

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

**冷凍食品の安全性確保のための
微生物規格基準設定に関する研究**

平成 22 年度～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 春日 文子

平成 25 (2013) 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

冷凍食品の安全性確保のための 微生物規格基準設定に関する研究

平成 22 年度～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 春日 文子

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

・総合研究報告

冷凍食品の安全性確保のための微生物規格基準設定に関する研究

春日 文子 ----- 3

- 1. 病原微生物汚染制御に向けた食品の分類法に関する研究
- 2. 食品分類に照合する病原微生物情報の整理
- 3. 野菜類における衛生指標菌の定量的検証
- 4. 市販カイワレ大根における各種衛生指標菌の定量化と細菌叢構成に関する研究

る研究

- 5. 冷凍食品の安全性確保のための微生物規格基準設定に関する研究
- 6. 冷凍食品の安全性確保のための微生物規格基準設定に関する研究
- 7. 寄生虫による汚染に関する研究

・研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 107

・研究成果の刊行物・別刷 ----- 111

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）
総合研究報告書

冷凍食品の安全性確保に関する研究

研究代表者 春日 文子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部長

研究要旨：

多様な低温流通食品が開発され、冷凍食品のみに微生物規格が設定される必然性が低くなり、またコーデックス委員会では FSO 等の数的指標を基盤として食品規格基準設定に関するガイドライン改訂を行っていることから、食品全体の微生物規格基準のあり方を検討する必要性が出てきた。そこで本研究は、以下の項目に沿い、冷凍食品を例として食品全体に応用可能な微生物規格基準設定理論の構築を行うこととした。

1. 食品微生物規格基準設定のあり方の検討
 - 1-1. 食品微生物規格設定のための食品の分類法の検討
 - 1-2. 食品微生物規格設定の理論構築
 - 1-3. 食品微生物規格の事例提案
2. 食品汚染寄生虫の対策に関する考察

第一年次は、文献調査および国際会議への参加を通じて、食品微生物規格設定のための食品の分類法ならびに微生物規格設定理論について考察した。また、海外の寄生虫を対象とした法令等について情報収集を行うとともに、食用サワガニにおける肺吸虫の汚染実態調査ならびに冷凍耐性の検討を行った。

第二年次は、微生物汚染実態の一部を実験的に補足するとともに、衛生指標菌の比較検証を行い、食品種毎に衛生指標菌を整理する必要性を提起した。また、希少確率事象のリスク許容に関わる基礎数理検討を行った。さらに、寄生虫については、海外のと畜場法を対象に、情報の収集整理を行った。また、寄生蠕虫の食品汚染実態調査、冷凍耐性の検討を行った。

第三年次は、衛生指標菌の検出状況に関する比較解析を通じて、より望ましい指標菌の在り方について考察し、抜き取り検査の不確実性についての数理的検討を行うとともに、寄生蠕虫の食品汚染実態調査、冷凍耐性に関する検討も継続して行った。

1. 食品微生物規格基準設定のあり方の検討

日本適合性認定協会が作成した食品分類表に、国際食品微生物規格委員会(ICMSF) が危害要因として定める微生物種(細菌・寄生虫) を適合させることで、食品と危惧される病原体の組み合わせを作成し、更に国内流通食品の汚染実態、食中毒発生、食品毎の喫食量及び現行の規格基準設定の有効性等に関する情報の整理・体系化を通じ、各食品について病原微生物情報を参照できる分類表を作成した。これにより、特定の病原微生物について、汚染実態が明らかでない食品群、食中毒発生・食品汚染を

認めるが規格基準が設定されていない食品群が抽出された。後者の一例として、野菜の多くが一般細菌、大腸菌群等の衛生指標菌を高い頻度で含む状況を把握した。カイワレ大根を具体例としてより詳細な検討を行い、当該食品を構成する細菌叢の多くは環境由来であり、その多くが先述の指標菌として算定されることを実証した。以上の知見はそれぞれの食品の特性に合わせた衛生管理の充実が食の安全性を総合的に担保していく上で欠かせないことを示しているといえよう。

食品ロットに含まれる微生物数の計数データに関する不確かさ評価方式とそれを基にした抜取検査方式について、サーベイと検討を進めた。国際的に採用されている2クラス抜取検査、3クラス抜取検査の数理をサーベイすると共に、計量抜取検査のOC(Operating Characteristic)曲線改善のために赤尾洋二が1960年代に提唱した圧縮限界の考え方の適用可能性を考察した。その結果、安全基準以外により緩い基準値を設定し、その両者に基づいて一般離散分布に基づく3クラス抜取検査を設計することで、2クラス抜取検査より検出性能の高い抜取検査方式を設計できることが示された。現時点ではポアソン分布に基づく抜取検査方式の設計が実現している。さらに、サンプリングプランを数理ソフトウェアでプログラム化し、OC曲線・OC曲面のグラフを描画できるようにした。汚染濃度に正規分布を仮定した場合のサンプリングプランを数理ソフトウェアでプログラム化し、様々な設定の下で平均汚染濃度 vs ロット合格率のグラフを描画できるようにした。

2. 食品汚染寄生虫の対策に関する考察

食品媒介の寄生虫症の発生を防止するには、食品衛生に係わる各種の法令が重要な役割を果たすと考えられた。そこで関連法規の国際比較を行ったところ、諸外国における輸入食品に対する検疫・検査は、我が国の対応と概ね同等であることが明らかとなった。我が国の「食品衛生法」には寄生虫に係る食品の規格基準が定められていないが、実際には、アニサキスの主要感染源となるサバだけでなく、深海魚のキンメダイや魚の加工食品からも、人体寄生種のアニサキスが多数検出された。文献検索では、様々な食品を各種の寄生虫が汚染することが示されている。一方で、「冷凍」という手段が食品媒介寄生虫の殺滅に有効であることが、文献調査と肺吸虫・猫回虫を用いた実験で確認された。以上の結果から、我が国では、種々の食品に食品媒介寄生虫の汚染を認めるが、冷凍の応用と関連法規の整備により、感染の予防を図ることが可能ではないかと考えられた。

分担研究者

椿 広計	統計数理研究所データ科学研究系 教授
大西 俊郎	九州大学大学院経済学研究院 准教授
朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 室長
杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官

A. 研究目的

冷凍食品の保存基準、成分規格は、長年に亘りわが国の冷凍食品の安全性確保に貢献してきた。しかし昨今の保存技術の向上に伴い、多様な低温流通食品が開発されるとともに、一部の冷凍食品の成分規格に対する疑義も呈され、食品安全委員会より冷凍食品全体の微生物規格見直しの必要性が示された。一方、コーデックス委員会では、

新たな食品規格基準設定にあたってはALOPやFISO等の数的指標を基盤とすることを合意し、既にコーデックス食品規格にもその考え方が反映されている。わが国でもこれら国際動向を見据えた微生物規格設定の準備をする必要がある。国際的議論では、微生物学的、統計学的に克服すべき課題も認識されており、研究として取り組むべき要素も多いが、わが国では他に類似の研究はない。

そこで本研究では、冷凍食品を例として食品全体に応用可能な微生物規格基準設定理論の構築を目標とし、具体的には

1. 食品微生物規格基準設定のあり方の検討
 - 1 - 1. 食品微生物規格設定のための食品の分類法の検討
 - 1 - 2. 食品微生物規格設定の理論構築
 - 1 - 3. 食品微生物規格の事例提案
2. 食品汚染寄生虫の対策に関する考察を行うことを目的とした。

1. に関しては、病原微生物汚染制御に向けた食品の分類法に関する研究を行うことを最終的な目的として、国際動向を見据えつつ、国内状況を捉えるべく食品全般の分類を行うための基礎的知見の集積を行うこととした。

また、菌数を対象とした抜取検査の設計に関して、公衆衛生学上許容できないイベントリスク（重篤な食中毒を発症させる確率が一定確率以上となる）を与える菌数を非許容菌数 nR とし、抽出した m ロット中この非許容菌数以上となるロットが1件でもあれば不合格とする2クラス抜取検査方式が国民からその実行を許容されているが、この2クラス抜取検査方式は、同一検出力を確保するために必要なロット数が大きくなり、統計的には合理的な方法と言えない。このため、国民から許容される3クラス抜取検査方式を用いることが検出力向上あるいはロットサイズ削減のために必要となる。この方式の検出力を上げるために、社会的に許容される菌数 nA を定め($nA < nR$)、この許容菌数より多い菌数となるロットが c 件あっても不合格とする3クラス抜取検査を設計するこ

とも本研究の目的とした。一方、この種の検査方式の背後には各ロットでカウントされる菌数測定「不確かさの評価」の2つの課題を明らかにする必要がある。一つは、統計学の枠組みを超えて、国際度量衡委員会がISOと共に1993年に刊行した「測定の不確かさの表現ガイド」と統計的方法の整合性の問題である。第2のそして食品安全により直接かかわる問題は、計数值、特に度数データや比率データの不確かさ表示に関する統計的問題である。この第2の問題についての展望を明らかにすることも本研究の目的である。

2. に関しては、寄生虫による食品汚染に関する研究に取り組んだ。食品媒介の寄生虫症の発生を防止するには、食品衛生に係わる各種の法令が重要な役割を果たす。このような法令の中から、初年度は「食品衛生法」、次年度は「と畜場法」と「食鳥検査法」、そして最終年度は「植物防疫法」と「家畜伝染病予防法」を選び、これらに相当する国際機関や諸外国の法令と我が国の法令とを比較し、食品中の寄生虫に関する規格基準や寄生虫に対する食品の検査法等の情報を抽出・整理した。また汚染食品の「冷凍」で寄生虫の感染を予防するための条件（温度・時間）に関する成績を集積した。更に、寄生虫による食品汚染の実態調査を実施した。

B. 研究方法

1. 食品微生物規格基準設定のあり方の検討

1 - 1. 食品微生物規格設定のための食品の分類法の検討

○食品微生物規格設定のための食品の分類法の検討

公益財団法人日本適合性認定協会が作成した食品分類表 R204-添付 5「試験の種類で申請する微生物試験所が妥当性確認・検証時に用いる対象品目分類表」を基に、国際食品微生物規格委員会が規定した、食品有害微生物を食品群ごとに追加することで、検討対象とするべき食品・微生物のリストを作成した。

過去5年間に国内で発生した食中毒事例について、厚生労働省・食中毒統計データを通じて検索を行ない、食中毒発生のある食品・微生物の組み合わせを、上記リストに追記した。

さらに、食品群と微生物（細菌・寄生虫）の組み合わせを検索対象用語として医中誌データベースを通じて文献を検索し、汚染率に係る数値を上記リストに追記した。加えて、国民健康栄養調査における過去3年間のデータを基に、食品別喫食量を集計した。

以上の作業の結果、(i) 微生物汚染実態状況を更に精査する必要があると思われる組み合わせ、(ii) 食中毒発生・食品汚染実態が明らかとなった食品・微生物種の組み合わせのうち、現行の規格基準・衛生規範において直接の管理対象となっていないものを抽出し、考察した。現行の規格基準による危害微生物の制御性については、衛生試験法により検出される細菌種の別を以て考察した。実験的補足として、プリン中のサルモネラ及び焼き鳥中のウェルシュ菌を取り上げ、食品内挙動および汚染調査を行った。

○ウシ内臓肉における EHEC O157 の消長

カナマイシン耐性 O157 株 (204-Km) を約 1.7×10^3 CFU となるよう、5g のウシ内臓肉 (小腸) 及びロース肉に接種し、4 および 20 で一定期間保存した。サンプルを 45ml の緩衝ペプトン水に加え、42 で 20 時間培養した後、カナマイシン含 CT-SMAC 寒天培地上に塗布することで、当該菌株の生存菌数を求めた。また、204-Km 株を、内臓肉由来の乳酸菌株及び大腸菌株と 4 にて共培養し、選択培地上で 204-Km 株の生菌数を求めた。

○野菜類における衛生指標菌の定量試験

2011 年 11-12 月に都内で購入した野菜 6 品目 (レタス、ホウレンソウ、シイタケ、カイワレ、ニンジン、トマト) 各 25g について、衛生指標菌試験法 (一般細菌、腸内細菌科菌群、大腸菌

群、E.coli) を用いたによる定量検出を実施し、それらの比較を行った。また、腸内細菌科菌群試験法においては、VRBG 培地上で優勢に発育を示す、典型・非典型集落について無作為に抽出し、16S rRNA 配列に基づく遺伝的同定を通じ、各検体における優勢細菌叢の構成を調査した。

○カイワレ大根における細菌汚染調査

医中誌 Web を通じて当該食品の細菌汚染に関する知見の収集を行った。都内で平成 24 年 6 月より 9 月にかけて、計 180 検体のカイワレ大根を購入し、一般細菌・大腸菌群・ β -グルクロニダーゼ産生大腸菌の定量的検出を培養法により行うと共に、腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検出を PCR 法により行った。生産地・購入日時等の情報を各検体に適合させ、得られたデータの解析に供した。細菌叢に係る知見の収集には、PCR-DGGE 法並びにメタゲノム法を用いた。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

○食品衛生に係わる各種法令の国際比較

調査対象の国、機関としてコーデックス委員会 (Codex)、国際獣疫事務局 (OIE) および欧州連合 (EU)、アメリカ合衆国、オーストラリア、ニュージーランド、および韓国を選び、これらの機関・国の公開資料を入手して、食品および輸入食品の寄生虫・微生物に係る規格基準に関する情報を収集した。また、と畜検査や食品の輸入検疫時の検査対象となる病原体・疾患、判定基準、廃棄等の措置、検査員の資格要件を検索・整理・解析した。

○寄生原虫・寄生蠕虫の冷凍耐性に関する調査・研究

寄生原虫・寄生蠕虫を殺滅するための食品の冷凍条件について、PubMed および医学中央雑誌等を検索し、関連の原著論文を抽出した。

肺吸虫は我が国では年間 40 例以上の症例報告が続く重要な食品媒介寄生蠕虫である。主な感染源はサワガニなので、サワガニを冷凍処理し、体内のウェステルマン肺吸虫および宮崎肺吸虫が感染能力を失うかを調べた。また、*Toxocara* 属の猫回虫について、虫体殺滅に有効な冷凍条件を調べた。

○寄生虫による食品汚染に関する調査研究

ゴマサバ *Scomber australasicus* のアニサキスに関する検査成績は乏しいことから、同時期に同一海域で漁獲されたマサバ *S. japonicus* と同時にゴマサバの検査を実施し、得られた成績を比較した。検出虫体を顕微鏡下で形態観察し、アニサキス I 型幼虫を選別した後、個体別に DNA を調製し、リボソーム DNA の ITS 領域を PCR 増幅した。増幅産物の制限酵素切断 (PCR-RFLP) とシーケンシングを行ない、虫種が *Anisakis simplex* (以下 As, 本邦の主要人体寄生種) であるのか、*A. pegreffii* (以下 Ap, スペインでの人体寄生種、我が国ではほとんど症例報告なし) であるかを分子同定により明らかにした。

また、深海魚であるキンメダイを対象に、アニサキスの寄生状況を調べた。虫体は視認で検出し、鮮魚由来のアニサキス虫体と同様の方法で種同定した。さらに、シメサバ、塩サバ(干物)等のサバ加工品やチャンジャ(タラ内臓の発酵食品)を対象に、アニサキスの汚染状況を調べた。虫体は目視で確認し、鮮魚由来のアニサキス虫体と同様の方法で種同定した。

C. 研究結果

1. 食品微生物規格基準設定のあり方の検討

本研究では、微生物危害性の観点から、食品微生物対照表を作成した。寄生虫情報は、肉類、魚類、野菜類、嗜好飲料に限定して得られ、国内で新たに認められた寄生虫食中毒事例の存在も浮き彫りになった。喫食量は動物性食品が高

い割合を占めていた。規格基準の制御性に関する考察を通じ、対応すべき病原体種について国内情勢に即した形での評価が必要であることが示された。実験的検証を通じ、製造～消費に至る温度管理の徹底が今回の対象に対しては有効な衛生管理手法として機能しうることを示した。食肉製品の中で、内臓肉は食品衛生法上、枝肉と同様に取り扱われているが、後者に比べ、汚染実態に関するデータは殆ど存在しない状況であった。一方で、当該食肉食品に起因する細菌性食中毒は多数発生していることを背景として、同食品内における挙動に関する調査を行った。結果として、我々は当該食肉製品における常在細菌叢が O157 の生存性に大きく影響を及ぼすことを実証すると共に、ウシ内臓肉における O157 は冷凍処理により比較的速やかに低減されることを示した。

野菜類に含まれる衛生指標菌の定量化をはかることで以下の知見を得た。カイワレ大根、レタス、ホウレンソウ検体は総じて高汚染度を示した。シイタケ・トマト検体は総じて低い汚染度で各試験法間にも一定の均衡性を示した。

ニンジン検体はやや低い汚染度であったが腸内細菌科菌群数値は均衡性を欠いた。遺伝的細菌種同定を通じ、レタス・ホウレンソウでは *Pseudomonas* 属菌、ニンジンでは *Enterobacter* 属菌、カイワレ大根では *Enterobacter*・*Pantoea* 属菌が優勢である等、発育構成菌叢は検体・品目により多様性を呈した。

都内に流通するカイワレ大根 180 検体を衛生試験に供したところ、検体 1g あたりの平均値は、一般生菌数が 1.0×10^7 、大腸菌群が 3.4×10^6 であった。何れの検体からも β -グルクロニダーゼ産生大腸菌は検出されず、PCR 法によっても腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌由来遺伝子は検出されなかった。これらの数値は、月別に変動が認められた。農場・月別に代表検体を抽出し、PCR-DGGE 法およびメタゲノム

解析に供したところ、6月の検体と7月の検体の間では異なる群集構造をとっており、その一因と目される細菌属が同定された。

(朝倉分担研究報告書)

1-2. 食品微生物規格設定の理論構築 ならびに 1-3. 食品微生物規格の事例提案

○計数データの不確かさに関わる問題の調査

国際的には計数データの不確かさ評価については、国際標準化機構のISO TC69「統計的方法の適用」SC6「精度管理」で議論されており、現時点でも各国の合意に基づく規格原案が得られていないことが分かった。2005年に質的データ(度数、比率など)の不確かさ評価に関わる原案作成をフランスが提唱したが原案作成に至らず、日本(鈴木知道東京理科大学教授)がその作業を引き継ぐ形になっている。

計数データの不確かさ表示に関する統計的困難が、何かはほぼ明らかである。すなわち、量的変数の従う確率分布として代表的である正規分布には、平均に関わる母数(位置母数) μ (平均)とばらつきに関わる母数 σ (標準偏差)が存在し、両者を実験的に推定することが可能である。その母数は、正規分布を想定した最尤法などで求められることは勿論、最尤推定量が分布形の想定に依存しない、素朴なモーメント推定量とも一致するために、汎用的統計手法と見なすことができたのである。

これに対して、度数分布として、食品安全分野でもよく用いられてきたポアソン分布は、平均 μ が定まると分散は μ と一意的に定まり、ばらつきに関する母数を導入することは不可能である。比率の代表分布である二項分布にも同様の問題がある。この問題を解決するために、平均 μ 、分散 $\sigma^2\mu$ といった確率モデルを導入しようとする、その最尤推定量は決して単純なモーメント法には帰着できないことも数学的に証明されている。実務的には安全側の処置であるモーメント法(擬似最尤法)で全ての問題を取

り扱おうとすると、対応する確率評価が不可能という批判をうけることになる。

○食品安全に関わる不確かさ評価方法

本研究は、ポアソン分布に代わり、一般化線形モデルの混合効果モデル(Mixed Effect Model)として正当化可能な「負の二項分布」に基づく不確かさ体系構築が必要と結論する。何故ならば、負の二項分布は、平均 μ のとき、分散は $\mu + \phi\mu^2$ という性質をもち、 $\phi=0$ の特別な場合がポアソン分布となる。

各測定値の平均 μ 自体がガンマ分布に従う揺らぎを持っているとき、その度数分布が負の二項分布となり、その揺らぎの程度を表すのが母数 ϕ であり、正規分布の分散とほぼ同じ役割を果たすこととなっている。

また、負の二項分布の μ に関する最尤推定はモーメント法となる点、ガンマ分布についても最尤推定はモーメント法として解釈できることから、量的データの不確かさで用いられる分散成分模型をこのガンマ分布の推論として定式化すれば、正規分布同様、分布形の仮定が本質的なものとならず、応用上利用しやすい分布と考える。

ただし、この種の統計的方法論の応用可能性については、食品分野の実データなどでの検証を通じて行われるべきものであり、多くの問題は、今日的課題と言わざるを得ない。

○3 クラス 抜 取 検 査 方 式 の Operating Characteristics 評価のための方法と設計理論

菌数 N がある離散確率分布に従っているとすると、3クラス検査方式の合格確率は、 $\Pr(m$ ロットすべて菌数 n_R 未滿かつ、 m ロット中 c ロット未滿のロットが菌数 n_A 未滿)となる。そこで、期待値 μ の離散分布において、

$$P(\mu) = \Pr(N = n_R),$$

$$Q(\mu) = \Pr(n_A < N < n_R)$$

とおけば、合格確率 $P_A(\mu, m, c, n_A)$ は、

$$P_A(\mu, m, c, n_A) = (1 - P(\mu))^m \sum_{k=0, \dots, c-1} C_k \{Q(\mu)/(1-P(\mu))\}^k \{1-P(\mu)-Q(\mu)/(1-P(\mu))\}^{m-k}$$

$$= \sum_{k=0, \dots, c-1} C_k Q(\mu)^k \{1-P(\mu)-Q(\mu)\}^{m-k}$$

となる。本研究は、菌数分布がロットに依らず一様な期待値 μ のポアソン分布に従うとし、 n_R が用量反応関係より定められていると仮定して、上記の確率評価方法を用いて3クラス抜取検査方式を設計した。

そこでは、ロットに対する合理的な要請は、期待値 μ のポアソン分布の下で、 n_R 以上の菌数となるロットが確率 α となる集団（棄却すべき集団）すなわち $P(\mu) = \alpha$ となる状況でロットが合格する確率は一定確率 δ 以下に抑えることとした。この条件を満たす μ を μ_δ と記すこととする。一方、 n_R 以上の菌数となるロットが確率 β となる集団（受容すべき集団）すなわち $P(\mu) = \beta$ となる状況でロットが合格する確率は一定確率 ε 以上にすることが必要である。

抜取検査方式設計方針は、この μ_α という期待値に対して、上記の制約条件を満たす3クラス検査方式の中で、 n_R が与えられたとき、最もロットサイズ m の小さくなる c, n_A の組み合わせを求めることとした。

従って、 $\gamma(\mu) = Q(\mu)/(1-\alpha)$ とおけば、 m を与えた時、

$$(1-\alpha)^m \sum_{k=0, \dots, c-1} C_k \gamma(\mu_\alpha)^k \{1-\gamma(\mu_\alpha)\}^{m-k}$$

は、 c と γ について、できるだけ小さくなるように

$$(1-\beta)^m \sum_{k=0, \dots, c-1} C_k \gamma(\mu_\beta)^k \{1-\gamma(\mu_\beta)\}^{m-k}$$

は、 c と γ についてできるだけ大きくなるような検査方式を設計した上で、合格率に関する確率の制約が満たされなければならない。この、制約付き最適化問題は、多目的最適化問題であり一意解をもつわけではなく、具体的には、許容すべき水準のみを規定する検査方式を実際に設計した。

○許容すべき水準のみ規定する検査方式の設計例

許容すべき水準（抜取検査方式でいう AQL; Acceptable Quality Level）のみを設定することだけを規定すると c と γ について、下記の合格確率を一定確率 ε 以上とすることが問題になる。

$$(1-\beta)^m \sum_{k=0, \dots, c-1} C_k \gamma(\mu_\beta)^k \{1-\gamma(\mu_\beta)\}^{m-k}$$

本来は、AQL は n_R と共に社会的に設定する必要があるが、これを n_R との関係性、すなわち上記 β を設定することで便宜的に定めることも可能である。

例えば、 $n_R=1000$ と想定したとき、 $\beta = 1 \cdot 10^{-5}$ と設定すると、受容すべきポアソン分布の期待値は 868 となる。すなわち、期待値 868 のポアソン分布の、上側 10^{-5} 点（0.001%点）がほぼ 1000 となる。

ここで、ロット数 m を 10、AQL の受容確率 ε を 95%以上に設定すると、この制約を満たす c と最小の n_A との組み合わせは表 1 のようになる。

逆に、棄却すべき品質水準（RQL）も $n_R=1000$ と想定したとき、 $\alpha = 10^{-5}$ と設定すると、受容すべきポアソン分布の期待値は 1137 と定まるので、表 1 にはこの c と最小の n_A の組み合わせが RQL をどの程度棄却する確率も記載した。この種の作業を m を変動させ、包括的に行う事で所望の抜取検査方式を設計することが可能となる。

表1 $n_R=1000$ 、 $m=10$ 、 $\mu_{0.99999}=868$ 、 $\varepsilon=0.95$ としたときの c と $\max n_A$ 、並びに $\mu_{0.00001}=1137$ に対する棄却確率 δ

C	n_A	Δ
1	886	0.00
2	875	0.00
3	866	0.00
4	859	0.00
5	852	0.00
6	844	0.00
7	836	0.00
8	827	0.00
9	815	0.00
10	792	0.00

この方式は $c=3$ では、AQL である 868 よりも閾値 n_A が低くなり、品質機能展開の提唱者として国際的にも著名な赤尾洋二氏（山梨大学名誉教授）が 1960 年代に提唱し、2000 年代以降国際的にも検討が開始された圧縮限界を有する計量抜取検査と類似の構造を持つことは、興味深い。社会的説明においても n_A という第 2 の閾値が十分小さくなっていることは δ が十分 0 に近い限り説明しやすいものと思われる。

○サンプリングプランの構築・評価

サンプリングプランを実装することを想定し、サンプリングプランの構築・評価を次の 5 つのフェーズに分解して、それぞれ数理ソフトウェア上で表現した。

(a) 汚染濃度のモデリング：ある微生物の汚染濃度（対数単位）が正規分布 $N(\mu, \sigma^2)$ に従うと仮定する。もちろん、 (μ, σ^2) は未知パラメータである。

(b) データに基づくパラメータ推定：データに基づいて (μ, σ^2) を推定する。例えば最尤推定が考えられる。適切な事前分布に基づき Bayes 推定することも考えられる。

(c) OC 曲線の描画：推定値に基づき、臨界値 vs ロット合格率のグラフを描画する。

(d) OC 曲線のずれを定量化：推定値と真値は一般に異なる。このずれによる OC 曲線のずれを描画する。

(e) ロット合格率の確率分布の評価：もし事前分布を仮定していると、ロット合格率に対する確率分布を評価できる。

（椿・大西分担研究報告書）

2. 寄生虫による汚染に関する研究

2-1. 食品衛生に係わる各種法令の国際比較

食品衛生関連法に関する国際比較により、寄生虫に係る食品の規格基準が定められていないことは、諸外国も我が国と同様であったが、食品衛生上の弱点であることが示唆された。

2-2. 寄生原虫・寄生蠕虫の冷凍耐性に関する調査・研究

○寄生原虫・寄生蠕虫を殺滅する冷凍条件についての文献調査

文献検索の結果、食品媒介種として重要な寄生虫の多くは、原虫・蠕虫を問わず、冷凍による虫体殺滅の条件が既に検討されていた。例えば、国際食品微生物規格委員会 (ICMSF) により危害要因としてリストアップされた原虫 6 種類のうち 5 種類、また蠕虫 5 種類のうち 4 種類については、既に冷凍の条件が検討されていた。概して言えば、アメリカ食品医薬品局や Codex が水産物の寄生虫に係る処理基準とした条件、すなわち -20 以下・7 日間以上の冷凍が、水産物以外の食品を汚染する寄生虫に対しても、殺滅に向けて有効に作用すると考えられた。

○寄生虫の殺滅に有効な冷凍条件に関する研究

ウェステルマン肺吸虫の感染は、中間宿主サワガニを喫食前に -18 で 100 分間、あるいは -80 で 50 分間冷凍すれば予防できることを明らかにした。ネコ回虫の感染は、感染源となる

待機宿主ニワトリの汚染筋肉を-25℃で12時間、喫食前に冷凍すれば予防できることを明らかにした。

2 - 3. 寄生虫による食品汚染に関する調査研究

○マサバおよびゴマサバにおけるアニサキス同胞種の寄生状況

駿河湾のマサバおよびゴマサバ由来のアニサキス I 型幼虫は As で、一部は筋肉から検出された。東シナ海のマサバおよびゴマサバ由来のアニサキス I 型幼虫は Ap で、総て内臓から検出された。

○ キンメダイにおけるアニサキスの寄生状況

深海魚であるキンメダイを調べたところ、サバに認められた虫種とは異なる人体寄生性のアニサキス *A. physeteris* が多数寄生していた。

○サバ等の加工食品からのアニサキスの検出状況

シメサバの 12%、塩サバの 3%、またチャンジャは検体の総てから、アニサキス As が検出された。さつま揚げの 6% から、As の遺伝子が検出された。

(杉山分担報告書)

D. 考察

1. 食品微生物規格基準設定のあり方の検討

国際間で異なる食品の分類が行われていることを背景として、本研究では、国際的な食品の分類として汎用される ISO16140 の Annex B 「Classification of sample types for validation studies」の考え方を取り入れつつ、わが国固有の食文化を考慮した形の、いわば互換性を見出すことのできる、食品分類に関する検討を行ってきた。

まず、本研究では JAB が作成した食品分類表を基本軸として採用し、ICMSF が危害要因

と定義する細菌性微生物を各食品群にプロットした上で、個々の食品群・微生物の組み合わせについて、国内流通食品の汚染実態データおよび食中毒発生動向を精査し、現行の微生物に対する食品の規格・基準として、改善・情報の収集につとめるべき課題を見出すための検討をおこなった。その中では、(i) 微生物汚染実態状況を更に精査する必要があると思われる組み合わせ、(ii) 食中毒発生・食品汚染実態が明らかとなった食品・微生物種の組み合わせのうち、現行の規格基準・衛生規範において直接の管理対象となっていないものが抽出された。(i) については、加熱加工食肉製品におけるウェルシュ菌或いは洋菓子におけるサルモネラを具体例として実験的作業を行い、現行法での対応に緊急の改善の必要性は少ないとの結論に至った。また、(ii) の中には規格基準の設定のみならず、衛生管理の啓蒙活動によって改善される内容も多分に包含していると考えられた。

国内の食品の成分規格には、一般生菌数や大腸菌群のような、いわゆる衛生指標菌が圧倒的に多く採用されている。しかしながら、衛生指標菌に対する成分規格設定の目的が、食品群によって明確に分類化されていないのが現状である。また、我が国独自の、“E.coli”(糞便系大腸菌群)の概念については、国際的整合性の観点でどのように整理をはかるかも論点となりうる。本研究では、細菌種を指標とした、ICMSF 監視対象病原体を捉えうる衛生試験法を考察することで、必ずしも E.coli を重要視する方法が絶対的なものではないとの考察を得た。更に、生野菜を具体例として各種衛生指標菌の定量化を行うことで、当該食品群に対して望ましい指標菌の在り方については更なる検討が必要であるとの結論を導き出した。衛生指標菌の設定については、科学的妥当性と共に、対象食品に対して求める意義(安全確保、品質確保等)を併せて改めて検討すべきと考える。

今回の検討において、10 ロットを抽出し 1000

個以上の菌が含まれるロットが1個でもあれば不合格とする2クラス抜取検査で用いる安全基準に加えて、全ロットが793~999個の菌を含んだ場合には不合格といった、新たな判定基準を追加する3クラス抜取検査方式を用いることは、抜取検査の性能を改善するという意味で、統計的には合理的である。

加えて、公衆衛生上の目標となる1000と共に、食品安全管理上の業者目標793(圧縮限界)が明確に意識されることになるという意味でも有用と考える。この方式は、現在特別な数値について検討しただけであるが、一般的評価アルゴリズムを開発済みであるので、菌数と発症に関するDose Response関係が同定されれば、食品安全専門家との協業のもとで、適切な3クラス抜取検査を設計できると考える。

なお、前述の不確かさ評価方式の結果から導かれる負の二項分布に基づく3クラス抜取検査方式の設計に当たっては、実際に食品ロット菌数のバラつきに関わる母数 ϕ の共同実験などによる推定が必要となる。実際、抜取検査方式自体が ϕ に依存するという大きな問題を解決する必要があり、2段階抜取検査、すなわち第一段の抜取は ϕ の推定の為におこない、第2段階の抜取検査で合否を判断するといった方式の開発も必要となろう。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

食品媒介寄生虫に対する食品衛生上の対応が必要な現状では、食品衛生法に則して寄生虫に係る食品の管理手段を検討し、食品の安全性を担保する必要があると考えられた。

ICMSFがリストアップしながらも、検討が進んでいない寄生虫(赤痢アメーバと蟻虫)に関しては、冷凍による殺滅効果を検討し、飲食に伴う健康被害が防止されるかを、今後明らかにする必要がある。

一方で、低温耐性が非常に強い寄生虫の存在が知られる。ある種の旋毛虫がその例となる。

この種は我が国の野生動物にも寄生しており、野生動物から飼育豚に汚染が広がる危険性もある。感染源となり得る豚肉の汚染を「と畜場法」に則して検査する必要がある、また旋毛虫類に係る食肉(豚肉)の規格基準の導入を我が国でも検討する必要がある。

宮崎肺吸虫のメタセルカリアは、ウェステルマン肺吸虫よりも冷凍耐性が高く、中間宿主サワガニを-18℃で100分間冷凍しても、実験マウスへの感染を完全には予防できなかった。有効な冷凍条件を再検討する必要がある。また猫回虫以外の*Toxocara*属回虫に対する冷凍条件の検討が必要である。

深海魚のキンメダイからも、*As*や*Ap*とは異なる稀有な人体寄生種*A. physeterisga*が多数検出された。注意が必要である。サバの加工食品等からもアニサキス*As*が検出された。死滅虫体であるために、感染の危険性はないが、アニサキス・アレルギーなどの健康被害の原因にもなり得ることから、対策が必要と考えられた。

E. 結論

本研究では、微生物(細菌・寄生虫)学的リスクを主眼においた食品の分類表を提案した。国内の食品汚染実態・食中毒発生状況の情報の収集と食品衛生法における規格基準の設定を比較することで、(1)今後汚染実態調査が必要となるであろう、あるいは(2)現行の食品衛生法では規格基準が設定されていない、食品病原微生物の組み合わせ例を挙げることができた。また、食中毒に関連する寄生虫情報、国内情勢に即した監視対象微生物の設定、食品衛生行政における食品分類の国際統一化等が、今後の食品衛生上での微生物危害を精査する上で重要であるとの結論を得た。野菜を具体例として行った試験を通じ、食品の衛生検査に使用される指標菌の適性を考慮すべきであることが明らかとなった。すなわち、食品の衛生管理に用いる指標菌の設定については、個々の食品の特性を捉

えた上で考慮するのが理想であり、構成細菌叢の把握はその検討にあたって重要な基礎的知見の集積に有用と考えられた。

新たな判定基準を追加する3クラス抜取検査方式を用いることは、抜取検査の性能を改善するという意味で、統計的には合理的である。食品および微生物の特徴に応じたサンプリングプランの設定を行う必要がある。その際、Bayes統計学の枠組みで捉え、サンプリングプランを定期的に評価し、更新していくべきであると考えられた。

今回、サンプリングプランを数理ソフトウェアでプログラム化し、OC 曲線・OC 曲面のグラフを描画できるようにした。汚染濃度に正規分布を仮定した場合のサンプリングプランを数理ソフトウェアでプログラム化し、様々な設定の下で平均汚染濃度 vs ロット合格率のグラフを描画できるようにした。

種々の食品に寄生虫の汚染はあるが、冷凍の応用や関連法規の整備等により寄生虫感染の予防を図ることが期待された。肺吸虫の感染を予防するためのサワガニの冷凍条件として、-80・50分間あるいは-18・100分間処理が有効であると再確認された。

F. 健康危険情報

平成23年度に「サワガニ体内に寄生する肺吸虫」について、厚生労働省健康危機管理調整官宛に通知した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asakura H, Momose Y, Kasuga F. (2011) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* - Its control from a viewpoint of food safety-. J Disas Res. 6: 426-434.
2. Asakura H, Saito E, Momose Y, et al. (2012) Prevalence and growth kinetics of

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine offal products in Japan. Epidemiol Infect. 140: 655-664.

3. Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. (2012) General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. Microbiol Immunol. In press.
4. Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino S, Igimi S, Yamamoto S. (2012) Membrane topology of Salmonella invasion protein SipB confers osmotolerance. Biochem Biophys Res Commun. 426 (4): 654-658.
5. Asakura H, Momose Y, Ryu CH, Kasuga F, Yamamoto S, Kumagai S, Igimi S. (2013) *Providencia alcalifaciens* causes barrier dysfunction and apoptosis in tissue cell culture: potent role of lipopolysaccharides on diarrheagenicity. Food Addit Contam. In press.
6. Sugiyama, H., Shibata. K., Morishima. Y., Muto, M., Yamasaki, H., Kawakami, Y. Current status of lung fluke metacercarial infection in freshwater crabs in the Kawane area of Shizuoka Prefecture, Japan. Journal of Veterinary Medical Science 75, in press, 2013.
7. 杉山 広. 生食による寄生虫感染症のリスク, In 生食のおいしさとリスク(一色賢司編). エヌ・ティ・エス,印刷中,東京,2013.
8. 杉山 広. 食品による寄生動物感染症 7. 蠕虫感染症 (2) 肺吸虫. 日本防菌防黴学会誌, 41, 印刷中, 2013.
9. Sugiyama, H., Singh, T.S. and Rangsiruji, A. Paragonimus (Chapter. 39). In Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens, (Liu, D.-Y., ed.), pp.

- 421-433, CRC press, Boca Raton, 2012.
10. Taira, K., Saitoh, Y., Okada, N., Sugiyama, H., Kappel, C.M.O. Tolerance to low temperatures of *Toxocara cati* larvae in chicken muscle tissue. *Veterinary Parasitology* 189, 383-386, 2012
 11. 杉山 広, 柴田勝優, 森嶋康之, 山崎 浩, 川上 泰. 肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ冷凍条件の検討. *Clinical Parasitology* 23, 57-59, 2012.
 12. 杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 春日文子. 食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出(続報). *病原微生物検出情報* 32, 172-173, 2011.
 13. 鈴木 淳, 村田理恵, 貞升健志, 甲斐明美. アニサキス感染事例およびサバ加工食品におけるアニサキスの寄生状況. *Clinical Parasitology* 22, 82-84, 2011.
 14. 杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 柴田勝優, 川上 泰. 肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ加熱条件の検討. *Clinical Parasitology* 21, 43-45, 2010.
 15. 杉山 広. 食品と寄生虫感染症. *日本食品衛生学雑誌* 51, 285-291, 2010.
 16. 杉山 広. 食品媒介寄生虫による食中毒. *日本食品微生物学雑誌* 27, 1-7, 2010.
- The 7th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses, December 15, 2012, Bangkok, Thailand.
3. 杉山 広, 柴田勝優, 森嶋康之, 山崎 浩, 川上 泰. 肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ冷凍条件の検討. 第 23 回日本臨床寄生虫学会, 東京, 2012 年 6 月.
 4. 杉山 広. アニサキスを原因とする食中毒. 第 153 回日本獣医学会学術集会・公衆衛生学分科会シンポジウム, 大宮, 2012 年 3 月.
 5. Taira K, Saitoh Y, Kapel C.M.O. *Toxocara cati* larvae persist and remain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Buenos Aires, August 2011.
 6. Sugiyama, H., Umehara, A., Kawakami, Y., Ohmae, H., Ooi, H.-K., Uchida, A. Molecular identification of *Anisakis* type I larvae from hairtail fish in Taiwan and Japan. The 23rd International Conference of the World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP 2011), Buenos Aires, August 2011.
 7. 鈴木 淳, 村田理恵, 貞升健志, 甲斐明美. アニサキス感染事例およびサバ加工食品におけるアニサキスの寄生状況. 第 22 回日本臨床寄生虫学会, 東京, 2011 年 7 月.
 8. 杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 柴田勝優, 川上 泰. 肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ加熱条件の検討. 第 21 回日本臨床寄生虫学会, 栃木, 2010 年 6 月.

2. 学会発表

1. Asakura H, Makino S, Okada Y, Kasuga F, Yamamoto S, and Igimi S. In vivo passage modulates acid tolerance responses in *Listeria monocytogenes*. International Association of Food Protection, 2010 Annual Meeting (2010.08) in CA, USA.
2. Sugiyama H. Current status of paragonimiasis in Japan: Infections associated with exotic dietary habits.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiroshi Asakura, Yoshika Momose, and Fumiko Kasuga	Enterohemorrhagic Escherichia coli - Its Control from a Viewpoint of Food Safety -	Journal of Disaster Research	Vol.6No.4	426-434	2011
Hiroshi Asakura, Keiko Kawamoto, Yumiko Okada, Fumiko Kasuga, Sou-ichi Makino, Shigeki Yamamoto, Shizunobu Igimi	Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of Listeria monocytogenes	Infection, Genetics and Evolution	12	94-101	2012
H.Asakura, E.Saito, Y.Momose, T.Ekawa, M.Sawada, A.Yamamoto, A.Hasegawa, J.Iwahori, T.Tsutsui, K.Osaka, T.Matsushita, M.Kakinuma, K.Motoyama, Y.Hayama, H.Kitamoto, S.Igimi and F.Kasuga	Prevalence and growth kinetics of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) in bovine offal products in Japan	Epidemiol. Infect.	140	655-664	2012
Hiroshi Asakura, Tomoya Ekawa, Naoki Sugimoto, Yoshika Momose, Keiko Kawamoto, Sou-ichi Makino, Shizunobu Igimi, Shigeki Yamamoto	Membrane topology of Salmonella invasion protein SipB confers osmotolerance	Biochemical and Biophysical Research Communications	426	654-658	2012
Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K.	General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in Salmonella enterica.	Microbiol Immunol.	<i>In press</i>		2012
Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino S, Igimi S, Yamamoto S	Providencia alcalifaciens causes barrier dysfunction and apoptosis in tissue cell culture: potent role of lipopolysaccharides on diarrheagenicity.	Food Addit Contam.	<i>In press</i>		2013
杉山 広	食品と寄生虫感染症	日本食品衛生学雑誌	Vol.51,No.6	285-291	2010
杉山 広	食品媒介寄生虫による食中毒	日本食品微生物学雑誌	27(1)	1-7	2010

杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 柴田勝優, 川上 泰	肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ加熱条件の検討	Clinical Parasitology	Vol.21, No.1	43-45	2010
杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 春日文子	食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出(続報)	病原微生物検出情報	Vol.32, No.6	172-173	2011
鈴木 淳, 村田理恵, 貞升健志, 甲斐明美	アニサキス感染事例およびサバ加工食品におけるアニサキスの寄生状況	Clinical Parasitology	Vol.22, No.1	82-84	2011
Kensuke Taira, Yasuhide Saitoh, Natsuki Okada, Hiromu Sugiyama, Christian M.O. Kapel	Tolerance to low temperatures of <i>Toxocara cati</i> larvae in chicken muscle tissue	Veterinary Parasitology	189	383-386	2012
杉山 広, 柴田勝優, 森嶋康之, 山崎浩, 川上 泰	肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ冷凍条件の検討	Clinical Parasitology	Vol.23, No.1	57-59	2012
Hiromu SUGIYAMA, Katsumasa SHIBATA, Yasuyuki MORISHIMA, Maki MUTO, Hiroshi YAMASAKI and Yasushi KAWAKAMI	Current Status of Lung Fluke Metacercarial Infection in Freshwater Crabs in the Kawane Area of Shizuoka Prefecture, Japan	Journal of Veterinary Medical Science	75		2013
杉山 広	食品による寄生動物感染症 7. 蠕虫感染症 (2) 肺吸虫	日本防菌防黴学会誌	Vol.41, No.3	165-171	2013

書籍

著者氏名	タイトル	書籍名	出版社	ページ	出版年
(Chapter. 39 を執筆) Hiromu Sugiyama, Takhellambam Shantikumar Singh, and Achariya Rangsiruji	Paragonimus(Chapter. 39)	Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens, (Liu, D.-Y., ed.)	CRC press, Boca Raton	421-433	2012
杉山 広	生食による寄生虫感染症のリスク	生食のおいしさとリスク(一色賢司編)	エヌ・ティ・エス, 東京	印刷中	2013