

平成16年度農林水産省
食品製造工程管理
情報高度化促進事業

平成16年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「各種温度条件に保存した調理食品および
ささ身における *Campylobacter jejuni* の消長
およびささ身中の *C.jejuni* 除菌について」

平成17年2月
財団法人 東京顕微鏡院

各種温度条件に保存した調理食品およびささ身における
Campylobacter jejuni の消長およびささ身中の *C.jejuni* 除菌について

(財) 東京顕微鏡院 食と環境の科学センター
伊藤 武、中川 弘、中島将次、大山祐佳

目的

カンピロバクター食中毒は世界各国で重要な食中毒であり、国内においても 1 名患者を含めて事件数は年間約 500 例あり、食中毒では最も多い発生例である。発生規模は 1980 年代では学校給食や仕出し弁当などによる大規模な発生が多くみられたが、最近では飲食店で提供される料理を原因とする事例が多くなってきた。原因菌である *Campylobacter jejuni* が市販鶏肉に高率に汚染していることからささ身の生食や鶏肉料理による事例が多く、鶏肉から二次汚染したと推察されるサラダなど惣菜類を原因食品とする。また、*C.jejuni* に関するこれまでの実験成績から、食肉製品などの加工食品中では *C.jejuni* は長時間生存できないこと、発育温度が 31–46℃であること、さらに発育条件が微好気的であることから食品中での増殖は特殊な場合以外認められないとされてきた。¹⁾

従って HACCP の危害要因としての *C.jejuni* の問題は食品中での生存性に与える水分活性、温度、有機酸、添加物などの影響を明確にしていくことであると考えられる。^{2) 3)} 今回は基礎的な実験として惣菜やささ身中での *C.jejuni* の生存性と温度条件を中心に検討した。また、原因食品として問題点の多いささ身からの *C.jejuni* 除菌方法についても若干の検討を行なった。

なお、惣菜（肉団子、唐揚げ、焼き鳥など）の加熱条件とカンピロバクターの死滅に関しては東京都食品安全情報評価委員会（2004 年 7 月）にデータが報告されているので、本実験では同様な実験は行なわなかった。

実験方法

1. 供試菌株

国内におけるカンピロバクター食中毒の原因菌として高い血清型である *Campylobacter jejuni* LIO 4 型株 (HP1004 株)、および *Campylobacter jejuni* LIO 7 型株 (HP10066 株) を供試した。これらの菌株は、東京都健康安全研究センター 微生物部食品微生物研究科より分与された。

2. 試験に供した食材

東京都内の百貨店で市販されているパック入りカット野菜サラダ (30 品目の野菜)、パック入りハムサラダ (ハム、じゃが芋、玉葱、マヨネーズ)、パック入り肉じゃが (豚肉、シラタキ、人参、インゲン、じゃが芋)、パック入りシチュー (牛肉、オクラ、人参、玉葱、牛乳など) および鶏ささ身を実験に供した。カット野菜サラダ、ハムサラダは低温下で販売、肉じゃがとシチューは室温販売されていた。鶏ささ身は冷蔵販売されていた。

これらの食品の pH、水分活性 (Aw)、一般生菌数、大腸菌群数は表 1 に示す如くである。

試験に供した食品はあらかじめカンピロバクターが陰性であることを確認した。すなわち、食品の 10 倍乳剤を作成し、CCDA 培地およびスキロー培地への直接塗抹およびプレストン培地による増菌培養を行なった。

3. 食品への *C.jejuni* 接種方法

凍結保存された供試菌株を血液寒天に塗抹し、42°C、2 日間微好気培養後、典型的な集落を中試験管に 5ml 分注された BHI ブイヨンに接種し、微好気混合ガス (5%酸素、10%水素、85%炭酸ガス) を噴入後ゴム栓をし、37°C、18 時間振盪培養した。培養後、供試菌の形態を位相差顕微鏡で観察し、運動性良好

ならせん菌であることを確認した。培養液を生理食塩水で 10 倍段階希釈して供試菌液を調製した。

野菜サラダ、ハムサラダ、肉じゃが、シチューについては各 10g 秤量し、試験菌液 10 μ l が全体に広がるよう接種し、ストマッカー袋に入れた。接種菌量は概ね 10⁵cfu/ml とした。

鶏ささ身については厚さ約 1mm に切り、重ねて 10g になるように秤量し、中心部に供試菌液を 100 μ l 接種し、ストマッカー袋に入れた。試験試料はいずれも 2 検体とした。

4. 保存温度と保存日数

各試料ともストマッカー袋に入れて密閉し、野菜サラダ、ハムサラダ、肉じゃが、シチューは 5°C、10°C、25°C に、鶏ささ身は -20°C、5°C、10°C の温度に保存した。保存日数は食品の賞味期限を参考に、-20°C 保存では 10、20、30 日後に検査した。5°C、10°C 保存では 1、2、3、4、7 日後に、25°C 保存では 1、2 日後に検査した。

5. *C.jejuni* の生残菌数の測定

保存日数経過後、試験品に 9 倍量の滅菌生理食塩水を加え 30 秒間ストマッキングした。ストマッキング処理後、生理食塩水で 10 倍段階希釈液を作成し、各試験液 0.05ml を 2 分割した CCDA 培地およびスキロー培地に滴下し、コンラージ棒で表面塗抹し、42°C で 48 時間培養した。発育した *C.jejuni* 集落数を算定し、生残菌数とした。

さらに、試験液 1ml をプレストン培地に接種し 42°C で 24 時間微好気培養し、CCDA 培地およびスキロー培地で、42°C、48 時間微好気培養し、*C.jejuni* の生残を確認した。

6. ささ身中の *C.jejuni* の D 値測定

ささ身を厚さ 1mm に切り、重ねて 10g になるよう秤量し中心部に試験菌液を 100 μ l 接種した。これをストマッカー袋に挿入した。接種菌量は 10⁷cfu/10g とした。加熱条件は湯通しの温度である 98°C、5 秒,10 秒,15 秒,20 秒および 30 秒とした。LIO 4 型株、LIO 7 型株について 4 回測定を行った平均より、縦軸に菌数 (log)、横軸に加熱時間 (秒) をとり得られた測定値をプロットして直線性を確認し、[D=1/傾き]の計算式により D 値を求めた。

加熱後試験品は氷水中で直ちに冷却し、これに 9 倍量の滅菌希釈水を加え 30 秒間ストマッキングした。ストマッキング処理後の試験品液 0.05ml を血液寒天培地、CCDA およびスキロー培地の平板分離培地に滴下し、コンラージ棒で表面塗抹し、42°C で 48 時間微好気培養し、生残菌数を測定した。

7. ささ身に接種した *C.jejuni* の除菌方法

ささ身表面に *C.jejuni* を 10⁵cfu 接種し、沸騰した機能水に 10 秒作用させた。また同様に 5%乳酸、5%食酢液でも同様に行なった。対照として沸騰水のみで同様に処理した。

処理後、生残菌数を上記の方法により測定した。

なお、機能水は旭硝子エンジニアリング株式会社 品名/型式

F.CHLORER/ADE - 61 で作成した電解次亜水（塩素濃度 60~80mg asCl/l、pH7.5）である。

8. 一般生菌数および推定大腸菌群数

一般生菌数は標準寒天培地、大腸菌群数はデゾキシコレート培地を使用した。

結果

1. 惣菜の保存温度と *C.jejuni* の生残

野菜サラダ：5℃保存では *C.jejuni* LIO 4 菌株は接種菌量が 10^5cfu であったが、保存1日で 10^3cfu/g に、2日後では 10^2cfu まで減少したが、7日後でも 10cfu 生残した。10℃保存でも *C.jejuni* の生残は5℃保存とほぼ同様の傾向であった。25℃保存では1日後でも 10cfu にまで急速に減少した。LIO 7株の場合もほぼ同様の結果が得られ、5℃、10℃保存では7日後でも *C.jejuni* の生残が確認できた（表2、図1,2）。なお、野菜サラダの25℃保存では1日保存で一般生菌数が 10^8 にまで増殖した。

ハムサラダ：ハムサラダの A_w は0.97とやや低く、一般生菌数や大腸菌群による汚染も極めて低い。両菌株とも5℃保存では *C.jejuni* 4日まで生存が確認されたが、LIO 4株は7日では陰性、LIO 7株は7日でも増菌培養陽性であった。25℃保存では急激に菌数が減少し、保存2日では陰性となった（表3、図3,4）。

肉じゃが：肉じゃがの A_w は今回検討した惣菜では最も低く、0.96であった。供試した *C.jejuni* 2菌株とも保存温度5℃、10℃、25℃のいずれの条件でも菌の死滅が早く、1日でも増菌培養で検出されているにすぎず、それ以降も時に増菌培養で生残が確認されるにとどまった（表4、図5,6）。なお、25℃に保存した場合、一般生菌数と大腸菌群数が殆ど増加していないのは高い温度により肉じゃがの水分が減少し、発育不良になったと推察される。

シチュー：市販されているシチューに添加した *C.jejuni* も早期に死滅し、5℃と10℃保存では 10^4cfu の菌量が1日で 10cfu に減少し、保存2日ではLIO 4株は増菌培養で陽性となった。LIO 7株は2日で陰性であった（表5、図7,8）。

2. ささ身の保存温度と *C.jejuni* の生残

ささ身に接種した *C.jejuni* は 5°C、10°C 保存とも 1 日後で、生残菌数の減少がみられるが、7 日でも 1 日後の生残菌数とほぼ同菌量が生残していた。−20°C の凍結条件では観察期間の 30 日でも *C.jejuni* の生残が確認された（表 6,7、図 9,10）。

3. ささ身中の *C.jejuni* の D 値

ささ身を 1mm の厚さに切り、重ねた中心に *C.jejuni* を接種し、ストマッカ一袋に入れ、98°C のお湯に入れて、生残菌数を測定し、この条件下での D 値を求めた。ささ身の厚さの調整が不揃いであり、D 値が大きく変動した。LIO 4 型株について 4 回測定を行った平均の D 値は 41.86 秒 (23.9–64.1 秒)、LIO 7 型株について 4 回測定を行った平均の D 値は 37.03 秒 (17.5–74.0) であった。なお、D 値は縦軸に菌数 (log)、横軸に加熱時間 (秒) をとり得られた測定値を対数変換してプロットし、直線性を確認後、 $[D=1/\text{傾き}]$ の計算式により D 値を求めた。(図 11)。

4. ささ身の湯通しによる *C.jejuni* の除菌

ささ身に *C.jejuni* を表面に滴下し、沸騰水で 10 秒間湯通しをおこなったが、*C.jejuni* を完全には除菌できなかつた。5%食酢、5%乳酸および機能水による湯通しでもいずれも *C.jejuni* は生残した（表 8）。

ささ身には薄皮があり、薄皮のまま、薄皮を除去した条件で比較したが、除菌状況には差異が認められなかつた。

考察

食中毒の原因菌である *C.jejuni* や *C.coli* は従来の食中毒菌と異なり、微好気性であり、嫌気条件や好気条件では発育せず、むしろ菌の死滅となる。発育温

度が 31–46°Cとやや高温域であること、食塩濃度 0.5–1.5%で発育し、2%以上の濃度では発育できないこと、発育可能 pH は 5.5–8.0 であること、10°C以下の低温では長時間生存でき、凍結条件では 1 ヶ月以上生存すること、あるいは乾燥条件では死滅しやすく、牛や豚のと体表面の *C.jejuni* は乾燥と共に死滅していくことが明らかにされている。従って、カンピロバクター汚染の危険性が高い食肉製品中の *C.jejuni* は低温保存で 1 週間以内であることが報告されている。⁴⁾

今回、国内で発生頻度の高い血清型である *C.jejuni* LIO 4 と LIO 7 をもちいて、原因食品として危険性の高い惣菜やささ身中での *C.jejuni* の生存性を検討した。野菜サラダに接種した *C.jejuni* は保管温度である 5°Cや 10°Cの低温では調査した 7 日でも *C.jejuni* の生存が観察された。ただし、25°Cでは 1 日目でも菌の死滅が見られ、従来から報告された成績と同様に *C.jejuni* は低温下では長期間生存した。水分活性が低いハムサラダや肉じゃがでは低温であってもほぼ 4 日まで生存することが確認され、水分含量の少ない食材中では *C.jejuni* の生存性が低いと考えられた。また、ハムの塩類濃度も *C.jejuni* の生存に影響したことが推察される。

市販のシチューでは低温保存であっても 2 日目で菌の検出が陰性であり、早期に死滅する成績が得られた。一般に井戸水や牛乳などの液体中の *C.jejuni* は低温保存では長期生存することが報告されているが、早期に死滅した理由として、シチューに含まれる香辛料や添加物の影響が菌の生存に関与したことが推察される。すなわち、惣菜中のカンピロバクターの生存性は保存温度条件の影響以外に惣菜の pH、Aw あるいは惣菜に含まれる添加物などの影響があるものと推察された。

これまでの報告では生肉中の *C.jejuni* は 10°C以下の低温保存では長期間生存すること、凍結条件では 1 ヶ月以上生存することが報告されており、今回試

験に供試したささ身でも同様な成績が得られた。鶏ささ身は *C.jejuni* の汚染の高い食品であることが知られているし、生食されることから国内では原因食品として多い食品である。沸騰水で約 10 秒間ほどの湯通しが行なわれるが、この程度の処理では表面に接種した *C.jejuni* は死滅しない。また、機能水、乳酸、食酢による処理でも死滅しない。

食鳥処理場の工程でささ身表面にカンピロバクターが汚染することがこれまでに報告されているし、機能水、食酢などによる湯通しでも *C.jejuni* を除菌（殺菌）できないことから、生食用のささ身については生食用としての規格基準を設定することが今後の対策として求められる。

要約

1. 惣菜の保存温度と *C.jejuni* の生残

惣菜に接種した *C.jejuni* は惣菜の種類により生存性が大きく異なった。野菜サラダでは 5°C、10°C の低温保存で検査した 7 日まで菌を確認できたが、ハムサラダでは 4 日頃まで生存性が確認できた。肉じゃが、シチューでは 1-2 日の短時間で死滅した。

2. ささ身の保存温度と *C.jejuni* の生残

ささ身に接種した *C.jejuni* は 5°C、10°C 保存では 7 日目でも生残菌を確認したし、-20°C 保存では 30 日目でも *C.jejuni* が生残した。

3. ささ身中の *C.jejuni* の D 値

ささ身に接種した *C.jejuni* の 98°C における D 値は LIO 4 型株が 41.86 秒、LIO 7 型株が 37.03 秒であった。すなわち、通常の 10 秒程度の湯通しでは *C.jejuni* は死滅しないことが確認された。

4. ささ身の湯通しによる *C.jejuni* の除菌（殺菌）

通常の沸騰水以外に機能水、5%乳酸、5%食酢による湯通し処理でも *C.jejuni*

を殺菌できなかった。

参考文献

- 1) 伊藤 武：食品と微生物, 4,10-22(1987)
- 2) Karenlampi,R. et al:Inter.J.Food Microbiol.,97,187-195(2004)
- 3) 伊藤 武ら：食品と微生物、5,137-143(1988)
- 4) Barrell,R.A.E:Inter.J.Food Microbiol.,1,187-196(1984)

表1 実験材料のpH、Aw、一般生菌数および大腸菌群数

食材	pH		Aw		一般生菌数(cfu/mL)		大腸菌群数(cfu/mL)	
	サンプル①	サンプル②	サンプル①	サンプル②	サンプル①	サンプル②	サンプル①	サンプル②
①鶏ささみ	6.03	5.92	0.970	0.988	1.5×10^3	1.1×10^4	1.5×10^2	7.7×10^2
②シチュー	5.49	5.19	0.976	0.983	<300	<300	<10	<10
③肉じゃが	5.63	5.61	0.966	0.968	1.2×10^2	<300	4.2×10^1	<10
④野菜サラダ	5.90	5.80	0.993	0.995	2.6×10^3	4.3×10^2	1.6×10^1	<10
⑤ハムサラダ	5.20	5.16	0.970	0.974	<300	<300	<10	<10

表2 野菜サラダを5°C、10°C、25°Cに保存した場合の*C.jejuni*の生存性

菌株	保存温度	日 数				
		1	2	3	4	7
LIO4	5°C	1.1×10^3	4.2×10^2	4.8×10^2	2.8×10^2	2.5×10^1
	10°C	8.6×10^2	5.6×10^2	2.1×10^2	2.4×10^2	6.5×10^1
	25°C	9.0×10^1	3.0×10^1	NT	NT	NT
LIO7	5°C	6.2×10^2	5.1×10^2	3.0×10^1	1.3×10^2	5.0
	10°C	4.3×10^2	8.5×10^1	4.0×10^1	3.5×10^1	2.0×10^1
	25°C	2.0×10^1	(+)	NT	NT	NT

接種菌量: *C.jejuni* LIO4 1.8×10^5 cfu/g、*C.jejuni* LIO7 2.0×10^5 cfu/g

+)・・・直接塗抹では陰性、増菌後陽性となった検体

0・・・直接塗抹、増菌後とも陰性

NT・・・Not tested

表3 ハムサラダを5°C、10°C、25°Cに保存した場合の*C.jejuni*の生存性

菌株	保存温度	日 数				
		1	2	3	4	7
LIO4	5°C	5.5×10^2	2.7×10^2	1.0×10^1	(+)	0
	10°C	6.9×10^2	3.6×10^2	1.2×10^2	1.5×10^1	0
	25°C	1.5×10^1	0	NT	NT	NT
LIO7	5°C	6.5×10^1	5.0	2.0×10^1	1.0×10^1	0
	10°C	2.3×10^2	(+)	5.0	0	0
	25°C	1.0×10^1	0	NT	NT	NT

接種菌量: *C.jejuni* LIO4 1.8×10^5 cfu/g、*C.jejuni* LIO7 2.0×10^5 cfu/g

+)・・・直接塗抹では陰性、増菌後陽性となった検体

0・・・直接塗抹、増菌後とも陰性

NT・・・Not tested

表4 肉じゃがを5°C、10°C、25°Cに保存した場合の*C.jejuni*の生存性

菌株	保存温度	日 数				
		1	2	3	4	7
LIO4	5°C	(+)	0	0	0	0
	10°C	0	(+)	(+)	0	0
	25°C	0	0	NT	NT	NT
LIO7	5°C	(+)	0	0	(+)	0
	10°C	0	0	0	0	0
	25°C	0	0	NT	NT	NT

接種菌量: *C.jejuni* LIO4 2.0×10^4 cfu/g、*C.jejuni* LIO7 3.0×10^4 cfu/g

+)・・・直接塗抹では陰性、増菌後陽性となった検体

0・・・直接塗抹、増菌後とも陰性

NT・・・Not tested

表5 シチューを5°C、10°C、25°Cに保存した場合の*C.jejuni*の生存性

菌株	保存温度	日 数				
		1	2	3	4	7
LIO4	5°C	2.5×10^1	(+)	(+)	(+)	0
	10°C	2.0×10^1	(+)	(+)	0	0
	25°C	0	0	NT	NT	NT
LIO7	5°C	2.0×10^1	(+)	0	0	0
	10°C	(+)	0	(+)	(+)	0
	25°C	0	0	NT	NT	NT

接種菌量: *C.jejuni* LIO4 2.0×10^4 cfu/mL、*C.jejuni* LIO7 3.0×10^4 cfu/mL

+)...直接塗抹では陰性、増菌後陽性となった検体

0)...直接塗抹、増菌後とも陰性

NT)...Not tested

表6 鶏ささみを5°C、10°Cに保存した場合の*C.jejuni*の生存性

菌株	保存温度	日 数				
		1	2	3	4	7
LIO4	5°C	1.0×10^2	8.0×10^1	7.5×10^1	9.5×10^1	8.0×10^1
	10°C	1.3×10^3	5.4×10^2	1.9×10^3	1.1×10^3	3.5×10^2
LIO7	5°C	8.0×10^1	2.0×10^1	5.0	1.0×10^1	4.0×10^1
	10°C	2.1×10^3	1.4×10^3	1.6×10^3	7.9×10^2	4.8×10^2

接種菌量: *C.jejuni* LIO4 5°C・・・ 2.0×10^4 cfu/g、10°C・・・ 1.8×10^5 cfu/g

接種菌量: *C.jejuni* LIO7 5°C・・・ 2.0×10^4 cfu/g、10°C・・・ 2.0×10^5 cfu/g

+)・・・直接塗抹では陰性、増菌後陽性となった検体

0・・・直接塗抹、増菌後とも陰性

表7 鶏ささみを-20°Cに保存した場合の*C.jejuni*の生存性

菌株	保存温度	日 数		
		10	20	30
LIO4	-20°C	3.5×10^1	2.0×10^1	1.5×10^1
LIO7	-20°C	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1

接種菌量:*C.jejuni* LIO4 2.0×10^4 cfu/g、*C.jejuni* LIO7 3.0×10^4 cfu/g

- +)...直接塗抹では陰性、増菌後陽性となった検体
- 0)...直接塗抹、増菌後とも陰性

表8 鶏ささみ湯通しによる*C.jejuni* の消長

供試菌株	接種菌数 (cfu/mL)	食酢5%	乳酸5%	強酸性水	湯のみ
LIO4	1.9×10^4	(+)	(+)	+	+
	1.7×10^4	(+)	+	(+)	+
	7.0×10^3	+	(+)	(+)	(+)
	4.7×10^3	+	(+)	(+)	(+)
LIO7	9.4×10^3	+	+	+	+
	1.1×10^4	+	(+)	+	(+)
	8.3×10^3	+	+	(+)	+
	6.2×10^3	(+)	+	(+)	+

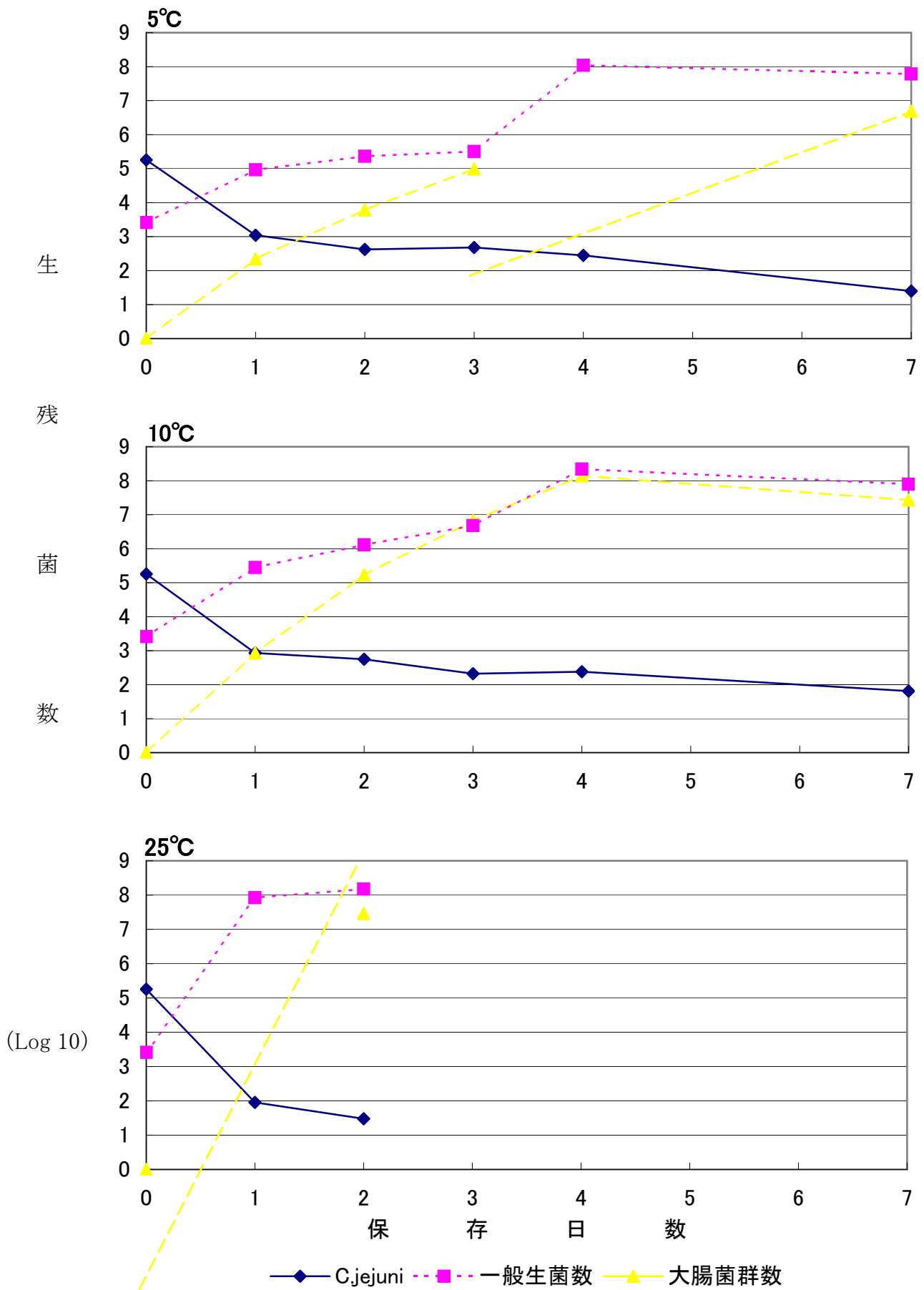


図1 野菜サラダに添加した *C.jejuni* LIO4 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

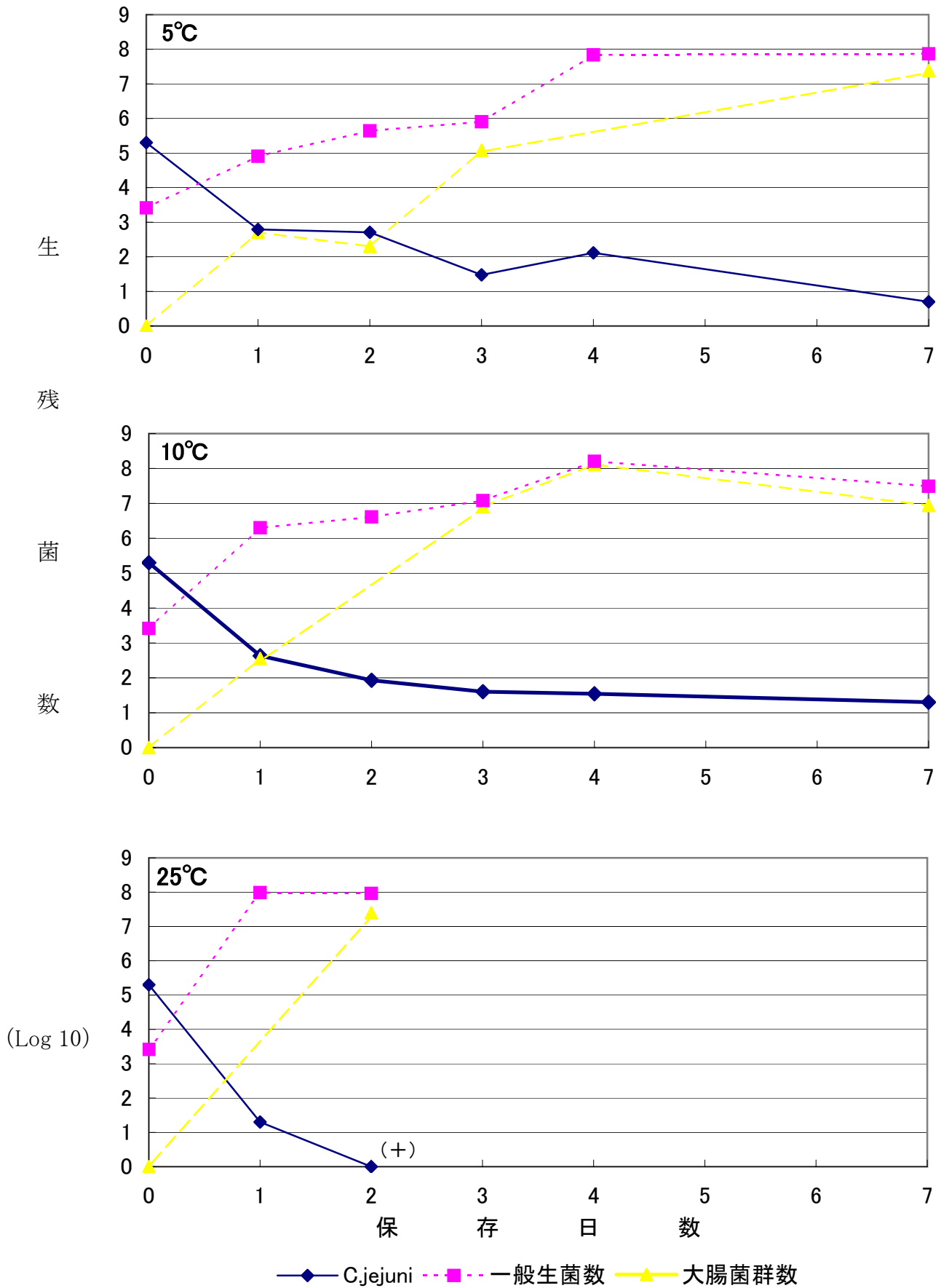


図2 野菜サラダに添加した *C. jejuni* LIO7 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

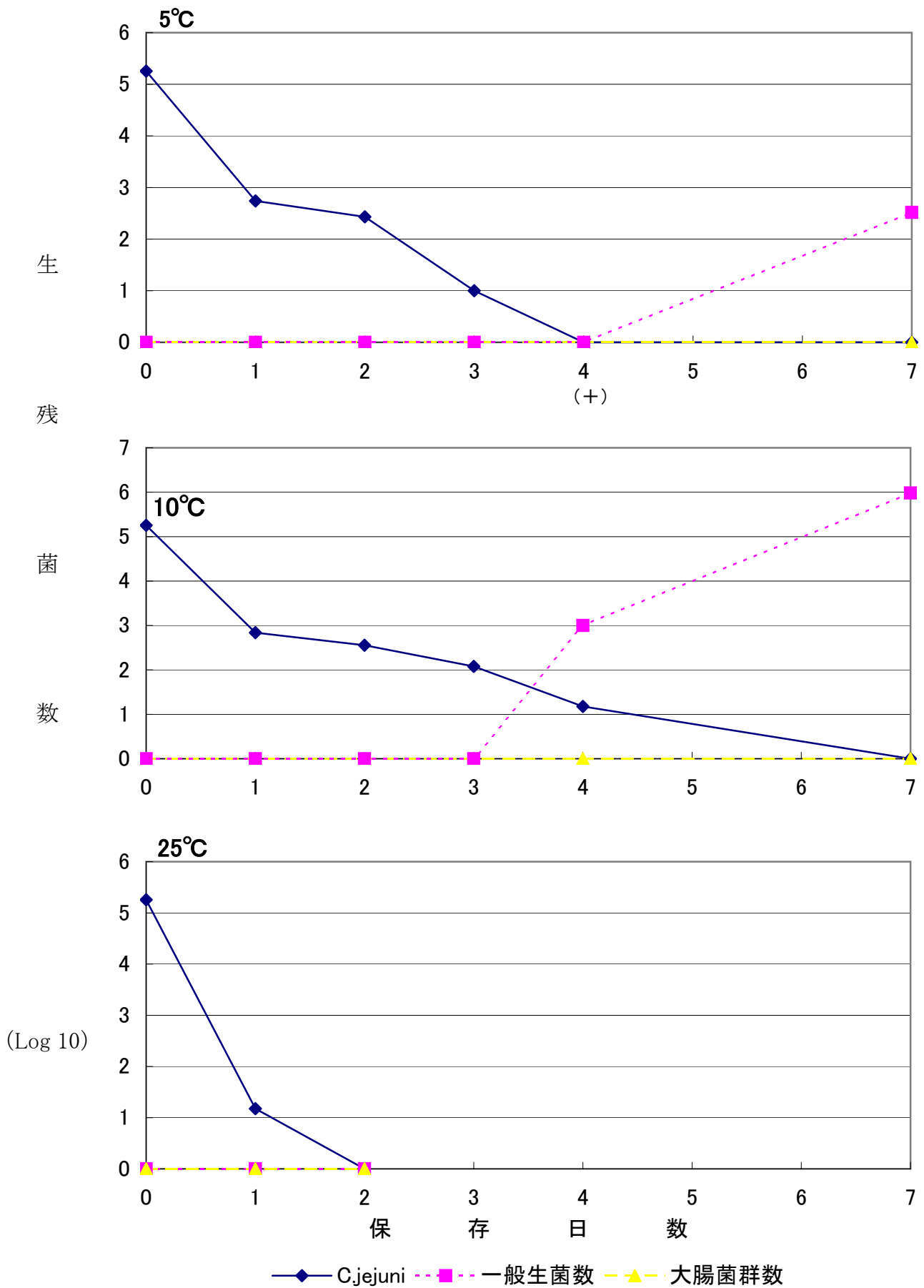


図3 ハムサラダに添加した*C.jejuni* LIO4 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

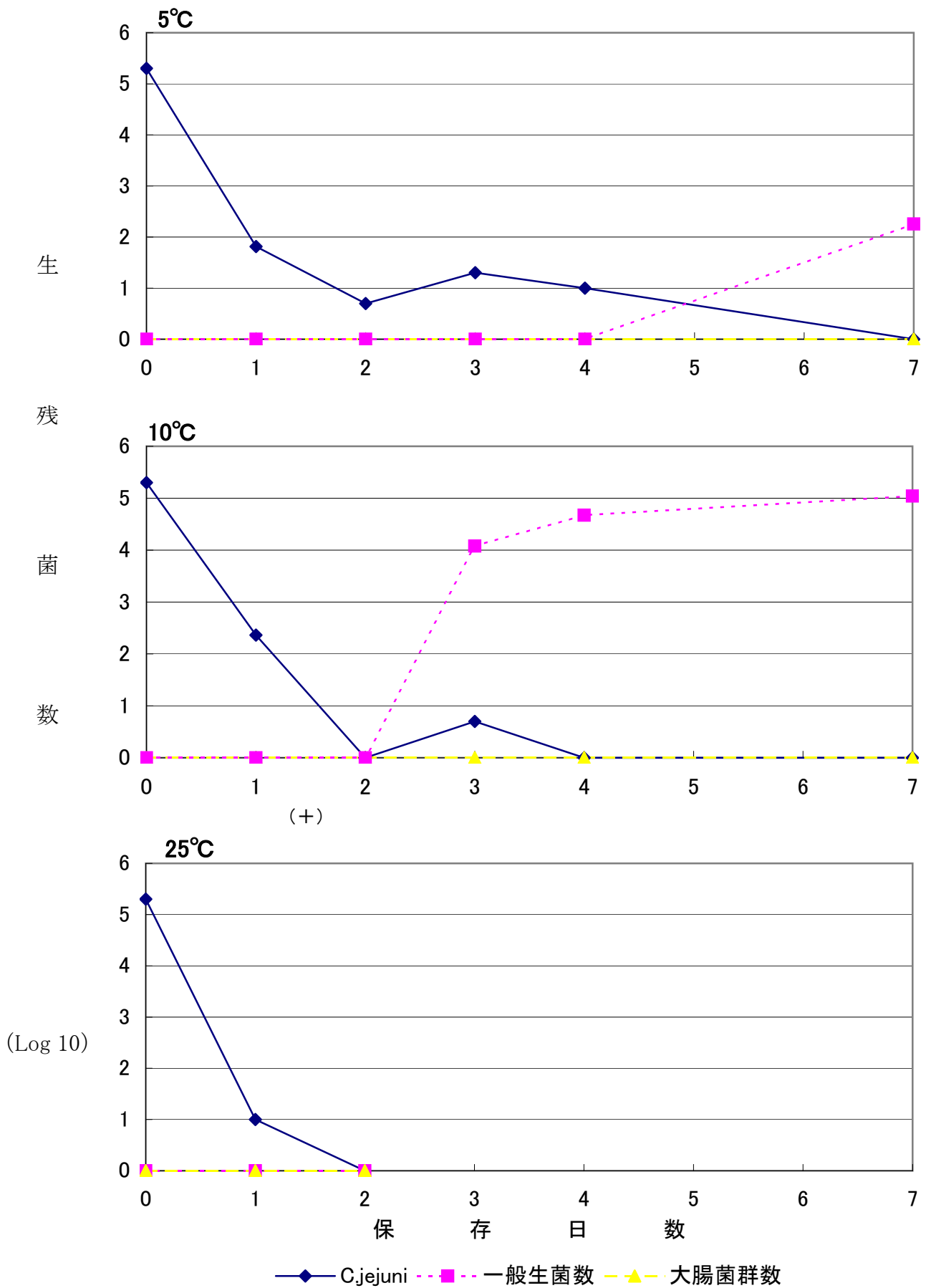


図4 ハムサラダに添加した*C.jejuni* LIO7 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

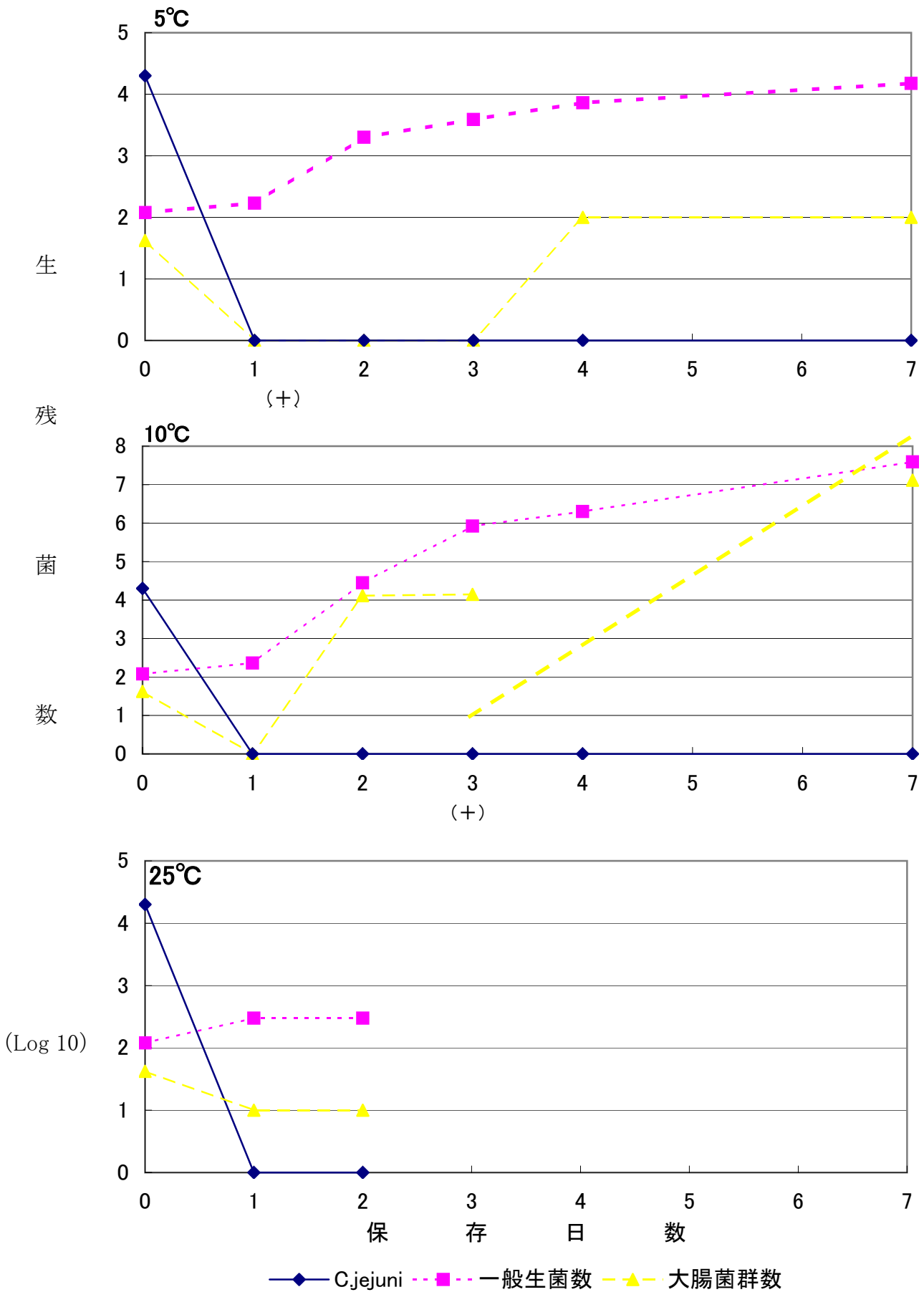


図5 肉じゃがに添加した *C.jejuni* LIO4 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

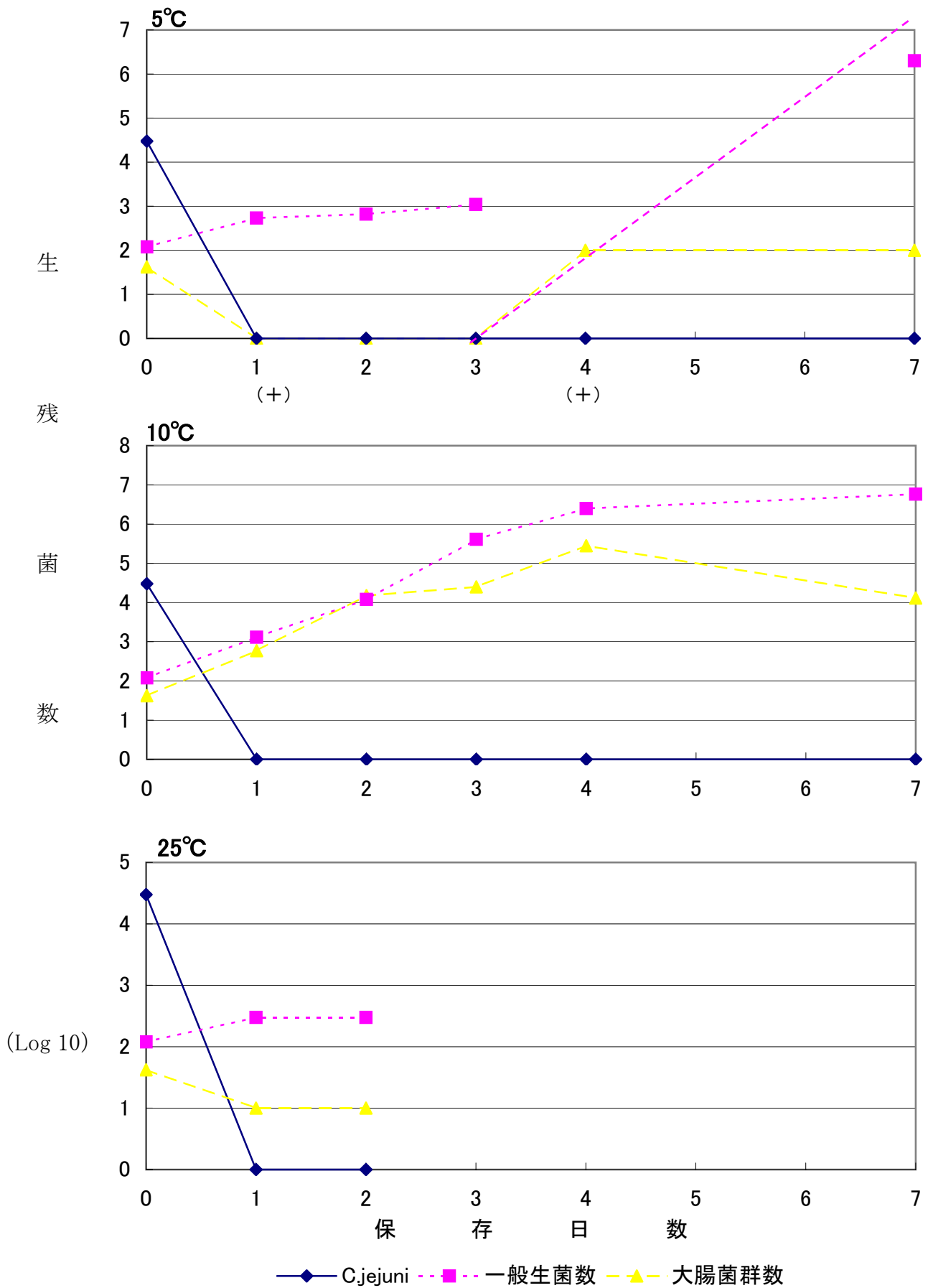


図6 肉じゃがに添加した *C.jejuni* LIO7 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

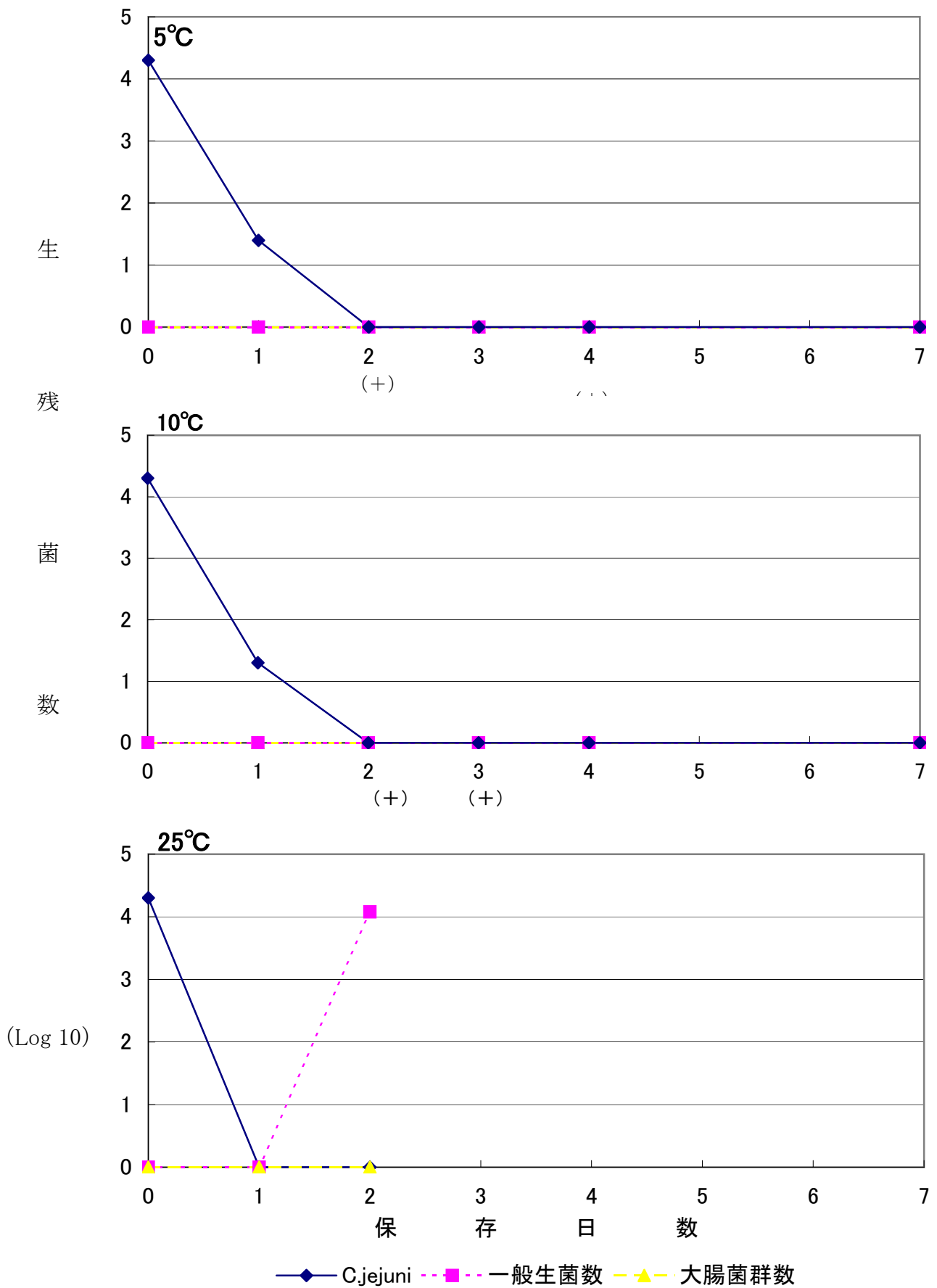


図7 シチューに添加した *C.jejuni* LIO4 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

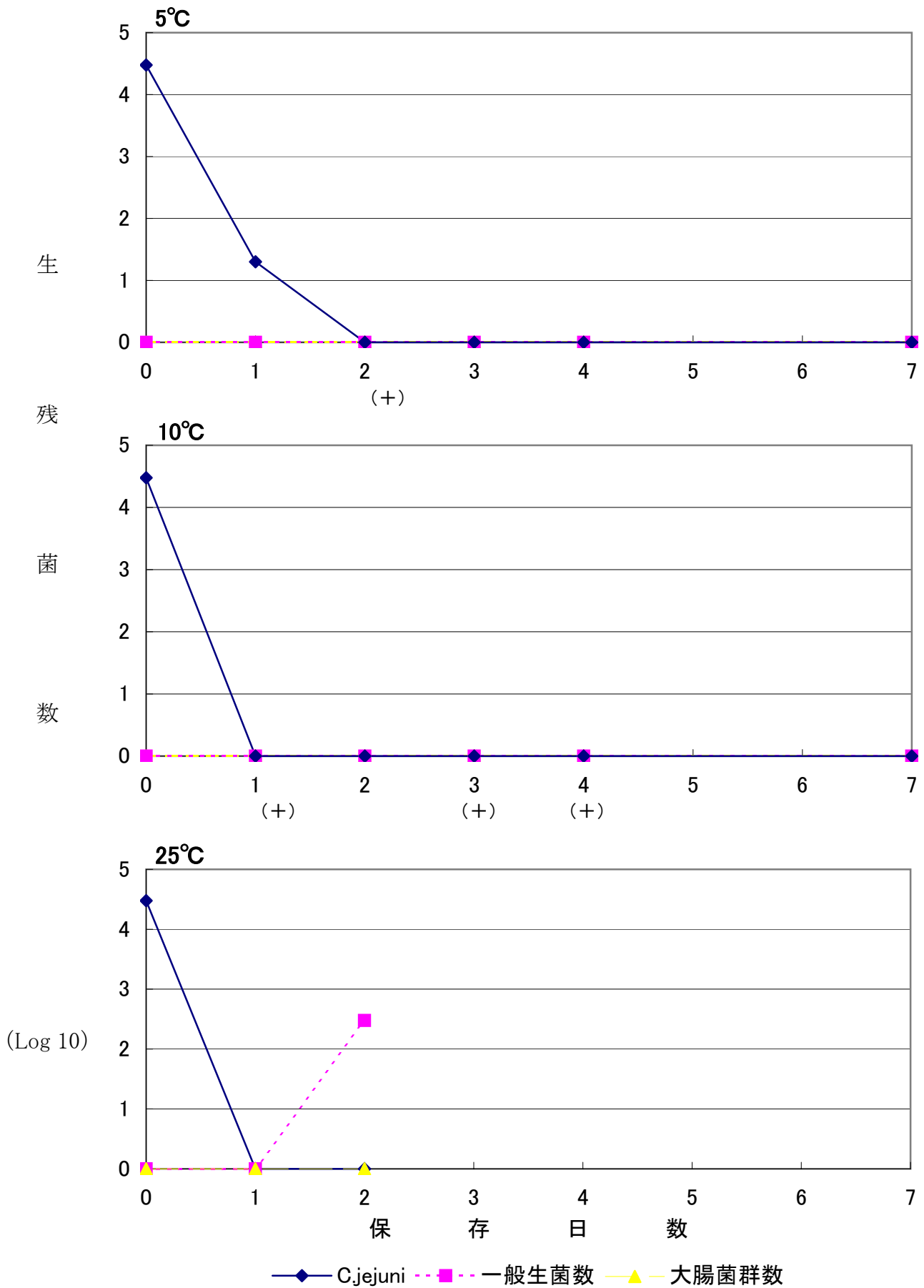


図8 シチューに添加した *C.jejuni* LIO7 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

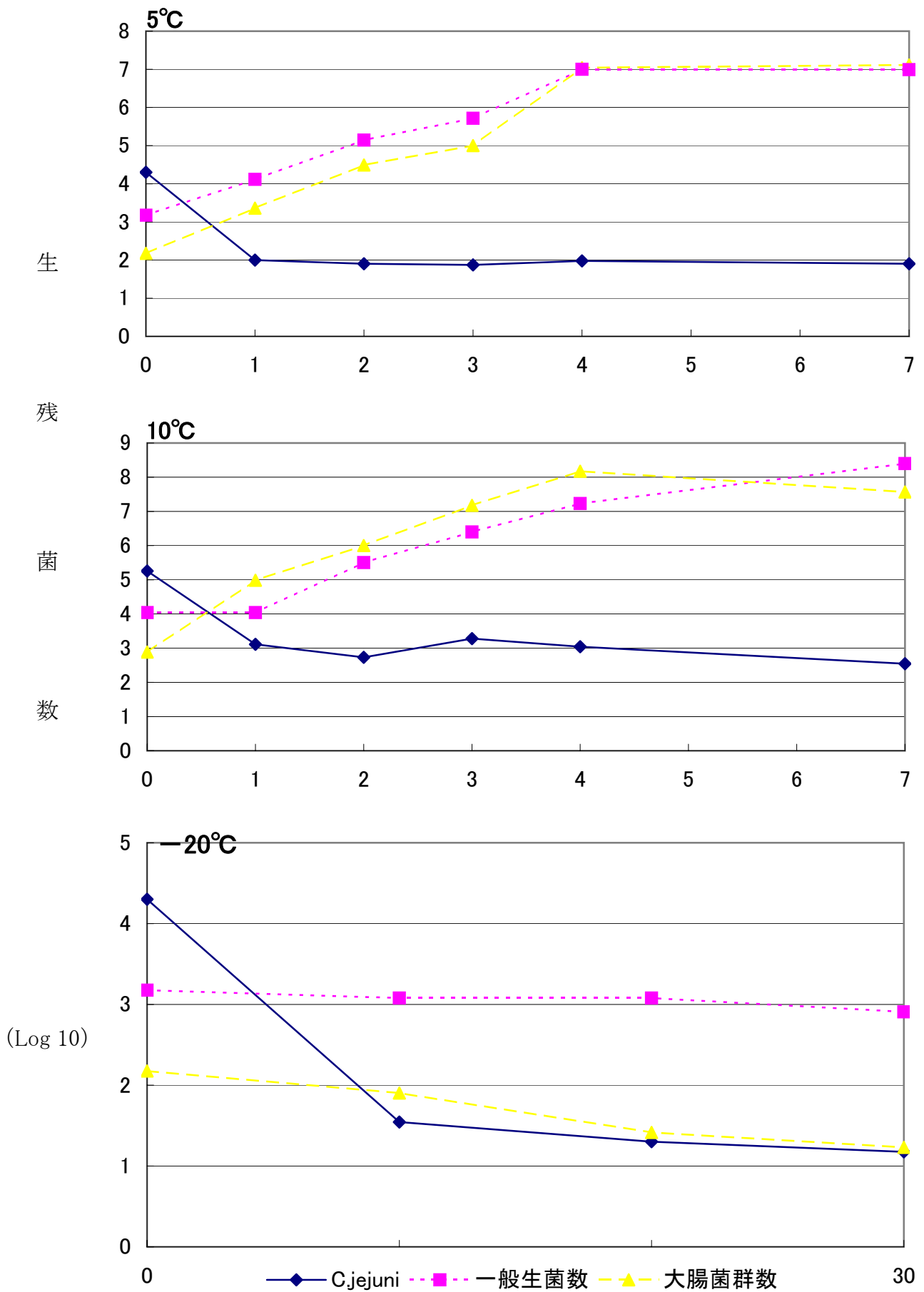


図9 鶏肉に添加した *C. jejuni* LIO4 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

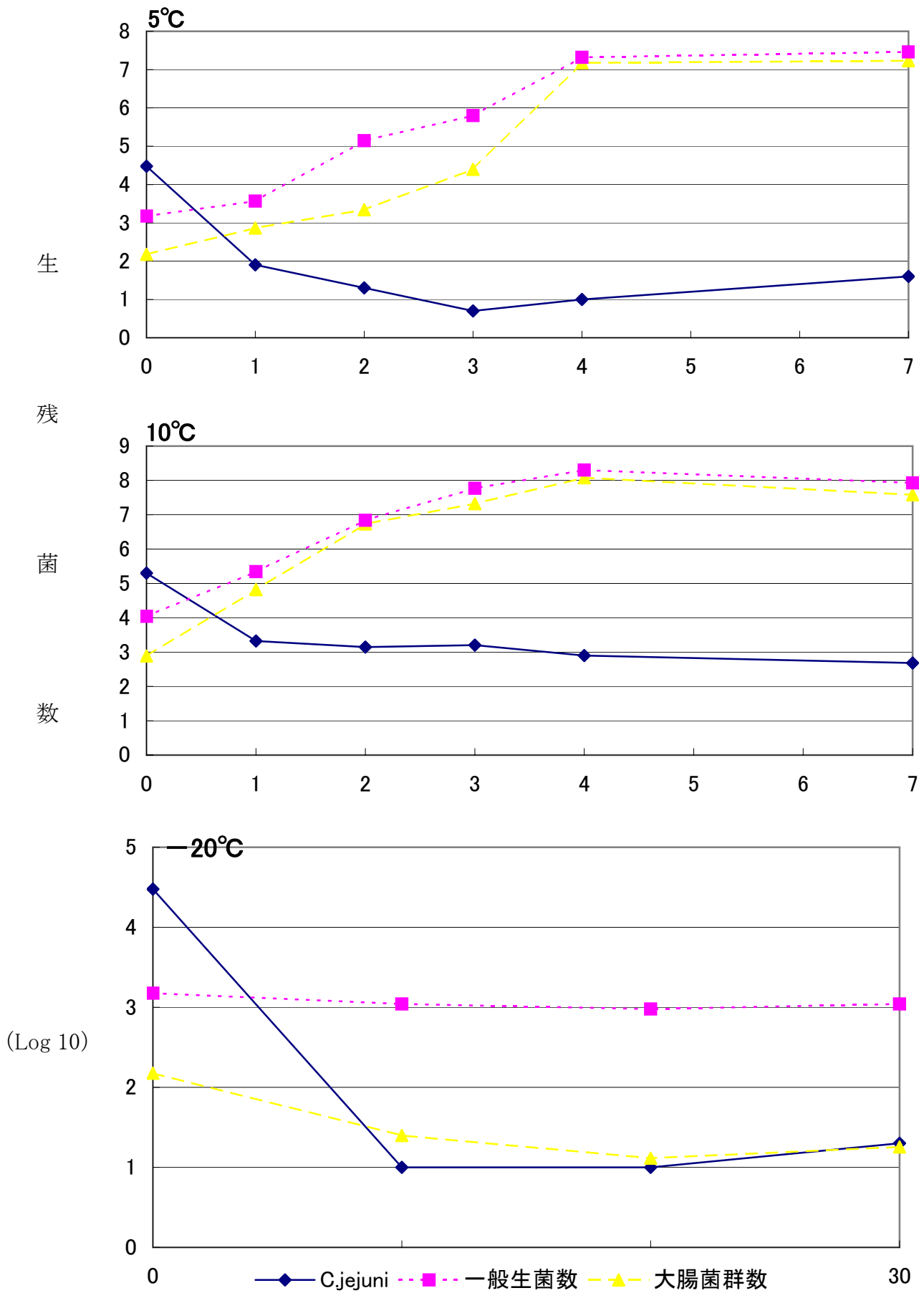


図10 鶏肉に添加した *C. jejuni* LIO7 の生残菌数および一般生菌数、大腸菌群数

図11 鶏ささ身に添加した *C.jejuni* の98°Cにおける死滅状況

