

り、これらの菌株も分離菌株の同定結果から、同一菌株による汚染と考えられる。また、10月26日調査の7頭中4頭でSTECの保菌が認められ、その内2頭で同じ性質を示すSTEC(O血清型不明)の保菌が認められた(データ示さず)。一般的に肥育牛は群管理されることが多いが、北海道A農場と石川A農場も群管理で飼育されており、数頭の群が居住場所、飼槽および水飲み水槽を共有することになる。この結果、なんらかの経緯でこうした施設が汚染されれば、同一群全ての牛に汚染が広がる可能性が高く、こういった状況でこの2つの農場の汚染が群単位で拡大したものと考える。栃木B農場は2頭の牛から分離(同日の検査)されたが、菌株の同定結果は一致しなかった。しかしこの内の1頭から分離された菌株は、同日検査の石川A農場3頭から分離された菌株と同定結果が一致した。また、北海道B農場出荷牛で保菌が認められたが、この分離株は同日検査の北海道A農場の菌株と同定結果が一致した。これら2つのケースの考察については、今後の調査・解析結果を待ちたい。

今回の調査で、愛知県出荷牛29頭はすべて黒毛和種か交雑牛であり、その内20頭が8、9月出荷であったが、1頭も直腸便中0157および026保菌が認められなかった。8、9月の他の道県出荷牛の直腸便中0157保菌率が57.1%であった(表6)のに対し非常に良好な結果であった。愛知県からの出荷農家数は11農家であったが、これらの農家は全て同一の農業共同体として稼働しており、この共同体での近年の試みとして、牛舎の構造面では、床はコンクリートとし、床面に決められた時間に水が一斉に流れ、常に床を清潔に保てるような構造にしている。また腸内環境を正常に保つことを目的として、飼料に生菌製剤(プロバイオティック乳酸菌)を添加して給餌している。当所での平成12~15年度の調査では、同共同体からの出荷牛の直腸便中0157保菌率は11.8%であり、同期間の調査結果(12.4%)と大きな開きはなかった。また今回当所でも実施した直腸便中STEC保菌調査結果(表7)でも、他県出荷牛の保菌率が42.9%であったのに対し、愛知県出荷牛では10.3%であり、分離菌株の同定の

結果、同一農場の複数個体から同一とみなされる菌株が分離されることもなかった。これらのことから、この共同体での上記のような試みが功を奏し、病原性大腸菌の定着と汚染の拡大を防ぎ、今回のような非常に良好な結果になったのではないかと推察される。

牛は輸送ストレスや輸送に際しての絶食ストレスにより消化管内環境に変調を来し、直腸便中の大腸菌数が大幅に増加する。当と畜場では、全国の各方面から牛が搬入されるため、長時間輸送によるストレスを感じている牛が多いと考えられ、直腸便中の大腸菌数が大幅に増加してしまった個体が多数搬入されているものと考えられる。また、当所での以前の調査（平成15年6～8月）では、直腸便中0157保菌率が21.8%であったのに対し、胃内容物中0157保菌率は29.1%と非常に高い結果であった。さらに、多くの生産者が同じ成長度合いの牛を群管理し、群ごとに出荷することが多い。これらのことから、汚染された群が搬入されれば、と畜場内の汚染の可能性は非常に高くなる。

微生物学的危害のひとつとして、と畜場に搬入される牛の0157等病原性細菌保菌率を低く抑えられれば、と畜場内の汚染の可能性も低くなるため、愛知県の農業共同体のような、牛に保菌させない、あるいは汚染を拡大させないといった取り組みは非常に有益である。0157等病原性大腸菌による汚染は農場内の群単位で存在しているものと考えられ、高率保菌牛を出荷している農場を摘発し、対策を促していくことはと畜場の衛生対策の一部になるものとする。

今回当所ではST産生大腸菌の保菌調査も同時に実施した。枝肉の直腸便による汚染の有無を調査する際、直腸便中に1年を通してある程度保菌されている菌種を指標菌とするのが望ましい。アメリカ農務省ではサルモネラ菌属を指標菌としているが、当所の調査ではサルモネラ属菌は検出されず、これを糞便汚染の指標菌とするのは適当ではない。今回の調査で最も検出率の高かった0157が通年で12.5%、冬季(12～2月)では1頭からも検出されず、当所での過去5年の調査でも冬季の保菌率は

1.7%と非常に低かった。026は通年の保菌率が2.5%と非常に低かった。この結果から、0157や026を糞便汚染の指標菌とするのも不適當であると考え。そこで、0157と026分離結果に、当所で実施したSTECの保菌調査結果を加えた結果、通年の保菌率が35.0%で、冬季でも23.3%であった。0157の存在を確認するのに迅速検出キットを使用している自治体も多く、その信頼性も確認されているが、STの存在を確認するための迅速検出キットも市販されており、その信頼性が確認されれば、日常検査での利用も可能である。

以上のことから、枝肉の糞便による汚染の有無を判断するにあたっての指標菌は0157や026を含むSTECとするのが適当なのではないかと考える。

表1. 出荷月別検出結果

	直腸便 (n=120)			口腔内 (n=101)		
	O157	O26	Salmonella	O157	O26	Salmonella
7月	10.5%	10.5%	0.0%	NT	NT	NT
8月	35.0%	0.0%	0.0%	5.0%	0.0%	0.0%
9月	23.8%	0.0%	0.0%	0.0%	4.8%	0.0%
10月	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
11月	10.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
12月	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1月	0.0%	10.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
2月	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
計	12.5%	2.5%	0.0%	1.0%	1.0%	0.0%

NT: 試験実施せず

表2. 牛の種類別結果

	直腸便			口腔内		
	O157	O26	Salmonella	O157	O26	Salmonella
黒毛和種	8.0%	12.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
交雑牛	15.0%	0.0%	0.0%	1.4%	1.4%	0.0%
ホルスタイン	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
外国牛	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

表3. 黒毛和種・交雑牛の月別結果

	直腸便 (n=120)			口腔内 (n=101)		
	O157	O26	Salmonella	O157	O26	Salmonella
7月	10.5%	10.5%	0.0%	NT	NT	NT
8月	35.0%	0.0%	0.0%	5.0%	0.0%	0.0%
9月	23.5%	0.0%	0.0%	0.0%	5.9%	0.0%
10月	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
11月	10.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
12月	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1月	0.0%	20.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
2月	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
計	13.3%	2.9%	0.0%	1.2%	1.2%	0.0%

NT: 試験実施せず

表4. 出荷道県別結果

県名	直腸便 (n=120)			口腔内 (n=101)		
	O157	O26	Salmonella	O157	O26	Salmonella
北海道	35.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
栃木	75.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
石川	16.7%	0.0%	0.0%	5.6%	0.0%	0.0%
愛知	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.4%	0.0%
奈良	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
和歌山	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
兵庫	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
鳥取	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
徳島	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
香川	11.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
佐賀	9.1%	18.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
宮崎	0.0%	25.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
熊本	4.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
鹿児島	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
合計	12.5%	2.5%	0.0%	0.8%	0.8%	0.0%

NT: 試験実施せず

表5. 出荷農場別結果（いずれかの項目で陽性であった農場のみ）

農場名 (検体数)	直腸便			口腔内		
	O157	O26	Salmonella	O157	O26	Salmonella
北海道 A (8)	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
北海道 B (1)	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
栃木 A (1)	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
栃木 B (3)	66.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
石川 A (12)	25.0%	0.0%	0.0%	8.3%	0.0%	0.0%
愛知 B (1)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	50.0%	0.0%
徳島 A (1)	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
香川 D (2)	50.0%	0.0%	0.0%	NT	NT	NT
佐賀 C (1)	0.0%	100.0%	0.0%	NT	NT	NT
佐賀 D (1)	100.0%	0.0%	0.0%	NT	NT	NT
佐賀 F (2)	0.0%	50.0%	0.0%	NT	NT	NT
宮崎 C (1)	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
熊本 I (2)	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

NT: 試験実施せず

表6. 直腸便中 STEC 検出結果

	O157	O26	OUT	STEC 計
7月	10.5%	10.5%	26.3%	47.4%
8月	35.0%	0.0%	10.0%	45.0%
9月	23.8%	0.0%	14.3%	38.1%
10月	0.0%	0.0%	30.0%	30.0%
11月	10.0%	0.0%	20.0%	30.0%
12月	0.0%	0.0%	20.0%	20.0%
1月	0.0%	10.0%	20.0%	30.0%
2月	0.0%	0.0%	20.0%	20.0%
合計	12.5%	2.5%	20.0%	35.0%

OUT: O157・O26 以外の O 抗原性を有するか、O 抗原性不明であったもの

表7. 愛知県とそれ以外の道県出荷牛の直腸便中 O157 および STEC 保菌率の比較

	愛知県 (n=29)		愛知県以外 (n=91)	
	O157	STEC	O157	STEC
7月	NT	NT	10.5%	47.4%
8月	0.0%	20.0%	70.0%	70.0%
9月	0.0%	0.0%	45.5%	72.7%
10月	0.0%	0.0%	0.0%	50.0%
11月	NT	NT	10.0%	30.0%
12月	NT	NT	0.0%	20.0%
1月	0.0%	100.0%	0.0%	22.2%
2月	NT	NT	0.0%	20.0%
計	0.0%	10.3%	16.5%	42.9%

NT: 試験実施せず

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

分担研究者 品川邦汎 岩手大学

と畜場における HACCP に関する研究

と畜場における高度衛生管理システムを確立する基礎的データを得るため、と畜場に搬入された牛の EHEC026、0157 及びサルモネラの汚染実態を調査した。78 頭の牛について調べたところ、EHEC0157 については、直腸内容物 10 頭 (12.8%)、唾液 4 頭 (5.1%)、枝肉 3 頭 (3.8%) から検出された。EHEC026 およびサルモネラはいずれの検体からも検出されなかった。このことから、と畜場における汚染の指標とする病原菌としては、EHEC0157 が適当であると示唆された。

研究協力者

浅見 成志
群馬県中央食肉衛生
検査所

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌(EHEC)及びサルモネラは、ヒトにおいて重篤な症状を起こし、公衆衛生上たびたび問題となっている。牛はその保菌動物として知られており、ヒト

への感染経路の一つとして、と畜場での解体処理時の枝肉や内臓への汚染があげられる。このため、枝肉におけるこれら病原菌の汚染実態から、解体処理方法が適切であるかどうか評価することは、と畜場における高度衛生管理システムを確立する上で重要であると考えられる。

米国においては、2000 年までに全てのと畜場に対して HACCP システム導入が義務づけられ、現在、農務省食品安全検査局

(USDA・FSIS)がそのシステムの検証として、枝肉のサルモネラ検査を実施している。一方、日本においても、とちく場法施行規則の一部改正により、HACCPシステムの考え方に沿った衛生管理が実施されているところであり、と畜場における衛生管理を評価し、指導するため、行政側の実施する細菌学的検証方法を設定する必要がある。以上のことから、その基礎的データを得るため、牛における EHEC026、0157 及びサルモネラの汚染実態を調査した。

B.検査方法

1) 材料

群馬県 A と畜場に平成 16 年 8 月から平成 17 年 2 月に搬入された、牛 78 頭 (黒毛和種 11 頭、F1 種 62 頭、ホルスタイン種 5 頭) の直腸内容物、唾液、枝肉を材料とした。

直腸内容物は消毒済みの薬さじにて、唾液はとさつ直後に 3 本の滅菌綿棒にて各約 1g を採取し、検体とした。枝肉は mEC 培地または BPW10ml を浸したスポンジで胸部および臀部各 100cm² を拭取り、これを合わせて 1 検体とした。

2) EHEC 及びサルモネラの検出方法

各検体は、本研究班で定めた方法に準じて EHEC026、0157 及びサルモネラの検査を行なった。

すなわち、EHEC は各検体をノボジオシン加 mEC 培地 50ml に接種し、42°C で 18 時間増菌培養後、免疫磁気ビーズを用いて集菌し、0157 は CT-SMAC およびクロモアガーにより、026 は CT-RMAC により 37°C で 20 時間分離培養した。分離された菌について、生化学的同定および血清型別を行ない判定した。026 および 0157 に血清型別

された菌について、逆受身ラテックス凝集反応法にて志賀毒素(Stx)産生性を調べ、産生性のある菌株を EHEC とした。

サルモネラは各検体を BPW に接種し、35°C で 24 時間培養後、RV プイオンで 42°C 24 時間選択増菌培養し、MLCB および BGS により 36°C 24 時間分離培養した。分離された菌について、生化学的同定および血清型別を行ない判定した。

得られた EHEC の一部については、山形県衛生研究所にて、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いて解析を実施した。

C.研究結果

EHEC0157 については、78 頭中、直腸内容物 10 頭(12.8%)、唾液 4 頭(5.1%)、枝肉 3 頭(3.8%)から検出され、その中で同一個体の直腸内容物と唾液から検出された牛が 1 頭、直腸内容物と枝肉から検出された牛が 1 頭認められた。なお、EHEC026 およびサルモネラはいずれの検体からも検出されなかった。

農場別の EHEC0157 検出状況は、直腸内容物では 31 農場中 5 農場(16.1%)から、唾液では 31 農場中 3 農場(9.7%)から、枝肉では 31 農場中 2 農場(6.5%)から検出され、このうち陽性牛が複数認められた農場は、直腸内容物では 3 カ所、唾液では 1 カ所の肥育牛農場であり、その検出率はそれぞれ 11.8%(17 頭中 2 頭)、100%(2 頭中 2 頭)、100%(4 頭中 4 頭)、100%(2 頭中 2 頭)であった。4 頭中 4 頭が陽性であった農場については、9 月に 3 頭、12 月に 1 頭検査しており、農場内での高い汚染が認められた。なお、枝肉で陽性牛が複数認められた農場もあったが、これは同一日に連続で解体さ

れた枝肉であり、解体工程上の汚染が原因と考えられた。生産県別の EHEC0157 検出状況は、直腸内容物と唾液のどちらかあるいは両方から検出された牛が群馬県で 71 頭中 9 頭(12.7%)、埼玉県で 4 頭中 4 頭(100%)、茨城県 3 頭中 0 頭(0%)であり、群馬県以外はどちらも 1 農場を検査対象としていた。

月別の EHEC0157 検出状況は、直腸内容物と唾液のどちらかあるいは両方から検出された牛は、8 月 11 頭中 1 頭(9.1%)、9 月 20 頭中 6 頭(30.0%)、10 月 10 頭中 2 頭(20.0%)、11 月 9 頭中 0 頭(0%)、12 月 14 頭中 3 頭(21.4%)、1 月 6 頭中 0 頭(0%)、2 月 8 頭中 1 頭(12.5%)であった。

品種別の EHEC0157 検出状況は、直腸内容物と唾液のどちらかあるいは両方から検出された牛が黒毛和種 11 頭中 4 頭(36.4%)、F1 種 62 頭中 9 頭(14.5%)、ホルスタイン種 5 頭中 0 頭(0%)であった。

性別の EHEC0157 検出状況は、直腸内容物と唾液どちらかあるいは両方から検出された牛が去勢 47 頭中 12 頭(25.5%)、牝 31 頭中 1 頭(3.2%)であり、去勢牛から高率に検出された。

分離された EHEC0157 の 17 株における Stx 型は、Stx1 及び 2 型が 11 株(64.7%)、Stx2 型が 6 株(35.2%)であり、ヒトから分離される EHEC0157 の Stx 産生性と同じ傾向を示した。

PFGE では、同一個体の直腸内容物と唾液、直腸内容物と枝肉から検出された株についてそれぞれ泳動像を比較したところ、直腸内容物と唾液では、同一の泳動像を示したが、直腸内容物と枝肉では、異なる泳動像を示した。

D. 考察および結果

EHEC0157 の保菌率は、直腸内容物において 12.8%であり、以前に実施された全国的な調査の結果と比較して、高い保菌率を示した。これは、特定の農場由来の牛が高い保菌率を示したことがその一因として考えられた。すなわち調査した 31 農場の内、2 農場が 100%(4 頭中 4 頭、2 頭中 2 頭)の保菌率を示しており、特定の農場に EHEC0157 が高度に浸潤していることが示唆された。これにより食肉の EHEC0157 汚染を効果的に制御するためには、これら肥育牛生産農家に対する検査と防除対策が重要と考えられた。また、唾液においても 5.1%の牛から EHEC0157 が検出されていることから、牛の解体時における頭部、特に舌の衛生管理も重要であることが確認できた。

今回の調査では、サルモネラは全く検出されなかった。全国的なサルモネラ保菌率は、平成 11 年度に全国食肉衛生協議会が調査を実施しており、牛盲腸便において 0.5%と報告している。さらに、当所が「対米輸出食肉を取り扱うと畜場等の認定要綱」に基づき、HACCP システムの細菌学的検証で実施している牛枝肉の拭取り検査においても、サルモネラを全く検出していないことから、我が国における牛のサルモネラ汚染は比較的 low、と畜場における汚染の指標とする病原菌としては、サルモネラよりも EHEC0157 が適当であると考えられた。

一方、米国では比較的高率に牛のサルモネラ汚染が報告されていることから、FSIS は、と畜場における HACCP システム検証の

ため、枝肉のサルモネラ検査を実施している。しかしながら、日米における牛の病原菌汚染状況が異なると考えられることから、米国におけると畜場 HACCP システムの細菌学的検証方法をそのまま日本のそれに挿入することは、適切ではないと考えられた。と畜場における衛生管理システムの細菌学的検証方法の設定にあたっては、全国的な疫学的調査結果を基に施設規模、解体する牛の品種等に応じた評価基準を設定する必要がある。

今回、EHEC0157 の季節による検出状況は、調査前半(8~10 月)が 41 頭中 9 頭(22.0%)、後半(11~2 月)が 37 頭中 4 頭(10.8%)と従前の報告通り、冬季より夏季に保菌率が高い傾向が見られた。このことから、HACCP システムの細菌学的検証の指標として EHEC0157 を用いる場合は、季節による影響を考慮する必要があると考えられた。

今回 3 頭の枝肉から EHEC0157 を検出したが、これは同一日に連続して解体された牛から検出されたものであった。なお 3 頭の内、最も最初にと畜された牛の直腸内容物からも EHEC0157 が検出されたが、当所で PFGE を実施したところ、この EHEC0157 は、3 頭の枝肉から分離された株と泳動像が異なっていた。このことから、EHEC0157 を保菌していた牛の直腸内容物が自身の枝肉とその直後に解体された枝肉を汚染したのではなく、解体工程中に何らかの汚染源があり、そこから次々に汚染が広がったものと考えられた。と畜場における HACCP システムでは、加熱殺菌工程がないことから、衛生標準作業手順(SSOP)を遵守した解体作業を進めることが重要

であり、SSOP を再検討し、見直しを実施するとともに、SSOP のモニタリングと検証をさらに徹底させたい。

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

分担研究者 品川邦汎 岩手大学

牛の腸管出血性大腸菌O157、O26およびサルモネラ保菌状況と
枝肉汚染状況に関する調査

牛の直腸内容物、唾液、枝肉から、腸管出血性大腸菌O157、O26およびサルモネラの分離を行った。O157は直腸内容物の12/60件から、唾液の3/60件から、枝肉の5/60件から分離されたが、O26およびサルモネラはすべて陰性であり、牛の処理においては、O157はより重要な食中毒菌と考えられた。O157が検出された枝肉には、保菌牛由来のものと非保菌牛由来のものがあり、前者は保菌牛を処理した際の直接的な汚染と、後者は保菌牛からの間接的な汚染と考えられた。また、直腸内容物のO157菌数は、 10^2 以下～ 10^5 cfu/gと幅があり、高度保菌牛は枝肉の汚染源としてより重要な存在と思われた。

協力研究者

佐藤 博

新潟県食肉衛生検査センター 長岡

検査所

と畜場における高度衛生管理の確立のための病原体汚染実態調査として、牛の直腸内容物、唾液、枝肉の汚染実態を腸管出血性大腸菌O157、O26およびサルモネラに関して調べ、と畜場におけるHACCP導入を想定した危害分析と

1 目 的

現状把握を行った。

2 材 料

と畜場に搬入された牛の直腸内容物 130 件、唾液 60 件、枝肉 60 件を材料とした。O157 に関しては、定性分離をすべての材料について、定量分離を直腸内容物の 100 件について実施した。O26 とサルモネラに関しては、定性分離のみを各 60 件について実施した。各材料の採取方法は次のとおり。生前に滅菌綿棒で口腔内を拭き取り唾液を採取し、と殺後に直腸漿膜面を切開し内容物を採取した。枝肉については、滅菌スポンジ (WHIRL-PAK) を用い肛門周囲と胸部の各 100cm² を拭き取り、材料とした。なお、腸管出血性大腸菌分離用とサルモネラ分離用のスポンジは別とし、後述する増菌培地 10ml を含ませ、それぞれ片側の枝肉を拭き取った。

3 方 法

1) O157 の定性分離

直腸内容物 1g あるいは唾液 1g と 50ml の N-mEC をサンプリングバッグに入れ、ストマッキングにより均質化した。

また、枝肉材料を入れた WHIRL-PAK には 40ml の N-mEC を加え、同様に均質化した。それぞれ 42°C で 18~24 時間、増菌培養後、培養液を免疫磁気ビーズ (ダイナビーズ O157) で処理し、CT-SMAC とクロモアガー O157 に塗抹し、37°C で 18~24 時間、分離培養した。疑わしいコロニーを CLIG 培地でスクリーニング後、市販免疫血清および生化学的性状試験により同定した。

2) O157 の定量分離

直腸内容物を滅菌生理食塩水で 10³ まで段階希釈し、各 0.1ml をクロモアガー O157 (CT サプリメント添加) に塗抹し、37°C で 18~24 時間、分離培養した。観察に適した希釈段階の平板について藤色のコロニー数を計測し、そのうちの 10 個を釣菌し、上記 1) 同様に同定した。菌数は計測値に、同定した 10 株中の O157 の割合を乗じ算出した。なお、定量分離が陰性で、定性分離が陽性となった場合は、菌数を 10²cfu/g 以下とした。

3) O26 の定性分離

増菌手順は O157 と同一とし、上記

1) の培養液を、免疫磁気ビーズ（ダイナビーズO26）で処理後、CT-RMACに塗抹し、37°Cで18~24時間、分離培養した。疑わしいコロニーをTSI、LIM培地でスクリーニング後、市販免疫血清および生化学的性状試験により同定した。

4) サルモネラの定性分離

直腸内容物1gあるいは唾液1gと50mlのBPWをサンプリングバッグに入れ、ストマッキングにより均質化した。また、拭き取り材料を入れたWHIRL-PAKには40mlのBPWを加え、同様に均質化した。それぞれ37°Cで18~24時間、前増菌後、培養液の1.5mlを15mlのRVプロスに入れ、42°Cで18~24時間、増菌培養し、MLCB培地とBG（スルファピリジン添加）培地で37°C、18~24時間、分離培養した。疑わしいコロニーをTSI培地とLIM培地でスクリーニング後、市販免疫血清および生化学的性状試験に

より同定した。

5) 分離株のタイピング

分離されたO157株について、Xba1を用いたPFGEパターン、薬剤感受性パターンによるタイピングを山形県衛生研究所に依頼した。

4 成績

1) 分離率

O157は直腸内容物の8/60件(13%)、唾液の3/60件(5.0%)、枝肉の5/60件(8.3%)から分離された。O26およびサルモネラはすべての材料で

表1 牛由来材料からの腸管出血性大腸菌O157、O26およびサルモネラの分離成績

検査数*	分離材料		
	直腸内容物 60**	唾液 60	枝肉 60
O157	8 (13)	3 (5.0)	5 (8.3)
陽性数(%) O26	0 (0)	0 (0)	0 (0)
サルモネラ	0 (0)	0 (0)	0 (0)

* O157、O26およびサルモネラの分離を同時に行った件数。

** これらの中の30件については、O157の定量分離も併せて行った。

陰性であった(表1)。

2) 直腸内容物のO157菌数

O157の定量分離を行った、直腸内容物100件のうち11件からO157が分

離され、菌数と件数は次のとおりであった。10²cfu/g以下が4件、10²cfu/gが3件、10³cfu/gが1件、10⁴cfu/gが2件、10⁵cfu/gが1件であった(表2)。

3) O157の分離パターン

同一個体に関して直腸内容物、唾液および枝肉からO157の分離を行ったのは58件(頭)で、うち12件はいずれかの材料からO157が分離され、その分離パターンは次のとおりであった。直腸内容物と枝肉からO157が分離されたものが2件、枝肉のみからO157が分離されたものが3件、直腸内容物のみからO1

った(表3)。

なお、枝肉からO157が分離された5件は、すべて同一日に処理された同一ロットであり、これらから分離された株はPFGEおよび薬剤感受性パターンが同一であった。

5 考察

1) 保菌と枝肉汚染

直腸内容物および唾液からO157は分離されたが、O26、サルモネラは分離されなかった。牛ではこれらの保菌率に差があり、O26、サルモネラよりもO157の保菌率が高いと考えられた。枝肉についても同様に、O157は分離

表2 直腸内容物の腸管出血性大腸菌O157菌数

菌数(cfu/g)	件数**
<10 ² *	4
10 ²	3
10 ³	1
10 ⁴	2
10 ⁵	1
合計	11

* 定性分離では陽性で、定量分離では陰性であったもの。

** 100件中の該当数。

表3 同一個体における腸管出血性大腸菌O157の分離パターン

	分離材料			件数*
	直腸内容物	唾液	枝肉	
分離パターン	+	-	+	2
	-	-	+	3
	+	-	-	5
	-	+	-	2
合計				12

* 同一個体について直腸内容物、唾液および枝肉からO157の分離を行った58件中の該当数。

57が分離されたものが5件、唾液のみからO157が分離されたものが2件あ

されたが、O26、サルモネラは分離されなかった。枝肉にO26およびサルモ

ネラ汚染がなかったのは、保菌牛が搬入されず、汚染源がなかったためと考えられた。牛ではO157の保菌率が高いと考えられることから、枝肉の汚染防止の観点からは、O157はリスクの高い食中毒菌と思われた。

2) 枝肉の汚染経路

O157汚染が確認された枝肉は5件で、O157の分離パターンは2つあり、2件は直腸内容物からもO157が分離され、他の3件は枝肉以外に分離されなかった。これら5件は同一ロットであり、分離株のPFGE型はすべて同一であった。よって、先述の2件は保菌牛を処理した際の直接的な枝肉汚染と考えられ、3件は保菌牛からの間接的な枝肉汚染と考えられた。O157を保菌する牛は、当該個体由来の枝肉に汚染をもたらすのみでなく、他の枝肉に汚染を拡散させる場合があると考えられた。枝肉のO157汚染が成立するためには、保菌牛の他に汚染経路が必要となる。汚染経路には手指、器具、機材等が介在し、これらの組み合わせにより、いくつかの汚染経路が

存在すると考えられた。

3) 枝肉汚染と保菌菌数

O157を保菌していた牛に由来する枝肉は、汚染のなかったものと、汚染のあったものとに分かれた。これは衛生管理に差があったためと考えられ、適切な衛生管理により枝肉の汚染防止は可能と考えられた。しかし、牛のO157保菌菌数には幅があり、汚染源側の要素も同一でないと考えられた。よって、牛枝肉のO157汚染の有無は、衛生管理による汚染防止効果と汚染源の強弱とのバランスにより決まると考えられた。

II. 分担研究報告書

II-2.

冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究

II-2-1. 冷凍食品の細菌汚染に関する研究

大場秀夫（社団法人日本冷凍食品協会）

II-2-2. 食品冷凍保存における汚染腸炎ビブリオの 検討

宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所）

厚生労働科学研究補助金（食品の安全性高度化推進 研究事業）
分担研究者報告書

分担研究者 大場秀夫 社団法人日本冷凍食品協会

冷凍食品の細菌汚染に関する研究

現在、国内で生産されている冷凍食品は年間約 1,500 千トンに達しているが、代表的な冷凍食品の製造工程の危害を検討し、高度衛生管理システムに必要な 5 つの製品分類を抽出した。最終製品について約 1,400 検体の細菌検査結果を検討した。生食用魚介類（イカ等）、加工用魚介類（むきエビ等）、水産用フライ類（魚フライ）、畜産フライ類（チキンカツ等）、調理フライ類（コロッケ等）それぞれの一部に比較的高い一般生菌数、並びに 2 検体に大腸菌群及び *E. coli* を検出した。

本年度は、加工基準のある生食用魚介類に注目し、まず、イカ類のさしみ製造工程における危害を分析した。生食用冷凍鮮魚介類製造工程の各工程において汚染指標細菌である一般生菌数、大腸菌群、*E. coli* および腸炎ビブリオの挙動を検討した。国内原料および輸入原料は比較的汚染菌数は低く、製造工程中のベルトコンベヤー及びカッター工程等で菌数が高くなる傾向がみられたが、許容範囲内であった。これらの製造工程ごとの結果を積み重ねることで各種の冷凍食品の危害分析が実施される。

研究協力者

鈴木 徹（東京海洋大学）
宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所）
前田裕之（日本水産株式会社）
森 康益（株式会社ニチレイ）
伊藤敏行（味の素冷凍食品株式会社）
秋田 勝（明治乳業株式会社）
吉田亜彦（日清フーズ株式会社）
佐藤 久（(財)日本冷凍食品検査協会）
芦田勝朗（(財)日本冷凍食品検査協会）
石村和男（(社)日本冷凍食品協会）
原田 眞（(社)日本冷凍食品協会）

A. 研究目的

(1) 冷凍食品の細菌検査

現在、国内で生産・販売されている冷凍食品は年間約 1,500 千トンと推定されるが、これらの主要な最終製品について細菌汚染状況を分析し検討することとした。まず、製造 1 週間以内の最終製品について細菌汚染状況を把握するために、生菌数、大腸菌群、大腸菌 *E. coli*、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌および腸炎ビブリオ菌について検査を実施し、それらをもとに高度衛生管理システムに必要な製品分類を抽出することにした。また、それらの結果から得られたデータから各製造工程の危害分析を順次実施する。

(2) 生食用イカ類さしみ製造工程

食中毒発生事例の病因物質を参考に病原微生物による汚染が高いと考えられる、水

産物を原料として使用した食品を選定し、製造工程各段階の危害の分析を試みた。水産冷凍食品の国内生産量は平成 15 年では 84 千トンで冷凍食品全体からみると 5.6% と少ないが、本年度の研究では食品衛生法の規格基準で加工基準が示されている生食用冷凍鮮魚介類の「いかさしみ」を取り上げることとした。また、生食用冷凍鮮魚介類においては、細菌数、大腸菌群に加えて、腸炎ビブリオ最確数が 100/g 以下（アルカリペプトン水、TCBS 寒天培地法）に規格基準が定められており、冷凍保存状態においては、腸炎ビブリオの生残推移は重要な問題と考えられる。本年度は「いかさしみ」の各製造工程における微生物汚染の定量的分析を実施し、その製造工程における微生物危害を把握して制御方法の基礎的検討を行う事を目的とした。

B. 研究方法

(1) 冷凍食品の細菌検査

(1) - 1 冷凍食品の細菌試験法

冷凍食品の最終製品並びに製造工程段階における検体の細菌数、大腸菌群、*E. coli*、腸炎ビブリオ等の試験方法は、日本冷凍食品協会の「冷凍食品の衛生についての自主的指導基準」で示された検査法を用いた。使用培地は、標準寒天培地（メルク社製）、デソオキシコレート寒天培地（メルク社製）、EC培地（メルク社製）、アルカリペプトン水（メルク社製）を用いた。また、ストマッキング用滅菌袋はフィルター付を使用した。

(1) - 2 検体の採取および試料の調製

冷凍食品最終製品は、冷凍したまま容器包装の表面を 70%アルコール綿でよく拭

き、滅菌した器具を用いて開封し、その内容の全体を細切りしたのち、無作為に 25 g を無菌的にストマッカー用ポリ袋にとり、滅菌リン酸緩衝希釈水 225 ml を加えて細砕して、これを試料液とした。

(1) - 3 細菌数

試料液（10 倍希釈）から開始し、（1 平板に 30~300 の集落がえられるように滅菌リン酸緩衝希釈水で段階希釈試料液を調製）その 1 ml を用いて標準寒天培地による混釈平板培養（平板 2 枚使用）を行い 35.0 度±1.0 度で 48 時間±3 時間培養後検体 1 g 当りの生菌数を算出した。

(1) - 4 大腸菌群

試料液を 10 倍希釈（100 倍希釈試料液）し、その 1 ml を用いてデソオキシコレート寒天培地による混釈平板培養（平板 2 枚を用い平板重層法）を行い、35.0 度±1.0 度で 20 時間±2 時間培養後、定型的コロニーを数え、検体 1 g 当りの大腸菌群数を算出した。確認試験は行わない。

(1) - 5 *E. coli*

試料液を 10 倍希釈（100 倍希釈試料液）し、その 1 ml をそれぞれ 3 本の EC 醗酵管培地に接種し、恒温水槽を用いて 44.5 度±0.2 度で 24 時間±2 時間培養後、醗酵管中にガス発生を認めたものを推定試験陽性とした。確認試験は行わない。また、*E. coli* 陽性検体は、MPN 法（5 本法）により g あたりの菌数を測定した。

(1) - 6 腸炎ビブリオ（生食用冷凍鮮魚介類）

検体 25 g に PBS（3 %食塩）225 ml を入れ、ストマッキング処理をし、検体の 10 倍希釈液を作成し試料とする。次に検

体の 10 倍希釈液 1 ml を P B S (3%食塩) 9 ml の入った試験管に入れ、検体の 100 倍希釈液を作成した。

検体の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液をアルカリペプトン水 10 ml の入った 3 本の試験管にそれぞれ 1 ml ずつ接種し、また、100 倍希釈液をアルカリペプトン水 10 ml の入った 3 本の試験管に 0.1 ml ずつ接種した。37±1.0 度、1 夜培養後、各試験管の上層の一白金耳を T S B S 寒天培地に塗抹し、37±1.0 度、1 夜培養した。確認試験は行わない。

判定された腸炎ビブリオから、各段階に希釈した試験管の陽性本数を最確数表にあてはめて、1 g あたりの最確数を求めた。

(1) - 7 冷凍食品最終製品の細菌数

冷凍食品の最終製品の一般的な細菌数の状況を把握するため、2003 年 4 月 1 日～2004 年 12 月 31 日の 1 年 9 ヶ月間の主要な工場で製造された最終製品について (2) - 1 ～ 6 で示した細菌試験法で検査を実施した。製品検査は、製造日より 1 週間以内のものを対象とし、工場出荷前の製品とした。対象工場数は、約 850 工場で任意にサンプリングし供試した。検査した結果を関係機関と検討し、高度衛生管理が必要な製品を抽出し、表 1 - 1 にカテゴリー別検体数を示した。

高度衛生管理システムの構築に必要な食品群については、今後順次危害分析を実施する必要がある。

(2) 生食用イカ類さしみ製造工程

平成 17 年 2 月～3 月にするめいかさしみ及びもんごういかの各製造工程ごとの細菌検査を各 3 回ずつ実施し、1 工程につき 5

検体抽出し、危害について検討した。また、洗浄汚染等を見るために、もんごういかのげそ及びやりいかを参考に検査した。一方、可能な限り、低温細菌の菌数も参考に検査した。

もんごういか(タキシタ(株))の各工程は、図 1 に示したように低温解凍、洗浄後、整形後、袋詰・小箱包装後、急速凍結後毎の検体について、(1) - 1 ～ 6 で示した細菌試験法で細菌数、大腸菌群、E. Coli 腸炎ビブリオの細菌検査を実施した。第 1 回目目で各工程の検査結果がほとんど細菌数 300 以下/g であったため、2 回目は一部の工程において、低温細菌も測定することとした。工程中の室温は 14°C から 15°C であった。

するめいか(株)宮古丸水)の各工程は、図 2 に示したように低温解凍、洗浄後、整形後、袋詰・小箱包装後、急速凍結後毎の検体について、(2) - 1 ～ 6 で示した細菌試験法で細菌数、大腸菌群、E. coli、腸炎ビブリオの細菌検査を実施した。室温は、0°C 前後であった。また、各工程の機器についてふき取り検査を実施した。

C 研究結果

(1) 冷凍食品の細菌検査

現在、国内で生産されている冷凍食品は年間約 1,500 千トンとなっており、これらの主要な最終製品について細菌汚染状況を分析し検討した。まず、製造 1 週間以内の最終製品について細菌汚染状況を把握するために、細菌数、大腸菌群、大腸菌、E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌および腸炎ビブリオ菌について検査を実施した。

検査結果の内容を検討し、5 つの分類に