

氏 名 (本 國 籍)	岸 本 満 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 346 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 9 月 10 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	調理施設における食中毒菌伝播動態の遺伝子多型解析
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 高見澤 一 裕 副査 岐阜大学 教授 大 橋 英 雄 副査 静岡大学 教授 田 原 康 孝 副査 信州大学 教授 柴 井 博四郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

食品由来細菌の二次汚染に関する研究は、食品の微生物的リスク評価に有用な情報を提供できる。特に手指を介した細菌の伝播実態、細菌伝播量、移行率、伝播の変動要素等が危害分析のためのデータとして望まれている。

調理過程における細菌の伝播率や調理操作ごとの伝播実態が予測できれば、的確かつ効率的な対策を講じることができる。しかし、微生物学的リスク評価のための科学的データは世界的に不足しており、特に手指を介した二次汚染に関する研究、暴露評価（汚染菌数や汚染頻度の分析）を行った研究が少ない。

調理過程におけるリスク評価を行うためには、食品由来または二次汚染する食中毒菌の存在を明らかにする必要がある。また、その汚染経路や原因（汚染源）を追跡するための有効な道具が必要である。

本研究の目的は手指を介した細菌の伝播率を明らかにすること、そして食中毒菌の伝播実態の解析手法を開発することである。本研究成果は食品取り扱い施設におけるリスク評価に有用な科学的データを提供する。

はじめに、調理過程の二次汚染のうち、手指を介した細菌の伝播実態を解析するために非病原性大腸菌 (*E.coli* JCM1649 株) 用いてモデル実験を行った。本実験の目的は、調理操作中の手指から食品への細菌伝播率（移行率）を明らかにすることである。

調理操作中に大腸菌が手指から食品へ移行した割合（移行率）はマグロでは $1.60 \pm 1.80\%$ (平均±標準偏差)、キャベツで $1.30 \pm 1.14\%$ (平均±標準偏差) だった。また、両者の母平均に有意差はなかった。手のひらに包み込むように食品を握んだ場合は、食品の特性に関係なく同様の様式で菌が移行したと考えられた。手指から食品へ移行する菌量は対数正規分布に従った。

次に食品由来細菌の手指への伝播率（移行率）を明らかにするため、食品取り扱い前後の手指の生菌数を計測し、その増加菌量より移行率を計算した。鶏挽肉を捏ねたとき、菌の移行率は0.063～0.346%、もやしの種等を摘み取ったとき、0.011～0.019%、あさり水中でかき混ぜたとき、1.200～7.333%だった。

3 食品のうち生菌数が多いものほど、手指への移行率は低かった。食品生菌数と、手指への菌移行率は負の相関があることがわかったが、食品の取り扱い方、すなわち手指と食品の接触様式も移行率に影響したと考えられた。

次に、調理施設等から採取した黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の遺伝子多型解析を行い、伝播実態を明らかにした。遺伝子多型解析法としてリボタイピング法、PFGE

(Pulsed-field Gel Electrophoresis) 法、BSFGE (Biased sinusoidal field gel electrophoresis) 法、RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis) 法を用いた。また、PFGE 法は感染菌や食中毒菌の遺伝子多型解析で標準的方法として多くの調査で実績をあげており、本研究では PFGE 法および BSFGE 法と同等の型別結果が得られる RAPD 法の開発を試みた。

一般調理施設(1)より分離した黄色ブドウ球菌 66 株は、リボタイピングでは 39 型(リボグループ)に、PFGE および BSFGE 法では 12 型に、RAPD 法では 11 型に別けられた。PFGE 法および BSFGE 法型別では両者は完全に一致したが、RAPD 法と PFGE 法型別では 8 型(73%)が一致した。型別結果を基に伝播経路を解析したところ、リボタイピング型別では 5 系統、PFGE, BSFGE および RAPD 型別では 2 系統の汚染経路があることが推定された。

次に、RAPD 法による型別の実用性を評価するため、一般調理施設(2)および大量調理施設から分離した *S. aureus* を RAPD 法と BSFGE 法により型別した。一般調理施設(2)より分離した 7 株は両型別で完全に一致した。大量調理施設より分離した 53 株は RAPD 法により 5 型に、BSFGE 法により 4 型に別けられ、3 型(60%)が一致した。型別結果を基に伝播経路を解析したところ、RAPD 型別、BSFGE 型別ともに両施設併せて 4 系統の汚染経路があることが推定された。RAPD 法は識別能が若干劣るが、迅速性および簡便性の特徴を有しており *S. aureus* の汚染源調査等に十分に活用できると考えられた。

以上、本論文の成果は、調理過程における手指と食品間の細菌伝播率を明らかにしたこと、そして *S. aureus* の汚染源、汚染経路解析のための RAPD 法を確立したことである。

審 査 結 果 の 要 旨

食中毒の予防は古くて新しい問題であり、特に、汚染源の迅速かつ鋭敏な診断方法の確立が大切である。本研究は手指を介した細菌の伝播率を明らかにすること(第1章)、そして食中毒菌の伝播実態の解析手法として各種遺伝子解析技術を研究した(第2章)。

第1章では、調理過程の二次汚染のうち、手指を介した細菌の伝播実態を解析するために非病原性大腸菌(*E. coli* JCM1649 株)を用いてモデル実験を行った。調理操作中に大腸菌が手指から食品へ移行した割合(移行率)はマグロでは $1.60 \pm 1.80\%$ (平均±標準偏差)、キャベツで $1.30 \pm 1.14\%$ (平均±標準偏差)だった。手のひらに包み込むように食品を握んだ場合は、食品の特性に関係なく同様の様式で菌が移行し

たと考えられた。手指から食品へ移行する菌量は対数正規分布に従った。次に食品由来細菌の手指への伝播率（移行率）を明らかにするため、食品取り扱い前後の手指の生菌数を計測し、その増加菌量より移行率を計算した。鶏挽肉を捏ねたとき、菌の移行率は 0.063～0.346%、もやしの種等を摘み取ったとき、0.011～0.019%、あさり水中でかき混ぜたとき、1.200～7.333%だった。3 食品のうち生菌数が多いものほど手指への移行率は低かった。食品生菌数と、手指への菌移行率は負の相関があることがわかったが、食品の取り扱い方、すなわち手指と食品の接触様式も移行率に影響したと考えられた。

第 2 章では、調理施設等から採取した黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の遺伝子多型解析を行い、伝播実態を明らかにした。遺伝子多型解析法としてリボタイピング法、PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) 法、BSFGE (Biased sinusoidal field gel electrophoresis) 法、RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis) 法を用いた。また、PFGE 法は感染菌や食中毒菌の遺伝子多型解析で標準的方法として多くの調査で実績をあげており、本研究では PFGE 法および BSFGE 法と同等の型別結果が得られる RAPD 法の開発を試みた。

一般調理施設 (1) より分離した黄色ブドウ球菌 66 株は、リボタイピングでは 39 型 (リボグループ) に、PFGE および BSFGE 法では 12 型に、RAPD 法では 11 型に別けられた。PFGE 法および BSFGE 法型別では両者は完全に一致したが、RAPD 法と PFGE 法型別では 8 型 (73%) が一致した。型別結果を基に伝播経路を解析したところ、リボタイピング型別では 5 系統、PFGE, BSFGE および RAPD 型別では 2 系統の汚染経路があることが推定された。

次に、RAPD 法による型別の実用性を評価するため、一般調理施設 (2) および大量調理施設から分離した *S. aureus* を RAPD 法と BSFGE 法により型別した。一般調理施設 (2) より分離した 7 株は両型別で完全に一致した。大量調理施設より分離した 53 株は RAPD 法により 5 型に、BSFGE 法により 4 型に別けられ、3 型 (60%) が一致した。型別結果を基に伝播経路を解析したところ、RAPD 型別、BSFGE 型別ともに両施設併せて 4 系統の汚染経路があることが推定された。RAPD 法は識別能が若干劣るが、迅速性および簡便性の特徴を有しており *S. aureus* の汚染源調査等に十分に活用できると考えられた。

以上、本論文は、調理過程における手指と食品間の細菌伝播率を明らかにしたこと、そして *S. aureus* の汚染源、汚染経路解析のための RAPD 法の有用性を証明した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文は、以下に発表した。

1. Ribotyping and a study of transmission of *Staphylococcus aureus* collected from food preparation facilities; Journal of Food Protection, 2004, 67, 1116-1122, Kishimoto, M., Hioki, Y., Okano, T., Konuma, H., Takamizawa, K., Kashio, H. and Kasuga, F.
2. 調理施設から採取された黄色ブドウ球菌の RAPD-PCR、BSFGE および PFGE による遺伝子多型解析. 日本食品微生物学会雑誌, 2004, 印刷中, 岸本満、鈴木匡弘、森田妃美子、丹羽珠梨、檜尾一、日置祐一、岡野哲也、小沼博隆、高見澤一裕、春日文子