

The conditions of pasteurization in some countries

| Countries    | egg yolk | egg yolk | whole egg | whole egg | egg white | egg white |
|--------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Romania      | 67°C     | 3 min    | 67°C      | 3 min     | -         |           |
| Poland       | 60.5°C   | 3 min    | 64°C      | 3 min     | 56°C      | 3 min     |
| Netherlands  | 60-66°C  | 3 min    | 64°C      | 4 min     | 54°C      | 60 min    |
| Germany      | 58°C     | 3.5 min  | 65.5°C    | 5 min     | 56°C      | 8 min     |
| France       | 62.5°C   | 4 min    | 58°C      | 4 min     | 55.5°C    | 3.5 min   |
| Sweden       | 62-63°C  | 4 min    | 58°C      | 4 min     | 55-56°C   | 3.5 min   |
| Denmark      | 68°C     | 4.5 min  | 68°C      | 4.5 min   | 61°C      | 3 min     |
| England      | 62.8°C   | 2.5 min  | 64.4°C    | 2.5 min   | 57.2°C    | 2.5 min   |
| Australia    | 60.6°C   | 3.5 min  | 64.4°C    | 2.5 min   | 55.6°C    | 10 min    |
| South Africa | 60°C     | 2.5 min  | 60°C      | 2.5 min   | 56.6°C    | 3 min     |
| Belgium      | 64°C     | 3 min    | 60°C      | 3 min     | -         |           |
| USA          | 60°C     | 3.5 min  | 60°C      | 3.5 min   | 60°C      | 3.5 min   |

The fate of *S. enteritidis* in Japanese cooking of eggs

| Cooking                             | Condition                     | Fate             |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Bottled Sea Urchin                  | with salt and ethanol         | rapidly die      |
| Thick fried egg                     |                               | die on baking    |
| Thin fried egg (egg sheet)          |                               | die on baking    |
| Noodles                             |                               | die on boiling   |
| Steamed fish paste mixed with egg   |                               | die on heating   |
| Soft-boiled egg                     | 70°C, 23min in water          | die              |
| Egg pudding                         | steaming, 5min                | die              |
| Japanese egg pudding                | 75°C, 35min in water          | die              |
| Egg sake                            | boiling                       | die              |
| Porched egg in noodle soup          | non mixing                    | survive          |
|                                     | mixing in hot                 | die              |
| Fried pork covered with egg, served | heating without cover         | survive          |
|                                     | heating with cover            | die              |
| Raw eggs                            | 10% soy sauce, non heating    | increase         |
| Natto (fermented soy beans)         | A half of raw egg per serving | increase         |
| Grated yam with soup                | A half of raw egg per serving | rapidly increase |

Chuhei Imai and Etsuko Nakamaru, Yushi 43 (3), 63-71(1990) in Japanese

Chuhei Imai and Etsuko Nakamaru, Yushi 43 (9), 62-70(1990) in Japanese

Akira Suzuki et al., Shokueishi 23,45-52, (1982) in Japanese

Chantarapanont, W., Slutsker, L., Tauxe, R. V., and Beuchat, L. R. (2000) Factors influencing inactivation of *Salmonella enteritidis* in hard-cooked eggs. *Journal of Food Protection*. 63, 36-43.

Six SE strains and one S. Senftenberg strain were inoculated into liquid egg white and liquid egg yolk. glass capillary method, tryptic soy agar for count

SE phage type  
egg white at 52C  
egg yolk at 56C

D values (min)

| PT4  | PT4  | PT8  | PT13a | PT34 | PT34 | Senftenberg |
|------|------|------|-------|------|------|-------------|
| 5.18 | 3.82 | 4.49 | 4.57  | 3.91 | 3.76 | 13.43       |
| 5.85 | 6.38 | 7.39 | 5.85  | 6.16 | 5.14 | 19.96       |

A PT4 and PT34 strains were inoculated into the yolk of medium and extra large shell eggs at 10 and 21C at the dose of 10(7)-10(8) CFU.

Then (1) the eggs were heated from 23C to 100C in water then held up to 15 min (American Egg Board method) or (2) they were placed in water at 100C then held up to 15 min. Tryptic soy agar for counts at 37 C for 48h

time (min) needed to inactivation

Medium eggs held at                      Extra large eggs held at

| 10C    |    | 21C    |    |
|--------|----|--------|----|
| <3     | <3 | 3 to 6 | <3 |
| 3 to 6 | 3  | 6 to 9 | 6  |

Method 1 was more effective than method 2.

**Humphrey, T.J., Greenwood, M. et al. (1989) The survival of salmonellas in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. *Epidemiology and Infection*. 103,35-45.**

|   |  | S. enteritidis<br>PT4 and S.<br>typhimurium | S.<br>senftenberg |                      |                    |
|---|--|---|-------------------|----------------------|--------------------|
| A hole cut in a shell egg using a needle or drill.  | Survival from a 4 min boiling                | PT110 and 141                               |                   |                      |                    |
| Culture broth of Sal. was inoculated in the yolk and the hole was sealed. The egg was boiled up to 10min. The yolk was stomached with buffered peptone Count: blood and McConkey agar plate, 24hr 37C dilution was incubated then added into Selenite, Tetrathionate, or Rappaport broth. | inoculum/g (log)                             |   | 6.81              |                      | 7.26               |
|   | No. of survivors (log)                       |   | 5.87              |                      | 6.72               |
|   | temperatre (C)                               |   | 54.6              |                      | 57.1               |
| An egg was broken in a dish and Sal. cell was inoculated into the yolk. The egg was cooked in a frying pan at 120C. It was cooked until the white was solid opaque. It took about 1.5-2.0 min.  | Survival in "sunny-side up" inoculum/g (log) | S. tyshimurium PT141                        | 6.68              | S. tyshimurium PT110 | S. enteritidis PT4 |
|   | No. of Sal. positive samples                 |   | 4/9               |                      | S. senftenberg     |
|   | No. of survivors (log)                       |   | not done          |                      |                    |
|   | temperatre (C)                               |   | 53.8              |                      |                    |
|   |  |   | 6.74              |                      | 6.9                |
|   |  |   | 9/9               |                      | 7.07               |
|   |  |   | 5.03              |                      | 9/9                |
|   |  |   | 53.9              |                      | 5.14               |
|   |  |   |                   |                      | 5.97               |
|   |  |   |                   |                      | 51.1               |

| Eggs were mixed with sterile milk and Sal. cells.                                 | Survival in Scrambled eggs cooked in a saucepan |      | low/moderate temp. cooking |       |      |
|---|---|------|----------------------------|-------|------|
|   | high temp. cooking                              |      |                            |       |      |
| The mixture was cooked in a saucepan. High and low/moderate flames were compared. | inoculum/g (log)                                | 6.09 | 6.6                        | 5.9   | 6.22 |
|   | No. of Sal. positive samples                    | 0/15 | 2/3                        | 29/30 | 6/6  |
|   | temperatre (C)                                  | 82.8 | 82.3                       | 73.9  | 74.7 |
|   |   |      |                            |       |      |

See above

The influence of inoculum size on the survival of SE PT4 in boiled eggs

| Inoculum size (log/g yolk) | Boiling time (min) |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                            | 4                  | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |      |
| 8                          | +                  | +    | +    | +    | +    | +    | +    | *    |
| 7                          | +                  | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    |
| 6                          | +                  | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    |
| 5                          | +                  | +    | +    | +    | +    | +    | -    | -    |
| 4                          | +                  | +    | +    | +    | +    | +    | -    | -    |
| 3                          | +                  | +    | +    | +    | +    | *    | -    | -    |
| 2                          | +                  | +    | +    | +    | +    | *    | -    | -    |
| temp. of egg yolk (C)      |                    | 56.2 | 57.6 | 57.9 | 59.1 | 64.5 | 65.5 | 68.6 |

+: positive after enrichment

\*: positive in some experiments

-: negative

**Humphrey, T.J., Chapman, P.A., et al. (1990) A comparative study of the heat resistance of Salmonellas in homogenized whole egg, egg yolk or albumen. Epidemiology and Infection. 104, 237-241.**

| Sal. cells in egg samples were inoculated into screw-capped vials then submerged in a water bath.   | strains               | D values (min) | in homogenized whole egg |            |     |
|---|-----------------------|----------------|--------------------------|------------|-----|
|   |                       |                | 55C                      | 60C        | 64C |
| Strains were cultured in Nutrient broth for 24 or 48hr at 37C. Cells were mixed with egg samples. Each 46 mm vials containing 1 ml of the samples was submerged in a water bath. Counts: blood agar plates for 24h at 37C | S. enteritidis PT4    | 6.4            | 0.44                     | 0.22       |     |
|   | S. enteritidis PT8    | 5.9            | 0.3                      | not tested |     |
|   | S. enteritidis PT13a  | 3.9            | 0.22                     | not tested |     |
|   | S. typhimurium PT 110 | 4.7            | 0.26                     | not tested |     |
|   | S. typhimurium PT 141 | 2.3            | 0.2                      | 0.15       |     |
|   | S. senftenberg 775W   | 34.3           | 5.6                      | 2.8        |     |

|                       | D values (min) 55C Homogenized egg |         |     | D values (min) 60C Homogenized egg |         |     |
|-----------------------|------------------------------------|---------|-----|------------------------------------|---------|-----|
|                       | Egg yolk                           | Albumen |     | Egg yolk                           | Albumen |     |
| S. typhimurium PT 141 | 2.3                                | 8       | 1   | 0.3                                | 0.8     | 0.3 |
| S. enteritidis PT4    | 6.4                                | 21      | 1.5 | 0.4                                | 1.1     | 0.2 |
| S. senftenberg 775W   | 34.3                               | 42      | 3   | 5.6                                | 11.8    | 0.8 |

|                       | D values Stationary phase cells | 60C Log phase cells |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------|
| S. typhimurium PT 141 | 0.33                            | 0.21                |
| S. enteritidis        | 0.5                             | 0.25                |
| S. enteritidis PT8    | 0.62                            | 0.29                |
| S. enteritidis PT4    | 0.9                             | 0.41                |

Consumption  
(Serving sizes)  
(Exposure distribution, validation)  
(Case reports)

**Methods**

Angulo, F.J., et al. (1998) Food safety symposium-Post-harvest, *Salmonella enteritidis* infections in the United States. *Vet Med Today: Public Veterinary Medicine. Journal of American Veterinary Medical Association*. Vol. 213, 1729-1731.

Review from surveillance data and articles.

**Results**

Only a small proportion of the salmonellosis are reported to CDC.

About 18,000 people in the US are hospitalized with *Salmonella* infection each year.

Approx. 40,000 persons each year (15 cases/100,000 people) have a stool sample examined.

>97% of the reported culture-confirmed cases are serotyped.

Reported *Salmonella* cases increased by 47% during this 25-year period.

*Salmonella Enteritidis* isolates increased by 459% during this 25-year period.

In 1996, there were 9,552 reported cases of SE in the US (1.5 cases/100,000 people), which suggested 200,000 to 1 million SE infections and 250 deaths.

Children <5 years old and the elderly are most popular in the SE infection.

6% of the SE isolates from normally sterile sites, such as blood, CSF, bone, or joints).

Eggs or egg-containing foods were implicated in 79% of SE outbreaks.

In Minnesota, the extent to which eggs were undercooked was directly associated with the likelihood of becoming infected.

The most alarming recent development is the raising of SE PT4 which causes marked increases in human illness.

Gompertz式による増殖モデルに基づく  
腸炎ビブリオの増殖予測式の作成

分担研究者：熊谷 進（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究協力者：和田正道（長野県衛生公害研究所）

3種類の因子(培養温度、塩分濃度およびpH)を変化させて増殖した腸炎ビブリオの経時的な菌数データから Gompertz 式 $N = A + C \times \exp\{-\exp(-B(t - M))\}$ に基づく一般的な増殖菌数曲線を導くため、Marquardt 法を用いて Gompertz 式にあてはめ、式の係数(A,C,B,M)を近似的に決定し、菌数を算出するためのプログラムを作成した。

1. 研究目的

魚介類による腸炎ビブリオ食中毒のリスクアセスメントのうち暴露評価に必要な、腸炎ビブリオの増殖予測モデルを作出するために、3種類の因子(培養温度、塩分濃度およびpH)を変化させて増殖した腸炎ビブリオの経時的な菌数データから Gompertz 式に基づく一般的な増殖菌数曲線を導くため解析を行い、一般的な Gompertz 式の各係数を推定し、菌数を算出するためのプログラムを作成した。

2. 研究方法・結果

解析に用いた実験データ

実験は静岡県榛原郡金谷町島 633-3 中部衛生検査センター(所長：仁科徳啓先生)で行った。実験は 4 種類の菌株(O4:K8 株、ATCC17802 株[O1]、O3:K6 秋田 A 株、O3:K6 秋田 B 株)ごとに 3 種類の因子を各 3 段階に変化させた 108 培養条件で行われた。各培養条件は全て 48 時間まで培養され、経時的に菌数が測定された。解析に際して、実験データを以下のように改変した。

- 1.菌数表示が $\infty$ (無限大)あるいは LA(ラボラトリーエラー)の場合は欠測値として扱った。
- 2.菌数表示が 0 の場合は、検出限界値の 1/2 の菌数として扱った。
- 3.菌数表示の左側に  $>$ (~を越える)が記された場合は  $5.0 \times$  表示菌数として扱った。

(例)  $>10^4 \rightarrow 5.0 \times 10^4$

## 解析方法および解析結果

解析は 1998/8/28 付で記した「増殖モデルの作成について」に準じて行ったが、実際のデータに不適当な部分はその都度改変した。

### (1) 各培養条件への Gompertz 式のあてはめ

Marquardt 法を用いて Gompertz 式にあてはめ、式の係数(A,C,B,M)を近似的に決定した。

$$N = A + C \times \exp\{-\exp(-B(t - M))\} \dots (1) \text{ Gompertz 式}$$

N : log(菌数)

A : log(初期菌数) Value of the lower asymptote  
(asymptotic log-count as t decreases indefinitely)

C : difference in value of the upper and lower asymptote  
(asymptotic amount of growth that occurs as t increases indefinitely)

M : 増殖速度が最大を示す時間

B : Mにおける増殖速度

t : 時間

解析結果を Table 1(冊子の最終ページに添付)に示す。108 培養条件の内、106 条件は解析可能であった。あてはめの程度を評価するため、sum of squares[ $\sum(\text{実測値} - \text{推定値})^2$ ]および実測値と推定値間の重相関係数を算出した。

### (2) 3種類の因子による各培養条件ごとに算出された係数 B および M の推定

以下に示す重回帰式に基づいて各係数( $\alpha_0, \alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_9$  および  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_9$ ) を決定した。9 次式による推定を行った結果、良好なあてはめが得られない場合は 18 次式による推定を行った。18 次式による推定で良好なあてはめが得られない場合は各項に定数を加えて変換後、あてはめを行った。B および M は無変換および自然対数(In B, In M) に変換した場合についてあてはめを試みた。

データとして以下の 3 種類の培養条件数について試みた。

1. 106 条件全てを用いた場合

2. 重相関係数が 0.7 未満を除いた 93 条件を用いた場合

3. 重相関係数が 0.7 未満を除く、A,C,B,M のいずれかがマイナス値ならば除く、A+C が 10 以上ならば 除いた 43 条件を用いた場合

解析は総当たり法により行い、自由度修正済みの重相関係数を指標として最適な式を選択した。多重共線性が疑われる式は除いた。



(9次式による推定)

$$\ln B(B) = \alpha_0 + \alpha_1 t + \alpha_2 p + \alpha_3 S + \alpha_4 t^2 + \alpha_5 p^2 + \alpha_6 S^2 + \alpha_7 t \cdot p + \alpha_8 t \cdot S + \alpha_9 p \cdot S \dots\dots\dots(2)$$

$$\ln M(M) = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 p + \beta_3 S + \beta_4 t^2 + \beta_5 p^2 + \beta_6 S^2 + \beta_7 t \cdot p + \beta_8 t \cdot S + \beta_9 p \cdot S \dots\dots\dots(3)$$

( t : 培養温度, p : pH,

S:NaCl%)

(18次式による推定)

$$\ln B(B) = \alpha_0 + \alpha_1 t + \alpha_2 p + \alpha_3 S + \alpha_4 t^2 + \alpha_5 p^2 + \alpha_6 S^2 + \alpha_7 t^3 + \alpha_8 p^3 + \alpha_9 S^3 + \alpha_{10} t \cdot p + \alpha_{11} t \cdot S + \alpha_{12} p \cdot S + \alpha_{13} t \cdot p^2 + \alpha_{14} t \cdot S^2 + \alpha_{15} p \cdot S^2 + \alpha_{16} S \cdot p^2 + \alpha_{17} S \cdot t^2 + \alpha_{18} p \cdot t^2 \dots\dots\dots(4)$$

$$\ln M(M) = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 p + \beta_3 S + \beta_4 t^2 + \beta_5 p^2 + \beta_6 S^2 + \beta_7 t^3 + \beta_8 p^3 + \beta_9 S^3 + \beta_{10} t \cdot p + \beta_{11} t \cdot S + \beta_{12} p \cdot S + \beta_{13} t \cdot p^2 + \beta_{14} t \cdot S^2 + \beta_{15} p \cdot S^2 + \beta_{16} S \cdot p^2 + \beta_{17} S \cdot t^2 + \beta_{18} p \cdot t^2 \dots\dots\dots(5)$$

( t : 培養温度, p : pH,

S:NaCl%)

Table 2 Gompertz 式の係数 B および M へのあてはめ程度

|                  | 次式 | 重相関係数(選択した次数) |          |           |           |            |
|------------------|----|---------------|----------|-----------|-----------|------------|
|                  |    | B             | M        | In (B+γ)  | In (M+δ)  | 定数         |
| 106 培養条件全てを用いた場合 | 9  | 0.659(5)      | 0.467(5) | 0.649(5)  | 0.547(5)  | γ=10, δ=15 |
| ”                | 9  | —             | —        | 0.660(9*) | 0.574(9*) | γ=10, δ=15 |
| 93 培養条件を用いた場合    | 9  | —             | —        | 0.497(5)  | 0.531(5)  | γ=1, δ=20  |
| ”                | 9  | —             | —        | 0.512(9*) | 0.558(9*) | γ=1, δ=20  |
| 43 培養条件を用いた場合    | 9  | —             | —        | 0.626(5)  | 0.911(5)  | γ=0, δ=0   |

|             |    |   |   |           |           |                      |
|-------------|----|---|---|-----------|-----------|----------------------|
| 〃           | 9  | — | — | 0.663(9*) | 0.915(9*) | $\gamma=0, \delta=0$ |
| 〃           | 18 | — | — | 0.663(7)  | —         | $\gamma=0, \delta=0$ |
| 〃 (各項の変換有り) | 18 | — | — | 0.719(7)  | —         | $\gamma=0, \delta=0$ |

\*:多重共線性

(参考)各項の変換について

各項に定数を増減して各種の変換を行い、In B および In M との単相関係数が最大となるようシミュレーション計算を行った。その結果に基づき定数値および変換型を決定した。

### (3) 一般化した Gompertz 式の作成

Table 2 に示した 43 条件を用いて推定した場合のアンダーラインを付した In B( $r^2=0.719$ ) および In M( $r^2=0.911$ )の推定式を用いて一般化した Gompertz 式の作成を行った。

Gompertz 式の係数 C については以下の 2 種類の算出値を用いて計算し、あてはまりの良い方を採用した。1 種類は 43 培養条件の各最大菌数を平均した値(7.32091)、2 種類目は 43 培養条件全体の最大菌数(8.99123)である。

2 種類の C を Gompertz 式に代入して求めた相関行列( $n=357$ )および実測値からの偏差の平均二乗誤差(RMSE)は以下の通りである。

| 相関行列 | A     | B     | C     | D     |         | RMSE   |
|------|-------|-------|-------|-------|---------|--------|
| A    | 1     | 0.984 | 0.899 | 0.899 | B-A の差分 | 0.3701 |
| B    | 0.984 | 1     | 0.916 | 0.917 | C-A の差分 | 0.9167 |
| C    | 0.899 | 0.916 | 1     | 1.000 | D-A の差分 | 1.0798 |
| D    | 0.899 | 0.917 | 1.000 | 1.000 |         |        |

A:実測値 B:各培養条件ごとに Gompertz 式で推定した値 C:平均値 D:最大値

$RMSE = \sqrt{\text{mean}^2 + (S.D.^2 \times (n-1)/n)}$  {mean=平均値、S.D.=標準偏差、n=データ数}

係数 C としては平均値の方があてはめが良いと考えられる。また、相関行列から実測値と一般化した Gompertz 式の算出値の相関は 0.899 である。Fig 1 に算出値(X)から実測値(Y)を推定する回帰式( $Y=1.079X-0.201$ )を示す。

$$\begin{aligned} \text{In B} = & -1.334449\text{E-}02X^1 - 3.345426\text{E-}02X^2 + 3.153137X^3 + 5.709813\text{E-}05X^4 + \\ & 9.469748\text{E-}04X^5 \\ & -8.300065\text{E-}06X^6 - 32.86613X^7 + 4.191771 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 X_1 &= (\text{温度} - 0.46)^2 & X_2 &= 2 \text{ pH} & X_3 &= 1/(\text{NaCl}^2 - 6.2) \\
 X_4 &= (\text{pH}^3 - 260)^2 & & & & \\
 X_5 &= (\text{温度} \times \text{pH} - 88)^2 & X_6 &= (\text{温度} \times \text{pH}^2 - 880)^2 & X_7 &= 1/(\text{pH} \times \text{NaCl}^2 - 40)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \ln M = & -0.3904712X_1 + 1.021662E-02X_2 + 1.747542E-02X_3 + 1.908856E-02X_4 \\
 & -0.0219392X_5 \\
 & + 8.144896
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 X_1 &= \text{温度} & X_2 &= \text{温度}^2 & X_3 &= \text{NaCl}^2 & X_4 &= \text{pH}^2 \\
 X_5 &= \text{温度} \times \text{pH} & & & & & &
 \end{aligned}$$

以上の式から推定された  $B_r = \exp(\ln B)$ ,  $M_r = \exp(\ln M)$  を以下の計算式に代入する。

$$N_c(\text{Log}) = A_0 + C \times \exp\{-\exp(-B_r(t - M_r))\} \dots \text{計算式}$$

$N_c$  = 予測される菌数     $C = 7.32091$      $A_0$  = 初期菌数(Log)     $t$  = 培養時間

### Gompertz 式に基づく腸炎ビブリオ菌数の算出プログラムの作成

上記の Gompertz 式を組み込んだ算出プログラム(GOMVIB.EXE)を作成した(Windows で稼働)。

初期菌数、培養温度(15~25 °C)、NaCl(1~7%)、pH(5.8~8.0)および培養時間(0~48h.)を入力すると増殖する菌数を表示する。

### 3. 考察

(1) Gompertz 式の係数  $B$  および  $M$  を高精度で推定できないため、108 培養条件全体で予測に使用する式を作成することはできなかった。

原因として考えられる点および対策案は以下のとおりである。

- 実験精度を高める必要 (1 培養条件あたりの実験回数を増加させる)。
- 実験データの改変方法を検討する必要があるか。
- Marquardt 法を用いた Gompertz 式の解法に不備があるか。
- Gompertz 式の係数  $B$  および  $M$  の推定式の改良 (今回は文献に記載された方法に準じた)。

(2) Gompertz 式の係数  $C$  の決定方法について

C の決定法が文献からは不明なため、平均値と最高値を代入し、あてはめの良い平均値を採用したが、RMSE を指標としてシミュレーション計算を行い最適な数値を決定する方法が良いと考える。

### 3. 結論

3 種類の因子(培養温度、塩分濃度および pH)を変化させて増殖した腸炎ビブリオの経時的な菌数データから Gompertz 式  $N = A + C \times \exp\{-\exp(-B(t - M))\}$  に基づく一般的な増殖菌数曲線を導くため、Marquardt 法を用いて Gompertz 式にあてはめ、式の係数(A,C,B,M)を近似的に決定し、菌数を算出するためのプログラムを作成した。

### 4. 発表

口演発表

ゴンペルツモデルに基づく腸炎ビブリオの増殖予測式の作成。和田正道、仁科徳啓、久保亮一、小沼博隆、熊谷進。日本食品衛生学会第79会学術講演会。

Table 1. 各培養条件ごとのゴンペルツ式による当てはめ(1/3)

| No. | 菌種 | 培養温度 | NaCl (%) | pH  | Sum    | RR    | A      | C            | B      | M        |
|-----|----|------|----------|-----|--------|-------|--------|--------------|--------|----------|
| 1   | 1  | 15   | 1        | 5.8 | 0.848  | 0.890 | 2.400  | 1.338        | 1.822  | 22.440   |
| 2   | 1  | 15   | 1        | 7   | 2.173  | 0.955 | 2.414  | 4.746        | 0.333  | 34.161   |
| 3   | 1  | 15   | 1        | 8   | 1.282  | 0.968 | 2.525  | 6.779        | 0.182  | 42.544   |
| 4   | 1  | 15   | 3        | 5.8 | 0.767  | 0.958 | 2.368  | 35442877.656 | 0.004  | 711.908  |
| 5   | 1  | 15   | 3        | 7   | 0.076  | 0.997 | 1.701  | 145771.723   | 0.003  | 758.806  |
| 6   | 1  | 15   | 3        | 8   | 0.157  | 0.994 | 2.020  | 7.206        | 0.040  | 29.439   |
| 7   | 1  | 15   | 7        | 5.8 | 0.359  | 0.952 | 2.321  | -1.957       | 0.124  | 13.757   |
| 8   | 1  | 15   | 7        | 7   | 7.535  | 0.126 | 2.386  | -0.415       | 3.130  | 0.260 *  |
| 9   | 1  | 15   | 7        | 8   | 7.578  | 0.048 | 2.355  | -0.155       | 2.997  | 0.308 *  |
| 10  | 1  | 20   | 1        | 5.8 | 2.647  | 0.934 | 0.613  | 66763.100    | 0.003  | 875.460  |
| 11  | 1  | 20   | 1        | 7   | 0.084  | 0.999 | 7.884  | -6.324       | -0.165 | 12.770   |
| 12  | 1  | 20   | 1        | 8   | 0.847  | 0.991 | 8.164  | -6.077       | -0.210 | 13.207   |
| 13  | 1  | 20   | 3        | 5.8 | 1.434  | 0.965 | -3.676 | 2954.473     | 0.002  | 831.739  |
| 14  | 1  | 20   | 3        | 7   | 0.169  | 0.998 | 7.906  | -6.552       | -0.151 | 13.786   |
| 15  | 1  | 20   | 3        | 8   | 0.374  | 0.995 | 8.457  | -8.753       | -0.090 | 12.025   |
| 16  | 1  | 20   | 7        | 5.8 | 9.334  | 0.081 | 2.965  | -0.886       | 9.090  | -0.115 * |
| 17  | 1  | 20   | 7        | 7   | 10.243 | 0.849 | 1.706  | 15.239       | 0.047  | 48.408   |
| 18  | 1  | 20   | 7        | 8   | 0.351  | 0.994 | 2.058  | 6.246        | 0.086  | 21.228   |
| 19  | 1  | 25   | 1        | 5.8 | 1.707  | 0.969 | 1.833  | 6.083        | 0.102  | 8.217    |
| 20  | 1  | 25   | 1        | 7   | 54.248 | 計算不能  | 6.307  | -2.846       | -5.024 | -4.455 * |
| 21  | 1  | 25   | 1        | 8   | 0.425  | 0.996 | 2.267  | 6.059        | 0.343  | 5.950    |
| 22  | 1  | 25   | 3        | 5.8 | 1.044  | 0.983 | 7.536  | -7.184       | -0.091 | 14.466   |
| 23  | 1  | 25   | 3        | 7   | 0.375  | 0.996 | 8.334  | -8.135       | -0.159 | 7.470    |
| 24  | 1  | 25   | 3        | 8   | 0.517  | 0.995 | 8.189  | -5.767       | -0.352 | 10.054   |
| 25  | 1  | 25   | 7        | 5.8 | 1.885  | 0.951 | 1.827  | 5.225        | 0.113  | 29.967   |
| 26  | 1  | 25   | 7        | 7   | 3.011  | 0.956 | 1.981  | 4.781        | 0.395  | 10.919   |
| 27  | 1  | 25   | 7        | 8   | 1.258  | 0.977 | 2.166  | 4.427        | 0.216  | 11.040   |
| 28  | 2  | 15   | 1        | 5.8 | 0.184  | 0.946 | 2.515  | 2.833        | 0.064  | 43.702   |
| 29  | 2  | 15   | 1        | 7   | 0.206  | 0.984 | 2.480  | 14267482.270 | 0.006  | 525.508  |
| 30  | 2  | 15   | 1        | 8   | 0.628  | 0.960 | 2.343  | 12042712.085 | 0.004  | 711.871  |
| 31  | 2  | 15   | 3        | 5.8 | 0.309  | 0.964 | 2.277  | 7.287        | 0.035  | 53.391   |
| 32  | 2  | 15   | 3        | 7   | 0.188  | 0.991 | 2.386  | 4.452        | 0.068  | 29.502   |
| 33  | 2  | 15   | 3        | 8   | 0.278  | 0.985 | 2.321  | 5.837        | 0.045  | 36.203   |
| 34  | 2  | 15   | 7        | 5.8 | 0.262  | 0.973 | 2.556  | -2.153       | 9.711  | 8.986    |
| 35  | 2  | 15   | 7        | 7   | 4.671  | 0.513 | 2.597  | -1.422       | 3.320  | 0.381 *  |
| 36  | 2  | 15   | 7        | 8   | 2.889  | 0.601 | 2.599  | -1.409       | 3.315  | 0.378 *  |
| 37  | 2  | 20   | 1        | 5.8 | 0.949  | 0.970 | -9.943 | 1526.079     | 0.001  | 1149.266 |
| 38  | 2  | 20   | 1        | 7   | 2.291  | 0.965 | 2.831  | 5.842        | 0.115  | 14.217   |

No.: 培養条件(1~108) 菌種: 1=04:K8, 2=ATCC17802 O1株, 3=03:K6秋田A株, 4=03:K6秋田B株

sum: sum of squares  $\sum (\text{実測値} - \text{推定値})^2$  RR: 実測値と推定値の重相関係数

A, C, B, M: Gompertz式の係数 [Gompertz式= $A + C \times \text{Exp}(-\text{Exp}(-B \times (t - M)))$ ]: t=培養時間]

Table 1. 各培養条件ごとのゴンペルツ式による当てはめ(2/3)

| No. | 菌種 | 培養温度 | NaCl(%) | pH  | Sum    | RR    | A     | C       | B      | M       |
|-----|----|------|---------|-----|--------|-------|-------|---------|--------|---------|
| 39  | 2  | 20   | 1       | 8   | 0.554  | 0.992 | 2.640 | 5.650   | 0.146  | 10.762  |
| 40  | 2  | 20   | 3       | 5.8 | -      | -     | -     | -       | -      | -       |
| 41  | 2  | 20   | 3       | 7   | 0.927  | 0.988 | 8.388 | -7.065  | -0.115 | 16.245  |
| 42  | 2  | 20   | 3       | 8   | 0.281  | 0.996 | 2.657 | 5.610   | 0.140  | 11.196  |
| 43  | 2  | 20   | 7       | 5.8 | 6.120  | 0.192 | 2.538 | -0.342  | 10.381 | 6.329   |
| 44  | 2  | 20   | 7       | 7   | 2.625  | 0.944 | 1.908 | 5.992   | 0.076  | 24.253  |
| 45  | 2  | 20   | 7       | 8   | 0.530  | 0.994 | 2.415 | 11.369  | 0.054  | 33.873  |
| 46  | 2  | 25   | 1       | 5.8 | 0.144  | 0.998 | 2.497 | 5.633   | 0.141  | 8.957   |
| 47  | 2  | 25   | 1       | 7   | 0.655  | 0.992 | 8.894 | -14.437 | -0.070 | 3.150   |
| 48  | 2  | 25   | 1       | 8   | 0.242  | 0.997 | 8.528 | -8.328  | -0.135 | 8.210   |
| 49  | 2  | 25   | 3       | 5.8 | 0.637  | 0.989 | 8.150 | -27.264 | -0.031 | -14.091 |
| 50  | 2  | 25   | 3       | 7   | 0.571  | 0.993 | 8.381 | -7.641  | -0.153 | 9.025   |
| 51  | 2  | 25   | 3       | 8   | 1.308  | 0.984 | 8.214 | -7.068  | -0.180 | 8.015   |
| 52  | 2  | 25   | 7       | 5.8 | 3.985  | 0.946 | 1.166 | 8.339   | 0.068  | 28.022  |
| 53  | 2  | 25   | 7       | 7   | 0.901  | 0.986 | 0.956 | 18.245  | 0.024  | 41.954  |
| 54  | 2  | 25   | 7       | 8   | 0.813  | 0.985 | 7.552 | -7.546  | -0.071 | 16.201  |
| 55  | 3  | 15   | 1       | 5.8 | 0.128  | 0.997 | 2.043 | 8.894   | 0.038  | 33.168  |
| 56  | 3  | 15   | 1       | 7   | 2.174  | 0.947 | 2.553 | 4.028   | 0.167  | 16.667  |
| 57  | 3  | 15   | 1       | 8   | 0.549  | 0.989 | 2.071 | 6.031   | 0.077  | 17.761  |
| 58  | 3  | 15   | 3       | 5.8 | 0.092  | 0.995 | 2.260 | 3.780   | 0.077  | 20.752  |
| 59  | 3  | 15   | 3       | 7   | 0.317  | 0.994 | 2.337 | 7.209   | 0.062  | 25.336  |
| 60  | 3  | 15   | 3       | 8   | 0.937  | 0.982 | 2.345 | 6.243   | 0.073  | 22.600  |
| 61  | 3  | 15   | 7       | 5.8 | 18.338 | 0.103 | 2.230 | -0.479  | 8.696  | 8.771   |
| 62  | 3  | 15   | 7       | 7   | 26.813 | 0.026 | 2.245 | -0.156  | 3.049  | 0.287   |
| 63  | 3  | 15   | 7       | 8   | 6.262  | 0.170 | 2.279 | -0.510  | 3.200  | 0.267   |
| 64  | 3  | 20   | 1       | 5.8 | 0.067  | 0.999 | 1.969 | 6.236   | 0.112  | 9.839   |
| 65  | 3  | 20   | 1       | 7   | 0.498  | 0.994 | 9.185 | -9.486  | -0.106 | 10.957  |
| 66  | 3  | 20   | 1       | 8   | 1.106  | 0.985 | 1.809 | 7.239   | 0.139  | 6.334   |
| 67  | 3  | 20   | 3       | 5.8 | -      | -     | -     | -       | -      | -       |
| 68  | 3  | 20   | 3       | 7   | 0.585  | 0.993 | 9.360 | -29.046 | -0.027 | -11.839 |
| 69  | 3  | 20   | 3       | 8   | 0.531  | 0.994 | 8.774 | -8.187  | -0.128 | 12.454  |
| 70  | 3  | 20   | 7       | 5.8 | 0.403  | 0.987 | 2.080 | 4.591   | 0.122  | 27.783  |
| 71  | 3  | 20   | 7       | 7   | 0.257  | 0.995 | 2.031 | 6.903   | 0.070  | 24.096  |
| 72  | 3  | 20   | 7       | 8   | 0.618  | 0.991 | 1.722 | 6.600   | 0.092  | 19.660  |
| 73  | 3  | 25   | 1       | 5.8 | 1.386  | 0.980 | 1.817 | 6.208   | 0.170  | 8.455   |
| 74  | 3  | 25   | 1       | 7   | 1.366  | 0.988 | 8.213 | -5.580  | -0.877 | 7.958   |
| 75  | 3  | 25   | 1       | 8   | 0.354  | 0.996 | 8.653 | -11.298 | -0.115 | 4.996   |
| 76  | 3  | 25   | 3       | 5.8 | 2.361  | 0.963 | 7.903 | -16.813 | -0.041 | -0.922  |

No. : 培養条件(1~108) 菌種: 1=04:K8, 2=ATCC17802 01株, 3=03:K6秋田A株, 4=03:K6秋田B株

sum: sum of squares  $\Sigma$  (実測値-推定値)<sup>2</sup> RR: 実測値と推定値の重相関係数

A, C, B, M: Gompertz式の係数 [Gompertz式=A+C×Exp(-Exp(-B×(t-M)))] : t=培養時間]

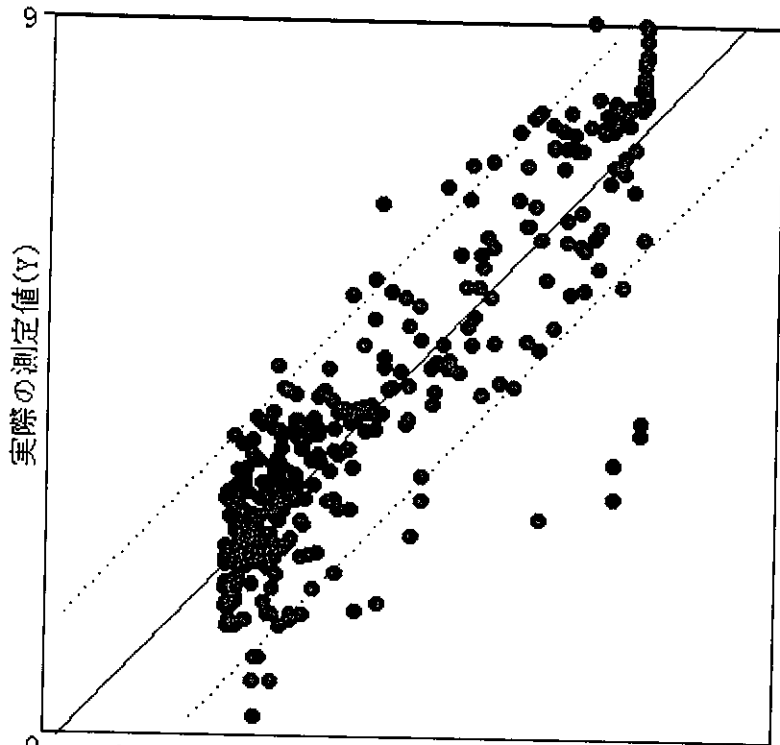
Table 1. 各培養条件ごとのゴンペルツ式による当てはめ(3/3)

| No. | 菌種 | 培養温度 | NaCl (%) | pH  | Sum    | RR    | A       | C          | B      | M        |
|-----|----|------|----------|-----|--------|-------|---------|------------|--------|----------|
| 77  | 3  | 25   | 3        | 7   | 0.698  | 0.993 | 8.321   | -6.378     | -0.278 | 9.265    |
| 78  | 3  | 25   | 3        | 8   | 0.482  | 0.995 | 8.610   | -7.694     | -0.186 | 8.783    |
| 79  | 3  | 25   | 7        | 5.8 | 1.093  | 0.983 | 1.621   | 6.604      | 0.089  | 21.231   |
| 80  | 3  | 25   | 7        | 7   | 1.160  | 0.986 | 1.789   | 6.655      | 0.131  | 12.532   |
| 81  | 3  | 25   | 7        | 8   | 2.315  | 0.973 | 8.176   | -7.223     | -0.116 | 17.878   |
| 82  | 4  | 15   | 1        | 5.8 | 0.211  | 0.994 | 2.681   | 101138.934 | 0.006  | 455.287  |
| 83  | 4  | 15   | 1        | 7   | 0.226  | 0.996 | 2.853   | 6.013      | 0.078  | 24.071   |
| 84  | 4  | 15   | 1        | 8   | 0.092  | 0.998 | 2.828   | 5.459      | 0.096  | 19.908   |
| 85  | 4  | 15   | 3        | 5.8 | 0.250  | 0.993 | 2.746   | 40.344     | 0.021  | 84.407   |
| 86  | 4  | 15   | 3        | 7   | 0.585  | 0.987 | 2.786   | 6.710      | 0.061  | 27.658   |
| 87  | 4  | 15   | 3        | 8   | 1.922  | 0.956 | 3.716   | 3.902      | 0.266  | 27.250   |
| 88  | 4  | 15   | 7        | 5.8 | 0.343  | 0.794 | 2.817   | -0.883     | 0.189  | 6.351    |
| 89  | 4  | 15   | 7        | 7   | 0.624  | 0.529 | 2.792   | -0.531     | 8.699  | 8.758 *  |
| 90  | 4  | 15   | 7        | 8   | 2.044  | 0.285 | 2.863   | -0.526     | 3.197  | 0.217 *  |
| 91  | 4  | 20   | 1        | 5.8 | 1.183  | 0.969 | -10.571 | 1627.359   | 0.001  | 1111.263 |
| 92  | 4  | 20   | 1        | 7   | 0.677  | 0.992 | 8.413   | -6.127     | -0.200 | 11.961   |
| 93  | 4  | 20   | 1        | 8   | 0.923  | 0.987 | 3.071   | 5.392      | 0.204  | 8.190    |
| 94  | 4  | 20   | 3        | 5.8 | 2.320  | 0.945 | 1.063   | 68039.211  | 0.003  | 846.656  |
| 95  | 4  | 20   | 3        | 7   | 1.311  | 0.981 | 8.718   | -17.555    | -0.039 | -0.764   |
| 96  | 4  | 20   | 3        | 8   | 2.091  | 0.974 | 8.244   | -6.042     | -0.182 | 12.272   |
| 97  | 4  | 20   | 7        | 5.8 | 0.926  | 0.964 | 2.177   | 4.341      | 0.102  | 29.049   |
| 98  | 4  | 20   | 7        | 7   | 0.338  | 0.992 | 1.836   | 8.322      | 0.047  | 17.631   |
| 99  | 4  | 20   | 7        | 8   | 0.089  | 0.997 | 2.617   | 4.846      | 0.112  | 16.609   |
| 100 | 4  | 25   | 1        | 5.8 | 0.752  | 0.986 | 8.220   | -17.945    | -0.035 | -3.766   |
| 101 | 4  | 25   | 1        | 7   | 0.387  | 0.996 | 8.835   | -8.799     | -0.138 | 7.450    |
| 102 | 4  | 25   | 1        | 8   | 0.907  | 0.991 | 2.496   | 6.049      | 0.570  | 5.340    |
| 103 | 4  | 25   | 3        | 5.8 | 0.075  | 0.999 | 8.412   | -6.253     | -0.157 | 14.919   |
| 104 | 4  | 25   | 3        | 7   | 1.140  | 0.986 | 8.322   | -6.558     | -0.216 | 8.286    |
| 105 | 4  | 25   | 3        | 8   | 0.575  | 0.993 | 8.652   | -7.887     | -0.163 | 7.738    |
| 106 | 4  | 25   | 7        | 5.8 | 2.010  | 0.968 | 1.966   | 6.420      | 0.093  | 22.807   |
| 107 | 4  | 25   | 7        | 7   | 48.732 | 計算不能  | 4.834   | -1.162     | -1.569 | -3.400 * |
| 108 | 4  | 25   | 7        | 8   | 7.265  | 0.923 | 3.027   | 5.040      | 0.401  | 12.862   |

No. : 培養条件(1~108) 菌種:1=04:K8, 2=ATCC17802 O1株, 3=03:K6秋田A株, 4=03:K6秋田B株

sum: sum of squares  $\Sigma$  (実測値-推定値)<sup>2</sup> RR: 実測値と推定値の重相関係数

A, C, B, M: Gompertz式の係数 [Gompertz式= $A+C \times \text{Exp}(-\text{Exp}(-B \times (t-M)))$  : t=培養時間]



n= 357  
 R= .898618  
 95% confidence interval  
 at mean of X= 1.50461  
 $Y = 1.07855 X - .200912$

line of regression(—)  
 and  
 95%confidence interval(----)

XY(min.)= 0 / 0  
 XY(max.)= 9.000 / 9.000

菌数の単位は常用対数(Log)

48培養条件の各最大値の平均値をGompertz式の  
 係数Cと置いて求めた推定値(X)

Fig 1. 腸炎ビブリオ菌数の予測を目的とした一般化した  
 Gompertz式による推定値と実測値との関連



実際の測定値(Y)



n= 893  
R= .903877  
95% confidence interval  
at mean of X= 1.6336  
Y= 1.19522 X + -.662617

XY(min.)= -.05 /-.05  
XY(max.)= 9.550/ 9.550

48培養条件の各最大値の平均値をGompertz  
式の係数 cと置いて求めた推定値(X)  
106培養条件の 893データを推定

line of regression(----) and 95%confidence interval(----)

48培養条件から作成した予測式を用いて106培養条件のデータを推定

農産物の微生物汚染実態に関する研究

分担研究者 小沼博隆 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

研究要旨

研究事業は、平成8年5～7月にかけて岡山、広島、大阪（堺市）の小学校を中心に勃発した腸管出血性大腸菌O157食中毒等食品由来の新興・再興感染症による健康被害を防止し、国民の不安を解消して安全な食生活の確保を図ることを目的としている。わが国では、カイワレ、メロン、オカカサラダ、レタスサラダ、ポテトサラダおよびキャベツサラダといった農作物を含む食材によって健康被害が発生している。また、欧米諸国でもレタス、アルファルファなどの生野菜やアップルジュースといった今まであまり問題にされていなかった農産物が腸管出血性大腸菌O157やサルモネラ食中毒の原因食品として疑われ、その危険性が指摘されている。しかし、その実態は明らかでないことから、各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにすることが急務である。そこで、農産物中の一般細菌数、大腸菌に加え、腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ菌、ウェルシュ菌およびリステリア菌を迅速かつ確実に検出することのできる検査法を確立し、その検査法を用いて今まで知られていなかった各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにする。今年度は個々の野菜類を調べるのではなく、大量の野菜を洗浄した洗浄水に絞って一般細菌数、大腸菌、腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ、ウェルシュ菌およびリステリア菌の汚染実態調査研究を行い、以下の結果を得た。

1. 各施設の野菜洗浄水の一般細菌数は、 $<3.0 \times 10^1 \sim 9.8 \times 10^7$  / mlの範囲にあり、大部分は $10^2 \sim 10^5$  / mlレベルの範囲であった。
2. 野菜洗浄水の大腸菌は、洗浄水193検体中5検体に検出された。
3. 野菜洗浄水の腸管出血性大腸菌O157汚染はみられなかった。
4. 野菜洗浄水のサルモネラ菌は、大根、ゴボウおよびブロッコリーなどの洗浄水から検出された。検出されたサルモネラの血清型は、*Salmonella Infantis*であった。
5. 野菜洗浄水のリステリア菌は、ジャガイモ、キャベツ、ほうれん草、小松菜、キュウリなどの洗浄水から検出された。
6. 野菜洗浄水のウェルシュ菌は、ほうれん草、キャベツ、なばな、ゴボウなどから193検体中5検体に検出された。
7. 有機肥料から腸管出血性大腸菌O157は検出されなかったが、サルモネラ菌とリステリア菌が検出された。しかし、堆肥製造方法を開放式堆肥舎から密閉式堆肥塔に変えてからはいずれの菌も検出されなくなった。
8. 病原菌汚染肥料を施肥した野菜圃場の土壌中のサルモネラ、腸管出血性大腸菌O157およびリステリア菌の消長を4ヶ月間にわたって調べた結果、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌O157は全く検出されなかったが、リステリア菌 (*Listeria innocua*) が検出された。
9. 病原菌汚染肥料を施肥した圃場で栽培された、ほうれん草についてサルモネラ菌、腸管出血性大腸菌O157およびリステリア菌の検出を試みたが検出されなかった。

以上の結果から、野菜類は低頻度であるが病原菌汚染を受けていることが明らかとなった。また、堆肥製造方法を従来から因習的に行われてきた解放式堆肥舎から密閉式堆肥塔に変えることによって、病原菌を効率よく殺菌できる可能性があることを突き止めた。

#### 協力研究者

宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所）  
金子誠一（東京都立衛生研究所）  
正木宏幸、齋藤章鳴（埼玉県衛生研究所）  
増田高志（静岡県環境衛生科学研究所）  
後藤公吉（新潟県保健環境科学研究所）

#### A. 研究の目的

本研究事業は、平成8年5～7月にかけて岡山、広島、大阪（堺市）の小学校を中心に勃発した腸管出血性大腸菌O157食中毒等食品由来の新興・再興感染症による健康被害を防止し、国民の不安を解消して安全な食生活の確保を図ることを目的としている。

わが国では、カイワレ、メロン、オカカサラダ、レタスサラダ、ポテトサラダおよびキャベツサラダといった農作物を含む食材によって健康被害が発生している。また、欧米諸国でもレタス、アルファルファなどの生野菜やアップルジュースといった今まであまり問題にされていなかった農産物が腸管出血性大腸菌O157やサルモネラ食中毒の原因食品として疑われ、その危険性が指摘されている。しかし、その実態は明らかでないことから、各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにすることが急務である。しかしながら、農産物から腸管出血性大腸菌O157やサルモネラを簡易・迅速に、しかも効率よく検出する試験法は確立されていない。そこで、農産物中の一般細菌数、大腸菌に加え、腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ菌、ウェルシュ菌およびリステリア菌を迅速かつ確実に検出することのできる検査法を確立し、その検査法を用いて今まで知られていなかった各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにする。今年度は個々の野菜類を調べるのではなく、大量の野菜を洗浄した洗浄水に絞って一般細菌数、大腸菌、腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ、ウェルシュ菌および

リステリア菌の汚染実態を明らかにする。

#### B. 材料および方法

##### 1) 検査材料

前回の成績から野菜の病原菌汚染頻度は、卵のサルモネラ (*Salmonella Enteritidis*) 同様に少ないことが考えられたので、シンク中で大量の野菜を洗浄した洗浄済み水を検査材料とした。また、個々の野菜については、泥付き野菜を検査材料とした。今回、調査対象とした洗浄済み水の内訳は以下の通りである。野菜・果物等の種類は、1) もやし、2) にんじん、3) なら、4) たまねぎ、5) キャベツ、6) ダイコン、7) ほうれん草、8) いよかん、9) キウイフルーツ、10) じゃがいも、11) きよみオレンジ、12) 長ネギ、13) ゴボウ、14) ブロッコリ、15) セロリ、16) 里芋、17) レタス、18) リンゴ、19) キュウリ、20) 白菜、21) いちご、22) バナナ、23) パセリ、24) 根しょうが、25) 長芋、26) かぶ、27) サニーレタス、28) カリフラワー、29) なばな、30) 小松菜、31) ちんげん菜である。泥付き野菜では、1) 小松菜、2) 白菜、3) キャベツ、4) きゅうり、5) きくらげ、6) ダイコン、7) ごぼう、8) 根みつば、9) 葉にんじん、10) 葉ねぎ、11) にんじん、12) ちんげん菜、13) かぶ、14) ごぼう、15) チェリートマト、16) サンチェリー、17) ミニトマト、18) キャンディトマトなどである。また、野菜類の栽培に使用される堆肥および畑の土壌についても検査材料とした。

##### 2) 研究協力施設

東京都衛生研究所（都衛研）、埼玉県衛生研究所（埼玉衛研）、静岡県環境衛生科学研究所（静岡衛研）、新潟県食肉衛生検査センターおよび国立医薬品食品衛生研究所の5施設である。

##### 3) 検体採取時期

平成11年11月～平成12年5月である。

#### 4) 検体採取施設

小学校、中学校、学校給食センター、病院給食および民間給食施設などである。

#### 5) 試料の調製

各種野菜洗淨水を試料原液とした。

一般細菌数測定にあたっては、試料原液を適宜10倍段階希釈する標準寒天培地混釈法を行った。大腸菌検出にあたっては、試料原液10ml、1ml、0.1mlのそれぞれをダーラム管入りEC broth (10ml) に接種した。

腸管出血性大腸菌O157、サルモネラおよびリステリア菌の検出にあたっては、各種野菜洗淨水(試料原液)300mlを濾過(フィルター;ポアサイズ0.45ミクロン)した後、そのフィルターをBuffered Peptone Water (BPW) 100mlで前増菌培養(36±1℃・6時間・20~24時間)した。

#### 6) 一般細菌数試験

各種野菜洗淨水(試料原液)を適宜10倍段階希釈する標準寒天培地混釈法で行い、35℃・48時間培養後、菌数計測を行った。

#### 7) 大腸菌検出試験

試料原液10ml、1ml、0.1mlのそれぞれをダーラム管入りEC broth (10ml) に接種し、44.5℃・48時間培養した。培養後、ガス発生のみられたものは、その1白金耳をEosin Methylene Blue (EMB) 平板培地に画線塗沫、35℃・24時間培養後、大腸菌の定型的集落を釣菌してシモンズクエン酸ナトリウム斜面寒天培地と普通寒天斜面培地に接種し35℃・24時間培養した。培養後、無変化(クエン酸ナトリウムを利用できない)のものを大腸菌陽性と推定し、合い対の普通寒天斜面培地に発育した菌をATB GN(自動同定装置)を用いて同定した。

#### 8) 腸管出血性大腸菌O157検出法

腸管出血性大腸菌O157検出法は、各種野菜洗淨水(試料原液)300mlを濾過したフィルターをBuffered Peptone Water (BPW) 100mlで前増菌培養(36±1℃・20~24時間)した後、その培養液1mlを10mlノボピオシン加mEC broth (NmEC broth) に接種し、42℃・20~24時間培養した。それ以降の試験方法は厚生省法と同様、セフェキシムアテルル酸塩加ソルビトールマッコンキー寒天培地(CT-SMAC)に画線塗沫後、36±1℃・20~24時間培養した。

#### 9) サルモネラ検出法

各種野菜洗淨水(試料原液)300mlを濾過したフィルターをBuffered Peptone Water (BPW) 100mlで前増菌培養(36±1℃・6時間・20~24時間)した後、その培養液1mlづつを10ml Tetrathionate Broth (TT) 培地、10ml Rappaport-Vassiliadis Enrichment broth (RV) 培地にそれぞれ接種し、42℃±0.5℃の温度で22時間±2時間培養した。培養後、その培養液の1白金耳量を2種類の分離平板培地(硫化水素の産生により判定する培地(XLD培地;Oxoid)および硫化水素非産生性であってもサルモネラと判定できる培地(クロモアガーサルモネラ;CHROMagar社)にそれぞれ画線塗沫し、36℃±1℃の温度で18~24時間培養した。培養後、各分離平板培地に発育・増殖した定型的集落を釣菌して、TSI培地、Lysine Indole Motility Medium (LIM培地)あるいはLysine Iron Agar (LIA(リジン鉄寒天)培地)等に接種し、36℃±1℃の温度で18~24時間培養する。培養後、TSI培地にあつては斜面部が赤変、高層部黄変・黒変・ガス産生(高層部における気泡又は亀裂の発生)したものを、LIM培地にあつては培地全体が紫変、インドール陰性、運動性陽性(まれに陰性あり)のものを、LIA培地にあつては培地全体が紫変、高層部黒変のものをサルモネラと判定し、血清学的試