

令和4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）

「小規模事業者における HACCP の検証に資する研究」

分担研究報告書

高度耐熱性芽胞を形成したあるウェルシュ菌の増殖挙動

研究分担者 五十君 静信 （東京農業大学）

研究協力者 佐々木萌花、横田 健治、梶川 揚申、檜木 真吾（東京農業大学）
戸田 政一（学校法人東京農業大学食品安全研究センター）

研究要旨

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方を取り入れた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」の追加実験としてクリーム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の再現性検証と制御法について検討した。

ウェルシュ菌の芽胞に関するこれまでの研究成果として、形態的に芽胞となっても本菌の芽胞は必ずしも 100℃耐熱性を獲得しているとは限らないこと。検討した食中毒由来株では 100℃耐熱性のある芽胞となることはむしろ稀であり、一般的な処理により芽胞形成が観察されても、この芽胞は 85℃10 分の加熱で死滅してしまう。一方、ある条件（温度の上下の繰り返し）により 100℃耐熱性の芽胞（高度耐熱性芽胞）が形成される条件も明らかにした。そのような操作により形成される高度耐熱性芽胞がどのようなメカニズムで形成されるかはまだ不明である。この処理により形成される高度耐熱性芽胞を用いてシチュー加熱後の冷却における、ウェルシュ菌の加熱後の温度管理と菌の増殖挙動を明らかにした。高度耐熱性獲得株は、危険温度帯である 55℃～30℃では、急速に増殖するため、シチューやカレーなどでは一般的に行われている深鍋の流水冷却では中心部の温度のモニタリングにより、発症菌数に達してしまうことを示した。深鍋の中心部を3時間以内に冷やしたとしても発症菌数に到達してしまうため、中心部の温度は2時間以内に危険温度帯を通過させる必要があることを明らかにした。本年度はまず本菌の制御に温度管理方法のみでどの程度管理の管理ができるかについて再現性を検証した。また温度管理のみの制御では十分とは言えないことから、本菌が偏性嫌気性菌である性質を利用し、酸素分圧等の制御がその増殖制御に活用可能であるかについて検討した。

A. 研究目的

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方を取り入れた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、模擬素材としてシチューを用いて検討した。

本年度は昨年実施した危険温度帯における実験結果の再現性を確認するとともに、危険温度帯を通過させた後の温度管理についての検討を行った。危険温度帯通過後、調理食品を室温に放置した場合の菌数の変化について検証した。また、調理後、10℃以下に品温を下げ、

温度管理を行うことによるウェルシュ菌の増殖抑制の効果の確認も行った。さらに、ウェルシュ菌が偏性嫌気性菌であることから、酸素分圧等を利用した制御方法の可能性についても検討した。これらの結果から、本菌の制御に有効と思われる情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

(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℃・48 時間) した菌株 (保存液①) を 65℃10 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℃・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を、1/10 量を DS 培地に添加して 35℃・48 時間培養し (保存液②)、70℃10 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。
- ④ 上記の操作を 75℃・80℃・85℃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

ウェルシュ菌を接種したクリームシチューを中試験管に 15ml ずつ小分けにし、これに嫌気状態を確保するため、流動パラフィン 1ml 加えて空気を遮断し以下①②の操作を行った。

① 危険温度帯滞留時間が長時間の場合 (恒温槽で温度コントロール)

上記検体を 80℃の恒温槽に漬け、平成 29 年度の厚労科研費研究報告書で示したカレーを用いた深鍋を流水を用いて冷却した場合のカレーの中心部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温度帯 (0 時間、1 時間、3 時間～10 時間、24 時間) 全 12

点での菌数を算定し記録した。

② 危険温度帯滞留時間が短時間の場合 (冷蔵庫保存)

上記検体を直ちに 10℃以下の冷蔵庫に保存し、0 時間、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間の菌数を測定した。

材料：

- ① クリームシチュールー、合挽肉、じゃがいも、人参
- ② 変法 Duncan and Strong 培地 (食品検査指針 微生物編 2018 年 参照)
- ③ ハンドフォード培地 (Mast Group Lot405525)
- ④ 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 用他ピペットル類
- ⑧ 鍋 (2L)
- ⑨ 恒温槽
- ⑩ 試験管立
- ⑪ 冷蔵庫 (10℃以下)

菌株：*Clostridium perfringens* Nagano 10

＊以後 ウェルシュ菌と記す

(3) 危険温度帯滞留時間を 2 時間とし、その後の菌数の変動

以後の温度と菌数の実験についてはメーカー所定の調理方法で調製したクリームシチューを 80℃まで冷却し、これに高度耐熱性芽胞を形成させる条件で培養を行った菌液を 85℃、10 分処理で高度耐熱性を確認したのち芽胞液の調整を行った。この芽胞液を試験管内に分注したクリームシチューにスパイクし、空気が入らないように流動パラフィンを重層し実験に用いた。

① 分散後、急速冷却で危険温度帯を 2 時間以内に通過後、シチューを室温 (25℃) 放置した場合

② 分散後、急速冷却で危険温度帯を 2 時間以内に 10℃まで冷却後、シチューを室温 (25℃) 放置した場合

を想定し、冷却後の室温（25℃）放置でのウェルシュ菌の菌数の挙動については、以前の研究で得られた結果を引用した。（図1）

（4）酸素分圧および酸化還元電位を変化させた場合の高度耐熱性芽胞の挙動

試験管に各種培地を作製し、オートクレーブ後、消泡剤を加えボルテックスミキサーで、0、1、3、5分間激しく浸透させ、酸素濃度を変化させ流動パラフィンを重ねし、経時的に酸素分圧と酸化還元電位を記録した。（図2）

用いた培地は、GAM ブイヨン培地、緩衝ペプトン水、緩衝ペプトン水 + Yeast extract + D(+)-Raffinose Pentahydrate 培地の3種類である。

C. 研究結果

（1）耐熱性芽胞菌の作成

これまでのプロトコールにより、100℃耐熱性の芽胞液を作製することができた。得られた芽胞は、85℃10分の加熱により生存し、100℃の加熱においても芽胞数は変化しなかった。以後の実験には、85℃10分加熱後の芽胞数を確認し、高度耐熱性芽胞として取り扱った。

（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

以後の実験の食材としては、このように調整し試験管に分注したクリームシチューを用いた。流動パラフィンにより酸素を遮断した。

（3）危険温度帯滞留時間を2時間とし、その後の菌数の変動

以下の条件について、これまでに得られた結果を引用した。

① 分散後、急速冷却で危険温度帯を2時間以内に通過後、シチューを室温（25℃）放置した場合

② 分散後、急速冷却で危険温度帯を2時間以内に10℃まで冷却後、シチューを室温（25℃）放置した場合

以前の研究で得られた結果を引用した。

（4）酸素分圧および酸化還元電位を変化させた場合の高度耐熱性芽胞の挙動

試験管に各種培地を作製し、オートクレーブ後、消泡剤を加えボルテックスミキサーで、0、1、3、5分間激しく浸透させ、酸素濃度を変化させ流動パラフィンを重ねし、経時的に酸素分圧と酸化還元電位を記録した。（図2）

用いた培地は、GAM ブイヨン培地、緩衝ペプトン水、緩衝ペプトン水 + Yeast extract + D(+)-Raffinose Pentahydrate 培地の3種類である。

培地をGAM ブイヨンとした場合、ボルテックスの時間を延ばすことにより、溶存する酸素分圧は比例して増大する。流動パラフィンでカバーして24時間放置すると、培地に含まれる酸化還元電位を低下させる成分により、酸素分圧は低下して、一定の値に安定してしまう。おそらく、酸化還元電位がマイナスになると、酸素は溶存した形をとれなくなるものと思われる。（図3）

培地を、酸化還元電位を低下させる機能がほとんどない緩衝ペプトン水として、同様の実験を行ったものを、図4に示す。酸化還元電位の影響をほとんど受けないため、培地に溶け込んだ酸素量は、24時間後もあまり変化せず存在している。酸化還元電位についても、溶存酸素が維持されていることから、24時間後も一定で、プラスを示している。この状態を維持できれば、ウェルシュ菌芽胞は、発芽・増殖することはないと思われる。残念ながら、緩衝ペプトン水中では、嫌気培養をしてもウェルシュ菌の増殖は確認できなかったため、増殖評価をすることはできなかった。

嫌気培養でウェルシュ菌の増殖が確認でき、かつ酸化還元電位を下げる効果の弱い培地として、緩衝ペプトン水 + Yeast extract + D(+)-Raffinose Pentahydrate 培地を用いて、同様な検討を行った実験結果を図5に示した。弱いながらも酸化還元電位を下げる働きがあることから、24時間後の酸素濃度は低く抑えられてしまい、酸素濃度の制御は十分に行えなかった。そこで、流動パラフィンの重層を行ったものを行わないもので、同様な実験をおこなった結果を、図6に示した。一部において酸化還元電位がプラスに転じることにより、酸素分圧を高くすることができた。

この結果を表にしたものが、図7である。大

変微妙な値ではあるが、酸素分圧 1.75mg/L では、本菌の高度耐熱性芽胞からの発芽・増殖が抑制されなかったのに対して、酸素分圧 2.49mg/L では、増殖がかんさつされず、発芽・増殖を抑制できる可能性が示された。

D. 考察

温度管理でのウェルシュ菌制御の要点

令和2年度報告した「予備試験温度グラフ」の温度変化に従ってシチューを急速冷却後、室温（25℃）放置することで、室温放置3時間後には発生菌数まで増殖してしまうことを報告した。

我々は令和2年度検証実験報告で加熱調理後のシチューにおいて、危険温度帯の開始点である55℃から室温まで1時間以内に危険温度帯を通過させる急速冷却により菌の増速を回避できるとしたが、急速冷却後そのまま室温放置3時間後には発症菌数に到達してしまい、完全にウェルシュ菌の増殖を抑制することは難しいことが示された。（図1）

顧客へ提供するまでの間は3時間以上の室温放置はしないことが求められる。

さらに実験では加熱調理後、冷蔵庫30分放置で10℃まで急冷し、その後25℃とした場合、室温移行後、6時間までは接種菌数の 10^4 cfu/gオーダーで推移し、急速な増殖は見られなかった。室温放置後9時間後から、 10^6 cfu/gオーダーとなり食中毒発症菌数に増殖することが確認された。冷蔵庫30分放置で10℃まで急冷しその後25℃とした場合は危険温度帯を短時間で通過させて25℃としているので誘導期が短くなり、室温放置後9時間後に増殖したものと推察された。加熱調理後危険温度帯を早く通過させるため1時間以内に10℃以下まで冷却する方法は、食中毒予防には有効な方法といえる。

温度管理のみで本菌の制御を行うとすると、現実的にはその実施が容易ではないと思われる。

る。そこで、温度管理以外の方法での制御が可能かの検討を行った。

ウェルシュ菌が、偏性嫌気性菌であることから、この性質が利用できないかの検討を行った。

酸素分圧による制御を検討したが、今回再現した酸素分圧ではウェルシュ菌の生育制御に至らないことが分かった。ウェルシュ菌は偏性嫌気性菌の中でも比較的低い嫌気度で増殖することが知られている。今回実験を行った範囲の酸素分圧ではウェルシュ菌の増殖制御に影響しないことに加え、その酸素分圧の範囲が具体的な数値として得られた。特に食材に酸化還元電位を低下させる効果を持つもの（例えば肉片など）が含まれると、酸化還元電位が下がり、マイナスとなると酸素濃度のコントロールができなくなってしまい、増殖抑制は難しくなると思われる。

そのため今後の展望としては、今回得られた酸素分圧の値より高い酸素分圧を再現するような酸化還元電位を制御できる方法が提供できれば、ウェルシュ菌の制御に有効な手段を提供できる可能性が出てくるものと思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 五十君静信。食品衛生の国際標準化の重要性と国内のHACCP制度化。明日の食品産業(2022)

2. 学会発表

- 1) 五十君静信。低温流通（チルド）食品の微生物制御の基礎と対策。日本食品工業倶楽部。ハイブリッド開催。2022.10.26

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 |

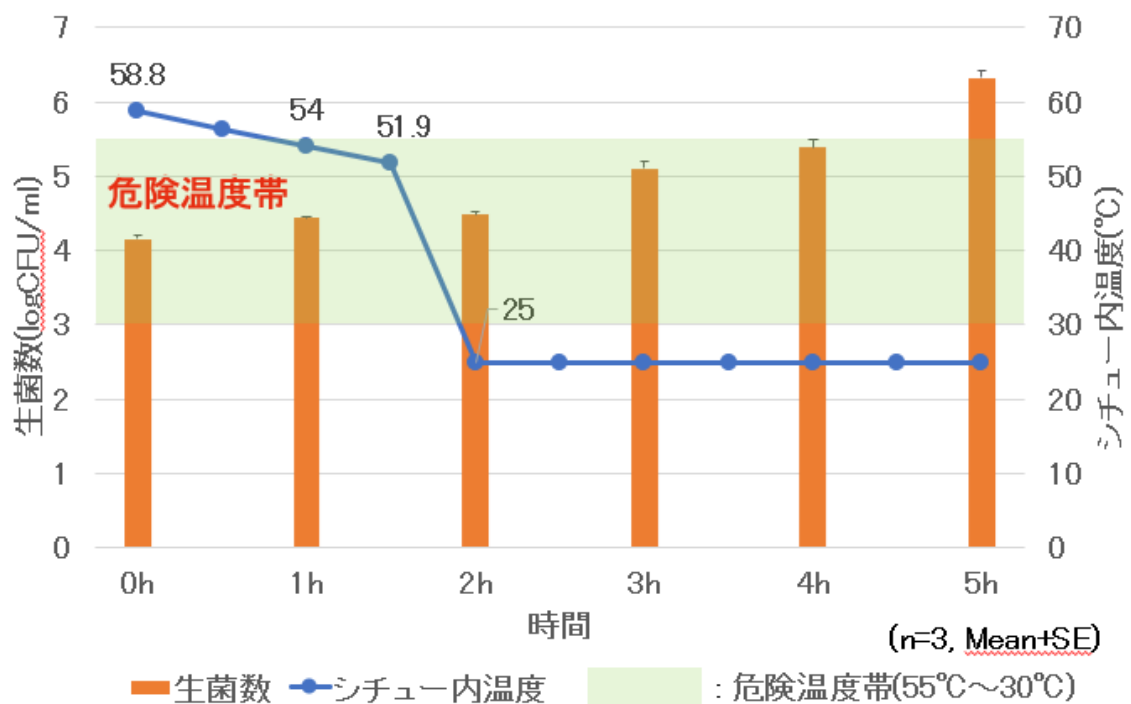


図1. 急速冷却後のシチュー内の菌数挙動（これまでの研究による総括）

これまでの研究により、危険温度帯（55°Cから 30°C）に到達した 55°Cから 1 時間程度で室温まで急速冷却することで、発症菌数以下に増殖を抑えることが可能であることを示した。しかし、その後室温である 25°Cに放置し 1 時間ごとに生菌数を測定すると、室温放置 3 時間後には発症菌数に到達してしまう。

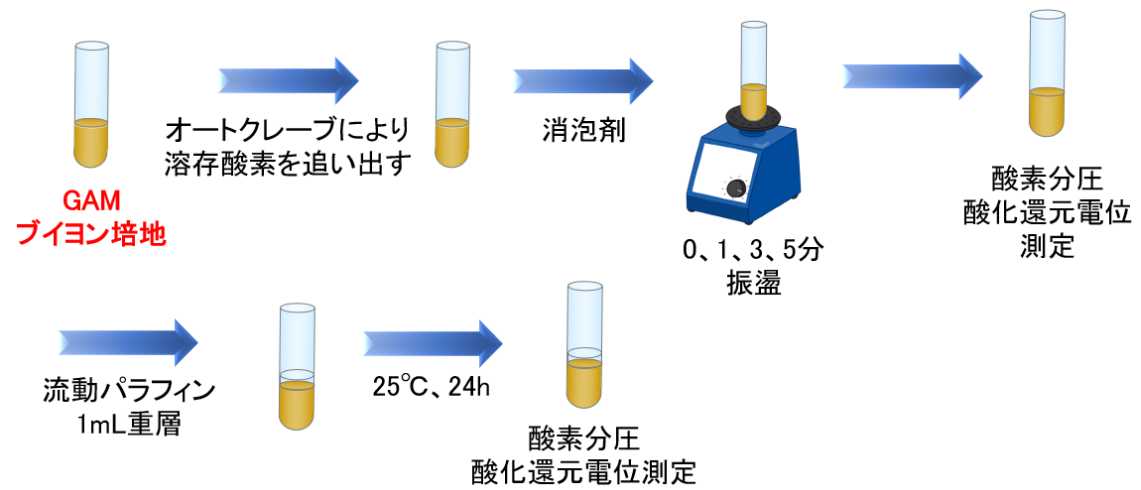


図 2. 激しい振盪による酸素分圧・酸化還元電位の変化の評価実験の概要

培地: GAMブイヨン培地

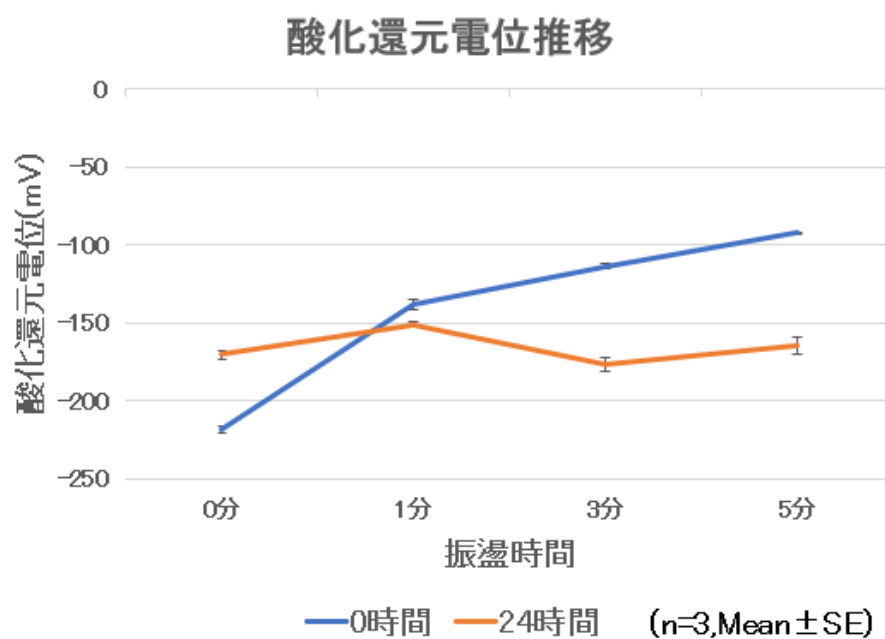
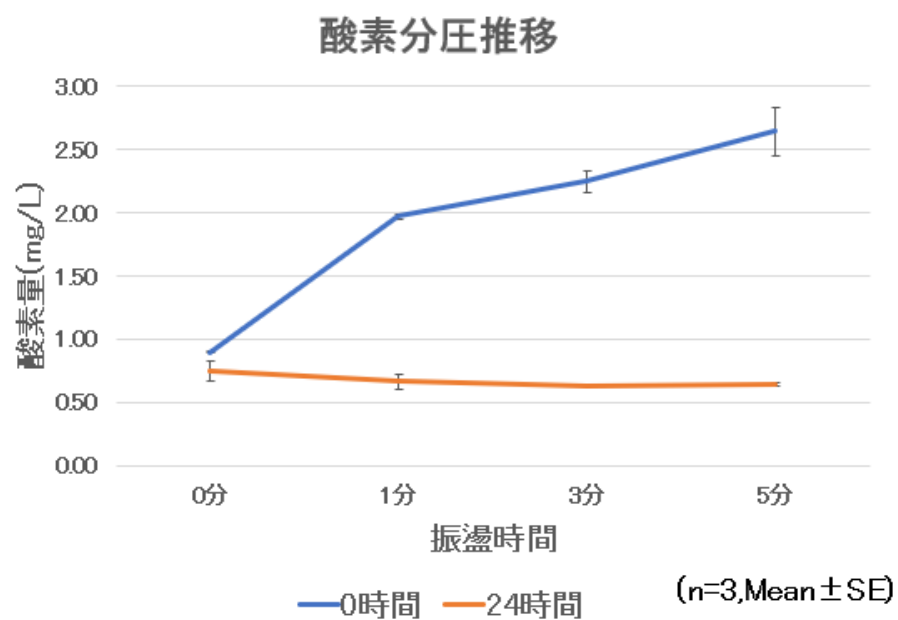


図3. GAM ブイヨン培地を用いた激しい振盪による酸素分圧・酸化還元電位の変化

培地:緩衝ペプトン水

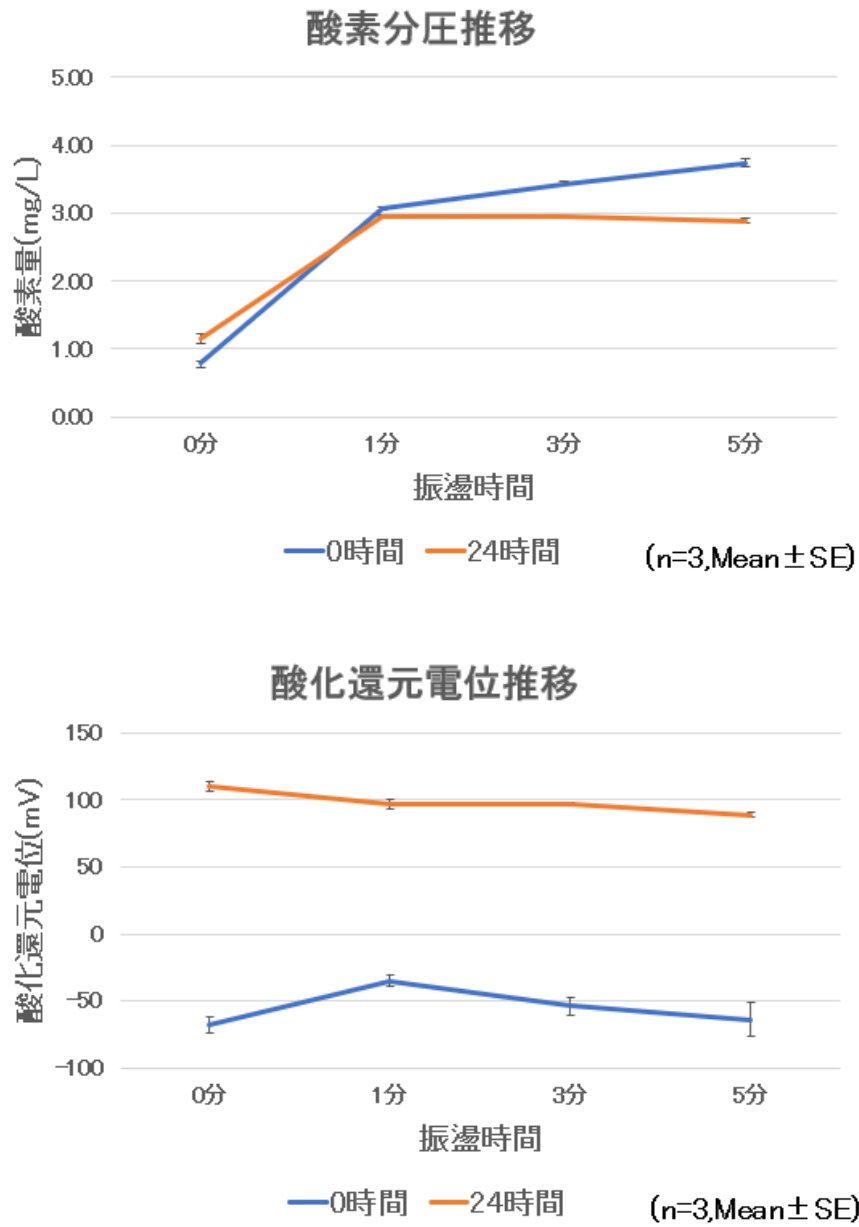


図4. 緩衝ペプトン水を用いた激しい振盪による酸素分圧・酸化還元電位の変化

培地：緩衝ペプトン水 + Yeast extract + D(+)-Raffinose Pentahydrate

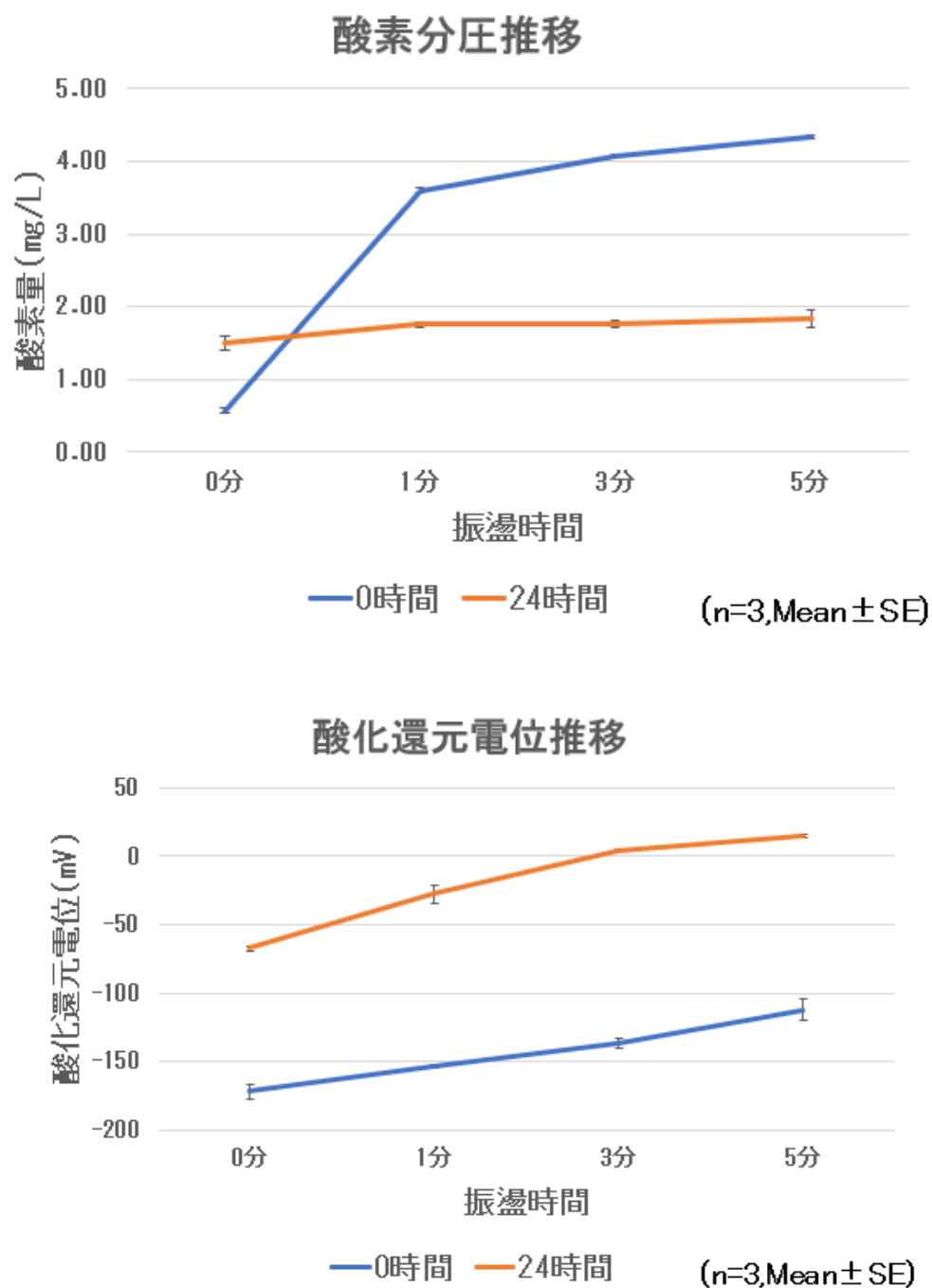


図5. 増殖可能培地を用いた激しい振盪による酸素分圧・酸化還元電位の変化

培地:緩衝ペプトン水 + Yeast extract + D(+)-Raffinose Pentahydrate
重層量:なし/1mL

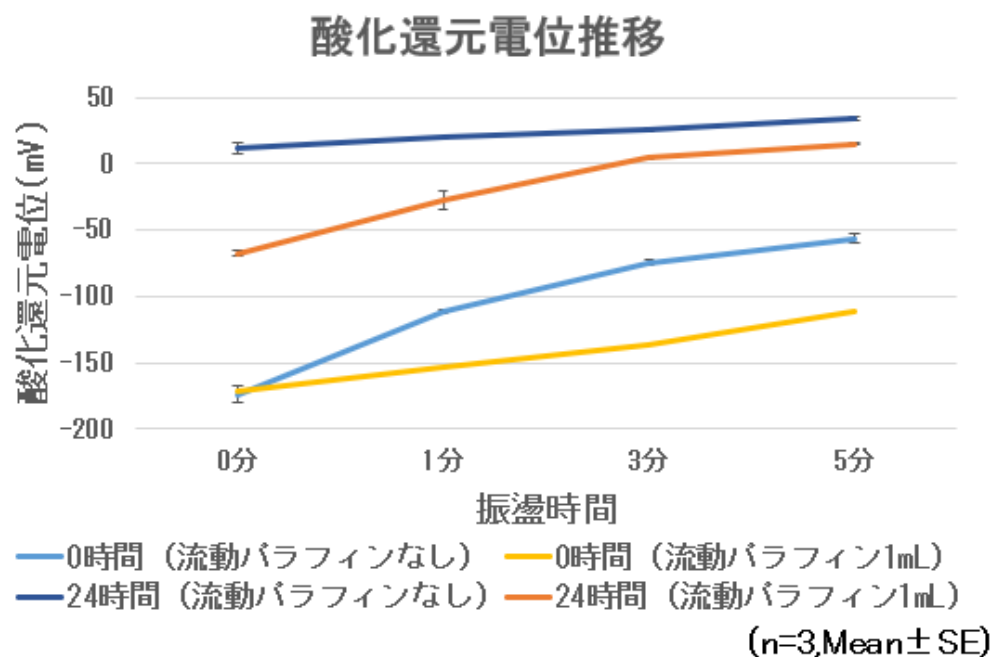
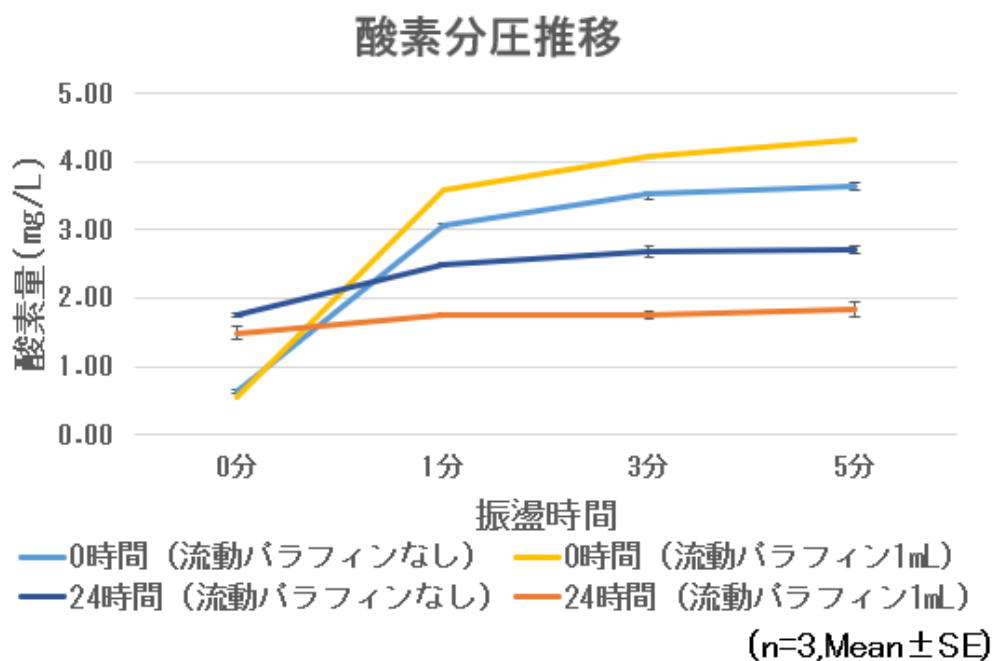


図6. 流動パラフィン加、激しい振盪による酸素分圧・酸化還元電位の変化

培地: 緩衝ペプトン水 + Yeast extract + D(+)-Raffinose Pentahydrate

条件: ・振盪時間0分、流動パラフィン重層なし

・振盪時間1分、流動パラフィン1mL重層

・振盪時間1分、流動パラフィン重層なし

	振盪時間0分、 流動パラフィン 重層なし	振盪時間1分、 流動パラフィン 1mL重層	振盪時間1分、 流動パラフィン 重層なし
酸素分圧 (mg/L)	1.75	1.76	2.49
酸化還元電位 (mV)	11	-27	20
生菌数 (CFU/mL)	2.12×10^8	2.11×10^8	増殖なし

図7. 酸素分圧・酸化還元電位の違いによる芽胞の発芽・増殖の評価

酸素分圧 1.75mg/L 付近で発芽・増殖を抑制できない

酸素分圧 2.49mg/L 付近で発芽・増殖を抑制できる可能性