

北九州市内で製造されたそうざいの細菌汚染状況と保存温度の影響

保健福祉局保健環境研究所 ○上野 可南子、藤田 景清、濱田 建一郎、
大羽 広宣¹、角 沙千奈²、藤崎 道子³、石打 郁代¹、村瀬 浩太郎⁴
(¹現・保健所東部生活衛生課、²現・保健福祉局介護保険課、
³現・産業経済局総合農事センター、⁴現・食肉センター)

1 はじめに

スーパー等で気軽に購入できるそうざいは、消費者にとって身近な食品であり、共働き世帯の増加や高齢化等の社会環境の変化に伴い、その需要は年々高まっている。本市では食中毒防止のため、市内でそうざいを製造しているスーパーや食品製造所などから定期的に食品を収去し、「北九州市食品衛生成分規格指導基準」(以下、「指導基準」という。)(表1)を満たしているか検査するとともに、衛生指導を行っている。

この収去検査結果について過去5年分をまとめたところ、スーパーなど小売店の調理場等(飲食店営業許可施設)で作られたそうざい(以下、「スーパー等のそうざい」という。)と、食品製造所(そうざい製造業許可施設)で作られたそうざい(以下、「製造所のそうざい」という。)とでは、検査結果に明確な違いが確認された。

また、そうざいは購入後、摂取するまでの時間と温度管理が重要とされている。そこで、スーパー等のそうざいを家庭で常温または冷蔵保存した場合の細菌数の経時変化について実験を行ったところ、若干の知見が得られたので併せて報告する。

2 検査概要

(1) 過去5年間の収去検査

検 体：2018～2022年度に収去されたそうざい126検体

検査項目：細菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌

検査方法：「食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018」に準じて実施。

(2) 常温または冷蔵保存した場合の細菌数の経時変化実験

検 体：2022年度に収去されたスーパー等のそうざい6検体(表2)

※細菌数が指導基準適合の検体を使用

検査項目：細菌数

検査方法：冷凍保管した検体を解凍した時点を初発(0時間)とし、常温(25℃)で1、3、6、12時間及び24時間または冷蔵(4℃)で24時間保管後、(1)と同様に検査を実施。

表1 北九州市食品衛生成分規格指導基準(一部抜粋)

項 目	そうざい	
	加熱調理食品	未加熱調理食品
細菌数	10万/g以下	10万/g以下
大腸菌群	陰性	
黄色ブドウ球菌	陰性	

表2 実験検体一覧

No.	食品名	区分
1	イカと野菜のXO醤ソース	加 熱
2	ごぼうとコンニャクのきんぴら	加 熱
3	ほうれん草の白和え	未加熱
4	ヤンニョムチキン	加 熱
5	マカロニサラダ	未加熱
6	ほうれん草と玉子炒め	加 熱

3 結果と考察

(1) 過去5年間の収去検査結果

検査結果は表3のとおり。細菌数の指導基準不適(10万/g超過)率は7.1%で、東京都が1993～2002年度に実施した検査結果8.9%¹⁾とほぼ同程度であった。しかし、スーパー等のそうざいに限ると、細菌数の指導基準不適率は13.4%とやや高く、さらに大腸菌群陽性や黄色ブドウ球菌陽性の検体もあった。一方、製造所のそうざいは全て指導基準に適合しており、細菌数は検体の9割以上で検出限界(300/g)以下であった。

製造所のそうざいは広域流通品が多く、消費期限が長い調理工程において加圧加熱殺菌など、高レベルな微生物制御が行われているが、スーパー等のそうざいは当日中に消費することを前提に調理されており、和え物、酢の物など調理の最終工程に加熱(殺菌)がない未加熱食品が多いことが要因と考えられる。特に、スーパー等の未加熱そうざいは92%が細菌数 $10^2 \sim 10^5$ /g以上であったため、購入後に細菌を増殖させない温度管理が重要であることが示唆された。

表3 そうざいの収去検査結果(2018～2022年度)

対象食品	検体数	細菌数/g/					細菌数 不適数(%)	大腸菌群 不適数(%)	黄色ブドウ球菌 不適数(%)
		<300	10 ²	10 ³	10 ⁴	>10 ⁵			
市内製造のそうざい	126	91	6	15	5	9	9(7.1)	2(1.6)	3(2.4)
スーパー等のそうざい	66	35	6	12	4	9	9(13.4)	2(3.0)	3(4.5)
	加熱済	41	33	3	1	3	3(7.3)	2(4.9)	3(7.3)
	未加熱	25	2	3	11	3	6(24.0)	—	—
	製造所のそうざい	60	56	0	3	1	0(0)	0(0)	0(0)
	加熱済	54	52	0	1	1	0(0)	0(0)	0(0)
	未加熱	6	4	0	2	0	0(0)	—	—

(2) 常温または冷蔵保存した場合の細菌数の経時変化

表2の6検体を常温(25℃)で24時間保存した場合の細菌数の経時変化を図1に示す。初発(0時間)においては全6検体が指導基準値未満(うち2検体は検出限界(300/g)以下)であったが、24時間経過後は5検体が指導基準値を超え、そのうち4検体は 2.2×10^8 /gを超えた。最も増加したのはNo.6で、初発の 1.7×10^4 /gから、1時間で約2倍、3時間で4倍近くに増え、24時間後には約26万倍まで増殖した。一方で、No.4はほとんど菌数に変化はなかった。この違いは、食品の栄養成分や水分活性、pH等による細菌の増殖しやすさと、存在する細菌の種類の違いによるものと考えられる。

また、冷蔵(4℃)保存した場合(図2)は、24時間後も菌数が増えていないものがほとんどだったが、No.6は指導基準値を超える 1.5×10^5 /gまで増殖した。これは、低温でも増殖可能な細菌によるものと考えられ、冷蔵保存でも細菌の増殖を完全に防ぐことは難しいことが確認された。

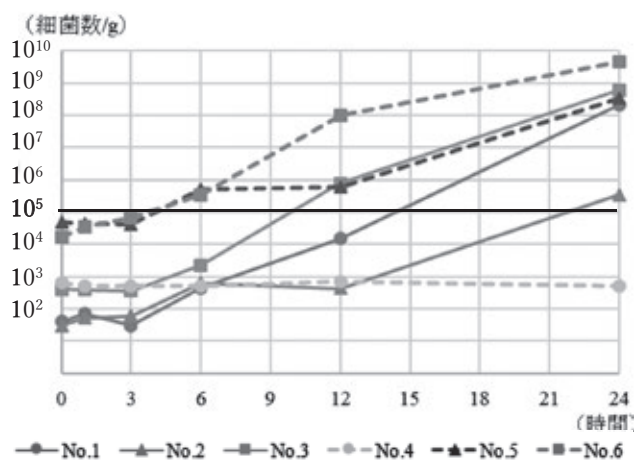


図1 常温(25℃)での細菌数の経時変化

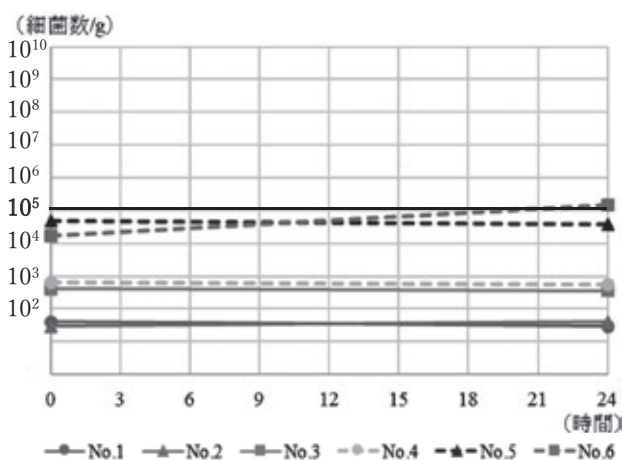


図2 冷蔵(4℃)での細菌数の経時変化

4 まとめ

食品製造時における微生物制御は極めて重要であるが、調理工程によっては難しいものもあり、実際にスーパー等の未加熱そうざいの92%の検体から $10^2 \sim 10^5$ /g以上の細菌が検出された。さらに、購入時は検出限界以下であっても、常温で24時間放置すれば指導基準値を超える可能性が高いことが実験で確認された。

以上のことから、家庭においても食中毒予防3原則の1つである「細菌を増やさない」ことが非常に重要であることが再確認された。また、冷蔵保存し数日に分けて喫食する家庭もあるが、今回の実験では冷蔵していても指導基準値を超過した検体があったため、冷蔵庫に入れても安心せずに、当日中に食べることが望ましいことが示された。なお、今回得られた知見については、当所の広報誌「北九州市保環研だより」に掲載し、食中毒予防の啓発に役立てる予定である。

(参考文献)

- 1) 神真知子、森本敬子、高橋由美、服部絹代、松下秀、吉田靖子：各種市販食品の細菌検査成績(1993年度～2002年度)、東京健安研七年報、55(2004)

qPCR法による食中毒菌一斉スクリーニング検査法の検討

保健福祉局保健環境研究所 微生物部門

○有川 衣美、中村 悦子、田代 拓樹、小畑 勝也、濱田 建一郎

1. はじめに

食中毒事件においては、速やかな再発・拡大防止のための衛生指導が必要であり、このため迅速な原因物質の特定が求められる。現在、細菌性食中毒の検査で用いられている培養法は、原因菌の確定までに平均5日ほどの日数を要し、また検出対象菌種毎に培養条件や培地が異なるため、非常に煩雑な作業が要求される。今回、細菌性食中毒検査の迅速化・省力化を目的に、16種類の遺伝子をターゲットとした、リアルタイムPCR（以下、qPCR）法による食中毒菌一斉スクリーニング検査法の検討を行い、培養法との比較試験を行ったところ、培養法とはほぼ同じ結果を4時間半ほどで出すことができたので、報告する。

2. qPCR法による食中毒菌一斉スクリーニング検査法の検討

【材料と方法】

一斉スクリーニング検査法の標的遺伝子は、本市における過去の食中毒発生状況(表1)を参考に、10種の食中毒菌の病原遺伝子等15遺伝子を選定し、これに粘液胞子虫クドア・セプテンブクタータを加えた16種類とした。食中毒菌の検出プライマーは既に論文^{1,2}に記載され、特異性と感度が確認されたものを、クドアについては参考通知³掲載のものを使用し、遺伝子を2種類ずつ組合せ、計8系列のPCR反応系を作成した(表2)。組合せは複数遺伝子の同時検出によるPCR反応の競合を避けるよう考慮し、また各プライマーの融解温度(melting temperature: Tm)の差を2℃以上確保するよう留意して行った。

予備試験には過去に当所へ搬入され菌種及び病原遺伝子の保有が判明している菌株、また他の機関から分与され各病原遺伝子の保有が判明している菌株を使用した。クドアについては当所において参考通知³法によるqPCR実施時に使用する陽性コントロールを用いた。福島らの報告^{1,2}を元に、DNA抽出にはQIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を、qPCR反応試薬にはSYBR Premix DimerEraser™ (TaKaRa) を用い、7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いてSYBR Green法によるqPCR反応後、融解曲線分析でTm値を求め、結果判定を行った。PCR反応及び融解曲線分析の条件を表3に示す。

【結果と考察】

解析を行った16 遺伝子のうちETECのst遺伝子を除く15遺伝子については指数関数的増幅を認め、その後の融解曲線分析において、各遺伝子に特異的なTm値の再現性を確認した。また各反応系2種類のTm値は

表1 北九州市内の食中毒発生状況(2006-2022年7月)

カンピロバクター	36
ウェルシュ菌	6
クドア・セプテンブクタータ	6
腸管出血性大腸菌O157	6
黄色ブドウ球菌	5
サルモネラ属菌	4
腸炎ビブリオ	2
大腸菌	1
ノロウイルス	20
その他	34
計	120

表2 各反応系と標的遺伝子の組合せ

反応系	菌種	標的遺伝子
A	カンピロバクター・コリ	<i>ceuE</i>
	EHEC(Stx1)	<i>Stx1</i>
B	エンテロキシン産生ウェルシュ菌	<i>cpe</i>
	下痢毒産生セラクス菌	<i>nheB</i>
C	カンピロバクター・ジエジユニ	specific DNA
	赤痢菌/EIEC	<i>virA</i>
D	クドア・セプテンブクタータ	specific DNA
	ETEC(LT)	<i>lt</i>
E	EHEC/EPEC	<i>eaeA</i>
	サルモネラ属菌	<i>invA</i>
F	EHEC(Stx2)	<i>Stx2</i>
	嘔吐毒産生セラクス菌	<i>ces</i>
G	黄色ブドウ球菌	<i>femB</i>
	ETEC(ST)	<i>st</i>
H	その他の下痢原性大腸菌	<i>astA</i>
	TDH産生腸炎ビブリオ	<i>tdh</i>

EHEC；腸管出血性大腸菌 ETEC；腸管毒素原性大腸菌
EPEC；腸管病原性大腸菌 EIEC；腸管組織侵入性大腸菌

表3 qPCR反応条件

	初期変性	PCR反応(30サイクル)				融解曲線分析		
温度	95℃	95℃	55℃	72℃	95℃	60℃	95℃	
時間	30秒	5秒	34秒	34秒	15秒	1分	15秒	

それぞれ明瞭に判別できることを確認した。

3. 食中毒事例患者便を用いた一斉検査法と培養法の比較試験

【材料と方法】

令和4年度に市内で発生した3件の食中毒事例の患者便8検体及び食品残品(ヒラメ)1検体について、本法と培養法との比較試験を行った。DNA抽出は食品

表4 食中毒事例における培養法と一斉検査法の比較

* クドアについては参考通知によるTaqManプローブ qPCR法との比較

試験 No.	検体数	培養法*			一斉検査法		
		検出菌種等	検出数	所要時間	検出遺伝子	検出数	所要時間
1	2 (便2)	<i>Campylobacter jejuni</i>	2	4.5日	<i>C. jejuni</i> 遺伝子	2	4時間半
2	2 (便2)	未検出	-	4.5日	<i>C. jejuni</i> 遺伝子	1	4時間半
3	5 (便4、食品1)	<i>Klebsiella septempunctata</i>	4	5時間	<i>K.septempunctata</i> 遺伝子	2	5時間

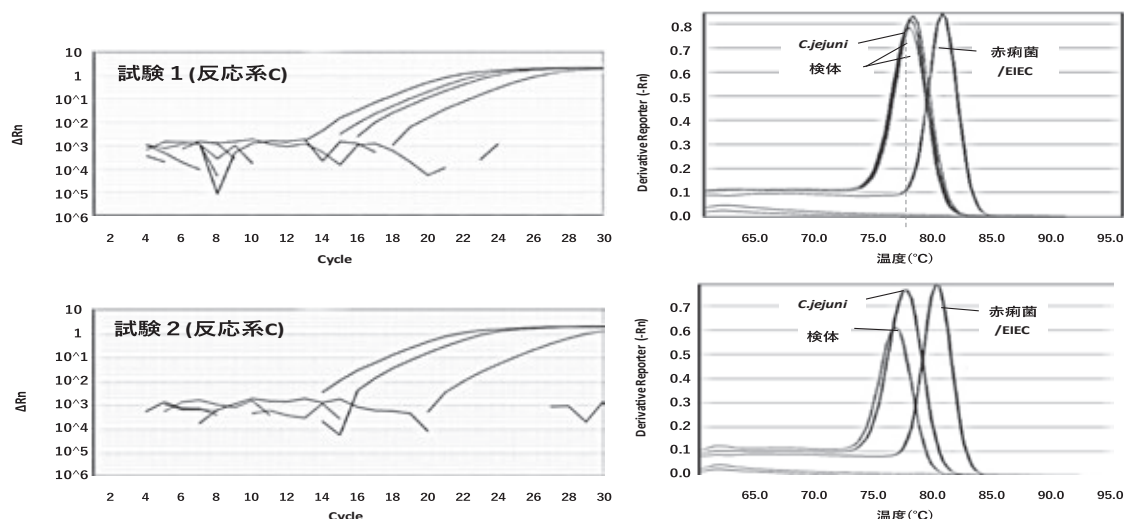


図1 試験1及び2の増幅曲線(左)と融解曲線(右)

を含め全てQIAamp Fast DNA Stool Mini Kitを用いて行い、陽性コントロールには予備試験でTm値により増幅遺伝子の特異性を確認したものを用いた。

【結果と考察】

培養法（クドアについては参考通知によるqPCR法）との結果比較を表4に、各増幅曲線と融解曲線を図1に示す。培養法で*Campylobacter jejuni*が検出された試験1では、一斉検査法で*C.jejuni*遺伝子検出用プライマーを含む反応系Cにおいて患者便2検体に指数関数的増幅が認められ、融解曲線分析でこの増幅が*C.jejuni*遺伝子であることを確認した。また試験2では同じく反応系Cにおいて培養法では検出されなかった1検体について*C.jejuni*遺伝子が検出されたが、これは死滅した*C.jejuni*の遺伝子を検出したものと推察された。

参考通知法で5検体中4検体から*K.septempunctata*遺伝子を検出した試験3では、一斉検査法による遺伝子検出は2検体のみであった(表4)。この原因として、本法は参考通知法よりPCRサイクルが少なく遺伝子の増幅が不足していたこと、採取された便量が非常に少なく、再検査に必要な便量を確保できなかったこと、当該検体はいずれも採取から3日が経過しており、便中の残存クドア量が少なかったこと等が考えられた。

4. まとめ

qPCR法による食中毒菌一斉検査法は、近年多くの地方衛生研究所等で検討され、実際の試験検査に導入

されてきている。本法は病原性の本体である病原遺伝子を便から直接検出するため、長期間の培養を要する菌や毒素産生性の確認が必要な菌についても迅速に検出する点で有用性が高い。今回、実際のカンピロバクター食中毒事例の便検体で一斉スクリーニングを試みたところ、培養法では確定までに5日を要するところ、4時間半で原因菌を推定し、培養法と同等の結果を得ることができた。また一斉検査の検討例が少ないクドアについても細菌と同時にスクリーニングが可能であることが示唆された。

本法は便検体搬入から数時間で食中毒原因菌を推定し、早期の保健所への情報提供・衛生指導を可能にし、検査対象菌の絞り込みによる試験の迅速化・効率化が大いに期待できる手法である。今後さらに保健所と協力し十分な検体量の確保やPCR条件等の検討を重ね、本市の保健衛生に寄与して行きたい。

【謝 辞】

貴重なご助言と資料を賜りました静岡県環境衛生科学研究所長岡宏美先生に心より御礼申し上げます。

【参考文献】

1. 福島博 島根県保環研究所報第50号(2008) 41-51
2. 飯田奈津子ら 静岡県環境衛生科学研究所報告, No.53 (2010), 19-24
3. 平成26年5月26日付厚労省医薬食品局食品安全部 監視安全課食中毒被害情報管理室事務連絡



3 すべての人に
健康と福祉を



6 安全な水とトイレ
を世界中に



13 気候変動に
具体的な対策を



14 海の豊かさを
守ろう



15 陸の豊かさも
守ろう



北九州市保健環境研究所報

第 50 号 (令和4年度)

〒804-0082

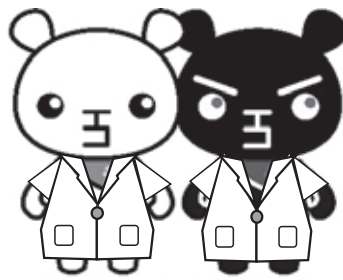
北九州市戸畑区新池一丁目2番1号

北九州市保健環境研究所

電話 (093) 882-0333 FAX (093) 871-2535

e-Mail ho-kenkyuu@city.kitakyushu.lg.jp

2311100A



©ていたん&ブラックていたん,北九州市