=原 著=

市販カット果実における衛生指標菌調査と接種した 腸管出血性大腸菌 O157:H7 および *Salmonella* Enteritidis の消長

名塚 英一^{*1,†}・稲津 康弘^{*2}・川崎 晋^{*2}・宮丸 雅人^{*1}

(^{*1}独立行政法人農林水産消費技術センター, ^{*2}独立行政法人食品総合研究所)

(受付 平成 16 年 8 月 2 日)

(受理 平成 16 年 11 月 14 日)

The Investigation of Bacterial Contamination in Fresh-cut Fruits, and the Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis on Fruit Cubes

Eiichi NAZUKA^{*1,†}, Yasuhiro INATSU^{*2}, Susumu KAWASAKI^{*2}
and Masato MIYAMARU^{*1}

(^{*1}Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services,
2-1 Shintoshin, Chuo-ku, Saitama-shi, Saitama 330-9731;

† Corresponding author)

(^{*2}National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai,
Tsukuba, Ibaraki 305-8642)

The purpose of this study was to clarify the bacterial contamination in fresh-cut fruits. Total viable aerobes, coliforms and fecal *Escherichia coli* in fresh-cut fruits were investigated. We prepared samples of fresh-cut melon, pineapple, watermelon, grapefruit, orange and kiwi. The incidence of total viable aerobes was the order of 2-6 log₁₀ cfu/g depending on the fruits tested. Fecal *E. coli* was detected in fresh-cut melon, pineapple and watermelon, and the numbers were 8, 1 and 2 of 10 samples each, respectively.

The ability of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis to survive and grow on cubes of melon, watermelon, pineapple and grapefruit was investigated. After being inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis*, the samples were kept at 4, 10 and 20°C, and their bacterial counts were examined after 0, 12, 24 and 48 hr of incubation. In the samples of melon and watermelon, *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* proliferated during storage at 20°C, but showed no change during storage at 4 and 10°C. However, *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* inoculated onto fresh-cut cubes of pineapple and grapefruit did not grow during 48 hr of storage at 4, 10 and 20°C. This result indicates that *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* were capable of growth and rapid proliferation on fresh-cut melon and watermelon at higher temperatures than those of a refrigerator.

Key words: Fresh-cut fruits, Bacterial contamination, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis

† 連絡先

^{*1} ☎330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心2-1 さいたま新都心合同庁舎検査棟

^{*2} ☎305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

緒 言

中食や孤食の増加など食生活の多様化に伴い、果実の可食部をブロック状に切り出したカット果実など惣菜の需要は百貨店、スーパーマーケット、コンビニエンスストアなどを中心に増加傾向にある¹⁵⁾。カット果実は手軽に利用できる反面、切断面は微生物が増殖または生残しやすく^{7, 11)}品質は劣化しやすい。カット果実は生食されるため、加工工程において食中毒菌の汚染があった場合、食中毒の原因となる可能性がある。実際に、メロンやスイカを原因としたサルモネラの食中毒が報告されている^{1, 10, 16)}。我が国におけるカット果実の細菌汚染調査については、生食用野菜やカット野菜の細菌汚染調査^{9, 17, 18)}と比べると少ない。また、我が国では高齢化の進展や生活習慣病の増加により、食中毒に対して感受性を持つ人々が増え⁸⁾、食中毒の増加が懸念される。

こうした背景から、今回、市販品のカット果実における細菌汚染実態を明らかにする目的で一般生菌数、大腸菌群および糞便系大腸菌群の実態調査を行った。さらに、万一、カット加工において食中毒菌の汚染に遭遇した場合を想定し、その後の温度管理の相違による食中毒菌の消長を予測するため、メロン、スイカ、パイナップルおよびグレープフルーツに腸管出血性大腸菌 O157: H7 (以下 O157) および *Salmonella* Enteritidis (以下 SE) を接種し、接種菌の増殖および生残を異なる温度で追跡したので報告する。

材料および方法

I. 一般生菌数、大腸菌群および糞便系大腸菌群の計測

検体はカットされたメロン、スイカ、パイナップル、グレープフルーツ、オレンジおよびキウイをそれぞれ 10 検体用いた。検体は東京都および埼玉県内の百貨店やスーパーマーケットで 2003 年 6 月～2004 年 2 月に購入した。一般生菌数および大腸菌群の試験は、食品衛生検査指針¹²⁾に準拠して行った。検体 10 g を滅菌ストマッキング袋に加え、リン酸生理食塩水 (PBS) 90 ml 加え、1 分間ストマッキング処理を行い、試料乳剤とした。試料乳剤は PBS で 10 倍段階希釈し、各段階希釈液 1 ml を滅菌シャーレに採った。一般生菌数は標準寒天培地 (日水製薬) で、35℃、48 時間混釈平板培養後、集落を計測した。大腸菌群はデゾキシコレート培地 (日水製薬) で、35℃、24 時間混釈平板培養後、発育した典型的な集落を計測した。糞便系大腸菌群は試料乳剤 10 ml を倍濃度に調製した EC 培地 (日水製薬) 10 ml に接種し、44.5±0.2℃ で 24 時間培養した。ガス発生が認められた試験管から一白金耳、EMB 寒天培地 (日水製薬) に画線塗抹し、35℃ で 24 時間培養し、EMB 寒天培地上に金属光沢または暗紫赤色の発育集落を確認した。検体の pH は、検体 10 g に蒸留水 10 ml 加え、ホモジナイザー

で均一化した後、pH メーター (アズワン、ラコムテスター pH 計) を用いて測定した。

II. カット果実に接種した O157 および SE の消長

1. 供試菌株

O157, 4 株 (CR-3, MN-28, MY-29, DT-66) および SE, 1～4 菌株は独立行政法人動物衛生研究所より分与された。O157 はベロ毒素非産生株である。SE, 1, 3 および 4 菌株は鶏糞分離株、SE, 2 菌株は牛糞分離株である。SE, 5 菌株は IFO-3313 (由来は不明) であり、財団法人発酵研究所より分与された。各菌株は使用までは、20% グリセロールを加え、-80℃ で凍結保存した。

抗生物質耐性株は、抗生物質を添加したトリプトソーヤ寒天培地で計測した場合、菌の損傷による計測値への影響を与えないという報告がある⁶⁾。本法では、接種菌の酸損傷による計測値への影響を考慮し、また果実の常在菌の発育を抑制する目的でリファンピシン耐性 O157 および SE をカット果実への接種に用いた。O157 の 4 株および SE の 5 株は、トリプトソーヤブイオン (TSB, 日水製薬) 3 ml に接種し、37℃ で 24 時間培養し、その 0.5 ml を 50 µg/ml リファンピシン加トリプトソーヤブイオンに接種し、37℃ で 24 時間培養した。一白金耳を 50 µg/ml リファンピシン加トリプトソーヤ寒天培地 (Rif 加 TSA, 日水製薬) に画線塗抹し、37℃ で 24 時間培養し、O157 および SE のリファンピシン耐性株を分離した。

2. 接種菌液

O157 および SE のリファンピシン耐性株は、TSB 3 ml に接種し、37℃ で 24 時間培養した。リファンピシン耐性 O157 の 4 株およびリファンピシン耐性 SE の 5 株を混合し、それぞれ PBS で約 6 log₁₀ cfu/ml に希釈したものを接種菌液とした。

3. カット果実への食中毒菌の接種および菌数計測

検体はメロン、スイカ、パイナップルおよびグレープフルーツを用いた。各果実は、表面を 70% エタノールで噴霧し、クリーンベンチで 15 分乾燥させた。70% エタノールで滅菌した包丁およびピンセットを用いて、各果実の可食部をブロック状に切り出し、これをカット果実とした。メロンはアンデスメロンを使用し、種子は取り除いた。グレープフルーツはホワイト種を使用し、じょうのう膜は滅菌ピンセットで取り除いた。切り出したカット果実 5 g を滅菌ストマッキング袋に入れ、これに O157 および SE の菌液 20 µl (約 6 log₁₀ cfu/ml) を、マイクロピペットを用いカット果実の表面に接種した。乾燥を避けるため密封し、4, 10, 20℃ で保存した。0, 12, 24, 48 時間保存後、ストマッキング袋に PBS 45 ml を加え、ストマッカーで 1 分間処理し、試料乳剤を作製した。試料乳剤 1 ml を PBS で 10 倍段階希釈し、

その 100 μ l を Rif 加 TSA 培地に塗抹し, 37°C で 24 時間培養し, 発育集落を計測した. すべての試験は 1 群当たり 3 検体実施し, 菌数を平均した.

結 果

市販カット果実における一般生菌数, 大腸菌群および

糞便系大腸菌群を計測した結果を Table 1 に示した. メロンの一般生菌数は 5 $\log_{10}$ cfu/g オーダーにある検体が 10 検体中 5 検体と最も多く, 2 $\log_{10}$ cfu/g オーダー以下はなかった. スイカの一般生菌数は 3~4 $\log_{10}$ cfu/g オーダーにある検体が 10 検体中 9 検体と多かったが, 1 検体は 6 $\log_{10}$ cfu/g オーダーにあった. カンキツ

Table 1. Incidence of total viable aerobes, coliforms and fecal *E. coli* in fresh-cut fruits

	No. of samples	Total viable aerobes						Coliforms							Fecal <i>E. coli</i>
		6.9 ⌋ 6.0 ^{a)}	5.9 ⌋ 5.0	4.9 ⌋ 4.0	3.9 ⌋ 3.0	2.9 ⌋ 2.0	Average ^{c)}	5.9 ⌋ 5.0	4.9 ⌋ 4.0	3.9 ⌋ 3.0	2.9 ⌋ 2.0	1.9 ⌋ 1.0	ND ^{d)}	Average	Positive
Melon	10	1 ^{b)}	5	2	2	0	4.9±0.9	1 ^{b)}	2	3	3	1	0	3.4±1.3	8 ^{b)}
Watermelon	10	1	0	4	5	0	4.0±0.9	0	1	2	3	3	1	2.7±1.0	2
Pineapple	10	0	2	5	3	0	4.3±0.6	0	0	0	1	6	3	1.5±0.4	1
Grapefruit	10	0	0	1	4	5	3.0±0.8	0	0	0	0	2	8	1.9±0.1	0
Orange	10	0	0	4	6	0	3.8±0.4	0	0	0	3	2	5	1.9±0.7	0
Kiwi	10	0	3	5	1	1	4.5±1.0	0	0	0	0	0	10		0

a) The order of bacterial populations: $\log_{10}$ cfu/g

b) The numbers of detected

c) The average of bacterial populations: $\log_{10}$ cfu/g (mean $\pm$ S.D.)

d) Values are < 10 cfu/g.

Fig. 1. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on fruit cubes stored at 4, 10 and 20°C for up to 48 hr. Experiments were replicated three times.

類のグレープフルーツおよびオレンジの一般生菌数は $5 \log_{10}$ cfu/g オーダー以上の検体は認められず、グレープフルーツは $2 \sim 4 \log_{10}$ cfu/g オーダーにあり、オレンジは $3 \sim 4 \log_{10}$ cfu/g オーダーにあった。キウイの一般生菌数は $4 \log_{10}$ cfu/g オーダーにある検体が 10 検体中 5 検体で最も多かった。一般生菌数の平均値は、メロンの $4.9 \pm 0.9 \log_{10}$ cfu/g が最も高く、グレープフルーツは $3.0 \pm 0.8 \log_{10}$ cfu/g で最も低かった。大腸菌群は、メロンではすべての検体で検出され、 $1 \sim 5 \log_{10}$ cfu/g オーダーにあった。スイカの大腸菌群は 10 検体中 9 検

Table 2. The pH of fresh-cut fruits

	pH ^{a)}
Melon	6.5 ± 0.3
Watermelon	5.3 ± 0.2
Pineapple	3.7 ± 0.1
Orange	3.8 ± 0.1
Grapefruit	3.6 ± 0.1
Kiwi	3.6 ± 0.1

a) Values are mean $\pm$ S.D. of three replicate trials.

体検出され、 $1 \sim 4 \log_{10}$ cfu/g オーダーにあった。パイナップルの大腸菌群は 10 検体中 7 検体検出され、6 検体が $1 \log_{10}$ cfu/g オーダーにあった。グレープフルーツおよびオレンジの大腸菌群は、それぞれ 10 検体中 2 および 5 検体検出されたが、 $3 \log_{10}$ cfu/g オーダーより高い検体はなかった。キウイでは大腸菌群は検出されなかった。糞便系大腸菌群はメロン、パイナップルおよびスイカで検出され、特にメロンで 8 検体と多く検出された。グレープフルーツ、オレンジおよびキウイでは、糞便系大腸菌群は検出されなかった。なお、メロン、スイカ、パイナップル、グレープフルーツ、オレンジおよびキウイの未加工果実内部を無菌的に切り出し、一般生菌数および大腸菌群を計測した結果、一般生菌数、大腸菌群ともに $1 \log_{10}$ cfu/g 以下であった。

Table 2 には市販カット果実の pH を示した。各市販カット果実は酸性を示したが、メロンおよびスイカの平均 pH はそれぞれ 6.5, 5.3 であり、他の果実に比べて中性に近い値であった。

Fig. 1~2 にメロン、スイカ、パイナップルおよびグ

Fig. 2. Survival and growth of *Salmonella* Enteritidis on fruit cubes stored at 4, 10 and 20°C for up to 48 hr. Experiments were replicated three times.

レープフルーツに接種した O157 および SE の菌数の消長を示した。本試験においてメロン、スイカ、パイナップルおよびグレープフルーツの常在菌は Rif 加 TSA で検出されなかった。メロンおよびスイカの 20℃ 保存下で、O157 および SE とともに急激な増殖を示したが、4、10℃ 保存下では、ほぼ静菌傾向を示した。一方、パイナップルおよびグレープフルーツでは、20℃ 保存下でも O157 および SE の菌数は増加を示さず、グレープフルーツに接種した SE 菌数は、48 時間後に約 $1.5 \log_{10}$ cfu/g の減少が認められた。パイナップルおよびグレープフルーツの 4、10℃ 保存下では、ほぼ静菌傾向を示した。

考 察

カット果実は皮の内部を製品とするため、カット野菜と比較して細菌数が少ないと予想される。しかし、市販カット果実の一般生菌数は $2 \sim 6 \log_{10}$ cfu/g にあり、大腸菌群も多く検出され、カット野菜における一般生菌数および大腸菌群の計測菌数¹⁷⁾ と大きな相違は認められなかった。非加熱食品において一般生菌数や大腸菌群の存在は、腐敗菌や食中毒菌の存在を意味するものではないが、計測菌数の多い場合には製造や保存時の非衛生的な管理が疑われる。弁当および総菜の衛生規範¹³⁾ には、非加熱のサラダ、生野菜の一般生菌数は検体 1 g 当たり 100 万個以下が望ましいと定められている。本調査では、一般生菌数が $6.0 \log_{10}$ cfu/g 以上の検体は、メロンおよびスイカで 1 検体ずつ検出された。糞便系大腸菌群の検出は、大腸菌群に比べ、ヒトや動物の糞便に由来する可能性が高く、加工工程における 2 次汚染が示唆される。本調査では、メロン、スイカおよびパイナップルにおいて糞便系大腸菌群が検出され、検体によっては、加工から販売に至る過程において微生物の汚染や増殖の可能性があるが、汚染経路や食中毒菌の検出率など今後の検討が必要である。

メロンおよびスイカの 20℃ 保存下で、接種した O157 および SE は 24 時間後までに約 $2.5 \sim 3 \log_{10}$ cfu/g の急激な増殖が認められた。食中毒菌の急激な増殖傾向については、メロンおよびスイカの可食部に接種した O157 の消長を調査した Del Rosario らの研究報告⁴⁾ およびサルモネラ属菌の消長を調査した Golden らの研究報告⁵⁾ と一致がみられた。ただし、Del Rosario らの研究および Golden らの研究では、不適切な温度管理として設定した保存温度はそれぞれ 25℃ および 23℃ と本研究より高い温度設定のため、12 時間後の O157 または SE の増殖は本研究結果より急激な増殖を示した。一方、パイナップルおよびグレープフルーツに接種した O157 および SE は、20℃ 保存下でも増殖しなかった。果実の pH と O157 および SE の増殖について検討した報告では、pH 4.0 程度の酸性条件下における O157³⁾ やサルモネラ属菌²⁾ の発育は抑制された。これら

のことから、パイナップルおよびグレープフルーツの酸性条件は、接種した O157 および SE の発育抑制の一因の一つと考えられた。一方、メロンおよびスイカに接種した O157 および SE は、低 pH による発育抑制を受けないため、20℃ 保存下で急激な増殖を示したと考えられた。したがって、特に、メロンおよびスイカのカット加工では、食中毒菌による汚染が低濃度であっても、その後不適切な温度管理が行われた場合、食中毒の発症菌数まで達する可能性があるため注意が必要である。弁当および総菜の衛生規範には製品の温度管理は 10℃ 以下で行うことが望ましいと記されている。本研究では、どの果実でも 4、10℃ 保存下で、接種した O157 および SE の急激な増殖はみられなかったことから、10℃ 以下の温度管理は食中毒のリスク低減に有効であると考えられた。ただし、カット果実に接種した O157 および SE は、カット果実の消費期限と考えられる 1~2 日後まで生残したことから、適切な低温管理と同時に、食中毒菌の汚染防止が不可欠である。

カット果実における食中毒菌の汚染経路については、まず、糞便系肥料や土壌由来の食中毒菌が栽培中に果実の表面に付着すること^{1,14)} が考えられる。メロンおよびスイカの表面に付着した食中毒菌は、長期間生存する能力があることも報告されており⁴⁾、これらの食中毒菌がカット果実の製造段階まで生残する可能性も考えられる。農作物の栽培から収穫における衛生管理は、適正農業規範 (GAP) の導入が推奨される⁷⁾。特に、カット果実は食品工場や販売店のバックヤードで製造されるため、野菜などさまざまな食品から汚染を受ける可能性がある。また、作業員への衛生教育が不十分であると作業員の手指などを介した汚染も考えられる。これらのことから、カット果実の製造においては 2 次汚染の防止を徹底する必要がある。さらに、HACCP システムの導入^{7,8)} もカット果実による食中毒のリスク低減には効果的である。このように、カット果実による食中毒のリスク低減の実現には、生産から食卓に至る一貫した汚染防止と 10℃ 以下の低温管理が重要である。

要 約

カットされたメロン、スイカ、パイナップル、グレープフルーツ、オレンジおよびキウイの一般生菌数、大腸菌群および糞便系大腸菌群の実態調査を行った。カット果実の一般生菌数は $2 \sim 6 \log_{10}$ cfu/g オーダーにあった。一般生菌数の平均値は、メロンの $4.9 \pm 0.9 \log_{10}$ cfu/g が最も高く、グレープフルーツは $3.0 \pm 0.8 \log_{10}$ cfu/g で最も低かった。大腸菌群はメロン、スイカおよびパイナップルでそれぞれ 10 検体中 10、8 および 9 検体検出された。糞便系大腸菌群はメロン、スイカおよびパイナップルで検出され、特にメロンで 10 検体中 8 検体と多く検出された。グレープフルーツ、オレンジおよびキウイでは糞便系大腸菌群は検出されなかった。

メロン、スイカ、パイナップルおよびグレープフルーツへ腸管出血性大腸菌 O157:H7 および *Salmonella* Enteritidis を検体 1 g 当たり約 $4 \sim 5 \log_{10}$ cfu/g になるよう接種し、4, 10, 20°C で 0, 12, 24, 48 時間保存し、O157 および SE の消長を検討した。その結果、メロンおよびスイカに接種した O157 および SE は、20°C の保存で急激な増殖を示したが、パイナップルおよびグレープフルーツの 20°C の保存では、O157 および SE は増殖しなかった。4, 10°C の保存ではどの果実においても接種した O157 および SE は増殖を示さなかった。

以上の結果、市販品のカット果実では、加工から販売に至る過程での微生物汚染や増殖の可能性が示唆された。さらに、カット果実に食中毒菌の汚染があった場合には、食中毒菌は増殖または生残するため、カット果実による食中毒のリスク低減のためには汚染防止と 10°C 以下の低温管理が重要である。

文 献

- 1) Beuchat, L. R.: Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot., **59**, 204-216 (1995).
- 2) Chung, K. C. and Goepfert, J. M.: Growth of *Salmonellae* at low pH. J. Food Sci., **35**, 326-329 (1970).
- 3) Conner, D. E. and Kotrola, J. S.: Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 382-385 (1995).
- 4) Del Rosario, B. A. and Beuchat, L. R.: Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. J. Food Prot., **58**, 105-107 (1994).
- 5) Golden, D. A., Rhodhamel, E. J. and Kautter, D. A.: Growth of *Salmonella* spp. in cantaloupe, watermelon and honeydew melons. J. Food Prot., **56**, 194-196 (1993).
- 6) Inatsu, Y., Bari, M. D., Kawasaki, S. and Isshiki, K.: Construction and validation antibiotic resistance *Escherichia coli* O157:H7 strains for acidic foods. Jpn. J. Food Microbiol., **20**, 177-183 (2003).
- 7) 泉 秀実: カット野菜の微生物汚染度とその制御. 防菌防黴, **29**, 107-114 (2001).
- 8) 一色賢司: 生食される野菜・果物の衛生管理の考え方. 防菌防黴, **31**, 13-18 (2003).
- 9) Kaneko, K., Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Kosuge, J., Kato, M., Takahashi, K., Shiraki, Y. and Ogawa, M.: Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. J. Food Prot., **62**, 644-649 (1999).
- 10) 金子賢一: 生食用野菜及び果物が媒介食品となる感染症. 食衛誌, **40**, 417-425 (1996).
- 11) Knudsen, D. M., Yamamoto, S. A. and Harris, L. J.: Survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. J. Food Prot., **64**, 1483-1488 (2001).
- 12) 厚生省生活衛生局監修: 食品衛生検査指針微生物編. 社団法人食品衛生協会, 東京 (2004).
- 13) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知: 弁当及びそうざいの衛生規範について. 平成 7 年 10 月 12 日, 衛食第 188 号/衛乳第 211 号/衛化第 119 号 (1995).
- 14) Madden, J. M.: Microbial pathogens in fresh produce the regulatory perspective. J. Food Prot., **55**, 821-823 (1992).
- 15) 食品産業戦略研究所: カット野菜. 食品の腐敗変敗防止対策ハンドブック, p. 203-209, サイエンスフォーラム, 東京 (1996).
- 16) 内村真佐子, 岸田一則, 依田清江, 小岩井健司, 久門勝利, 鶴岡佳久, 水口康雄: 保育園におけるメロンが原因の腸管出血性大腸菌 O157:H7 による集団食中毒事例. 千葉県衛生研究所研究報告, **22**, 31-34 (1998).
- 17) 上田成子, 桑原祥浩: 生食用野菜の細菌学的研究. 防菌防黴, **26**, 673-678 (1998).
- 18) 上田成子, 桑原祥浩: 生食用野菜における食中毒菌の増殖・消長. 防菌防黴, **27**, 369-375 (1999).