

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」
令和 6 年度分担研究報告書

真空調理による漬物製造における嫌気性菌の消長について

研究分担者 溝口嘉範 広島女学院大学人間生活学部管理栄養学科 准教授
研究協力者 渡部佳美 広島女学院大学人間生活学部管理栄養学科 教授

研究要旨：平成 30 年 6 月に食品衛生法等が改正され、原則として全ての食品等事業者に対して HACCP に沿った衛生管理の実施が制度化され、令和 2 年 6 月 1 日から施行された。本研究では食品等事業者が自らの確な危害要因分析と分析結果に基づく管理措置の決定及び HACCP 導入後の検証を適切に行い、国際的な基準に適合した HACCP システムを無理なく構築することを可能とするツールや教育資材等を開発し支援すること目的としている。本分担研究は真空包装食品における生物学的危害要因の検証として嫌気性菌のボツリヌス菌に焦点を当て、ボツリヌス菌の代替菌として *Clostridium sporogenes* を原材料とともに添加し、真空調理による白菜漬の製造過程における消長を調査した。また、食品等事業者が自社内で簡易的な添加試験を実施する際の課題を検討した。製品中の原材料由来の乳酸菌は 14 日間で約 2 Log cfu/g 増加し、これに伴い pH は 5.36 から 4.04 まで顕著に低下した。pH と乳酸菌数の間には統計的に有意な負の相関が認められた。接種した *Clostridium sporogenes* は、真空 2 時間後の検体では 3 検体中 2 検体で不検出となり、生残数が減少傾向を示した。統計的な検出力不足から有意差は得られなかったが、低 pH・高乳酸菌環境が *Clostridium sporogenes* の生残・増殖を抑制した主要因であると示唆された。食品企業での添加試験実施には、芽胞菌液調製、小規模試験の統計的限界、不検出データの取扱い等に課題がある。今後は、食品等事業者での実施を容易にする手法の開発が求められる。

A. 研究目的

平成 30 年 6 月に食品衛生法等が改正され、原則として全ての食品等事業者に対して HACCP に沿った衛生管理の実施が制度化され、令和 2 年 6 月 1 日から施行され、令和 3 年 6 月 1 日に完全施行された。

食品取扱従事者が 50 名以上の大規模

な食品製造・加工業者に対しては、国際的な基準（コーデックス規格）に適合した HACCP に基づく衛生管理を実施することが義務付けられており、対象の事業者は自ら、あるいはコンサルタントや保健所の支援を受けながら HACCP に基づく衛生管理を実施しているところである。

HACCP に沿った衛生管理の義務化から 4 年が経過し、衛生管理の見直しが必要になってきている。本研究では食品等事業者が自らの確な危害要因分析と分析結果に基づく管理措置の決定及び HACCP 導入後の検証を適切に行い、国際的な基準に適合した HACCP システムを無理なく構築することを可能とするツールや教育資材等を開発し支援すること目的としている。

HACCP に基づく衛生管理の導入前、導入後、あるいは、製造工程の変更時に危害要因が適切に除去あるいは許容レベルまで低減されているかを客観的な証拠に基づき検証する必要がある。生物学的危害要因の検証として製品の試験検査も必要になり、標準的な実施方法の提示が有効と考えられる。

真空包装食品については、嫌気性菌、特にボツリヌス菌が生物学的危害要因であり、加熱殺菌、pH、水分活性(Aw)、塩分濃度、保存温度などの複数の管理手段の組み合わせにより制御しているが、最終製品におけるその消長を確認することは検証として重要である。これらの管理手段がボツリヌス菌の芽胞の発芽・増殖を確実に阻止できることを検証するため、接種試験が有効な手段の一つとして挙げられる。しかし、ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素は感染症法で二種病原体等に指定されており、一般に食品等事業者が扱うこと難しく、代用可能な細菌の選定及び実施方法の提示が必要である。小熊らはボツリヌス菌の代用として *Clostridium sporogenes* が使用可能と報告している (<https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2003/000273/200301192A/200301192A0001.pdf>)。

そこで本分担研究では、真空包装食品における生物学的危害要因の検証として、ボツリヌス菌に焦点を当て、その代用菌である *Clostridium sporogenes* を真空調理食品に添加して消長を調査し、その結果から食品等事業者での簡易添加試験実施における課題と今後の方向性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株

独立行政法人製品評価技術基盤機構から分与した *Clostridium sporogenes* (NBRC 13950) を本試験に使用した。

2. 接種菌液の調製

凍結乾燥された *Clostridium sporogenes* 分与株の菌体を指定の復元水（復元水 702 ダイゴ、塩谷エムエス）で懸濁し、液状チオグリコール酸培地（ダイゴ、塩谷エムエス）に接種し、嫌気培養用ケースに入れて嫌気培養用パック（アネロパック®・ケンキ 三菱ガス化学）を用いて 37℃で一晩培養した。さらに、1 白金耳を液状チオグリコール酸培地に接種し、37℃で 2 日間嫌気培養した培養液を接種菌液とした。

3. 接種菌液の菌数測定

接種菌液の階段希釈液を作成し、それらを 0.1ml ずつ嫌気性菌用選択分離培地（アキュディア™ GM 加 GAM 寒天培地、島津ダイアグノスティクス）に接種し、コンラージ棒で培地全体に広げ、嫌気培養用ケースに入れて嫌気培養用パック（アネロパック®・ケンキ

三菱ガス化学)を用いて、37°Cで 72 時間±2 時間で培養した。生育したコロニーを目視でカウントすることで、*Clostridium sporogenes* の菌数を測定した。

4. 接種試験

接種試験に使用する真空包装食品は真空調理を利用して時短で漬ける白菜漬とした。

白菜を 3 cm幅に切裁し、400g 計量した白菜を流水で 1 分間、水を交換しながら、計 3 回洗浄し水切りした。その後、真空フィルムに白菜を入れ、付着水を考慮して、白菜の 20%になるまで水分添加した。併せて、白菜に対し 2%の食塩 (8g)、切り昆布 1.5g、4%の低温発酵糠床 (16g) を加え、まんべんなく液が行き渡るように、1 分間、袋の外から馴染ませた。次に接種菌液を 1mL 添加し、再度、袋の外から 1 分間まんべんなく十分になじませ、真空包装機 (SK-300H, 石島商事) で真空度 99.9%に真空後、10°Cで 14 日間漬け込み最終製品とした。これを 3 検体用意した (N=3)。

5. 微生物検査

真空にして 2 時間後に開封した検体および 14 日後に開封した検体について、約 10g を正確に秤量し、滅菌ストマフィルターに入れ、その 9 倍量の滅菌生理食塩水 (0.9%NaCl) を加えて、ストマッカー (パドル式 ホモジナイザー, IUL INSTRUMENTS) で 1 分間ホモジネートしたものを試料原液とした。

Clostridium sporogenes の検出には、嫌気性菌用選択分離培地 (アキュディア™ GM 加 GAM 寒天培地、島津ダイアグノスティクス) を使用した。試料原液やその段

階希釈液を 0.1ml ずつ接種し、コンラージ棒で培地全体に広げ、嫌気培養用ケースに入れて嫌気培養用パック (アネロパック®・ケンキ 三菱ガス化学)を用いて培養した。培養条件は 37°Cで 72 時間±2 時間、嫌气的とし、生育したコロニーを目視でカウントした。

乳酸菌群については、試料原液またはその段階希釈液を乳酸菌検査用培地 (3M™ ペトリフィルム™ 乳酸菌数測定用プレート (LAB プレート), 3M) へ 1 ml ずつ接種した。培養条件は 35°Cで 48 時間±2 時間、好氣的とし、サイズや濃淡を問わず、全ての赤色のコロニーを目視でカウントした。

6. 理化学検査

高圧滅菌した試料に 2 倍量の蒸留水を加え、ブレンダー (6630、オスター) で 10,600rpm で 5 分間粉碎して均一化したものを遠心分離し、その上清を pH メーター (D-54、堀場製作所) で pH を測定した。

7. 対照試験

接種試験と同様な工程で供試菌株を接種せず真空包装した検体を対照とし、真空包装して 2 時間後の検体 (N=3) を上記微生物検査および理化学検査に供し、漬け込む前の原材料由来の微生物の汚染状況および pH を調査した。

8. *Clostridium sporogenes* の芽胞菌数測定

接種菌液を恒温槽で 80°C、20 分間保持した後に、段階希釈液を作成し、それらを 0.1ml ずつ嫌気性菌用選択分離培地 (アキュディア™ GM 加 GAM 寒天培地、島津ダイアグノス

ティクス)に接種し、コンラージ棒で培地全体に広げ、嫌気培養用ケースに入れて嫌気培養用パック(アネロパック®・ケンキ 三菱ガス化学)を用いて、37°Cで72時間±2時間で培養した。生育したコロニーを目視でカウントすることで、*Clostridium sporogenes*の芽胞菌数を測定した。

9. 統計分析

IBM SPSS Statistics バージョン 30.0.0.0 を使用した。

C. 研究結果

1. 接種菌液の菌数測定

接種菌液における *Clostridium sporogenes* の菌数は 5.74 Log cfu/mL であった。

また、80°C、20 分間加熱処理後の芽胞数は 2.95 Log cfu/g であった。これらの結果から、培養液である接種菌液の *Clostridium sporogenes* は栄養型と芽胞型が半数ずつ存在したと考えられた。

2. 接種試験

2.1 *Clostridium sporogenes* 数の変化

真空 2 時間後の検体における *Clostridium sporogenes* の菌数は平均 2.46 Log cfu/g、標準偏差は 0.15 であった (N=3)。一方、真空 14 日後の漬け込みが終了した最終製品の検体では、*Clostridium sporogenes* の菌数は 2 検体で不検出、1 検体で 2.00 Log cfu/g、であった (N=3)。*Clostridium sporogenes* を接種していない対照は 3 検体とも

Clostridium sporogenes は不検出であった。このため原材料には *Clostridium sporogenes* は存在しなかったと考えられた (図 1)。

接種菌液 1mL を検体に接種した場合、検体中の菌数の理論値は 3.04 Log cfu/g になる。これに対し製品に接種し真空包装した 2 時間後の検出菌数は平均 2.46 Log cfu/g (範囲: 2.30-2.60) であった。漬物内で接種後短時間のうちに栄養型細胞の一部が不活化された可能性が示唆された (図 1)。

真空 2 時間後検体及び真空 14 日後検体における検出率の差について Fisher の正確確率検定を行った結果、正確な有意確率 (両側) は 0.400 であり、統計的な 5%水準で有意な差は検出されなかった。

2.2 乳酸菌数の変化

真空 2 時間後の検体における乳酸菌の菌数は平均 5.61 Log cfu/g、標準偏差は 0.30 であった (N=3)。一方、真空 14 日後の漬け込みが終了した最終製品の検体では、乳酸菌の菌数は平均 7.69 Log cfu/g、標準偏差は 0.04 であった (N=3)。対照の乳酸菌数は平均 5.78 Log cfu/g、標準偏差は 0.10 であり、原材料由来と考えられた (N=3) (図 2)。

対照、真空 2 時間後検体、真空 14 日後検体の 3 グループ間の差は Kruskal-Wallis 検定で有意ではなかった (P=0.065) が、14 日間の漬け込みで約 2 Log の増加傾向が強く示唆された。真空 2 時間後検体と真空 14 日後検体を比較した Mann-Whitney U 検定でも有意差は得られなかった (P=0.10) が、観察された乳酸菌数の増加は顕著であった。

2.3.pH の変化

pH は、対照で平均 5.25、真空 2 時間後検体で平均 5.36 と同程度であった。真空 14 日後検体は平均 4.04 まで大きく低下した (図 3)。真空 2 時間後検体と真空 14 日後検体の差は Mann-Whitney U 検定で有意ではなかった($P=0.100$)が、約 1.3 の顕著な低下であり、pH 4.6 を下回ることから微生物制御には重要な変化であった。

2.4 pH と乳酸菌数の関係

pH と乳酸菌数の間には統計的に高度に有意な強い負の相関が認められた (Pearson $r=-0.991$, $P<0.001$ 、Spearman $r=-0.828$, $P=0.006$)。乳酸菌数が増加すると pH が低下するという関係性が確認された (図 4)。

D. 考察

本研究の結果から、真空調理による白菜漬において、原材料由来の乳酸菌が顕著に増殖し、それに伴い pH が大きく低下することが明らかになった。pH と乳酸菌数の間には統計的に有意な負の相関が認められ、pH 低下が乳酸菌の発酵活動によるものであることが強く裏付けられた。

接種された *Clostridium sporogenes* は、接種時 (真空 2 時間後検体) には検出されたが、14 日後には検出率が低下し、生残数が減少傾向を示した。この減少傾向は統計的な 5%水準では有意ではなかったが、観察データとしては明らかであり、サンプルサイズが小さいことによる検出力不足が影響したと考えられる。対照群では

Clostridium sporogenes が検出されなかったことから、原材料には存在せず接種による導入であることは確認できた。

この *Clostridium sporogenes* の菌数減少傾向は、同時期に進行した乳酸菌の増殖とそれに伴う pH の顕著な低下 (特に pH 4.6 以下への到達) と強く関連していると推測される。酸性環境は *Clostridium sporogenes* の芽胞の発芽および栄養型細胞の増殖を強く抑制することが知られている。したがって、乳酸菌の発酵によって作り出される低 pH、高乳酸菌の環境が、*Clostridium sporogenes* の生残及び増殖を効果的に抑制した主要因であると考えられた。

また、本研究を通じ、食品企業が自社で嫌気性菌添加試験を行う上での課題が明確になった。主要な課題として、専門知識や設備を要する芽胞菌液の調製と管理、小サンプルサイズによる統計的な限界と結果解釈の困難さ、不検出データの適切な取扱い、および一般的な検査方法における検出限界の制約が挙げられる。これらの課題は、試験の信頼性確保と実施の簡便性の両立を困難にしている。今後の展望として、企業での実施を容易にするための取り組みが求められる。具体的には、簡便な芽胞菌液の供給システムの構築、小サンプルでも科学的に意味のある評価を可能にする統計的手法や解釈基準の検討、pH など代替評価指標の活用、及び検査手法自体の簡便化・迅速化が挙げられる。これらの取り組みにより、HACCP の検証としての添加試験がより多くの食品事業者にとって現実的な手法となることが期待される。

E. 結論

本研究で真空調理による白菜漬において、乳酸菌の発酵による pH の低下が *Clostridium sporogenes* の生残を抑制する主要因であることが示唆された。この知見は、HACCP における pH 管理の重要性を裏付けるものである。一方で、N=3 という小規模試験の統計的限界、不検出データの取扱い等に課題があることが確認された。今後は、より簡便で利用しやすい芽胞菌液供給、小サンプルでの効果評価手法の標準化、および pH 等、代替評価指標の活用に関する研究開発が検討課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

広島菜漬の微生物学的実態調査及び乳酸菌による微生物制御の可能性：溝口嘉範，広島女学院大学人間生活学部紀要（12）
13-17 2025 年 3 月 15 日

2. 学会発表

広島菜漬の細菌学的実態調査及び乳酸菌による微生物制御の可能性：溝口嘉範，藤原舞奈，松田葵，森本麻椰，中村瑠花，中野日南子，大田直香，第 120 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集，2024 年，愛知県

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

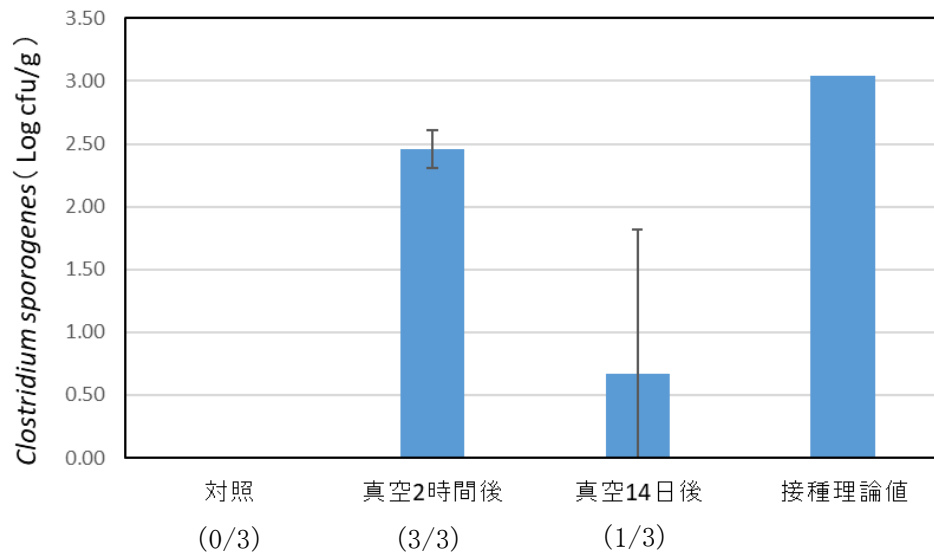


図 1. *Clostridium sporogenes* の菌数変化及び検出状況 (陽性数/検査数)

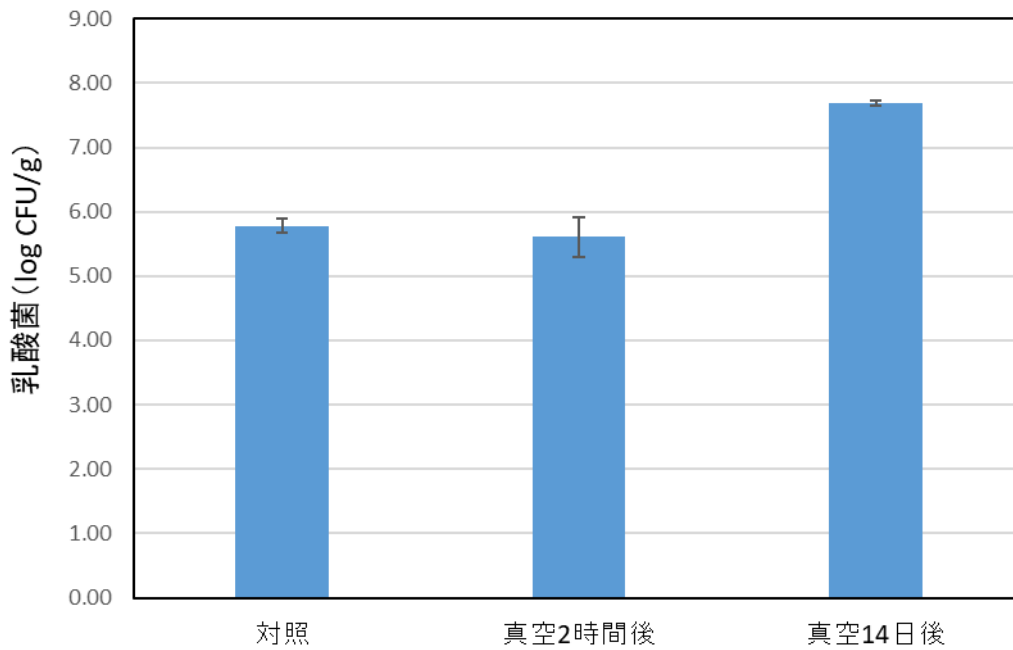


図 2. 各群における乳酸菌数の変化

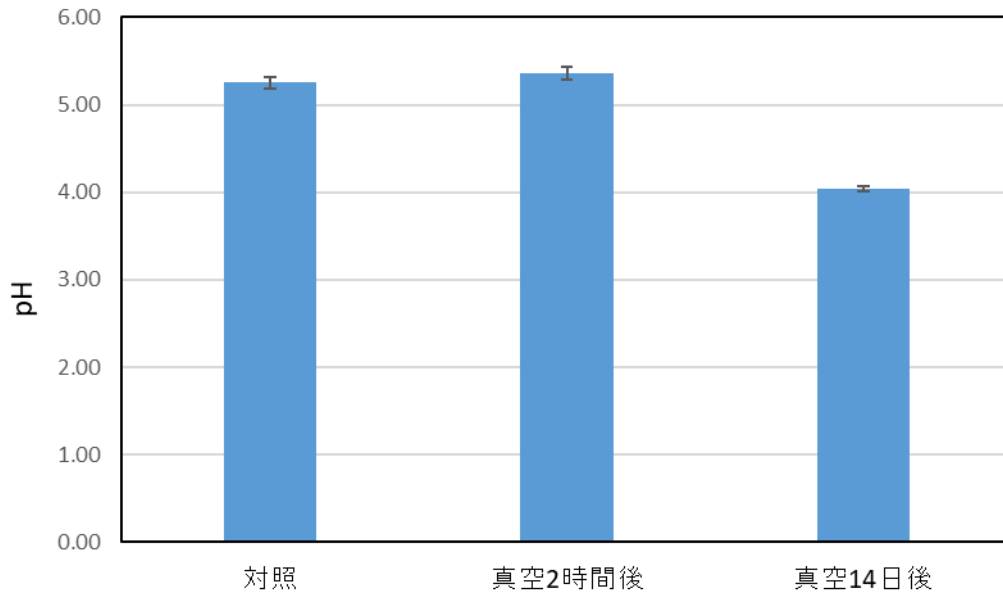


図3. 各群における pH の変化

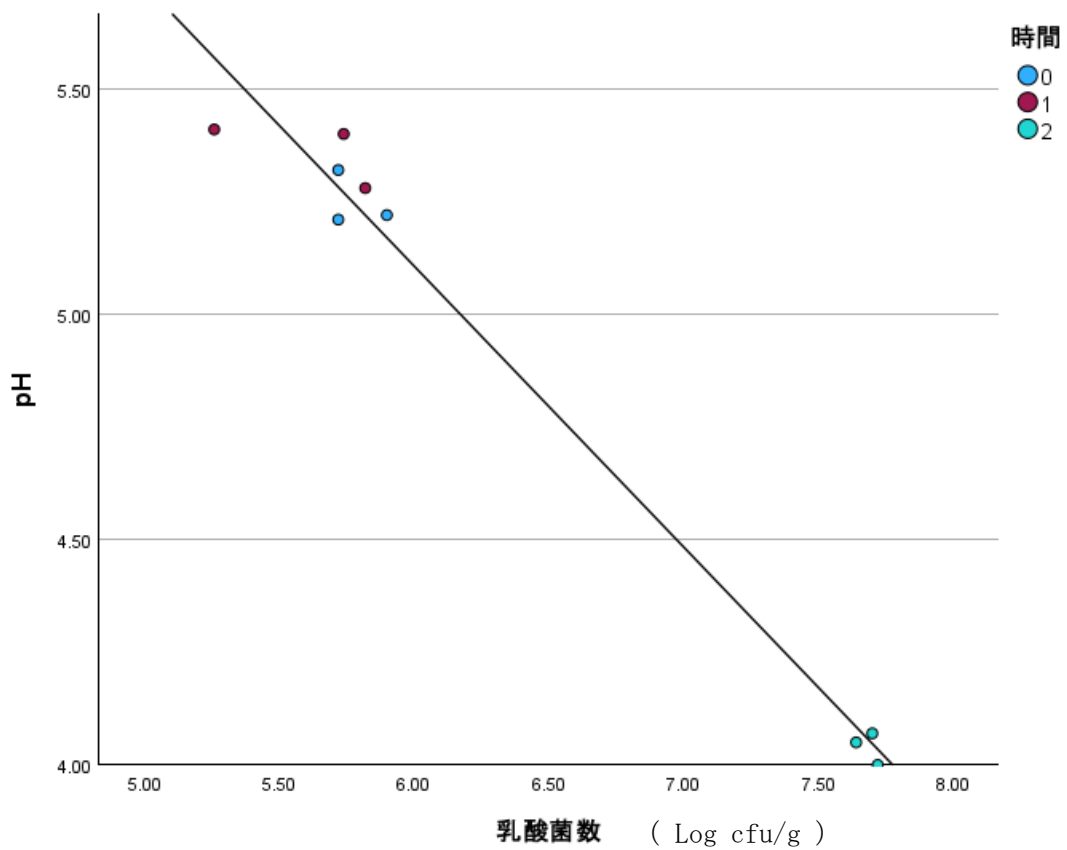


図4. pH と乳酸菌数の関係 (0 : 対照、1 : 真空 2 時間後検体、2 : 真空 14 日後検体)