

表2c

殻付き卵各流通経路における時間・温度経過

流通経路	確率分布関数	専門家からの聞き取りデータ				
		時間(日)		温度(°C)		
		最小	最大	最小	最大	
<b>生協から家庭直送</b>						
農場	=RiskUniform(0,3)	=RiskPert(0,temp dist,35)	0	3	0	35
生協	=RiskUniform(1,3)	=RiskPert(5,25,30)	1	3	5	30
<b>GPセンター-小売店-家庭</b>						
農場	=RiskUniform(0,3)	=RiskPert(0,temp dist,35)	0	3	0	35
GPセンター	=RiskUniform(1,2)	=RiskPert(5,temp dist,30)	1	2	5	30
小売店	=RiskUniform(1,3)	=RiskPert(5,25,35)	1	3	5	35
<b>GPセンター-問屋-小売店-家庭</b>						
農場	=RiskUniform(0,3)	=RiskPert(0,temp dist,35)	0	3	0	35
GPセンター	=RiskUniform(1,5)	=RiskPert(5,temp dist,30)	1	5	5	30
問屋・市場	=RiskUniform(2,6)	=RiskPert(0,25,35)	2	6	0	35
小売店	=RiskUniform(1,3)	=RiskPert(5,25,30)	1	3	5	30
<b>GPセンター-製造業者</b>						
農場	=RiskUniform(0,3)	=RiskPert(0,temp dist,35)	0	3	0	35
GPセンター	=RiskUniform(1,5)	=RiskPert(5,temp dist,30)	1	5	5	30
問屋・市場	=RiskUniform(2,6)	=RiskPert(0,25,35)	2	6	0	35
製造業者での保存	=RiskUniform(1,7)	=RiskPert(5,25,30)	1	7	5	30

日本の年間平均気温

平成10年度版理科年表データ

最低観測地点	全国平均	最高観測地点
5.7	13.5	22.4
確率分布関数 (temp dist)	=RiskPert(5.7,13.5,22.4)	

流通後の汚染卵中のSE菌数

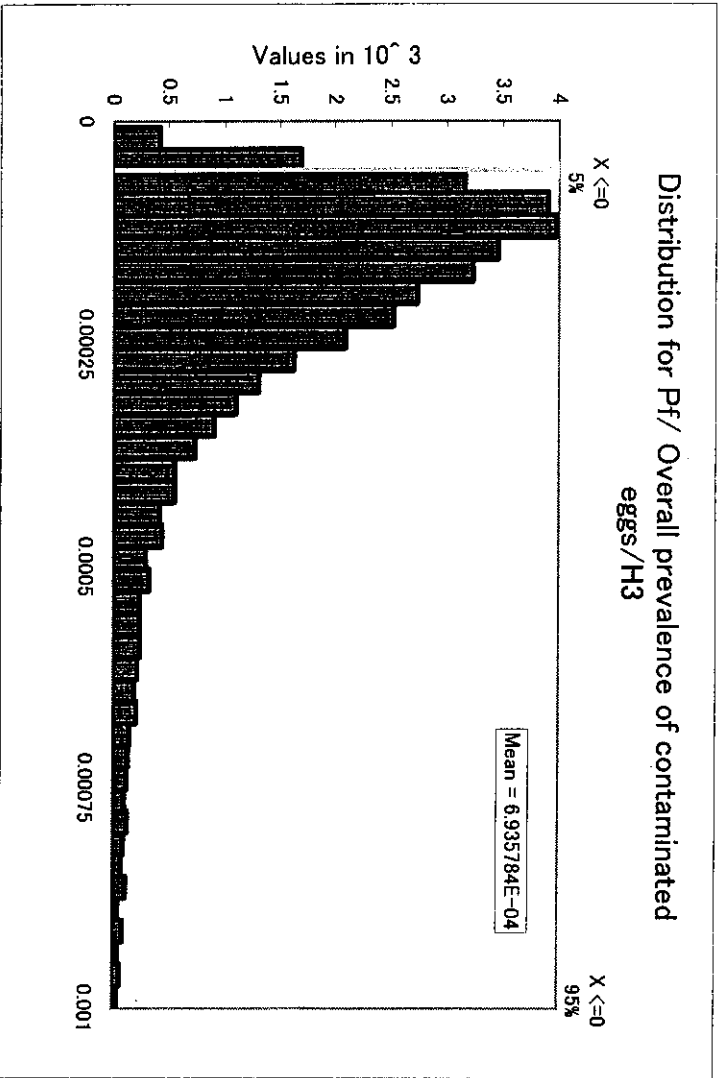
= (各流通経路出口におけるSE菌数\*殻付き卵全体に占める割合(%))の合計

表2d

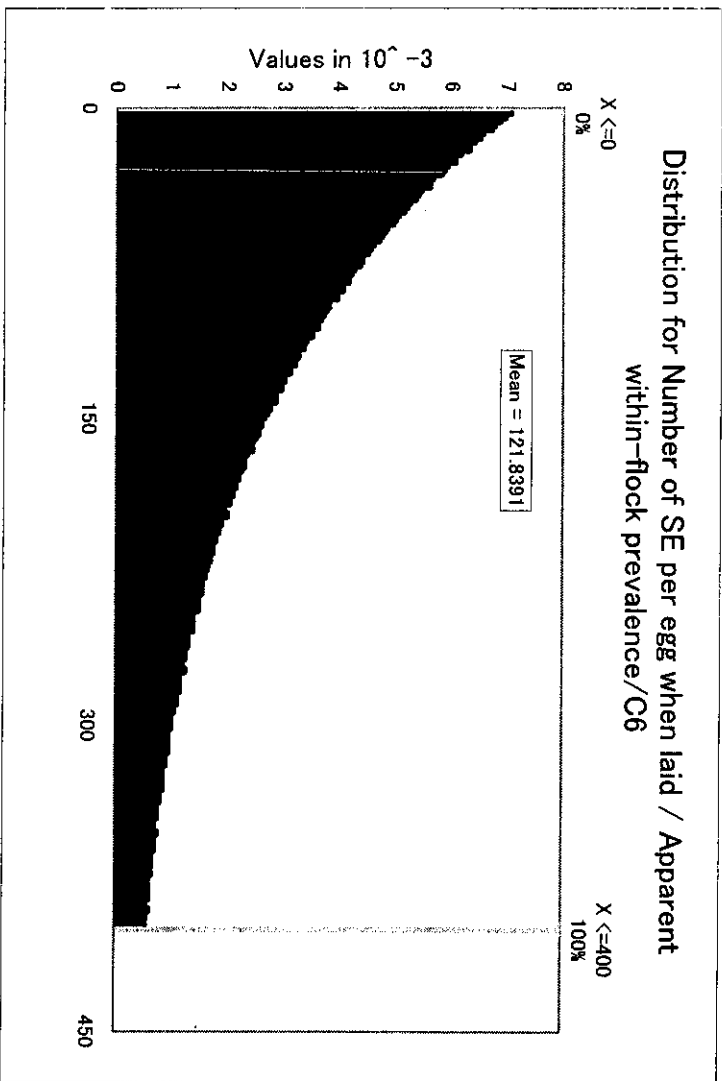
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	<p>日本の家庭で、卵が生で消費される確率は？</p>												
2	<p>年間一人当たり家庭での卵消費量</p>												
3	<p>(家計調査等より、平成10年度本研究報告書において推計)</p>												
4	<p>月間一人当たり家庭での生卵消費量</p>												
5	<p>(電話アンケートより)</p>												
6	<p>生卵個数 × 人数 z</p>												
7	<p>相対頻度 y (x-mean)<sup>2</sup></p>												
8	0	392	0.426087	11.4641127									
9	0.5	32	0.0347826	8.32824315									
10	1	96	0.1043478	5.69237358									
11	2	93	0.101087	1.92063445									
12	3	58	0.0630435	0.14889532									
13	4	67	0.0728261	0.37715619									
14	5	36	0.0391304	2.60541706									
15	6	17	0.0184783	6.83367793									
16	7	7	0.0076087	13.0619388									
17	8	18	0.0195652	21.2901997									
18	9	4	0.0043478	31.5184605									
19	10	49	0.0532609	43.7467214									
20	11	2	0.0021739	57.9749823									
21	12	16	0.0173913	74.2032431									
22	13	0	0	92.431504									
23	14	2	0.0021739	112.659765									
24	17	9	0.0097826	185.344547									
25	22	19	0.0206522	346.485852									
26	27	3	0.0032609	557.627156									
27	30	16	0.0173913	708.311939									
28	Sum people 936												
29	Sum people 936												

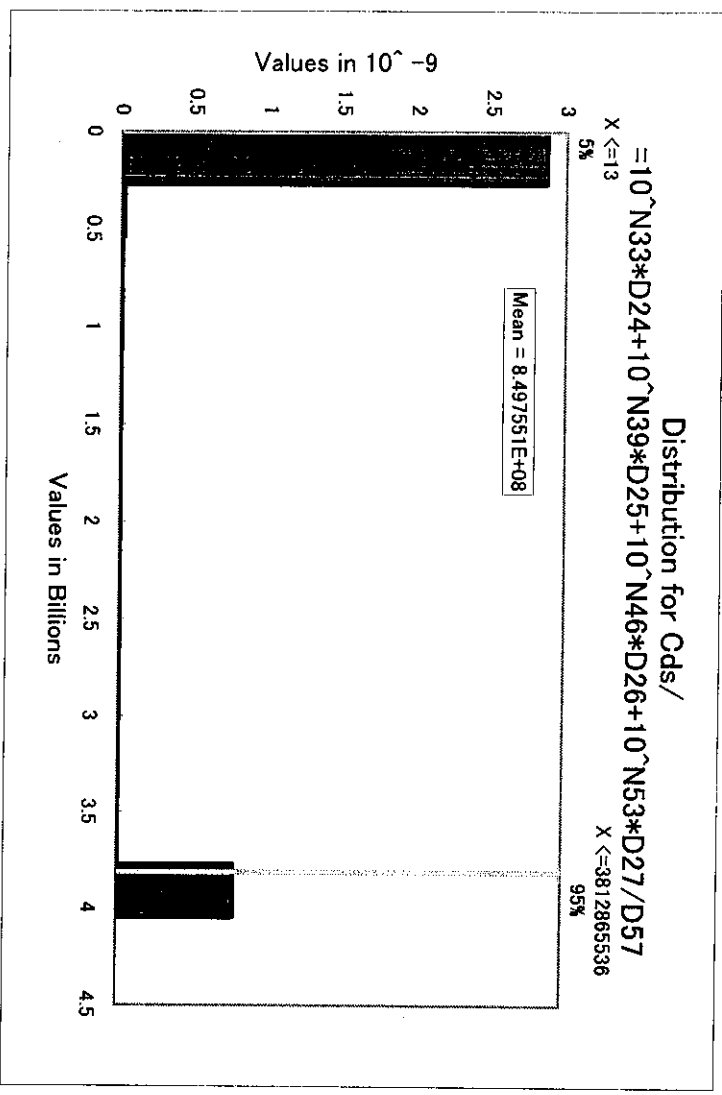
相対頻度 y = z/SUM(\$C\$7:\$C\$26)	= z/936
Mean	3.38586957 =SUMPRODUCT(B8:B27,D8:D27)
Stdev	5.82903547 =SQRT(SUMPRODUCT(E8:E27,D8:D27))
Sum 936 Discretes	#NAME? =RiskNormal(936*H7,SQRT(936)*H8)
Mean of true distribution	#NAME? =I10/936
Probability an egg is consumed raw	#NAME? =I11*12/178.65



Minimum	6.56E-06
Mean	6.94E-04
Maximum	1.607506
Std Dev	1.65E-02
Variance	2.72E-04
Skewness	92.75362
Kurtosis	9003.255
Mode	2.95E-04
Left X	5.52E-05
Left P	5%
Right X	1.16E-03
Right P	95%
Diff. X	1.10E-03
Diff. P	90%
5th Perc.	5.52E-05
95th Perc.	1.16E-03
#Errors	0

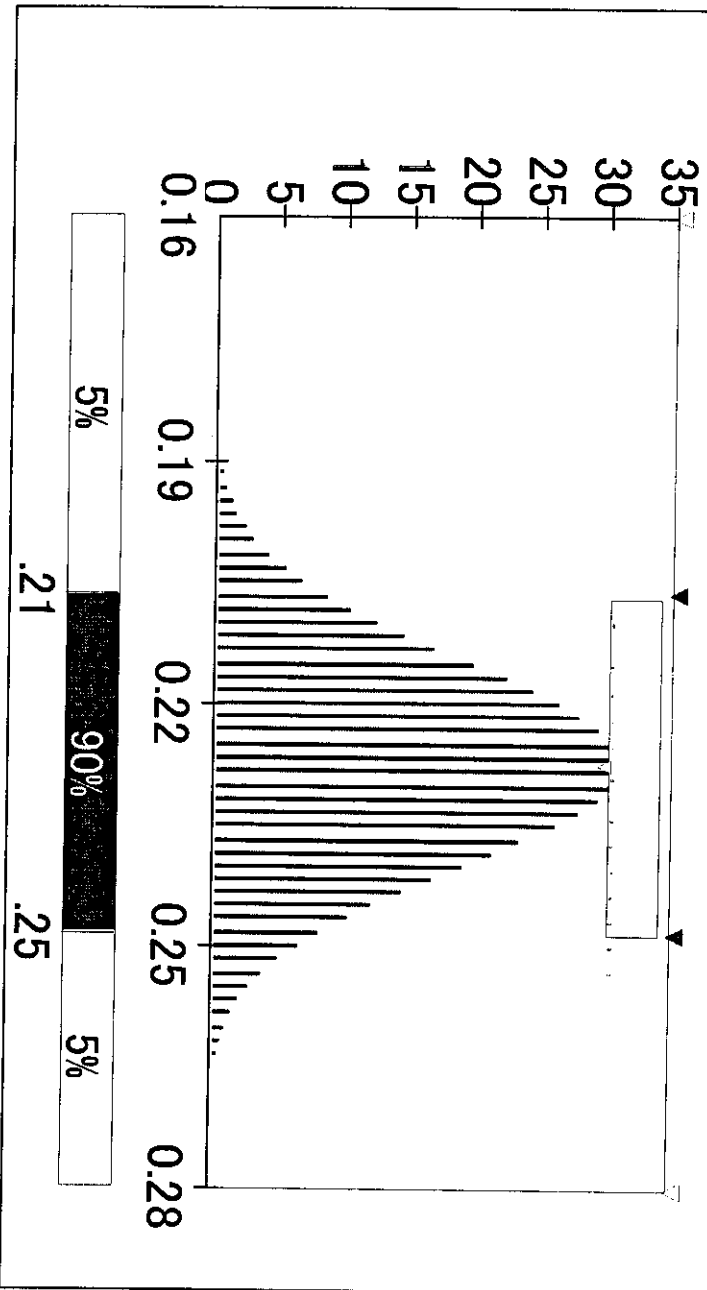


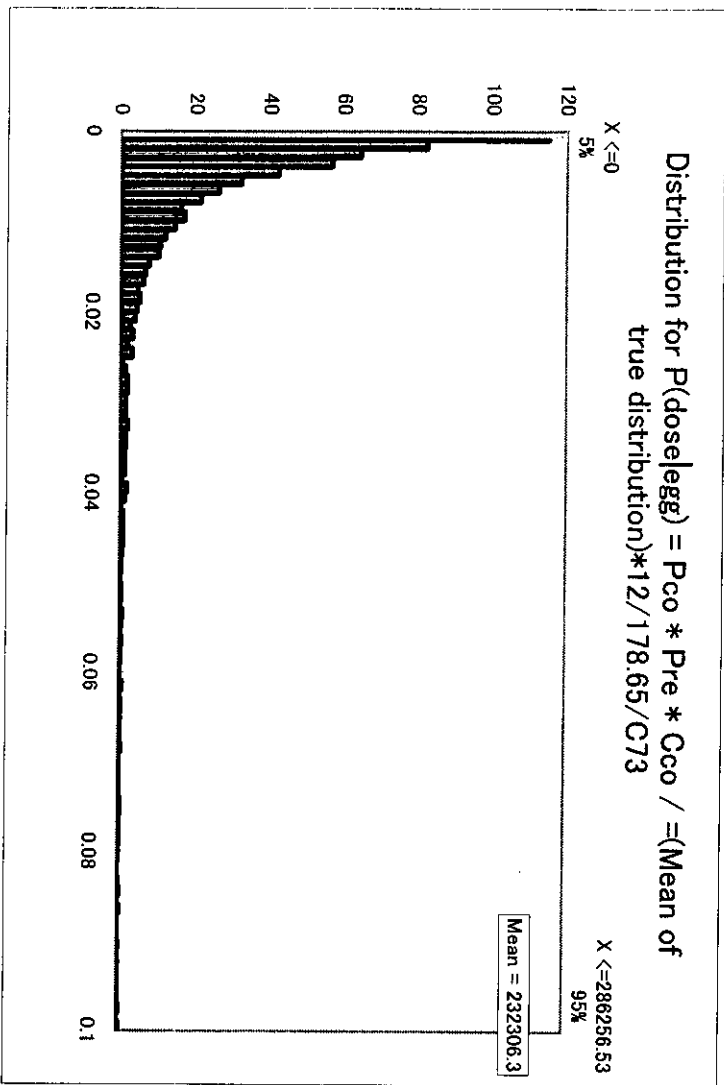
Minimum	1.008707
Mean	121.8391
Maximum	399.9428
Std Dev	98.49252
Variance	9700.775
Skewness	0.879142
Kurtosis	2.901533
Mode	1.706561
Left X	0
Left P	0%
Right X	400
Right P	100%
Diff. X	400
Diff. P	100%
5th Perc.	8.217836
95th Perc.	324.7694
#Errors	0



Minimum	1
Mean	8.50E+08
Maximum	4.05E+09
Std Dev	1.56E+09
Variance	2.44E+18
Skewness	1.373041
Kurtosis	2.91014
Mode	3.81E+09
Left X	13
Left P	5%
Right X	3.81E+09
Right P	95%
Diff. X	3.81E+09
Diff. P	90%
5th Perc.	13
95th Perc.	3.81E+09
#Errors	0

Distribution for Probability an egg is consumed raw/K13





Minimum	9.85E-06
Mean	232306.3
Maximum	1.41E+09
Std Dev	1.42E+07
Variance	2.01E+14
Skewness	99.13142
Kurtosis	9881.215
Mode	1.27E-04
Left X	4.10E-04
Left P	5%
Right X	286256.5
Right P	95%
Diff. X	286256.5
Diff. P	90%
5th Perc.	4.10E-04
95th Perc.	286256.5
#Errors	0

表 3

frozen

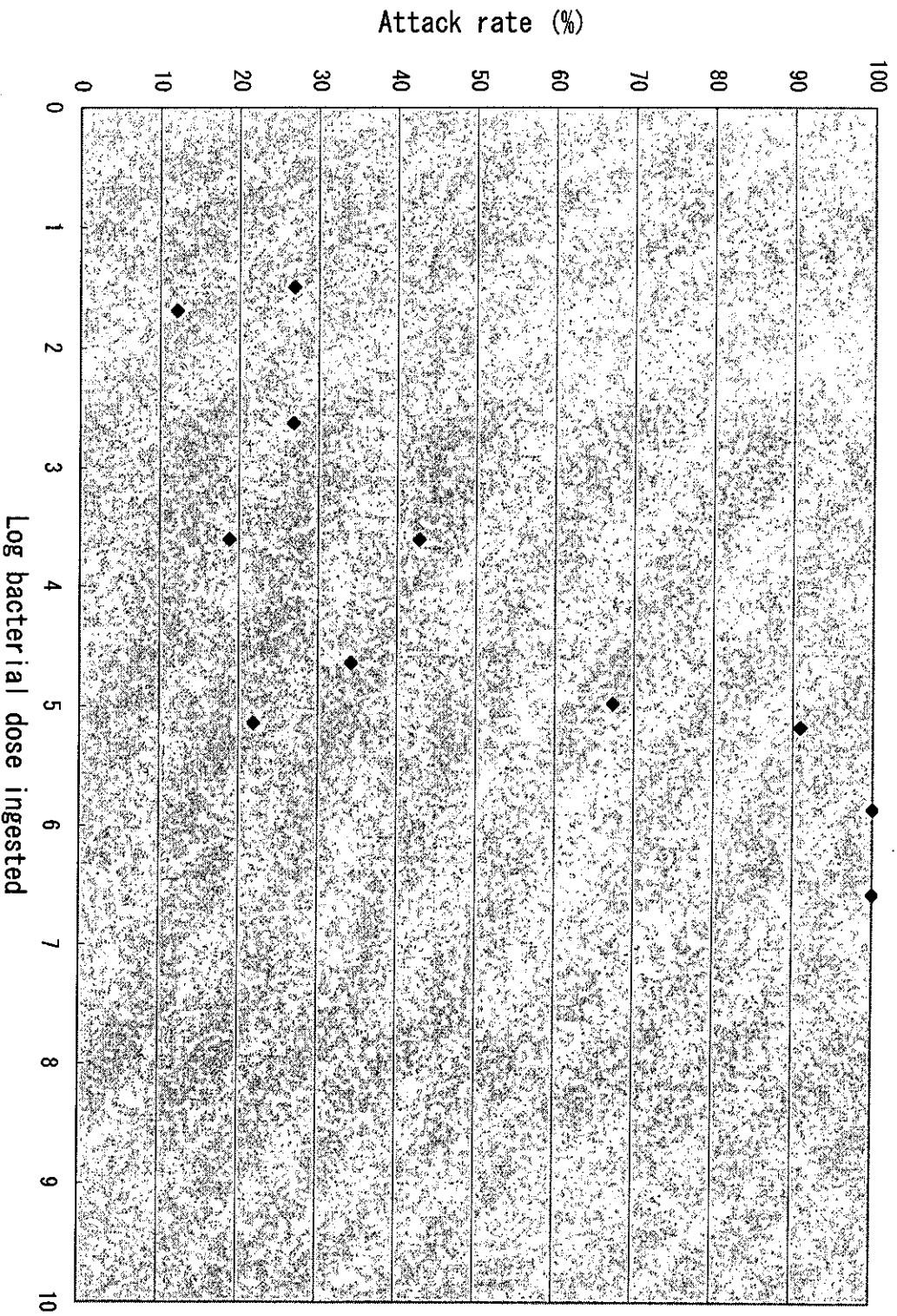
Case No.	Dose	Log dose	Attack rate (%)
4	49	1.69	12.11
#VALUE!		4.64	34.21
#VALUE!		3.61	18.75
6	4050	3.61	42.74
#VALUE!		1.49	26.92
11	140000	5.15	21.87
16	150000	5.18	90.91
17	96000	4.98	67.31
#VALUE!		5.86	100.00
27	3800000	6.58	100.00
#VALUE!		2.62	26.87

not frozen

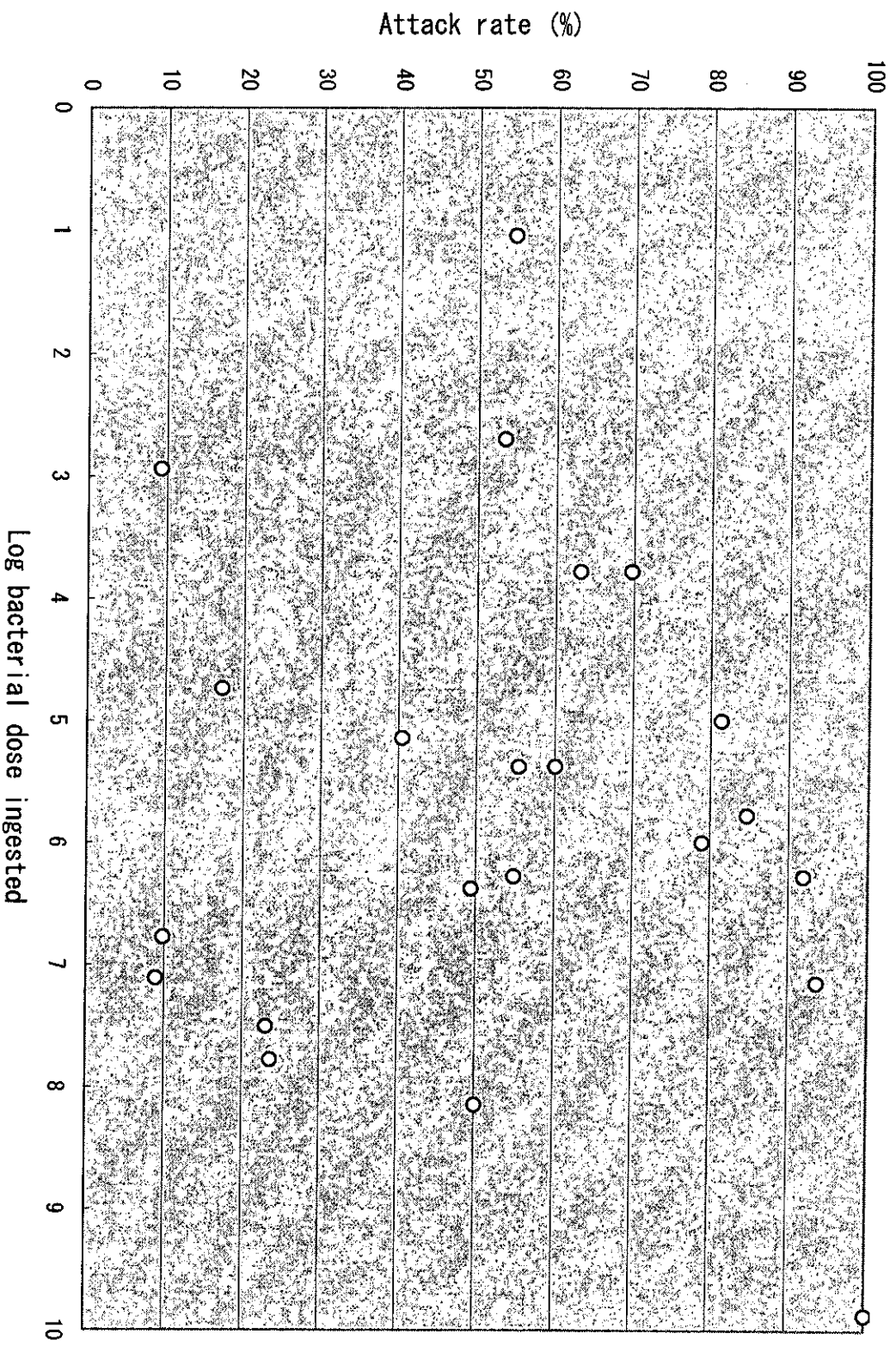
Case No.	Dose	Log dose	Attack rate (%)
#VALUE!		2.94	9.16
10	60000000	7.78	23.56
#VALUE!		6.28	54.78
13	6000000	6.78	9.73
#VALUE!		5.38	60.00
#VALUE!		3.78	63.05
19	11	1.04	54.55
20	32000000	7.51	22.96
21	1000000	6.00	78.95
23	1900000	6.28	91.87
24	14000000	7.15	93.59
25	240000	5.38	55.34
26	100000	5.00	81.30
29	13000000	7.11	8.85
#VALUE!		5.78	84.62
32	55000	4.74	17.13
#VALUE!		5.15	40.40
34	2400000	6.38	49.37
35	6000	3.78	69.64
37	140000000	8.15	50.00
38	500	2.70	53.33
39	7500000000	9.88	100.00



Dose-response relationship in outbreaks where foods were frozen



Dose-response relationship in outbreaks where foods were not frozen



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

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、欧米諸国ではレタス、アルファルファ、パセリ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:H7（EHEC 0157）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。しかしながら、各種農産物の病原菌汚染実態は明らかにされていないことから、平成10、12年度の2年間にわたり農産物中の大腸菌、EHEC 0157、サルモネラ菌、ウェルシュ菌およびリステリア菌の病原菌汚染実態を調べ、大腸菌の検出された野菜は48種類中27種類（56.3%）に検出された。その中でも特に大腸菌汚染率が高かった野菜は、もやし、オクラ、あさつきおよびミニトマトであったことを報告した。また、野菜洗浄水中の病原菌汚染調査では、EHEC 0157汚染はみられなかったが、大根、ゴボウおよびブロッコリーなどからサルモネラ菌が、ジャガイモ、キャベツ、ほうれん草、小松菜、キュウリなどからリステリア菌が、ほうれん草、キャベツ、なばな、ゴボウなどからウェルシュ菌がそれぞれ検出されたことを報告した。そこで今年度は、①野菜種子が病原菌に汚染された場合の種子の保存中における菌数の変化ならびにその種子が生育した場合の野菜の可食部に検出されるか否かおよび検出された時の菌数測定。②生食用野菜に汚染していると考えられる病原菌（EHEC 0157、サルモネラ菌）が如何なる条件の時に最も増殖するのか、また、③それらの効果的な洗浄、殺菌方法の検討を含めて調査研究を行い、以下の結果を得た。

1. 芽野菜の種子におけるEHEC 0157およびサルモネラ菌は、種子の保存が8ヶ月間においても汚染菌数が $10^4$ cfu/10g程度であれば種子中で生存し、生育した芽野菜の可食部に $10^7$ cfu/g以上の高い菌数で汚染菌が生存することが示された。また、汚染菌量が $10^2$ cfu/10gと低い場合でも可食部に菌が生存する場合があることが示された。これらのことから、いったん種子が食中毒細菌に汚染されると長期間の保存によっても種子に生存すること、それが芽野菜になった場合の可食部にも多くの菌が生存することが明らかになった。これらのことを考えて、収穫時の種子の衛生、保存種子の殺菌処置、生育工程での殺菌処理および芽野菜の摂食時の加熱等が重要であると考えられた。
2. 野菜洗い液中でのサルモネラおよびEHEC 0157の増殖態度を調べたところ、野菜洗い液中でのサルモネラの増殖性は、レタスおよびキュウリで速く、25℃保存では4～6時間で10倍以上に増殖し、30℃以上の2時間

保存で10倍以上、4時間で100倍以上に増殖した。

野菜洗い液中でのEHEC 0157の増殖性は、キュウリおよびダイコンで速く、25℃保存では2時間で10倍以上に増殖し、30℃以上保存で4時間で100倍以上に増殖した。

ホウレン草ゆで汁中ではサルモネラおよびEHEC 0157は急激に増殖することが分かった。また、栄養源であるオカカを加えた場合はEHEC 0157は2時間で10倍程度に増殖し、4時間で100倍以上に増殖したが、サルモネラの増殖スピードはほとんど変わらず、むしろ遅くなる傾向がみられた。

3. 野菜類に汚染した病原菌を除去する目的で、*Salmonella*およびEHEC 0157を用いて試験した結果、野菜洗い液中においては、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の濃度200ppmで5分以上感作させないと殺菌効果が見られないことがわかった。また、野菜の洗い液は、野菜の種類によって流出する細胞質等の量が異なり、殺菌効果に差がみられたことから、野菜の種類に応じてNaClO濃度を調整するような殺菌方法を検討する必要があると考えられる。

## 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、齋藤章鴨 (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)

仁科 徳啓 (東海大短期大学静岡校)

工藤由起子 (国立感染症研究所)

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 (EHEC 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。しかしながら、各種農産物の病原菌汚染実態は明らかにされていないことから、平成10、12年度の2年間にわたり農産物中の大腸菌、EHEC O157、サルモネラ菌、ウェルシュ菌およびリステリア菌の病原菌汚染実態を調べ、大腸菌の検出された野菜は48種類中27種類 (56.3%) に検出された。その中でも特に大腸菌汚染率が高かった野菜は、もやし、オクラ、あさつきおよびミニトマトであったことを報告した。また、野菜洗浄水中の病原菌汚染調査では、EHEC O157汚染はみられなかったが、大根、ゴボウおよびブロッコリーなどからサルモネラ菌が、ジャガイモ、キャベツ、ほうれん草、小松菜、キュウリなどからリステリア菌が、ほうれん草、キャベツ、なばな、ゴボウなどからウェルシュ菌がそれぞれ検出されたことを報告した。そこで今年度は、①野菜

## A. 研究目的

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、欧米諸国ではレタス、アルファルファ、パセリなどの

種子が病原菌に汚染された場合の種子の保存中における菌数の変化ならびにその種子が生育した場合の野菜の可食部に検出されるか否かおよび検出された時の菌数測定。②生食用野菜に汚染していると考えられる病原菌（EHEC O157、サルモネラ菌）が如何なる条件の時に最も増殖するのか、また、③それらの効果的な洗浄、殺菌方法の検討を含めて調査研究を行い、以下の結果を得た。

## B. 材料および方法

B-1 食中毒細菌汚染種子の保存後における種子中および生育後の可食部中の汚染菌の生存性についての研究に関する材料および方法は、以下の如くである。

1) 種子：市販のカイワレ大根、アルファルファ、ガーデンクレスの種子を用いた。

2) 菌株：*Escherichia coli* O157 : H7 (人由来株) および *Salmonella* Enteritidis (人由来株) を供試した。

3) 接種菌液の作製：各菌株をトリプチケース・ソイ・ブロス (TSB、Difco) で 37 °C 18 時間培養した培養液を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、日水) で 10 段階希釈して  $10^3$  または  $10^5$  に希釈した。この菌液 (約  $10^5$  または  $10^3$  cfu/ml) を接種菌液とした。接種菌液の菌数の確認は  $10^5$  希釈して作成した接種菌液をさらに 10 倍希釈しその液 0.1ml を TSA (5 枚) に塗抹し、37 °C 培養後に生育コロニー数を測定して求めた。

種子への菌液の接種：滅菌シャーレに種子 10g をそれぞれ測り取り、各菌液 0.1ml を数箇所に分けて種子に接種した。接種後、安全キャビネット内で室温にて 1 時間風乾し、蓋をして 4 °C (湿度 40 %) にて保存した。各種子、菌種および菌濃度

の組み合わせにおいて 30 検体ずつ作製した。接種直後および 1、2、4、8 ヶ月後に保存した種子を取り出し、種子中の菌数および種子が生育した時の可食部の菌数を測定した。

4) 保存種子中の菌数の測定：菌を接種し保存した種子の各種類について、各 3 検体 (1 検体 : 10g) ずつをストマッカー袋に入れ、TSB (90ml) を加えた後に手で揉み解し、これを原液とした。原液 10ml、

1ml および 0.1ml をそれぞれ 3 連で 10ml の TSB に加えた。また原液 0.1ml を 10ml の TSB に加えたものから 1 ml を 10ml の TSB に加えた。これらを 37 °C 18 時間 静置培養した後、それぞれの培養液 1ml を *E. coli* O157 汚染種子については 9ml のノボピオシン加 mEC 培地 (n+mEC、栄研)、*S. Enteritidis* 汚染種子については Tetrathionate 培地 (TT、Oxoid) に接種し 42 °C 18 時間培養した。各培養液 10ml を *E. coli* O157 汚染種子についてはクロモアガー O157 寒天培地 (クロモアガー社)、*S. Enteritidis* 汚染種子については XLD 寒天培地 (Oxoid) に各 1 枚ずつ画線塗抹した。37 °C 18 時間培養後にコロニー数を測定した。各平板培地上の目的の菌と疑われる形態のコロニーは 3 個選び *E. coli* O157 についてはラテックス凝集キット (UNI) による凝集反応および CLIG 培地 (極東製薬) による生化学性状、*S. Enteritidis* についてはラテックス凝集キット (Oxoid) による凝集反応および TSI 培地 (栄研) による生化学性状について確認試験を行った。これによって得られた結果を用いて最確数を求めた。

さらに、原液を 0.3ml をクロモアガー O157 培地または XLD 培地 (各 10 枚) に塗抹し、37 °C 18 時間培養後にコロニ

一数を測定した。各平板培地上の目的の菌と疑われる形態のコロニーは3個選び同上的方法によって確認試験を行った。

5) 汚染種子の生育時における可食部の菌数：保存汚染種子をそれぞれ滅菌した200ml 容量のビーカー内のキムワイプ上に移し、少量の滅菌水を加えて室温にて6日間生育させた。発芽・生育後、3～5 gの可食部を採取しそれと同量のPBSを加えストマッカーにて1分間圧搾破碎した。これを原液とし $10^6$ まで10階段希釈した。原液および希釈液を0.1ml ずつ *E.coli* O157 汚染種子についてはセフィキシム・亜テルル酸加ソルビトール・マッコンキー寒天培地 (CT-SMAC、Oxoid) およびクロモアガー O157 に、*S. Enteritidis* 汚染種子についてはXLD 寒天培地に各1枚ずつ塗抹した。これらの寒天培地を37℃ 24時間培養後、コロニー数を測定した。各平板培地上の目的の菌と疑われる形態のコロニーは3個選び *E.coli* O157 についてはラテックス凝集キット (UNI) による凝集反応およびCLIG培地 (極東製薬) による生化学性状、*S. Enteritidis* についてはラテックス凝集キット (Oxoid) による凝集反応およびTSI培地 (栄研) による生化学性状について確認試験を行った。

6) 種子の表面構造の観察：実体顕微鏡下において各種子の無処理の状態を観察した。さらに乾燥状態および湿潤した状態の種子について走査型電子顕微鏡下において観察した。乾燥状態の場合の種子の固定はオスニウム酸のペーパー固定を行い液体窒素によって凍結乾燥し検体とした。湿潤状態での種子の固定方法は、2.5%グルタルアルデヒド・2%リン酸ホルマリンバッファーに2時間浸し固定後、リン酸バッファーに置き換え10分間静置

する。さらに新たなリン酸バッファーに置き換え10分間静置することを2回くり返した。その後、脱水のために50、70、90および95%エタノールに順次20分ずつ浸し、99.5%エタノールに30分間浸し、さらに新たな99.5%エタノールに30分間浸した。最後に酢酸イソアミル液に置き換え乾燥後、それを検体とした。

B-2 生食用野菜に汚染していると考えられる病原菌 (EHEC O157、サルモネラ菌) 増殖に関する研究の材料および方法は以下の如くである。

- 1) 菌株：*Escherichia coli* O157 : H7 (食中毒由来株；以後EHEC O157と略) および *Salmonella* *Infantis* (野菜由来株；以後SIと略) を供試した。
- 2) 菌液の調整：菌株は、Tryptic soy broth (TSB) で3回継代培養した菌 (EHEC O157 およびSI) をTSBにて37℃ 1夜増菌後、Tryptic soy agar (TSA) へ濃厚に各線塗抹後、37℃ 24時間培養したものにPBS5mlを入れ掻き取り、この菌液へ5mlのPBS (計10ml) を加えた。各菌の洗浄と遠心 (3,000rpm、15分) は、3回繰り返し接種菌液が $10^8$ cfu/ml オーダになるように調整し、接種原液とした。
- 3) 野菜：レタス、キュウリ、ホウレン草、ダイコン、ネギ、カブ、セロリおよびホウレンを供試した。
- 4) 試料の調整：大根では表皮を除き内部を厚さ5mm程度の半月切に、レタスは、大きさ5cm<sup>2</sup>に細切、およ

びキュウリは 5 mm程度に輪切りとした。野菜の洗い液の調整は、ストマッカー袋に細切した野菜を各々 100 g採取し、これに 100 ml の滅菌緩衝液 (PBS pH7.0 および 6.0) を加え 1 分間もみ洗いしたものを試料原液とした。また、茹で野菜の試料の調整は、ホウレン草を 2 分間茹でたそのゆで汁と、ゆで汁にオカカを加えたものを試料原液とした。

5) PBS の調整 :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.2g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7g、NaCl 6.9g を精製水 1 l に溶解後滅菌し、pH を 2 N の HCl、5 % 酢酸、2N の NaOH で補正後使用した。

6) サルモネラの増殖試験 : 試料原液 30ml を採取し、10ml ずつ 3 本の滅菌中試験管に分注する。分注した試験管 3 本に *Salmonella* Infantis (SI) を  $10^3\text{cfu} / \text{ml}$  になるよう接種し SI 増殖試験用試料とした。この 3 本の中試験管は 25 °C、30 °C および 35 °C にそれぞれ保存し、2、4、6 および 8 時間後にそれぞれ 1ml ずつを採取して、上記と同様に適宜 10 倍段階希釈を行い保存温度と時間による SI 菌数の変化を測定する試料とした。茹で野菜では、上記と同様に SI を  $10^3\text{cfu} / \text{ml}$  になるよう接種し、25 °C、30 °C および 35 °C にそれぞれ保存し、2、4、6 および 8 時間後に適宜 10 倍段階希釈を行い保存温度と時間による SI 菌数の変化を測定する試料とした。

経時的に採取したそれぞれの試料 0.1ml ずつを XLD 寒天平板に塗抹培養し、35 °C・18 時間培養後に、硫化水素を産生した黒色の定型的集

落を計測した。

7) EHEC O 157 の増殖試験 : 試料原液 30ml を採取し、10ml ずつ 3 本の滅菌中試験管に分注する。分注した試験管 3 本に *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC O157) を  $10^3\text{cfu} / \text{ml}$  になるよう接種し EHEC O157 増殖試験用試料とした。この 3 本の中試験管は 25 °C、30 °C および 35 °C にそれぞれ保存し、2、4、6 および 8 時間後にそれぞれ 1ml ずつを採取して、上記と同様に適宜 10 倍段階希釈を行い保存温度と時間による EHEC O157 菌数の変化を測定する試料とした。茹で野菜では、上記と同様に EHEC O157 を  $10^3\text{cfu} / \text{ml}$  になるよう接種し、25 °C、30 °C および 35 °C にそれぞれ保存し、2、4、6 および 8 時間後に適宜 10 倍段階希釈を行い保存温度と時間による SI 菌数の変化を測定する試料とした。

経時的に採取したそれぞれの試料 0.1ml ずつを Chromo agar O157TAM 寒天平板に塗抹培養し、35 °C・18 時間培養後に、藤色に発色した定型的集落を計測した。

B-3 野菜洗い液中に接種した *Salmonella* および EHEC O157:H7 の除菌試験についての研究関する材料および方法は以下の如くである。

1) 供試材料 : 大根 (千葉県産)、レタス (茨城県産)、キュウリ (群馬県産) を同一スーパーマーケットから試験日の早朝に購入し供試材料とした。野菜は、大根直径 8 ~ 10cm 前後の洗浄済半切の下根部を、レタスは合成樹脂製フィルム包装

丸物 250 ~ 300 g の株、キュウリは有孔の合成樹脂製フィルム包装で直径 3 cm 程度 3 本入として販売されていたものを購入した。

## 2) 試料の調整

野菜の洗い液：大根は表皮を除き内部を厚さ 5mm 程度の半月切に、レタスは、大きき 5 cm<sup>2</sup> に細切、およびキュウリは 5 mm 程度に輪切りとした。野菜の洗い液の調整は、ストマッカー袋に細切した野菜を各々 100 g 採取し、これに 100 ml の滅菌緩衝液 (PBS pH7.0 および 6.0) を加え 5 分間もみ洗いし作製した。

PBS の調整：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7g、NaCl 6.9g を精製水 1 l に溶解後滅菌し、pH を 2 N の HCl、5 % 酢酸、2N の NaOH で補正後使用した。

菌液の調整：供試菌株は、いずれも野菜からの分離株（保存：カジトン培地栄研）で *Salmonella infantis* および EHEC O157:H7 の 2 株を使用した。菌株は、TSB (OXOID) にて 37 °C 1 夜増菌後、TSA (OXOID) へ濃厚に各線塗抹後、37 °C 24 時間培養したものに PBS5ml を入れ掻き取り、この菌液へ 5ml の PBS (計 10ml) を加えた。各菌の洗浄と遠心 (3,000rpm、15 分) は、3 回繰り返して接種菌液が 10<sup>8</sup> cfu/ml オーダになるような濁度に調整し、接種原液とした。

## 3) 菌数測定

野菜汚染菌数の測定：標準寒天平板培養法 (SPC) により、細切後に 100g の野菜中に 100ml の PBS を加えた時点の生菌数を測定した。

接種菌数の測定：滅菌チューブへ 9ml の滅菌 PBS を入れ、これに各々の接種原液 1ml を加えた後 pH7.0 の PBS を用いて低減希釈したのち、その 100 μ l を 2

枚の CHROM agar O157 TAM 培地へコンラージ氏棒を使用し塗抹した。37 °C 24 時間培養後に発育した 2 枚の集落の平均数によりサルモネラおよび EHEC O157 の接種菌数を算出した。

pH7.0 および pH6.0 (塩酸および酢酸) に調整した洗い液中の NaClO による *Salmonella infantis* および EHEC O157 の菌数測定：滅菌チューブへ PBS で洗った野菜洗い液を 8ml 入れたのち、各々の接種原液 1ml を加え均一な浮遊液を作製した。これに 20ppm、50ppm および 200ppm になるように各 PBS で希釈した NaClO (関東化学) を 1ml 加えた直後、5 分後、10 分後、20 分後および 30 分後の菌数を測定した。菌数の測定は、測定時間ごとに、それぞれの菌液を低減希釈した後、その 100 μ l を 2 枚の CHROM agar O157 TAM 培地へコンラージ氏棒を使用し塗抹、37 °C 24 時間培養後に発育した 2 枚の集落の平均数によりサルモネラおよび EHEC O157 の接種菌数を算出した。なお、洗い出し液を 80 °C 20 分間加熱したものについても同様な試験を実施した。

対照として野菜洗い液を加えない pH7.2 および pH4.5 の PBS 中での各菌の消長ならびに PBS 中での各菌の 50ppm および 200ppm 中の NaClO の殺菌効果を調べた。菌数の測定法は、前記の野菜洗い液中の菌数測定法に準じて行った。各菌液共に菌数測定までは、25 °C の高温水槽中に保存した。

## C. 結果および考察

C-1 食中毒細菌汚染種子の保存後における種子中および生育後の可食部中の汚染菌の生存性について

*E. coli* O157 は、カイワレダイコン種子において汚染菌数が 10<sup>4</sup> cfu/10g の場



合は 4 ヶ月まで種子から菌が検出された (図 1)。しかし、8 ヶ月目においては検出限界に近い菌数であった。しかし、この種子を生育させたところ、2 ヶ月目を除き可食部から多くの菌が検出された (図 2)。特に 4 および 8 ヶ月目においてはいずれの検体からも  $10^6$  cfu/g 以上の濃度で検出された。汚染菌数が  $10^2$  cfu/g の場合は種子からは検出され難く、汚染直後においても 3 検体中 1 検体からのみ検出されその後保管月においては全く検出されなかった (図 3)。この種子を生育させたところいずれの月も可食部からは検出されなかった (図 4)。可食部の一般生菌数はいずれの汚染菌数においても保存月にかかわらず約  $10^7$  cfu/g 以上であった (図 5、6)。

ガーデנקレス種子において汚染菌数が  $10^4$  cfu/10g の場合は汚染直後から 8 ヶ月目まで種子中の汚染菌量は  $10^4$  cfu/10g を保持した (図 7)。しかし、この種子が生育した時の可食部からは 8 ヶ月まで  $10^6$  cfu/g 以上の濃度で汚染菌が検出された (図 8)。汚染菌数が  $10^2$  cfu/g の場合は 2 ヶ月目以降汚染菌は検出されなくなり (図 9) 生育した可食部からも検出されなかった (図 10)。可食部の一般生菌数は 8 ヶ月目までほとんどの検体が、 $10^8$  cfu/g 以上であった (図 11、12)。

アルファルファ種子において汚染菌数が  $10^4$  cfu/10g の場合は汚染後 2 ヶ月まで全検体から検出されたが、8 ヶ月目には 3 検体中 1 検体のみから検出された (図 13)。この種子が生育した時の可食部からは 8 ヶ月目まで  $10^7$  cfu/g 以上の高い菌数で汚染菌が検出された (図 14)。汚染菌数が  $10^2$  cfu/g の場合は 2 ヶ月目以降汚染菌は検出されなくなり (図 15) 生育した可食部からも検出されなかった (図 16)。可食部の一般生菌数はいずれの汚染

菌数においても保存月にかかわらず約  $10^7$  cfu/g 以上であった (図 17、18)。

S. Enteritidis は、カイワレダイコン種子において汚染菌数が  $10^4$  cfu/10g の場合は 8 ヶ月まで  $10^2$  cfu/10g 以上の高い菌数で種子から汚染菌が検出された (図 19)。しかし、8 ヶ月目においては検出限界に近い菌数であった。しかし、この種子を生育させたところ、8 ヶ月まで  $10^6$  cfu/10g の高い菌数で種子から汚染菌が検出された (図 20)。汚染菌数が  $10^2$  cfu/g の場合は種子からは 4 ヶ月目まで 3 検体中 1 または 2 検体から検出された (図 21)。この種子を生育させたところ汚染直後に 1 検体のみから検出され 1 ヶ月以降は可食部からは検出されなかった (図 22)。可食部の一般生菌数はいずれの汚染菌数においても保存月にかかわらず約  $10^5$  cfu/g 以上であった (図 23、24)。

ガーデנקレス種子において汚染菌数が  $10^4$  cfu/10g の場合は汚染直後から 8 ヶ月目まで種子中の汚染菌量は  $10^3$  cfu/10g を保持した (図 25)。しかし、この種子が生育した時の可食部からは 8 ヶ月まで  $10^8$  cfu/g 以上の濃度で汚染菌が検出された (図 26)。汚染菌数が  $10^2$  cfu/g の場合は 2 ヶ月目と 8 ヶ月目には全検体から汚染菌は検出されなかった (図 27)。生育した可食部からは 2 ヶ月目以降検出されなかった (図 28)。可食部の一般生菌数は 8 ヶ月目までほとんどの検体が、 $10^7$  cfu/g 以上であった (図 29、30)。

アルファルファ種子において汚染菌数が  $10^4$  cfu/10g の場合は汚染後 8 ヶ月まで全検体から検出された (図 31)。この種子が生育した時の可食部からは 8 ヶ月目まで  $10^8$  cfu/g 以上の高い菌数で汚染菌が検出された (図 32)。汚染菌数が  $10^2$  cfu/g の場合は 1 ヶ月目まで全検体から 2 ヶ月以降は 3 検体中 1 または 2 検体から汚染

菌が検出された（図 33）。生育した可食部からは 4 ヶ月目まで 3 検体中 1 または 2 検体から検出されたが、8 ヶ月目には検出されなかった（図 34）。可食部の一般生菌数はいずれの汚染菌数においても保存月にかかわらず約  $10^7$  cfu/g 以上であった（図 35、36）。

実体顕微鏡下で各種子を観察した結果、ガーデンクレスにおいて種子全面に産毛状の細い繊維が見られた（図 37）。アルファルファおよびカイワレ大根においては産毛状のものは見られず表面が粗かった（図 37）。

走査電子顕微鏡下で像を観察した結果、乾燥状態で固定（オスニウム酸固定）した場合はアルファルファ表面は 250 倍でなだらかな隆起が細かに見られた（図 38）。さらに 3,000 倍ではそれら隆起は深い溝で別れていることが明らかになった（図 39）。ガーデンクレスにおいては 250 倍で細かな皺が全面に見られた（図 38）。さらに 3,000 倍ではそれらの皺はさらに細かな皺から成ることが明らかになった（図 39）。カイワレ大根においては 250 倍で多角形の構造物が敷き詰められたように見られた（図 38）。3,000 倍では多角形の構造物の部分が不定形の物質で占められていることが明らかになった（図 39）。

一方、湿潤状態で固定（ホルマリン固定）した場合はアルファルファ表面は 250 倍でなだらかな隆起が細かに見られた（図 40）。さらに 3,000 倍でそれらの隆起は非常になだらかではっきりとした境目がなく溝も見られなかった（図 41）。ガーデンクレスにおいては 250 倍で全面がピロード状のように見られた（図 40）。さらに 3,000 倍では細かなネット状の構造を成していることが明らかになった（図 41）。カイワレ大根においては 250 倍で滑

らかな多角形の構造物がみられ、その構造物の境界が明らかであった（図 40）。さらに 3,000 倍では表面が滑らかであることが明らかになった（図 41）。

## 考 察

保存後の種子中の菌の生存性は、汚染菌量が  $10^4$  cfu/10g の場合は *E. coli* O157 はガーデンクレスでは 8 ヶ月目まで高い菌数で検出されたが、カイワレ大根では 8 ヶ月目には検出限界近くまで菌数が減少し、アルファルファでは 2 ヶ月目以降検出限界に近い菌数で検出されるか検出されない検体もあった。このようにガーデンクレスは *E. coli* O157 の生存性が他の種子に比べ高かった。*S. Enteritidis* ではどの種子においても高い菌数が 8 ヶ月目まで検出されたことから、*E. coli* O157 と *S. Enteritidis* の種子保存中の生存性の比較すると *S. Enteritidis* の方が生存性が高いことが明らかになった。

一方、汚染菌量が  $10^2$  cfu/10g の場合は、*E. coli* O157 は保存後に検出されたのはガーデンクレスの 1 ヶ月目の 1 検体のみであり汚染菌数が低い場合は種子中で生存しがたいことが判明した。しかし、*S. Enteritidis* はカイワレ大根では 2 ヶ月目まで、ガーデンクレスでは 4 ヶ月目まで、アルファルファでは 8 ヶ月目まで検出される検体があった。このことから *S. Enteritidis* は *E. coli* O157 に比べ生存性が高いことが  $10^4$  cfu/10g の場合と同様に明らかになった。

さらにこれら保存種子を生育させて可食部中の菌数を計測したところ、*E. coli* O157 汚染菌量が  $10^4$  cfu/10g の場合、種子から汚染菌が検出された検体は可食部からも菌が検出された。また、種子からは汚染菌が検出されなかった時においても可食部から高い菌数の汚染菌が検出さ

れた。しかし、 $10^2$  cfu/10g の場合は可食部から検出される検体は少なかった。S. Enteritidis 汚染菌量が  $10^4$  cfu/10g の場合、いずれの種子検体からも検出されていたため生育後の可食部においても高い菌数の汚染菌が検出された。 $10^2$  cfu/10g の場合はアルファルファにおいては 4 ヶ月目までガーデンクレスにおいては 2 ヶ月目まで高い菌数で可食部から検出された。このように汚染菌数が  $10^4$  cfu/10g 程度の時は種子の保存期間が長くても *E. coli* O157 および S. Enteritidis が可食部に汚染菌が多く、汚染菌数が  $10^2$  cfu/10g 程度と低い場合でも種子の保存期間が短かければ種子の種類によっては S. Enteritidis が可食部を汚染している場合があることが示唆された。理由は明らかではないが、S. Enteritidis はサルモネラによる食中毒事例の多いアルファルファにおいて長期間にわたり種子から検出され、生育時の可食部においてもアルファルファが最も検出菌数が多く検出可能期間も長かったため、サルモネラのアルファルファでの生存性および生育性が他の野菜より高い可能性が示された。

種子の表面構造はどちらの固定方法でも各種子によって異なっていた。カイワレ大根種子の表面を高倍率の電子顕微鏡下で観察したところ、他種子で見られる深い溝や細かな皺が認められず、この観察結果はカイワレ大根種子が他種子より両菌株とも種子および可食部からの検出が低かったことに関連する可能性が考えられた。ガーデンクレスについては湿潤すると表面構造が細かな網目状に変化することが明らかになった。またアルファルファにおいても溝が広がり浅くなり構造変化が大きかった。カイワレ大根においては浸潤することで付着物が剥れ落ちたようにみえた。

種子が食中毒細菌に汚染される時に湿潤する可能性があることを考えると、これら湿潤することによる表面構造の変化は種子における食中毒細菌の生存性に重要であると思われ、今後の研究が必要と考えられた。

#### C-2 サルモネラを接種した野菜洗液の温度別増殖態度

1) レタス：25℃保存では、4時間までは菌数の増加は認められないが、6時間では7検体中3検体が10倍 ( $10^4$  cfu/ml) 程度に増加した。8時間では7検体中6検体が10倍 ( $10^4$  cfu/ml) 程度に増加し、1検体が100倍 ( $10^5$  cfu/ml) 程度増加した(表4.2)。

30℃保存では、2時間で7検体中1検体が10倍 ( $10^4$  cfu/ml) 程度に増加した。4時間では7検体中4検体が10倍 ( $10^4$  cfu/ml) 程度に増加した。また、6時間では7検体中全てが10倍 ( $10^4$  cfu/ml) 以上に増加し、そのうち2検体が100倍~1,000倍 ( $10^5$  ~  $10^6$  cfu/ml) 以上に増加した。8時間では、さらに菌数が増加し7検体中全てが100倍 ( $10^5$  cfu/ml) 以上に増加し、そのうち2検体が1,000倍 ( $10^6$  cfu/ml) 以上に増加した(表4.2)。

35℃保存では、2時間で7検体中1検体が10倍 ( $10^4$  cfu/ml) 以上に増加した。4時間では7検体中5検体が10倍 ( $10^4$  cfu/ml) 以上に増加し、そのうち1検体が100倍 ( $10^5$  cfu/ml) 以上に増加した。また、6時間では7検体中全てが100倍 ( $10^5$  cfu/ml) 以上に増加し、そのうち1検体が1,

000倍 ( $10^6$  / ml) 以上に増加した。8時間では、さらに菌数が増加し7検体中全てが1,000倍 ( $10^6$  cfu / ml) 以上に増加し、そのうち1検体が10,000倍 ( $10^7$  cfu / ml) 以上に増加した(表42)。

これらの結果から、レタス洗い水中のサルモネラ(SI)は、25℃保存では4時間まで増殖はみられないが、6時間では10倍以上に増殖することが明らかとなった。また、30℃以上に保存した場合は2時間でも10倍以上に増殖するものがみられ、4時間では100倍以上に増殖することが分かった。

- 2) キュウリ: 25℃保存では、4時間までは菌数の増加は殆ど認められないが、6時間では7検体中3検体が10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 程度に増加し、8時間では7検体中全ての検体が10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 以上に増加し、1検体が100倍 ( $10^5$  cfu / ml) 程度に増加した(表43)。

30℃保存では、2時間で7検体中1検体が10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 程度に増加し、4時間では7検体中4検体が10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 以上度に増加した。また、6時間では7検体中全てが10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 以上に増加し、そのうち1検体が1,000倍 ( $10^6$  cfu / ml) 以上に増加した。8時間では、さらに菌数が増加し7検体中全てが100倍 ( $10^5$  cfu / ml) 以上に増加し、そのうち1検体が1,000倍 ( $10^6$  cfu / ml) 以上に増加した(表43)。

35℃保存では、2時間で7検体中1検体が10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 以上に増加した。4時間では7検体中全ての5検体が10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 以上に増加し、そのうち1検体が100倍 ( $10^5$  cfu / ml) 以上に増加した。また、6時間では7検体中全てが100倍 ( $10^5$  cfu / ml) 以上に増加し、そのうち2検体が1,000倍 ( $10^6$  cfu / ml) 以上に増加した。8時間では、さらに菌数が増加し7検体中全てが100倍 ( $10^5$  cfu / ml) 以上に増加し、そのうち6検体が1,000倍 ( $10^6 \sim 10^7$  cfu / ml) 以上に増加した(表43)。

これらの結果から、キュウリ洗い水中のサルモネラ(SI)は、25℃保存では2時間まで増殖はみられないが、4時間では10倍以上に増殖するものがみられ、6時間では確実に10倍以上増殖することが分かった。また、30℃以上に保存した場合は2時間でも10倍以上に増殖するものがみられ、4時間では100倍以上に増殖することが分かった。

- 3) キャベツ: 25℃保存では、8時間まで菌数の増加はど認められなかった(表44)。

30℃保存では、6時間まで菌数の増加はど認められなかったが、8時間では7検体中1検体が10倍 ( $10^4$  cfu / ml) 以上に増加した(表44)。

35℃保存では、4時間まで菌数の増加はど認められなかったが、6時間では7検体中2検体が10倍 ( $10^4 \sim 10^5$  cfu / ml) 以上に増加した(表44)。