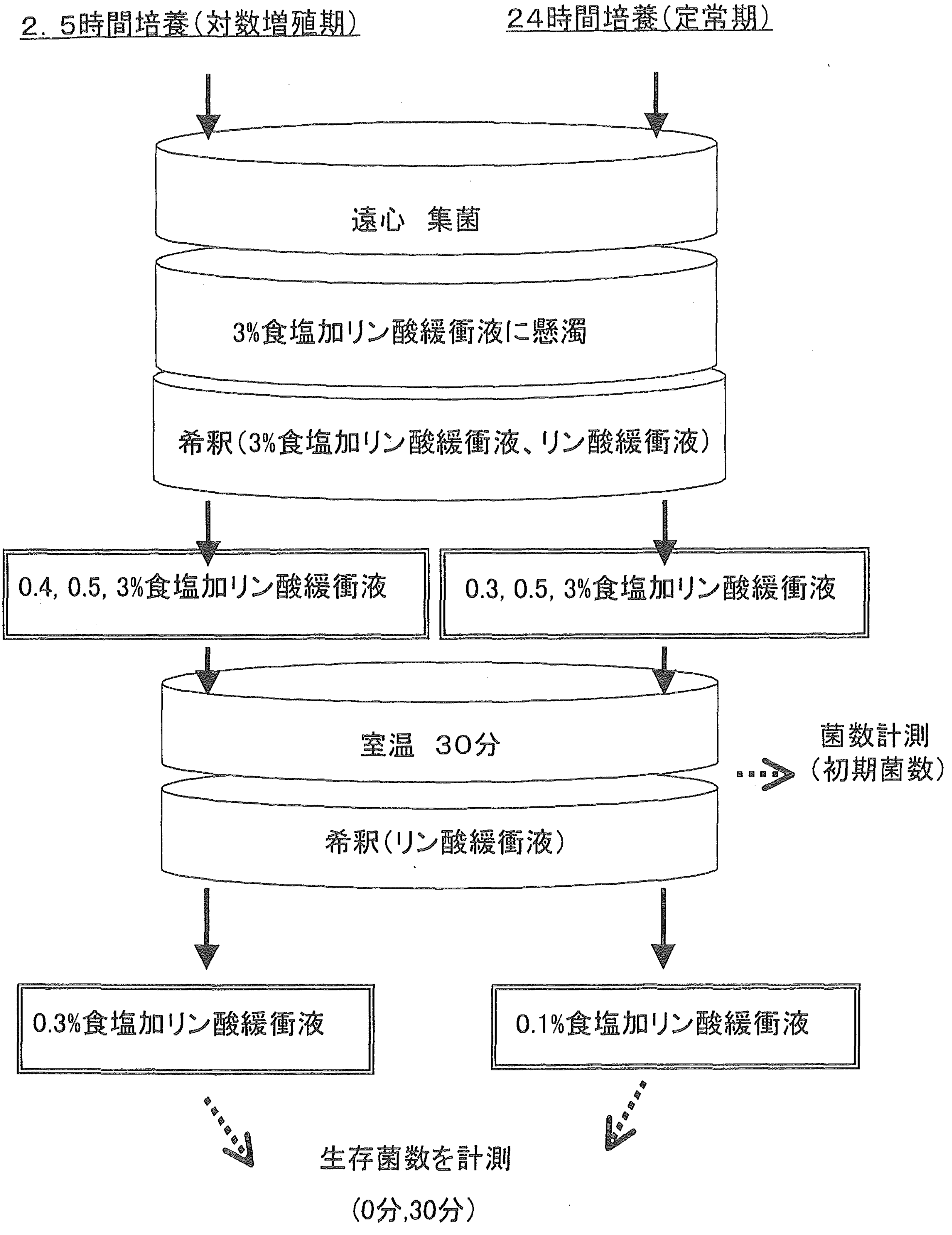


図3-1　低張食塩水による低張食塩水耐性の獲得　実験方法

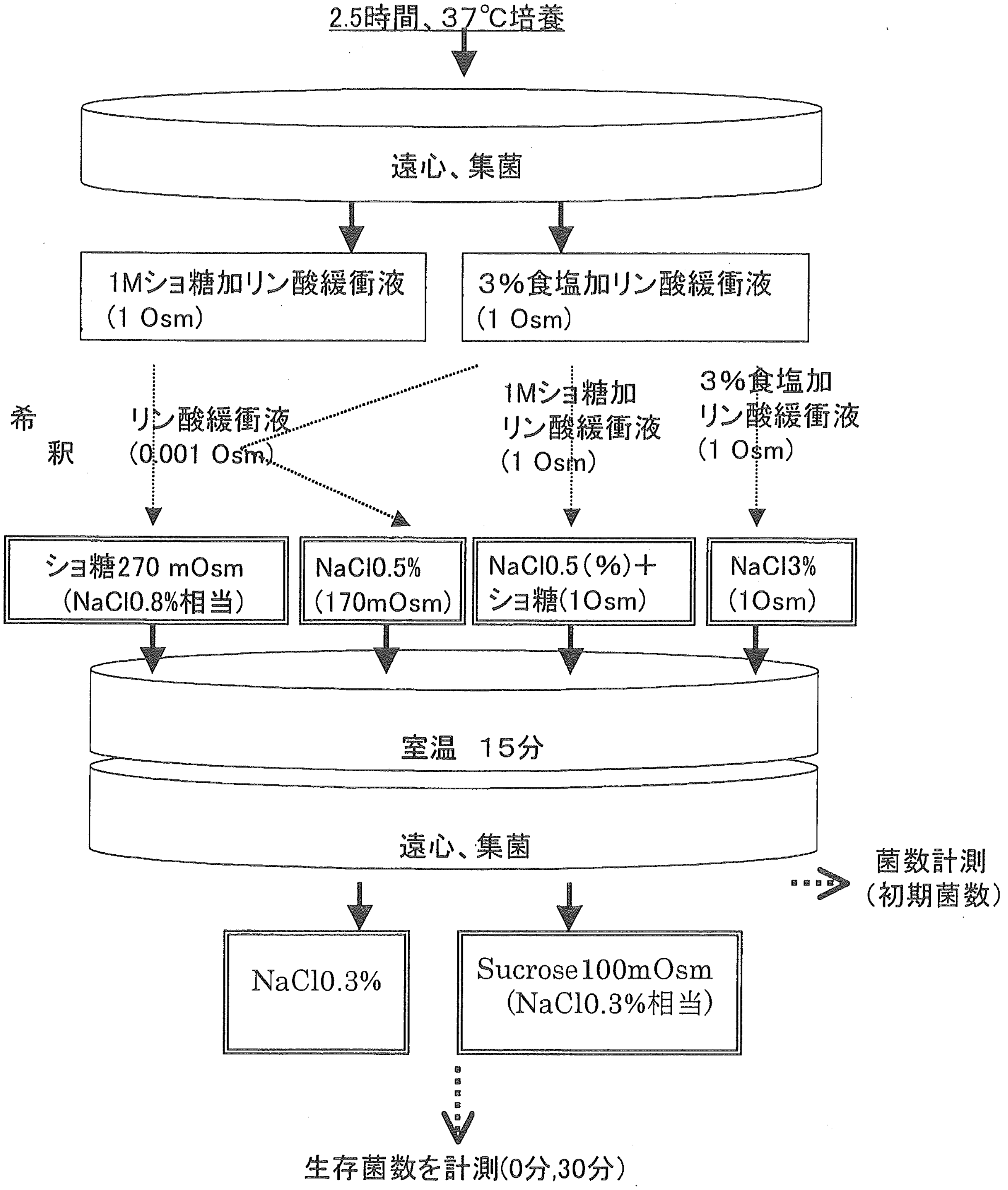


図3-2 低食塩濃度・低浸透圧による耐性の獲得 実験方法

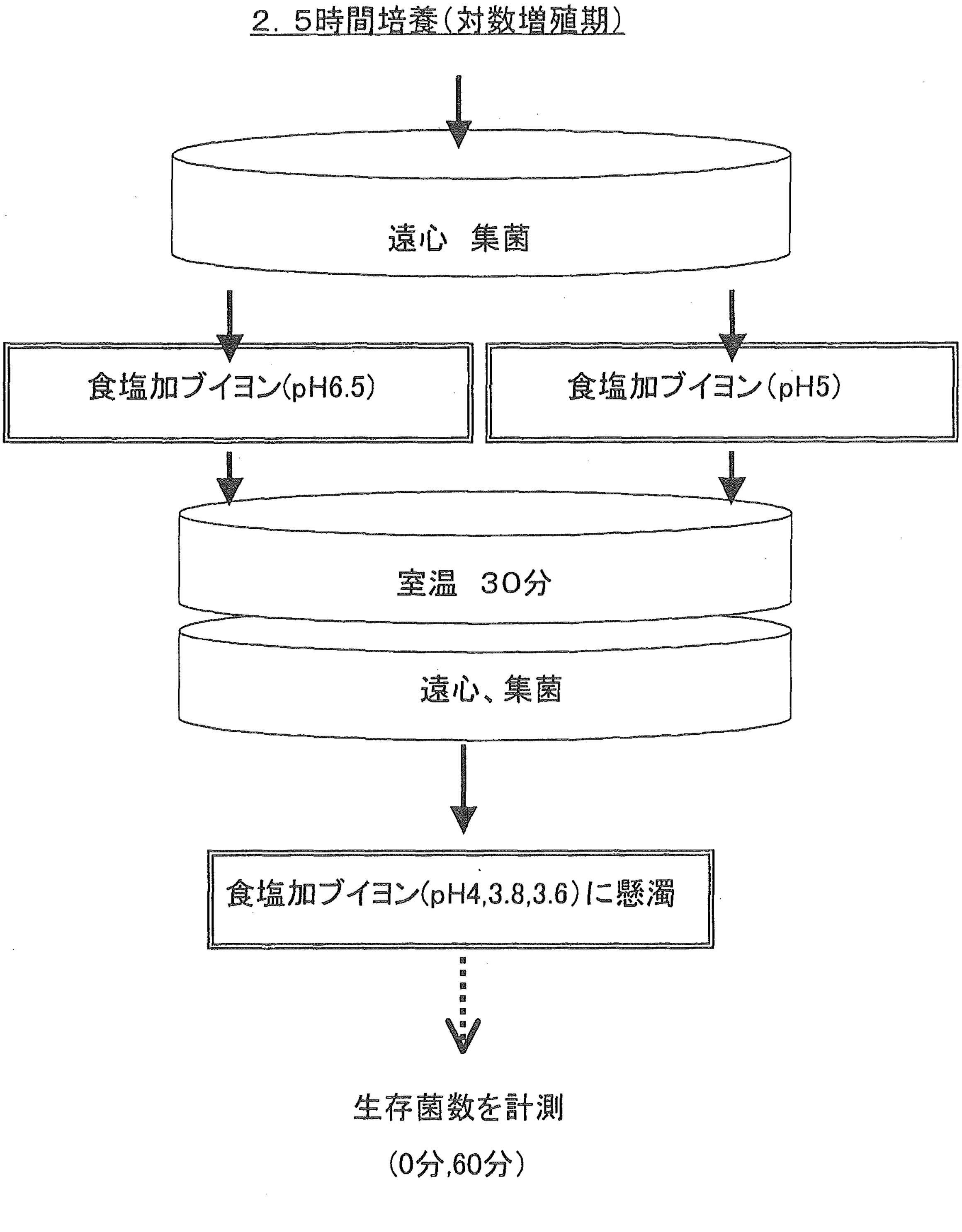


図3-3 酸による酸耐性の獲得 実験方法

2．5時間培養（対数増殖期）

↓

遠心　集菌

↓

食塩加ブイヨン(pH6.5)　　食塩加ブイヨン（pH5）

↓

室温　30分

遠心、集菌

1%食塩加リン酸緩衝液に懸濁

菌数計測（初期菌数）

↓ 希釈（リン酸緩衝液）

NaCl濃度(%)	0.16	0.18	0.20	0.22	0.24
リン酸緩衝液(μl)	420	410	400	390	380
菌懸濁液(μl)	80	90	100	110	120

↓

生存菌数を計測(0分,30分）

図3-4　酸による低浸透圧耐性の獲得　実験方法

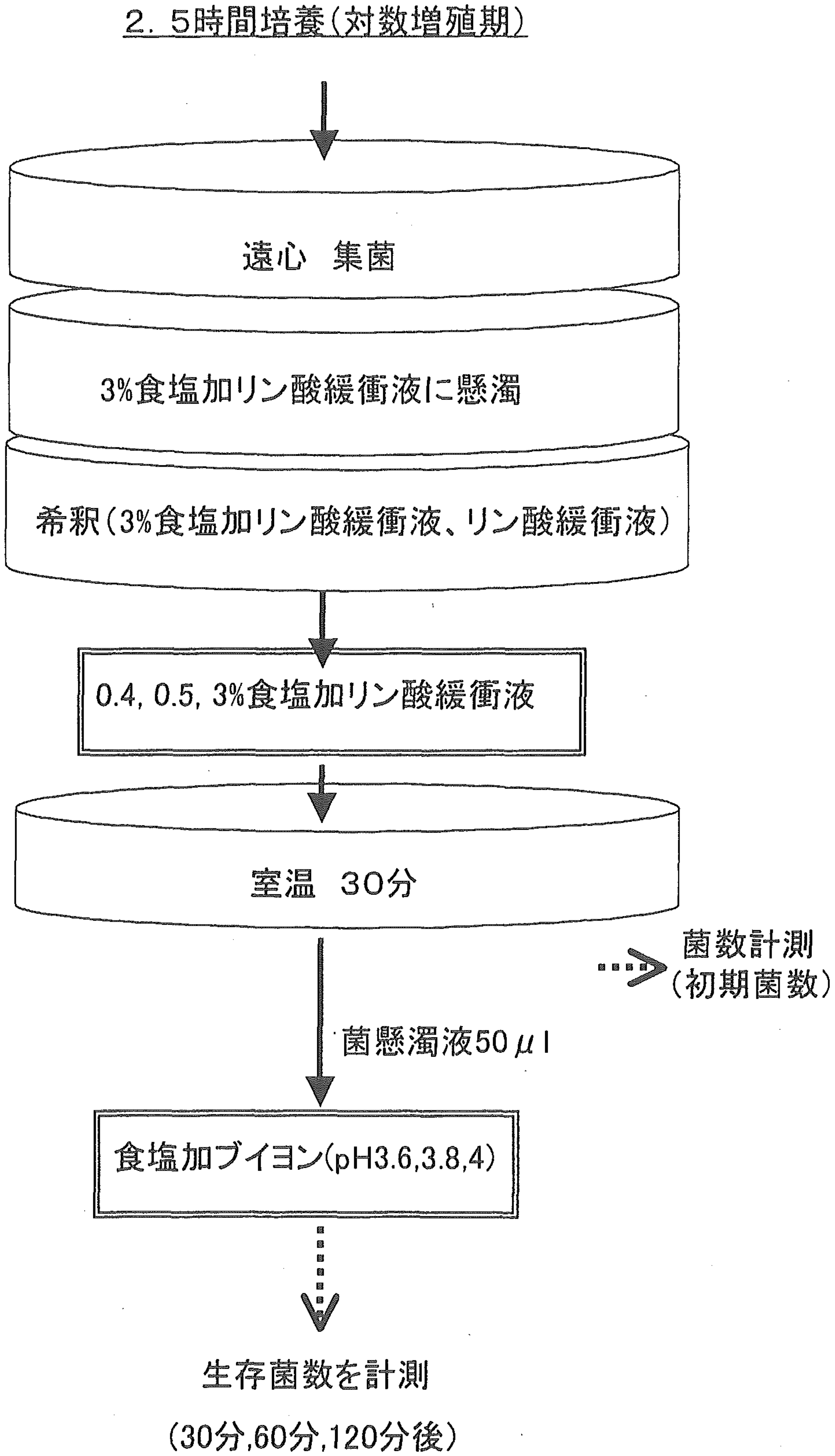


図3-5　低浸透圧による酸耐性の獲得　実験方法

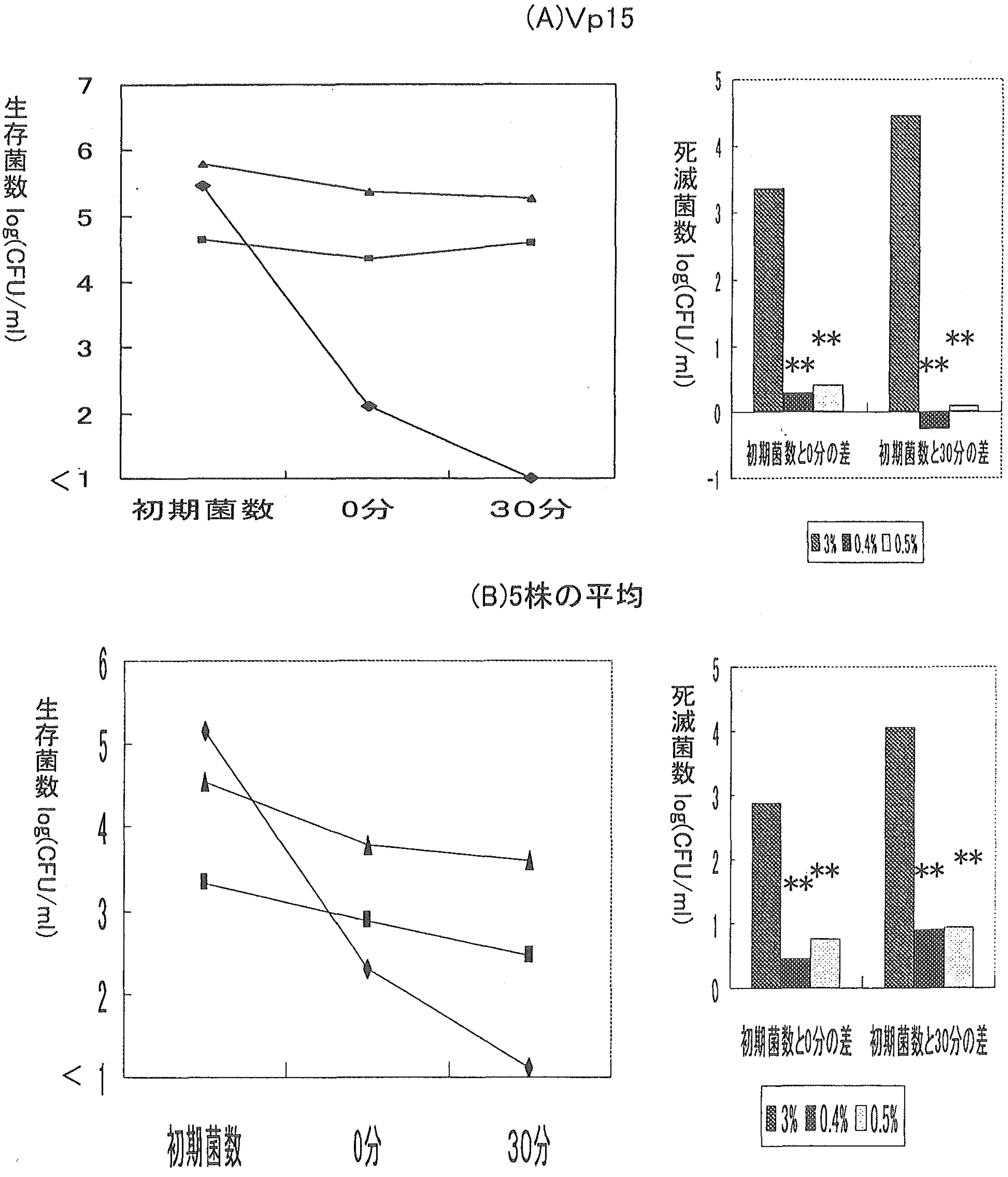


図3-6 食塩濃度0.3%における死滅 対数増殖期

菌を3%(◆)、0.4%(■)、0.5%(▲)食塩水に曝露した後、0.3%食塩水での死滅を調べた。
(A) Vp15 2回行った平均 (B) Vp9、21、42、112、316の平均
**: 死滅菌数について、3%食塩水との間に有意差($p<0.01$)が認められた。

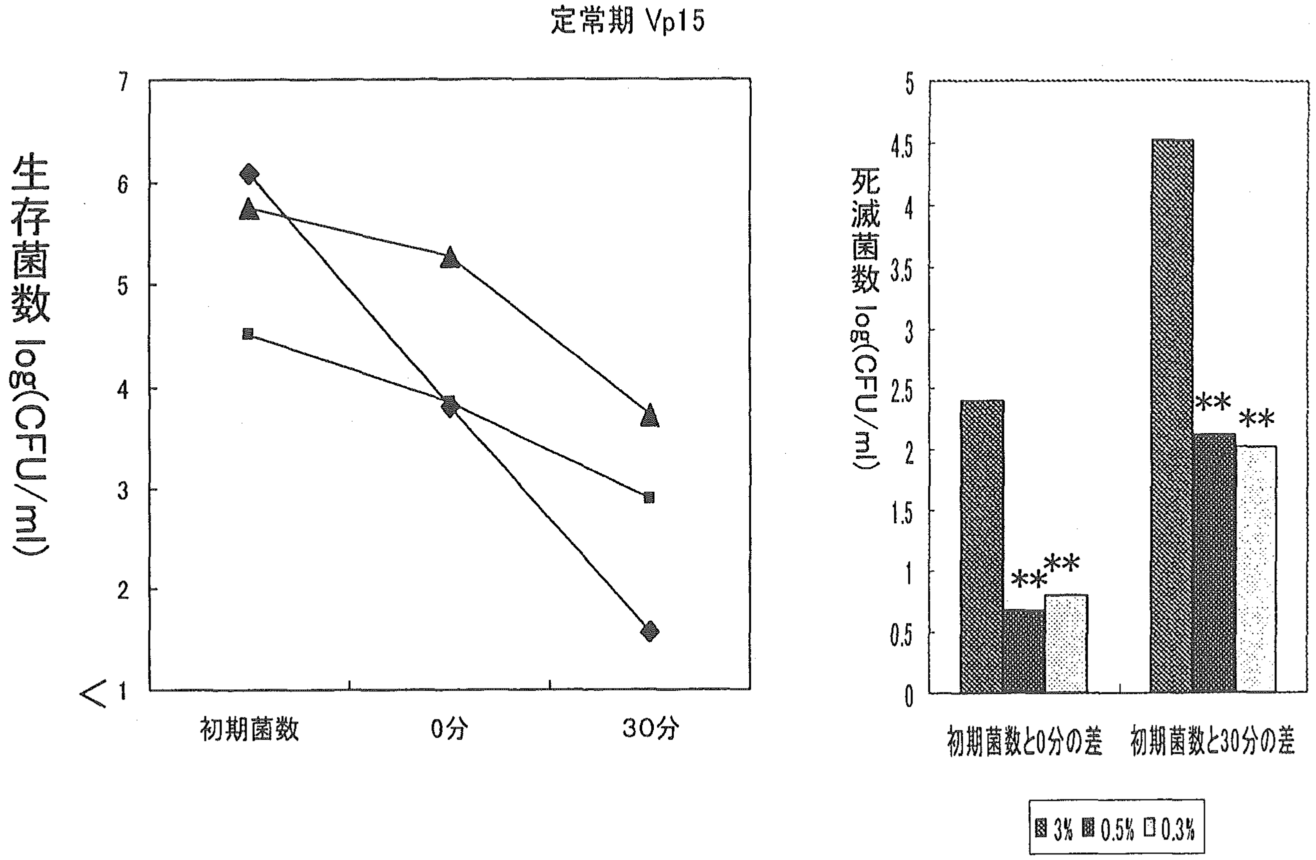
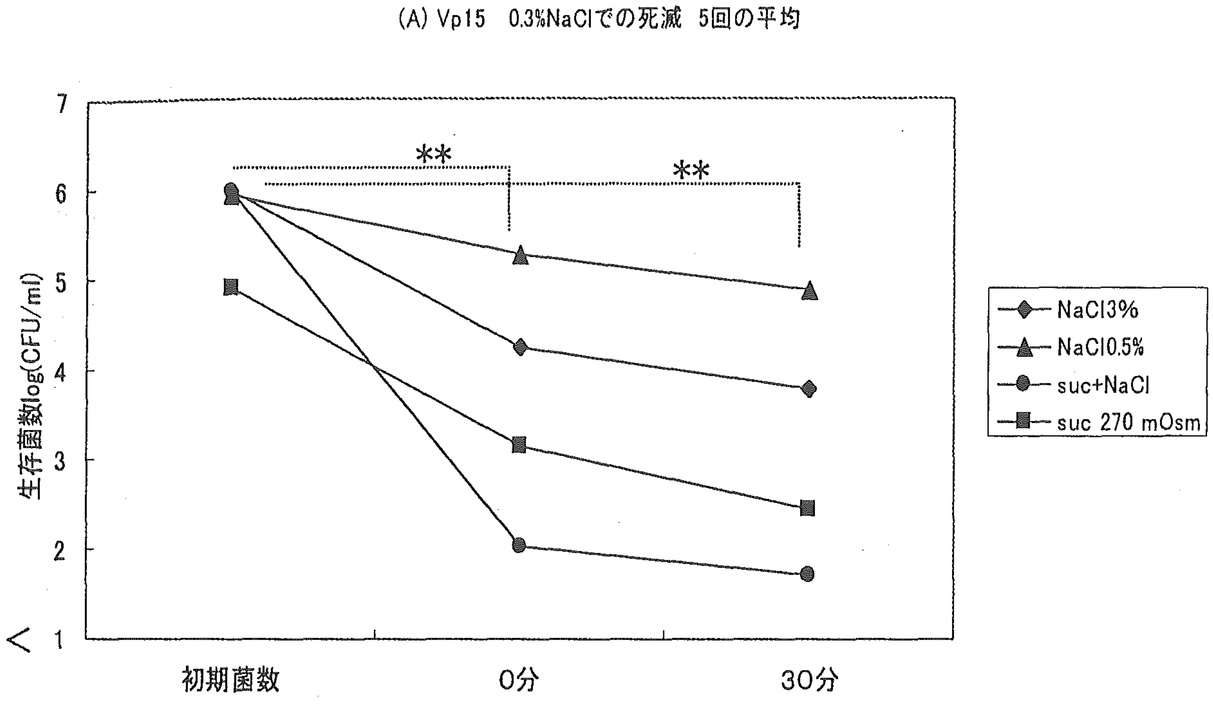


図3-7 食塩濃度0.1%における死滅 定常期

菌を3%(◆)、0.4%(■)、0.5%(▲)食塩水に曝露した後、0.1%食塩水での死滅を調べた。
Vp15 3回行った平均

**: 死滅菌数について、NaCl3%との間に有意差($p<0.01$)が認められた。



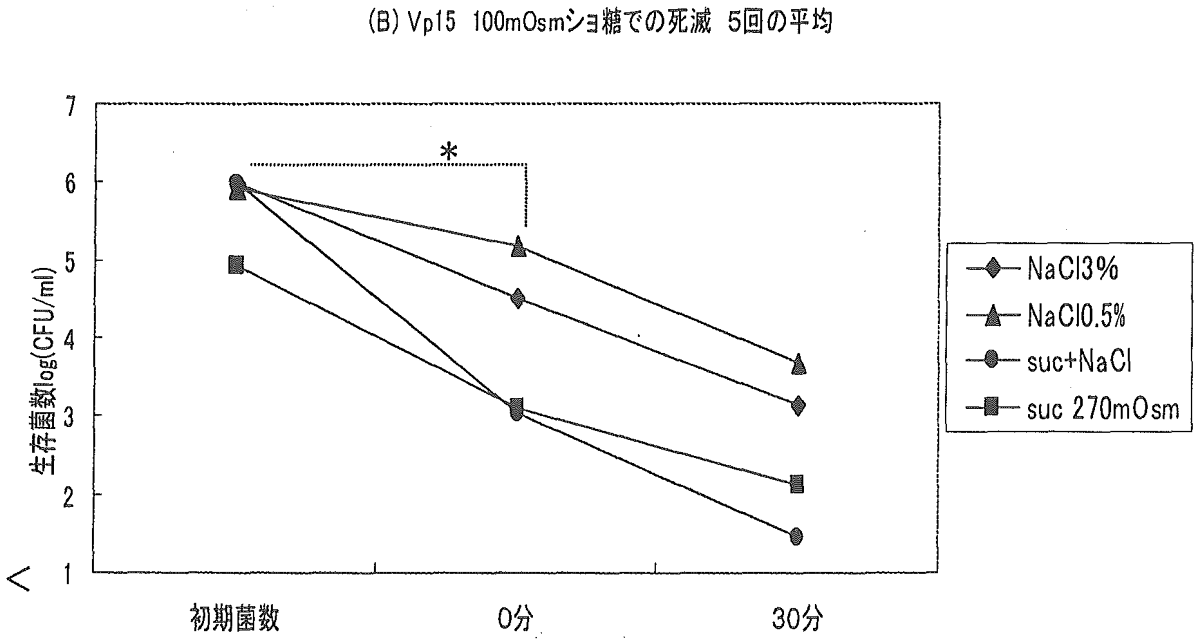
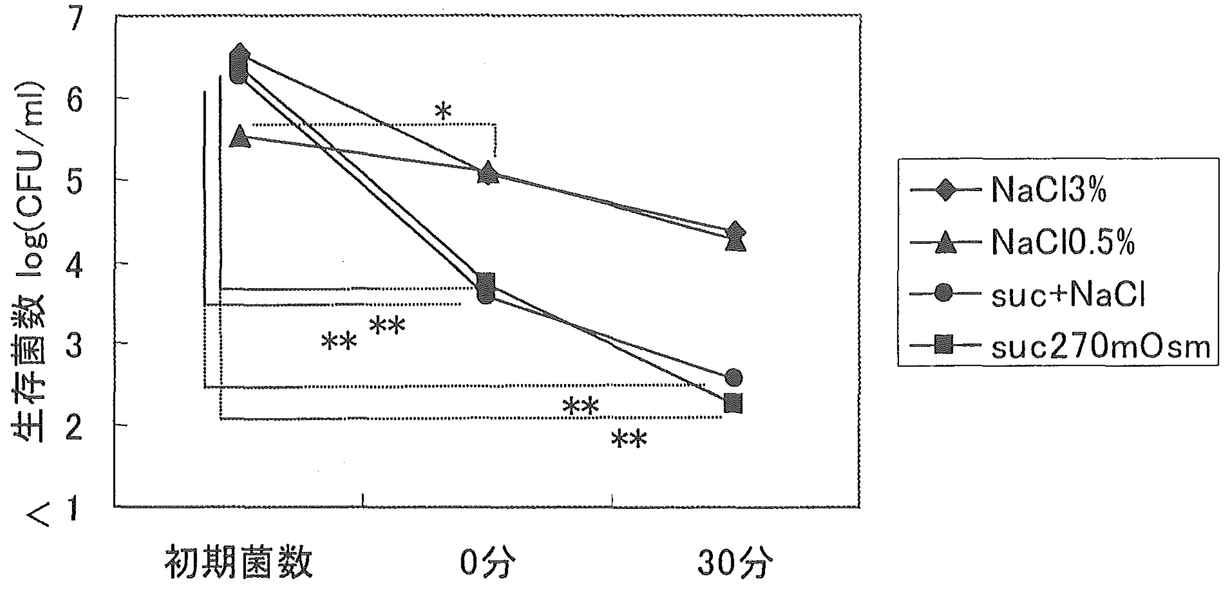


図3-8 低浸透圧・低食塩濃度による耐性獲得 Vp15 5回行った平均

(A) 0.3%NaClでの死滅 (B) ショ糖100mOsmでの死滅
初期菌数から減少した菌数について、3%NaCl に曝露した菌との間に、
有意差(**:p<0.01 ,*:p<0.05)が認められた。

(A) NaCl0.3%での死滅　Vp9,21,42の平均



(B) ショ糖100mOsmでの死滅　Vp9,21,42の平均

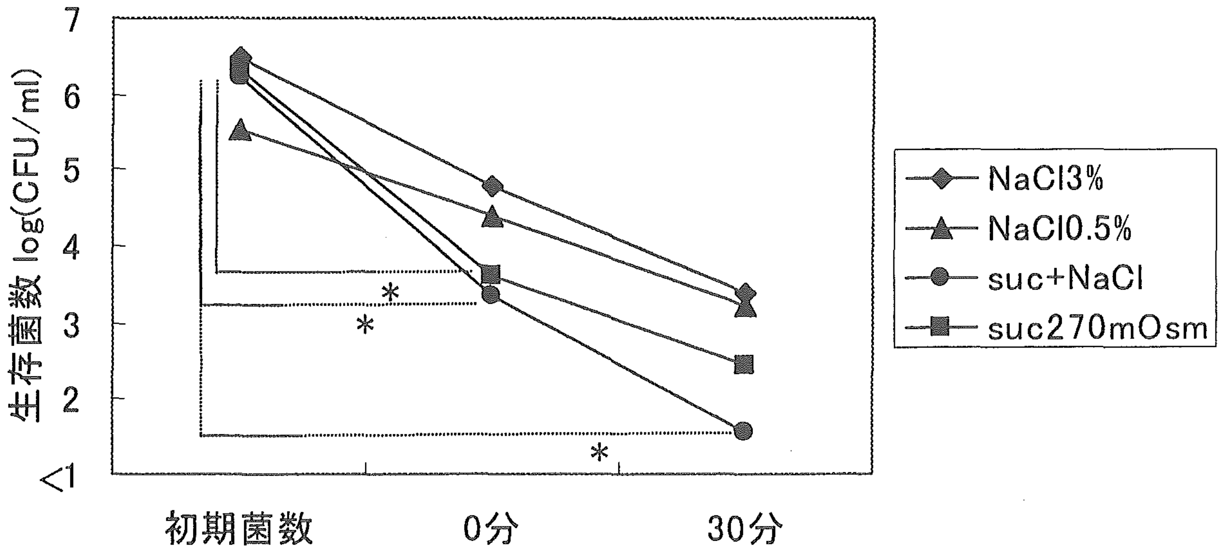


図3-9　低浸透圧・低食塩濃度と耐性獲得　Vp9,21,42の平均

(A) 0.3%NaClでの死滅　(B) ショ糖100mOsmでの死滅
初期菌数から減少した菌数について、NaCl3% に曝露した菌との間に、
有意差(**:p<0.01 ,*:p<0.05)が認められた。

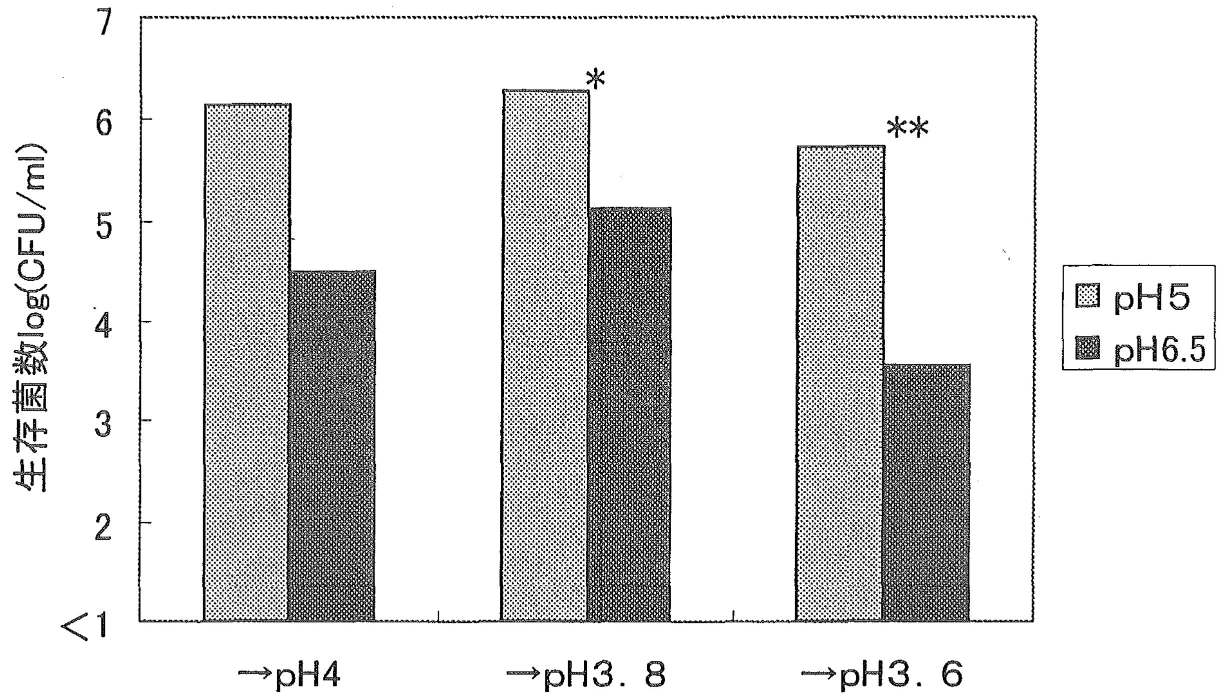


図3-10 酸に曝された60分後の生存菌数 6株の平均

pH5に曝露された菌とpH6.5に曝露された菌との生存菌数の間に、有意差(**:p<0.01 ,*:p<0.05)が認められた。

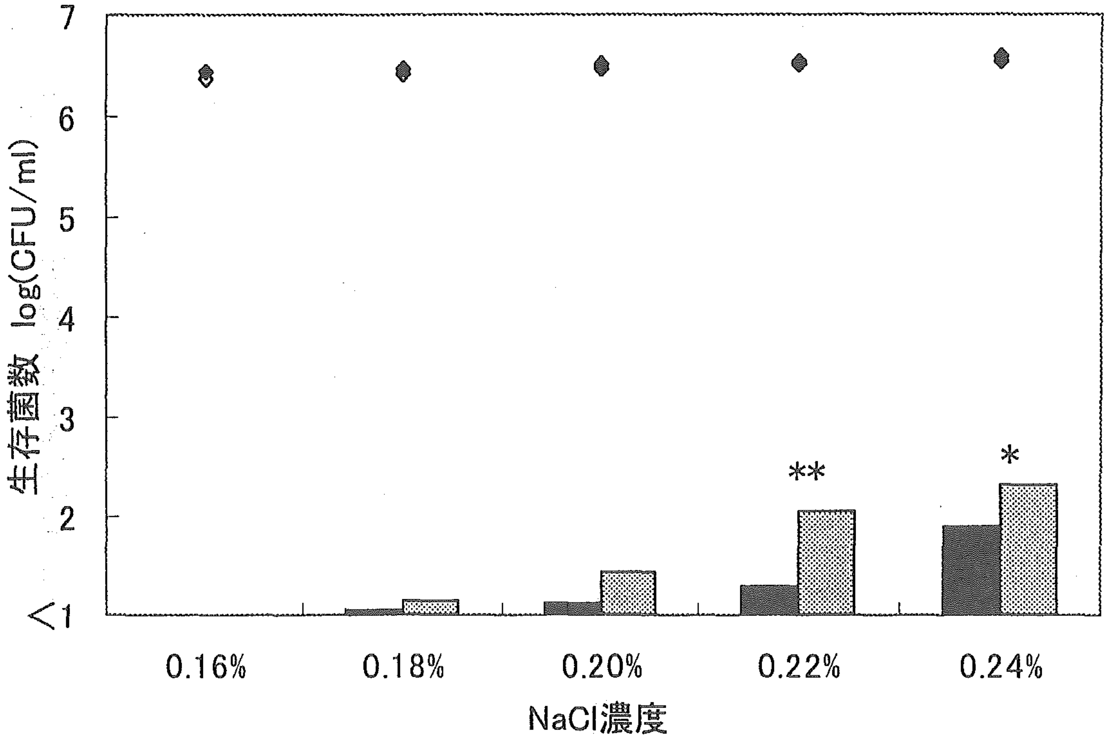


図3-11 低NaClに曝された30分後の生存菌数 5株の平均

pH5(■)またはpH6.5(▩)に曝露した菌を、各濃度の低食塩濃度水に曝し、30分後の菌数を計測した。◆:初期菌数

pH6.5に曝露した菌と比較し、pH5に曝露した菌は30分間に死滅する菌数が有意に多い(**:p<0.01 ,*:p<0.05)ことが認められた。

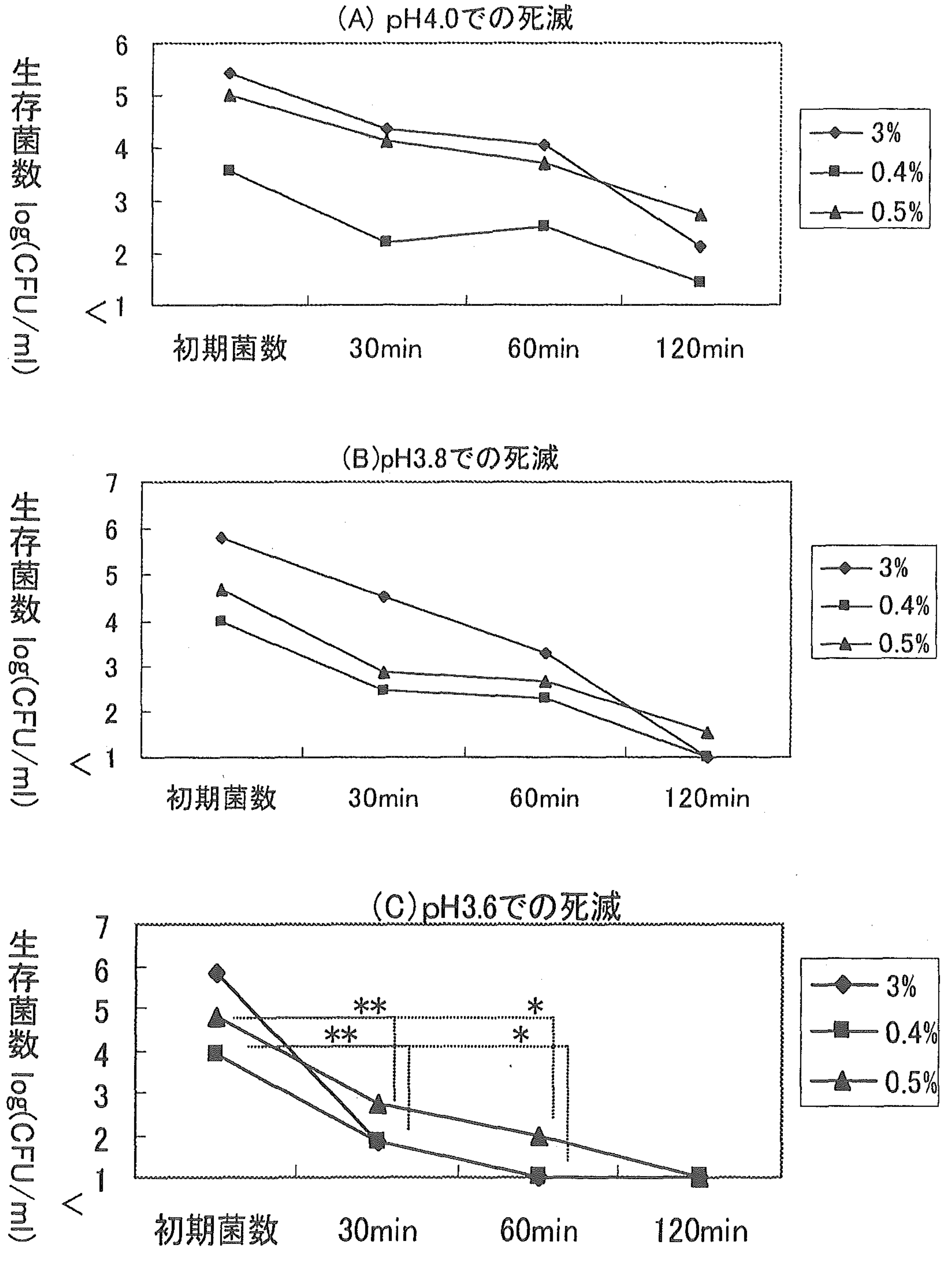


図3-12 低浸透圧による酸耐性

(A)pH4.0での死滅 V9,15,21の平均 (B)pH3.8での死滅 5株の平均
(C) pH3.6での死滅 Vp9,15,42,316の平均
初期菌数からの減少菌数について、3%NaClに曝露した菌との間に、
**:$p<0.01$,*:$p<0.05$で有意差が見られた。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Exposure Assessmentのための基礎知見としての予測微生物学的研究 －*Vibrio parahaemolyticus*の熱抵抗性

分担研究者　春日文子　（国立医薬品食品衛生研究所）
協力研究者　広田雅光、伊藤嘉典　（国立医薬品食品衛生研究所）
宇佐神美孝、藤井香予子、西島基弘　（実践女子大学）
新井麻奈未、中川　弘、伊藤　武　（（財）東京顕微鏡院）

研究要旨

微生物学的リスクアセスメント、特にExposure Assessmentにおいては、フードチェーンの一部において病原菌の汚染データが欠如する時、その前の段階のデータを基に菌数の変化を推定することが必要な場合がある。その推定作業を科学的に支援する理論体系が予測微生物学である。

腸炎ビブリオは加熱に対しても特に強い耐熱性を持たないと言われている。しかし、実際に食材と共に加熱した際の数的変化に関するデータは少ないため、不十分な加熱後の生残菌数を推定するためには、実験データの蓄積による予測モデルの構築が必要である。

本分担研究では、このような目的に資する為、魚介類に接種した腸炎ビブリオの、加熱に伴う菌数の変化について観察を行った。その結果、ポリミキシン培地のみの場合、10～15 分以降に菌は観測されなくなったが、食材との共存により、熱抵抗曲線は菌数が初め急速に減少する前半と、その後緩やかに減少する後半の二相に分かれ、48℃ 60分の加熱でも log2. 14～3. 69の菌数が残る場合があった。食材によって菌が温存されると推測でき、加熱処理後の食品を適切に保存する必要があることがわかった。

A. 研究目的

平成 12 年、加熱魚介類を原因とした *Vibrio parahaemolyticus* による大型食中毒が多発した。この原因として、加熱後の魚介類の取り扱い不備による二次汚染が推定されたが、食材の加熱自体が不十分であった可能性も否定しきれなかった。当分担研究では前年度の研究報告の中で、*Vibrio parahaemolyticus* の液体培地中での加熱致死動態について調べ、予測式を作成したが、様々な食材における加熱処理時の菌の死滅動態に関する詳細なデータも必要であ

る。そこでいくつかの食材を選び加熱によってどのように菌が変化するのかを調べ、液体培地中の動態と比較した。

B. 研究方法

保管菌株 *Vibrio parahaemolyticus*B-52株を、食塩ポリミキシン培地中で 37℃ overnight の培養を 2 回行った。食品材料を約 5g ずつ入れたストマッキング袋に、食塩ポリミキシン培地で 10 培に希釈した菌液を、各袋に 0.25ml ずつ加えた。袋を water bath(48.0℃)に沈め、この時間を 0 時とし、その後所定の時間ごとに 2 袋ずつ取り出し氷冷した。加熱中、食材の中心部に温度センサーを留置し、中心温度をモニターした。いずれの食材においても、中心温度は２～５分以内に 48.0℃に達し、測定終了までその温度を維持した。その後、各袋に食塩ポリミキシン培地を 50ml 入れ、ストマッキングした後必要に応じて希釈し、スパイラルプレターを使って、1 つのサンプルにつき 2 枚ずつ TCBS 寒天培地に塗布した。37℃ overnight 培養後、菌数を測定した。

対照として、食塩ポリミキシン培地 5 ml に菌液を加え、同様の操作を行った。また、使用した食材は *Vibrio parahaemolyticus* の汚染がなかったことを確認した。

C. 結果

各食材を 48.0℃で加熱処理した時の、菌数を 1/10 に減少させるのに必要な時間Ｄ値(単位：分)を表１に示した。ポリミキシン培地のみの場合、10 分以内に菌は測定限界以下になったが、食材が存在するとほとんどの場合、菌数は初め急速に減少した前半と、その後緩やかに減少した後半の二相に分かれて減少した。それぞれの相毎にＤ値を算出した。食材の存在によって菌の生残が延長することが示された。

図１～１０にポリミキシン培地中、あるいは各魚介類に接種した腸炎ビブリオの経過時間ごとの残存菌数を示す。また図１１～１８に、食材中心部の温度変化を示す。

D. 考察

48℃ 60 分の加熱後でも log2.14～3.69 の菌数が残る場合があった。これは、毛細管現象により食材表面に拡散した腸炎ビブリオが液体培地に十分触れず、液体を介した熱伝導を受けなかった、という物理的な影響も否定できない。しかし、同様の現象は実際に腸炎ビブリオに汚染された魚介類を加熱する際にも起こる可能性はある。いずれにしても、この実験により、魚介類の調理にあたっては、十分な高温での加熱が必要であることに加え、加熱処理後の食材において *Vibrio parahaemolyticus* が再び増殖することを防ぐための適切な温度管理も必要であることが示唆された。

E. 結論

腸炎ビブリオを 48.0℃のウォーターバス中で加熱した場合、ポリミキシン培地のみには 10～15 分以降に菌は観測されなくなったが、食材との共存により、熱抵抗曲線は菌数が初め急速に減少する前半と、その後緩やかに減少する後半の二相に分かれ、48℃ 60 分の加熱でも log2. 14～3. 69 の菌

数が残る場合があった。食材によって菌が温存されると推測でき、加熱処理後の食品を適切に保存する必要があることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

口頭発表

広田雅光、伊藤嘉典、春日文子

冷凍保存時における *Vibrio paraphaemolyticus* の致死動態

日本食品衛生学会第83回学術講演会、東京、2002年5月15－17日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

I. 参考文献

1) 春日文子:食品汚染病原体微生物のリスクアセスメント、モダンメディア、47(5)、109～117(2001)

2) Vose, D.: Risk Analysis: A Quantitative Guide. 2nd edition. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex, England

3) 藤川浩:日本防菌防黴学会誌、25、519～533(1997)

4) 藤川浩: 日本防菌防黴学会誌、26、423～437(1998)

5) 藤川浩、土戸哲明:食品工業、1998.11.30号、16～23(1998)

6) 藤川浩:月刊HACCP、67、52～58

7) 土戸哲明、高橋克忠、春日文子ほか、藤川浩、五十嵐誠一郎、堀田国元、加藤裕勝:特集、日本防菌防黴学会誌、28、634～678(2000)

8) 春日文子:微生物学的リスクアセスメントと予測微生物学、食品工業、44(14)、1～7

表１　食材によるＤ値

実験数	ポリミキシン	あさり	かに	えび	たこ
1			28.9	3.32 (0～10)	8.87 (0～30)
1 前半	2.92(0～10)	14.49(0～20)		3.32 (0～10)	8.87 (0～30)
1 後半		−54.05(20～40)		24.57(10～60)	2500.00(30～60)
2		26.04	20.58	7.27 (0～3)	4.64 (0～20)
2 前半	4.83(0～15)	10.06 (0～20)	12.59 (1～30)	7.27 (0～3)	4.64 (0～20)
2 後半		192.31(20～30)	44.64(30～60)	90.91(3～60)	−909.09(20～60)

※　()内は観察時間を表す

※　単位：min

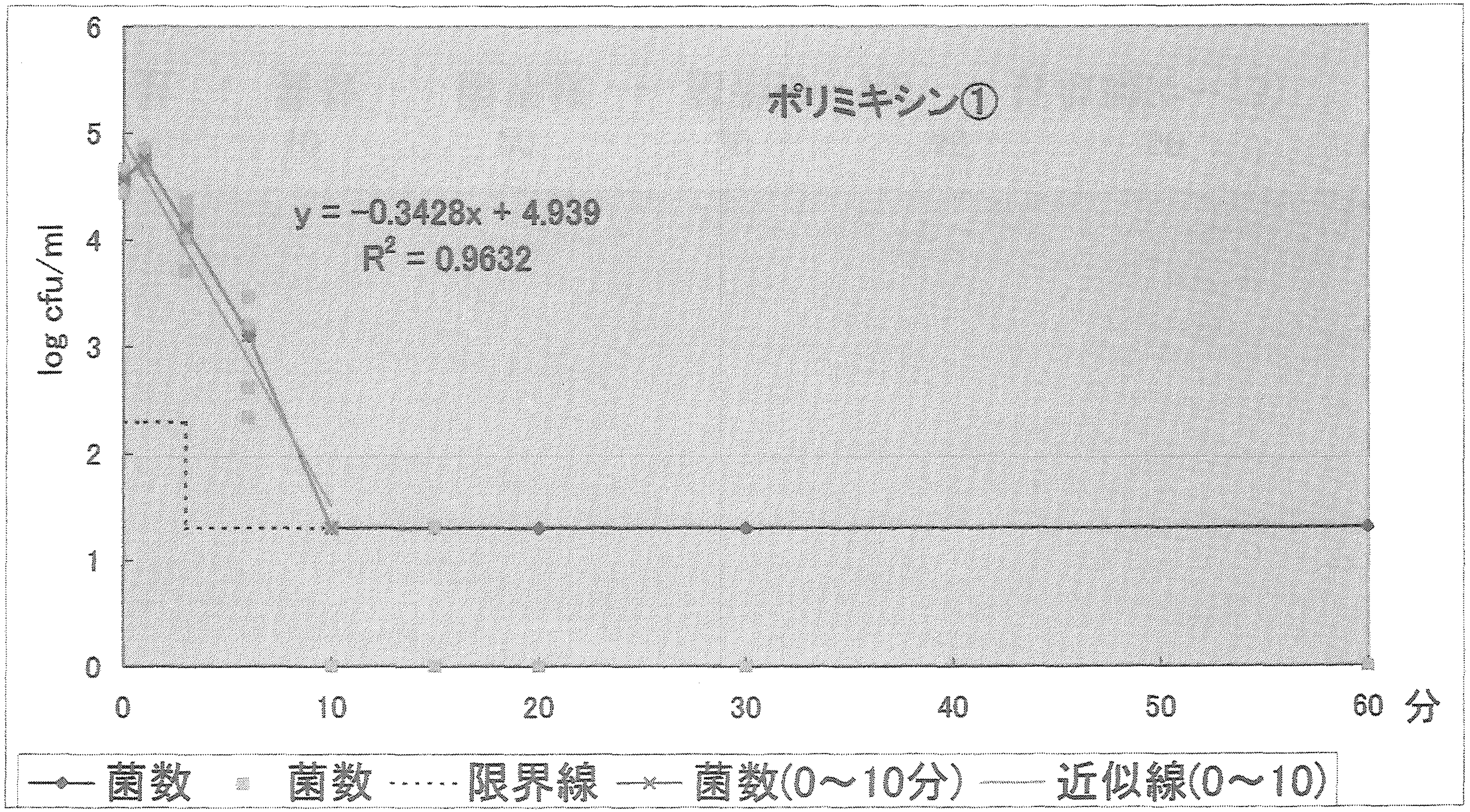


図1 *Vibrio parahaemolyticus* B-52 株 48℃

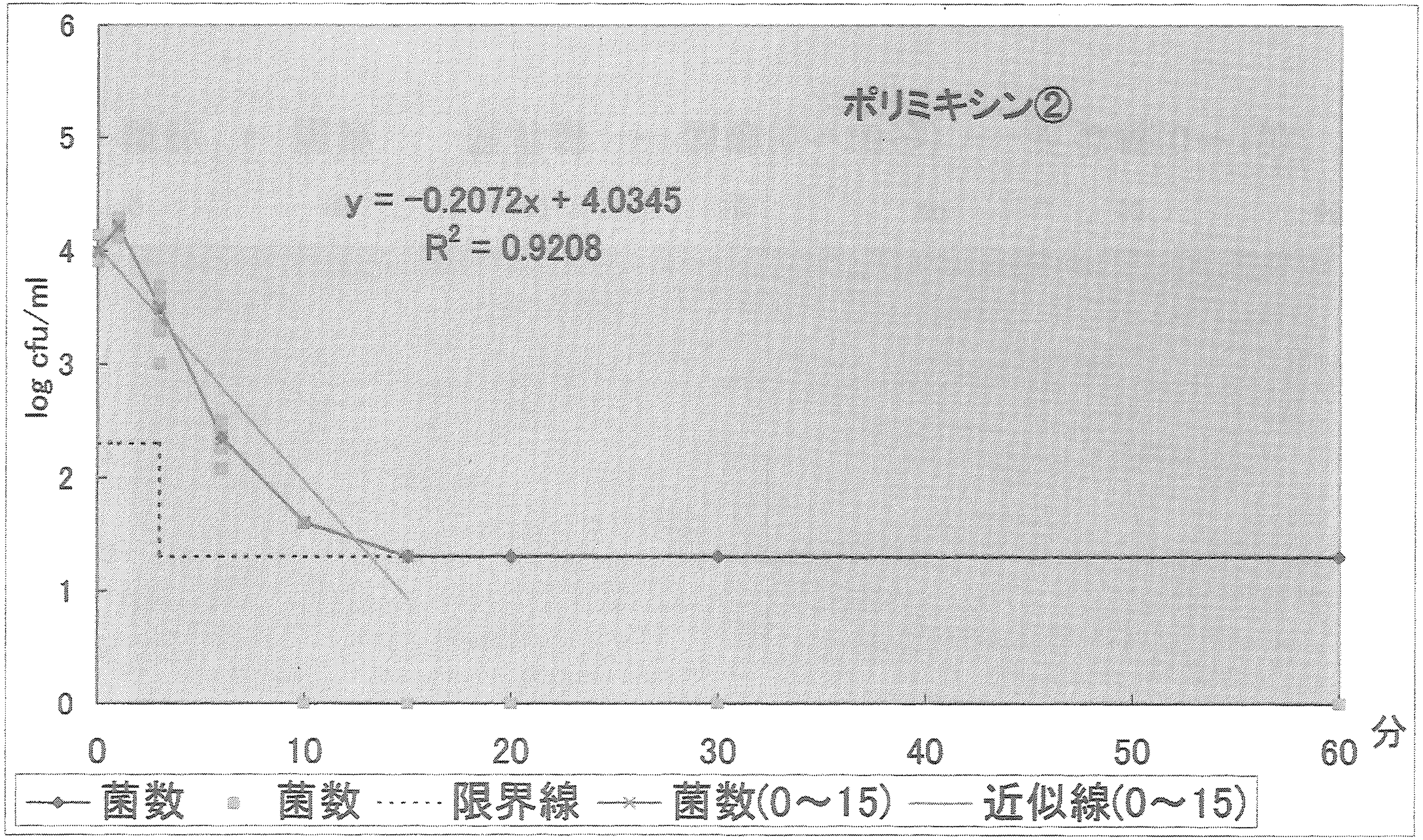


図2　*Vibrio parahaemolyticus* B-52 株 48℃

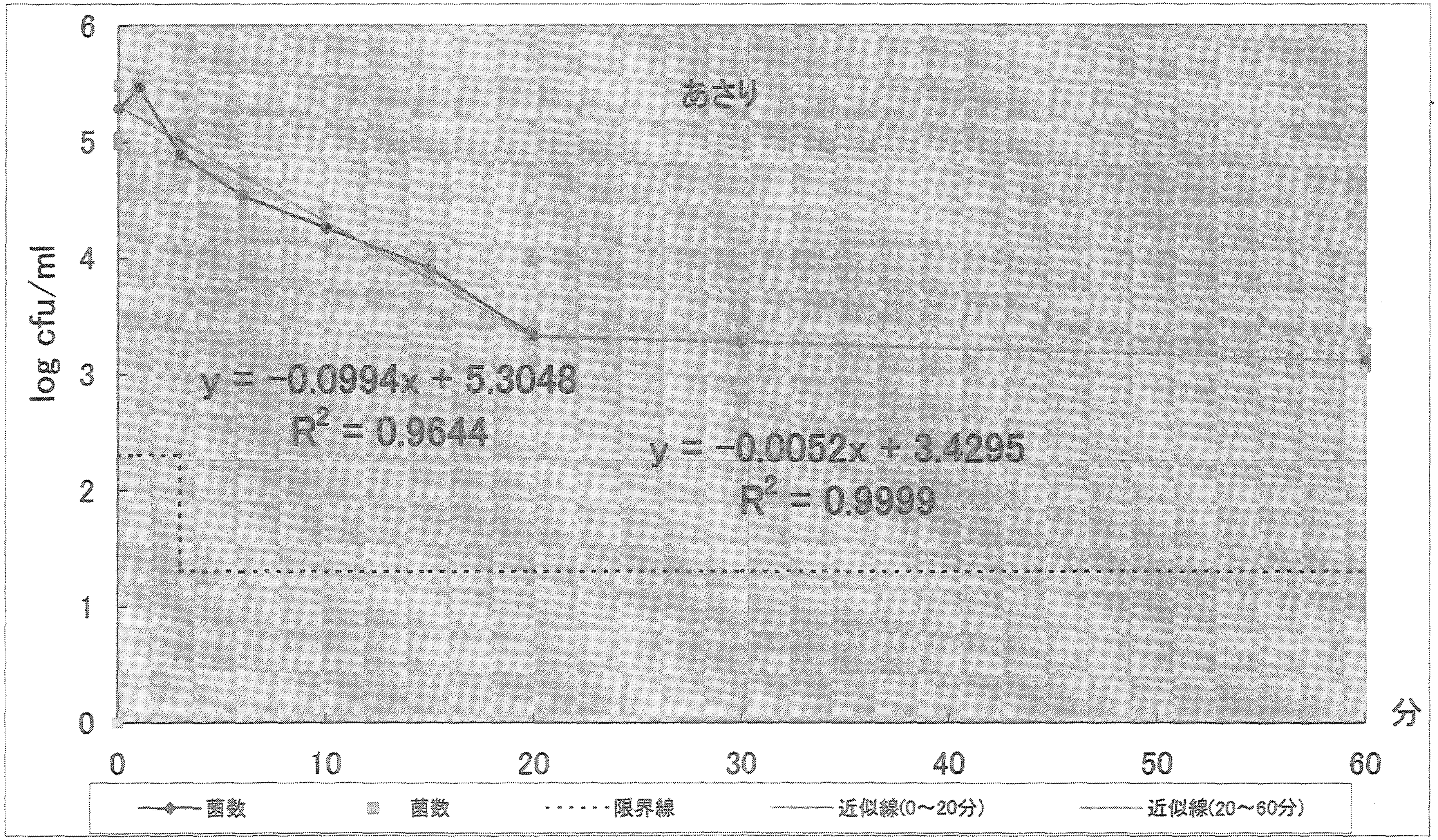


図3　菌の死滅動態(あさり)

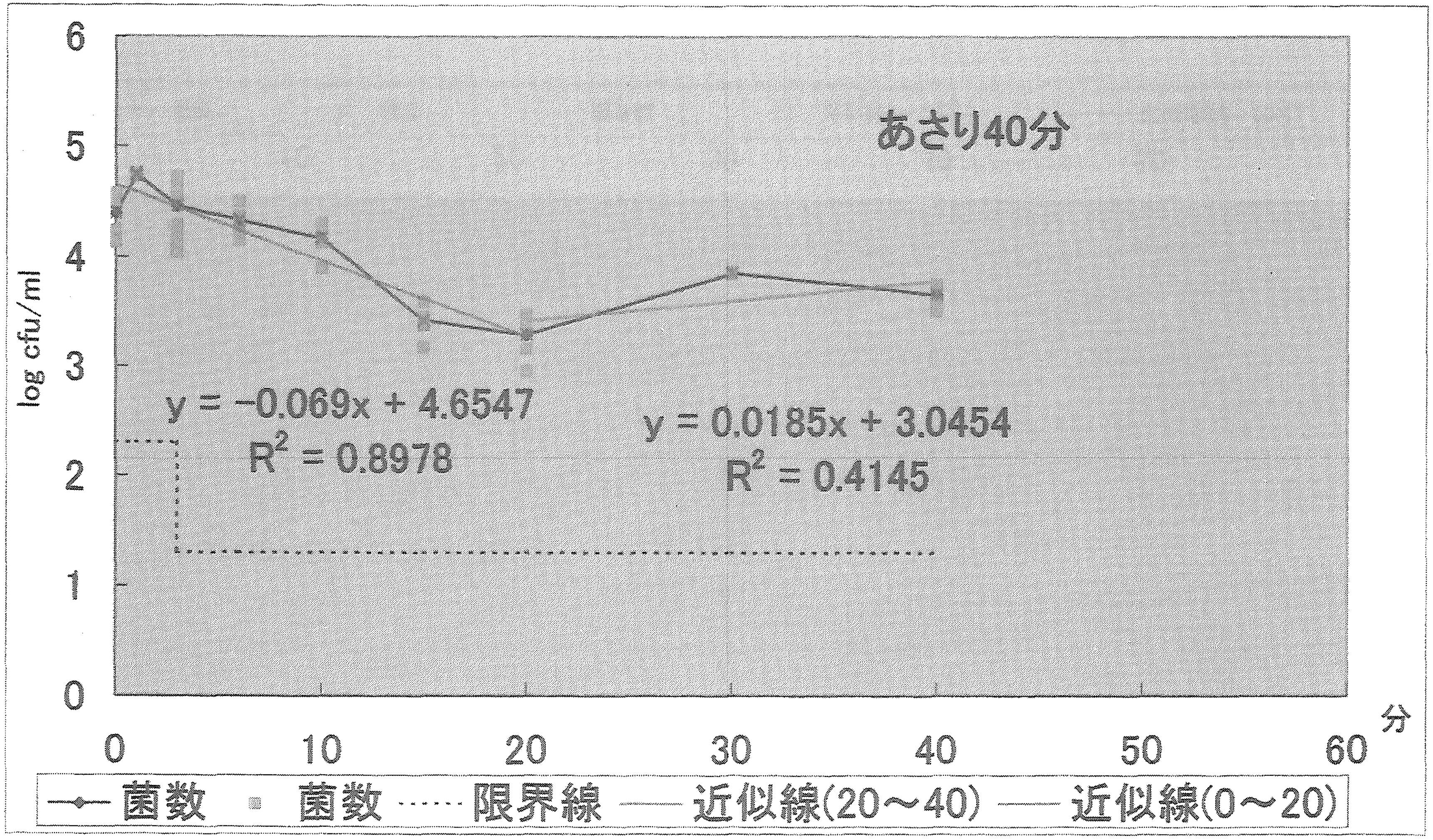


図4　菌の死滅動態(あさり)