

千葉県内流通浅漬けの *Listeria monocytogenes* を中心とした汚染状況調査

ー平成 27 年度の収去および買い上げ検体微生物検査成績ー

藤掛恒, 安藤珠美, 相川建彦, 安部文子

要旨

平成 27 年 6 月から平成 28 年 2 月の間に千葉県内で流通している浅漬け 44 検体について *Listeria monocytogenes*、*Escherichia coli*、腸炎ビブリオ及び腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 について検査を実施した。その結果 3 検体で *L.monocytogenes* が検出され、内 1 検体は高病原性の血清型 4b であった。また、1 検体で *E.coli* が検出された。

キーワード：浅漬け、*Listeria monocytogenes*、調理済み食品、千葉県

keywords : lightly pickled vegetables、*Listeria monocytogenes*、Ready-to-eat meals、Chiba Prefecture

(平成 28 年 6 月 7 日受付 平成 28 年 7 月 25 日受理)

はじめに

Listeria monocytogenes は広範囲の家畜や家禽、野生動物等、土壌・河川など環境中に広く分布しており、様々な食品が汚染されることが考えられる^{1) 2)}。*L.monocytogenes* が引き起こすリステリア症は髄膜炎、敗血症、脳炎などの重篤な症状を引き起こし、死に至ることもある。妊婦、高齢者及び基礎疾患を持つ集団はリステリア症にかかりやすく、重症化すると致死率が高い。特に妊婦では流産・早産・死産及び垂直感染により胎児に重篤なリステリア症を起こすことがある³⁾。

L.monocytogenes の発育温度域は広く、低温でも増殖する。また、10%程度の高い塩分濃度でも増殖が可能である⁴⁾。

わが国の食中毒統計では *L.monocytogenes* による食中毒の報告はないが、諸外国ではチーズなどの乳・乳製品やミートパテなどの食肉加工品、コールスローなどのサラダのような、冷蔵保存されており喫食前に加熱を要しない調理済み食品 (Ready-to-eat 食品) による事例が報告され⁵⁾米国ではメロンによる *L.monocytogenes* の食中毒事例で死亡例もある⁴⁾。

わが国で *L.monocytogenes* の規格基準が定められているのは、平成 27 年度時点で非加熱食肉製品とナチュラルチーズのみであるが、他の Ready-to-eat 食品でも汚染が十分考えられる。その中でも浅漬けは生鮮野菜等を食塩等で短時日漬け込んだもので、1.7~3.2%の塩分を含み⁶⁾、低温で流通・保存されることから *L.monocytogenes* が増殖可能な環境であると推測される。

大阪府における浅漬けからの *L.monocytogenes* 検出報告⁷⁾を受けて本県でも調査が必要であると考え、県内で生産・流通している浅漬けの汚染状況の調査を行った。

実験方法

1. 試料

平成 27 年度千葉県「公設卸売市場等に対する収去検査計画」により県内の各健康福祉センターが平成 27 年 6 月から平成 28 年 2 月の間に収去した浅漬け 19 検体及び当研究所で買い上げた県内流通の浅漬け 25 検体の計 44 検体を試料とした。

2. 検査項目

L.monocytogenes、漬物の衛生規範⁸⁾に示されている *Escherichia coli* 及び腸炎ビブリオ、国内で浅漬けによる食中毒事件が発生したことから腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 についても検査を実施した。

3. 検査法

1) *L.monocytogenes*

本調査では非加熱食肉製品及びナチュラルチーズの成分規格に定められている試験法⁹⁾に準拠して検査を実施した。実施した検査法の概要を下に示した。

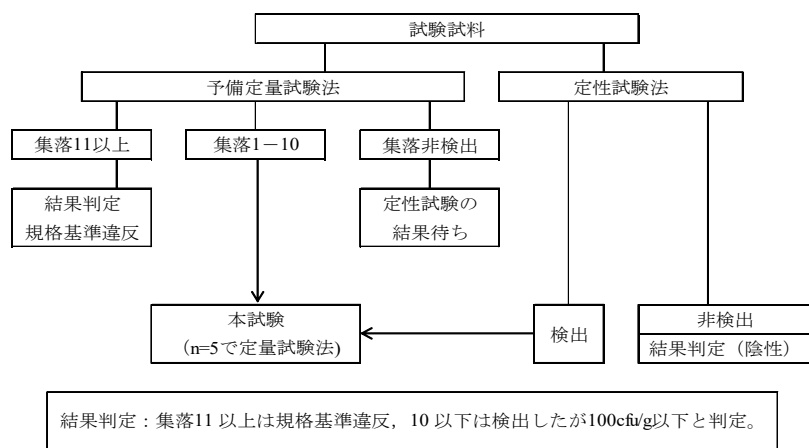
L.monocytogenes の基準適合性は、対象となる食品検体 1 g 当たり *L.monocytogenes* が 100 CFU/g を超えないことを定量試験により n=5 で評価する。予備試験を行う場合は、検体 25 g を対象とした予備定量試験と定性試験の併用により評価し、必要場合は本試験として定量試験を行い、その結果から当該食品の基準適合性を判断する (図)。

①予備定量試験法

試験試料 25 g にハーフプレーザー液体培地 225 ml を加え調製試料とした。調製試料から 2 ml を分取し、20±2 °C で 1 時間±5 分の蘇生培養を行った。蘇生培養後、その 1 ml を 3 枚のクロモアガーリステリア寒天培地に分けて塗抹し、37 °C で 24±3 時間培養した。クロモアガーリステリア寒天培地で培養後、集落形成が認められないまたは発育・ハロー形成が弱い場合は追加で 24±3 時間培養した。調製試料 1 ml 当たりの *L.monocytogenes* 定型集落数から、検体中の菌数を算出した。

②定性試験法

試験試料 25 g にハーフプレーザー液体培地 225 ml を加え調製試料とし、30 °C で 24±3 時間培養した。培養後、クロモアガーリステリア寒天培地、PALCAM 寒天培地にそれぞれ一白金耳量を画線塗抹した。クロモアガーリステリア寒天培地は 37±1 °C で 24±3 時間、PALCAM 寒天培地は 37 °C で 48 時間培養した。同時に培養後の調製試料 0.1 ml をプレーザー液体培地に接種し、37 °C で 48±3 時間培養した。培養後のプレーザー液体培地について、クロモアガーリステリア寒天培地、PALCAM 寒天培地にそれぞれ一白金耳量を画線塗抹し同様に培養した。

図 予備試験を行う場合の *L.monocytogenes* 検査のフロー図

各寒天培地上の定型集落を釣菌し、TSYEA 平板上に画線塗抹後、37℃で18～24時間培養し、各種確認試験として、グラム染色、カタラーゼ反応試験、運動性試験、CAMP試験、炭水化物分解能試験、血清型別試験を行った。

③本試験（定量試験法）

予備定量試験においてクロモアガーリステリア寒天培地上に *L.monocytogenes* の定型集落が認められた場合、または定性試験により *L.monocytogenes* が検出された場合は、本試験を5回実施した。

試験試料10gにBPW90mlを加え、20±2℃で1時間±5分蘇生培養した。試料から1mlを取り、3枚のクロモアガーリステリア寒天培地に塗抹し、37℃で24±3時間培養した。培養後、クロモアガーリステリア寒天培地上の定型集落の合計数を計測した。定型集落をTSYEA平板上に画線塗抹し、37℃で18～24時間培養し、定性試験と同様に各種確認試験を行った。

調製試料1ml当たりの *L.monocytogenes* 集落数から、検体中の菌数を算出し、5回の定量試験のうち最も菌数の高い値を検査結果とした。

2) *E.coli*

試験試料25gにリン酸緩衝液225mlを加え、その10mlを採取しリン酸緩衝液90mlで希釈し、これを試料原液とした。

試料原液1mlずつをECはっ酵管3本に接種し、44.5±0.2℃で24±2時間培養後、ガス発生を認めた試料を推定試験陽性とした。ガス発生を認めなければ推定試験陰性とした。

推定試験陽性の場合、当該ECはっ酵管より、1白菌耳量をEMB寒天培地に画線塗抹し、35±1℃で24±2時間培養した。

EMB寒天培地上に発育した金属光沢～暗紫赤色の定型集落を、また定型集落が無い場合は、定型集落に類似した集落を釣菌した。そして、釣菌した集落を、乳糖ブイオンはっ酵管及び普通寒天斜面培地にそれぞれ接種した。乳糖ブイオンはっ酵管は35±1℃で48±3時間、普通寒天斜面培地は35±1℃で24±2時間培養した。

乳糖ブイオンはっ酵管でガスの産生を認め、相対する普通寒天斜面培地上の菌がグラム陰性無芽胞桿菌であれば *E.coli*

陽性と判定した¹⁰⁾。

3) 腸炎ビブリオ

試験試料25gにアルカリペプトン水225mlを加え、調製試料とした。

調製試料を35～37℃で16～20時間培養後、上層部からTCBS寒天培地、クロモアガービブリオ寒天培地もしくはX-VP寒天培地にそれぞれ1白菌耳量を画線塗抹し、35～37℃、18～24時間培養した。

各寒天培地上の腸炎ビブリオの定型集落を釣菌し、TSI培地、LIM培地、VP培地、普通寒天斜面培地及び0、3、6、8、10%の耐塩試験用トリプトン水に接種し、35～37℃で18～24時間培養後、腸炎ビブリオの生化学的性状を示した場合、腸炎ビブリオ陽性と判定した¹⁰⁾。

4) 腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157

試験試料25gにmEC培地225mlを加え調製試料とした。

調製試料を42±1℃で22±2時間培養し増菌培養液とした。

増菌培養液についてベロ毒素(VT)遺伝子検出法を実施した。VT遺伝子検査陰性の場合、腸管出血性大腸菌陰性と判定した。

VT遺伝子検査陽性の場合、免疫磁気ビーズ法及び直接塗抹法による分離培養を行った。

免疫磁気ビーズ法では、増菌培養液から免疫磁気ビーズ濃縮液を調製し、その濃縮液をCT-SMAC寒天培地及びCT-クロモアガーSTEC培地にそれぞれ画線塗抹した。

直接塗抹法では、増菌培養液をCT-SMAC寒天培地及びCT-クロモアガーSTEC培地にそれぞれ画線塗抹した。

直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法で塗抹した培地を36±1℃で18～24時間培養した。平板上に腸管出血性大腸菌の定型集落が認められた場合は、TSI培地、LIM培地及び普通寒天斜面培地に接種し、36±1℃で18～24時間培養した。腸管出血性大腸菌の生化学的性状を示したものは、病原大腸菌免疫血清によるスライド凝集試験を行った。いずれかに凝集を認めた場合は、VT遺伝子検出法を実施した。VT遺伝子検査陽性の場合には病原大腸菌免疫血清試験で凝集を認めた血清型を陽性と判定した¹¹⁾。

表-1 収去検体および買い上げ検体における検査結果

	検体数	検出検体数（検出率）					
		<i>Listeria</i>	<i>Escherichia</i>	腸炎	腸管出血性大腸菌		
		<i>monocytogenes</i>	<i>coli</i>	ビブリオ	O26	O111	O157
収去検体	19	1 (5.3%)	0	0	0	0	0
買い上げ検体	25	2 (8.0%)	1 (4.0%)	0	0	0	0
合計	44	3 (6.8%)	1 (2.3%)	0	0	0	0

表-2 野菜種別の検査結果

	検体数	検出検体数（検出率）					
		<i>L.monocytogenes</i>	<i>E.coli</i>	腸炎 ビブリオ	腸管出血性大腸菌		
					O26	O111	O157
白菜	12	1 (8.3%)	0	0	0	0	0
なす	7	0	0	0	0	0	0
きゅうり	6	0	0	0	0	0	0
うり	5	0	1 (20.0%)	0	0	0	0
キャベツ	3	2 (66.7%)	0	0	0	0	0
かぶ	2	0	0	0	0	0	0
その他 (ミックス含む)	9	0	0	0	0	0	0
合計	44	3 (6.8%)	1 (2.3%)	0	0	0	0

表-3 *L.monocytogenes*、*E.coli* が検出された 4 検体の検査結果

検体名		<i>L.monocytogenes</i>			<i>E.coli</i>
		血清型	菌数 (CFU/g)		
収去検体	キャベツ塩漬け	陽性	1/2a	10	陰性
買い上げ 検体	白菜こうじ漬け	陽性	1/2b	10	陰性
	キャベツ塩漬け	陽性	4b	40	陰性
	うり漬け	陰性	—	—	陽性

結果

検査結果は、収去検体と買い上げ検体とは温度管理に差があるため、分けて表-1 に示した。また、野菜種別の検査結果について表-2 に示した。

1) *L.monocytogenes*

全 44 検体中 3 検体から *L.monocytogenes* が検出された（検出率 6.8%）。19 検体の収去検体の内、1 検体、25 検体の買い上げ検体の内、2 検体であった。

L.monocytogenes が検出された検体の内訳はキャベツ塩漬け 2 検体（血清型 1/2a および 4b）、白菜こうじ漬け 1 検体（血清型 1/2b）であった。3 検体すべて菌量は 100 CFU/g 以下であった（表-3）。

2) *E.coli*

全 44 検体中うり漬け 1 検体から *E.coli* が検出された（検出率 2.3%）（表-3）。

3) 腸炎ビブリオ

全 44 検体において腸炎ビブリオが非検出であった。

4) 腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157

全 44 検体において腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 が非検出であった。

考察

千葉県内に流通している浅漬けについて汚染調査を行った結果、*L.monocytogenes* が 3 検体で検出されたが、いずれも 100CFU/g 以下と少量であった。ただし、検出された *L.monocytogenes* の血清型は 1/2a、1/2b、4b であった。

L.monocytogenes は現在 1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d、4e 及び 7 の血清型が知られており、食品からの分離株は主に 1/2a、1/2b 及び 1/2c である一方、リステリア症患者から分離される臨床由来株のほぼ 6 割を血清型 4b が占めており、次いで多い 1/2b、1/2a を含めると 9 割以上となる⁴⁾。

平成 27 年度までにわが国では *L.monocytogenes* による食中毒の報告はないため、Ready-to-eat 食品を汚染している

L.monocytogenes は病原性の低い血清型ばかりであると推測していたが、今回の調査で検出された 4b は病原性が高い血清型で、1/2b、1/2a も臨床由来から頻繁に分離される血清型である。

健常者は 10⁶CFU/g 以上に汚染された食品を喫食しないかぎりリステリア症のリスクは低いが、高齢者や免疫機能が低下している感受性の高い集団は健常者に比べてリスクが 200 倍高いとされており、少量の菌でも発症することがある。そのためリステリア症全患者数の 7 割を 65 歳以上の高齢者が占めている⁹⁾。

以上のことから、本研究の結果は、わが国でも、高齢者や妊婦等が *L.monocytogenes* に汚染された浅漬けなどの Ready-to-eat 食品を喫食することで、リステリア症を引き起こす恐れがあることを示したものと考える。

リステリア症の感染リスクを低減するためには、洗浄・消毒による混入対策を徹底すると共に、製造・輸送を低温で行うなど衛生管理に努める必要がある。

浅漬けは加熱や発酵の工程がなく、製造工程で完全な殺菌ができないことから、原材料の洗浄・消毒は非常に重要な工程と言える。今回の調査で *L.monocytogenes* が検出された野菜はキャベツ、白菜の葉物野菜 2 種類であった。収去検体のキャベツは 1 玉を半割された製品、買い上げ検体のキャベツと白菜はざく切りにされた製品であった。葉物野菜は、葉と葉の間に洗いが発生しやすいため、洗浄液に浸しただけでは洗浄や消毒が不十分の可能性があり、未洗浄箇所が残らないように入念な洗浄が必要である。

また、製造工程での混入を防ぐとともに、製品中での増殖を抑制する必要がある。製造加工中に食品を汚染し増殖する可能性があることから、製造者は、加工中に製造機器や従事者を介した二次汚染がないように十分配慮しなければならない。さらに、*L.monocytogenes* の増殖抑制には製造・輸送時は 4℃以下の温度管理が有効である⁹⁾。

リステリア症に罹患する原因として、長時間の冷蔵保存により *L.monocytogenes* が著しく増殖した Ready-to-eat 食品の喫食が挙げられている⁹⁾。このことから消費者も食品に表示されている保存温度や消費期限を守り、開封済み食品は早めに消費するなど適切な対応が求められる。

製造者、消費者それぞれが *L.monocytogenes* を意識した衛生管理を行うことで、Ready-to-eat 食品の *L.monocytogenes* 汚染率およびリステリア症のリスクをさらに低くすることが可能であろう。

今回の調査では *E.coli* が 1 検体から検出された。漬物の衛生規範において *E.coli* は陰性であることが定められているため、当該検体について衛生規範に違反していることから、販売店舗の管轄保健所に情報提供を行った。*E.coli* が検出された買い上げ検体はクーラーバッグや温度管理用機器等を用いずに搬入されており、厳密な温度管理がなされていなかったが、包装に破損や漏れが認められなかったことから、また購入後ただちに検査を実施したことから検査結果への影響は少ないと考えられた。

浅漬けは原材料野菜の旬の時期により、季節ごとに使用される野菜が異なり、季節ごとに違った野菜を漬け込む。今回の調査ではキャベツと白菜から *L.monocytogenes* が検出されたが、他種類の野菜からの検出があるか検討していきたい。

L.monocytogenes は冷蔵環境や 10 %程度の高い塩分濃度中で増殖可能なことから、浅漬けだけでなく様々な食品中で汚染が考えられる。塩、アルコール、酸または加熱殺菌により保存性を高めた古漬け製品でも保存料使用量の減少や減塩志向によって、従来の製品より保存性が低下し、*L.monocytogenes* が増殖しやすい環境となっている可能性がある。古漬け製品での検査も検討したい。

野菜を原材料とした Ready-to-eat 食品以外にも、食肉加工品や乳製品などで病原性の高い血清型の *L.monocytogenes* に汚染されている可能性がある。これらの汚染状況の調査を実施する必要もあるだろう。

引用文献

- 1) Yoshimasa SASAKI, Mika HARUNA, Mariko MURAKAMI, Mizuho HAYASHIDA, Nao TAKAHASHI : Contamination of poultry products with *Listeria monocytogenes* at poultry processing plants, Journal of Veterinary Medical Science, 76, 129-132, (2014)
- 2) 勝部 泰次, 丸山 総一 : リステリア症と食品衛生, 食品衛生学雑誌, 30, 479-490, (1989)
- 3) 中村寛海, 西川禎一 : 水産品のリステリア汚染, 食品衛生, 50, 175-184, (2006)
- 4) 中村寛海 : 食品媒介リステリア症と食品製造施設のリステリア汚染—リステリアの施設定着株を取り巻く話題—, 日本食品微生物学会雑誌, 32, 1-11, (2015)
- 5) 仲川 玲 : リステリア・モノサイトゲネスの規格基準について, 食品衛生研究, 65-2, 21-28, (2015)
- 6) 福地由里子, 小菅充子 : 漬け物中の食塩濃度, 和洋女子大学紀要, 家政系編, 41, 85-95, (2001)
- 7) 田口 真澄, 神吉 政史, 中村 寛海, 朝倉 宏 : 浅漬けからの *Listeria. monocytogenes* 検出, 日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, 108, 121(2014)
- 8) 漬物の衛生規範, 環食第 214 号別紙, 昭和 56 年 9 月 24 日 (最終改正 : 食安監発 1213 第 2 号, 平成 25 年 12 月 13 日)
- 9) リステリア・モノサイトゲネスの検査について, 食安発 1128 第 2 号, 平成 26 年 11 月 28 日
- 10) 食品, 添加物等の規格基準, 厚生省告示第 370 号, 昭和 34 年 12 月 28 日
- 11) 腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について, 食安監発 1120 第 1 号, 平成 26 年 11 月 20 日
- 12) 上崎菜穂子, 鮫島隆, 大森康雄, 府中英孝, 三明清隆 : 生ハムにおける水分活性と乳酸ナトリウムによる *Listeria monocytogenes* の制御, 日本食品科学工学会誌, 60-7, 347-356, (2013)