

大きく2つのグループに分かれることがわかった。すなわち1つのグループは Hiroshima, Gumma, Okayama でその他より熱抵抗性が高く、もう一つは Shizuoka と Osaka である。

図2は60℃における熱抵抗曲線であり、D値は、20.10・32.47 secの値を示した。これらの曲線も、大きく2つに分かれた。熱抵抗性の高いグループは Gumma, Okayama で、それ以外はそれらより熱抵抗性が低くなっていた。

図3は、測定した酸抵抗曲線の3・4回を平均した値をプロットしたものである。Okayama 株では pH 2.25、Osaka 株では pH 2.75 において、7℃での incubation の際、加熱処理した菌液の方が非加熱のものよりも高い酸耐性を示した。それより、低い pH では、熱処理による酸耐性の違いは小さくなった。また、高い pH においても、この酸耐性の違いは観察されなかった。37℃においては、双方の菌株において、どの pH でも、加熱、非加熱による違いは見られなかった。このように、加熱処理によってもたらされる酸耐性の違いが見られる pH は比較的限定されていることがわかった。

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

Vibrio においては6菌株を、5つのpH、3つの温度、3つの塩濃度で、熱抵抗試験を行ない、得られた熱抵抗曲線を、

Gompertzモデル

$$N/N_0 = A + C \cdot \exp(-\exp(-B \cdot (t-M)))$$
 と

Weibullモデル

$$\log N = \log N_0 - b \cdot t^n$$

に回帰することで、任意のpH、温度、塩濃度の3つのパラメータからその時に得られるであろう熱抵抗曲線を予測するモデル系の構築を試みた。その結果、実際の実験から得られた熱抵抗曲線は2つのモデルとも非常によく回帰できた。この2つのモデルから得られた係数をつかって、それぞれ重回帰分析によって、pH、温度、塩濃度の3つの条件から熱抵抗曲線を予測するモデル式を求めた。これらの予測式をつかって任意の条件pH、温度、塩濃度より、熱抵抗曲線を予測し、実際の実験結果と比較したところ、GompertzモデルよりWeibullモデルを用いて作ったモデル式

$$\log N = \log N_0 - b \cdot t^n$$

ただし

$$\ln(b) = -8.7596 + 14.4262 \cdot$$

$$\text{pH} - 2.7644 \cdot \text{Temp} + 14.4423 \cdot \text{Na} - 0.0222 \cdot$$

$$\text{pH}^2 + 0.044 \cdot \text{Temp}^2 + 0.0452 \cdot \text{Na}^2 - 0.1974 \cdot$$

$$\text{pH} \cdot \text{Temp} - 1.7885 \cdot \text{pH} \cdot \text{Na} - 0.0203 \cdot \text{Temp} \cdot \text{Na}$$

$$\ln(n) = -16.5297 + 15.6149 \cdot$$

$$\text{pH} - 3.0108 \cdot \text{Temp} + 16.8251 \cdot \text{Na} - 0.0814 \cdot$$

$$\text{pH}^2 + 0.0543 \cdot \text{Temp}^2 + 0.0417 \cdot \text{Na}^2 - 0.2374 \cdot$$

$$\text{pH} \cdot \text{Temp} - 1.8226 \cdot \text{pH} \cdot \text{Na} - 0.0671 \cdot \text{Temp} \cdot \text{Na}$$

の方が、実際に観測された熱抵抗曲線によくあうモデル式が得られた。(図4)

冷凍保存実験においては、6菌株のうち血清型の異なる3菌株を選んで実験に用いた。菌株の違いによる差異はこの冷凍実験を通して見られなかった。冷凍保存時の菌の生存数の変化(生存曲線)のパターンはどの条件でも類似していて、冷凍開始後1日までの間に1・4対数個ほど急激に減少し、あとは6・7週間にわたって緩やかに減少した。1日までに起こる急激な減少は、食品材料よりもポリミキシン培地中の方が大き

かった。また、ポリミキシン培地における塩濃度の影響は、その濃度が低いほど大きく、2%の時3対数個以上減少するのに対し、5%、10%では1-2対数個であった(図5)。また食品材料では1-1.5対数個程度の減少であったが、ほたてに接種した場合よりもあおやぎに接種した菌の減少の方が大きかった(図6、7)。1日以降に見られる緩やかな減少においても、ポリミキシン培地(0.07-0.1対数個)のほうが食品材料(0.02-0.03対数個)よりも大きかった。あじの接種場所の違いによる生存曲線の差異は認められなかった。

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

図8に、本研究で検討した二次汚染の経路を示す。

(1) 手指を介した一般生菌ならびに大腸菌群の移行動態

グローブジュース法を用いて回収された手指上の菌数は、菌がコンパクトドライ上に検出される確率をベイズ理論に基づいて考慮し、その確からしさがポアソン関数

$$L(x) = \prod_i \frac{e^{-\lambda D_i^{-1} V_i} (\lambda D_i^{-1} V_i)^{x_i}}{x_i!}$$

(ただし λ (cfu/ml) はグローブジュース中の菌濃度、 D はコンパクトドライ i に滴下される菌液の希釈係数、 V は滴下量(今回は全て1 ml)、 x は計測された cfu) で表わされるものと考えた。

同様に、各メニューに含まれる食材がもとも有する細菌数を算出し、メニュー毎に合計した。

食材(原材料)から調理人の手指への菌の移行率は、

$$r = (L_A - L_B)/L_F$$

ただし

r = 移行率/片手

L_A = 食材取り扱い後の手指の菌数(cfus)

L_B = 食材取り扱い前の手指の菌数(cfus)

L_F = 食材に含まれる総菌数 (cfus)

メニューD では、使用したひじきが予想外にきれいであったため、菌の移行率が算出できなかった。それ以外のA~Cの各メニューについて、移行率の結果を表1に示す。結果は確率分布を持つが、指標としてその平均値と5%ならびに95%値を取り上げてみると、メニュー毎に非常に一定した値を示した。大腸菌群についてもほぼ同様の結果が得られた。

手指に塗布した大腸菌のまぐろあるいはキャベツの移行については、菌数は測定したが数学的解析はまだ行っていない。来年度の研究において、解析を行なう。

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

調整した卵液中の SE 菌数ならびに実際に模擬調理台へ滴下された SE 菌数 (N_i) は、希釈卵液からの回収 cfu 値が Gamma 分布、SE 濃度が Poisson 分布するものと考え、補正を加えた。テーブル面に移行した菌数 t_i は、

$$t_i = \text{RiskNegbin}(x_i, p_r/10) + x_i$$

(ただし p_r はふき取り法による菌の回収率であり、別途、平均 66.6% [90% 信頼限界値: 42.9%, 95.2%] と算出、 x_i はふき取り法による cfu) により算出した。調理台への滴下菌数のうち、ふきんを介してテー

ブル面まで移行した菌の割合 t_i/N_i を図 9 ならびに表 2 に示す。4 回の実験の結果は、それぞれの確率分布の重なりが大きいので (図 9)、再現性が良いと判断された。

SE 希釈液を添加したふきん内部の走査型電子顕微鏡写真を図 10 ならびに図 11 に示す。ふきんの微細繊維に SE の鞭毛がしっかりからみついている様子がわかる。

3. 腸炎ビブリオのリスクプロファイル作成

付表に作成したプロファイルを示す。

D. 考察

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

1996 年に単離された菌株のうち、DNA パターンの異なる菌株を選んで、その熱抵抗性を調べたところ、その D 値は 55℃、60℃の二つの温度で、大きく二つのグループに分かれた。この中で、違ったグループに属する 2 株を選んで、加熱処理の有無における 37℃、7℃での酸耐性を調べたところ、限定された pH 条件下ではあるものの酸耐性に違いが見られた。

O157 の各菌株間において、熱耐性や酸耐性に違いがあることが示されたことから、リスクアセスメント、特に Exposure Assessment において菌の数的動態を推定するためには、それらの variability を考慮した予測式を構築する必要があると考えられた。

Exposure Assessment において菌数の変化が予想される場合として、流通・貯蔵過

程における増殖と死滅、調理の際の加熱や酸による死滅のほか、検食システムに基づき食材や調理後の食品を冷凍保存した際の低温による菌数の変化も挙げられる。本研究においては、国内の食中毒事例を中心に分離された *E.coli* O157:H7 と腸炎ビブリオを用い、熱抵抗性、酸抵抗性、そして凍結に伴う菌の生残動態を解析した。

Vibrio の凍結保存時の菌の生残動態は、今回我々の行った研究では、菌株の違いによる差、食品材料における差は明確に示されなかった。しかし、もっと多くの菌株、食品材料においてもこのような結果がもたらされるのかどうかを明確にする必要があると思われる。我々の実験において食品材料も液体培地においても、冷凍開始初期段階で急激な菌数の減少が見られた。このことは、検食システムにおいて冷凍保存された食品を検査する場合、摂食時より少ない菌数を検出してしまう可能性があることを示している。したがって、どの菌株においても、どの食材においても、またどのような条件であってもこの減少が見られるのかを早急に調べる必要があると考える。また他種の細菌においても調査する必要があると思われる。

予測式を構築するうえで、我々は主に、細菌の増殖・死滅過程によく用いられてきた Gompertz モデルと、Peleg and Cole (1998) によって報告された Weibull の密度関数を使ったモデルを用いた。微生物の増殖・死滅においては、いまだに理論により得られるモデルの中で実際の細菌の挙動の間によくフィットできるものは少なく、またよくフィットできるものでも理論的裏づけが弱い場合が多い。今回は実際の細菌の

挙動に比較的フィットする2モデルについて検討した。実験値を双方のモデルで回帰した結果は非常によくフィットした。この回帰結果を元に任意の実験条件から予測される熱抵抗曲線を求めるモデル式を重回帰分析を用いて作成した。この結果は Weibull モデルを用いた予測モデルの方が実際の実験結果をよく予測した。これは、Gompertz モデルより Weibull モデルの方が式中のパラメータが少なく、重回帰分析による誤差が少ないことによるためかもしれない。我々は、予測式を構築するのに、比較的単純なモデルであり、実際の実験データともよくあう Weibull モデルを使うことを考えている。また、このモデルを使うにあたっては、このモデルの理論的裏づけもさらに検討していかなければならないと考えている。

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

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。FAO/WHO による鶏肉の *Salmonella* と *Campylobacter* のリスクアセスメントにおいても、調理過程の二次汚染による食品の汚染は考慮すべきものと分析されたものの、具体的なデータに欠け、大きな仮定を導入せざるを得なかった。2001 年 12 月にシアトルで行なわれた Exposure Assessment に関するガイドライン作成のための Workshop においても、調理消費過程とそこでの二次汚染に関するデ

ータの必要性が一つの議題として検討された。この部分に定量的データを提供することは、国内だけでなく国際的に貴重なことと思われる。

この分担研究においては、調理過程の二次汚染を、手指を介する経路と調理台をふくむ調理器具表面を介する経路とに分けて、それぞれデータ収集を行ない、また数学的解析を行なった。どちらの経路についても、使用した食材や菌ごとに非常に再現性良く移行率が算出された。このことは、世界でもまだ数少ないこの部分の実験としてまた数学的解析手法として、本研究の手法が妥当であり、結果の利用が可能であることを示唆している。今後は、今回検討したような経路での二次汚染が起こる頻度を推定して加味することにより、実際の定量的リスクアセスメントに今回のデータを生かしていきたい。

3. 腸炎ビブリオのリスクプロファイル作成

今回、アメリカのコーデックスワーキンググループ対応メンバーが作成した、リスクプロファイル項目を参照し、日本のデータを主に用いて、腸炎ビブリオのリスクプロファイル作成を行なった。本来、リスクプロファイルはリスクアセスメントをどう依頼するかを検討にあたり、マネージャー側が作成するものである。本分担研究において、わが国で初めてのリスクプロファイルを提示したことにより、今後マネージャーサイドでの作業の参考にいただければ幸いである。

E. 結論

国際的手法に準じてわが国独自の微生物学的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。基本的に、国際的に提唱されている手法の一部について妥当性が実証され、また日本でのデータ収集が有用であることも示された。今後は、具体的なリスクアセスメントの対象と目的に応じ、今回の手法を応用し、必要なデータ収集と解析にあたる予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 講演等

Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Itoh Y. and Hara-Kudo Y.
Control of *Escherichia coli* O157:H7 contamination in food: sprout as an example
11th World Congress of Food Science and Technology, Seoul, Korea, April 22-27, 2001

Fazil, A., Lammerding, A. M., Ebel, E., Kasuga, F., Kelly, L. and Anderson, W.:
Risk Characterization of *Salmonella* in Poutry and Eggs.
Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk 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 O157: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

春日文字

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

春日文字

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

春日文字

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

春日文字

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

春日文字、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 回獣疫学会学術集会、川崎市、2002 年 3 月

山本茂貴、春日文字、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ー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ーサルモネラ症を例にしてー
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

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

I. 参考文献

Peleg, M. and Cole, M.B. (1998) Reinterpretation of microbial Survival Curves. Critical Reviews in Food Science, 38, (5), 353-380

Ebel, E., Kasuga, F., Schlosser, W. and Yamamoto, S. (2000) Exposure assessment of *Salmonella* Enteritidis in eggs. MRA 00/04, FAO/WHO

Fazil, A., Morales, R. A., Lammerding, A. M., Vicari, A. S. and Kasuga, F. (2000) Hazard identification and hazard characterization of *Salmonella* in broilers and eggs. MRA 00/03, FAO/WHO

Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods
FAO Headquarters, Rome, Italy, 17 - 21 July 2000

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

Report of the Joint FAO/WHO Expert
Consultation on Risk Assessment of
Microbiological Hazards in Foods.
Risk characterization of *Salmonella* spp. in
eggs and broiler chickens and *Listeria*
monocytogenes in ready-to-eat foods.
FAO Headquarters, Rome, Italy, 30 April - 4
May 2001

森田師郎、牧島満利子、角田光淳、春日文
子、熊谷進、他
効果的な各種手洗い法の検討
東京都衛生局学会誌、No. 100、212-213、
1998

森田師郎、牧島満利子、角田光淳、春日文
子、熊谷進、他
各種手洗い法の洗浄効果の検討
日本食品微生物学会雑誌、第16巻、第1
号、p. 65-70、1999

山本茂貴、春日文子
鶏卵における *Salmonella Enteritidis* の微
生物学的リスクアセスメントーFAO/WHO に
よるプロジェクト
獣医疫学雑誌 4, 87-89. (解説) 2000

春日文子、廣田雅光、伊藤嘉典、熊谷進
食中毒菌の加熱致死特性に関する基礎的研
究
防菌防黴、第38巻、第10号、p. 643-648、
2000

図 1. 腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157:H7 5 菌株の pH 7.3 (TSB) 中、55°C における熱死滅曲線

Sep. 29-Oct. 14., 1999: *E. coli* O157:H7, Average of Trials, Hiroshima 2 (Hiroshima), Shizuoka 126 (Shizuoka), Oku 23 (Okayama), Sakai 212 (Osaka) and Sakai 298 (Gumma), TSB (p.H.7.3), 55°C

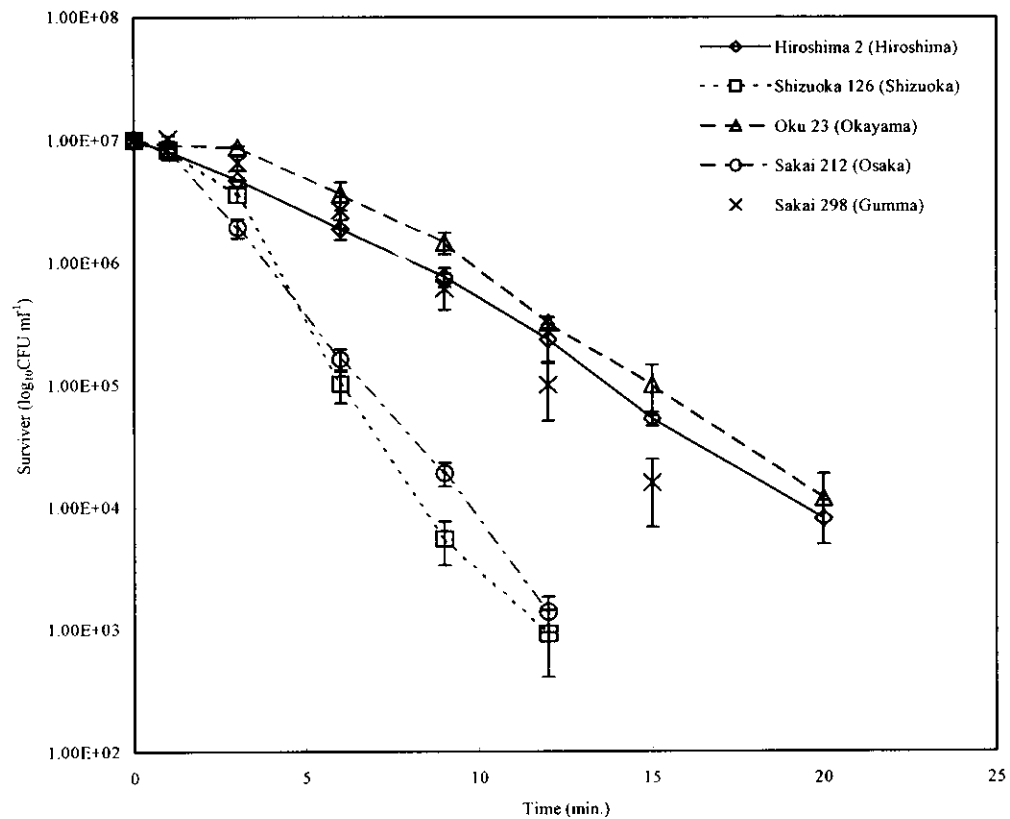


図 2. 腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157:H7 5 菌株の pH 7.3 (TSB 中)、60°C における熱死滅曲線

Oct. 20-Nov. 12., 1999: *E. coli* O157:H7, Average of Trials, Hiroshima 2 (Hiroshima), Shizuoka 126 (Shizuoka), Oku 23 (Okayama), Sakai 212 (Osaka) and Sakai 298 (Gumma), TSB (p.H.7.3), 60°C

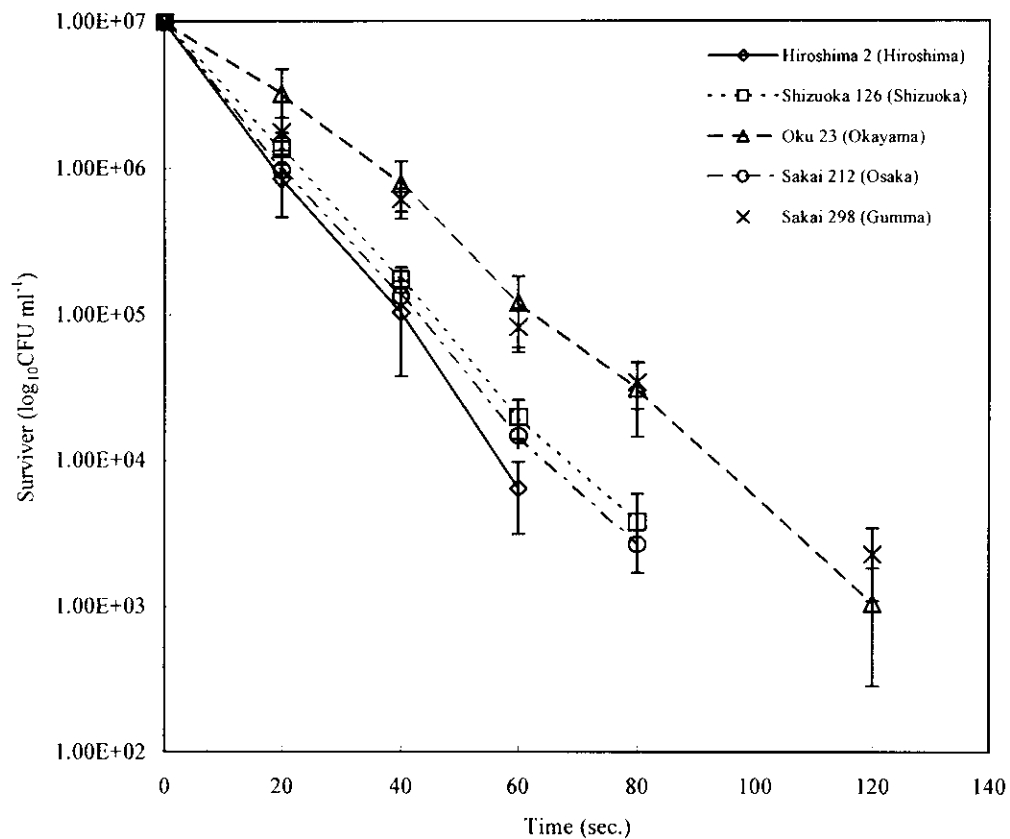


図 3. 加熱、非加熱処理の Okayama、Osaka 両菌株の酸性培地中の 37℃、7℃における死滅動態

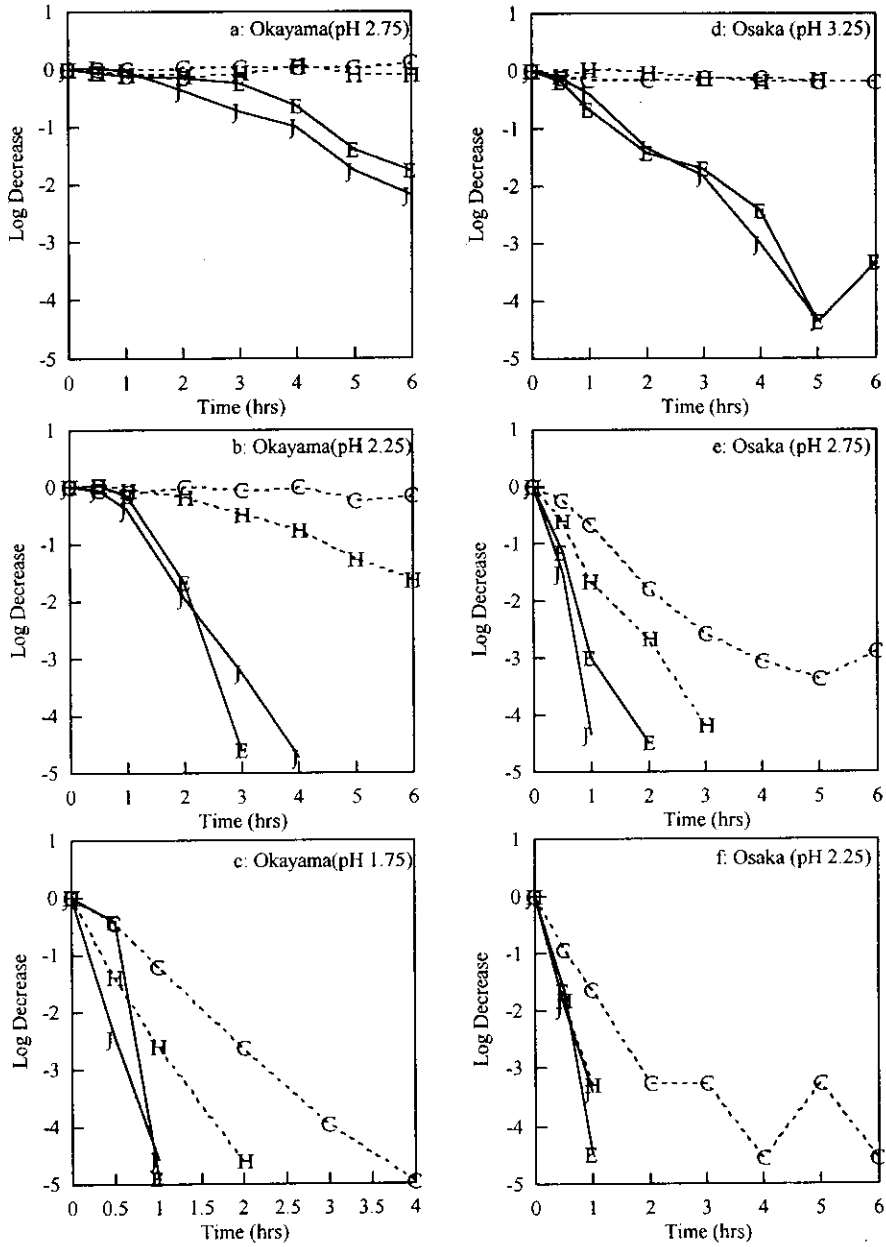


図 4. Weibull 式を用いた予測値と実測値の例
(条件:B-31, 1%, pH7.7, 48℃)

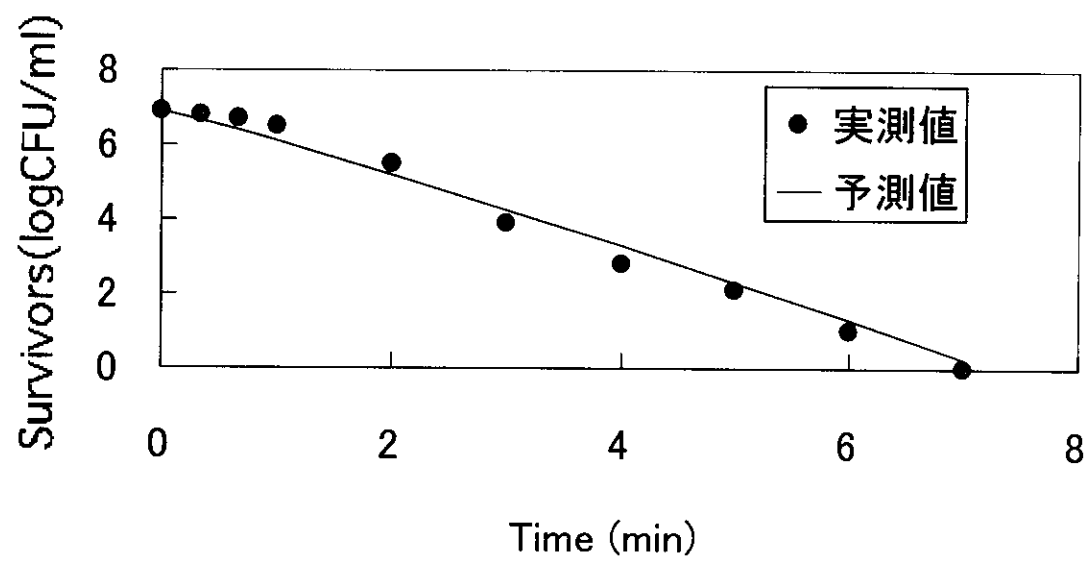
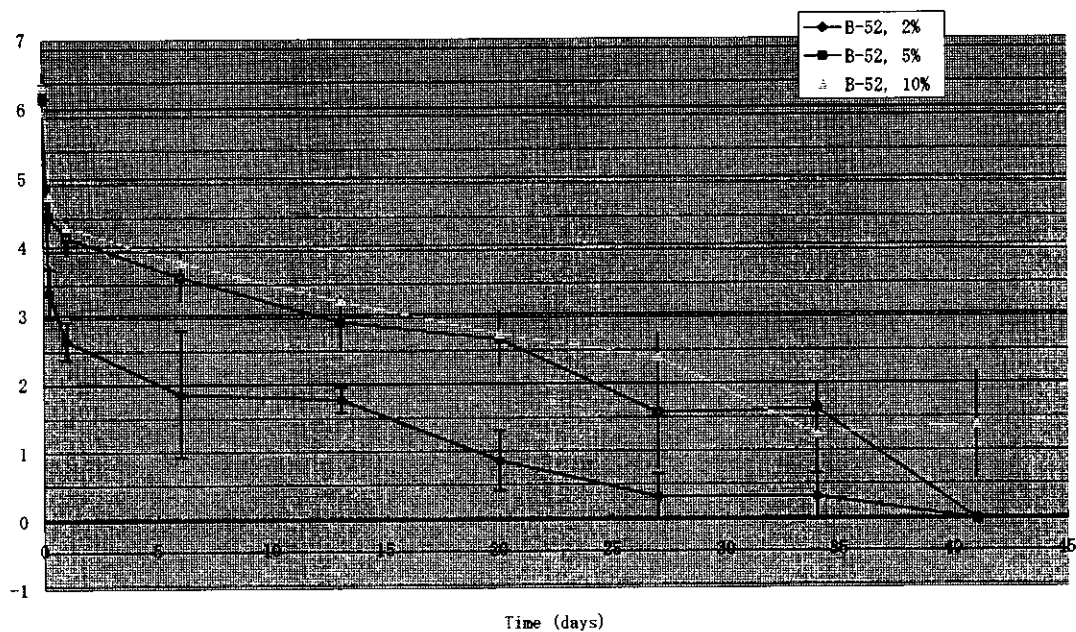
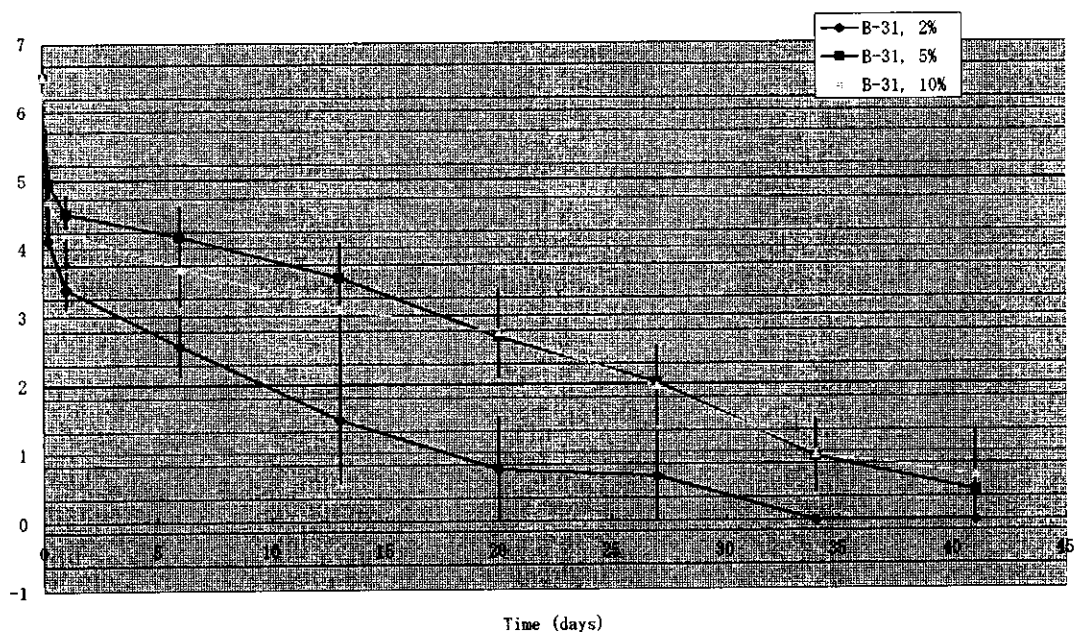


図 5. 腸炎ビブリオ 3 菌株をポリミキシン培地中で -25℃ に保存したときの菌数の変化

B-52株の様々な塩分濃度におけるポリミキシン培地中での生存曲線



B-31株の様々な塩分濃度におけるポリミキシン培地中での生存曲線



C-3株の様々な塩分濃度におけるポリキシン培地中での生存曲線

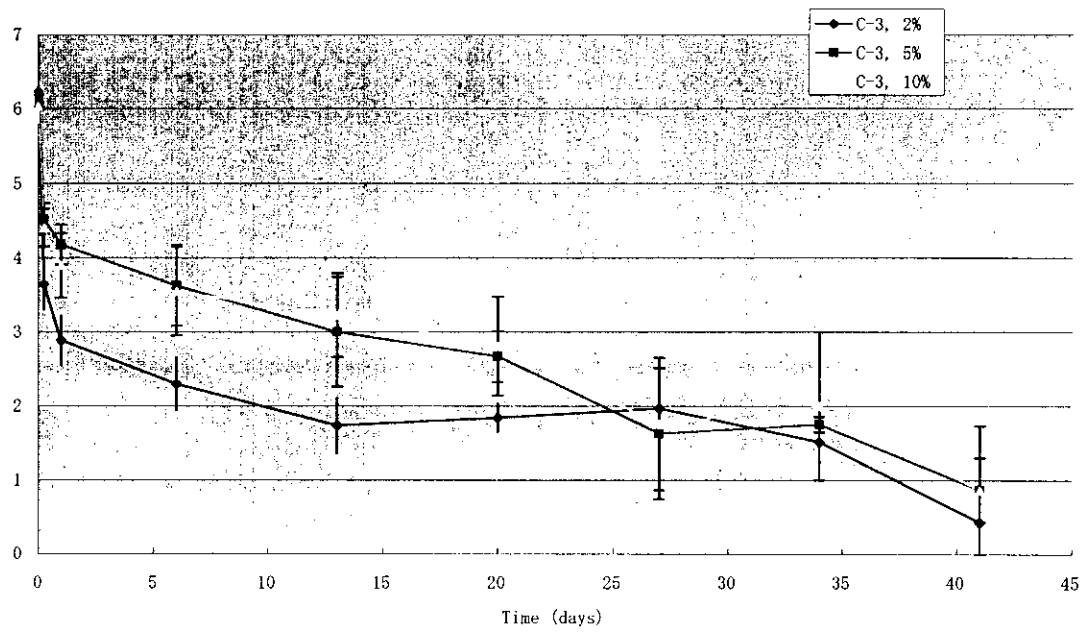


図6. 腸炎ビブリオ3菌株をあじのえらとはらに接種し・25℃に保存したときの菌数の変化

あじに接種し冷凍(-25℃)したときの生存曲線

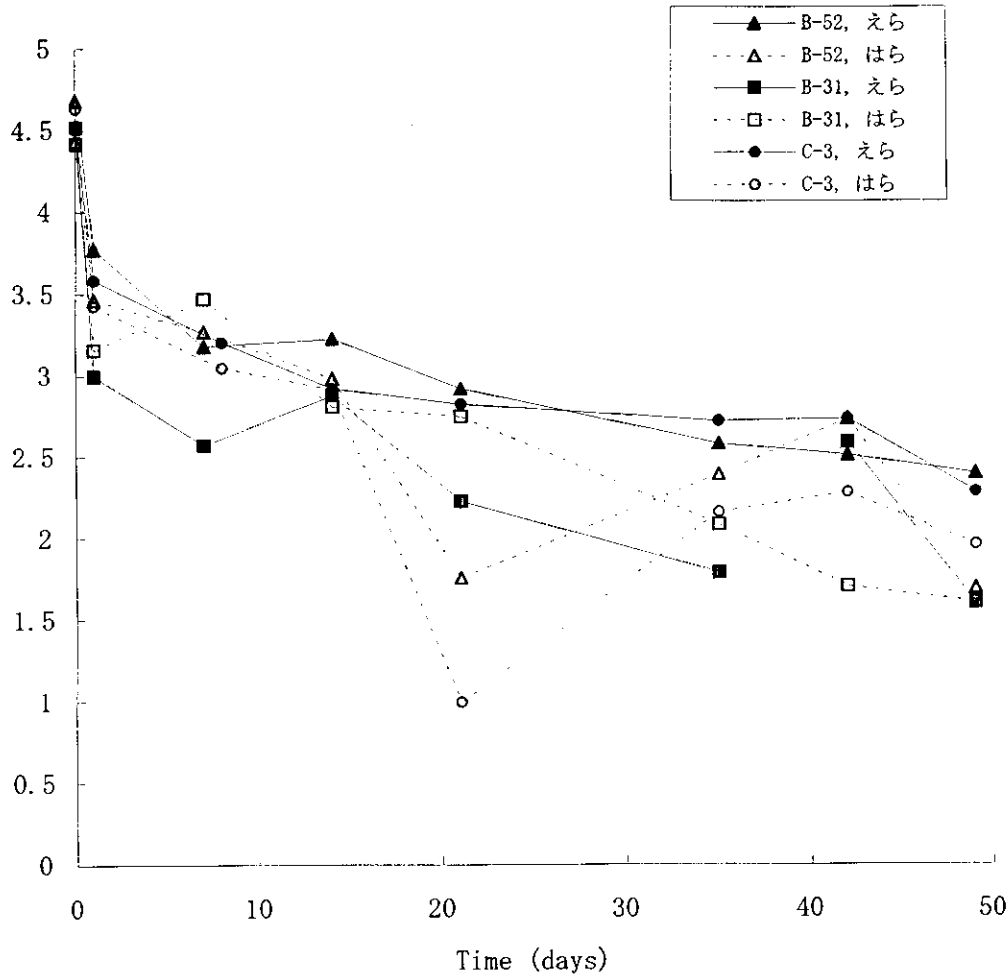


図 7. 腸炎ビブリオ 3 菌株をほたてとあおやぎに接種し-25℃に保存したときの菌数の変化

ほたて、あおやぎに接種し 冷凍保存(-25℃)したときの生存曲線

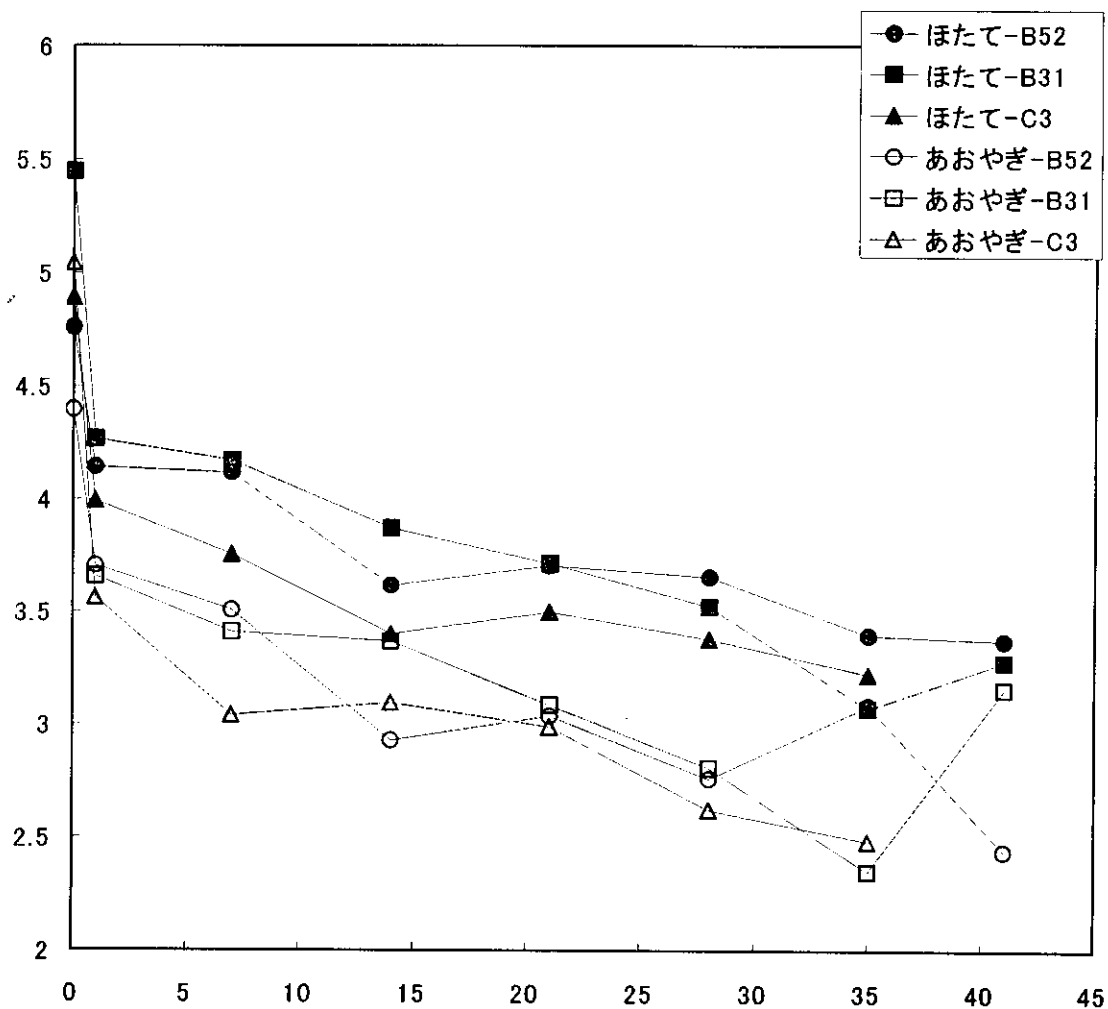


図 8. 調理中に起こりうる二次汚染として検討した経路

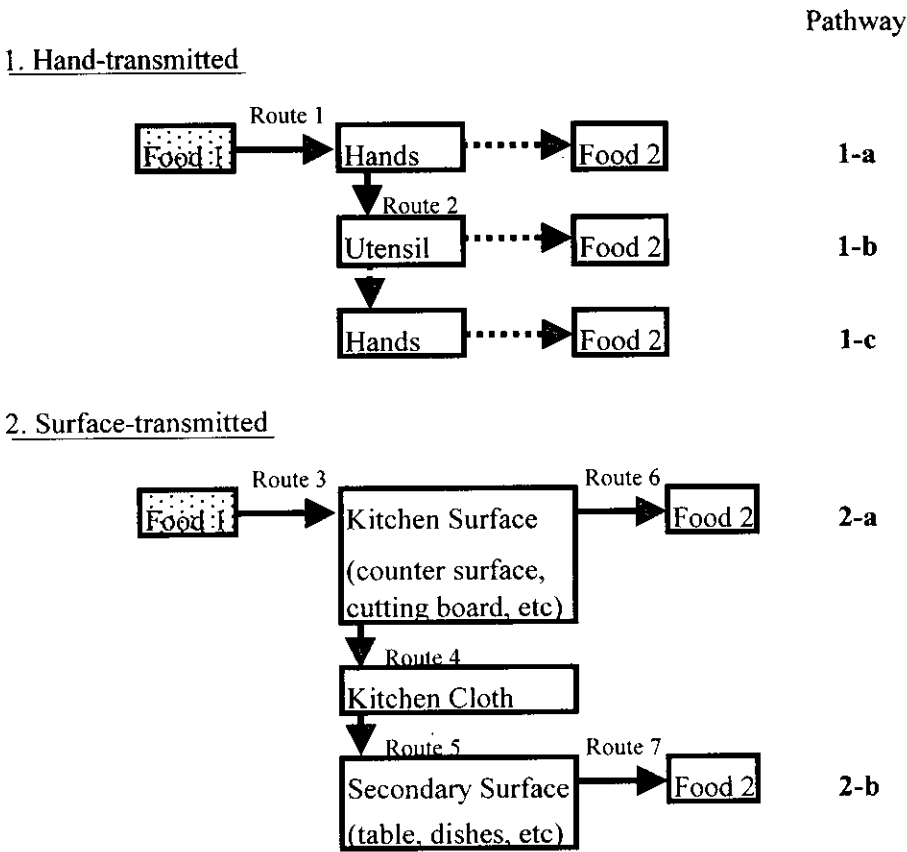


図 9. 調理台からふきんを介してテーブル面へのサルモネラ・エンテリティディスの移行率
(4 回の実験各回の移行率の確率分布)

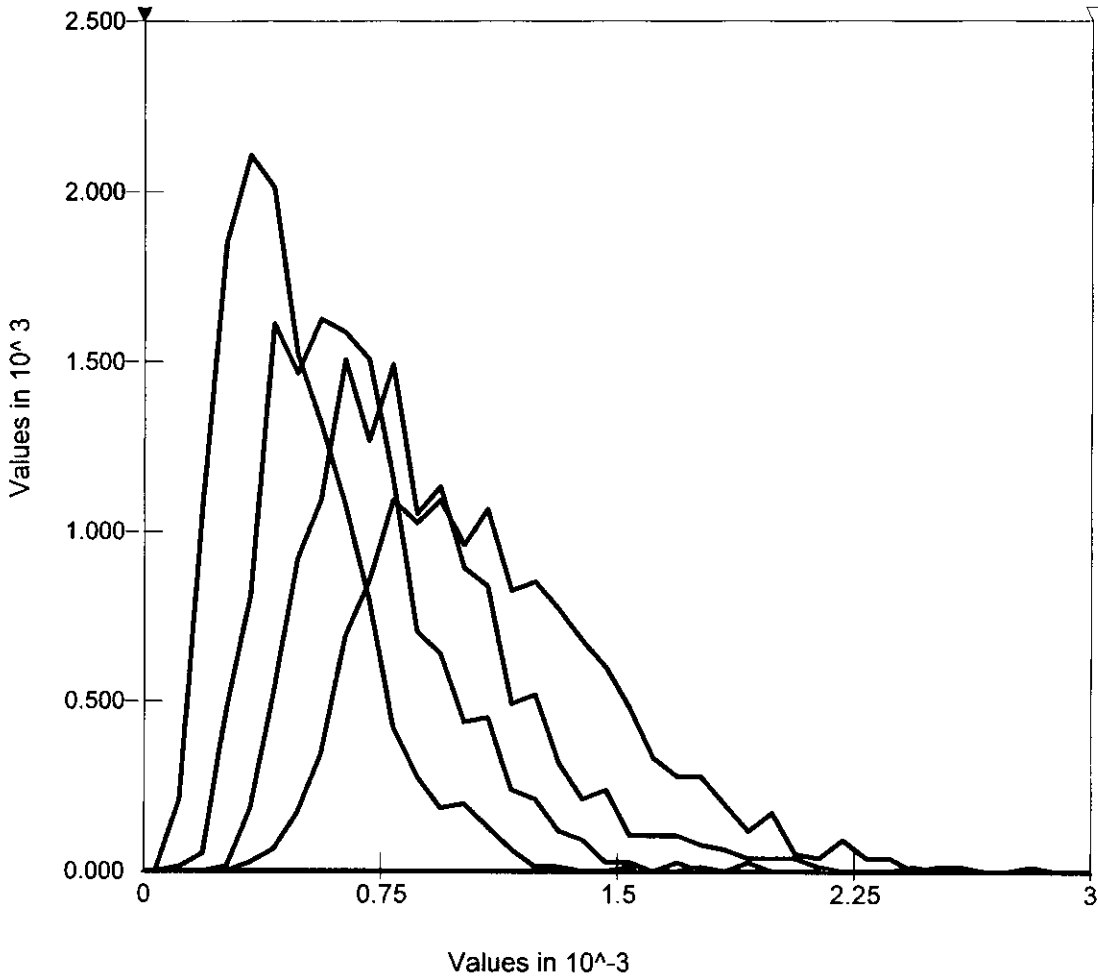


図 10. SE 希釈液をふき取った後のふきん繊維に付着する SE 菌体

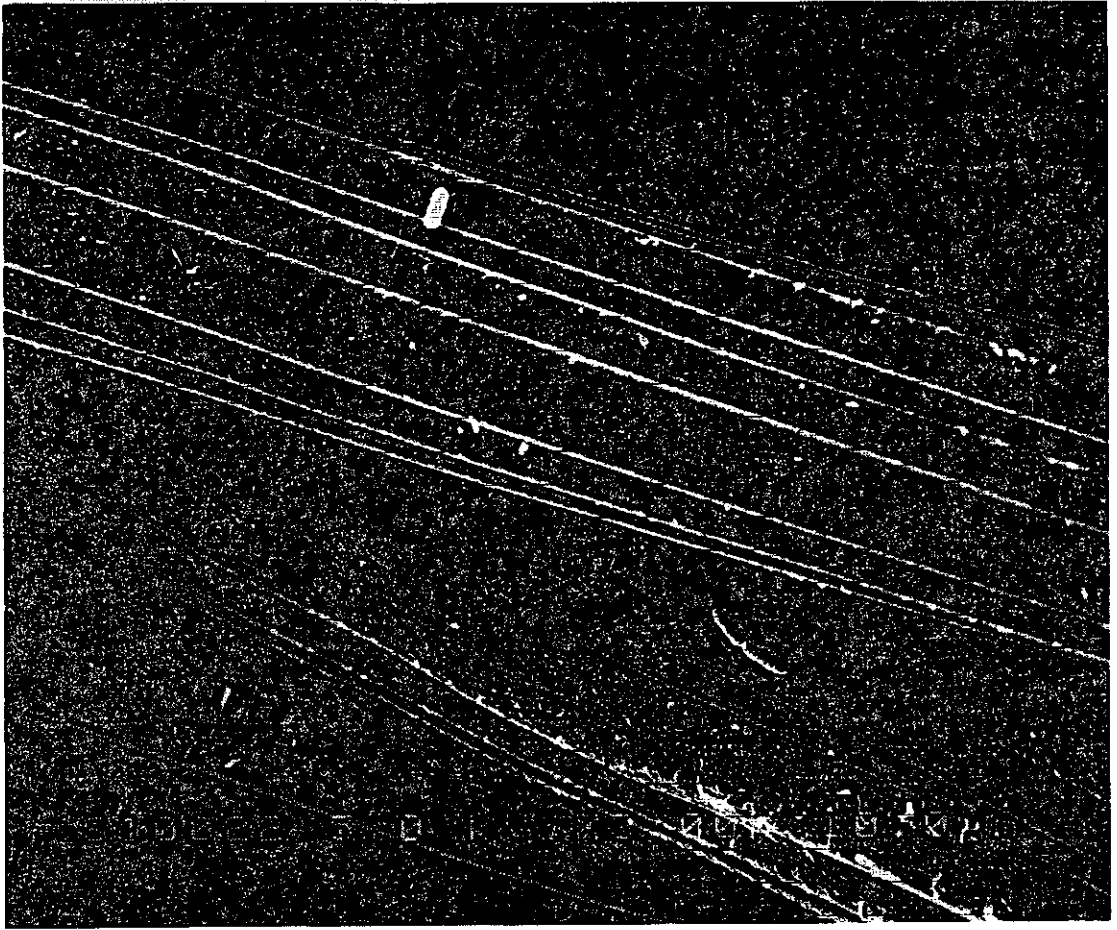


図 11. 図 10 の上部を拡大したもの

(菌の鞭毛がふきの微細繊維に密着してからまっている様子がわかる)

