

令和 5 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）
分担研究報告書

浅漬け類からの食中毒菌検出のための試験法検討及び
海藻類による食中毒発生状況に関する調査研究

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者 都丸亜希子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
西田智子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
松岡英明 東京農工大学工学研究院

研究要旨

我が国に設定されている食品中の微生物規格の多くは、昭和 34 年に制定された厚生省告示第 370 号「食品、添加物等の規格基準」に基づいており、食品とその衛生を取り巻く状況が大きく変化した現在においてもそれらが科学的に妥当か否かの検証が必要とされている。特に令和 3 年の HACCP 完全制度化に伴い、そうざい、漬物等の衛生規範が廃止される等、各種食品製造工程における衛生管理はそれ以前と大きく異なっている。本研究では、現在微生物規格を有しない食品群において、衛生実態を管理するための微生物規格を検討する上での基礎知見の集積を図ることを目的として、令和 5 年度は日本国内におけるサラダ、漬物等を含む生鮮野菜における食中毒菌及び衛生指標菌の検出状況と、それらを原因食品とする食中毒事例の発生状況についての文献調査を行った。今年度は、国内外における海藻類を原因食品とする食中毒事例の調査報告及び海藻類における細菌汚染実態についての文献調査を行った。更に、昨年度の本研究において国内で流通している野菜類のうち、浅漬け類におけるリステリア・モノサイトゲネスの汚染率が高かったことから、現在ナチュラルチーズ（ソフト及びセミハード）と非加熱食肉製品の同菌試験に用いられる公定法が浅漬け類においても適用可能かを、添加回収試験を行い検証した。その結果、2000 年以降に国内外で発生した海藻類が原因食品である集団食中毒事例は、大腸菌 O7:H4 に汚染された海藻サラダによる国内の 1 事例、ノロウイルスに汚染されたカット海苔及び青のりを原因食品とする国内と韓国の各 1 事例の計 3 事例が見られた。そのうち 2 事例は、患者数 2000 名を超える大規模事例であった。国内外での海藻類の細菌汚染実態調査は 3 例の報告が見られ、イタリアの 1 例において非加熱喫食用の海藻類からリステリア・モノサイトゲネスとセレウス菌が 2~3 log colony forming unit (CFU)/g のレベルで検出されていた。

野菜浅漬け類へのリステリア・モノサイトゲネス添加回収試験では、白菜浅漬けを用いた場合の前増菌培地からの選択分離培養における 50% 検出水準値 (LOD₅₀) は 0.744 CFU/25 g (検体量)、増菌培地からの選択分離培養における LOD₅₀ は 1.11 CFU/25 g (検体量) であった。非加熱食肉製品及びナチュラルチーズの公定法に採用されている NIHSJ-08:2020 を用いた本菌の検出は可能であると思われたが、接種菌量が低い場合は前増菌培養段階からの選択分離培養における陽性率、接種菌量が高い場合には増菌培養段階からの選択分離培地における陽性率が高い傾向が見られた。

A. 研究目的

我が国を含む世界各国においては、食品の安全性を確保することを目的として様々な食品に対し微生物規格基準を定めている。規格基準は主に、過去に食中毒事例の原因となった微生物と食品の組み合わせ、或いは食品の衛生状況の指標となる項目が用いられており、食品の安全性及び衛生の確保に重要な役割を果たしてきた。一方、国内の衛生状況は時代の変遷と共に変化しており、昨今では食品の国際流通も増加の一途を辿る等、食を取り巻く環境は変化しており、食中毒の原因食品も従来多いとされていた動物性食品のみならず、野菜、果物等の青果物による大規模事例の増加が国際的に問題となっている。また、分子遺伝学の発展による食中毒発生時及び食品汚染微生物の解析技術の飛躍的向上により集団事例の同定が容易となっており、諸外国ではキノコ、小麦粉、チョコレート等従来ではあまり認知されていなかった食品による大規模食中毒事例の発生が明らかとなっている。そのため、国内においても従来微生物規格基準が必要とされていなかった食品群と微生物の組み合わせについて、その設定が必要とされるか否かを考慮するための基礎的資料とする目的で、令和5年度は国内及び諸外国における生鮮野菜類を原因とする食中毒の発生状況及び国内で流通する野菜類（生鮮野菜及び漬物類）における細菌汚染実態についての文献調査を行い、当該食品の喫食による食中毒発生リスクの評価に役立てることを目的とした。今年度は、海藻類について同様の調査を行うとともに、昨年度研究で市販浅漬け類での汚染率が高いことが

示されたリステリア・モノサイトゲネスについて、今後汚染実態を行うための添加回収試験による検証を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 国内外における海藻等を原因食品とする細菌性及びウイルス性食中毒に関する文献調査

国内医学文献データベースである医中誌、アメリカ国立生物工学情報センターの文献データベースである Pubmed 及び Elsevier 社のデータベースである ScienceDirect を用い、2000 年以降に国内で発生した野菜に関連する食中毒事例についての報告を検索した（最終確認日：2024 年 3 月 28 日）。キーワードには「海藻」「食中毒」「細菌」「汚染」等を用いた。

2) 国内外における海藻類の細菌汚染実態に関する文献調査

医中誌、Pubmed 及び ScienceDirect を用い、2000 年以降に報告された海藻類の細菌汚染実態調査に関する文献を検索した（最終確認日：2024 年 3 月 28 日）。キーワードには「海藻」「細菌」「汚染」「seaweed」「prevalence」「isolation」等を用いた。

3) 浅漬け類におけるリステリア・モノサイトゲネスの添加回収試験

添加回収試験は、ナチュラルチーズ（ソフト及びセミハード）と非加熱食肉製品の公定法が準拠している NIHSJ-08:2020 に準拠して実施し、接種菌株として *Listeria monocytogenes* ATCC19115 株（血清型 4b）を、食品検体には市販の白菜浅漬け（原材料：

白菜、昆布、唐辛子、漬け原料液として昆布だし及び食塩、pH 4.93、塩分濃度 2.1%)を用いた。試験菌株は -80°C に保存したグリセロールストックから Trypticase soy agar (Beckton Dickinson and Company) 平板に単一集落を形成するように接種し、 37°C で 24 時間培養後に 1 集落を 4 mL の Brain Heart Infusion broth (Beckton Dickinson and Company 社) に接種して 37°C で 24 時間静置培養を行った。増菌後の培養液 1 白金耳を 4 mL の Brain Heart Infusion broth に接種して 37°C で 24 時間静置培養を行った後の菌液を、滅菌リン酸緩衝 (PBS、3M 社) を用いて階段希釈したものを、浅漬けへの接種菌液とした。接種菌液は原液の 10^{-8} 乗希釈液を $1/2$ 濃度としたものを低菌量、 10^{-8} 乗希釈液を中菌量、 10^{-7} 乗希釈液の $1/2$ 濃度としたものを高菌量の接種菌液とした。各菌量の接種菌液は $100\mu\text{L}$ を接種に用い、同量を TSA 平板 2 枚に塗布したものを 37°C で 24 時間培養し、実際の接種菌数を測定した。食品検体は各接種菌量につき 4 検体を用い、陰性対象のみ 1 検体として、1 検体あたり 25 g を無菌的に計量、ストマッカー袋に分注し、あらかじめ 30°C に加温した 225 mL のハーフフレイザーブロス (メルクミリポア社) と試験菌液を加えてストマッカー (クレオス社) を用いてストローク 8.0 にて 2 分間ストマッキング処理を行った。その後、ストマッカー袋を 30°C で 25 時間の前増菌培養を行った。前増菌培養後の菌液は 0.1 mL を 10 mL のフレイザーブロス (メルクミリポア社) に接種し、 37°C で 24 時間の増菌培養を行うとともに、Ottaviani and Agosti agar (ALOA ;メルクミリポア社) 平板及び PALCAM (メルクミリポア社) 平板に 1 白金耳ずつ塗布し、 37°C

で 48 時間まで培養した。増菌培養後の菌液についても、同様に 2 種類の選択分離培地に塗布し、 37°C で 48 時間までの培養を行った。定型集落が得られた平板を陽性と判定した。前増菌培養から及び増菌培養からの選択分離培養における 50%検出限界値 (LOD_{50}) の算出は、ISO 16140-2:2016 に記載された方法で行った。

C. 研究結果

1) 国内外における海藻等を原因食品とする細菌性食中毒についての文献調査

今回の調査結果概要を表 1 に示した。2000 年以降に発生した海藻類を原因食品とする集団食中毒事例は 3 例報告されており、1 事例は学校給食で提供された海藻サラダを汚染していた大腸菌 O7:H4 によるものであり、患者数は約 3000 名であった。他の 2 事例はいずれもノロウイルスを原因物質としており、日本国内で発生したカット海苔を原因食品とする事例と、韓国で発生した青のりを原因食品とする事例であった。

2) 国内外における海藻類の細菌汚染実態に関する文献調査

表 2 に、国内外における海藻類の細菌汚染実態に関する文献調査結果を示した。2000 年以降の海藻類の汚染実態に関する報告は 3 報見られ、1 報は国内の市販乾燥海藻類を対象として細菌数、大腸菌群及び E. coli について調査を行っていた。大腸菌群及び E. coli は 11 検体の全てで陰性だったが、細菌数の中央値は $2\sim 3 \log \text{CFU/g}$ となっており、2 検体から $4\sim 5 \log \text{CFU/g}$ の細菌数が検出されていた。別の 1 報は国内の市販乾燥海藻類における *Cronobacter* 属菌の汚染状況を調査しており、

8 検体の全てで陰性であった。イタリアでの調査では、RTE 海藻類を対象として *L. monocytogenes* とセレウス菌を調査しており、それぞれ 14 検体中 3 検体から分離されており、いずれの菌も 2~3 log CFU/g の汚染レベルが報告されていた。

3) 浅漬け類におけるリステリア・モノサイトゲネスの添加回収試験

表 3 に、白菜浅漬けへのリステリア・モノサイトゲネスの添加回収試験の結果を示した。接種菌量の実測値は、低菌量が 0.5 CFU/25 g、中菌量が 1 CFU/25 g 及び高菌量が 8.5 CFU/25 g であった。ISO 16140-2:2016 に記載された手法から算出された、前増菌培地からの選択分離培養における 50% 検出水準値 (LOD₅₀) は 0.744 CFU/25 g (検体量)、増菌培地からの選択分離培養における LOD₅₀ は 1.11 CFU/25 g (検体量) であった。定性試験の結果は、前増菌段階と増菌段階のいずれにおいても、ALOA 培地を選択分離培地に用いた場合は 24 時間培養後に定型集落の形成が見られたが、PALCAM 培地では定型集落の形成に時間を要し、高菌量接種群のみで 48 時間での定型集落形成が見られた。純培養菌をこれらの選択分離培地に接種した際には、いずれの培地でも 24 時間で定型集落の形成が見られ、選択分離培地による差はなかった。また、接種菌量が低い場合は前増菌培養段階からの選択分離培養における陽性率、接種菌量が高い場合には増菌培養段階からの選択分離培地における陽性率が高い傾向が見られた。結論としては、非加熱食肉製品及びナチュラルチーズの公定法に採用されている NIHSJ-08:2020 を用いて、白菜浅漬けからの本菌の検出は可能で

あると思われたが、他の食品と同様に前増菌培養及び増菌培養両方からの選択分離培養が必要であった。

D. 考察

本研究での調査により、国内外での海藻類による食中毒事例は昨年度実施した生鮮野菜類によるものに比較して稀ではあるものの、患者数が 2000 名を超える大規模事例が報告されていた。その理由としては、生鮮野菜よりも同一ロットに含まれる製品量が大きく、他の食品と混ぜて喫食されることが及び非加熱で喫食されることが多い乾燥海藻類の特性に関連していると思われた。また、消費期限が長い製品の特性により、製品の製造時点から消費及び食中毒発生までに数年を経ていることも特徴的であった。市販海藻製品の細菌汚染実態調査においては、水分活性が低い製品の特長から、大腸菌群、*E. coli* 及びクロノバクター属菌が属するグラム陰性菌については汚染率が低いことが示されていた。一方、グラム陽性菌であるリステリア・モノサイトゲネスとセレウス菌については若芽、スピルリナ及びアオサから分離されていた。陽性検体の汚染菌量はリステリアが 2.8~3.51 log CFU/g、セレウス菌が 2.23~3.83 log CFU/g と、一般的な定量試験の検出下限値である 1 log CFU/g よりも 10~100 倍高い菌量であり、製造工程のいずれかの時点でこれらの菌の増殖があった可能性が考えられた。海藻類による食中毒発生状況及び汚染実態調査結果から、食中毒を引き起こす頻度は昨年度の調査対象である生鮮野菜類より低く、製品の規格基準設定が必要な状況とは思われなかったが、製造工程における衛生管理の重要性が

示唆された。

市販浅漬け類へのリステリア・モノサイトゲネス添加回収試験の結果から、白菜浅漬けにおいてはハーフフレイザーブロスを用いた前増菌段階からの選択分離培養がフレイザーブロスを用いた増菌段階からの選択分離培養よりも、低菌量接種群における定型集落の形成性が高い傾向が示された。また、純培養菌では見られない選択分離培地の種類による定型集落形成時間の差が添加回収試験で見られたことから、食品マトリクスの性状等が定型集落の形成性に影響を与えていることが確認された。今回の添加回収試験は非加熱食肉製品及びナチュラルチーズの成分規格の公定法に採用されている NIHSJ-08:2020 に準拠して行っており、選択分離培地の培養時間は 48 時間までとなっているため、最終判定としては 48 時間での結果を採用したが、任意の試験としてその後も平板の観察を継続したところ、72 時間以降に定型集落が形成された検体も一部に見られた。今回用いた白菜浅漬けの pH は 4.93 であり、文献における本菌の増殖限界 pH である 4.6 よりも上であったが、乳酸菌等の夾雑菌を含む浅漬け検体では本菌の定型集落形成に所定の培養時間よりも長い時間を要する可能性がある可能性も考えられた。今後、他種の浅漬けでも同様の試験を行い、浅漬けに特有の問題点とその改善手法を検討することで、日本独自の食品である浅漬け類からの本菌検出を確実にを行うための試験法の検証を行うことが可能になると思われる。

E. 結論

本研究での調査により、国内外での海藻

類による食中毒事例は昨年度実施した生鮮野菜類によるものに比較して稀ではあるものの、患者数が 2000 名を超える大規模事例が報告されていた。市販海藻製品の細菌汚染実態調査においては、海外の調査で若芽、スピルリナ及びアオサからリステリア・モノサイトゲネスとセレウス菌が 2~3 log CFU/g のレベルで分離されていた。市販海藻製品について、微生物規格基準設定がただちに必要な状況とは思われなかったが、製造工程における衛生管理の重要性が示唆された。

市販浅漬け類へのリステリア・モノサイトゲネス添加回収試験の結果から、白菜浅漬けにおいて非加熱食肉製品及びナチュラルチーズの公定法に採用されている NIHSJ-08:2020 を用いた本菌の検出は可能であると思われたが、定型集落の形成に所定の培養時間よりも長時間を要する可能性があることに注意が必要であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

百瀬愛佳、西田智子、窪田邦宏、岡田由美子 野菜類を原因とする細菌性食中毒の国内発生状況. 第 44 回日本食品微生物学会 (2023. 9. 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 2000～2023 年に報告された国内外における海藻類による食中毒事例

発生時期	原因食品	病原体	死者	患者数	調査地域	出典	報告年	著者
2020	海藻サラダ	<i>Escherichia coli</i> O7:H4	0	2958	日本	Epidemiology and Infection	2021	Kashima
2017.1～2	カット海苔	ノロウイルス	0	2094	日本	Emerging Infectious Diseases	2018	Sakon
2012	青のり	ノロウイルス	0	91	韓国	Epidemiology and Infection	2015	Park

表 2. 2000～2023 年に報告された国内外における市販海藻類の細菌汚染実態報告

調査期間	対象食品	病原体	検体数	陽性検体数	汚染レベル	調査地域	出典	報告年	著者		
2020.12～ 2021.1	市販乾燥海藻	細菌数	11	—	0～1 乗：1, 1～2：4, 2～3：2, 3～4：2, 4～5：2 検体	日本	食品衛生研究	2022	及川		
		大腸菌群	11	0							
		E. coli	11	0							
2008～2010	市販乾燥海藻（若芽、昆布、めかぶ、天草、ひじき、とろろ昆布、ふのり、青のり）	<i>Cronobacter</i> spp.	8	0		日本	Biocontrol Science	2014	Ogihara		
記載なし	RTE 若芽	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	1	3.07 log CFU/g	イタリア	Journal of Food Protection	2021	Martelli		
	RTE ダルス（紅藻類）		2	0							
	RTE スピルリナ		2	1						2.8	
	RTE アマノリ類		2	0							
	RTE 昆布類		2	0							
	RTE ひじき		2	0							
	RTE アオサ		2	1						3.51	
	RTE 若芽		<i>Bacillus cereus</i>	2						0	
	RTE ダルス（紅藻類）			2						0	
	RTE スピルリナ			2						2	2.38, 2.23
	RTE アマノリ類			2						0	
	RTE 昆布類			2						0	
	RTE ひじき			2						0	
	RTE アオサ			2						1	3.83

表 3. 浅漬け類へのリステリア・モノサイトゲネス添加回収試験結果

選択分離培養の培養条件			菌濃度レベルごとの陽性検体数/試験検体数			
増菌ステップ	培養時間 (時間)	選択分離培地	低菌量	中菌量	高菌量	ブランク
前増菌培養	24	ALOA	1/4	0/4	3/4	0/1
		PALCAM	0/4	0/4	0/4	0/1
	48	ALOA	2/4	2/4	4/4	0/1
		PALCAM	0/4	0/4	1/4	0/1
増菌培養	24	ALOA	2/4	1/4	4/4	0/1
		PALCAM	0/4	0/4	0/4	0/1
	48	ALOA	2/4	1/4	4/4	0/1
		PALCAM	0/4	0/4	3/4	0/1