

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：36101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350111

研究課題名(和文) 冷凍流通食品の低温細菌汚染と不適切な温度管理に伴う危害食中毒菌の増殖

研究課題名(英文) Bacterial contamination of the foods delivered at frozen condition and control of the growth of food poisoning bacteria in those foods

研究代表者

岡崎 貴世 (OKAZAKI, Kiyo)

四国大学・生活科学部・教授

研究者番号：10227738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、様々な食品が冷凍状態で流通している。冷凍流通食品から *Leuconostoc mesenteroides* (LM)、*Staphylococcus lentus* (SL)、*Listeria grayi* (LG) などいくつかの細菌を分離した。冷凍食品中で LM と LG は他の菌より急速に増殖した。増殖温度が低い細菌が食品に混入した場合、腐敗や食中毒のリスクを高めることが示唆された。食品保存料のナイシンは高い抗菌活性を示したが、他の保存料は効果が認められなかった。塩素系消毒剤は食中毒菌(エルシニアとリステリア)に対して殺菌効果を示し、汚染菌の制御に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In recent years, various kinds of foods have been delivered at low-temperature or frozen conditions. *Leuconostoc mesenteroides* (LM), *Staphylococcus lentus* (SL), *Listeria grayi* (LG) and some bacteria were isolated from the delivered frozen foods. The number of bacteria inoculated to frozen food samples increased considerably. In particular, LM and LG showed more rapid growth than other bacteria. The results indicate that contamination with bacterial strains having a low optimum growth temperature can be a cause of food spoilage or food poisoning. The food preservative (nisin) showed high antibacterial activity. However, the other preservatives were not effective against all the bacteria tested. Two kinds of chlorine disinfectants were effective against food poisoning bacteria (*Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes*), and it was thought that they were useful in controlling the bacteria that can contaminate frozen foods.

研究分野：食品衛生学

キーワード：細菌汚染 冷凍流通食品 食中毒 低温細菌

1. 研究開始当初の背景

近年、消費者の食の多様化やグルメ嗜好、さらにインターネットの普及により食品のお取り寄せが以前より簡単にできるようになったことに伴い、冷凍状態で流通する食品の販売量が増加傾向にある。冷凍で流通している食品には、食品衛生法で規定された「冷凍食品」と、流通のために冷凍された「冷凍流通食品」があるが、「冷凍流通食品」には保存基準や微生物規格基準を含む成分規格がなく、微生物学的な衛生状態について不明なものも多く、その品質に不安が持たれる。

冷凍された食品の品質は温度管理によって大きく影響されるが、特に冷凍流通食品の問題点として、食品が消費者の手元に届くまでに複数の流通関係者の手を渡ることが挙げられる(例えば、製造者、貯蔵者、輸送者、配送者、販売者など)。流通関係者間で一貫した温度管理ができていない場合には問題は生じないが、複数ある流通関係者の1カ所でも不適切な温度管理があった場合や、流通関係者間で食品の受け渡しがスムーズに行なわれなかった場合には、冷凍食品の温度上昇に伴う『部分的解凍や再凍結』が起こり品質が低下する。実際に、消費者からメーカーに寄せられた冷凍食品に対する苦情の約半数は温度変化に由来している(社)日本冷凍食品協会CS研究会2010年公表データより)。

冷凍状態で流通する食品にとって、低温下で増殖可能な低温細菌の混入は大きな問題となる。例えば食中毒菌であるリステリア菌は氷点下でも増殖可能であり、2001年にナチュラルチーズによる集団食中毒を起こした。同じく低温細菌のエルシニア菌も毎年食中毒患者を発生させている。このように温度管理を怠ると食品の味や食感などの品質低下だけでなく、汚染菌が増殖した食品を摂取することによって健康を損なう危険がある。冷凍させた食品の流通量が増加している現在、冷凍流通食品の細菌汚染の実態を明らかにし、適切な衛生管理方法を関連業者に周知することは急務であると考えられる。

2. 研究の目的

冷凍された食品の品質は温度管理によって大きく影響される。そこで、冷凍流通食品の細菌汚染の実態を調査し、流通の段階で不適切な温度管理による食品の『部分的解凍や再凍結』が起こった場合の低温細菌の増殖性を明らかにする。また食品から分離された汚染菌や食中毒菌の食品保存料等抗菌剤に対する感受性試験を行い、低温流通食品を汚染する有害食中毒菌の制御方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 冷凍流通食品および冷凍食品の細菌汚染状況

冷凍流通食品 26 品(餃子、ハンバーグ、おせち料理など)および比較のため冷凍食品 15 品(ミンチ肉、肉焼売、シーフードミックスなど)を検査試料とした。冷凍流通食品はインターネット通販で、冷凍食品は量販店でそれぞれ購入し、購入後速やかに -20 保存を行い、検査前に5 で24時間解凍を行った。一般生菌(中温増殖性細菌)と低温細菌の測定は標準寒天培地を用い、35、24~48時間または7、10日間培養し、コロニー数を計測した。大腸菌と大腸菌群の測定はXM-G寒天培地を用い、35、24~48時間培養、同様にコロニー数の計測を行った。

(2) 低温細菌の分離と同定

低温細菌測定培地に生育したコロニーのいくつかを無作為に選択し、標準寒天平板に画線塗抹して菌の純粋分離を行った。分離菌の性状は、グラム染色性、形態、芽胞の有無、オキシダーゼテスト、カタラーゼテスト、OF試験を行い、それらの特徴から対応するアピ・マニュアルキット(シスメックス・ピオメリユー株式会社)を用いて、菌の同定を行った。

(3) 低温細菌分離菌の特性

最適増殖温度

前培養した菌液をTSB培地(日本BD社)で希釈して $OD_{660} = 0.001$ (約 1.0×10^5 cfu/ml)の菌懸濁液を調整した。その0.1mlをTSB培地3mlに接種し、5~35(5間隔)で培養した。増殖の程度は OD_{660} の上昇で評価し、最も増殖の程度の大きかった培養温度を最適増殖温度とした。

分泌酵素活性

0.2%可溶性デンプンまたは0.2%カゼイン添加普通寒天平板に菌液を一定量接種し、20で1~10日間培養し、寒天平板の表面にヨウ素ヨウ化カリウム溶液または5%酢酸溶液を滴下し、菌によって分解されたデンプンまたはカゼインの直径を測定した。

抗生物質に対する感受性

分離菌の薬剤感受性は、12種類の抗生物質に対する感受性で評価した。測定はディスク拡散法で行った。

(4) 冷凍食品の途中解凍・再冷凍が分離菌の増殖に及ぼす影響

$OD_{660} = 0.01$ (約 1.0×10^6 cfu/ml)に調整した菌液50 μ lを食品サンプル(ミニハンバーグ(加熱済み);タテ \times ヨコ \times 厚さ=45 \times 45 \times 18(単位mm)、約30g/個)の内部または表面に接種後、-20で冷凍して細菌汚染食品サンプルを調整した。この汚染食品サンプルを25で6、12、24時間途中解凍し、その後再び-20で冷凍した。サンプルは25、2時間の条件で解凍し細菌検査を行った。

(5) 冷凍食品汚染低温細菌の制御

供試菌として分離菌と食中毒菌であるエルシニア菌 (*Yersinia enterocolitica* NBRC 105693) およびリステリア菌 (*Listeria monocytogenes* JCM 7671) を用いて食品保存料等による細菌の増殖阻害作用を測定した。食品保存料はソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、p-ヒドロキシ安息香酸 n-ブチルエステル、およびナイシン A (ニサプリン、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) を、日持ち向上剤はグリシン、酢酸ナトリウムおよびクエン酸を用いた。供試菌に対する抗菌作用は液体培地希釈法で、最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度を求めた。液体培地として TSB 培地と SCDLP 培地をそれぞれ用いた。

また殺菌料である次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ピューラックス、株式会社オーヤラックス) と亜塩素酸水 (ケアフォー No.15、本部三慶株式会社) を用いた。各殺菌料は pH 5.0 に調整して使用した。菌懸濁液と所定の濃度に希釈した殺菌料を等量混合し 30 秒間室温で静置し、その混合液 0.1ml を TSB 培地 2ml に添加し消毒成分を失活させ、35 で 24 時間培養して菌の増殖の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 冷凍流通食品および冷凍食品の細菌汚染状況

冷凍流通食品の細菌汚染状況は、冷凍食品よりも低い傾向があった。検査に用いた試料が調理済み食品や加熱後食品が多かったことが汚染の程度が低かった要因のひとつと考えられた。しかし、3 試料から食品の不衛生な取扱いの指標となる大腸菌群が検出された (大腸菌は不検出)。また冷凍流通する食品にとって注意を要する低温細菌が 26 試料中 11 試料で検出され、流通の過程で温度管理を怠り解凍が起こると、これらの汚染菌が増殖し不衛生な状態になることが示唆された。一方、冷凍食品は細菌汚染度が高かったが、多くが「加熱後摂取冷凍食品」であったことから、喫食前に十分な加熱を行うことで健康影響のリスクを小さくすることができると考えられた。

(2) 低温細菌の分離と同定

冷凍流通食品と冷凍食品から 34 株の菌を分離した。分離菌は、グラム陰性菌が 58.8%、グラム陽性球菌が 11.8%、グラム陽性桿菌 (芽胞形成無し) が 26.5%、グラム陽性桿菌 (芽胞形成) が 2.9% で構成されていた。また、すべてのグラム陰性菌はブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌で、低栄養状態でも発育し、日和見感染菌の起原菌となる細菌群であることが分かった。これらの菌は抗菌薬や消毒剤に抵抗性を示す菌種が多いことから、今回検出された菌は食品製造現場の消毒後にも生残り、食品を汚染していたと推察される。分離菌 34 株から培養所見の異なる菌を選択し同定した結果、以下に示す細菌が検出さ

れた。

グラム陽性菌: *Leuconostoc mesenteroides* (LM)、*Staphylococcus lentus* (SL)、*Listeria grayi* (LG)、*Microbacterium* spp.

グラム陰性菌: *Chryseobacterium indologenes* (CI)、*Pseudomonas fluorescens* (PF)、*Elizabethkingia meningoseptica*
同定された菌はいずれも食品中に存在する可能性のある細菌で、中には食品の腐敗に關与する菌や低温で増殖可能な菌も存在した。

(3) 低温細菌分離菌の特性

同定された分離菌のうち 5 株を選び、最適増殖温度を測定した結果、LM: 20、SL: 35、LG: 10、CI: 20、PF: 25 であった。デンプンまたはタンパク質分解酵素活性は CI と PF が高いことが分かった。これらの菌が食品中で増殖することにより食品の品質が著しく低下することが示唆された。また分離菌 CI と PF は最適増殖温度がそれぞれ 20 と 25 であるため、低温管理を怠ると食品の品質低下が起こるおそれがあると考えられた。薬剤感受性に関しては、グラム陽性菌である SL が試験に用いたすべての抗生物質に対して感受性を示すことがわかった。ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌である CI と PF は複数の抗生物質に耐性を示した。

(4) 冷凍食品の途中解凍・再冷凍の影響

検査に先立ち分離菌の冷凍保存による菌数変化を測定した。その結果、PF は冷凍 7 日間で菌数が 1 桁減少したが、その他の分離菌は菌数変動せず、冷凍操作で菌数変化がないことを確認した。各分離菌で汚染した冷凍食品サンプルを途中解凍し再冷凍した場合、食品サンプル内部または表面の菌数は、途中解凍時間が長くなるとともに増加し、特に食品表面の菌は著しく増加した。菌数増加は分離菌の種類によって差異が認められ、最適増殖温度が低い LG と LM 接種食品サンプルは途中解凍時間が 12 時間を超えると腐敗状態となった。今回試験に用いた冷凍食品サンプル (約 30g) は、途中解凍時間が 2 時間を超えると食品内部の温度が解凍温度 (25) と等しくなった。冷凍流通される食品の大きさにも影響されるが、食品が低温増殖性菌で汚染されている場合、室温 (25) で途中解凍があった場合、短時間で食品は初期腐敗あるいは腐敗状態になるおそれがあることがわかった。

(5) 冷凍食品汚染低温細菌の制御

食品保存料のナイシン A は、グラム陽性分離菌 3 株に対して増殖阻害作用 (MIC; LM: 31.3ppm、SL: 250ppm、LG: 250ppm) および殺菌作用を示した (MBC; LM: 62.5.ppm、SL: 500ppm、LG: 1,000ppm)。ナイシンは *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が産生するバクテリオシンで、主にグラム陽性菌に効果を示し、グラム陰性菌には効果がないとい

う報告があり、本研究においても同様の結果が得られた。ナイシンの食品への使用基準は、「穀類及びでん粉を主原料とする洋生菓子」120ppm 等を除き、ほとんどの食品に対して250ppm である。得られた結果からナイシンのみを使用して食品中の微生物制御を行うのは十分ではなく、他の保存料や殺菌消毒操作を併用する必要があると考えられた。*p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチルエステルは、SL と LG に対して増殖阻害を示したが(それぞれの MIC 値 : 500ppm、1,000ppm) それ以外の保存料および日持ち向上剤は分離菌に対してほとんど増殖阻害効果を示さなかった (MIC > 2,000ppm)。

そこで殺菌料の塩素系消毒剤 (pH5.0 調整) の効果を測定した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム液は食中毒菌のエルシニア菌とリステリア菌に対して強い増殖阻害作用を示した (1.25ppm、30 秒)。また亜塩素酸水も同様な効果を示し (2.11ppm、30 秒) また分離菌に対しても有効であった。これらの塩素系消毒剤は食品への使用は限定されるが、調理器具等からの 2 次汚染防止に有効な手段と考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

岡崎貴世、加納成美、冷凍で流通する食品を汚染する低温細菌の特性と一時解凍による挙動、日本防菌防黴学会第 41 回年次大会、2014 年 9 月 24 日、品川区立総合区民会館(東京都)

Kiyo Okazaki, Control of bacteria isolated from frozen foods using preservatives, International Conference on Antimicrobial Research 2014, Oct. 2014, Madrid (Spain)

岡崎貴世、七條月、鈴木恵理、市販カット野菜の細菌汚染状況および薬剤抵抗性菌の出現頻度、第 3 回日本栄養改善学会四国支部学術総会、2016 年 4 月、四国大学(徳島県)

岡崎貴世、スプラウトの細菌汚染状況と低温汚染菌の薬剤感受性、日本家政学会第 68 回大会、2016 年 5 月、金城学院大学(愛知県)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡崎貴世 (OKAZAKI, Kiyo)

四国大学・生活科学部・教授

研究者番号 : 1 0 2 2 7 7 3 8