

令和6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）
「国際的な基準に基づく HACCP システムの導入に資する研究」
分担研究報告書

HACCP に関する科学的根拠：カット野菜の細菌実態と衛生指標に関する考察

研究分担者 五十君 静信（東京農業大学）
研究協力者 檜木 真吾、原山 夏琳、大槻 駿介、I Hsun Huang、
（東京農業大学/学校法人東京農業大学食品安全研究センター）

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方に基づく衛生管理のための手引書」（小規模な一般飲食店業者向け）グループ1「非加熱のもの（冷蔵品を冷たいまま提供）」の市販カット野菜（主にカットキャベツ）の実態調査として、これまでに一般生菌数、汚染指標菌、耐熱性芽胞菌の調査結果を示し報告した。カット野菜の工程管理へ HACCP システム導入では、一般生菌数が、消費期限日で平均 10 の 6 乗個/g であったことから、どのような指標をもって衛生状況の判断をするのが適切であるかに関する科学的根拠が必要と思われる。

農産物は収穫時、流通時、家庭での保存環境等により衛生管理方法によっては食中毒の原因となる可能性がある。近年では食品加工工場でカットしたカット野菜が加熱用から非加熱用と多様な形態でスーパー、コンビニエンスストア、レストランチェーン店などに流通が拡大している。このような状況下、非加熱状態で喫食する機会が多いカット野菜の衛生管理は極めて重要と考える。

このような状況から我々は市販されている生で食されるカット野菜（主にキャベツ）を購入し、一般生菌数、腸内細菌科菌群、耐熱性芽胞菌の汚染状況を調べるとともに、標準寒天培地上に形成された集落について、MALDI-TOF-MS を用いて菌種の同定を行い、カット野菜の菌叢を解析し、衛生指標となりうる菌種や菌群について考察を行なった。

一般生菌数は 10 の 6 乗と高いものの、占有率の高い菌種による菌叢解析では、危害要因となる可能性を有する菌種、菌群は確認されず、衛生上問題となると思われる菌種の検出はなかった。

A. 研究目的

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方に基づく衛生管理のための手引書」（小規模な一般飲食店業者向け）グループ1「非加熱のもの（冷蔵品を冷たいまま提供）」の実態調査として市販カット野菜（カットキャベツ等）の一般生菌数、汚染指標菌、耐熱性芽胞菌等の汚染実態調査結果を受けて、衛生指標となる菌種、菌群等の考察を行うため、当該食品の菌叢を明らかにした。消費量が多く、一般的に生で喫食されるカット野菜の衛生指標をどのように設定し管理していくかに関する知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

スーパーやコンビニエンスストア等で市販している袋入りのカット野菜を購入し、購入後、検体を 10℃以下で保存し、消費期限日および消費期限 2 日後の検体について、定法に従い、一般生菌数、腸内細菌科菌群、芽胞形成菌を定量的に測定した。測定は n=2 で行いその平均値を用いた。以前の同様な検討により研究成果として得られていた分離菌株および新規に分離した菌株は、-80℃で保存後、寒天平板培地でシングルクローンであるかの確認を行った後、菌種同定を行った。芽胞形成菌については、平板

上の集落を保管後、80℃5分の耐熱性試験を行った後、耐熱性株について同定を行った。菌叢については、標準寒天培地上に形成された集落（シングルコロニー）を検体当たり100集落を目標とし、菌種の同定を行った。同定結果から主要な菌叢の推定を行った。分離菌株の同定は、BRUKER社のMALDIバイオタイパーを用いて行った。必要に応じて、遺伝子解析による菌種同定を行った。

用いた培地・試薬

- ② 検体希釈用：滅菌生理食塩水
- ② 一般生菌数算定用：標準寒天培地（島津ダイアグノスティクス）
- ③ 腸内細菌科菌群数算定用：VRBG培地（OXOID）
- ④ 耐熱性芽胞菌分離：耐熱性菌は80℃5分加熱後、標準寒天培地にて分離
- ⑤ 耐熱性芽胞菌同定用：MYP培地（疑いのある集落は接種し確認）

菌数測定作業：

（1）検体の前処理

カット野菜（主にキャベツ）25gと滅菌生理食塩水225mLをストマッカーで処理し、10倍階段希釈液を作成した。

（2）指標菌の定量

① 一般生菌数の定量

10倍希釈から $10^3 \cdot 10^5$ 希釈液を調製し、それぞれの希釈検液を標準寒天培地で混釈、または表面塗抹後、35±1℃で48±2時間培養後、菌数算定を行った。

② 腸内細菌科菌群の定量

10倍希釈液から $10^3 \cdot 10^5$ 希釈液を調製し、それぞれの希釈検液をVRBG培地で混釈、または表面塗抹後、35±1℃で24±2時間培養後、菌数算定を行った。

③ 耐熱性芽胞菌の定量

前処理検体（カットキャベツ25gと滅菌生理食塩水225mL）をストマッカーで混ぜ、10倍希釈液を80℃・5分間の加熱処理を行なった後、 $10^3 \cdot 10^5$ 希釈液を調製し、それぞれの希釈検液を標準寒天培地で混釈、または表面塗抹後、35±1℃で48±2時間培養する。

培養後、コロニーの生育が認められた場合、白金耳で釣菌し、これをMYP培地に画線塗

抹し、35±1℃ 24±2時間培養した。平板にコロニーの発育が認められた場合をもって耐熱性芽胞菌と判定した。

C. 研究結果

夏季調査51検体の消費期限日と消費期限2日後の一般生菌数の分布を図1に示した。消費期限日の中央値は 10^6 個/g、消費期限2日後の中央値は 10^7 個/gであった。腸内細菌科菌群の分布を図2に示した。消費期限日の中央値は $10^{4.5}$ 個/g、消費期限2日後の中央値は $10^{5.5}$ 個/gであった。耐熱性芽胞菌の結果は、図3に示した。消費期限日では、半数が検出限界地以下、消費期限2日後では、全体的に菌数が1オーダー上昇している傾向がみられた。

冬季調査50検体の消費期限日と消費期限2日後の一般生菌数の分布を図4に示した。腸内細菌科菌群の分布を図5に示した。耐熱性芽胞菌の結果は、図6に示した。冬季に分離された耐熱性芽胞菌の同定結果を図7に示した。

一般生菌数が夏季で平均 10^6 個/g程度、冬季で平均 $10^{5.5}$ 個/g程度の菌数が検出されていた。

3) 分離菌株の菌種同定

夏季調査時に分離した菌株を同定した結果を、図8に示す。属名で示したように、*Pseudomonas*、*Pantoea*が多く、*Lelliottia*、*Raoultella*、*Lactococcus*といった属菌が分離されていた。食中毒起因菌は、*Bacillus*属菌で可能性があるが、ほとんどが植物の常在菌であると思われる。腸内細菌科菌群の培地にも増殖する菌が多い。

冬季調査時の耐熱性芽胞菌について菌株の同定を行った結果を図7に示した。消費期限日、消費期限2日後から分離された、耐熱性芽胞菌の割合は、それぞれ10%、5%といずれも10%以下であった。検討した株のうち6株が、*Bacillus*属で、食中毒の原因となる菌種である、*B. cereus*が含まれる*Bacillus*属グループは、151検体中3検体から検出された。

D. 考察

(1) 気温の高い時期（夏季調査）の考察。

HACCP 制度化が施工されて 1 年以上経過した現在、非加熱状態で喫食する機会の多いカット野菜は製造工程における衛生管理および製造ラインの菌処理が徹底されているものと思われる。

今般、市販カットキャベツの購入地域を固定せず 51 検体を購入して消費期限日及び消費期限日 2 日後の汚染指標菌の測定したところ消費期限日での平均対数値は、一般生菌数でグラム当たりの検出菌数の対数値は、7 以上 8 未満、耐熱性芽胞菌で 2 以上 3 未満、腸内細菌科菌群で 5 以上 6 未満であった。

調査では一般生菌数、腸内細菌科菌群において比較的高い菌数であったが、検出された菌種のほとんどが植物の正常菌叢由来と思われること、食中毒起因菌の含まれる耐熱性芽胞菌の汚染率が低いことからカットキャベツでの健康被害リスクは低いと考えられた。

しかしながら消費期限 2 日後では一般生菌数、耐熱性芽胞菌、腸内細菌科菌群ともに消費期限日から 1 オーダーレベルの菌増殖が確認されたこと、また検体によっては 10^8 CFU/g を超えてきてしまうことからカット野菜類（キャベツ等）は消費期限内に喫食することが望まれた。

施設毎の菌数比較では、施設によりばらつきが認められた。特にロット差が大きい製品の場合、その製品の製造環境や加工に使用される器具・機器などの洗浄及び消毒、あるいは販売までの温度管理が十分に管理されていないことが示唆されるため衛生管理の再考が必要と考える。

一般生菌数と腸内細菌科菌群数が、大きく変わらない結果が得られていることに関しては、今回の調査で分離された主な菌種は植物の正常菌叢を形成している菌種と思われ、食中毒の原因とならないと思われる。衛生指標としての腸内細菌科菌群が使えるかについては、植物の主な菌叢が腸内細菌科菌群の選択培地である VRBG 培地に増殖してしまうことから衛生指標としては採用できない。

(2) 気温の低い時期（冬季調査）の考察

冬季の調査では、夏季調査と同様な方法で一般生菌数、腸内細菌科菌群、耐熱性芽胞菌を対

象に、市販品 50 検体について調査した。全体の傾向としては、夏季調査と同様な結果が見られたが、一般生菌数、腸内細菌科菌群ともに、菌数が 0.5~1 オーダー近く低い傾向が見られた。これは、外気温が低いことに起因するものと思われる。衛生指標としては腸内細菌科菌群を用いるのは、夏季調査と同様な理由から難しいと思われた。衛生指標として、耐熱性芽胞菌形成菌を用いることの可能性はあると思われる。

耐熱性芽胞菌形成菌としては、菌種の同定結果から、耐熱性のみを指標とすると、消費期限日で 10%、消費期限 2 日後で 5% が該当した。菌種の同定まで行くと確実であるが、属レベルでも半数は以上が健康障害との直接な関係がないため、あまり妥当とは言えないものと思われる。むしろ、*B. cereus* を簡便に検出することができれば、確実であると思われるが、今回の調査結果では菌数は低くおそらく健康障害に至るには問題ないレベルに収まっているため、衛生指標の設定は現実的ではない。

今般の実態調査で一般菌数や腸内細菌科菌群の菌数は高いが、カットキャベツは消費期限内に喫食することで健康被害が発生する可能性は低いものと思われる。消費期限後 2 日で、菌数はさらに 10 倍程度は増えてしまい、一部は菌数が 10^8 CFU/g を超えてしまうことから、腐敗・変敗の観点から、消費期限以降の摂食についてはあまり勧めることはできない。

夏季と冬季の調査結果から、夏季には菌数が高めに推移するため、低温管理の徹底が求められる。消費期限後 10°C 保存 2 日で、菌数は 10 倍程度増え、 10^8 CFU/g を超えるものも出てくることから、商品としての価値は急速に低下するものと思われる。菌種レベルの検討では、検出される主要な菌種は、植物の正常菌叢と思われる。耐熱芽胞菌については、検出される割合は低いものの、消費期限を過ぎるとその菌数が高まる傾向が強い。

E. 結論

市販のカット野菜を夏季と冬季合計 101 検体について、消費期限日と消費期限後 2 日目の衛生指標の菌数レベルについて評価を行った。

市販のカット野菜では、消費期限内においても 10^6 CFU/g 程度の菌が検出される。ヒトに健康障害を与える菌種はみられず、菌種レベルの評価においても腸内細菌科菌群の培地にも生

育する植物の菌叢由来の菌であったことから、細菌学的に衛生指標とする菌群の設定は困難であると思われた。夏季と冬季の調査結果から、夏季には菌数が高めに推移するため、低温管理の徹底が求められる。消費期限後 10℃保存 2 日で、菌数は 10 倍程度増え、 10^8 CFU/g を超えるものも出てくることから、商品としての価値は急速に低下するものと思われる。

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

- 1) 五十君静信。食品における食中毒起因細菌制御の重要性。日本食品衛生学会シンポジウム。ハイブリッド開催。2024. 6. 7

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし