

令和元年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
小規模事業者等における HACCP 導入支援に関する研究
分担研究報告書

芽胞形成菌の温度管理による食品中での挙動及び制御方法の検討
（手引き書作成支援に関する科学的根拠）

研究分担者 五十君 静信 東京農業大学 教授

研究要旨

食品衛生法の改正により、フードチェーンを構成する食品の製造・加工、調理、販売等を行う全ての食品等事業者を対象として、HACCP による衛生管理の手法を取り入れ、我が国の食品の安全性の更なる向上を図ることが示された。一方、現状を考慮し、小規模事業者や一定の業種等を対象とした一般衛生管理を基本として、事業者の実情を踏まえた手引書等を参考に必要に応じて重要管理点を設けて管理するなど、弾力的な取扱いを可能とするものとしている。このような弾力的運用は、既に HACCP を導入している米国や EU でも採用されており、我が国がこのような弾力的運用を採用し実行するためには我が国の食品衛生の実情に合わせた検討が必要であり、本分担研究ではその基礎となる科学的知見の収集、整理、提供等を行うことである。

依然として食中毒の患者数が多く、患者数の減少が見られない芽胞形成菌であるウェルシュ菌の制御方法として、深鍋での模擬調理食品について実験を行い、加熱調理後の温度管理によるウェルシュ菌の消長について検討し、温度管理による、本菌の制御方法について検討を行った。

研究協力者

高柳 晃司	ホシザキ北信越株式会社
山森 慶子	ホシザキ北信越株式会社
川宮 美由紀	ホシザキ北信越株式会社
曲尾 優花	ホシザキ北信越株式会社
金盛 幹昌	ホシザキ株式会社
高澤 秀行	高澤品質管理研究所
多賀 夏代	高澤品質管理研究所
戸田 政一	高澤品質管理研究所

し、空気が混ざらないように静かに攪拌して菌を分散させた（写真 1）。

ウェルシュ菌をスパイクしたクリームシチューを中試験管に 15ml ずつ小分けし、これに嫌気状態を確保するため、流動パラフィン 1 ml を加え空気を遮断し、80℃に設定した恒温槽に漬けた（写真 2. 3）。

平成 29 年度厚生労働行政推進調査事業費「小規模事業者等における HACCP 導入支援に関する研究」研究報告書に示されている深鍋調理カレーの加熱調理後の温度変化データに合わせて恒温槽の温度をコントロールしながら各経過時間（0 時間、1 時間、3 時間～10 時間、24 時間）全 12 点でのウェルシュ菌の菌数を測定し、ウェルシュ菌の菌数の消長を明らかにした。

実験使用材料・器材等

- ① クリームシチュールー、合挽肉、じゃがいも、人参（写真 4）
- ② 耐熱性が確認されたウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* H6174H6174 株
- ③ 変法 Duncan and Strong 培地（食品検査指針微生物編 2018 年 参照）
- ④ ハンドフォード培地（Mast Group Lot405525）

A. 研究目的

「公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方に基づく衛生管理のための手引書」（小規模な一般飲食店業者向け）グループ 3 「加熱後冷却し再加熱するもの、または加熱後冷却するもの：カレー、スープ、ソース、たれ、ポテトサラダ等」の追加実験としてシチュー調理におけるウェルシュ菌増殖危険温度帯の滞留時間とウェルシュ菌増殖の相関性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

一般的な調理方法で調製したクリームシチューを 80℃まで冷却し、これに 85℃、10 分で事前に耐性を確認したウェルシュ菌芽胞をスパイク

⑤ブレインハートインフュージョン培地 (OXOID Lot2359557)

⑤嫌気パウチ

⑥自動記録温度ロガー

⑦ディスポメスピペット 20ml 用他ピペット類

⑧鍋 (家庭用鍋・2L 程度)

⑨恒温槽

⑩試験管立

(1) 耐熱性芽胞菌の調製

① *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) H6174 を変法 DS 培地にて増菌培養 (35°C・48 時間) した菌株 (保存液①) を 65°C10 分でヒートショック処理を行った。

② ブレインハートインフュージョン培地 (BHI 培地) に 0.1m 塗抹、35°C・48 時間培養後の発育を観察した。

③ BHI 培地上で発育が確認された保存液①は 1/10 量を DS 培地に添加して 35°C・48 時間培養し (保存液②)、70°C10 分のヒートショック処理を行い BHI 培地にて発育を確認した。(写真 5)

④ 上記の操作を 75°C・80°C・85°C まで行い、耐熱性の強いウェルシュ菌芽胞懸濁液を作成した。

*) 各ヒートショック処理後の BHI 培地上で発育が確認されない場合は同温で再度ヒートショック処理を行い、BHI 培地上で発育が確認できるまで培養を繰り返した。

(2) ウェルシュ菌芽胞懸濁液をスパイクしたクリームシチューの調製

①家庭用鍋に具材 (野菜類は市販レトルト品) とクリームシチューのルー (雪印社製北海道シチュークリーム) を入れ完全に溶けるまで煮込み、クリームシチューを調理した。

②上記のクリームシチューを室温放置して 80°C になった時点でウェルシュ菌 3 乗~4 乗個/g になるように添加し、空気が入らない様にゆっくりと攪拌して菌を均一に分散させた。

(3) 菌検査実験

①上記クリームシチューを 80°C に保ちながら中試験管に約 15ml 分注し、各試験官に流動パラフィン 1ml 重層した。(写真 2) また、温度確認用としてウェルシュ菌芽胞懸濁液無添加のクリームシチュー試験管 3 本も作成した。すべての試験管を恒温槽に漬けて 80°C から室温までの温度変化を調整*1) する。

②平成 29 年度の温度変化表 (寸胴鍋中カレーの中心温度変化: グラフ 1) に合わせ、恒温槽の温度を 30 分単位でコントロールして 0 時

間・1 時間~10 時間・24 時間 (0 時間~10 時間までは 1 時間毎) に試験管を各 3 本抜き取り時間帯により増殖予測に対応して階段希釈した検体*2) をハンドフォード培地パウチ培養法で培養した。

*1) 温度確認用のシチュー試験管中心部にロガーをセットして恒温槽のヒーターで温度をコントロールした。(写真 6)

*2) 各時間帯により増殖予測に対応した階段希釈は以下の通り

・80°C~66°C (0 時間~2 時間まで) は 1、2、3 乗倍希釈で培養

・60°C~41°C (3 時間~8 時間まで) は 3、5、7 乗倍希釈で培養

・40°C~19°C (9 時間~24 時間まで) は 7、9、10 乗倍希釈で培養

C. 研究結果

表 1 に経過時間、温度、培養後の菌数をまとめた。

今回の実験によりウェルシュ菌は 0 時間 (79.8°C) から 6 時間 (46.4°C) まではスパイク直後の菌数 (3 乗~4 乗個/g) のバラツキの範囲内で安定していることが観察された。

しかしながら 7 時間から 8 時間の一時間で 7 乗~8 乗個/g へ一気に増殖し、食中毒発生菌数に達することが確認された。(写真 7~16)。

9 時間~24 時間では 10 乗~11 乗個/g レベルまで達し、24 時間ではシチュー内にガスの産生が確認された。(写真 17・18・19)

本結果はグラフ 1 と写真 17~19 に示した。

D. 考察

①本実験結果より、危険温度帯は加熱調理後 6 時間~7 時間後 46°C 前後の温度帯で爆発的に増殖することが確認された。

この急激な増殖のメカニズムとして加熱後 6 時間~7 時間までは芽胞の状態で存在し、7 時間後、46°C 前後の温度帯で発芽したと同時に一斉に増殖したことが示唆された。

表 1 の 6 時間目の数値 8.7×10^3 個/g と 7 時間目の低い数値 1.2×10^5 個/g から世代時間を計算すると約 15 分となる。

また、表 1 の 5 時間目の高い数値 1.7×10^4 個/g と 8 時間目の低い数値 7.2×10^7 個/g から世代時間を計算すると約 15 分となり、非常に早く増殖することが想定された。

このような急速な増殖は、増殖開始から 1 時

間以内で食中毒を発生させるレベルの菌数となることから、初発菌数は少量であっても温度と時間の関係により食中毒発生レベルの菌数まで達する可能性があることが推察される。

② 9時間～24時間までの菌数が10乗～11乗個/gであったが、この菌数は通常あり得ない菌数であることからシチュー粘性が高いため攪拌不足による菌分散の偏りの可能性が推察された。本件については次年度テーマとして再現性試験にて検証することとした。

③ 公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCPの考え方に基づく衛生管理のための手引書」(小規模な一般飲食店業者向け「カレー、スープ、ソース、たれ、ポテトサラダ等」)に記載されている「危険温度帯10℃～60℃」については、本検証実験で45℃前後にて増殖スイッチが入り、増殖開始から1時間以内で食中毒発生レベルの菌数まで分裂することが確認されたことから、記載されている温度管理の妥当性について、再度の検証実験によりより詳細な温度管理方法を再考する必要があることが示唆されたと思われる。

次年度以降の継続テーマとして以下を検討する必要があると思われる。

① 本実験の再現性検証

菌株2種類以上、n=5で実施、

② 耐熱性芽胞菌のヒートショック後の発芽、増殖型になる時間の確認

DNA量での検証実験

③ 適切な冷却時間の検証

食中毒発症菌数に増殖させないための温度と時間をコントロールする方法の検討とその情報提供(室温放置冷却、水冷却、冷蔵庫冷却による温度変化と時間の関係)

E. 結論

依然として国内の食中毒患者数の多いウェルシュ菌について、模擬食材に芽胞を添加し、温度管理による菌数の消長を確認したところ、45℃前後までの温度帯では明らかな菌数変化は観察されなかったが、45℃前後から急速に菌数が増え、約1時間程度で食中毒発症菌数に到達してしまうことが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - ① 五十君静信。HACCPなどの食品の工程管理における微生物検査の考え方。日本食品微生物学会学術セミナー。2019.12.20。大阪府大
 - ② 五十君静信。食品のリスクマネジメントにおける国際整合性の重要性と微生物検査の考え方。2019.12.10。MALDI-MS食品微生物研究会シンポジウム。新宿区角管区民ホール
3. 講演会等での情報発信
 - ① 五十君静信。食品衛生法改正に伴うHACCP制度化の動きとその対応。2019.5.23、高齢者住宅新聞社食品衛生法改正対策セミナー。大阪ガス ハグミュージアム
 - ② 五十君静信。HACCP制度化の概要。2019.6.26、日本生活協同組合連合会・店舗HACCP学習会、日本生協連検査センター
 - ③ 五十君静信。食品衛生法改正に伴うリスクマネジメントにおける課題。2019.6.27、2019年度コープデリ品質保証研修会、埼玉会館
 - ④ 五十君静信。食品衛生法改正における国際整合性の重要性。2019.6.29、茨城大学農学部フードイノベーション棟竣工記念講演会、茨城大学農学部
 - ⑤ 五十君静信。HACCP制度化における微生物試験法の選択の考え方。2019.7.3、AFIテクノロジー食の安全安心技術情報セミナー、大阪ホテル阪急インターナショナル
 - ⑥ 五十君静信。食品衛生法改正に伴うHACCP制度化の動きとその対応。2019.7.6、第14回雪の市民会議 in 東京農業大学、東京農大横井講堂
 - ⑦ 五十君静信。食品のリスクマネジメントにおける課題～消費者意識との乖離やサステナビリティ～について。2019.10.27、NPO食の安全と安心を科学する会、食のリスクコミュニケーション・フォーラム2019、東京大学農学部フードサイエンス棟
 - ⑧ 五十君静信。HACCP制度化における微生物試験法の選択の考え方。2019.8.2、AFIテクノロジー食の安全安心技術情報セミナー、フクラシア品川

- ⑨ 五十君静信。食品衛生管理の国際標準化はなぜ必要か。2019. 9. 17、感染予防協会セミナー、グランフロント大阪
- ⑩ 五十君静信。微生物試験法における妥当性確認と試験法を選択する上での考え方。2019. 10. 4、スリーエムジャパンセミナー大阪、トラストシティカンファレンス新大阪
- ⑪ 五十君静信。微生物試験法における妥当性確認と試験法を選択する上での考え方。2019. 10. 11、スリーエムジャパンセミナー東京、フクラシア丸の内オアゾ
- ⑫ 微生物試験法における妥当性確認と試験法を選択する上での考え方。2019. 11. 25、スリーエムジャパンセミナー名古屋、名古屋ゲートタワー
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他

図1. 予備試験温度変化グラフ

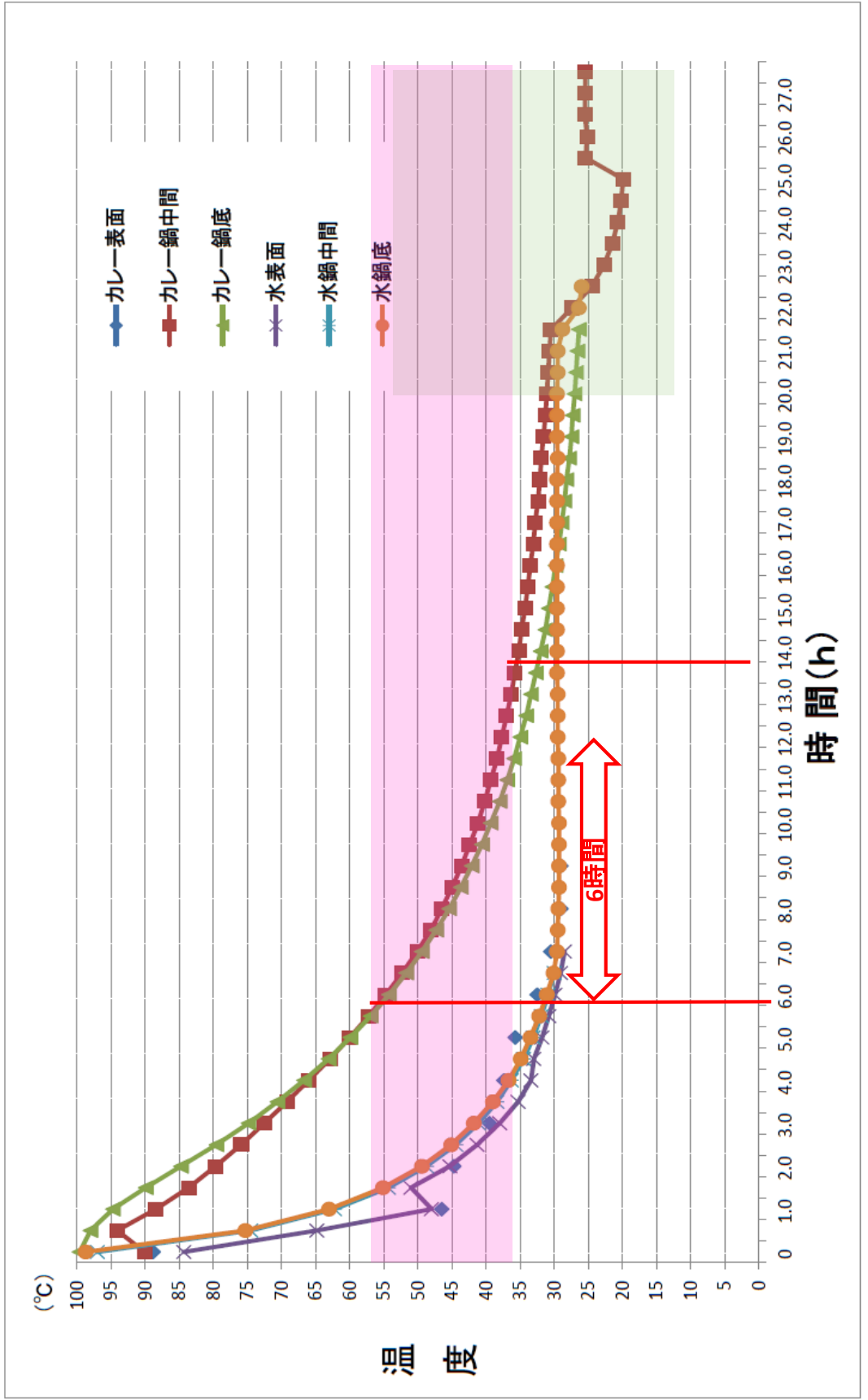




写真1 スパイク開始温度 80℃



写真 2
85℃耐熱性を確認したウェルシュ菌
をスパイクしたクリームシチュー15ml
に流動パラフィンを1ml重層



写真 3 恒温槽での加温



写真 4 シチュー調理の具材

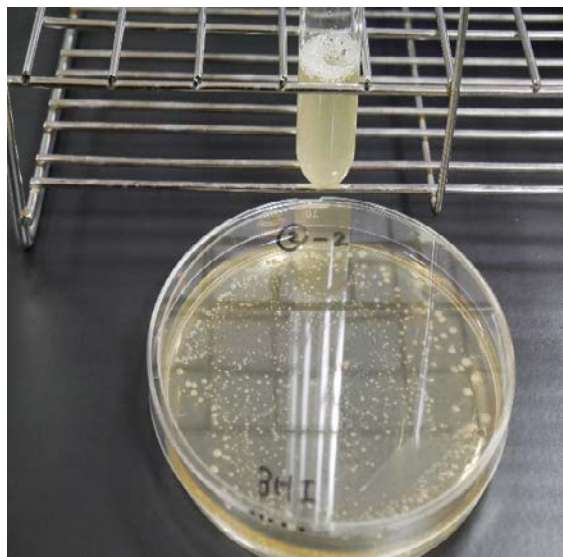


写真 5 85°C耐熱ウエルシュ菌と懸濁液 写真 6 恒温槽での試験管芯温測定場所



写真 7 0時間

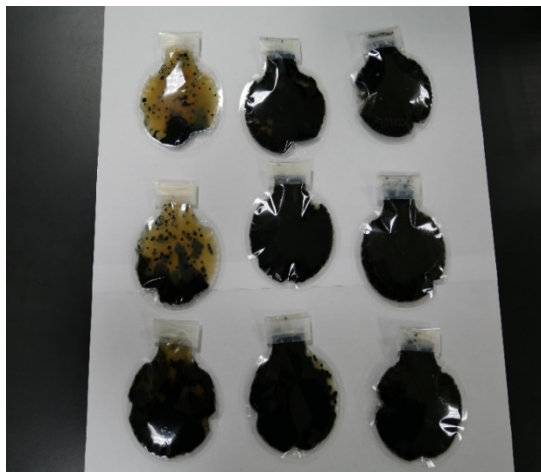


写真 8 1時間

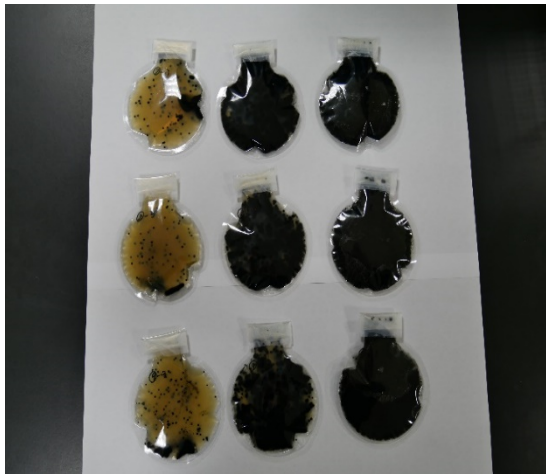


写真 9 2時間

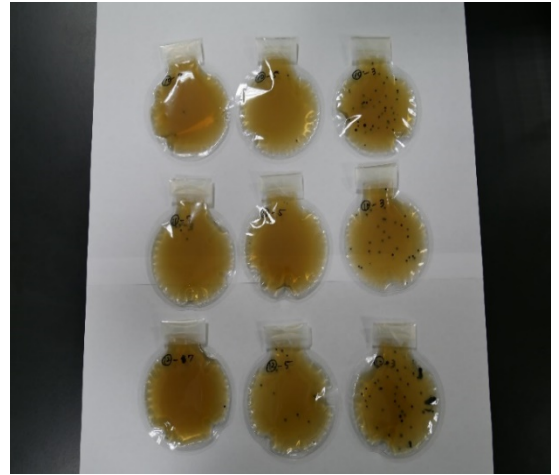


写真 10 3時間

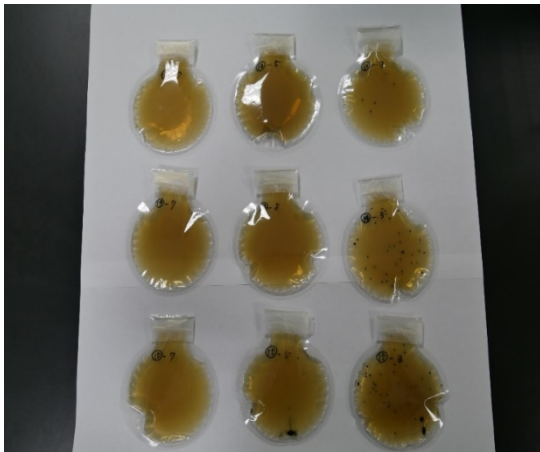


写真 11 4時間

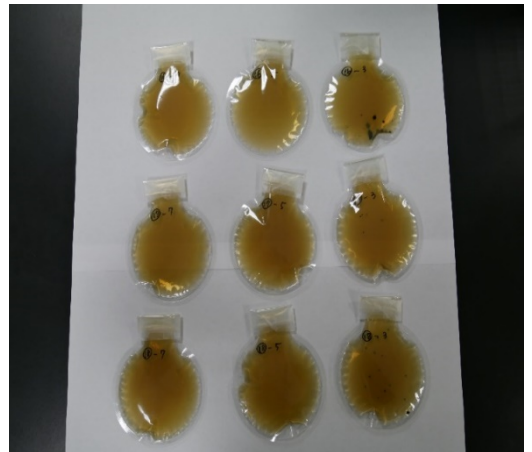


写真 12 5時間

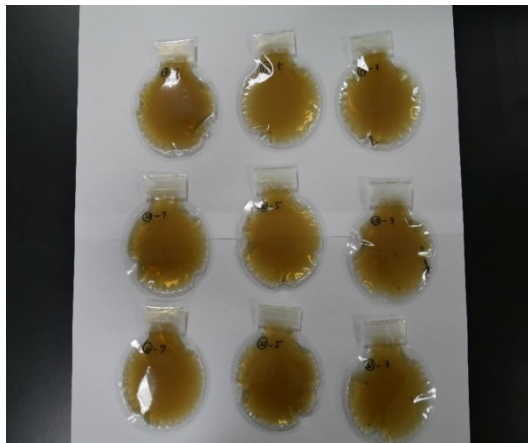


写真 13 6時間



写真 14 7時間



写真 15 8時間

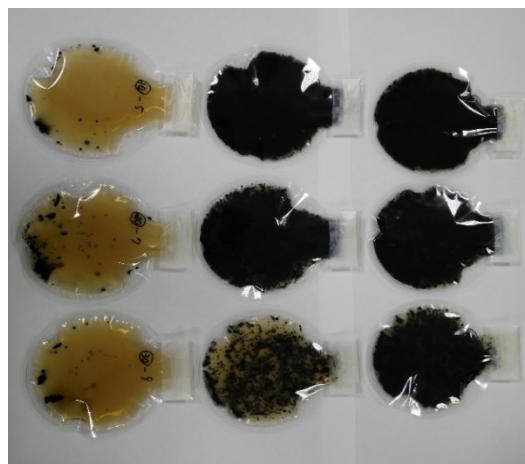


写真 16 9時間

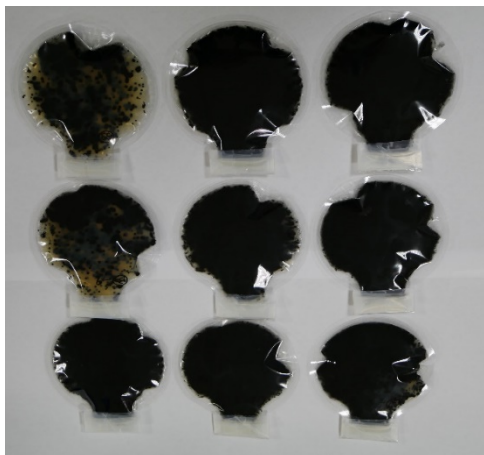


写真 17 10時間

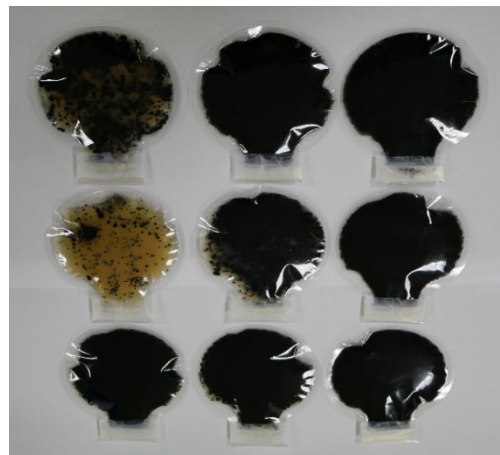


写真 18 24時間

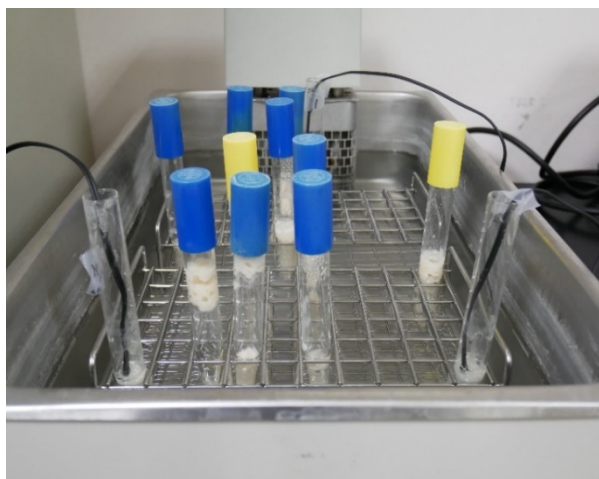


写真19 24時間後のシチュー

表1. 経過時間・温度・培養後の菌数

時間(分)	目標温度(°C)	実測温度(°C)	×1乗	×2乗	×3乗	菌数(cfu/g)
0	80	79.8	∞	∞	80	8.0×10^3
			∞	∞	69	6.9×10^3
			∞	∞	106	1.1×10^4
0.5	75.9	75.8	NT	NT	NT	NT
1	72.5	72.7	∞	∞	58	5.8×10^3
			∞	∞	87	8.7×10^3
			∞	∞	139	1.4×10^4
1.5	69.2	69.4	NT	NT	NT	NT
2	66	66.2	∞	∞	69	6.9×10^3
			∞	∞	67	6.7×10^3
			∞	∞	105	1.1×10^4
2.5	62.9	63.1	NT	NT	NT	NT
時間(分)	目標温度(°C)	実測温度(°C)	×3乗	×5乗	×7乗	菌数(cfu/g)
3	60	60	57	ND	ND	5.7×10^3
			40	ND	ND	4.0×10^3
			∞	16	ND	1.6×10^5
3.5	57.3	57.2	NT	NT	NT	NT
4	54.7	54.7	ND	ND	ND	ND
			42	ND	ND	4.2×10^3
			∞	7	ND	7.0×10^4
4.5			NT	NT	NT	NT
5	50.1	50.1	172	ND	ND	1.7×10^4
			8	2	ND	ND
			26	0	ND	2.6×10^3
5.5	48.1	48.1	NT	NT	NT	NT
6	46.5	46.4	ND	ND	ND	ND
			87	ND	ND	8.7×10^3
			3	ND	ND	ND
6.5	45	145	NT	NT	NT	NT
7	43.6	43.6	∞	∞	32	3.2×10^7
			∞	12	5	1.2×10^5
			∞	∞	16	1.6×10^7
7.5	42.4	42.4	NT	NT	NT	NT
8	41	41.2	∞	∞	72	7.2×10^7
			∞	∞	320	3.2×10^8
			∞	∞	256	2.7×10^8
時間(分)	目標温度(°C)	実測温度(°C)	×7乗	×9乗	×11乗	菌数(cfu/g)
8.5	40.1	40.2	NT	NT	NT	NT
9	39.3	39.3	∞	562	ND	5.6×10^{10}
			∞	329	ND	3.3×10^{10}
			∞	20	ND	2.0×10^9
9.5	38.4	38.4	NT	NT	NT	NT
10	37.7	37.7	∞	781	ND	7.8×10^{10}
			∞	335	ND	3.4×10^{10}
			∞	421	ND	4.2×10^{10}
24	25	19.1	∞	∞	270	2.7×10^{11}
			∞	324	ND	3.2×10^{10}
			∞	188	ND	1.9×10^{10}

*NT:Not tested, ND:Not detected 1 CFU/g>, ∞ : 1000 CFU<

