

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580353

研究課題名(和文) 汚染実態調査に基づく発展途上で導入可能な生食野菜の生産工程管理手法の開発

研究課題名(英文) Development of the applicable method to increase bacterial food hygienic condition of raw vegetables based on the severance of crop producing environment in developing countries

研究代表者

稲津 康弘 (Inatsu, Yasuhiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品安全研究領域・上席研究員

研究者番号：70353927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：生野菜(加工品)を原因とする食中毒事件が世界各地で発生しており、その対策が求められている。殺菌によって商品の菌数を下げることに限界があるので、野菜の生産段階から食中毒菌を付けないようにする必要がある。この考え方が正しいことを、発展途上国の農業環境を調査することで証明した。すなわち、畑の近くに牧場がある、あるいは農業用水のため池で食用の鳥を飼っているような所では、農業用水からも糞便由来の大腸菌が検出される。しかも野菜に付いた大腸菌は、市場に届くまでほとんど死なないことも判明した。それ故、家畜の飼育方法を含めた、栽培環境の衛生管理が必要であるといえる。

研究成果の概要(英文)：Reducing the outbreaks caused by the consumption of raw vegetables is one of the important issues especially in developing countries. We have conducted the corroborative severance study of irrigation water used for crop production in Vietnam, Laos, Cambodia and Bangladesh. About half of 300 checked samples were contaminated with E.coli. Direct entrance of animal into the field or running of the fecal contaminated water into crop field from beside animal farm may cause this results because no contamination was found from the water from deep well. Introduction of good agricultural practices (GAP) into farm will be required to protect the crops from fecal contamination.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：適正農業規範 食中毒

1. 研究開始当初の背景

1996年の堺市集団腸管出血性大腸菌 O157:H7 (大腸菌 O157) 食中毒事件以来、わが国においても「生野菜」が食中毒の原因食材となりうるということが認知されてきた。海外とりわけ米国ではレタスやホウレンソウ等、葉物野菜を原因食材とする大規模食中毒事件が毎年のように発生している。FAO / WHO 合同 Codex 委員会は 1998 年に「生鮮果実及び野菜の微生物による食品安全危害を低減するガイドライン」を作成し、2003 年 7 月に同食品衛生部会 (CCFH) は、「生鮮果実・野菜衛生管理規範」を策定した。しかしながらその後も野菜を原因食材とする食中毒事例の発生が続いたことから、CCFH は上記ガイドラインの改訂作業を行っており、2008 年 5 月に専門家を集めた会議を行った。考えられる限り正確かつ最新の科学的知見を反映させたこの会議のレポート (“ Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting report ”) では、収穫後の衛生管理にも増して、収穫前の生産環境の衛生管理の重要性が強調されている。本課題担当者が 2007 年に農林水産省の委託で現地調査を行った米国の大規模食中毒事件に関しても、野生動物による用水等の汚染が食中毒菌汚染の原因であることを強く示唆する研究報告がなされている (Cooley et al. PLoS One. 2007, 2. e1159)。上記レポートにもあるように、非完熟堆肥の使用あるいは圃場への動物の進入等、潜在的な汚染経路を指摘することは可能であるものの、そのいずれが実際の現場で生産物の汚染に強く寄与しているのかは、ほとんど未解明であった。

発展途上国、特に近年、発達の著しいメコン川流域諸地域 (Great Mekong Sub-region: GMS) 諸国においても、生食野菜を原因とする食中毒は重大な公衆衛生上の問題であり、各国政府も ASEAN GAP あるいは独自の GAP プログラムの導入を進めている (たとえば、稲津ほか、食総研報、2008. 72. 93-106)。2004 年から 2009 年まで世界銀行と世界野菜センターは GMS 諸国を対象としたプロジェクト研究を実施し、現地の農民に適用可能な教育プログラムを作成した。これは作物の生産性と品質の向上を主たる目的とするものであるが、食品安全管理の観点から見た場合、これは上記 2003 年の WHO / FAO 衛生管理規範と基本的な所では一致している。2009-10 年に課題提案者がラオスおよびカンボジアの農村において現地調査を行った所では「GAP 導入教育は現在進行中であるが、それが実際に運用された場合の一般衛生管理上の効果を定量的に把握する手段はほとんど講じられていない」とのことである。バングラデシュでは農務省農業開発局 (DAE) が一般的な指導マニュアルを作成して現場指導を推進しているが、現状は GMS 諸国と大差がない。特に発展途上国においてはでき

るだけ安く簡便な方法を使用して生産物の安全性を高めることが望まれており、そのためには正確な現状の把握と、実証的なデータに基づく介入措置を導入することが必要である。これはマニュアルへの信頼を強めることで、農業従事者の GAP 取組みへの動機付けを強めるためにも重要な点である。

2. 研究の目的

生野菜を原因とする食中毒を防止するために、適切な農業生産工程管理 (GAP) の導入が、どの程度有効であるのかという点について、検証する必要がある。そこで本研究では複数の地域・季節および年度において農業用水等をサンプリングし、それらへの食中毒菌や糞便汚染指標細菌の混入の有無について検査を行うことで、発展途上国における農業現場の汚染実態を把握し、圃場の衛生管理状況との関連を明らかとすることを目的とした (図 1)。

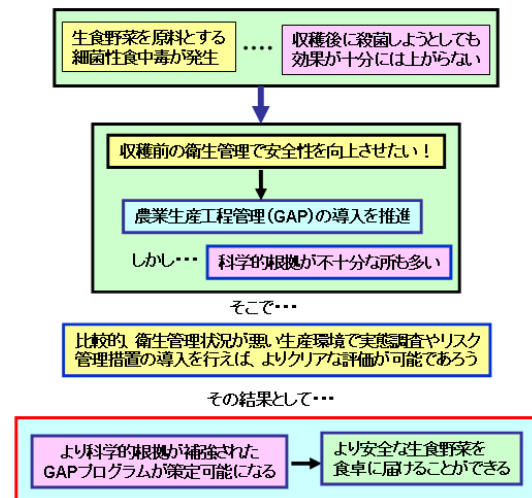


図 1 実験の目的

3. 研究の方法

ラオス農林省清浄農業開発センター (CADC)、カンボジア王立農業大学 (RUA)、ベトナムドンナイ工科大学およびバングラデシュ国立ダッカ大学の研究協力のもと、主として現地において検体収集および分析を行った。課題提案者は日本国内においてサンプリングプランの策定および分析方法の検討・改善を行うとともに、検体収集および分析のために少なくとも年に 1 度以上、現地の研究所に滞在し、研究協力者と共同で実験を実施した。協力機関の研究者が現地政府の農業普及関係者と連携して、現地の生食野菜生産農場を選定した上で、複数の季節および年度にわたり、生産に使用する用水等を収集および分析した。検体中の糞便汚染指標細菌およびサルモネラの分離および同定は、「食品衛生検査指針」に準拠して行った。その他の細菌は顕微鏡像および生化学性状試験に基づいて同定を行った。また一部の細菌につい

では、ペーパーディスク法により、抗生物質耐性スペクトルの測定を行った。得られたデータの信頼性を確保するために、分析担当者を国内に招聘して分析手法等の指導を図る機会を設けるとともに、微生物分析技術の内部評価試験を実施することによって、実験データの信頼性の確保を図った。

4. 研究成果

1年目にカンボジア RUA において、実験施設の整備を行うとともに、現地共同実験を行うことを通じて、細菌検査担当者の技術指導を行った。その際に、収集された検体の保存状況が分析結果に影響を与える可能性が示唆されたことから、夏季に国内において、土壌および用水検体を対象として、確認試験を行った。異なった RAPD-PCR パターンを示す大腸菌 18 株（食品由来）を混合した上で、複数の土壌またはこれを 5%含む地下水に接種し、屋外で放置したものの生菌数の変化を、培養法にて測定した。土壌を含む水中の大腸菌数は 4 週間で 4.1~1.8 log CFU/g ほど低下した。同じ土壌に接種した大腸菌の生菌数低下は 2.1~1.3 log CFU/g であった。初発の大腸菌濃度が 3~5 log CFU/g の範囲では、4 週間後の土壌中の大腸菌濃度の減少幅と初発濃度との間に明確な関係はみられず、4 週間の貯蔵で 0.5~2.9 log CFU/g の生菌数の低下がみられた（図 2）。この結果は、土壌および土壌混入用水を夏の外気温下で 1 週間以上放置すると、土壌の種類によっては無視できないレベルの生菌数の減少が生じる可能性があることを示唆する。よって以降のサンプリング調査において、収集された検体は可能な限り速やかに分析に供した。なお、土壌の PCR-DGGE 解析の結果と、接種した大腸菌の生菌数低下の間に明確な関係は見いだされなかった。

表 1 検体の pH および水分活性

	1 回目		2 回目	
	pH	water (%)	pH	water (%)
A	6.2	18	8.5	29
B	6.6	28	8.0	31
C	6.6	20	7.9	14
D	6.3	35	6.7	40

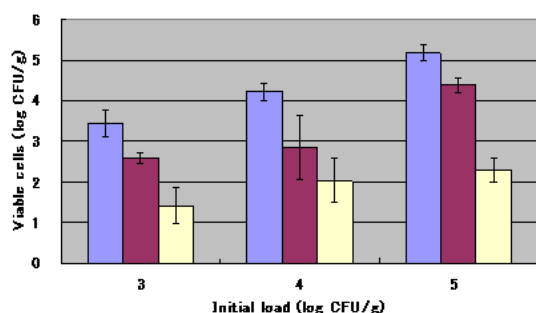


図 2 土壌(A)中の大腸菌数の変化

2年目はカンボジア RUA と連携して、生産環境中の衛生指標細菌等の調査を実施した。1圃場または市場あたり5検体を採取し、MPN5 本法にて大腸菌とサルモネラの菌数を測定した。プノンベン近郊農家の5圃場の土壌からはいずれも 3~4 log MPN/g レベルの大腸菌（ペロ毒素非生産性）およびサルモネラ推定菌が検出され、その原因として未完熟堆肥の使用や用水の汚染等、一般衛生管理の不徹底が疑われた（表 2）。流通過程を辿って生菌数を調査したところ、出荷された白菜に付着したこれらの菌は流通過程においても死滅することなく、小売り段階まで生存する可能性が示された（圃場 仲買 市場でいずれも 3 log CFU/g 台を維持していた）（図 3）。またバングラデシュダッカ大学において農業指導所関係者に GAP 導入推進に係る技術指導を行うとともに、野菜を含む市販食品の細菌検査を行った。エルシニアなどを含む複数の腸管系食中毒菌に加え、リステリアや黄色ブドウ球菌、あるいは 4~15 種類の抗生物質に耐性を有する大腸菌群が分離された。なお同年はダッカ大学の協力研究者を国内に招聘し、共同研究および講演会を実施した。

表 2 カンボジア圃場土壌中の大腸菌数（上）およびサルモネラ菌数（下）

Parameters	Plots	Results MPN/g
<i>E. coli</i> (Non-pathogenic)	A	4.7×10 ³ MPN/g
	B	13.94×10 ³ MPN/g
	C	9.2×10 ³ MPN/g
<i>Salmonella</i> (Suspected)	A	27.2×10 ³ MPN/g
	B	4.72×10 ³ MPN/g
	C	3.36×10 ³ MPN/g

All the samples were collected from 3 different plots in one farm. By following 3 different plots, 5 replications in each plot and soil sample in each replication was collected for this experiment.

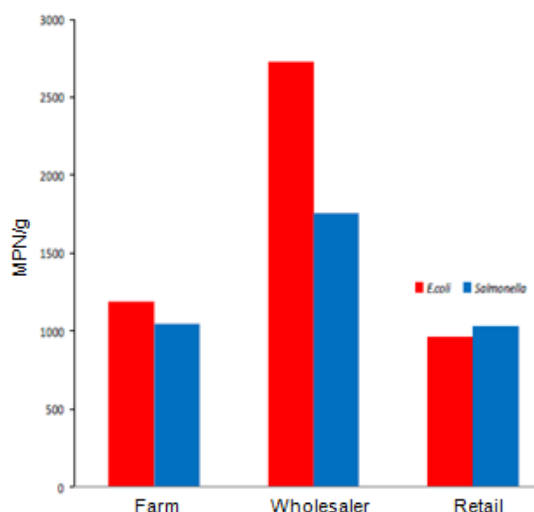


図 3 カンボジアのフードチェーン各段階における大腸菌およびサルモネラ菌数（赤：大腸菌、青：サルモネラ）

3年目はベトナム（ホーチミン市周辺：2回）、ラオス（ビエンチャン市近郊：1回およびルアンナムタ県周辺：2回）およびカンボジア（プノンペン市周辺：2回）において農業用水を収集し、大腸菌群、糞便系大腸菌、大腸菌およびサルモネラの検出を行うとともに、分離株の同定を行った。約330の検体の約半数から糞便系大腸菌が分離され、そのほとんどが大腸菌と同定された。15%の検体からサルモネラ類似のコロニー性状を示す菌が分離されたものの、リジン脱炭酸酵素陰性かつサルモネラ血清と反応せず、最終的に *Citrobacter* 属菌と同定された。腸管系食中毒菌である *Cronobacter sakazakii* が3検体から分離されたほか、*Edwardsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Morganella* 属および *Serratia* 属の大腸菌群が分離された。これらの細菌の多くは動物糞便中に存在するものである。糞便汚染の可能性が低いと考え得る、深い井戸から採取した農業用水から、糞便汚染指標細菌は検出されなかった。これらの国では作物を栽培する圃場に近接する所に牧場が存在し、そこから圃場に糞便汚染を受けた水が流入する、乾期に圃場が牧場として利用されており、動物糞便が圃場土壌に混入する、あるいは食鳥を飼育する池の水が農業用水に利用されている、といった実情があることが、調査の結果、判明した（図4）。なお本年度はカンボジア RUA およびラオス CADC の研究者を国内に招聘して共同研究を実施するとともに、本研究に関する国際セミナーを実施した。



図4 栽培環境の動物糞便汚染の可能性

以上の研究の結果、少なくとも今回、調査の対象とした東南アジア～南アジアの発展途上国の農産物生産環境、特に農業用水が高頻度で糞便汚染を受けている可能性が示唆され、その汚染源は（野生動物によるというよりは）家畜によることが推測された。ただし、3年目の調査結果からサルモネラは検出されておらず、一般に腸管出血性大腸菌の存在頻度はこれよりも低いことから、現地で生産および消費される生野菜が、収穫段階において、微生物学的にただちに危険であるとまでは言うことはできない。とはいえ、適切な家畜の飼育方法の導入や、GAPの導入によって、糞便汚染の可能性を減少させることができれば、食中毒リスクを下げるのが可能であることも事実である。この点に関連して、GAP導入の作物品質に与える影響について研究を進めてきたラオス CADC において、本研究の成果を踏まえ、今後、微生物学的な側面からも仕事を進めるべく、関係機関と調整を行っているところである（AVRDC World Vegetable Center が2014年度から、カンボジア等も含めた GAP 普及事業を行う旨、連絡が入っており、こちらからも協力が求められている）。また2年目の研究結果から、少なくとも白菜に付着した大腸菌は収穫後、現地での流通過程において、ほとんど死滅しないことが示された。生野菜に付着した細菌は、次亜塩素酸等の殺菌剤を用いた洗浄を行ったとしても、たかだか2桁しか生菌数を低下させることができないというのが、本研究担当者を含めた、世界の多くの研究者の実験結果によって示されている。よって、栽培過程で食中毒菌の汚染を防止することが、食中毒防止の観点からは、極めて重要であるといえる。

本研究を通じて、バングラデシュとカンボジアでは（十分とはいええないものの）それなりの実験環境の整備と研究者の育成を行うことができたが、ラオスについては（日本国内の震災の影響等もあって）まだ十分に研究環境が整えきれていないところがある。国際協力の観点からも、今後、より一層の共同研究の推進が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Sharmin Zaman, Yasuhiro Inatsu et al. "Low-cost sustainable technologies for the production of clean drinking water" *Journal of Environmental Protection*. 5. On line (DOI: 10.4236/jep.2014.51006) (2014) (査読あり)
2. Fauzia Ahmed Rupa, Yasuhiro Inatsu et al. "Prevalence of antibiotic resistant bacteria on tomato surface and effectiveness of disinfectants in reducing the microbial load" *Journal*

of Food Science and Engineering. 2. 293-300 (2012) (査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

1. 稲津康弘「アジアにおける食の安全研究の現状」食品科学工学会第61回大会(招待講演)(2014年8月28日 中村学園大学)
2. Yasuhiro Inatsu et al. "A novel international corroborative research project to increase food hygiene condition in developing country" 2nd Southeast Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems (2013年12月4日 ラオス ランサンホテル)
3. Yasuhiro Inatsu et al. "Ongoing studies at NFRI to reduce vegetable-related foodborne diseases" 42th UJNR Food and Agriculture Panel Meeting (2013年12月9日 エポカルつくば)
4. Yasuhiro Inatsu et al. "Basic techniques of isolation / characterization of contaminated bacteria and their application for the surveillance of retailed foods" On-the-job Research Capacity Building for Sustainable Agriculture in Developing Countries. (国連大学招待講演)(2012年12月11日 ダッカ大学)
5. Vinit Set, Yasuhiro Inatsu et al. "Assesment of *E. coli* and *Salmonella* in Chinese cabbage supply chain in Cambodia" 1st Asian Food Security Association Conference on Food Safety and Food Security. (2012年9月14~17日 大阪府立大学)
6. Yasuhiro Inatsu et al. "Fate of *Escherichia coli* contaminated into soil or irrigation water" 1st Asian Food Security Association Conference on Food Safety and Food Security. (2012年9月14~17日 大阪府立大学)
7. 稲津康弘ほか「土壌および用水中に混入した大腸菌の生存性」日本農芸化学会2012年度大会(2012年3月25日 京都女子大学)

〔図書〕(計2件)

1. Latiful Bari and Yasuhiro Inatsu " *E. coli* 0157:H7" in Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology, vol 1. Elsevier Ltd, Academic Press, pp. 735-739. (2014)

2. Yasuhiro Inatsu et al. "Pre-requisite programmes on food safety; Part 3: Farming" (ISO TS 22002-3) International Standard Organization (2011)

〔その他〕

1. 稲津康弘ほか「発展途上国でどうやって安全な食べ物を作るか～国際貢献に興味がある人のために」JSPS ひらめきときめきサイエンス(2014年7月28日 筑波農林交流センター)
2. Yasuhiro Inatsu "Undertakings to ensure hygienic vegetable production in Japan and other countries" at "Multi country Observational Study Mission on Innovative Farm Management Practices to Enhance Agricultural Productivity" (2013年11月18日 Asian Productivity Organization 依頼講演)
3. 稲津康弘「野菜による食中毒と適正農業規範(GAP)に関する最近の動向」『衛生の友』47. p.2 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲津 康弘 (Inatsu Yasuhiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品安全研究領域・上席研究員

研究者番号：70353927