

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

「サルモネラならびに
腸管出血性大腸菌 0157:H7 の D 値に関する研究」

平成 16 年 2 月

東海大学
小沼博隆教授

研究報告書

サルモネラならびに腸管出血性大腸菌O157:H7のD値に関する研究

分担研究者 小沼 博隆（東海大学海洋学部水産学科）

協力研究者 加藤 行男（麻布大学獣医学部）

研究要旨

加熱による病原菌の死滅に関する研究は、枚挙にいとまはないが、その大部分が液体培地あるいは液体培地に食品成分を含ませて試験・研究しているのが現状である。したがって、食品生産者が最も知りたい各種食品中でのD値を検討した研究は非常に少ないのが実情である。そこで、食品素材を動物脂肪、高蛋白食品、高脂肪食品、デンプン質食品ならびに液体培地などと大きく5種類に分類し、その中での代表的な食品を選び、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌O157:H7のD値の計測を行った。

その結果、*S. Enteritidis*のD値は、55℃で加熱した場合には菌株によってばらつきはあるがラード中でのD値が14.45～33.61分と最も高く、次いで牛挽肉（4.62～5.44分）、TSB培地（2.73～5.18分）、豆腐（3.52～4.42分）、マッシュドポテト（3.64分）、チーズ（1.52～2.19分）の順であった。一方、60℃で加熱した場合には、ラード中でのD値（4.97～17.16分）が他の供試材料に比べ最も高いことは、55℃と同じであったが、55℃では豆腐中やマッシュドポテト中のD値はチーズに比べ高かったが、60℃加熱では豆腐中でのD値（0.13～0.17分）およびマッシュドポテト中でのD値（0.15～0.16分）は、チーズ中のD値（0.13～0.17分）とほとんど同じとなった。

E. coli O157のD値は、55℃で加熱した場合にはラード中のD値（27.47分）が最も高く、次いで牛挽肉（18.33分）、豆腐（17.28分）、チーズ（11.62分）、TSB培地（10.16分）、マッシュドポテト（8.82分）の順であった。一方、60℃で加熱した場合はラード中のD値（13.29分）が最も高く、次いでマッシュドポテト（1.74分）、豆腐（1.43分）、牛挽肉（1.08分）、チーズ（0.83分）、TSB培地（0.70分）の順であった。

1. 研究目的

加熱による病原菌の死滅に関する研究は、枚挙にいとまはないが、その大部分が液体培地あるいは液体培地に食品成分を含ませて試験・研究しているのが現状である。したがって、食品生産者が最も知りたい各種食品中でのD値を検討した研究は非常に少ないのが実情である。そこで、食品素材を動物脂肪、高蛋白食品、高脂肪食品、デンプン質食品ならびに液体培地などと大きく5種類に分類し、その中での代表的な食品中を選び、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌O157:H7のD値の計測を行った。

2. 研究方法

1) 供試菌株

当研究室保存のヒト下痢症患者由来の *Salmonella* Enteritidis（以下 *S. Enteritidis*）

3 菌株 (菌株 No. S379、S380 および S381) および *Escherichia coli* 0157:H7 (以下 *E. coli* 0157) 3 菌株 (菌株 No. S390、S393 および S394) の計 6 菌株を用いた。*E. coli* 0157 の 3 菌株はいずれも *eaeA* 遺伝子および病原性プラスミドを保有し、菌株 No. S393 は VT2 を、菌株 No. S390 および S394 は VT1,2 遺伝子の保有株である。

2) 供試材料

供試材料は、動物油脂としてラード、高脂肪・高たんぱく食品として牛挽肉、高脂肪食品としてチーズ (クリームチーズ)、高たんぱく食品として豆腐、デンプン質食品としてマッシュドポテト、液体培地として trypticase soy broth (以下、TSB とする、BBL 社) を用いた。

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。その肉を無菌的にひき肉にし、115℃、5 分間オートクレーブで滅菌した牛脂を全体の 30% になるように混ぜて高脂肪分で無菌の挽肉を作製した。ラード、豆腐、マッシュドポテトは牛脂同様にオートクレーブで 115℃、5 分間滅菌して用いた。これらの食品、牛挽肉およびチーズは trypticase soy agar (以下 TSA、BBL 社) 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

菌の熱抵抗性はその発育段階が影響することが分かっていることから *S. Enteritidis* の各菌株は予備実験で TSB 中での増殖曲線を求めた。その結果、TSB 中に 10^2 菌を接種し、37℃ で培養した場合に供試菌株は 12 時間後に定常期に達することが明らかとなった。そこで、本実験に用いた *S. Enteritidis* および *E. coli* 0157 の各菌株は TSB 中に接種し、37℃ で 12 時間から 14 時間までの培養菌株を用いることとした。

なお、*S. Enteritidis* は 3 株別々に、*E. coli* 0157 は 3 株を混合して供試材料に接種し実験に用いた。

4) 菌株の供試材料への接種

牛挽肉、豆腐、マッシュドポテト、チーズおよび液体培地への接種菌量は 10^7 cfu/g (ml) になるように次の方法で行った。TSB で 12~14 時間培養した菌液 1ml を遠心し、上清を捨て、PBS で一回洗浄後、新たに 2.5ml の PBS に浮遊し、この PBS 浮遊菌液全量を 50g (50ml) の供試材料に接種し、よく混合して実験に用いた。

ラードは液体培地で培養した菌株の場合、水分が分離し水層が出来るために、均質な材料にすることが難しいと思われたため、平板培地で 12 時間から 14 時間培養した菌株を白金耳でかきとり、 10^7 cfu/g になるように直接接種し、よく混合して実験に用いた。なお、各種食品ならびに液体培地中に 10^7 cfu/g レベルを接種できたかどうかの確認は、あらかじめ食品・培地 30g あるいは 30ml に菌を 10^7 cfu/g レベル接種した後、その 1g/ml づつに分配し加熱実験の試料とした。実験に際しては加熱実験と平行して加熱処理をしない 2 試料の菌数を調べ、その平均を対照区として用いた。

5) 加熱処理

菌株を接種した各食品 1g および TSB 1ml 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、空気を十分除き、ヒートシーラーで密封後、恒温槽を用い温浴中で加熱処理を行った。

加熱温度は *S. Enteritidis* では 55℃、60℃ および 62.5℃、*E. coli* 0157 では 55℃、57.5℃

および 60 を用いた。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。温度測定は菌未接種の各食品あるいは液体培地を供試検体同様にポリ袋にいれ、データ・コレクタ AM-7002 (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。

6) 菌数の測定

加熱処理後の菌数は、各食品あるいは液体培地 1g(ml) を 9.0ml の PBS に入れ、混合した後必要に応じて PBS で 10 倍段階希釈を行い、その 0.1ml を TSA 平板上にのせコンラージ棒を用いて塗布し、37 で 24 時間培養後に菌数の測定を行った。また、必要に応じて混釈培養法も用いた。

7) D 値の測定

各食品あるいは TSB 中の各菌種の D 値は、各菌株の菌数の消長をグラフにし、回帰直線の傾きを計算し、その傾きに従い算出した。

3. 結果

1) *S. Enteritidis* の D 値

S. Enteritidis 各菌株の各食品中あるいは TSB 中の各加熱処理温度での菌数の消長は図 1 から図 18 に示し、D 値は表 1 に示した。

S. Enteritidis の D 値を接種した供試材料別に見ると、菌株によってばらつきはあるものの 55 で加熱した場合にはラード中での D 値が 14.45 ~ 33.61 分と最も高く、次いで牛挽肉 (4.62 ~ 5.44 分)、TSB 培地 (2.73 ~ 5.18 分)、豆腐 (3.52 ~ 4.42 分)、マッシュドポテト (3.64 分)、チーズ (1.52 ~ 2.19 分) の順であった。菌株ごとに見るとラード中では菌株 S379 が 14.45 分、S380 が 33.61 分、S381 が 18.25 分で、S380 の D 値が最も高かったが、マッシュドポテト中では 3 菌株間では D 値に差は見られず、牛挽肉中、豆腐中、チーズ中、TSB 中では菌株 S380 の D 値が他の株に比べ低く、菌株の熱に対する抵抗性は食品の種類によって異なっていた。

60 で加熱した場合には、ラード中での D 値 (4.97 ~ 17.16 分) が他の供試材料に比べ最も高いことは、55 と同じであったが、55 では豆腐中やマッシュドポテト中の D 値はチーズに比べ高かったが、60 加熱では豆腐中での D 値 (0.13 ~ 0.17 分) およびマッシュドポテト中での D 値 (0.15 ~ 0.16 分) は、チーズ中の D 値 (0.13 ~ 0.17 分) とほとんど同じとなった。また、菌株別にみると TSB 培地中では 55 における S381 の D 値は 5.18 分と他の 2 株よりも高かったが、60 における D 値は 0.26 分と他の 2 株よりも D 値が低くなるなど 55 とは異なった結果が食品間、菌株間で認められた。

62.5 で加熱した場合には、ラード中での D 値が 3 菌株とも 2 分以上だったのに対し、他の供試材料ではマッシュドポテト中における D 値は 0.05 から 0.36 分、TSB 中および牛挽肉中における D 値が 0.10 から 0.12 分間の値を、豆腐およびチーズ中の菌株は 0.04 分から 0.08 分間の値を示し、いずれも低値であった。

2) *E. coli* 0157 の D 値

E. coli 0157 の各食品および TSB 中の各加熱処理温度での菌数の消長は図 19 から図 24 に、D 値は表 2 に示した。

接種した供試材料別に *E. coli* 0157 の D 値をみると、55 で加熱した場合にはラード中

でのD値(27.47分)が最も高く、次いで牛挽肉(18.33分)、豆腐(17.28分)、チーズ(11.62分)、TSB培地(10.16分)、マッシュドポテト(8.82分)の順であった。57.5で加熱した場合にはラードでのD値(16.31分)が最も高く、次いで牛挽肉(7.47分)、マッシュドポテト(5.74分)、豆腐(5.02分)、チーズ(11.62分)、TSB培地(1.37分)の順であった。60で加熱した場合もラードでのD値(13.29分)が最も高く、次いでマッシュドポテト(1.74分)、豆腐(1.43分)、牛挽肉(1.08分)、チーズ(0.83分)、TSB培地(0.70分)の順であった。

4. 考察

細菌の熱抵抗性は同じ菌種であっても菌株により異なること、また菌が入っている媒質により異なることも知られている。本研究ではラード中の熱抵抗性が一番高く、次いで牛挽肉であった。特に、*S. Enteritidis* S380株のラード中でのD値は極めて高く認められたが、その原因については水分活性値やラード成分などが考えられる。Junejaら【8】は*S. typhimurium* DT104の挽肉中の熱抵抗性は挽肉の脂質の分量により異なり、脂質が多いほど熱抵抗性が高くなることを報告し、その原因として脂質が多くなるにつれ水分活性が低下し、熱伝導が低下することが原因としている。また、同様に糖分や塩分濃度が高くなるとその中にある*Salmonella*の熱抵抗性が高くなることも報告されている【1, 2, 5,】。Goodfellowら【6】は*Salmonella*を牛肉に接種した時のD値は51.6で61分程、57.2で3.8から4.2分、62.7で0.6から0.7分、Humphreyら【7】は牛肉に*S. Typhimurium* DT104接種し、58で加熱処理をした場合のD値は12.1分としている。また、液卵では60で加熱処理した*S. Enteritidis*のD値は0.55から0.75分、牛乳中に異なる血清型の*Salmonella*を10菌株混合して接種したD値は60で0.058分、であるが、チョコレート中では*S. Typhimurium*のD値は90でも75分であるなどの報告がされている【4】。*E. coli*も*Salmonella*同様に菌株などによりD値が異なる。Junejaら【9】は*E. coli* 0157:H7を4菌株混合させた実験で、鶏挽肉では55でのD値が11.83分、57.5で3.79分、60で1.63分であり、牛挽肉中(脂質90%)では55でのD値が21.13分、57.5で4.95分、60で3.17分であったと報告している。我々の実験では55のD値が18.33分、57.5で7.47分、60で1.08分と異なる値が得られたが、これらの値の差は菌株の違い、我々は供試材料が所定の温度に達してから時間を計り始めるのに対しJunejaら【9】は検体を恒温層に入れた段階から時間を測定しているなどの違いによるものと考えられた。

TSB中では*S. Typhimurium*の55でのD値は菌株により最低で3.7分、最高で18.3分、60では0.3分から0.82分、65のD値が0.056分であることが報告されている。

本研究ではマッシュドポテトおよび豆腐中での*Salmonella*および*E. coli* 015:H7のD値も明らかにした。マッシュドポテトやポテトサラダは多くの*Salmonella*による食中毒試験の原因食品であり、ポテトが媒介物となった*E. coli* 0157:H7による食中毒の報告【3】もされており、本研究のデータはポテトを使用した食品による*Salmonella*および*E. coli* 0157:H7の食中毒予防対策の一つとして重要なデータとなりうると思われた。

5. 参考文献

1) Abdel Kareem, H., and Z. Mattar. 2001. Heat resistance and growth of *Salmonella*

enteritidis, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* in whole liquid egg. *Acta Microbiol. Pol.* **50**:27-35.

- 2) **Blackburn, C. de W., L. M. Curtis, L. Humphenson, C. Billion, and P. J. McClure.** 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *Int. J. Food Microbiol.* **38**:31-44.
- 3) **Doan, C. H., and P. M. Davidson.** 2000. Microbiology of potatoes and potatoes products: a review. *J. Food Prot.* **63**:668-683.
- 4) **Doyle, M. E., and A. S. Mazzotta.** 2000. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. *J. Food Prot.* **63**:779-795.
- 5) **Gibson, B.** 1973. The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms. *J. Appl. Bact.* **36**:365-376.
- 6) **Goodfellow, S. J., and W. L. Brown.** 1978. Fate of *Salmonella* inoculated into beef for cooking. *J. Food Prot.* **41**:598-605.
- 7) **Humphrey, T. J., S. J. Wilde, and R. J. Rowbury.** 1997. Heat tolerance of *Salmonella* Typhimurium DT104 isolates attached to muscle tissue. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**:265-268.
- 8) **Jujena, V. K., and B. S. Eblen.** 2000. Heat inactivation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in beef as affected by fat content. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**: 461-467.
- 9) **Jujena, V. K., O. P. Snyder Jr, and B. S. Marmer.** 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.

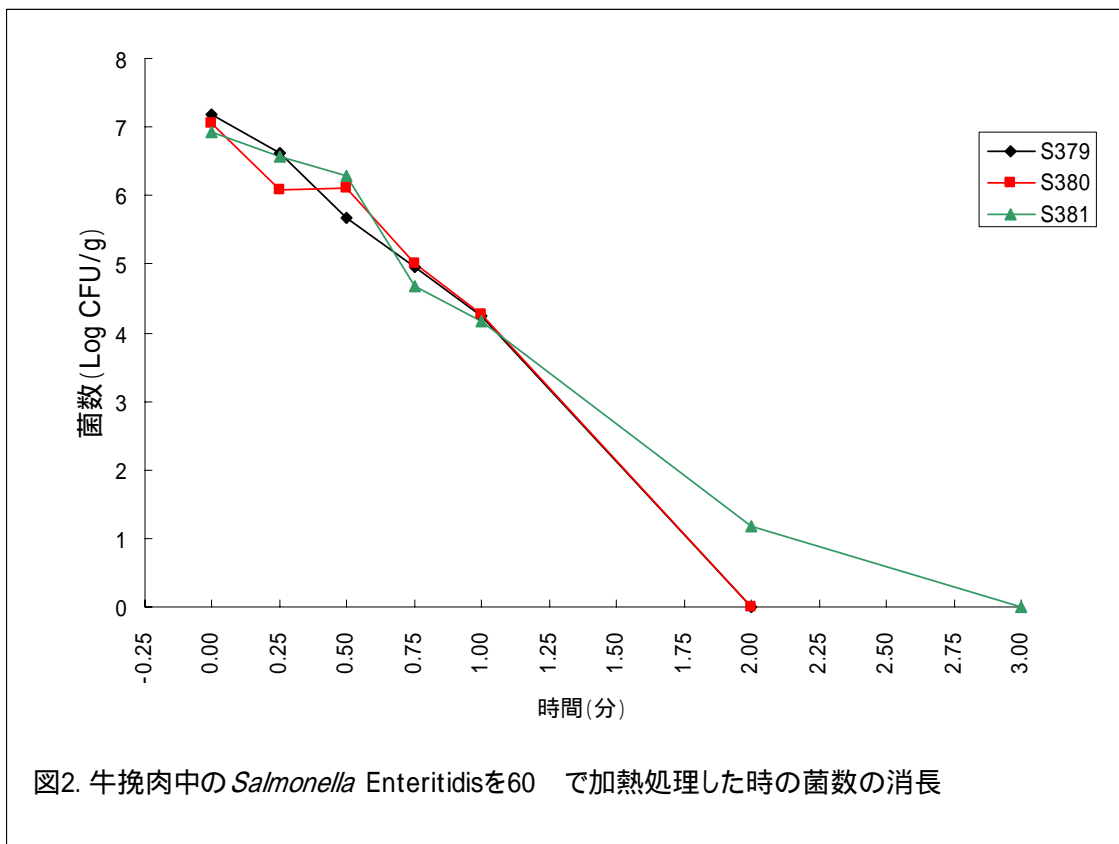
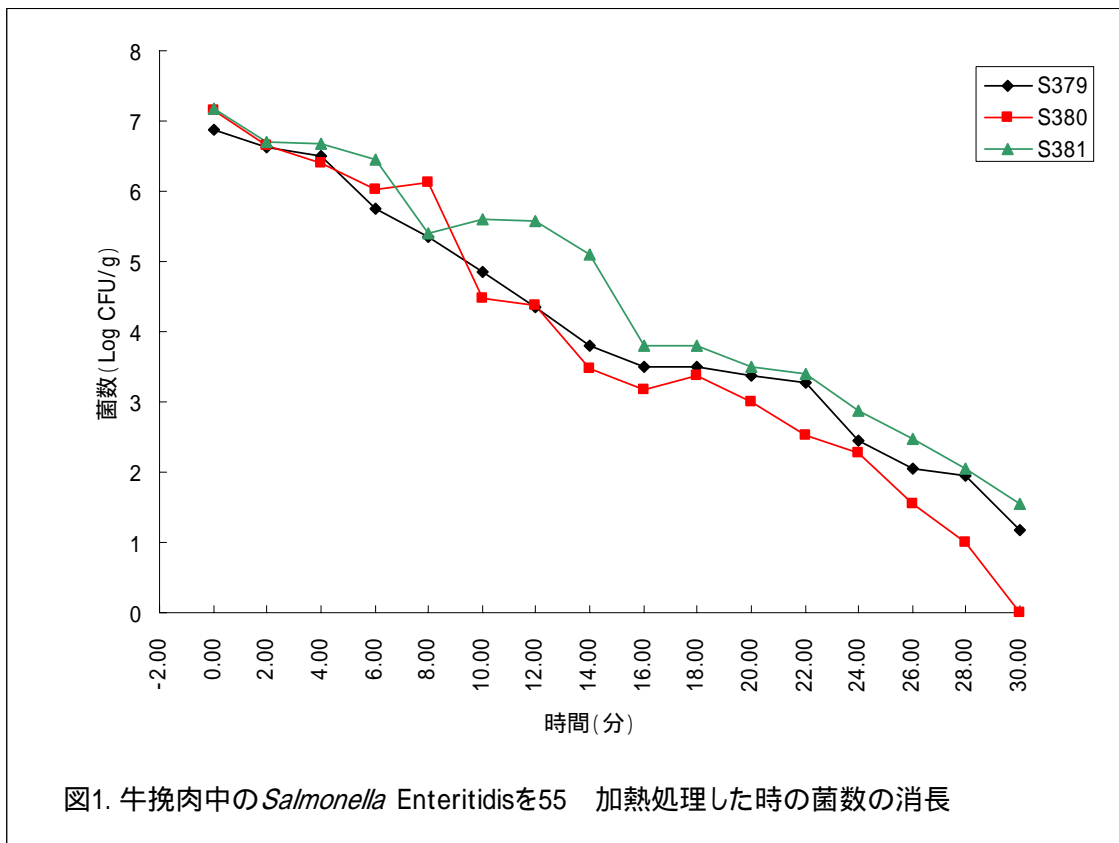
表1. 各種食品および液体培地での *Salmonella* Enteritidis のD値

品目	菌株	温度()およびD値(分)		
		55	60	62.5
ラード	S379	14.45	4.97	2.32
	S380	33.61	17.16	2.55
	S381	18.25	7.37	2.39
牛挽肉	S379	5.44	0.33	0.10
	S380	4.62	0.38	0.10
	S381	5.35	0.33	0.12
TSB培地	S379	4.46	0.48	0.11
	S380	2.73	0.35	0.10
	S381	5.18	0.26	0.10
豆腐	S379	3.56	0.13	0.04
	S380	3.52	0.16	0.08
	S381	4.42	0.17	0.06
マッシュドポテト	S379	3.64	0.15	0.12
	S380	3.64	0.16	0.05
	S381	3.64	0.16	0.36
チーズ	S379	1.97	0.15	0.04
	S380	1.52	0.13	0.06
	S381	2.19	0.17	0.06

表2. 各種食品および液体培地内での*E. coli* O157:H7^{a)}のD値

品目	温度()およびD値(分)		
	55	57.5	60
ラード	27.47	16.31	13.29
牛挽肉	18.33	7.47	1.08
豆腐	17.28	5.02	1.43
チーズ	11.62	3.62	0.83
TSB培地	10.16	1.37	0.70
マッシュドポテト	8.82	5.74	1.74

^{a)} 食中毒由来*E. coli* O157:H7を3菌株混合



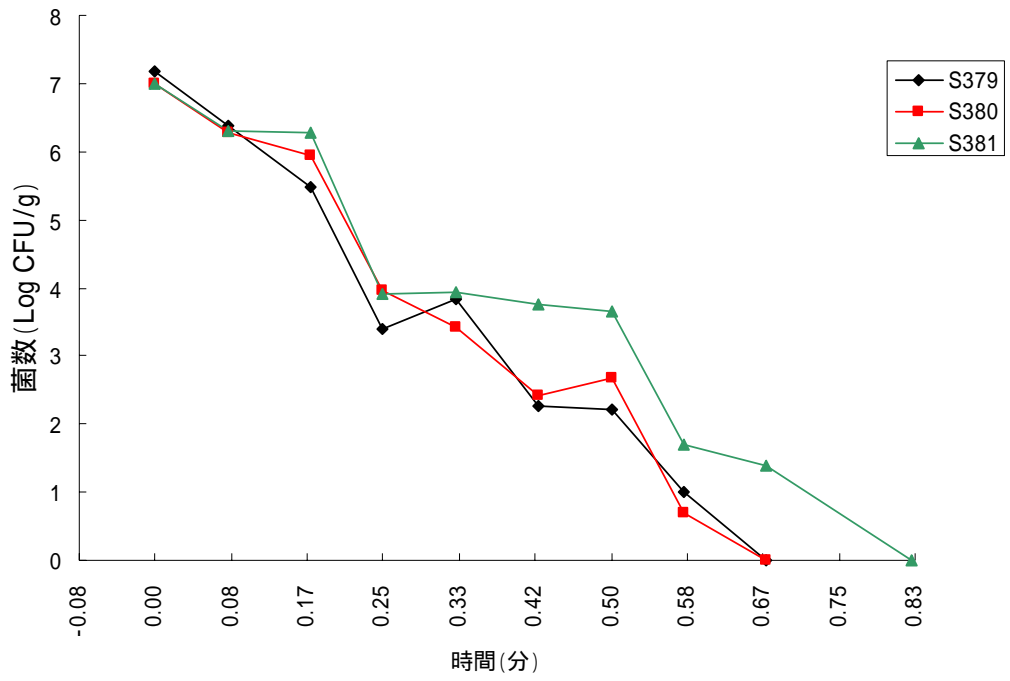


図3. 牛挽肉中の *Salmonella* Enteritidisを62.5 で加熱処理した時の菌数の消長

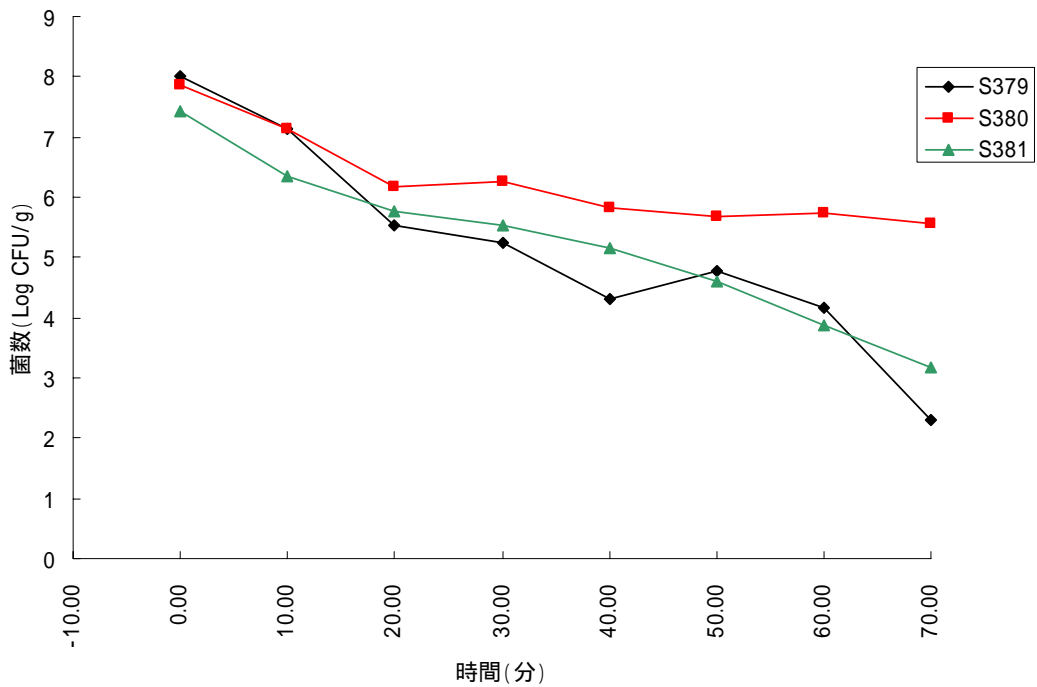
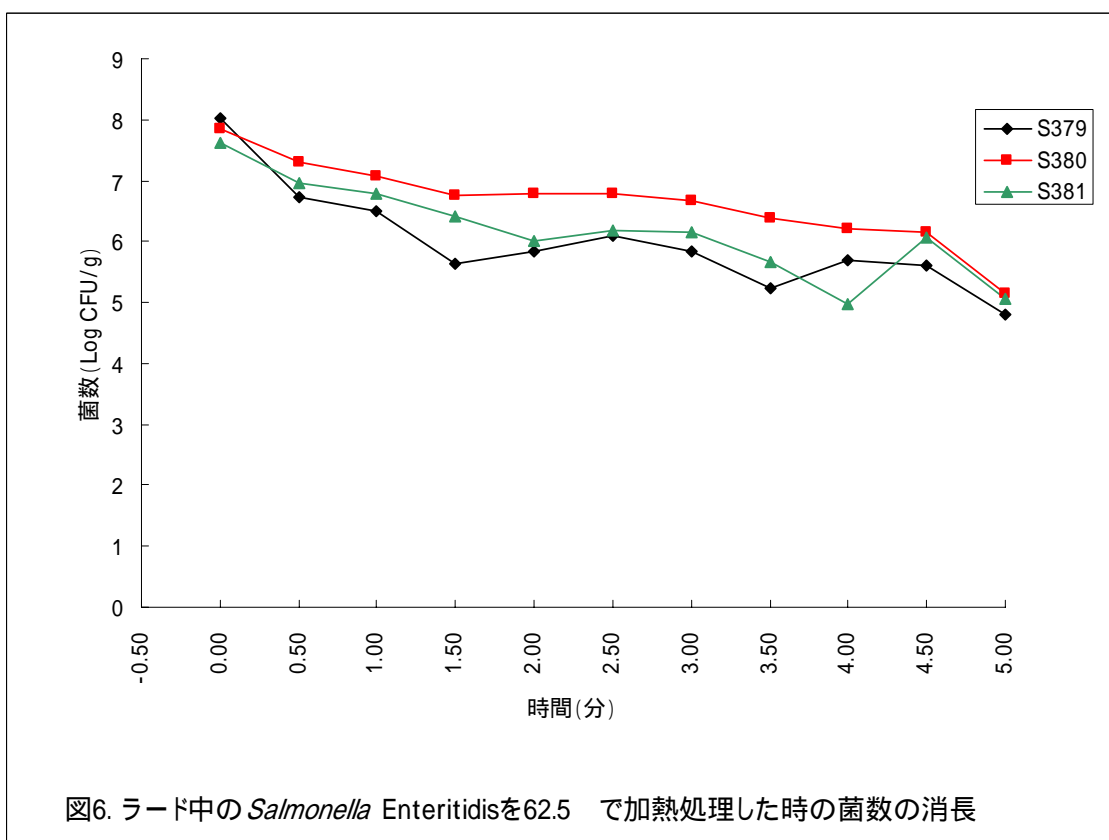
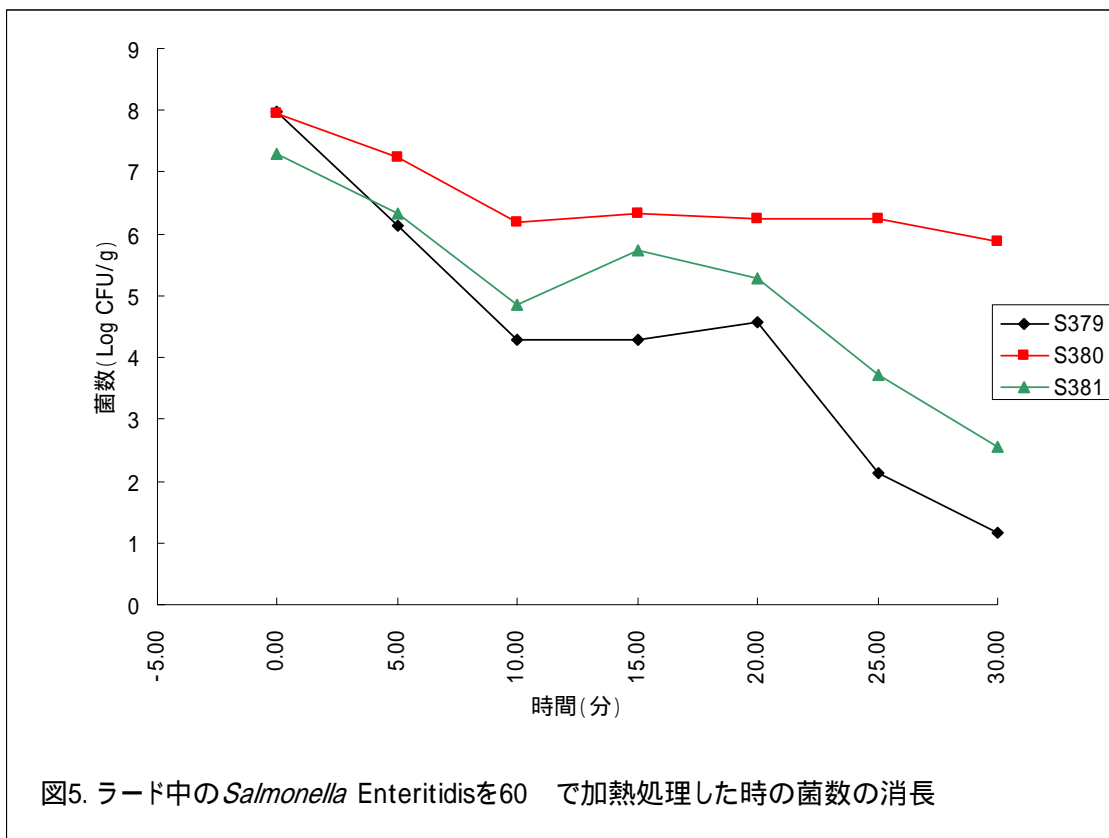
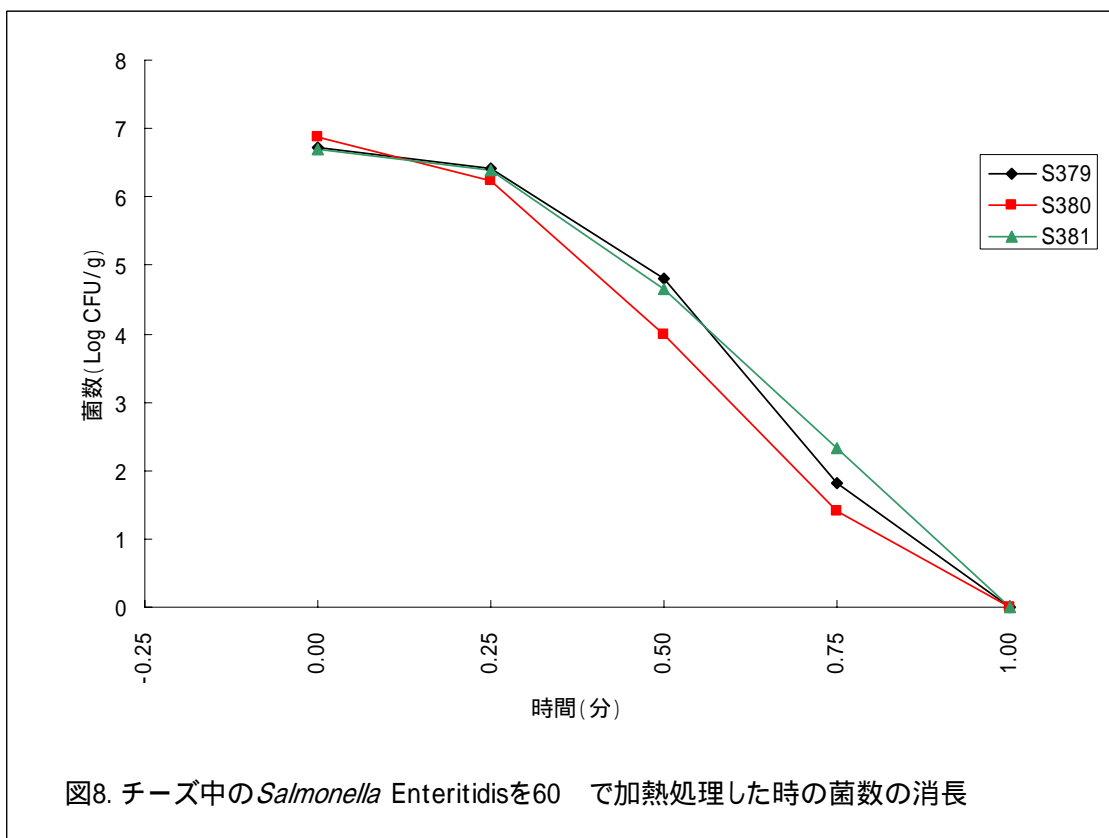
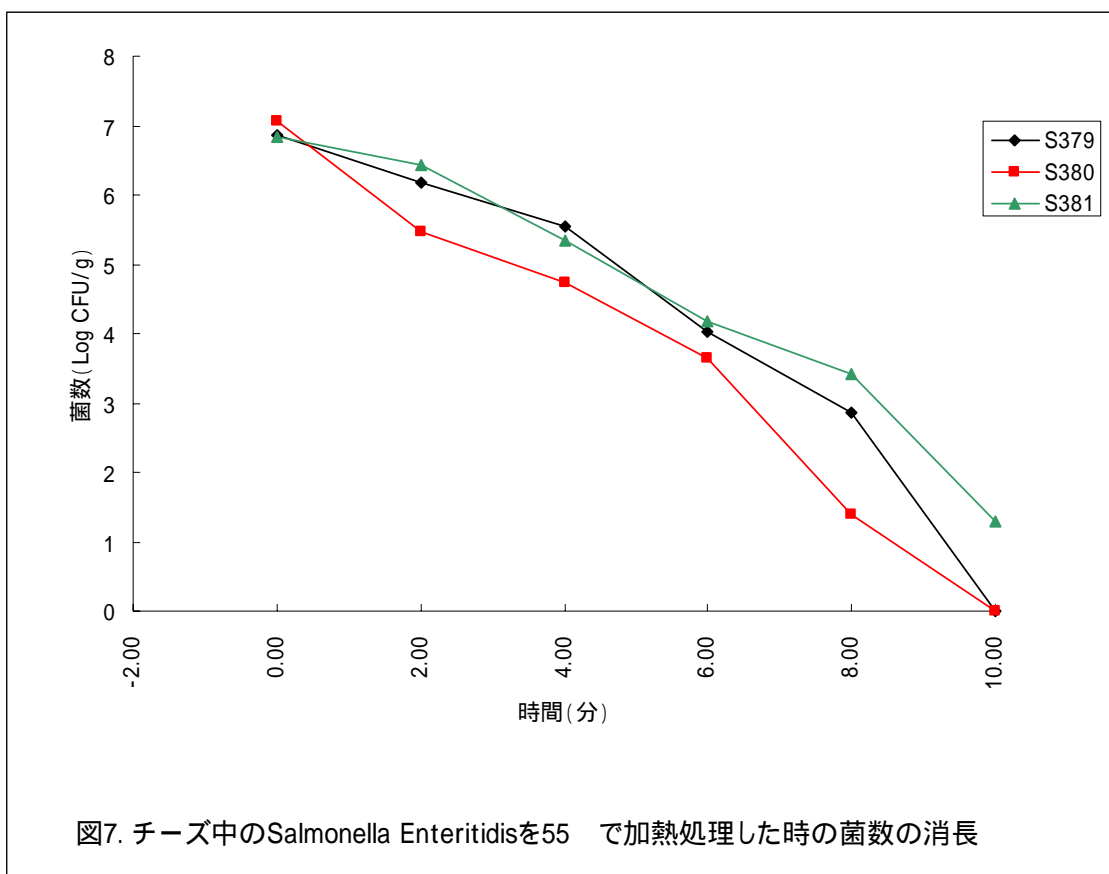
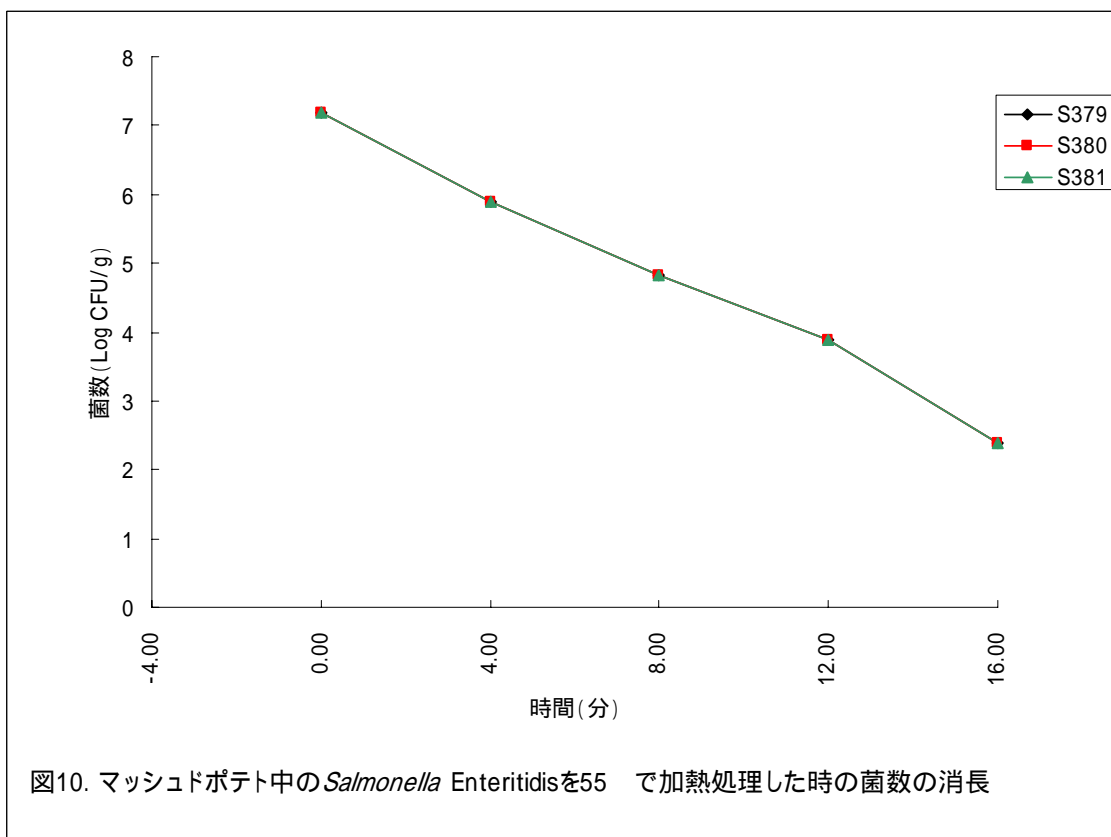
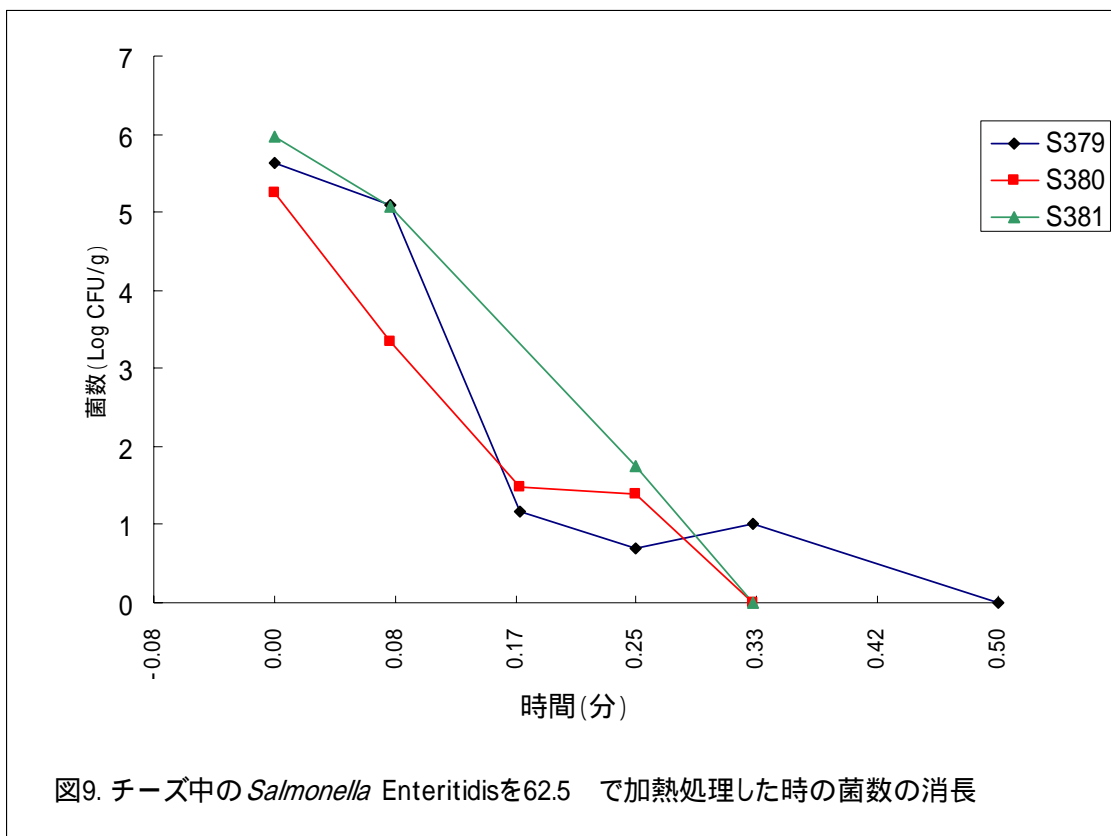
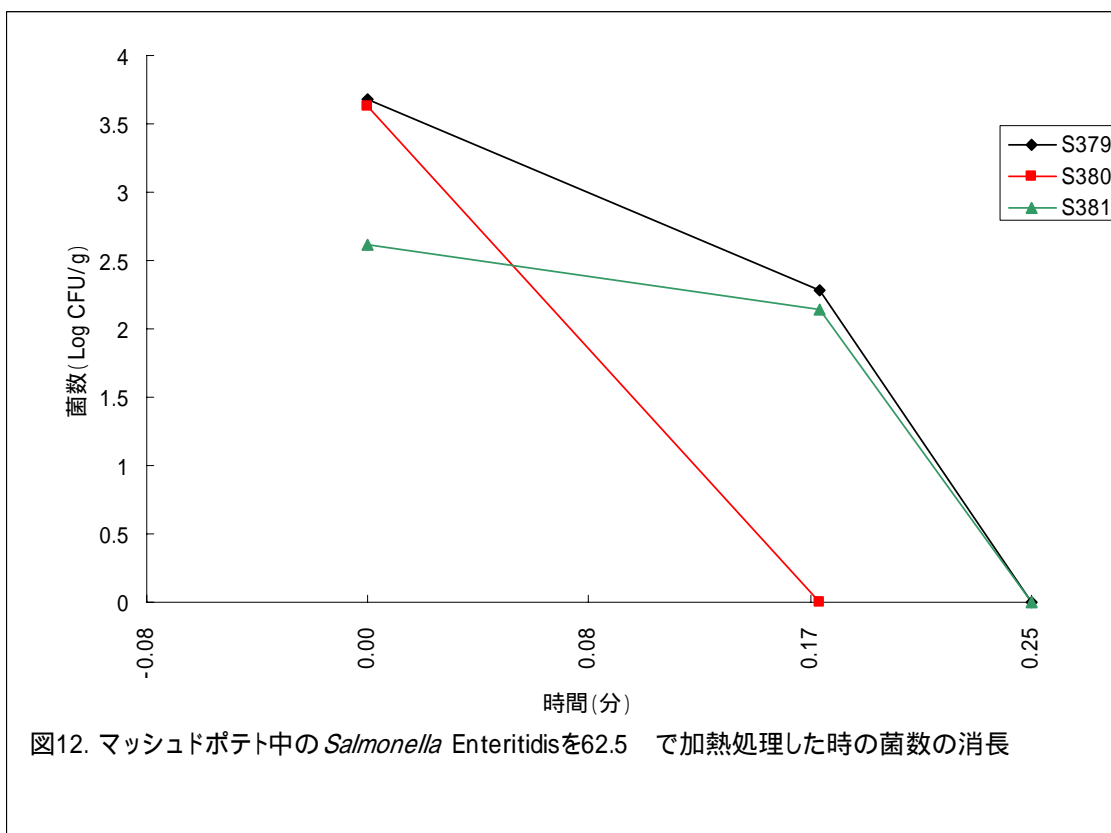
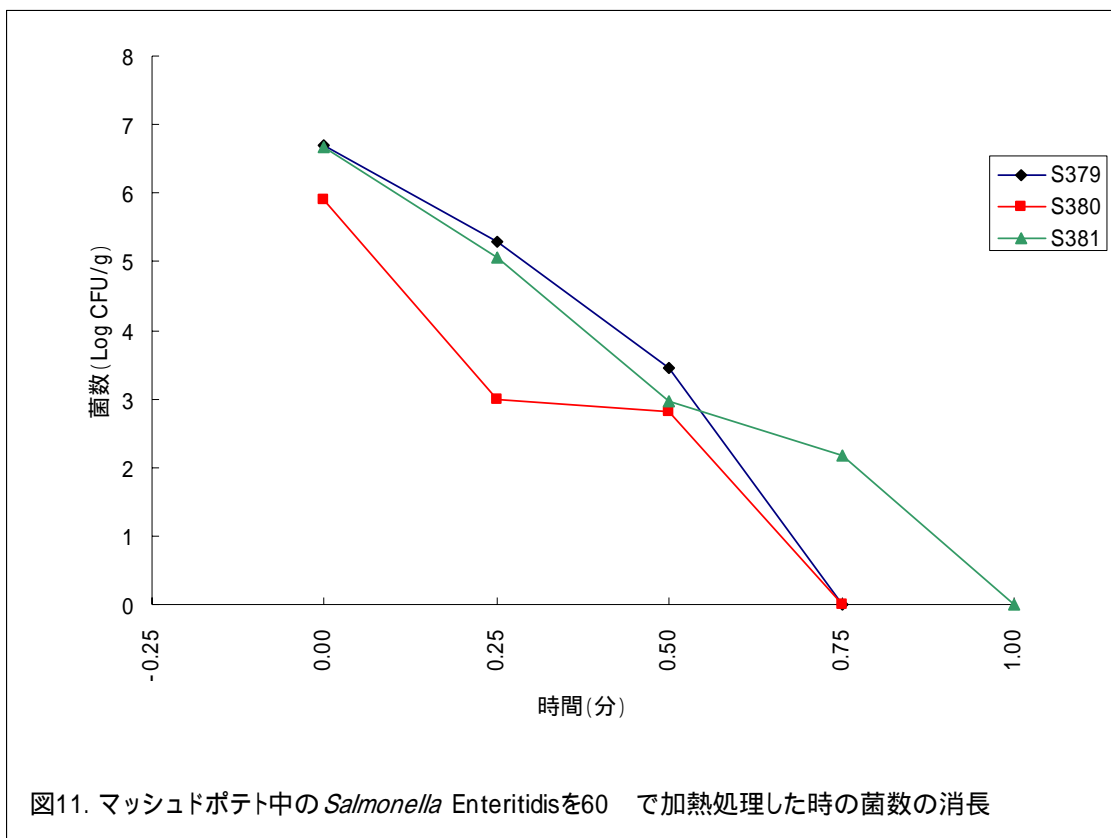


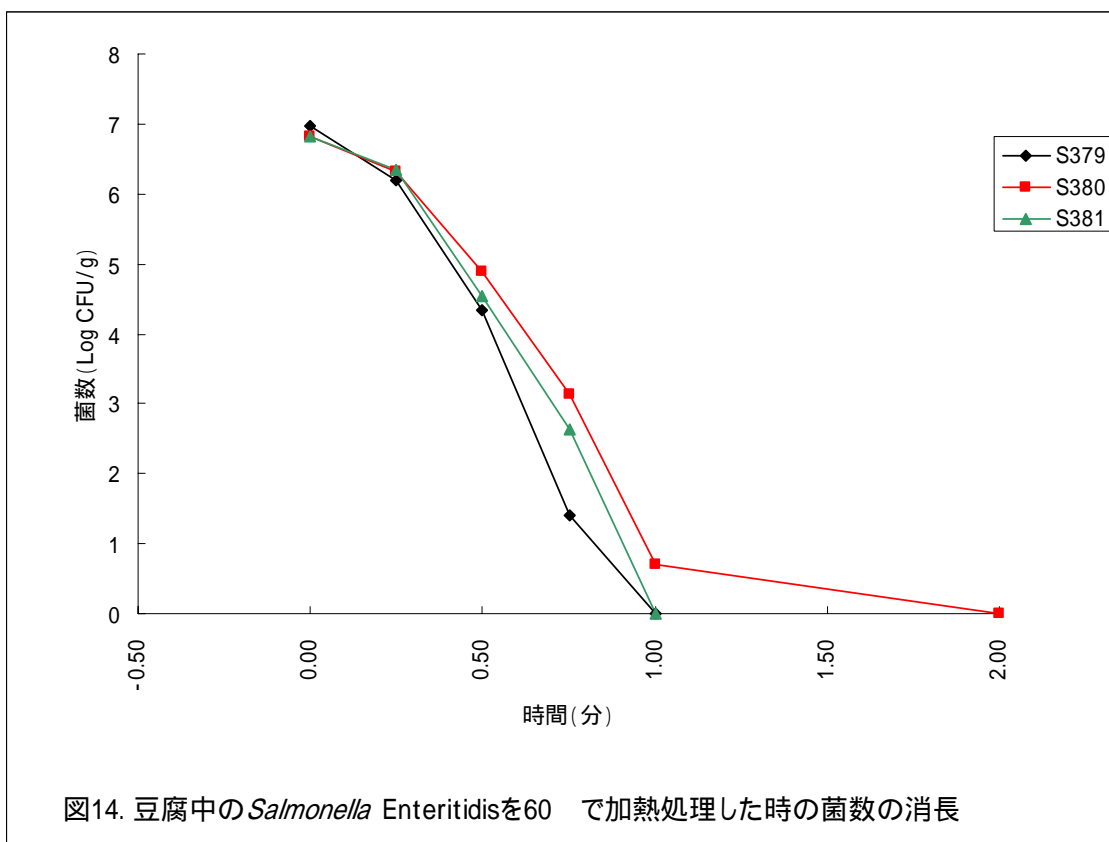
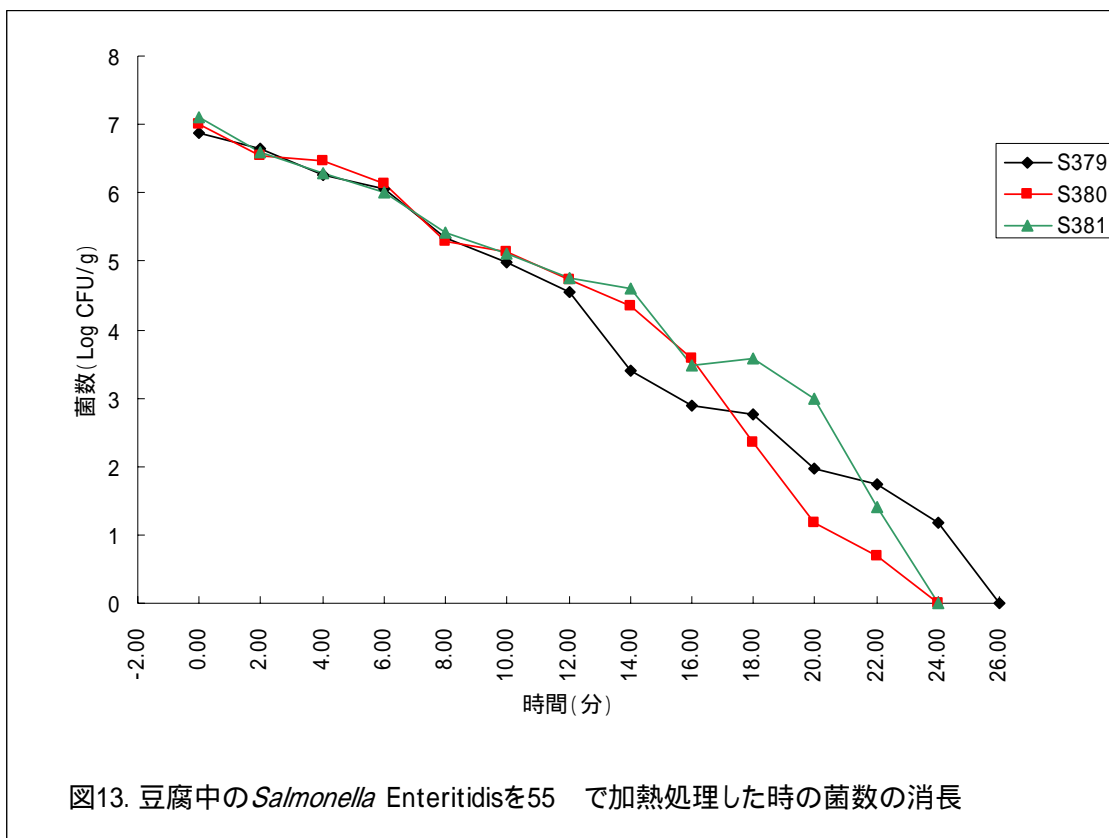
図4. ラード中の *Salmonella* Enteritidisを55 で加熱処理した時の菌数の消長

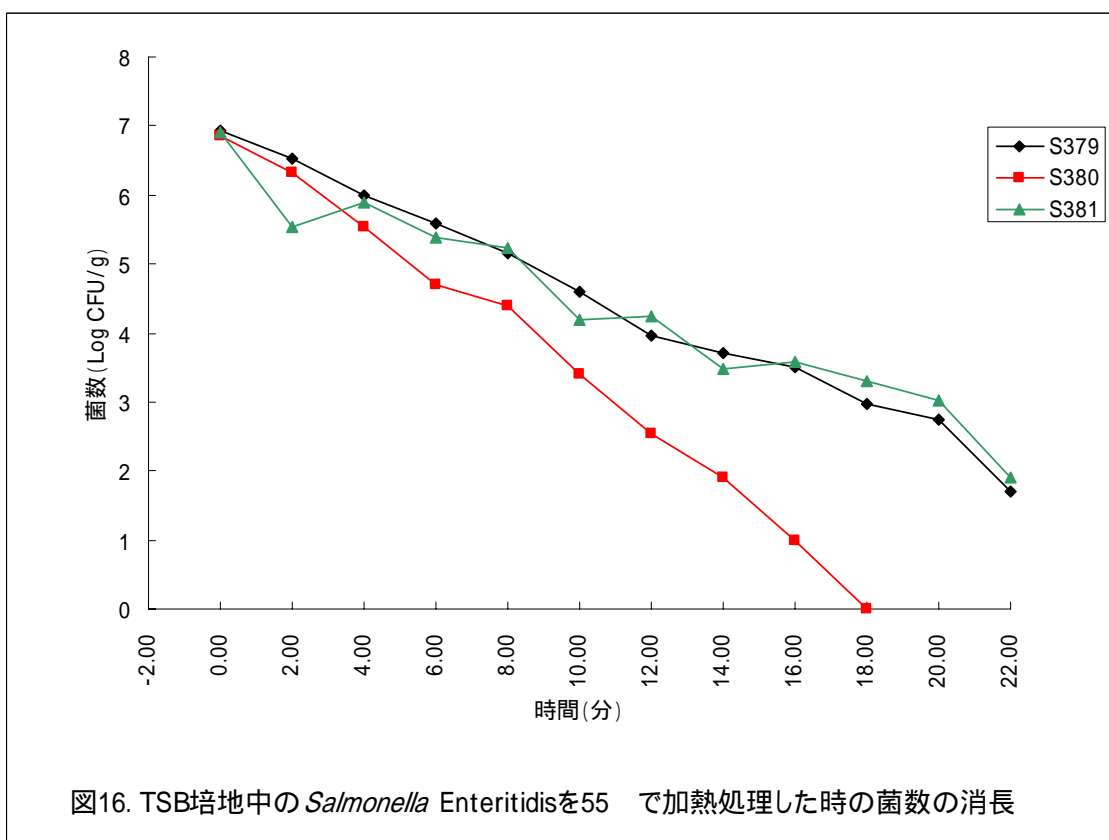
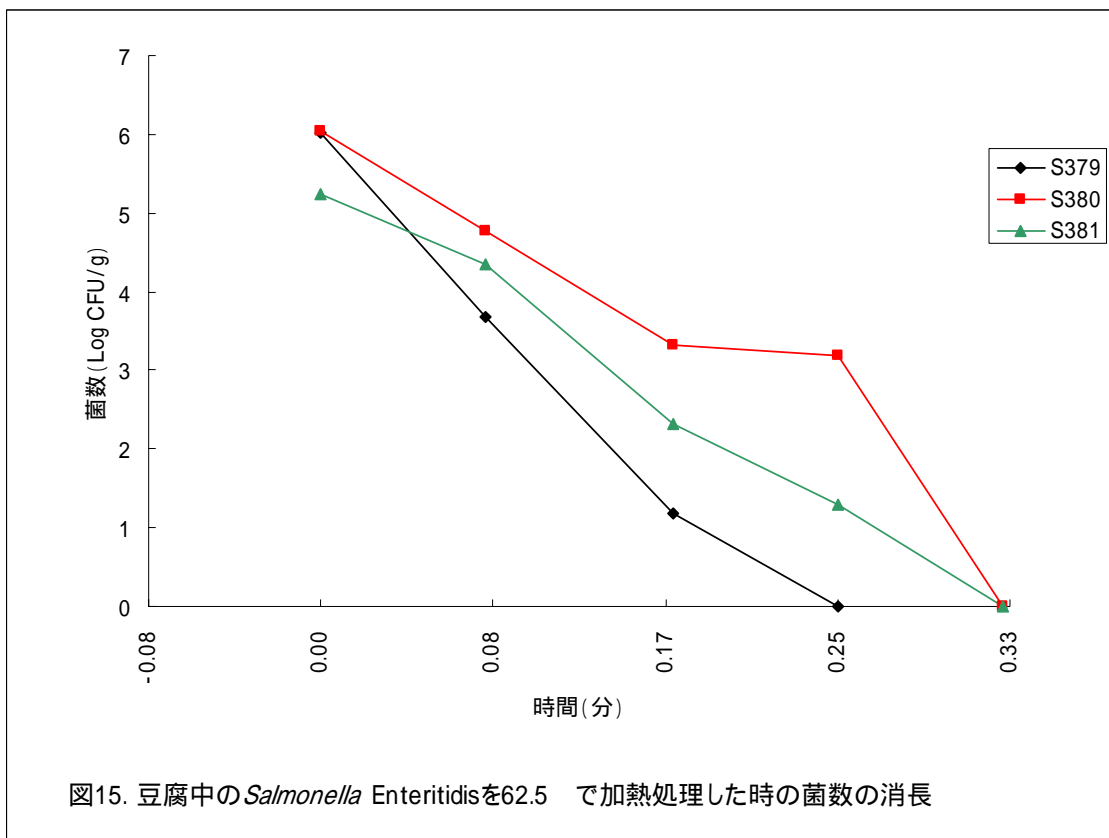


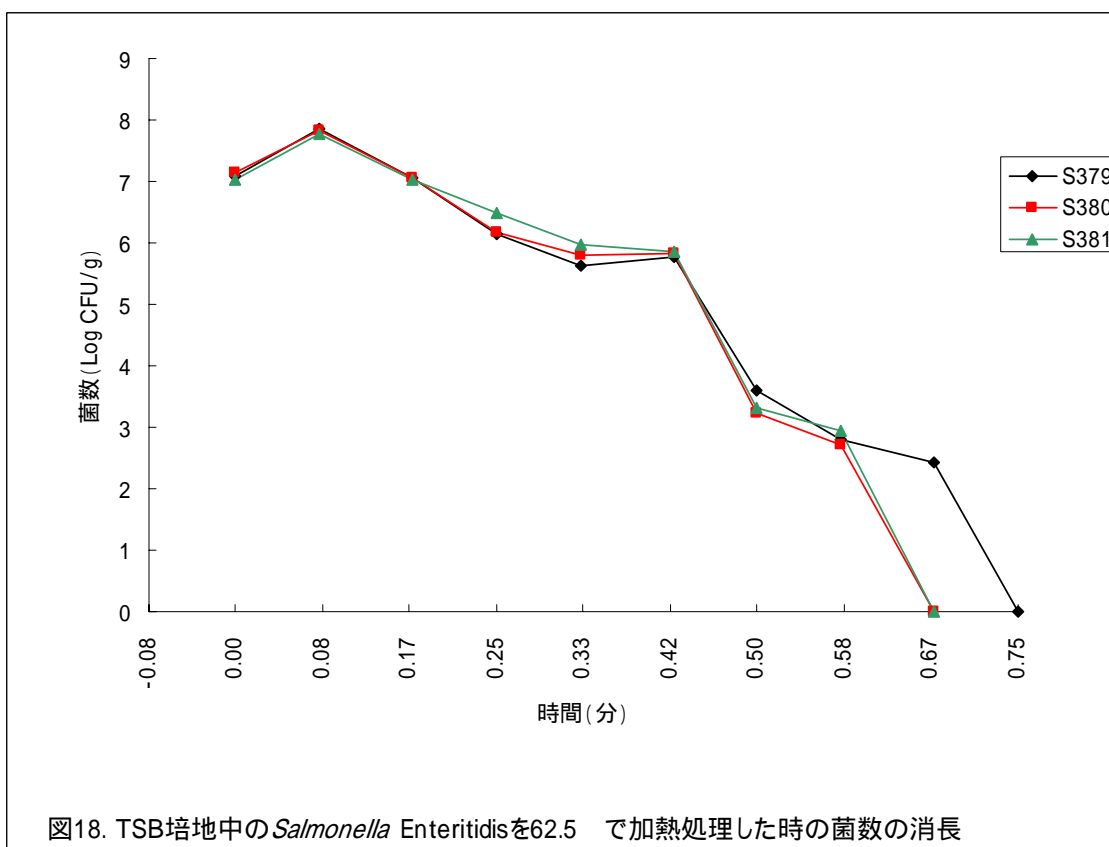
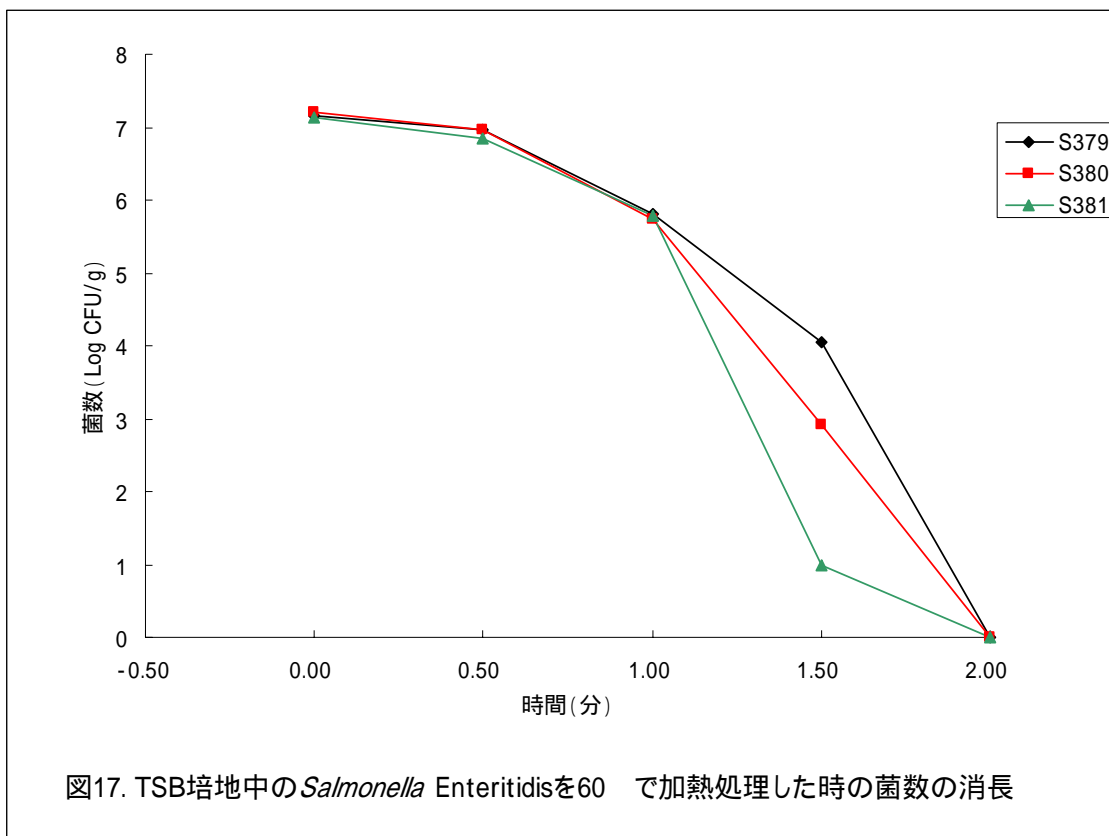


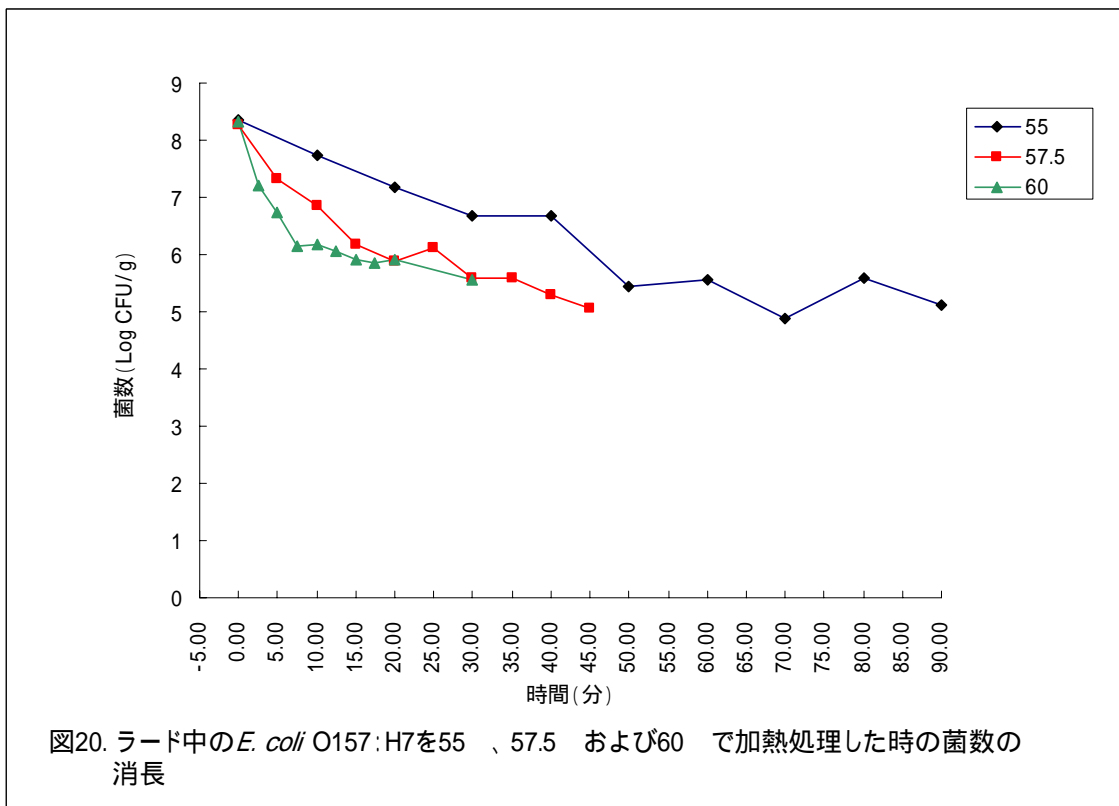
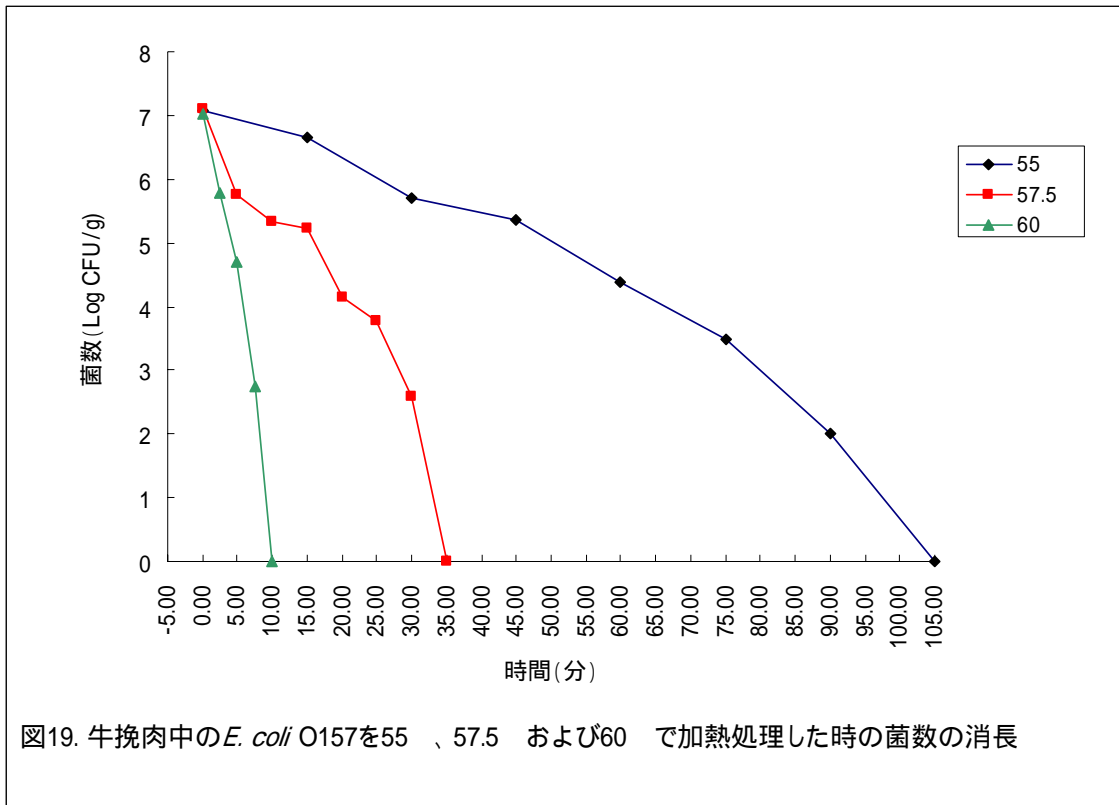












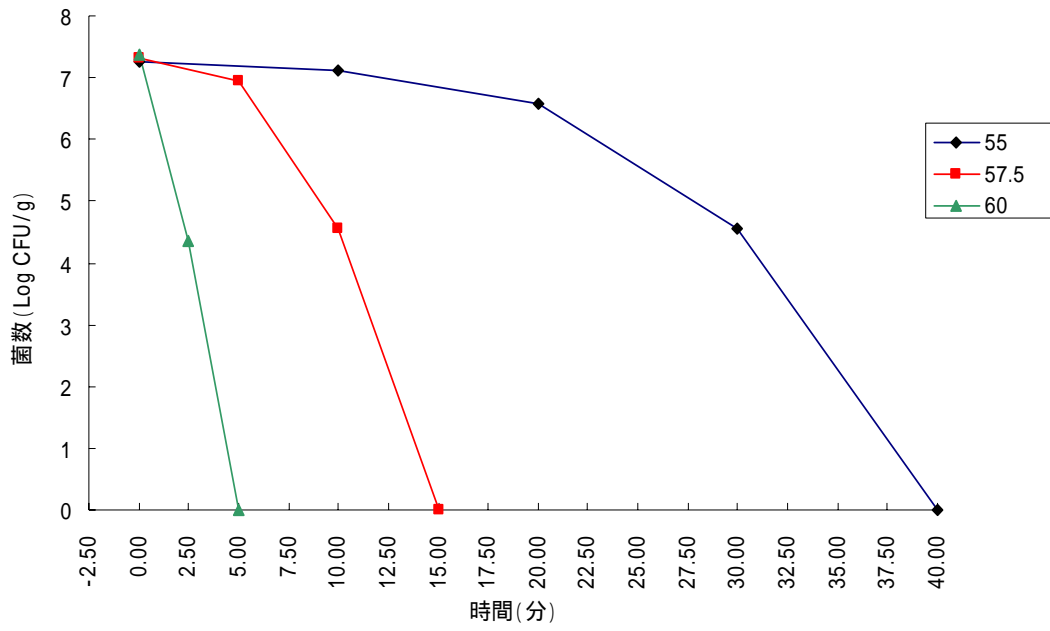


図21. チーズ中の *E. coli* O157:H7 を 55、57.5 および 60 で加熱処理した時の菌数の消長

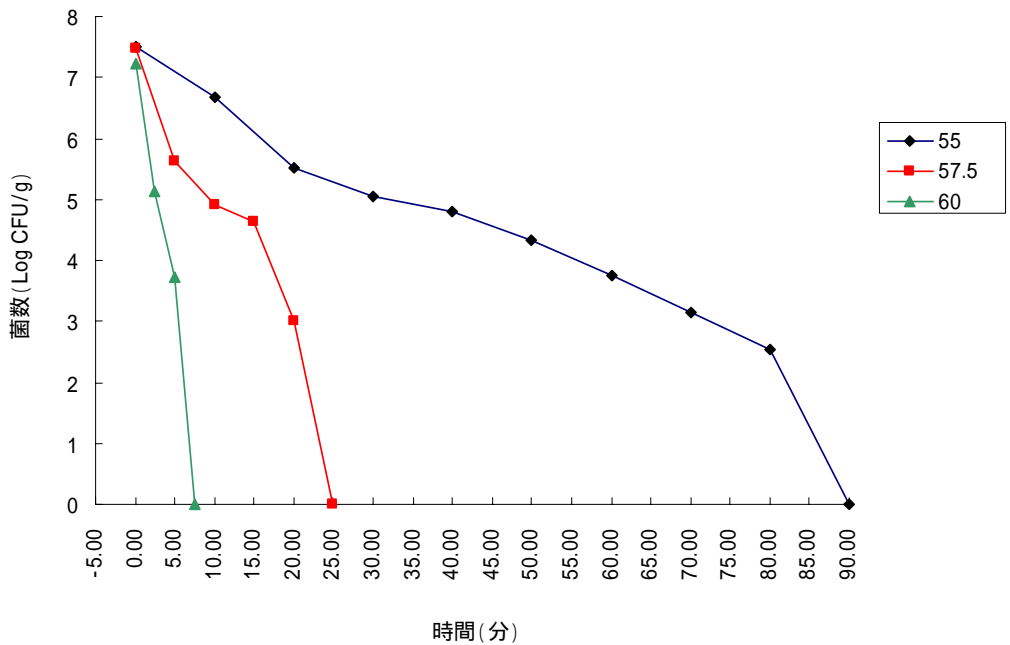


図22. 豆腐中の *E. coli* O157:H7 を 55、57.5 および 60 で加熱処理した時の菌数の消長

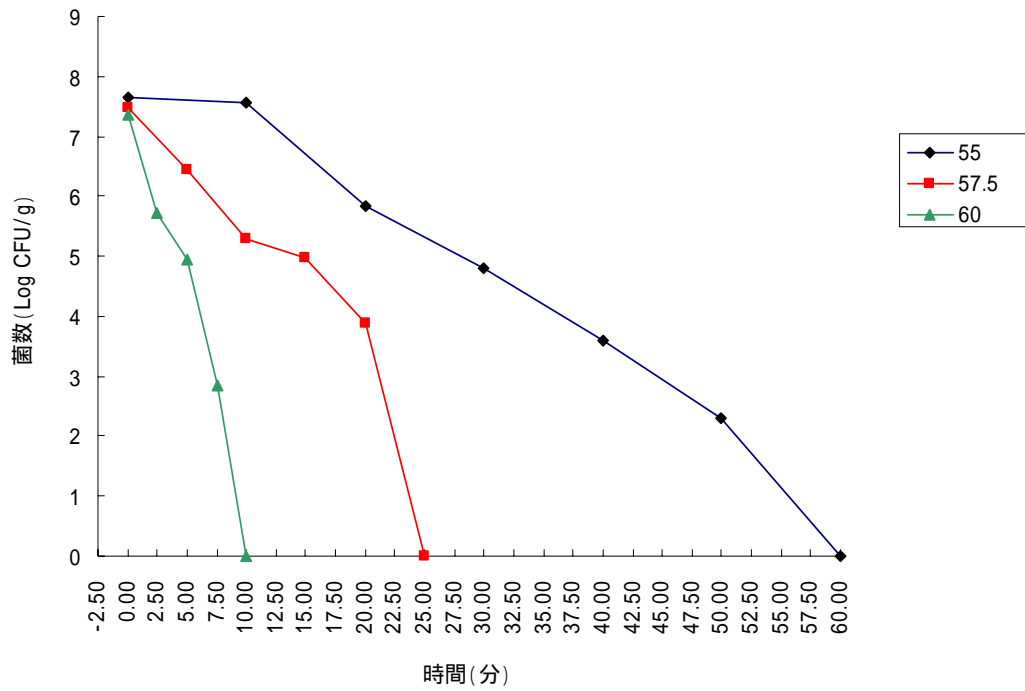


図23. マッシュドポテト中の *E. coli* O157:H7を55、57.5 および60 で加熱処理した時の菌数の消長

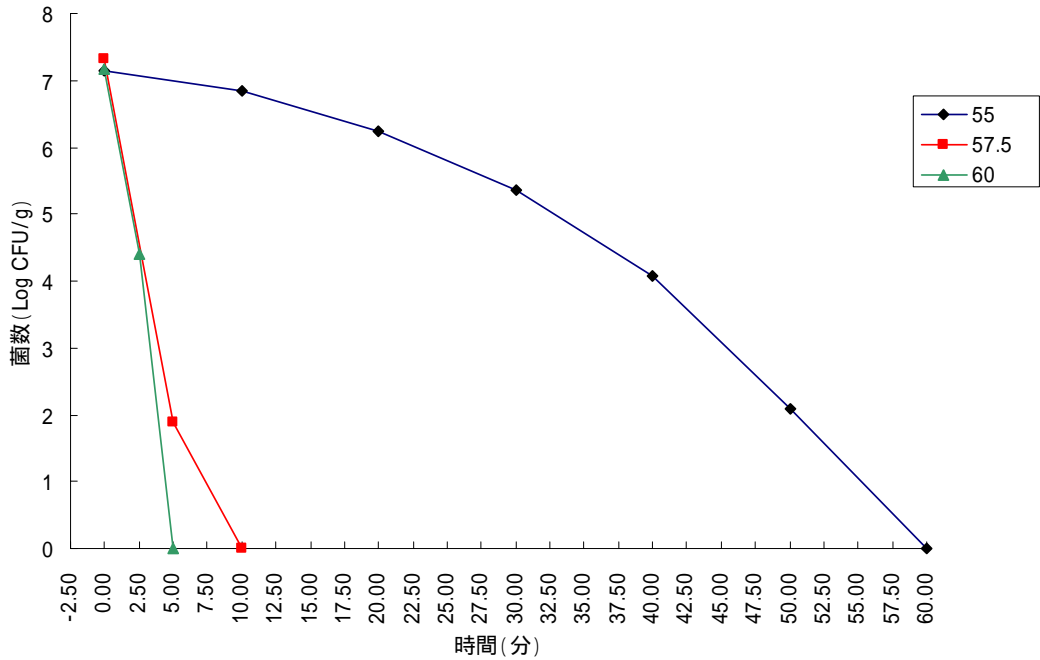


図24. TSB培地中の *E. coli* O157:H7を55、57.5 および60 で加熱処理した時の菌数の消長

