

200939014A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 熊谷 進

平成22 (2010) 年3月

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 熊谷 進

平成22(2010)年 3月

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..... 1

熊谷 進

II. 分担研究報告

1. 機器の衛生管理に関する研究..... 7

熊谷 進

2. 殻付き卵のサルモネラ汚染防止対策の経済効果推定..... 71

山本 茂貴

3. 腸炎ビブリオ食中毒の防止対策に関する研究..... 87

小西良子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 140

IV. 研究成果の刊行物..... 141

細菌性食中毒の防止対策に関する研究

研究代表者 熊谷 進

研究要旨

複雑な構造をもつ食肉加工機械について汚染実験を行ない、検査を優先させるべき構造を明らかにした。パイプ接続部のサルモネラ汚染実験により、接続器を確実に締めた場合、SE が付着しても表面のみの残存にとどまり菌量も少ないが、緩んでいる場合は接続部全体に菌液が広がり菌量も多く残存することが実証された。ステンレス表面を綿棒による拭き取りで検査する場合の、拭き取り圧力の違いによる回収効率について検討した結果、試料が乾燥した状態で拭き取り圧力に応じて回収菌数及び回収率が高くなる傾向がみられた。ステンレスとプラスチック表面の洗浄効果の実験を行い、有効な市販の洗剤(FP)濃度を求めた。

経済効果の研究については、過年度に実施した鶏卵由来のサルモネラ食中毒の防止対策である日付表示義務およびコールドチェーン導入の社会的費用の推定の見直しを図るとともに、新たにワクチン接種の社会的費用を推定した。3つのサルモネラ食中毒防止対策の個別便益を推定する手法の見直しを行ない、これら対策の経済効果を費用便益分析によって推定した。シミュレーション結果に基づいて、サルモネラ食中毒防止対策の経済効果を推定したところ、それぞれの費用便益比(B/C)は、コールドチェーンの導入率が30%のケースで、ワクチン接種が3.00、コールドチェーン導入が2.29、鶏卵の日付表示義務が4.61、3つの対策全体では2.93との結果を得た。

腸炎ビブリオ汚染実態調査により、①腸炎ビブリオ食中毒の激減は03K6によるものだけでなく他の血清型によるものにも認められていること、②現状では、03K6以外の血清型の *tdh* 陽性腸炎ビブリオが魚介類から分離されており、*tdh* 陽性検体率も以前と変わらないにもかかわらず、これら血清型菌による食中毒発生が認められないこと、③PFGE 解析でパンデミック株の腸炎ビブリオが流行した1998年前後に分離された株がいまだに国内に生息し輸入食品にも存在し、それが現在でも少数ながら食中毒を起こしていることが認められ、さらに食品営業者へのアンケート調査や海水温等の公表データより、平成13年以降（厳密には指導を開始した12年以降）の流通末端から消費における魚介類取り扱いの衛生的改善が食中毒減少をもたらしたものと考えられた。

A. 研究目的

①食品製造加工に用いられる機器の衛生管理の監視の要点を求めるためには、部品のみならず、機器自体の構造や機能との関係における汚染と洗浄のし易さについての知見を得る必要がある。この点を究明するために、とくに複雑な構造をもつ食肉加工機械および機械表面のモデルとしてのステンレス板について汚染実験を行うこととした。また、パイプ接続部の締め付け度と細菌の漏出程度との関係を求めるために、パイプのサルモネラ接種実験を行った。

②食中毒リスク対策を講じる際には、想定されるリスク対策措置のうち最も効果的かつ効果的なものを選択する必要がある。また、リスク管理措置を講じた後は、当該リスク管理措置の有効性を検証する必要がある。その方法論としては、公共経済学の分野において確立され、既にさまざまな分野に適用されている経済分析手法である費用便益分析がある。本研究は、殻付き卵のサルモネラ汚染防止対策について、生産段階でのワクチンの接種、流通段階でのクールチェーンの導入、小売段階での鶏卵の日付表示義務を対象に費用便益分析に基づく経済効果の推定を行い、それぞれの対策の有効性を検証するとともに、今後の食中毒リスク対策措置の選択や有効性検証における費用便益分析の枠組みの確立に寄与することを目的としている。

③腸炎ビブリオ食中毒は、平成 10 年 (1998 年) までに急増し、事件数 839 件、患者数 12,318 人に至った。このため、平成 13 年 (2001 年) 6 月に一連の対策が講じられ、その後、現在まで腸炎ビブリオ食

中毒は減少し平成 20 年 (2008 年) までに患者数は 168 名 (約 1/70) に、事件数は 17 件 (約 1/50) に減少している。しかし、こ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。この点を究明することを目的とし、平成 21 年度 (2009 年度) は過去 2 年間の本研究での成果のまとめを考慮し、国産および輸入の二枚貝での汚染状況を調べ、得られた分離菌株の血清型、*tdh/trh* 保有、pandemic 株解析、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析などを調べ、平成 10 年 (1998 年) 前後の腸炎ビブリオ流行時の食品等からの分離株や近年の食中毒患者株由来株ともそれら特徴を比較し検討した。

B. 研究方法

①室温に放置し品質劣化させた豚肉を、カッター、チョッパー、スタッファーで順次処理した後に、各機械の諸部位を拭き取った綿棒を強く攪拌したバッファーについて、一般生菌数、大腸菌群数、ATP 値を測定することによって汚染程度を調べた。各機械を洗浄した後にも同様に汚染程度を調べた。パイプの接続部の締め付け程度による細菌の漏出の程度を、サルモネラを接種し 24 時間放置した後、接続器を解体して左右の接続金属部の SE 菌数測定によって調べた。ステンレス鋼表面に付着したサルモネラを綿棒による拭き取りで回収する場合の、拭き取り圧力の違いによる回収効率を検討した。バイオフィーム形成能の異なるサルモネラを用い、それぞれの菌が 4℃あるいは 37℃

でステンレススチール(SS)あるいはプラスチック(PL)に付着する条件を設定した。また、それらの器材に付着した菌を洗剤によって剥がす条件を探るため、実験室で使用する Triton X-100(TX-100)および市販の食器用洗剤のファミリーフレッシュ(FF)を用いて洗剤の効果を検討し、後者については濃度条件を決めた。

②殻付き卵のサルモネラ汚染防止対策である、ワクチン接種、コールドチェーン導入、鶏卵の日付表示義務の3つの対策について費用便益分析に基づく経済効果の推定を行った。費用便益分析では、個々の対策を講じた場合(With ケース)と講じなかった場合(Without ケース)を比較し、社会的費用と社会的便益を推定した。

なお、対策によって施設・設備等の初期投資が行われる場合、当該施設・設備等は耐用年数にわたって便益を発現することから、会計上の費用収益対応の原則に基づき、税法上の耐用年数を計算期間として、当該年数にわたって年間の社会的費用および社会的便益の現在価値をそれぞれ合計したものを社会的費用および社会的便益として算出した。

③過去2年間の本研究での成果のまとめを考慮し、国産および輸入の市販二枚貝を入手し、定性および定量解析(MPN法)を実施することによって腸炎ビブリオ汚染実態を調査した。分離された菌株については *tdh*、*trh*、および *toxR* 遺伝子の有無、血清型、耐熱性溶血毒(TDH)産生性を調べるとともに、Group specific-PCRやPFGE解析も行った。また、食品営業者を対象に魚介類取り扱いの衛

生管理についてのアンケート調査を行った。

C. 研究結果

①カッター、チョッパー、スタッファーの汚染実験の結果、一般生菌数と大腸菌群数ともに機械部位による差異が大きかった。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かった。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。接続器を確実に締めた場合、SEが付着しても表面のみの残存にとどまり菌量も少ないが、緩んでいる場合はSEの特性や液体の性状によっては接続部全体に菌液が広がり、さらに菌量も多く残存することが判明した。試料が乾燥していない状態では、拭き取り圧力を高めても、綿棒による回収菌数及び回収率は高くならなかった。ステンレス鋼表面に付着したサルモネラを綿棒による拭き取り効率と拭き取り圧力との関係については、乾燥した状態では、拭き取り圧力が高い方が綿棒による回収菌数及び回収率は高くなる傾向がみられた。TSBに懸濁添加した場合は卵黄液に懸濁添加した場合と比較して綿棒による回収菌数及び回収率ともに高い傾向がみられたが、卵黄液に懸濁添加した場合、一部の検体では100%近い回収率が得られた。SSとPLを用いた実験において、4℃では、SS、PLのいずれに対してもバイオフィーム形成能の低い菌の方が高い菌よりも多く付着したのに対し、37℃では、反対の結果が認められた。洗剤による菌の回収についても両菌株による相違が認められた。

②シミュレーション結果に基づいて、サルモネラ食中毒防止対策の経済効果を推定したところ、それぞれの費用便益比(B/C)は、コールドチェーンの導入率が30%のケースで、ワクチン接種が3.00、コールドチェーン導入が2.29、鶏卵の日付表示義務が4.61、3つの対策全体では2.93との結果を得た。

③*tdh* 陽性検体は輸入アサリ(29検体)で14%、国産アカガイ(37検体)で5%、輸入アカガイ(94検体)で18%であり、国産アオヤギ(28検体)では検出されなかった。検出された中で輸入アカガイの陽性率は国産アカガイと比較して有意に高かった。また、*tdh* 陽性腸炎ビブリオ菌数の平均値を比較したところ、輸入アサリは輸入アカガイよりも有意に高い結果であった。また腸炎ビブリオ数100 MPN/gを超える検体の割合は輸入アサリで約7割、輸入および国産アカガイ、国産アオヤギで約2割であった。*tdh* 陽性株は7検体(いずれも輸入)から分離され、世界的な流行株であり日本でも1998年をピークに大流行した血清型O3:K6が4検体から分離された。魚介類取り扱い営業者へのアンケート結果から、平成13年以降、末端食品営業におけるとくに低温管理と調理器具の使い分けに高い頻度での改善が認められた

D. 考察

肉加工食品の汚染実験により、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とから、汚染検査の対象としてはこのような構造の優先度を高くすべきことが判つ

た。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かったことから、細菌汚染の指標として有用なさらに精度の高い簡易方法を開発すべきと考えられる。

ステンレス表面における拭き取り圧力と回収菌数との関係の実験結果から、綿棒による拭き取りでステンレス板に付着した菌を回収する場合、付着した菌の乾燥状態、懸濁物質の違い、拭き取り圧力など種々の条件に影響を受けることが明らかとなった。試料が乾燥していない状況では、拭き取り圧力を高めても回収率が高くなるとは限らず、さらに回収方法を検討する必要があるが、1検体を除いて生残菌数の90%以上を回収することが可能であり、拭き取りは有効な菌の回収方法であると考えられる。乾燥状態では、菌の回収率は低かったが、圧力が高い方が回収率が高い傾向であった。

SSあるいはPLに4℃または37℃で付着したSEは、バイオフィーム形成能の有無によって器材からの洗浄効果に差が現われることが示唆された。しかし、市販の洗剤(FF)を最終濃度0.1%で用いることにより、いずれの菌も温度条件や器材の種類に関係なく、高い洗浄効果を得ることができるものと期待される。

経済効果の研究では、サルモネラ食中毒患者数、死亡者数の減少が全て3つの対策のみによる効果であると仮定しており、他の要因は考慮されていない。例えば、3つの対策の他にも、飲食店、旅館・ホテル等において、朝食に生卵を出さない等の個別的取組みが行われている。また、鶏卵の消費量の減少や、鶏卵の生食量の減少といっ

た食生活の多様化や食習慣の変化もみられる。このため、3つの対策の便益は過大評価されている可能性がある。しかし、個別対策のCBRは最低でも2.29であったため、過大評価されているとしても、3つの対策の社会経済的な実施妥当性は認められ得るといえる。

魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態調査結果から、腸炎ビブリオ汚染は平成13年(2001年)の調査での国内産魚介類の腸炎ビブリオ陽性率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。また、依然として*tdh*陽性腸炎ビブリオを含む腸炎ビブリオの魚介類への汚染は認められ、腸炎ビ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魚介類の腸炎ビブリオ汚染率の減少に帰することはできない。また、平成8年(1996年)から10年(1998年)にかけての海水温の上昇は、沿岸海水の腸炎ビブリオ増殖、その結果として食中毒増加の一因であったことは否めないが、その後の食中毒減少は海水温の変化によるものではないといえる。しかし、アンケート調査の結果および冷蔵工場の総冷蔵能力の年次変化の統計データより、流通末端と消費段階での魚介類取り扱いの衛生的改善が食中毒減少に大きく貢献したものと考えられる。

E. 結論

本研究の結果、機械の衛生管理の監視のための細菌汚染検査を行う場合に優先度の高い構造として溝を有する構造が浮き彫りにされた。検査方法としては依然として培養法から成る菌数測定を主体とした方法に

頼らざるを得ず、それに替わる簡易方法の開発が望まれる。平面の拭き取り検査の効率は拭き取り圧力によって異なることが実証され、とくに乾燥した表面についてはある程度以上の拭き取り圧力を用いるべきことが判明した。パイプ接続部の汚染実験から、接続部の締めつけの重要性が確認され、作業終了時は部品に分けて洗浄・消毒を実施しなければならないことが再確認された。

日付表示義務およびコールドチェーンの導入に係る社会的費用の推定方法を見直すとともに、ワクチン接種を含む3つのサルモネラ汚染防止対策それぞれの社会的費用の推定を行った。コールドチェーンについては導入率が不確実なため、30%をベースケースとして、20%、10%の値を設定した感度分析を実施した。また、3つの対策全体の社会的便益を、サルモネラ食中毒患者減少便益およびサルモネラ食中毒死亡者減少便益として推定した。3つの各対策の個別便益を推定する手法については、ベースケースおよび対策シナリオにおける殻付き卵の保管・流通時間や温度等に関する設定値の見直しを行い、これに基づいて個別便益を推定した。その結果、3つの個別対策の社会経済的な実施妥当性が検証され、そのうち日付表示が最も効率的であることが検証された。

腸炎ビブリオ食中毒は、平成10年(1998年)までに急増し食中毒防止対策がとられた。その後、平成21年(2009年)までこれまでにない減少カーブを描き患者数が約1/40、事件数の約1/60に減少し食中毒統計上の最低レベルを維持している。この激減は、この間の海水温や気温など

の環境要因の変化、魚介類の消費量の変化によっては説明できない。しかし、現在でも他の血清型の *tdh* 陽性腸炎ビブリオは魚介類から分離され、*tdh* 陽性検体率も以前と変わらないにもかかわらず、これら血清型菌による食中毒発生も起こっていないこと、PFGE 解析で pandemic 株の腸炎ビブリオが流行した平成 10 年（1998 年）前後に分離された株がまだに国内にも生息し輸入食品としても国内に存在しており、腸炎ビブリオ食中毒が非常に減少した現在も食中毒を起こしていることなどから、流通末端と消費段階での魚介類取り扱いの衛生的改善が食中毒減少に大きく貢献したことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ruriko Iibuchi, Yukiko Hara-Kudo,
Akio Hasegawa and Susumu Kumagai.
Survival of *Salmonella* on Plastic
Surface under Dry Condition in
Relation to Biofilm Formation
Ability. Journal of Food Protection.
(2010) 印刷中

2. 学会発表

大友良光、杉山寛治、齋藤志保子、大塚佳代子、八尋俊輔、山中葉子、山崎省吾、田中廣行、川村美佐子、中川 弘、小沼博隆、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 腸炎ビブリオの魚介類汚染状況と TDH 陽性株の解析. 日本食品衛生学会第 98 回学術講演会. 平成 21 年 10 月. 函館.

矢部美穂、山崎省吾、大塚佳代子、杉山寛治、齋藤志保子、八尋俊輔、大友良光、山中葉子、田中廣行、中川 弘、小沼博隆、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 国内産のアジ及びアサリにおける腸炎ビブリオの汚染調査. 第 30 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 21 年 10 月. 東京.

八尋俊輔、山中葉子、齋藤志保子、大塚佳代子、大友良光、杉山寛治、山崎省吾、田中廣行、中川 弘、小沼博隆、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 国内産のアジ、アサリにおける腸炎ビブリオおよび TDH 産生株の分離状況. 第 13 回腸炎ビブリオシンポジウム. 平成 21 年 11 月. 岡山

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

平成21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）

（分担研究報告書）

機器の衛生管理に関する研究

－食肉加工機械の汚染実験－

研究分担者 熊谷 進

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）

研究要旨

機器自体の構造や機能との関係における汚染と洗浄のし易さについての知見を得るために、前年度に引き続き複雑な構造をもつ食肉加工機械について、汚染実験を行った。室温に放置し品質劣化させた豚肉を、カッター、チョッパー、スタッパーで順次処理した後に、各機械の諸部位を拭き取った綿棒を強く攪拌したバッファーについて、一般生菌数、大腸菌群数、ATP 値を測定することによって汚染程度を調べた。各機械を洗浄した後も同様に汚染程度を調べた。その結果、一般生菌数と大腸菌群数ともに機械部位による差異が大きかった。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かった。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。

A. 研究目的

食品製造加工に用いられる機器の衛生管理の監視の要点を求めるためには、部品のみならず、機器自体の構造や機能との関係における汚染と洗浄のし易さについての知見を得る必要がある。この点を究明するために、今年度から次年度にかけて、とくに複雑な構造をもつ食肉加工機械について、汚染実験を行うこととした。

B. 研究方法

1) 使用機械

カッター、チョッパー、スタッパーを用いた。

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

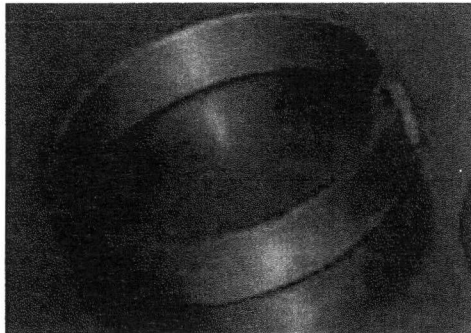
ペトリフィルム（住友スリーエム製、一般生菌数用、大腸菌群用）、ルミテスター110（キッコマン製）、ルシフェールHSセット（キッコマン製）、ルシフェールCT150（キッコマン製）

4) 拭き取り手順

上記放置した市販豚薄切り肉・約 10 kg 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パーに充填し処理した。処理後に綿棒で下記写真に示した各部位を拭取り（表 1）、その後各機械を分解し、部品を 30 秒間 40℃ の温水に漬けた。温水から引き上げた部分は軽く水切りをした後に、先の拭取り場所に隣接した部位を綿棒で拭取った。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取り場所に隣接した部位を綿棒で拭取った。5) 検査手順

拭き取り綿棒の先をリン酸バッファ

チョッパー拭取り部分



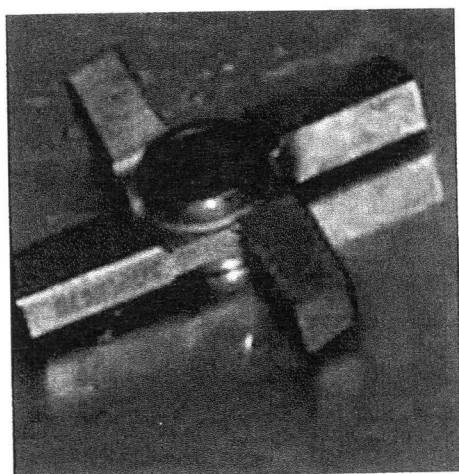
チョッパーリングの上面を拭取り

ー (pH 6.8) 5 ml 中に浸し、強く攪拌してから、10 段階希釈液を作成し、各液 1 ml をペトリフィルムに滴下した後に、同フィルムを 37℃ 一晚培養し、コロニー数を計測した。また、培養前の同じ液 1 ml を ATP 測定に供した。供試した豚肉の菌数は、25 g 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の面積で補正し、CFU/mm²/ml バッファで表した。ATP 測定値はルシフェール値/ml で表し、その値との対応を図示するためには上記培養法で測定した菌数も CFU/ml で表した。



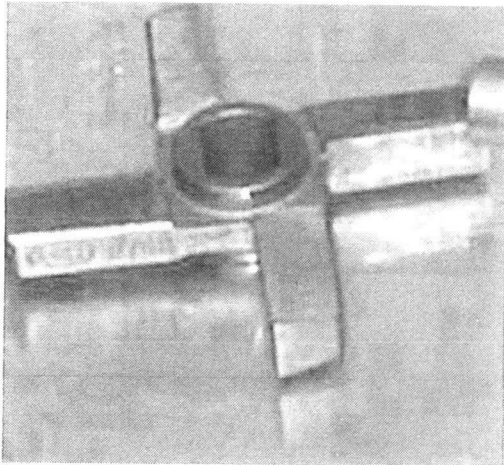
プレートの穴を両面から綿棒を挿入して拭取り



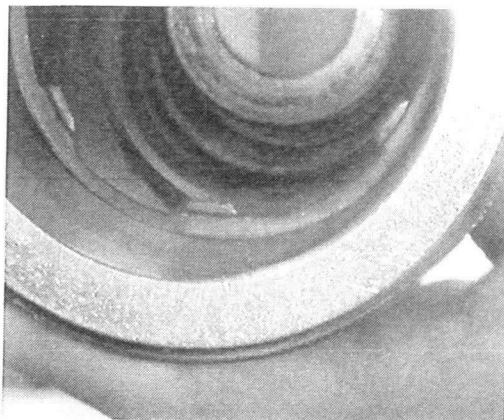
十字ナイフの刃部および付け根の溝部を拭取り



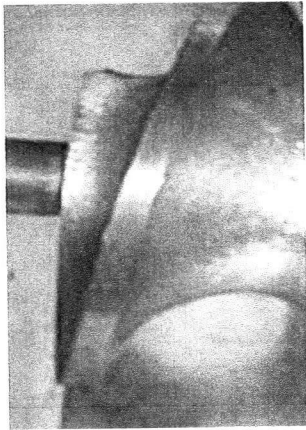
プレートのを穴を両面から綿棒を挿入して拭取り



十字ナイフの刃部および付け根の溝部を拭取り

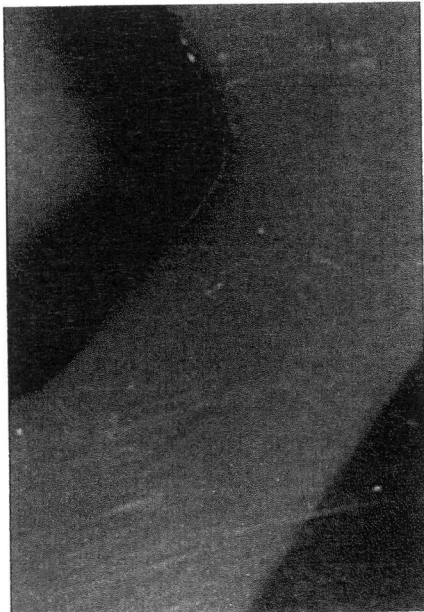


ノックピン（筒部）内面を拭取り

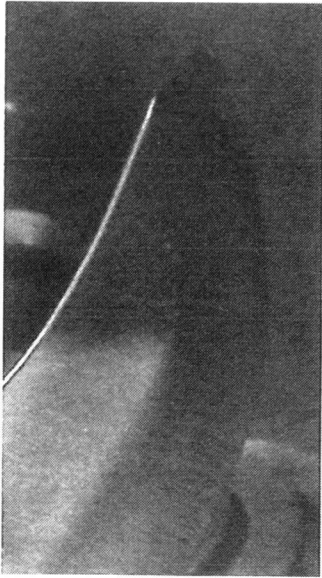


ロール先端付近を拭取り

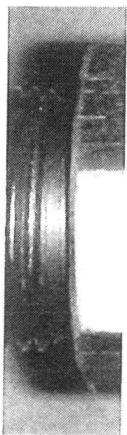
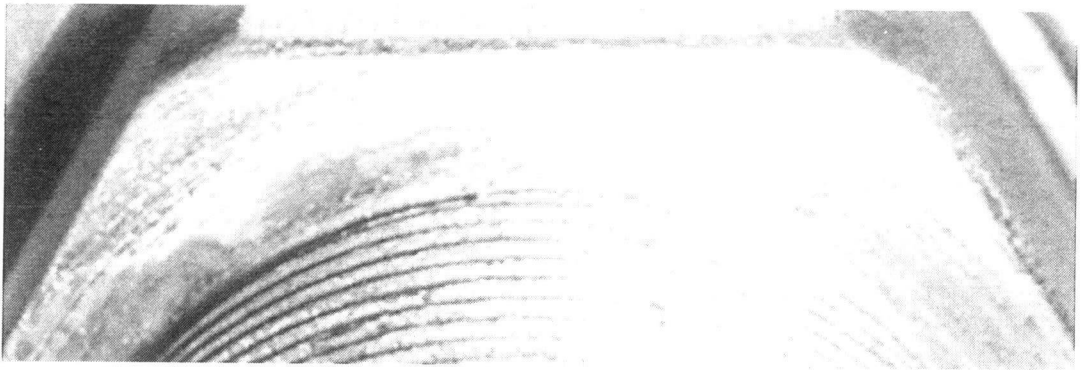
カッター拭取り部分



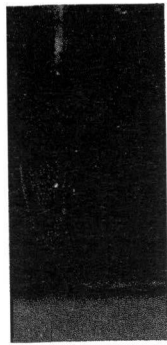
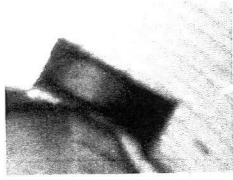
カッターの刃



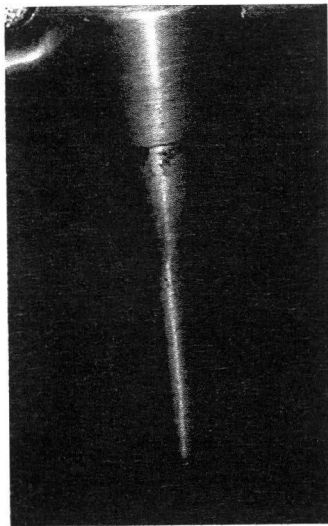
カッターの刃



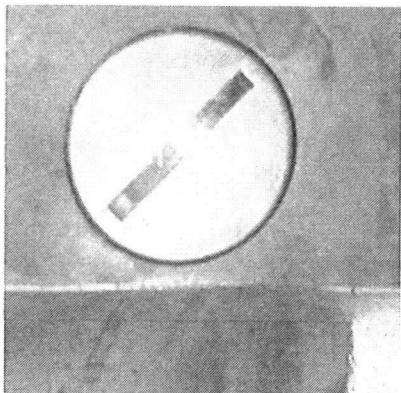
カッターのシャフトのボルトの起始部角を拭取り



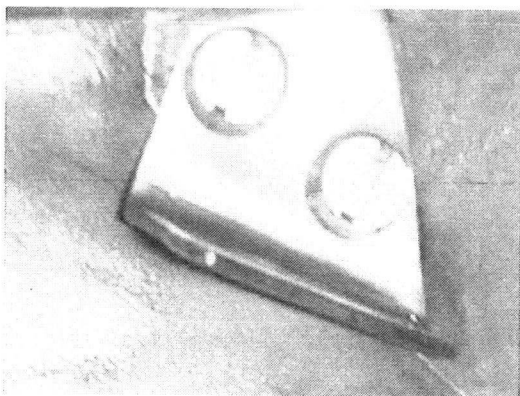
カッターのシャフトの溝を拭取り



カッターの温度センサー側面を拭取り



カッターの蓋にあるネジ溝を拭取り



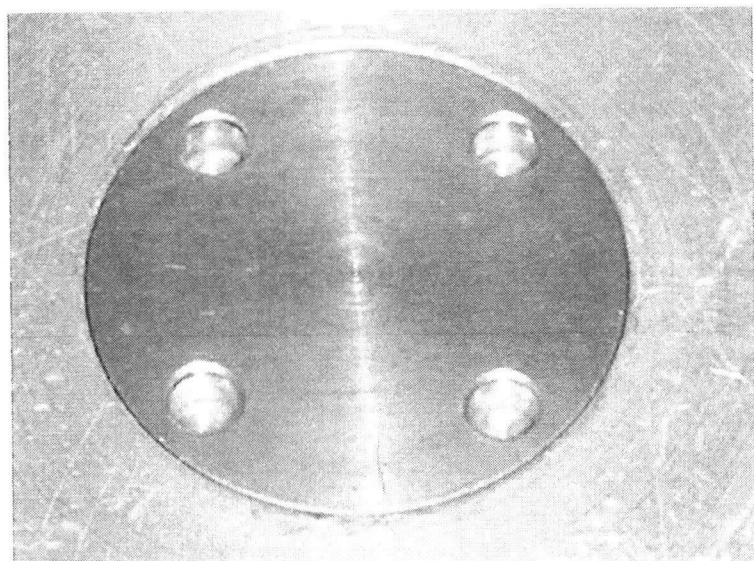
カッターの蓋にあるボルト溝を拭取り



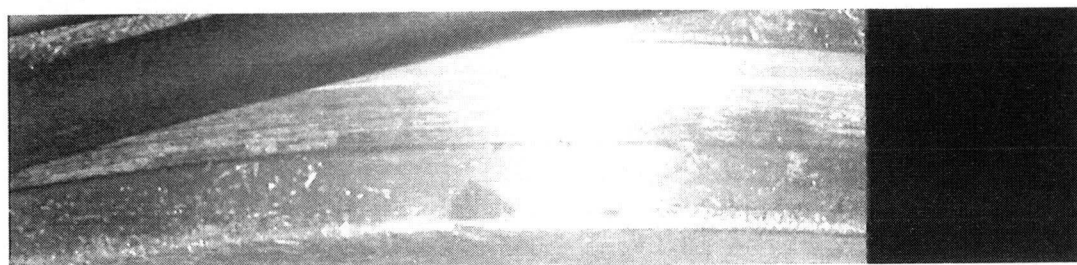
カッターの蓋の曲がり部



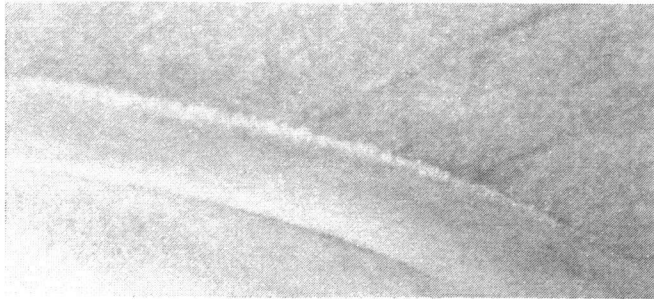
カッターの皿の湾曲面



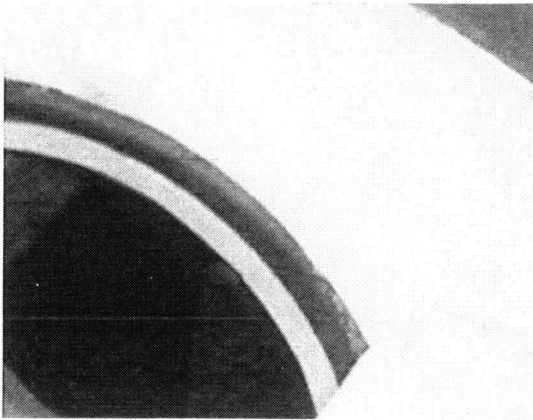
スタッファーの底面にある穴（閉鎖）を拭取り



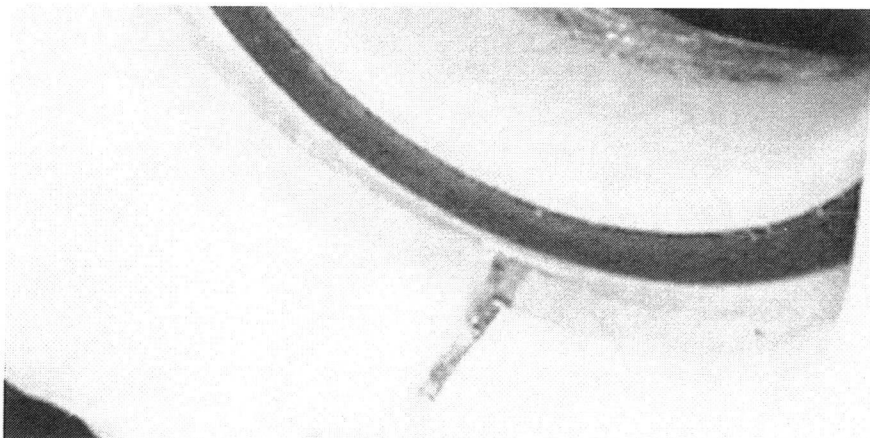
スタッファーの底面リングを外し、溝凹面を拭取り



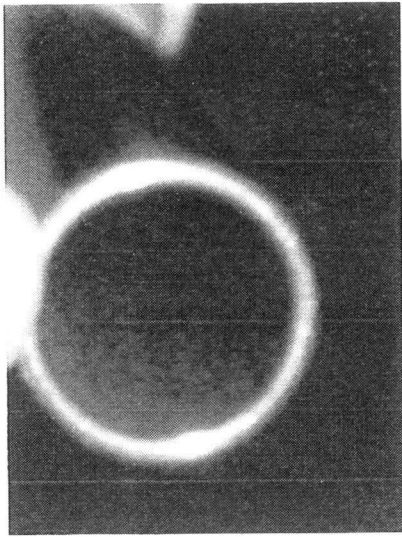
スタッファー裏蓋の裏湾曲面を拭取り



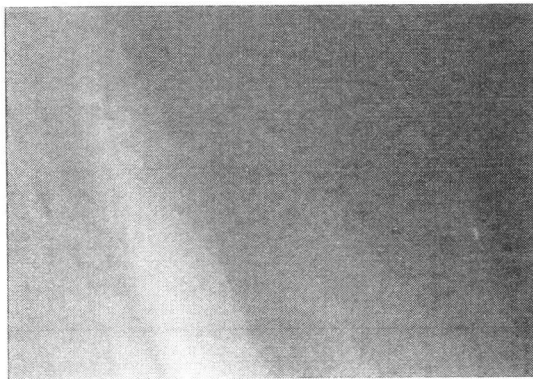
スタッファーノズルのリング部をリングをつけたまま拭取り



スタッファーノズルのリング部にある溝を拭取り



スタッファーノズルの内側面を拭取り



スタッファーの内側湾曲面を拭取り

表1. 拭き取り箇所数

拭取り箇所	カッター	チョッパー	スタッファー
処理後拭取り	9ヶ所	11ヶ所	8ヶ所
洗浄(40℃湯漬け30秒間1回)後拭取り	9ヶ所	11ヶ所	8ヶ所
完全洗浄して乾燥後拭取り	9ヶ所	11ヶ所	8ヶ所
合計	84ヶ所		