

## A. 研究目的

本研究では、サルモネラ食中毒防止対策の一環として平成 11 年度に導入された鶏卵の日付表示義務によるサルモネラ食中毒防止の経済効果の推定を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒防止対策の効果発現メカニズムの整理

農場から消費者に至るフードチェーンにおける関係主体に着目し、鶏卵の日付表示の導入によって発生する直接的および間接的な費用やその負担状況、各主体の行動変化を、日本養鶏協会および日本卵業協会へのヒアリング調査によって把握し、日付表示の導入が食中毒防止効果を発揮するに至るまでの費用および効果の発現メカニズムを定性的に整理した。

### 2. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒防止対策の社会的効果および社会的費用の体系的整理

1. の整理を踏まえ、二重計上を回避しつつ、鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒防止対策の社会的効果および社会的費用に係る効果・費用項目を体系的に整理した。

### 3. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒患者の減少効果の推定

2. で整理した社会的効果および社会的費用の各項目について、その推定方法を検討し、概略的な推定を行った。

具体的には、鶏卵の日付表示による社会的費用については GP センターへのヒアリング調査に基づいて、その推定方法を検討した。

社会的便益については、サルモネラ属菌による食中毒発生件数に関する時系列データを被説明変数とし、鶏卵生産量、トレンド変数および日付表示導入後トレンド変数を説明変数とする重回帰分析を行い、日付表示導入による食中毒患者の減少効果を抽出した。さらに、統計に表れない潜在的なサルモネラ食中毒患者数を既往の研究に基づく拡大係数を用いて推定した。

### 4. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒防止対策の経済効果の推定

3. で推定した鶏卵の日付表示の導入に伴う社会的費用と社会的便益を用いて、公共経済学において確立されている経済効果の分析手法である費用便益分析によってその効果を推定した。

その際、潜在的なサルモネラ食中毒患者数を推定する拡大係数や、サルモネラ食中毒による死亡者数には不確実性が伴うため、これに確率分布を与えたモンテカルロシミュレーションを行い、経済効果を分布として推定した。

なお、計算対象期間は 5 年間とし、現在価値換算に用いる社会的割引率は 4 % とした。

## C. 研究成果

### 1. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒防止対策の効果発現メカニズムの整理

鶏卵の日付表示の導入によって発生する直接的および間接的な費用およびその負担状況や、関連各主体の行動変化等を日本養鶏協会および日本卵業協会へのヒアリング調査に基づき、図表 1 のフロー図に整理した。

### 2. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒防止対策の社会的効果および社会的費用の体系的整理

効果メカニズムを整理し、定量的な把握可能性を検討した結果、鶏卵日付表示の主な社会的費用としては GP センターが日付表示のための新規機器（ラベル）を導入することによるコスト増加が抽出され、主な社会的効果としてはサルモネラ食中毒防止による医療費、逸失利益、精神的損害等の Cost of illness の軽減が抽出された（図表 2）。

### 3. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒患者の減少効果の推定

#### 3. 1 日付表示の社会的費用の推定

社会的費用として、もっとも顕在化しておりかつ計測が可能と考えられる GP センターの日付ラベル機器設置コストおよびランランニングコストを試算する。

ある GP センターへのヒアリングによれば、日付表示のための豆シール機の導入価格は約

250～300万円/機、卵殻印字機は700～800万円程度とのことである。また豆シール機は各GPセンターについて2機ずつ導入している。

これらの機器が全国的にどれだけ導入されているかを把握することは困難であるが、全国のGPセンターは約500箇所程度とのことであり（日本卵業協会へのヒアリング結果）、仮にすべてのGPセンターに250万円の豆シール機が導入されたとすると、豆シール機設置のための総コストは以下のように推計される

250万円/台×500箇所×2台/箇所=25億円

また、ランニングコストについては、2002年9月25日付鶏鳴新聞においてインクジェットの場合鶏卵一個当たりのランニングコストが0.009円とされている。一方、豆シールについてはその10倍程度との情報が東洋インクのウェブサイト<sup>1</sup>に掲載されている。したがって、豆シール機の場合は鶏卵1個当たり約0.09円と想定した。

鶏卵1個当たり重量を農林水産省指定のMサイズ約60gとし、すべての鶏卵に豆シールを貼付するものと想定すると、鶏卵の生産量1トンあたりのランニングコストは以下のとおり推計される。

0.09円/個÷60g/個×1000000=1,500円/t

これに毎年の鶏卵生産量を乗じることで、ランニングコストは図表3のとおり、37～38億円/年と推定される。

### 3. 2 日付表示による社会的便益の推定

#### 3. 2. 1 サルモネラ食中毒患者の減少数の推定

サルモネラ食中毒患者の時系列変化を、トレンド、鶏卵日付表示ダミー、卵の消費量、トレンドで回帰して、鶏卵日付表示の効果を取り出すことを試みる。

まず食中毒統計（厚生労働省）を用いて、食中毒総件数とそのうちサルモネラ属菌あるいは卵類およびその加工品由来であるもののデータを整理した（図表4）。

サルモネラ属菌による食中毒件数と卵類およびその加工品による食中毒件数はおおむね

同じトレンドをたどっていることが伺える。もちろん、病因物質、原因食品が不明のもの多いため、サルモネラ属菌による食中毒に占める卵類およびその加工品による食中毒の比率は変動している可能性もあるが、その動向はおおよそ連動していると仮定しても大きな齟齬はないと考えられる。

なお、阿部(2005)<sup>2</sup>によれば、1987～1999年にわが国で発生した *Salmonella Enteritidis* (SE) を原因物質とする190事例の食中毒調査報告書を収集・整理し、調理方法からSE食中毒の発生要因を調査したところ、原因食品が推定された101事例の鶏卵の使用頻度は高く、全体の75.2%を占めていたとの報告もあり、サルモネラ属菌による食中毒と鶏卵摂取との関連性は非常に高いことが傍証される。

次に、サルモネラ属菌による食中毒件数を被説明変数とし、鶏卵生産量およびトレンド変数などを説明変数とする重回帰分析を行うことによって、鶏卵日付表示の実施による影響を把握した。いつかの説明変数を組み合わせて重回帰分析を行った結果、被説明変数である「サルモネラ属菌による食中毒件数」は、「鶏卵生産量」「日付表示後（2000年以降）のトレンド変数」「1995年を起点とするトレンド変数」を説明変数として重回帰分析を行うことで、比較的良好な結果が得られた（図表5）。なお、日付表示後（2000年以降）のトレンド変数とは、2000年以前はゼロ、2000年以降は（年次－1999）の値（例えば、2003年の値は4）をとる変数である。また、1995年を起点とするトレンド変数とは、1995年以前はゼロ、1995年以降は（年次－1994）の値（例えば、2003年の値は9）をとる変数である。

この分析結果から、日付表示の義務付けに伴うサルモネラ属菌による食中毒の発生削減件数（Without-With）は、2000年の258件から時間の経過とともに増大し、2005年では1,547件になるとの結果が得られた（図表6）。

食中毒統計（厚生労働省）に基づき、1996年から2005年までの10年間におけるサルモネラ食中毒の発生件数1件当たりの患者数を

<sup>1</sup> 東洋インクウェブサイト  
([http://www.toyoink.co.jp/prod\\_ch/natural/egg.html](http://www.toyoink.co.jp/prod_ch/natural/egg.html))

<sup>2</sup> 阿部和男「食材及び調理方法から解析したサルモネラ食中毒の発生要因の研究」, 宮城県保健環境センター年報, 第23号, 2005.

求めると約 18 人/件であった (図表 7)。

また、食中毒統計 (厚生労働省) に基づくサルモネラ属菌による食中毒発生件数や患者数は、保健所等を通じて報告された数であり、実際にはサルモネラ属菌による食中毒が発生したにもかかわらず、保健所等を通して報告されなかった数は入っていない。岩崎・春日・窪田 (2007)<sup>3</sup>によれば、宮城県を対象としたケーススタディにおいて、サルモネラ属菌による食中毒の実被害数は報告数の約 240 倍であるとの結果が得られている。

そこで、図表 6 で推定された食中毒発生削減件数に、上記から得られた発生件数 1 件当たりの実被害数=18 人/件×240=4,320 人/件を乗じることによって、食中毒患者の削減数は 2000 年の約 113 万人から時間の経過とともに増大し、2005 年では約 679 万人になると推計される (図表 8)。

### 3. 2. 2 Cost of illness 減少効果の推計

ここでは、山本・石渡 (1998)<sup>4</sup>を参考としながら、前述した日付表示によるサルモネラ食中毒患者の減少効果をベースとして Cost of illness の減少効果を推定する。

山本・石渡 (1998)によれば横浜市におけるサルモネラ食中毒による推定受療パターンと医療費に基づいて、サルモネラ食中毒患者 1 人あたりの平均的医療費が 9,739 円/人と推定されている (図表 9)。これを 3. 2. 1 で求めた食中毒患者の削減数に乗じると、Cost of illness 減少効果は、2000 年の約 110.2 億円から時間の経過とともに増大し、2005 年では約 661.4 億円になると推計される (図表 1.0)。

## 4. 鶏卵の日付表示によるサルモネラ食中毒防止対策の経済効果の推定

ここまで推定した費用および効果について、日付表示導入による費用便益分析を実施することで、その経済効果を推定する。

<sup>3</sup> 岩崎恵美子・春日文子・窪田邦宏「宮城県における積極的食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害数推定」, 「食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究」(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、主任研究者 森川馨) 分担研究報告書, 2007.

<sup>4</sup> 山本茂貴・石渡正樹「横浜市におけるサルモネラ食中毒による社会的損失」獣医学雑誌 No.2, 51-62, 1998.

ここで、評価対象期間は豆シール機の耐用年数とする<sup>5</sup>。豆シール機の耐用年数は機種による相違も大きいと考えられるが、仮に 5 年と想定し、日付表示が導入された 2000 年から 2004 年の 5 年間とした。また現在価値換算に用いる社会的割引率は 4%と想定した<sup>6</sup>。

### 4. 1 日付表示の社会的費用の推定

日付表示のための機器導入コスト 25 億円は日付表示の導入年次である 2000 年に発生するものとし、ランニングコスト (図表 3) は日付表示の導入年次の 2000 年から 2004 年までの 5 年間について発生するものを評価対象とした。

これらを 2000 年の現在価値に換算すると、18,777 百万円と推定された (図表 1.1)。

### 4. 2 日付表示の社会的便益の推定

Cost of illness 減少効果 (図表 1.0) を日付表示の導入年次の 2000 年から 2004 年までの 5 年間について発現するものを評価対象とした。

これらを 2000 年の現在価値に換算すると、143,365 百万円と推定された (図表 1.1)。

### 4. 3 経済効果の推定

これらの社会的費用と社会的便益の推定結果から、2000 年の現在価値で評価したときの鶏卵の日付表示の導入の効果は、費用の 7.64 倍 (費用便益比) の大きさ、費用を 1,246 億円上回る (純便益) との結果が得られた (図表 1.1)。

### 4. 4 モンテカルロシミュレーションによる不確実性を考慮した分析

図表 7 に示すとおり、サルモネラ食中毒患者の中には僅かながら死亡者も存在する。4. 3 では社会的便益として Cost of illness 減少効果のみをとりあげたが、こうした死亡者の減少効果は Cost of illness 減少効果では適切に捉えることはできない。死亡者の発生減少数を確率的に捉えるとともに、死亡者の社会的損失を用い

<sup>5</sup> 公共事業の費用便益分析において、評価対象期間は耐用年数等を考慮して定めることとされていることに準拠した。

<sup>6</sup> 公共事業の費用便益分析においては、国債等の実質利回りを参考値として社会的割引率が 4%と設定されていることに準拠した。

て算出する必要がある。

また、4. 3においては、すべての変数の値について平均値などの代表値を一点推定値として設定し、決定論的に費用便益分析を行った。しかし、例えば、機器導入コストは250～300万円/機と幅があるなど、変数の中には不確実性を伴うものもある。ここでは、こうした不確実性を考慮して、各変数に確率分布を設定し、モンテカルロシミュレーションを行うことによって、費用便益分析結果を確率分布として求める。

#### 4. 4. 1 死亡者減少効果

図表7から、1996年から2005年までの10年間における食中毒発生件数1件当たり平均死亡者数は0.00332である。死亡者の減少数は、食中毒発生減少件数とこの死亡確率を用いた二項分布としてモデル化される。しかし、ここにはPCの計算能力を超える演算が含まれるため、食中毒発生減少件数と死亡確率の積をパラメータとするポアソン分布として近似する<sup>7</sup>。ただし、これでは死亡者の減少数がもとの死亡者数を超える可能性があるため、その場合、死亡者がゼロになる（死亡者の減少数が死亡者数になる）ものとして取り扱う。

また、死亡者の社会的損失については、交通事故分野において多数の研究蓄積がある。交通事故と食中毒とでは異なる点は多々あるが、安全が前提のシステムにおいて予期せず急に死に至る点では類似している。ここでは内閣府(2007)<sup>8</sup>に示された死亡者の社会的損失のうち、人的損失については慰謝料を0、治療関係費を図表9に示した90千円に置き換え、その他の金銭的損失は発生しないものとして、一人当たり約242百万円と設定した(図表12)。

#### 4. 4. 2 不確実性の考慮

図表13のとおり、不確実性を伴う変数とこれに確率分布を割り当てた。

#### 4. 4. 3 モンテカルロシミュレーションに

### よる不確実性を考慮した分析

以上の設定に基づき、@RISKを用いてラテンハイパーキューブ法による10万回の費用便益分析のシミュレーションを実施した結果、費用便益比では最小値0.0433、平均値7.84、最大値263であり、社会経済的に施策実施の妥当性が認められる $B/C \geq 1.0$ となる確率は96.14%となった(図表14)。純便益では、最小値18.3百万円、平均値132百万円、最大値4,941百万円であり、社会経済的に施策実施の妥当性が認められる $NPV \geq 0$ となる確率は96.14%となった(図表15)。

### D. 考察

鶏卵の日付表示の有無によるサルモネラ属菌による食中毒件数の差異は、年次のみが考慮されるトレンド変数を用いた重回帰分析の結果に基づいて算出している。このため、ここで得られた社会的便益には、鶏卵の日付表示だけでなく、同時期に実施された鶏へのワクチン投与やコールドチェーン導入等の他のサルモネラ食中毒防止対策の効果や、食習慣の変化による効果なども含まれていると考えられる。従って、ここでの経済効果は過大推計になっている可能性があることに留意する必要がある。

従って、鶏卵の日付表示義務が社会経済的に妥当な施策であったか否かについては、社会的便益から鶏卵の日付表示義務の効果のみを分離して評価を行わなければ判断することはできない。

今後、ここで算出された社会的便益から、各サルモネラ食中毒防止対策の導入効果をそれぞれ分離して算出する方法等について検討が必要である。

### E. 結論

鶏卵の日付表示義務に伴う社会的費用および便益項目を定性的に整理し、そのうち、定量化可能な社会的費用と社会的便益を抽出した。そして、これらを計測し、費用便益分析によって経済効果を推定した。

さらに、不確実性を伴う変数に確率分布を設定し、モンテカルロシミュレーションを行うことによって、費用便益分析結果を確率分布として求めた。

<sup>7</sup> David Vose "Risk Analysis - A Quantitative Guide", Wiley, 2000 (邦訳: 長谷川専・堤盛人「入門リスク分析」勁草書房, 2003.)

<sup>8</sup> 内閣府政策統括官(共生社会政策担当)「交通事故の被害・損失の経済的分析に関する調査研究報告書」平成19年3月。

ただし、社会的便益には他のサルモネラ食中毒対策の効果が含まれていることから、鶏卵の日付表示義務の社会経済的妥当性については判断できなかった。

今後、ここで算出された社会的便益から、各サルモネラ食中毒防止対策の導入効果をそれぞれ分離して算出する方法等について検討が必要である。

#### F. 論文発表等

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

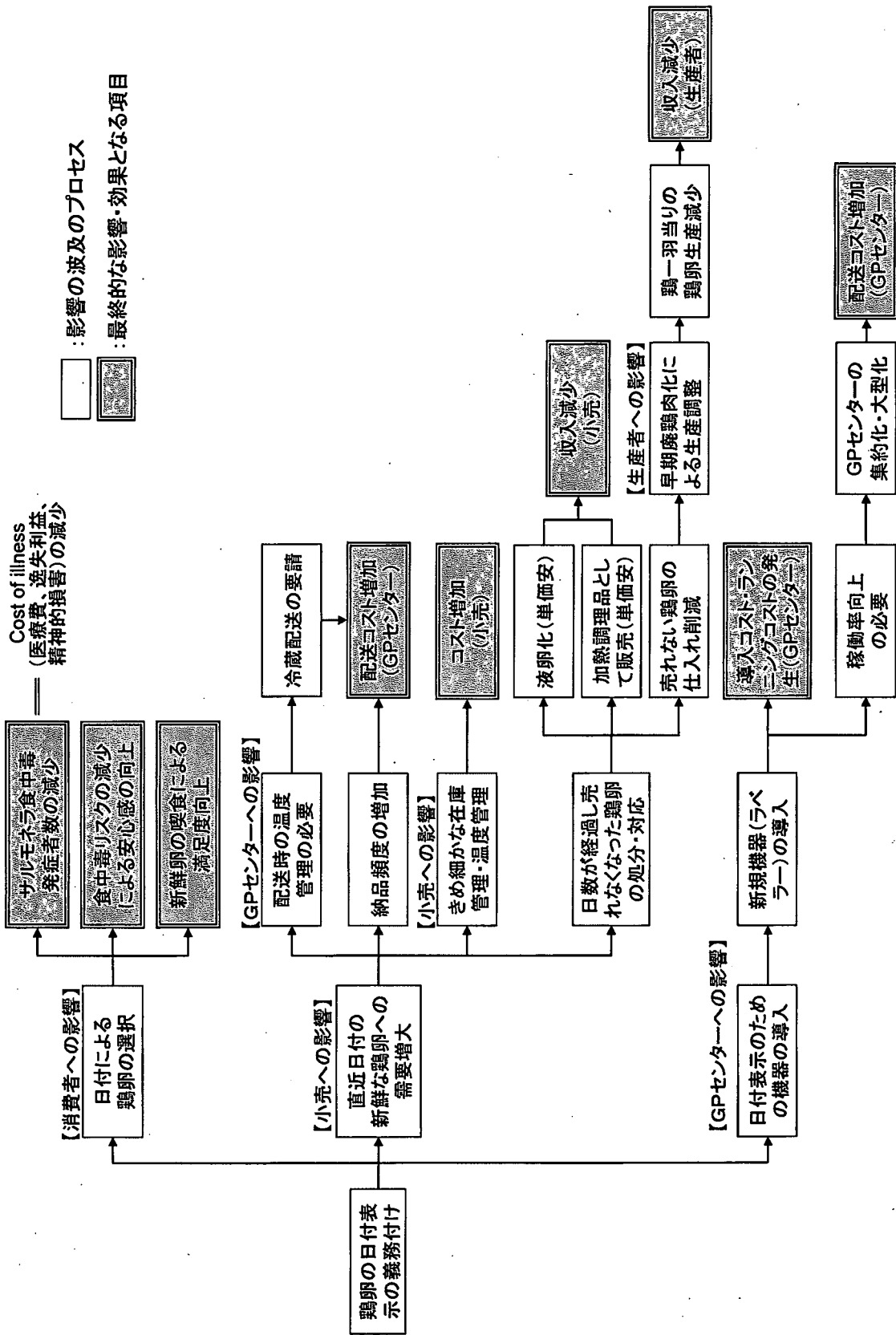
無し

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

無し



図表 1 鶏卵日付表示の影響フロー図

出典：日本養鶏協会および日本卵業協会へのヒアリング調査に基づき三菱総合研究所作成

図表 2 鶏卵の日付表示の導入に伴う社会的効果項目および社会的費用項目

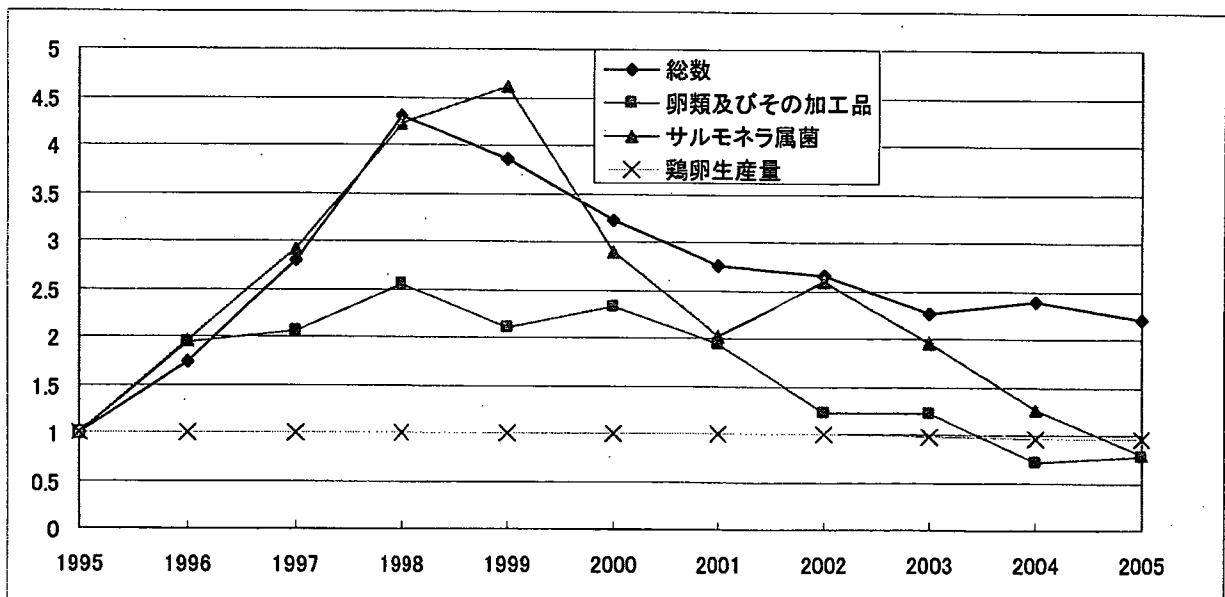
項目	影響主体	定量的な把握可能性	備考	
費用項目	新規機器導入コストの発生	GPセンター	◎	
	新規機器ランニングコストの発生	GPセンター	◎	
	配送コスト増加（稼働率向上）	GPセンター	×	GPセンターの集約状況や納品先の立地によるため把握困難
	配送コスト増加（納入頻度増・冷蔵配送）	GPセンター	×	小売店の納入方針によるため把握困難
	在庫管理・温度管理に伴うコスト増加	小売	×	小売店ごとの在庫管理・温度管理方針によるため把握困難
	収入減少（日数経過鶏卵処分）	小売	×	小売店ごとの仕入調整方針によるため把握困難
	収入減少（生産調整）	生産者	×	生産者の生産調整の方針によるため把握困難
効果項目	サルモネラ食中毒発症者の減少	鶏卵消費者	◎	
	食中毒リスク減少による安心感の向上	鶏卵消費者	△	CVMによる把握可能性あり
	新鮮卵を食べることによる満足度向上	鶏卵消費者	△	CVMによる把握可能性あり

出典：日本養鶏協会および日本卵業協会へのヒアリング調査に基づき三菱総合研究所作成

図表 3 日付ラベル機器のランニングコスト

年次	2000	2001	2002	2003	2004	2005
鶏卵生産量(t/年)	2,540,075	2,526,782	2,528,902	2,529,128	2,490,653	2,461,626
ランニングコスト(百万円/年)	3,810.1	3,790.2	3,793.4	3,793.7	3,736.0	3,692.4

出典：農林水産省統計情報部「鶏卵流通統計」



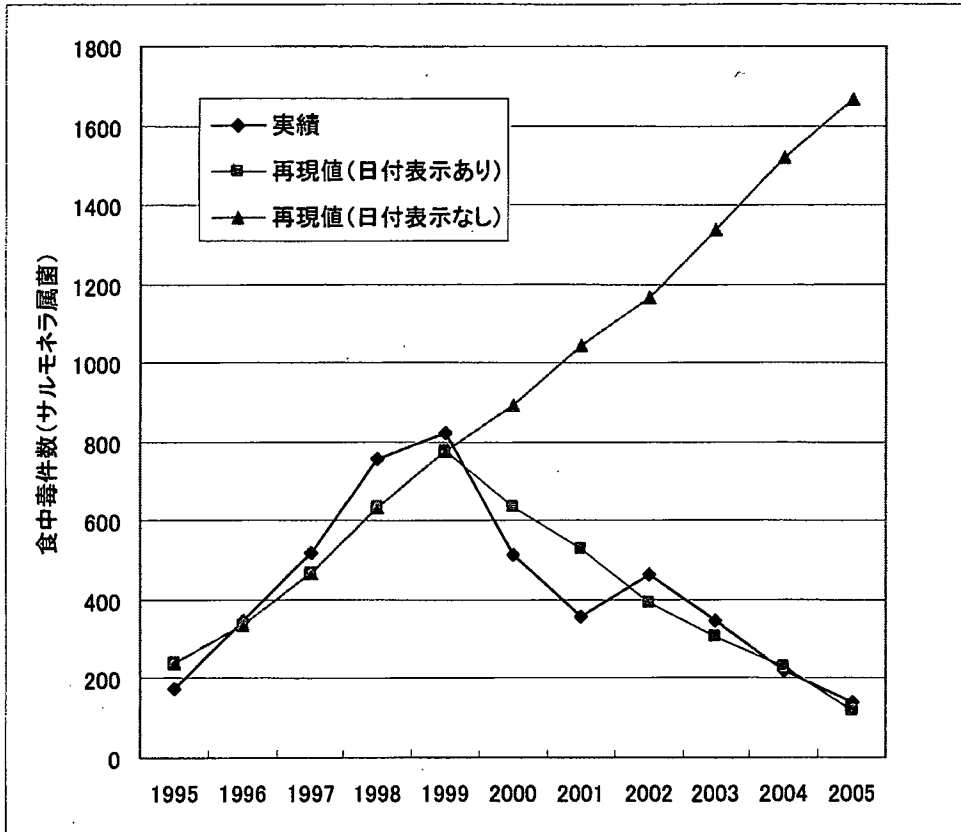
図表 4 食中毒件数の推移  
(1995年=1とした指数表示)

出典：厚生労働省「食中毒統計」より三菱総合研究所作成

図表 5 食中毒件数に係る重回帰分析結果

	係数	t
切片	4610.551	0.624
鶏卵生産量(t)	-0.00176	-0.611
日付表示後トレンド(2000年起点)	-257.879	-4.977
トレンド(1995年起点)	127.055	4.451

自由度調整済決定係数:=0.782



年次	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005		
実績	179	350	521	757	825	518	361	465	350	225	144		
再現値	With ケース (日付表示あり)		242	340	469	638	777	638	531	396	307	235	122
	Without ケース (日付表示なし)		242	340	469	638	777	896	1,047	1,170	1,338	1,524	1,670
Without-With	0	0	0	0	0	258	516	774	1,032	1,289	1,547		

図表 6 重回帰分析による食中毒件数の再現状況

図表 7 サルモネラ属菌による食中毒件数と患者数および死亡者数

年次	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	合計
食中毒発生件数(件)	350	521	757	825	518	361	465	350	225	144	4,516
患者数(人)	16,576	10,926	11,471	11,888	6,940	4,949	5,833	6,517	3,788	3,700	82,588
食中毒発生件数1件当たり患者数(人/件)	47	21	15	14	13	14	13	19	17	26	<b>18</b>
死亡者数(人)	3	2	1	3	1	0	2	0	2	1	15
食中毒発生件数1件当たり死亡者数(人/件)											<b>0.00332</b>



図表 8 日付表示の義務付けに伴うサルモネラ属菌による食中毒患者の削減数推計値

年次	2000	2001	2002	2003	2004	2005
食中毒発生削減件数(件)	258	516	774	1,032	1,289	1,547
食中毒患者削減数推計値(人)	1,131,852	2,263,705	3,395,557	4,527,410	5,659,262	6,791,115

図表 9 推定受療パターンと医療費

受療パターン	確率(例:横浜市における推定)	医療費(円)
入院	6.0%	89,710
通院	57.5%	7,220
売薬を飲む	23.0%	1,000
何もしない	13.5%	0
サルモネラ食中毒患者一人当たり平均医療費(円/人)		9,739

図表 10 日付表示の義務付けに伴う Cost of illness 減少効果

年次	2000	2001	2002	2003	2004	2005
食中毒患者削減数推計値(人)	1,131,852	2,263,705	3,395,557	4,527,410	5,659,262	6,791,115
Cost of illness 減少効果(百万円)	11,022.6	22,045.2	33,067.7	44,090.3	55,112.9	66,135.5

図表 11 費用便益分析の結果

	2000	2001	2002	2003	2004	合計
<b>社会的費用</b>						
日付ラベル機器導入コスト(百万円)	2,000					2,000
ランニングコスト(百万円/年)	3,810	3,790	3,793	3,794	3,736	18,923
社会的費用合計(百万円)	5,810	3,790	3,793	3,794	3,736	20,923
社会的費用(百万円:現在価値)	5,587	3,504	3,372	3,243	3,071	18,777
<b>社会的便益</b>						
Cost of illness 減少効果(百万円)	11,023	22,045	33,068	44,090	55,113	165,339
社会的便益(百万円:現在価値)	10,599	20,382	29,397	37,689	45,299	143,365
<b>費用便益分析</b>						
費用便益比						7.64
純便益(百万円)						124,588

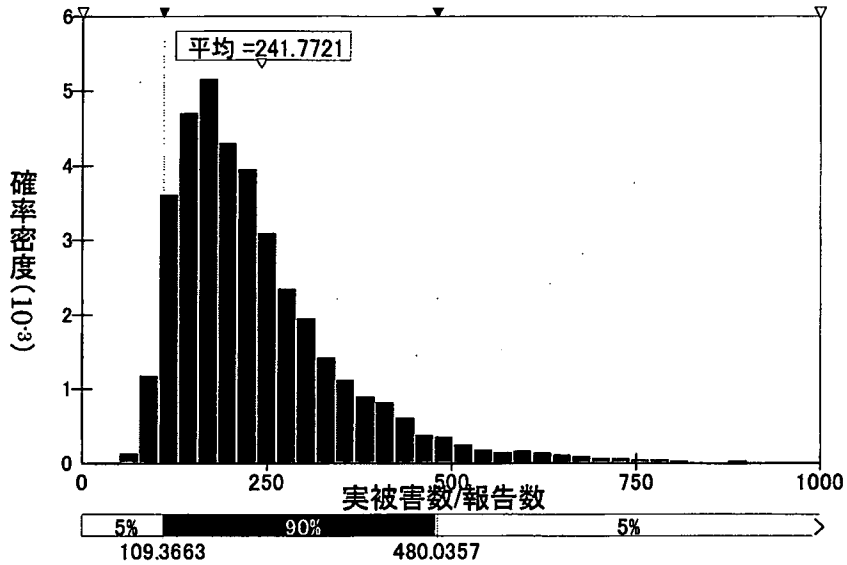
図表 12 死亡者の社会的損失額の設定

損失項目		交通事故	食中毒
人的損失	逸失利益	15,496	15,496
	慰謝料	12,919	0
	治療関係費	599	90
	葬祭費	751	751
	小計	29,764	16,337
物的損失		368	0
事業主体の損失		1,075	0
各種公的機関等の損失		1,957	0
金銭的損失合計		33,165	16,337
死亡損失		226,000	226,000
総計		259,165	242,337

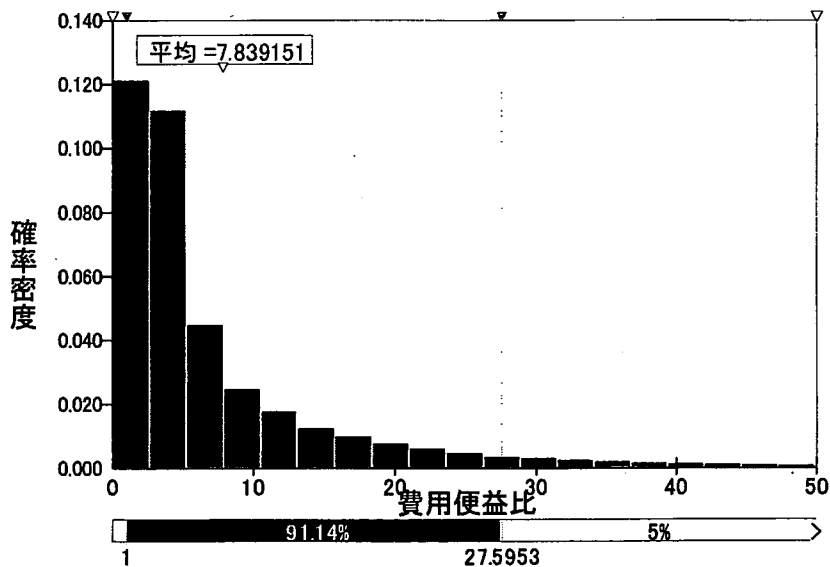
出典: 交通事故は、内閣府政策統括官(共生社会政策担当)「交通事故の被害・損失の経済的分析に関する調査研究報告書」平成19年3月。食中毒はこれに基づき設定

図表 13 不確実性を伴う変数とその確率分布

不確実性を伴う変数	確率分布	備考
日付ラベル機器導入価格(百万円)	一様分布 : Uniform(2000,3000)	
食中毒発生件数 1 件当たり患者数 (人/件)	指数分布 : Expon(7.1816) Shift=+1.8912	データへの適合分布
サルモネラ属菌による食中毒報告数に対する実被害数	複合分布 : 岩崎・春日・窪田(2007)に基づき図表 14 のとおり再現	検出数 ÷ 機関カバー率 ÷ 検便検査率 × 医療機関受診率 × 食品由来割合 ÷ 報告数 = 75 ÷ 52% ÷ Beta(5,27) ÷ Beta(31,52) × 95% ÷ 12
サルモネラ食中毒患者受領パターン別医療費	離散分布 : Discrete({89710, 7220, 1000, 0}, {6.0%, 57.5%, 23.0%, 13.5%})	

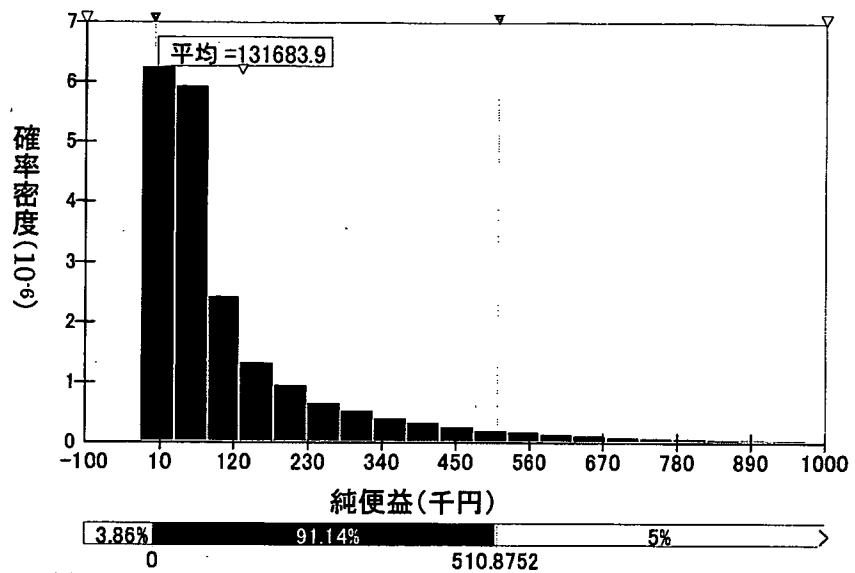


図表 14 食中毒報告数に対する実被害数の分布



最小値	平均値	最大値	B/C ≥ 1 となる確率
0.0433	7.84	263	96.14%

図表 15 費用便益比の分布



最小値	平均値	最大値	B/C ≥ 1 となる確率
-18.3 百万円	132 百万円	4,941 百万円	96.14%

図表 16 純便益の分布

平成 19 年度 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）

細菌性食中毒の防止対策に関する研究

主任研究者 熊谷 進

（東京大学大学院生命科学研究科）

分担研究報告書

腸炎ビブリオ食中毒の防止対策に関する研究

分担研究者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

#### 研究要旨

腸炎ビブリオ食中毒は、平成 10 年（1998 年）までに急増した後に現在まで患者数が 1/10 以下に、事例数が 1/25 以下に減少している。しかし、その減少については対策の効果によるものか自然減少によるものか不明である。このため、対策を講じた時期の魚介類の腸炎ビブリオ汚染と現在の汚染状況が異なるのか究明した。今年度に二枚貝を中心とする魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態を究明した結果、腸炎ビブリオは 75.7% の検体から分離され、*tdh* 遺伝子は 6.9% の検体で陽性であった。また、腸炎ビブリオ菌数 100 MPN/g を超えると TDH 陽性腸炎ビブリオの汚染が約 5 倍に増加することが明らかになった。これらの結果から、腸炎ビブリオ食中毒発生が少なくなかった平成 13 年の調査時と、二枚貝を中心とする魚介類の腸炎ビブリオ汚染の状況は現在も大きく異なることが判明した。今後さらに、対策の取られた項目について調査の必要がある。さらに、遺伝子検出法を用いた TDH 陽性腸炎ビブリオの検出の検討を行った。その結果、実検体では PCR 法および LAMP 法の検出が一致する検体が 37 検体中 31 検体であったが、PCR 法で *tdh* 遺伝子と同等の大きさの産物が弱い泳動像として認められ他の増幅産物が主として認められるという判定が難しい検体が 6 検体あった。今後、リアルタイム PCR 法など他の遺伝子検出法についても応用の検討が必要と考えられた。

#### 研究協力者

秋田県健康環境センター	齋藤志保子
埼玉県衛生研究所	大塚佳代子
静岡県環境衛生科学研究所	杉山寛治
長崎県衛生公害研究所	山崎省吾
熊本県保健環境科学研究所	八尋俊輔、宮坂次郎
国立大学法人弘前大学大学院	大友良光
東海大学海洋学部	高橋貴一、小沼博隆
（財）日本食品分析センター	宇田川藤江、田中廣行
（株）BML フード・サイエンス	矢部美穂、中川 弘
（株）デンカ生研	権平文夫
（株）栄研化学	池戸正成

## A. 研究目的

腸炎ビブリオは日本の特徴的な食中毒原因物質として挙げられ、古くから多数の腸炎ビブリオ食中毒の発生が報告されている。発生数は年により変動するが、1997年から1998年にかけて患者数が約2倍(12,318人)に、事件数が約4倍(839件)に急増するという異常な事態となった。特にこの多くは1996年以降東南アジアを中心に流行が知られていた耐熱性溶血毒素(TDH)産生性血清型03:K6によるものであった。これを重く見て、1998年(平成10年)12月に食品衛生調査会に水産食品衛生対策分科会を発足し対策に必要な科学的データの作成および解析が行われた。その一部結果を踏まえ、1999年(平成11年)8月には厚生省から「生食用魚介類」および「煮カニ等の加熱加工魚介類」について4℃以下という低温管理と汚染海水の使用回避による2次汚染の防止が通知された。2000年(平成12年)5月には水産食品衛生対策分科会による「腸炎ビブリオによる食中毒防止対策に関する報告書」がとりまとめられた。その内容の一部は、2001年(平成13年)6月に「食品衛生法施行規則」および「食品、添加物等の規格基準」の一部改正として

通知され、規格基準の新設(「生食用鮮魚介類」、「ゆでがに」)、規格基準の改正(「食品一般の製造、加工及び調理基準」、「生食用鮮魚介類」、「冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)」、「ゆでだこ」)、成分規格(「ゆでだこ」、「飲食の際に加熱しないゆでがに」は腸炎ビブリオ陰性；生食用鮮魚介類、むき身の生食用かき、生食用冷凍鮮魚介類は1gあたり腸炎ビブリオが100MPN以下)、10℃以下で管理することなどが示された。これらは翌月に施行に至った。

その後、現在まで腸炎ビブリオ食中毒は減少し2007年には患者数が860名(1/10以下)に、事例数が29件(1/25以下)に減少している(図1)。しかし、その減少については対策の効果によるものか自然減少によるものか不明である。このため、二枚貝等の鮮魚介類の腸炎ビブリオ汚染を調査し、対策を講じた時期の魚介類の腸炎ビブリオ汚染と現在の汚染状況が異なるのか究明した。

また、腸炎ビブリオの多くは、耐熱性溶血毒素(TDH)等の病原因子を保有しない菌であり、一部の魚介類や海水に汚染した病原性の腸炎ビブリオが食中毒の原因となっている。このため、直接的に病原因子を検出する方法

が望ましい。病原因子の検出には PCR 法などの遺伝子を対象にした検出法が主に使われている。このため、TDH も直接的に食品培養液から検出できれば迅速に汚染の有無を判定できると考えられることから、*tdh* 陽性腸炎ビブリオの効率的な検出のための遺伝子検出法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 二枚貝等の鮮魚介類の腸炎ビブリオ汚染

#### 1-1. 検体

平成 19 年 7～11 月に、平成 13 年の調査とほぼ同一の地域から 247 検体の二枚貝等の魚貝類を入手し検体とした。地域は、北海道、東北、関東、東海・中部、九州とし、検体はアオヤギ、アサリ、ホタテ、イワガキ等を主とした。

#### 1-2. 検出方法

平成 13 年の調査時と同様の方法で試験を行った。

#### ① 増菌方法

2 種類の培地を組み合わせ、三段階増菌法にて培養した。検体 25 g にアルカリペプトン水 225ml を加え、35～37℃で 18 時間培養した。この培養液 1 ml を食塩加ポリミキシンプイオン 10 ml に加え 35～37℃で 18 時間培養した。さらに、この培養液 1 ml を事前に 35℃に加温した食塩加ポリミキシンプイオン 10 ml に

加え 35～37℃で 6 時間培養した。これらは、定性試験および定量試験（最確数法）の両方に共通して用いられた。

#### ② 分離培養方法

定性試験の 3 段階目増菌培養液 1 ml を検体とし腸炎ビブリオ K6 抗原に対する免疫磁気ビーズを用いて免疫磁気ビーズ濃縮法を使用書に従い行った。最終的に 0.1 ml の洗浄液にビーズを浮遊させ、10～20  $\mu$ l をクロモアガー・ビブリオ培地に画線し、35～37℃で 18 時間培養した。また、同増菌培養液 10  $\mu$ l をクロモアガー・ビブリオ培地に直接塗抹し、35～37℃で 18 時間培養した。

#### ③ 腸炎ビブリオの確定試験

生育したクロモアガー・ビブリオ培地上のコロニーを観察し、腸炎ビブリオと思われる藤色のコロニーを釣菌し糖分解性試験、硫化水素生産性試験、塩分濃度耐性試験および *toxR* 遺伝子を標的にした PCR 法を行い確定した。

#### ④ DNA 抽出方法

増菌液 1 ml および 0.1 ml を 10,000  $\times g$  で 10 分間遠心後、上清を除き沈殿に滅菌蒸留水を加え再浮遊させた。100℃で 5 分加熱し、10,000  $\times g$  で 5 分遠心して得られた上清を Template DNA とした。

#### ⑤ *tdh* 遺伝子検出 PCR 法

PCR は Tada ら の 方 法 (Molecular Cellular Prob. 1992, 6: 477 -487) に よ っ て 行 い 得 ら れ た PCR 産 物 を 泳 動 し *tdh* 遺 伝 子 の 確 認 を 行 っ た。

#### ⑥ 最 確 数 (MPN) 法

3 管 法 の 5 段 階 ま で の MPN 法 に て 腸 炎 ビ ブ リ オ 菌 数 お よ び *tdh* 陽 性 菌 数 を 測 定 し た。② の 分 離 培 養 法 に 従 い、各 MPN 試 験 管 培 養 液 を ク ロ モ ア ガ ー ビ ブ リ オ 培 地 に 画 線 し 35-37°C で 18 時 間 培 養 し た。ク ロ モ ア ガ ー ・ ビ ブ リ オ 上 の コ ロ ニ ー を 観 察 し、腸 炎 ビ ブ リ オ と 思 わ れ る コ ロ ニ ー を 釣 菌 し 性 状 試 験 を 行 い 腸 炎 ビ ブ リ オ で あ る か 確 認 し た。定 性 試 験 で *tdh* 陽 性 検 体 に つ い て は ⑤ の 方 法 に 従 い *tdh* 陽 性 菌 を で き る だ け 分 離 す る た め に 多 く の コ ロ ニ ー を PCR に て 試 験 し た。ま た、定 性 試 験 で *tdh* 陽 性 で あ っ た 検 体 に つ い て は、各 MPN 試 験 管 培 養 液 に つ い て PCR を 行 っ た。

#### ⑧ 菌 の 分 離 お よ び 血 清 試 験

*Tdh* 検 出 の PCR で 陽 性 の 検 体 に つ い て は、ク ロ モ ア ガ ー ・ ビ ブ リ オ 培 地 上 の 100 コ ロ ニ ー を 選 択 し Box screening 法 を 利 用 し PCR に て *tdh* の 有 無 を 試 験 し た。*Tdh* 陽 性 コ ロ ニ ー が 分 離 で き た 場 合 は 血 清 型 を 確 認 し た。

2. 遺 伝 子 検 出 法 を 用 い た TDH 陽 性 腸 炎 ビ ブ リ オ の 検 出 の 検 討

#### 2-1. 供 試 菌 株

海 洋 細 菌 で あ る *Vibrio* 属 お よ び *Grimontia* 属 菌 を 対 象 に LAMP 法 に よ る TDH 検 出 の 特 異 性 を 試 験 し た。各 菌 株 は 2.0 % (W/V) 食 塩 加 BHI ブ ロ ス に 接 種 し、37°C 18 時 間 培 養 し た。そ の 培 養 液 を 用 い て PCR 法 に よ る *tdh* 遺 伝 子 検 出、RPLA 法 に よ る TDH 検 出、5% ヒ ト 赤 血 球 加 我 妻 培 地 に よ る 神 奈 川 現 象 (溶 血 反 応) の 確 認 お よ び LAMP 法 に よ る *tdh* 遺 伝 子 検 出 を 行 っ た。ま た、*tdh* 陽 性 腸 炎 ビ ブ リ オ 培 養 液 を 10 段 階 希 釈 し て *tdh* 遺 伝 子 検 出 の PCR 法 お よ び LAMP 法 で の 検 出 特 異 性 お よ び 感 度 の 試 験 に 用 い た。

#### 2-2. 供 試 検 体

2007 年 8 月 か ら 11 月 に、東 京 都 内 で 購 入 し た ア オ ヤ ギ 37 検 体 に つ い て 腸 炎 ビ ブ リ オ の 検 出 を 行 っ た。検 体 を 購 入 後、室 温 で 2 時 間 以 内 に 研 究 所 へ 輸 送 し、15°C で 保 管 し 5 時 間 以 内 に 試 験 に 供 試 し た。

#### 2-3. *tdh* 遺 伝 子 検 出 LAMP 法

4 種 類 の *tdh* 特 異 的 プ ラ イ マ ー が 入 っ た Reaction Mix を 含 む 試 薬 21  $\mu$ l の う ち 20  $\mu$ l を Loopamp 反 応 チ ュ ー ブ に 分 注 し、増 菌 1 の 増 菌 液 か ら 抽 出 し た DNA を Template DNA と し て 5  $\mu$ l を 加 え、計 25  $\mu$ l と し、濃 度 測 定 装 置 (Loopamp リ ア ル タ イ ム 濃 度 測 定 装 置 : LA320C) で 反 応 を

行った。反応条件は、65℃で1時間の反応を行った。

#### 2-4. その他の方法

腸炎ビブリオの分離、DNA抽出方法、*tdh* 遺伝子検出 PCR 法、RPLA 法、血清型別試験については、上述の「1. 二枚貝等の鮮魚介類の腸炎ビブリオ汚染」に記した方法を用いた。

### C. 結果

#### 1. 二枚貝等の鮮魚介類の腸炎ビブリオ汚染

全検体である247検体中の187検体(75.7%)で腸炎ビブリオが分離された。産地別では、北海道は60検体中の44検体(73.3%)、東北は94検体中の52検体(55.3%)、関東は33検体中の33検体(100%)、中部・近畿は19検体中の19検体(100%)、九州は38検体中の38検体(100%)で腸炎ビブリオが分離された。検体種別では、アオヤギは73検体中の57検体(78.1%)、アサリは54検体中の54検体(100%)、イワガキは40検体中の32検体(80%)、ホタテガイは37検体中の9検体(24.3%)で腸炎ビブリオが分離された。

*tdh* 遺伝子を対象としたPCR法では、247検体中の17検体(6.9%)で*tdh* 遺伝子が検出された。検体の産地別では、北海

道は62検体中の8検体(12.9%)であり、その全てはアオヤギであった。東北は94検体中のムラサキイガイ1検体(1.1%)であった。関東は33検体中の3検体(9.1%)であり、検体種はアサリ、アオヤギ、不明であった。東海・中部は19検体中の3検体(15.8%)で*tdh* 遺伝子が検出され、検体種はアサリであった。

腸炎ビブリオが分離された32検体について総腸炎ビブリオ菌数を求めた。最大値は、本研究での測定範囲の設定を超え>140,000 MPN/10 gであったが、最小定量値である3 MPN/10 g未満のものが多かった。その他は、比較的偏り無く広い範囲の腸炎ビブリオ定量値を示した。

定性分析で*tdh* 遺伝子陽性の21検体について*tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオ菌数を求めた。最大値は、1,000 MPN/10 gを越えていたが、最小定量値である3 MPN/10 g未満のものが多かった。10 MPN/10 g以下の総腸炎ビブリオ菌数レベルでは、*tdh* 遺伝子が検出されなかった。各検体の総腸炎ビブリオ菌数と*tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオ菌数をグラフにプロットして解析した結果、両者に相関は認められなかった。

*tdh* 遺伝子陽性の21検体のうち5検体から*tdh* 遺伝子陽性菌株



が分離された。血清型を確認したところ、04:K9、04:K37、04:K38、04:KUT、OUT:K37、OUT:K38、OUT:KUTであり、0群は04およびOUTであり、K型はK37、K38およびKUTで類似していた。しかし、03:K6は分離されなかった。

*tdh* 遺伝子陰性菌株の血清型は、03:K6、011:K51、04:KUT、06:KUT、010:KUT、011:KUT、OUT:K37 および OUT:KUTであった。特に、03:K6についてはアオヤギ、アサリ、ハマグリなどで分離された。

## 2. 遺伝子検出法を用いた TDH 陽性腸炎ビブリオの検出の検討

特異性を検討した結果、腸炎ビブリオの神奈川現象陰性の10株は、PCR法およびRPLA法で*tdh* およびTDH陰性であり、LAMP法でも陰性であった。一方、神奈川現象陽性の31株は、PCR法およびRPLA法で*tdh* 遺伝子およびTDH陽性であり、LAMP法でも陽性であった。腸炎ビブリオ以外の *Vibrio* 属菌や *Grimontia hollisae* は、PCR法で*tdh* 陰性であり、LAMP法でも*tdh* 陰性であった。

*Tdh* 陽性腸炎ビブリオ5株を用いて感度を検討した結果、1反応あたり菌数が42~9 cfu および4.2~0.9 cfu では10反応試験中全試験で陽性であった。また、0.4~0.1 cfu では10検体

中PCR法が4検体、LAMP法が3検体陽性であった。

*tdh* 遺伝子を対象としたPCR法では、37検体中の6検体(16.2%)で*tdh* 遺伝子の増幅と同等の大きさの明瞭な遺伝子産物が検出された。さらに、他の5検体で、不明瞭であるが*tdh* 遺伝子の増幅と同等の大きさの遺伝子産物が検出されたが、目的の大きさ以外の産物が主として認められまた多数の不明瞭な産物も認められた。

また、*tdh* 遺伝子を対象としたLAMP法では、37検体中の6検体(16.2%)で*tdh* 遺伝子が検出された。本研究では、*tdh* 遺伝子を対象としたPCR法およびLAMP法の両方法で*tdh* 遺伝子が検出された検体を*tdh* 遺伝子陽性検体としたので*tdh* 遺伝子陽性検体は6検体であった。

*tdh* 遺伝子陽性菌の腸炎ビブリオは3検体から分離された。いずれもPCR法およびLAMP法で*tdh* 遺伝子が陽性結果を示した検体であった。しかし、PCR法およびLAMP法で*tdh* 遺伝子が陽性であった別の2検体では*tdh* 遺伝子陽性菌の腸炎ビブリオが分離されなかった。また、LAMP法で*tdh* 遺伝子陰性でありPCR法で*tdh* 遺伝子と同等の大きさの産物が弱い泳動像として認められ他の増幅産物が主として認め

られた5検体でも、*tdh* 遺伝子陽性菌の腸炎ビブリオは分離されなかった。

*tdh* 遺伝子陽性菌株の血清型は、04:K37、04:K38、04:KUT、OUT:K37、OUT:K38、OUT:KUTであり、0群は04およびOUTであり、K型はK37、K38およびKUTで類似していた。*tdh* 遺伝子陰性菌株の血清型は、011:K51、04:KUT、06:KUT、010:KUT、011:KUT、OUT:K37 および OUT:KUTであった。

#### D. 考察

平成13年の調査では *tdh* 陽性腸炎ビブリオの汚染率は10%であった(表1)が、今回の調査では6.9%であり、若干の減少であった。1998年の食中毒多発時と比較し2007年は患者数が1/10以下に、事例数が1/25以下に減少していることに比べると、汚染率が減少したことが食中毒減少の理由になっているとは考えられなかった。

2001年(平成13年)6月に「食品衛生法施行規則」および「食品、添加物等の規格基準」の一部改正として通知された。この中の規格基準設定である「腸炎ビブリオ数100MPN/g」を本研究データに当てはめてみると、これを超える検体は約1/5あった。*tdh* 陽性率は「腸炎ビブリオ数100MPN/g」を越える検体では

18.2%であったが、越えない検体では約4.4%であった。このことから、腸炎ビブリオ菌数100MPN/gを超えるとTDH陽性腸炎ビブリオの汚染が約4倍に増加することが明らかになった。平成13年の調査では腸炎ビブリオ数100MPN/gを超える検体は19.1%であり、その *tdh* 陽性率は24.2%で、腸炎ビブリオ数100MPN/g以下の検体では *tdh* 陽性率は6.4%であった(図2)。これは今回の研究と同様の傾向であった。

本研究の結果から、腸炎ビブリオ食中毒発生が少なくなかった平成13年の調査時と、二枚貝を中心とする魚介類の腸炎ビブリオおよび *tdh* 陽性腸炎ビブリオ汚染率は現在も大きく異ならないことが判明した。しかし、1996年に出現して以降、腸炎ビブリオ食中毒が激減した現在でも食中毒の主要な血清型である03:K6(表2)は検出されなかった。このため、腸炎ビブリオ食中毒の減少の理由として、魚介類の水揚げから市場、流通、消費の段階での魚介類取扱が改善されたこと、また、血清型03:K6の *tdh* 陽性腸炎ビブリオの魚介類の汚染が減少したことが可能性として考えられた。今後さらに、対策の取られた項目についての調査の必要性が強く考えら

れる。

また、アオヤギからの *tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオ検出において *tdh* 遺伝子検出 PCR 法および LAMP 法を用いて比較した結果、両方法に差が認められた。両方法ともに、37 検体中 6 検体で *tdh* 遺伝子が検出されたが、PCR 法では、*tdh* 遺伝子と同等の大きさの増幅産物が若干認められるものの、その他の多種類の増幅産物も認められ *tdh* 遺伝子以外の遺伝子が増幅されていたと考えられるものが 5 検体あった。PCR 法は最も汎用されている微生物遺伝子検出法であるが、増幅産物をアガロースゲル電気泳動法後に目視で産物の泳動像を観察し判定する方法が主流であり、その際に判定が難しい場合がある。本研究では、PCR 法と LAMP 法の特異性と感度が同等であることが確認された。このことから、実検体で *tdh* 遺伝子と同等の大きさの増幅産物が若干認められたが、その他の多種類の増幅産物が認められ *tdh* 遺伝子以外の遺伝子が増幅されていたものは、検体中の微量な *tdh* 遺伝子が LAMP 法で検出されずに PCR 法だけで検出されたとは考えられなかった。今後さらに、PCR での増幅産物の解析を行うなど検討し、確認が必要である。

腸炎ビブリオ食中毒患者分離

株のほとんどが *tdh* または *trh* 遺伝子を保有する病原性菌株であるのに対し、環境中に分布する病原性株の頻度は極めて低く、魚介類などの環境サンプルから病原性菌株を分離するのは困難である。しかし、本研究では 37 検体中 6 検体から *tdh* 遺伝子が検出された。このことから、遺伝子検出法を用いることによって、魚介類などの環境サンプルからの *tdh* 遺伝子を保有する腸炎ビブリオの検出が効率よく行えると考えられた。今後さらに、リアルタイム PCR 法など他の遺伝子検出法についても応用の検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

二枚貝を中心とする魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態を究明した結果、腸炎ビブリオは 75.7% の検体から分離され、*tdh* 遺伝子は 6.9% の検体で陽性であった。また、腸炎ビブリオ菌数 100 MPN/g を超えると TDH 陽性腸炎ビブリオの汚染が約 5 倍に増加することが明らかになった。これらの結果から、腸炎ビブリオ食中毒発生が少なくなかった平成 13 年の調査時と、二枚貝を中心とする魚介類の腸炎ビブリオ汚染の状況は現在も大きく異なることが判明した。今後さらに、対策の取られた項目について

て調査の必要がある。さらに、遺伝子検出法を用いた TDH 陽性腸炎ビブリオの検出の検討を行った。近年開発され既に多くの病原微生物の高感度で迅速な検出方法の一つとして LAMP 法があるが、本研究では開発された *tdh* 遺伝子検出 LAMP 法の特異性および感度、さらに実検体からの検出において検討した。その結果、LAMP 法の特異性および感度は PCR 法と同等であり、実検体では PCR 法および LAMP 法の検出が一致する検体が 37 検体中 31 検体であったが、PCR 法で *tdh* 遺伝子と同等の大きさの産物が弱い泳動像として認められ他の増幅産物が主として認められるという判定が難しい検体が 6 検体あった。今後、リアルタイム PCR 法など他の遺伝子検出法についても応用の検討が必要と考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Asai, Y., Kaneko, M., Ohtsuka, K., Morita, Y., Kaneko, S., Noda, H., Furukawa, I., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. *Salmonella* prevalence in seafood imported into Japan. J. Food Prot. In press.

永島江美子, 小田雄一郎, 小澤一弘, 仁科徳啓, 工藤由起子,

小沼博隆. *Vibrio vulnificus* の清水港湾内における分布. 日本食品微生物学会. 24:189-193, 2007.

工藤由起子. 季節と食中毒 夏場の腸炎ビブリオ対策. 食と健康. 社団法人日本食品衛生協会. 51 巻:6-15. 2007. 6 月号

### 2. 学会発表

特になし

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

特になし