

平成17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17年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「凍結・氷温・冷蔵保存食肉中の
大腸菌 O157:H7 の D 値に関する研究」

平成18年1月
学校法人 東海大学
小沼博隆教授

研究報告書

凍結・氷温・冷蔵保存食肉中の大腸菌 O157:H7 の D 値に関する研究

分担研究者 小沼 博隆（東海大学海洋学部）

協力研究者 加藤 行男、Okatani AT（麻布大学）

研究要旨

大腸菌O157:H7は、主に牛などの家畜の腸管内に生息し、それらから生産される食肉・食肉加工食品からも検出されている。これら食肉・食肉加工食品は、本菌食中毒の重要な感染源となっている。特にアメリカでは加熱が不十分なハンバーグなどが本菌食中毒の主な感染源である。ハンバーグあるいはミートパティ等の挽肉を用いた食品の場合、本菌は食品の内部まで侵入しており、表面を十分加熱しても、その内部温度の上昇が不十分であると残存する可能性がある。これら挽肉を用いた食品は主に冷凍あるいは冷蔵で流通している。これら凍結あるいは冷蔵された挽肉製品に含まれる本菌の加熱に対する抵抗性を知ることは食肉を製造・加工・調理・保管などでの取扱や制御方法確立のためには極めて重要である。

そこで、本研究では保存温度および保存期間の異なる牛挽肉に含まれる大腸菌O157:H7の熱抵抗性（D値）の変動の有無の検討を行なった。

方法は、大腸菌O157:H7 5株を牛挽肉中に入れ凍結保存、氷温保存、冷蔵保存後の熱抵抗性の変動を経時的に計測した。

その結果、同じ菌株でも保存期間によりそれぞれの保存温度での熱抵抗性は変わり、保存期間が長くなるにつれ、菌の熱抵抗性は凍結保存の方が、冷蔵保存や氷温保存に比べ高くなることを明らかにした。また、本研究では57.5℃での大腸菌O157:H7のD値は菌株により約5倍も異なること、さらに、ほとんど検討されていない氷温保存による大腸菌O157:H7のD値の変動を明らかにした。本研究の結果は、加熱処理によるハンバーグなど挽肉等を用いた食品中の大腸菌O157:H7の制御を行う際にはこのような熱抵抗性の高い菌株が存在し、凍結保存後も熱抵抗性が高いまま保持される可能性を考慮する必要性が示唆された。

1. 研究目的

大腸菌 O157:H7 は、腸管出血性大腸菌感染症を起こす大腸菌の主要な血清型の菌で、それによる食中毒事例も多く報告されている。本菌による食中毒は、その死亡率が他の細菌性の食中毒に比べて高く、危惧される重要な問題である。本菌のヒトへの感染菌量は数十から数百個と非常に少なく、例えば、本菌に汚染された食品の加熱が不十分であった場合、残存した菌量が少なくても本菌による食中毒が発生する可能性が高いと考えられる。

本菌は、主に牛などの家畜の腸管内に生息し、それらから生産される食肉・食肉加工食品からも検出されている。これら食肉・食肉加工食品は、本菌食中毒の重要な感染源となっ

ている。特にアメリカでは加熱が不十分なハンバーグなどが本菌食中毒の主な感染源である。ハンバーグあるいはミートパティ等の挽肉を用いた食品の場合、本菌は食品の内部まで侵入しており、表面を十分加熱しても、その内部温度の上昇が不十分であると残存する可能性がある。これら挽肉を用いた食品は主に凍結あるいは冷蔵で流通している。これら凍結あるいは冷蔵された挽肉製品に含まれる本菌の加熱に対する抵抗性を知ることは重要である。

そこで、本研究では保存温度および保存期間の異なる牛挽肉に含まれる大腸菌 O157:H7 の熱抵抗性 (D 値) の変動の有無の検討を行なった。

2. 研究方法

1) 供試菌株

供試菌株として、当研究室保存のヒト下痢症患者由来の *Escherichia coli* O157:H7(以下 *E. coli* O157) 5 菌株 (以下菌株 A、B、C、D、E) を用いた。

2) 牛挽肉

牛挽肉は、赤身のブロック肉を購入し、バーナーで表面を焙りその表面を無菌的にそぎ取る作業を 3 回行い、無菌肉を作製した。その肉を無菌的に挽肉にし、115°C、5 分間オートクレーブ滅菌した牛脂を全体の 30% になるように混ぜて供試挽肉とした。作製した挽肉は trypticase soy agar (以下 TSA) で無菌(生菌数 10^{-1} 以下)であることを確認した。

3) 菌株の調整

供試した菌株は trypticase soy broth(以下 TSB)中での増殖曲線を求め、それぞれの菌株が定常期に達する時間を測定し、それぞれの菌株が定常期に達した段階で挽肉に接種した。

4) 菌株の供試材料への接種

挽肉への接種菌量は、挽肉 1g 中 10^7 cfu になるように、TSB で 11~13 時間培養した菌液を挽肉 100g に対し 1ml 接種し、よく混合して実験に用いた。

5) 検体の作成方法

菌を接種した挽肉 1g をストマッカー用ポリ袋(オルガノ社)を用いて作製した 80×25mm のポリ袋に入れ、供試材料を 2mm ほどの厚さになるように調整し、挽肉中および挽肉と袋の間に気泡が残らないようにし、ヒートシーラーで密封することにより検体を作成した。

6) 検体の前処置の方法および D 値測定のための加熱処理

冷蔵保存 (4°C) および氷温保存 (-1°C) は上記のとおり各菌株を接種した同一の牛挽肉から作製した検体を用い、保存処置を行わないコントロール (接種直後)、各保存温度で 1 日半 (36 時間) および 3 日間保存し、D 値の測定を行った。凍結保存 (-20°C) は、同様の方法で新たに作製した検体を用い、保存処置を行わないコントロール (接種直後)、各保存温度で 1 日半、3 日、7 日および 10 日間保存した検体の D 値の測定を行った。

D 値測定のための加熱処理は、恒温槽を用いて温浴中で行った。保存処置を施さないコントロール (接種直後) は、検体を作製直後に加熱処理を行った。冷蔵、氷温、凍結の各保存処置を行った検体は、それぞれの保存機器から取り出し、即座に加熱処理を行った。

D 値測定のための加熱処理の温度は冷蔵、氷温、凍結保存で 57.5°C および 60°C を用い、凍結保存の検体ではさらに 63°C での加熱処理も行った。加熱時間の測定は、検体を恒温槽に入れ、検体が所定の温度に達した段階から行った。温度の測定は菌未接種の挽肉を供試

検体同様にポリ袋に入れ、Thermo Logger AM-8000K(安立計器株式会社)で毎回測定した。加熱処理後は各検体を即座に氷水に入れ、冷却した。

7) 菌数の測定

加熱処理後の菌数は、各検体を滅菌フィルタバッグ・ミニ (エルメックス株式会社) に移し、9.0ml の滅菌 PBS を入れ、ストマッカー80T・オルガノ (Seward Medical London, UK) を用いて良く攪拌した後に必要に応じて PBS で 10 倍段階希釈を行い、その 0.1ml を TSA 平板上へのせ、コンラージ棒を用いて塗抹した。37°C、48 時間培養後、菌数の測定を行った。また、必要に応じて、TSA 平板培地 5 枚に 10 倍希釈検体を 0.2ml ずつ塗抹し、10 倍希釈検体 1 ml 当りの菌数の測定も行った。

8) D 値の算出

D 値は、各処置を行った検体中の各菌株の菌数の測定を 2 回~3 回繰り返し、その菌数の消長の平均をグラフにし、加熱時間の測定の開始から菌数が測定可能であった時間までの回帰直線の傾きを計算し、その傾きに従い算出した。D 値の単位は分ですべて示した。

3 結果

供試した各菌株の保存法、保存期間および加熱温度による菌数の消長は図 1 から図 35 に示し、冷蔵保存後、氷温保存後および凍結保存後の D 値は各自表 1、表 2 および表 3 に示した。また、検体を凍結保存したときの検体内部の温度減少を図 36 に示し、温水に検体を入れたときの検体内部の各加熱温度までの温度の上昇を図 37 から図 39 に示した。

1) 牛挽肉中に接種直後の *E. coli* O157 各菌株の D 値

挽肉に各菌株を接種し、保存処置をせずに接種直後に加熱した際の D 値は、加熱温度 57.5°C では菌株 A の 2.23 が最も低く、次いで菌株 B の 2.69、菌株 C の 3.94、菌株 D の 7.74、菌株 E の 10.74 の順であった。加熱温度 60°C では菌株 B の 0.65 が最も低く、次いで菌株 C の 0.81、菌株 B の 0.83、菌株 D の 1.94、菌株 E の 2.31 の順であった。加熱温度 63°C では、菌株 A の 0.12 が最も低く、次いで菌株 B の 0.18、菌株 C の 0.20、菌株 D の 0.35、菌株 E の 0.41 の順であった。

2) 冷蔵保存後の牛挽肉中の *E. coli* O157 各菌株の D 値

冷蔵保存後の挽肉中の各菌株の D 値は、ほとんどの菌株で保存処置をしていない挽肉(接種直後)のものよりも低下し、保存 3 日目になるとその傾向は顕著であった。保存処置による D 値の低下は、57.5°C では保存前に D 値が最も高かった菌株 E の低下が最も顕著で、保存前には 10.74 であった D 値が 3 日間保存後には 4.09 へと 61.9%低下した。次いで、菌株 C の D 値が 3.94 から 2.64 へと 33%、菌株 B の D 値が 2.69 から 1.94 へと 27.9%、菌株 D の D 値が 7.74 から 5.79 へと 25.2%、菌株 A の D 値が 2.23 から 2.12 へと 4%低下した。60°C で加熱した場合は、菌株 C の D 値が 0.81 から 0.47 へと 41.8%、菌株 E の D 値が 2.31 から 1.39 へと 39.8%、菌株 D の D 値が 1.94 から 1.17 へと 39.6%、菌株 B の D 値が 0.65 から 0.49 へと 25.0%ならびに菌株 A の D 値が 0.83 から 0.70 へと 15.7%低下した。

ただし、57.5°C では 1 日半保存後に、菌株 A の D 値は 2.23 から 3.47 へ、菌株 D の D 値

が 7.74 から 8.76 に上昇し、60℃では菌株 A では保存前の 0.83 から一日半保存後にいったん 0.48 まで低下した D 値が 0.70 まで上昇し、菌株 B では、1 日半目に 0.48 であった D 値が 0.50 に若干上昇していた。

2) 氷温保存後の牛挽肉中の *E. coli*O157 各菌株の D 値

氷温保存後の挽肉中の各菌株の D 値は冷蔵保存後の変化同様に、ほとんどの菌株で保存処置をしていない挽肉（接種直後）のものよりも低下し、保存 3 日目にその傾向は顕著であった。保存処置による D 値の低下は、57.5℃では保存前に D 値が最も高かった菌株 E の低下が最も顕著で、保存前には 10.74 であった D 値が 3 日間保存後には 3.29 へと 69.4%低下した。次いで、菌株 D の D 値が 7.74 から 4.29 へと 44.5%、菌株 C の D 値が 3.94 から 2.64 へと 33.1%、菌株 B の D 値が 2.69 から 2.02 へと 25%、菌株 A の D 値が 2.23 から 2.02 へと 7.9%低下した。60℃で加熱した場合、菌株 E が 57.5℃での加熱時と同様に、D 値が最も低下し、2.31 から 0.99 へと 57.0%低下したが、氷温保存では次いで菌株 A の D 値が 0.83 から 0.44 へと 47% 低下、菌株 D の D 値が 1.94 から 1.11 へと 42.5%、菌株 C の D 値が 0.81 から 0.57 へと 29.9%、および菌株 B の D 値が 0.65 から 0.50 へと 23.1%低下した。1 日半保存後の D 値でもほとんどの場合には D 値は保存処置前に比べ低下したか或いは変化が見られなかったが、菌株 A の D 値は保存処置を施していないものに比べ、57.5℃および 60℃のいずれの加熱温度でも上昇し、57.5℃では 2.23 であった D 値は 3.96 まで上昇、60℃では 0.83 から 0.99 に上昇した。また、菌株 B では保存前に 0.65 だった D 値が 1 日半保存後には 0.47 低下し、3 日間保存後には 0.50 と微小の上昇が見られた。

3) 凍結保存後の牛挽肉中の *E. coli*O157 各菌株の D 値

凍結保存後では、冷蔵保存および氷温保存後の結果とは対照的に、菌株 A の D 値の低下が最も大きく、57.5℃で接種直後には 2.23 であった D 値が 7 日目には 0.77 と 65.6%低下、10 日目には 0.43 と 80.7%低下、60℃においても接種直後には 0.83 の D 値が 7 日目には 0.62 と 25.0%低下、10 日目には 0.24 と 70.9%と著しく低下した。しかし、57.5℃で 1 日半目および 3 日目には 57.5℃の加熱で 1 日半目の D 値が 2.49、3 日目には 2.37 となり、接種直後の 2.23 に比べ上昇していた。また、63℃でも同様に、1 日半目で 0.22 と接種直後の 0.12 よりも上昇していたが、3 日目および 7 日目には挽肉の内部温度が 63℃に達した時点で最小希釈段階でも TSA 寒天培地上に菌の発育が確認されず、10 日目には最小希釈段階（ 10^{-1} ）で 3 回繰り返しのうちの 1 回で 1 または少数のコロニーのみが TSA 平板培地上で確認されたが、その他の繰り返しではコロニーの発育が見られず不安定であったため、D 値は測定不可能であった。

菌株 B の 60℃では接種直後の 0.65 に比べ、1 日半目には 0.61 に低下、3 日目には 0.69 と僅かに上昇、63℃でも同様に接種直後には 0.18 であった D 値が 1 日半目には 0.15 に低下、3 日目には 0.17 に若干上昇が見られたが、菌株 A 同様に 7 日目には 57.5℃で 2.31 へと 14.1%、60℃で 0.49 へと 24.0%、63℃で 0.13 へと 28.4%、10 日目には 57.5℃で 2.12 へと 21.1%、60℃で 0.42 へと 34.9%、63℃で 0.11 へと 40.3%と D 値は接種直後に比べ著しく低下していた。

菌株 C では 57.5℃では接種直後には 3.94 であった D 値が 1 日半目には 3.52、3 日目に

は 3.02 と低下したが、7 日目には 3.60 と 1 日半目および 3 日目に比べ上昇し、10 日目には 3.17 へと再度低下し、接種直後に比べ、19.6%低下していた。60℃では接種直後に 0.81 であった D 値が 1 日半目には 0.92 に上昇したが、その後は低下し、10 日目には 0.68 と 15.8%低下していた。例外は 63℃で、接種直後には 0.20 であった D 値が変動はあったものの、1 日半目には 0.30、3 日目には 0.21、7 日目には 0.41、10 日目には 0.32 の D 値を示し、10 日目でも接種直後に比べ、61.8%も上昇していた。

菌株 D では 57.5℃では、接種直後では 7.74 であった D 値が、保存日数が増えるにつれ低下し、7 日目で 5.23 まで低下したが、10 日目には 5.58 となり若干上昇し、60℃でも接種直後には 1.94 であった D 値が 1 日半目には 1.33 へと低下したが、その後は 10 日目の 1.50 まで徐々に上昇した。63℃では 3 日目に 0.47 と接種直後の 0.35 に比べ上昇していたが、その他の期間では低下しており、10 日目には 0.26 であった。

菌株 E の 57.5℃では接種直後の 10.74 が 1 日半目には 8.46、3 日目には 7.26 と低下したが、7 日目に 8.02、10 日目に 8.36 と 3 日目に比べ、上昇し、60℃においても接種直後の 2.31 から 7 日目の 1.46 まで低下したが、10 日目では 1.64 であった。63℃では接種直後の 0.41 が、1 日半から 10 日目までは 0.33 から 0.38 の範囲で推移した。

凍結保存における各菌株の D 値を減少率でみると、保存 1 日半と 3 日目では一部の例外はあるものの概ね冷蔵保存および氷温保存と同様に、熱抵抗性が高い菌株 E および菌株 D の D 値の低下率が他の菌株に比べ大きかった。しかし、10 日目では、菌株 D および E の低下率は菌株 C に次いで低い値で、菌株 A の D 値の低下率が最も大きくなった。

4) 冷蔵・氷温・凍結保存後の *E. coli* O157 の熱抵抗性への影響の比較

1 日半目の D 値を比較すると、冷蔵保存および氷温保存の菌株 B、C、D の 60℃の D 値は冷蔵保存、氷温保存でほとんど差は見られなかった。菌株 A の氷温保存後の D 値は 57.5℃で 3.96 および 60℃で 0.99、菌株 B の 57.5℃で 2.66、菌株 E の 60℃で 2.04 であったのに対し、冷蔵保存後ではこれらの D 値は 3.47 および 0.48、2.54、1.88 で、氷温保存後の D 値の方が冷蔵保存後に比べ高かった。それとは逆に菌株 C、D、E の 57.5℃の冷蔵保存後の D 値は 3.91、8.76 ならびに 9.17 であったのに対し、氷温保存後のこれらの D 値は 3.28、7.74 ならびに 8.92 で、冷蔵保存後の D 値の方が氷温保存後に比べ高かった。凍結保存後では 57.5℃で菌株 B の D 値が 2.61、菌株 C の D 値が 3.52 であったのに対し、冷蔵保存後では菌株 B の D 値が 2.54、菌株 C の氷温保存後の D 値が 3.28 で、凍結保存後の D 値の方が他の二つよりも高かった。60℃では凍結保存後の菌株 B の D 値が 0.61 であったのに対し、冷蔵保存後および氷温保存後のいずれでも 0.48D で、凍結保存後の D 値の方が高かったが、その他では冷蔵保存および氷温保存よりも凍結保存後の D 値の方が低かった。3 日目になると、菌株 C の 57.5℃の D 値は、氷温保存と冷蔵保存の間で差は見られなかったが、冷蔵保存後の菌株 B の 57.5℃が 1.94、60℃で 0.49 ならびに菌株 C の 60℃の D 値が 0.47 であったのに対し、氷温保存後のそれらの D 値は 2.02 および 0.50 ならびに 0.57 で、氷温保存後の方が高かった。冷蔵保存後の菌株 A、D および E の D 値は 57.5℃で 2.12、5.79 および 4.09 ならびに 60℃で 0.70、1.17 および 1.39 であったのに対し、氷温保存後のこれらの D 値は 2.05、4.29 および 3.29 ならびに 0.44、1.11 および 0.99 で、いずれの D 値も冷蔵保存後の方が高かった。凍結保存後では、菌株 D の 57.5℃の D 値が 5.70 であったのに

対し、冷蔵保存後では 5.79 と冷蔵保存後の D 値の方が若干高かったが、それ以外では冷蔵保存後および氷温保存後よりも凍結保存後の D 値のほうがたかった。

4 考察

本研究では、脂肪分含有率 30%程牛挽肉を用いて、ハンバーグあるいはミートパティ等のような牛挽肉を用いた食品に含まれる大腸菌 O157:H7 の熱抵抗性 (D 値) の保存温度および保存期間による変動の有無の検討を行なった。その結果、挽肉に菌株を接種した直後の D 値は、加熱温度 57.5°C では 2.23 から 10.74、加熱温度 60°C では 0.65 から 2.31、加熱温度 63°C で 0.12 から 0.41 と同一の加熱温度でも菌株により D 値に 3~5 倍の差が認められた。また、冷蔵保存、氷温保存ならびに凍結保存後では、1 日半と保存期間が短い場合には D 値が上昇する菌株が存在するが、57.5°C および 60°C では保存期間が長くなると全ての菌株で D 値の低下が認められた。しかし、菌株によっては、本研究で用いた最も高い加熱温度 (63°C) で 10 日間凍結保存しても 1 日半以降は D 値が低下しない菌株の存在も明らかになった。また、菌株によって D 値の低下の割合が大きく異なり、保存温度により同じ菌株でも D 値の変動率が大きく異なった。

以前にも *E. coli* O157 の挽肉中などの D 値に関する研究は行われているが、そのほとんどが 1 菌株あるいは複数の菌株を混合したものをを用いて行っている。Huang ら(2003)は *E. coli* O157 の D 値が 57.5°C で 2.64、60°C で 1.71、Orta-Ramirez ら (1997)は 63°C の D 値は 0.43、Jujena ら (1997) は 57.5°C で 4.95 ± 0.16 、60°C で 3.17 ± 0.18 であったと報告している。本研究と彼らの研究のデータを比較すると、本研究で加熱温度 57.5°C における最も高い D 値は菌株 E の 10.74 であったのに対し、報告されている最も高い値は Jujena ら (1997)の 5.11 で、本研究で用いた菌株 C (3.94) と菌株 D (7.74) の中間位の値である。加熱温度 60°C では本研究で最も高かった菌株 E の 2.31 が、Huang ら(2003)の 1.71 と Jujena ら(1997)の最も高い値の 3.35 の中間であった。加熱温度 63°C では本研究の最も高い値が 0.41 で、Orta-Ramirez ら(1997)の 0.43 とほぼ一致していた。供試した 5 菌株のいずれかで彼らの得た D 値の結果に近い値が見られた。しかし、我々の研究では菌株 E の 57.5°C の D 値は、彼らの値に比べ、少なくとも 2 倍以上も高い値を示している。細菌の熱抵抗性は菌株、培養時間、温度などにより大きく変動することが知られているが、前述した研究も我々と同様に 37°C で培養し、定常期に達した菌株を使用しており、培養温度による影響である可能性は低いと想定した場合、菌株の違いによるものと思われた。しかし、彼らの結果が 1 菌株または 4 菌株を混合して使用したものであるため、その 1 菌株の D 値のみの結果または混合することにより、熱抵抗性の高い菌株と低い菌株が混合されていた場合には熱抵抗性の強い菌株の値が緩和されている可能性も考えられ、個々の菌株の値を求めた今回の実験では熱抵抗性の強い菌株の値が明確に得られたものと思われる。

冷蔵保存、氷温保存および凍結保存による菌株の D 値の変動

冷蔵保存および氷温保存では 3 日目には 57.5°C および 60°C には全ての菌株の D 値が低下し、菌株の熱抵抗性が低下していた。冷蔵保存および氷温保存の各菌株の D 値の変動を比較すると、保存期間が短い 1 日半目では 2 つの保存方法のいずれにおいても、加熱温度および菌株の違いにより D 値の変動に一定の傾向は認められず。この時点での熱抵抗性の変

動は個々の菌株が持つ特徴によるものと思われた。保存 3 日目では供試した 5 菌株中 3 菌株において、氷温保存に比べ冷蔵保存後の D 値の方が高かった。氷温保存に比べ冷蔵保存後の熱抵抗性の低下が少ない理由は定かでないが、冷蔵保存の方が菌体に与える損傷の程度が低い、あるいは冷蔵保存の方が供試した菌株にとって環境の変化に対する適応性を何らかの形で高めた結果、熱抵抗性の低下がおさえられたのではないかと考えられた。

凍結保存では 1 日半目にはほとんどの菌株で冷蔵保存および氷温保存後に比べ、熱抵抗性が低くなっていたが、3 日目にはそれらの保存方法よりも逆に熱抵抗性が高くなっていた。Jujena ら (1997) は 57.5°C、60°C で *E. coli* O157 を加熱したときに、保存処置を施さなかったものと冷蔵保存後(4°C)および凍結保存後(-18°C)で 48 時間保存しても D 値はほぼ同じで、保存による違いは認められなかったとしているが、Jackson ら(1996)は 55°C での加熱では凍結保存(-18°C、1~15 日間保存)した菌株の D 値が冷蔵保存(3°C、3 から 9 時間保存)したものに比べ高かったと報告している。Zhao ら (2004) は Jackson(1996) らとは逆に、3 週間ほど凍結保存 (-20°C) した菌株のほうが 10 日間ほど冷蔵保存(5°C)した菌よりも熱抵抗性が低下したと報告している。これらのように報告によって結果が異なるのは、熱抵抗性を継続的に測定したのは Jackson ら(1996)のみだが、彼らは 1 菌株のみを使用して実験を行なっている。一方、複数の菌株を用いた Zhao ら(2004)は継続的なデータを示していない。また、研究者によっては供試菌として複数の菌株を混合して用いている。このことから報告によって結果が異なるのは、使用菌株の違いによることが原因として考えられた。

本研究では、5 菌株それぞれを冷蔵保存および氷温保存で 3 日まで、凍結保存で 10 日間までのデータを計測した結果、多くの菌株では 1 日半では凍結保存された菌の方の熱抵抗性が低くなるが、保存期間が 3 日になると、逆の現象が起こり、凍結保存のほうがほとんどの菌株で冷蔵保存および氷温保存後よりも高くなっていた。冷蔵保存、氷温保存、凍結保存後の D 値を比較した際、時間がたつにつれ凍結保存の熱抵抗性が高くなった理由は明らかではないが、凍結保存のほうが冷蔵保存や氷温保存より菌にとって生存するのにより厳しい環境であり、初期段階では凍結による菌体の損傷などにより、熱抵抗性が大きく低下するのではないかと考えられる。しかし、時間の経過とともに、細菌が凍結という極限の環境で生き残るのにヒートショックプロテインのような耐性蛋白などを産生し、その影響で熱抵抗性が高くなると推測された。

本研究では、*E. coli* O157 5 株を牛挽肉中に入れ冷蔵保存、氷温保存、凍結保存後の *E. coli* O157 の熱抵抗性の変動を経時的に計測し、同じ菌株でも保存期間によりそれぞれの保存温度の熱抵抗性は変動し、保存期間が長くなるにつれ冷蔵保存および氷温保存後に比べ凍結保存後の熱抵抗性の方が高くなる傾向を示すことが明らかとなった。また、本研究では 57.5°C での *E. coli* O157 の D 値は菌株により約 5 倍も異なることが明らかとなり、さらに、ほとんど検討されていない氷温保存による *E. coli* O157 の D 値の変動あきらかにした。以上の結果から、加熱処理による牛挽肉等の食品中の *E. coli* O157 の制御を行う際にはこのような熱抵抗性の高い菌株が存在し、凍結保存後も熱抵抗性が高いまま保持される可能性を考慮する必要性が示唆された。

5 参考文献

1. Doyle, M. P., and Schoeni, J. L. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:855-856
2. Grzadkowska, D. and Griffiths. 2001. Cryotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media and food. *J. Food Sci.* 66:1169-1173.
3. Huang, L., and Jujena, V. K. 2003. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef supplemented with sodium lactate. *J. Food Prot.* 66:664-667.
4. Jackson, T. C., Hardin, M. D., and Acuff, G. R. 1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. *J. Food Prot.* 59:230-237.
5. Jujena, V. K., Snyder, O. P. Jr., Marmer, B. S. 1997. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *Int. J. Food microbiol.* 35:231-237.
6. Jujena, V. K., Klein, P.G., and Marmer. 1998. Heat shock and thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in a model beef gravy system and ground beef. *J. Food Prot.* 84:677-684.
7. Orta-Ramirez, A., Price, J. F., Hsu, Y-C., Veeramuthu, G. J., Cherry-Merritt, J. S., and Smith, D. M. 1997. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella senftenberg*, and enzymes with potential as time-temperature indicators in ground beef. *J. Food Prot.* 60:471-475.
8. Zhao, T., Doyle, M. P., Kemp, M. C., Howell, R. S., and Zhao, P. 2004. Influence of freezing and freezing plus acidic calcium sulfate and lactic acid addition on thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot.* 67:1760-1764.

表1. *E. coli* 0157 : H7を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に加熱したときのD値

菌株	加熱温度(°C)	冷蔵保存期間およびD値(分)		
		接種直後	1日半	3日
A	57.5	2.23	3.47	2.12
	60	0.83	0.48	0.70
B	57.5	2.69	2.54	1.94
	60	0.65	0.48	0.49
C	57.5	3.94	3.91	2.64
	60	0.81	0.76	0.47
D	57.5	7.74	8.76	5.79
	60	1.94	1.78	1.17
E	57.5	10.74	9.17	4.09
	60	2.31	1.88	1.39

表2. *E. coli* 0157 : H7を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間氷温保存後に加熱したときのD値

菌株	加熱温度(°C)	氷温保存期間およびD値(分)		
		接種直後	1日半	3日
A	57.5	2.23	3.96	2.05
	60	0.83	0.99	0.44
B	57.5	2.69	2.66	2.02
	60	0.65	0.48	0.50
C	57.5	3.94	3.28	2.64
	60	0.81	0.77	0.57
D	57.5	7.74	7.74	4.29
	60	1.94	1.78	1.11
E	57.5	10.74	8.92	3.29
	60	2.31	2.04	0.99

表3. *E. coli* 0157 : H7を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日
および10日間冷凍保存後に加熱したときのD値

菌株	加熱温度(°C)	冷凍保存期間およびD値(分)				
		接種直後	1日半	3日	7日	10日
A	57.5	2.23	2.49	2.37	0.77	0.43
	60	0.83	0.54	0.90	0.62	0.24
	63	0.12	0.22	—	—	—
B	57.5	2.69	2.61	2.34	2.31	2.12
	60	0.65	0.61	0.69	0.49	0.42
	63	0.18	0.15	0.17	0.13	0.11
C	57.5	3.94	3.52	3.02	3.60	3.17
	60	0.81	0.92	0.80	0.79	0.68
	63	0.20	0.30	0.21	0.41	0.32
D	57.5	7.74	6.37	5.70	5.23	5.58
	60	1.94	1.33	1.36	1.39	1.50
	63	0.35	0.31	0.47	0.28	0.26
E	57.5	10.74	8.46	7.26	8.02	8.36
	60	2.31	1.70	1.49	1.46	1.64
	63	0.41	0.38	0.34	0.37	0.33

— : D値算出不能

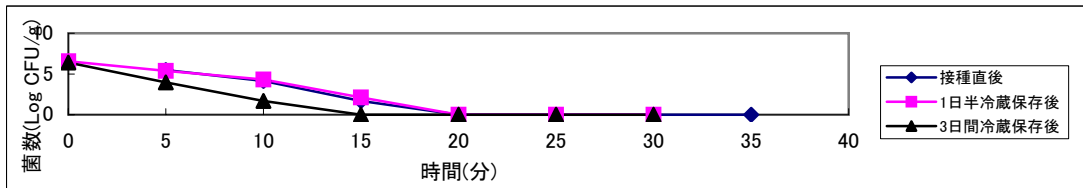


図1. 大腸菌O157:H7(菌株A)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

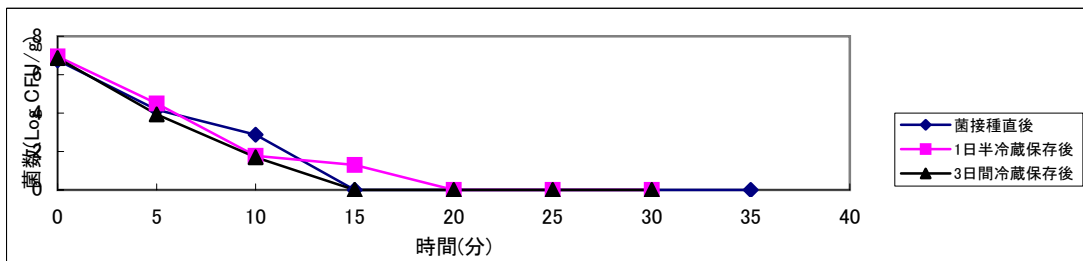


図2. 大腸菌O157:H7(菌株B)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

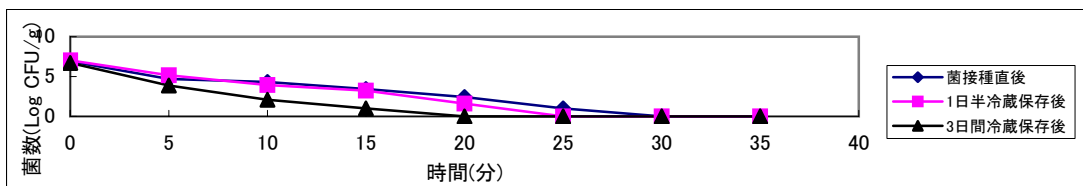


図3. 大腸菌O157:H7(菌株C)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

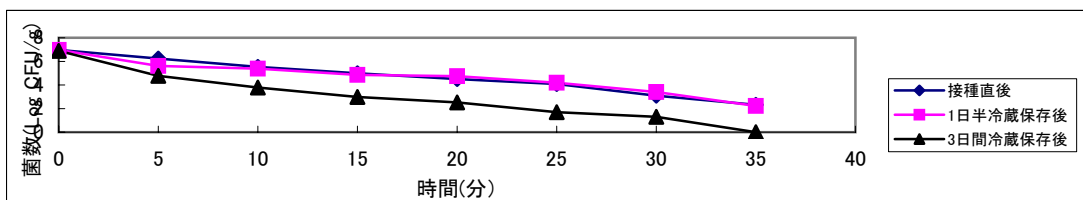


図4. 大腸菌O157:H7(菌株D)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

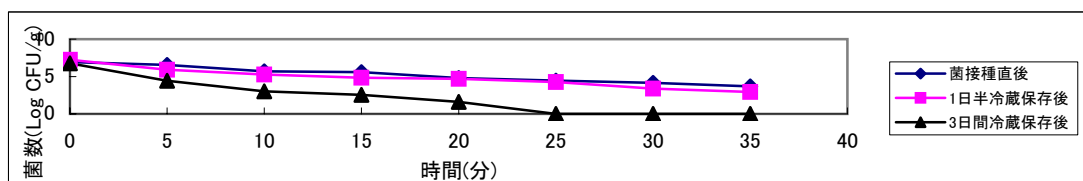


図5. 大腸菌O157:H7(菌株E)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

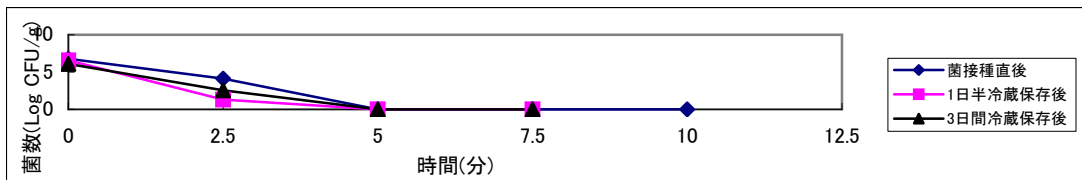


図6. 大腸菌O157:H7(菌株A)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に60°Cで加熱したときの消長

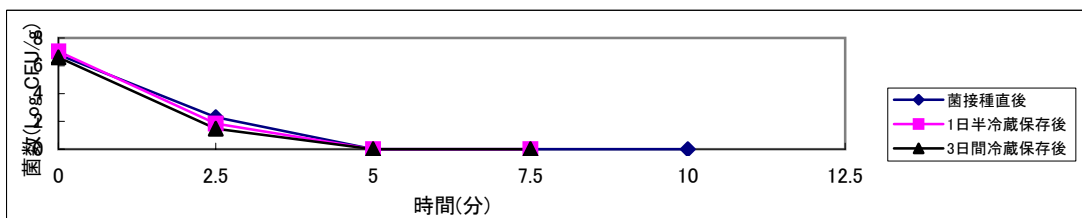


図7. 大腸菌O157:H7(菌株B)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に60°Cで加熱したときの消長

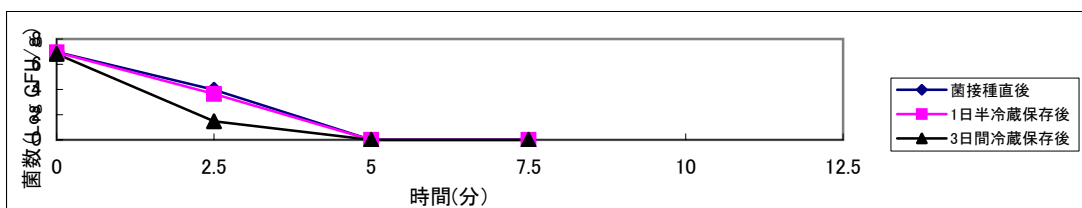


図8. 大腸菌O157:H7(菌株C)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に60°Cで加熱したときの消長

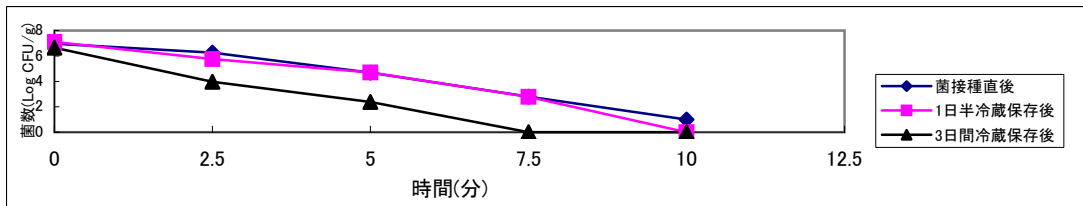


図9. 大腸菌O157:H7(菌株D)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間冷蔵保存後に60°Cで加熱したときの消長

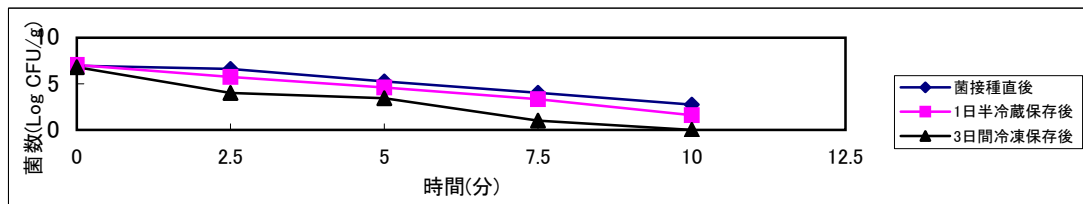


図10. 大腸菌O157:H7(菌株E)を牛挽肉に接種し、接種後、1日半および3日間冷蔵保存後に60°Cで加熱したときの消長

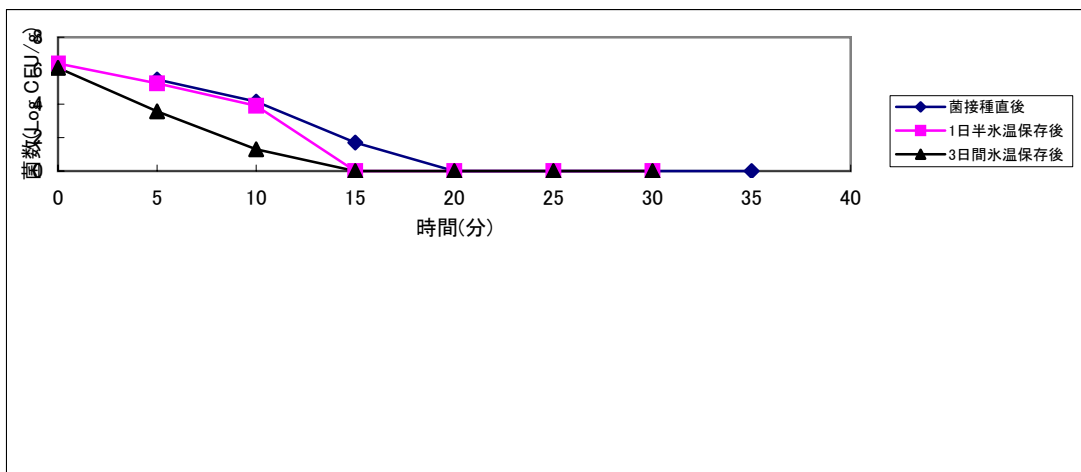


図11. 大腸菌O157:H7(菌株A)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間 水温保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

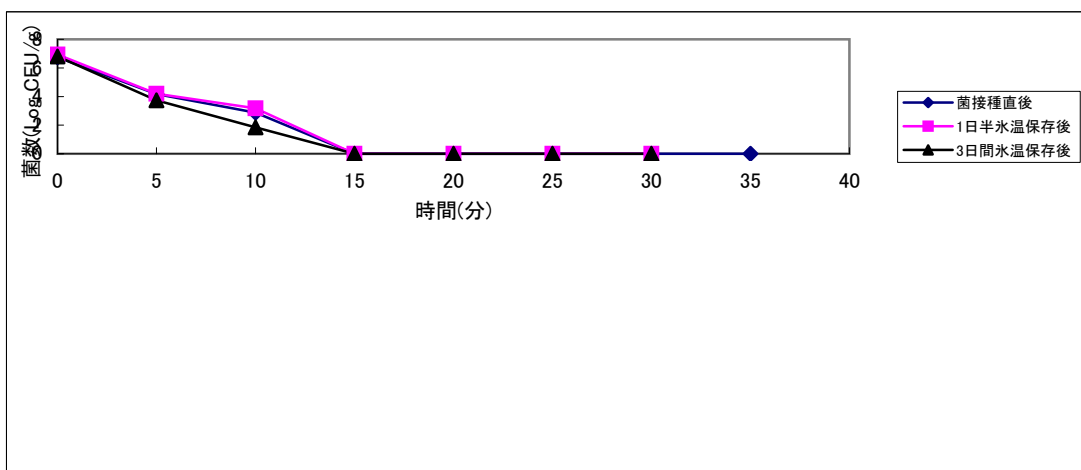


図12. 大腸菌O157:H7(菌株B)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間水温保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

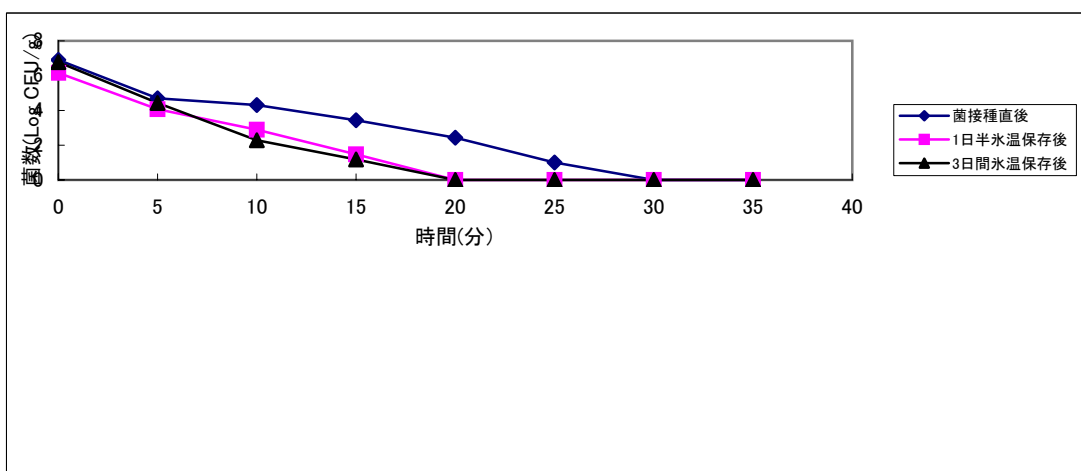
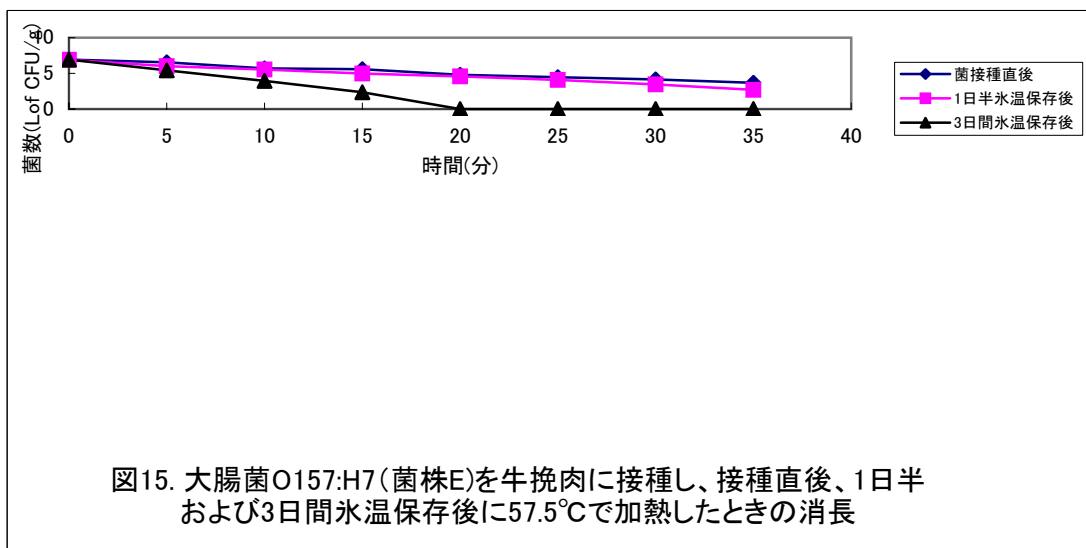
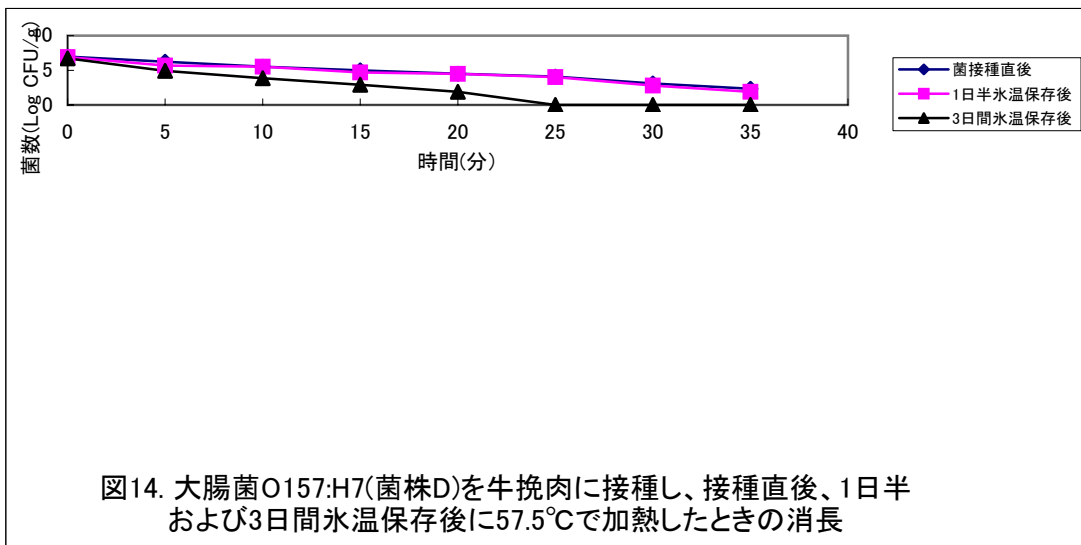


図13 .大腸菌O157:H7(菌株C)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間水温保存後に57.5°Cで加熱したときの消長



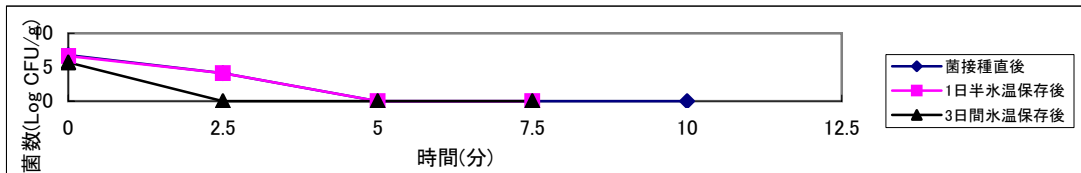


図16. 大腸菌O157:H7(菌株A)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間氷温保存後に60°Cで加熱したときの消長

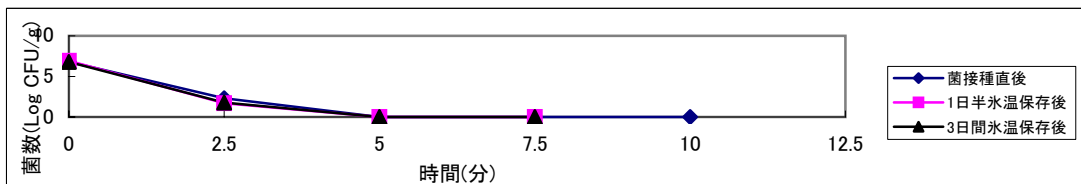


図17. 大腸菌O157:H7(菌株B)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間氷温保存後に60で加熱したときの消長

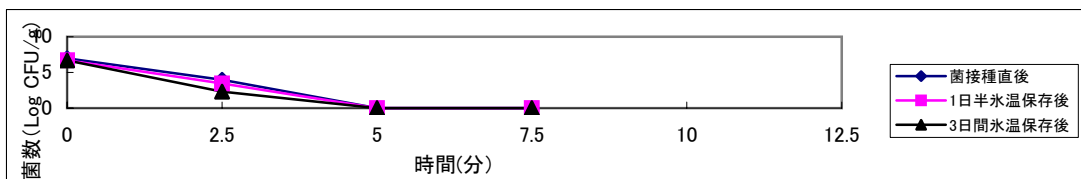
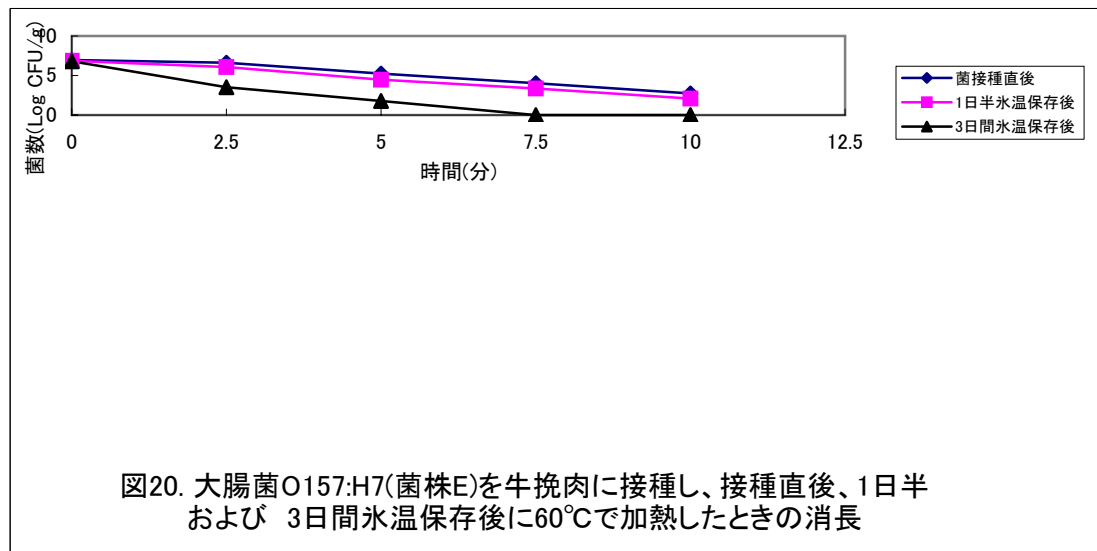
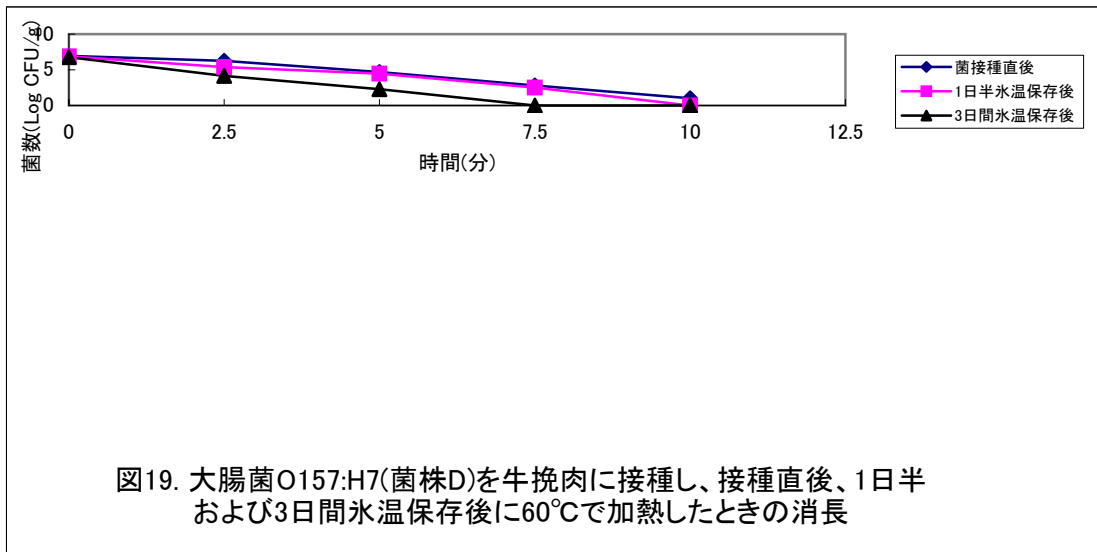
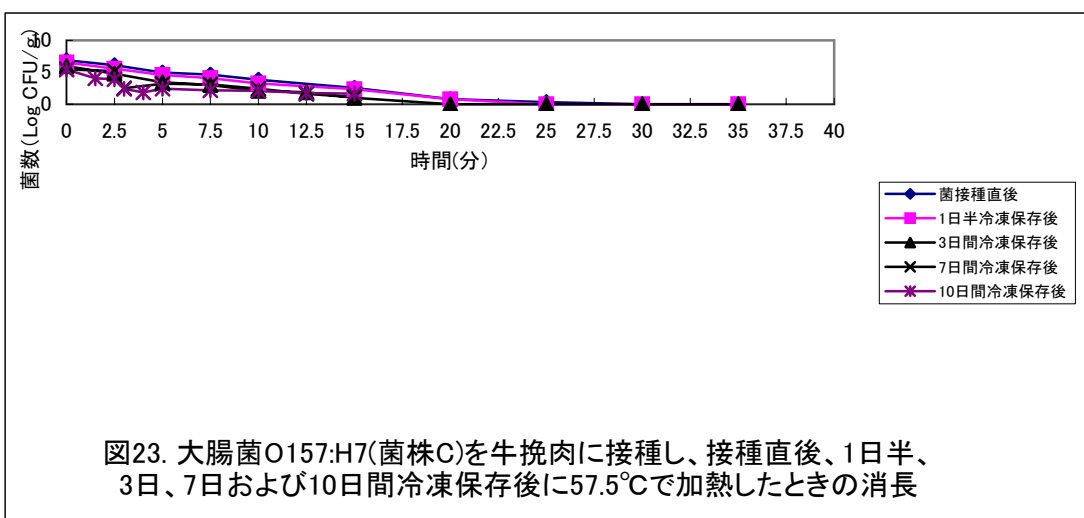
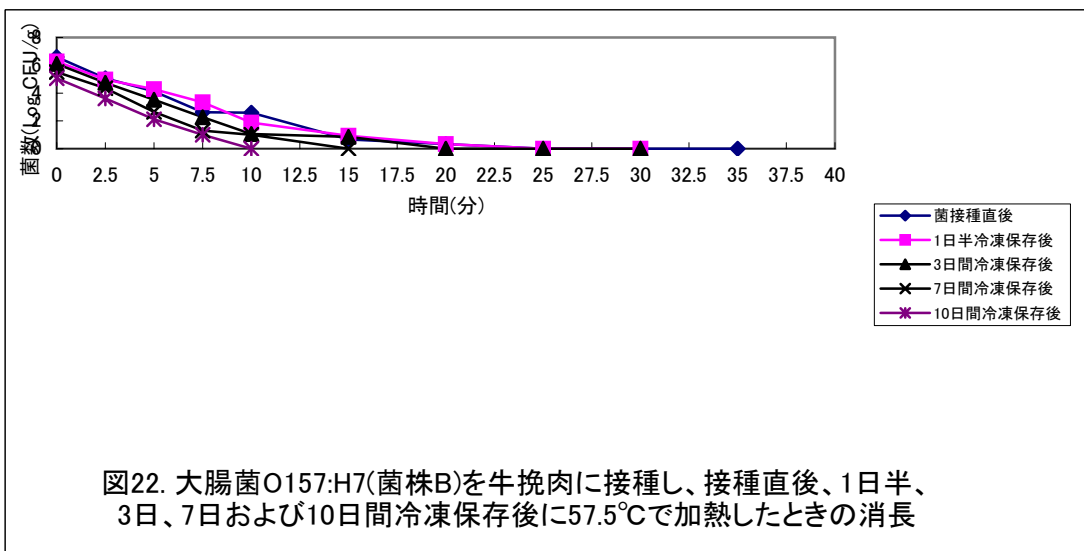
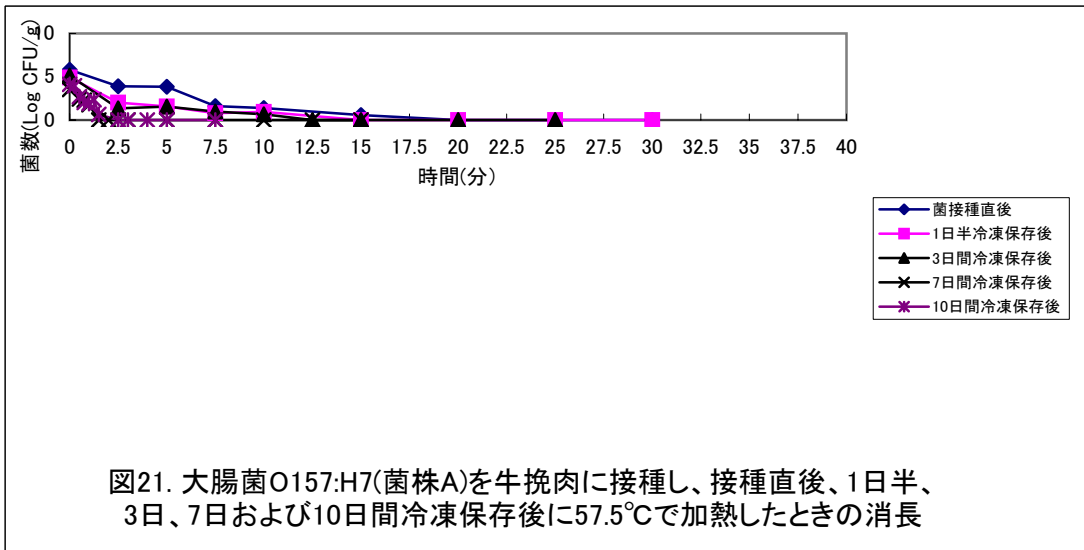


図18. 大腸菌O157:H7(菌株C)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半および3日間氷温保存後に60°Cで加熱したときの消長





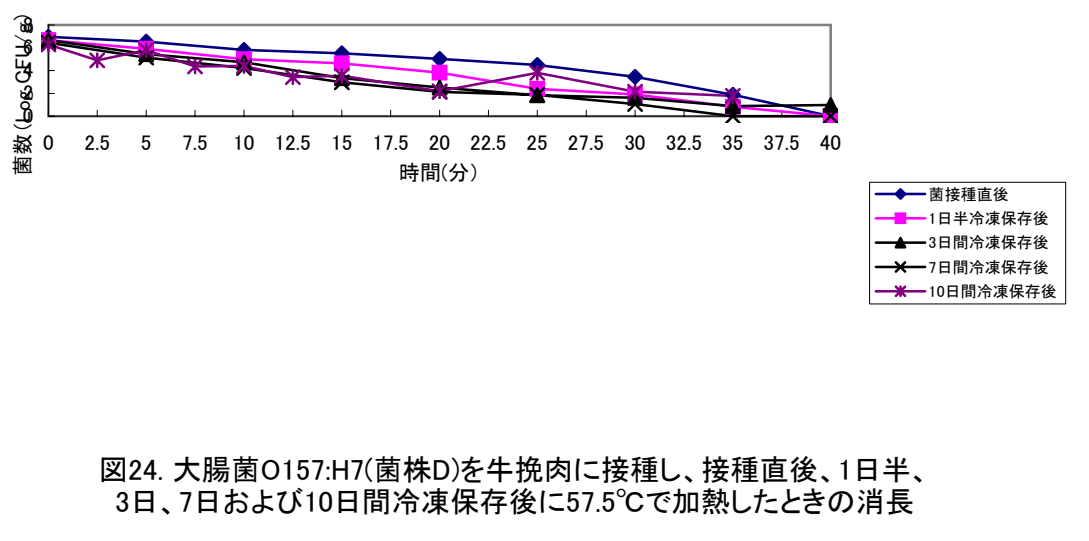


図24. 大腸菌O157:H7(菌株D)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

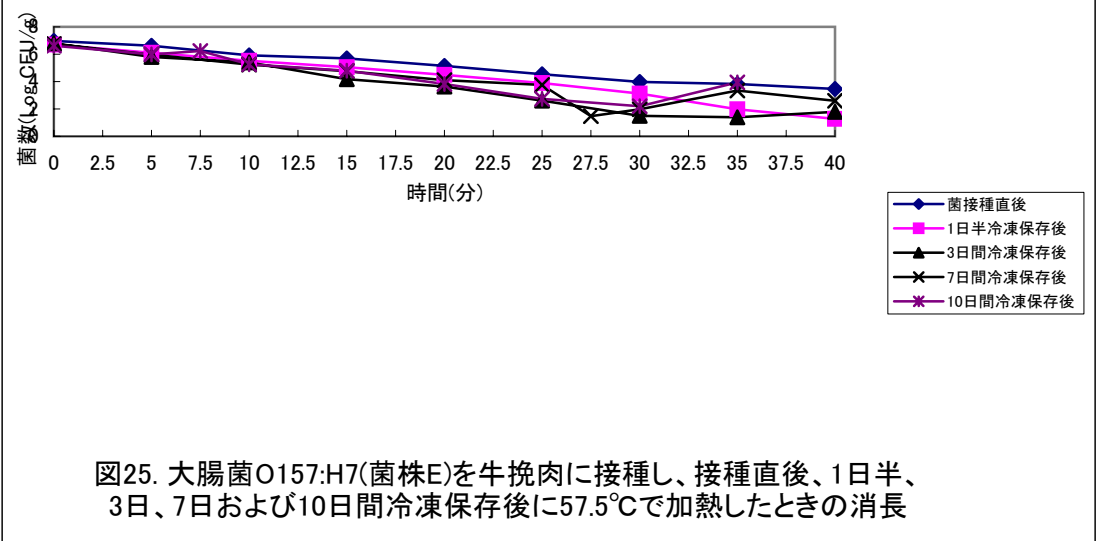


図25. 大腸菌O157:H7(菌株E)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に57.5°Cで加熱したときの消長

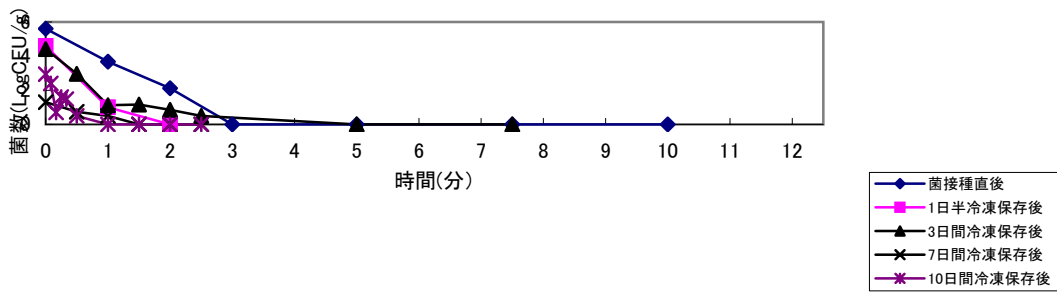


図26. 大腸菌O157:H7(菌株A)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に60°Cで加熱したときの消長

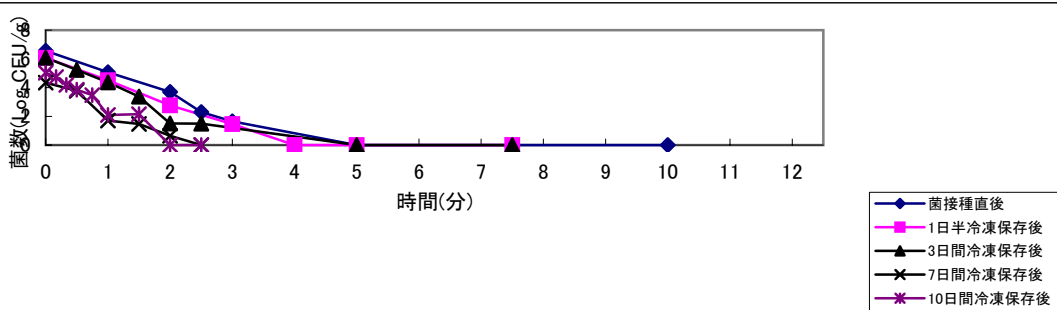


図27. 大腸菌O157:H7(菌株B)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に60°Cで加熱したときの消長

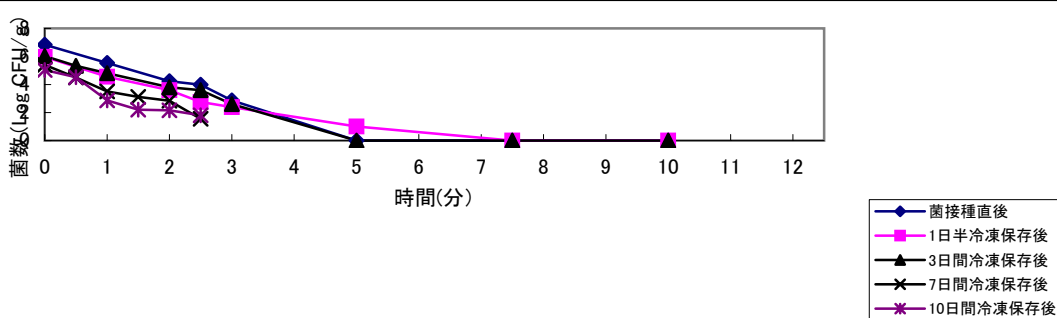
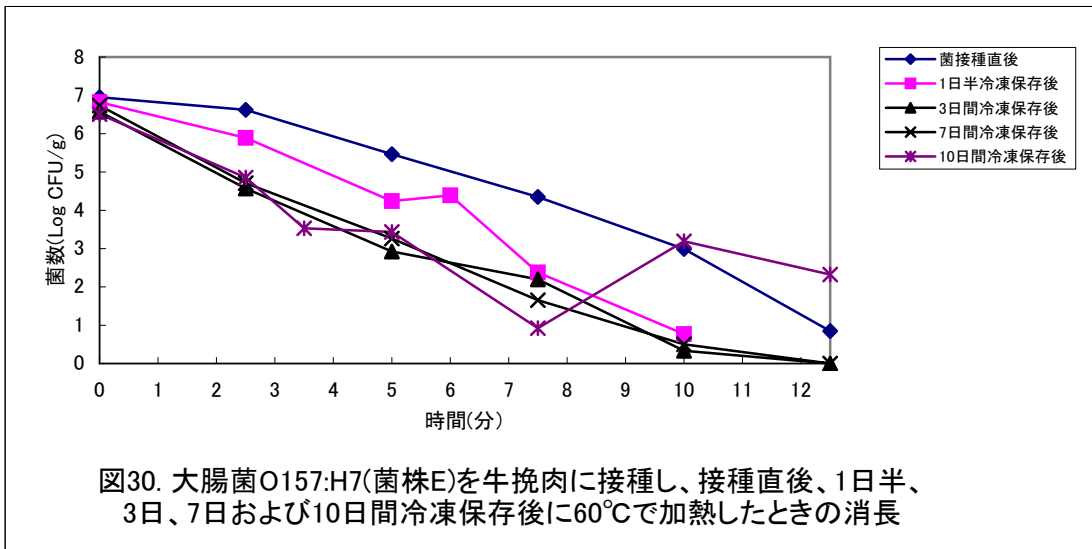
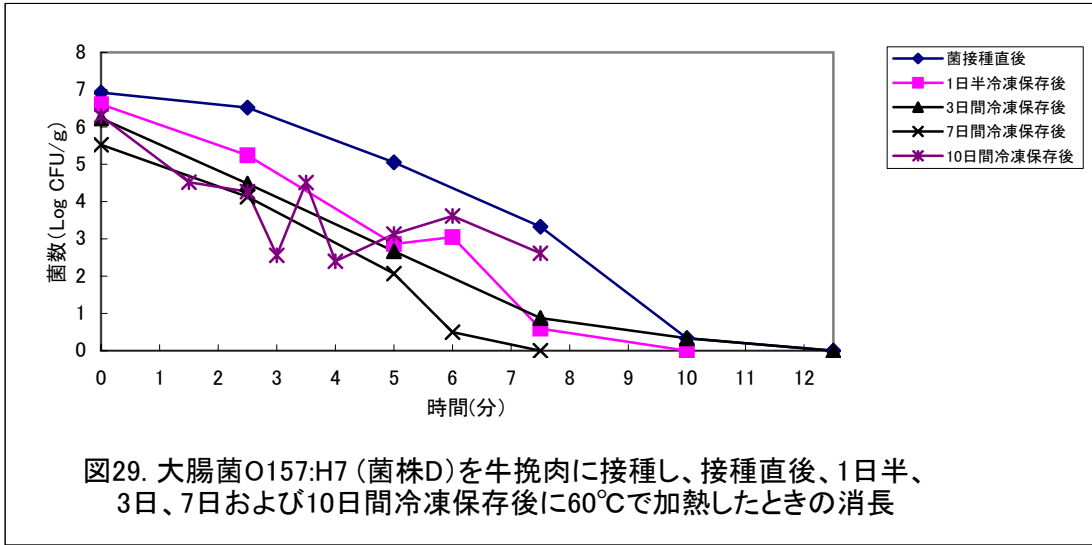


図28. 大腸菌O157:H7(菌株C)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に60°Cで加熱したときの消長



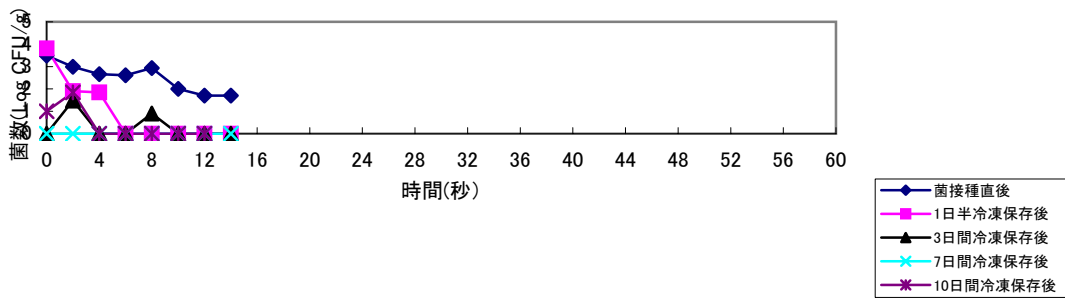


図31. 大腸菌O157:H7(菌株A)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に63°Cで加熱したときの消長

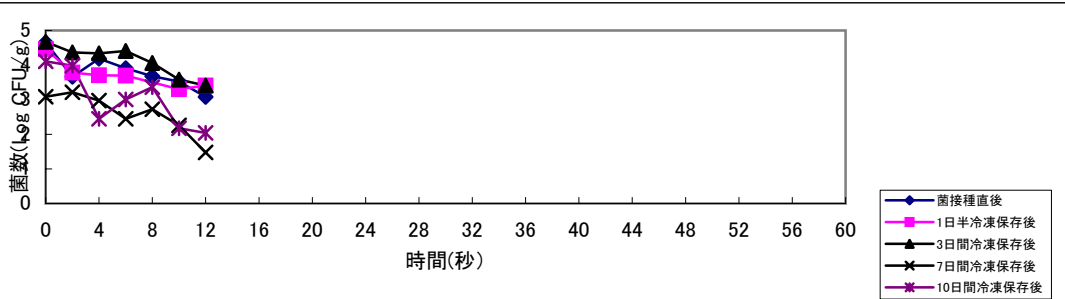


図32. 大腸菌O157:H7(菌株B)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に63°Cで加熱したときの消長

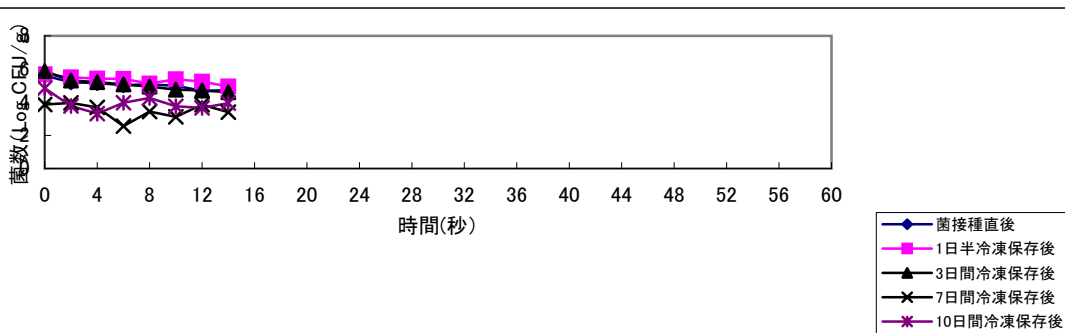


図33. 大腸菌O157:H7(菌株C)を牛挽肉に接種し、接種直後、1日半、3日、7日および10日間冷凍保存後に63°Cで加熱したときの消長

