

大量調理施設における衛生検査手法についての検討

坂本 薫¹, 田畑 尚子, 森井 沙衣子¹, 田中 更沙¹, 北元 憲利¹

人間環境部門, ¹先端食科学研究センター

A Study on the Sanitation Inspection in Food Service Facilities

Kaoru SAKAMOTO, Naoko TABATA, Saeko MORII, Sarasa TANAKA, Noritoshi KITAMOTO

School of Human Science and Environment, and
Research Institute for Food and Nutritional Science, University of Hyogo
1-1-12 Shinzaike-honcho, Himeji, 670-0092 Japan

Abstract; In food service facilities, the sanitation management is essential. However, it takes much cost and effort. We investigated the sanitation inspection in food service facilities by several sanitary test and immunochromatography test. Commercial sanitary test kit is convenient and suitable for sanitation inspection of food service facilities. It is difficult to conduct sanitation inspection in all food service facilities because of costs. However, our results suggested that it is indispensable for sanitation management. It is required to develop a sanitation inspection kit that is inexpensive, multiple and easy to use.

Keywords; food service facilities, sanitation inspection, immunochromatography

1. はじめに

平成 10 年の食中毒の事件は 3000 件を超え、患者数も 4.3 万人と多かった。しかし、それ以降の食中毒の発生病件数、患者数はともに減少傾向にあり、平成 20 年以降の食中毒患者数は毎年 2 万人程度で推移している¹⁾。食中毒は一年中発生しており、その原因はウイルスや寄生虫、またはキノコのような自然毒など様々である。平成 27 年における食中毒は 1202 件、患者数は 2.2 万人と報告²⁾されており、そのうちの約 35% は細菌が原因となって発生した食中毒である³⁾。飲食店や仕出屋などの施設が原因となっており、食事を提供する施設における衛生管理の重要性は明らかである。

厚生労働省は集団給食施設等における食中毒予防のための衛生管理方法として、HACCP の概念に基づいた調理過程における重要管理事項「大量調理施設衛生管理マニュアル」を作成している⁴⁾。特定多数の集団に給食を提供する大量調理施設では、衛生的に食品を取り扱うことが義務づけられ、その方法がマニュアル化されている。しかし、衛生状態を確認するための衛生検査は、コストや手間がかかるため実際の厨房では実施困難なことが多

い。そこで本研究では、大量調理施設に適した衛生検査法を見いだすために、本学の給食管理実習において、市販の衛生検査キット、および作製した平板培地などを用いて衛生検査を実施し、衛生検査の手法による差について検討することとした。またその結果から、検査手法ごとのメリット、デメリットを調査し、それぞれに適した検査箇所についても考察を加えた。

2 実験方法

2. 1 衛生検査実施場所

衛生検査は、平成 27 年の 6 月、7 月に実施した給食管理実習中の大量調理施設で行った。衛生検査実施回数は 6 回とした。給食管理実習とは、兵庫県立大学環境人間学部食環境栄養課程の 3 年次に開講される実習である。食品の発注から検収、調理、配膳、洗浄など一連の作業を行いながら、大量調理の流れおよびマネジメント方法を学ぶ実習であり、すべての洗浄作業は「調理場における洗浄・消毒マニュアル Part1」⁵⁾、「調理場における洗浄・消毒マニュアル Part2」⁶⁾、「学校給食調理場における手洗いマニュアル」⁷⁾に準じて実施している。本実験で行っ

た衛生検査実施場所は表 1 に示したとおりである。調理員の手洗い前と手洗い後の手指および手袋着用後の手指の検査に関しては、パームチェックを用いた方法と ATP ふき取り検査のみ実施した。調理員の手洗い方法は、学校給食調理場における手洗いマニュアル⁷⁾の「標準的な手洗いマニュアル」に示された方法とした。また、実施に際しては、給食管理実習を行う 3 年生および本研究室学生の協力により、4 名体制で実習中の衛生検査を実施した。

表 1 衛生検査実施場所

検査箇所	平板	スタンプ	シート	ATP ふき取り	イムノク ロマト
床(検収室) 使用後	○	○	○	○	○
床(主調理室) 使用後	○	NT	○	NT	○
包丁 使用前	○	NT	○	NT	○
包丁 使用後	○	NT	○	NT	○
まな板 使用前	○	○	○	○	○
まな板 使用後	○	○	○	○	○
布巾 使用前	○	NT	○	NT	○
布巾 使用後	○	NT	○	NT	○
配膳台 使用後	○	○	○	○	○
スチコン取っ手 使用後	○	○	○	○	○
冷蔵庫取っ手	○	○	○	○	○

○ : test, NT : Non-Test

2. 2 平板培地による衛生検査方法

平板培地の種類は普通寒天培地(一般細菌, 日水製薬(株)), マンニット食塩培地(ブドウ球菌, 日水製薬(株)), SSB 寒天培地(腸内細菌・サルモネラ・赤痢, 日水製薬(株)), TCBS 寒天培地(コレラ菌・腸炎ビブリオ, 日水製薬(株)), マッコンキー寒天培地(腸内細菌・大腸菌, 日水製薬(株))の 5 種類とした。各培地は蒸留水に溶解し、オートクレーブで加熱滅菌処理を行った後、滅菌済みシャーレに分注した。検体はリン酸緩衝生理食塩水(以下 PBS, NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, pH 7.4)で湿らせた滅菌済み綿棒で拭き取って採取し、それぞれの培地に塗布した。その後、35°C, 48 時間インキュベーターで培養し、集落数のカウントを行った。各培地における集落の判別方法は日水製薬の使用書のとおりとした。内容を以下に示す。

(1) 普通寒天培地

- ・表面に発育したすべての集落

(2) マンニット食塩培地

- ・黄色ブドウ球菌は黄色の帯に囲まれた黄色集落

(3) SSB 寒天培地

- ・サルモネラ, 赤痢菌は淡青色の半透明集落

- ・乳糖白糖分解菌は赤紫色の混濁した集落

(4) TCBS 寒天培地

- ・コレラ菌のような白糖分解菌は混濁した黄色集落
- ・腸炎ビブリオのような白糖非分解菌は中心部が緑青色の集落

(5) マッコンキー寒天培地

- ・大腸菌は赤褐色を呈し、周囲に淡桃色～赤褐色の沈殿を生じる集落

2. 3 スタンプ培地による衛生検査方法

食品・環境衛生検査用フードスタンプ「ニッスイ」(日水製薬(株))を用いて衛生検査を行った。フードスタンプは検体に押し付けるだけでサンプリングすることができる簡便な衛生検査法である。本実験で使用した培地は、標準寒天(生菌数), X-SA 寒天(黄色ブドウ球菌), MLCB 寒天(サルモネラ), TCBS 寒天(腸炎ビブリオ), XM-G 寒天(大腸菌・大腸菌群)の 5 種類とした。検体にフードスタンプの寒天部分を押し付け、35°C, 20 時間(XM-G 寒天のみ)もしくは 24 時間インキュベーターで培養し、集落数のカウントを行った。各スタンプの集落の判別は製品の使用書⁸⁾のとおりとした。内容を以下に示す。標準寒天培地は Ten Cate, L⁹⁾の評価方法に従い、表 2 のように判別した。

(1) 標準寒天

- ・表面に発育したすべての集落(表 2)

(2) X-SA 寒天

- ・表面に発育した青(水)色の凸レンズ状で、正円・湿潤・光沢のある集落

(3) MLCB 寒天

- ・表面に発育した中心部が黒色の集落

(4) TCBS 寒天

- ・表面に発育した緑色(腸炎ビブリオ)および黄色(V. alginolyticus)集落

(5) XM-G 寒天

- ・大腸菌は表面に発育した青色(青～青紫)集落
- ・大腸菌群は表面に発育した赤色(桃～赤紫)集落

表 2 スタンプ培養による標準寒天(生菌数)の評価法

判定基準	集落数
ごくわずかに汚染(±)	<10
軽度に汚染(+)	10~29
中等度に汚染(++)	30~99
重度に汚染(+++)	>100

2. 4 シート培地による衛生検査方法

シート培地サニ太くん (JNC (株)) を用いて衛生検査を行った。サニ太くんは、あらかじめ滅菌希釈液 (PBS) をシート培地に添加し、直接検体をスタンプする方法と検体を綿棒で拭き取り、綿棒に付着した菌を希釈液に溶かし出し、シート培地に添加する方法がある。本実験では、簡便な衛生検査法の比較を行うことを目的としているため、シート培地に直接スタンプを行う方法を採用した。シート培地は、一般生菌用、黄色ブドウ球菌用、サルモネラ用、大腸菌・大腸菌群用の4種類とした。サニ太くんの取り扱い説明書¹⁰⁾の使用手順に従い、シート培地に検体をスタンプした後、35℃、24時間 (一般生菌用のみ) もしくは48時間インキュベーターで培養し、集落数のカウントを行った。各培地における集落の判別方法についても取扱説明書¹⁰⁾に従った。内容を以下に示す。

(1) 一般生菌用

- ・赤色に発色した集落。集落がカウントできない場合は、発色見本表¹⁰⁾を用いて約 1×10^2 、約 1×10^3 、約 1×10^4 、約 1×10^5 、約 1×10^6 以上、と評価

(2) 黄色ブドウ球菌用

- ・黒いスポットに周りが青く発色した集落

(3) サルモネラ用

- ・鮮明な青色～緑色の集落
- ・大腸菌群は紫色の集落

(4) 大腸菌・大腸菌群用

- ・大腸菌群は青色～うす緑色または藍色に発色した集落
- ・大腸菌は藍色に発色した集落

2. 5 ATP 拭き取り検査による衛生検査

ATP+AMP 拭き取り検査とは、微生物および食品残渣などに存在する ATP、AMP 量を測定することで、簡便に手指や調理器具などが清潔に保たれているかを検査する方法である。ATP 拭き取り検査にはルミテスター

表3 ATP 拭き取り検査による実測値 (RLU) の清浄度ランク基準

清浄度ランク	実測値(RLU)
きれい	I <200
	II 201~500
	III 501~1000
	IV 1001~2500
	V 2501~5000
汚い	VI 5001~10000
	VII 10001~25000
	VIII 25001~50000
	IX >50000

PD-20、およびルシパック Pen (キッコーマン (株)) を使用した。測定は、検体を水道水で濡らしたルシパック Pen の綿棒で拭き取り、それをルミテスターPD-20 にセットした。セット後30秒でRLU値(ATP拭き取り検査実測値)が示されるので、測定されたRLU値をI~IXにランクづけした清浄度ランク¹¹⁾に従い、判定を行った。ランクを表3に示す。ATPふき取り検査は、表1に示した検査実施場所および、調理員6名の手洗い前後の手指、調理員6名の手袋着用後の手指について衛生検査を行った。

2. 6 パームチェックによる手指の衛生検査

パームチェック (株) 日研生物医学研究所とは、手のひらの形をした寒天培地に手を押し付けて培養するだけで、手指や手のひら全体に付着している細菌や真菌による汚染を簡易に検査することができる培地である。パームチェックには標準寒天培地 (一般細菌) を用いた。検査する手のひらを培地表面に密着させ、培地が割れない程度で押し付け、フタを閉じて35℃、24時間インキュベーターにて培養した。培養後、培地全体に発育したすべての集落数を測定し、パームチェックの簡易判定表¹²⁾にて「軽度の汚染」、「中度の汚染」、「重度の汚染」の3段階の評価とした。パームチェックは、ATPふき取り検査と同一の手指について検査を行った。

表4 パームチェック (一般細菌) による汚染度判定基準

判定の区分	菌数/平板
軽度の汚染(+)	100未満
中度の汚染(++)	100~300未満
重度の汚染(+++)	300以上

2. 7 イムノクロマト法による衛生検査

イムノクロマト法は毛細管現象を応用した免疫測定法である。抗原抗体反応により、検体溶液中の抗原と金コロイド標識抗体が反応することで免疫複合体を形成し、この複合体がテストライン上に固相化されている抗体に捕捉され、その結果、テストラインが出現する。さらに、抗原と結合していない金コロイド標識抗体も移動し、コントロールライン上の抗体に捕捉されるため、抗原の有無に関わらずコントロールラインも出現する¹³⁾。

この検査法は、イムノクロマトキットであれば操作が簡便で、目視により判定ができ、測定時間も一般的に15分程で結果を得られるため利便性が高い。しかし、イムノクロマト法で食中毒菌を検出するキットは多く開発されているとはいえない。そこで、本研究では既存の衛生

検査法のみだけではなく、先行研究¹⁴⁾に準じたイムノクロマト法による黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシンの検出を試みることにした。

2. 7. 1 試料

抗体等は、以下を使用した。

- (1) 市販精製黄色ブドウ球菌培養上清を免疫源として作成した抗エンテロトキシン抗体 (姫路分離株) : 市販精製黄色ブドウ球菌に対する単クローン抗体 108 および 1006 (北元研究室作製) (ウエスタンブロット法で市販精製エンテロトキシンに反応)
- (2) 抗黄色ブドウ球菌抗体 (抗血清) (バイオトレンドケミカル社)
- (3) 抗IgG 抗体 (AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC.)

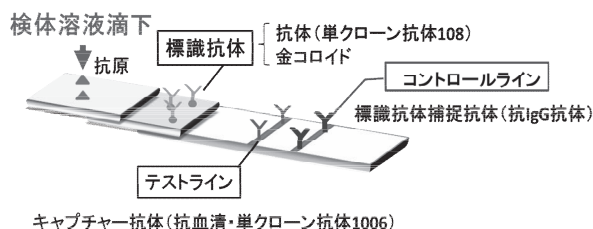


図 1 イムノクロマト法における抗体使用状況

2. 7. 2 検体の採取方法

検体は PBS で湿らせた綿棒 (滅菌済み) で拭き取り、PBS 2.0 ml が入った滅菌容器に入れ、冷凍保存したものを使用し、作成したサンプルパッドを用いてイムノクロマト法による判定を行った。

2. 7. 3 テストストリップの作成

テストストリップの作成は、スロットブロット法により行った。ニトロセルロース膜は GE ヘルスケア・ジャパン株式会社製の Nitrocellulose Blotting Membrane を使用した。バイオドット SF 装置 (BIO-RAD 社製) を用いて抗体をブロッティングした。コントロールラインには抗 IgG 抗体、テストラインには抗血清または単クローン抗体 1006 を用いた。ブロッティングには 5 % スキムミルク添加 5 mM リン酸緩衝液を用いた。

2. 7. 4 抗原との反応

抗原との反応は、ハーフストリップ法により行った。96 well マイクロプレートに検体溶液 50 μ l と金コロイド標識抗体溶液 30 μ l または 15 μ l を添加し、作成したテストストリップに反応させた。

2. 7. 5 金コロイド標識抗体の作製

金コロイド標識抗体は、(株) ワインレッドケミカルの金コロイド抗体コンジュゲート法に従って作製した。標

識抗体としては、単クローン抗体 108 を使用した。

3 結果と考察

3. 1 調理施設、調理器具の衛生検査結果

衛生検査手法の異なる衛生検査結果を表 5 に示した。一般細菌は調理後の床や包丁、まな板の使用後に多く検出される傾向があった。一般細菌用の培地では病原菌の有無については判定することができないが、包丁やまな板は直接食物に触れているため、菌が多く検出されたと考えられた。床についても菌が検出されているが、汚染区域である検収室の床は、外部から直接持ち込まれる野菜の汚れや包装などに付着しているものが影響していると考えられる。一方、清潔区域である主調理室の床は、調理時に飛沫が飛び散ったことや洗浄水の跳ね水などで床が汚染されたと推察された。

黄色ブドウ球菌の多くは、100°C 30 分の加熱でも破壊されない嘔吐毒素を食品中で産生するため、毒素を産生させないように食品の汚染や菌の増殖を防ぐことが重要であるとされている¹⁵⁾。本実験の結果において、黄色ブドウ球菌は床 (検収室、主調理室) や包丁、まな板の使用後に検出され、さらに使用後の布巾、パススルー冷蔵庫の取っ手なども検出される傾向にあった。黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚表面に存在している細菌であるため、布巾やパススルー冷蔵庫の取っ手など調理員の手指が触れる箇所からも検出されたと考えられた。検査を行った布巾は主調理室で使用した布巾であるが、調理中に汚染されたことが示唆されたため、用途別に布巾を用意する、使い回しを避け 1 回使用した布巾は使用しない、などの対応が必要であることが確認された。

サルモネラ菌は哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類の腸管内に広く分布しており、主に卵や食肉などが感染源となることが多い食中毒菌である¹⁵⁾。衛生検査においてサルモネラ菌は床 (検収室、主調理室) や包丁、まな板の使用後に検出され、スチームコンベクションオープン (以下、スチコン) でも 1 回検出された。スチコンの取っ手で菌が検出されたことについては、未加熱の食品に触れた調理員の手指によって汚染したと考えられた。サルモネラ菌は少量でも食中毒症状を発症するため、給食従事者への衛生面の教育が必要である。

腸炎ビブリオ菌はサルモネラ菌と並んでわが国の二大食中毒菌であり、その原因食品は魚介類の生食と、魚介類からの二次汚染食品である。腸炎ビブリオは海水菌であり、真水や 10°C 以下の低温に弱いいため、生鮮魚介類を処理する際には水道水でよく洗浄し、冷蔵保存することが食中毒防止に有効である¹⁵⁾。本研究においては、腸炎

表5 衛生検査手法の異なる衛生検査結果

回	検査箇所	細菌検査												洗浄度試験			
		一般細菌			黄色ブドウ球菌			サルモネラ菌			腸炎ビブリオ		大腸菌・大腸菌群			ATPふき取り	
		平板	スタンプ*	シート*	平板	スタンプ	シート	平板	スタンプ	シート	平板	スタンプ	平板	スタンプ	シート		
第1回	検収室床	+++	+++	129	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	210,445	IX
	主調理室床	++	NT	15	+	NT	-	-	NT	-	-	-	-	NT	-	NT	
	使用前包丁	±	NT	0	-	NT	-	-	NT	-	-	-	-	NT	-	NT	
	使用后包丁	++	NT	1×10 ³	+	NT	+	-	NT	+	-	NT	+	NT	+	NT	
	使用前まな板	±	±	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,156	IV
	使用后まな板	+++	+++	1×10 ⁵	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	47,457	VIII
	使用前布巾	コンタミ	NT	1	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	使用后布巾	+	NT	12	+	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	配膳台	±	±	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44,532	VIII
	スチコン	±	±	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,065	VII
冷蔵庫取っ手	±	+	103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,823	VII	
第2回	検収室床	+++	+++	143	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	20,049	VII	
	主調理室床	+++	NT	113	+	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用前包丁	±	NT	2	-	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用后包丁	+++	NT	1×10 ³	+	NT	-	-	NT	+	-	NT	+	NT	+	NT	
	使用前まな板	±	±	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87	I
	使用后まな板	++	+++	1×10 ⁴	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	161,835	IX
	使用前布巾	±	NT	6	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	使用后布巾	++	NT	1×10 ²	+	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	配膳台	±	+++	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	スチコン	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,344	VII
冷蔵庫取っ手	++	+++	139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	II	
第3回	検収室床	+++	++	170	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	52,979	IX	
	主調理室床	++	NT	19	+	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用前包丁	±	NT	0	-	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用后包丁	+++	NT	1×10 ³	+	NT	+	-	NT	+	-	NT	+	NT	+	NT	
	使用前まな板	±	±	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,305	IV
	使用后まな板	+++	+++	1×10 ⁴	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	33,636	VIII
	使用前布巾	+	NT	4	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	使用后布巾	++	NT	1×10 ²	+	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	配膳台	+++	±	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44,159	VIII
	スチコン	+	±	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91,934	IX
冷蔵庫取っ手	+++	+	1×10 ²	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32,374	VIII	
第4回	検収室床	++	+++	106	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	33,739	VIII
	主調理室床	±	NT	5	+	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用前包丁	±	NT	4	-	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用后包丁	±	NT	1×10 ²	-	NT	-	-	NT	+	-	NT	+	NT	+	NT	
	使用前まな板	±	±	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	106	I
	使用后まな板	+++	+++	1×10 ³	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	198,782	IX
	使用前布巾	±	NT	0	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	使用后布巾	±	NT	0	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	配膳台	±	±	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,701	VII
	スチコン	+++	+++	1×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	108,334	IX
冷蔵庫取っ手	+++	±	68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,180	IV	
第5回	検収室床	+++	++	22	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	121,482	IX	
	主調理室床	+	NT	8	+	NT	-	-	NT	+	-	NT	+	NT	-	NT	
	使用前包丁	±	NT	2	-	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用后包丁	++	NT	301	+	NT	-	-	NT	+	-	NT	+	NT	+	NT	
	使用前まな板	±	±	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,696	IV
	使用后まな板	+++	+++	1×10 ³	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	246,385	IX
	使用前布巾	±	NT	0	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	使用后布巾	+	NT	29	+	NT	-	-	NT	+	-	NT	+	NT	-	NT	
	配膳台	+	±	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,810	VII
	スチコン	±	±	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,086	VII
冷蔵庫取っ手	±	+	17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,156	VIII	
第6回	検収室床	+++	+++	85	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	22,444	VII	
	主調理室床	+++	NT	1×10 ³	+	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用前包丁	±	NT	1	-	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT		
	使用后包丁	+++	NT	181	-	NT	+	-	NT	-	-	NT	+	NT	+	NT	
	使用前まな板	±	±	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,761	IV
	使用后まな板	++	+++	1×10 ³	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	90,029	IX
	使用前布巾	±	NT	0	-	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	使用后布巾	±	NT	118	+	NT	-	-	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT	
	配膳台	±	±	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,720	V
	スチコン	+	±	16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73,075	IX
冷蔵庫取っ手	++	+	1×10 ²	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	6,610	VI	

【細菌検査（一般細菌）（*一般生菌数）】±：ごくわずかの汚染、+：軽度の汚染、++：中等度の汚染、+++：重度の汚染、数値：集落数、コンタミ：試料汚染、NT：Not-Test

【細菌検査（一般細菌以外）】-：検出なし、+：検出、NT：Not-Test

【洗浄度試験】数値：実測RLU値、ローマ数字：洗浄度ランク、NT：Not-Test

ビブリオは検収室の床と使用後のまな板で1回検出された。腸炎ビブリオは好塩性であるため、食塩が存在しなければ速やかに死滅し、煮沸にも弱い。これらのことから、増殖を抑制するためには、汚染された調理器具の流水洗浄や食材の十分な加熱、また菌を媒介する手指の洗浄が重要であると考えられた。

大腸菌・大腸菌群は、包丁やまな板の使用後で最も多く観察された。次いで床、布巾の使用後やパススルー冷蔵庫の取っ手などからも検出された。大腸菌は自然界に広く分布し、そのほとんどは非病原性である。大腸菌は腸管以外の場所では環境適応力がなく比較的速やかに死滅するため、大腸菌が検出されるということは、比較的新しい糞便汚染があったことを示す。また、大腸菌群は環境水系や汚泥などに広く分布している。そのため、大腸菌群の検出は糞便汚染のみだけではなく、汚水や泥などの感染を意味しており、清潔さを判断する指標として利用されている。しかし、自然環境から採取される野菜や魚介類などの生鮮食品は泥や環境水の一部が残存していることも多いので、大腸菌群が検出されても非衛生状態を意味するものではないとされている¹⁵⁾。検出された菌は大腸菌群ではあるものの、生の食品を扱った手で布巾や冷蔵庫などを触ったために菌が検出されたのではないかと推察した。パススルー冷蔵庫の取っ手は汚染区域である下処理室側の取っ手を検査対象としている。下処理室から主調理室などの非汚染区域へ移動する際は、調理器具などからの二次汚染の可能性を考え、調理担当者における手洗いの順守はもとより、エプロンや履物の交換を徹底しなければならないことが示された。表6は本研究で行った衛生検査手法において、検出結果が異なった割合を示している。この結果からも、衛生検査の手法によって、細菌の検出結果が異なる場合があることが示唆された。

表6 異なる衛生検査手法の検査結果の相違

	一般細菌	黄色ブドウ球菌	サルモネラ菌	腸炎ビブリオ	大腸菌・大腸菌群
第1回	3(27)	4(36)	3(27)	0(0)	1(9)
第2回	2(18)	6(55)	2(18)	1(9)	1(9)
第3回	3(27)	4(36)	3(27)	1(9)	0(0)
第4回	1(9)	3(27)	3(27)	0(0)	1(9)
第5回	1(9)	7(64)	5(45)	0(0)	2(18)
第6回	2(18)	7(64)	1(9)	0(0)	3(27)

すべての検査箇所における異なる検査結果数()は%

検出結果に相違が起こる要因の1つとしては、衛生検査手法の特性によるものが考えられる。平板培地は1つ

の培地にいくつかの細菌が培養されることがあるため判定が困難なことがあり、衛生検査者に熟練した判定技術が必要とされる。また、平板培地作製のための労力、オートクレーブといった機器が必要であるなどといったデメリットがあることから、大量調理施設における平板培地を用いた衛生検査の実施は難しい。フードスタンプによるスタンプ法は表面が平滑である必要があり、また油脂成分が付着している検査対象物には適用できない。しかし、使用方法や判定方法が簡便であり、誰でも手軽に衛生検査を行うことができるため、大量調理現場における衛生検査に適している。シートスタンプ法は、他の衛生検査の手法と比較して培地が乾燥したシートであるため、通常の水分を含んだ培地に比べて、使用期限が長いという特徴がある。また本研究においては、直接スタンプ・拭き取り法に用いたが、他にも食品検査や表面塗抹法・画線培養など目的に合わせて使用できるため、汎用性も高いと推察した。平面である検査対象物にはフードスタンプによるスタンプ法で問題ないが、冷蔵庫の取っ手のような凹凸のあるスタンプすることが難しい箇所には、シート培地によるスタンプ法が凹凸に応じられるため適している。検査対象物によって衛生検査手法を変えることで、正確な衛生検査を行うことが可能であると考えられた。

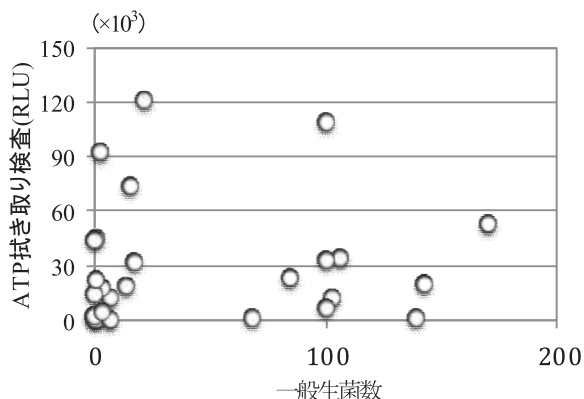


図2 ATP拭き取り検査(RLU)と一般細菌数(シート培地)の関係

ATP拭き取り検査は、検体を拭き取った後、直ちに測定結果を知ることが可能であり、その場で清浄度を判定でき、清浄度が具体的に数値で示されることが利点として挙げられる。ATP拭き取り検査の実測値(RLU値)は床やまな板の使用後、スチコンの取っ手などが高値を示した。ATP拭き取り検査から清潔な状態ではないことは明確となったが、清浄度と細菌による汚染状態に関連があるのかはわからない。そこで、ATP拭き取り検査におけるRLUと一般細菌数(シートスタンプ法)の関係を

図2に示した。ATP 拭き取り検査のRLU と一般生菌数を比較したところ、相関関係は認められなかった。また、第2回と第3回の床（検収室）およびスチコンを比較すると、清浄度ランクは同じであるが、一般生菌数に差があることがわかった。また第2回と第3回と第6回のスチコンおよび冷蔵庫を比較すると、スチコンの清浄度ランクが冷蔵庫より高値を示したのに対し、一般生菌数は冷蔵庫が高い結果となった(表5)。これらの結果からも、ATP 拭き取り検査と一般生菌数に相関関係は認められなかった¹⁶⁾。ATP 拭き取り検査と一般生菌数に相関性が認められなかったことから、ATP 拭き取り検査の清浄度は生菌数を反映しないことが確認された。ATP 拭き取り検査は、主に器具の洗浄後の清浄度を測定する手法であり、調理後の細菌による汚染状態を把握する方法としては適さないが、迅速・簡便な衛生検査キットとして、調理現場で働く人々の衛生管理意識の向上に有用であると考えられた。

3. 2 手指の衛生検査結果

パームチェック、およびATP 拭き取り検査を用いた手指の衛生検査の結果を表7に示した。

表7 手指の衛生検査結果

回	検査箇所	一般細菌		洗浄度	
		パームチェック		ATPふき取り	
第1回	調理員A 手洗い前	++	3,532	V	
	調理員A 手洗い後	+	209	II	
	調理員B 手袋着用後	+++	133,431	IX	
第2回	調理員C 手洗い前	+	732	III	
	調理員C 手洗い後	-	50	I	
	調理員D 手袋着用後	+	2,038	IV	
第3回	調理員E 手洗い前	+	991	III	
	調理員E 手洗い後	+	62	I	
	調理員F 手袋着用後	+	30,959	VIII	
第4回	調理員G 手洗い前	+	14,538	VII	
	調理員G 手洗い後	-	567	III	
	調理員H 手袋着用後	+	41,787	VIII	
第5回	調理員I 手洗い前	+++	6,842	VI	
	調理員I 手洗い後	-	512	III	
	調理員J 手袋着用後	+	6,901	VI	
第6回	調理員K 手洗い前	+++	16,706	VII	
	調理員K 手洗い後	+	1,784	IV	
	調理員L 手袋着用後	+	2,207	IV	

－：汚染なし、＋：軽度の汚染、++：中度の汚染、+++：重度の汚染
 数値：RLU値、ローマ数字：清浄度ランク

パームチェックによる手洗い前と手洗い後を比較すると、個人差があり、手洗い後の汚染度が低くなったのは検査を実施した6人中5人という結果であった。また盛り付け調理時などに用いられる衛生手袋の着用後は、手指が汚染されていることが示唆された。パームチェックは、培地が手のひらの形になっており、手指の汚染され

ている部分が目で判断できることがメリットである。この特徴を活かし、手洗い指導の際に用いることで対象者が手指の汚染部分を把握することができ、より効果的な指導が行えるものと考えられた。

ATP 拭き取り検査による手指の管理基準値は1500以下である¹⁷⁾。すべての結果において、手洗い前後の検査対象者6名は全員、手洗い前より手洗い後の清浄度ランクが下がっていることがわかった(表7, 図3)。しかし第6回では、洗浄度が管理基準値である1500を上回る結果となったことから、すべての調理担当者に適切な手洗い方法を徹底しなければならぬと考えられた。また衛生手袋着用後はRLU値が高くなる¹⁸⁾との報告がある。本研究においても、同様の傾向が確認されたため、衛生手袋着用後の手洗いを徹底する必要があることが明確となった。

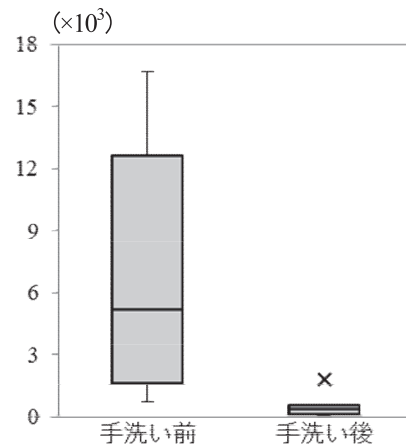


図3 手洗い前後のRLU値の変化(n=6)

先行研究において、ATP 拭き取り検査結果をもとに洗浄法等の指導を行ったところ、汚染度は急速に改善され、調理員の衛生管理意識の向上につながったとの報告¹⁹⁾やルミテスターを導入したATP 拭き取り検査を実施することにより二次汚染危害をより小さくする可能性が示唆されたとの報告もある¹⁶⁾。これらのことから、ATP 拭き取り検査結果を用いた衛生指導を行うことで、給食管理実習を行った本学の学生における衛生管理に対する意識の向上が期待された。

3. 3 イムノクロマト法による衛生検査の検討結果

3. 3. 1 テストラインに使用する抗血清の濃度の検討

陽性コントロールとしては、コントロールラインに抗IgG抗体を用い、検体溶液(抗原)として2倍希釈した黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシンを用いた。抗血清濃度60mg/mlと仮定し、抗血清が0.025~5.0μg/ml濃度となるよう5mMリン酸緩衝液で11段階に希釈し、試

験を行った。その結果、5.0 および 4.0 $\mu\text{g/ml}$ にはテストラインが認められたが、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度ではテストラインが認められない結果となった。以上の結果より、2.0~4.0 $\mu\text{g/ml}$ の間で境界があるものと仮定し、再度抗血清濃度の検討を行うこととした。

陰性コントロールとしては、コントロールラインに抗 IgG 抗体を用い、検体溶液として PBS を用いた。これは、検体採取時に PBS を使用したためである。1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{g/ml}$ の 3 種類の濃度で検討したところ、図 4 に示すように、4.0 および 1.0 $\mu\text{g/ml}$ でテストラインが認められる結果となった。金コロイド標識抗体が他のタンパク質と反応している可能性があると考えられたので、さらにキャプチャー抗体である抗血清の濃度の検討を行った。

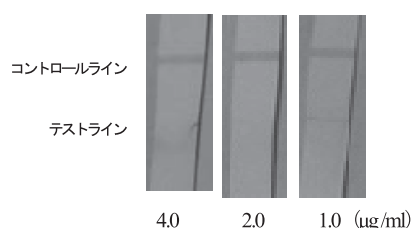


図 4 陰性コントロールにおける抗血清濃度の検討

3. 3. 2 抗血清濃度の検討 (2 回目)

陽性コントロールとして、抗血清を 5 mM リン酸緩衝液で 0.1~4.0 $\mu\text{g/ml}$ の 12 段階の濃度となるよう希釈し、試験を行った。その結果、0.15 $\mu\text{g/ml}$ でテストラインが認められ、それ以外は薄いテストラインが認められた。陰性コントロールとしても同様の濃度で試験を行ったところ、0.1~4.0 $\mu\text{g/ml}$ のうち 0.1 と 4.0 $\mu\text{g/ml}$ を含む 8 種類の濃度でテストラインが認められた。

以上より、抗血清を用いた場合、安定した結果は得られなかったことから、テストラインに使用するキャプチャー抗体として、抗血清以外を検討することとした。

3. 3. 3 テストラインに使用する単クローン抗体 1006 の濃度の検討

単クローン抗体 1006 を 5 mM リン酸緩衝液で 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096 倍希釈し、試験を行った。その結果、陽性コントロールでは、2~64 倍希釈までテストラインがあり、128~512 倍希釈は薄いテストラインがあった。一方、陰性コントロールでは、2~128 倍希釈までテストラインありという結果となった。

陽性コントロールおよび陰性コントロールを比較したところ、128 倍希釈でテストラインの色の濃さに差がある可能性があったため、テストラインには単クローン抗体 1006 を使用することとした。そこで、単クローン抗体 1006 を 5 mM リン酸緩衝液で 60, 80, 100, 120, 150 倍希釈

し、試験を行った。

陽性コントロールでは、全てテストラインありという結果となり、陰性コントロールにおいても、全てテストラインありとなり、陽性コントロールおよび陰性コントロールに差がないという結果となった。陰性コントロールにテストラインが見られたため、単クローン抗体の濃度以外の問題がある可能性が考えられた。

3. 3. 4 金コロイド標識抗体量の検討

金コロイド標識抗体 30 μl を 15 μl に減らして試験を行ったところ、陽性コントロール、陰性コントロール共にテストラインありという結果となった。陽性および陰性コントロールを比較したところ、図 5 に示したようにテストラインの色の濃さに差は見られなかった。よって、金コロイド標識抗体量は陰性コントロールにテストラインが出現する原因ではないと考えられた。

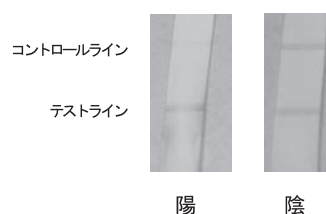


図 5 金コロイド標識抗体量の検討

陽：陽性コントロール、陰：陰性コントロール

3. 3. 5 金コロイド標識抗体濃度の検討

標識に用いた金コロイド原液を 5 mM Tris-HCl (pH 8.4) で 2.5 倍希釈して試験を行った。その結果、コントロールラインおよびテストライン共にラインが認められたもののかなり薄かった。このことより金コロイド原液を 2.5 倍希釈したものを使用すると、ラインの色自体が薄くなってしまったことがわかった。

3. 3. 6 金コロイド標識抗体保存液の種類の見直し

金コロイド標識抗体溶液を調製する際に用いる保存液を 3 種類試した。すなわち、1% BSA 添加 5 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1% BSA 添加 5 mM PBS, 1% BSA 添加 5 mM リン酸緩衝液の 3 種類を使用して、陽性および陰性コントロールのテストラインの色の濃さを見た。その結果、Tris-HCl (pH 8.4), PBS については、陽性および陰性コントロールのテストラインの色の濃さに差はなかったが、リン酸緩衝液には陽性および陰性コントロールのテストラインの色の濃さに差があった。

以上の結果を踏まえて、1% BSA 添加 5 mM リン酸緩衝液を保存液として用いることとした。

3. 3. 7 最終的な条件の検討

金コロイド標識抗体濃度の検討において、標識に用い

た金コロイド原液を 2.5 倍希釈したものを使用すると、ラインの色自体が薄くなってしまふことがわかったが、陰性コントロールのテストラインが出現してしまうため、さらに希釈をした方が良いものと考え、金コロイド原液を 5 mM Tris-HCl (pH 8.4) で 4 倍希釈したものを使用した。

単クローン抗体 1006 の希釈倍率については、100 倍希釈と 120 倍希釈を比較検討したところ、図 6 に示したように、単クローン抗体 1006 を 120 倍希釈した方の陰性コントロールのテストラインの色が薄く、陽性コントロールのテストラインの色との差があった。この結果より、120 倍希釈を実験条件とすることとした。

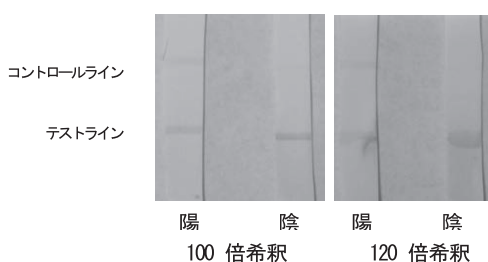


図 6 100 倍および 120 倍希釈のテストライン

陽：陽性コントロール、陰：陰性コントロール

3. 3. 8 採取した検体のイムノクロマトテスト

コントロールラインは抗 IgG 抗体、テストラインは単クローン抗体 1006 (120 倍希釈)、金コロイド標識抗体溶液 15 μ l、採取した検体 50 μ l、陽性コントロールの検体溶液は黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシン (2 倍希釈) 50 μ l、陰性コントロールの検体溶液は PBS 50 μ l とし、採取した検体について実施した。結果の一部を図 7 に示す。

図 7 に示したとおり、陽性コントロールのコントロールラインはごく薄く、テストラインは陽性・陰性コントロール共にラインが認められた。また、1 回～6 回の実習における 66 検体についてイムノクロマトテストを行ったところ、ほぼすべての検体でテストラインが出現した。

細菌検査により黄色ブドウ球菌が検出されなかった検体においても、イムノクロマトテストで陽性となる可能性はある。しかし、陰性コントロールのテストラインが検出される問題は解決されなかったため、これらの結果を受けた判定はできなかった。イムノクロマト法で安定した結果が得られる条件を見出すことはできなかったが、テストラインに使用した抗血清または単クローン抗体 1006 と金コロイド標識抗体溶液に使用した単クローン抗体 108 の組み合わせの妥当性については、すでに片山ら¹⁴⁾により確認済みである。陰性コントロールにおいて

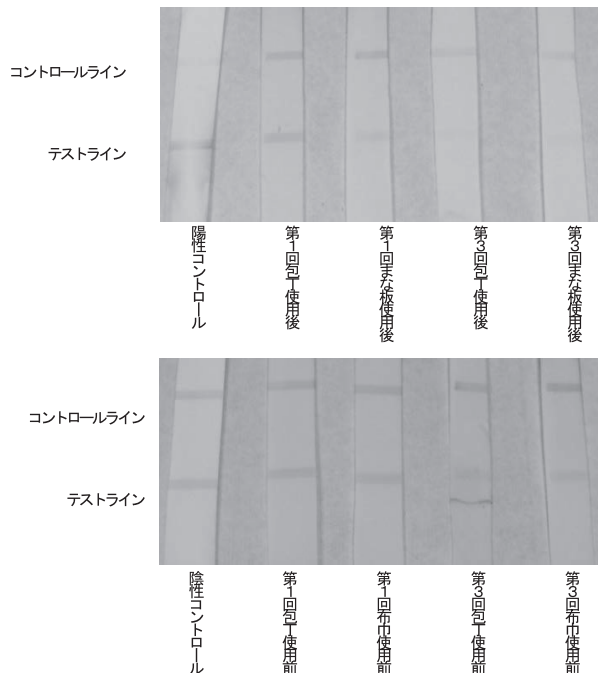


図 7 採取した検体のイムノクロマトテスト結果

テストラインが出現したそのほかの原因としては、抗体の抗体価が低下していたことが考えられる。また、金コロイドの濃度が高く抗体の濃度が相対的に低かったなど、金コロイド標識抗体溶液の金コロイド濃度と抗体の濃度の比率が最適でなかったことが原因となっていることも考えられる。イムノクロマト法を大量調理施設における衛生検査に用いるためには、さらによりよい実験条件について検討することが必要であると考えられた。

4 まとめ

特定多数の集団に給食を提供する大量調理施設では衛生管理が重要な課題となっているが、コストや手間のかかる衛生検査は実施困難な状態にある。そこで、本研究では大量調理施設に適した衛生検査法について検討するため、市販されている衛生検査キットや作製した平板培地などを用いて、どのような差がみられるのかを検査した。また、検査手法ごとの利点を理解し、それぞれに適した検査箇所を検査した。

市販の衛生検査キットはコンパクトかつ簡便で、大量調理施設の衛生検査に適していると考えられたが、コストを要するため、すべての大量調理施設に衛生検査の実施を推奨することは難しい。しかし、衛生検査を実施し衛生管理の意識付けを繰り返すことが衛生管理の徹底に有効であると考えられ、布巾や冷蔵庫の取っ手などからの二次汚染を防ぐためにも有効であると考えられる。

イムノクロマト法については、イムノクロマト法を用いた衛生検査の実施に向けて、様々な条件を試した。その結果、本研究では安定した条件の設定にまでは至らなかったが、抗原(黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシン)の有無を示すテストラインに使用した抗体と金コロイド標識抗体溶液に使用した抗体の組み合わせやその濃度の条件設定、金コロイド標識抗体の金コロイドと抗体の濃度比についての検討が重要であることがわかった。イムノクロマト法の原理を用いることにより、多検体を同時に検出できる衛生検査キットの開発などが可能となる。今後、簡便で判定が容易で、なおかつ低コストであるキットの開発が望まれる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご協力いただきました平成27年度坂本研究室、北元研究室の学生の皆様に心より感謝申し上げます。

文献

- 厚生労働省：4. 食中毒発生状況, (2)過去の食中毒発生状況, 年次別食中毒発生状況, http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2 (2016. 9. 15)
- 厚生労働省：4. 食中毒発生状況, (2)過去の食中毒発生状況, (2)過去の食中毒発生状況, http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2 (2016. 9. 15)
- 厚生労働省：4. 食中毒発生状況, (2)過去の食中毒発生状況, (3)過去の食中毒事件一覧, http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2 (2016. 9. 15)
- 厚生労働省：大量調理施設衛生管理マニュアル, http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/130201_9-2.pdf (2016. 9. 15)
- 文部科学省スポーツ青少年局『調理場における洗浄・消毒マニュアル Part 1』文部科学省スポーツ・青少年局学校健康教育課, 2009
- 文部科学省スポーツ青少年局『調理場における洗浄・消毒マニュアル Part 2』文部科学省スポーツ・青少年局学校健康教育課, 2009
- 文部科学省スポーツ青少年局『学校給食調理場における手洗いマニュアル』文部科学省スポーツ・青少年局学校健康教育課, 2008
- 食品・環境の細菌検査用フードスタンプ「ニッスイ」, 日水製薬株式会社
- L. Ten Cate, A Note on a Simple and Rapid Method of Bacteriological Sampling by Means of Agar Sausages, *J. appl. Bact.*, 28(2), 1964, pp. 221-223
- シート培地サニ太くん取扱い説明書および発色見本表, JNC 株式会社, http://www.jnc-corp.co.jp/sanita/pdf/seiiku_taisyuu.pdf (2016. 9. 15)
- 「ルミテスターPD-20 活用マニュアル」, キッコーマン株式会社, <http://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/kit/atpamp/pdf> (2016. 9. 15)
- パームチェックの簡易判定表 (SCD または SCD-LP 寒天培地), 株式会社日研生物医学研究所
- 中島泉, 免疫実験法ハンドブック, 名古屋大学出版会 2006
- 片山舞奈美他「食中毒細菌に対する単クローン抗体を用いた迅速簡便診断法の基礎的検討」『兵庫県立大学大学院環境人間学研究科環境人間学専攻修士論文』 2013
- 小林秀光, 微生物学第 3 版, 化学同人 2012, pp. 75-100
- 村山恵美子「集団給食施設における簡便化手法による衛生管理」『鹿児島女子短期大学紀要』第 43 号 2008, pp. 39-43
- 株式会社鶏卵肉情報センター「新しい衛生管理法 ATP ふき取り検査 (改訂増補版)」月刊 HACCP 編集, 2009, pp. 58 -62
- 堀光代他「岐阜市学校給食共同調理場における衛生管理調査」『岐阜市立女子短期大学研究紀要』第 61 輯 2012, pp. 67 -72
- 亀田菜央子他「ルミテスターを活用した特定給食施設の衛生管理に関する研究」『相模女子大学紀要(自然系)』 2012, pp. 13 -19

(平成28年 9 月30日 受付)