

令和7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：カット野菜の細菌叢の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 コウ インシュン、加藤 徹大、ジュバイル アブドウラー、
竹田 直紀
（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（カットキャベツ等）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、これまでの実態調査等のデータから、一般生菌数は消費期限日に平均 10^6 CFU/g と高値を示し、一般食品では腐敗・変敗の指標となる菌数レベルであったことから、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求められた。

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急速に拡大している。このような状況下では、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。

これらの現状を受けて我々は市販されている生で食されるカット野菜を購入し、市販 128 製品について、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、カット野菜の主要な 菌叢構成を解析した。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。

一般生菌数は消費期限日に平均 10^6 CFU/g と高値を示し、培地上に形成された集落の属レベル/菌種レベルの菌叢解析では、ほぼ植物の菌叢であると思われた。危害要因となる可能性を有する菌種、菌群はわずかであり、そのまま喫食しても健康障害を引き起こすリスクは低いものと思われる。

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、耐熱性芽胞菌等のこれまで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、当該食品から分離される細菌を明ら

かにする。その結果から、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・運用すべき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°C 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。これまでの同様な検討により得られていた分離菌株および新規に分離した菌株は、 -80°C で保存後、寒天平板培地で単離コロニー (single colony) であるかの確認を行った後、属レベル/菌種レベルで同定を行った。芽胞形成菌については、平板上の集落を保管後、 80°C 5 分の耐熱性試験を行った後、耐熱性の確認された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) から、各検体について約 100 集落を対象として、属レベルおよび菌種レベルの同定を行った。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：耐熱性菌は検体の 10% 乳剤を 80°C 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：

(1) 検体の前処理

カット野菜 (キャベツ等) 25 g と滅菌生理食塩水 225 mL 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表面塗抹後、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 培地で表面塗抹後、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 (カットキャベツ等 25 g と滅菌生理食塩水 225 mL をストマッカーで混ぜ、10 倍乳剤を $80^{\circ}\text{C} \cdot 5$ 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表面塗抹後、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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

市販 128 製品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 A に示した。消費期限日の中央値は 10^6CFU/g 、消費期限 2 日後の中央値は 10^7CFU/g であった。腸内細菌科菌群の分布では、消費期限日の中央値は $10^{5.5} \text{CFU/g}$ 、消費期限 2 日後の中央値は $10^{6.5} \text{CFU/g}$ であった。耐熱性芽胞菌の結果は、半数が検出限界以下、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。

冬季調査と夏季調査について、消費期限日と消費期限 2 日後の一般生菌数と腸内細菌科菌群の分布を図 1 B に示した。

3) 分離菌株の菌種同定

カット野菜から分離した耐熱性菌の同定結果は、図 2 に示した。生菌数として得られた菌株の属レベルの同定結果を図 3、菌種レベルでの同定結果和を図 4 に示す。属レベルの同定結果で示したように、*Pseudomonas*、*Pantoea* が多くの検体から分離されており、次いで、*Lelliottia*、*Raoultella*、*Lactococcus* といった属が分離されていた。

主要な構成菌は、ほぼ植物由来の常在菌であると思われる。*Pseudomonas* など多くの検体から主要な菌叢として分離同定される菌株は、腸内細菌科菌群の培地にも増殖する菌株が多い。これらの株は国内で広く用いられている大腸菌群用の培地にも生育すると思われる。

耐熱性菌では食中毒起因菌として *Bacillus*

cereus が該当する可能性がある。*B. cereus* は 2 株が検出された。耐熱性細菌として検出された株は、いずれも菌数は低く、枯草菌などの病原性のない菌種がほとんどであった。

D. 考察

HACCP 制度化が施行されて 4 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微生物管理が徹底されているものと推察された。製品の特性から加熱工程が設定できないため、細菌の菌数レベルは高い。

消費期限日及び消費期限日 2 日後の一般生菌数、腸内細菌科菌群、耐熱性細菌数を調査したところ、図 1 に示した結果となった。消費期限日では、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は、菌数レベルは低く、検出率も低いことからカットキャベツでの健康被害が発生する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 オーダー程度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 を超えてしまうことからカット野菜類（キャベツ等）は、腐敗・変敗の観点から消費期限内に喫食することが望まれる。

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に大きな差が認められなかった結果が得られていることに関しては、菌種同定の結果から *Pseudomonas* などの主要な構成菌が、腸内細菌科菌群用の培地に発育してしまうことによるものと思われる。今回の調査で腸内細菌科菌群とされた菌株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推察され

た。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ものと考えられる。これらの株は国内で広く用いられている大腸菌群の培地にも生育してしまうと推察される。

耐熱性芽胞形成菌としては、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、2 株を除き、ヒトの健康障害との直接な関係がない株であった。やはり、耐熱性菌を衛生指標とすることは妥当ではないと考えられる。衛生評価を行うとすると、*B. cereus* を直接対象として検査するのが妥当であると思われる。簡便な検出法が確立されれば有用であるといえる。当該菌が存在したとしても、今回の調査結果では菌数は低いことからヒトの健康障害発生リスクは低いと推察される。現状では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生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考えられる。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、消費期限以降の喫食についてはあまり勧めることはできない。

属レベルや菌種レベルの検討では、検出される主要な菌種・菌群は、植物の正常菌叢と推察された。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ある。

E. 結論

市販のカット野菜について、消費期限日と消費期限後 2 日目の一般生菌数や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、消費期限内で 10^6 CFU/g 程度の菌が検出される。主要な菌叢ではヒトに健康被害を与える菌種はみられず、植物の菌叢由来の菌であった。これらの多くは腸内細菌科菌群の培地にも生育するため、衛生指標とすることは困難であると思われた。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 を超える検体も出てくることから、品質

は急速に低下するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abdullah Jubair, Hiroyuki Chiba, I Hsun Huang Akinobu Kajikawa, Masataka Uchino, and Shizunobu Igimi. Premature stop codons in *inlA* reduce Caco-2 cell invasion by *Listeria monocytogenes* and contribute to serotype bias in human clinical isolates. Bioscience of Microbiota, Food and Health. 2026 投稿中

2. 学会発表

- 1) 加藤 徹大、コウ インシュン、岡野 花梨、島原 義臣、伊藤 光次郎、五十君 静信。環境由来大腸菌の10℃での増殖性とその遺伝的特徴。日本食品微生物学会学術総会。2025. 9. 18。カルッツかわさき
- 2) 久保川 竣介、島田 慎一、吉田 理沙、岡野 花梨、五十君 静信、土井 りえ、成澤 一美。病原大腸菌の低温増殖性の検証。

日本食品微生物学会学術総会。2025. 9. 18。
カルッツかわさき

- 3) 島原 義臣、コウ インシュン、加藤 徹大、五十君 静信。バイオフィルムモデルにおけるリステリア属菌の挙動に関する研究。日本食品微生物学会学術総会。2025. 9. 18。カルッツかわさき
- 4) コウ インシュン、加藤 徹大、ジュバイル アブヅラー、五十君 静信。市販生食用カット野菜における細菌の実態調査と衛生管理指標の考察。日本食品微生物学会学術総会。2025. 9. 19。カルッツかわさき
- 5) ジュバイル アブヅラー、コウ インシュン、加藤 徹大、内野 昌考、五十君 静信。L. monocytogenes分離株のCaco-2細胞への接着および侵入の差異に関する研究。日本食品微生物学会学術総会。2025. 9. 18-19。カルッツかわさき

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