

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282019

研究課題名(和文)生食野菜類の食中毒リスク低減に資する基礎研究

研究課題名(英文)Study on reduction of the risk for foodborne illness by fresh produce

研究代表者

宮本 敬久 (Miyamoto, Takahisa)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70190816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生食用青果物(ミニトマト、レタス、ホウレンソウ)における生産環境(土、水)からの食中毒細菌汚染の機構について検討した。種々の濃度のサルモネラ、腸管出血性大腸菌O157、リステリアで汚染した土壌を用いて栽培した結果、汚染土壌中の食中毒細菌は、収穫時にも初発汚染菌濃度に比例して生残した。これらの汚染土壌で栽培した可食部分は、ミニトマトでは食中毒汚染は認められず、レタスおよびホウレンソウでは、土壌汚染菌量に比例して汚染頻度は増加した。表面に接種した細菌は、無傷の場合数日後には陰性となったが、損傷部分で長期間生残した。ポリリジンと乳清タンパクによる前処理は食中毒細菌の付着力を低減した。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify the mechanism for contamination of vegetables by foodborne pathogens during cultivation. Salmonella Enteritidis, Escherichia coli O157 and Listeria monocytogenes survived until harvest time for 70d depending on the initial inoculum. After cultivation on these contaminated soil, tomato fruits were not contaminated with the pathogens, however, lettuce and spinach were contaminated with the pathogens depending on the level of pathogen contamination of soil. The pathogens inoculated on the surface of these vegetables disappeared in a few days, though they survived much longer on the injured surfaces. Pretreatment of the surface of vegetables with polylysine and milk serum protein decreased the secondary attachment of the pathogens onto the vegetables.

研究分野：食品衛生化学、食品保蔵学、食品微生物学

キーワード：サルモネラ 腸管出血性大腸菌 リステリア 汚染機構 生残性 野菜 二次付着 生産段階

1. 研究開始当初の背景

カット野菜、カット果実類の生産と流通が増加しており、外食産業におけるサラダバーの普及やコンビニエンスストアなどで販売されるパックサラダなども含め、今後も生産量の増加が予想されている。安全な生食用野菜類を流通販売するため、流通管理の徹底や生食用農作物の各種物理的、化学的殺菌法の効率化および新規殺菌法の開発が行われているが、一旦、食中毒細菌に汚染されると、殺菌料で処理しても完全に殺菌することは不可能である。実際には農作物生産現場における食中毒細菌汚染の低減が最も重要である。このための基礎研究として、海外では栽培環境や作業からの食中毒細菌汚染についての研究が行われており、これによって得られた科学的データをもとにして野菜類、ハーブ類など作物毎に食中毒細菌汚染低減のための栽培ガイドラインが作成されてきている。しかし、品種や栽培環境が異なると汚染要因も異なるため、我が国の野菜栽培に直接適用するのは困難である。ところが我が国ではこれらの基礎研究はほとんど行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、3年間の研究期間内に、これまでのトマトについての研究を継承しつつ、トマト、レタスおよびハウレン草について、食中毒細菌としてサルモネラ以外にも、腸管出血性大腸菌およびリステリアを用いて、食中毒細菌汚染が成立する栽培環境(土壌および水)要因を明らかにする。さらに野菜類の可食部に付着した食中毒細菌の生残性を調べる。また、これまでに見出した細菌付着阻害効果のある食品添加物などを用いて、レタスやハウレン草を収穫前に表面処理することにより、環境中や作業由来の食中毒細菌が栽培中や収穫時に一旦付着したとしても通常の洗浄殺菌処理により従来よりも効率的に除菌できる方法を開発する。

3. 研究の方法

(1)栽培方法：品種としては、ミニトマト：マイクロトム、リーフレタス：晩抽レッドファイヤーおよびハウレン草：サラダアカリを用いて、殺菌後の種を約45gのオートクレープ処理した市販培養土を入れたポット(直径7.5cm)に播き、毎日20-30mLの滅菌水道水を灌水して、明期16h、暗期8hのフォトチャンパー内で栽培した(1個体/ポット)。栽培温度は、トマトは25℃、レタスおよびハウレン草は20℃で栽培した。また、ハウレン草栽培土壌には石灰を混ぜ、pH6.2~6.5に調整した。これらをオートクレープ処理後に使用した。

(2)汚染土壌からの作物汚染：サルモネラ、腸管出血性大腸菌およびリステリアの食中毒株で汚染した土壌で栽培し、土壌中にお

ける細菌の生残性、初期土壌汚染濃度と収穫時における野菜の可食部汚染の関係を明らかにするとともに汚染部位および存在形態を同定した。

(3)野菜類の表面に付着させた食中毒菌の消長：トマト、レタスの可食部表面に、種々の濃度のサルモネラを付着させて栽培し、生菌数の経時変化を調べた。可食部に人為的に付けた傷の部分にも接種して調べた。

(4)汚染用水からの作物汚染：レタスおよびハウレン草について種々の濃度のサルモネラで汚染した水を灌水して栽培し、経時的に可食部におけるサルモネラ生残菌数を測定した。

(5)食品添加物による食中毒細菌付着低減法：これまでに種々の食中毒細菌に対する付着阻害効果を見出したポリリジンおよび乳清タンパク質を用いて植物表面を前処理し、この後、種々の濃度で食中毒細菌を接種して24hインキュベート後に通常の洗浄/殺菌処理を行い、食中毒細菌の生残に対する前処理の効果を調べた。

4. 研究成果

(1)汚染土壌中のサルモネラ生菌数の変化
本実験のミニトマト栽培では、70日目以降にトマト果実を収穫できた。この栽培過程における異なる初期濃度でサルモネラ汚染した土壌中の一般生菌およびサルモネラ生菌数の経時変化を図1に示す。10⁴、10⁶ CFU/gの汚染土壌では、土壌中のサルモネラ量は14日目までに一旦増加し、10⁷ CFU/gとなった。14日目以降は減少に転じ、70日目には10³ CFU/g程度まで減少した。一方、10⁸ CFU/gの土壌中のサルモネラ量は一時的な増加傾向は見られず、栽培開始以降減少した。初期汚染濃度に比例して収穫時にも10³~10⁶ CFU/gのサルモネラが生残した。レタスおよびハウレン草の栽培においても同様の結果であった。

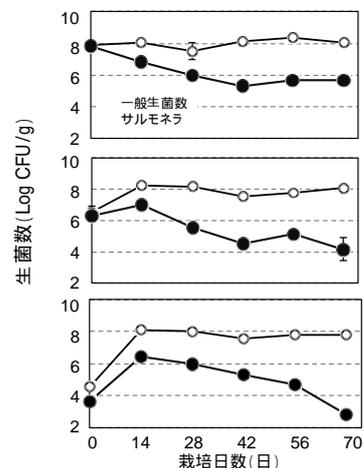


図1.土壌におけるサルモネラ生菌数の変化

腸管出血性大腸菌では、生菌数の低下がサルモネラに比べると早かった。リステリアでは、 $10^2 \sim 10^6$ CFU/g の初期汚染菌は 56 日目に、 10^8 CFU/g 初期汚染菌は 70 日目に検出下限未満となった。

(2) 汚染土壌で栽培した作物の食中毒細菌汚染

$10^4 \sim 10^8$ CFU/g の初期汚染土壌で栽培したミニトマトでは、果実および茎からはサルモネラは検出されなかった。

レタスは栽培開始から 50~60 日で収穫できた。 $10^4 \sim 10^8$ CFU/g のサルモネラで初期汚染した土壌で栽培したレタスを丸ごと検査した結果、12 検体全てでサルモネラは MPN3 本法の検出下限未満であった。表 1 に示すように外側から葉を 3 枚ずつ一組にして検査した結果、土壌の汚染濃度が高い方が中心付近の葉からもサルモネラが検出された。しかし、表面殺菌後には全てサルモネラは定性試験陰性となった。

表 1. 土壌由来サルモネラによるリーフレタス汚染

葉の番号 (外側から)	陽性検体/全検体			
	土壌の初期汚染サルモネラ濃度 (CFU/g)			
	9.3×10^3	7.2×10^4	8.0×10^5	8.0×10^7
1-3	0/2	0/2	2/2	1/2
4-6	0/2	0/2	1/2	1/2
7-9	0/2	0/2	2/2	1/2
10-12	0/2	0/2	2/2	1/2
13-15	0/2	0/2	2/2	1/2
16-18	0/1	0/1	1/1	0/2
19-21	0/1	-	-	0/1

ハウレンソウは栽培開始から 40 日程度でサラダ用のベビーリーフとして収穫できた。 $10^2 \sim 10^8$ CFU/g の初期汚染土壌で栽培した場合、 10^6 CFU/g のサルモネラ初期汚染土壌で栽培したハウレンソウの可食部からサルモネラが検出されたが、表面殺菌した場合には 10^8 CFU/g の汚染土壌で栽培した葉からも検出されなかった。本試験結果からは、土壌中のサルモネラは植物体内部へは移行しにくいものと推定された。

(3) 野菜表面における食中毒細菌の消長

トマト果実およびレタス可食部表面の正常部位および人為的に傷つけた部位に食中毒菌を人為的にスポット接種して調べた。トマトでは傷は約 2 週間でリグニン化して修復した。サルモネラを 10^3 CFU 接種した場合、正常部位では 3 日目に 3 検体中 3 検体でサルモネラ陰性となったが、傷部分では 7 日目まで 3 検体中 2 検体生残した(表 2)。レタスでは、表 3 に示すようにサルモネラを 10^2 CFU 接種した場合、正常部位では 7 日目に 6 検体中 6 検体でサルモネラ陰性となったが、傷部分では 3 日目まで 6 検体中 6 検体で生残が認められた。

リステリアでは、 10^4 , 10^6 CFU となるようにレタスの葉にスポット接種した結果、損傷がない葉では 6 日目まで、損傷した葉では 12 日目までリステリアが検出された。

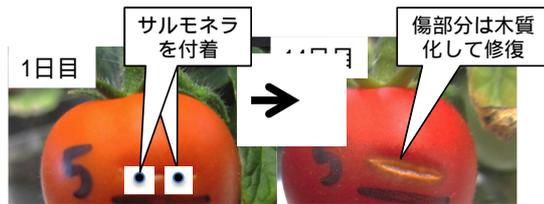


図 2. トマト表面につけた傷とその修復

表 2. トマト果実表面におけるサルモネラの生残性

接種菌数 [CFU/接種 部位]	陽性/全検体							
	0日目	3日	5日	7日	10日	14日	21日	28日
10^3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10^6	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10^8	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10^9	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3

接種菌数 [CFU/接種 部位]	陽性/全検体							
	0日目	3日	5日	7日	10日	14日	21日	42日
10^3	3/3	2/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10^5	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	1/3	1/3
10^7	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	1/3
10^9	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3

表 3. レタス葉表面におけるサルモネラの生残性

接種菌数 [CFU/葉]	傷	サルモネラ陽性検体/全検体					
		接種後の日数 [日]					
		0	7	14	21	28	35
1.2×10^2	無	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	有	5/6	4/6	6/6	3/6	4/6	6/6
0.8×10^4	無	6/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	有	6/6	3/6	6/6	2/6	4/6	4/6

(4) 汚染用水からの食中毒細菌汚染

種々の濃度でサルモネラ汚染した用水を灌水して栽培したリーフレタスにおけるサルモネラの消長を調べた結果を表 4 に示す。用水のサルモネラ汚染濃度が高いと長期間生残し、レタスでは 3.5 CFU/mL 以下の場合に 7 日後にはレタスから未検出となった。ハウレン草では、325 CFU/mL 以下の場合に、大腸菌 O157 は 835 CFU/mL 以下の場合に 7 日後には未検出となった(表 5)。

(5) レタス栽培における食中毒細菌汚染に対するマルチの効果

土壌の温度および湿度の保持や雑草防除のために使用されるマルチの栽培中の食中毒細菌による可食部汚染に対する効果を調べた。結果を表 6 に示す。 10^8 CFU/g のサルモネラ初期汚染濃度で栽培した場合でもレ

タスのサルモネラ汚染は認められなかった。表1の結果と比較すると土壤中のサルモネラによるリーフレタスの可食部汚染防止にはマルチの使用が有効であることが示された。しかし、リステリアについては初期汚染土壌での栽培ではマルチ無しで栽培したレタスは全ての試験区で検出下限となったが、マルチを使用したレタスでは12検体中1検体で3.2 log CFU/葉(1から3枚目の葉), 2.3 log CFU/葉(10から12枚目の葉)でリステリアが検出された。マルチにより土壌中の湿度が保たれた結果、リステリアが長期間生残して可食部汚染したことが推定された。

表4. 灌水由来サルモネラのリーフレタスにおける生残性

噴霧菌液濃度 (CFU/mL)	サルモネラ陽性検体/全検体						
	接種後の日数 (日)						
	0	4	6	7	8	14	21
0.35	1/3	—	—	0/3	—	—	—
2.5	1/3	—	—	0/3	—	—	—
3.5	2/3	—	—	0/3	—	—	—
4.6	1/3	0/3	0/3	—	1/3	—	—
5.0	0/3	—	—	0/3	—	—	—
5.5	0/3	—	—	0/3	—	—	—
25	2/3	—	—	0/3	—	—	—
35	3/3	—	—	0/3	—	—	—
50	0/3	—	—	1/3	—	—	—
55	3/3	—	—	1/3	—	—	—
265	3/3	3/3	3/3	—	1/3	—	—
430	3/3	—	—	—	1/3	—	—
3400	3/3	3/3	2/3	—	2/3	1/3	1/3
290000	3/3	3/3	3/3	—	3/3	3/3	3/3

表5. 灌水由来大腸菌0157のハウレン草における生残性

噴霧菌液濃度 (CFU/mL)	大腸菌0157陽性検体/全検体	
	接種後の日数 (日)	
	0	7
835	0/3	0/3
4800	2/3	1/3
61500	2/3	1/3
705000	3/3	3/3
5150000	3/3	3/3

表6. 土壌由来サルモネラによるリーフレタス汚染に対するマルチの効果

葉の番号 (外から)	陽性検体/全検体			
	土壌の初期汚染サルモネラ濃度 (CFU/g)			
	6.2×10^4	7.3×10^5	1.4×10^6	4.3×10^8
1 - 3	0/3	0/3	0/3	0/3
4 - 6	0/3	0/3	0/3	0/3
7 - 9	0/3	0/3	0/3	0/3
10 - 12	0/3	0/3	0/3	0/3
13 - 15	0/3	0/3	0/3	0/3

(6) 食品添加物による前処理の二次付着食中毒細菌の付着力低減効果

0.001%ポリリジンと0.25%乳清タンパクの混合溶液をキャベツおよび栽培中のレタスの葉上に噴霧・乾燥後、サルモネラ懸濁液を接種して24時間インキュベートした後、葉を洗浄し、葉上の生菌数を測定した。その結果、図3に示すように食品添加物で前処理した場合、洗浄後のサルモネラの生菌数は、未処理と比較して、キャベツでは2.55 log、レタスでは1.74 log 少なく、前処理の効果はキャベツにおいてより顕著であった。

この結果は、ポリリジンと乳清タンパク混合液をスプレーして表面処理しておくこと、キャベツおよびレタスに対するサルモネラの付着力を低減させることができ、水で洗浄するだけで未処理に比べ、殺菌料処理と同程度の二次汚染菌生菌数の低減が可能であることを示すものである。

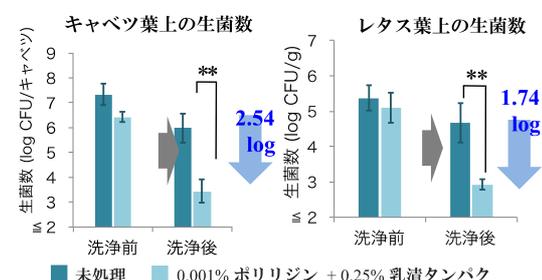


図3. ポリリジンおよび乳清タンパクの併用前処理による野菜へのサルモネラの付着力低減効果

本研究は、青果物の生産段階における環境中の食中毒細菌汚染濃度と可食部汚染の関係について検討し、生産段階における食中毒細菌汚染低減のための科学的根拠を示したものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Honjoh, K., Mishima, T., Kido, N., Misako Shimamoto, M., Miyamoto, T., (2014) Investigation of possible contamination routes of Salmonella via soils and the effects of mulch for avoiding its contamination to leafy lettuce plants during cultivation, Food Science and Technology Research, 20, 5, 961-969.

2. Islam, Md T., Akinobu Oishi, A., Machida, C., Ogura, A., Shoken Kin, S., Honjoh, K., Miyamoto, T., (2014) Combined effects of selected food additives on adhesion of various foodborne pathogens onto microtiter plate and cabbage

leaves, Food Control, 46, 233-241.

〔学会発表〕(計7件)

1. 本城賢一, 林 英, 祝迫侑里, 城 聖美, 木嶋伸行, 宮本敬久, 栽培土壌におけるリステリアの損傷ならびにリーフレタス可食部汚染機構の解明, 第36回日本食品微生物学会学術総会, 2015. 11. 13.

2. 森永憲子, 小椋彩, Md Tariqul Islam, 本城賢一, 宮本敬久, 農産物の食中毒細菌汚染低減法の開発, 平成27年度(公社)日本食品科学工学会西日本支部 および(公社)日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会, 2015. 10. 31.

3. Islam, MD T., Machida, C., Ogura, A., Honjoh, K., Miyamoto, T., Clarification of the mechanism of inhibiting the biofilm formation of pathogenic bacteria on fresh produce by food additives, International Union of Microbiological Societies 2014, 2014. 07. 30.

4. 宮本敬久, 農産物および食品における有害微生物の汚染低減技術, 日本防菌防黴学会 創立40周年記念事業 第40回年次大会, 2013. 09. 11.

5. 小椋 彩, 町田智佳子, Md Tariqul Islam, 本城賢一, 宮本敬久, ポリリジンと乳清タンパクによる野菜の二次汚染低減効果, 日本食品科学工学会第60回記念大会, 2013. 08. 31.

6. 島本美紗子, 米田朋樹, 城戸希望, 三島朋子, 本城賢一, 宮本敬久, 葉菜可食部を汚染したサルモネラの生残性, 日本食品科学工学会第60回記念大会, 2013. 08. 31.

7. 島本美紗子, 米田朋樹, 城戸希望, 三島朋子, 本城賢一, 宮本敬久, 葉菜類における栽培環境からのサルモネラ汚染, 第50回化学関連支部合同九州大会, 2013. 07. 06.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/foodhygienicchemistry/page03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 敬久 (MIYAMOTO TAKAHISA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 70190816

(2) 研究分担者

本城 賢一 (HONJOH KEN-ICHI)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 00264101