

Assessment of Microbiological Hazards in Foods, Rome, April 30– May 4, 2001

Kasuga, F.

Exposure Assessment of *Salmonella* Enteritidis in Eggs.

International Association for Food Protection 88th Annual Meeting, Minneapolis, August 5-8, 2001

Kasuga, F., Osaka, K., Toyofuku, H., Kumagai S. and Yamamoto S.

Contribution from Asia toward International Risk Assessment.

Second Asian Symposium on Risk Assessment and Management, Kobe, November 2001

Kasuga, F., Yamamoto, A., Iwahori, J., Tsutsui, T., Fujikawa, H., Yunokawa, Hirota, M., Kumagai, S. and Yamamoto S.

Risk assessment of *Salmonella* Enteritidis infection associated with raw egg consumption at home in Japan.

UJNR Symposium, Tokyo, March 2002

春日 文子、広田 雅光、伊藤 嘉典、熊谷 進
腸炎ビブリオの加熱致死動態の予測微生物学的解析

日本防菌防黴学会第 28 回年次大会、大阪、2001 年 5 月

広田 雅光、伊藤 嘉典、春日 文子、熊谷 進
腸管出血性大腸菌 0157:H7 の熱抵抗性と加熱処理によって誘導される酸耐性

日本防菌防黴学会第 28 回年次大会、大阪、2001 年 5 月

春日 文子

わが国における食中毒の現状と問題点

平成 13 年度食中毒防止に関する中央講習会、東京、2001 年 8 月

春日 文子

微生物学的リスクアセスメントとその具体的手法

食品衛生指定検査機関協会平成 13 年度特殊技術研修会、相模原市、2001 年 10 月

春日 文子

微生物学的リスクアセスメントの意義と具体的手法

第 22 回日本食品微生物学会学術総会、大阪市、2001 年 10 月

春日 文子

リスクと国際社会：リスクアセスメントの国際動向

けいはんなセミナー「食品の安全性確保をめざして 食品産業社会における微生物リスクのアセスメントと予測」吹田市、2001 年 11 月

春日 文子

微生物のリスクアセスメント

厚生労働省医薬局食品保健部食品保健講習会、東京、2002 年 3 月

春日 文子、山本 茂貴、広田 雅光、熊谷 進
FAO/WHO による卵のサルモネラ・エンテリティディス汚染の Risk Characterization
第 10 回獣医疫学会学術集会、川崎市、2002 年 3 月

山本茂貴、春日文子、広田雅光、熊谷進
日本の疫学データを用いたサルモネラ感染
の Hazard Characterization
第 10 回獣医疫学会学術集会、川崎市、2002
年 3 月

2. 紙上発表

Fazil, A., Lammerding, A. M., Kasuga, F., Ebel,
E., Kelly, L., Anderson, W. and Snary, E.
(2001)
Risk characterization of *Salmonella* in broilers
and eggs.
MRA 01/02, FAO/WHO (2001)

Kasuga, F., Osaka, K., Toyofuku, H., Kumagai
S. and Yamamoto S.
Contribution from Asia toward International
Risk Assessment.
Proceedings for 2nd Asian Symposium on Risk
Assessment and Management (SASRAM 2001)

Kasuga, F. and Vose, D. (2001)
Modelling of cross-contamination of
foodborne pathogen occurring in restaurants
and home kitchens.
Joint FAO/WHO workshop for Development of
guidelines on exposure assessment of
microbiological hazards in foods, Background
documents. p. 62 – 69, 2001

Kasuga, F., Yamamoto, A., Iwahori, J., Tsutsui,
T., Fujikawa, H., Yunokawa, Hirota, M.,
Kumagai, S. and Yamamoto S. (2002)
Risk assessment of *Salmonella* Enteritidis
infection associated with raw egg consumption
at home in Japan.

*In Pathogenic Microorganisms and Their
Toxins: A Global Perspective of Their Risk,
The Ninth International Symposium on Toxic
Microorganisms.* pp. 60-68.

春日文子
食品汚染病原微生物のリスクアセスメント
モダンメディア、第 47 巻、第 5 号、p. 1-9、
2001

春日文子
微生物学的リスクアセスメントと予測微生物
学
食品工業、第 44 巻、第 14 号、p. 18-24、
2001

春日文子
食品企業にも求められる科学的なリスクア
ナリシスの概念－微生物学的リスクアセス
メントで衛生面などの目標値設定が可能に
月刊 HACCP、第 71 号 (2001 年 8 月号)、
p. 75-80、2001

春日文子
わが国における食中毒の現状と問題点
平成 13 年度食中毒防止に関する中央講習
会テキスト、日本体育・学校健康センター、
p. 89-108、2001

熊谷進、中村政幸、浅井鉄夫、春日文子、
能田健
フィールドとベーシックリサーチの領域横
断的ワークショップ①－サルモネラ症を例
にして－
月刊 HACCP、第 71 号 (2001 年 8 月号)、
p. 46-48、2001

春日文子

微生物学的リスクアセスメントーその動向
と実際

獣医疫学雑誌、第5巻、第2号、p. 89-97、
2001

参考文献

- 1) CODEX Alimentarius Commission:
Principles and guidelines for the conduct
of microbiological risk assessment.
CAC/GL-30 (1999)
- 2) USDA-FSIS: Salmonella Enteritidis risk
assessment, Shell eggs and egg products,
Final report (1998)
- 3) Ebel, E., Kasuga, F., Schlosser, W. and
Yamamoto, S.: Exposure assessment of
Salmonella Enteritidis in eggs. MRA
00/04, FAO/WHO (2000)
- 4) Fazil, A., Morales, R. A., Lammerding, A.
M., Vicari, A. S. and Kasuga, F.: Hazard
identification and hazard characterization
of *Salmonella* in broilers and eggs. MRA
00/03, FAO/WHO (2000)
- 5) Vose, D.: Risk Analysis: A Quantitative
Guide. 2nd edition. John Wiley & Sons
Ltd., West Sussex, England (2000)
- 6) 熊谷進：微生物危害のリスクアセスメ
ントに関する研究
平成12年度厚生科学研究費補助金報
告書「食中毒原因究明方策に関する
研究報告書」(2000)

表1

家庭での生卵摂食に伴うSalmonella Enteritidisによる食中毒の試行的リスクアセスメント概要

Hazard Identification

SE、サルモネラ症、食中毒の現状について記述

Exposure Assessment

Input Parameters		
Stage	Input/Definition	Data
生産段階	汚染卵産卵率 Pf 全鶏卵中の汚染卵の割合 : probability of contamination at lay (at farm), Pf	鶏群汚染率、鶏群内汚染率、陽性鶏群検出感度 Sunagawa et al. (1997) 汚染鶏の汚染卵産卵率 Humphrey et al. (1989)
	汚染卵中のSE菌数 Cf 産卵1日後までの新鮮卵中の菌数 : concentration of SE at farm, Cf	USDA model Humphrey (1989, 1991) Gast and Beard (1992)
流通保存段階	市場流通卵汚染率 Pds 全市場流通卵中の汚染卵の割合 : probability of contamination during distribution and storage, Pds	市場卵調査データ Pfと同じ
	汚染卵中のSE菌数 Cds 消費者や調理加工業者に購入される直前の汚染卵中の菌数 : concentration of SE at the end of distribution/storage, Cds	流通経路 温度、時間履歴 $Cds = Cf \cdot f(T, t)$ 聞き取り調査結果 卵黄膜ブレークダウン時間 卵白におけるSEの増殖関数 Fazil et al. (2001)
消費段階	購入卵汚染率 Pco 消費者、業者に購入された卵のうちの汚染卵の割合 : probability of contamination at consumption, Pco	汚染卵産卵率 Pfと同じ
	家庭で生卵として消費される確率 Pre 購入された卵が生卵として消費される確率 : probability of raw egg	全国家計調査による 家庭での卵消費量 電話アンケート調査結果
	汚染卵中のSE菌数 Cco 摂食される時点での汚染卵中の菌数 : concentration of SE at consumption, Cco	購入後の温度、時間履歴(あれば) なければCdsと同じと仮定 購入後は冷蔵されていると仮定

Hazard Characterization

Input	食中毒報告中の定量的データ
Output	摂食菌数－発症率関係曲線 $P(\text{illness} \text{dose})$ Fazil et al. (2001)

Risk Characterization

Input	年間鶏卵総出荷量	全家庭で1年間に生卵として消費される殻付き卵の個数A
	全家庭で消費される殻付き卵の年間総個数	
	家庭に購入された1個の卵が生卵として消費される確率	
	各流通経路を通った生卵による発症率	生卵1個による発症率B
	それぞれの流通経路に占める卵の流通量の割合	
	全鶏卵中の汚染卵の頻度C	
Output	全国における家庭での生卵摂食に伴うサルモネラ・エンテリティディス食中毒の1年間あたり発症者数の確率分布 A*B*C (3万回のシミュレーション) 対策案の比較	

表2 卵の生産段階において使用したデータの種類と解析方法

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	鶏卵汚染率								
2	Apparent flock prevalence	from Sunagawa et al. (1997)	=RiskBeta(3+1,37-3+1)						
3	Apparent within-flock prevalence	from Sunagawa et al. (1997)	=RiskBeta(7+1,60-7+1)						
4	Flock sensitivity	=1-(1-RiskTexpon(D3,0,1))^20							
5	True flock prevalence	=D3/C4							
6	Prevalence of contam eggs from infected hens	from Humphrey (1989)			1.07%				
7	Overall prevalence of contaminated eggs	=C5*D3*E6							
8	鶏卵1個当たりのSE菌数								
9	Number of SE per egg when laid	From USDA-FSIS risk assessment							
10	Log of bacteria	=LOG(C10)							
11									

表3

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)	時間(日)		温度(°C)		
			最小	最大	最小	最大	
生協から家庭直送	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
GPセンター--小売店-家庭	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
GPセンター--問屋-小売店-家庭	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
GPセンター--製造業者	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4 流通過程の入力情報

鶏卵内温度			
温度下降係数 (k)		0.11	
外気温 (Ta)		=RiskPert(min,most likely,max)	
初期卵温 (Ti)		37	
経過時間		=RiskUniform(min,max)	
経過時間後鶏卵内温度		=((EXP(-k*(time*24))*(Ti-Ta))+Ta)	
卵黄膜劣化時間 (YMB time) 関数			
平均鶏卵内温度 (average egg temp)		=((EXP(-k*(time*12))*(Ti-Ta))+Ta)	
log (YMB time)		=2.0872-0.04257*average egg temp	
菌増殖関数			
log growth rate		=-0.143+0.026*average egg temp	
殻付き卵の流通経路			
年間鶏卵総出荷量	うち、殻付き卵	2485880 トン	41431333333.3333 個
	液卵	85.500%	
		14.500%	
殻付き卵全体に占める割合 (%)			
生協から家庭直送			
GPセンタ---小売店-家庭			
GPセンタ---問屋-小売店-家庭			
GPセンタ---製造業者			
全体			
11%			
48%			
2%			
38%			
100%			

表5 家庭における生卵消費量に関するデータ

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2	Q. 日本の家庭で、卵が生で消費される確率は？												
3	年間一人当たり家庭での卵消費量												
4	(家計調査等より、平成10年度本研究報告書において推計)												
5	月間一人当たり家庭での生卵消費量												
6	(電話アンケートより)												
7	生卵個数 x	人数 z	相対頻度 y	(x-mean) ²									
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													
					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 3169.1739 =RiskNormal(936*H7,SQRT(936)*H8)								
					Mean of true distribution 3.3858696 =I10/936								
					[Probability an egg is consumed raw				0.22743 =I11*12/178.65				

表 6. Exposure Assessmentにおいて使用した入力データ

鶏群汚染率と鶏群内感染率

Sunagawa, H. et al. (1997): A survey of *Salmonella enteritidis* in spent hens and its relation to farming style in Hokkaido, Japan.
International Journal of Food Microbiology 38: 95-102.

感染鶏からの汚染卵産卵率

Humphrey T. J. et al. (1989): *Salmonella enteritidis* phage type 4 from the contents of intact eggs: A study involving naturally infected hens.
Epidemiology and Infection 103: 415-423.

産卵直後の汚染卵中の SE 菌数

Humphrey T. J. et al. (1989): *Salmonella enteritidis* phage type 4 from the contents of intact eggs: A study involving naturally infected hens.
Epidemiology and Infection 103: 415-423.

Humphrey, T.J et al. (1991): Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs.
Epidemiology and Infection 106: 489-496.

Gast, R.K. and Beard, C.W. (1992): Evaluation of a chick mortality model for predicting the consequences of *Salmonella enteritidis* infections in laying hens.
Poultry Science 71: 281-287.

卵の流通経路と時間、温度履歴

熊谷 (2000) 平成 12 年度厚生科学研究費補助金報告書

卵黄膜ブレイクダウン時間 (YMB Time) 関数

YMB Time 経過後の卵白における SE の増殖関数

Fazil, A., Lammerding, A. M., Kasuga, F., Ebel, E., Kelly, L., Anderson, W. and Snary, E. (2001): Risk characterization of *Salmonella* in broilers and eggs.
MRA 01/02, FAO/WHO

生卵摂食実態

熊谷 (2000) 平成 12 年度厚生科学研究費補助金報告書

図1 生産段階における汚染卵の頻度

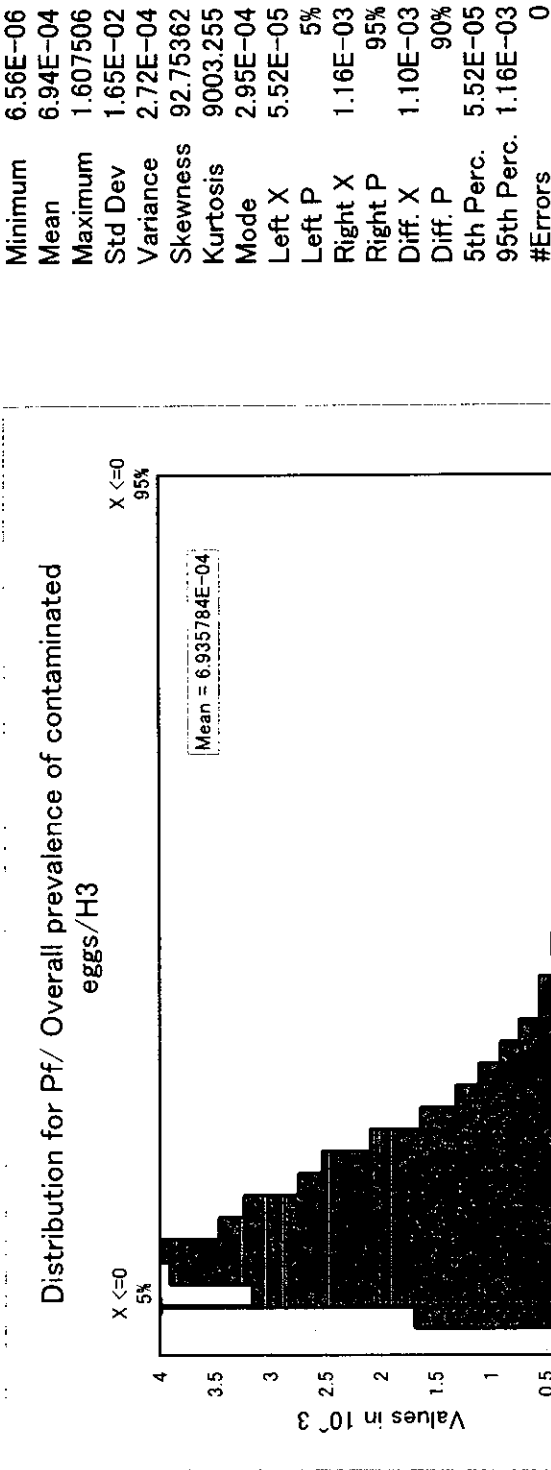


図2 消費者にわたる直前の汚染卵中のSE菌数

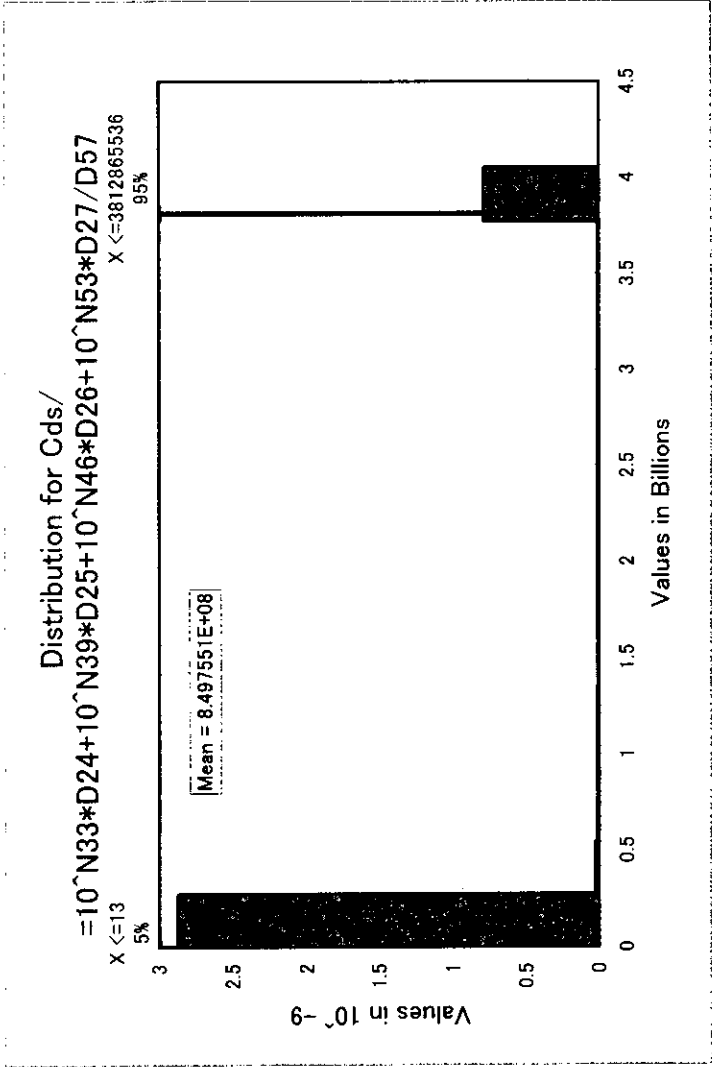


図3 家庭に購入された1個の卵が生卵として消費される確率

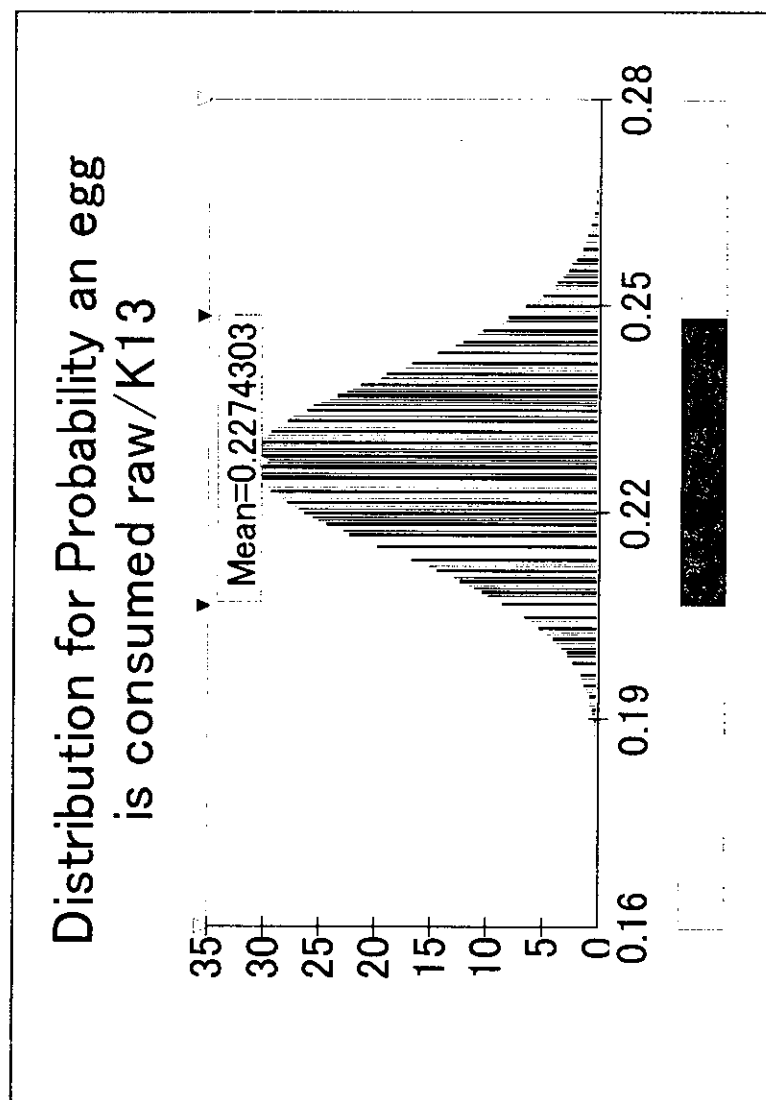
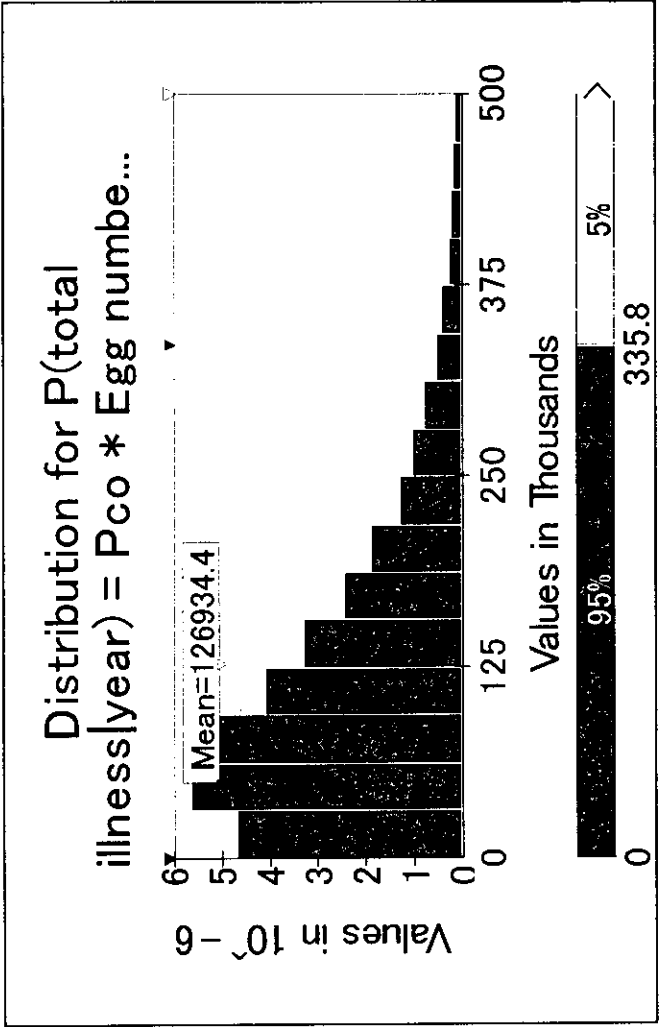


図4 全国における家庭での生卵摂食に伴うサルモネラ・エンテリティディス食中毒の1年間あたり発症者数の確率分布



Cell	ModelIF79
Minimum	441.3634
Mean	126934.4
Maximum	1104490
Std Dev	107854.5
Variance	1.16E+10
Skewness	1.858444
Kurtosis	8.708895
Mode	62952.92
Left X	0
Left P	0%
Right X	335798.8
Right P	95%
Diff. X	335798.8
Diff. P	95%
5th Perc.	13038.3
95th Perc.	335798.8

図5 対策案の比較の一例

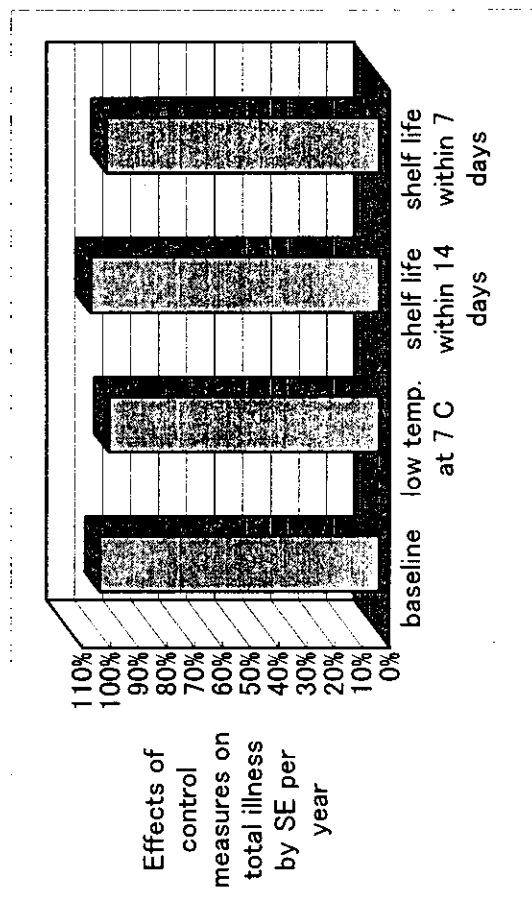
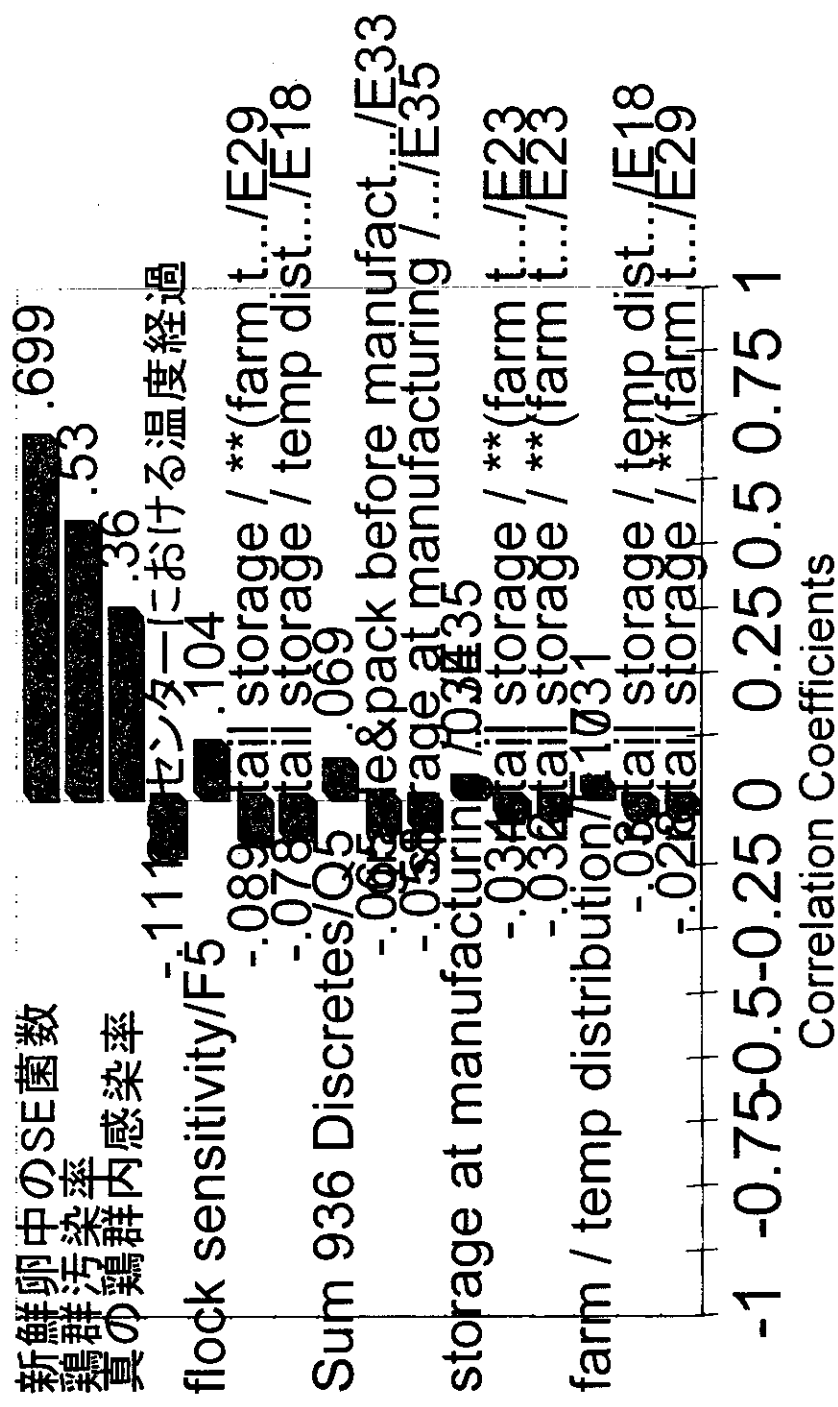


図6 各入力情報の患者発生数に及ぼす効果の比較



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

国際的リスクアセスメントの手法を用いたモデリングに関する研究

分担研究者 春日 文子（国立感染症研究所主任研究官）

協力研究者

1. Exposure Assessment のための基礎知見としての予測微生物学的研究
 - (1) *E.coli* O157:H7 の熱抵抗性ならびに酸抵抗性
ならびに
 - (2) *Vibrio parahaemolyticus* の熱抵抗性ならびに凍結に伴う菌の生残動態
： 広田雅光、伊藤嘉典（国立感染症研究所食品衛生微生物部）
2. Exposure Assessment のための基礎知見としての、調理過程における二次汚染のモデル化に関する研究
 - (1) 手指を介した一般生菌ならびに大腸菌群の移行動態
： 岸本満（名古屋栄養専門学校）、David Vose (David Vose Consultancy)
 - (2) 調理器具表面を介した *Salmonella Enteritidis* の移行動態
： 新井麻奈美、中川弘（東京顕微鏡院）、斎藤典子（国立感染症研究所電顕室）、
David Vose (David Vose Consultancy)
3. 腸炎ビブリオのリスクプロファイル作成
： 小坂健（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究要旨

国際的に議論されている微生物学的リスクアセスメントの手順や手法に準じて、わが国独自のリスクアセスメントを構築するために、基礎となる知見の収集と得られたデータの数学的解析を行った。

以下の3項目（5細項目）に分けて研究を遂行した。

1. Exposure Assessment のための基礎知見としての予測微生物学的研究

(1) *E.coli* O157:H7 の熱抵抗性ならびに酸抵抗性

出血性大腸菌のリスクアセスメントを行なう際に、Exposure Assessmentにおいて菌の動態の推定に資するため、平成8年に日本各地で起きた集団食中毒事例から分離された *E.coli* O157:H7 菌株を用い、それらの熱抵抗性と酸抵抗性を比較するとともに、熱抵抗曲線や酸抵抗曲線の近似式を求めた。日本ではほぼ同時期に分離された菌株は、熱抵抗性の上で大きく2つに分類された。また、50℃10分間加熱した菌株は、塩酸に対して抵抗性を有するようになった。

(2) *Vibrio parahaemolyticus* の熱抵抗性ならびに凍結に伴う菌の生残動態

腸炎ビブリオのリスクアセスメントを行なう際に、Exposure Assessmentにおいて菌の動態の推定に資するため、近年日本各地で分離された *Vibrio parahaemolyticus* 菌株を用い、熱抵抗曲線の近似式を求めた。さらに、凍結に弱いとされている *Vibrio parahaemolyticus* が、検食システムにより食品中で凍結保存された場合、どのような生菌数の変化が起こるのかを推定するために、食品に接種した菌数の凍結後の変化を測定した。ホタテとアオヤギに接種した *Vibrio parahaemolyticus* は 0 時から 1 日後まで、急激に $10 \sim 10^4$ 個低下し、その後緩慢に減少していった。

2. Exposure Assessment のための基礎知見としての、調理過程における二次汚染のモデル化に関する研究

(1) 手指を介した一般生菌ならびに大腸菌群の移行動態

いかなる微生物を対象としたリスクアセスメントにおいても、Exposure Assessment の中で消費過程に関するデータは共通して不足している。特に、調理中の二次汚染に関し、定量的なモデリングに使用できるデータは、世界的にも少ない。そこで二次汚染を、手指を介する場合と調理器具表面を介する場合とに分け、定量実験を行った。手指を介する場合として、さらに、調理実習中の原材料から手指への一般生菌ならびに大腸菌群の移行と、手指に塗布された既知量の大腸菌の生食用食材への移行の 2 ステップについて、それぞれデータを採取した。

調理実習において、初期菌数の高い鶏挽肉ともやしをそれぞれ下処理した際、食材ごとに一定した割合で、一般生菌も大腸菌群も手指へ移行することがわかった。菌数測定に関する検出効率も勘案しつつ、これら移行率ならびに手指から生食用食材への移行率について、確率分布を考慮したモデリングを行った。

(2) 調理器具表面を介した *Salmonella Enteritidis* の移行動態

(1) と同様に、調理器具表面を介する二次汚染のモデリングのための実験を行った。*Salmonella Enteritidis* によって汚染された卵液が調理台上にこぼれ、それを拭き取ったふきんによって食卓表面に塗布され、食卓上に落下した食品を介して最終的に摂食される、というシナリオを想定した。各段階で *Salmonella Enteritidis* の菌数を測定して確率論的モデリングを行ったほか、ふきん内部の *Salmonella Enteritidis* の走査電顕写真を撮影した。

3. 腸炎ビブリオのリスクプロファイル作成

将来実行される可能性の高い腸炎ビブリオのリスクアセスメントに備え、リスクプロファイル作成を行った。

A. 研究目的

コーデックス食品衛生部会と FAO/WHO 専門家会議を中心に、微生物学的リスクアセスメントの手順や手法についての議論がなされている。わが国独自のリスクアセスメントを一刻も早く遂行するためには、国際的議論に準拠したモデルアセスメントを行なうと同時に、将来のリスクアセスメントの基礎となる知見の収集を行って、そのデータに対して数学的解析を試行し、国際的に提唱されている手法の妥当性や日本のデータに対する適用性を検討する必要がある。そのため、本分担研究では以下の5つの項目に分けて、研究を遂行した。すなわち、

1. Exposure Assessment のための基礎知見としての予測微生物学的研究

(1) *E.coli* O157:H7 の熱抵抗性ならびに酸抵抗性

(2) *Vibrio parahaemolyticus* の熱抵抗性ならびに凍結に伴う菌の生残動態

2. Exposure Assessment のための基礎知見としての、調理過程における二次汚染のモデル化に関する研究

(1) 手指を介した一般生菌ならびに大腸菌群の移行動態

(2) 調理器具表面を介した *Salmonella* Enteritidis の移行動態

3. 腸炎ビブリオのリスクプロファイル作成

である。

Exposure Assessment において菌の数的動態を推定するためには、予測微生物学的データの蓄積ならびにそれに基づいた物理化学的条件に対応した関数化が不可欠である。研究項目1では、*E.coli* O157:H7 と

Vibrio parahaemolyticus のリスクアセスメントに近い将来行なわれることを想定して、それぞれの菌の熱抵抗性ならびに凍結時の菌の生残動態を解析するための基礎実験を行なった。

また、Exposure Assessment の最終過程である調理消費過程における食中毒菌の二次汚染に関しては、世界的にもまた対象となりうるどの菌についてもデータが不足していることが知られている。食品によっては二次汚染の患者発生に及ぼす影響は大きい。この部分に関するデータ収集ならびに解析は急務である。研究項目2では、調理過程における二次汚染を、手を介する経路と食器具やふきんを介する経路の二つに分けて、実験ならびに確率論的モデリングを行なった。

さらに、今後実行される可能性の高い腸炎ビブリオのリスクアセスメントに備え、研究項目3としてリスクプロファイル作成を行った。

B. 研究方法

1. Exposure Assessment のための基礎知見としての予測微生物学的研究

(1) *E.coli* O157:H7 の熱抵抗性ならびに酸抵抗性

1996年に国内で単離された *E.coli* O157:H7 の菌株のうち、パルスフィールドゲル電気泳動により異なった DNA パターンをもつ4株を選び(Izumiya らの1997)、実験に供試した。

保存菌株を TSA Plate に塗布し、この中からいくつかのコロニーをサンプリングし、これを TSB で 37℃、16 時間培養したも

のを、原液として用いた。これを、目的の pH に調整した TSB で、 10^6 または 10^8 個になるように希釈し、シリンジバイアルに 1 ml ずつ分注した。分注菌液を目的の温度に調整したウォーターバスに入れて加熱処理し、所定の時間毎に 2 本ずつサンプリングして、ただちに氷冷した。必要に応じて PBS で希釈し、スパイラルプレーターで TSA Plate に塗布し、 37°C , Over Night インキュベートした後、protos コロニーカウンターで計数した。

一方、酸抵抗性を調べる実験では、O157:H7 の希釈菌液を加熱処理した後、酸性培地中で培養し、その死滅過程を研究した。使用した菌株は、異なる熱抵抗性を示した 2 株である。 $\text{pH } 7.3$ の TSB で一晩培養した菌株を同じ $\text{pH } 7.3$ の TSB で 10 倍に希釈し、それに多くの文献で、熱ショックを起こす条件である 50°C 、10 分の熱処理を加えた。これを、目的の pH に調整された TSB で 10^5 個の濃度になるように希釈し、シリンジバイアルに 0.5 ml ずつ分注し、 37°C と 7°C の 2 つの温度で incubation した。所定の時間ごとに 2 本ずつ sampling し、熱抵抗性の実験と同様に、菌数を測定した。

(2) *Vibrio parahaemolyticus* の熱抵抗性ならびに凍結に伴う菌の生残動態

国内の食中毒事例からの分離株 5 株 (B-52: O3:K6, TDH(+), B-54: O3:K6, TDH(+), B-31: O3:K6, TDH(-), C-1: O4:K8, TDH(+), C-3: O4:K68, TDH(+), C-20: O1:K68, TDH(+)) を用いて加熱実験を行ない、致死動態を解析した。加熱温度は 45、46.5、48 および 52°C 、加熱時の pH と塩分濃度はそれぞれ $\text{pH } 4.7$ 、 5.7 、 6.7 、 7.7 、 8.7 、

および 1, 3, 7% の条件で行なった。加熱方法は *大腸菌* の実験に準じた。

さらに、凍結に伴う菌数の変化を調べるために、約 10^8 CFU/ml に準備した菌液 (アルカリペプトン液中) ならびに同濃度の菌液 1 ml をえらあるいは内臓に接種したあじ、あおやぎとほたてに接種したものを、マイナス 25°C に最長 6 週間保存し、その間に回収される菌を、時間を追って計数した。

2. Exposure Assessment のための基礎知見としての、調理過程における二次汚染のモデル化に関する研究

(1) 手指を介した一般生菌ならびに *大腸菌群* の移行動態

栄養専門学校の学生を 4 人一組のグループに分け、各グループにおいて以下の 4 種類のメニューを調理した。

A. 鶏肉のミートローフ (材料: 鶏ひき肉、たまねぎ、パン粉、たまご、なす、トマト、クレソン)

B. もやしときゅうりのさっぱりサラダ (同: もやし、きゅうり、レタス、パセリ、ラディッシュ、ハム)

C. あさりのチャウダー (同: あさり、ベーコン、たまねぎ、にんじん、じゃがいも、マッシュルーム、トマト、ピーマン)

D. 豆腐とひじきの寒天寄せ (同: ひじき、豆腐、青しそ葉、寒天、わさび、めんつゆ)

各メニューの材料には、経験上比較的一般細菌数が高い食品を含めるようにした。各メニューについて、原材料の下処理と細切、手こねが終わった時点で、各学生の片手の表面細菌をグローブジュース (森田他、1998、森田他、1999) を用いて採取した。同時に、もう一方の手で予め滅菌された菜

ばしと包丁の柄を 3 秒間強く握ってもらい、握った個所からグローブジュース法と同じサンプリング液を用いて細菌を採取した。検体液は適宜希釈した後、1 ml をコンパクトドライ TC ならびに EC (日水製薬) に滴下し、片手ならびに食器具上の一般細菌数ならびに大腸菌群数、大腸菌数を計数した。調理に使用した原材料についても、別途同様の方法で細菌数の測定を行ない、両手に触れる食材重量当たりの細菌数を算出した。これらの定量データを用い、調理中に、原材料に由来する一般生菌と大腸菌群が手指ならびに手指を介して食器具に移行する頻度と程度を推定した。

次に、非病原性大腸菌 JCM1649 株の既知量を培地とともによく洗浄した手指に塗布した後、1 群の被験者にはまぐろのさくを握ってもらい、また別の被験者群にはキャベツの千切りを一定量つまんで盛り付け作業をしてもらい、手指に接触した食品に移行した大腸菌数をコンパクトドライを用いて培養計数した。なお、この実験の被験者になった学生には、予め実験の説明書を読んでもらい、協力に同意する署名をしてもらった。

(2) 調理器具表面を介した *Salmonella* Enteritidis (以下 SE) の移行動態

卵液に *Salmonella* Enteritidis IFO 604 を約 10^3 あるいは 10^5 CFU/ml の濃度になるように添加したものを 1 ml、模擬調理台としてのステンレス板上に滴下した。これを滅菌水で湿らせたふきんにて拭き、直後にこのふきんを用い模擬テーブルとしてのメラミン加工木版上で 1 回拭き操作を行った。ふきん中の SE をメンブランフィル

ター法を用いて回収した後、MLCB 寒天培地上に塗布し計数した。また、ステンレス板と木版上に残存あるいは移行した SE を KM 法による拭き取りにて回収し、同様に計測した。

さらに、 10^8 CFU/ml SE 添加卵液あるいは PBS を 1 ml 滴下したふきんを 2.5% グルタルアルデヒド/2% パラホルムアルデヒド/PBS を用いて固定し、走査型電子顕微鏡を用いて、ふきん内部での *Salmonella* Enteritidis の存在状況を撮影した。

3. 腸炎ビブリオのリスクプロファイル作成

コーデックス食品衛生部会の中で組織された食中毒菌ごとのワーキンググループにおいて、リスクプロファイルを行なう際の基本項目がアメリカから提唱された。この項目は扱う病原体を超えて応用可能な合理的な構成である。本研究においては、この項目にしたがって、日本を中心としたデータに基づき、リスクプロファイルを作成した。

C. 研究結果

1. Exposure Assessment のための基礎知見としての予測微生物学的研究

(1) *E.coli* O157:H7 の熱抵抗性ならびに酸抵抗性

図 1 は、 55°C における 5 つの菌株の、pH 7.3 TSB 培地中での生存菌数の対数をプロットした熱抵抗曲線である。この曲線から菌数を 1/10 にするのにかかる時間 D 値を求めたところ、5 菌株は 2.65-5.82 min の値を示した。また、5 菌株は熱抵抗性の上で大