

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500736

研究課題名（和文） 真空調理過程における食中毒起因菌の消長と分子疫学的検討

研究課題名（英文） Valuation and molecular epidemiology of food-poisoning bacteria in vacuum packed pouch cooking

研究代表者

中嶋 隆（NAKAJIMA TAKASHI）

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：60348141

研究成果の概要（和文）：食中毒起因菌を接種した挽肉を用いて、真空調理過程における消長を検討した。サルモネラ菌、カンピロバクター菌、ブドウ球菌では二次加熱で死滅したが、ウェルシュ菌が産生する耐熱性芽胞菌では死滅しなかった。また、市販の輸入トリ肉から分離したサルモネラは、日本ではほとんど検出されない血清型で、その薬剤耐性も希な伝達性のある薬剤耐性プラスミド〔R(TC.KM)〕を保有するものがあった。

研究成果の概要（英文）：We examined valuations of food poisoning bacteria in ground meat while in vacuum packed pouch cooking process. *Salmonella*, *Campylobacter* and *Staphylococcus aureus* were exterminated, however, heat-resistant spore of *Clostridium perfringens* were not exterminated after second heating. Serotypes of *Salmonella* isolated from imported chicken meat at supermarket were not popular in Japan. Some *salmonella* strains possessed transferable drug resistance plasmid〔R(TC.KM)〕, and the plasmid is rare in Japan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学、食生活学

キーワード：調理と加工，真空調理、食中毒起因菌、食品衛生

1. 研究開始当初の背景

最近、おいしさに加えて、食材のもつ機能の保持、抗酸化調理の面から100以下で調理する真空調理法の実用化が進んでいる。一方、我が国の食中毒例の起因物質のほとんどのものが細菌やウイルスによるものであり、その発生例の多くものが加熱不足によって引き起こされている。しかし、低温で処理する真空調理法での食中毒起因菌（食中毒菌）

の消長等については十分に解析されていない。

食中毒起因物質は、2008年ではカンピロバクター菌が1位、サルモネラ菌が3位を占めている（厚生労働省：食品衛生研究、59(9):73-160、2009）。その原因となった食品をみると、不明のものを除けば、サルモネラでは鶏卵や食肉を含んだ複合食品が、カンピロバクター菌では食肉が最も多い。

中嶋らは、群馬県、埼玉県及び長野県内のスーパー等で市販されている国産の鶏挽肉からサルモネラ菌の検出を試み、トリ肉が高率に汚染していることを確認した(中嶋隆ら：市販されている鶏挽肉のサルモネラ汚染状況、医学と生物学、150(6)；229-233、2006)。

また、家畜や鶏の飼料にはそれに含有している栄養成分の有効な利用の促進のために添加される飼料添加物としての抗生物質を含む抗菌性物質が含まれており、さらに疾病の予防や治療のために多くの抗菌性物質が利用されている。そのため、抗菌性物質に対する耐性菌が生じ、食肉を介して人に感染することが考えられている。特に、近年、食肉中のサルモネラ菌の多剤耐性菌が出現し、感染症患者の治療への影響が危惧されている。太田らは、MRSAの発生要因として抗菌性物質の選択圧によるものが大きいとしている(太田玲子ら：MRSA発生と使用抗菌薬の関連性、感染症学誌、81(4):370-378、2007)。野村らは、中嶋ら(前掲)の分離した薬剤耐性サルモネラ菌を用い、その耐性遺伝子の多くものが接合伝達することを確認している(野村ら：市販の鶏挽肉から分離したサルモネラの薬剤耐性遺伝子の接合伝達性、医学と生物学；150(7)、281-282、2006)。

このことから、食肉に耐性菌が存在した場合、調理工程や環境汚染等により耐性菌による汚染の拡大と感受性菌の耐性化することも考えられる。

また、カンピロバクター菌は凍結や発育環境が悪化すると細菌としては生きてはいるが人工培地に発育できないいわゆるVBNC(Viable But Non Culturable)の状態の細菌になりやすくなること(Murphy C et al：J Appl. Microbiol. 100：623-632、2006)などの報告もあり、調理方法等により *Campylobacter* や *Salmonella* 等の食中毒菌のVBNC化が進みその生残性等に大きな差異が生じる恐れがある。

我が国のウェルシュ菌食中毒の発生件数は7位(厚生労働省：前掲)ときわめて多いとは言えないが、1件当たりの患者数は食中毒例のなかで最も多く、食肉等を原因食とする大型食中毒例が多い。米国(2006)においても、食中毒の発生件数はノロウイルス、サルモネラ菌に次で第3位であり、1件当たりの患者数も最も多い(CDC:MMWR,58(22)：609-615、2009)。その起因菌の大部分を占める耐熱性芽胞の産生菌は、給食菌ともいわれ、その菌による食肉等を原因食とする食中毒発生例が病院・介護施設・調理実習を含めた学校給食等の大量調理施設で多発し、注意が喚起されている。

この菌は偏性嫌気性菌であるが厳しい嫌気性状態を要求せず、他の食中毒菌に比べて、高温での増殖速度もきわめて速いことが知られている(植村：食水系統感染症と細菌性食中毒(坂崎編)、中央法規出版、東京、pp282-303、1991)。

この菌での食中毒菌の大部分が100の加熱に耐える芽胞を産生するHobbs型菌である。

2. 研究の目的

国内産の食肉からのサルモネラ菌の分離状況等についての報告はあるが、輸入量が多い外国産の食肉についての報告は少ない。食肉の世界的な流通の中で、発展途上国等に存在し、日本にはほとんど見られないが血清型、薬剤耐性菌等が輸入食肉を介して日本国内に入ってきていないか、遺伝子型別等を行い疫分子学的解析し、汚染の拡大防止策に検討した。

真空調理法は100以下の加熱が行われているが調理現場での実用化が先行され、この調理法を用いたときの食中毒菌の消長、下痢毒産生能の変化等に関するデータが少ないことから、各処理過程での食中毒菌の増加、死滅、下痢毒産生能の変化等について検討した。

また、食中毒菌が食肉等を介しての手指、使用器具等の環境汚染とその拡大防止の方法についても検討した。

同時に、真空調理過程における耐性の伝達性と選択圧についても検討した。

3. 研究の方法

群馬県及び埼玉県内の量販店から購入した輸入トリ肉からサルモネラ菌を中嶋ら(前掲)の方法で分離・同定した。血清型別、薬剤耐性型別、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行った。

真空調理過程での食中毒菌の消長は、食中毒菌を市販の挽肉(トリ肉と牛肉の合挽)に接種・混合した後、ハンバーグとして調製し、真空調理を行った。使用した食中毒菌は、サルモネラ菌(輸入トリ使用肉から分離した *Salmonella* Nessziona)、カンピロバクター菌(*Campylobacter jejuni* ATCC C29428)、ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC6538)及びウェルシュ菌(*Clostridium perfringens* Hobus 5型)の4菌種である。真空調理は60で30分間、一次加熱処理を行い冷凍保存後、80で3分間、二次加熱処理した。

ウェルシュ菌の培養には、チョコグリコレート培地(Difco製、Oxford製、日水製薬製、栄研化学製など)耐熱性芽胞の形成には、Duncan-Strong培地、菌数算定にはサイクロセリン加 SFP培地を用いた。ウェルシュ菌が産生する下痢毒の測定は、デ

ンカ化学(東京)製の測定キットを用いた。芽胞の耐熱性試験には、75 20分と100 20分の加熱を用い、100 20分の加熱に耐えたものを耐熱性芽胞とした。ペプトンによる耐熱性芽胞の産生能の検討には Duncan-Strong 培地の Proteose peptone に代えて Peptone、Tryptone、Phytone、Gelysate、Proteose-peptone No3、カザミノ酸等を用いた。

調理過程で使用される器具(まな板)による汚染の拡大調査は、油脂を多く含む食品(市販マーガリン)に大腸菌(*Escherichia coli* K-12株)を接種・混合し、まな板に塗布・乾燥し、洗浄・消毒した。同様に、伝達性のあるRプラスミドを含む大腸菌をまな板や挽肉などに塗布・接種し、その伝達性と選択圧を調査した。

好気性菌との共存におけるウェルシュ菌の発育性及び耐熱性芽胞と毒素産生については、使用した培地に10日間、室温に放置した Duncan-Strong 培地を、菌株にアルカリゲネス菌(*Alkagenes faecalis* ATCC8750)を用いた。

4. 研究成果

(1) 輸入トリ肉からのサルモネラの分離：分離されたサルモネラの血清型別を行ったところ、国内でほとんど分離されなかった *Salmonella* Nessziona (Sn) と *Salmonella* Minesota (Sm) があった。ことから輸入トリ肉を介して新しいサルモネラ血清型菌が国内に侵入していることが認められた。Sn は薬剤感受性菌であったが、Sm はテトラサイクリン(TC)とカナマイシン(KM)の両剤に耐性菌と感受性菌があり、その耐性菌も耐性が伝達性あるR(TC.KM)プラスミドと伝達性のないものがあった。R(TC.KM)プラスミドは、特定の血清型を除き、ヒトから分離されることが少ないプラスミドであるから、トリ肉から分離されたことから注目していく必要があることがわかった。また、SnとSmが群馬県と埼玉県の間販店の両方から分離されたこと SnのPFGE像が同一像を示したことから、養鶏場内での伝搬、食鳥処理場や包装施設などでの汚染の拡大が考えられた。

(2) 真空調理過程における食中毒菌の消長

サルモネラ菌：一次加熱処理で死滅し、一次加熱処理を適切に行った後、凍結保存した場合であれば、二次加熱処理を行わなくても安全性を確保することができることがわかった。

カンピロバクター菌：一次加熱処理後、直接、分離平板に塗抹したしたものでは集落の形成がみられなかった。カンピロバク

ターは、凍結や発育環境が悪化すると生きているが、VBNCになりやすいといわれていることから、一次加熱処理後、微好気性ガス(酸素5%、炭酸ガス5%、窒素90%)で曝気下での増菌培養を行っても集落の形成は認められなかった。このことから、この温度では、VBNCが起こりにくく、一次加熱処理でカンピロバクターは死滅したものと考えられ、二次加熱処理をする必要がないことがわかった。

ブドウ球菌：25℃で前培養した菌を使用したときは、一次加熱でほぼ死滅した。しかし、45℃で前培養したときは完全には死滅せず、前培養の温度による耐熱性の差異が認められた。しかし、二次加熱処理では、どちらのブドウ球菌も死滅した。このことから、一次加熱処理だけでは、十分でないことを認識する必要あり、室温の高いところでの放置には注意が必要であることがわかった。

ウェルシュ菌：芽胞を形成しにくい条件のもとで前培養して得た栄養型菌を用いた場合、一次加熱処理でほとんど菌が死滅した。耐熱性芽胞を形成する条件のもとで前培養した場合は、一次加熱処理ではほとんど死滅せず、中には一次加熱をしないものより加熱した方が増加したものが認められた。これは、一次加熱処理のヒートショックにより、芽胞からの発芽が促進されたものと考えられた。食品中での芽胞を産生させないようにするとともに、芽胞が産生されたものの取扱に食品での注意が必要であることがわかった。また、一次加熱処理した後、凍結保存したものは二次加熱でもその菌数はほとんど減少せず、問題点があることがわかった。一時加熱後、急冷し、凍結保存するのが一般的であるが、今回、一次加熱後、室温で放冷したとき、加熱によるヒートショックを受け、その菌数は急増するが、その多くのが栄養型菌であり、高温での二次加熱で激減した。食中毒を防止するためには、芽胞から発芽をさせることができれば、喫食直前での再加熱が有効であることが科学的に裏付けられた。栄養型菌では一時加熱処理でほとんどのものが死滅した。

(3) ウェルシュ菌の耐熱性芽胞が真空調理課程で死滅しないことから食品等における耐熱性芽胞の形成について検討した。

ウェルシュ菌の増菌によく用いられるチョコグリコレート培地では、栄養型菌がよく発育するが、耐熱性芽胞はほとんどみられず、下痢毒素の産生も見られなかった。特に、Difco製やOxford製のものでは、耐熱性芽胞がまったくみられず、製造会社による差異が認められた。しかし、この培地にリン酸一水素二ナトリウムや炭酸水素

ナトリウムを加えると耐熱性芽胞の産生量が増加し、下痢毒の産生量も増加が認められた。

ペプトンによるウェルシュ菌の発育性、耐熱性芽胞の産生能を検討するため Proteose-peptone を他のペプトンに代えて使用した。ペプトンの種類により、耐熱性芽胞や下痢毒の産生能に大きな差異が認められた。特に、Phytone は原法に用いられている Proteose-peptone より耐熱性芽胞の産生や下痢毒の産生が良好であった。しかし、一般の細菌の培培養によく用いられる Peptone) は耐熱性芽胞の産生も下痢毒の産生もきわめて悪かった。チオグリコレート培地と同様 Duncan-Strong 培地にリン酸一水素二ナトリウムや炭酸水素ナトリウムを加えると耐熱性芽胞菌の産生量が増加し、下痢毒の産生量の増加も認められた。

食品等の中に、発育や耐熱性芽胞芽胞の産生を抑制するものや促進させるものがあるか検討した結果、タマネギや牛乳等には促進作用が、砂糖等には抑制作用があった。カボチャでは、ウェルシュ菌がほとんど増殖しなかったが、リン酸一水素二ナトリウムを加えると栄養型菌が良好に発育するも耐熱性芽胞や下痢毒の産生はほとんどみられなかった。

香辛料に対するウェルシュ菌の発育や耐熱性芽胞の産生等をしたところ、ブラックペッパーやグローブ等には、抗菌作用があったが、その微量を加えるにより耐熱性芽胞、下痢毒の産生を促進作用があった。

カフェインには、ウェルシュ菌に対する抗菌作用があるが、微量であれば耐熱性芽胞の産生促進作用があった。しかし、この産生促進作用は、Duncan-Strong 培地の Proteose-

peptone を Phytone に代えたときは、見られなくなかった。

バリリンやノルバリリン等にもウェルシュ菌の耐熱性芽胞の産生を抑制する作用が認められた。

好気性菌と共存におけるウェルシュ菌の発育性を検討するため、糞便中に多く含まれ、好気性好気性菌である *Alcaligenes faecalis* を Duncan-Strong 培地中でウェルシュ菌と共存させるとウェルシュ菌がよく発育し、高率に耐熱性芽胞を産生した。このことから食品中でウェルシュ菌と好気性菌が共存した場合、ウェルシュ菌の増殖速度が速まり、耐熱性芽胞の産生は促進され、一時加熱ではもちろんこと、二次加熱でもほとんど死滅しないことを考慮する必要があることがわかった。

(4)調理課程で使用される器具(まな板)による汚染の拡大も考えられることから、

まな板に付着した細菌の除去効果を検討するため、油脂を多く含む食品に大腸菌(K-12株)を接種・混合し、それをまな板に塗布し、洗浄・消毒を行った。塗布したまな板にあつては、たわしを用いて水道水で洗浄しても、その洗浄効果はほとんど認められなかったが温湯水や洗剤での効果が大きかった。また、次亜塩素酸ナトリウム液での消毒効果においても、その液のみでの効果はほとんどみられなかったが界面活性剤を加えることにより、その効果は増大した。さらに、まな板に多数の傷のあるものとほとんど傷のないものと比較すると、洗浄後、傷の少ないものに比べて、傷のあるものは多数の細菌が残り、使い古したまな板においては、使用しないようにするか、傷のある部分を削り取るなどの再生をする必要があることがわかった。

(5)食肉や調理に使用される器具(まな板)における R プラスミドの接合伝達ところ、肉ブイオンでの伝達は高率であったが、食肉中で導入菌と受容菌混合したとききわめて低率であった。また、器具の表面での接合伝達性も低かった。しかし、水分多い食品や栄養の豊富なものが付着したときは、接合伝達がおこることから、抗生剤の使用の多い病院等では、抗菌性物質の選択圧が高く食品の取扱に注意が必要である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

平方千裕、ハンバーグの真空調理におけるウェルシュ菌の消長、第64回日本家政学会、2012年5月13日、大阪市立大学

本間(平方)千裕、真空調理法におけるハンバーグの安全な加熱条件の検討、第56回栄養改善学会、2009年9月4日、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1)研究代表者

中嶋 隆 (NAKAJIMA TAKASHI)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：60348141

(2)研究分担者

綾部 園子 (AYABE SONOKO)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：90320647

田中 進 (TANAKA SUSUMU)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授

授

研究者番号：70348142
松岡 寛樹 (MATSUOKA HIROKI)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教

授

研究者番号：20299837
平方 千裕 (HIRAKATA CHIHIRO)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助

手

研究者番号：60533114

(3)連携研究者

木村 博一 (KIMURA HIROKAZU)
国立感染症研究所・感染症情報センタ

一・室長

研究者番号：20391807

森田 幸雄 (MORITA YUKIO)
東京家政大学・家政学部・准教授

研究者番号：50415056