

200837030A

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年（2009年）4月

主任研究者 熊谷 進

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年（2009年）4月

主任研究者 熊谷 進

目 次

I. 総括研究報告		
細菌性食中毒の防止対策に関する研究	熊谷 進	1
II. 分担研究報告		
1. 機器の衛生管理に関する研究—食肉加工機械の汚染実験—	熊谷 進	20
機器の衛生管理に関する研究—ステンレス表面におけるサルモネラの生残性の検討	三輪憲永	38
機器の衛生管理に関する研究—ボルト上でのサルモネラの長期生残性およびサルモネラ汚染ネジのボルトとナットの汚染割合について—	森田幸雄	65
機器の衛生管理に関する研究—ボルトにおけるサルモネラの生残性と拭き取り試験の有効性	小野一晃	83
機器の衛生管理に関する研究—ボルトとナットにおけるサルモネラの生残試験—	小野一晃	92
2. 殻付き卵のサルモネラ汚染防止対策の経済効果推定	山本茂貴	108
3. 腸炎ピブリオ食中毒の防止対策に関する研究	小西良子	122

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)
平成20年度 総括研究報告書

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 教授

研究要旨

研究目的

1. 食品の製造加工機器の衛生管理に関する研究：食品の製造加工に用いられる機器について、食中毒細菌汚染防止の観点から機器の衛生要件を究明する。
2. 鶏卵によるサルモネラ食中毒防止の経済効果：サルモネラ食中毒の防止対策のそれぞれについて個別に便益を計測する手法を検討する。コールドチェーンの導入によるサルモネラ食中毒防止の経済効果を推定する。
3. 腸炎ビブリオ食中毒の防止対策に関する研究：市販のアジと二枚貝について腸炎ビブリオ汚染実態を究明する。

研究方法

1. 食品製造加工機器に用いられるステンレス表面とボルト上でのサルモネラの生残実験を行なった。各器材表面にサルモネラ菌液を接種してから、生残菌数の変化を測定した。
2. 食中毒リスクをモンテカルロシミュレーションによって推定し、各対策による便益への寄与度を計測した。定量化可能な社会的費用として、物流コストの増加等を抽出することによって、コールドチェーン導入によるサルモネラ食中毒防止の経済効果を求めた。
3. 市販のアジと2枚貝の腸炎ビブリオ汚染実態について血清型を含めた調査を昨年度と同じ方法で行った。

結果と考察

1. ステンレス上でのサルモネラの生残については、ステンレスの組成と研磨度の相違による影響は見られなかった。ボルトにおける菌の生残に関しては、綿棒を用いる通常の拭取り方法とボルトを緩衝液に漬け込む方法の間に、大きな検出感度の差異が認められたことから、方法の改良が必要である。
2. 各対策の寄与度は、日付表示義務が20%、コールドチェーンが50%、ワクチンが30%と推定された。社会的便益はコールドチェーンの寄与度を用いて平均約737億円と算出され、費用便益比は平均1.05と推定された。
3. *tdh* 陽性菌はアサリでは9.5%、アジでは2.9%から検出され、アサリでの汚染率が高かった。また、1gあたり100の総腸炎ビブリオ数を超える検体の割合はアサリでは23.9%、アジでは7.3%とアサリで高いことが認められるなど、腸炎ビブリオの汚染源対策の評価と構築のために有用な知見が得られた。

結論

食品の製造加工に用いられる機器について、衛生管理の監視に必要な菌の生残に関する知見を得た。鶏卵のコールドチェーン導入に伴う経済効果を推定した。市販のアジと2枚貝の腸炎ビブリオ汚染実態の現状を明らかにした。

研究分担者

- 小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所)
山本茂貴 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究協力者

- 新村 裕 (食肉科学技術研究所)
中島誠人 (食肉科学技術研究所)
柴田清弘 (食肉科学技術研究所)
小野一晃 (埼玉県衛生研究所)
森田幸雄 (群馬県衛生環境研究所)
長谷川専 (株式会社三菱総合研究所)
土谷和之 (株式会社三菱総合研究所)
大橋毅夫 (株式会社三菱総合研究所)
工藤由起子 (国立医薬品食品衛生研究所)
齋藤志保子 (秋田県健康環境センター)
大塚佳代子 (埼玉県衛生研究所)
杉山寛治 (静岡県環境衛生科学研究所)
山中葉子 (三重県保健環境研究所)
山崎省吾 (長崎県衛生公害研究所)
八尋 俊輔 (熊本県保健環境科学研究所)
大友良光 (国立大学法人弘前大学大学院)
堂原寿人 (東海大学海洋学部)
小沼博隆 (東海大学海洋学部)
川村美佐子 ((財)日本食品分析センター)
田中廣行 ((財)日本食品分析センター)
矢部美穂 ((株)BMLフード・サイエンス)
中川 弘 ((株)BMLフード・サイエンス)
権平文夫 (株)デンカ生研

A. 研究目的

細菌性食中毒の防止対策を講じる上で、健康危害リスクの推定に加え、対策を講じた場合の経済効果の推定が必要である。また、講じた防止対策の有

効性を評価することが将来の対策を講じる上で有用と考えられる。本研究の目的は、食中毒対策の構築に必要な経済効果と対策の検証の方法を究明することにある

もうひとつの目的は、これまで顧み

られなかった食品の製造加工機械の衛生管理の監視に必要な知見を得ることである。HACCPの普及によって食品製造の衛生管理方法に改善が図られてきたが、それを支える一般衛生管理のうち、機械の衛生管理は、他の事項と並んで重要である。しかし、衛生管理の良否を判定するための方法およびそのための監視方法については不明である。

そこで本年度は、機械の衛生管理については、前年度に引き続きボルトとナット上におけるサルモネラの生残実験、ステンレス板表面およびボルト上でのサルモネラ汚染評価のための拭き取り試験の有効性実験、食肉加工機械の汚染実験を行った。経済効果については、鶏卵由来のサルモネラ食中毒の防止対策としてほぼ同時期に実施された鶏卵の日付表示義務、コールドチェーンの導入、ワクチン接種の3つのサルモネラ食中毒防止対策のそれぞれについて個別に便益を計測する手法の検討を行うとともに、コールドチェーンの導入によるサルモネラ食中毒防止の経済効果を費用便益分析によって推定した。対策の検証に関する研究では腸炎ビブリオ食中毒を取り上げ、市販二枚貝とアジについて汚染実態調査を行い、食中毒が多発した2001年における実態と比較検討することにより、食中毒減少の要因を探索した。

B. 研究方法

①ボルト・ナットでの長期生残実験

野外より分離したサルモネラ菌株のうち、バイオフィーム産生性の高い菌株 (No. 54, 63) と低い菌株 (No. 280, 282) を Trypticase Soy Broth (TSB) または卵黄液中で一晩培養した後に、各菌培養液 5 μ l をボルト上に滴下し、ナットを行き詰まるまで締めてから、もとの位置まで緩めた。ナットを再度行き詰まるまで締めた状態のもの (ユニット) および、ナットをボルトから完全に外した状態のもの (セパレート型) それぞれをシャーレ中に納め、シリカゲル (500g) を底面に敷き詰めてあるデシケーター (外寸 300 \times 300 \times 300mm) 内に 22.5-23.0 $^{\circ}$ C で保存した。この保存庫内から逐次シャーレを取り出し、ボルトとナットを 10ml 量の PBS 中で攪拌してから、その 0.1ml をブリリアントグリーン (BGM) 寒天培地と CHROM Agar Salmonella 培地に接種し、24 時間培養後に生残菌数を測定した。さらに、10ml の PBS 振り出し液のうち 5ml を 45ml の BPW 培地に接種し、24 時間増菌培養後に定性試験を行った。

②ボルト・ナットでの短期生残実験

生残実験バイオフィーム産生性の高い菌株 (No. 54, 63) と低い菌株 (No. 280, 282) を Tryptic Soy Broth (TSB) または卵黄液中で一晩培養した後、PBS で 10 倍、100 倍、1000 倍に希釈し、概ね 10⁵~8cfu/ml に相当する菌液を作成した。各菌培養液 5 μ l をボルト上に滴下し、ナットを行き詰まるまで締めてから、もとの位置まで緩

め、ボルトから完全に外した状態でシャーレ中に納め、シリカゲル (500g) を底面に敷き詰めてあるデシケーター (外寸 300 × 300 × 300mm) 内に 22.5-23.0°C で保存した。菌株 No. 280 は保存 2 日後と 8 日後、菌株 No. 54 は保存 7 日後と 14 日後にデシケーターからシャーレを取り出し、ボルト表面を滅菌綿棒で拭き取り、10ml 量の PBS 中で攪拌した。ボルトとナットについても、同様に 10ml 量の PBS 中で攪拌した。これら PBS 振り出し液の 0.1ml をブリリアントグリーン寒天培地に接種し、24 時間培養後に菌数を測定し、さらに、振り出し液の 5ml を 45ml の BPW (Buffered Pepton Water) 培地に接種後、24 時間増菌培養を行った。

③ステンレス板での生残実験

カジトン培地に保存した試験菌をトリプトソイブイオン培地 (OXOID LTD., Basingstoke, England, CM0129; 以下 TSB) および卵黄液 (OXOID SR0047C) 10 mL に接種し、35°C で一晩 (18 - 20 時間) 培養した後、発育菌数をブリリアントグリーン寒天培地 (OXOID CM0263, 以下 BGM 培地) を用いた寒天平板塗抹法により確認した。培養液を TSB または卵黄液で 10 倍段階希釈し、10 倍~105 倍希釈液 50 μL を各希釈段階 3 枚のステンレス板 (10 mm × 10mm) に添加し、シャーレ内に収めた後シリカゲルを入れたデシケーター内で 22~25°C で保管した。菌株 280 は 2 日目 (48 時間後)、菌株 54 は 7 日目 (168 時間後)

に取り出し、PBS を 10 μL 添加した綿棒 (日本綿棒株式会社、1A754S) で、目視で残存物が残っていない状況まで拭き取った。綿棒および拭き取り後のステンレス板をそれぞれ PBS 10 mL を入れたディスポチューブ (50 mL 容量) に入れ、ボルテックスミキサー (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA) の目盛 5 で 1 分間攪拌した後、それぞれの攪拌液 (綿棒振り出し液およびステンレス板洗い出し液) の菌数を BGM 培地により測定した。菌数が検出限界以下の検体については、増菌培養により菌の生残を確認した。すなわち、攪拌液 5 mL を 45 mL 緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water, BPW, OXOID) に入れ、35°C で 20-24 時間培養した後、0.5 mL を 10 mL のテトラチオーネ培地 (TT broth, OXSOID) に入れ、42°C で 20 時間培養した。培養液 100 μL を BGM 培地に塗抹し、35°C で一晩培養して菌の発育の有無を確認した。

④肉加工機械汚染実験

1) 使用機械

カッター、チョッパー、スタッフアーを用いた。

2) 実験に用いた豚肉

市販の豚薄切り肉を購入し、1-2 日間室温で放置した後に使用した。

3) 検査器具

ベトリフィルム (住友スリーエム製)、ルミテスター (PD-10N、キッコマン製)、ルシパックペン (キッコマン製)。

4) 拭き取り手順

上記放置した市販豚薄切り肉・約10kgをカッターとチョッパーで順次処理してから、得られた挽肉をスタッファーに充填し処理した。処理後に綿棒で写真に示した各部位を拭き取り(表1)、その後各機械を分解し、部品を30秒間40℃の温水に漬け込んだ。温水から引き上げた部分は軽く水切りをした後に、先の拭き取り場所に隣接した部位を綿棒で拭き取った。さらに各部品を洗剤とスポンジで通常作業と同様に洗浄し、水洗してから水切りをし、乾燥した後に前回の拭き取り場所に隣接した部位を綿棒で拭き取った。

5) 検査手順

拭き取り綿棒の先をリン酸バッファー(pH6.8)5ml中に浸し、強く攪拌してからATPキット綿棒をバッファーに漬け、同綿棒をATP測定に供した。さらに、10段階希釈液を作成し、各液1mlをペトリフィルムに滴下した後に、同フィルムを37℃一晩培養してから、コロニー数を計測した。供試した豚肉の菌数は、25gを食品衛生検査指針に準じて処理し、ペトリフィルムを用いて生菌数を計測した。

拭き取りのデータは、ノギスで計測したデータを基に算出した拭き取り箇所面積で補正し、cfu/mm²/mlバッファー、または、ATP計測値/mm²で表した。

⑥個別対策の便益計測手法の検討

3つの対策がサルモネラ食中毒患者の

減少にどの程度寄与しているかを計測し、サルモネラ食中毒患者の減少便益に対する各対策の寄与度を乗じることで個別対策の便益を計測することとした。鶏卵由来のサルモネラ食中毒に関する定量的リスクアセスメントモデルを収集、レビューし、鶏卵の日付表示義務、コールドチェーンの導入、ワクチン接種の3つの対策シナリオを適切に導入できるリスクアセスメントモデルを選定した。このモデルをベースに、可能な範囲でわが国の鶏卵に係る生産・流通・喫食の実態やこれらに関するデータを用いて、3つの対策シナリオを含むリスクアセスメントモデルを構築した。3つの対策の全ての組合せである8シナリオについて食中毒リスクを計測した。ある対策が行われた場合(Withケース)とある対策が行われなかった場合(Withoutケース)の食中毒リスクの差を、当該対策の食中毒リスク低減効果とし、個別対策のリスク低減効果への寄与度は、各対策の食中毒リスクの低減効果を3つの対策による食中毒リスク低減効果で除したものとして定義した。リスク低減効果は便益とほぼ線形の関係にあるため、各対策のリスク低減効果への寄与度は、当該対策の便益への寄与度として捉えることができる。個別対策の便益への寄与度として、個別対策の食中毒低減効果への寄与度を推定した。平成19年度研究において推定した3つの対策が全て講じられた場合の便益額に個別対策の便益への寄与度を乗じることで個別

対策の便益を推定した。

⑦コールドチェーンの導入によるサルモネラ食中毒防止の経済効果の推定
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、コールドチェーン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、ヒアリング調査によって把握し、コールドチェーン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。二重計上を回避しつつ、コールドチェーン導入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。鶏卵の生産・流通・販売事業者へのヒアリング調査に基づいて、その推定可能性を検討し、推定可能な項目について概略的な推定を行った。コールドチェーン導入による便益額と社会的費用を用いて、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。

⑧腸炎ビブリオ実態調査

材料と方法

1. 検体

平成20年6月から11月に、二枚貝として殻付アサリ(201検体)および鮮魚としてアジ(206検体)を検体種とし、消費者が直接入手する小売店など消費末端で購入し検体とした。検体はいずれも産地が国内であることが明記してあ

るものを選び、各研究協力者(機関番号1-10)が試験の当日に入手し直ちに試験に供試した。検体産地は、北海道、東北、関東、中部・近畿、九州に区別した。

アサリは、殻を取り除き中身を滅菌はさみで細断し検体とした。アジは、えら、内臓と尾を採取し25gに足りないときは複数個体から採取して、いずれも裁断し25gを1検体とした。

2. 検出方法

平成13年の調査時および19年度本調査事業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。まず、ストマッカー一袋に入れた検体25gにアルカリペプトン水(日水製薬)225mlを加え、35-37℃で18時間培養した。この培養液1mlを食塩加ポリミキシンブイオン(日水製薬)10mlに加え35-37℃で18時間培養した。この培養液1mlを食塩加ポリミキシンブイオン10mlに加え2回培養した。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段階増菌培養液1ml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行った。濃縮菌液10-20mlをクロモアガー・ビブリオ培地(クロモアガー社)に画線し、35-37℃で18時間培養した。*tdh*検出のPCRの結果が陽性の場合には多数のコロニーが釣菌でき

るよう希釈列を塗抹した。また、同増菌培養液 10ml をクロモアガー・ビブリオ培地に直接塗抹し、35-37°C で 18 時間培養した。

(3) 腸炎ビブリオの確定試験

クロモアガー・ビブリオ培地上の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。糖分解性試験に 2% NaCl 添加 Triple Sugar Iron Agar (TSI) 半斜面培地、また、塩分濃度耐性試験に NaCl 添加 Nutrient Broth (NB) を使用した。分離した藤色のコロニーを釣菌し、0%、3%、7% および 8% NaCl 添加 NB 培地に浸した後、TSI 培地に画線および突刺し、それぞれ 35°C で 18 時間培養を行った。各コロニーを腸炎ビブリオ *toxR* 遺伝子を対象にした PCR に供試した。

(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。滅菌蒸留水量は、増菌液 1 ml には 0.1 ml (これを 10 倍濃縮とする)、増菌液 0.1 ml には 1 ml (これを 10 倍希釈とする) とした。その後、100°C 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。また、クロモアガー・ビブリオ培地上に生育した藤色のコロニーおよび 2% NaCl 添加 TSA 培地に生育したコロニーは、滅菌蒸留水 0.1 ml にコロニーを適量浮遊させ、100°C で 10 分間加熱し、DNA を抽出し、

$10,000 \times g$ 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、反応試薬液 45ml に Template DNA 5ml を加え計 50ml の反応とした。PCR 条件は、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長 72°C 1 分を 1 サイクルとし、35 サイクルとした。得られた PCR 産物を泳動し *tdh* 遺伝子の確認を行った。

(6) *toxR* 遺伝子検出 PCR 法

腸炎ビブリオと思われるコロニーの Template DNA を用いて、Takahashi らの方法 (J. Microbiol. Methods. 2005, 61:77-85) によって行い反応試薬液 20ml に Template DNA 5ml を加え計 25ml の反応とした。PCR 条件は、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 63°C 1.5 分、伸長 72°C 1.5 分を 1 サイクルとし、20 サイクルとした。得られた PCR 産物を泳動し *toxR* 遺伝子の産物 (386 bp) の確認を行った。

(7) 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。検体乳剤の 10 ml、1 ml および 0.1 ml を 3 本ずつアルカリペプトン水 10 ml に加えた。35-37°C で 18 時間培養、各培養液 1 ml を食塩加ポリミキシンブイヨン 10ml に加え 35-37°C で 18 時間培養、さらに、その 1 ml を食塩加ポリミキシンブイヨン 10 ml に加え 35-37°C で 6 時間培養した。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培養、性状試験を行い腸炎ビブリオであるか確認した。各 MPN 試験管培養液についても PCR を行った。

(8) Box screening 法

クロモアガー・ビブリオ培地上に生育した藤色のコロニーに No. 1-100 までの番号をつけた。その後、滅菌蒸留水 0.1 ml に若い順に No. 1-10、No. 11-20 というように 10 番ずつ藤色のコロニーを同一のチューブに浮遊させた。また、同じように下一桁が同一の藤色のコロニーを同一のチューブに浮遊させた。合計 20 本のチューブについて 100°C で 5 分間加熱し、10,000 × g で 5 分遠心して得られた上清を Template DNA とした。これを用いて PCR 法にて *tdh* 遺伝子の有無を確認し、結果からいずれのコロニーが *tdh* 遺伝子陽性か判定した。

(9) 菌の分離および血清試験

スライド凝集法による K 型別試験、O 群別試験を行った。

(10) RPLA 法

逆受け身ラテックス凝集反応キット (KAP-RPLA, デンカ生研) を用いた。

(11)

C. 研究結果

①ボルト・ナットでの長期生残実験

No. 54 の TSB 懸濁菌液で、 1.1×10^9 cfu/ml、卵黄懸濁菌液で 5.3×10^8 cfu/ml、一方、No. 280 の TSB 懸濁菌液で、 1.6×10^9 cfu/ml、卵黄懸濁菌液で 6.0×10^8 cfu/ml であった。菌数測定に

は BGM 寒天培地と CHROM Agar Salmonella 培地の 2 種類の分離平板を用いたが、結果に差はみられなかった。

菌株 No. 54 は、TSB 懸濁菌液を接種した場合は、卵黄懸濁菌液を接種した場合よりも菌数が減少しにくい傾向がみられ、保存 337 日後でも増菌培養法で菌が検出された。TSB 懸濁液を接種した場合にはセパレート型とユニット型との間には顕著な差はみられなかったが、卵黄懸濁液を接種した場合には、セパレート型の方が急速に菌数が減少した。

菌株 No. 280 は、TSB 懸濁液を接種した場合には保存 261 日目まで生存し、ユニット型とセパレート型で大きな差はみられなかった。他方、卵黄懸濁液を接種した場合には菌数の減少は顕著に早く、保存 8 日以降は 10cfu/ml 未満となり、増菌培養後も菌は検出されなかった (<0.2cfu/ml)。

菌株 282 の TSB 混濁菌液を接種した場合のユニットは 168 日後に検出されなくなった。菌株 282 はそれ以外 (TSB 混濁菌液接種した場合のセパレート、卵黄混濁菌液接種した場合のユニット・セパレート) はすべて 28 日後には検出されなくなった。菌株 64 を接種したものはすべて 448 日後であっても生存し、卵黄混濁液を接種した場合のユニットは菌量も多かった。

②ボルト・ナットでの短期生残実験

サルモネラ菌株の一晚培養後の菌量は、菌株 No. 54 は TSB 懸濁液で 6.2×10^8 cfu/ml、卵黄液懸濁液で $1.4 \times$

10^9 cfu/ml、一方、菌株 No. 280 は TSB 懸濁液で 1.3×10^9 cfu/ml、卵黄液懸濁液で 1.8×10^9 cfu/ml であった。

懸濁液の原液および PBS で $10^{\sim}1000$ に希釈した各菌液をボルト接種（約 1 時間）後に菌数測定した結果を表 1 に示す。

菌株 No. 54 の TSB 懸濁液原液を接種した場合、ボルトの PBS 振り出し液の菌数は 1.4×10^4 cfu/ml、拭き取り綿棒の PBS 振り出し液の菌数は 1.0×10^2 cfu/ml であった。また、卵黄液懸濁液原液を接種した場合、ボルトの PBS 振り出し液の菌数は 5.9×10^4 cfu/ml、拭き取り綿棒の PBS 振り出し液の菌数は 1.9×10^3 cfu/ml であった。これに対して、TSB 懸濁液や卵黄液懸濁液の 10 倍から 1000 倍希釈液を接種した場合にはいずれも検出限界（10cfu/ml）未満であった。

菌株 No. 280 の TSB 懸濁液原液を接種した場合、ボルトの PBS 振り出し液の菌数は 5.0×10^4 cfu/ml、拭き取り綿棒の PBS 振り出し液の菌数は 1.5×10^3 cfu/ml であった。また、卵黄液懸濁液原液を接種した場合、ボルトの PBS 振り出し液の菌数は 2.3×10^4 cfu/ml、拭き取り綿棒の PBS 振り出し液の菌数は 8.4×10^2 cfu/ml であった。これに対して、TSB および卵黄各懸濁液（原液）の PBS による $10^{\sim}1000$ 倍希釈液を接種した場合にはいずれも検出限界未満であった。

菌株 No. 54 について、菌接種 7 日後には、TSB 懸濁液の原液を接種したボル

トの振り出し液から $5.0^{\sim}8.0 \times 10^1$ cfu/ml の菌が検出されたが、懸濁液（原液）の PBS による $10^{\sim}1000$ 倍希釈液を接種したボルトの振り出し液からは増菌培養を行っても菌は検出されなかった（ <0.2 cfu/ml）。

また、ボルトの拭き取り検体については、いずれも増菌培養を行っても菌は検出されなかった。

菌接種 14 日後には、TSB 懸濁液の原液を接種したボルトの振り出し液の 3 検体中 2 検体からそれぞれ 2.0×10^1 cfu/ml、 3.0×10^1 cfu/ml の菌が検出されたが 1 検体は増菌培養でのみ菌が検出された。また、ボルトの拭き取り検体については、いずれも増菌培養を行っても菌は検出されなかった。

菌株 No. 280 について、菌接種 2 日後には、TSB 懸濁液の原液を接種したボルトの振り出し液から $5.0 \times 10^3^{\sim}1.2 \times 10^4$ cfu/ml の菌が検出されたが、原液の $10^{\sim}1000$ 倍希釈液を接種したボルトの振り出し液からは増菌培養を行っても菌は検出されなかった。

また、ボルトの拭き取り検体については、3 検体中 1 検体から 3.0×10^1 cfu/ml の菌が検出されたが、他の 2 検体については増菌培養でのみ菌が検出された。

一方、卵黄懸濁液の場合には、原液を接種したボルトの振り出し液から $3.0^{\sim}5.0 \times 10^1$ cfu/ml の菌が検出されたが、懸濁液（原液）の $10^{\sim}1000$ 倍希釈液を接種したボルトの振り出し液からは増菌培養を行っても菌は検出されな

かった。また、拭き取り検体については、増菌培養を行っても菌は検出されなかった。

菌接種 8 日後には、TSB 懸濁液の原液を接種したボルトの振り出し液から $1.9 \sim 2.4 \times 10^3$ cfu/ml の菌が検出された。また、拭き取り検体については、3 検体とも増菌培養でのみ菌が検出された。

拭き取り検体については、ボルト上の菌数が PBS 振り出し液中に 10^3 (cfu/ml) 以上の場合に増菌培養で菌が検出され、一方、PBS 振り出し液中の菌数が 10^1 (cfu/ml) 以下の場合には、増菌培養を行っても菌は検出されなかった。

菌株 64 と 282 については、トリプトソイブイオン・卵黄での増菌にかかわらず、バイオフィーム高産生菌株である菌株番号 64 を $10^7 \sim 10^6$ cfu 接種したものの 7 日後は、ボルト・ナット・めん棒から接種菌が回収され、 10^3 cfu 接種の 7 日後ではボルトとナットのみから回収されるにとどまった。一方、バイオフィーム低産生菌株である菌株番号 282 では 10^6 cfu 接種したものの 7 日後もボルト・ナット・綿棒から接種菌が回収されたが、 10^6 cfu 接種の 7 日後ではボルトとナットのみ、 10^4 cfu 以下の接種の 7 日後はいずれからも回収できなかった。

バイオフィーム高生産性菌株が高濃度に接種されたボルト・ナット等の機材は、セパレート状態においても、1 週間程度では菌がボルト・ナットともに保存されていることが判明した。

③ステンレス板での生残実験

菌株 280 を TSB で培養し、TSB で希釈懸濁してステンレス板に添加した場合、2 日間の保管により、全ての検体で生残菌数は 1% 未満となった。いずれのステンレスでも 10^6 オーダーの添加菌数では直接塗抹で菌を回収可能で、ステンレス No. 1 および 3 では、 10^5 オーダー以下の添加菌数でも、直接塗抹で菌を検出可能な検体が多くみられた。ステンレス No. 2 および 4 では、 10^5 オーダー以下の添加菌数では、1 検体を除いて直接塗抹で菌は検出されず、No. 2 の 10^2 添加及び No. 4 の 10^3 添加では増菌でも菌の生残は確認できなかった。ステンレス板の洗い出しでは、No. 1 の 10^5 オーダーの 1 検体を除いて菌は検出されず、他の検体は綿棒の拭き取りにより 100% 菌を回収可能であった。

菌株 280 を卵黄液で培養し、卵黄液で希釈懸濁してステンレス板に添加した後保存した場合、保管 2 日で、全ての検体で生残菌数は 1/1000 未満となり、 10^3 以下の添加菌数では全ての検体で菌は検出不能であるなど、TSB 懸濁より生残菌数は低い傾向であった。ステンレスの違いによる生残性については明確な差は認められなかった。ステンレス板の洗い出しでは、全く菌は検出されず、綿棒の拭き取りにより 100% 菌を回収可能であった。

菌株 54 を TSB で培養し、TSB で希釈懸濁してステンレス板に添加した後保存した場合、7 日間保管した後でも、

全検体から菌が回収され、菌株 280 と比較して生残性が高かった。10³オーダー以上添加の検体では、すべての検体で直接塗抹により菌が回収され、添加菌数より回収菌数が高くなるものがみられた。綿棒による拭き取り後でもステンレス板の洗い出しにより 10⁴~10⁵程度の菌が回収される検体のみみられたが、ステンレス洗い出しによる回収菌数は添加菌数の2%以下であり、98%以上は綿棒による拭き取りで回収可能であった。ステンレスの違いによる菌の生残性には明確な差は認められなかった。

菌株 54 を卵黄液で培養し、卵黄液で希釈懸濁してステンレス板に添加した後保存した場合には、7日間保管した後も、全ての検体から菌が回収された。10³オーダー以上添加の検体では、すべての検体で直接塗抹により菌が回収された。ほとんどの検体で接種菌数の90%以上の菌が生残しており、100%以上の回収率となる検体もみられたが、TSB 懸濁と比較すると菌の生残性が低い傾向がみられた。添加菌数、綿棒拭き取り及びステンレス洗い出しによる回収菌数を比較すると、1検体を除いてステンレス洗い出しによる回収菌数は2%以下であり、98%以上は綿棒による拭き取りで回収可能であった。ステンレスの違いによる回収菌数には明確な差は認められなかった。

④肉加工機械汚染実験

実験に供した豚肉の生菌数は

7.70x10⁸ (n=3) であった。

一般生菌数と大腸菌群数ともに機械部位による差異が極めて大きかった。ルミテスト測定値の高低は、必ずしも一般生菌数と大腸菌群数の大小と対応していなかった。そのこととも一致し、ルミテスト測定値と一般生菌数との間の相関係数は比較的low値であったのに対し、一般生菌数と大腸菌群数との間には高い相関が認められた。ルミテストの感度は菌数に比して顕著に低く、指標として用いるためには感度の上昇が必要であることが判った。

構造的に小さい溝をもつ部位は菌数が高く、洗浄後も比較的高い菌数が認められた。こうした部位においては、拭き取り効率が、平面に比して低いと推定されるので、菌数が実際よりも低く計測されている可能性が残る。したがって、部位別の残存菌数比較の精度を向上するためには、拭き取り操作の標準化が必要と考えられる。なお、肉が接触し難いと考えられる部位はいずれも低い菌数であった。

⑤個別対策の便益計測手法の検討

3つの食中毒対策はほぼ同時に講じられたため、平成19年度研究で得られた便益は3つの対策の複合的な便益となっている。各対策の個別便益を計測するためには、食中毒リスク低減効果への寄与度を求める必要がある。

個別の食中毒リスク低減効果を求める方法には、全ての対策が講じられていない場合 (Without ケース) と、あ

る対策が講じられた場合 (With ケース) とを比較して食中毒リスクの変化を計測する方法がある。この2つの方法で食中毒リスク低減効果を計測することとした。これは3つの対策の全ての組合せである8シナリオについて食中毒リスクを推定することにほかならない。

8つのシナリオについてそれぞれモンテカルロシミュレーションソフトであるPalisade社@Risk4.5日本語版を用いてラテンハイパーキューブ法による50万回のシミュレーションを実行した。

全ての対策が講じられていなかった場合 (Without ケース) と、ある対策を講じた場合 (With ケース) とを比較した場合の日付表示義務の寄与度は19.3%、コールドチェーンの寄与度は48.6%、ワクチン接種の寄与度は32.1%と算出された。一方、全ての対策が講じられている場合 (With ケース) と、ある対策が講じられていなかった場合 (Without ケース) とを比較した場合の日付表示義務導入の寄与度は21.0%、コールドチェーン導入の寄与度は49.2%、ワクチン接種の寄与度は29.8%と算出された。

平成19年度研究において推定した3つの対策が全て講じられた場合の便益額の平均値は1,474億円であった。日付表示義務295億円、コールドチェーン737億円、ワクチン接種442億円と推定された。

⑥コールドチェーンの導入によるサル

モネラ食中毒防止の経済効果の推定

イニシャルコストである農場・GPセンターの施設整備費の増加分である約600億円は2000年に発生したものと、ランニングコストである物流コストの増加は2000年から2004年までの5年間について発生するものとして評価した。

5年間にわたる物流コストの増加分を2000年の現在価値に換算すると、約106億円と推定された。農場・GPセンターの施設整備費の増加分と合算すると、社会的費用は約700億円と推定された。

コールドチェーンの導入による社会的便益が平均で737億円と推定されており、その社会的費用が約700億円と推定された。従って、2000年の現在価値で評価したときのコールドチェーンの導入効果は、費用の1.05倍(費用便益比)の大きさ、費用を37億円上回る(純便益)との結果が得られた。

なお、平成19年度で対象とした日付表示義務の経済効果については、費用の1.57倍(費用便益比)の大きさ、費用を107億円上回る(純便益)との結果が得られた。

⑦腸炎ビブリオ実態調査

(1) 腸炎ビブリオの分離での定性分析

全検体である407検体中の367検体(90.2%)で腸炎ビブリオが分離された。検体種ごとでは、アサリ201検体中の189検体

(94.2%)、アジ 206 検体中 178 検体 (86.4%) であり、アサリの方が若干検出率が高かった。産地別では、アサリは北海道で 16 検体中 11 検体 (約 7 割) から腸炎ピブリオが分離されたが、他の地域に比べて少なかった。アジは中部・近畿と九州で約 9 割から腸炎ピブリオが分離され、他の地域に比べて高かった。

(2) *tdh* 陽性腸炎ピブリオの定性分析

tdh 遺伝子を対象とした PCR 法では、407 検体中の 25 検体 (6.1%) で *tdh* 遺伝子が検出された。検体種ごとでは、アサリ 201 検体中の 19 検体 (9.0%)、アジ 206 検体中 6 検体 (2.9%) であり、アサリの方が約 3 倍高かった。産地別では、アサリは関東の 6 検体中 3 検体が *tdh* 陽性であり非常に高い結果であった。また、中部・近畿では 102 検体中 12 検体 (11.8%)、九州では 71 検体中 3 検体 (4.2%) が陽性であった。また、アジは関東の 13 検体中 1 検体 (7.7%)、中部・近畿の 55 検体中 2 検体 (3.6%)、九州の 87 検体中 3 検体 (3.4%) が陽性であった。

(3) 腸炎ピブリオの定量分析

腸炎ピブリオが分離された 367 検体について総腸炎ピブリオ菌数を求めた。アサリでの最大値は、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 未満のものもあり全体的に分散していた。アジでは $>140,000$ MPN/10 g の検体はなく、3 MPN/10 g 未満のものも多く見られた。また、1 g あたり総腸炎ピブリオ数が 100 を超える検体の割合はアサリでは 25.1%、アジでは 12.1% とアサリで高かった。

(4) *tdh* 陽性腸炎ピブリオの定量分析

定性分析で *tdh* 遺伝子陽性の 25 検体 (アサリ 19 検体、アジ 6 検体) について *tdh* 遺伝子陽性腸炎ピブリオ菌数を求めた。アサリでは最大値は、10 MPN/10 g を越えていたが、多くは最小定量値である 3 MPN/10 g 未満であった。一方、アジでは最大値は 100 MPN/10 g を超えていた。総腸炎ピブリオ菌数と *tdh* 遺伝子陽性腸炎ピ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。

(5) *tdh* 陽性の腸炎ピブリオ分離菌株

tdh 遺伝子陽性の 25 検体のうち 6 検体から *tdh* 遺伝子陽性菌株が分離された。これら分離菌株の性状及び *toxR* 遺伝子の有無を試験した結果、全菌株が腸炎ピブリオの性状と一致し、*toxR* 遺伝子も検出された。

分離菌株の TDH 毒素産生性は全株で確認された。

tdh 陽性株での血清型は、03:K6、04:KUT、05:K17、010:K52、010: KUTであった。いずれの株も Group specific PCR 法による解析では pandemic 株ではなかった。

(6) 血清型 03:K6 腸炎ピブリオの分離

血清型 03:K6 がアサリ 62 検体、アジ 10 検体から分離された。これらのうち、アサリ 2 検体由来の菌株が *tdh* 陽性であった。その他はいずれも陰性であった。

(7) 統計学的解析

アジとアサリの総腸炎ピブリオ菌数の平均値は有意にアサリで高かった ($p < 0.0001$)。アジとアサリの *tdh* 陽性腸炎ピブリオ菌数の平均値には有意差はなかった。また、アジにおける *tdh* 陽性検体と *tdh* 陰性検体の総腸炎ピブリオ菌数の平均値にも有意差はなかった。アサリにおける *tdh* 陽性検体と *tdh* 陰性検体の総腸炎ピブリオ菌数の平均値は有意に *tdh* 陽性検体で高く ($p < 0.001$)、アジとアサリを併せた全検体での *tdh* 陽性検体と *tdh* 陰性検体の総腸炎ピブリオ菌数の平均値では有意に *tdh* 陽性検体で高かった ($p < 0.0001$)。

D. 考察

本実験では、BGM 寒天培地と CHROM Agar Salmonella 培地の2種類の分離平板を併用して、生残菌数の測定を行っ

た。サルモネラ菌株を TSB および卵黄液中で一晩培養後に菌数測定した場合には、平板の違いによる差はみられなかったが、保存検体については、BGM 寒天培地の平板上に発育したコロニー数は CHROM Agar Salmonella 培地よりも概して高く、CHROM Agar Salmonella 培地は損傷を受けた菌の分離には適さないことが示唆された。このことから、洗浄不十分のために菌の残存が推察された場合には、損傷菌に適した培地を用いた検査が必要であることが考えられた。

両菌株とも TSB 懸濁液を使用した方が卵黄懸濁液よりも菌の生残性が高く、懸濁液による違いがみられた。さらに、生残期間について、TSB 懸濁液を接種した場合にはユニット型とセパレート型の間に顕著な違いはみられなかったが、菌株 No. 54 では卵黄懸濁液を接種した場合にはユニット状態の方がセパレート状態より生残性が高かった。これらのことから、卵黄懸濁液の場合には TSB 懸濁液よりも保存庫内の湿度に大きく影響されることが考えられた。

菌株番号 64 をトリプトソイブイオンで増菌しボルトに接種したもの、および、同菌株を卵黄で増菌しボルトに接種したもの、ともに1年以上生残した。トリプトソイブイオンで増菌しボルトに接種したものはボルトとナットのユニット状態・セパレート状態ともに同様な生残性を示したが、卵黄で増菌しボルトに接種したものはユニット状態のほうがセパレート状態よりも生残性

が高い傾向があることが示唆された。

拭き取り検体については、ボルト上に菌が生残していても、PBS 振り出し液中の菌数が 10^3 (cfu/ml) 以上の場合に増菌培養で菌が検出されたが、PBS 振り出し液中の菌数が 10^1 の菌数が 10^1 (cfu/ml) 以下の場合には、増菌培養を行っても菌は検出されなかったことから、機器に残存した菌の検査法について、特に表面に凹凸がみられる場合には、滅菌綿棒等を用いた拭き取り方法について更に検討する必要があることが考えられた。

ステンレス板に付着した菌を回収する方法については、スタンプ法、綿棒やスワブによる拭き取り法あるいは液体中で洗い出すなどの方法が利用されている。スタンプ法は簡便であるが平面以外の部位では使用が困難であり、凹凸のある場所の汚染調査には適さない。洗い出し法は高い回収率が期待されるが、採取可能なものには大きさの制限がある。綿棒による拭き取りは、曲面や入り組んだ部位でも容易に利用できることから、食品製造施設の機械・器具類の表面など汚染調査に有効な方法となるものと考えられる。今回の結果では綿棒による拭き取りによりほとんどの検体で 98%以上の菌が回収可能であり、実際の汚染実態調査においても綿棒による拭き取りで十分な回収率を期待できるものと考えられる。特に菌株 280 ではほぼ 100%回収できたが、これは菌株 280 の生残菌数が菌株 54 と比較して少なかったことが影響し

ているものと考えられる。一方、菌株 54 では 100%の回収率は得られなかったが、生残菌数が多かったため、1本の綿棒では全て拭き取ることが困難であったためと考えられることから、菌数が高い場合は複数の綿棒を用いて拭き取るなど、方法を検討する必要がある。

ステンレス板の違いによる生残状況をみると、菌株 280 では TSB に懸濁した場合は NO. 1 および 3 のステンレスで若干生残菌数が高くなる傾向がみられたが、菌株 280 を卵黄液に懸濁した場合や菌株 54 では明確な差はみられず、実験誤差等を考慮すると、今回の実験ではステンレスの組成と表面仕上げによる菌の生残性の違いを明確にすることはできなかった。

食肉加工機械の汚染実験の成績から、構造的に小さい溝をもつ部位は菌数が高く、洗浄後も比較的高い菌数が認められた。こうした部位においては、拭き取り効率が、平面に比して低いと推定されるので、菌数が実際よりも低く計測されている可能性が残る。したがって、部位別の残存菌数比較の精度を向上するためには、拭き取り操作の標準化が必要と考えられる。なお、肉が接触し難いと考えられる部位はいずれも低い菌数であった。また、菌数測定が感度の点から優れていることが判明したが、結果を得るまでに時間がかかることから、菌数を反映する何らかの簡易検査方法が必要であることが判った。また、拭き取り操作の標準化も

今後の課題として浮上した。

コールドチェーンの導入による社会的費用の推定においては、施設整備費の増加分を新規の施設整備に関するデータに基づいて算出しているため、今後、既存施設の改修コスト等に関する情報を収集することで、より詳細な費用推定を行う必要がある。

昨年度は調査対象が二枚貝であったが、247 検体中 187 検体 (75.7%) が腸炎ピブリオ陽性であり、16 検体 (6.5%) が *tdh* 陽性であった。今年度は407検体(アサリ 201 検体とアジ 206 検体) 中 367 検体 (90.2%) が腸炎ピブリオ陽性であり、25 検体 (6.1%) が *tdh* 陽性であった。これらの結果は、2001 年の調査での腸炎ピブリオ陽性率 95.4% (165/173 検体)、*tdh* 陽性率 10% (33/329 検体) と比較して極端に減少はしていない。依然として *tdh* 陽性腸炎ピブリオを含む腸炎ピブリオの魚介類への汚染は認められ、腸炎ピブリオ食中毒の患者数および事件数の著しい減少の理由としては腸炎ピブリオ汚染率の減少とは言えない。そこで、分離された *tdh* 陽性菌株の解析結果を比較すると、2001 年の調査では全分離株が 03:K6 であったが、昨年度に分離の 5 検体由来株は 04、00T、K37、K38、KUT の組み合わせであり 03:K6 は分離されず、今年度に分離の 2 検体由来株が 03:K6 であ

り 4 検体は 04:KUT、05:K17、010:K52、010:KUT であった。総合すると近年 2 年の 11 検体中 2 検体 (18.2%) が 03:K6 を保有し、多くは 03:K6 以外であることから、魚介類での *tdh* 陽性 03:K6 の分布が減少したことが明らかになった。このことは 03:K6 による食中毒発生を減少させていることに直接的に関連していると考えられる。しかし、他の血清型の *tdh* 陽性腸炎ピブリオは分離され *tdh* 陽性検体率もあまり変わらないことから、血清型 03:K6 と他の血清型で感染性や増殖性の強さが異なることも考えられる。

E. 結論

TSB 懸濁菌液の方が卵黄懸濁菌液よりもサルモネラの生残性が高く、卵黄懸濁液の場合には TSB 懸濁液よりも保存庫内の湿度に大きく影響されることが示唆された。菌株によっては、ボルトとナットのユニット状態の方が、セパレート状態よりも生残性が高いことが認められたが、この状態においてバイオフィーム産生性が高いか否かについては更なる検討が必要である。

また、保存検体については、BGM 培地の方が CHROM Agar Salmonella 培地よりも平板上に発育するコロニー数が概して多く、損傷菌を対象とした検査に適した培地の検討が必要である。

サルモネラの種類、いわゆるバイオフィームの産生性等により、ネジに付

着したサルモネラは1年以上も生残していた。さらに、卵黄で増菌しボルトに接種したものはユニット状態のほうがセパレート状態よりも生残性が高い傾向があることが示唆された。また、ボルトにサルモネラを接種し、いちどユニット状態にした後、セパレートにして保存した場合、ボルト、ナットともにほぼ同じ菌量が回収され、しかも、バイオフィーム高生産性菌株が高濃度に接種された場合は、セパレート状態においても、1週間程度では菌がボルト・ナットともに保存されていることが判明した。

ネジ上での菌の生残性は TSB 懸濁菌液と卵黄懸濁菌液とは異なり、乾燥条件下においては TSB 懸濁液の方が生残性が高いことが示唆された。また、ボルト上に菌が生残していても、拭き取り検査では十分には菌が検出できなかったことから、検査手法の見直しや工夫が必要である。

食肉加工機械の成績から、一般生菌数と大腸菌群数ともに機械部位による差異が極めて大きいこと、ATP 測定値の高低は、必ずしも一般生菌数と大腸菌群数の大小と対応していないことが判った。構造的に小さい溝をもつ部位は菌数が高く、洗浄後も比較的高い菌数が認められた。以上より、菌数を反映する何らかの簡易検査方法が必要であること、また、拭き取り操作の標準化も今後の課題として浮上した。

USDA が構築したサルモネラ食中毒の確率論的リスクアセスメントモデルを

ベースに、可能な範囲でわが国の鶏卵に係る生産・流通・喫食の実態やそれらのデータを用いてリスクアセスメントモデルを構築した。これに3つの対策シナリオを導入し、各々の食中毒リスク低減効果を推定した。これを用いて各対策の便益への寄与度を推定し、3つの対策によって複合的に発現した全体の便益から個別対策の便益を推定することが可能となった。

また、この結果を用いて、コールドチェーンの導入を対象に定量化可能な社会的費用を推定し、費用便益分析によって経済効果を推定した。併せて、平成19年度で対象とした日付表示義務の経済効果についても推定した。

今後、本研究で構築したリスクアセスメントモデルについて、コールドチェーンの効果を中心に気温等についての感度分析等を行うことにより結果の妥当性を確認するとともに、必要な精度に応じたより簡便な菌の増殖モデルを採用するなどの見直しを図る必要がある。また、コールドチェーン導入の社会的費用について、既存施設の改修コスト等に関する情報を収集することで、より詳細な費用推定を行う必要がある。

また、3つの対策のうち、まだ検討されていないワクチン接種の経済効果を推定するとともに、3つの対策の複合的な経済効果についても推定、分析を行う必要がある。

国内産の市販のアサリ 201 検体とアジ 206 検体において、*tdh*