

図1. 拭き取り試料処理手順

拭き取り済み綿棒 → リン酸バッファー5 ml に振り出し (ボルテックスで)

10段階希釈

肉処理後 3段階 (原液—1 / 100)

湯浸け後 1段階 (穴、溝、オーリングについては3段階)

完全洗浄乾燥後 1段階

↓
ペトリフィルム (SPC、大腸菌群) に滴下

↓
培養

↓
計測

↓
ATP キット綿棒を1秒漬ける

↓
キットに戻して処理

↓
発色測定

表2. 拭き取り箇所

拭き取り箇所	チヨツパー	
リング1/4	A	1
穴3つ		2
表面1/4		3
刃両面1個		4
刃みぞ両面		5
穴一つ		6
表面1/4		7
刃両面1個		8
刃みぞ両面		9
スクリューのぎす巾		10
内面右1/4		11
	カッター	
刃1cm	B	1
でっぱり		2
ボルトのみぞ部分		3
ボルトの角部分		4
センサー		5
ネジ頭(大)		6
ネジ頭(小)		7
凹み ノギス巾		8
内壁		9
	スタッパー	
穴一つ	C	1
床溝1/4		2
蓋L字角		3
オーリング		4
溝半分		5
ノズル内面		6
壁面		7
本体上面?1/4		8

C. 結果と考察

前年度結果と異なり部位別の差異は小さいとはいえ、一般生菌数と大腸菌群数ともに機械部位による差異が認められた(表4)。ルミテスター110を用いたATP測定キットの測定感度は、前年度用いたルミテスターPD-10Nの測定感度よりも高く、汚染度評価における感度の点では培養法による菌の検出の代替法として耐え得るものと考えられた。しかし、培養法による菌数とATP測定値との間の相関は低く、定量的評価には難があることが示唆された。したがって、結果を得るまでに20時間程度かかるという欠点はあるが、現状では汚染度を定量的に評価するために、従来法である培養法を用いるべきものと考えられる。菌数を反映する何らかの簡易検査方法の開発が待たれる。

機械の部位別汚染度は平成20年度と必ずしも一致しない成績が得られたが、両年度の成績を総合すると(表5)、肉処理直後には、チョッパーについては両刃の溝について、プレートの穴と表面、スクリュウのノックピン内表面の順に汚染度が高いこと、洗浄後にもノックピン内表面以外は汚染が残り易いことが判明した。

カッターについては、刃、ネジ頭、ついでボルトの溝と始部角、蓋湾曲部表面に肉処理直後の汚染度が高いこと、洗浄後にはネジ頭、ボルトの溝と始部角に汚染が残り易いことが判った。スタッファーについては、底面の穴凹み部、床の溝部、オーリング(装着したまま)、ノズル

リング部の溝部に肉処理直後の汚染度が高いこと、洗浄後には穴とオーリングに汚染が残り易いことが判った。

以上の成績から、食材に直接接触する機械の汚染度評価のためには、食材への密着性の高いと考えられる部位および溝を含む部位に代表される汚染を受け易い部位の拭き取り検査、さらに洗浄後の汚染度評価に限定する場合には溝を含む部位をそれぞれ優先すべきであると考えられ、解放系の食品加工製造機器の衛生管理状態の評価または監視に用い得る方法であろうと考えられた。また閉鎖系についても分解後の汚染度評価には有用なものと考えられるが、分解できない部品の検査にはEHEDGが用いている検査方法以外に、さらに新たな検査方法を開発することが必要である。EHEDGによる現行の検査方法で対応できない機械は、分解できず、かつ、機械内部に充填した寒天を回収することができない壺型に代表される機械またはその部品についての検査であり、特にこうした構造物の検査方法の開発が必要である。

D. 結論

食材に直接接触する機械の汚染度評価のためには、食材への密着性の高いと考えられる部位および溝を含む部位に代表される汚染を受け易い部位の拭き取り検査、さらに洗浄後の汚染度評価に限定する場合には溝を含む部位をそれぞれ優先すべきであると考えられ、解放系の食品加工製造機器の衛生管理状態の評価ま

たは監視に用い得る方法であろうと考えられた。また閉鎖系についても分解後の汚染度評価には有用なものと考えられるが、分解できず、かつ、機械内部に充填した寒天を回収することができない壺型に代表される機械またはその部品については、検査方法の開発が今後必要である。また、現状では汚染度を定量的に評価するため、従来法である培養法を用いるべきものと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表3. 平成20年度結果(参考)

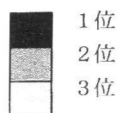
一般生菌数(CFU/mm2/ml)				大腸菌群数(CFU/mm2/ml)					
チヨッパ-処理		湯漬け後	完全洗浄後(y)	チヨッパ-処理		湯漬け後	完全洗浄後(y)		
理	処理後(x)			理	処理後(x)				
A	1	165.29	33.06	0.00	A	1	121.21	14.33	0
	2	16026.71	51.75	1.38		2	11686.14	25.13	0
	3	2269.78	40.21	0.01		3	1388.35	12.97	0
	4	119.37	3.34	0.00		4	43.95	0.23	0
	5	137799.04	497.61	0.05		5	32918.68	192.34	0
	6	8207.34	12.20	0.14		6	2948.16	0.40	0
	7	19.93	1.86	0.01		7	4.86	0.05	0
	8	233.32	61.31	0.00		8	119.37	17.09	0
	9	64.11	2.87	0.06		9	28.71	0.23	0
	10	4436.36	80.00	0.00		10	1530.91	2.40	0
	11	167.08	92.82	0.00		11	123.14	26.92	0
カッター処理		処理後	湯漬け後	完全洗浄後	カッター処理		処理後	湯漬け後	完全洗浄後
B	1	3148.15	0.22	0.00	B	1	1051.85	0.00	0.00
	2	254.55	0.06	0.00		2	102.18	0.00	0.00
	3	1.10	1656.44	0.01		3	0.33	128.83	0.00
	4	79734.22	0.21	276.41		4	3508.31	0.01	90.37
	5	-	24.91	-		5	-	10.83	-
	6	-	1.27	-		6	-	0.58	-
	7	474074.07	962.96	0.11		7	207407.41	266.67	0.00
	8	64000.00	1.02	0.01		8	20363.64	0.07	0.00
	9	1200.00	0.06	0.00		9	549.09	0.01	0.00
スタッフ-処理		処理後	湯漬け後	完全洗浄後	スタッフ-処理		処理後	湯漬け後	完全洗浄後
C	1	1273.41	280.90	3.86	C	1	1198.50	119.85	0.34
	2	33864.21	3671.42	0.00		2	4694.05	511.32	0.00
	3	9818.18	2.07	0.01		3	2254.55	0.05	7.64
	4	41718.82	2.86	15.02		4	12015.02	0.35	0.00
	5	26151.39	2731.37	-		5	3486.85	499.78	-
	6	-	2101.91	-		6	-	369.43	-
	7	0.02	0.06	0.00		7	0.00	0.00	0.00
	8	199.29	224.20	0.12		8	89.68	69.75	0.04

表 4. 平成 21 年度結果

一般生菌数 (CFU/mm2/ml)				大腸菌群数 (CFU/mm2/ml)					
チヨッパ-処理	処理後	湯漬け後	完全洗浄後	チヨッパ-処理	処理後	湯漬け後	完全洗浄後		
A	1	4190	4180	0.165	A	1	440	253	0.055
	2	4010	1020	10.6		2	97.3	41.7	0
	3	9400	3080	0.486		3	97.3	227	0.065
	4	2280	789	15		4	21.7	3.53	0
	5	6120	11800	15		5	95.7	670	0
	6	4320	7780	54		6	54	745	0.22
	7	1650	820	0.097		7	21.1	486	0
	8	18400	263	0		8	515	16.3	0
	9	2780	5220	10.5		9	105	402	0
	10	800	333	0.2		10	23.6	23.6	0
	11	7490	7150	0.093		11	217	164	0
カッター処理				カッター処理					
B	1	18100	2440	0.37	B	1	259	55.6	0
	2	600	115	0		2	25.5	4.55	0
	3	644	1930	3.34		3	21.5	61.3	0
	4	199	47.2	33.2		4	6.64	0.73	0
	5	-	6880	-		5	-	303	-
	6	-	43.6	-		6	-	2.00	-
	7	9440	26500	88.9		7	185	1480	0
	8	1960	920	0.036		8	218	27.3	0
	9	1820	14.4	0.036		9	109	0.91	0
スタッファ-処理				スタッファ-処理					
C	1	37500	4230	0.38	C	1	3750	37.5	0
	2	18000	2180	0.012		2	838	58.7	0
	3	6000	10400	0.4		3	364	436	0
	4	9600	542	16.6		4	834	18.8	0.021
	5	494	56.1	-		5	16	2.91	-
	6	-	14000	-		6	-	955	-
	7	164	0.76	0		7	14.5	0.036	0
	8	4190	243	0.019		8	156	13.7	0

表5. 各年度試行における菌数の高い箇所（上位3-4位）

拭き取り箇所	一般生菌数(CFU/mm2/ml)				大腸菌群数(CFU/mm2/ml)			
	チョッパー	処理後	湯漬後	完全洗浄後	チョッパー	処理後	湯漬後	完全洗浄後
リング1/4	A	1						
プレート穴3つ		2						
同表面1/4		3						
刃両面1個		4						
刃みぞ両面		5						
穴一つ		6						
表面1/4		7						
刃両面1個		8						
刃みぞ両面		9						
スクリーンのぎす巾		10						
内面右1/4		11						
	カッター	処理後	湯漬後	完全洗浄後	カッター	処理後	湯漬後	完全洗浄後
刃1cm	B	1						
でっぱり		2						
ボルトのみぞ部分		3						
ボルトの角部分		4						
センサー		5						
ネジ頭(大)		6						
ネジ頭(小)		7						
凹み ノギス巾		8						
内壁		9						
	スタッパー	処理後	湯漬後	完全洗浄後	スタッパー	処理後	湯漬後	完全洗浄後
穴一つ	C	1						
床溝1/4		2						
蓋L字角		3						
オーリング		4						
溝半分		5						
ノズル内面		6						
壁面		7						
本体上面1/4		8						



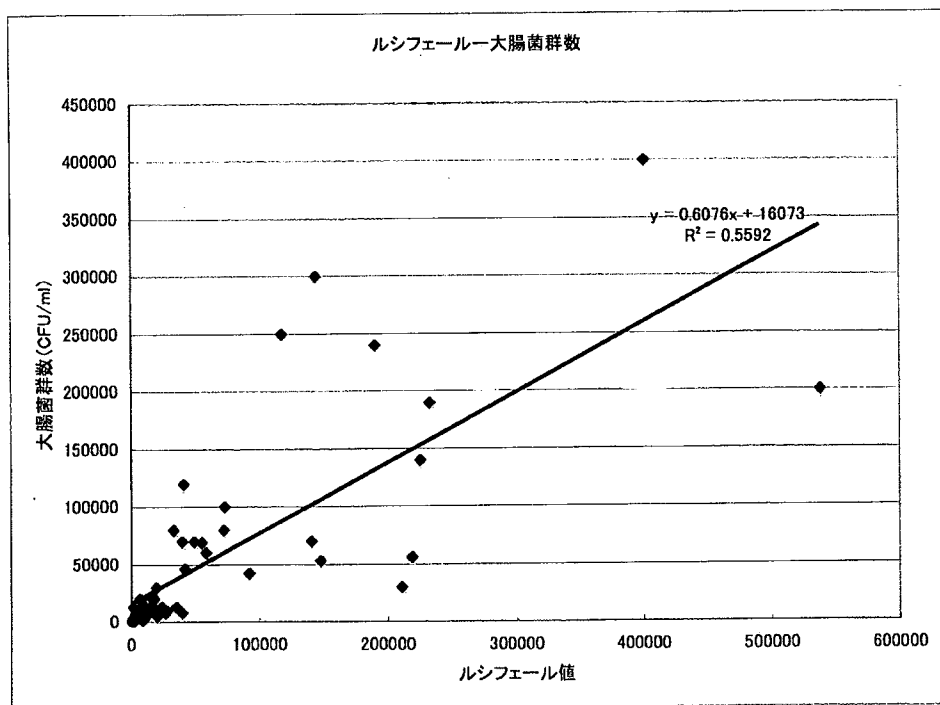
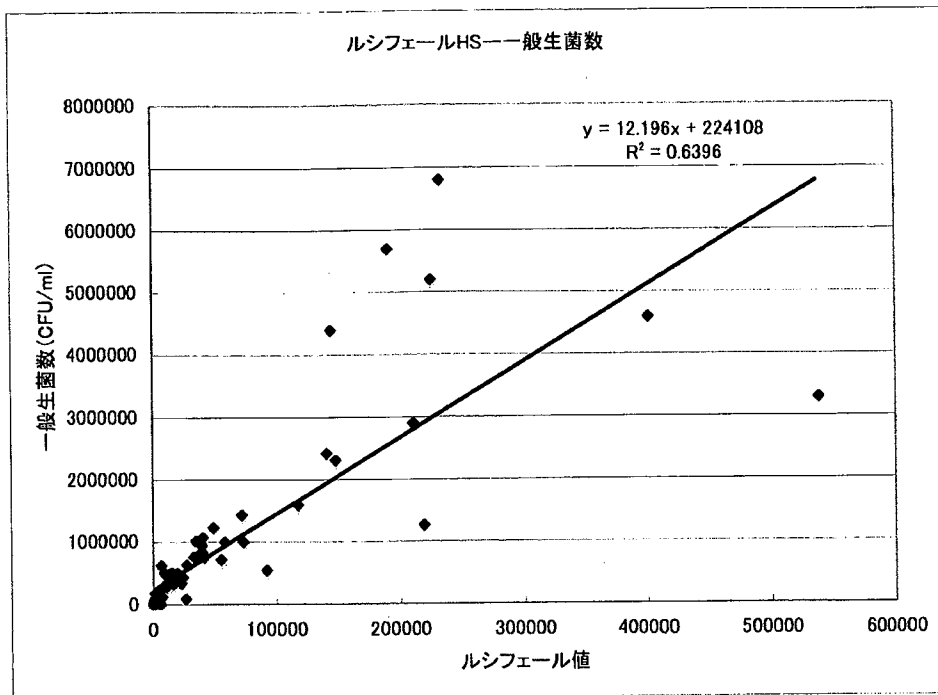


図2. ルシフェール値と培養法で測定した一般生菌数または大腸菌群数との関係

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

食品の製造加工機器の衛生管理に関する研究
協力研究項目：パイプの接続器の微生物漏出等

研究協力者 森田幸雄、古茂田恵美子 東京家政大学栄養学科
分担研究者 熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨

食品製造器具が細菌に汚染された場合を想定して、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検討した。パイプ接続器のネジを締め付け回転毎（15回転～11回転）の接合部に *Salmonella* Enteritidis（菌株番号 64：バイオフィーム高生産性菌株）培養卵黄液および同菌株培養トリプトソイブイオン（各々約接種菌量 10^8 cfu/100 μ l）を 100 μ l ずつ接種し、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 菌数を確認した。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。よって、接続部は稼働時には確実に締め、また、作業終了時は部品に分け、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。また、喫食に用いる用具（箸）の不適切な利用等による食中毒リスクを把握するための基礎実験を実施した。箸が細菌汚染している場合、箸で肉を挟んだ時は約 50% の菌が肉に移行すること、および、箸でレタスを挟んだ時は約 40% の菌がレタスに移行することが判明した。さらに、肉が汚染している場合、その肉を箸で挟んだ時は箸には約 9% の菌が移行し、さらにその箸でレタスを挟んだ場合、レタスには肉の約 3% の細菌が移行することが判明した。箸が汚染している場合、細菌は容易に食材に移行することが確認された。食品製造器具や喫食に用いる用具等の不適切な取扱によって食中毒発生危害が増大することから、これらの器具の適切な取扱や使用が求められる。

A. 研究目的

食品の製造加工に用いられる機器については、ISO や JIS などの規格があり、それらの中には洗浄効果等の衛生要件を考慮したものがあるが、食中毒細菌防止のための具体的な要件については不明である。また、食品衛生法、と畜場法等、食品衛生に関する関連法令は

一般的な記述にとどまっており、具体性に欠けている。さらに、HACCP による衛生管理の前提としての一般的衛生管理計画の中においても、機械器具については、保守点検作業のみがとりあげられているにすぎず、食中毒防止の観点から、機械・器具が備えるべき条件や衛生管理上、または食品衛生監視の上での監視点が不明である。

そこで、食品製造器具が細菌に汚染

された場合を想定して、パイプの接続部の締め付け具合による細菌の漏出の程度を検討した。さらに、日本人が喫食の際に日常的に使用する箸の細菌汚染等についても検討した。

B. 研究方法

1. パイプの接続器の微生物の漏出

パイプ接続器の準備・菌接種方法：パイプ接続器のネジを28N・m圧で締めた場合を15回転とし、それから、ひとまわりずつ緩め、14回転、13回転、12回転、11回転した。このパイプ接続器の接合部に *Salmonella* Enteritidis (以下「SE」と略) (菌株番号64：バイオフィーム高生産性菌株) を一白金耳接種後一夜培養した卵黄液および同様に作製したトリプトソイブイオン (各々約接種菌量 10^8 cfu/100 μ l) を100 μ lずつ接合部に接種 (写真1、写真2) した。その後、プラスチック容器に入れ密封して (写真3)、室温 (15~20 $^{\circ}$ C) にて24時間放置した。

パイプ接続器の菌の汚染確認方法：接続器を解体して左右の接続金属部はクロモアーガーサルモネラ培地に5分間接地した後に取り除く、いわゆるスタンプ法によって接種し、その後、24時間、37 $^{\circ}$ C培養を実施し、分離培地上のSE集落を確認した。

2. 調理器具による食品への細菌の汚染

未加熱の肉を箸で接触後、その箸をサラダ等、生で食する食べ物の摂取に使用すること等、箸の不適切な使用によって食中毒が発生する可能性がある。そこで、調理用具の不適切な利用

による食中毒リスクを把握するため次の2つの基礎実験を実施した。

1) 約 10^7 cfu/ml 濃度の SE (菌株番号64：バイオフィーム高生産性菌株) に箸を1分間浸したのち、30秒間菌液を落とし、豚肉バラスライス (5cm \times 3cm:約15cm 2) またはレタス (約3 \times 3cm、3枚) を、その箸で20秒間挟み、豚肉またはレタスに移行するSE量を算出した。

2) 約 10^7 cfu/ml 濃度の SE (菌株番号64：バイオフィーム高生産性菌株) に豚肉バラスライス (5cm \times 3cm:約15cm 2) を30秒間浸したのち、30秒間菌液を落とし、滅菌容器に静置した。SEで汚染した肉を箸で20秒間挟んだのちに、その箸でレタス (約3 \times 3cm、3枚) を20秒間挟み、肉およびレタスに移行するSE量を算出した。

C. 研究結果

1. パイプの接続器の微生物の漏出

1) サルモネラ含有卵黄液の場合 (写真4)：パイプの接続器を確実に締めた場合 (15回転：28N・m圧) においてもSEは接種部分のみならず周囲の半分程度に広がっていた。緩めた場合 (12回転、11回転) SEは接続部全周囲に広がっていた。接続器が緩むと菌液は接続部分の深部に浸入し、また、卵黄液とSE菌株番号64のバイオフィーム高生産性株の組に合わせによっては接続部分の深部に浸入した菌は多量に生存することが判明した。

2) サルモネラ含有トリプトソイブイオンの場合 (写真5)：パイプの接続器を確実に締めた場合 (15回転：28N・m

圧)でも、緩めた場合(12回転、11回転)においても菌量は少なかった。トリプトソイブイオンとSE菌株番号64のバイオフィーム高生産性株の組に合わせでは、少ない菌量のSEが生存することが判明した。

2. 調理器具による食品への細菌の汚染

1) 約 10^7 cfu/ml濃度のSEに箸を1分間浸したのち、30秒間菌液を落とした場合、約 4.0×10^4 cfu(対数平均値 $\text{mean} \pm \text{SE} : 4.6 \pm 0.1$ cfu)のSEが箸に付着し、この箸で豚肉バラスライスまたはレタスを20秒間挟んだ場合、豚肉からは約 2.0×10^4 cfu(対数平均値: 4.3 ± 0.1 cfu)[箸の菌量の約50%]、レタスからは約 1.6×10^4 cfu(対数平均値: 4.2 ± 0.1 cfu)[箸の菌量の約40%]が検出されることが判明した(写真6)。

2) 約 10^7 cfu/ml濃度のSEに豚肉バラスライスを30秒間浸した後、30秒間菌液を落としたものは約 2.5×10^5 cfu(5.4 ± 0.1 cfu)のSEが豚肉表面に付着し、SEで汚染した肉を20秒間挟んだ箸は約 2.2×10^4 cfu(対数平均値: 4.3 ± 0.0 cfu)[肉の菌量の約9%]の汚染があり、その箸でレタスを20秒間挟んだ場合は、約 8.0×10^3 cfu(対数平均値: 3.9 ± 0.0 cfu)[肉の菌量の約3%]のSEがレタスに移行した(写真7)。

D. 考察

1. パイプの接続器の微生物の漏出

接続器は確実に締めた場合、菌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、緩んだ場合、細菌の

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。よって、接続部は稼働時には確実に締め、また、作業終了時は部品に分け、消毒を実施しなければならないことが再確認された。

2. 調理器具による食品への細菌の汚染

箸が細菌汚染している場合、肉を箸で挟んだ時は約50%の菌が肉に移行すること、および、レタスを箸で挟んだ時は約40%の菌がレタスに移行することが判明した。さらに、肉が細菌汚染している場合、その肉を箸で挟んだ時、箸には約9%の菌が移行し、さらにその箸でレタスを挟んだ場合、レタスには肉の約3%の細菌が移行することが判明した。箸が汚染している場合、細菌は容易に食材に移行すること、細菌汚染がある豚肉を箸で挟み、さらに、その箸で食材を挟むことによっても容易に細菌は食材に移行することが確認された。

E. 結論

1. パイプの接続部は稼働時には確実に締め、また、作業終了時は各部品に分け、消毒を実施しなければならないことが再確認された。食品製造に用いる器具の不適切な取扱によって食中毒発生危害が増大することが判明した。

2. 喫食に用いる用具(箸)の不適切な取扱によって食中毒発生危害が増大することが判明した。

3. 今回の調査を含め、科学的な成績を基に食品製造者や消費者に食中毒防止

のための適正な取り扱いを啓発しなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

本研究をまとめるにあたり、協力を

いただいた東京家政大学食品衛生学第二研究室員（中川恵梨子、古川智春、大野美樹、佐藤美知、長沼絵梨花、西橋 彩、石山結加里、下柊棚美郷）に深謝する。

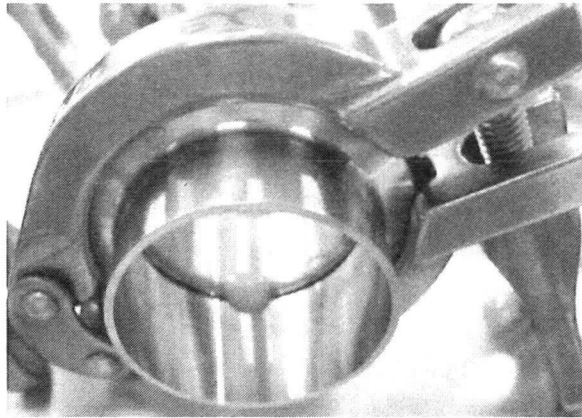


写真1 パイプ接続部にパイプ接続器の接合部にSE(菌株番号64)卵黄増菌液(接種菌量約 10^8 cfu/100 μ l)を100 μ lずつ接種

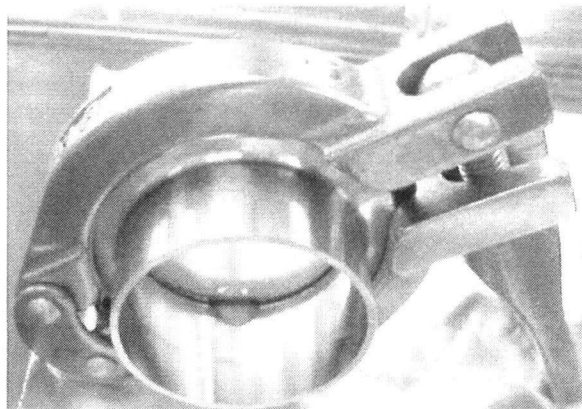


写真2 パイプ接続部にパイプ接続器の接合部にSE(菌株番号64)トリプトソイブイオン増菌液(接種菌量約 10^8 cfu/100 μ l)を100 μ lずつ接種

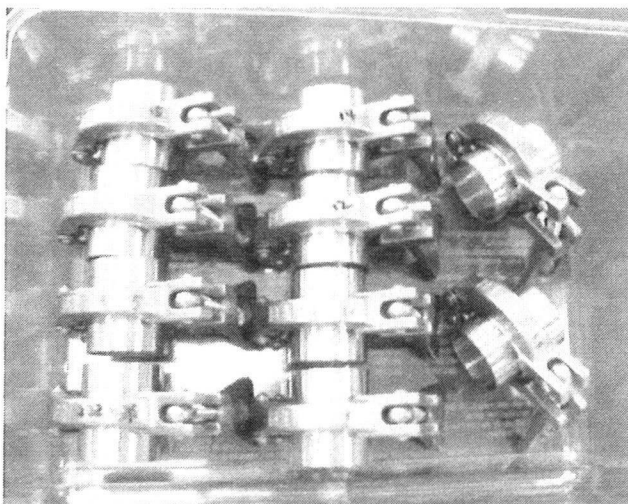


写真3 乾燥を防ぐためにプラスチック容器に入れ、密封し、室温にて24時間放置

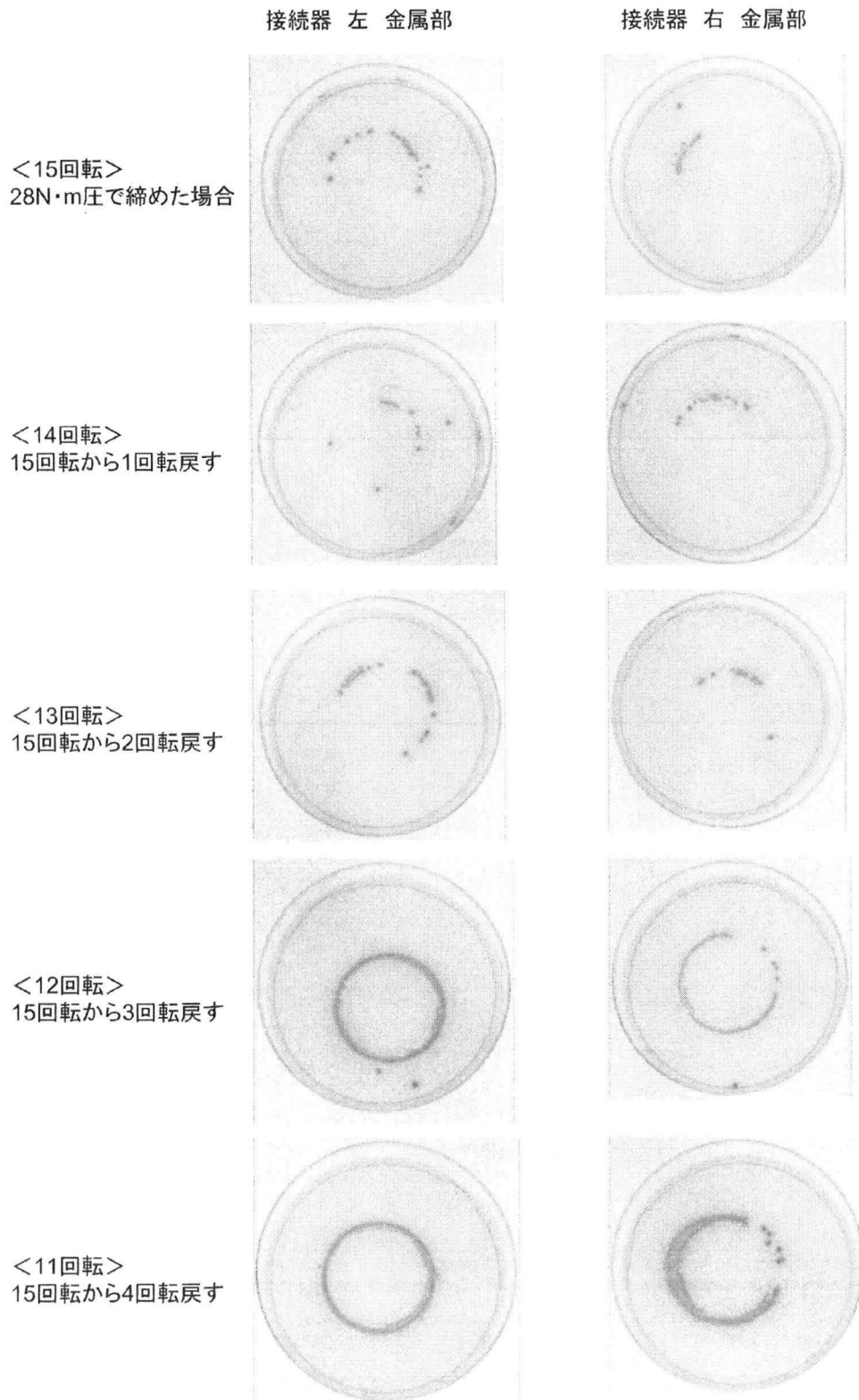


写真4 SE(菌株番号64)含有卵黄液を接続部に接種後、室温にて24時間放置したものの接続器のサルモネラ分離状況

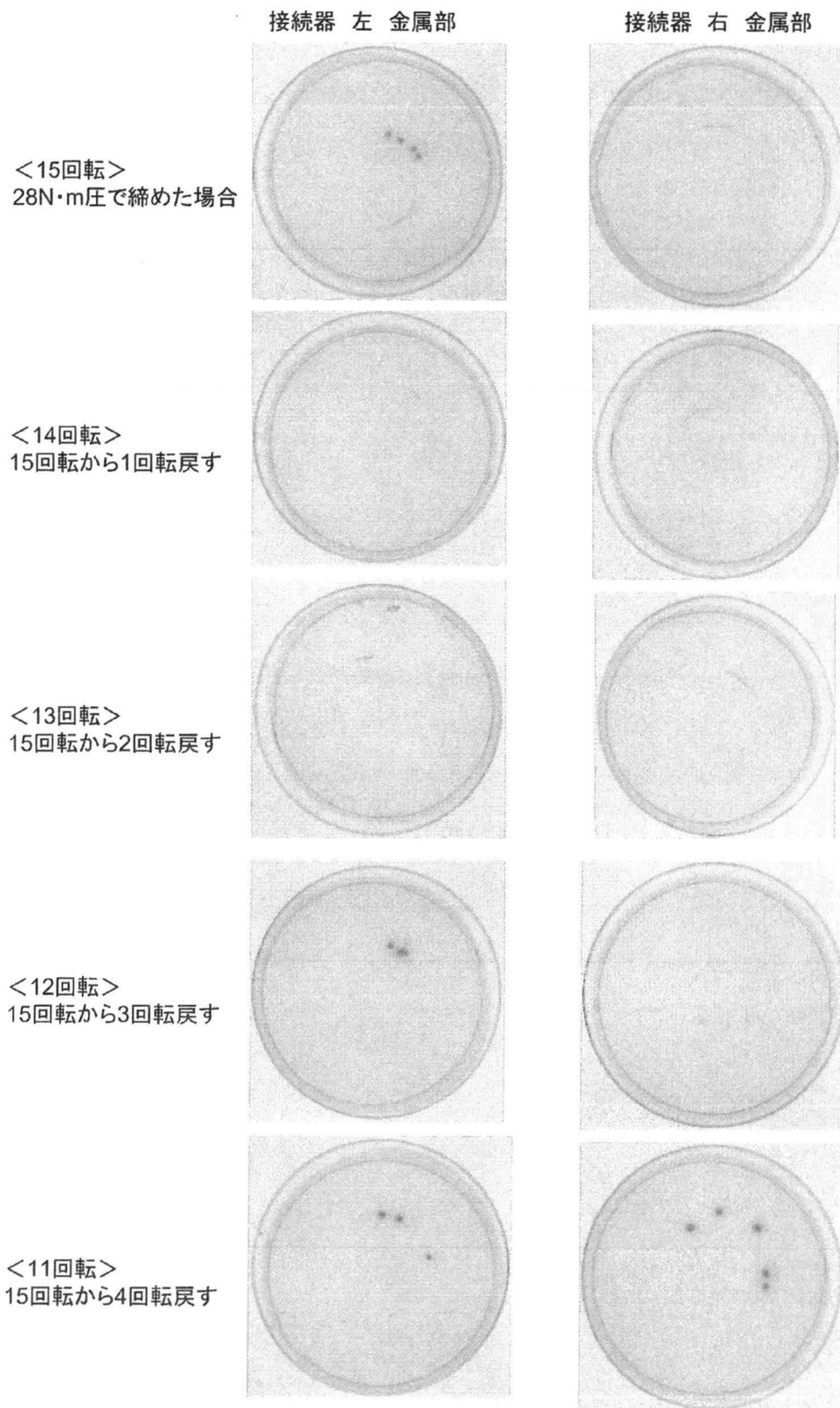


写真5 SE(菌株番号64)含有トリプトソイブイオンを接続部に接種後、室温にて24時間放置したものの接続器のSE分離状況

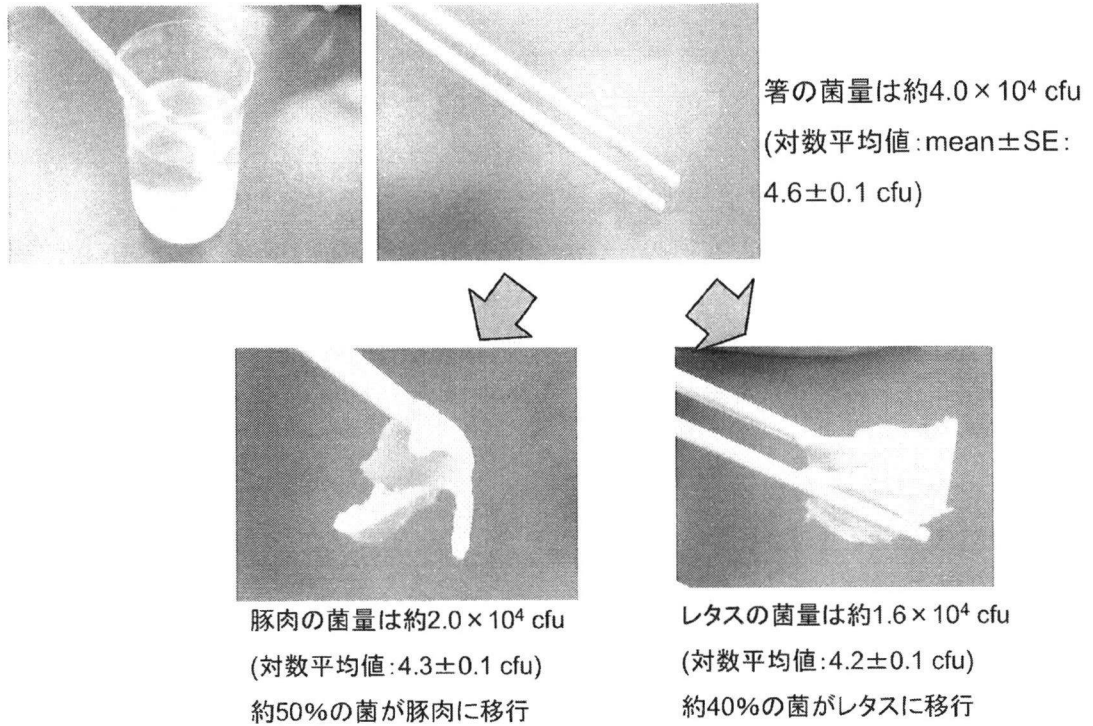


写真6: 箸がSEで汚染している場合、豚肉には約50%のSEが移行、レタスには約40%のSEが移行

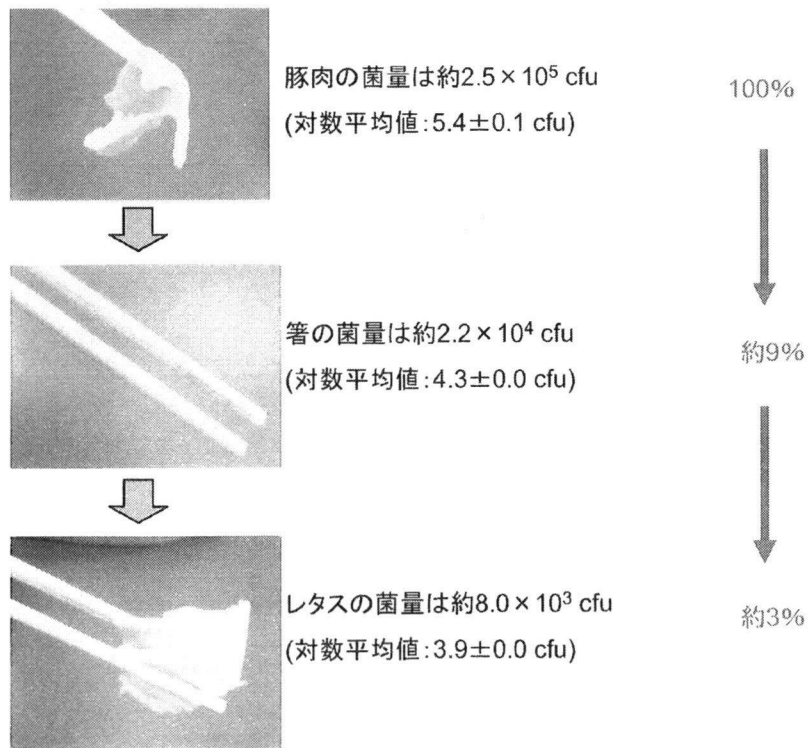


写真7: 豚肉がSEで汚染している場合、箸には約9%のSEが移行し、その箸でレタスをつまむと約3%のSEが移行

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）

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

ステンレス表面に付着したサルモネラの綿棒による回収に関する検討

分担研究者 熊谷 進（東京大学大学院生命科学研究科）

研究協力者

三輪憲永 東海大学短期大学部

小沼博隆 東海大学海洋学部

研究要旨

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状況について検討した。バイオフィーム産生性の異なるサルモネラ菌株（54 および 280）を用い、トリプトソイブイオン（TSB）および卵黄液で培養し、同液で希釈懸濁した後、ステンレス板に添加し、シリカゲルを入れたデシケータ内に収め 22～23℃で保管した。1, 3, 7 日間保管後、添加部分を綿棒で拭き取ると共に、拭き取り後のステンレス板を PBS で洗い出し菌を回収した。拭き取り圧力は、歪みセンサー（共和電業株式会社 PCD300）の数値 750（強）、400（中）及び 50（弱）の 3 段階とし、それぞれの回収状況を比較した。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。試料が乾燥した状態では、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。また、TSB に懸濁添加した場合の綿棒による回収率は、菌株 54 と比較して菌株 280 の方が高かった。

A. 研究目的

食品製造施設等において、食品の製造加工に用いられる機械・器具類については、食品衛生法の下に通知として「営業施設基準の準則」が示されており、「機械器具類のうち、食品に直接接触する部分

は、耐水性で洗浄し易く、加熱又はその他の殺菌が可能なものであること」とされている。また、日本工業規格（JIS）では、「食料品加工機械の安全性及び衛生に関する設計基準通則—第 2 部：衛生設計基準 JIS B 9650-2」に、食料品加工機械の安全及び衛生に関する設計基準が掲げられている。この中で、構成材料につ

いては一般要求事項として、「材料は、意図した用途に適し、材料及びコーティングの表面は、意図した用途条件下で耐久性があり、洗浄・清掃しやすく、必要ならば消毒が可能で、破壊がなく、ひび割れ、傷入り、はく離、腐食、摩耗に対して抵抗力があり、好ましくない物質の浸透を防げるもの」、また食品接触部及び食品飛散部の構成材料は、「無害」「食品を汚染せず、又は食品に対して、悪影響を及ぼさない」「非吸収性」「食品、洗剤及び消毒剤に対して防食防錆」「必要に応じて、冷凍、低温殺菌、殺菌などの冷熱処理温度に耐える」との基準が掲げられている。これらの条件を満たす材質の一つとして、ステンレス鋼が挙げられ、多くの食品製造施設等で、ステンレス製の機械・器具類が使用されているおり、JISでは300シリーズ（クロム・ニッケル含有）のステンレス鋼を使用することが望ましいとされている。

一方、ステンレス製の食品製造設備や器具等の表面に付着した食中毒細菌は、条件によっては数時間から数日生存すると報告されており、食品の二次汚染の原因となる可能性がある。食品の二次汚染は、食中毒細菌に汚染された原材料等から調理設備や調理器具等を介して他の食品に汚染が拡大されて行くものと考えられ、食中毒発生原因の主要な要因の一つである。このため、食品製造施設の設備等の食品接触面における食中毒細菌汚染状況を把握し、適切な汚染防止対策を講ずることは食中毒発生予防の上で極めて重要である。食品接触面における汚染菌

を回収する方法として、培地によるスタンプ、緩衝液などによる汚染部の洗い出し、スワブによる拭き取りなどの方法がある。培地によるスタンプ法は簡便であるが、凹凸の多い部分や、入り組んだ部位のサンプリングには適さない。緩衝液などによる汚染部の洗い出しはサンプリング部位の形状や大きさによっては洗い出し液の回収が困難となる場合が多い。これらの方法に対して、スワブによる拭き取りは簡便であり、入り組んだ部位や凹凸のある部位でも回収可能である。しかし、拭き取り方法や拭き取り圧力の差による回収状況の違いに関しては明確にされておらず、統一的な拭き取り方法は確立されていない。

以上の背景より、食品製造施設等における食品接触面を汚染した食中毒細菌をスワブによる拭き取りで回収する場合、拭き取り圧力の違いによる回収状況を比較する目的で、食中毒の発生事例が多く、比較的環境抵抗性が高いと考えられる食中毒起因菌であるサルモネラを用いて、JISで推奨されている300シリーズ系のステンレス鋼に付着した菌を、異なった圧力により綿棒で拭き取った場合の圧力と回収状況について検討した。

B. 研究方法

1. ステンレス板

JISで食品製造施設等での使用が推奨されている300シリーズ系のSUS 304、研磨#320のステンレス鋼を用いた。

2. 試験菌株

バイオフィーム形成能力の異なるサル

モネラ 2 株を用いた (表 1)。

3. 試験菌のステンレス板への接種および回収方法

試験菌のステンレス板への接種および回収方法の概略を図 1 に示した。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 で一晚 (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 10^2 希釈し、50 μ L をステンレス板 (10 mm \times 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内に入れ 20~25°C で保管した。菌添加ステンレス板を、1 日、3 日及び 7 日保管後に取り出し、PBS を 10 μ L 添加した綿棒 (日本綿棒株式会社、1A754S) で拭き取った。綿棒による拭き取りは、歪みセンサー (共和電業株式会社 PCD300) をピンセットに取り付け、ピンセットに綿棒を固定して圧力によるピンセットの歪みを測定しながら行った。拭き取り圧力は強 (歪みセンサー数値 750)、中 (歪みセンサー数値 400) 及び弱 (歪みセンサー数値 50) の 3 段階とし、綿棒を往復させずに 5 回拭き取った。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 を入れたディスクチューブ (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 45mL 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、0.5mL 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 μ L を BGM 培地に塗抹し、35°C で一晚培養して菌の発育の有無を確認した。

綿棒の振り出しにより回収された菌数を「綿棒による回収菌数」、ステンレス板の洗い出しにより回収された菌数を「ステンレス板残存菌数」、両者を併せて保管後の「生残菌数」とした。また、「生残菌数」に対する「綿棒による回収菌数」の比率を「綿棒による回収率」とした。

C. 結果

1. ステンレス板への添加菌数

各ステンレスに添加した試験菌の菌数を表 2 に示した。培養液を 10^2 希釈し、50 μ L を添加した。各ステンレス板に 10^6 オーダーの菌が添加された。

2. 保管中の温度及び湿度

試験菌を接種したステンレス板を保管したデシケータ内の温度及び湿度を図 2 に示した。保管中の温度は、ほぼ 22°C に保たれていた。湿度は試験開始時には 50% 以上であったが速やかに下降し、1 時間後には 40% 以下となった。その後一

時 40%以上となったが 1 日保管後の試料取り出した時に再度シリカゲルを乾燥させ保管したところ、2 日目以降は 15%程度となった。

3. 綿棒による回収菌数とステンレス板残存菌数

① 菌株 54 を TSB で懸濁添加

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場合の拭き取り圧力ごとの綿棒による回収菌数とステンレス板残存菌数を図 3~5 に示した。1 日保管では、添加液は乾燥しておらず、やや粘調性を帯びた状態であった。綿棒による回収菌数は全検体 10^7 以上であり、ステンレス板残存菌数は全ての検体で 10^6 以下であった。圧力の違いによる綿棒による回収菌数には明確な差はみられなかった。3 日保管では、添加液は乾燥していた。綿棒による回収菌数は、圧力 50 では 3 検体とも 10^6 以下、圧力 400 では 2 検体が 10^6 以上で 1 検体が 10^6 以下、圧力 750 で 3 検体とも 10^6 以上であり、圧力が高い方が回収菌数が高くなる傾向がみられた。ステンレス板残存菌数は全ての検体で $10^6 \sim 10^7$ の範囲であった。7 日保管では、綿棒による回収菌数は、圧力 50 では 3 検体とも 10^7 以下、圧力 400 及び 750 では全ての検体で 10^7 以上であり、圧力が低いと回収菌数が低くなる傾向がみられたが、圧力 400 と 750 では明確な差はみられなかった。ステンレス板残存菌数は全ての検体で 10^7 以上であった。

② 菌株 54 を卵黄液で懸濁添加

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場合の拭き取り圧力ごとの綿棒による回収とステンレス板残存菌数を図 6~8 に示した。1 日保管では、TSB と同様添加液は乾燥しておらず、やや粘調性を帯びた状態であった。綿棒による回収菌数は、全検体 10^7 以上であり、ステンレス板残存菌数は全ての検体で 10^6 以下であった。圧力の違いによる綿棒による回収菌数には明確な差はみられなかった。3 日保管では、添加液は TSB と同様乾燥していた。綿棒による回収菌数は、圧力 50 では 2 検体で 10^4 以上、圧力 400 では 3 検体とも 10^4 以上、圧力 750 では 2 検体で 9.0×10^6 以上であり、圧力が高い方が回収菌数が高くなる傾向がみられた。なお、回収菌数の高かった 2 検体は、綿棒の拭き取りにより乾燥した試料がステンレス板から剥離して回収された。ステンレス板残存菌数は圧力 750 の 2 検体を除いて概ね 10^7 程度であった。圧力 700 の 1 検体の残存菌数は検出限界以下で増菌により残存が確認され、他の 1 検体は増菌でも残存は確認できなかった。7 日保管では、綿棒による回収菌数は、 $10^4 \sim 10^5$ であり、ステンレス板残存菌数は全ての検体で 10^7 以上であった。

③ 菌株 280 を TSB で懸濁添加

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の拭き取り圧力ごとの綿棒による回収とステンレス板残存菌数を図 9~11 に示した。1 日保管では、菌株 54 の場合と同様、添加液は乾燥しておらず、やや粘調性を帯びた状態であった。綿棒による回収菌