

令和4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）

「小規模事業者におけるHACCP検証に資する研究」

分担研究報告書

いくら等魚卵製品における検証手法設定に向けた研究

| | | |
|-------|--------------|--|
| 研究分担者 | 朝倉 宏 窪田邦宏 | 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部 |
| 研究協力者 | 山本詩織 有田佳子 | 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 |

研究要旨：いくら等の魚卵製品の多くは、無加熱で摂取される食品にあたるため、その衛生管理は安全確保上、重要な課題である。いくら製品の衛生的取り扱いについては、平成10年に発出された厚生省衛乳第231号においてO157を製品等の試験検査対象項目としている。また、当該食品に対する自治体による監視指導にあたっては、冷凍食品（無加熱摂取冷凍食品）と位置付けられることも多く、同成分規格である、細菌数（生菌数）100,000以下/g及び大腸菌群陰性を遵守していることが確認される場合もある。一方、近年において、当該食品の衛生実態を調査した報告は乏しいことを踏まえ、本分担研究では、わが国でHACCP制度が開始された現況における当該製品の衛生実態を探知すべく、いくら製品166検体を対象に衛生指標菌及び病原菌の検出試験を実施した。衛生指標菌試験結果より細菌数は最大4.40logCFU/gとなり、北海道のいくら認証基準である5.0logCFU/g以下を満たしていた。腸内細菌科菌群は29検体より検出され、最大菌数は3.04logCFU/gであった。 β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌は3検体より検出され、最大菌数は1.48logCFU/gであった。黄色ブドウ球菌は9検体より検出された。過去の事例から最も危害性が懸念される腸管出血性大腸菌は全検体で陰性であった。腸内細菌科菌群として検出された集落としては、主に環境等に由来する*Lelliottia amnigena*が主体であったほか、分離された β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌は*E. coli*であった。冷蔵温度帯での保存試験を通じ、代表検体において細菌数及び腸内細菌科菌群数は保存3日後以降で増加を示した。以上より、当該魚卵製品の安全性を検証するための試験項目としては、国際的に糞便汚染指標として汎用される β -グルクロニダーゼ产生大腸菌を糞便汚染指標として、品質評価試験項目となり得る細菌数と共に設定することで、安全性と品質の両面の確保に資すると考えられる。

A. 研究目的

いくらをはじめとする魚卵製品の多くは、無加熱で摂取される食品にあたることから、その衛生管理は国民の健康保持を図る上で重要な課題である。いくら製品の衛生的取り扱いについては、厚生省より通知（衛乳第231号、平成10年9月18日）が発出されており、O157を製品等試験検査の対象項目に置くこととされている（<https://www.mhlw.go.jp/www1/houdou/1009/h0918-1.html>）。

一方、当該製品の衛生管理に係る国内の監視指導にあたっては、当該製品を冷凍食品（無加熱摂取冷凍食品）と見做し、同成分規格として定められている、細菌数（生菌数）100,000以下/g及び大腸菌群陰性を指標として用いられることが多い。

本研究では、いくら等の魚卵製品の製造加工にあたっての検証方法の探索を行うことを目的として、いくら製品を対象とした微生物試験を行い、同成績並びに保存試験成績に基づき、当該製品に対する検証方法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. いくら製品検体

国内において、冷凍状態でインターネット販売されるいくら製品計166検体を入手した。いずれも入手時には冷凍状態であることを目視確認した上で、流水解凍せた後に以下の微生物試験等に供した。

2. 検体調整及び衛生指標菌定量検出試験

検体25gを採材し、225mLの緩衝ペプトン水（ISO処方）に加え、1分間ストマッキング処理を行った。その後、同懸濁液及び10倍階段希釀列各1mLをTEMPO AC, TEMPO EB, TEMPO EC, TEMPO STA（ビオメリュー）に供し、各指標菌数を求めた。

菌数算定にあたって、衛生指標菌試験において不検出となった検体の成績は、1/2 LODである0.50 log CFU/gを採用した。また、原料の魚種（鮭・鱈）あるいは産地（外国産・国産）による菌数分布の差異については、One way ANOVAによる解析を行った。

3. 病原細菌のスクリーニング試験

上記2.で調整した検体懸濁液を37°Cにて20時間培養後、同培養液を鑄型として、病原菌自動検出システム（MDS）（3M）を用いて、志賀毒素産生性大腸菌（STEC）及びサルモネラ属菌由来遺伝子の検出を行った。

4. 菌種同定

上項2を通じて、腸内細菌科菌群陽性を呈した検体については、VRBG寒天培地に培養液を接種し、代表集落をMueller-Hinton寒天培地上で継代培養した後、VITEK2（ビオメリュー）を用いて菌種同定を行った。

5. 保存試験

腸内細菌科菌群が検出された6検体を8°Cで0~7日間の保存試験に供した。保存0、1、3、7日後に各25gを採材し、項2.と同様に細菌数及び腸内細菌科菌群数を求めることで、自然汚染を呈した腸内細菌科菌群の保存過程における動態を評価した。

C. 結果

1. いくら製品検体における衛生指標菌の検出状況（図1、表1）

いくら製品計166検体における衛生指標菌検出成績の概要について以下に記す。

(i) 細菌数（生菌数）

供試検体のうち、136検体より細菌数が確認され、その平均値±SDは 1.92 ± 1.08 log CFU/gであった。最大菌数は4.40 log CFU/g、95パーセンタイル値は4.08 log CFU/gであった。

なお、全検体は、無加熱摂取冷凍食品の成分規格として定められる $5.00 \log \text{CFU/g}$ 以下を満たしていた。

(ii) 腸内細菌科菌群

腸内細菌科菌群はいくら製品計 166 検体のうち 29 検体より検出され、その平均値 $\pm \text{SD}$ は $0.69 \pm 0.47 \log \text{CFU/g}$ であった。最大菌数は $3.04 \log \text{CFU/g}$ 、95 パーセンタイル値は $1.85 \log \text{CFU/g}$ であった。

なお、腸内細菌科菌群については、成分規格等で設定されている項目ではないため、参考となる数値等は特段得られなかった。

(iii) 大腸菌

大腸菌 (β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌であり、国内の食品衛生法で定められる *E. coli* とは異なる) は、いくら製品計 166 検体のうち 3 検体より検出され、その最大菌数は $1.48 \log \text{CFU/g}$ であった。95 パーセンタイル値は $0.50 \log \text{CFU/g}$ であった。

なお、冷凍食品の成分規格への適合状況を確認するための細菌試験では、検体の 100 倍希釈乳剤を調整し、これを 1mL 検査に供することとなっていることから、理論上の検出限界は $2.0 \log \text{CFU/g}$ と算定された。

(iii) 黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌は、いくら製品計 166 検体のうち、9 検体より検出され、その最大菌数は $1.65 \log \text{CFU/g}$ 、95 パーセンタイル値は $1.00 \log \text{CFU/g}$ であった。

加えて、原料の魚種 (鮭・鱈)、或いは産地 (外国産・国産) による菌数分布を比較したところ、大腸菌及び黄色ブドウ球菌については魚種間及び産地間で有意差を認めたものの、当該指標菌陽性は特定製品由來

検体に限定されていたことから、原料の魚種或いは産地に基づく有意差とは考え難いと判断された。

2. 病原細菌の検出状況

いくら製品検体における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 及びサルモネラ属菌の存在を明らかにする目的で、迅速検出法である MDS を用いたスクリーニング検査を実施したところ、供試検体はいずれも陰性を示した。

3. 冷蔵保存を通じた微生物挙動 (図 2)

いくら製品検体のうち、腸内細菌科菌群陽性を呈した 6 検体 (A~F) について、解凍後に、 8°C 下で最長 7 日間保存を行い、保存から 0, 1, 3, 7 日後に細菌数及び腸内細菌科菌群数を求めた。

結果として、細菌数は検体 D を除く 5 検体で保存 7 日後には保存 0 日後に比べて高い菌数を示した。また、腸内細菌科菌群については、検体 B は保存 3 日後及び 7 日後で保存 0 日後に比べて高い菌数を示したほか、検体 C、検体 E 及び検体 F では保存 7 日後で保存 0 日後に比べて高い菌数を示した。なお、検体 B で保存 7 日後に分離された腸内細菌科菌群様集落を菌種同定に供したところ、*Lelliottia amnigena* であった。

4. 腸内細菌科菌群として検出された代表集落の菌種同定 (表 2)

項 2において、腸内細菌科菌群が陽性となった 29 検体について、それぞれ VRBG 寒天培地に塗抹し、培養後に定型集落を認めた計 28 検体より代表 2 集落を釣菌し、菌種同定試験に供した。

釣菌した集落の菌属（種）同定結果として、計 10 菌（属）が同定され、*Lelliottia amnigena* は 7 検体からと最も多く、*Serratia liquefaciens*、*Pantoea* spp.、*E. coli* が各 4 検体からと続いた。これらのうち、細菌学的分類に基づき腸内細菌科菌群とされないものは、*Serratia* spp.、*Pantoea* spp.、*Hafnia* spp. であった。これらを除外した上で腸内細菌科菌群と最終的に同定された菌種としては、*Lelliottia amnigena* が最多であり、次いで *E. coli* であった。

D. 考察

本研究では、いくら等魚卵製品における衛生実態を踏まえた上で、同製品の工程管理を行う上で妥当と思われる検証手法について検討を行った。

衛生試験成績から、今回の供試検体では過去の事例において健康被害との関連性が示される腸管出血性大腸菌は検出されなかった。衛生指標菌の定量検出試験結果として、腸内細菌科菌群が一定程度検出されたが、菌種同定成績から、*L. amnigena* 等の主に環境に由来する細菌が当該食品では優勢である実態が明らかとなった。

HACCP 検証を行う上では、ヒトの健康被害との関連性を持つ衛生指標を選択することが必要かつ重要な事項と思われる。その意味において、検証にあたって、現行の無加熱摂取冷凍食品の成分規格である大腸菌群陰性を評価項目とする評価方法は必ずしも適切とは言い難い状況とも思われる。なお、現行の成分規格では検体の 100 倍乳剤を調整し、定性試験により大腸菌群の有無を判定しているが、同法では実質的には

大腸菌群が $2.0 \log \text{CFU/g}$ 以下であることを確認する形となっている。

上記の方法に代わりうる方法としては、魚卵製品については、国際的な糞便汚染指標菌として汎用される β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌（いわゆる generic *Escherichia coli*）を試験項目として、食品一般の希釈倍率である 10 倍乳剤を用いた検証を行い、その陰性を確認していく方法が科学性かつ実行性の両面から妥当と考えられる。

なお、*L. amnigena* を含めた細菌数は冷蔵保存時間の延長に伴い、特に保存 7 日後で明確な増殖を示す検体が存在した。このことは、当該食品の冷蔵保存時間帯について、各製品の特性を踏まえた検証を通じて設定していくことが、腐敗変敗の可能性を最小限にとどめ、品質の確保へと繋がることを示唆していると言えよう。腐敗変敗の原因菌は幅広く存在し得ることを鑑みると、そのための検証項目としては、細菌数を選択することが適切と考えられる。

E. 結論

本研究では、いくら製品を対象とした微生物試験を行い、細菌数及び β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌を当該食品の検証を進める上での試験項目として設定することが有用と考えられる知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

山本詩織、窪田邦宏、吉富真理、温泉川肇彦、五十嵐靜信、朝倉宏、仕出し弁当の保存経過にともなう細菌増殖挙動に関する検討. 日本食品微生物学会雑誌.

印刷中.

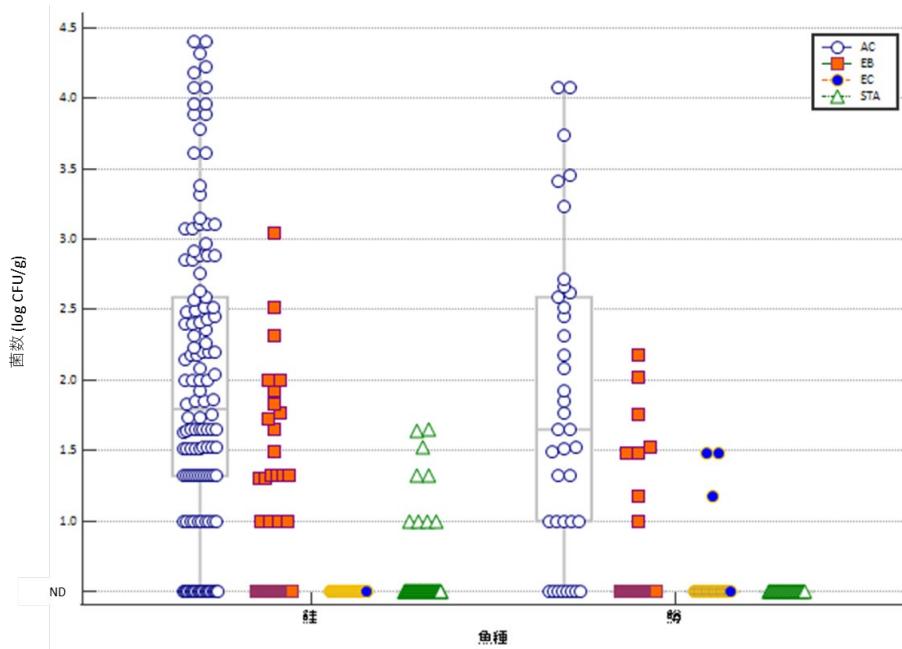
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 学会発表

なし

A



B

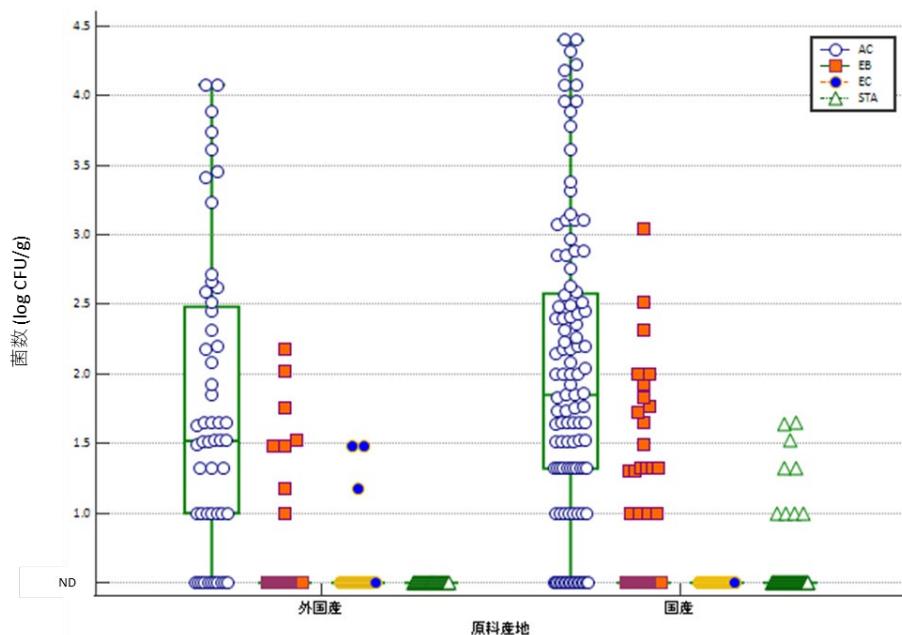
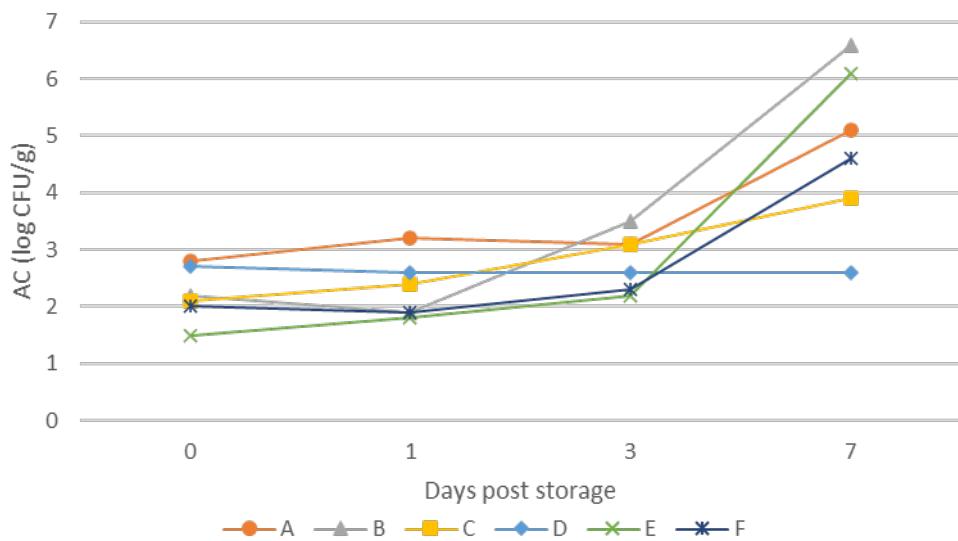


図 1. いくら製品検体からの衛生指標菌検出菌数分布の概要.

セクション A は原料魚種（鮭・鱈）、セクション B は原料の産地（外国産・国産）の別

に記す。ND は不検出を示す。

A



B

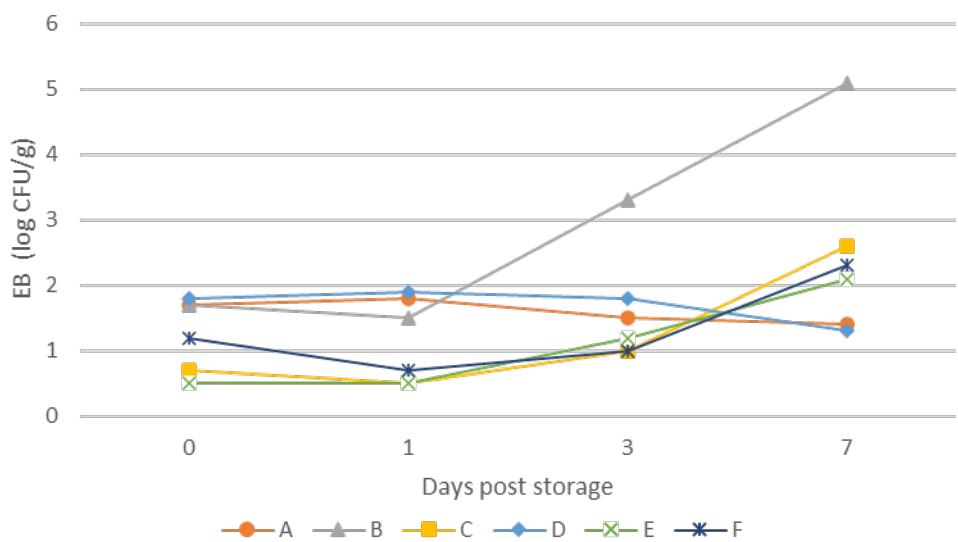


図 2. 冷蔵保存過程を通じた、腸内細菌科菌群陽性いくら製品 6 検体中の細菌数及び腸内細菌科菌群の挙動。

セクション A、B はそれぞれ細菌数、腸内細菌科菌群数の挙動を示す。

表 1. いくら製品検体からの衛生指標菌検出成績の概要。

| 項目 | AC | EB | EC | STA |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 陽性検体数 | 136 | 29 | 3 | 9 |
| 平均値 ± SD | 1.92 ± 1.08 | 0.69 ± 0.47 | 0.52 ± 0.12 | 0.54 ± 0.19 |
| 中央値 | 1.74 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| 最大値 | 4.40 | 3.04 | 1.48 | 1.65 |
| 95 パーセンタイル値 | 4.08 | 1.85 | 0.50 | 1.00 |
| (参考)成分規格* | <5.00 | - | - | - |

AC: 細菌数（生菌数）、EB: 腸内細菌科菌群、EC: β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌、

STA: 黄色ブドウ球菌（単位はいずれも log CFU/g）。

表 2. いくら製品検体より分離同定された腸内細菌科菌群に属する菌属（種）。

| 菌属（種） | 分離された検体数 |
|--------------------------------|----------|
| <i>Lelliottia amnigena</i> | 7 |
| <i>E. coli</i> | 4 |
| <i>Atlantibacter hermannii</i> | 3 |
| <i>Enterobacter</i> spp. | 3 |
| <i>Kluyvera intermedia</i> | 2 |
| <i>Citrobacter braakii</i> | 1 |