

19990642

平成11年度厚生科学研究報告書

動物性加工食品等の高度衛生管理に関する研究

主任研究者
熊谷 進

目 次

腸炎ビブリオの耐熱性に関する研究 熊谷 進、春日文字、伊藤嘉典、広田雅光……………	1
真空包装あるいは好気条件下で低温保存した豚肉における 病原性 <i>Yersinia enterocolitica</i> の消長 熊谷 進、林谷秀樹一……………	5
腸炎ビブリオの増殖 小沼博隆、仁科徳啓、小澤一弘、浅川 豊、金子孝昌、久保亮一……………	21
HACCP に基づく衛生管理計画の評価方法の開発に関する研究 山崎省二……………	109
食品に起因する危害に関するデータベース及びプレディクティブ モデルの開発に関する研究 難波 江……………	115
マリントキシン等水産食品の安全性確保に関する研究 大島泰克……………	145
食肉中のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) に関する調査、研究 池 康嘉、谷本弘一、小澤良之、野村隆浩、藤本修平、富田治芳……………	163
<i>Coxiella burnetii</i> 死滅温度に関する実験的研究 萩原敬且、山本茂貴、長岡宏美、春日文字……………	167
腸炎ビブリオ汚染実態調査研究 島田俊雄、八柳 潤、斉藤紀行、甲斐明美、山井志郎、杉山宣治、 山川清孝、仲西寿男、小沼博隆、伊藤健一郎……………	175

腸炎ビブリオの耐熱性に関する研究

分担研究者：熊谷 進

研究協力者：春日文字（国立感染症研究所）

伊藤嘉典（国立感染症研究所）

広田雅光（国立感染症研究所）

腸炎ビブリオ O3K6 の耐熱性を明らかにするために加熱致死実験を行った結果、O3K6 またはその TDH 産生株に特有な特徴は見い出されなかった。食塩濃度が 1 から 7 % に増加するに伴い耐熱性が増加することが認められ、7 % 食塩ペプトン水中では 52℃ 下で 4 桁減少するに要する時間は、3 - 7 分であった。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ O3K6 が新たに流行し、その食中毒が増加しているため、その予防方策の構築が急がれている。加熱による制御は予防に役立つ主要な手段であることが知られているが、O3K6 に対して従来と同じ加熱条件で死滅させ得るかどうかについては不明である。本研究の目的は、この株における耐熱性を明らかにすることにある。

B. 研究方法

腸炎ビブリオ O3K6 (TDH 産生株および非産生株)、O4K8 株 (TDH 産生株)、O4K68 株 (TDH 産生株)、O1K68 株 (TDH 産生株) を一晩食塩加ペプトン水中で増菌してから、1%、3% または 7% ペプトン水中に懸濁した菌液を調整し、加熱実験に供した。加熱実験方法は平成 9 年度のものと同じ方法とした。すなわち、バイアル中に菌液を 1 ml 入れ、湯浴によって加熱し、逐次バイアルを取り出し、スパイラルプレーターで食塩加 TSA 上に塗抹し、培養してから菌数を計測することによって生残菌数を求めることによって耐熱性を測定した。

C. 結果と考察

生残菌数は加熱時間とともに減少したが、菌数 (対数 CFU 表示) は直線的には減少せず、すなわち指数関数的には減少せず、時間に伴う菌数 (対数 CFU 表示) 変化は傾きの異なる 2 直線を描く場合が多いことが認められた。これら

2直線の傾きから得られたD値を表1に、菌数を4桁減少するに要した時間を表2に示した。

以上の成績において、O3K6 またはその TDH 産生株に特有な特徴は見いだされなかった。したがって、O3K6 に対しても従来通り加熱が有効な制御方法であって、現在の食中毒の増加が O3K6 の耐熱性を反映したものではないものと考えられる。

食塩濃度が1から7%に増加するに伴い耐熱性が増加することが認められ、7%食塩ペプトン水中では52℃下で4桁減少するに要する時間は、3-7分程度であった。このことから、調理においてしばしば使用される食塩濃度の条件を想定した場合、調理における必要加熱時間の設定には、この52℃下で4桁減少するに要する3-7分がひとつの目安として利用できるものと考えられる。

D. 結論

腸炎ビブリオ O3K6 の耐熱性を明らかにするために加熱致死実験を行った結果、O3K6 またはその TDH 産生株に特有な特徴は見いだされなかった。食塩濃度が1から7%に増加するに伴い耐熱性が増加することが認められ、7%食塩ペプトン水中では52℃下で4桁減少するに要する時間は、3-7分であった。

表 1

1% Na-pepton

血清型	TDH	保存No.		D-value (min)		
				48°C	46.5°C	45°C
O3:K6	+	B-52	D ₁	2.32	5.35	11.64
			D ₂	1.38	3.18	58.26
O3:K6	+	B-54	D ₁	8.03	8.08	17.96
			D ₂	1.29	4.32	69.43
O3:K6	-	C-1	D ₁	4.04	33.54	12.81
			D ₂	1.51	2.99	73.24
O4:K8	+	B-31	D ₁	2.46	15.62	14.85
			D ₂	0.90	2.11	59.45
O4:K68	+	C-20	D ₁	1.94	45.78	14.68
			D ₂	0.62	4.56	55.90
O1:K68	+	C-3	D ₁	2.86	18.05	15.89
			D ₂	1.01	3.24	99.60

3% Na-pepton

血清型	TDH	保存No.		D-value (min)		
				48°C	46.5°C	45°C
O3:K6	+	B-52	D ₁	2.76	9.19	16.94
			D ₂	8.74	73.23	144.32
O3:K6	+	B-54	D ₁	2.85	9.33	141.73
			D ₂	22.5	141.7	-----
O3:K6	-	C-1	D ₁	1.84	11.4	16.94
			D ₂	8.27	126.52	107.74
O4:K8	+	B-31	D ₁	2.37	9.1	129.22
			D ₂	26.36	87.97	-----
O4:K68	+	C-20	D ₁	2.99	9.13	18.33
			D ₂	31.76	168.07	175.59
O1:K68	+	C-3	D ₁	3.02	10.71	13.82
			D ₂	12.45	188.18	163.14

7% Na-pepton

血清型	TDH	保存No.		D-value (min)		
				52°C	48°C	46.5°C
O3:K6	+	B-52	D ₁	0.95	24.05	25.2
			D ₂	3.20	-----	97.2
O3:K6	+	B-54	D ₁	1.31	44.87	97.2
			D ₂	2.20	-----	-----
O3:K6	-	C-1	D ₁	1.57	9.21	30.6
			D ₂	-----	-----	109.8
O4:K8	+	B-31	D ₁	1.21	11.76	48.6
			D ₂	3.25	-----	-----
O4:K68	+	C-20	D ₁	1.79	5.98	85.2
			D ₂	-----	19.57	-----
O1:K68	+	C-3	D ₁	1.57	7.19	88.2
			D ₂	-----	16.04	-----

表 2

1% Na-pepton

血清型	TDH	保存No.	菌数を 10^4 個減らすのにかった時間 (min)		
			48℃	46.5℃	45℃
O3:K6	+	B-52	5.80	12.45	184.68
O3:K6	+	B-54	5.54	17.22	249.95
O3:K6	-	C-1	6.45	13.87	126.79
O4:K8	+	B-31	4.14	9.40	161.70
O4:K68	+	C-20	3.18	18.70	174.41
O1:K68	+	C-3	4.86	14.42	110.56

3% Na-pepton

血清型	TDH	保存No.	菌数を 10^4 個減らすのにかった時間 (min)		
			48℃	46.5℃	45℃
O3:K6	+	B-52	11.59	125.22	340.60
O3:K6	+	B-54	15.73	250.81	566.92
O3:K6	-	C-1	10.34	230.27	282.28
O4:K8	+	B-31	9.48	206.73	616.88
O4:K68	+	C-20	16.20	193.28	470.58
O1:K68	+	C-3	18.55	267.22	402.96

7% Na-pepton

血清型	TDH	保存No.	菌数を 10^4 個減らすのにかった時間 (min)		
			52℃	48℃	46.5℃
O3:K6	+	B-52	3.81	96.22	217.73
O3:K6	+	B-54	5.62	179.48	388.80
O3:K6	-	C-1	6.29	36.84	293.17
O4:K8	+	B-31	6.11	47.04	196.80
O4:K68	+	C-20	7.17	52.45	340.80
O1:K68	+	C-3	6.29	52.45	352.80

真空包装あるいは好気条件下で低温保存した豚肉における病原性
Yersinia enterocolitica の消長

研究協力者：林谷 秀樹 東京農工大学農学部

我が国で分離される *Yersinia enterocolitica* の代表的な病原性血清型である O:3、O:5,27、O:8 および O:9 の 4 血清型菌をそれぞれ豚肉に接種し、真空包装あるいは好気条件下で保存した時の菌の消長について検討するとともに、豚肉における自然汚染菌が本菌の豚肉における増殖態度にどのような影響を与えるかを知る目的で、無菌の豚肉に本菌を接種し、同様に真空包装あるいは好気条件下で保存した時の菌の消長を検討し、以下の成績を得た。

1) 2℃ および 7℃ に保存した真空包装豚肉では、接種した 4 血清型菌はいずれも 5 週間の保存期間を通し、わずかに減少する傾向はみえるものの、ほぼ接種菌数を維持した。2) 2℃ および 7℃ に保存した無菌の真空包装豚肉においても、接種した O:3 菌および O:8 菌のいずれの菌株とも、5 週間の保存期間を通し接種菌数を維持した。3) 2℃ および 7℃ に好気保存した豚肉では、接種した 4 血清型菌はいずれも官能検査で可食性を失わない状態である限りはほとんど増減することなく推移したが、一般生菌数がほぼプラトーに達し、肉の pH が上昇し始めて肉の可食性が失われた頃からわずかながら菌数が増加する傾向を示した。4) 2℃ および 7℃ に好気保存した無菌豚肉では、接種した O:3 菌および O:8 菌はいずれも増減することなく、接種菌数を維持した。5) 2℃ および 7℃ に好気保存した無菌豚肉汁では、接種した O:3 菌および O:8 菌は pH が 5.6 の肉汁中ではいずれとも増殖はみられなかったが、pH が 7.0 のものではいずれも増殖した。6) 以上の成績から、病原性 *Y. enterocolitica* は、真空包装あるいは好気保存した豚肉において、豚肉が可食性を有する限りは、増殖することはないが死滅することもなく長期間に渡り生残することが明らかになった。また、本菌の豚肉での増殖を抑制する要因として、豚肉の汚染細菌によるものではなく、pH などの肉の成分が関与している可能性が示された。

A. 研究目的

我が国における代表的な食中毒菌のひとつである *Yersinia*

enterocolitica は、4°C 以下での発育が可能な低温菌としても知られている^{19,26)}。本菌には、現在までのところ 67 の O 抗原群が存在し、このうち 9 血清群が人に対して病原性を有することが明らかになっている^{1,29)}。我が国で分離される病原性血清型としては、O:3、O:5,27、O:8、および O:9 の 4 つが知られている^{16,27)}。

病原性 *Y. enterocolitica* の自然界における主要なレゼルボアとして豚が知られている。豚は本菌を高率に保有しており^{2,8,9)}、それゆえ本菌のヒトへの感染源としては豚肉が重要視されている^{4,19)}。豚肉から分離される病原性 *Y. enterocolitica* の血清型は O:3、O:5、27、O:9 で、特に O:3 の分離報告は多く、我が国の市販豚肉からも高率に分離されている^{10,26,27,28)}。一方、O:8 は豚肉からほとんど分離されない^{25,26)}。

食肉、特に豚肉における病原性 *Y. enterocolitica* の増殖態度については、好気保存の場合、増殖したという報告³⁾がみられる一方、増殖できなかったという相反する報告^{5,7)}もみられ、その増殖態度には不明な点が多い。また、現在、食肉の流通において、食肉の保存期間を延長する目的で広く普及している真空包装豚肉における病原性 *Y. enterocolitica* の増殖態度については報告がみられず、その増殖態度は不明なままである。

前述したように、豚肉からの病原性 *Y. enterocolitica* の分離状況には血清型により違いがみられることから、豚肉における病原性 *Y. enterocolitica* の増殖態度にも血清型により違いがある可能性が考えられる。本研究では、我が国で分離される代表的な病原性血清型である O:3、O:5,27、O:8 および O:9 の 4 血清型菌をそれぞれ豚肉に接種し、真空包装あるいは好気条件下で保存した時の菌の消長について検討した。また、豚肉における自然汚染菌が本菌の豚肉における増殖態度にどのような影響を与えるかを知る目的で、無菌の豚肉に本菌を

接種し、同様に真空包装あるいは好気条件下で保存した時の菌の消長を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試菌株として *Y. enterocolitica* 血清型 O:3、O:5,27、O:8 およ O:9 の各 1 株を用いた。これら菌株は供試前に自己凝集性試験²⁰⁾ならびにカルシウム依存性試験¹¹⁾を行い、病原性状が陽性であることを確認した後、病原性プラスミドを検出し¹⁸⁾、病原株であることを確認した。供試菌株は、使用するまで skin milk(Difco)に浮遊させ、 -80°C で凍結して保存した。

2. 供試材料

供試材料として、スライス肉、ミンチ肉および無菌スライス肉の 3 種の豚肉を準備した。スライス肉は背最長筋(ロース)を、市販精肉店でスライス(厚さ約 1 cm、重量約 100 g)してもらったものを用いた。ミンチ肉は購入したスライス肉を滅菌したハサミで細切して作成した。また、無菌のスライス肉は、市販精肉店から購入した豚背最長筋のブロック肉の表面をバーナーで焼いた後、焼いた部分を滅菌したメスで切り取るという作業を 2 回繰り返した後、上記のスライス肉と同じ大きさとなるように、滅菌したメスでスライスして作成した。

3. 供試材料への菌接種

供試菌株はいずれも trypticase soy agar 平板培地(BBL、以下 TSA 培地)に接種し、 25°C で 24 時間培養後、発育した菌を白金耳で掻き取り、

リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline,pH7.2、以下 PBS)に浮遊させた。この菌液を PBS9ml で適当な濃度になるように 10 倍階段希釈して菌液を作成した。調製した菌液はスライス肉、ミンチ肉および無菌スライス肉に、いずれも 10^4 CFU/g になるように接種した。この時、スライス肉ならびに無菌スライス肉ではコンラージ棒を用いて菌液が均一になるよう肉表面に菌液を塗抹し、ミンチ肉では肉に菌液が均一に混じるよう、滅菌ガラス棒を用いてよく混合した。なお、スライス肉およびミンチ肉には *Y.enterocolitica*O:3、O:5,27、O:8 および O:9 の 4 菌株を、無菌スライス肉には *Y.enterocolitica*O:3 および O:8 の 2 菌株を接種した。菌液を接種したスライス肉および無菌スライス肉は、真空包装の場合は、酸素透過性の低い真空包装用のプラスチックフィルム(20×30cm、2~3cc/□・24h/atm、20℃、オザキ軽化学)に入れ、真空包装機(Tospack V-220、東静電気)を用いて真空包装した状態で、好気保存の場合は、ガラスシャーレに入れた状態で、いずれの場合とも 2℃または 7℃で低温保存した。また、ミンチ肉は菌液接種後、ガラスシャーレに入れた状態で、2℃または 7℃で保存した。また、スライス肉、ミンチ肉および無菌スライス肉のいずれとも、菌を接種していないものも作製し、2℃または 7℃で保存してコントロールとした。なお、真空包装豚肉の実験は、2℃に保存したものでは 3 回、7℃に保存したものでは 2 回、また真空包装した無菌豚肉の実験は 2℃および 7℃に保存したもののいずれとも 2 回、同じ実験を繰り返して行ない、平均値と標準偏差を算出した。

4. 接種菌の回収

菌を接種したスライス肉については、真空包装保存したものでは菌接種 0 日目ならびに 1 週ごとに 5 週目まで、好気保存したものでは菌

接種 0 日目ならびに 1 日ごとに 6 日目まで接種菌の回収を行った。また、無菌スライス肉については、真空包装保存したものでは菌接種 0 日目ならびに接種後 1、2、3、5 週目に、好気保存したものでは菌接種 0 日目ならびに 1 日ごとに 4 日目まで接種菌の回収を行った。ミンチ肉は菌接種 0 日目および 1 日ごとに 6 日目まで接種菌の回収を行った。

菌を接種した供試材料は、無菌的に細切、混和し、その中から取り出した 1 g を滅菌 PBS9ml とともにホモゲナイザーによりホモゲナイズした。適当なコロニー数が得られるよう PBS を用いて 10 段階希釈し、その 0.1 ml を *Y. enterocolitica* の菌数測定には cefusulozin-irgasan-novobiocin 寒天平板 (OXOID、以下 CIN 培地) ならびに virulent *Yersinia enterocolitica* 選択培地 (以下 VYE 培地)⁶⁾ に、総生菌数のカウントには、TSA 培地に接種した。なお、真空包装した豚肉の総生菌数の測定には TSA 培地に加え、5% 馬脱繊維血添加 BL 寒天平板培地 (栄研、以下 BL 培地) を用いた。検体を塗抹後、CIN、VYE および TSA 培地は 25℃ で 48 時間、BL 培地は 4℃ で 1 週間培養後、発育してきた菌数を測定した。なお、*Y. enterocolitica* については、選択培地上に発育してきた特徴的なコロニーを釣菌して純培養後、抗血清によるスライド凝集反応により接種菌であることを確認した。

5. pH 測定

供試検体はいずれも菌数測定のために細切する前に、接触型電極 (pH□ 10、Beckman) を用いて肉表面の pH を測定した。

6. 豚肉の官能的検査

供試検体はいずれも菌数測定のために細切する前に、肉色や臭気

ついて複数のパネラーにより官能検査を実施し、可食性の有無について検討した。

C. 研究結果

図 1 はスライス肉に *Y. enterocolitica* の 4 血清型菌をそれぞれ約 10^4 CFU/g になるように接種後、真空包装して 2℃ に保存した検体における本菌の経時的消長を示したものである。接種した 4 血清型菌は、いずれも 5 週間の保存期間を通し、わずかに減少する傾向はみえるものの、ほぼ接種菌数を維持した。また、総生菌数はいずれの菌株も保存開始時は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g であったが、保存期間の経過とともに緩やかに増加し、5 週目には約 10^8 CFU/g に増殖した。なお、真空包装した豚肉における総生菌数は、BL 培地のほうが TSA 培地における菌数よりも若干多かったので、真空包装肉における総生菌数は BL 培地における菌数で示してある。pH はいずれの検体とも保存開始時には 5.4~5.8 の範囲にあったが、保存期間の経過につれわずかずつ低下し、5 週目には 5.1~5.3 まで低下した。なお、官能検査では、検体はいずれも保存開始後 4 週後の時点からわずかな酸臭が感じられたが、5 週後でも可食性を失うほどではないと判断された。

図 2 は図 1 と同様に菌を接種し真空包装したスライス肉を 7℃ で保存した時の菌の経時的消長を示したものである。接種した 4 血清型菌は 2℃ の場合と同様、いずれも 5 週間の保存期間を通じ、わずかに減少傾向を示したがほぼ接種菌数を維持した。一方、総生菌数はいずれの検体においても保存開始時には $10^5 \sim 10^6$ CFU/g であったが、1~2 週目には約 10^8 CFU/g に増加し、5 週目までその値を維持した。pH はいずれの検体においても保存開始時は 5.4~5.7 の範囲であったが、保存

期間の経過とともに徐々に低下し、5週後には5.0~5.2となった。また、官能検査では、検体はいずれも保存開始後4週後の時点から酸臭とともに硫黄臭がして、可食性は失われたものと判断された。

図3は無菌スライス肉にO:3菌とO:8菌を 10^4 CFU/gになるように接種し、真空包装後2℃あるいは7℃で保存した検体における本菌の経時的消長を示したものである。O:3菌およびO:8菌のいずれとも、2℃と7℃の保存温度のいずれにおいても、5週間の保存期間を通し接種菌数を維持した。肉のpHはいずれの接種菌においても、保存温度に関わらず保存開始から5週の保存期間を通じて、5.4~5.6の範囲で推移した。官能検査では、O:3菌およびO:8菌を接種した検体のいずれとも、いずれの保存温度においても、保存開始後5週目まで可食性を失わなかった。

図4はスライス肉に*Y. enterocolitica*の4血清型菌をそれぞれ 10^4 CFU/gになるように接種し、2℃で好気保存した検体における本菌の経時的消長を示したものである。接種した4血清型菌のいずれにおいても、6日間の保存期間を通し、ほぼ接種菌数の 10^4 CFU/g前後で推移した。一方、総生菌数はいずれも保存開始時において約 10^5 CFU/gであったが徐々に増加し、5日目までに約 10^9 CFU/gに達した。pHはいずれの検体も保存開始時から4日目までは5.6~5.8の範囲で推移したが、5日目以降はやや増加し5.7~6.2に上昇した。また、官能検査ではいずれの検体とも保存開始から4日目には腐敗臭が強くなり、5日目には可食性を失ったと判断された。

図5は図4と同様に菌を接種したスライス肉を、7℃で保存した時の菌の経時的消長を示したものである。接種した4血清型菌のいずれにおいても、6日間の保存期間を通し、わずかな菌数の増加がみられた。供試4菌株中最も菌数の増加がみられたものはO:8菌で、保存6日目

には約 10^6 CFU/g に達したが、他の 3 菌株も 10^5 CFU/g 程度までまで菌数が増加した。総生菌数はいずれの検体においても保存開始時において約 10^5 CFU/g であったものが徐々に増加し、3~5 日目くらいには約 10^9 CFU/g に達し、6 日目までその菌数を維持した。pH は、いずれの検体も保存開始時から 4 日目までは 5.6~5.8 の範囲で推移したが、5 日目以降は上昇し、6 日目には 6.1~6.5 まで上昇した。官能試験では保存開始から 4 日後には腐敗臭がして可食性を失ったと判断された。

図 6 はミンチ豚肉に *Y. enterocolitica* の 4 血清型菌をそれぞれ 10^4 CFU/g になるように接種し、2℃で好気保存した検体における本菌の経時的消長を示したものである。接種した 4 血清型菌いずれの検体においても、保存後 5 日目までにわずかな増加がみられた。総生菌数はいずれも保存開始時において約 10^5 CFU/g であったが、保存 5 日目までに約 10^9 CFU/g に達した。pH はいずれとも保存開始時から 5 日目までは 5.6~5.8 の範囲で推移したが、6 日後には 5.9~6.3 まで上昇した。官能検査では、いずれの検体も保存開始 4 日目には腐敗臭がして可食性を失ったと判断された。

図 7 は図 6 と同様、菌を接種したミンチ肉を、7℃で好気保存した検体における本菌の経時的消長を示したものである。接種した 4 血清型菌はいずれの検体においても、6 日間の保存期間を通してわずかず菌数が増加し、3 日後には約 10^5 CFU/g、5 日後には約 10^6 CFU/g に達した。総生菌数はいずれにおいても保存期間を通し増加し、4 日目には $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/g に達し、6 日目までその菌数を維持した。pH はいずれも保存開始時から 3 日目までは 5.6~5.8 の範囲で推移したが、4 日目以降徐々に上昇し 6 日目には 6.1~6.5 に達した。官能検査ではいずれの検体も保存開始から 4 日目には腐敗臭がして可食性を失ったと判断された。

図 8 は無菌スライス肉に O:3 菌または O:8 菌をそれぞれ約 10^4 CFU/g になるように接種し、2℃あるいは7℃で好気保存した検体における本菌の経時的消長を示したものである。O:3 菌および O:8 菌はいずれとも4日間の保存期間を通じ、ほぼ接種菌数を維持した。また、pH はいずれにおいても4日間の保存期間を通じて、5.5~5.8の範囲で推移し、保存期間を通じて可食性を失うこともなかった。

D. 考察

豚肉は病原性 *Y. enterocolitica* の人への重要な感染源と考えられているが、豚肉中における *Y. enterocolitica* の消長については不明な点が多い。真空包装した豚肉での病原性 *Y. enterocolitica* の増殖については検討した報告が見当たらないが、Gill と Reichel¹³⁾ は、肉の pH が 6.0 以上の牛肉に病原性・血清型等不明の *Y. enterocolitica* を接種し、真空包装して 10℃で低温保存した場合、 10^4 CFU/g の接種菌数が5日後には 10^8 CFU/g にまで増殖したことを報告している。一方、Grau¹⁴⁾ は非病原性 *Y. enterocolitica* を真空包装牛肉に接種し 5℃で保存した場合、肉の pH が 5.4-5.85 である一般的な肉では、接種菌は30日後まで増殖しなかったことを報告している。本研究では、病原性 *Y. enterocolitica* の4血清型菌は真空包装後 2℃または 7℃で低温保存した場合、いずれの菌株とも5週間の保存期間を通じて増減しなかった。これらのことから、病原性 *Y. enterocolitica* は真空包装豚肉中では増殖しないものと思われた。しかし、Grau¹⁴⁾ は非病原性 *Y. enterocolitica* を肉の pH が 6.0 以上の DFD 牛肉に接種し、真空包装後 5℃に保存した場合、また、Gill と Newton¹³⁾ は非病原性 *Y. enterocolitica* を肉の pH が 6.0-6.5 と高い牛肉に接種し真空包装後

10℃に保存した場合、いずれも菌が増殖したことを報告しており、後述するように、好気保存した場合は肉のpHが高くなると病原性 *Y. enterocolitica* の増殖がみられたことから考えて、肉のpHによっては病原性 *Y. enterocolitica* は真空包装した豚肉で増殖する可能性も考えられ、今後の検討課題となった。

好気で保存した豚肉での本菌の増殖について、Hannaら¹⁵⁾は、豚肉にO:8菌を $10^2 \sim 4$ CFU/g接種し、7℃で5日間保存したところ、 10^7 CFU/gに増殖したことを報告している。またNettenら²²⁾は、豚肉にO:3菌を 10^3 CFU/cm²接種し、4℃で保存したところ、菌投与18日目には菌数が 10^7 CFU/cm²にまで増加したことを報告している。一方、Fukushima⁷⁾はO:3菌を接種後6℃および25℃で保存した豚肉において、それぞれ12日間と24時間の保存期間を通じて菌は死滅することはないが増殖もしないことを、Hellmannら¹⁷⁾もO:3菌を接種後4℃で保存したミンチ豚肉において、72時間の保存期間を通じて菌が増殖しないことを報告しており、好気保存した豚肉における病原性 *Y. enterocolitica* の消長に関しては相反する成績が示されている。本研究において、豚肉に病原性 *Y. enterocolitica* を接種し、2℃あるいは7℃で好気保存した場合、肉が官能検査で可食性を失わない状態である限りは菌はほとんど増殖することなく推移し、得られた成績は、FukushimaやHellmannらの成績を支持するものであった。しかし、2℃および7℃のいずれの保存温度においても、菌接種後好気保存した豚肉において、一般生菌数がほぼプラトーに達し、肉のpHが上昇し始めて肉の可食性が失われた頃からわずかながら接種した病原性 *Y. enterocolitica* が増加する傾向がみられた。

Fukushima^{5,7)}は、好気保存した豚肉においてO:3菌が増殖しない理由として、肉の汚染細菌との拮抗の可能性を指摘しているが、本研究

において無菌豚肉を作成し、O:3 菌と O:8 菌を接種して好気保存した場合、いずれの接種菌とも 5 日間の保存期間を通じ菌数が全く増減しなかったことから、本菌が真空包装または好気保存した豚肉中で増殖しない理由は、他の細菌との拮抗によるものではなく、肉の pH などの肉成分による影響の可能性が高いものと思われる。一方、真空包装肉においては、その優勢菌種であることが知られる *Lactobacillus* 属菌は²³⁾、*Y. enterocolitica* の増殖を阻害するとの報告²⁴⁾もみられるが、今回 *Lactobacillus* 属菌の影響のない無菌の真空包装豚肉中における O:3 菌と O:8 菌の消長を調べた結果、好気の場合と同様、菌の増殖はみられなかったことから、真空包装豚肉での病原性 *Y. enterocolitica* の消長に *Lactobacillus* 属菌は影響を与えていないものと推察される。また、Fukushima⁷⁾は好気保存した豚肉中で O:3 菌は増殖しないが、非病原性 *Y. enterocolitica* は他の汚染菌と同様に増殖することを報告しており、Manu-Tawiah ら²¹⁾も非病原性 *Y. enterocolitica* は好気保存した豚肉中では他の汚染細菌と同様に増殖することを報告しており、*Y. enterocolitica* の病原性株と非病原性株の間では豚肉における増殖態度に差がみられる。このような差がなぜみられるのかを解明することは、*Y. enterocolitica* の自然界における生態を考える上で興味ある課題であり、今後、その機序について検討して行きたい。

本研究において真空包装または好気保存した豚肉中での病原性 *Y. enterocolitica* の消長に血清型間で違いがなかったことから、豚肉からの病原性 *Y. enterocolitica* の分離率が血清型によって異なる理由は、豚肉中における菌の動態の違いによるものではないと思われた。

以上、本研究により、病原性 *Y. enterocolitica* の 4 血清型は真空包装あるいは好気保存した豚肉において、他の汚染細菌の影響を受けることなく、初期汚染を受けた状態のまま長期間生存し続けることが示

された。今後、病原性 *Y. enterocolitica* の豚肉から人への感染予防を図るためには、と畜場や食肉加工場において本菌の豚肉への汚染を防ぐことが最も重要と思われる。さらに、本菌が豚肉を汚染した場合、減少することなく長期間に渡り生残することを念頭に置いて、二次汚染を起こさぬよう肉の取り扱いには十分な注意が払うことが必要であろう。

参考文献

- 1) Alecsic, S., Bochmuhl, J., and Lange, F., 1986. Studies on the serology of flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related *Yersinia* species. Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. A 261:299-310.
- 2) Andersen, J.K., Sørensen, R., and Glensbjerg, M., 1991. Aspect of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. Int. J. Food Microbiol. 13:231-238.
- 3) Borch, E., Lindberg, C.W., 1995. Predicting aerobic growth of *Yersinia enterocolitica* O:3 at different temperatures, pH values and L-lactate concentrations. Contrib. Microbiol. Immunol. 13:134-136
- 4) De Boer, E., and Nouws, J.F.M., 1991, Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Int. J. Food Microbiol. 12:375-378.
- 5) Fukushima, H., 1986. *Yersinia enterocolitica* serotype O3 in naturally infected raw pork. Jpn. J. Vet. Sci. 48:183-187
- 6) Fukushima, H., 1987. New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. 25:1068-1073.

- 7) Fukushima, H., and Gomyoda, M., 1986. Inhibition of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 by natural microflora of pork. *Appl. Environ. microbiol.* 51:990-994.
- 8) Fukushima, H., Maruyama, K., Omori, I., Ito, K., and Iorihara, M., 1989. Role of the contaminated skin of pigs in fecal *Yersinia contamination* of pig carcasses at slaughter. *Fleischwirtsch* 69: 369-372.
- 9) Fukushima, H., Nakamura, K., Omori, I., Ito, K., and Iorihara, I., 1990. Contamination of pigs with *Yersinia* at the slaughterhouse. *Fleischwirtsch* 70:1300-1302.
- 10) Fukushima, H., Hoshina, K., Nakamura, R., and Ito, Y., 1987. Raw beef, pork and chicken in Japan contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, and *Clostridium perfringens*—a comparative study. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* 184:60-70.
- 11) Gemski, P., Lazere, J.R., and Casey, T., 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 27:682-685.
- 12) Gill, C.O., and Newton, K.G., 1979. Spoilage of vacuum-packaged dark, firm dry meat at chill temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:362-364.
- 13) Gill, C.O., Reichel, M.P., 1989. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol.* 6:223-230.

- 14) Grau F. H., 1981. Role of pH, lactate, and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative gram-negative bacteria on beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1043-1050.
- 15) Hanna, M.O., Stewart, J.C., Zink, Z.L., Carpenter, Z.L., 1977. Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures. *J. Food Sci.* 42:1180-1184.
- 16) Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Kaneko, K., Kosuge, J., Kato, M., Ogawa, M., and Kapperud, G., 1995. Potential source of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori prefecture, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 33:1253-1257.
- 17) Hellmann, E., and Heinrich, G., 1985. Studies on growth rates of virulence plasmid carrying *Yersinia enterocolitica* in milk, minced pork, and vegetables after artificial contamination. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. B* 182:1-16.
- 18) Kado, C.I., and Liu, S.T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365-1373.
- 19) Kapperud, G., 1991. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int. J. Food Microbiol.* 12:53-56.
- 20) Laird, W., and Cavanaugh, D.A., 1980. Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. *J. Clin. Microbiol.* 11:430-432.
- 21) Manu-Tawiah, W.D.J., Myers, D.J., Olson, D.G., and Molins, R.A., 1993. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under gas atmospheres. *J. Food Sci.* 58:475-479.