

令和 4-6 年度食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

総合分担研究報告書

生鮮野菜等による食中毒発生状況及び細菌汚染実態に関する研究

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 百瀬愛佳 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
都丸亜希子 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
山本詩織 鎌倉女子大学家政学部

研究要旨

日本国内における食品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」に基づき設定されている。そのため、現在でもそれらが科学的に妥当か否かの検証が望まれている。また、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大きな転換期を迎えている。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た。令和 4 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汚染実態とそれらを原因食品とする食中毒事例の発生状況等について、文献調査を行った。その結果、2000 年以降に国内で発生した野菜類が原因食品の可能性がある集団食中毒事例は 38 例の報告が見られ、原因菌ごとでは腸管出血性大腸菌 17 件、サルモネラ 8 件、*Escherichia albertii* 3 件、エルシニア 2 件、カンピロバクター、その他の病原大腸菌、チフス菌、黄色ブドウ球菌が各 1 件であった。米国 CDC による、2016 年以降の複数の州にまたがる食中毒集団事例の原因食品は、サルモネラ、毒素原性大腸菌及びリステリアのいずれにおいても野菜類が食肉類と同程度またはそれ以上を占めていた。

令和 5 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 07: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 $2 \sim 3 \log \text{ colony forming unit (CFU)/g}$ 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 (LOD_{50}) 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 LOD_{50} は 1.11 CFU/25 g (検体量) であった。

令和 6 年度は、市販の野菜浅漬け類 88 製品におけるリステリア・モノサイトゲネスの汚染実態調査を実施した。その結果、茄子の浅漬け 20 検体中 1 検体 (陽性率 5.0%) 及び白菜の浅漬け 13 検体中 1 検体 (同 7.7%) からリステリア・モノサイトゲネスが分離された。汚染菌量はいずれも定量下限値 (10 cfu/g) 未満であった。ミックス漬け 21 検体、蕪及び大根の浅漬け 10 検体、キャベツ浅漬け 10 検体及びキュウリの浅漬け 14 検体からは、リステリア・モノサイトゲネスは分離されなかった。リステリア・モノサイトゲネス以外のリステリア属菌は茄子 1 検体、ミックス漬け 2 検体及びキャベツ 1 検体から分離され、リステリア属菌全体の陽性率は 6.8% (6/88 検体) であった。得られたリステリア・モノサイトゲネス 2 菌株の分子遺伝学的解析を行ったところ、茄子由来株は CC6/ST6 に、白菜由来株は CC5/ST5 に属していた。陽性検体の汚染菌量が低かったことから、浅漬け類による健康成人におけるリステリア症感染リスクは、他の食品と比較して高くはないと推察されたが、よりリスクを低減するために製造工程の衛生管理の向上等によって本菌の汚染率を下げる事が望ましいと考えられた。

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。規格基準に設定される食中毒菌としては、これまでに食中毒事例が発生した食品との組み合わせや、微生物汚染実態から食中毒の発生リスクが高いと想定されるものが設定されており、食品の衛

生確保に重要な役割を果たしてきた。また、製造工程における衛生管理には、一般生菌数や大腸菌群、腸内細菌科菌群のように食品や製造環境にある程度存在し、衛生的な取り扱い等の指標となる項目が用いられている。日本国内での食品中微生物規格基準は主に、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、現在でもその多

くが変わらず用いられている。一方、国内の食品製造における衛生管理の状況は令和 3 年の HACCP 完全制度化を持って大きく変化した。また、食品の輸入のみならず輸出も拡大している。国際的にも、食中毒の原因食品として従来の乳や肉等の動物性食品に加え、サラダや丸ごとの果物等の青果物による大規模事例の増加が問題となっている。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、過去に発生が見られなかった様々な食品による食中毒事例が報告されている。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。そのため本分担研究では、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、野菜類を中心とした細菌汚染実態、食中毒発生状況の文献調査委、非加熱で喫食する野菜加工品のリステリア汚染実態調査等を実施した。

B. 研究方法

1) 日本国内における生鮮野菜等を原因食品とする細菌性食中毒についての文献調査

国内医学文献データベースである医中誌及び国立感染症研究所の病原微生物検出情報 (Infectious Agents Surveillance Report: IASR) 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: 2022 年 12 月 20 日)。キーワードには「野菜」「食中毒」「サラダ」「惣菜」等を用いた。検索結果で得られた論文から、原因食品が「サラダ」ではあるが原因食

材が「海藻」「豆類」等の野菜以外のものを除外し、結果の取りまとめを行った。

2) 日本国内における生鮮野菜類の細菌汚染実態についての文献調査

医中誌及び Pubmed を用い、2000 年以降の国内における野菜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: 2023 年 3 月 15 日)。キーワードには「野菜」「細菌」「サラダ」「惣菜」「汚染」「vegetables」「Japan」「prevalence」「isolation」等を用いた。

3) 諸外国における生鮮野菜類を原因食品とする細菌性食中毒についての調査

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部が発出している「食品安全情報」から、令和 3 年及び 4 年に記載された諸外国における生鮮野菜類を原因とする集団食中毒事例の情報を抽出した。米国 Center for Disease Control and Prevention のホームページから、2016 年以降の Multistate Outbreak 情報のうち、サルモネラ、毒素原性大腸菌及びリステリアによるものを抽出し、その原因食品について調査した。諸外国におけるスプラウトを原因食品とする食中毒事例について、Microbiological Risk Assessment Series 43, Prevention and control of microbiological hazards in fresh fruits and vegetables: Part 3-sprout (2023, WHO)、「より、発生国ごと、発生時期ごとに取りまとめた。

4) 諸外国における生鮮野菜類の細菌汚染実態についての調査

諸外国におけるスプラウトを原因食品とする食中毒事例 Microbiological Risk Assessment Series 43, Prevention and control of microbiological hazards

in fresh fruits and vegetables: Part 3-sprout (2023, WHO)

5) 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。

6) 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。

7) 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℃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℃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℃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℃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 μ L を接種に用い、同量を TSA 平板 2 枚に塗布したものを 37℃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℃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℃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℃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℃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℃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 (LOD₅₀) の算出は、ISO 16140-2:2016 に記載された方法で行った。

8) 国内で市販されている野菜浅漬け類におけるリステリア・モノサイトゲネス汚染実態調査

一般に販売されている野菜浅漬け製品におけるリステリア・モノサイトゲネスの汚染実態調査は、ナチュラルチーズ（ソフト及びセミソフトタイプ）と非加熱食肉製品の公定法が準拠している NIHSJ-08:2020 及び NIHSJ-09:2020 を用いて実施した。野菜浅漬け類 88 製品は、2024 年 9 月から 2025 年 3 月に神奈川県内及び東京都のスーパーマーケット及びデパート等で購入し、7℃以下の冷蔵条件下で実験室に搬入・保管し、消費期限内に試験に供した。検体 25g を試験品の 3 箇所以上から無菌的に採取し、half Fraser ブロス（メルク）225 mL に懸濁して 10 倍乳剤を作成し、その 1 mL を 3 枚の ALOA 培地（メルク）に塗布した（定量試験）。寒天平板は 37℃で 48 時間以上培養し、定型集落の発育が見られた場合は Trypticase Soy agar (Beckton, Dickenson and Company) を用いて純培養後にグラム染色、カタラーゼ試験、羊血液寒天（栄研）を用いた溶血性試験及び糖分解性試験（ラムノース及びキシロース）を実施してリステリア・モノサイトゲネスであることを確認した。リステリア属菌の確認試験には、VP 試験と半流動培地を用いた傘状発育の確認を行った。定性試験で用いた 10 倍乳剤の残りは 30℃で 25 時間±1 時間培養したのち、1 白金耳を ALOA 培地及び PALCAM 培地 (Oxoid) に塗抹して 37℃で 48 時間以上培養すると共に、

0.1 mL を Fraser 培地 10 mL に接種して 37℃で 24 時間±2 時間、2 次増菌培養を行った（定性試験）。培養後の菌液 1 白金耳を ALOA 培地及び PALCAM 培地 (Oxoid) に塗抹して 37℃で 24 時間培養した。培養時間終了後、それぞれの寒天平板に定型集落の発育が見られた場合は、純培養後に定量試験と同様の確認試験を実施した。

2) 分離菌株の分子遺伝学的解析

分離されたリステリア・モノサイトゲネス菌株は、純培養後に TSA 培地に塗抹し、37℃で一晩培養した集落を滅菌綿棒で掻き取って、Maxwell RSC Blood DNA キット（プロメガ）を用いて全 DNA を抽出した。抽出した DNA の純度及び濃度は TapeStation (Agilent) を用いて確認した。その後、TruSeq DNA PCR-free Library（イルミナ）を用いてライブラリーを作製し、NovaSeq X Plus（イルミナ）による Paired End 法でドラフトゲノム解析を行った。得られたデータは、CLC genomics Workbench ソフトウェア ver 24.0（フィルジェン）を用いて不要配列のトリミングとリードのアセンブリを行った後、パスツール研究所の Pub MLST による Multi Locus Sequence Typing (MLST) 等の解析を実施した。

C. 研究結果

1) 日本国内における生鮮野菜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令和 4 年度分担報告書表 1 に示した。2000 年以降に発生した、野菜が原因食品に含まれる可能性のある集団食中毒事例のうち、サルモネラが原因菌となっているものは 8 事例見られたが、その内 2 事例は野菜以外の食材を含む複合食品等で

あり、1 事例は調理器具の汚染が原因であった。喫食者数と発症者数が明らかとなっているものは6 事例あり、発症率は2.2～60.6%であった。汚染菌量が明らかとなっているものは3 事例、喫食菌数が明らかとなっているものは1 事例見られた。汚染菌量は最終製品では<30～90 MPN/100g の範囲であったが、原料の野菜で汚染菌量が明らかになったキュウリとカイワレ大根はそれぞれ 1.1×10^6 MPN/100 g 及び 960MPN/g であった。

腸管出血性大腸菌を原因菌とするものは17 事例見られた。その内、複合食品によるものは1 事例で、キムチ等白菜を原因とするものが3 事例、キュウリが原因のものが4 事例、葉物野菜が関連しているものが4 事例見られた。喫食者数と発症者数が明らかとなっているものは12 事例あり、発症率は0.4～59.1%であった。汚染菌量が明らかとなっている報告は見られなかった。

病原性大腸菌を原因菌とするものは4 事例見られた。その内、複合食品によるものは1 事例で、白菜を原因とするものが1 事例、キュウリが原因のものが1 事例、長ネギを原因とするものが1 事例見られた。喫食者数と発症者数が明らかとなっているものは1 事例あり、発症率は30.6%であった。汚染菌量が明らかとなっているものは1 事例、推定菌量が示されているものは1 事例見られ、それぞれ <30MPN/100 g と $1.0 \sim 4.0 \times 10^6$ /g であった。

Escherichia albertii が原因菌となっているものは3 事例見られた。その内、複合食品によるものが1 事例、ニガナを原因とするものが1 事例、キャベツが原因のものが1 事例であった。3 事例の発症率は50～57.7%（推定含む）であった。

エルシニア属菌が原因菌となっているも

のは2 事例見られ、サラダによるものであった。発症率は1 事例で明らかとなっており、56.5%であった。

2) 日本国内における生鮮野菜類及び浅漬け類の細菌汚染実態についての文献調査

令和4 年度分担報告書表2 に、日本国内における生鮮野菜類及び浅漬け類の細菌汚染実態調査結果を示した。2000 年以降の、生鮮野菜類の汚染実態に関する報告は25 報、浅漬け類に関する報告は13 報見られた。

生鮮野菜類に関する報告のうち、衛生指標菌4 種（大腸菌、大腸菌群、糞便系大腸菌及び腸内細菌科菌群）に関するものはそれぞれ8 報、10 報、2 報及び3 報みられ、全報告数を合計した汚染率はそれぞれ7.1%、75.5%、10.1%及び41.5%であった。病原菌のうち、陽性結果が報告されたものは病原性大腸菌1 報、黄色ブドウ球菌3 報、セレウス菌2 報、サルモネラ属菌8 報及びリステリア5 報で、全報告数を合計した汚染率汚染率はそれぞれ1.9%、4.5%、42%、0.03%及び0.3%であった。

浅漬け類に関する報告のうち、衛生指標菌4 種（大腸菌、大腸菌群及び腸内細菌科菌群）に関するものはそれぞれ6 報、4 報及び2 報見られ、全報告数を合計した汚染率はそれぞれ1.6%、2.4%及び69.2%であった。糞便系大腸菌についての報告は見られなかった。病原菌のうち、陽性結果が報告されたものは黄色ブドウ球菌4 報、セレウス菌1 報及びリステリア5 報見られ、全報告数を合計した汚染率はそれぞれ1.8%、15.2%及び5.2%であった。

3) 諸外国における生鮮野菜類を原因食品と

する細菌性食中毒についての調査

令和3年及び4年の「国立医薬品食品衛生研究所安全情報部食品安全情報」で報告された、諸外国における生鮮野菜類を原因とする集団食中毒事例は16例見られた（令和4年度分担報告書表3）。原因菌は、サルモネラ属菌が8例、腸管出血性大腸菌が5例、リステリアが2例、エルシニア・エンテロコリチカが1例であった。原因食品は、包装済みサラダが4例、ほうれん草が2例、葉物野菜の可能性が2例のほか、ミニトマト、レッドオニオン、玉ねぎ、キクラゲ、アボカド、冷凍コーン、キムチ及びスプラウトであった。特に感染者数が多い事例の原因食品は、レッドオニオンの1642（2か国合計）と、玉ねぎの1040名であり、いずれも原因菌はサルモネラ属菌であった。

2017年以降のCDC Multistate outbreakに報告されたサルモネラ属菌、STEC及びリステリアによる集団食中毒事例数を原因食品ごとにまとめたグラフを令和4年度分担報告書図1に示した。サルモネラ属菌及びSTECでは、2017年から2021年まで毎年野菜果物を原因とする集団事例が発生しており、肉及びその加工品よりも集団事例数が多い年も見られた。リステリアは、集団事例が数年にわたることが多いため、調査期間全体の合計数で示した。その結果、乳製品に次いで野菜果物を原因とする集団事例が多く発生していることが示された。

Microbiological Risk Assessment Series 43, Prevention and control of microbiological hazards in fresh fruits and vegetables: Part 3-sproutに報告された、諸外国におけるスプラウトを原因とする食中毒事例を発生国ごと、病原体ごとに取りまとめた（令和4年度分担報告書表4）。

スプラウトを原因とする集団食中毒事例は2021年までに91例報告されており、サルモネラ属菌によるものが64件、腸管出血性大腸菌によるものが16件、リステリア・モノサイトゲネスによるものが4件であった。その他、黄色ブドウ球菌、エルシニア・エンテロコリチカ、パラチフス菌、セレウス菌によるものが各1件、原因菌が不明のものが3件であった。発生国別では、米国が64件、カナダが10件、スウェーデン及びフィンランドが各4件、英国及びオーストラリアが各3件、日本が2件等であった。

2016年以降のCDC Multistate outbreakに報告されたサルモネラ属菌、STEC及びリステリアによる集団食中毒事例数を原因食品ごとにまとめた結果を表5-1〜3に示した。サルモネラ属菌及びSTECでは、2016年から2021年まで毎年野菜果物を原因とする集団事例が発生しており、肉及びその加工品よりも集団事例数が多い年も見られた。リステリアは、集団事例が数年にわたることが多いため、調査期間全体の合計数で示した。その結果、乳製品に次いで野菜果物を原因とする集団事例が多く発生していることが示された。

4) 諸外国における生鮮野菜類の細菌汚染実態についての調査

令和4年度分担報告書表6に、諸外国における生鮮野菜類の細菌汚染実態調査結果を示した。2000年以降の、生鮮野菜類の汚染実態に関する報告は13報見られた。衛生指標菌のうち、大腸菌及び大腸菌群に関するものはそれぞれ2報及び3報みられ、全報告数を合計した汚染率はそれぞれ9.0%及び73.9%であった。糞便系大腸菌及び腸内細菌科菌群に関する報告は見られなかった。病原菌のう

ち、陽性結果が報告されたものは腸管出血性大腸菌 1 報、腸管毒素原性大腸菌 4 報、病原性大腸菌 2 報、サルモネラ属菌 8 報、リステリア 7 報及びクロノバクター属菌 1 報で、全報告数を合計した汚染率汚染率はそれぞれ 6.0%、0.6%、3.2%、0.12%、7.9%及び 2.1%であった。

5) 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

調査結果概要を令和 5 年度分担報告書表 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。

6) 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

令和 5 年度分担報告書表 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 2~3 log CFU/g となっており、2 検体から 4~5 log 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。

7) 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

令和 5 年度分担報告書表 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。

8) 国内で市販されている野菜浅漬け類におけるリステリア・モノサイトゲネス汚染実態調査

今回調査した市販の野菜浅漬け類 88 検体のうち、2 検体(茄子浅漬け及び白菜浅漬け、陽性率 2.3%) からリステリア・モノサイトゲネスが分離された。カテゴリーごとの陽性率は、茄子の浅漬けで 5.0% (20 検体中 1 検体)、白菜の浅漬けで 7.7% (13 検体中 1 検体) であった。陽性検体における汚染菌量はいずれも定量下限値 (10 cfu/g) 未満であった。ミックス漬け 21 検体、蕪及び大根の浅漬け 10 検体、キャベツ浅漬け 10 検体及びキュウリの浅漬け 14 検体からは、本菌は分離されなかった。リステリア・モノサイトゲネスを除くリステリア属菌は、野菜浅漬け 88 検体中 4 検体(茄子 1 検体、ミックス 2 検体及びキャベツ 1 検体) から分離された(陽性率 5.7%)。蕪及び大根の浅漬け 10 検体及びキュウリの浅漬け 14 検体からは、リステリア・モノサイトゲネスを除くリステリア属菌は分離されなかった。リステリア属菌全体の陽性率は、6.8% (6/88 検体) であった。

9) 分離菌株の分子遺伝学的解析

市販浅漬け検体から分離された *Listeria monocytogenes* 2 菌株について、MLST 解析を行った。その結果、茄子浅漬け由来株は CC6/ST6 株、白菜浅漬け由来株は CC5/ST5 株であった。得られた全ゲノム塩基配列を用いた cgMLST 型は、茄子浅漬け由来株で 11685、白菜浅漬け由来株では 6363 であった。

D. 考察

令和 4 年度の本研究調査により、2000 年以降に国内で報告された野菜類が原因となっている可能性のある集団食中毒事例は、腸管出血性大腸菌によるものが最も多く (17 事例)、次いでサルモネラ属菌 (8 事例)、病原性大腸菌 (4 事例)、*E. albertii* (3 事例) 等であった。同定されている原因食材としては、腸管出血性大腸菌を原因とする事例ではきゅうり、白菜漬け(キムチを含む)、キャベツ、サンチュ等の葉物野菜が多くみられた。サルモネラ属菌を原因とする事例では、キュウリ、カイワレ大根及び冷凍青菜類が報告されていた。病原大腸菌でもキュウリ及びキムチ漬けが、*E. albertii* ではキャベツが報告されており、細菌性食中毒事例の発生が多く報告されている生鮮野菜類はキュウリ、カイワレ大根、キャベツ等の葉物野菜、冷凍青菜類及びキムチを含む白菜漬けであることが明らかとなった。一方、諸外国での集団事例の原因食品は、包装済みサラダ、ほうれん草、葉物野菜、ミニトマト、レッドオニオン、玉ねぎ、キクラゲ、アボカド、冷凍コーン、キムチ及びスプラウト等様々な野菜類が報告されており、特に玉ねぎとレッドオニオンを原因とする事例で患者数が 1000 人を超える大規模事例となっていたこと。一方で、国内での主な原因食品の一つであるきゅうりによる事例は見られず、国内外での原因食品には相違がみられる結果となった。

2000 年以降に報告された、国内における野菜類の細菌汚染実態に関する論文では、腸管出血性大腸菌について調査したものは 9 報(合計 3030 検体)、毒素原性大腸菌については 2 報(合計 1597 検体)、サルモネラ属菌については 8 報(合計 3141 検体)の報告が見

られたが、陽性検体が得られたのはサルモネラ属菌の1検体（アルファルファ）のみであった。本検体は大腸菌については陰性と報告されていた。*E. albertii* については1報の報告が見られ、セリ、三つ葉、クレソン、キュウリ等から分離されていた。リステリア・モノサイトゲネスは5報（合計1091検体）の調査報告があり、3検体（ネギ、カイワレ、輸入もやし）から分離されていた。セレウス菌は2報（合計858検体）の報告があり、360検体（分離率42%）から分離されていたが、本菌は土壌細菌であり、土壌で栽培される野菜からの分離は一般的と考えられる。以上のように、国内で集団事例がしばしばみられている生鮮野菜類であっても、汚染実態調査での汚染率は極めて低いことが示された。浅漬け類についても同様の傾向が見られ、腸管出血性大腸菌について4報（合計236検体）、サルモネラ属菌について2報（合計174検体）の調査報告が見られたものの、いずれも全検体で陰性の結果が示されていた。リステリアについては5報（合計326検体）で17検体から検出されており、高食塩濃度下及び低温で増殖可能なリステリアが国内で流通している浅漬け類から5%を超える検出率で分離されていることが明らかとなった。今後、国内リステリア症患者との関連を調査していく必要があると思われる。そのため、令和5年度以降には野菜浅漬け類からリステリアを分離するための研究を実施した。

近年の日本国内における野菜類による食中毒の発生実態と、市販野菜類の細菌汚染実態が明確となった。一方、同時期に報告された国内流通野菜類の細菌汚染実態調査の結果からは、野菜類における食中毒菌汚染率が極めて低いことが示された。一部の報告では、

PCR等の遺伝子検査が陽性を示した検体について細菌分離を行っており、遺伝子検査陽性検体の一部のみが培養陽性であった。また、生鮮野菜は一般的に消費までの期間が数日程度と短く、それ以前に細菌検査の結果を得るのが難しい場合も考えられることから、健康リスクの高い病原菌については、遺伝子検査結果を汚染マーカーとすることも衛生管理上有用である可能性が考えられた。サルモネラ属菌が検出されたスプラウト類検体については、大腸菌が陰性であったと報告されており、病原菌に代わる衛生指標菌等を考察するには更なるデータが必要と思われた。また、多くの汚染実態調査で、1つの野菜検体につき25gの1試験検体を用いていた（n=1）検査を行っており、低レベルの汚染を必ずしも把握できていない可能性も考えられたことから、生鮮野菜類の細菌検査におけるサンプリングプラン等の設定が大変重要であることが示唆された。

令和6年度の本分担研究での調査により、市販野菜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は全体で2.3%（2/88検体）、カテゴリーごとでは茄子浅漬けで5.0%（20検体中1検体）、白菜の浅漬けで7.7%（13検体中1検体）であることが示された。それぞれの検体における汚染菌量は、定量法の定量下限値未満であり、ある程度の汚染頻度はあるものの、汚染レベルは高くはなかった。一方、リステリア属菌全体の陽性率は6.8%（6/88検体）となり、カテゴリーごとでは茄子浅漬けで10%、白菜浅漬けで7.7%、ミックス漬けで9.5%、キャベツ浅漬けで10%を示しており、国内流通浅漬け類のいくつかのカテゴリーでは10%前後の陽性率であることが明らかとなった。蕪及び大根の浅

漬けときゅうりの浅漬けからはリステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌が分離されず、原材料によって汚染率が異なる可能性が示唆された。分離菌株の分子疫学的解析の結果、野菜浅漬け由来株は北米、ヨーロッパ及びアジア等国際的に広く分離される遺伝子型に分類された。パスツール研究所の PubMLST サイトに登録されている CC5/ST5 株は臨床検体、食品及び製造環境から、CC6/ST6 株は臨床検体及び食品から多く分離されている。一方、今回リステリア・モノサイトゲネスが分離された浅漬け検体における汚染菌量は低く、定量試験法の定量下限値未満であったことから、これらの食品による健康成人におけるリステリア症感染リスクは、他の食品と比較して高くはないと推察された。しかしながら、ハイリスクグループを含めた消費者全体でのリスクをより一層低減するためには、浅漬け類の製造工程の衛生管理等の向上により本菌の汚染率を下げる事が望ましいと考えられた。

E. 結論

近年、諸外国では包装済みサラダや薬物野菜、冷凍野菜等を原因とする大規模な食中毒事例が頻発しており、WHO 等でも大きな問題とされている。今年度の本研究で、国内で 2000 年以降に報告された野菜類が原因食品の可能性がある集団食中毒事例についての文献調査を行ったところ、腸管出血性大腸菌による 17 事例、サルモネラ属菌による 8 事例、*E. albertii* による 4 事例等が示され、国内においても諸外国と同様に野菜類を原因とする食中毒事例がある程度発生していることが改めて確認された。一方、同時期に報告された国内流通野菜類の細菌汚染実態調査

の結果からは、野菜類における食中毒菌汚染率が極めて低いことが示されたことから、管理に有効な汚染マーカー及び指標菌等や検査におけるサンプリングプラン等の設定が大変重要であることが示唆された。本研究での調査により、市販野菜浅漬け類におけるリステリア属菌汚染率は 6.8% (6/88 検体) であり、リステリア・モノサイトゲネスに限定した汚染率は 2.3% (2/88 検体) であった。リステリア・モノサイトゲネスは茄子浅漬けと白菜浅漬けから分離され、その他のリステリア属菌は茄子浅漬け 1 検体、ミックス漬け 2 検体及びキャベツ 1 検体の合計 4 検体から分離された。

令和 5 年度分担研究により、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場合があることに注意が必要であった。

令和 6 年度分担研究により、国内で市販されている野菜浅漬類はある程度リステリア

に汚染されていることが示された。一方、今回調査した検体はいずれも、汚染菌量は試験法の定量下限値（10 cfu/g）未満であり、リステリア・モノサイトゲネスの成分規格が定められているナチュラルチーズ（ソフト及びセミソフトタイプ）と非加熱食肉製品の基準値を超えるものは見られなかった。そのため、当該食品による健康成人におけるリステリア症感染リスクは、他の食品と比較して高くはないと推察されたが、よりリスクを低減するために製造工程の衛生管理向上等によって本菌の汚染率を下げることを望ましいと考えられた。

本分担研究により、野菜類及び野菜加工品における食中毒菌汚染実態はある程度見られるものの、規格基準設定による管理を行うレベルとは考えにくいことが示された。一方で、野菜浅漬け類におけるリステリア汚染等、HACCP による衛生管理の更なる向上により、野菜加工品の衛生度を高めていく必要性も示唆された。

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 (2024. 9. 大阪)

Yumiko Okada. *Listeria monocytogenes* and its testing method in Japan. 13th UJNR International

Symposium on Toxic Microorganisms
(2024.9.18. 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし