

令和6年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「国際的な基準に基づく HACCP システムの導入に関する研究」

分担研究報告書

危害リストおよび HACCP プラン作成支援ツールの構築

-微生物死滅予測ツールの活用方法およびその妥当性の検討-

研究分担者	山崎栄樹	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者	佐々木きなり	鎌倉女子大学 家政学部
	森田百華	鎌倉女子大学 家政学部
	山本詩織	鎌倉女子大学 家政学部
	上間匡	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

**研究要旨：**微生物の増殖／死滅に関する予測ツールは食品製造の衛生管理手法等の妥当性を検証する上で有用なツールになると考えられるが、その活用は進んでいない。本研究では病原微生物の死滅予測ツールの活用方法の例示を目的として、Cook My Meat と Process Lethality Spreadsheet という2種類の予測ツールを用いた食肉の加熱調理中の病原微生物の死滅予測の方法について考察するとともに、その推定結果の妥当性について検討を行った。2種類のツールを用いた推定においては、加熱調理条件の軽微な変更により食肉中の微生物の減少度に大きな変化が生じると推定され、わずかな調理条件の変更であっても製品の安全性に及ぼす影響が大きいことが示唆された。さらに、サルモネラ属菌と鶏肉を用いた様々な低温調理条件下での添加回収試験の結果と予測ツールを用いた各条件下での菌数減少度の推定値を比較したところ、両者の間に良好な相関が確認され、予測ツールの利用により実験を伴うことなく加熱処理条件の変化に伴う菌数死滅の変化を十分な妥当性をもって推定可能であることが示唆された。本結果は、食品製造事業者が自らの製造基準の妥当性について考察する場合や食品衛生監視員が監視指導を行う上で指導内容の科学的根拠を考察する際に、今回用いた予測ツールが有効な補助的ツールとして使用可能であることを示すものであると考える。

#### A. 研究目的

微生物の増殖／死滅に関するデータベースや予測ツール等が公開されており、食品衛生業界においても有用なツールとして期待を集めている。すなわち、これらのツールは実験を伴わない形で微生物の増殖／死滅を推定することを可能とするため、事業

者等が許容限界（Critical Limit: CL）設定を行う場合や、食品衛生監視員が監視指導内容の科学的根拠を考察する際の足掛かりとして有用なツールの一つになるものと期待される。しかしながら、事業者のみならず事業者に対して監視指導を行う食品衛生監視員においても、それらの予測ツール

は殆ど活用されていないのが現状である。食品衛生監視員に対する聞き取り調査から予測ツールの活用が進んでいない原因として、予測ツールの存在自体は認知されているもののその具体的な活用方法が分からないためであるとの意見が寄せられた。本研究では病原微生物の死滅予測ツールについてその活用方法の例示を目的として、webで無料公開されている食肉の加熱調理時の内部温度拡散予測ツールであるCook My Meat<sup>1)</sup>と温度変化のある加熱処理を行なった際にどの程度の菌数減少が見込めるかを推定するためのエクセルシートであるProcess Lethality Spreadsheet<sup>2,3)</sup>を用いた食肉の加熱調理中の病原微生物の死滅予測を行なった。さらに、鶏肉とサルモネラ属菌を用いた添加回収試験により推定結果の妥当性について検証を行なった。

## B. 研究方法

### 1. Cook My Meatを用いた低温調理条件における肉塊内部の温度変化推定

Cook My MeatのWeb site<sup>1)</sup>にて肉塊の肉厚、調理開始前の中心温度、低温調理温度 (Side1, 2共に低温調理器の湯温を華氏で入力) と時間、および低温調理後の氷冷温度 (Side1, 2共に32 °Fを入力) と時間を入力し、肉塊中心部の温度変化の推定を行なった。Meat TypeとしてはTurkeyを選択した。推定実施後に、Cook My Meatの推定結果の各カラムの中心部の温度を推定中心温度として記録した (図1)。

### 2. Process Lethality Spreadsheetを用いた低温調理条件における肉塊内部の菌数減少度の推定

Cook My Meatにより得られた推定中心温度をProcess Lethality Spreadsheet<sup>2,3)</sup>のData TableのTimeおよびCore Temp欄に入力し、各処理時間におけるLog Reduction of Processの推定を行なった (図2)。T<sub>ref</sub>は調理時の設定温度 (湯温) とし、z値とD値はMicrobiological Risk Assessments Series<sup>4)</sup>にてサルモネラ属菌について示された下記の値を用いた。

$$z_{\text{value}} = 7.19 \text{ }^{\circ}\text{C} (= 12.94 \text{ }^{\circ}\text{F})$$

$$D_{\text{value}} = 10^{(-0.139 \times \text{設定温度} (^{\circ}\text{C})) + 8.580}$$

### 3. 低温調理条件による添加回収試験

*Salmonella* Typhimurium LT2株をLB (Luria-Bertani) 培地に接種したのち、37 °Cで18~24時間静置培養した。一方で、鶏肉 (冷蔵) を縦7 cm×横7 cm×厚さ2 cmもしくは3 cmにカットし、その中心部に上記で得られた培養液 (0.8 mL, 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> cfu程度) を注射器を用いて注入した後、プラスチック製食料保存袋に封入して低温調理用試料とした。低温調理はBONIQ 2.0 (株式会社AXES) および専用調理水槽 (10 L用) を用いて行なった。設定温度に達温した調理水槽に低温調理用試料を投入 (1調理水槽あたり1個の試料を投入) し設定時間の加温調理を行なった後に、調理水槽から試料を取り出し直ちに氷冷を行なった。氷冷後の試料はホモジナイズ後に25 gを分取し225 mLのリン酸緩衝生理食塩水に懸濁して試料原液とした。試料原液より10倍段階希釈系列を作成後、各段階希釈液の0.1 mLをクロモアガー™サルモネラに塗抹し37 °Cで18±2時間の培養後、形成された定形集落を計測することで生残したサルモネラ属菌数を算出した。

## C. 結果

### 1. 予測ツールを用いた微生物の菌数減少度推定

Webで無料公開されているCook My Meat<sup>1)</sup>はマサチューセッツ工科大学の学生が作製したステーキ調理中の肉塊内部の温度変化を推定するシミュレーションツールであり、食肉の種類、厚さ、加熱前の肉塊温度、加熱温度、加熱時間を入力すると調理時間に応じて肉塊の内部で熱がどのように拡散するかを推定するツールとなっている(図1)。同ツールは食品衛生監視員間で監視指導の際の根拠を考察するためのツールとして注目されており、金木らは鶏肉の低温調理条件における肉塊内部温度変化についてCook My Meatによる推定結果と測定により得られた実測値の間に高い相関があることを明らかにして同ツールの有用性を示している<sup>5)</sup>。一方で、Process Lethality Spreadsheet<sup>2,3)</sup>はNorth American Meat Instituteが提供する温度変化のある加熱処理を行なった際の菌数減少度を推定するエクセルシートである。同ツールでは加熱温度(最終到達温度)および最終到達温度に達するまでの温度の経時変化と、ターゲットとなる菌のz値および最終到達温度におけるD値を入力することで、加熱過程における菌数の対数減少度(Log Reduction of Process: LRP)を推定することが可能となっている(図2)。本研究ではこれら2種類の予測ツールを組み合わせることで、加熱調理条件ごとの菌数減少度について推定を行なった。すなわち、Cook My Meatを用いて特定の調理条件における中心温度の経時変化を推定し、推定された温度変化を

Process Lethality Spreadsheetに入力することで、同調理条件下での菌数減少度を推定した。

肉厚2 cm, 3 cmおよび4 cmの鶏肉を肉塊温度5 °C (41 °F) の状態で60 °Cの湯浴に投入し85分間低温調理した場合の中心部の温度変化をCook My Meatを用いて推定したところ、図3, Aの様な結果が得られた。さらに、同鶏肉塊がサルモネラ属菌に汚染されている場合を仮定して、Process Lethality Spreadsheetを用いて各調理時間における鶏肉中のサルモネラ属菌のLRPを推定すると図3, Bの通りとなった。この結果は、例えば初期菌数を $10^8$  cfuとした場合の菌数減少が図3, Cの様になることを意味している。

### 2. 菌数減少度推定結果の妥当性の検証

Cook My MeatとProcess Lethality Spreadsheetを用いた菌数減少度推定結果の妥当性の検証を目的として、鶏肉に対してサルモネラ属菌を用いた添加回収試験を実施した。すなわち、肉厚2 cmもしくは3 cmの鶏胸肉の中心部にサルモネラ属菌液を接種し、55~65 °Cの様々な温度および時間の組合せで湯浴を用いた低温調理とそれに引き続く氷冷を行なった後に生残した菌数を計測し、測定結果について調理前の菌数と比較することで各調理条件のLRPの実測値(LRP<sub>実測値</sub>)を算出した。一方で、各調理における肉厚、肉塊初期温度、調理温度および時間、氷冷温度(0 °C)および時間をCook My Meatに入力し、調理開始から氷冷終了までの中心部の温度変化を推定した後に、Process Lethality Spreadsheetを用いて各調理条件におけるLRPの推定値(LRP<sub>推定値</sub>)を算出した。その結果、LRPの

実測値と推定値の相関は図4に示す通りとなった。各調理条件におけるLRPの実測値と推定値の差 ( $LRP_{\text{実測値}} - LRP_{\text{推定値}}$ ) についてヒストグラムを作成したところ図5の通りとなった。さらに、図5の分布に対して Shapiro-Wilk normality testを実施したところ  $p$  値 = 0.5888 となり、正規分布に従うと判定された。そこで、 $LRP_{\text{実測値}} - LRP_{\text{推定値}}$  の平均値および標準偏差 (S. D.) を算出したところ以下のように見積られた。

$$\text{平均値} \pm 2S. D. = -0.213 \pm 2.092$$

#### D. 考察

食肉を原材料とする食品製造を行う事業者（飲食店を含む）に対する監視指導では、加熱食肉製品の製造基準に従い中心部を 63 °C で 30 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法による殺菌を求めることとなる。適切な CCP 管理を行うためには製造品目ごとに製造基準もしくは CL を設定する必要があるが、多様な製品を製造する施設においては製品ごとの製造基準もしくは CL の妥当性の確認に多くの労力が必要となってくる。また、食品衛生監視員が指導を行う際には何らかの根拠が必要となるが、個々の製品に対する指導根拠の科学的妥当性の検証には多大な労力が必要となる。本研究では web で無料公開されている予測ツールを用いて製造基準等の妥当性検証を支援する方法について検討を行なった。本検討で使用した Cook My Meat と Process Lethality Spreadsheet という 2 種類の予測ツールを用いて低温調理条件下でのサルモネラ属菌の減少度について推定を行ったところ、冷蔵庫 (5 °C) から取り出した肉塊を 60 °C, 85 min の条件で調理し

た場合、肉厚 2 cm の際の中心部の推定菌数減少度が  $10^{-37.6}$  倍 ( $LRP = 37.6$ ) であったのに対して、肉厚 3 cm の場合は  $10^{-23.6}$  倍 ( $LRP = 23.6$ ) と推定された (図 3, B)。この結果は、肉厚が 1 cm 異なるだけで殺菌度が  $10^{14.0}$  倍もの変化を見せるということを示しており、わずかな調理条件の変更であっても製品の安全性に及ぼす影響が大きいことを示唆している。このような情報は製品ごとの製造工程管理の妥当性を検討する場合のみならず従業員教育や事業者指導においても非常に重要な情報を与えるものであり、実験を伴わずこのような情報を得られることは事業者や食品衛生監視員にとって製造工程管理基準等の科学的妥当性の考察への取り組みを促進するものと考えられる。

本研究では、上記の推定結果の妥当性についても鶏肉に対するサルモネラ属菌の添加回収試験の結果に基づき考察を行った。その結果、LRP の実測値は推定値に比較して平均して 0.085 低く見積られ、また、約 95% の確率で

$$\text{推定値} - 0.213 \pm 2.029$$

に収まると見積られた。本結果は、1 種類のサルモネラ属菌株を用いた結果であるため株ごとの熱耐性の違いやその他特性による不確実性を包含してはいないものの、上記で得られた数値は図 3, B に示す肉厚、調理時間等の変化に伴う LRP の変化率と比較して十分に小さいものであると考えられ、Cook My Meat と Process Lethality Spreadsheet を使用した推定が加熱調理条件の変化に伴う菌数死滅の変化を推定する上で有効なツールであることを示す結果であると考えられた。

## E. 結論

本研究では食品有害微生物の増殖／死滅等に関する予測ツールの活用方法の例示を目的として、Cook My MeatとProcess Lethality Spreadsheetという2種類のツールを組み合わせた低温調理条件下での食品中の菌数減少度の推定と、推定結果の妥当性の検証を行った。その結果、予測ツールの利用により実験を伴うことなく加熱処理条件の変化に伴う菌数死滅の変化を十分な妥当性をもって推定可能であることが示された。加えて、推定ではわずかな調理条件の変更で食品中の微生物の減少度が大きく変化することも示された。本結果は、食品製造事業者が自らの製造基準の妥当性について考察する場合や食品衛生監視員が監視指導を行う上で指導内容の科学的根拠を考察する際に、これらの予測ツールが有効な補助的ツールとして使用可能であることを示すものであると考える。これらのツールの活用により、事業者等が無理なくHACCPシステムの高度化に取り組む足掛かりとなることを期待する。

## F. 研究発表

該当なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## H. 引用文献

1. Massachusetts Institute of Technology, Cook My Meat.  
<https://up.csail.mit.edu/science-of-cooking/home-screen.html>  
(Accessed on January 20<sup>th</sup>, 2025)
2. Timothy A. F., Use of the AMI Process Lethality Spreadsheet to Validate the Safety of Cooking Procedures, *Proceedings of the 54th Reciprocal Meat Conference*, p52-53, 2001
3. Process lethality spreadsheet - Instruction for Using the AMI Peocess Lethality Determination Spreadsheet.  
<https://www.amif.org/process-lethality/> (Accessed on January 20<sup>th</sup>, 2025)
4. Chapter 6: Exposure Assessment of *Salmonella* in Broiler Chickens. *Microbiological Risk Assessment Series 2, Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens*, WHO and FAO, 2002
5. 金木ら：低温調理した食肉を提供する飲食店への指導について．長野県第50回食品衛生監視員技術研修会・第25回公衆衛生獣医師会調査研究発表会 抄録集，2024

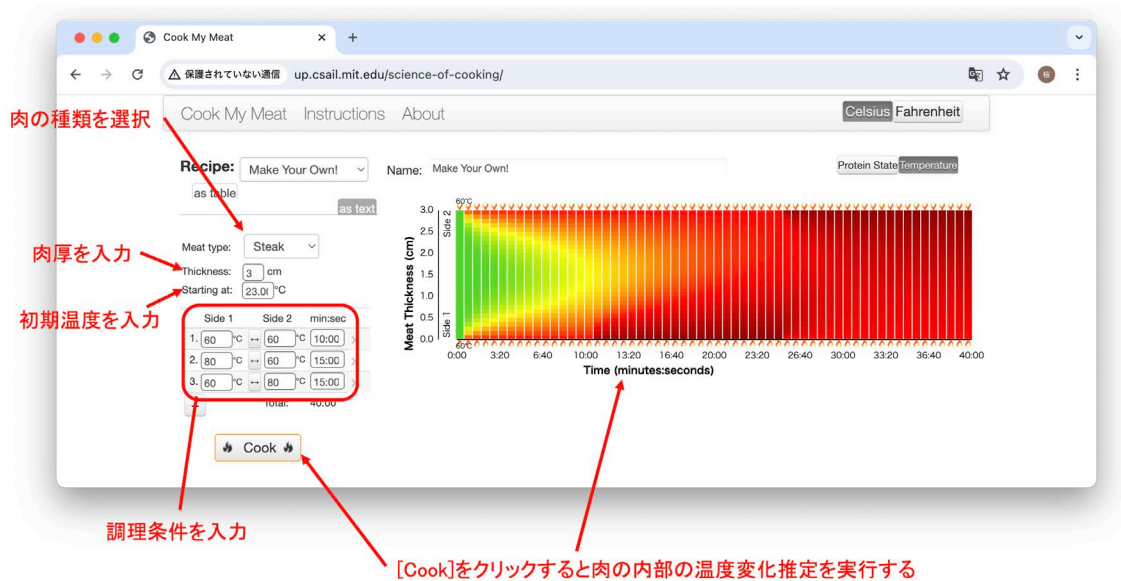


図 1. Cook My Meat の概要

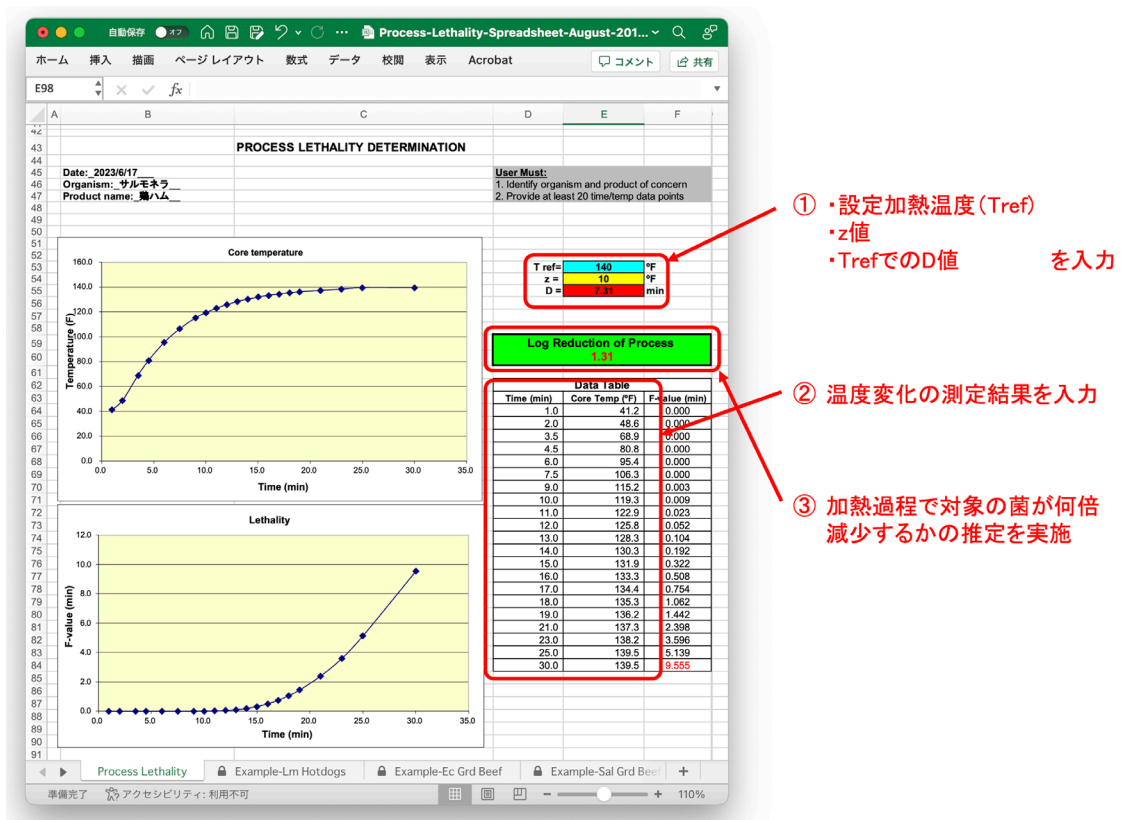
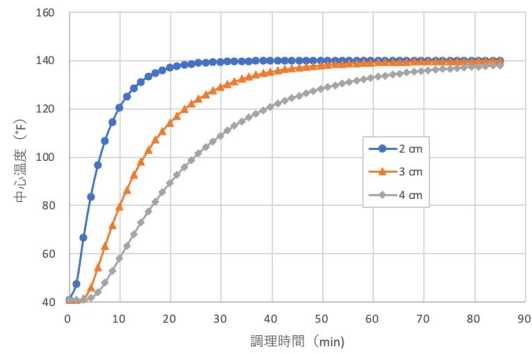
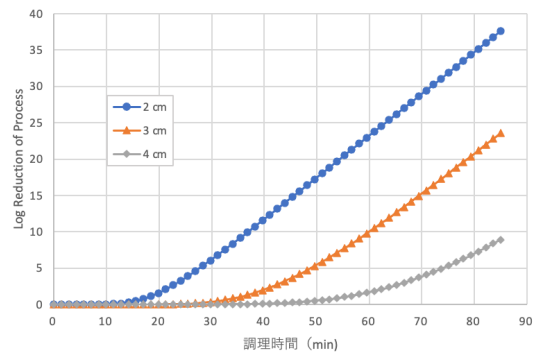


図 2. Process Lethality Spreadsheet の概要

A



B



C

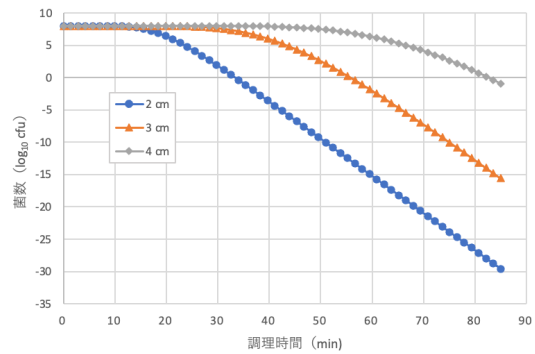


図3 Cook My Meat およびProcess Lethality Spreadsheetを用いた推定例

肉厚 2 cm, 3 cm および 4 cm の鶏肉を肉塊温度 5 °C (41 °F) の状態で 60 °C の湯浴に投入し 85 分間低温調理した場合の Cook My Meat による中心温度の温度変化 (A) および、Process Lethality Spreadsheet による各調理時間における鶏肉塊中のサルモネラ属菌の Log Reduction of Process の推定結果 (B) を示した。加えて、初期菌数を 10<sup>8</sup> cfu とした場合の Log Reduction of Process から算出した各調理時間における菌数の推移 (C) を示した。

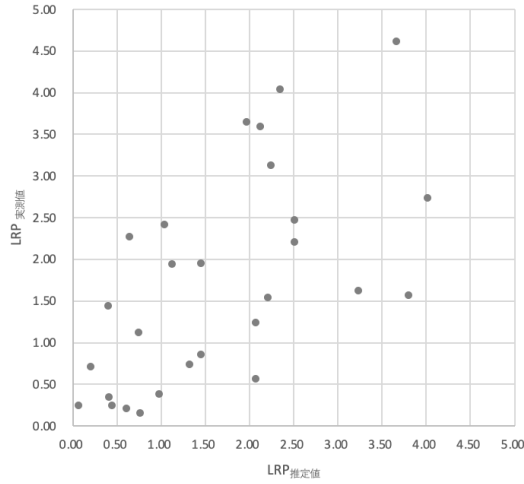


図4 Cook My Meat および Process Lethality Spreadsheet による LRP 推定値と添加回収試験による LRP 実測値の相関

肉厚、温度・時間および冷却時間を様々な組み合わせた調理条件において *Salmonella* Typhimurium LT2 株を接種した鶏肉を用いた回収試験により LRP を実測するとともに、同条件において Cook My Meat および Process Lethality Spreadsheet を用いて LRP を推定し、両者の結果の相関について散布図で示した。

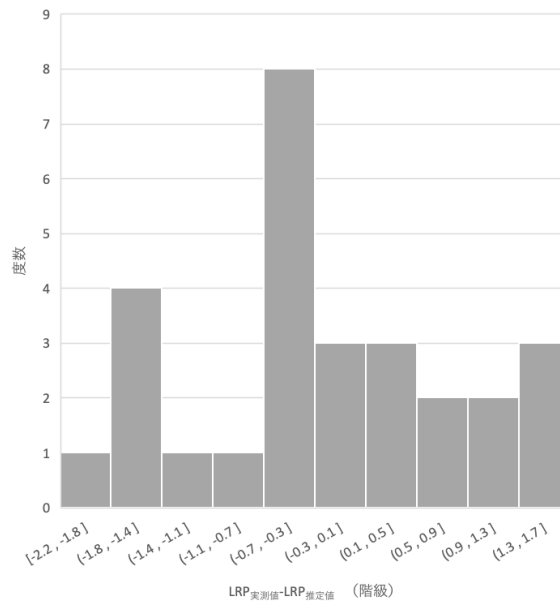


図5 Cook My Meat および Process Lethality Spreadsheet による LRP 推定値と添加回収試験による LRP 実測値の差の分布

図4の各条件における LRP の実測値と実測値の差についてヒストグラムで示した。