瓜・大根・野沢菜である。何れの製品についても、販売店で直接購入し、10以下で所属機関に移送、試験に供した。

2) 衛生指標菌の定量検出

検体10gを採材し、滅菌鉗を用いて細切後、90mLの緩衝ペプトン水を含む滅菌ストマッカー袋に加えた。6ヒトストローク/秒の速度で1分間ホモゲナイズした後、100μLを標準寒天培地、VRBL寒天培地、MRS寒天培地に塗布し、一般生菌数、大腸菌群数、乳酸菌数をそれぞれ求めた。また、同懸濁液1mLを別途、TBX寒天培地に混釈法により接種し、大腸菌の定量検出をあわせて行った。

3) 16S rRNA pyrosequencing 解析

上述の検体懸濁液10mLを21, 500 x gにて10分間遠心分離後、上清を捨て、沈査を得た。同沈査より、PowerFood DNA Extraction Kit (MO BIO)を用いてDNA抽出を行った。得られたDNA溶液を鋳型として、16S rRNA部分領域をPCR増幅し、精製・濃度定量を経て、Ion Chef/ Ion PGM systemを用いたPyrosequencingに供した。

4) 菌叢データ解析

出力データより、検体別分類・不要配列を除去した後、RDP classifier を通じて、各検体における構成菌叢に関するデータを得た。バーチャート作成等には METAGENOME@KIN を用いた。

漬物の衛生規範に関する実態調査 - 真菌調査

1) 調査および材料

平成 27 年 4 月～12 月の期間に国内で販売されている漬物入手した。入手地域・入手漬物の種類は別途図表に纏めた。本研究で供試した漬物検体は国内広域より入手した。それらの多くは、極めて十分に衛生管理された漬物ではなく、その地域で食品として販売されている漬物を対象とした。また漬物の種類は、規範にある材料を広く入手するため計画的に集めるよう心がけた。

2) 試験法

(i) 酵母の試験法 (漬物の衛生規範による)

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

(ii) カビの試験法 (漬物の衛生規範による)

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

(iii) 漬物の衛生規範 (製品の適合要件)

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

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 文献調査成績

(i) 症例数

医学中央雑誌データベース (医中誌 Web) を用い、1990 年 1 月から 2015 年 12 月までの原著論文から国内で感染した回虫・鞭虫・鉤虫症例を抽出し、

年別症例数を明らかにすると共に、患者の感染源となった汚染野菜の特定を試みた。また、症例数については、臨床検査会社 BML の協力を得て、寄生虫症例の中から、回虫症・鞭虫症・鉤虫症と診断された症例の数について提示を受けた。

(ii) 感染源

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

2) 登録検査機関へのアンケート調査

厚生労働省の「食品衛生法上の登録検査機関における検査実績」に掲載されている登録検査機関のうち、自主検査件数の多い上位 16 機関と、公益法人目黒寄生虫館に依頼し、平成 17 年以降、毎年輸入キムチの寄生虫卵検査の実施件数と陽性件数について、記入式のアンケート調査を行った。

3) 輸入キムチにおける虫卵検査

(i) 被験物質

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

(ii) 検査法

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

4) 行者ニンニクにおける虫卵検査

(i) 被験物質

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

(ii) 検査法

検体からの虫卵の剥離操作は、5 分間の超音波洗浄によった。超音波洗浄後、洗浄液の全量を 1,000mL 容の円錐型液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。

比重液には硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液 (d=1.23~1.24) を用いた。

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究

1) ボツリヌス菌の食品内動態試験 (ボツリヌス菌添加/保存試験)

(i) 芽胞液の作製

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

(ii) 栄養型菌液の調製

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

(iii) 食品検体への菌液添加

芽胞液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、加熱処理後、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4 °C、25 °C あるいは 30 °C に保存した。菌液添加日を保存 0 日目とし、15 日、30 日、100 日、180 日、270 日、360 日目に、各保存温度につき 4 検体ずつ食品内の菌数測定に用いた (0 日目、15 日目、30 日目は平成 26 年度の検討)。

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

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

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

(iv) 理化学性状 (pH・酸化還元電位) の測定

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

(v) 生菌数 (一般細菌数) の測定

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

(vi) クロストリジア属菌数の測定

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

2) ボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度範囲に関する検討

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

3) ボツリヌス毒素定量検出法の検討

(i) マウス毒性試験法 (毒素の *in vivo* 検出法)

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

(ii) *in vitro* 定量検出法

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

4. 米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

米国で 2011 年に 1 月に成立した FSMA を実施に移すために 2015 年 11 月に最終規則化された「農産物の安全に関する規則 (Produce Safety rule)」やその関連資料を調査することで米国における非動物性食品 (果物・野菜等) に関する微生物基準の動向の把握を試みた。

C. 研究成果

1. 細菌汚染実態に関する研究

浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

1) 施設 B の調査成績

平成 26 年 6 月 30 日に 1 回目、8 月 18 日に 2 回目、11 月 4 日に 3 回目の調査を行った。施設のゾーニング等は、入室時の足洗い消毒槽とエアシャワーを設置し、原料保管冷蔵庫、下処理室、仕込み室、冷蔵下漬け室 (冷蔵室)、包装室など作業区域ごとに区画されていた。原材料の殺菌はコンベア式バブリング洗浄殺菌機 (残留塩素 30ppm、pH6.5、2 分間) を使用していた。

1 回目の調査では、冷蔵室や包装室が *L. monocytogenes* に汚染されていることが明らかになった。なかでも、食品に直接接触する重石板を押さえるパイプ棒の内部（検体 No.9）と計量後の個装品に調味液を充填するノズル（検体 No.10）から *L. monocytogenes* が検出されたことから、機械・器具類の汚染が最終製品への汚染につながっていると考えられた。機械・器具類の洗浄方法は水洗いのみであり、こすり洗いの必要性を認識していなかったことから、特に包装機に関連する器具の形状に適したブラシを用いた日常的なこすり洗いおよび次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた浸漬・噴霧消毒の実施を指導した。

その後の 2 回目の調査では、製品から *L. monocytogenes* は検出されず、汚染箇所や菌数は顕著な低減を示したものの、前回菌数が多かった包装機の調味液充填ノズルと、スライダークからの *L. monocytogenes* 検出は続いていた（検体 No.36、38）。また、下漬けを行う冷蔵室の床は常に濡れており、床の洗浄消毒が不十分な状況であったことから、冷蔵室の床を含め、施設内のこすり洗いの更なる徹底と次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒を指導した。

11 月に実施した 3 回目の調査では、いずれの施設環境および食品検体も *L. monocytogenes* は陰性を示した。この調査の 1 ヶ月前に、行政の食品衛生担当者が洗浄度をその場で確認できる ATP ふき取り検査を実施し、効果的な洗浄方法や洗浄・消毒の作業手順書作成を具体的に指導していた。その結果 11 月の調査時には現場に応じた洗浄・消毒の作業手順書が作成されており、指導に従って下漬時使用器具の内部洗浄に適したブラシが活用され、冷蔵室の床の清掃も実施されるようになっていた。そして包装機の調味液充填ノズルの分解洗浄消毒、コンベアベルトなどへの次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた消毒が実施されており、施設の衛生対策が改善された。

2) 施設 A および施設 C の調査成績

施設 A は、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。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 *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* を検出したが、前回と同じ場所の検体 No.33 と 36 の定量試験での菌数は減少しており、製品から *L. monocytogenes* は検出されなかった。検体 No.32、33 では血清型 3b が検出されたが、この血清型は 1 回目の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。

施設 C は平成 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 *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* が検出された。本施設の 2 回目の調査は行っていない。

3) PFGE 法による解析

制限酵素 *AscI* では A、B グループ（B, B1, B2 : 互いに 1 band から 3 band 異なる）、C の 3 つに型別された。制限酵素 *ApalI* では a グループ（a, a1 : 2 band 異なる）、b グループ（b, b1 : 1 band 異なる）、c の 3 つに型別された。

施設 A では平成 25 年度分離株 8 株と平成 26 年度 6 月の分離株 25 株の合計 33 株を型別し、Aa（*AscI* : A、*ApalI* : a グループ）と Bb（*AscI* : B グループ、*ApalI* : b グループ）に大別された。施設 B では平成 25 年度分離株 2 株と平成 26 年度分離株 20 株の合計 22 株を型別し、血清型に関わらず全て Cc（*AscI* : C、*ApalI* : c）であった。施設 C では 26 株を型別し、Aa（*AscI* : A、*ApalI* : a グループ）と Cc の 2 つに分かれた。

4) リボプリンターシステムによる解析

施設 A では 36 株が計 5 型（I, II, III, IV, V）に分類され多様な型が存在していたことが判明した。そのうち、グループ I と II が施設を持続汚染していたと考えられた。施設 B 由来の 23 株は、採取時期が異なるにも関わらず、同じグループ（VI）を示し、施設 A に比べて、高い持続性を以て施設汚染を示したものと考えられた。施設 C では、グループ IV と VI の 2 型の菌株が施設を汚染の主体として存在したと考えられた。

衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

1) 衛生指標菌数の動態比較

2013 年 12 月の衛生規範改正前（2013 年 2 月）および改正後（2015 年 2 月）に、4 施設にて製造された、計 8 種・96 検体の浅漬け製品を対象として、衛生指標菌数を直接塗抹法により求めた。

生菌数については、検体全体を対象とした改正前後での比較により有意差は認められず、改正前の平均生菌数は 2.52×10^6 CFU/g、改正後の同数値は 2.05×10^6 CFU/g であった。製品別では、計 5 製品では改正前後で有意差を以て数値の変動が認められた（ $p < 0.05$ ）が、残り 3 製品の同数値は改正前後で有意差を認めなかった。

大腸菌群数については、製品全体での平均値が改

正前で 1.77×10^3 CFU/g、改正後では 2.57×10^4 CFU/g と若干上昇傾向にあった。しかしながら、製品別比較を通じ、同上の数値は製品 No. 5 に大きく依存しており、他の 6 製品(製品 No. 1, 2, 3, 4, 7, 8)について、製品別に改正前後間での同菌数比較を行ったところ、有意な減少傾向を認めた。なお、大腸菌については本研究で供試した全ての検体で陰性となった。

乳酸菌数は、改正前検体の平均値が 3.17×10^5 CFU/g であったのに対し、改正後には 9.93×10^5 CFU/g と増加傾向を示した。製品別では計 4 製品(製品 No. 5, 6, 7, 8)で有意な増加を認めた。一方、製品 No. 2 および No.3 中の乳酸菌数は、改正後に減少を示した。

以上より、衛生規範の改正を通じて、供試対象とした市販浅漬け製品における各種衛生指標菌数は顕著に変動したことが明らかとなった。

2) 衛生規範改正を通じた、市販浅漬け製品の構成菌叢変動

(i) 優勢菌叢の変動

衛生規範改正前における優勢構成菌叢は、*Roseateles* spp. (平均構成比 40.56%)、*Leuconostoc* spp. (同 19.72%)、*Rhizobium* spp. (6.71%)、*Sphingomonas* spp. (同 6.59%)、*Methylobacterium* spp. (同 3.28%) 等であった。一方、同規範改正後における各製品の優勢菌叢については、*Leuconostoc* spp. (同 32.52%)、*Lactobacillus* spp. (同 23.60%)、*Buttiauxella* spp. (同 11.20%)、*Pseudomonas* spp. (同 5.87%)、*Sphingomonas* spp. (同 5.47%) 等となり、何れの製品においても、最も優勢となる菌叢については改正前後で異なっていた。

(ii) 大腸菌群に分類される菌叢の検証

大腸菌群に属すると推察される菌属として、供試検体より検出されたものは、*E. coli* の他、*Klebsiella*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* spp. 等であった。大腸菌群は、更に糞便由来または非糞便(環境)由来とする細分類の他、病原性を指標とした識別も学術的には行われている。製品別に見た、改正前後での構成菌叢比較を通じ、製品 No. 5 では、*Buttiauxella* spp. の構成比が、改正前の 2.02×10^{-2} % から改正後には 83.19% にまで急激に増加している実態が把握された。

(iii) 乳酸菌構成比の変動

構成菌叢解析を通じ、供試検体において乳酸菌として検出された菌属としては、*Aerococcus*, *Carnobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* spp. 等が含まれると想定された。漬物製品一般にお

いて高頻度に検出される乳酸菌としては、*Lactobacillus* spp. や *Leuconostoc* spp. が知られている。浅漬け製品を構成する乳酸菌に該当する菌叢の構成比は、全検体では改正前で 25.40% であったが、改正後には 57.00% と増加傾向にあった。製品別での比較により、計 4 製品(製品 No. 3, 4, 6, 7) では改正後に有意な乳酸菌に該当する菌属構成比の増加が確認された。一方、製品 No. 2 及び No. 5 では改正後の乳酸菌構成比率は改正前に比べ、減少傾向にあった。

(iv) 主要食中毒起因菌の構成比変動

EHEC, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* は生鮮野菜・果実に起因する細菌性食中毒の主たる原因菌として知られている。改正前後でのこれら 3 菌属(種)の構成比比較を行ったところ、*Salmonella* spp. については、衛生規範改正前の製品 No. 5 より検出され、その構成比は、 2.23×10^{-3} % であったが、改正後検体は何れも陰性を示した。また、*Listeria* spp. については、改正前の 3 製品(No. 2, 5, 7) より検出され、その構成比はそれぞれ 1.42×10^{-3} %, 1.05×10^{-2} %, 2.15×10^{-3} % であり、改正後検体での同菌由来遺伝子は製品 No. 5 の 1 検体のみから認められた。

漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

1) 漬物の酵母

供試した 105 漬物について酵母試験を実施した結果、約 60% (60 試料) で酵母の検出を確認できなかった。残り 45 試料で酵母の検出を認められた。酵母数をみると 10^2 個/g は 15 試料、 10^3 個/g は 9 試料、 10^4 個/g は 10 試料、 10^4 個/g 以上は 11 試料であった。

漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麹漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。ただし、本研究で入手した漬物の多くは加熱処理されていない未加熱製品である。それらの漬物中の酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae* であり、漬物のそのものに由来するものと判定した。表 6 に示したが、7 試料において漬物由来とされない種が検出された。

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

2) 漬物のカビ

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

漬物の種類別では、からし漬けを除いてカビの検出が認められた。漬物中にはカビの検出頻度は

非常に少ないことが確認できた。

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

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

3) 漬物の食塩濃度

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

4) 加熱処理した漬物での事故事例

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

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 食品汚染・症例に関する文献・実態調査

(i) 臨床症例数

国内感染の土壌媒介寄生虫症例としては、1990年から2015年までの26年間に回虫が225例、鞭虫が23例、鉤虫は8例であった。2011年以降の5年間でも、回虫が90例、鞭虫が7例、鉤虫は2例と、土壌媒介寄生虫症例は発生が続いていた。BMLの資料から明らかとなった土壌媒介寄生虫症は、2000年から2015年までの16年間に回虫が272例、鞭虫が283例、鉤虫は215例であった。2011年以降の5年間でも、回虫が34例、鞭虫が45例、鉤虫は13例と、最近も症例の発生が継続し、しかも文献検索結果と比べて症例数は多かった。

(ii) 原因食品の特定

文献検索で抽出された土壌媒介寄生虫症例256例中、感染源が生野菜の症例は11例、無農薬野菜は14例、有機野菜は7例で、残りは感染源を明らかにすることができなかった。内訳を見ると、生野菜を感染源とする回虫症例は9例、鞭虫症例は2例であり、無農薬野菜を感染源とする回虫症例は14例、有機野菜を感染源とする回虫症例は5例、鞭虫症例および鉤虫症例は各々1例であった。寄生

虫の種類を問わず、無農薬野菜を感染源とした症例が最も多かった。

感染源となった具体的な野菜の種類も特定を試みたが、具体的な野菜名の記述がない論文、あるいは複数の野菜名を単に列記しただけの論文ばかりで、汚染野菜の種類の特定は困難であった。

2) 登録検査機関へのアンケート調査

15機関及び目黒寄生虫館から回答が得られた。2005～2006年度の寄生虫(卵)検査数は、計90件であったが、2007年度～2010年度は、何れの検査機関においても検査は実施されておらず、2011～2015年度では、年間計1～9件の検査が実施されていた。なお虫卵が検出されたのは、2005年度に実施された1件のみであった。

3) 輸入キムチ・行者ニンニクでの汚染実態調査

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

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) ボツリヌス菌の食品内動態試験

(a) ボツリヌス菌芽胞液の添加回収試験

a-1) クロストリジウム属菌および一般細菌の食品内動態

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

a-2) 理化学的性状の経時的変化

保存試験開始時の食品pH値は 5.15 ± 0.11 であった。pH値は保存温度に関係なく、保存期間を通じて概ね5～5.5程度の範囲にあった。酸化還元電位は、試験開始時点で 32.02 ± 7.0 mVで、4℃および30℃条件下ともに、一旦上昇傾向になったがその後下降し、試験終了時(1年後)には開始時点より低い値となった。一般的に、ボツリヌス菌の生育可能な酸化還元電位は-200 mV程度であると報告されているが、我々は平成26年度の検討結果から

-200 mV から+200 mV までの広い範囲でボツリヌス菌が良好に発育することを明らかにしており、酸化還元電位についても、当該検体はボツリヌス菌の生育が可能な理化学性状を有すると考えられた。

(b) ボツリヌス栄養型菌液の添加試験

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

(c) ボツリヌス菌芽胞液の添加試験 2-栄養素添加

ボツリヌス菌等は発育・増殖に高タンパク質および高炭水化物を必要とする。今回の対象検体の原材料は大根という、窒素源および炭素源が非常に乏しいマトリックスであることから、本菌が当該食品内で発育・増殖しなかった一因として、窒素源及び炭素源の不足が考えられた。そこで、当該検体に芽胞液と共に、20 倍濃縮の BHI broth を添加し、ボツリヌス菌の動態を検討した。BHI broth 非添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 非添加 B 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 B 型芽胞液添加群における試験開始時のクロストリジア属菌は、それぞれ 382 ± 40 cfu/g、 512 ± 112 cfu/g、 308 ± 3 cfu/g、 607 ± 436 cfu/g であった。30 日間の保存期間後のクロストリジア属菌数は、A 型 B 型いずれの菌型、また保存温度においても、保存試験開始時よりも減少傾向にあり、BHI broth 添加条件下でもボツリヌス菌の増殖は見られなかった。同じ検体および芽胞菌非添加検体での生菌数は、いずれの群も保存試験開始時より若干の増加傾向が見られ、一部例外もあるものの、BHI broth を添加した 30°C 保存群にその傾向が強かった。

2) ボツリヌス菌の増殖にかかる理化学的性状に関する検討

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

3) ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量的検出法の探索 (マウス毒性試験法との比較検討)

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用した迅速・高感度のボツリヌス毒素 *in vitro* 検出法

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

4. 米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

「農産物の安全に関する最終規則」は、人が喫食する果物や野菜について、それらの安全な栽培、収穫、包装、および保存に関する科学的な基準を初めて規定したものである。以下は、当該最終規則に定められた重要項目の概略である。

1) 農業用水

病原菌を伴う可能性がある糞便汚染を検出するため、農業用水の品質と検査の要件が規定されている。

1-1. 水質

最終規則は農業用水の微生物学的品質に関して 2 セットの基準を設定しており、これらはいずれも糞便汚染の指標となり得る大腸菌 (generic *E. coli*) についてのものである。

潜在的に危険性のある微生物が存在した場合、それらが直接的または間接的に農産物に移行する可能性が高い農業用水には大腸菌が検出されてはならないとしている。このような用水の例としては、収穫時および収穫後に手指を洗うための水、食品が接触する表面に用いる水、収穫時または収穫後に農産物と直接接触する水 (製氷用の水を含む)、発芽野菜の灌漑用の水などが挙げられる。これらの用水に大腸菌が検出された場合はその使用を直ちに中止し、再使用前に改善措置を取らなければならないとしている。本最終規則はこれらの用水として未処理の表層水を使用することを禁止している。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる水に関する数的基準は幾何平均値 (geometric mean: GM) と統計学的閾値 (statistical threshold: STV) よりなる。当該水検体 100 ml あたりの大腸菌生菌数 (CFU) は、GM が 126 以下、STV が 410 以下でなければならないとしている。

当該水がこれらの基準を満たさなかった場合は、実行可能な限りできるだけ速やかに (遅くとも翌年中に) 改善措置を取らなければならないとしており、当初、農業用水が微生物基準を満たさなかった農家は、いくつかの選択肢 (省略) のいずれかを実施す

ることにより、基準がクリアされ、当該水を使用できるようにするとしている。

1-2. 検査

最終規則では、検査の頻度が水源の種類(すなわち、表層水か地下水か)にもとづき規定されている。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いるために、外的要因の影響を最も受け易いと考えられる未処理の表層水を検査する場合は、農場は初期調査として、2~4年にわたり収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも20検体を検査しなければならない。農場はこの初期調査の結果からGM値とSTV値(これら2つの値は「微生物学的水質指標」と呼ばれる)を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断するとしている。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる未処理の地下水に関しては、農場は初期調査として、栽培期間または1年の、収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも4検体を検査しなければならない。農場は初期調査結果からGM値とSTV値を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断するとしている。

大腸菌が検出されてはならない水として一部の目的に使用される未処理の地下水に関しては、農場は初期検査として、栽培期間または1年間にわたりこれらの水を少なくとも4回検査しなければならないとしている。農場はその結果にもとづき、これらの水が当該の目的に使用可能かどうかを判断しなければならない。以下の場合、農業用水は検査の必要がないとしている。

- ・ 最終規則に規定される諸要件を満たす公共水道または水源から受水する水(ただし、当該の水が関連の要件を満たしていることを示す検査結果またはコンプライアンス証明書を農場が保有していることが必要)
- ・ 最終規則の水処理要件に従って処理された水

2) 生物学的土壌改良材

2-1. 家畜ふん (Raw Manure)

FDAは、汚染リスクの最小化のために土壌改良材としての家畜ふんの施肥と収穫との間に何日間置くことが必要かについて、リスク評価および広範な研究を行っている。

現時点では、FDAは、農家が米国農務省(USDA)のNational Organic Programに示された基準に従うことに反対していない。この基準は、家畜ふんの施肥と収穫との間に、土壌と接する作物については120日、接しない作物については90日の期間をおくことを呼びかけている。

最終規則によると、家畜ふんなどの未処理の動物性生物学的土壌改良材は、施肥時に農産物にふれず、また、施肥後に農産物に触れる可能性を最小化するような方法で施肥しなければならない。

2-2. 完熟堆肥 (Stabilized Compost)

最終規則には、家畜ふんなどの生物学的土壌改良材を熟成処理する工程について、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)、サルモ

ネラ属菌(*Salmonella* spp.)、糞便系大腸菌群、大腸菌0157:H7などの菌数の検出上限を規定する微生物学的基準が設定されている。最終規則にはこれらの基準に適合した科学的に裏付けのある堆肥作成法として2つの例が示されている。これらの方法のいずれかによって作成した完熟堆肥は、施肥時および施肥後に農産物に触れる可能性が最小になるような方法で施肥しなければならないとしている。

3) 発芽野菜

発芽野菜は食品由来疾患アウトブレイクにしばしば関連してきた。発芽野菜は、その栽培に必要な高温多湿で栄養豊かな環境条件により、危険な微生物に特に汚染され易い。

米国では1996年から2014年までの間に、発芽野菜に関連して、アウトブレイク43件、患者2,405人、入院患者171人、死亡者3人が発生した。この中には、米国では初めての報告であった発芽野菜によるリステリアアウトブレイクも含まれている。

発芽野菜にのみ適用される要件には以下が含まれる。

- ・ 発芽に用いる種子や豆を処理すること(または、種子(豆)生産業者、流通業者、供給業者などによる事前の処理とその記録に頼ること)に加え、さらに、それらに危険な微生物が付着・侵入しないような対策をとる。
- ・ 特定の病原体について、生産バッチごとの使用済み灌漑水、またはバッチごとの栽培中の発芽野菜を検査する。これらの検査結果が陰性であることが確認される迄、販売できない。
- ・ リステリア属菌またはリステリア・モノサイトゲネスの存在について、発芽野菜の栽培、収穫、包装、および保管に係わる環境の検査を行う。
- ・ 使用済灌漑水、発芽野菜及び(又は)環境検体の検査が陽性だった場合は改善措置を取る。

4) 家畜および野生動物

最終規則は、飼育動物(家畜など)や種々の目的のための作業動物に依存する農場について、最終規則の遵守可能性に懸念を示している。最終規則では、これらの動物に対して、農場に侵入する野生動物(シカや野生のブタ)と同様の規準が設定されている。農家は、汚染の可能性がある農産物を特定し、それらを収穫しないよう、合理的に判断して必要と考えられるあらゆる対策を取らなければならないとしている。

少なくとも、すべての農場は、収穫方法によらず、栽培区域および収穫予定のすべての農産物を目視検査しなければならない。

さらに、最終規則は、一定の状況下では農場が栽培期間中に追加の調査を行うことを求めている。もしこの調査で動物による汚染の可能性を示す有意な証拠が見つかった場合、農場は、後の収穫時に役立つと考えられる対策をとらなければならない。そのような対策の一例として、汚染区域を示す旗を設置することが挙げられる。

最終規則は家畜等の放牧と農産物の収穫との間

に待機期間を置くことを求めているが、FDA は、農家が生産物と生産慣習に応じて、そのような期間の設置を自主的に検討することを奨励している。

農場は、野外の栽培区域から動物を排除したり、動物の生息域を破壊したり、栽培区域または排水区域の境界を明示したりする必要はない。本規則のどの条項も、このような行為を強制している、または奨励していると解釈してはならないとしている。

5) 作業者の研修、健康、および衛生

最終規則では、作業者の健康と衛生に関して以下の諸要件が規定されている。

- ・ 発症もしくは感染した作業者による農産物および食品接触表面の汚染を防ぐため、作業者に、農産物や食品接触表面を汚染する可能性がある健康状態の場合はその旨を監督者に連絡するよう指導するなどの対策をとる。
- ・ 農産物または食品接触表面を取り扱ったり触れたりする場合は、衛生慣習に従う。一例を挙げると、トイレの使用後などの際は手指をよく洗い、乾かす。
- ・ 例えば、トイレや手洗い設備を訪問者に利用可能にして、訪問者が農産物および（または）食品接触表面を汚染させないよう対策をとる。

農産物および（または）食品接触表面を取り扱う農場作業員およびその監督者は、健康や衛生の重要性などの特定の課題について研修を受けなくてはならないとしている。

農産物および（または）食品接触表面を取り扱う農場作業員およびその監督者は、また、担当業務の遂行に必要な研修、教育を受講し、さらに経験を有していなければならない。これは教育と、実地研修、または現在の担当業務に関連した仕事への就労経験との組み合わせでも良いとしている。

6) 設備、道具および建物

最終規則は、設備、道具および建物が不適切な衛生下に農産物の汚染の原因になることを防ぐために、これらについての基準を設定している。最終規則はここで、温室や発芽室、及び他の類似の構造物、また、トイレや手洗い設備などを対象としている。

農産物および食品接触表面の汚染を防ぐために必要な対策としては、設備や道具の適切な保管、維持、および洗浄などが挙げられている。

7) 適用除外項目

以下に記載するものは本最終規則の対象から除外されるとしている。

- ・ 「生、またはそのまま食べられる農業製品」に当てはまらない農産物。
- ・ 生で食べることがほとんどないとFDAが特定した以下の農産物：アスパラガス、インゲン豆、赤カブ、甜菜、カシュー、ヒヨコ豆、カカオ豆、コーヒー豆、スイートコーン、クランベリー、デーツ、ナス、イチジク、セイヨウワサビ、ヘーゼルナッツ、オクラ、ピーナッツ、ペパーミ

ント、ジャガイモ、カボチャ、サツマイモなど。

- ・ 食用の穀類：オオムギ、デントコーン、フリントコーン、オート麦、米、ライ麦、小麦、ソバ、油糧種子（綿実、亜麻仁、菜種、大豆、ヒマワリの種）など。
- ・ 生産者個人が、または生産農場で消費することを目的とした農産物。
- ・ 農産物の過去3年間の平均の年間売上高が25,000ドル以下の農場。

また、公衆衛生上重要な微生物の量を的確に減少させる商業的加工工程を経る農産物も一定条件下に適用除外の対象になるとしている。さらに条件付き適用除外、およびその場合に農場に課される要件も示されている。

D. 考察

1. 細菌汚染実態に関する研究

浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

これまでの *L. monocytogenes* 症事例における汚染源の調査結果から、本菌は原材料から持ち込まれるというよりはむしろ製造・加工工程で食品を汚染していると考えられている。本研究で複数回調査した施設 A および B においても、下漬をする冷蔵室の床と製品充填機周辺から施設に特有な菌株が持続的に分離され、これらの環境の洗浄が不十分であることが判明した。本菌は環境下で速やかにバイオフィーム形成を果すが、同形質は多くの物理・化学的処理に抵抗性を示すため、製造環境に定着した場合は除去が難しいと言われている。

L. monocytogenes の除去に際して、施設 A では継続的な加熱処理を行なうことで、菌数の減少に成功した。しかし、熱湯の取扱は施設内の温度を上昇させる弊害があり、それ以外にも作業員の危険を伴うため注意が必要である。スチームクリーナーで蒸気を機械にあてる方法も、エアロゾルを発生させることから、加熱処理は限定的に用いるほうがより効果的とも考えられる。

施設 B では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い具体的な改善方法を提示したことで、施設側の理解が深まり、*L. monocytogenes* の陰性化が実現したと考えられる。今後も機械・器具類の洗浄が適切に行われているかどうかの検証のためには定期的な製造環境モニタリングが必要と考えられた。

衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

本研究では、2013年に改正された漬物の衛生規範に従って製造された市販浅漬け製品に加え、同規範改正以前に流通した、同一製品を対象として、衛生規範改正前後における市販浅漬け製品の衛生状

況に関する実態調査を行った。

衛生指標菌数の比較検討を通じ、大腸菌群については複数製品で減少傾向が認められ、乳酸菌数については反対に増加傾向を示す製品が複数認められた。生菌数については明確な変動は認められなかった他、大腸菌については全ての供試検体で陰性を示した。これらの成績を勘案すると、衛生規範改正に伴い、供試製品については、衛生状況の改善が図られたと考えられる。その一方、同規範改正を通じた比較検討成績は、浅漬けをはじめとする非動物性食品の製造工程における衛生指標として、生菌数や大腸菌群を用いる意義は必ずしも高いとは言いがたく、欧州等で報告されているように、大腸菌を用いた衛生管理を行う必然性を提唱していると目される。その導入にあたっては、更なる検証データの集積が必要と考えられる。

菌叢解析の結果より、供試製品における優勢菌叢は、衛生規範の改正前後で大きな変動を示したことが明らかとなり、指標菌動態との関連性も認められた。改正前に優勢菌叢として同定された、*Roseateles* spp, *Rhizobium* spp, *Sphingomonas* spp. 等は、生鮮野菜・果実より高頻度に分離されているが、これらは薬剤耐性菌としての報告もある他、疾病との関連性も示唆されている。これらの構成比の低減は従って、微生物危害の低減につながるものと示唆され、衛生規範改正に伴う、製品の衛生状況改善が果たされたものと考えられる。

一方、大腸菌群に属する *Buttiauxella* spp. については、1 製品(No. 5)において優勢な構成比を示した。当該菌は、非糞便性の非病原細菌であり、土壌や植物、水等の環境由来細菌として知られる。製品 No. 5 は改正後に大腸菌群数を増加させていたが、菌叢解析の成績より、同数値の増加は、病原性を有する大腸菌群によるものではないと目された。

乳酸菌数は、改正後の複数製品において増加を認めたと、これに呼応した形で乳酸菌に含まれる菌叢の構成比も増加傾向を示した。乳酸菌はバイオフィルム形成等を介して、酸等の環境ストレスに抵抗性を示す他、一部の乳酸菌については、0.04%以上の次亜塩素酸ナトリウムに対して抵抗性を示すことも知られている。衛生規範改正に伴う、次亜塩素酸ナトリウムの使用励行が、結果として乳酸菌の生残に有効に機能していることが示唆された。

本研究における成績は、衛生規範改正に伴う浅漬け製品の衛生状況の改善を確認できた一方、HACCP 導入に向けて求められる衛生管理上、必要不可欠な衛生指標の在り方に関する課題も提起された。欧州では生鮮野菜の製造衛生管理上、大腸菌を用いることが近年提唱されており、今後、我が国においても、生鮮野菜或いは軽度の加工を行う植物性食品の製造基準等の在り方を議論・整理する必要がある。

漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

市販される漬物中に、どの程度の真菌(酵母、カビ)が検出されるかについて調査を実施した。検出結果から、多くの漬物製品において、酵母やカビが全く陰性であるとはいえないことが明確になった。酵母数をみると 10^2 個/g ~ 10^4 個/g 以上と漬物中の酵母検出数は多様であった。漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麹漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。酵母数の多い漬物からは *Saccharomyces cerevisiae* が検出された。以上の結果からわかるように、加熱しない限り漬物由来の酵母は存在するものであり、異常な数値とはいえない。むしろ問題は、漬物由来以外の酵母の検出数である。漬物由来とされない酵母の検出種に *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus* が確認された。つまり製造工程での汚染も考えられ、こうした酵母の種によって産膜酵母などが汚染されることもあるため、施設環境(空調等)や漬物原料等における衛生改善が求められる。

カビについては、約 30%の検体より検出された。一般にカビ数は食品中では少ない。その理由としては、細菌とは異なる分裂様式(発芽による菌糸伸長)をとるためと考えられる。そのため、時間経過によってもカビ数は少ないことが多い。ただし、少ないからといってカビを問題視しないことはあってはならない。

本研究を通じて、今後検討すべき重要な課題としては、どのようなカビ種が検出され、確認されるかを把握する必要があると思われる。すなわち検出されるカビの同定を通じ、汚染源を特定できることが多いからである。食品に添加された保存料の有無、および漬物汁中の食塩濃度から判断しても、保存料の有無に関係なくカビが検出され、食塩濃度も低いことが明らかとなった。今回、検出されたカビは、湿性環境にみられる代表的な *Fusarium*, *Acremonium*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Paecilomyces* 等であり、中でも特に多かったカビ種を確認したところ、空中由来であった。これらは従って製造工程中に食品に混入したのと考えられる。

また、本研究課題の病原微生物の観点からカビ種を判断すると、*Exophiala*, *Acremonium*, *Fusarium* など日和見感染カビも少なからず確認された。カビの発生事故品や異物やカビ数も重要であるが、漬物の低塩化及び加熱処理食品として市場に広く出回ることなどを考慮していくと今後は、このような特定カビに注視しながら漬物の衛生規範を検討することも必要であると提言したい。

加熱処理した漬物での事故事例を経験した。この2事例は同様の過程で発生されていることから、今後漬物の加熱加工する場合の大切な教訓となる。いずれも地場産業として販売を促している食品であ

ったが、耐熱性カビ *Neosartorya fischeri* であった。これは 60-70、15-30 分加熱程度では死滅しないカビであるため、加工工程処理をどのように指導するか等も含めて、漬物の衛生規範で重要といえる事例であった。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

文献学的検索により、回虫・鞭虫・鉤虫に感染する症例は、最近でも少数ながら継続して国内発生していることが確認された。感染源となる野菜の虫卵汚染は、現在でも継続していることが強く示唆された。BML の資料からは、更に多数の土壌媒介寄生虫症例が我が国で診断される事実が示された。ただし BML の症例は、国内感染事例だけでなく、輸入症例も含む。特に熱帯地方の発展途上国では、野菜における土壌媒介寄生虫の虫卵汚染は高度で、これを喫食して感染する機会にも恵まれている。このような状況を背景に、土壌媒介寄生虫に海外で感染し、輸入症例として受診する患者が多い事に、我が国の医療関係者は留意すべきである。

今回の検討で、感染源となった野菜の名前を特定することも試みたが、具体的な野菜の名前を記述していない論文ばかりであった。文献学的検索を今後継続しても、感染源となった野菜を特定することは容易でないと考えられた。患者と面談して、直接に聞き取る工夫ができないか、今後検討する必要がある。

2005 年 11 月に中国と韓国との間で発生したキムチの寄生虫卵汚染に関する問題を契機として、我が国でも輸入キムチの寄生虫卵検査が実施された。その結果、一部のキムチ検体から回虫(人体寄生性)を始めとする寄生虫卵が検出された。しかしその後、検査の結果を目にすることがなくなった。本アンケート調査から、輸入キムチの検査が実際に実施されなくなったからではないかと考えられた。しかし 2011 年度以降は、少数であっても検査が継続して実施されていることも分かった。土壌媒介寄生虫の感染事例は最近でも発生しており、中には感染源として輸入キムチを示唆する報告も認める。従って輸入キムチを対象とした寄生虫卵検査は、感染源の特定や予防法の策定とも関連する。検査を実施して、陰性であってもその成績を記録することは、今後も重要な課題になると考えられた。

最近 5 年間に一部検査機関ではキムチの寄生虫卵検査が実施されていた。しかし、虫卵の検出例は認められず、中国・韓国産の輸入キムチを対象に寄生虫卵検査を実施し、汚染状況を調べた。その結果、回虫等の人体寄生虫の虫卵は検出されなかったが、ダニの卵が検出された。今回実施した超音波法によるキムチの検査法は、人体寄生性の寄生虫卵検出にも適用可能と考えられた。

キムチは様々な原材料より構成されており、高脂

質であり、微細な夾雑物も多い。平成 17 年に厚労省からキムチの検査法が通知されたが、その検査法では脂質や夾雑物の除去が十分に行うことができないことが従来より指摘されてきた。また我々が実施した超音波法(浮遊法)によっても、キムチからの虫卵検出には多くの時間が必要なことが改めて確認された。検査を効率的に進めるためにも、寄生虫卵を残したまま、キムチの残渣だけを効率的に除去する方法について、今後更に検討を進める必要がある。

本研究班では、非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法として超音波法を構築し、多数の検体から効率的に寄生虫卵が分離できることを示してきた。当該法を用いて、北海道東部で栽培された(あるいは野生の)行者ニンニクを対象として寄生虫卵の検査を実施した。特に、感染症法で 4 類に規定されるエキノкокスの虫卵の検出を試みたが、いずれの検体もエキノкокス虫卵陰性を示した。本症はキタキツネやエゾヤチネズミを媒介して環境への汚染拡大が懸念されている。今回は検査数が限られており、食品汚染実態の正確な把握には至っていないが、今後は、検体数を増やして、検査を継続したいと考えている。実際に、今回供試した行者ニンニク検体には砂泥の付着が肉眼的にも多く認められており、汚染の危険性を否定できる段階にはないといえよう。

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究

1) ボツリヌス菌の食品内動態

平成 20 年に通知された指導内容を逸脱していた「たくあん」製品を用いて菌の添加/長期保存試験を行った。本試験では、計 72 個の「たくあん」製品を菌非添加検体として用いたが、いずれからもクロストリジウム属菌は検出されず、ボツリヌス菌の原材料への汚染はなかったと考えられた。しかし、食品内のボツリヌス菌動態の検討結果から、原材料がボツリヌス菌芽胞に汚染された場合、長期にわたりボツリヌス芽胞数が初期濃度で維持される可能性が示唆された。ボツリヌス菌の場合、乳児等の一部のグループを除き、菌が増殖し毒素を産生する状況でない限りヒトへの健康危害はないと考えられるが、芽胞菌数が減少せず食品内で長期維持されることは留意すべき点であると考えられる。

本試験では、「たくあん」検体の pH 値および酸化還元電位がボツリヌス菌の発育が可能な条件下にあったにもかかわらず、添加菌は食品内で増殖しなかった。その理由として発育に必要な窒素源および炭素源の不足を考え、BHI broth 存在下でのボツリヌス菌の添加試験も行ったが、同様に食品内での増殖は見られなかった。しかしながら、炭素源および窒素源が豊富な「煮豆」製品を用いた検討では、短時間でガス産生を伴うボツリヌス菌の顕著な増加が確認された。BHI broth を添加した「たくあん」

製品においてボツリヌス菌の発育がみられなかったのは、(1) BHI brothの添加量が不十分であった(2) BHI brothは糖含量があまり高くない事から、炭素源が不足状態であった、などの可能性に加え、BHI broth添加群で生菌数の増殖がよい傾向にあったことから(3) 検体内に存在する一般細菌等により添加した栄養素が消費され、ボツリヌス菌の発育より先に一般細菌の発育が促進してしまった可能性も考えられた。検体内に存在する一般細菌に関しては、ボツリヌス菌の増殖が顕著であった「煮豆」製品では、生菌数は検出されず、共存菌はなかったと考えられる。「煮豆」製品に関しては、ボツリヌス菌が容易に増殖する事は既に報告され、平成20年の厚生労働省の指導通達後、ボツリヌス対策として「120℃4分間の加熱と同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行っている」と平成22年のフォローアップ調査で回答している。今回、用いた「煮豆」製品から生菌数が検出されなかった理由としては、120℃4分間の加熱と同等以上であったかどうかは本試験だけでは判定できないが、少なくとも一般細菌が死滅する程度の加熱殺菌は実施されていたからだと考えられた。これらかの結果から、ボツリヌス菌の食品内増殖については、競合する他菌の有無の影響や食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集、更なる検討が必要と考えられた。

平成20年に通達されたボツリヌス対策では、背景でも述べたように、当該食品中のボツリヌス菌を除去する、ボツリヌス菌の増殖を防止する、またはボツリヌス毒素の産生を防止する、のいずれかをとることとしており、具体的には、[1] 中心部温度を120℃4分間加熱する方法またはこれと同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行なう。[2] 冷蔵(10℃以下)条件で流通保存することとし、容器包装にその旨を明記する。[3] pHを4.6以下に調整し、菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生を防止する。[4] 水分活性を0.94以下にし、菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生を防止する。などがあり、これらの措置は容器包装詰低酸性食品を取り扱う業界団体の責任において講じる事となっている。上記のうち[2]以外は、当該製品の外観からではどの措置がなされているのか判別できない。対策未実施製品があった場合は、本研究のように「市場品を用いた調査/検討の実施」、あるいは事故発生により違反が判明する状態である。市場に出回っている「煮豆」製品の中には、加熱処理済みである旨を記載しているものも見受けられたことから、当該食品を扱う業界団体には指導内容の遵守に加え、自主的に対策内容の表記を行う団体/企業が増える事を期待したい。

2) ボツリヌス菌増殖を許容する酸素濃度

ボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度条件については、概ね0.75%以下であることが示された。真空包装食品におけるボツリヌス菌の発育ならびに毒素産生に関する点では、Kasaiらが包装米飯において5%以下の酸素濃度で発育・毒素産生リスクがあると報告している。本研究では、食品マトリックスを用いた検討は行っていない他、実際の食品に

あつては、他菌による酸素濃度への影響あるいは食品マトリックスに含まれる栄養組成がボツリヌス菌の栄養要求性を満たすかどうかといった点も考慮する必要があると考えられる。本研究により得られた結果からは、少なくとも1%以下の酸素濃度を有する食品に対しては、ボツリヌス菌の増殖リスクがあると想定され、一定濃度以上の酸素を均一に含む食品製造が本菌汚染リスクの低減には有効と思われた。

3) ボツリヌス毒素に対するFRET定量法の検証

ボツリヌス毒素の検出法・定量法としては、体重20g前後のアルビノマウス(*ddY*系あるいはICR系)を用いたマウス毒性試験法がゴールドスタンダード法として位置づけられており、我が国においても公定法として採用されている。マウス毒性試験法は検出感度が高く、LD₅₀値を1Uとし、ボツリヌス毒素量表記の基準となっている。しかしながら、同法の実施にあたっては、施設や動物倫理等、多くの課題があるため、一般的な食品検査機関では実行できる状態にない。このような背景から、代替法の構築が社会的に求められており、これまでに毒素タンパク質に対する抗原抗体反応を検出原理としたELISA法やその改良法PCR-ELISA法等が開発されているが、現時点では、検出感度においてマウス毒性試験法と同等性が担保される方法は存在しない。また、毒素遺伝子の検出を原理としたPCR法も開発されているが、試料に混在する食品成分によるPCR反応阻害などの問題点に加え、毒素遺伝子の存在と毒素産生が一致しない場合もあり、あくまでも補助的な使用に留まっている。近年、米国BioSentinel社によって開発された蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を利用したボツリヌス毒素検出法は、毒素の作用本体であるエンドペプチダーゼ活性を検出原理としており、毒素の基質の一部に2種の蛍光色素を標識したものをを用いる。検出原理として毒素活性を検出対象としている点において、マウス毒性試験法と同じであり、他法と比してマウス毒性試験法とのよい相関性が期待できるのではないかと考え、本研究では同法の検出感度に関し、マウス毒性試験法との比較検討を行った。結果として、A型毒素に対する検出感度は同等性が確認され、マウス毒性試験法の代替法としての可能性を期待させる結果であったが、B型毒素に対する検出感度には大きな差がみられた。今後、検査試料の前処理方法等について、更なる検討が必要と思われる。

4. 米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

FSMAを実施に移すために必要な規則の一部として2015年11月に最終規則化された「農産物の安全に関する規則(Produce Safety rule)」では、「農業用水の品質と検査」、「動物由来の生物学的土壌改良材」、「発芽野菜の生産」、「家畜や野生動物による汚染」、「健康と衛生の重要性についての研修」、および「農場の設備、道具、建物」に関する要件が重要項目として挙げられている。これらの項目からも

理解できるように、食品微生物汚染対策として、農業用水を始めとする農場における重要管理点に関連する項目が中心となっており、一次生産段階から喫食段階まで（Farm-to-Fork）の包括的対策の基本に沿った内容といえる。特に生のまま喫食することが多い発芽野菜に対する規則が細かく決められており、米国だけでなく欧州でも多数の患者が発生したことから特に関心が高いことが示唆される。

我が国では果物・野菜に関する食習慣、嗜好性や果物・野菜の生産・加工時の慣習、衛生管理状況が米国とは異なると考えられるので、米国での規則制定が直接参考になるわけではないが、食品の世界的な流通の状況、およびFSMAが米国への輸入食品にも適用されることに鑑み、米国、欧州連合（EU）をはじめとする国際的な動向を今後も注視して行く必要があると考えられる。

E. 結論

1. 細菌・真菌等の汚染実態に関する研究

浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

浅漬製造施設の協力を得て、製造環境の改善に向けた調査を行った。何れの施設も冷蔵室や包装室の床のたまり水、そして製品包装機の拭き取り検体からリステリア菌が検出され、汚染箇所が特定された。分離株の遺伝子型別を通じ、各施設での本菌汚染が持続的なものであったことが推察された。複数回の調査ならびに改善指導を行ったA、B社では、本菌対策に関する理解が深まり、製品での陰性化が実現した。本報告書では、今後同様の事例が発生した際の参考資料として活用できるよう、その除去法を取り纏めた。

浅漬製造施設では製品に *L. monocytogenes* が混入する可能性のある場所の管理状態を評価するための、モニタリングプログラムの設計が重要であり、その実行が消費者の健康被害を防ぐことにつながると考えられた。汚染除去に際しての情報と共に、本研究の結果を今後の衛生対策に反映させたい。

衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

本研究では、市販浅漬け計8製品96検体を対象として、衛生規範改正前後での衛生状況の比較を目的として、各種衛生指標菌の定量検出及び構成菌叢を比較した。同成績により、衛生規範の改正後に市販される供試浅漬け製品については、微生物危害の低減が図られたことが実証された。また、指標菌動態と構成菌叢の併用を通じ、野菜等を原材料とする食品の製造工程における衛生管理には、大腸菌群等は不適であり、大腸菌を使用する利点が挙げられた。

国内に流通する多様な漬物について真菌・酵母の定量検出を行い、以下の知見を得た。

(1) 漬物の酵母試験結果：約40%の試料より酵母が検出された。酵母数としては $10^2 \sim 10^4$ 個/g以上であった。漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麹漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった（但し、供試検体の多くは非加熱製品）。検出された酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae*であったが、一部検体からは漬物由来といえない酵母種が検出された。後者は、産膜酵母等の汚染源となるため、漬物の加工工程における衛生規範見直しが求められる。

(2) 漬物のカビ試験結果：約30%の検体よりカビが検出された。カビ数をみると 10^2 個/g程度と多いとは言えなかったが、本規範で重要な問題点はカビ種である。カビ種の確認により、空中、原料、水系由来に分けることができ、その原因を知るとは、今後の衛生規範の在り方を考える上で重要な知見となり得ると思われた。日和見感染カビである *Exophiala* が確認されたことから、カビ種の特定は極めて重要であり、今後の衛生規範改正で検討が望まれる。

(4) 加熱処理した漬物での事故事例：加熱処理した漬物でカビ事故事例が起こった事例を経験した。2件で、いずれも地場産業として販売している食品であった。それらの試料から耐熱性カビが確認された。製造環境で重要な加工工程における衛生規範の指導事例の一つといえた。

(5) 漬物の真菌調査から近年の漬物は低塩あるいは加熱加工品であることによる真菌事故例が今後危惧され、漬物の衛生管理及び試験法等の衛生規範の見直しが求められる。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

回虫症、鞭虫症および鉤虫症は、現在も日本国内で発生しており、感染源となる野菜の虫卵汚染も低頻度ながらも継続している実態を把握した。感染源に関しては無農薬野菜あるいは有機野菜とするものも認められたが、具体的な野菜の種類に関しては特定が困難であった。キムチの寄生虫卵検査は、2011年度以降も検査機関で実施されているが、虫卵は2005年度に1機関において1検体から検出されただけであり、通常の食品における汚染頻度は低いものと想定された。中国および韓国原産の輸入キムチ計5検体について寄生虫卵検査を行ったが、人体寄生性の虫卵は検出されなかった。同様に、北海道で市販される行者ニンニク41検体を対象に寄生虫卵検査を行ったが、いずれの検体も陰性で、エキノコックス虫卵も検出されなかった。

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌

漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究

ボツリヌス菌の食品内動態及び食品内毒素の *in vitro* 定量的検出方法の探索を行った。ある「たくあん」製品におけるボツリヌス菌の増殖は認められなかったが、生存は長期的に認められ、食品汚染時のリスク低減を目的として、継続的な調査が必要と考えられた。また、食品の特性として、本菌の増殖には窒素源・炭素源が必要であるため、これらの栄養特性の精査を根拠とした、食品の危害分類の可能性が示唆された。ボツリヌス毒素検出法として、FRET 法による検討を進め、動物毒性試験法との比較を行った。A 型毒素については同等の検出感度を示したが、B 型毒素については改善の余地があることが明らかとなった。

4. 米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた微生物基準に関する調査

本最終規則は Farm-to-Fork の基本に沿った内容であり加熱処理を経ない発芽野菜を始めとする生鮮食品に関しても細かく基準が定められている。灌漑に使用する用水や堆肥に関する規定から現場作業者の意識啓蒙活動に関する規定まで含まれており、包括的な内容となっている。我が国においても、加熱処理を経ずに喫食される食品に関しては特に、一次生産段階における汚染対策を含め、Farm-to-Fork 全体に亘る包括的な対応が望まれる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Kanki M, Naruse H, Taguchi M, Kumeda Y. (2015) Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. *Int J Food Microbiol.* 211: 18-22.
- 2) Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S, Asakura H. (2015) Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *J Food Safety.* 35: 458-465.
- 3) Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S. (2016) Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety.* doi: 10.1111/jfs.12256
- 4) 杉山広、荒川京子、柴田勝優、川上泰、森嶋康之、山崎浩、荒木潤、生野博、朝倉宏。(2015) わ

が国における土壌媒介寄生中症，特に回虫症の発生とその汚染源の文献的および検査期間データに基づく調査．*食品衛生研究*．65: 37-41.

- 5) 堀内朗子、荒川京子、秋庭達也、吉田建介、平田史子、松本奈保子、丸山弓美、奥津敬右、朝倉宏、杉山広。(2015) ストマッカーを利用した野菜等の回虫卵検査法の検討．*食品衛生研究*．65:45-50.
- ## 2. 学会発表
- 1) 橘理人、吉村昌徳、山本詩織、春日文子、五十君静信、朝倉宏：衛生規範改正前後における市販浅漬け製品の指標菌数ならびに菌叢動態に関する比較検討．第 42 回日本防菌防黴学会総会．2015 年 9 月、大阪．
 - 2) 吉村昌徳、磯陽子、橘理人、須田貴之、小西良子、春日文子、五十君静信、朝倉宏：芽物野菜の種子における微生物汚染と、発育に応じた菌叢動態に関する検討．第 42 回日本防菌防黴学会総会．2015 年 9 月、大阪．
 - 3) 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．
 - 4) 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．

H. 知的財産権取得状況

該当なし

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
「非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：細菌汚染実態に関する研究
「浅漬け製造施設におけるリステリア株の性状と汚染除去法に関する研究」

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 *Listeria monocytogenes* が検出された浅漬製造の 3 施設（A、B、C 社）とその地域を管轄する行政の食品衛生担当者の協力を得て、製造環境の改善に向けた調査を行った。その結果 3 施設ともに冷蔵室や包装室の床のたまり水、そして製品包装機の拭き取り検体から *L. monocytogenes* が検出され、汚染箇所が明らかになった。分離株の遺伝子型別を通じ、施設毎に類似した遺伝子型が確認され、施設内で本菌による汚染が持続していたと推察された。複数回の調査ならびに改善指導を行った A、B 社では、*L. monocytogenes* 対策についての理解が深まり、製品の *L. monocytogenes* 陰性化が実現した。浅漬製造施設では、製品に *L. monocytogenes* が混入する可能性のある場所の管理状態を評価するための、モニタリングプログラムの設計が重要であり、モニタリングが実行されることが消費者の健康被害を防ぐことにつながると考えられた。この結果を今後の衛生対策に反映させて行きたい。

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つための実態調査を行なうこととした。

平成 25 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、*L. monocytogenes* が継続的に検出される実態を把握した。

平成 26 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。

今年度は製造環境が改善された 1 施設

(施設 B) の調査経過の詳細を主に報告する。合わせて本研究で分離された *L. monocytogenes* の菌株解析成績についても報告する。

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。B社については、平成25年度に小売店で購入し検査した野菜浅漬けのうち同社製品は計7検体あり、うち3検体から *L. monocytogenes* が検出されていた。同社には複数の包装ラインがあるが、*L. monocytogenes* が検出された3検体は容器の形状が同じであり、同一の包装ラインで製造されたものであったことから、この包装ラインについて複数回の調査を行った。

施設のふきとり材料等は、合計115検体を採取し *L. monocytogenes* の検出を試みた。*L. monocytogenes* 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

3施設から分離した *L. monocytogenes* 72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 *L. monocytogenes* 13株の合計85株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法およびリポプリンターシステム(Dupont)による解析を実施した。

C. 研究結果

1) 施設Bの調査成績

平成26年6月30日に1回目、8月18日に2回目、11月4日に3回目の調査を

行った。施設のゾーニング等は、入室時の足洗い消毒槽とエアシャワーを設置し、原料保管冷蔵庫、下処理室、仕込み室、冷蔵下漬け室(冷蔵室)、包装室など作業区域ごとに区画されていた。原材料の殺菌はコンベア式バブリング洗浄殺菌機(残留塩素30ppm、pH6.5、2分間)を使用していた。

1回目の調査では、冷蔵室や包装室が *L. monocytogenes* に汚染されていることが明らかになった(表1)。なかでも、食品に直接接触する重石板を押さえるパイプ棒の内部(検体No.9)と計量後の個装品に調味液を充填するノズル(検体No.10)から *L. monocytogenes* が検出されたことから、機械・器具類の汚染が最終製品への汚染につながっていると考えられた。機械・器具類の洗浄方法は水洗いのみであり、こすり洗いの必要性を認識していなかったことから、特に包装機に関連する器具の形状に適したブラシを用いた日常的なこすり洗いおよび次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた浸漬・噴霧消毒の実施を指導した。

その後の2回目の調査では、製品から *L. monocytogenes* は検出されず、汚染箇所や菌数は顕著な低減を示したものの、前回菌数が多かった包装機の調味液充填ノズルと、スライダークからの *L. monocytogenes* 検出は続いていた(検体No.36、38)。また、下漬けを行う冷蔵室の床は常に濡れており、床の洗浄消毒が不十分な状況であったことから、冷蔵室の床を含め、施設内のこすり洗いの更なる徹底と次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒を指導した。

11月に実施した3回目の調査では、いずれの施設環境および食品検体も *L. monocytogenes* は陰性を示した。この調査の1カ月前に、行政の食品衛生担当者が洗浄度をその場で確認できるATPふき取り検

査を実施し、効果的な洗浄方法や洗浄・消毒の作業手順書作成を具体的に指導していた。その結果 11 月の調査時には現場に応じた洗浄・消毒の作業手順書が作成されており、指導に従って下漬時使用器具の内部洗浄に適したブラシが活用され、冷蔵室の床の清掃も実施されるようになっていた。そして包装機の調味液充填ノズルの分解洗浄消毒、コンベアベルトなどへの次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた消毒が実施されており、施設の衛生対策が改善された。

2) 施設 A および施設 C の調査成績

施設 A は、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（表 2）。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 *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* を検出したが、前回と同じ場所の検体 No.33 と 36 の定量試験での菌数は減少しており、製品から *L. monocytogenes* は検出されなかった。検体 No.32、33 では血清型 3b が検出されたが、この血清型は 1 回目の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。

施設 C は平成 26 年 7 月に調査を行った（表 3）。他の 2 施設と異なり下処理室での *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* が検出された。本施設の 2 回目の調査は行っていない。

3) PFGE 法による解析

制限酵素 *AscI* では A、B グループ（B,B1,B2：互いに 1band から 3 band 異なる）、C の 3 つに型別された。制限酵素 *ApaI* では a グループ（a,a1:2 band 異なる）、b グループ（b,b1：1 band 異なる）、c の 3 つに型別された。B2 以外の電気泳動パターンを図 1 に示す。

施設 A では平成 25 年度分離株 8 株と平成 26 年度 6 月の分離株 25 株の合計 33 株を型別し、Aa (*AscI* : A、*ApaI* : a グループ) と Bb (*AscI* : B グループ、*ApaI* : b グループ) に大別された。（表 4）。

施設 B では平成 25 年度分離株 2 株と平成 26 年度分離株 20 株の合計 22 株を型別し、血清型に関わらず全て Cc (*AscI* : C、*ApaI* : c) であった（表 5）。

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（表 6）。

4) リボプリンターシステムによる解析

施設 A では 36 株の Ribogroup が I,II,III,IV,V に型別され、多様な型が存在していた。そのうち、Ribogroup I と II が施設を持続汚染していると考えられた（表 4）。

施設 B の 23 株では、検体採取時期が異なっても同じ Ribogroup VI が検出されており、同一のグループが持続して施設を汚染していたと考えられた（表 5）。

施設 C では、Ribogroup IV と VI の 2 つのグループが施設を広く汚染していると考えられた（表 6）。

D. 考察

これまでの *L. monocytogenes* 症事例における汚染源の調査結果から、本菌は原材料から持ち込まれるというよりはむしろ製造

・加工工程で食品を汚染していると考えられている。本研究で複数回調査した施設 A および B においても、下漬をする冷蔵室の床と製品充填機周辺から施設に特有な菌株が持続的に分離され、これらの環境の洗浄が不十分であることが判明した。本菌は環境下で速やかにバイオフィーム形成を果たすが、同形質は多くの物理・化学的処理に抵抗性を示すため、製造環境に定着した場合は除去が難しいと言われている。

L. monocytogenes の除去に際して、施設 A では継続的な加熱処理を行なうことで、菌数の減少に成功した。しかし、熱湯の取扱は施設内の温度を上昇させる弊害があり、それ以外にも作業者の危険を伴うため注意が必要である。スチームクリーナーで蒸気を機械にあてる方法も、エアロゾルを発生させて *L. monocytogenes* を飛散させる可能性があることから、加熱処理は限定的に用いるほうがより効果的とも考えられる。

施設 B では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い具体的な改善方法を提示したことで、施設側の理解が深まり、*L. monocytogenes* の陰性化が実現したと考えられる。今後も機械・器具類の洗浄が適切に行われているかどうかの検証のためには定期的な製造環境モニタリングが必要と考えられた。

E. 結論

浅漬製造の 3 施設 (A、B、C 社) の協力を得て、製造環境の改善に向けた調査を行った。その結果 3 施設ともに冷蔵室や包装室の床のたまり水、そして製品包装機の拭き取り検体から *L. monocytogenes* が検出され、汚染箇所が明らかになった。分離株の遺伝子型別を通じ、施設毎に類似した遺伝子型が確認され、施設内で本菌による汚染

が持続していたと推察された。複数回の調査ならびに改善指導を行った A、B 社では、*L. monocytogenes* 対策についての理解が深まり、製品の *L. monocytogenes* 陰性化が実現した。浅漬製造施設では、製品に *L. monocytogenes* が混入する可能性のある場所の管理状態を評価するための、モニタリングプログラムの設計が重要であり、モニタリングが実行されることが消費者の健康被害を防ぐことにつながると考えられた。この結果を今後の衛生対策に反映させて行きたい。

F. 研究発表

(誌上発表)

- 1) Kanki M, Naruse H, Taguchi M, Kumeda Y. (2015) Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. *Int. J. Food Microbiol.* 211,18-22.
- 2) Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S. (2016) Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety.* doi: 10.1111/jfs.12256

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 施設 B の *L. monocytogenes* 調査成績

場所	検体名	1 回目			2 回目			3 回目	
		検体 No.	検出	菌数*	検体 No.	検出	菌数	検体 No.	検出
下処理室	壁部分の床の水	12	-						
	8 つ切りカッターの歯	17	-						
	カッター横の排水溝周り	18	-						
	床のホースの外側	19	-						
	下漬前タンク 上部内壁	25	-		27	-			
冷蔵室	床	15	+	30	28	+	<10	43	-
			1/2a,3a			1/2a,3a			
	下漬タンク 外側	16	+	10	29	-			
	下漬タンク 内壁	7	-						
	下漬タンク 水抜き部分	8	-						
	重し板(合成樹脂製)	6	-					45	-
	重し板(ステンレス製)							42	-
	コンテナ	4	-						
	ザル	5	-						
	計量器の上皿	1	-		32	-		52	-
	計量器を置く作業台	2	+	<10	33	-		51	-
			3a						
包装室	包装機(コンベア入口)	3	+	10	34	-			
			1/2a						
	包装機(コンベア中腹)				35	-			
	重しを押さえる棒(内側)	9	+	10	31	-			
			3a						
	重しを押さえる棒(外側)							44	-
	包装機 (調味液充填ノズル)	10	+	180	36	+	<10	46,47	-
			1/2a			3a			
	包装機(ヒートシート部分)	24	+	50	37	-		53	-
			1/2a,3a						
包装機(スライダ-部分)	21	+	760	38	+	<10	48	-	
		1/2a,3a			1/2a				
包装後に乗るコンベア				39	-		49	-	
包装機の下床	23	+	40	40	+	30	50	-	
		1/2a,3a			1/2a				
食品	原材料 茄子(洗浄前)	13	-						
	原材料 茄子(洗浄後)	14	-						
	カット後茄子	26	-						
	下漬終了後の茄子	11	+	<10	30	-			
			3a						
調味液	20	-							
最終製品	22	+	<10	41	-		54	-	
		1/2a							

*算出限界はふきとり水で 100 cm³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。

表 2 施設 A の *L. monocytogenes* 調査成績

場所	検体名	1回目			2回目		
		検体 No.	検出	菌数*	検体 No.	検出	菌数
下処理室	カッターの歯	3	-				
	カットしたみぶながはいるタンク	4	-				
	みぶなの根本を切るまないた	10	-				
	シャワーコンベアの洗浄中の水	11	-				
	シャワーコンベアの排水	12	-				
	カットしたみぶなを上げる台	13	-				
	カットしたみぶなを上げる台の下 の水	14	-				
	塩漬タンク内の水 (使用前)	16	-				
冷蔵室	床	9	+	90	36	+	<10
	塩漬タンクの上澄液	8	-				
下漬洗浄 室	塩漬みぶなを洗った水の廃液	7	-				
	計量カップを置く台	24	+	10	28	-	
包装室	計量カップ	25	+	<10	29	-	
	包装機 袋を回す部分	17	+	40			
	包装機 塩漬みぶな投入部分	18	+	<10	34	-	
	包装機 袋を開ける部分	19	+	10	31	-	
	包装機 調味液注入口				30	-	
	調味液廃液	23	+	60	35	-	
	包装機の下 の床	21	+	60	33	+	10
	包装機 作業台の下				32	+	35
	作業台の下 の床	22	-				
	計量前のみぶなが浸かっていた 塩水	26	-				
食品	原材料みぶなの根本、葉	1,2	-				
	洗って水を切ったみぶな	6	-				
	塩漬時使用する氷	15	-				
	塩漬したみぶな	5	-				
	しょうがと唐辛子	20	-				
	最終製品	27	+	50	37	-	

*算出限界はふきとり水で 100 cm³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。

表 3 施設 C の *L. monocytogenes* 調査成績(調査日 2014.07.24)

場所	検体名	検体 No.	検出	菌数*
	1F 塩漬け用シンク内塩水	1	-	
	1F 下準備用まな板	2	+ 1/2a	98
	1F 製造所内真空パック機横床	3	+ 1/2a	<10
	1F かぶらアク抜き用水	4	-	
下処理室	1F フードスライサー回転軸(根菜用)	5	-	
	1F フードスライサーベルト(根菜用)	6	-	
	1F 洗浄機(葉物用)金網ベルト	7	-	
	1F かぶらの皮(廃棄分)	8	-	
	1F きざみかぶら用スライサー刃	9	-	
	2F 冷蔵チャンバー内床	10	+ 3a	<10
冷蔵室	2F 冷蔵チャンバー内コンテナ	11	-	
	2F 冷蔵チャンバー内タルキャリア	12	+ 1/2a,3a	1.1×10^6
	2F 冷蔵チャンバー内床たまり水	13	+ 1/2a,3a	78
	2F 作業台	14	-	
	2F 充填機袋とりアーム	15	-	
	2F 充填機投入口	16	-	
包装室	2F 充填機本体	17	+ 1/2a	
	2F 調味液	18	-	
	2F 充填機本体かど	19	+ 1/2a	1.1×10^3
	2F ターンテーブル(充填前漬物入れるカップ置き)	20	-	
	2F 充填前漬物入れるカップすすぎ水	21	-	
	最終製品(かぶら漬)	22	-	
食品	最終製品(漬)	23	-	
	最終製品(白菜漬)	24	+ 1/2a	<10

*算出限界はふきとり水で 100 cm³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。

表 4 施設 A 分離 *L. monocytogenes* の解析成績

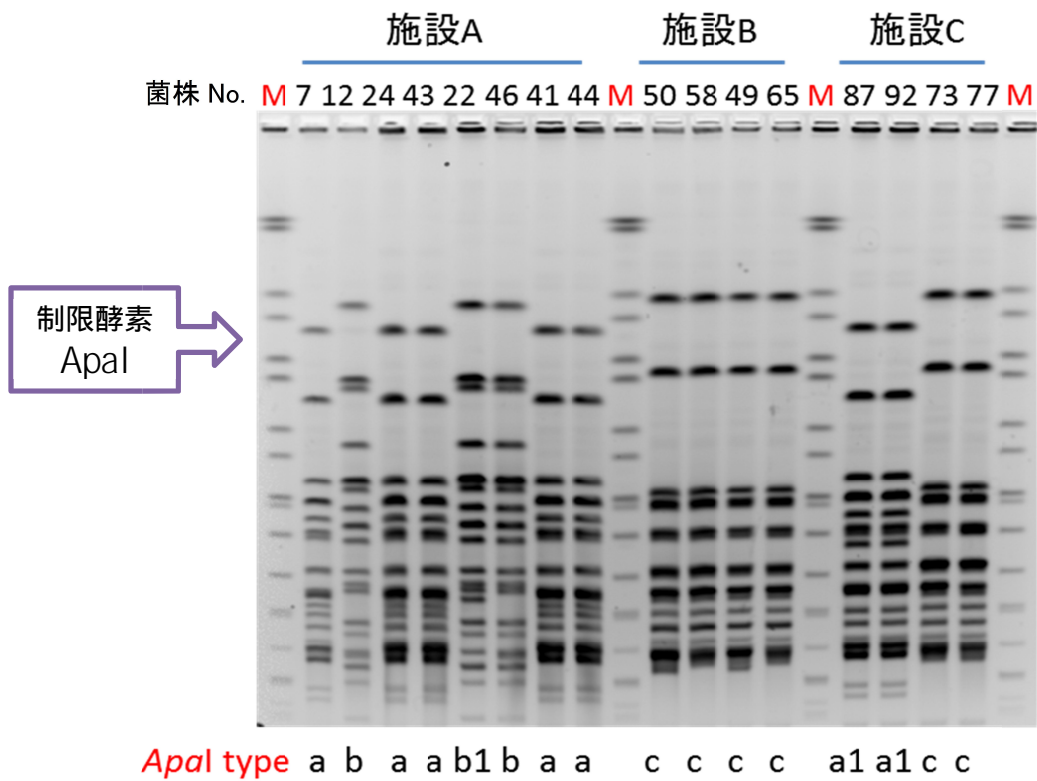
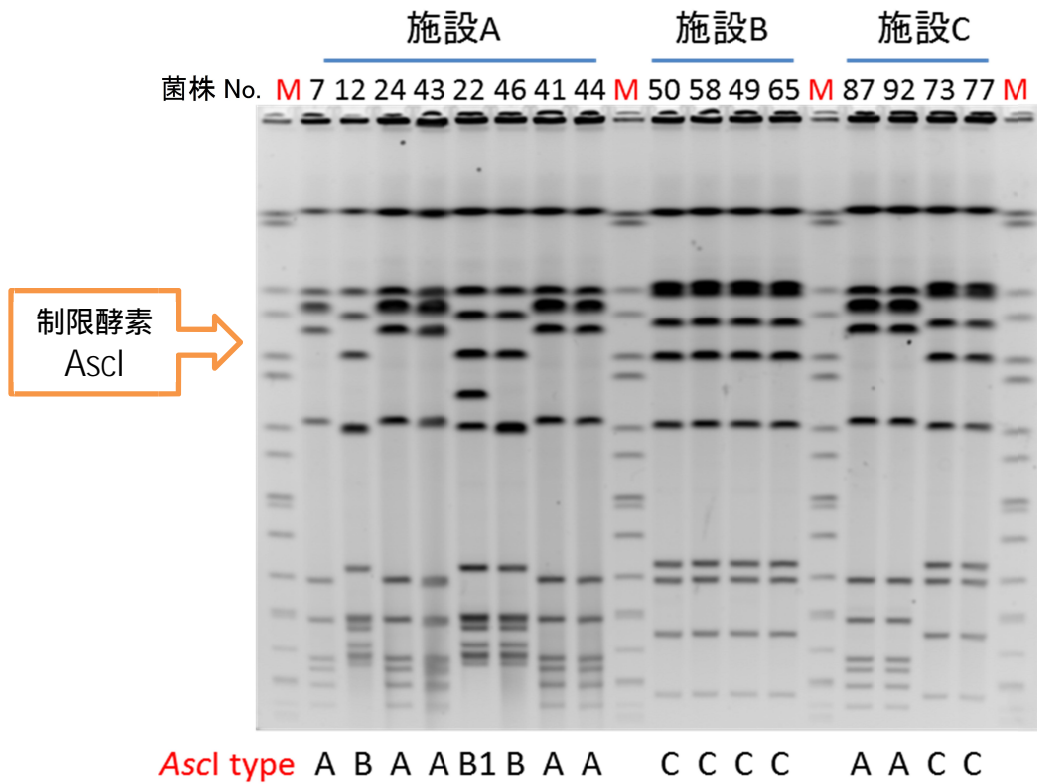
採取場所	検査日	検体 No.	検体名	菌株 No.	血清型	Ribo Group	PEGE profile		
							Ascl	/	Apal
製品	2013.05.21	MH5	市販製品(みぶな)	1	1/2b	II	B2	/	b
	2013.08.19	MH19	市販製品(みぶな)	3	1/2b	II	B	/	b
				7	1/2a	I	A	/	a
	2013.10.07	MH48	市販製品(みぶな)	8,9	1/2a	I			
				10,11	1/2b	III	B	/	b
	2013.10.07	MH49	市販製品(みぶな)	12	1/2b	III	B	/	b
	2014.02.03	MH85	市販製品(みぶな)	16	1/2a	I	A	/	a
17				1/2b	II				
冷蔵室	2014.06.16	9	冷蔵室内の床	21,23	1/2a	IV	A	/	a1
				22	1/2b	V	B1	/	b1
包装室	2014.06.16	24	計量カップを置く台	38,39	1/2a	I	A	/	a
				40	1/2b	II	B	/	b
				33,37	1/2a	I	A	/	a
	2014.06.16	23	調味液廃液	34	3a	I	A	/	a
				35,36	1/2b	II	B	/	b
	2014.06.16	17	包装機袋を回す部分	24,25	1/2a	I	A	/	a
	2014.06.16	25	計量カップ	42	1/2a	I	A	/	a
				41	3a	I	A	/	a
	2014.06.16	19	包装機袋を開ける部分	27,28	1/2a	I	A	/	a
	2014.06.16	18	包装機みぶな投入部分	26	1/2a	I	A	/	a
				30,32	1/2a	I	A	/	a
	2014.06.16	21	包装機の下の床	29	3a	I	A	/	a
				31	1/2b	II	B2	/	b
				43,45	1/2a	I	A	/	a
食品	2014.06.16	27	最終製品(みぶな)	44	3a	I	A	/	a
				46	1/2b	II	B	/	b
				14 検体	36 株				

表 5 施設 B 分離 *L. monocytogenes* の解析成績

採取 場所	検査日	検体 No.	検体名	菌株 No.	血清 型	Ribo Group	PEGE profile		
							Ascl	/	Apal
製品	2013.08.19	MH23	市販製品(茄子)	4	1/2a	VI	C	/	c
	2013.10.07	MH42	市販製品(茄子)	6	1/2a	VI			
	2013.10.15	MH62	市販製品(白菜)	14	1/2a	VI	C	/	c
冷蔵室	2014.06.30	16	冷蔵中の下漬タンク外側	55	1/2a	VI	C	/	c
	2014.06.30	15	冷蔵室の床	53	1/2a	VI	C	/	c
				54	3a	VI	C	/	c
				64	1/2a	VI	C	/	c
	2014.08.18	28		63	3a	VI	C	/	c
包装室	2014.06.30	2	計量器を置く作業台	47	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	3	包装機(コンベア)	48	1/2a	VI	C	/	c
	2014.06.30	9	下漬の重しを押さえる棒	49	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	10	包装機	50	1/2a	VI	C	/	c
	2014.08.18	36	(調味液充填ノズル)	65	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	24	包装機 (ヒートシート部分)	61	1/2a	VI	C	/	c
				62	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	21	包装機(スライダー)	56	1/2a	VI	C	/	c
				57	3a	VI	C	/	c
	2014.08.18	38	包装機(スライダー)	66	1/2a	VI	C	/	c
	2014.06.30	23	包装機の下の床	59	1/2a	VI	C	/	c
60				3a	VI	C	/	c	
2014.08.18	40		67	1/2a	VI	C	/	c	
食品	2014.06.30	11	中間製品 (下漬後の茄子)	52	3a	VI	C	/	c
	2014.06.30	22	最終製品(茄子)	58	1/2a	VI	C	/	c
18 検体				23 株					

表 6 施設 C 分離 *L. monocytogenes* の解析成績

採取場所	検体 No.	検体名	菌株 No.	血清型	Ribo Group	PEGE profile		
						Ascl	/	Apal
下処理室	2	1F 下準備用まな板	68,69,70	1/2a	VI	A	/	a1
	3	1F 製造所内 真空パック機横床	71,72	1/2a	VI	A	/	a1
冷蔵室	10	2F 冷蔵チャンパー内床	73,74,75	3a	VI	C	/	c
	12	2F 冷蔵チャンパー内 タルキャリアー	76,79 77,78,80	1/2a 3a	IV IV	A C	/	a1 c
		13	2F 冷蔵チャンパー内 床たまり水	81,84,86 82,83,85	1/2a 3a	IV IV	A C	/
包装室	17	2F 充填機本体	87,88	1/2a	IV	A	/	a1
	19	2F 充填機本体かど	89,90,91	1/2a	IV	A	/	a1
食品	24	最終製品(白菜)	92,93	1/2a	IV	A	/	a1
8 検体			26 株					



M : Salmonella Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain

図 1 *Listeria monocytogenes* の PEGE profile

平成27年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究」

分担研究報告書

衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品の衛生実態に関する研究

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	吉村昌徳	日本冷凍食品検査協会関西事業所
研究協力者	須田貴之	日本食品分析センター大阪支所
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	橋 理人	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	小西良子	麻布大学 生命・環境科学部
研究協力者	倉園久生	帯広畜産大学 畜産衛生学専攻
研究協力者	牧野壮一	京都聖母女学院短期大学
研究協力者	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：本研究では、衛生規範の改正前後に市販された同一の浅漬け計8製品を対象として、衛生指標菌汚染実態ならびに構成菌叢に関する比較検討を行った。改正前後で各製品6検体（計96検体）を対象に指標菌数の比較を行ったところ、7製品で改正後に有意な大腸菌群数の低下を認めた。これに対し、乳酸菌数については、7製品を除き改正後に有意な増加を示した。大腸菌については何れの製品もサンプリング時期に関わらず、陰性であった。16S rRNA pyrosequencing法による菌叢解析の結果として、計6製品では、改正後検体において *Roseateles* 属菌の構成比率に明瞭な減少を認めると共に、4製品では改正後に *Leuconostoc* 属菌の構成比率の上昇を認める等、改正前後で構成菌叢の顕著な変動を示す製品が多数を占めた。規範の改正を通じ、大腸菌群数の増加を示した1製品については、優勢菌叢が *Leuconostoc* 属より *Buttiauxella* 属へと変動を認めた。後者については、大腸菌群に分類されることから、規範改正後における同菌数の増加は、本属菌によるものと推察された。本研究の成績より、衛生規範の改正に伴い、供試製品の細菌学的衛生状況は改善されたことが実証された。また、大腸菌群には複数の植物性常在菌叢が含まれることから、浅漬け等、原材料由来菌叢を包含する非動物性食品に係る衛生指標としては望ましくはなく、大腸菌等がこれに代わり得るものと想定された。

A. 研究目的

非動物性の加工食品の中で、浅漬けについては、北海道で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事例をはじめとして、サルモネラ属菌やリステリア・モノサイトゲネス等の病原細菌による食品汚染ならびに食中毒発生事例が報告されている。

生鮮野菜あるいは軽度の加工調理野菜は、植物が元来保有する栄養成分の摂取が図ら

れることがメリットとして認識されてきたため、その消費量も増加傾向にあるが、これに応じて当該食品の喫食に伴う食中毒事例も増加傾向にあり、その対策が求められている。

2012年に発生した白菜の浅漬けを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事例を契機として、厚生労働省

では、漬物の衛生規範を改正し、同食品の製造工程における衛生管理対策が周知されてきた。本研究班では、これまでに衛生規範改正直後に、浅漬け製造施設の協力を得て、製造工程の実態検証に係るパイロットスタディを行い、塩素消毒及び塩蔵工程が病原細菌汚染制御に有効に機能する実態を検証してきた。しかしながら、同施設の規範前の衛生管理実態については不明である他、改正を通じた市販製品の衛生実態についても不明であることから、本研究最終年度では、衛生規範前後に流通した、計 8 製品・96 検体の市販浅漬け製品を対象に、主要指標菌の定量及び構成菌叢解析を行い、衛生状況に関する比較検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 浅漬け検体

計 4 製造施設において製造され、東京都内で市販される、8 製品を対象として、改正前（2013 年 2 月）及び改正後（2015 年 3 月）に、各製品 6 検体を入手した（計 96 検体）。なお、各製品の主原料となる野菜は、白菜・茄子・胡瓜・大根・野沢菜である。何れの製品についても、販売店で直接購入し、10 以下で所属機関に移送、試験に供した。

2. 衛生指標菌の定量検出

検体 10g を採材し、滅菌鋏を用いて細切後、90mL の緩衝ペプトン水（BPW）を含む滅菌ストマッカー袋に加えた。6 ヒストローク/秒の速度で 1 分間ホモゲナイズした後、100 μ L を標準寒天培地、VRBL（Violet Red Bile Lactose）寒天培地、MRS

寒天培地（何れも Oxoid）に塗布し、一般生菌数、大腸菌群数、乳酸菌数をそれぞれ求めた。また、同懸濁液 1mL を別途、TBX 寒天培地（メルク - ミリポア）に混釈法により接種し、大腸菌の定量検出をあわせて行った。

3. 16S rRNA pyrosequencing 解析

上述の検体懸濁液 10mL を 21, 500 x g にて 10 分間遠心分離後、上清を捨て、沈査を得た。同沈査より、PowerFood DNA Extraction Kit (MO BIO)を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 溶液を鋳型として、799f/1115r プライマーを用いて 16S rRNA 部分領域を PCR 増幅し、E-gel Size Select 及び AMPure XP を用いて精製した。DNA 濃度を定量後、計 48 検体より抽出した PCR 増幅産物を混合し、Ion Chef/ Ion PGM system (Thermo Fisher Scientific) を用いた Pyrosequencing に供した。

4. 菌叢データ解析

出力された fastaq ファイルについて、検体別に分離・不要配列除去後、fasta ファイルに変換し、RDP classifier を通じて、各検体における構成菌叢に関するデータを得た。バーチャートの作成等においては、METAGENOME@KIN(ワールドヒュージョン) を用いた。

C. 結果

1. 衛生規範改正前後に市販された浅漬け製品における衛生指標菌の動態比較

2013 年 12 月の衛生規範改正前（2013 年 2 月）および改正後（2015 年 2 月）に、4 施設にて製造された、計 8 種の浅漬け製

品を対象として、製品・サンプリング時期の別にそれぞれ6検体(計96検体)における衛生指標菌数を直接塗抹法により求め、改正前後での各製品の衛生状況に関する知見の収集をはかった。サンプリング時期別の比較成績概要については、表1に記す。

生菌数については、検体全体を対象とした改正前後での比較により有意差は認められず、改正前の平均生菌数は 2.52×10^6 CFU/g、改正後の同数値は 2.05×10^6 CFU/gであった。製品別では、計5製品では改正前後で有意差を以て数値の変動が認められた($p < 0.05$)が、残り3製品の同数値は改正前後で有意差を認めなかった。

大腸菌群については、製品全体での平均値が改正前で 1.77×10^3 CFU/g、改正後では 2.57×10^4 CFU/gと若干上昇傾向にあった。しかしながら、製品別での比較を通じ、同数値の多くは製品 No. 5に因るものであることが明らかとなり、他の6製品(製品 No. 1, 2, 3, 4, 7, 8)について、製品別に改正前後間での同菌数を比較検討したところ、有意差をもって減少傾向を示した($p < 0.05$)。なお、大腸菌については本研究で供試した全ての検体で陰性となった。

乳酸菌数については、改正前の平均値が 3.17×10^5 CFU/gであったのに対し、改正後には 9.93×10^5 CFU/gと増加傾向を示した。製品別では、計4製品(製品 No. 5, 6, 7, 8)において有意な増加を認めた($p < 0.05$)。一方、製品 No. 2およびNo.3における乳酸菌数は、改正後に減少を示した。

以上の結果より、衛生規範の改正を通じて、供試対象とした市販浅漬け製品における各種衛生指標菌は顕著に変動したことが明らかとなった。

2. 衛生規範改正を通じた、市販浅漬け製品の構成菌叢変動

(i) 優勢菌叢の変動

衛生規範改正前における優勢構成菌叢は、*Roseateles* spp. (平均構成比 40.56%)、*Leuconostoc* spp. (同 19.72%)、*Rhizobium* spp. (6.71%)、*Sphingomonas* spp. (6.59%)、*Methylobacterium* spp. (3.28%)等であった。一方、同規範改正後における各製品の優勢菌叢については、*Leuconostoc* spp. (32.52%)、*Lactobacillus* spp. (23.60%)、*Buttiauxella* spp. (11.20%)、*Pseudomonas* spp. (5.87%)、*Sphingomonas* spp. (5.47%)等となり、何れの製品においても、最も優勢となる菌叢については改正前後で異なっていた(図1)。

(ii) 大腸菌群に分類される菌叢の検証

大腸菌群に属すると推察される菌属として、供試検体より検出されたものは、*E. coli* の他、*Klebsiella*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* spp.等があった。大腸菌群は、更に糞便由来または非糞便(環境)由来とする細分類の他、病原性を指標とした識別も学術的には行われている。製品別に見た、改正前後での構成菌叢比較を通じ、製品 No. 5では、*Buttiauxella* spp.の構成比が、改正前の 2.02×10^{-2} %から改正後には 83.19%にまで急激に増加している実態が把握された(図1)。

(iii) 乳酸菌構成比の変動

構成菌叢解析を通じ、供試検体において乳酸菌として検出された菌属としては、*Aerococcus*, *Carnobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococ*

cus, *Vagococcus*, *Weissella* spp.等が含まれると想定された。漬物製品一般において高頻度に検出される乳酸菌としては、*Lactobacillus* spp.や*Leuconostoc* spp.が知られている (Saeedi et al., 2015)。浅漬け製品を構成する乳酸菌に該当する菌叢の構成比は、全検体では改正前で25.40%であったが、改正後には57.00%と増加傾向にあった。製品別での比較により、計4製品(製品No. 3, 4, 6, 7)では改正後に有意な乳酸菌に該当する菌属構成比の増加が確認された(表2)。一方、製品No. 2及びNo. 5では改正後の乳酸菌構成比率は改正前に比べ、減少傾向にあった。

(iv) 主要食中毒起因菌の構成比変動

EHEC, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* は生鮮野菜・果実に起因する細菌性食中毒の主たる原因菌として知られている (De Roever 1998)。改正前後でのこれら3菌属(種)の構成比比較を行ったところ、*Salmonella* spp.については、衛生規範改正前の製品No. 5より検出され、その構成比は、 2.23×10^{-3} %であったが、改正後検体は何れも陰性を示した。また、*Listeria* spp.については、改正前の3製品(No. 2, 5, 7)より検出され、その構成比はそれぞれ 1.42×10^{-30} %, 1.05×10^{-20} %, 2.15×10^{-30} %であり、改正後検体での同菌由来遺伝子は製品No.5の1検体のみから認められた(データ未載)。

D. 考察

本研究では、2013年に改正された漬物の衛生規範に従って製造された市販浅漬け製品に加え、同規範改正以前に流通した、同一製品を対象として、衛生規範改正前後に

おける市販浅漬け製品の衛生状況に関する実態調査を行った。

衛生指標菌数に関する検討を通じ、大腸菌群については複数製品において減少傾向が認められ、乳酸菌数については反対に増加傾向を示す製品が複数認められた。生菌数については明確な変動は認められなかった他、大腸菌については全ての供試検体で陰性を示した。これらの成績を勘案すると、衛生規範改正に伴い、供試製品については、衛生状況の改善が図られたと考えられる。その一方、同規範改正を通じた比較検討成績は、浅漬けをはじめとする非動物性食品の製造工程における衛生指標として、生菌数や大腸菌群を用いる意義は必ずしも高いとは言い難く、欧州等で報告されているように、大腸菌を用いた衛生管理を行う必然性を提唱していると目される。その導入にあたっては、更なる検証データの集積が必要と考えられる。

菌叢解析の結果より、供試製品における優勢菌叢は、衛生規範の改正前後で大きな変動を示した。改正前に優勢菌叢として同定された、*Roseateles* spp., *Rhizobium* spp., 及び *Sphingomonas* spp.については、生鮮野菜・果実より高頻度に分離されている (Enya et al. 2007) が、これらは薬剤耐性菌としての報告もある他、疾病との関連性も示唆されている (Lai et al., 2001; Kilic et al., 2007)。これらの構成比の低減は従って、微生物危害の低減につながるものと示唆され、衛生規範改正に伴う、製品の衛生状況改善が果たされたものと考えられる。

一方、大腸菌群に属する *Buttiauxella* spp. については、1製品 (No. 5) において優勢

な構成比を示した。当該菌については、非糞便性の非病原細菌であり、土壌や植物、水等の環境由来細菌として知られる(Coats and Rumpho, 2014; Balzer et al., 2010)。製品 No. 5 は改正後に大腸菌群数を増加させていたが、菌叢解析の成績より、同数値の増加は、病原性を有する大腸菌群によるものではないと目された。

乳酸菌数は、改正後の複数製品において増加を認めたが、これに呼応した形で乳酸菌に含まれる菌叢の構成比も増加傾向を示した。乳酸菌はバイオフィルム形成等を介して、酸等の環境ストレスに抵抗性を示す(Kubota et al., 2009) 他、一部の乳酸菌については、0.04%以上の次亜塩素酸ナトリウムに対して抵抗性を示すこと(Arioli et al., 2013) も知られている。衛生規範改正に伴う、次亜塩素酸ナトリウムの使用励行が、結果として乳酸菌の生残に有効に機能していることが示唆された。

漬物の衛生規範改正に伴う製造工程管理の在り方を考える上では、HACCP 導入についても考慮する必然性がある。本研究における成績は、衛生規範改正に伴う浅漬け製品の衛生状況の改善を確認できた一方、HACCP 導入に向けて求められる衛生管理上、必要不可欠な衛生指標の在り方に関する課題も提起された。欧州では生鮮野菜の製造衛生管理上、大腸菌を用いることが近年提唱されており、同基準の設定については、今後の我が国における生鮮野菜あるいは軽度の加工を行う非動物性食品の製造基準の在り方を議論・整理する必要がある。

E. 結論

本研究では、市販浅漬け計 8 製品を対象として、衛生規範改正前後での衛生状況の比較を行うため、各種衛生指標菌の定量検出及び構成菌叢を比較した。同成績により、衛生規範の改正後に市販される供試浅漬け製品については、微生物危害の低減が図られたことが実証された。また、指標菌動態と構成菌叢の併用を通じ、野菜等を原材料とする食品の製造工程における衛生管理には、大腸菌群等は不適であり、大腸菌を使用する利点が挙げられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

・Asakura H, Tachinaba M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S. Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety*. In press. doi: 10.1111/jfs.12256

2. 学会発表

・橘理人、吉村昌徳、山本詩織、春日文子、五十君静信、朝倉宏．衛生規範改正前後における市販浅漬け製品の指標菌数ならびに菌叢動態に関する比較検討 第 42 回日本防菌防黴学会総会．2015 年 9 月．大阪．

・吉村昌徳、磯陽子、橘理人、須田貴之、小西良子、春日文子、五十君静信、朝倉宏．芽物野菜の種子における微生物汚染と、発育に応じた菌叢動態に関する検討．第 42 回日本防菌防黴学会総会．2015 年 9 月．大阪．

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- Arioli S, Elli M, Ricci G, Mora D. 2013. Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *Int. J. Food Microbiol.* 163:1-5.
- Balzer M, Witt N, Flemming HC, Wingender J. 2010. Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Sci. Technol.* 61:1105-11.
- Coats VC, Rumpho ME. 2014. The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Front Microbiol.* 23:368.
- De Roever C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control.* 9:321-47.
- Enya J, Shinohara H, Yoshida S, Tsukiboshi T, Negishi H, Suyama K, Tsushima S. 2007. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microb. Ecol.* 53:524-36.
- Kilic A, Senses Z, Kurekci AE, Aydogan H, Sener K, Kismet E, Basustaoglu AC. 2007. Nosocomial outbreak of *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in a hemato/oncology unit. *Jpn J Infect Dis.* 60:394-6.
- Kubota H, Senda S, Tokuda H, Uchiyama H, Nomura N. 2009. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiol.* 26:592-7.
- Lai CC, Teng LJ, Hsueh PR, Yuan A, Tsai KC, Tang JL, Tien HF. 2004. Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 38:149-53.
- Saeedi M, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Yazdi FT. 2015. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Winter Salad (Local Pickle) during Fermentation Using 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *J. Food Safety.* 35:287-94.

表 1 . 衛生規範改正前後間での市販浅漬け製品における衛生指標菌数の比較 .

生菌数							
No.	主原料	施設	衛生規範改正前		衛生規範改正後		p 値*
			平均値±SD (CFU/g)		平均値±SD (CFU/g)		
1	白菜	A	4.47E+03	± 1.20E+03	4.25E+03	± 6.60E+02	0.35409
2	白菜	A	1.27E+04	± 1.90E+03	8.31E+03	± 4.88E+03	0.04217
3	胡瓜	A	5.10E+05	± 1.12E+06	3.72E+03	± 5.34E+02	0.16013
4	茄子	A	7.67E+02	± 3.34E+02	3.70E+03	± 8.05E+02	0.00005
5	茄子	A	1.85E+07	± 6.28E+06	1.34E+07	± 2.92E+06	0.05596
6	茄子	B	2.33E+02	± 2.16E+02	6.93E+04	± 7.92E+04	0.04290
7	大根	C	7.81E+03	± 7.70E+03	3.75E+04	± 1.92E+04	0.01100
8	野沢菜	D	1.10E+06	± 1.28E+06	2.90E+06	± 1.74E+06	0.03589
平均菌数(CFU/g)			2.52E+06	± 6.48E+06	2.05E+06	± 4.57E+06	0.34153

大腸菌群数							
No.	主原料	施設	衛生規範改正前		衛生規範改正後		p 値*
			平均値±SD (CFU/g)		平均値±SD (CFU/g)		
1	白菜	A	2.71E+03	± 1.26E+03	1.67E+01	± 4.08E+01	0.00162
2	白菜	A	8.58E+02	± 2.87E+02	2.00E+02	± 3.03E+02	0.00159
3	胡瓜	A	4.03E+02	± 2.50E+02	0.00E+00	± 0.00E+00	0.00541
4	茄子	A	2.00E+02	± 7.07E+01	0.00E+00	± 0.00E+00	0.00048
5	茄子	A	5.97E+03	± 4.27E+03	2.06E+05	± 7.26E+04	0.00054
6	茄子	B	1.26E+02	± 1.99E+02	0.00E+00	± 0.00E+00	0.09153
7	大根	C	1.17E+02	± 7.53E+01	1.67E+01	± 4.08E+01	0.01099
8	野沢菜	D	3.78E+03	± 2.38E+03	5.00E+01	± 5.48E+01	0.00603
平均菌数(CFU/g)			1.77E+03	± 2.64E+03	2.57E+04	± 7.27E+04	0.01349

乳酸菌数							
No.	主原料	施設	衛生規範改正前		衛生規範改正後		p 値*
			平均値±SD (CFU/g)		平均値±SD (CFU/g)		
1	白菜	A	6.25E+05	± 1.96E+05	5.93E+05	± 3.41E+05	0.42258
2	白菜	A	4.00E+05	± 1.95E+05	1.70E+05	± 4.85E+04	0.01660
3	胡瓜	A	5.55E+03	± 2.24E+03	2.50E+02	± 1.05E+02	0.00107
4	茄子	A	1.93E+02	± 9.03E+01	2.83E+02	± 4.31E+02	0.31808
5	茄子	A	4.39E+05	± 3.07E+05	4.40E+06	± 1.41E+06	0.00038
6	茄子	B	8.22E+03	± 1.03E+04	1.65E+05	± 1.43E+05	0.02173
7	大根	C	1.06E+05	± 6.88E+04	7.44E+05	± 2.05E+05	0.00016
8	野沢菜	D	9.52E+05	± 6.88E+05	1.86E+06	± 7.15E+05	0.02398
平均菌数(CFU/g)			3.17E+05	± 4.22E+05	9.93E+05	± 1.52E+06	0.00227

*採材時期の違いによる数値の有意差を求めるため、本研究では t 検定を用い、p 値が 0.05 以下の場合は有意差があると判定した (太字で示す)。

表 2 . 衛生規範改正前後間での、主要乳酸菌構成比率の比較 .

No.	主原料	施設	衛生規範改正前		衛生規範改正後		p値*
			平均値± SD (%)		平均値± SD (%)		
1	白菜	A	3.25E+00	± 2.51E+00	7.94E-01	± 2.57E-01	0.07011
2	白菜	A	4.26E+01	± 1.21E+01	1.65E+01	± 3.63E+00	0.00885
3	胡瓜	A	6.63E-01	± 3.72E-01	8.45E+01	± 9.17E+00	0.00203
4	茄子	A	5.13E-01	± 4.50E-01	7.52E+01	± 8.97E+00	0.00021
5	茄子	A	9.66E+01	± 9.29E-01	1.00E+01	± 3.39E+00	0.00001
6	茄子	B	6.28E+00	± 2.93E+00	9.89E+01	± 5.12E-01	0.00000
7	大根	C	1.92E+01	± 9.20E-01	9.67E+01	± 7.85E-01	0.00000
8	野沢菜	D	3.00E+01	± 2.76E+01	8.03E+01	± 2.18E+01	0.06713
平均値(%)			2.54E+01	± 3.23E+01	5.70E+01	± 4.04E+01	0.00522

*採材時期の違いによる有意差を求めるため、本研究では t 検定を用い、p 値が 0.05 以下の場合は有意差があると判定した (太字で示す)。

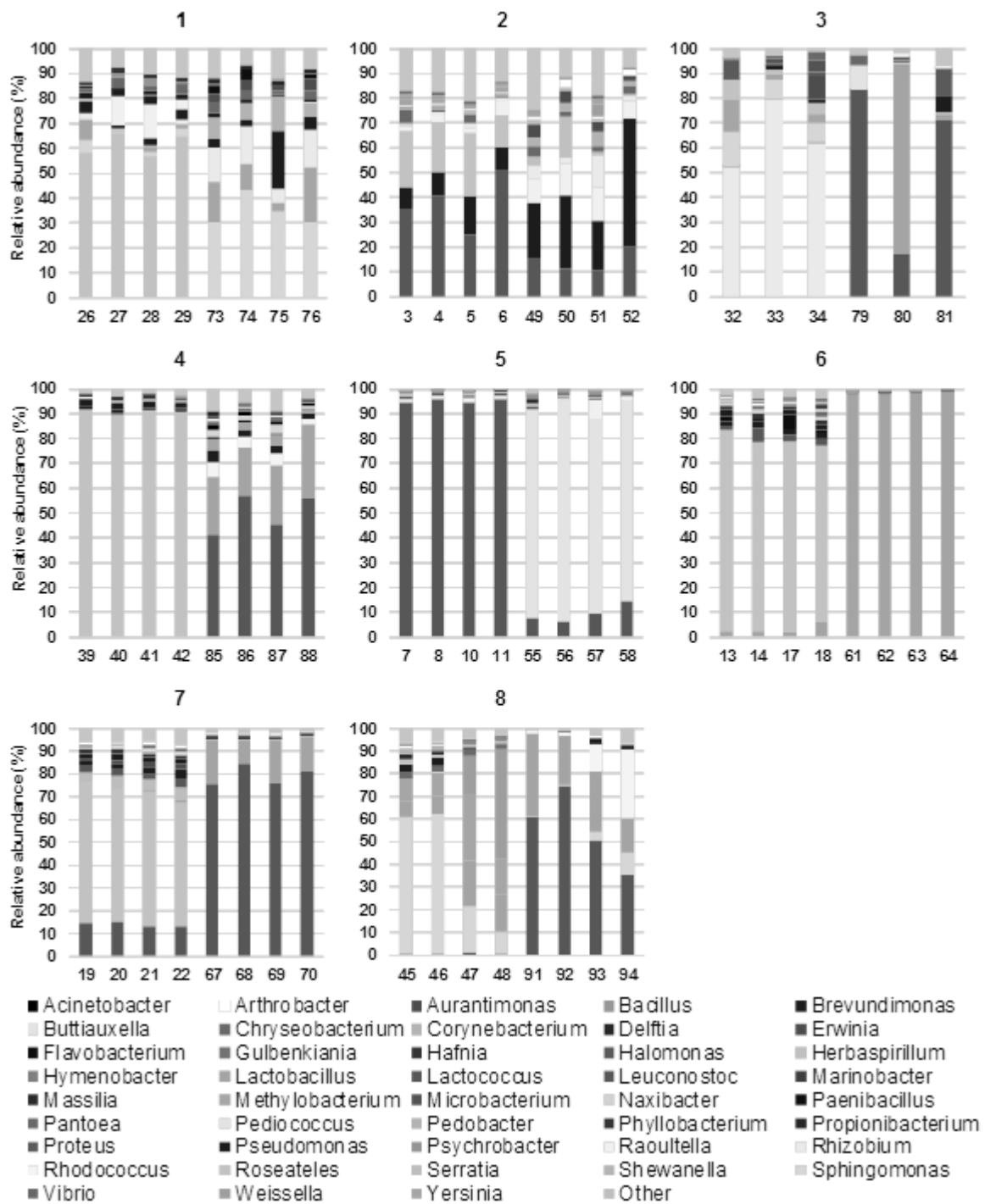


図1. 衛生規範改正前後間での市販浅漬け製品構成菌叢の比較.

各製品について、衛生規範改正前後で各3検体を無作為に抽出し、16s rRNA pyrosequencing 解析に供し、構成菌叢を同定した成績(属レベル)を示す。各製品より上位15菌属を比較対象とし、グラフ作成にあたった。

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究」

漬物の衛生規範に関する実態調査 - 真菌調査 -

研究協力者 NPO 法人カビ相談センター 高鳥浩介
高鳥美奈子
田中詩乃
相模女子大学 太田利子
高崎健康福祉大学 村松芳多子
桐生大学 高橋淳子

研究要旨：漬物 105 点について漬物の衛生規範における真菌調査を実施した。

(1) 漬物の酵母試験結果：供試試料中 6 割は酵母を確認できなかったが、酵母の検出された試料中には $10^2 \sim 10^4$ 個/g 以上が認められた。本研究で用いた漬物は未加熱試料のため *Saccharomyces cerevisiae* の出現頻度が高かった。一部に漬物由来といえない酵母種が確認でき、産膜酵母などの汚染源になると推察できる。

(2) 漬物のカビ試験結果：供試試料中 7 割はカビの検出はみられなかったが、カビ検出された試料中には 10^2 個/g 程度のカビが認められた。本研究の重要な課題であるカビ種は、日和見感染カビとして *Exophiala* 等が確認された。

(3) 加熱処理した漬物での事故事例：過去のカビ事故が発生した加熱処理済み漬物 2 件の事例は、いずれも地場産業として販売している食品であった。それらの試料からは耐熱性カビが確認された。

漬物の真菌調査から近年の漬物は低塩あるいは加熱加工品であることによる真菌事故例が今後危惧され、漬物の衛生管理及び試験法等の衛生規範の見直しが求められる。

A. 研究目的

漬物の衛生規範は、当時厚生省から昭和 56 年 9 月 24 日付 環食第 214 号で通知され、その内容は漬物に係る衛生上の危害の発生を防止するため、その原料の受入れから製品の販売までの各過程における取扱い等の指針を示し、漬物に関する衛生の確保及び向上を図ることであった。

ところが漬物の浅漬けでの事故事例が発生し、平成 25 年 12 月 13 日付 食安発 1213 第 2 号 漬物に係る衛生上の危害の発生防

止するため漬物に関する衛生の確保及び向上を図ることを目的として衛生規範の見直しがされた。ただし、漬物の衛生規範としての真菌については、現在も昭和 56 年通知のままである。時代の変化から様々な漬物が市場に出回りさらに健康志向の観点から減塩食品が出回るようになり、現実に苦情もみられてきた。

そこで、漬物の真菌の実態を調査して今後の取り組みに情報を提供したく本調査を計画した。

B. 研究方法

(1) 調査および材料

平成 27 年 4 月～12 月の期間に国内で販売されている漬物入手した。入手地域は図 1、表 1 のとおりであり、入手漬物の種類は表 2、図 2 にまとめた。

本研究の漬物は表 1 でわかるように国内広域にわたって入手している。なお、なるべくその地域で流通している漬物入手した。したがって国内各地に共通するいわゆるきわめて十分に衛生管理された漬物ではなく、その地域で食品として販売されている漬物を対象試料とした。また漬物の種類は、規範にある材料を広く入手するため計画的に集めるよう心がけた(図 2)。

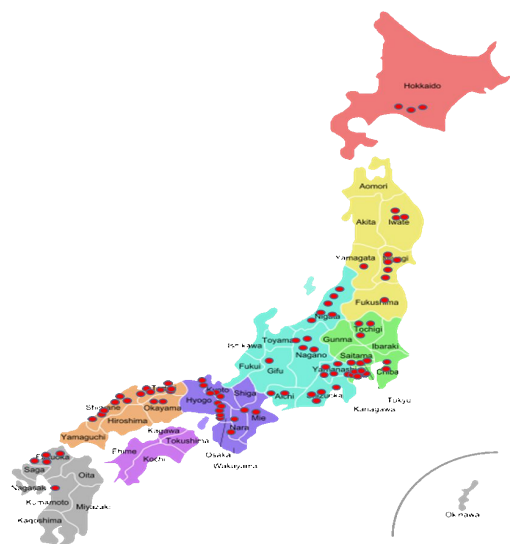


図 1 漬物入手の都道府県別分布

入手した地域は神奈川県が最も多く 24 件であり、あとは北海道から九州まで各地から入手した。漬物の種類と材料をみてもわかるように塩漬、醤油漬などさまざまな野菜が用いられていた。

表 1 都道府県別の漬物の入手数

都道府県名	数	都道府県名	数
北海道	3	岐阜県	1
岩手県	3	静岡県	4
宮城県	5	愛知県	2
山形県	1	三重県	2
福島県	1	京都府	5
栃木県	3	大阪府	5
群馬県	3	奈良県	2
千葉県	2	鳥取県	7
東京都	3	島根県	6
神奈川県	24	岡山県	2
新潟県	6	福岡県	4
山梨県	4	熊本県	1
長野県	4	不明	2

表 2 供試漬物の種類と材料

漬物の種類	材料
塩漬 20	うど 1 かぶ 1 大根 1
	きゅうり 4 野沢菜 1 高菜 1
	キャベツ 1 白菜 4 なす 5
	らっきょう 1
醤油漬 16	きゅうり 5 なす 1 めかぶ 1
	ごぼう 2 野沢菜 1 らっきょう 1
	大根 3 白菜 2
みそ漬 6	きゅうり 2 大根 3 にんにく 1
かす漬 10	うり 2 ぶき 1 菜の花 1
	きゅうり 4 メロン 1 わさび 1
こうじ漬 5	きゅうり 2 大根 2 なす 1
酢漬 16	かぶ 4 大根 2 しょうが 2
	きゅうり 1 長芋 1 らっきょう 6
ぬか漬 18	うり 2 なす 2 大根 8
	きゅうり 5 人参 1
からし漬 2	きゅうり 1 なす 1
もろみ漬 1	すいか 1
キムチ 10	大根 1 白菜 9
甘露煮 1	梅 1

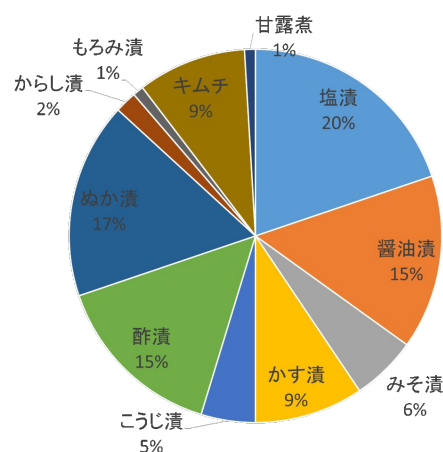


図 2 漬物の種類別割合

(2) 試験法

1) 酵母の試験法（漬物の衛生規範による）

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

表 3 酵母数試験法

酵母(生菌数1000個以下)	
試料	(1) パック中の検体すべてを対象とし均質な試料とする。 (2) 供試する量は1検体10gとする。 (3) 試料希釈液の調製はワーリングブレンダー(ホモジナイザー)を用い、希釈用の滅菌液は、生理食塩水を使用する。
培地	(4) ポテト・デキストロース寒天培地を使用し、下記の薬品を添加する(1000mlあたり)。 NaCl 50g クロラムフェニコール 100mg プロピオン酸ナトリウム 2g 培地のpHは5.4に調整する。
方法	(5) 塗抹法または混釈平板法による。 (6) 培養の条件は25℃で3~5日間
判定	(7) 計測は10倍、100倍、1000倍各希釈段階につき平板3枚の平均集落数とし、集落数が10~100個の範囲内にある希釈段階の実測値を以て表示する。 もし10倍希釈で集落数10個以下の場合は $< 10 \times 10$ とし、また1000倍希釈で集落数100個以上の場合は $> 100 \times 10^3$ として示す。
上記以外の具体的操作については、食品衛生検査指針微生物編準用	

2) カビの試験法（漬物の衛生規範による）

カビの試験法はポテト・デキストロース寒天培地を基本に抗生物質のクロラムフェニコールを添加した培地で試験する。

培養方法として塗抹法が用いられており、真菌用培地平板 3 枚の平均集落数と記されている。しかし具体的な培地摂取量が記載されていない

その衛生規範を表 4 に示した。

表 4 カビ数試験法

カビ(陰性であること)	
試料	(1) パック中の検体すべてを対象とし均質な試料とする。 (2) 供試する量は1検体10gとする。 (3) 試料希釈液の調製はワーリングブレンダー(ホモジナイザー)を用い、希釈用の滅菌液は、生理食塩水を使用する。
培地	(4) ポテト・デキストロース寒天培地を使用し、下記の薬品を添加する(1000mlあたり)。 クロラムフェニコール 100mg 培地のpHは5.4に調整する。
方法	(5) 塗抹法による。 (6) 培養の条件は25℃で5~7日間
判定	(7) カビ集落発生の有無は通常10倍希釈段階の平板各3枚を用いて観察するが、試料の細片(繊維)によって著しく観察が妨げられるときや、保存料など微生物の発育阻止物質が試料中に含まれている場合は、100倍希釈段階の平板を用いて観察してもよい。 発生した集落は、顕微鏡によってそのものが確かにカビであることを調べる。 同一希釈段階の平板3枚のすべてにカビの集落が認められなかった場合は、カビ陰性と判定する。
上記以外の具体的操作については、食品衛生検査指針微生物編準用	

3) 漬物の衛生規範（製品の適合要件）

製品（すべての漬物）について「カビおよび産膜酵母が発生していないこと」「異物が混入していないこと」と適合条件が付記されている。また、容器包装に充てん後、加熱殺菌したものにあっては、「カビが陰性であること」「酵母は検体 1g につき 1,000 個以下であること」の 2 要件が示されている（表 5）。これらの試験方法および適合要件を考慮して入手した 105 試料の漬物について試験を実施した。なお、食品の健康志向から減塩漬物が、どの程度流通しているか、また保存料の有無についても確認した。

表 5 衛生規範の抜粋【製品（すべての漬物）】

(1) 製品は、次の要件に適合するものであること。 カビ及び産膜酵母が発生していないこと、 異物が混入していないこと、 容器包装に充てん後加熱殺菌したものにあっては、次の要件に適合するものであること、 アカビが陰性であること、 イ酵母は、検体1gにつき1000個以下であること。
--

(3) 倫理面への配慮

本研究は倫理上の制約を伴わない。

C. 研究結果

(1) 漬物の酵母

供試した 105 漬物について酵母試験を実施した結果、約 60% (60 試料) で酵母の検出を確認できなかった。残り 45 試料で酵母の検出を認められた。酵母数をみると 10^2 個/g は 15 試料、 10^3 個/g は 9 試料、 10^4 個/g は 10 試料、 10^4 個/g 以上は 11 試料であった。

漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麹漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。ただし、本研究で入手した漬物の多くは加熱処理されていない未加熱製品である。それらの漬物中の酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae* であり、漬物のそのものに由来するものと判定した。表 6 に示したが、7 試料において漬物由来とされない種が検出された。

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

表 6 漬物の種類別の酵母数

	供試試料数	酵母数 (個/g)				
		10	$\sim 10^2$	$\sim 10^3$	$\sim 10^4$	10^4
塩漬	20	8	4 (1)	4 (1)	2	3 (1)
しょうゆ漬	16	13	3	0	0	0
味噌漬	6	5	1	0	0	0
粕漬	10	5	2	1	2	0
麹漬	5	3	0	1 (1)	1 (1)	0
酢漬	16	9	3	2	2	0
ぬか漬	18	7	1	0	3	7 (1)
からし漬	2	1	0	1	0	0
もろみ漬	1	1	0	0	0	0
キムチ	10	8	1 (1)	0	0	1
合計	104	60	15	9	10	11

()内は*Saccharomyces cerevisiae*以外の酵母

*甘露煮製品は漬物の定義に外れるため除外した

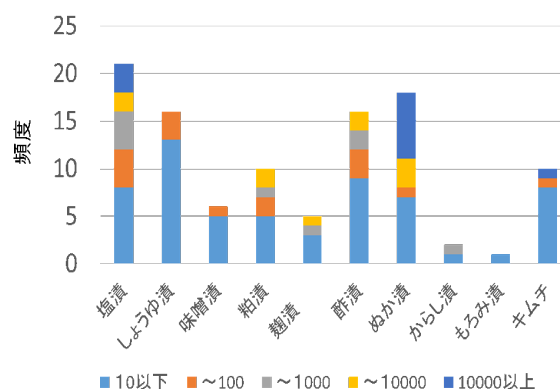


図 3 漬物の種類別の酵母検出頻度

(2) 漬物のカビ

105 試料の漬物についてカビ試験を実施した。その結果、約 70% (75 試料) の試料でカビの検出が認められなかった。残り 40 試料でカビを認めた。カビ数をみると 10^2 個/g は 28 試料、 10^3 個/g は 2 試料と少なく、さらに、 10^4 個/g 以上の試料は検出されなかった (表 7)。

漬物の種類別では、からし漬けを除いてカビの検出が認められた。漬物別のカビ検出頻度を図 4 に示した。漬物中にはカビの検出頻度は非常に少ないことが確認できた。

本研究の主要な課題はカビ数ではなく、どのような種類のカビが検出されたかが、重要因子である。検出されたカビの種類を表 8 に示した。漬物において検出されたカビは、湿性環境に多いカビで代表的なカビの *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* 等であった。一方、*Aspergillus*, *Eurotium*, *Paecilomyces* 等のように乾性環境 (表 9) に多いカビも確認された。

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

表 7 漬物の種類別のカビ数

	供試試料数	カビ数 (個/g)			
		10	~10 ²	~10 ³	~10 ⁴
塩漬	20	17	4	0	0
しょうゆ漬	16	10	6	0	0
味噌漬	6	4	2	0	0
粕漬	10	6	4	0	0
麹漬	5	2	3	0	0
酢漬	16	10	4	2	0
ぬか漬	18	16	2	0	0
からし漬	2	2	0	0	0
もろみ漬	1	0	1	0	0
キムチ	10	8	2	0	0
合計	104	75	28	2	0

*甘露煮製品は漬物の定義に外れるため除外した

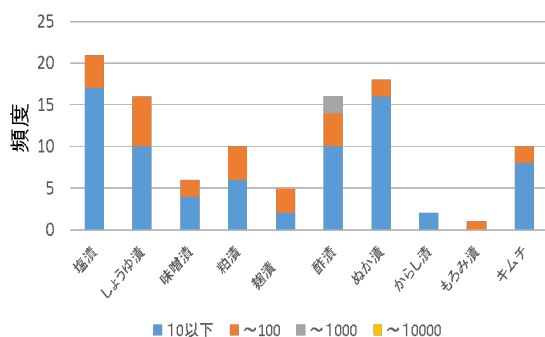


図 4 漬物の種類別のカビ検出頻度

表 8 漬物中の検出カビの種類等

漬物種類	原料	保存料有無	漬物汁の食塩濃度	カビ種
かす漬	うり	無	液無し	<i>Arthriniun, Mycelia, Rhizoctoria</i>
	きゅうり	無	未測定	<i>Aspergillus</i>
	きゅうり	無	未測定	<i>Cladosporium, Aspergillus</i>
	メロン	無	液無し	<i>Acremonium</i>
こうじ漬	きゅうり	無	0.1%以下	<i>Exophiala, Cladosporium</i>
	大根	無	0.38	<i>Acremonium, Cladosporium</i>
	大根	無	0.1%以下	<i>Phoma, Aureobasidium</i>
塩漬	かぶ	無	未測定	<i>Mycelia</i>
	高菜	無	0.1%以下	<i>Aspergillus, Arthriniun</i>
	白菜	無	0.9	<i>Penicillium</i>
しょう油漬	きゅうり	有	未測定	<i>Penicillium</i>
	きゅうり	無	1.82	<i>Penicillium, Nigrospora</i>
	ごぼう	無	0.1%以下	<i>Scolecobasidium</i>
	大根	無	0.1%以下	<i>Penicillium</i>
	白菜	無	0.1%以下	<i>Penicillium</i>
	らっきょう	無	0.1%以下	<i>Ulocladium, Mycelia</i>
酢漬	きゅうり	無	0.1%以下	<i>Acremonium, Mycelia, Ulocladium, Aureobasidium</i>
	しょうが	無	0.1%以下	<i>Mycelia</i>
	らっきょう	無	未測定	<i>Fusarium, Penicillium</i>
	らっきょう	無	0.1%以下	<i>Eurotium</i>
	らっきょう	無	0.1%以下	<i>Mycelia</i>
	らっきょう	無	0.1%以下	<i>Cladosporium, Acremonium, Mycelia</i>
ぬか漬	大根	有	未測定	<i>Cladosporium</i>
	大根	無	2.02	<i>Eurotium</i>
みそ漬	にんにく	有	未測定	<i>Fusarium</i>
もろみ漬	すいか	無	未測定	<i>Phoma, Curvularia, Penicillium</i>

表 9 検出カビの発生源

空中	原料や土壌	水系
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Aureobasidium</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Exophiala*</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Phoma</i>	<i>Acremonium*</i>
<i>Paecilomyces*</i>	<i>Scolecobasidium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Arthriniun</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Mycelia</i>	産膜酵母	
	<i>Candida*</i>	

*太字は日和見真菌

(3) 漬物の食塩濃度

入手した一部の漬物製品の漬物汁について、食塩濃度を測定したところ、試料の多くは1%以下の低塩値を示した(図5)。

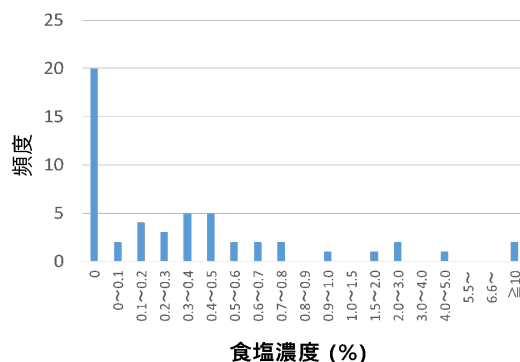


図 5 漬物中の食塩濃度と頻度

(4) 加熱処理した漬物での事故事例

本研究は市販漬物中にどの程度の酵母、およびカビが検出されるかについて定量試験を実施した。一方で、加熱処理した漬物でカビ事故事例が起こった事例を経験した。この事例は、A県とB県の2件で起きた。いずれも地場産業として積極的に販売促進している食品であったが、賞味期限内でカビの発生がみられた。カビの特定を行ったところ、いずれも耐熱性カビ *Neosartorya fischeri* であった(図6)。

加熱方法	製品の種類・特徴	事故事例の状態
A県 加熱殺菌処理漬物	地場産業製品	加熱殺菌処理済み包装製品に、カビ発生により包装製品が膨化した。
B県 加熱殺菌処理漬物	野沢菜	
原因カビ	耐熱性カビ <i>Neosartorya fischeri</i> (写真参照)	

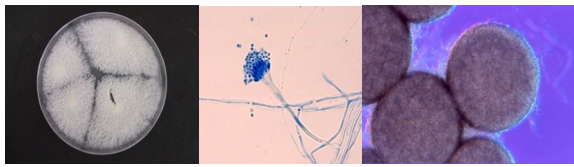


図 6 加熱殺菌処理済み漬物のカビ発生事例

D. 考察

本研究は、衛生規範で対象となっている食品のうち漬物中にどの程度の真菌(酵母、カビ)が検出されるかについて調査を実施した。

酵母やカビの結果から、全く陰性であるとはいえないことが明確になった。漬物中の酵母試験の結果から、酵母の検出を認めなかった試料は約 60%(60 試料)であった。残り 45 試料で酵母の検出を認められた(表 6)。酵母数をみると 10^2 個/g ~ 10^4 個/g 以上と漬物中の酵母検出数は多様であった。漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麹漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。酵母数の多い漬物からは *Saccharomyces cerevisiae* が検出された。以上の結果からわかるように、加熱しない限り漬物由来の酵母が存在するものであり、異常な数値とはいいがたい。むしろ問題は、漬物由来以外の酵母の検出数である。漬物由来とされない酵母の検出種に *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus* が確認された。つまり製造工程での汚染も考えられ、こうした酵母の種によって産膜酵母などが汚染されることもあり、空気や漬物原料等の衛生改善が求められる。

漬物のカビ試験結果から、約 70%(75 試料)の試料でカビの検出が認められなかった。残り 40 試料でカビを認められ、量的には少なかった(表 7)。一般にカビ数は食品

中では少ない。その理由として細菌のような分裂ではなく発芽による菌糸伸長にある。そのため、時間経過によってもカビ数は少ないことが多い(表 7)。ただし、少ないからといってカビを問題視しないことはあってはならない。

本研究で重要な課題は、どのようなカビ種が検出され確認されるかである。すなわち検出カビを同定することにより、汚染源を特定できることが多いからである。食品に添加された保存料の有無、および漬物汁中の食塩濃度から判断しても、保存料の有無に関係なくカビが検出され、食塩濃度も低いことがわかった。検出されたカビは、湿性環境にみられる代表的な *Fusarium*, *Acremonium*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Paecilomyces* 等で発生源を特定できる(表 9)。特に多かったカビ種を確認すると空中由来であった。これは製造工程中に食品に混入したものと考えられる。

また、本研究課題の病原微生物の観点からカビ種を判断すると、*Exophiala*, *Acremonium*, *Fusarium* など日和見感染カビも少なからず確認された。カビの発生事故品や異物やカビ数も重要であるが、漬物の低塩化及び加熱処理食品として市場に広く出回ることなどを考慮していくと今後は、このような特定カビに注視しながら漬物の衛生規範を検討することも必要であると提言したい。

加熱処理した漬物での事故事例を経験した。この 2 事例は同様の過程で発生されていることから、今後漬物の加熱加工する場合の大切な教訓となる。いずれも地場産業として販売を促している食品であったが、耐熱性カビ *Neosartorya fischeri* であった(図 6)。これは 60-70、15-30 分加熱程

度では死滅しないカビであるため、加工工程処理をどのように指導するか等も含めて、漬物の衛生規範で重要といえる事例であった。

E. 結論

105 点の漬物について真菌数試験法を実施した。

(1) 漬物の酵母試験結果：約 60% (60 試料) の試料では、酵母の検出を確認できなかった。残りの 45 試料で酵母の検出を認められた。酵母が認められた試料中には 10^2 ~ 10^4 個/g 以上の酵母数を認めた。

漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麹漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。ただし、本研究で入手した漬物の多くは加熱処理されていない非加熱製品である。それらの漬物中の酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae* の出現頻度が高かった。一部で漬物由来といえない酵母種の検出がされた。これが産膜酵母などの汚染源となることから漬物の加工工程における衛生規範見直しが求められる。

(2) 漬物のカビ試験結果：約 70% (75 試料) の試料でカビの検出が認められなかった。残りの 40 試料でカビの検出を認めた。カビ数をみると 10^2 個/g 程度であり、カビ数としては多くなかった。

しかし、本規範で重要な問題点はカビ数ではなく、カビ種である。検出されたカビを確認すると空中、原料、水系由来に分けることができ、その原因を知ることが今後衛生規範で重要である。

(3) 日和見感染カビとして *Exophiala* 等が確認されたことからカビ種の特定は極めて重要であり、今後の衛生規範改正で検討が望まれる。

(4) 加熱処理した漬物での事故事例：加熱処理した漬物でカビ事故事例が起こった事例を経験した。2 件で、いずれも地場産業として販売している食品であった。それらの試料から耐熱性カビが確認された。製造環境で重要な加工工程における衛生規範の指導事例の一つといえた。

(5) 漬物の真菌調査から近年の漬物は低塩あるいは加熱加工品であることによる真菌事故例が今後危惧され、漬物の衛生管理及び試験法等の衛生規範の見直しが求められる。

F. 研究発表

・日本防菌防黴学会第 41 年次大会発表(平成 26 年)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究
分担研究報告書

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
研究分担者	廣井豊子	帯広畜産大学畜産衛生学研究部門
研究協力者	荒川京子	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	柴田勝優	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	賀川千里	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	堀内朗子	日本食品衛生協会食品衛生研究所
研究協力者	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・鞭虫・鉤虫という土壌媒介寄生虫に感染していた。本研究における文献検査により、これら土壌媒介寄生虫による感染は、激減しながら現在も継続していることが確認された。感染源となる野菜の虫卵汚染は確実に継続しているが、具体的な汚染野菜の特定は、文献検索では困難であった。そこで輸入キムチが回虫症の感染源と推定する症例もあることから、輸入キムチに関する検査機関へのアンケート調査や市販材料の検査を実施した。しかし陽性例やそれに繋がる糸口を見い出せなかった。また 4 類感染症のエキノコックスを視野に入れ、本症の流行地・北海道では感染源となる恐れがありながら、生食されることもある「行者ニンニク」を対象に、虫卵検査を実施した。しかし検体は総てエキノコックス虫卵陰性であった。

1. 非動物性食品を感染源とする寄生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・鞭虫・鉤虫は野菜等を感染源とする食品媒介寄生虫であり、土壌媒介寄生虫とも呼ばれる。かつて我が国では国民の半数以上が土壌媒介寄生虫に感染していた。最近では感染者は激減したが、国内での感染が確実な症例の報告もあることから、感染源である野菜の虫卵汚染は、現在も継続していると推測される。ただし感染源となった野菜の種類や症例数の推移の詳細などについては、不明な点が多い。そこでこれらの点を明らかにするため、医学中央雑誌に掲載された文献を中心として、検索用のデータベースを構築し、解析に取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 症例数

文献学的な二次資料として医学中央雑誌（医中誌 Web）を用い、1990 年 1 月から 2015 年 12 月までの原著論文から国内で感染した回虫、鞭虫、鉤虫による症例を抽出し、年別の症例数を明らかにすると共に、患者の感染源となった汚染野菜の特定を試みた。なお昨年度までは、日本臨床寄生虫学会誌を文献学的な一次資料に利用し、土壌媒介寄生虫症の発生状況を解析した（1990 年/第 1 巻～2015 年/第 25 巻の 25 年間/25 巻に収載された症例が対象）。この中には、今回の医中誌 Web 検索では抽出されない症例があることを経験した。そこで、このような日本臨床寄生虫学会誌のみに収載された症例も付け加えて、今回の検索用データベースを構築した。

これら土壌媒介寄生虫のうち、鉤虫に関しては、ズビニ鉤虫とアメリカ鉤虫の 2 種が人体感染の主要な原因として知られてい

る。これら両種の人体への主たる感染経路は異なり、前者は経口感染で、後者は経皮感染である。このため本研究では、野菜の摂食、あるいは経口感染によると論文著者が示した症例のみを鉤虫による症例（ズビニ鉤虫症）として選別し、検索性データベースに含めた。

また症例数の検討として、臨床検体の検査会社であるビー・エム・エル（BML）にも協力を仰いだ。同社は全国の医療機関から依頼を受けて、症例から検出された虫体の同定を受託している。これらの寄生虫症の事例の中から、回虫症、鞭虫症、鉤虫症と診断された症例の数について、提示を受けた。従って鉤虫症に関しては、経口感染ではなく、経皮感染による症例も数の中に含まれている。

(2) 感染源

各症例の感染源となった野菜に関しては、論文著者の記述に従い、生野菜、無農薬野菜、有機野菜に分類した。なお本研究では、農薬または化学肥料を使用しない栽培方法によって作られた野菜を「無農薬野菜」と定義した。したがって人糞（いわゆる下肥）のみを肥料として栽培された野菜は、無農薬野菜とした。また「有機野菜」は、農水省によって厳密に定義された栽培法によるものをさすが、「無農薬野菜」を「有機野菜」と区別しない医療関係者（論文著者）も多い。そこで本研究では、論文著者が「有機野菜」と記述した場合は、その記述をそのまま採用した。また各論文で著者が感染源を野菜（あるいは生野菜）とのみ記述した症例は、論文を精読して上述の定義から感染源を「無農薬野菜」あるいは「有機野菜」に振り分ける努力をした。しかし記述が不十分な論文および判別不可な論文は、不明（あるいは生野菜）と分類した。

C. 研究結果

(1) 症例数

文献学的検索で明らかとなった国内感染の土壌媒介寄生虫症例は、1990年から2015年までの26年間に回虫が225例、鞭虫が23例、鉤虫は8例であった（表1）。2011年以降の5年間でも、回虫が5例、鞭虫が7例、鉤虫は2例と、土壌媒介寄生虫によ

る症例は発生が続いていた。

BMLの資料から明らかとなった土壌媒介寄生虫症は、2000年から2015年までの16年間に回虫が272例、鞭虫が283例、鉤虫は215例であった（表1）。2011年以降の5年間でも、回虫が34例、鞭虫が45例、鉤虫は9例と、最近も症例の発生が継続し、しかも文献検索による結果と比べて症例数は多かった（BMLの資料は国内感染だけでなく輸入症例も含む、後述）。

(2) 感染源

文献学的検索で抽出された土壌媒介寄生虫症例256例中、感染源が生野菜の症例は11例、無農薬野菜は14例、有機野菜は7例で、残りは感染源を明らかにすることができなかった（表2~4）。内訳を見ると、生野菜を感染源とする回虫症例は9例、鞭虫症例は2例であり、無農薬野菜を感染源とする回虫症例は14例、有機野菜を感染源とする回虫症例は5例、鞭虫症例および鉤虫症例は各々1例であった。寄生虫の種類を問わず、無農薬野菜を感染源とした症例が最も多かった。

感染源となった具体的な野菜の種類も特定を試みたが、具体的な野菜名の記述がない論文、あるいは複数の野菜名を単に列記しただけの論文ばかりで、汚染野菜の種類の特定は困難であった。

D. 考察

文献学的検索により、回虫、鞭虫、鉤虫に感染する症例は、最近でも少数ながら継続して国内発生していることが確認された。感染源となる野菜の虫卵汚染は、現在でも継続していることが強く示唆された。

BMLの資料からは、更に多数の土壌媒介寄生虫症例が我が国で診断される事実が示された。ただしBMLの症例は、国内感染事例だけでなく、輸入症例も含む。海外、特に熱帯地方の発展途上国では、野菜における土壌媒介寄生虫の虫卵汚染は高度で、これを喫食して感染する機会が多い。このような状況を背景に、土壌媒介寄生虫に海外で感染し、輸入症例として受診する患者が多い事に、我が国の医療関係者は留意すべきである。

表 1. 回虫症，鞭虫症，鉤虫症の発生状況：文献検索および BML での検査に基づく症例数

年	文献検索に基づく症例数			BML での検査に基づく症例数		
	回虫症 症例数	鞭虫症 症例数	鉤虫症 症例数	回虫症 症例数	鞭虫症 症例数	鉤虫症 症例数
1990	15	0	2	-	-	-
1991	12	3	1	-	-	-
1992	11	2	1	-	-	-
1993	12	0	0	-	-	-
1994	8	1	0	-	-	-
1995	7	2	0	-	-	-
1996	7	1	0	-	-	-
1997	4	0	0	-	-	-
1998	57	1	0	-	-	-
1999	2	0	0	-	-	-
2000	3	1	0	19 (6)*	23 (13)	20 (5)
2001	66	1	0	27 (17)	24 (17)	25 (25)
2002	2	0	1	31 (10)	29 (23)	33 (32)
2003	5	0	0	22 (4)	17 (12)	9 (8)
2004	2	2	1	19 (3)	13 (10)	9 (8)
2005	2	1	0	19 (1)	9 (4)	9 (9)
2006	2	0	0	17 (1)	4 (0)	0
2007	0	1	0	12 (1)	7 (2)	0
2008	2	0	0	11 (4)	10 (3)	5 (4)
2009	0	0	0	3 (2)	8 (1)	2 (0)
2010	1	0	0	7 (2)	7 (2)	2 (1)
2011	0	0	0	1 (2)	7 (0)	1 (0)
2012	3	1	0	10 (4)	13 (4)	2 (1)
2013	0	0	0	2 (0)	3 (0)	0
2014	1	2	2	4 (0)	9 (3)	0
2015	1	4	0	6 (5)	5 (1)	3 (2)
合計	225	23	8	210 (62)	188 (95)	120 (95)

*：日本人（外国人）

表 2. 感染源から見た回虫症例数

年	総数	野菜			不明
		生	無農薬	有機	
1990 ~ 94	58	2	10	2	44
1995 ~ 99	77	4	0	1	72
2000 ~ 04	78	3	2	2	71
2005 ~ 09	6	0	1	0	5
2010 ~ 15	6	0	1	0	5
計	225	9	14	5	197

表 3. 感染源から見た鞭虫症例数

年	総数	野菜			不明
		生	無農薬	有機	
1990 ~ 94	6	0	0	0	6
1995 ~ 99	4	1	0	1	2
2000 ~ 04	4	0	0	0	4
2005 ~ 09	2	0	0	0	2
2010 ~ 15	7	1	0	0	6
計	23	2	0	1	20

表 4. 感染源から見た鉤虫症例数

年	総数	野菜			不明
		生	無農薬	有機	
1990 ~ 94	4	0	0	0	4
1995 ~ 99	0	0	0	0	0
2000 ~ 04	2	0	0	1	1
2005 ~ 09	0	0	0	0	0
2010 ~ 15	2	0	0	0	2
計	8	0	0	1	7

今回の検討では、感染源となった野菜の名前を特定することも試みたが、具体的な野菜の名前を記述した論文はなく、従って文献学的検索を継続しても、感染源である野菜を特定することは、容易でないと考えられた。患者と面談して直接に聞き取る工夫ができないか等を、今後は検討する必要がある。

E. 結論

土壌媒介虫症として回虫症、鞭虫症および鉤虫症は、現在も日本国内で発生しており、感染源となる野菜の虫卵汚染が現在でも継続している。感染源に関しては無農薬野菜あるいは有機野菜とするものも認められたが、具体的な野菜の種類に関しては特定が困難であった。

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, 37-41, 2015.

2. 堀内朗子, 荒川京子, 秋庭達也, 吉田建介, 平田史子, 松本奈保子, 丸山弓美, 奥津敬右, 朝倉 宏, **杉山 広**, ストマッカーを利用した野菜等の回虫卵検査法の検討, 食品衛生研究, 65, 45-50, 2015.

2. 学会発表 なし.

2. 輸入キムチの寄生虫卵検査の実施に関する登録検査機関を対象としたアンケート調査

A. 研究目的

2005年10~11月に中国と韓国は、輸入キムチに寄生虫卵の汚染があることに気付く、その原因が製造国での汚染であるとして、相互に非難の応酬を繰り返した(いわゆる「(キムチの)汚染騒動」あるいは「キムチ戦争」)。我が国も、当時は韓国から年間に3万トンのキムチを、さらに中国からもキムチを輸入しており、汚染実態の把握等で緊急対応が求められた。そして厚生労働省は、キムチの検査法を通知し、検疫所に検査の実施を指示した。その結果、検疫所では陽性例を検出できなかったが、市販の輸入キムチを検査した研究者から寄生虫

卵を検出したとの報告が続き（その後には回虫卵も検出され）、行政としての検査を継続することになった。しかしその後実施された検査の結果は、報告が見当たらない。そこで 2005 年以降の輸入キムチに関する寄生虫卵検査の実施状況および検査結果について、食品の検査を実施する検査機関に対して、アンケートによる聞き取り調査を実施した。

B. 研究方法

厚生労働省の「食品衛生法上の登録検査機関における検査実績」に掲載されている登録検査機関のうち、自主検査件数の多い上位 16 機関と、公益法人目黒寄生虫館に依頼し、平成 17 年以降、毎年の輸入キムチの寄生虫卵検査の実施件数と陽性件数について、記入式のアンケート調査を行った（資料 1, 2 参照）。

C. 研究結果

検査機関 16 のうち 1 機関を除く 15 機関と目黒寄生虫館から回答が得られた（表 5）。2005 年度および 2006 年度の検査数は、計 79 件および 11 件であったが、2007 年度から 2010 年度までは、いずれの検査機関においても検査は実施されていなかった。また 2011 年度以降 2015 年度までは、年間に計 1 件から 9 件の検査が実施されていた。なお虫卵が検出されたのは、2005 年度に実施された 1 件のみであった。

D. 考察

2005 年 11 月に中国と韓国との間で発生したキムチの寄生虫卵汚染に関する非難の応酬を契機として、我が国でも輸入キムチの寄生虫卵検査が実施された。その結果、一部のキムチ検体から回虫（人体寄生性）を始めとする寄生虫卵が検出された。しかしその後、検査の結果を目にすることがなくなった。今回のアンケート調査から、輸入キムチの検査が実際に実施されなくなったからではないかと考えられた。しかし 2011 年度以降は、少数であっても検査が継続して実施されていることも分かった。土壌媒介寄生虫の感染事例は最近でも発生しており、中には感染源として輸入キムチを示唆する報告も認める。従って輸入キムチ

を対象とした寄生虫卵検査は、感染源の特定や予防法の策定とも関連する。検査を実施して、陰性であってもその成績を記録することは、今後も重要な課題になると考えられた。

E. 結論

キムチの寄生虫卵検査は、2011 年度以降も検査機関で実施されているが、虫卵は 2005 年度に 1 機関において 1 検体から検出されただけであった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし。

3. 輸入キムチの土壌媒介寄生虫卵調査

A. 研究目的

2005 年 11 月に中国と韓国との間で発生したキムチの寄生虫卵汚染に関する非難の応酬を契機として、両国からのキムチの輸入量が多い我が国では、厚生労働省がキムチ検査法を通知し、検疫所での検査実施を指示した。その結果、検疫所では陽性例を検出できなかったが、市販の輸入キムチを検査した研究者から寄生虫卵を検出したとの報告が続き、また検出虫卵の中に人体寄生性の回虫卵が含まれることも証明された。しかし輸入キムチの検査は余り実施されなくなり、土壌媒介寄生虫卵による汚染実態は明らかでない。一方で現在でも、土壌媒介寄生虫の感染事例は発生しており、感染源として輸入キムチを示唆する報告も認める。そこで市販の輸入キムチについて寄生虫卵の検出を試みた。

本研究班で我々は、生野菜や漬物等に付着する寄生虫卵を効率的に検出する方法の検討を進めてきた。その結果、従来の歯ブラシ法、あるいは我々が構築したストマッカー法に比べ、新たに構築した超音波法が最も効率的に虫卵を検出することを明らかにした。そこで本研究では、この超音波法を適用して回虫卵等の土壌媒介寄生虫卵の検出に取り組むこと努めた。

表 5. 登録検査機関における輸入キムチの検査実施数および回虫卵の検出数：アンケート調査による結果

No.	登録検査機関名	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	2015年
1	一般財団法人千葉県薬剤師会検査センター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	一般財団法人日本食品分析センター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	一般財団法人東京顕微鏡院	0	0	0	0	0	0	1	2	8	0	1
4	一般財団法人日本冷凍食品検査協会	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	公益社団法人日本食品衛生協会	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	一般財団法人食品環境検査協会	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	一般社団法人食肉科学技術研究所	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	一般社団法人日本海軍検定協会	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	公益財団法人日本食品油脂検査協会	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	一般財団法人ライオンキン検査協会	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	1
11	一般財団法人新潟県環境衛生研究所	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	一般社団法人愛知県薬剤師会	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	一般財団法人広島県環境保健協会	50 (1)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	公益財団法人北九州生活科学センター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	一般財団法人沖縄県環境科学センター	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	公益財団法人目黒寄生虫館	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	計	79 (1)	11	0	0	0	0	1	2	9	9	2

検査実施数（回虫卵が陽性の検体数）を示す。

2015 年 10 月 7 日

資料 1

登録検査機関
検査区分責任者殿

国立感染症研究所
寄生動物部第 2 室室長 杉山広

アンケート調査へのご協力願い

貴機関におかれましては、平素より食品衛生業務へのご協力ありがとうございます。

さて、平成 22 年度に発生した漬物を原因とする食中毒事例から、厚生厚労科研「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」が開始されたところです。今年度の研究班報告会において評価委員会より、平成 17 年に発生したに韓国産および中国産キムチの回虫卵汚染問題に関連して、その後の検査状況について調査するよう要望がありました。

つきましては、業務ご多忙な中大変恐縮ですが、貴機関における平成 17 年度以降のキムチの寄生虫卵検査実施状況につきまして、御回答くださるようお願い申し上げます。回答内容は、同封のハガキにご記入の上、平成 27 年 11 月 6 日必着にてご返送下さい。

なお、平成 27 年度研究班報告書本文中に貴機関名を付記させていただきます。

以上、よろしくお願い申し上げます。

国立感染症研究所寄生動物部第二室・室長・杉山 広
(朝倉班研究分担者：寄生虫による汚染に関する研究チーム)

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
電話：03-5285-1111，FAX：03-5285-1150
E-mail：hsugi@nih.go.jp

調査回答用紙

「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」

下記の欄に年度ごとのキムチの検査件数，および回虫
卵が検出された件数をご記入ください．検査の実施が
なかった場合は0をご記入ください．

平成（年度）	検査件数	回虫卵 陽性件数
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		

ご協力，有難うございました．

B. 研究方法**(1) 被験物質**

2016年1月に食料品店で購入した韓国産キムチ2点および中国産キムチ3点を被験物質とした．各キムチは約100gを検査材料とし，洗浄容器（1,000mL容の広口ねじ口瓶）に入れ，500mLの洗浄液（Antifoam A 150 μ L 添加 0.5% Tween80・クエン酸緩衝液）を加え，約10分間静置したのち，以下の操作を行った．

(2) 検査法

キムチからの虫卵の分離操作は，5分間の超音波洗浄によった．すなわち検体入り

の洗浄容器を超音波洗浄水槽（ダルトン）に入れ，発振器（東京超音波技研製，型番UP-305，出力700W，周波数27kHz）により超音波を発生させて洗浄した．

超音波処理後，洗浄液の全量を茶漉しでろ過しながら1,000mL容の円錐型液量計（以下，液量計）に移し，同量の洗浄液で洗浄容器を洗い，その洗浄液も液量計に移した．そして60分以上静置した後，上清約900mLをアスピレーターで吸引除去した．得られた洗浄液・沈渣部分は50mLの遠沈管2本に分注した後，液量計の管壁を精製水50mLで2回洗い，この洗浄液を新たな50mL遠沈管2本に加えた．これら50mL遠

沈管 4 本を毎分 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。その沈渣を 15mL 遠沈管に集めて、毎分 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。この上清を吸引除去して得られた沈渣に、精製水および酢酸エチルを加えて激しく混和し、毎分 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。上清をすべて除去し、沈渣に比重液（ショ糖浮遊液； $d=1.27$ ）を加えて混和し、浮遊法にて虫卵の回収操作を行った。そして顕微鏡下に全視野を観察して虫卵数を求めた。

C. 研究結果

いずれの輸入キムチ検体からも、人体寄生性の寄生虫卵は検出されなかった（表 6）。なお、キムチ検体 4（韓国産）から、浮遊時間 0.5 時間でダニの卵が検出された。

D. 考察

前章で述べたように、最近の 5 年間に一部の検査機関ではキムチの寄生虫卵検査が実施されていた。しかし、虫卵の検出例を認めなかったことから、中国産および韓国産の輸入キムチを対象に寄生虫卵検査を実施し、汚染状況を調べた。その結果、回虫等の人体寄生性の虫卵は検出されなかったが、ダニの卵が検出された。今回実施した超音波法によるキムチの検査法は、人体寄生性の寄生虫卵検出にも適用可能と考えら

れた。

キムチは表 7 に示すように、様々な原材料が添加されているため、高脂質であり、微細な夾雑物も多い。平成 17 年に厚労省からキムチの検査法が通知されたが、その検査法では脂質や夾雑物の除去が十分に行うことができないことが指摘されてきた。また我々が実施した超音波法（浮遊法）によっても、キムチからの虫卵検出には多くの時間が必要なことが改めて確認された。検査を効率的に進めるためにも、寄生虫卵を残したまま、キムチの残渣だけを効率的に除去する方法について、今後さらに検討を進める必要がある。

E. 結論

中国および韓国原産の輸入キムチ計 5 検体について、超音波法（浮遊法）による寄生虫卵検査を行ったが、人体寄生性の虫卵は検出されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし。

表 6. 輸入キムチの寄生虫卵検査結果

キムチ 検体番号	原産国	内容量	浮遊時間と回収寄生虫卵数				結果
			0.5 時間	1 時間	2 時間	3 時間	
1	中国	800 g	0	0	0	0	陰性
2	中国	1 kg	0	0	0	0	陰性
3	中国	200 g	0	0	0	0	陰性
4	韓国	300 g	0	0	0	0	陰性
5	韓国	330 g	0	0	0	0	陰性

表 7. 輸入キムチの原材料一覧

キムチ 検体番号	原産国	原材料名
1	中国	白菜，漬汁原材料（大根，赤唐辛子粉，長ねぎ，砂糖，あみ塩辛にんにく，玉ねぎ，人参，生姜，鰹だし，食塩，ごま）
2	中国	白菜，人参，漬汁原材料（ぶどう糖，果糖，液糖，砂糖，食塩，にんにく，唐辛子，生姜，魚醤，オキアミ，大豆たん白加水分解物，鰹エキス，酵母エキス）
3	中国	白菜，漬汁原材料（大根，赤唐辛子粉，長ねぎ，砂糖，あみ塩辛にんにく，玉ねぎ，人参，生姜，鰹だし，食塩，ごま）
4	韓国	白菜，漬汁原材料（食塩，大根，にんにく，果糖，砂糖，唐辛子，えびエキス，にら，ねぎ，鰹節エキス）
5	韓国	白菜，漬汁原材料（唐辛子，イワシ塩辛，玉ねぎ，にんにく，りんご，梨，ねぎ，ニラ，生姜，なつめ粉末，昆布エキス，ごま，粉飴，米粉，食塩，栗）

4．北海道産行者ニンニクのエキノコックス虫卵汚染調査

A. 研究目的

寄生虫エキノコックスによる人体症例は、感染症法で第 4 類に規定され、全例の報告が義務付けられている。本虫は成虫がキツネやイヌなどの腸管に寄生し、虫卵が糞便に混じって体外に排泄される。人はこの虫卵を経口摂取することで感染する。そして人体内で虫卵から幼虫が孵化し、この幼虫（これを包虫と呼ぶ）が血流に乗って全身の各臓器、特に肝、肺、腎、脳などに定着、そこで幼虫がさらに発育して（しかし成虫にはならず）、寄生部位に応じた多彩な症状が発現する。

人体感染の主たる原因となるエキノコックスには 2 種類があり、病名も原因となる寄生虫種により区別され、それぞれ単包性エキノコックス症（単包条虫による）、あるいは多包性エキノコックス症（多包条虫による）と呼ばれる。我が国では多包性エキノコックス症が、この 20 年～30 年の間に北海道東部から北海道全域に流行域を拡大し、地域住民に対する健康被害の原因として、大きな脅威となっている。

エキノコックスの人への感染経路の一つとして、野草の生食が疑われてきた。北海

道では陽性キツネの糞便にエキノコックスの虫卵を多数認めることから、その糞便で汚染された野草にはエキノコックスの虫卵が多数付着して、人への感染源になる可能性が高いと考えられる。野草（あるいは地物の野菜）の中でも、特に行者ニンニクは非加熱で、あるいは加熱不十分で喫食される場合も多いと聞く。そこで北海道東部で入手した行者ニンニクを対象に寄生虫卵検査を実施し、エキノコックス虫卵の検出を試みることにした。検査法には超音波法を採用した。

B. 研究方法

(1) 被験物質

被験物質は行者ニンニクとし、帯広市およびその近郊の青果販売店で購入した。購入は 2 月末から 5 月上旬までの間に 6 回に分けて行い、合計 41 検体の行者ニンニクを入手した。なお行者ニンニクは購入後、試験開始まで 7 日間以上、- 80 で冷凍した。このような条件での冷凍により、エキノコックスの虫卵は感染性を完全に失うことが知られており、検査従事者へのエキノコックス感染の危険性を排除した。

検体は原則として全量を検査に用いたが、変敗を認めた検体はその部分を廃棄し、健

常な部分のみを検体とした(表8)。検査にあたって検体は、洗浄容器(1,000mL容の広口ねじ口瓶)に入れ、その5倍量の洗浄液(Antifoam A 150 μ L 添加 0.5% Tween80・クエン酸緩衝液:自家調整)を加えて、約10分間静置したのち、以下の操作を行った。

(2) 検査法

行者ニンニク検体からの虫卵の剥離操作は、5分間の超音波洗浄によった。すなわち検体入りの洗浄容器を超音波洗浄水槽(ダルトン)に入れ、発振器(東京超音波技研製、型番UP-305、出力700W、周波数27kHz)により超音波を発生させて洗浄した。

超音波洗浄後、洗浄液の全量を1,000mL容の円錐型液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。約30分間の静置後、上清約900mLをアスピレーターで吸引除去した。得られた洗浄液・沈渣部分は50mLの遠沈管2本に分注し、さらに円錐型液量計の管壁を精製水50mLで2回洗い、その洗浄液も新たな遠沈管2本に加えた。これらの50mL遠沈管4本を毎分2,000回転で5分間遠心分離し、その沈渣を15mL遠沈管に集めて、毎分2,000回転で5分間遠心分離した。この上清を吸引除去し、得られた沈渣に比重液(硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液; $d=1.23\sim 1.24$)を加えて混和し、浮遊法にて虫卵の回収操作を行った。そして顕微鏡下に全視野を観察して虫卵数を求めた。

C. 研究結果

被験物質である行者ニンニク41検体について寄生虫卵検査を実施したが、いずれの検体も陰性で、エキノコックスの虫卵は全く検出されなかった(表8、試験検査成績書・第AA15-13-01642号も参照)。

D. 考察

当研究班では、非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法として超音波法を構築し、多数の検体から最も効率的に寄生虫卵が分離できることを示した(平成26年度の当研

究班報告書を参照)。そこでこの超音波法を適用して、市販野菜を被験物質とした寄生虫卵の汚染実態調査を実施した。被験物質としては、北海道東部で栽培された(あるいは野生の)行者ニンニクを選び、感染症法で第4類に規定されるエキノコックスの虫卵の検出を試みた。しかしながら、いずれの行者ニンニク検体からもエキノコックスの虫卵は検出されなかった。今回は検査数が限られ、従って今後検体数を増やして、検査を継続したいと考えている。

今回の調査の対象とした被験物質の行者ニンニクは砂泥の付着が多く、超音波法(虫卵の剥離操作)の後に行う虫卵の検出操作では、沈殿法ではなく浮遊法を採用した。浮遊法による虫卵回収数は、浮遊法を用いた場合と有意差のないことを我々は既に証明しているが(平成25年度および平成26年度の当研究班報告書を参照)、浮遊法では沈渣から虫卵が分離され、管口部分に浮遊するまで待つ必要がある。

今回の調査では、被験物質の行者ニンニクから、寄生虫卵を検出することはできなかった。しかし超音波法を用いることで、複数の検体を短時間で洗浄処理することができた。また被験物質の破損も超音波法では認められず、特に浮遊法と組み合わせた場合に、顕微鏡下での虫卵観察が容易となった。このような利点は、野菜の寄生虫卵汚染検査を実施するに当たり、大きな利点になると考えられた。

E. 結論

本研究班において野菜や漬物等に付着した寄生虫卵を効率的に検出することが証明された超音波法により、北海道で販売されている行者ニンニク41検体について寄生虫卵検査を行ったが、いずれの検体も陰性で、エキノコックスの虫卵は検出されなかった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

表 8. 市販行者ニンニクの寄生虫卵検査結果

検体番号	購入日	受領日	検体重量 (g)		結果
			受領時	検査時	
1- 1,2*	NR**	4月22日	145.0	145.0	陰性
1- 3,4	NR	4月22日	135.0	135.0	陰性
1- 5,6	NR	4月22日	145.0	145.0	陰性
1- 7,8	NR	4月22日	134.5	134.5	陰性
1- 9,10	NR	4月22日	139.5	139.5	陰性
2- 1	NR	5月13日	86.3	86.3	陰性
2- 2	NR	5月13日	99.1	99.1	陰性
2- 3	NR	5月13日	103.0	103.0	陰性
2- 4	NR	5月13日	105.1	105.1	陰性
2- 5	NR	5月13日	115.4	115.4	陰性
3- 1	4月25日	5月20日	77.2	77.2	陰性
3- 2	4月25日	5月20日	82.1	82.1	陰性
3- 3	4月25日	5月20日	75.2	75.2	陰性
3- 4	4月25日	5月20日	77.2	77.2	陰性
3- 5	4月25日	5月20日	73.8	73.8	陰性
3- 6	4月29日	5月20日	111.9	111.9	陰性
3- 7	4月29日	5月20日	116.3	116.3	陰性
3- 8	4月29日	5月20日	117.6	117.6	陰性
3- 9	4月29日	5月20日	116.8	116.8	陰性
3- 10	2月15日	5月20日	100.0	100.0	陰性
3- 11	2月15日	5月20日	106.4	106.4	陰性
3- 12	2月15日	5月20日	99.2	99.2	陰性
3- 13	2月15日	5月20日	104.5	104.5	陰性
3- 14	2月15日	5月20日	103.2	103.2	陰性
3- 15	3月15日	5月20日	174.0	172.6	陰性
3- 16	3月15日	5月20日	161.0	101.1	陰性
3- 17	3月15日	5月20日	177.7	100.0	陰性
3- 18	3月15日	5月20日	172.2	105.3	陰性
3- 19	3月15日	5月20日	235.1	232.5	陰性
3- 20	3月15日	5月20日	215.5	119.2	陰性
3- 21	3月15日	5月20日	208.0	103.8	陰性
3- 22	NR	5月20日	113.9	103.2	陰性
3- 23	NR	5月20日	116.5	116.5	陰性
3- 24	NR	5月20日	111.5	111.5	陰性
3- 25	NR	5月20日	110.2	110.2	陰性
3- 26	NR	5月20日	111.2	111.2	陰性

*: 検体量が少なかつたため2検体ずつまとめて検査実施

NR **: 記録なし

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
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

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 年にボツリヌス対策に係る指導通知が出されている。しかし、平成 22 年に行われた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、ボツリヌス対策に関する現状調査ならびにボツリヌス対策強化に関する検討の必要性が明らかとなった。本年度は、平成 25 年度の我々の調査により明らかになった指導内容逸脱「たくあん」製品を用いてボツリヌス菌の添加・保存試験を行ない、食品内でのボツリヌス菌の動態を検討した。添加したボツリヌス菌の食品内増殖はみられなかったが、保管温度に関わらず 6 ヶ月目まで添加時と同等の菌数を維持し、その後減少するも 1 年目においても菌の検出は可能であった。一方、「たくあん」製品とは異なり、窒素源・炭素源が豊富な「煮豆」製品で実施した添加・保存試験では、短期間でボツリヌス菌の顕著な増殖が確認された。これらから、ボツリヌス菌の食品内増殖については、理化学的性状に加え、食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集が必要と考えられた。加えて、共鳴エネルギー転移を利用したボツリヌス毒素の *in vitro* 定量検出法とマウス毒性試験法との比較検討を実施したところ、毒素型によっては検出感度に両試験法間で大きな差があることが明らかとなり、ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量検出法に関して継続した改良と検討が必要と考えられた。

A. 背景および研究目的

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、これに含まれる

食品としては、120 °C 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 °C 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、当該食品中のボツリヌス菌を除去する、ボツリヌス菌の増殖を防止する、またはボツリヌス毒素の産生を防止する、のいずれかをとることとし、具体的には中心部温度を 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、冷蔵（10℃以下）保存、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）。このように容器包装詰低酸性食品に対してボツリヌス食中毒対策がなされたが、平成 24 年に再び鳥取県内で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、改めて、ボツリヌス対策の周知・指導の徹底および強化の必要性が明らかとなった。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、120℃で 4 分間または同等以上の条件で加熱殺菌を行っていた食品は 12 品目、10℃以下の冷蔵条件で流通されていた食品が 6 品目、pH を 4.6 以下に調整していた食品が 1 品目、水分活性を 0.94 以下としていた食品が 5 品目、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っていた食品が 21 品目、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。加えて、ボツリヌス対策強化に有用となる、ボツリヌス菌増殖にかかる理化学的性状に関する検討や情報収集も必要とされている。本分担研究では、こうした背景から、平成 25 年度にはインターネッ

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を確認した。平成 26 年度には、平成 25 年度の結果をふまえ、食品内での菌動態を明らかにする目的で、ボツリヌス菌の添加/長期保存試験を開始した。またボツリヌス菌の増殖に関わる理化学的性状として、ボツリヌス菌の増殖を許容する酸化還元電位の幅の検討を行ない、幅広い酸化還元電位条件下でボツリヌス菌が良好な発育を示す事を明らかにした。平成 27 年度は、ボツリヌス菌の添加/保存試験を継続するとともに、ボツリヌス菌の増殖にかかる酸素濃度の検討と、ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量的検出法の探索を実施した。

B. 材料

I. ボツリヌス菌の食品内動態試験（ボツリヌス菌添加/保存試験）

1. 供試検体（食品）

平成 26 年度同様に「たくあん」製品 1 種（食品内 pH が 4.6 超にもかかわらず常温流通されており、容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策として通達された指導内容を逸脱していると考えられる食品）を使用した。加えて、補助的検討に「煮豆」製品 1 種を使用した。

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. 試薬および培地等

3-1) クックドミート培地

ブドウ糖 0.6 g、可溶性デンプン 0.4 g を精製水 200 mL に加熱溶解させた。クックドミート培地 (OXOID) 1 g と、上記のブドウ糖可溶性デンプン水溶液 10 mL をスクリーチン栓付き試験管 (18 mm x 180 mm) に分注後、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌した。高圧蒸気滅菌後は、冷水にて急冷させた。

3-2) 芽胞調製用培地

トリプチケースペプトン (BD BBL) 50 g、ペプトン (BD Bacto) 5 g およびメルカプト酢酸ナトリウム (和光純薬工業) 1 g を精製水 900 mL に溶解、pH を 7.0 に調整後、精製水を加えて 1,000 mL にし、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌した。

3-3) 卵黄加 CW 寒天培地

カナマイシン不含 CW 寒天培地 (日水) 30 g を 500 mL の精製水に溶解し、121°C 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後 50°C 程度まで冷却したものに、無菌 50%卵黄溶液 (極東製薬)を 50 mL 加え、平板培地を作成した。

3-4) ブレインハートインフュージョン培地 (BHI broth)

ブレインハートインフュージョン培地 (BD Bacto) 14.8 g を 20 mL の精製水に溶解し、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌し、20 倍濃縮の BHI broth とした。

3-5) ペプトン加生理食塩水

ペプトン (BD Bacto) 1 g および塩化ナトリウム 8.5 g を精製水 1,000 mL に溶解、pH を 7.0 に調整後、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌した。

3-6) クロストリジア培地

クロストリジア培地 (日水) 46.9 g を精製水 1,000 mL に溶解後、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌し、使用直前まで加温保存した。

3-7) 標準寒天培地

標準寒天培地 (日水) 23.5 g を精製水 1,000 mL に溶解後、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌し、使用直前まで加温保存した。

3-8) pH メーターおよび酸化還元電位測定

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

II. ボツリヌス菌の増殖にかかる理化学的性状に関する検討

酸素濃度の検討

1. 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。

2. 試薬

酸素濃度の制御にあたっては、BIONIX 低酸素培養キット(スギヤマゲン)を用いた。また、本菌の増殖確認には、クロストリジア寒天培地を用いた。

III. ボツリヌス毒素の in vitro 定量的検出法の探索 (マウス毒性試験法との比較検討)

1. 試薬および動物

1) 精製ボツリヌス毒素

精製ボツリヌス毒素として、当該施設所有のボツリヌス A 型毒素およびボツリヌス B 型毒素 (和光純薬工業, 現在は取り扱いなし) を用いた。

2) ゼラチン加リン酸緩衝液

第二リン酸ナトリウム・12 水和物 4 g とゼラチン (BD Difco) 2 g を精製水 900 mL に溶解、pH を塩酸溶液で 6.2 に調整後、精製水を加えて 1,000 mL にし、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌した。

3) 10% トリプシン溶液

生理食塩水中に 10%となるようにトリプシン 1:250 (ナカライテスク)を添加し、泡立てないように溶解させた。

4) マウス

マウス毒性試験法でのボツリヌス毒素の検出には、ICR 系マウス (Jcl:ICR, 日本クレア, 雌, 体重約 20 g) を用いた。

5) ボツリヌス毒素の in vitro 定量的検出用試薬

ボツリヌス毒素の in vitro 検出用試薬として BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit および BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit (BioSentinel 社, 米国) を用いた。黒色平底 96 穴プレートは Greiner-Bio One 製を用いた。必要に応じ、Matrix A Botulinum Neurotoxin Immunoprecipitation Kit あるいは Matrix F Botulinum Neurotoxin Immunoprecipitation Kit (BioSentinel 社, 米国) も使用した。

C. 実験方法

I. ボツリヌス菌の食品内動態試験 (ボツリヌス

ス菌添加/保存試験)

1) ボツリヌス菌芽胞液

平成 26 年度に調製し- 80 °C に保存している芽胞液を用いた。芽胞液の菌数は、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、黒色集落数を測定し算出した。

(芽胞液の作製方法：各供試菌株をクックドミート培地で一晚嫌気培養後、芽胞調製用培地 10 mL に接種し 30 °C で一晚培養した。培養液は 80 °C 20 分間の加熱処理後、再び 30 °C で培養した。同加熱処理を翌日および一週間後に繰り返した後、滅菌水で 3 回洗浄した。芽胞形成は、ウイルツ芽胞染色キット (武藤化学) を用いて芽胞染色後、顕微鏡下で観察し確認した。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。)

2) 栄養型菌液の調製

- 80 °C に保存してあるボツリヌス菌芽胞液を解凍後、80 °C 20 分間の加熱処理し、その 1 μ L を卵黄加 CW 寒天培地に塗布した。30 °C で 24 時間嫌気培養し、発育した集落菌塊を滅菌精製水に懸濁し栄養型菌液とした。作製した栄養型菌液の菌数は、クロストリジア寒天培地を用いて混釈培養し、黒色集落数を測定し算出した。

3) 食品検体への菌液添加

3-a) ボツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験 (平成 26 年度からの継続試験)

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、検体食品 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4 °C、25 °C あるいは 30 °C に保存した。菌液添加日を保存 0 日目とし、15 日、30 日、100 日、180 日、270 日、360 日

に、各保存温度につき 4 検体ずつ食品内の菌数測定に用いた。(0 日目、15 日目、30 日目は平成 26 年度の検討) 陰性対照として芽胞液非添加の検体を、芽胞液添加検体と同様に保存し、食品内菌数の測定および理化学的性状 (pH と酸化還元電位) の測定に供した。ただし、芽胞液非添加の陰性対照群の保存温度は、4 °C および 30 °C とした。

3-b) ボツリヌス栄養型菌液の「たくあん」製品への添加試験

ボツリヌス栄養型菌液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、検体食品 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4 °C あるいは 30 °C で保存し、60 日後に食品内菌数を測定した。ただし、保存期間中に容器包装に膨張等の変化が見られた場合はその時点で保存を終了し、食品内菌数の測定を行うこととした。本試験には、各保存温度につき 2 検体を使用した。陰性対照として滅菌精製水を添加した検体を作成し、栄養型菌液添加群と同様に保存、60 日後に食品内菌数の測定および理化学的性状 (pH と酸化還元電位) の測定に供した。

3-c) ボツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験 2 (栄養素添加試験)

菌の発育に必要な栄養素の補充として 20 倍濃縮 BHI broth を検体食品 1 g あたり 0.25 μ L 添加した。その後、80 °C 20 分間の加熱処理した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) を添加し、4 °C あるいは 30 °C で保存し、30 日後に食品内菌数を測定した。ただし、保存期間中に容器包装に膨張等の変化が見られた場合はその時点で保存を終了し、食品内菌数の測定を行うこと

とした。本試験には、各保存温度につき2から3検体を使用した。芽胞液添加の陰性対照として滅菌精製水を添加した検体を作成し、芽胞液添加群と同様に保存、食品内菌数の測定および理化学性状（pHと酸化還元電位）の測定に供した。

3-d) ボツリヌス菌芽胞液の「煮豆」製品への添加試験：炭素源および窒素源豊富な食品への菌添加試験（補助的検討）

炭素源および窒素源が豊富な非動物性食品として黒豆の容器包装詰食品を用い、ボツリヌス菌芽胞液の添加試験を行った。80℃20分間の加熱処理した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「煮豆」製品それぞれ1検体に食品1gあたり 10^3 cfuとなるように添加し、30℃で保存し、30日後に食品内菌数を測定した。ただし、保存期間中に容器包装に膨張等の変化が見られた場合はその時点で保存を終了し、食品内菌数の測定を行うこととした。陰性対照として、芽胞液非添加の3検体を、芽胞菌添加検体と同様に30℃で保存し、食品内菌数の測定および理化学性状の測定に供した。

上記のボツリヌス菌液およびBHI brothの検体への添加には、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。

4) 理化学性状（pHおよび酸化還元電位）の測定

ボツリヌス菌非添加の検体を用い、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食品内部に挿入し、pHおよび酸化還元電位を測定した。

5) 生菌数（一般細菌数）の測定

無菌的に取り出した検体100gを細切後、滅菌ペプトン加生理食塩水100mLを加え、ストマッカーにて十分混和させ、これを試料原液（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1mLを標準寒天培地と混釈し平板を作成後、35℃で48時間培養を行ない、生育集落数を計測し、検体1gあたりの菌数を求めた。混釈平板は各段階希釈液に対して2枚ずつ作製した。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1mLを培地に混釈し、同様に操作、培養を行なった。

6) クロストリジア属菌数の測定

生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1mLをクロストリジア寒天培地と混釈後、培地を重層し平板を作成し、35℃で48時間嫌気培養を行なった。生育した黒色集落数を計測し、検体1gあたりのクロストリジア属菌の菌数を求めた。混釈重層平板は各段階希釈液に対して2枚ずつ作製した。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1mLを培地に混釈し、同様に操作、培養を行なった。

II. ボツリヌス菌の増殖にかかる理化学的性状に関する検討

計10供試株についてクックドミートブイヨンを用いて、37℃で嫌気培養を行った。得ら

れた培養液より、PBS を用いて、約 10^3 cfu / 100ul の希釈培養液を作成し、クックドミートブイヨン 10mL に接種した。同接種菌液を、BIONIX 低酸素培養キット（スギヤマゲン）を用いて、酸素濃度を 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0% に調整した上で、37 °C 下に最大 1 週間まで培養を継続し、1 日毎に濁度変化による発育の有無を確認した。最終的な増殖確認は、クロストリジア寒天培地に同接種菌液 100 μ L を塗布し、37 °C \cdot 48 時間嫌気培養後の黒色集落の発育の有無を以て判定した。

III. ボツリヌス毒素の in vitro 定量的検出法の探索（マウス毒性試験法との比較検討）

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

2) 毒素の in vitro 定量検出法

精製ボツリヌス A 型毒素および B 型毒素は、滅菌リン酸緩衝液で段階希釈した。A 型毒素には BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit を、B 型毒素には BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用い、各 Kit のマニュアルに従い操作した。陰性対照に

は、滅菌リン酸緩衝液のみおよび加熱処理によって不活化をした毒素を用いた。切断前の基質は 434 nm の励起光下で 526 nm の最大蛍光波長を、毒素活性により切断された基質は 470 nm の最大蛍光波長を有しているため、35 °C で 24 時間の反応時間のうち、434 nm の励起光下で 470 nm および 526 nm の蛍光強度を測定した。毒素活性は、470 nm と 526 nm の蛍光強度比 (RFU at 526 nm / RFU at 470) から算出し、毒素の検出は毒素活性値にもとづき行った。B 型毒素に関しては必要に応じて事前にトリプシンによる活性化を行った。

3) トリプシン処理

毒素溶液に 1/10 容量の 10%トリプシン溶液を加え、時々振盪させながら 37 °C 1 時間反応させた。

D. 結果

I. ボツリヌス菌の食品内動態試験（ボツリヌス菌添加/保存試験）

(a) ボツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験

a-1) クロストリジア属菌および一般細菌の食品内動態（表 1, 2）

試験開始時の A 型菌および B 型菌芽胞添加量は、クロストリジア属菌として検出される黒色集落数として、検体 1 g あたりそれぞれ 418 ± 213 cfu および $1,093 \pm 329$ cfu であった。検体食品内のクロストリジア属菌の動態は、A 型 B 型いずれの菌型においても保存温度に関係なく、6 ヶ月目まで添加時と同程度の菌数を維持していた（図 1）。その後、減少傾向に転じたが、1 年目においても菌は検出可能であった。6 ヶ月目以降の菌数の減少は、4 °C 保存群より保存温度が高い群（25 °C および

30 °C 保存群) においてより顕著となる傾向があり、試験終了時点の1年目の平均菌数では、4 °C 保存群が最も高くなった。

試験開始時の一般細菌数(生菌数)は、A型菌芽胞添加群、B型菌芽胞添加群、芽胞非添加群でそれぞれ、 406 ± 213 cfu/g、 396 ± 374 cfu/g、 246 ± 136 cfu/gであった。4 °C 保存群では、生菌数は、芽胞菌添加の有無に関わらず1年を通して開始時とほぼ同程度の菌数であったが、25 °C および 30 °C 保存群では、検体間で程度に大きな差がみられるものの、初期菌数よりも増加した(図2)。

a-2) 理化学的性状の経時的変化(表2, 図3)
芽胞菌非添加群を用いて、検体食品の理化学的性状(pH値と酸化還元電位)を測定した。保存試験開始時のpH値は 5.15 ± 0.11 であった。pH値は保存温度に関係なく1年を通して大きな変動なくおおむねpH5前後からpH5.5前後の範囲にあり、検体のpH値は常にボツリヌス菌の生育が可能な条件にあったと考えられた。酸化還元電位は、試験開始時点で 32.02 ± 7.0 mVで、4 °C および 30 °C 条件下ともに、一旦上昇傾向になったがその後下降し、試験終了時の1年目では開始時点よりも低い酸化還元電位を示した。一般的に、ボツリヌス菌の生育可能な酸化還元電位は-200 mV程度であると報告されているが、我々は平成26年度の検討結果から-200 mVから+200 mVまでの広い範囲でボツリヌス菌が良好に生育することを明らかにしており、酸化還元電位についても、検体はボツリヌス菌の生育が可能な値であったと考えられた。

(b) ボツリヌス栄養型菌液の「たくあん」製品への添加試験

芽胞菌を用いた試験(a)では、検体食品内でボツリヌス菌が長期間維持されているものの、菌の顕著な増殖はみられなかった。そこで、栄養型菌液の添加を行い、「たくあん」製品内でボツリヌス菌の増殖について確認試験を行った(表3, 4, 5)。

試験開始時のA型およびB型栄養型菌添加量は、それぞれ 277 ± 41 cfu/g、 419 ± 61 cfu/gであった。60日の保存期間中、検体の容器包装の膨張等の変化は見られず、60日後に保存を終了し菌数の測定を行った。60日後のクロストリジウム属菌数は、A型菌添加4 °C 保存群で 151 ± 45 cfu/g、A型菌添加30 °C 保存群で 71 ± 10 cfu/g、B型菌添加4 °C 保存群で 157 ± 40 cfu/g、B型菌添加30 °C 保存群で 95 ± 21 cfu/gで、いずれの菌型、保存温度においても減少傾向にあり、栄養型菌添加においてもボツリヌス菌の検体食品内での生育・増殖は見られなかった(表3)。生菌数は、芽胞菌を用いた試験(a)の結果と同様に、いずれの群も開始時と同等程度の菌数を維持あるいは若干の増加傾向が見られた(表4)。栄養型菌非添加検体を用いた理化学的性状の測定結果から、これらの検体もpH値および酸化還元電位に関してはボツリヌス菌の生育可能範囲にあったと考えられた(表5)。

(c) ボツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験2- 栄養素添加

細菌の生育には、培地等に窒素源および炭素源となる栄養素が必要となる。特にボツリヌス菌などクロストリジウム属菌は生育・増殖に高タンパク質および高炭水化物が必要とされ、検査室等で用いられるボツリヌス菌の生育・増殖用培地には、クックドミート培地やGAM寒天培地、CW寒天培地、TPYG培地

など、標準寒天培地や LB 培地等よりもタンパク質および炭水化物含量が高い培地が通常使用される。今回の検体が「たくあん」製品で窒素源および炭素源が非常に乏しい「だいこん」(参照: 表 9) が主たる原材料であることから、ボツリヌス菌が発育・増殖しなかった原因の 1 つとして、窒素源および炭素源の不足が考えられた。そこで「たくあん」検体に、芽胞液とともに、栄養素の補充として 20 倍濃縮の BHI broth を添加した条件下でボツリヌス菌の動態を検討した。BHI broth 非添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 非添加 B 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 B 型芽胞液添加群における試験開始時のクロストリジア属菌は、それぞれ 382 ± 40 cfu/g、 512 ± 112 cfu/g、 308 ± 3 cfu/g、 607 ± 436 cfu/g であった (表 6)。30 日間の保存期間中、容器包装の膨張等の変化は見られず、30 日後に保存を終了し菌数の測定を行った。30 日後のクロストリジア属菌数は、A 型 B 型いずれの菌型、また保存温度においても、保存試験開始時よりも減少傾向にあり、BHI broth 添加条件下でもボツリヌス菌の増殖は見られなかった。同じ検体および芽胞菌非添加検体での生菌数は、いずれの群も保存試験開始時より若干の増加傾向が見られ、一部例外もあるものの、BHI broth を添加した 30 °C 保存群にその傾向が強かった (表 7)。芽胞液菌非添加検体を用いた理化学的性状の測定結果から、これらの検体も pH 値および酸化還元電位に関してはボツリヌス菌の発育可能範囲にあった (表 8)。

(d) ボツリヌス菌芽胞液の「煮豆」製品への添加試験 - 炭素源・窒素源豊富な食品への菌添加試験 (補助的検討)

ボツリヌス菌の増殖に関わる栄養素に関する補助的検討として、炭素源および窒素源が豊富な非動物性食品へのボツリヌス菌芽胞液の添加試験を行った。豆類は一般的に栄養成分としてタンパク質および炭水化物を多く含む非動物性食品であり (参照: 表 9)、豆類のうち大豆は特にタンパク質量が多い。大豆を原料とした「煮豆」製品は、容器包装詰食品として常温流通、販売されている場合も多い現状も鑑み、黒大豆煮豆製品に対してボツリヌス菌芽胞液の添加を行い、30 °C で保存した。添加 6 日目には芽胞液添加検体でガス産生による容器包装の膨張が見られたため、7 日目に保存を中止し、芽胞液添加検体ならびに陰性対照の芽胞液非添加検体の食品内菌数の測定を行った (図 4)。芽胞液非添加の 3 検体の pH 値は 6.81 ± 0.1 、酸化還元電位は -245.2 ± 3.7 mV で、一般細菌およびクロストリジア属菌はいずれも検出しなかった。容器包装に膨張が見られた芽胞菌添加検体のクロストリジア属菌数は、A 型および B 型芽胞液添加検体それぞれ、 5.6×10^6 cfu/g および 2.3×10^6 cfu/g で、食品内でボツリヌス菌が顕著に増加していた。一方、生菌数は検出されなかった。

II. ボツリヌス菌の増殖にかかる理化学的性状に関する検討

計 9 供試株では、酸素濃度 0.75% 以下で培養 1 日以内に良好な増殖を示し、うち 407 - 1 を除く 8 株は 1.00% でも同 4 日以内に増殖を呈した (表 10)。一方、CB21 株については、0.50% 以下での増殖を示すにとどまった (表 10)。また、生存性については、より高い酸素濃度下においても、ヒートショックを行った後に

は確認された（データ未載）。

III. ボツリヌス毒素の in vitro 定量的検出法の探索（マウス毒性試験法との比較検討）

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用した迅速・高感度のボツリヌス毒素 in vitro 検出法「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」が米国 BioSentinel 社によって開発されている。本試験では、この「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」と現在の国際的な標準法であるマウス毒性試験法 (in vivo 法) を用い、検出感度の比較検討を行った。精製ボツリヌス A 型毒素を用いた場合、マウス毒性試験法での検出最低濃度は 6-10 pM であった。一方、BioSentinel 社の A 型毒素用キット (BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit) を用いた試験では、陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 pM であった (図 5)。また精製ボツリヌス B 型毒素を用いた場合、マウス毒性試験法での検出最低濃度は 30-100 pM であったのに対し、B 型毒素用キット (BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit) で陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 nM であった (図 5)。

E. 考察

I. ボツリヌス菌の食品内動態試験（ボツリヌス菌添加/保存試験）

平成 20 年に通知された指導内容を逸脱していた「たくあん」製品を用いて菌の添加/長期保存試験を行った。本試験では、計 72 個の「たくあん」製品を菌非添加検体として用いたが、いずれからもクロストリジウム属菌は検出されず、ボツリヌス菌の原材料への汚染はなかったと考えられた。しかし、食品内の

ボツリヌス菌動態の検討結果から、原材料がボツリヌス菌芽胞に汚染された場合、長期にわたりボツリヌス芽胞数が初期濃度で維持される可能性が示唆された。ボツリヌス菌の場合、乳児等の一部のグループを除き、菌が増殖し毒素を産生する状況でない限りヒトへの健康危害はないと考えられるが、芽胞菌数が減少せず食品内で長期維持されることは留意すべき点であると考ええる。

本試験では、「たくあん」検体の pH 値および酸化還元電位がボツリヌス菌の発育が可能な条件下にあったにもかかわらず、添加した A 型および B 型ボツリヌス菌 (芽胞および栄養体) は食品内で増殖しなかった。その理由として発育に必要な窒素源および炭素源の不足を考え、BHI broth 存在下でのボツリヌス菌の添加試験も行ったが、同様に食品内での増殖は見られなかった。しかしながら、炭素源および窒素源が豊富な「煮豆」製品を用いた検討では、短期間でガス産生を伴うボツリヌス菌の顕著な増加が確認された。BHI broth を添加した「たくあん」製品においてボツリヌス菌の発育がみられなかったのは、(1) BHI broth の添加量が不十分であった (2) BHI broth は糖含量があまり高くない事から、炭素源が不足状態であった、などの可能性に加え、BHI broth 添加群で生菌数の増殖がよい傾向にあったことから (3) 検体内に存在する一般細菌等により添加した栄養素が消費され、ボツリヌス菌の発育より先に一般細菌の発育が促進してしまった可能性なども考えられた。検体内に存在する一般細菌に関しては、ボツリヌス菌の増殖が顕著であった「煮豆」製品では、生菌数は検出されず、共存菌はなかったと考えられる。「煮豆」製品に関

しては、ボツリヌス菌が容易に増殖する事は既に報告され、平成 20 年の厚生労働省の指導通達後、ボツリヌス対策として「120 °C 4 分間の加熱と同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行っている」と平成 22 年のフォローアップ調査で回答している。今回、用いた「煮豆」製品から生菌数が検出されなかった理由としては、120 °C 4 分間の加熱と同等以上であったかどうかは本試験だけでは判定できないが、少なくとも一般細菌が死滅する程度の加熱殺菌は実施されていたからだと考えられた。これらかの結果から、ボツリヌス菌の食品内増殖については、競合する他菌の有無の影響や食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集、更なる検討が必要と考えられた。

平成 20 年に通達されたボツリヌス対策では、背景でも述べたように、当該食品中のボツリヌス菌を除去する、ボツリヌス菌の増殖を防止する、またはボツリヌス毒素の産生を防止する、のいずれかをとることとしており、具体的には、[1] 中心部温度を 120 °C 4 分間加熱する方法またはこれと同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行なう。[2] 冷蔵 (10 °C 以下) 条件で流通保存することとし、容器包装にその旨を明記する。[3] pH を 4.6 以下に調整し、菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生を防止する。[4] 水分活性を 0.94 以下にし、菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生を防止する。などがあり、これらの措置は容器包装詰低酸性食品を取り扱う業界団体の責任において講じる事となっている。上記のうち[2]以外は、当該製品の外観からではどの措置がなされているのか判別できない。対策未実施製品があった場合は、本

研究のように「市場品を用いた調査/検討の実施」、あるいは事故発生により違反が判明する状態である。市場に出回っている「煮豆」製品の中には、加熱処理済みである旨を記載しているものも見受けられた (図 6) ことから、当該食品を扱う業界団体には指導内容の遵守に加え、自主的に対策内容の表記を行う団体/企業が増える事を期待したい。

II. ボツリヌス菌の増殖にかかる理化学的性状に関する検討

ボツリヌス菌の増殖に求められる酸素濃度条件に関して検討を行った。結果として食品マトリックス内でボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度は概ね 0.75%以下であることが示された。真空包装食品におけるボツリヌス菌の発育ならびに毒素産生に関する点では、Kasai らが包装米飯において 5%以下の酸素濃度で発育・毒素産生リスクがあると報告している (J Food Prot. 2005. 68: 1005-11)。本研究においては、食品マトリックスを用いた検討は行っていない他、実際の食品にあっては、他菌による酸素濃度への影響あるいは食品マトリックスに含まれる栄養組成がボツリヌス菌の栄養要求性を満たすかどうかといった点も考慮する必要があると考えられる。本研究により得られた結果からは、少なくとも 1%以下の酸素濃度を有する食品に対しては、ボツリヌス菌の増殖リスクがあると想定され、一定濃度以上の酸素を均一に含む食品製造が本菌汚染リスクの低減に有効と思われた。

III. ボツリヌス毒素の in vitro 定量的検出法の探索 (マウス毒性試験法との比較検討)

ボツリヌス毒素の検出法・定量法としては、体重 20 g 前後のアルビノマウス (ddY 系あるいは ICR 系)を用いたマウス毒性試験法がゴールドスタンダード法として位置づけられており、日本においてもマウス毒性試験法が公定法に採用されている。マウス毒性試験法は検出感度が高く、この方法で測定された LD50 値を 1U とし、ボツリヌス毒素量表記の基準となっている。しかしながらマウス毒性試験法は動物実験であることから、施設、動物倫理などの多くの面から制約があり、食品の安全性を試験する方法としてこのマウス毒性試験法が一般検査機関で実行できる状態にないのが現状である。このような背景から、マウス毒性試験法の代替法となる、動物を使用せず、かつ、通常の検査施設で実施可能な高感度なボツリヌス毒素の定量的検出法が必要とされている。これまでに、毒素タンパク質に対する抗原抗体反応を検出原理とした ELISA 法やその改良法 PCR-ELISA 等の *in vitro* ボツリヌス毒素の検出法が開発されているが、現時点では、検出感度の点でマウス毒性試験法に勝る方法はない。また毒素遺伝子の検出を原理とした PCR 法も開発されているが、試料に混在する食品成分による PCR 反応阻害などの問題点に加え、毒素遺伝子の存在と毒素産生が一致しない場合もあり、PCR 法などの毒素遺伝子検出法は補能助的な使用に留まっている。近年、米国 BioSentinel 社によって開発された蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用したボツリヌス毒素検出法は、毒素の作用本体であるエンドペプチダーゼ活性を検出原理としており、毒素の基質の一部に 2 種の蛍光色素を標識したものをを用いる。検出原理がマウス毒性試験法と同じであ

ることから、他法と比してマウス毒性試験法とのよい相関性が期待できるのではないかと考え、この蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用したボツリヌス毒素の *in vitro* 定量的検出法とマウス毒性試験法の感度の比較検討を行った。精製ボツリヌス A 型毒素を用いた場合、検出感度は両試験法で同等程度であり、マウス毒性試験法の代替法としての可能性を期待させる結果であったが、B 型毒素を用いた場合は大きな差がみられた。予備実験的に、菌培養上清を用いた検討やトリプシンによる B 型毒素活性化処理、同社の Immunoprecipitation Kit を用いた精製/濃縮操作等も行ったが、現在の時点では感度の相違は改善できなかった。検査試料の前処理等についてのさらなる検討が必要と感じられた。

F. 結論

ボツリヌス菌の食品内動態及び食品内毒素の *in vitro* 定量的検出方法の探索を行った。前者については、平成 20 年に通知された指導内容を逸脱した「たくあん」製品にボツリヌス芽胞菌を添加し、経時的に食品内の菌数(クロストリジア属菌及び生菌数)と理化学的性状値を測定した。用いた「たくあん」製品は、保管温度に関わらず 1 年間の保管期間を通して食品内 pH および酸化還元電位はボツリヌス菌の発育可能範囲であった。A 型・B 型芽胞菌の添加後、6 ヶ月目迄は添加時と同等の菌数が食品内に維持され、その後減少傾向が見られたが 1 年後においても菌は検出可能であった。さらに、「たくあん」製品に対しボツリヌス菌(栄養体)添加/保存試験を行いボツリヌス菌の食品内動態を検討したが、ボツリヌス菌の発育は認められなかった。「たくあん」製品とは異なり、菌の発育に必

要な窒素源・炭素源が豊富な「煮豆」製品にボツリヌス菌芽胞を添加し 30 °C で保存したところ、1 週間で容器の膨張が見られ、ガス産生を伴ったボツリヌス菌の顕著な増加が確認された。以上の成績より、ボツリヌス菌の食品内増殖については、食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集が必要と考えられた。

ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量法探索としては、共鳴エネルギー転移を利用した BioSentinel 社製（米国）の BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用い、マウス毒性試験法との感度の比較検討した。A 型毒素についてはマウス毒性試験法と同等の高い検出感度を示したが、B 型毒素の検出感度は、マウス毒性試験法に比べて低く、今後も継続した改良と検討が必要と考えられた。

G. 健康危害情報

なし

H. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表1: ボツリヌス菌芽胞液添加群でのクロストリジウム属菌数および生菌数

A型菌						B型菌							
保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	生菌数		クロストリジウム属菌数		保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	生菌数		クロストリジウム属菌数	
			cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD				cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD
0		1	211	406 ± 213	406	418 ± 213	0		5	236	396 ± 374	1,413	1,093 ± 329
		2	353		665				876				
		3	350		146				204				
		4	710		453				1,333				
4		13	192	225 ± 59	72	213 ± 102	4		25	359	235 ± 83	842	686 ± 140
		14	313		207				713				
		15	215		300				689				
		16	182		273				503				
15	25	17	1,290	1,660 ± 1,085	171	220 ± 119	15	25	29	1,295	1,611 ± 1,137	1,045	588 ± 328
		18	3,260		75				270				
		19	1,238		315				555				
		20	850		320				555				
	30	21	563	719 ± 231	360	290 ± 95		30	33	563	1,603 ± 1,914	630	509 ± 236
		22	910		185				610				
		23	480		380				610				
		24	924		235				155				
30	4	45	795	1,015 ± 726	184	137 ± 91		4	57	3,750	1,937 ± 2,019	264	239 ± 99
		46	893		102				232				
		47	332		28				110				
		48	2,040		234				348				
	25	49	1,000	861 ± 109	354	283 ± 146	30	25	61	15,100	13,858 ± 9,558	432	322 ± 175
		50	885		230				290				
		51	814		106				87				
		52	745		440				477				
	30	53	18,300	28,150 ± 15,882	60	88 ± 27		30	65	40,500	12,171 ± 19,115	356	612 ± 351
		54	17,300		118				330				
		55	51,300		72				1,080				
		56	25,700		102				682				
100	4	77	240	530 ± 288	260	253 ± 85		4	89	250	865 ± 719	280	343 ± 95
		78	850		370				260				
		79	690		190				360				
		80	340		190				360				
	25	81	11,050	11,695 ± 8,827	320	245 ± 62	100	25	93	13,360	6,038 ± 5,057	30	763 ± 879
		82	12,950		270				240				
		83	22,150		210				290				
		84	630		180				790				
	30	86	1,225	6,839 ± 7,120	390	394 ± 110		30	97	255	2,671 ± 4,067	510	306 ± 174
		87	11,900		325				305				
		88	14,000		550				305				
		207	230		310				85				
180	4	109	280	420 ± 145	482	467 ± 245		4	121	305	1,103 ± 804	1,730	1,156 ± 674
		110	420		682				1,410				
		111	360		584				183				
		112	620		120				1,300				
	25	113	16,800	13,728 ± 8,728	154	385 ± 181	180	25	124	1,800	3,800 ± 2,124	593	1,028 ± 704
		114	15,300		485				800				
		115	21,550		334				642				
		116	1,260		565				2,075				
	30	117	12,000	4,735 ± 5,360	840	488 ± 384		30	128	3,640	10,171 ± 15,713	342	693 ± 426
		118	3,560		209				1,303				
		119	720		796				654				
		120	660		106				472				
270	4	141	260	515 ± 180	100	391 ± 348		4	154	324	435 ± 123	510	492 ± 157
		142	580		520				515				
		143	540		119				280				
		144	680		825				661				
	25	145	1,690	8,835 ± 14,344	171	93 ± 88	270	25	157	391	2,670 ± 814	110	293 ± 236
		146	3,825		168				530				
		148	1,475		22				70				
		149	30,350		12				460				
	30	151	590	9,853 ± 17,835	26	41 ± 26		30	162	1,365	1,576 ± 528	50	118 ± 83
		152	860		14				230				
		153	1,360		71				130				
		174	869		67				331				
360	4	175	323	667 ± 346	44	51 ± 30		4	186	326	621 ± 265	323	431 ± 121
		176	1,047		11				518				
		177	429		80				553				
		178	3,310		8				10				
	25	179	2,410	2,178 ± 966	12	22 ± 15	360	25	191	1,130	1,814 ± 1,227	418	136 ± 194
		180	2,010		28				109				
		181	980		40				6				
		182	1,280		12				48				
	30	183	1,930	1,308 ± 458	36	20 ± 11		30	194	1,400	1,416 ± 428	75	85 ± 70
		184	1,190		12				31				
		185	830		20				187				
		195	1,370		196				1,970				

表2: 芽胞液非添加群での理化学的性状値とクロストリジウム属菌数および生菌数

保存期間	温度 (°C)	ID	pH		酸化還元電位		生菌数		クロストリジウム属菌数	
			pH	mean ± SD	mV	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD
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	
100	4	101	4.99	5.26 ± 0.20	43.3	43.9 ± 5.7	130	380 ± 278	<2	< 2
		102	5.47		51.7		160		<2	
		103	5.32		37.9		690		<2	
		104	5.24		42.8		540		<2	
	30	105	5.11	5.19 ± 0.39	43.9	40.4 ± 12.7	8,535	4,004 ± 3,245	<2	< 2
		106	5.09		22.4		3,160		<2	
		107	5.74		42.9		3,490		<2	
		108	4.82		52.3		830		<2	
180	4	133	5.35	5.27 ± 0.13	41.7	38.3 ± 11.2	290	310 ± 59	<2	< 2
		134	5.20		45.1		240		<2	
		135	5.40		44.8		330		<2	
		136	5.13		21.6		380		<2	
	30	137	4.96	5.22 ± 0.22	19.8	20.8 ± 3.0	200	15,260 ± 28,700	<2	< 2
		138	5.11		18.1		1,660		<2	
		139	5.42		20.3		58,300		<2	
		140	5.39		25.1		880		<2	
270	4	166	5.59	5.32 ± 0.19	14.9	18.5 ± 12.4	128	205 ± 69	<2	< 2
		167	5.24		17.9		166		<2	
		168	5.27		35.4		271		<2	
		169	5.16		5.9		253		<2	
	30	170	5.09	5.08 ± 0.09	10.2	24.5 ± 10.2	250	1,049 ± 856	<2	< 2
		171	5.20		29.0		2,215		<2	
		172	5.03		24.9		1,120		<2	
		173	5.00		33.7		610		<2	
360	4	198	5.50	5.40 ± 0.15	20.5	4.5 ± 19.5	90	214 ± 138	<2	< 2
		199	5.34		21.8		111		<2	
		200	5.53		-15.6		274		<2	
		201	5.22		-8.9		380		<2	
	30	202	4.83	5.19 ± 0.57	24.3	19.5 ± 15.9	16	6,973 ± 13,818	<2	< 2
		203	4.95		37.5		65		<2	
		204	4.93		16.6		109		<2	
		205	6.05		-0.5		27,700		<2	

表3: 栄養型菌添加/保存試験でのクロストリジウム属菌数 (cfu/g of food)

菌型	試験開始時	保存温度	60日後
A	277 ± 41	4 °C	151 ± 45
		30 °C	71 ± 10
B	419 ± 61	4 °C	157 ± 40
		30 °C	95 ± 21

表4: 栄養型菌添加/保存試験での生菌数 (cfu/g of food)

菌型	試験開始時	保存温度	60日後
非添加	634 ± 233	4 °C	1,132 ± 240
		30 °C	1,332 ± 299
A	709 ± 216	4 °C	1,478 ± 595
		30 °C	2,882 ± 1,001
B	486 ± 119	4 °C	798 ± 161
		30 °C	1,169 ± 368

表5: 栄養型菌添加/保存試験理での食品内理化学的性状値

	保存温度	pH	酸化還元電位
試験開始時		5.17 ± 0.10	32.8 ± 7.2
60日後	4 °C	5.25 ± 0.04	35.6 ± 6.2
	30 °C	5.27 ± 0.13	37.4 ± 7.9

表6: BHI broth添加試験でのクロストリジウム属菌数 (cfu/g of food)

菌型	BHI添加	試験開始時	保存温度	30日後
A	-	382 ± 40	4 °C	310 ± 255
			30 °C	125 ± 7
	+	512 ± 112	4 °C	207 ± 49
			30 °C	150 ± 95
B	-	308 ± 3	4 °C	202 ± 42
			30 °C	120 ± 11
	+	607 ± 436	4 °C	113 ± 34
			30 °C	61 ± 14

表7: BHI broth添加試験での生菌数 (cfu/g of food)

菌型	BHI添加	試験開始時	保存温度	30日後
非添加	-	465 ± 131	4 °C	298 ± 113
			30 °C	1,098 ± 513
	+	420 ± 173	4 °C	660 ± 580
			30 °C	1,365 ± 290
A	-	1,046 ± 103	4 °C	2,320 ± 1,372
			30 °C	5,878 ± 6,537
	+	659 ± 353	4 °C	2,013 ± 2,190
			30 °C	2,363 ± 1,405
B	-	939 ± 301	4 °C	2,293 ± 2,097
			30 °C	1,580 ± 1,153
	+	1,170 ± 353	4 °C	957 ± 337
			30 °C	5,087 ± 1,227

表8: BHI broth添加試験での理化学的性状値

	保存温度	BHI添加	pH	酸化還元電位
試験開始時		-	5.11 ± 0.04	38.4 ± 11.0
		+	5.20 ± 0.15	23.0 ± 14.0
30日後	4 °C	-	5.29 ± 0.07	38.9 ± 14.1
		+	5.35 ± 0.54	25.1 ± 7.9
	30 °C	-	5.40 ± 0.03	43.1 ± 0.6
		+	5.42 ± 0.07	38.7 ± 4.6

表9: 主な豆類および野菜類のタンパク質、脂質、炭水化物量

	食品100 gあたりの成分量 (g)				食品100 gあたりの成分量 (g)		
	タンパク質	脂質	炭水化物		タンパク質	脂質	炭水化物
豆類 大豆:黄大豆 全粒 ゆで	0.148	0.098	0.084	ブロコリー 生	0.043	0.005	0.052
大豆:ぶどう豆 *	0.141	0.094	0.370	トウモロコシ ゆで	0.035	0.017	0.186
えだまめ ゆで	0.115	0.061	0.089	たけのこ ゆで	0.035	0.002	0.055
レンズ豆 全粒 ゆで	0.112	0.008	0.291	エリンギ ゆで	0.032	0.005	0.065
ひよこまめ 全粒 ゆで	0.095	0.025	0.274	カリフラワー ゆで	0.027	0.001	0.051
あおえんどう 全粒 ゆで	0.092	0.010	0.252	かぼちゃ ゆで	0.019	0.001	0.133
あずき 全粒 ゆで	0.089	0.010	0.242	じゃがいも 蒸し	0.015	0.001	0.197
いんげんまめ 全粒 ゆで	0.085	0.010	0.248	ごぼう ゆで	0.015	0.002	0.137
そらまめ:お多福豆	0.079	0.012	0.522	さといも 蒸し	0.015	0.001	0.134
にんにく 生	0.064	0.009	0.275	レンコン ゆで	0.013	0.001	0.161
クワイ ゆで	0.062	0.001	0.272	さつまいも 蒸し	0.012	0.002	0.319
甘ぐり	0.049	0.009	0.485	オリーブ	0.010	0.150	0.045
ぎんなん ゆで	0.046	0.015	0.358	にんじん ゆで	0.007	0.001	0.085
やまいも 生	0.045	0.005	0.226	だいこん 生	0.005	0.001	0.041

* ぶどう豆 = 黒大豆 全粒 ゆで

日本食品標準成分表2015年版より抜粋

表10：異なる酸素濃度条件下におけるボツリヌス菌の発育状況

酸素濃度 (%)	A型菌株					B型菌株				
	62A	33A	36A	CB21	Renkon1	Okra	NH-2	67B	326-5	407-1
0.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.75	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
1.00	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図1: ホツリヌス菌芽胞液添加群でのクロストリジウム属菌の食品内動態 (菌数の経時的変動)

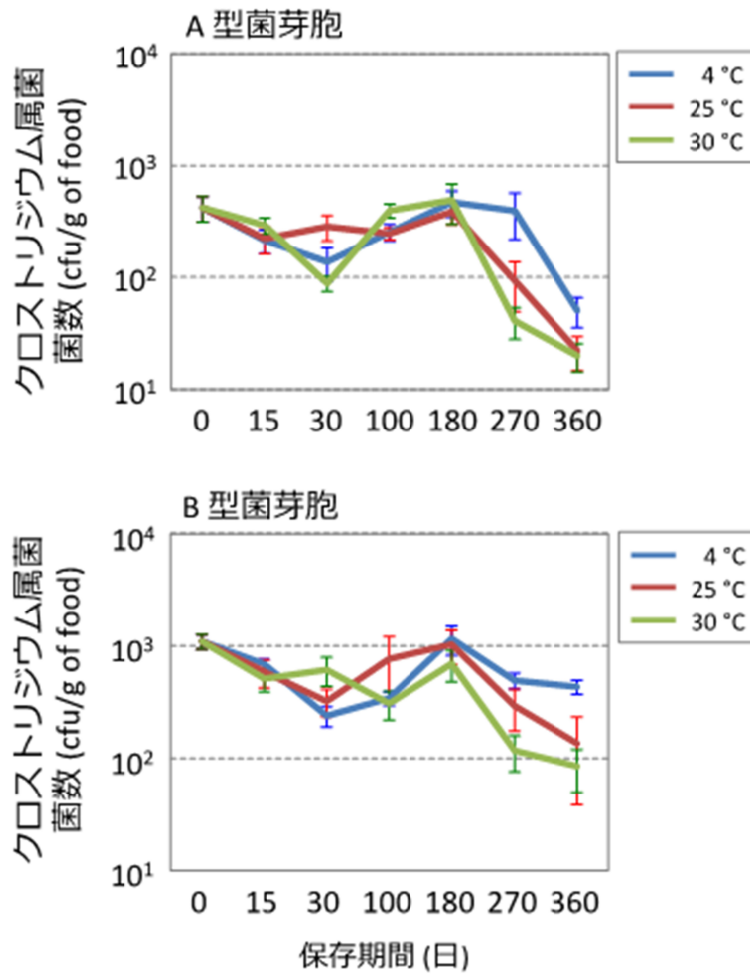


図2: ホツリヌス菌芽胞液添加試験での一般細菌の食品内動態 (生菌数の経時的変動)

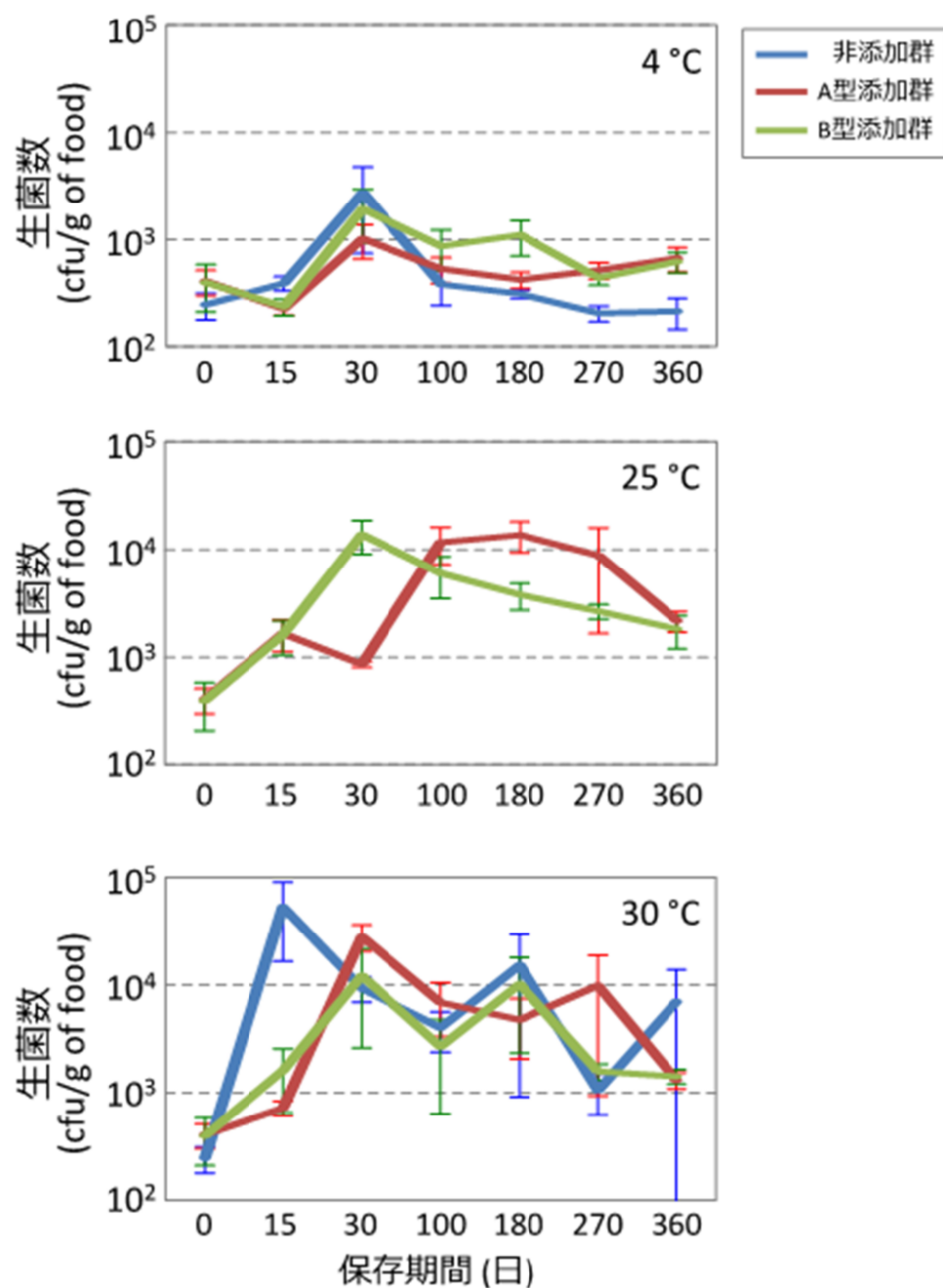


図3: ボツリヌス菌芽胞液添加試験での食品内pH値および酸化還元電位の経時的変化

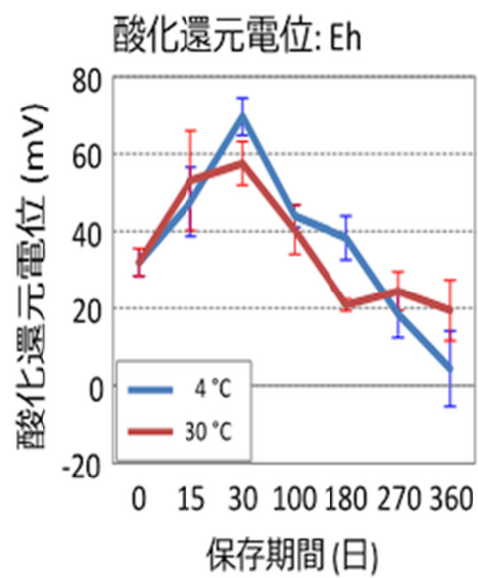
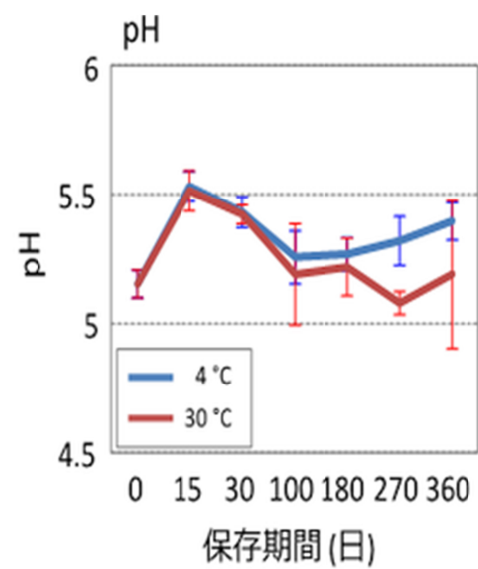


図5: FRETを利用した*in vitro* ボツリヌス毒素検出法

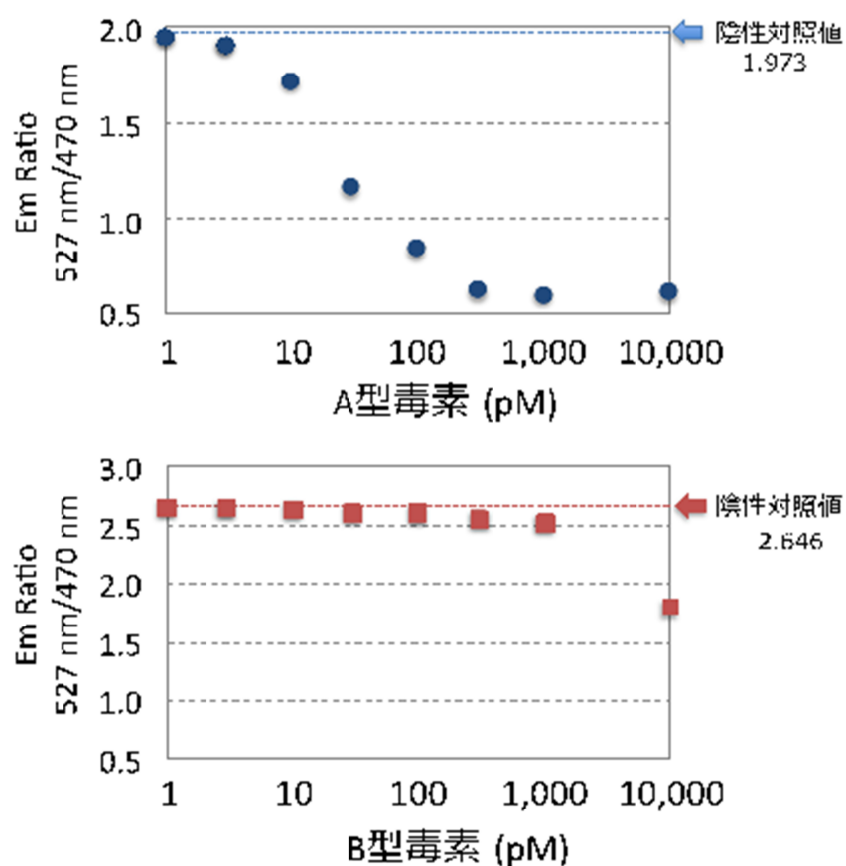
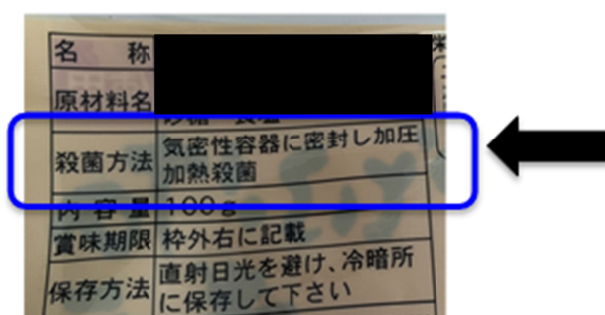


図6: 殺菌方法の表示がある容器包装詰「煮豆」製品



平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究」
分担研究報告書

米国の「農産物の安全に関する最終規則」に定められた
微生物基準に関する調査

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（果物・野菜等）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。

本年度は米国における非動物性食品に関する微生物基準の動向を把握するため、米国で 2011 年 1 月に成立した食品安全近代化法（FSMA: Food Safety Modernization Act）を実施に移すために 2015 年 11 月に米国食品医薬品局（US FDA: US Food and Drug Administration）により最終規則化された「農産物の安全に関する最終規則」について、関連各種資料の調査を行った。その結果、本規則では「農業用水の品質と検査」、「動物由来の生物学的土壌改良材」、「発芽野菜の生産」、「家畜や野生動物による汚染」、「健康と衛生の重要性についての研修」、および「農場の設備、道具、建物」に関する要件が重要項目として挙げられていることがわかった。

我が国では果物・野菜に関する食習慣、嗜好性や果物・野菜の生産・加工時の慣習、衛生管理状況が米国とは異なるが、食品の世界的な流通の状況、および FSMA が米国への輸入食品にも適用されることに鑑み、米国や欧州連合（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。

本最終規則は Farm-to-Fork の基本に沿った内容であり加熱処理を経ない発芽野菜を始めとする生鮮食品に関しても細かく基準が定められていた。灌漑に使用する用水や堆肥に関する規定から現場作業者の意識啓蒙活動に関する規定まで含

まれており、包括的な内容となっている。我が国においても、加熱処理を経ずに喫食される食品に関しては特に、一次生産段階における汚染対策を含む Farm-to-Fork 全体にわたる包括的な対応が望まれる。

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、白菜の浅漬け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「あずきばっとう」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年にパパイアの喫食に関連して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名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挙げられ、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。

米国では食品安全対策の強化による消費者保護を目的として食品安全近代化法（FSMA: Food Safety Modernization Act、資料1参照）が2011年に1月に成立し、

それを実施に移すために「農産物の安全に関する規則 (Produce Safety rule)」が 2015 年 11 月に最終規則化された(資料 2 参照)。本年度は、米国食品医薬品局(US FDA: US Food and Drug Administration)が刊行した「農産物の安全に関する最終規則：必須要件」(資料 3) や関連資料(資料 4) を中心に文献調査を行うことで、米国における非動物性食品の微生物基準の動向を把握することを目的とした。

B. 研究方法

米国で 2011 年に 1 月に成立した FSMA を実施に移すために 2015 年 11 月に最終規則化された「農産物の安全に関する規則 (Produce Safety rule)」やその関連資料(資料 3、4) を調査することで米国における非動物性食品(果物・野菜等)に関する微生物基準の動向の把握を試みた。

C. 研究結果

「農産物の安全に関する最終規則」は、人が喫食する果物や野菜について、それらの安全な栽培、収穫、包装、および保存に関する科学的な基準を初めて規定したものである。以下は、当該最終規則に定められた重要項目の概略である。

1. 農業用水

病原菌を伴う可能性がある糞便による汚染を検出するため、農業用水の品質と検査の要件が規定されている。

1-1. 水質

最終規則は農業用水の微生物学的品質に関して 2 セットの基準を設定しており、こ

れらはいずれも糞便汚染の指標となり得る大腸菌 (generic *E. coli*) についてのものである。

潜在的に危険性のある微生物が存在した場合、それらが直接的または間接的に農産物に移行する可能性が高い農業用水には大腸菌が検出されてはならないとしている。このような用水の例としては、収穫時および収穫後に手指を洗うための水、食品が接触する表面に用いる水、収穫時または収穫後に農産物と直接接触する水(製氷用の水を含む)発芽野菜の灌漑用の水などが挙げられる。これらの用水に大腸菌が検出された場合はその使用を直ちに中止し、再使用の前に改善措置を取らなければならないとしている。本最終規則はこれらの用水として未処理の表層水を使用することを禁止している。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる水に関する数的基準は幾何平均値 (geometric mean: GM) と統計学的閾値 (statistical threshold: STV) よりなる。当該水検体 100 ml あたりの大腸菌生菌数 (CFU) は、GM が 126 以下、STV が 410 以下でなければならないとしている。

当該水がこれらの基準を満たさなかった場合は、実行可能な限りできるだけ速やかに(遅くとも翌年中に)改善措置を取らなければならないとしており、当初、農業用水が微生物基準を満たさなかった農家は、いくつかの選択肢(省略)のいずれかを実施することにより、基準がクリアされ、当該水を使用できるようになるとしている。

1-2. 検査

最終規則では、検査の頻度が水源の種類

(すなわち、表層水か地下水か)にもとづき規定されている。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いるために、外的要因の影響を最も受け易いと考えられる未処理の表層水を検査する場合は、農場は初期調査として、2~4年にわたり収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも20検体を検査しなければならない。農場はこの初期調査の結果からGM値とSTV値(これら2つの値は「微生物学的水質指標」と呼ばれる)を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断するとしている。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる未処理の地下水に関しては、農場は初期調査として、栽培期間または1年の、収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも4検体を検査しなければならない。農場はこの初期調査の結果からGM値とSTV値を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断するとしている。

大腸菌が検出されてはならない水として一部の目的に使用される未処理の地下水に関しては、農場は初期検査として、栽培期間または1年間にわたりこれらの水を少なくとも4回検査しなければならないとしている。農場はその結果にもとづき、これらの水が当該の目的に使用可能かどうかを判断しなければならない。

以下の場合、農業用水は検査の必要がないとしている。

- ・ 最終規則に規定される諸要件を満たす公共水道または水源から受水する水(ただし、当該の水が関連の要件を満

たしていることを示す検査結果またはコンプライアンス証明書を農場が保有していることが必要)

- ・ 最終規則の水処理要件に従って処理された水

2. 生物学的土壌改良材

2-1. 家畜ふん (Raw Manure)

FDAは、汚染リスクの最小化のために土壌改良材としての家畜ふんの施肥と収穫との間に何日間置くことが必要かについて、リスク評価および広範な研究を行っている。

現時点では、FDAは、農家が米国農務省(USDA)のNational Organic Programに示された基準に従うことに反対していない。この基準は、家畜ふんの施肥と収穫との間に、土壌と接する作物については120日、接しない作物については90日の期間をおくことを呼びかけている。

最終規則によると、家畜ふんなどの未処理の動物性生物学的土壌改良材は、施肥時に農産物にふれず、また、施肥後に農産物に触れる可能性を最小化するような方法で施肥しなければならない。

2-2. 完熟堆肥 (Stabilized Compost)

最終規則には、家畜ふんなどの生物学的土壌改良材を熟成処理する工程について、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、サルモネラ属菌 (*Salmonella spp.*)、糞便系大腸菌群、大腸菌 O157:H7 などの菌数の検出上限を規定する微生物学的基準が設定されている。最終規則には、これらの基準に適合した科学的に裏付けのある堆肥作成法として2つ

の例が示されている。これらの方法のいずれかによって作成した完熟堆肥は、施肥時および施肥後に農産物に触れる可能性が最小になるような方法で施肥しなければならないとしている。

3. 発芽野菜

発芽野菜は食品由来疾患アウトブレイクにしばしば関連してきた。発芽野菜は、その栽培に必要な高温多湿で栄養豊かな環境条件により、危険な微生物に特に汚染され易い。

米国では1996年から2014年までの間に、発芽野菜に関連して、アウトブレイク43件、患者2,405人、入院患者171人、死亡者3人が発生した。この中には、米国では初めての報告であった発芽野菜によるリステリアアウトブレイクも含まれている。

発芽野菜にのみ適用される要件には以下が含まれる。

- ・ 発芽に用いる種子や豆を処理すること（または、種子（豆）生産業者、流通業者、供給業者などによる事前の処理とその記録に頼ること）に加え、さらに、それらに危険な微生物が付着・侵入しないような対策をとる。
- ・ 特定の病原体について、生産バッチごとの使用済み灌漑水、またはバッチごとの栽培中の発芽野菜を検査する。これらの検査結果が陰性であることが確認されるまで、発芽野菜は販売できない。
- ・ リステリア属菌またはリステリア・モノサイトゲネスの存在について、発芽

野菜の栽培、収穫、包装、および保管に係わる環境の検査を行う。

- ・ 使用済み灌漑水、発芽野菜、および（または）環境検体の検査が陽性だった場合は改善措置を取る。

4. 家畜および野生動物

最終規則は、飼育動物（家畜など）や種々の目的のための作業動物に依存する農場について、最終規則の遵守可能性に懸念を示している。最終規則では、これらの動物に対して、農場に侵入する野生動物（シカや野生のブタ）と同様の規準が設定されている。農家は、汚染の可能性がある農産物を特定し、それらを収穫しないよう、合理的に判断して必要と考えられるあらゆる対策を取らなければならないとしている。

少なくとも、すべての農場は、収穫方法によらず、栽培区域および収穫予定のすべての農産物を目視検査しなければならない。

さらに、最終規則は、一定の状況下では農場が栽培期間中に追加の調査を行うことを求めている。もしこの調査で動物による汚染の可能性を示す有意な証拠が見つかった場合、農場は、後の収穫時に役立つと考えられる対策をとらなければならない。そのような対策の一例として、汚染区域を示す旗を設置することが挙げられる。

最終規則は家畜等の放牧と農産物の収穫との間に待機期間を置くことを求めているが、FDAは、農家が生産物と生産慣習に応じて、そのような期間の設置を自主的に検討することを奨励している。

農場は、野外の栽培区域から動物を排除したり、動物の生息域を破壊したり、栽培

区域または排水区域の境界を明示したりする必要はない。本規則のどの条項も、このような行為を強制している、または奨励していると解釈してはならないとしている。

5. 作業者の研修、健康、および衛生

最終規則では、作業者の健康と衛生に関して以下の諸要件が規定されている。

- ・ 発症もしくは感染した作業者による農産物および食品接触表面の汚染を防ぐため、作業者に、農産物や食品接触表面を汚染する可能性がある健康状態の場合はその旨を監督者に連絡するよう指導するなどの対策をとる。
- ・ 農産物または食品接触表面を取り扱ったり触れたりする場合は、衛生慣習に従う。一例を挙げると、トイレの使用後などの際は手指をよく洗い、乾かす。
- ・ 例えば、トイレや手洗い設備を訪問者に利用可能にして、訪問者が農産物および（または）食品接触表面を汚染させないよう対策をとる。

農産物および（または）食品接触表面を取り扱う農場作業員およびその監督者は、健康や衛生の重要性などの特定の課題について研修を受けなくてはならないとしている。

農産物および（または）食品接触表面を取り扱う農場作業員およびその監督者は、また、担当業務の遂行に必要な研修、教育を受講し、さらに経験を有していなければならない。これは教育と、実地研修、また

は現在の担当業務に関連した仕事への就業経験との組み合わせでも良いとしている。

6. 設備、道具および建物

最終規則は、設備、道具および建物が不適切な衛生下に農産物の汚染の原因になることを防ぐために、これらについての基準を設定している。最終規則はここで、温室や発芽室、および他の類似の構造物、また、トイレや手洗い設備などを対象としている。

農産物および食品接触表面の汚染を防ぐために必要な対策としては、設備や道具の適切な保管、維持、および洗浄などが挙げられている。

7. 適用除外項目

以下に記載するものは本最終規則の対象から除外されるとしている。

- ・ 「生、またはそのまま食べられる農業製品」に当てはまらない農産物。
- ・ 生で食べることがほとんどないとFDAが特定した以下の農産物：アスパラガス、インゲン豆、赤カブ、甜菜、カシュー、ヒヨコ豆、カカオ豆、コーヒー豆、スイートコーン、クランベリー、デーツ、ナス、イチジク、セイヨウワサビ、ヘーゼルナッツ、オクラ、ピーナッツ、ペパーミント、ジャガイモ、カボチャ、サツマイモなど。
- ・ 食用の穀類：オオムギ、デントコーン、フリントコーン、オート麦、米、ライ麦、小麦、ソバ、油糧種子（綿実、亜麻仁、菜種、大豆、ヒマワリの種）な

ど。

- ・ 生産者個人が、または生産農場で消費することを目的とした農産物。
- ・ 農産物の過去 3 年間の平均の年間売上高が 25,000 ドル以下の農場。

また、公衆衛生上重要な微生物の量を的確に減少させる商業的加工工程を経る農産物も一定条件下に適用除外の対象になっている。さらに条件付き適用除外、およびその場合に農場に課される要件も示されている。

D. 考察

FSMA を実施に移すために必要な規則の一部として 2015 年 11 月に最終規則化された「農産物の安全に関する規則(Produce Safety rule)」では、「農業用水の品質と検査」、「動物由来の生物学的土壌改良材」、「発芽野菜の生産」、「家畜や野生動物による汚染」、「健康と衛生の重要性についての研修」および「農場の設備、道具、建物」に関する要件が重要項目として挙げられている。これらの項目からも理解できるように、食品微生物汚染対策として、農業用水を始めとする農場における重要管理点に関連する項目が中心となっており、一次生産段階から喫食段階まで(Farm-to-Fork)の包括的対策の基本に沿った内容といえる。特に生のまま喫食することが多い発芽野菜に対する規則が細かく決められており、米国だけでなく欧州でも多数の患者が発生したことから特に関心が高いことが示唆される。

我が国では果物・野菜に関する食習慣、嗜好性や果物・野菜の生産・加工時の慣習、衛生管理状況が米国とは異なると考えられ

るので、米国での規則制定が直接参考になるわけではないが、食品の世界的な流通の状況、および FSMA が米国への輸入食品にも適用されることに鑑み、米国、欧州連合(EU)をはじめとする国際的な動向を今後も注視して行く必要があると考えられる。

E. 結論

本最終規則は Farm-to-Fork の基本に沿った内容であり加熱処理を経ない発芽野菜を始めとする生鮮食品に関しても細かく基準が定められている。灌漑に使用する用水や堆肥に関する規定から現場作業者の意識啓蒙活動に関する規定まで含まれており、包括的な内容となっている。我が国においても、加熱処理を経ずに喫食される食品に関しては特に、一次生産段階における汚染対策を含む Farm-to-Fork 全体にわたる包括的な対応が望まれる。

参考文献：

- 1) US FDA
KEY REQUIREMENTS: Final Rule on Produce Safety
<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/FSMA/UCM472887.pdf>
- 2) US FDA
FSMA に関する Q and A
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm247559.htm>
- 3) US FDA

“What the Produce Safety Rule
Means for Consumers”

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm472503.htm>

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(資料 1 : 仮訳)

US FDA

FSMA に関する Q and A より

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm247559.htm>

食品安全近代化法 (FSMA、2011 年 1 月成立) を構成する重要な 5 要素

- ・ **予防的管理** : FDA は、問題が起こる可能性を阻止または最小化するために、包括的で予防ベースの管理対策を食品供給チェーン全体にわたり要求する法的権限を初めて持った。
- ・ **検査と遵守** : 検査は、安全な食品の製造の説明責任は業界にあることを確保するための重要な手段である。FDA は、検査に関するリソースをリスクベースで配分し、また革新的な検査方法を導入する予定である。
- ・ **輸入食品の安全性確保** : FDA は、輸入食品が米国の基準を満たし、喫食しても安全であることを確認する新しい手段を得た。例えば、今回新しく、輸入業者は、国外の供給業者が安全確保のために適切な予防的管理を実施していることを検証しなければならないことになった。
- ・ **FDA の対応** : FDA は今回初めて、すべての食品について強制的な回収の権限をもつことになった。しかし、食品業界は多くの場合、自主的回収に関する FDA の要請を尊重するので、この権限はたまにしか行使する必要がないことが予想される。
- ・ **他機関との協力関係の強化** : FDA は、連邦、州、地域、国外などすべてのレベルの食品安全機関を対象に、既存の協力関係を強化することが重要である。

(資料 2 : 仮訳)

US FDA

FSMA に関する Q and A より

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm247559.htm>

食品安全近代化法 (FSMA) の施行に必要な 7 本の基本的な規則

- ・ **食品の製造等における予防的管理**

食品関連施設は、危害要因を特定し、それらを最小化する方法を規定した安全計画を備えていなければならない。

(最終規則発行日：2015 年 9 月 10 日)

- ・ **動物用飼料の製造等における予防的管理**

動物用飼料を対象とした CGMP (優良製造規範) および予防的管理を規定。

(最終規則発行日：2015 年 9 月 10 日)

- ・ **農産物の安全確保**

国内外の農場における農産物の栽培、収穫、包装、保管に関する科学的基準を規定。

(最終規則発行日：2015 年 11 月 13 日)

- ・ **国外の供給業者の検証**：輸入業者は、米国に輸入される食品が、米国内の食品製造業者に要求されるのと同レベルの健康保護をもたらす方法で製造されたことを検証しなければならない。

(最終規則発行日：2015 年 11 月 13 日)

- ・ **第三者機関による認証**：第三者機関が食品安全監査を実施し、食品または動物用飼料を製造する国外の施設に認証を与えることを認めるプログラムを規定。

(最終規則発行日：2015 年 11 月 13 日)

- ・ **食品の衛生的な運搬**：食品を運搬する時は、食品の安全を確保するため、衛生的な方法で行わなければならない。

(最終規則発行予定日：遅くとも 2016 年 3 月 31 日)

- ・ **故意の違反の防止**：国内外の食品関連施設は、意図的に大規模な住民被害を引き起こすことを目的とした行為を防ぐために、食品の製造等の過程でこれらの行為に曝される可能性がある工程に対処しなければならない。

（最終規則発行予定日：遅くとも 2016 年 5 月 31 日）

(資料3：US FDA KEY REQUIREMENTS: Final Rule on Produce Safety より)

<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/FSMA/UCM472887.pdf>

農産物の安全に関する最終規則：必須要件

FDA の食品安全近代化法 (Food Safety Modernization Act: FSMA) を実施するための「農産物の安全に関する規則(Produce Safety rule)」が 2015 年 11 月に最終規則化された。本規則は、人が喫食する果物や野菜について、それらの安全な栽培、収穫、包装、および保存に関する科学的な最低基準を初めて規定している。

本規則は当初 2013 年 1 月に提案された。コメント提出期間や住民集会、ネットセミナー (webinar)、公聴会、農場への訪問などの際に得られた意見を踏まえ、FDA は 2014 年 9 月に補足の通知を発行した。この改訂案は当初の案をより实际的、柔軟、効果的にするためのものであった。

本最終規則は当初の案と改訂案、および適宜の追加の変更を組み合わせたものである。食品の予防的管理に関する規則 (Preventive Controls for Human Food rule) の最終規則で「農場 (farm)」およびその関連の用語の定義が改定され、農産物の安全に関する基準を規定する本最終規則でもこれと同じ定義が用いられている。すべての業務が農場の定義内のものである事業体は FDA に食品関連施設として登録する必要はなく、したがって食品の予防的管理に関する規則の対象外である。

以下は本最終規則に定められた必須要件の一部の概要である。

1. 農業用水：

水質：最終規則では水質基準の設定に関して一般的な方法が採用された。最終規則は用水の微生物学的品質に関して 2 セットの基準を設定しており、これらはいずれも糞便汚染の指標となり得る大腸菌 (generic *E. coli*) についてのものである。

潜在的に危険性のある微生物が存在した場合、それらが直接的または間接的に農産物に移行する可能性が高い農業用水には大腸菌が検出されてはならない。このような用水の例としては、収穫時および収穫後に手指を洗うための水、食品が接触する表面に用いる水、収穫時または収穫後に農産物と直接接触する水 (製氷用の水を含む)、発芽野菜の灌漑用の水などが挙げられる。これらの用水に大腸菌が検出された場合はその使用を直ちに中止し、再使用前に改善措置を取らなければならない。本最終規則

はこれらの用水として未処理の表層水を使用することを禁止している。

2 番目の数的基準は、発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる水に関するものである。この基準は 2 つの数値、幾何平均値 (geometric mean: GM) と統計学的閾値 (statistical threshold: STV) よりなる。当該水検体 100 ml あたりの大腸菌生菌数 (CFU) は、GM が 126 以下、STV が 410 以下でなければならない。

当該水がこれらの基準を満たさなかった場合は、実行可能な限りできるだけ速やかに (遅くとも翌年中に) 改善措置を取らなければならない。また、当初、農業用水が微生物基準を満たさなかった農家は、以下に挙げる選択肢のいずれかを実施することにより、基準がクリアされ、当該水を使用できるようになる。

- ・ 灌漑水の最後の施水と収穫との間に連続する 4 日を超えない時間をとることで、潜在的に危険な微生物に圃場で死滅する時間を与える。
- ・ 潜在的に危険な微生物が、一定程度、収穫後の保存中に死滅し、商品化のための洗浄中に除去されるよう配慮する。
- ・ 農業用水を清浄処理する。

検査：最終規則では、一部の目的に用いられる未処理の水の検査に一般的な方法が採用されている。最終規則では、検査の頻度が水源の種類 (すなわち、表層水か地下水か) にもとづき規定されている。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いるために、外的要因の影響を最も受け易いと考えられる未処理の表層水を検査する場合は、農場は初期調査として、2~4 年にわたり収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも 20 検体を検査しなければならない。農場はこの初期調査の結果から GM 値と STV 値 (これら 2 つの値は「微生物学的水質指標」と呼ばれる) を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断する。

- ・ 農場は、初期調査の後、毎年新たに少なくとも 5 検体を検査し、この 5 検体のデータと直近の 15 検体のデータ (合計 20 検体) から GM 値と STV 値を再計算しなければならない。

発芽野菜以外の農産物の栽培に直接用いる未処理の地下水に関しては、農場は初期調査として、栽培期間または1年の、収穫期にできる限り近い時期に採取された少なくとも4検体を検査しなければならない。農場はこの初期調査の結果からGM値とSTV値を算出し、それらが微生物学的水質基準の要件を満たしているかどうかを判断する。

- ・農場は、初期調査の後、毎年新たに少なくとも1検体を検査し、この1検体のデータと直近の3検体のデータ（合計4検体）からGM値とSTV値を再計算しなければならない。

大腸菌が検出されてはならない水として一部の目的に使用される未処理の地下水に関しては、農場は初期検査として、栽培期間または1年間にわたりこれらの水を少なくとも4回検査しなければならない。農場はその結果にもとづき、これらの水が当該の目的に使用可能かどうかを判断しなければならない。

- ・初期の4検体の結果が大腸菌非検出の基準を満たす場合は、農場はその後毎年1回、少なくとも1検体を検査すればよい。もしいずれかの年の検査結果が基準を満たさなかった場合、農場は栽培期間または1年に少なくとも4回の検査を再度行わなければならない。

以下の場合、農業用水は検査の必要がない。

- ・最終規則に規定される諸要件を満たす公共水道または水源から受水する水（ただし、当該の水が関連の要件を満たしていることを示す検査結果またはコンプライアンス証明書を農場が保有していることが必要）
- ・最終規則の水処理要件に従って処理された水

2. 生物学的土壌改良材：

家畜ふん（Raw Manure）：FDAは、汚染リスクの最小化のために土壌改良材としての家畜ふんの施肥と収穫との間に何日間おくことが必要かについて、リスク評価および広範な研究を行っている。（土壌改良材とは、植物栽培に必要な化学的または物理的な状態および保水力を改善するために、土壌に意図的に添加する家畜ふんなどの物質のことである。）

現時点では、FDA は、農家が米国農務省 (USDA) の National Organic Program に示された基準に従うことに反対しない。この基準は、家畜ふんの施肥と収穫との間に、土壌と接する作物については 120 日、接しない作物については 90 日の期間をおくことを呼びかけている。FDA は、リスク評価と研究が現在進行中であることに鑑み、これらの基準に従うことは汚染の可能性を最小化するための慎重な一歩であると考えている。

最終規則によると、家畜ふんなどの未処理の動物性生物学的土壌改良材は、施肥時に農産物にふれず、また、施肥後に農産物に触れる可能性を最小化するような方法で施肥しなければならない。

完熟堆肥 (Stabilized Compost) : 最終規則には、家畜ふんなどの生物学的土壌改良材を熟成処理する工程について、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、サルモネラ属菌 (*Salmonella* spp.)、糞便系大腸菌群、大腸菌 O157:H7 などの菌数の検出上限を規定する微生物学的基準が設定されている。最終規則には、これらの基準に適合した科学的に裏付けのある堆肥作成法として 2 つの例が示されている。これらの方法のいずれかによって作成した完熟堆肥は、施肥時および施肥後に農産物に触れる可能性が最小になるような方法で施肥しなければならない。

3. 発芽野菜 :

最終規則には発芽野菜の汚染を防止するための新しい要件が含まれている。発芽野菜は食品由来疾患アウトブレイクにしばしば関連してきた。発芽野菜は、その栽培に必要な高温多湿で栄養豊かな環境条件により、危険な微生物に特に汚染され易い。

米国では 1996 年から 2014 年までの間に、発芽野菜に関連して、アウトブレイク 43 件、患者 2,405 人、入院患者 171 人、死亡者 3 人が発生した。この中には、米国では初めての報告であった発芽野菜によるリステリアアウトブレイクも含まれている。

発芽野菜にのみ適用される要件には以下が含まれる。

発芽に用いる種子や豆を処理すること (または、種子 (豆) 生産業者、流通業者、供給業者などによる事前の処理とその記録に頼ること) に加え、さらに、それらに危険な微生物が付着・侵入しないような対策をとる。

特定の病原体について、生産バッチごとの使用済み灌漑水、またはバッチごとの栽培中の発芽野菜を検査する。これらの検査結果が陰性であることが確認されるまで、発芽野菜は販売できない。

リステリア属菌またはリステリア・モノサイトゲネスの存在について、発芽野菜の栽培、収穫、包装、および保管に係わる環境の検査を行う。

使用済み灌漑水、発芽野菜、および（または）環境検体の検査が陽性だった場合は改善措置を取る。

発芽野菜の生産農家は他の農産物を生産する農家に比べ、最終規則の遵守開始に至るまでの猶予期間が短い。発芽野菜の生産農家には、生産規模に応じて、1 から 3 年の猶予期間が与えられるが、用水に関する要件を満たすための追加の猶予期間は認められない。

4. 家畜および野生動物

最終規則は、飼育する動物（家畜など）や種々の目的のための作業動物に依存する農場について、最終規則の遵守可能性に懸念を示している。最終規則では、これらの動物に対して、農場に侵入する野生動物（シカや野生のブタ）と同様の規準が設定されている。農家は、汚染の可能性がある農産物を特定し、それらを収穫しないよう、合理的に判断して必要と考えられるあらゆる対策を取らなければならない。

少なくとも、すべての農場は、収穫方法によらず、栽培区域および収穫予定のすべての農産物を目視検査しなければならない。

さらに、最終規則は、一定の状況下では農場が栽培期間中に追加の調査を行うことを求めている。もしこの調査で動物による汚染の可能性を示す有意な証拠が見つかった場合、農場は、後の収穫時に役立つと考えられる対策をとらなければならない。そのような対策の一例として、汚染区域を示す旗を設置することが挙げられる。

最終規則は家畜等の放牧と農産物の収穫との間に待機期間を置くことを求めているが、FDA は、農家が生産物と生産慣習に応じて、そのような期間の設置を自主的に検討することを奨励している。FDA は、この点に関するガイダンスを必要に応じ今

後作成することを検討する予定である。

本規則に関する補足の通知に示されたように、農場は、野外の栽培区域から動物を排除したり、動物の生息域を破壊したり、栽培区域または排水区域の境界を明示したりする必要はない。本規則のどの条項も、このような行為を強制している、または奨励していると解釈されてはならない。

5. 作業者の研修、健康、および衛生

最終規則では、作業者の健康と衛生に関して以下の要件が規定されている。

発症もしくは感染した作業者による農産物および食品接触表面の汚染を防ぐため、作業者に、農産物や食品接触表面を汚染する可能性がある健康状態の場合はその旨を監督者に連絡するよう指導するなどの対策をとる。

農産物または食品接触表面を取り扱ったり触れたりする場合は、衛生慣習に従う。一例を挙げると、トイレの使用後などの際は手指をよく洗い、乾かす。

例えば、トイレや手洗い設備を訪問者に利用可能にして、訪問者が農産物および(または)食品接触表面を汚染させないように対策をとる。

農産物および(または)食品接触表面を取り扱う農場作業者およびその監督者は、健康や衛生の重要性などの特定の課題について研修を受けなくてはならない。

農産物および(または)食品接触表面を取り扱う農場作業者およびその監督者は、また、担当業務の遂行に必要な研修、教育を受講し、さらに経験を有していなければならない。これは教育と、実地研修、または現在の担当業務に関連した仕事への就労経験との組み合わせでも良い。

6. 設備、道具および建物

最終規則は、設備、道具および建物が不適切な衛生下に農産物の汚染の原因になることを防ぐために、これらについての基準を設定している。最終規則はここで、温室や発芽室、および他の類似の構造物、また、トイレや手洗い設備などを対象としている。

農産物および食品接触表面の汚染を防ぐために必要な対策としては、設備や道具の適切な保管、維持、および洗浄などが挙げられる。

適用除外

本規則は以下に挙げるものには適用されない。

「生、またはそのまま食べられる農業製品」に当てはまらない農産物。

生で食べることがほとんどないと FDA が特定した以下の農産物：

アスパラガス、インゲン豆、赤カブ、甜菜、カシュー、ヒヨコ豆、カカオ豆、コーヒー豆、スイートコーン、クランベリー、デーツ、ナス、イチジク、セイヨウワサビ、ヘーゼルナッツ、オクラ、ピーナッツ、ペパーミント、ジャガイモ、カボチャ、サツマイモなど。

食用の穀類：オオムギ、デントコーン、フリントコーン、オート麦、米、ライ麦、小麦、ソバ、油糧種子（綿実、亜麻仁、菜種、大豆、ヒマワリの種）など。

生産者個人が、または生産農場で消費することを目的とした農産物。

農産物の過去 3 年間の平均の年間売上高が 25,000 ドル以下の農場。

本規則では、公衆衛生上重要な微生物の量を的確に減少させる商業的加工工程を経る農産物も、一定条件下に適用除外の対象になる。

本規則には、条件付き適用除外、およびその場合に農場に課される要件も示されている（詳細は省略）。

特例許可

（省略）

遵守開始日

（省略）

環境影響評価書

(省略)

業界への支援

(省略)

(資料 4 : 仮訳)

US FDA

“What the Produce Safety Rule Means for Consumers”より

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm472503.htm>

農産物の安全に関する最終規則 (Final Rule on Produce Safety) : 重要項目

「本規則は、人が喫食する果物や野菜について、それらの安全な栽培、収穫、包装、および保存に関する科学的な最低基準を規定している。」

病原菌を伴う可能性がある糞便による汚染を検出するため、農業用水の品質と検査の要件が規定されている。

動物由来の生物学的土壌改良材 (家畜ふんや堆肥などで、植物の成長を促進する能力を改善するために土壌に添加される) を使用する際の要件が示されている。これらの要件は、危険な細菌が食品供給チェーンに侵入する可能性を低下させることに役立つ。

発芽野菜は食品由来疾患アウトブレイクにしばしば関連してきた。最終規則には、リステリア・モノサイトゲネスのような危険な微生物による汚染を防ぐため、発芽野菜の生産における検査などの基準が示されている。

農家は、収穫時に、汚染 (家畜や野生動物による汚染を含む) の可能性がある区域を特定し、汚染農産物を収穫しないために、必要と考えられるすべての対策を取らなくてはならない。農家はまた、ある場合には、動物による汚染の可能性の調査を栽培期間中に開始しなければならない。

農産物および (または) 食品接触表面を取り扱う農場作業員およびその監督者は、健康と衛生の重要性についての研修を受けなければならない。農場は、農産物や食品接触表面が感染した作業員によって病原体に汚染されることを防止するよう努めなければならない。これには、農場作業員に、農産物の安全性を損なう可能性がある健康上または衛生上の問題が生じた場合、その旨を監督者に届け出るよう農場作業員を指導することが含まれる。

最終規則には、農場の設備、道具、建物（温室、発芽室など）が、それらが不衛生であるなどの問題により農産物の汚染を引き起こすことがないように、基準が設定されている。

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
Kanki M, Naruse H, Taguchi M, Kumeda Y.	Characterization of specific alleles in InIA and PrfA of <i>Listeria monocytogenes</i> isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells.	Int J Food Microbiol.	211	18-22	2015
Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S, Asakura H.	Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture.	J Food Safety.	35	458-465	2015
Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S.	Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts.	J Food Safety. 印刷中	-	-	2016
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中症，特に回虫症の発生とその汚染源の文献的および検査期間データに基づく調査	食品衛生研究	65	37-41	2015
堀内朗子、荒川京子、秋庭達也、吉田建介、平田史子、松本奈保子、丸山弓美、奥津敬右、朝倉宏、杉山広。	ストマッカーを利用した野菜等の回虫卵検査法の検討。	食品衛生研究	65	45-50	2015

