

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 システムの導入に資する研究
分担研究報告書

手引き書作成支援に関する科学的根拠
危害要因となる微生物の制御に関するデータ

分担研究者	下島優香子	東洋大学食環境科学部
研究協力者	佐藤睦月 五十君静信	東洋大学食環境科学部 東京農業大学

研究要旨

食品の生物的危害要因を管理するためには加熱殺菌が重要であり、加熱条件を決定する資料とするために危害要因となる細菌の D 値、Z 値をまとめた。通常の加熱調理では芽胞を死滅させるのは困難であり、芽胞形成菌の管理には加熱後の適正な冷却と低温保管が重要となる。食品中の好気性芽胞数を測定するために、国内では 100℃で 10 分間の加熱後に測定する試験法が公定法となっているが、国際的には 80℃10 分間の加熱が主流である。好気性芽胞数における加熱条件の影響を把握するために、国内に流通する香辛料 80 検体を対象として好気性芽胞数を含む汚染実態調査を行った。一般生菌数は $<1.3 \sim 8.1 \log \text{cfu/g}$ に分布し、販売者により差が認められた。大腸菌群数は 26 検体が定量下限値を超え、 $1.8 \sim 5.7 \log \text{cfu/g}$ に分布した。大腸菌は全て定量下限値未満であった。好気性芽胞数は食肉製品の製造基準である 1000 cfu/g 以上となった検体は 100℃加熱で 9 検体、80℃加熱では 42 検体であった。100℃加熱では定量下限値未満であっても 80℃加熱では定量下限値を超えた検体は 39 検体存在し、両方法で定量された検体では 80℃加熱の方が約 2 オーダー多く定量された。嫌気性芽胞は 28 検体は定量下限値を超え、 $1.3 \sim 3.3 \log \text{cfu/g}$ に分布した。ウェルシュ菌は 10 検体、セレウス菌は 30 検体が定量下限値を超え、サルモネラは 1 検体から分離された。香辛料は食中毒菌が分離される場合や衛生指標菌が高値を示す場合があり、衛生管理に注意する必要があると考えられた。

A. 研究目的

国内の食品等事業者は HACCP に沿った衛生管理が義務化されている。特に食品取扱従事者が 50 名以上の大規模な食品製造・加工業者に対しては、国際的な基準（コーデックス規格）に適合した HACCP に基づく衛生管理が求められている。HACCP システムは、行政が決定または指示するものではなく、食品等事業者自らが的確な危害要因分析と分析結果に基づく管理措置の決定を行い、HACCP 導入後の検証を適切に行っていくものである。危害要因には生物的危害要因、化学的危害要因、物理的危害要因がある。生物的危害要因を管理するためには、微生物の加熱殺菌が重要

であり、加熱条件を決めるためには危害要因となる微生物の D 値、Z 値を参照する必要がある。食品等事業者が国際的な基準に適合した HACCP システムを構築する資料とすることを目的として、食品の種類ごとに細菌の D 値、Z 値をまとめた。また、芽胞は加熱に強く、加熱調理後も生存すると考えられており、芽胞形成菌を管理するためには加熱調理後の冷却および低温保管が必要とされている。そのため食品中および原材料中の芽胞数を把握することも危害要因分析に重要である。国内での芽胞数の公定法は、食肉製品の製造基準で原材料となる香辛料を対象とした試験法があり、試料液を 100℃で 10 分間加熱した後、

標準寒天混釈法で菌数を測定する方法である。しかし芽胞は菌種や菌株により D 値および Z 値は異なり、耐熱性の芽胞と比較的加熱で死滅しやすい芽胞が存在する。海外では芽胞数を選択する条件は 80℃で 10 分間の加熱が一般的である。今回、加熱温度の違いによる影響を確認することを目的として、国内に流通する香辛料を対象に、異なる加熱温度による芽胞数の測定を行った。あわせて国内に流通する香辛料の汚染実態調査を行った。

B. 研究方法

1) 食中毒菌の D 値および Z 値

ネット上に公開される D 値および Z 値をまとめた。

2) 香辛料の細菌検査

2) -1 供試検体

インターネット通販で、12 の販売者（加工者、輸入者）から購入した香辛料計 80 検体を供試した（表 3AB）。

2) -2 検査項目および検査方法

試料 5 g に 0.1% ペプトン加生理食塩水 (pH7.0) 90 mL を加え混和して試料原液を作製し、適宜階段希釈を行った。

一般生菌数

試料原液および階段希釈液 1 mL を標準寒天培地（栄研化学）で混釈し、35℃で 48 時間培養後計測した。

大腸菌群・大腸菌数

試料原液および階段希釈液 1 mL を XM-G 寒天培地（島津ダイアグノスティックス）で混釈し、35℃で 20 時間培養後、赤色集落を大腸菌群、青色集落を大腸菌として計測した。

好気性芽胞数

試料原液を滅菌中試験管に 20 mL 測り取り、水浴中で 100℃で 10 分間、または 80℃で 10 分間の加熱後、冷水にて急冷した。加熱処理液およびその階段希釈液について標準寒天培地で混釈し、35℃で 48 時間培養後計測した。

嫌気性芽胞数

試料原液の 10 倍希釈液および 100 倍希釈液 10 mL をパウチ袋に入れ、70℃で 20 分間加熱後急冷し、クロストリジア測定用培地（島津ダイアグノスティックス）15 mL を加え混釈した。固化したら袋の口をシールし、35℃で 24 時間培養して黒色集落を計測した。黒色集落について釣菌し、トリプトソイ寒天培地 2 枚に画線塗抹し、35℃で

好気および嫌気培養を行い、嫌気培養でのみ発育を示した場合に嫌気性芽胞とした。なお、嫌気培養はアネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を用いて行った。

ウェルシュ菌

試料原液およびその 10 倍希釈液 10 mL をパウチ袋に入れ、ハンドフォード改良培地（栄研化学）15 mL を加え混釈後、46℃で 24 時間培養後計測した。定型集落は卵黄加カナマイシン含有 CW 寒天培地（島津ダイアグノスティックス）に画線塗抹培養し、定型集落を確認した。

セレウス菌

試料原液 0.1 mL を MYP 寒天培地（島津ダイアグノスティックス）に塗抹し、30℃で 24 時間培養後定型集落を計測した。定型集落は羊血液寒天培地（島津ダイアグノスティックス）に画線塗抹し、溶血を確認した。

サルモネラ

試料 25 g に緩衝ペプトン水（Thermo Scientific）225 mL を加え混和し、37℃で 22 時間一次増菌培養を行った。一次増菌培養液を Rappaport Vassiliadis 培地（Thermo Scientific）12 mL に 0.1 mL、および Tetrathionate 培地（Thermo Scientific）10 mL に 1 mL 加え、42℃で 22 時間二次増菌培養を行った。二次増菌培養液をクロモアガーサルモネラ（関東化学）、DHL 寒天培地（栄研化学）、SS 寒天培地（栄研化学）に画線塗抹後 37℃で 22 時間培養し、定型集落について TSI 寒天培地（島津ダイアグノスティックス）および LIM 培地（島津ダイアグノスティックス）でサルモネラの同定を行った。定型的な性状を示した株について型別用免疫血清（デンカ）を用いて血清型別を行った。

3) 統計解析

統計解析は EZR Version 1.68 を用いて行い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。なお、定量下限値未満は 0 log cfu/g として解析した。

C. 研究結果

1) 危害要因となる細菌の D 値および Z 値

ニュージーランド政府が発行した生肉の D 値および Z 値を表 1 に示した。細菌を十分に失活させる加熱条件は 6D と考えられている。生の食肉を汚染する危害要因として *L. monocytogenes*、サルモネラ属菌、STEC の D 値および Z 値から、*L. monocytogenes* の D 値が最も大きい。よって、芽胞非形成菌を死滅させる加熱は、加熱温度におけ

る *L. monocytogenes* の D 値の 6 倍の時間、中心部が加熱されるように加熱条件を設定することがよいと考えられた。

表 2 には、FDA の示した魚および魚介製品の危害要因と管理のガイダンスから *L. monocytogenes* の 6D 殺菌の効果が得られる工程時間を示した。いずれもこの加熱条件では芽胞は生存すると考えられるため、加熱後の冷却および低温保管が必要になる。

2) 香辛料の汚染実態調査結果

一般生菌数

販売者（加工者・輸入者）ごとの一般生菌数を図 1 に示した。一般生菌数は $<1.3 \sim 8.1 \log \text{ cfu/g}$ に分布した。販売者により差が認められ、B-D, B-E, B-F, B-H, C-D, C-E, C-H, I-A, I-D, I-E, I-F, I-G, I-H には有意差が認められた。なお、香辛料の種類による有意差は認められなかった。

大腸菌群・大腸菌数

大腸菌群は 80 検体中 54 検体が定量下限値未満 ($<1.3 \log \text{ cfu/g}$) であり、26 検体は $1.8 \sim 5.7 \log \text{ cfu/g}$ に分布した (図 2)。大腸菌は全て定量下限値未満 ($<1.3 \log \text{ cfu/g}$) であった。

好気性芽胞数

100°C10 分間の加熱条件では、80 検体中 54 検体 (67.5%) が定量下限値未満 ($<1.3 \log \text{ cfu/g}$) であり、26 検体 (32.5%) は $1.3 \sim 6.3 \log \text{ cfu/g}$ に分布した (図 3A, 図 4A)。一方、80°C10 分間の加熱条件では、80 検体中 15 検体 (18.8%) が定量下限値未満 ($<1.3 \log \text{ cfu/g}$) であり、65 検体 (81.3%) は $1.3 \sim 8.1 \log \text{ cfu/g}$ に分布した (図 3B, 図 4A)。80°C10 分間の加熱条件では定量値が得られたが、100°C10 分間の加熱条件では定量下限値未満となった検体は 39 検体存在し、80°C10 分間の加熱条件の方が優位に多く定量値が得られた。100°C10 分間の加熱条件で定量値が得られた 26 検体は全て 80°C10 分間の加熱条件でも定量値が得られ、80°C10 分間の加熱条件のほうが約 2 オーダー多く定量された (図 3B)。食肉製品の製造基準では 1000 cfu/g 未満であるが、基準値以上となった検体は 100°C10 分間の加熱条件で 9 検体 (11.3%) 存在した (図 3A)。その販売店は A が 1 検体、D が 2 検体、E が 3 検体、F が 2 検体、H が 1 検体であった。一方で 80°C10 分間の加熱条件では 42 検体 (52.5%) が 1000 cfu/g 以上であった (図 3B)。

嫌気性芽胞数

嫌気性芽胞は 80 検体中 52 検体は定量下限値

未満 ($<1.3 \log \text{ cfu/g}$) であり、28 検体は $1.3 \sim 3.3 \log \text{ cfu/g}$ に分布した (図 5)。なお、一部の吸水性の高い試料以外は試料原液 10 mL の混釈も行った。その結果、試料原液の 10 倍希釈液および 100 倍希釈液では集落を形成しなかったが試料原液では数個の集落が得られた検体が 9 検体存在した (データ未記載)。しかし、試料原液の 10 倍希釈液では集落が得られたが試料原液では得られなかった検体が 2 検体、試料原液の方が少なかった検体が 3 検体、試料原液では培地全体が黒変して計測不能となった検体 (クローブ) が 3 検体存在した。

ウェルシュ菌

ウェルシュ菌は 80 検体中 70 検体は定量下限値未満 ($<0.3 \log \text{ cfu/g}$) であり、10 検体は $0.3 \sim 1.9 \log \text{ cfu/g}$ に分布した (図 6)。試料原液では集落が認められたが 10 倍希釈液では認められなかった検体は 6 検体存在した。一方、試料原液の 10 倍希釈液では集落が得られたが試料原液では得られなかった検体は 1 検体、試料原液では培地全体が黒変して計測不能となった検体 (クローブ) が 3 検体存在した。

セレウス菌

セレウス菌は 80 検体中 50 検体は定量下限値未満 ($<2 \log \text{ cfu/g}$) であり、30 検体は $2.0 \sim 3.9 \log \text{ cfu/g}$ に分布した (図 7)。

サルモネラ

サルモネラは販売店 E の唐辛子 (チリパウダー) からのみ分離され、血清型は Bareilly であった。

D. 考察

国際的な水準の HACCP に基づく衛生管理のためには、微生物による危害要因を管理する必要がある。微生物の中でも芽胞非形成菌の管理には、食材の適切な加熱が重要である。特に危害要因となり得る食肉と魚介の適切な加熱条件のための資料とすることを目的として、食肉と魚介の D 値および Z 値をまとめた。食肉も魚介も、危害要因となる芽胞非形成食中毒菌の中で、耐熱性が高いと考えられる *L. monocytogenes* を確実に死滅させる条件で加熱することが必要と考えられた。

芽胞形成菌は通常の加熱工程、加熱調理では死滅が困難なため、加熱後は発芽および増殖が起こらないように速やかに冷却することや、低温で保管することが重要となる。HACCP システム構築のためには、食材や食品製品の芽胞数の把握が必要である。国内で好気性芽胞数の公定法は食肉製

品の原材料となる香辛料の試験法として100°C10分加熱後菌数を測定する方法であるが、その条件では高耐熱性の芽胞のみが選択されると考えられる。そのため、国内に流通する香辛料を対象に、好気性芽胞数の測定における加熱条件の影響を検討した。海外で好気性芽胞数の測定に一般的に用いられる80°C10分間の加熱条件では、100°C10分間の加熱条件よりも定量下限値を超える検体が多く、定量値も約2オーダー高かった。国内での好気性芽胞数の公定法は食肉製品の製造基準の試験法として示された100°C10分間の加熱条件のみであり、一般的に好気性芽胞数の試験法として採用されているが、その条件では一部の好気性芽胞は死滅していることが示唆された。また、食肉製品の製造基準である、1000 cfu/gを超えた検体は100°C10分間の加熱条件で9検体(11.3%)あり、国内に流通する香辛料は、食肉製品の製造基準には沿わない製品があることが示された。それらの販売店は、一般生菌数も多い販売店であった。一般生菌数は販売店によって差が認められた。販売店DおよびEよりも有意に低値を示した販売店Cは、ホームページに風味を損なわない殺菌や加熱殺菌を行っている旨を記載しており、殺菌工程により一般生菌数が少なくなっている可能性が考えられた。

嫌気性芽胞数は嫌気性パウチ袋を用いた混釈方法で行った。試料原液の10倍希釈液では集落が得られたが試料原液では得られなかった検体、試料原液の方が少なかった検体が存在した。また、クローブ検体は試料原液では培地全体が黒変して計測不能であった。嫌気性パウチ袋を用いた検査方法は、試料液10 mLと培地15 mLを混釈する方法であるが、試料液の量が多いため感度が良くなる一方、マトリックスの影響が大きいことが考えられた。香辛料の中には菌の発育を抑制するものや、成分によりクロストリジウム測定用培地を黒変させてしまうものもあり、試料原液を用いた測定は困難な場合があると示唆された。

国内に流通する香辛料は、サルモネラ、セレウス菌、ウェルシュ菌が存在する場合もあり、一般生菌数、大腸菌群や好気性および嫌気性芽胞数などの衛生指標菌が多い検体もあるため、適切な加熱、加熱後の迅速な冷却および低温保管が必要であると考えられた。次年度も引き続き、微生物の制御のための基礎データ集積を行っていく予定である。

E. 結論

食中毒細菌による危害要因を多く含む食材である食肉と魚介において、芽胞非形成菌の加熱殺菌は比較的耐熱性の高い*L. monocytogenes*を6オーダー減少させる6Dの加熱が推奨されることが考えられた。好気性芽胞数を測定する際に100°C10分間の加熱条件では一部の好気性芽胞は死滅していることが示唆された。抗耐熱性ではなく広範囲の好気性芽胞数を測定するためには80°C10分間の加熱条件がよいと考えられた。国内に流通する香辛料は、サルモネラ、セレウス菌、ウェルシュ菌が存在する場合もあり、一般生菌数、大腸菌群や好気性および嫌気性芽胞数などの衛生指標菌が多い検体もあるため、適切な加熱、加熱後の迅速な冷却および低温保管が必要であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimajima Y, Ishikawa T, Noguchi E, Araki R, Gomyo K, Miyajima I, Akita Y, Ohara Y, Nakagawa R, Okada Y, Morita Y. Bacteriological Survey of Insect Products in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, 21: 478 - 484, 2024.

2. 学会発表等

下島優香子, 荒木侖奈, 野口恵理香, 石川球子, 秋田悠花, 五明 開, 宮島 樹, 小原結衣, 仲川龍雅, 岡田由美子, 森田幸雄. 日本で市販される食用昆虫の細菌学的実態調査. 日本食品衛生学会, 2024年11月(春日井市).

下島優香子. 新宿区保健所 特定給食施設等オンライン管理講習会: 大量調理施設衛生管理マニュアルの正しい理解と活用. 2024年11月, 合計約300人, 講師.

下島優香子. 相模原市生活衛生課食品衛生班保健所職場研修: 共同研究に関する研究報告及びリストeriaの衛生管理について. 2025年2月19日, ウェルネスさがみはら7階視聴覚室(相模原市), 合計約30人, 講師.

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

表 1 食肉における食中毒菌の D 値および Z 値

温度	<i>L. monocytogenes</i>			サルモネラ属菌 ^{a)}		STEC ^{a)}			
	食肉 ^{a)}	シカ肉 ^{b)}	イノシシ肉 ^{b)}	鶏肉	牛肉/豚肉	食肉	牛肉/豚肉	食肉	
D値	55	95.6	14.9	23.8	47.4	47.2	69.9	33.6	36.3
	56	66.2			34.2	34.7	49.3	23.9	26
	57	45.8			24.7	24.5	34.7	17	18.7
	58	31.7			17.8	17.3	24.5	12.1	13.4
	59	21.9			12.9	12.2	17.2	8.6	9.6
	60	15.2	3.7	4.2	9.3	8.6	12.2	6.1	6.9
	61	10.5			6.7	6.1	8.6	4.4	5
	62	7.3			4.9	4.3	6.1	3.1	3.6
	63	5.1			3.5	3.1	4.3	2.2	2.6
	64	3.5			2.5	2.2	3	1.6	1.9
	65	2.4			1.8	1.5	2.1	1.1	1.3
	66	1.7			1.3	1.1	1.5	0.8	1
	67	1.2			1	0.8	1.1	0.6	0.7
	68	0.8			0.7	0.6	0.8	0.4	0.5
	69	0.6			0.5	0.4	0.6	0.3	0.4
	70	0.4			0.4	0.3	0.4	0.2	0.3
	71	0.3							
	72	0.2							
	73	0.2							
	74	0.1							
	75	0.1							
Z値		6.25			7.04	6.6	6.57	6.74	6.92

a) New Zealand government, Standardising D and Z values for cooking raw meat, 2015

b) Abel T., et al., Meat Science 167, 108164, 2020

表2 魚，魚介製品のための *L. monocytogenes* の不活化

製品中心温度 (°C)	致死率	6D殺菌の工程時間 (分)
63	0.117	17.0
64	0.158	12.7
65	0.215	9.3
66	0.293	6.8
67	0.398	5.0
68	0.541	3.7
69	0.736	2.7
70	1.000	2.0
71	1.359	1.5
72	1.848	1.0
73	2.512	0.8
74	3.415	0.6
75	4.462	0.4(24秒)
76	6.310	0.3
77	8.577	0.2
78	11.659	0.2
79	15.849	0.1
80	21.544	0.09
81	29.286	0.07
82	39.810	0.05
83	54.116	0.03
84	73.564	0.03
85	100.000	0.02(1.2秒)

$z=7.5^{\circ}\text{C}$

FDA Fish and fishery products hazards and controls guidance, 4th edition, 2021

表 3 香辛料の供試検体

A 販売者

販売者（加工者・輸入者）	検体数
A	15
B	10
C	10
D	9
E	9
F	8
G	7
H	4
I	4
J	2
K	1
L	1
計	80

B 種類

種類	検体数
ターメリック	9
コリアンダー	8
クミン	8
ブラックペッパー・ホワイトペッパー	8
唐辛子	6
カルダモン	6
ジンジャー	4
シナモン	4
フェネグリーク	3
ヒハツ	3
パプリカ	3
クローブ	3
ウコン	3
フェンネル	2
花椒	1
ハバネロ	1
ナツメグ	1
ティムールペッパー	1
カロンジ	1
アニスシード	1
アジョワンシード	1
アサフェティダ	1
混合	2
計	80

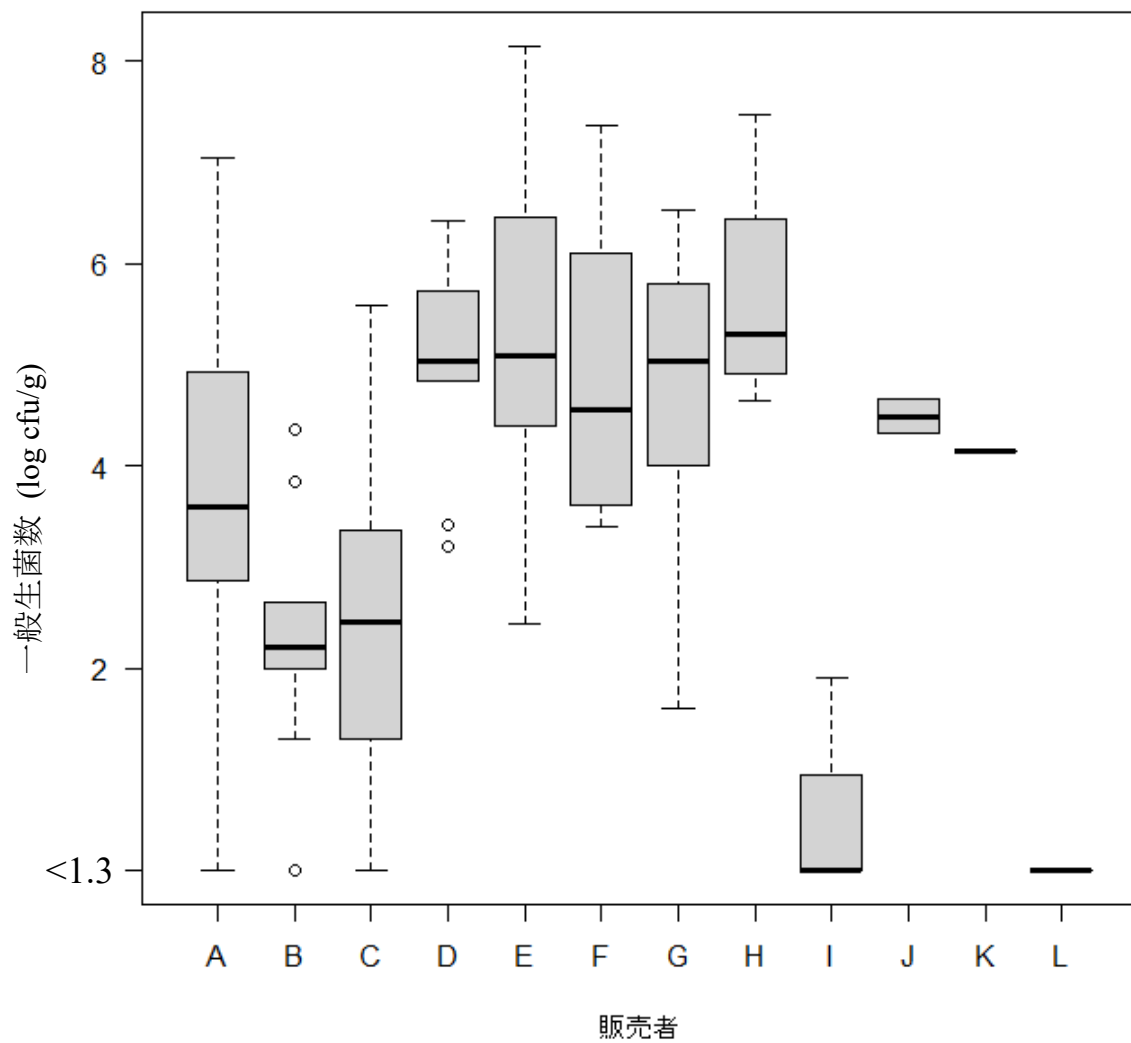


図1 香辛料の販売者ごとの一般生菌数

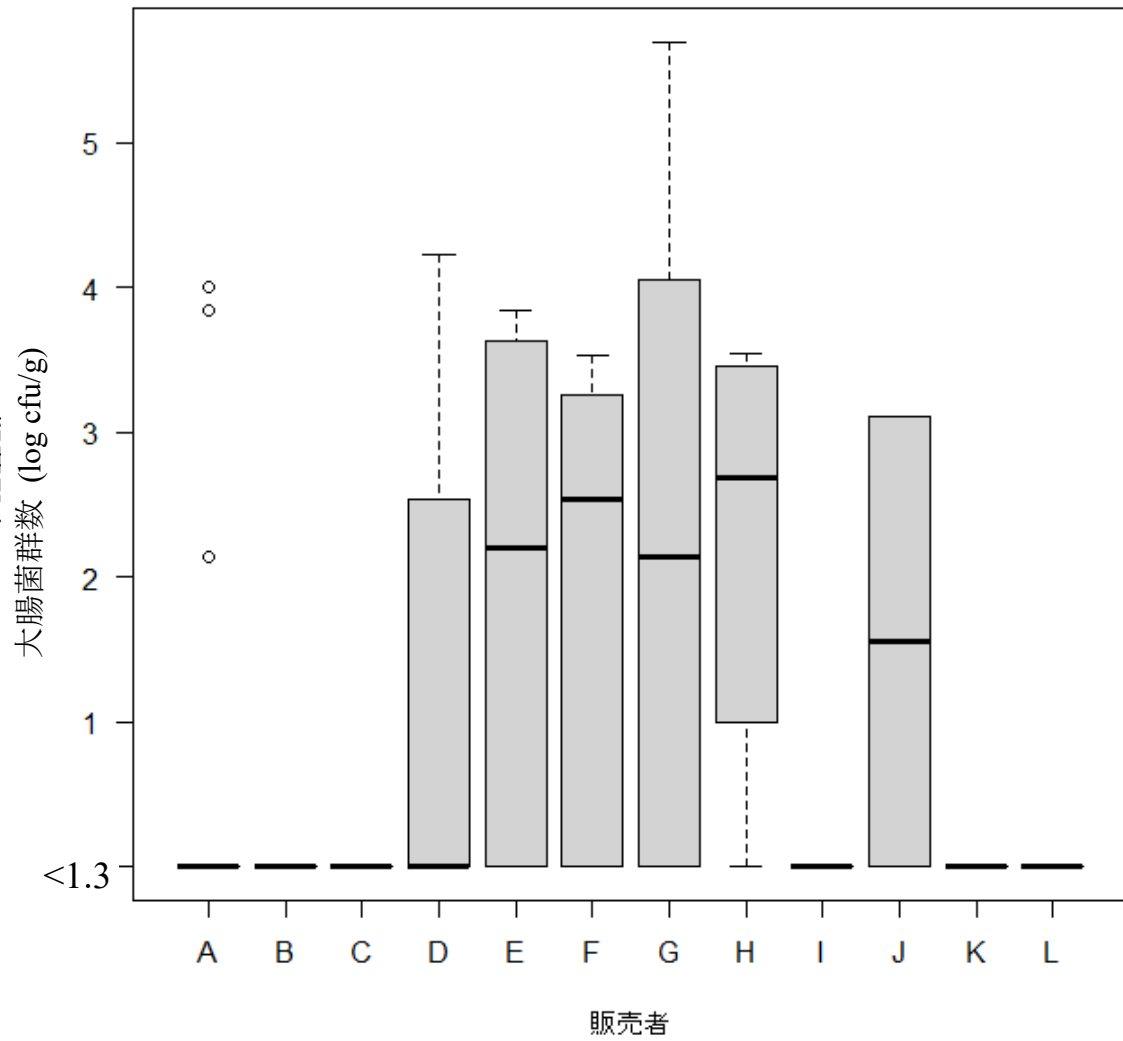


図2 香辛料の販売者ごとの大腸菌群数

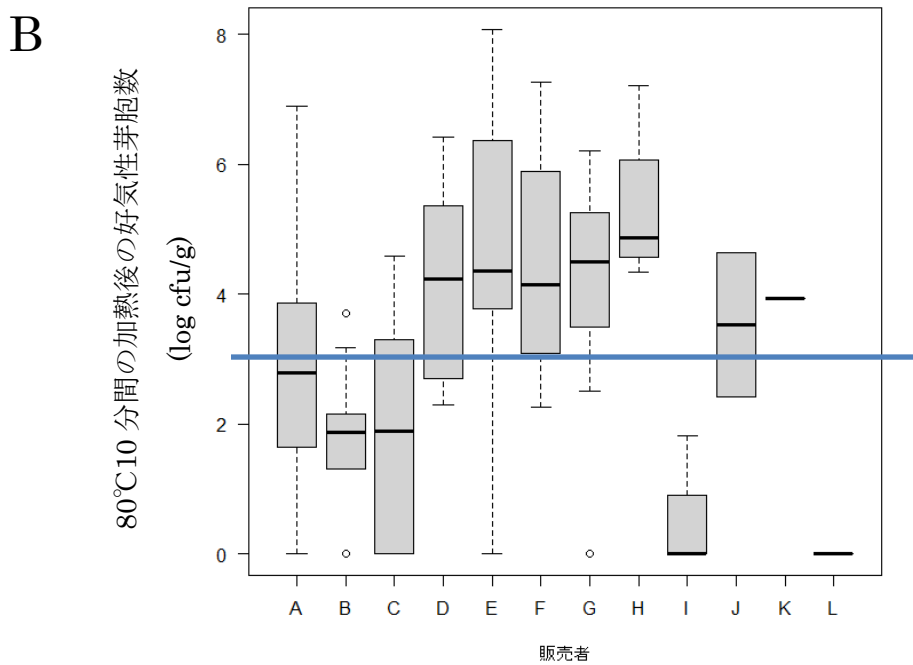
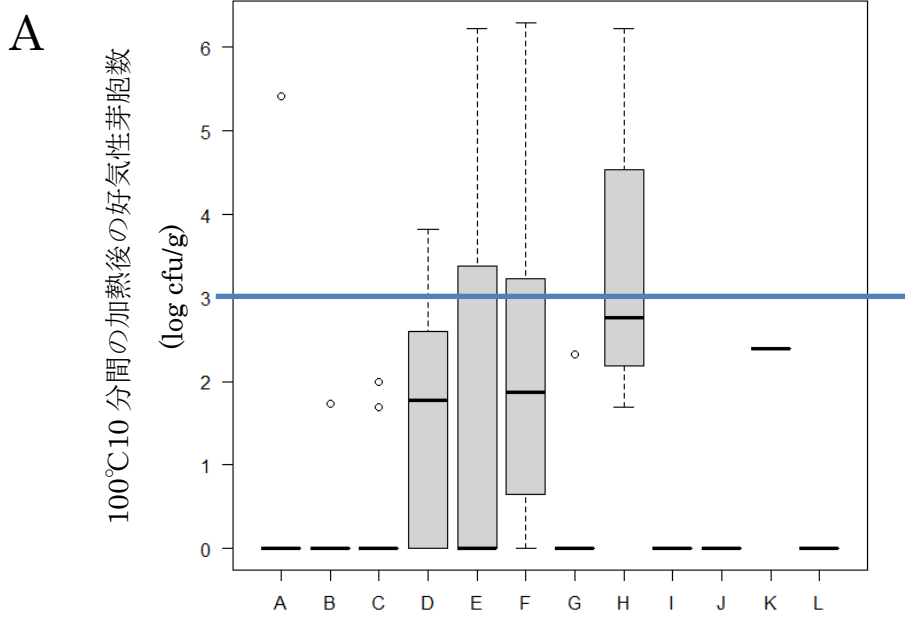
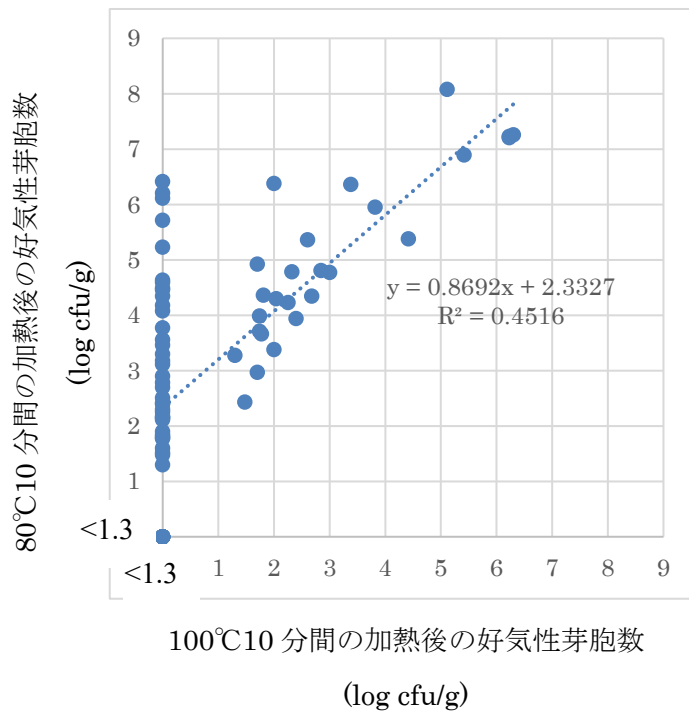


図3 香辛料の販売者ごとの好気性芽胞数

A 100°C10 分加熱後測定

B 80°C10 分加熱後測定

A



B

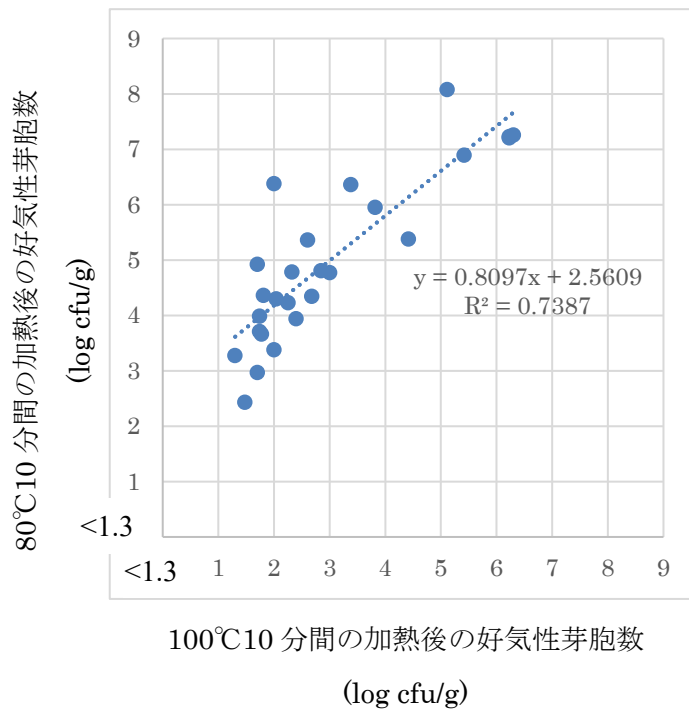


図4 香辛料の好気性芽胞数における加熱条件の相関

A 全 80 検体

B いずれの加熱条件でも定量下限値を超えた 26 検体

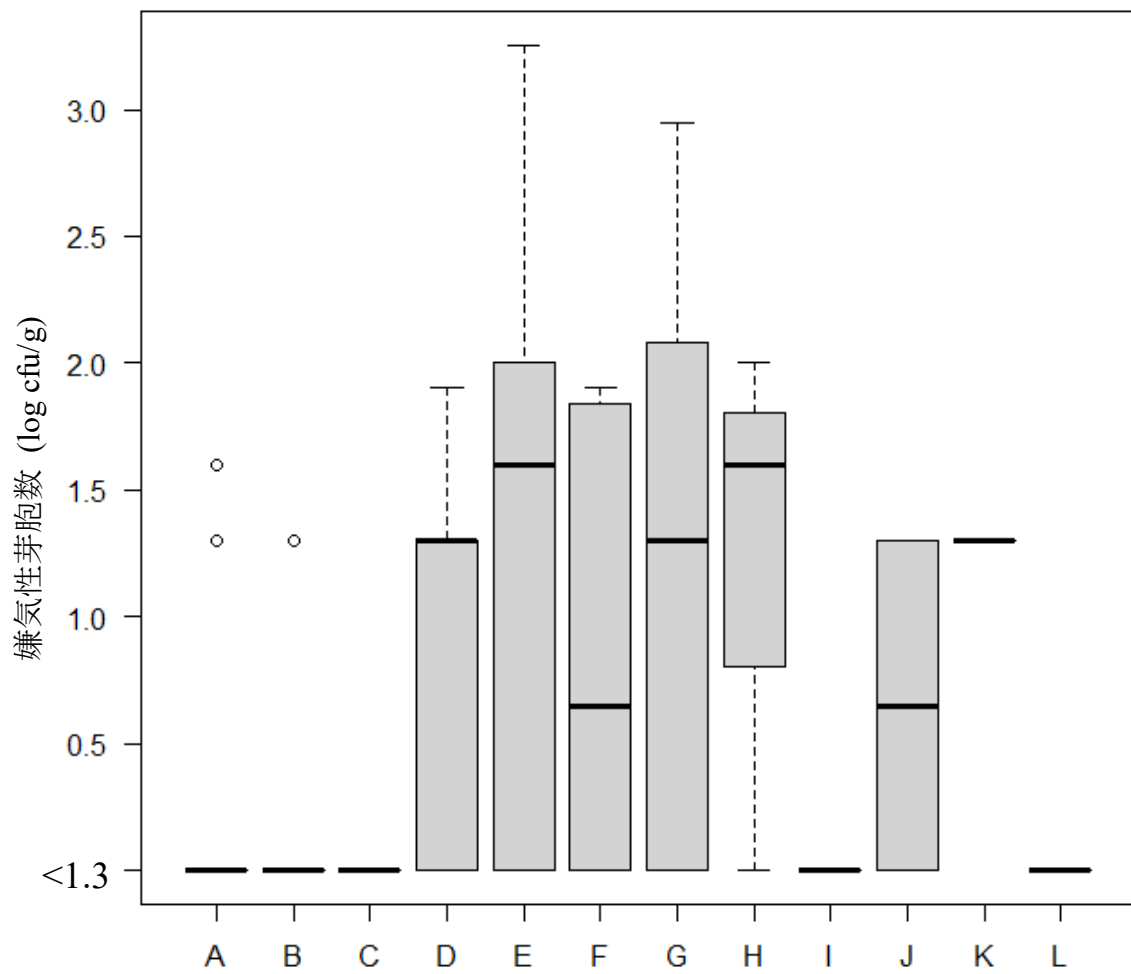


図5 香辛料の販売者ごとの嫌気性芽胞数

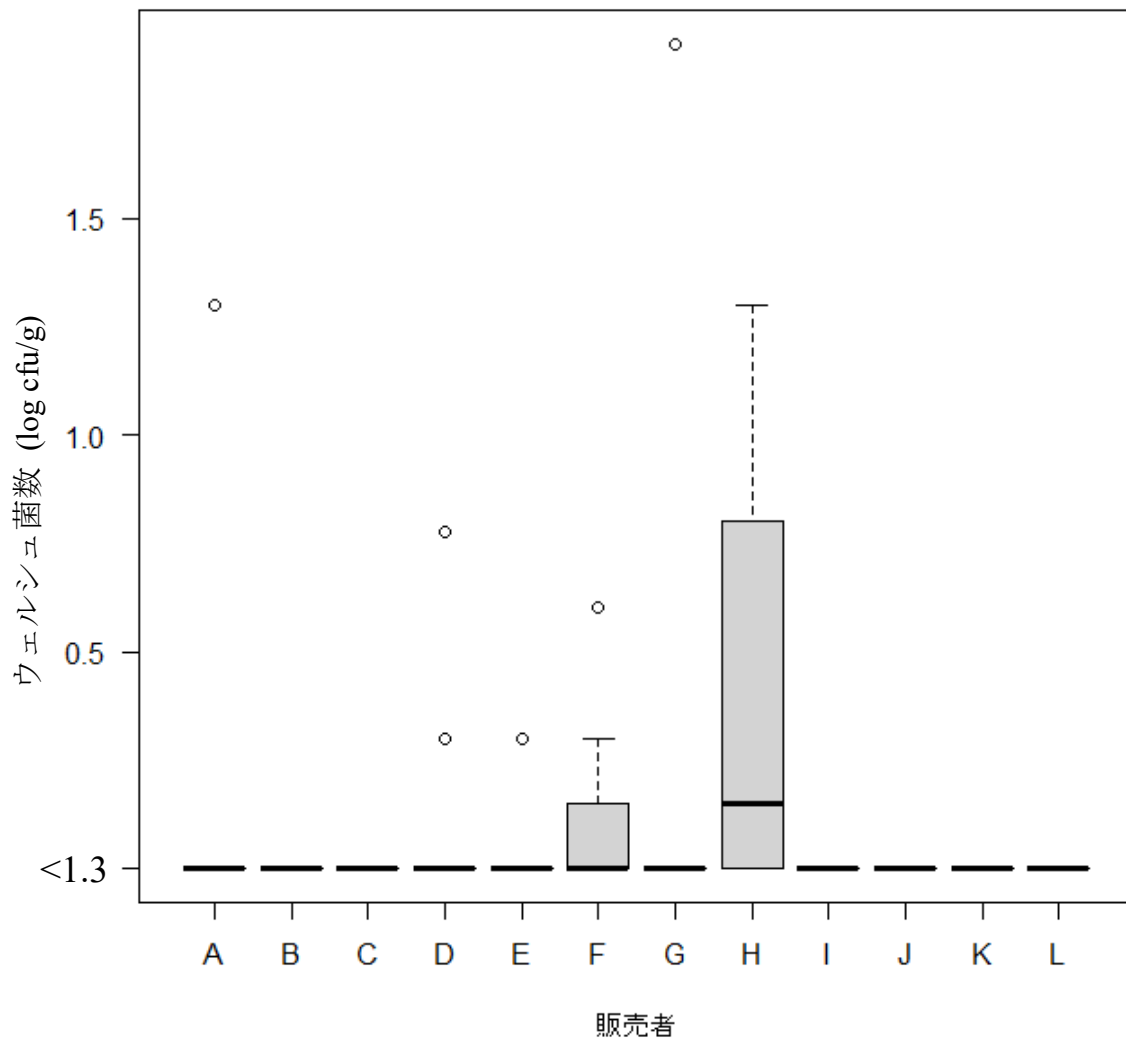


図6 香辛料の販売者ごとのウェルシュ菌数

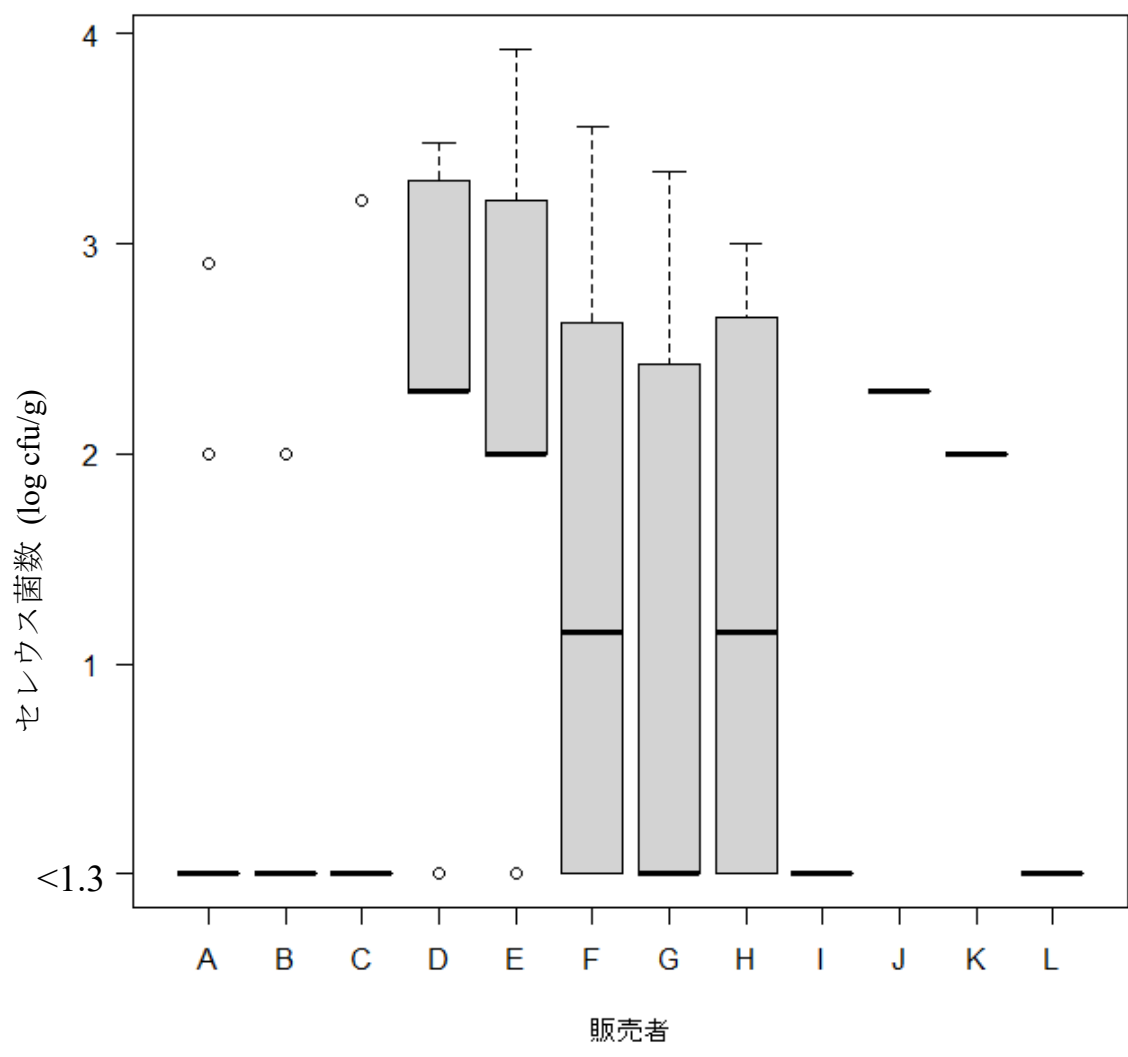


図7 香辛料の販売者ごとのセレウス菌数