

平成 15 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 15 年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「凍結・解凍回数及び保存温度による食肉中の
カンピロバクターとサルモネラの菌数の変動」

平成 16 年 2 月

岩手大学
品川邦汎教授

凍結・解凍回数及び保存温度による食肉中のカンピロバクターとサルモネラの菌数の変動

岩手大学農学部獣医学科
品川邦汎、重茂克彦
秋田県衛生科学研究所
齊藤志保子

鶏肉にカンピロバクター及びサルモネラを接種し、凍結・解凍を繰り返し、その菌数の変動をみたところ、サルモネラ生存菌数は凍結・解凍の回数の増加に従い減少傾向はみられたが、その減少はわずかであった。カンピロバクターの生存菌数はサルモネラより減少傾向が顕著であったが、1回の凍結・解凍での減少は0.5~1オーダーであった。また、鶏肉及び牛肉にカンピロバクターとサルモネラを接種し、微好気及び好気条件下で32、20、4で保存し、両菌の菌数の変動をみたところ、鶏肉と牛肉による差はみられなかった。カンピロバクターは微好気条件32保存検体においても菌数の増加はみられず、むしろ減少した。32保存検体の方が20保存検体より減少傾向が顕著であった。同じ温度条件では微好気条件で保存した検体の方が好気条件保存検体より生存菌数が多い傾向がみられた。サルモネラは32、20保存検体で顕著な菌の増加がみられたが、4保存検体では菌数の増加はみられなかった。汚染鶏肉の凍結によるカンピロバクター菌数の減少はわずかであり、また32の食肉中でも増殖がみられないことから、カンピロバクター感染症予防には、鶏肉等畜産物のカンピロバクター汚染率、汚染菌数を低下させる対策が重要と考えられた。サルモネラは通常室温以上では食肉中で顕著に増加することから食中毒予防には生産から流通、消費までのコールドチェーンの重要性が再確認された。また、消費段階での畜産物の衛生的な取り扱いについてのさらなる情報提供、啓蒙が重要と考えられた。

A. 研究目的

カンピロバクターは重要な下痢症の原因菌であり、カンピロバクター食中毒事例は、平成15年に発生した国内の細菌性食中毒事例542中275事例50.7%を占めた。また一方、カンピロバクターによる散発下痢症患者は年間をとおしてサルモネラ感染者より多発しており、大きな健康被害を引き起こしている。その背景として、鶏肉におけるカンピロバクターの高度な汚染が重要視されている。

我々のこれまでの鶏肉におけるカンピロバクター汚染実態調査においても、鶏肉の高率な汚染が確認された。しかし、外国産の輸

入鶏肉からの分離率は国内産鶏肉に比較して非常に低率であった。この原因のひとつとして輸入時の凍結による菌数の減少が考えられたことから、カンピロバクターを接種した鶏肉について凍結・解凍を繰り返し、その菌数の変動をみた。

また、カンピロバクターは好気的な環境下では早急に死滅すること、30以下では増殖できないことから、通常、食肉・食品中では増殖できないと考えられてきた。一方、前記の汚染実態調査で鶏肉の汚染率は高度であるがその汚染菌数は多くの場合少数であることが判明したことから、食肉中での増殖が

下痢症発生のリスクを高める可能性が考えられた。このようなことからカンピロバクターを接種した鶏肉を 4、20 及び真夏の室温として可能性のある温度の 32 に、微好気及び好気状態で保存し、菌数の変動をみた。

他の食中毒菌との比較のためサルモネラを用いて同様に試験を実施した。さらに、牛肉における保管温度による両菌の菌数の変動についても検討した。

B. 検査方法

1. 凍結・解凍によるカンピロバクター及びサルモネラの菌数の変動

接種菌液の調整：カンピロバクター (*C. jejuni* Ca2905) は保存株を血液寒天培地で 42 24 時間微好気培養後、1 コロニーを BHI プロースに接種、37 24 時間微好気培養後、その 50 μ l を 1ml の BHI プロースに接種、37 24 時間微好気培養後、生理食塩水で 100 倍希釈し、約 1.0×10^7 cfu/ml の菌液を調整した。サルモネラ (*S. Enteritidis* Sa1437) は保存株を普通寒天平板で 37 培養後、1 コロニーを 5ml の BHI プロースに接種、37 24 時間培養後、生理食塩水で 100 倍希釈し、約 1.0×10^7 cfu/ml の菌液を調整した。それぞれの調整菌液を等量混合し接種菌液とした。

検体の調整：市販の鶏もも肉 25g を各々滅菌シャーレに入れ、接種菌液を鶏肉の表面に 0.2ml 接種し、試験検体(14 検体)を作成した。接種時の菌数を把握するため、2 検体について直ちに菌数を測定した。残りの 12 検体はそれぞれアネロパウチ(三菱ガス化学株式会社)に入れ、微好気状態で冷凍庫(-20)に保管し凍結した。冷凍保管時の菌数は、1 日保存後に 10 検体を解凍(以後、解凍はすべて冷水中で行った)し、そのうち 2 検体について菌数を測定した。残りの 8 検体は再度凍結し、2 日後に前日再凍結した 8 検体をすべて解凍し、そのうち 2 検体について菌数を測定した。残りの 6 検体は再々凍結した

。同様の方法により 3 日後、5 日後、7 日後に 2 検体ずつ菌数測定を行った。なお、初日に凍結した 12 検体中 2 検体は凍結状態のまま保存し、7 日後に解凍して菌数を測定した。

菌数測定方法：検体(鶏肉 25g)に生理食塩水 225ml を加え、ストマック処理後、希釈し、その 0.1ml を CCDA、DHL 平板コンラージ棒で塗布した。カンピロバクターは CCDA 平板を 42 48 時間微好気培養後コロニー数を計測した。サルモネラ は DHL 平板を 37 24 時間培養後コロニー数を計測した。菌液未接種の鶏肉についても同様に検査を実施し、接種試験に支障がないことを確認した。

2. 保存温度によるカンピロバクター及びサルモネラ菌数の変動

接種菌液の調整：カンピロバクターは前記の凍結解凍試験と同様に調整し、サルモネラは培養液を $10^4 \sim 10^5$ 倍希釈し、約 $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml の菌液を調整した後、それぞれの菌液を等量を混合した。

検体の調整：鶏肉及び牛肉について、凍結解凍試験と同様に作成した検体を好気的および微好気的狀態で、32、20、4 に保存した。

菌数測定法：凍結解凍試験と同様に実施。

温度と保存時間：表 1 に示すとおり、サルモネラ検査(印)、カンピロバクター検査(印)を行った。

C. 結果

1. 凍結・解凍によるカンピロバクター及びサルモネラの菌数の変動

サルモネラの凍結・解凍による菌数の変化は、7 日間保存(5 回凍結・解凍を繰り返し)後もはほとんど変わらなかった(表 2, 図 1)。他方、カンピロバクターの菌数はサルモネラに比べ、著名な減少減少がみられた。1 回の凍結・解凍により 0.5~1 オーダーの菌

数減少がみられた。初日に凍結し7日間保存後、解凍して調べた検体の菌数は、凍結・解凍を繰り返し(5回)7日間保存した検体より明らかに多く認められた表2, 図1)。カンピロバクター菌数の減少は、保存期間の長短より凍結・解凍回数による影響の方が大きいと考えられる。

2. 保存温度によるカンピロバクター及びサルモネラ菌数の変動

1) 鶏肉中のカンピロバクター菌数の変動(表3)

カンピロバクター菌数は32保存鶏肉において微好気、好気いずれの条件下でも減少したが、好气的条件下での減少が多くみられた(最初 1.1×10^5 cfu/gのものが、48時間保存後には100cfu/g以下に減少)。20保存(微好気、好気条件)では菌数の変化はほとんど見られず、48時間後でも1オーダーの減少であった。同様に、4保存7日間後でも約1オーダーの減少程度であり、微好気保存と好気保存条件では顕著な差がみられ、好気保存検体の方が1オーダー少なかった。低温の微好気条件下ではカンピロバクターは生存性が良好で菌数の減少はわずかであることが判明した。

2) 鶏肉中のサルモネラ菌数の変動(表3)

32保存鶏肉中のサルモネラ菌数は、試験No.2においては24時間保存で約 10^7 倍に増加したが、48時間後には減少し、特に好気条件保存検体で減少が顕著であった。試験No.1では3248時間保存検体まで菌数の増加がみられた。実験に供した鶏肉の汚染細菌叢は鶏肉により異なり、また保存条件により保存中に細菌叢が変化し、検体中の細菌叢の増殖形態が様々に異なると考えられた。サルモネラ以外の菌の種類により24時間以降の菌数の増減が影響されたものと考えられた。20保存検体では増殖カーブの立ち上がりは

遅いが、48時間保存検体まで菌数の増加がみられた。4保存検体では菌数の変動はみられなかった。

3) 牛肉中のカンピロバクター菌数の変動(表4)

鶏肉中における菌数変動と同様に、32保存で菌数の増加はみられず、減少傾向は32保存検体の方が20保存検体よりやや高かった。4保存では微好気、好気いずれの条件にも係わらず減少傾向は緩やかであった。

4) 牛肉中のサルモネラ菌数の変動(表4)

牛肉中でも鶏肉中における菌数変動と同様の傾向がみられた。20保存検体の増殖カーブでは、増殖開始は32保存検体に比べ遅かったが、その後の増殖は32保存と同様な傾向を示し、どちらの保存温度でも72時間まで菌数の増加がみられた。4保存検体では菌数の変動はみられなかった。いずれの保存温度でも好気条件保存検体の方が微好気条件保存検体より菌数の増加がわずかに勝っていた。

D. 考察

サルモネラは20、32で保管された食肉中では増殖し、特に32保存では6時間後には菌数は約3オーダー増加した。4保存では菌数の増加はみられず、食中毒予防には食肉の生産段階から流通、消費に至るまでのコールドチェーンの重要性が再確認された。

カンピロバクターについては、我々がこれまで実施した鶏肉の汚染実態調査において、外国産輸入鶏肉の汚染率が国内産鶏肉と比較して非常に低率であることが注目された。この原因のひとつとして輸入時の凍結による菌数の減少が考えられた。今回我々が実施した検討により1~2回の凍結・解凍によるカンピロバクター菌数の低下は約 $1/10 \sim 1/50$

であることが示され、外国産鶏肉において凍結前の最初の汚染菌数が極めて少量であった場合、店頭に並べられた段階の鶏肉のカンピロバクター菌数は検出限界以下になる可能性が考えられた。しかし、逆に菌数低下が1/10～1/50程度に過ぎないことは、外国産輸入鶏肉のカンピロバクター汚染率が国産品と比較して非常に低いことがむしろ凍結傷害以外の要因に起因している可能性を示唆するものと考えられた。このことは凍結輸出直前の製品自体のカンピロバクター汚染率が低率であることを示唆しているものと推察された。輸出・凍結直前の状態にある外国産鶏肉のカンピロバクター汚染率が国産品と比較して低いことの原因は不明であるが、その要因を解明し、国内における鶏肉生産現場に還元することにより国産鶏肉のカンピロバクター汚染低下を実現することが期待される。このことから、現地の実状を把握することによりその要因を解明することが今後の課題と考えられる。

一方、カンピロバクターは32℃、微好気条

件で保存された食肉中でも増殖はみられなかった。通常32℃以上の高い温度に長時間、食肉や調理済み食品を放置することは考えづらい。食肉や食品中でカンピロバクターが増殖する可能性は低く、食中毒の発生要因としては農場から販売店にまでの段階における鶏肉等畜産物の汚染が重要であり、特に高濃度に汚染された鶏肉に対する不適切な取り扱いが問題となると考えられた。

カンピロバクター感染症予防対策としては鶏肉等畜産物のカンピロバクター汚染率及び汚染菌数を低下させることが根本的な方法であるが、加えて調理従事者へのカンピロバクターの畜産物における汚染実態の情報提供、鶏肉の高度な汚染などをふまえた衛生的取り扱い方法の啓蒙をさらに進めていくことが必要と考えられた。

表1 保存温度によるカンピロバクター及びサルモネラの菌数の変動
検体一覧

保存温度	保存時間					
	3h	6h	24h	48h	72h(3d)	7d
32	*	*			**	
20		*			**	
4						

* 好气的条件保存検体のみ

** 牛肉における試験のみ

表2 凍結・解凍回数による菌数の変動(鶏肉1g当たり)

試験No	供試菌名	検体No	凍結解凍回数(保存日数)						
			1(1)	2(2)	3(3)	4(4)	5(7)	1(7)	
1	サルモネラ	1	3.0×10^3	3.8×10^3	4.0×10^3	2.6×10^3	1.5×10^3	NT	NT
		2	4.0×10^3	5.3×10^3	2.9×10^3	2.7×10^3	3.1×10^3	NT	NT
		平均	3.5×10^3	4.5×10^3	3.4×10^3	2.7×10^3	2.3×10^3	NT	NT
	カンピロバクター	1	7.8×10^4	4.8×10^3	1.3×10^3	2.0×10^2	1.0×10^2	<100	NT
		2	6.7×10^4	5.0×10^3	2.1×10^3	4.5×10^2	1.5×10^2	<100	NT
		平均	7.3×10^4	4.9×10^3	1.7×10^3	3.3×10^2	1.3×10^2	NT	NT
2	サルモネラ	1	3.4×10^4	2.5×10^4	2.6×10^4	2.0×10^4	2.2×10^4	1.8×10^4	2.9×10^4
		2	3.4×10^4	2.9×10^4	2.7×10^4	2.3×10^4	2.0×10^4	1.6×10^4	2.5×10^4
		平均	3.4×10^4	2.7×10^4	2.6×10^4	2.2×10^4	2.1×10^4	1.7×10^4	2.7×10^4
	カンピロバクター	1	4.3×10^5	8.9×10^4	3.4×10^4	1.6×10^4	5.9×10^3	3.0×10^3	7.0×10^4
		2	5.0×10^5	1.2×10^5	4.1×10^4	1.8×10^4	7.9×10^3	2.3×10^3	6.1×10^4
		平均	4.6×10^5	1.0×10^5	3.7×10^4	1.7×10^4	6.9×10^3	2.7×10^3	6.5×10^4

NT:検査せず

表3 保存温度による鶏肉中のサルモネラ、カンピロバクターの菌数変動(CFU/鶏肉1g)

試験No.	供試菌名	培養温度	保存条件	保存時間						
				0時間	3時間	6時間	24時間	48時間	72時間	7日
1	サルモネラ	32	微好気	2.7×10^4	NT	NT	1.4×10^9	2.6×10^{10}	NT	NT
		20	微好気	2.7×10^4	MT	NT	3.6×10^7	1.0×10^9	NT	NT
	カンピロバクター	32	微好気	1.0×10^5	NT	NT	5.9×10^4	1.3×10^3	NT	NT
		20	微好気	1.0×10^5	NT	NT	2.5×10^4	9.0×10^3	NT	NT
2	サルモネラ	32	微好気	16.5	NT	NT	2.1×10^8	1.3×10^8	NT	NT
		32	好気	16.5	650	4.1×10^4	5.7×10^8	$<1.0 \times 10^7$	NT	NT
		20	微好気	16.5	NT	NT	5.0×10^5	4.4×10^7	NT	NT
		20	好気	16.5	NT	100	8.5×10^5	5.6×10^7	NT	NT
		4	微好気	16.5	NT	NT	NT	NT	25	<100
		4	好気	16.5	NT	NT	NT	NT	100	<100
	カンピロバクター	32	微好気	1.1×10^5	NT	NT	1.1×10^5	1.2×10^3	NT	NT
		32	好気	1.1×10^5	NT	NT	1.4×10^4	<100	NT	NT
		20	微好気	1.1×10^5	NT	NT	3.2×10^4	1.6×10^4	MT	NT
		20	好気	1.1×10^5	NT	NT	2.2×10^4	1.2×10^4	NT	NT
		4	微好気	1.1×10^5	NT	NT	NT	NT	4.2×10^4	3.1×10^4
		4	好気	1.1×10^5	NT	NT	NT	NT	4.3×10^4	5.5×10^3

NT:検査せず

表4 保存温度による牛肉中のサルモネラ、カンピロバクターの菌数変動(CFU/牛肉1g)

供試菌名	培養温度	保存条件	保存時間						
			0時間	3時間	6時間	24時間	48時間	72時間	7日
サルモネラ	32	微好気	480	NT	NT	4.9×10^8	5.0×10^8	5.4×10^8	NT
	32	好気	480	2.6×10^3	9.8×10^4	8.2×10^8	2.5×10^9	7.5×10^9	NT
	20	微好気	480	NT	NT	5.8×10^5	3.3×10^7	5.2×10^7	NT
	20	好気	480	NT	850	5.2×10^5	9.4×10^7	4.6×10^8	NT
	4	微好気	480	NT	NT	NT	NT	370	133
	4	好気	480	NT	NT	NT	NT	390	293
カンピロバクター	32	微好気	9.0×10^4	NT	NT	1.3×10^4	<100	NT	NT
	32	好気	9.0×10^4	NT	NT	4.5×10^3	<100	NT	NT
	20	微好気	9.0×10^4	NT	NT	4.0×10^4	180	NT	NT
	20	好気	9.0×10^4	NT	NT	1.9×10^4	160	NT	NT
	4	微好気	9.0×10^4	NT	NT	NT	NT	3.3×10^4	4.8×10^3
	4	好気	9.0×10^4	NT	NT	NT	NT	3.2×10^4	6.3×10^3

* NT:検査せず