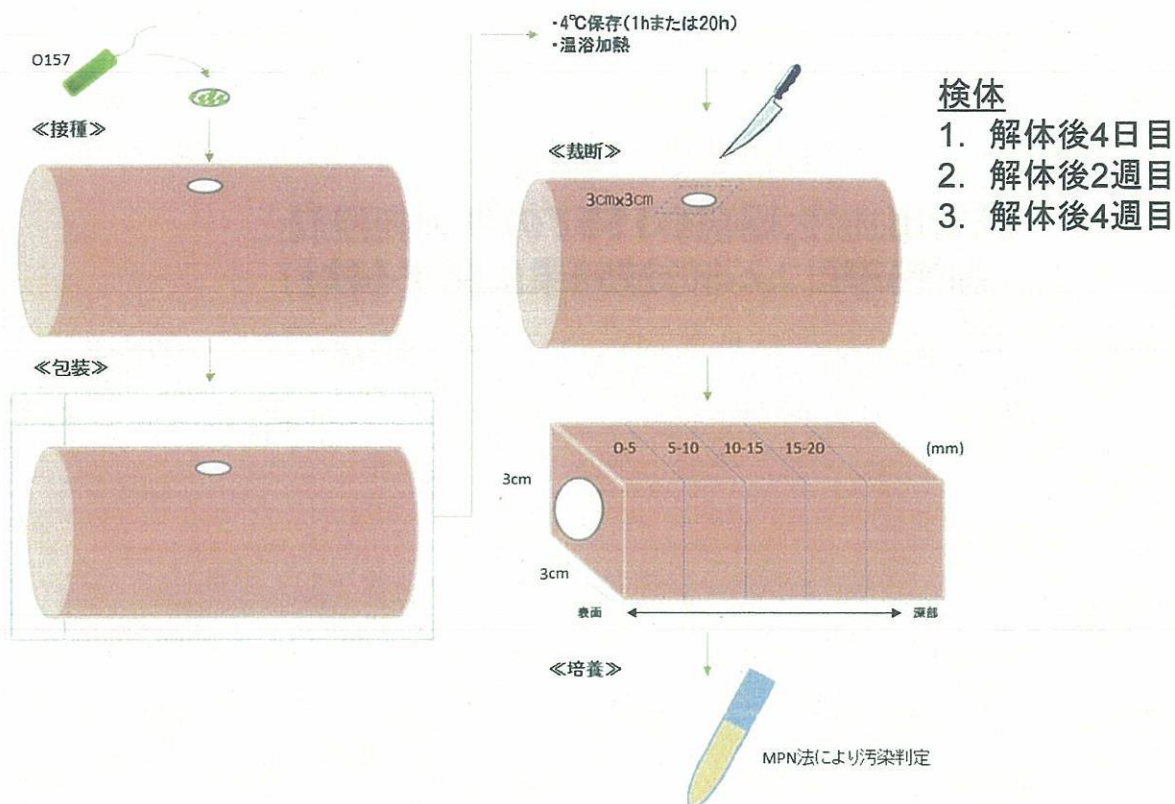


腸管出血性大腸菌**O157**の牛肉内浸潤と 加熱処理による低減効果に関する検討

検討項目

1. 牛肉検体へのO157浸潤性
 - 1) 検体の違い(部位、熟成度)
 - 2) 接種菌数の違い
 - 3) 分布の精査(培養法、顕微鏡像)
2. 温浴加熱を用いた殺菌条件の検討
 - 1) 温度の違い
 - 2) 加温時間の違い
 - 3) その他の加熱条件

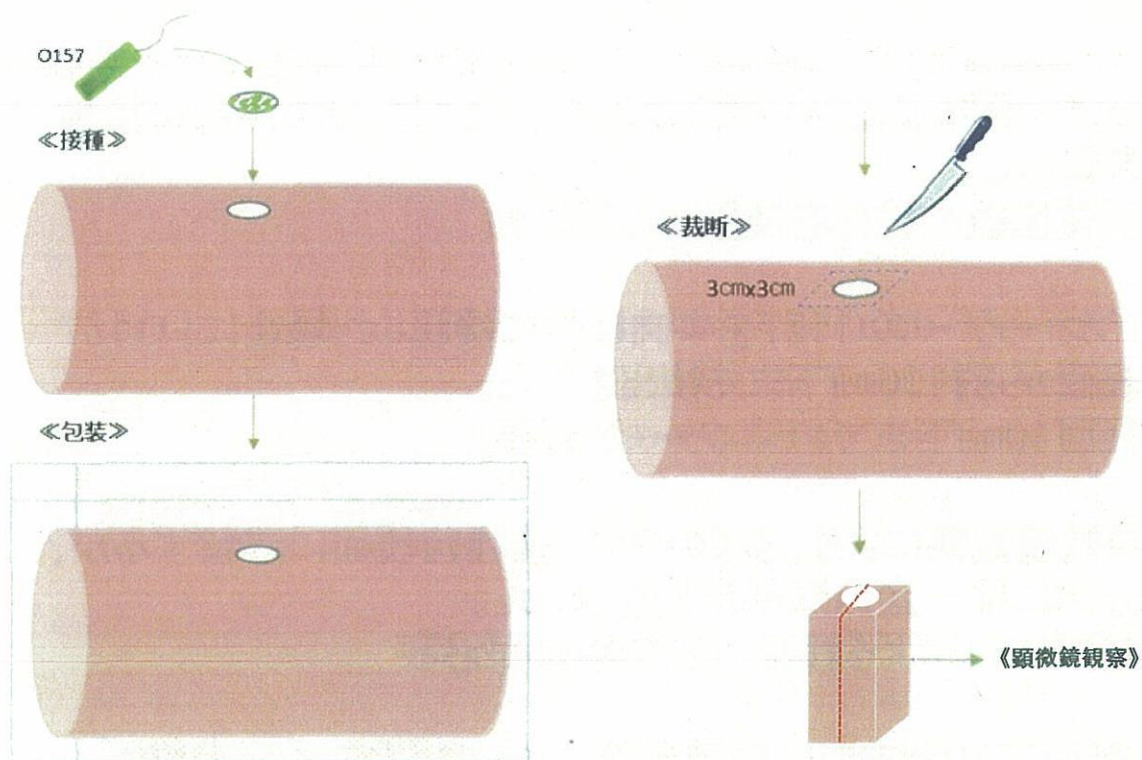
牛肉検体内へのO157浸潤性に関する検討フロー図



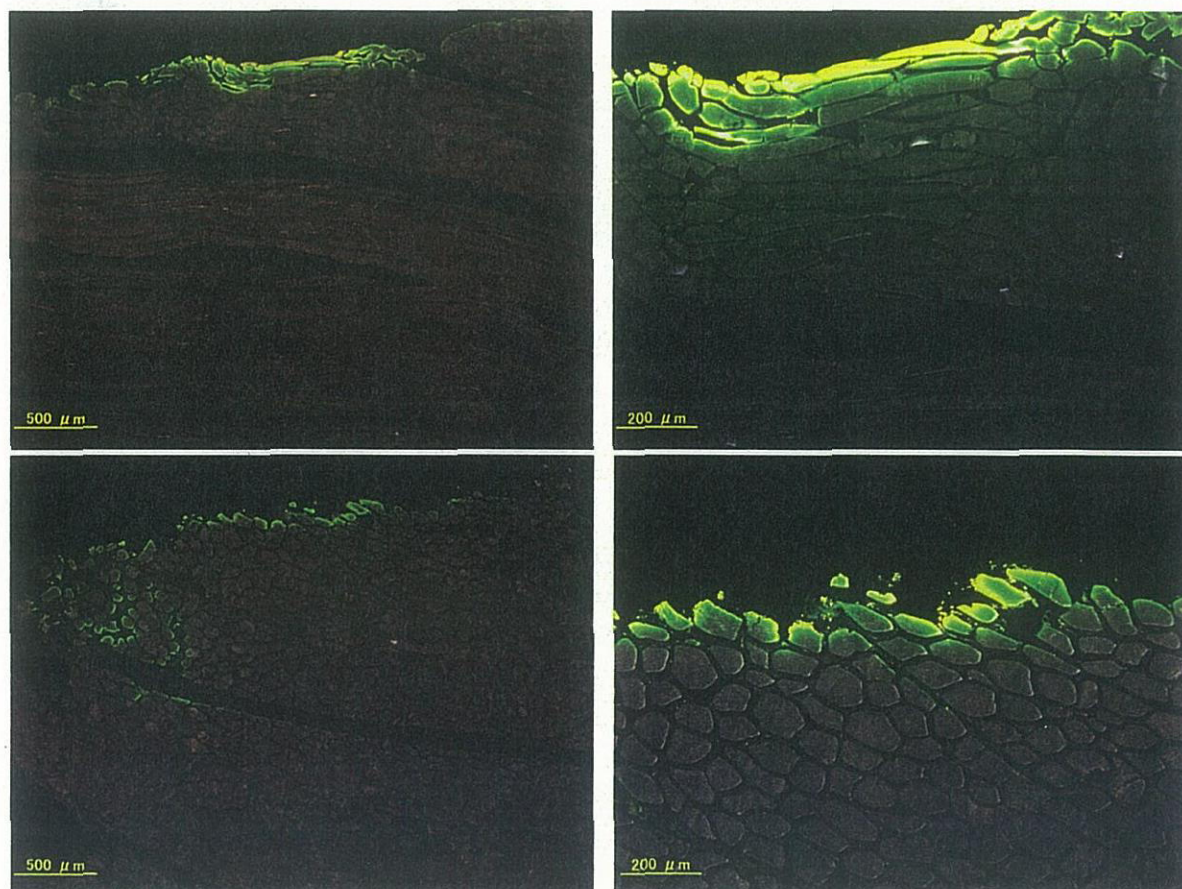
牛肉検体内へのO157浸潤性

解体後4日目検体									
接種菌数	部位	検体A	MPN/cm ³	検体B	MPN/cm ³	検体C	MPN/cm ³	標準偏差	標準誤差
3.4x10 ³ cfu/cm ²	表面ふきとり	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	0-5mm	3/2/0	20.67	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>169.85	>129.19
	5-10mm	2/0/0	2.04	2/0/0	2.04	0/1/0	0.67	1.58	0.79
	10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
	15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
3.4x10 ⁵ cfu/cm ²	表面ふきとり	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	0-5mm	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	5-10mm	3/0/0	5.11	3/1/0	9.56	3/1/0	26.67	13.78	11.38
	10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
	15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
解体後2週目検体									
接種菌数	部位	検体A	MPN/cm ³	検体B	MPN/cm ³	検体C	MPN/cm ³	SM	SD
3.2x10 ³ cfu/cm ²	表面ふきとり	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	0-5mm	3/2/0	20.67	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>169.85	>129.19
	5-10mm	2/0/0	2.04	3/2/0	20.67	0/1/0	0.67	7.79	11.17
	10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
	15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
3.2x10 ⁵ cfu/cm ²	表面ふきとり	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	0-5mm	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	5-10mm	3/3/0	53.33	3/1/1	16.67	2/1/2	6.00	25.33	24.83
	10-15mm	1/0/0	0.80	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0.71	>0.08
	15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
解体後4週目検体									
接種菌数	部位	検体A	MPN/cm ³	検体B	MPN/cm ³	検体C	MPN/cm ³	SM	SD
5.8x10 ³ cfu/cm ²	表面ふきとり	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/1	102.22	>197.03	>82.11
	0-5mm	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/2/3	64.44	>184.44	>103.92
	5-10mm	3/2/0	20.67	0/0/0	<0.67	2/2/0	4.67	<8.67	>11.67
	10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
	15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	<0.67	0.00
5.8x10 ⁵ cfu/cm ²	表面ふきとり	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	0-5mm	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	>244.44	0.00
	5-10mm	3/0/0	5.11	3/1/0	5.11	3/2/2	46.67	18.96	23.99
	10-15mm	3/1/0	9.56	2/0/0	2.04	0/0/0	<0.67	4.09	4.78
	15-20mm	3/1/0	9.56	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	3.63	5.13

牛肉凍結切片におけるGFP発現O157菌体の局在解析フロー



牛肉凍結切片におけるGFP発現O157菌体の局在



O157の牛肉内局在・浸潤度に関する検討に関するまとめ

1. O157添加回収試験において、解体後熟成の進んだ牛肉検体では、解体直後(4日後)の検体に比べて、より深部に接種菌を認めた。

→解体直後の検体を使用する優位性

2. 10^4 オーダーのO157を牛肉検体に接種した場合に、O157は表面から約10mm下まで検出された。

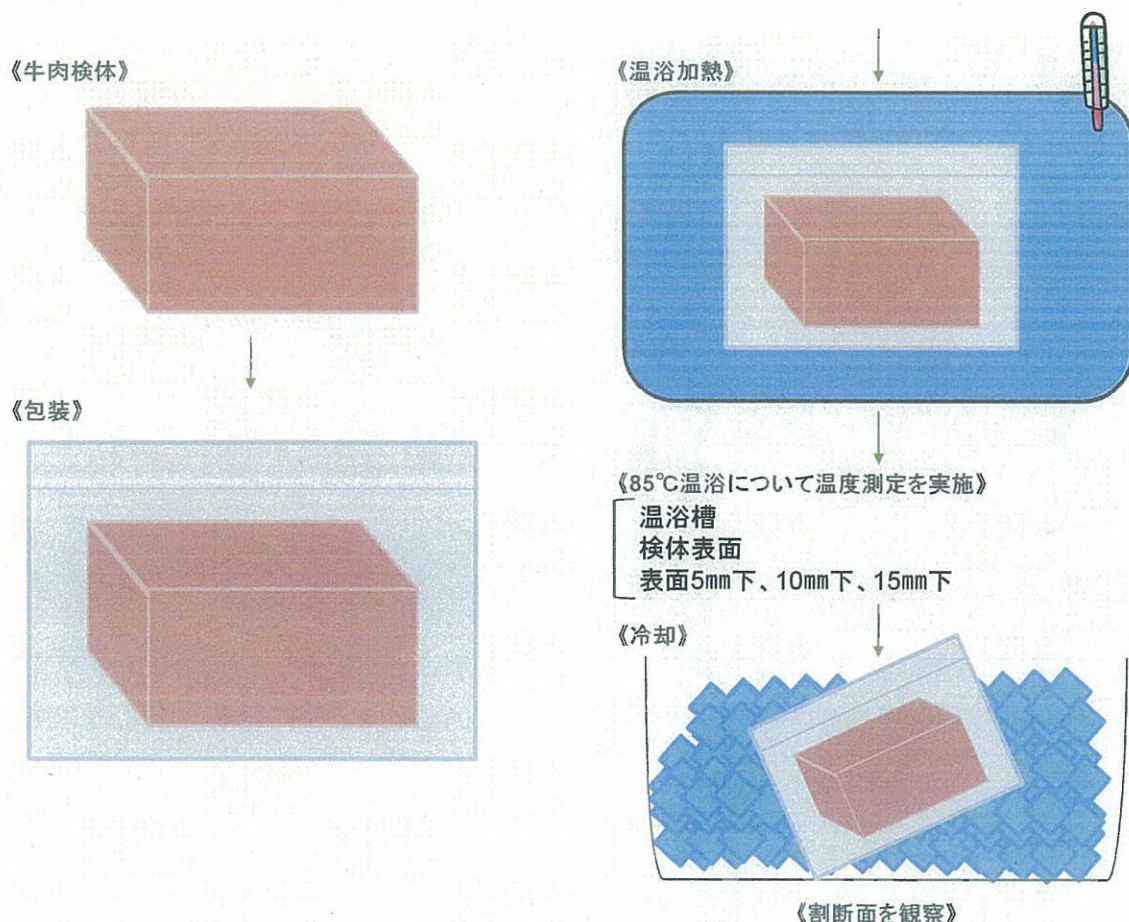
→表面10mm下までのモニターが必要

3. 顕微鏡観察により、多くのO157接種菌表面に滞留するが、部分的には一定の深部浸潤を示した。

→表面加熱による殺菌方法の検証が必要

➡ 表面下10mmまでの殺菌条件について提案する必要性

牛肉検体における温浴加熱条件検討フロー



温度条件の検討(加熱時間: 1分)

75℃

80℃

85℃



温浴加熱(85℃)・冷却後の牛肉検体割断面像

1分



3分



5分



10分



O157・SalmonellaのD値

最低内部 温度(°C)	最低内部温度に達してからの加熱時間(秒)	
	Salmonella	O157
57.2	327.93	400.93
57.8	260.48	303.80
58.4	206.91	230.20
58.9	164.35	174.43
59.5	130.55	132.17
60.0	103.70	100.15
60.6	82.37	75.89
61.1	65.43	57.50
61.7	51.97	43.57
62.2	41.28	33.02
62.8	32.79	25.02
63.3	26.05	18.96
63.9	20.69	14.36
64.4	16.44	10.88
65.0	13.06	8.25
65.4	10.37	6.25
66.1	8.24	4.74

10mm下から検出されたO157菌数

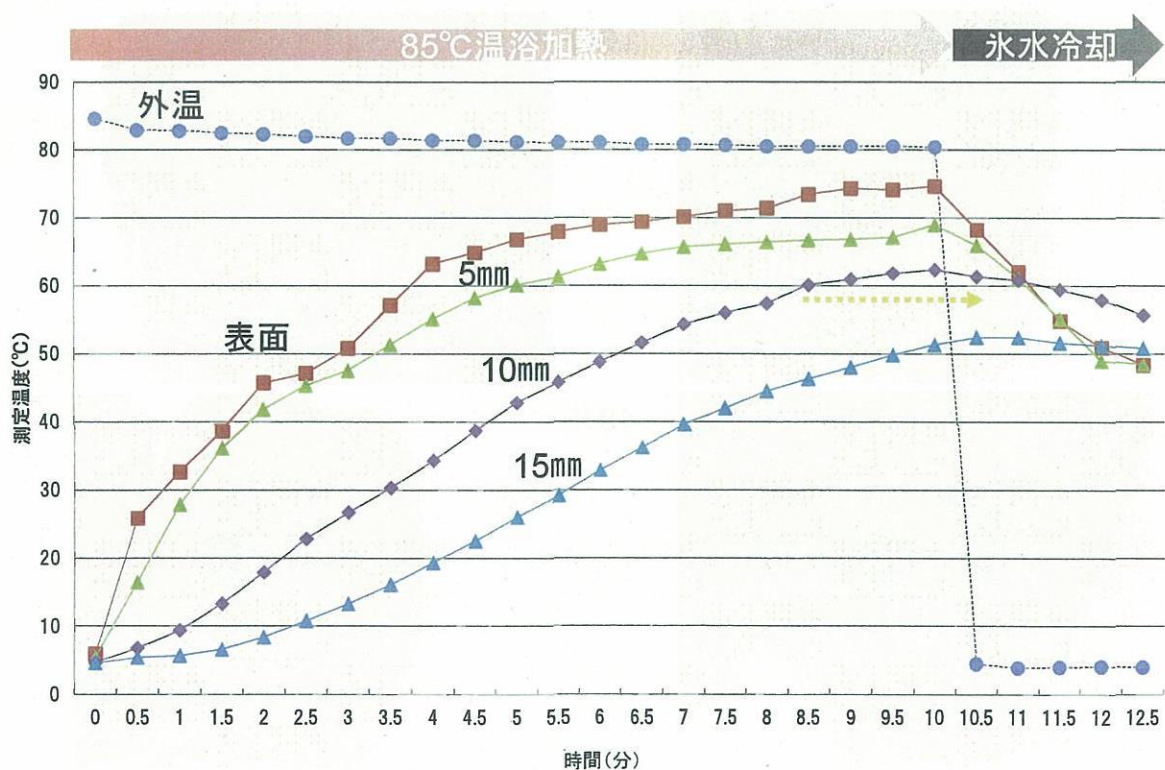
- ・解体直後: 1.58CFU
- ・解体後2週目: 7.79CFU
- ・解体後4週目: 8.67CFU



O157汚染防除には少なくとも、
D値に沿った加熱条件の設定
が必要

出典: HACCP: 衛生管理計画の作成と実践(データ編) 厚生省
生活衛生局乳肉衛生課監修

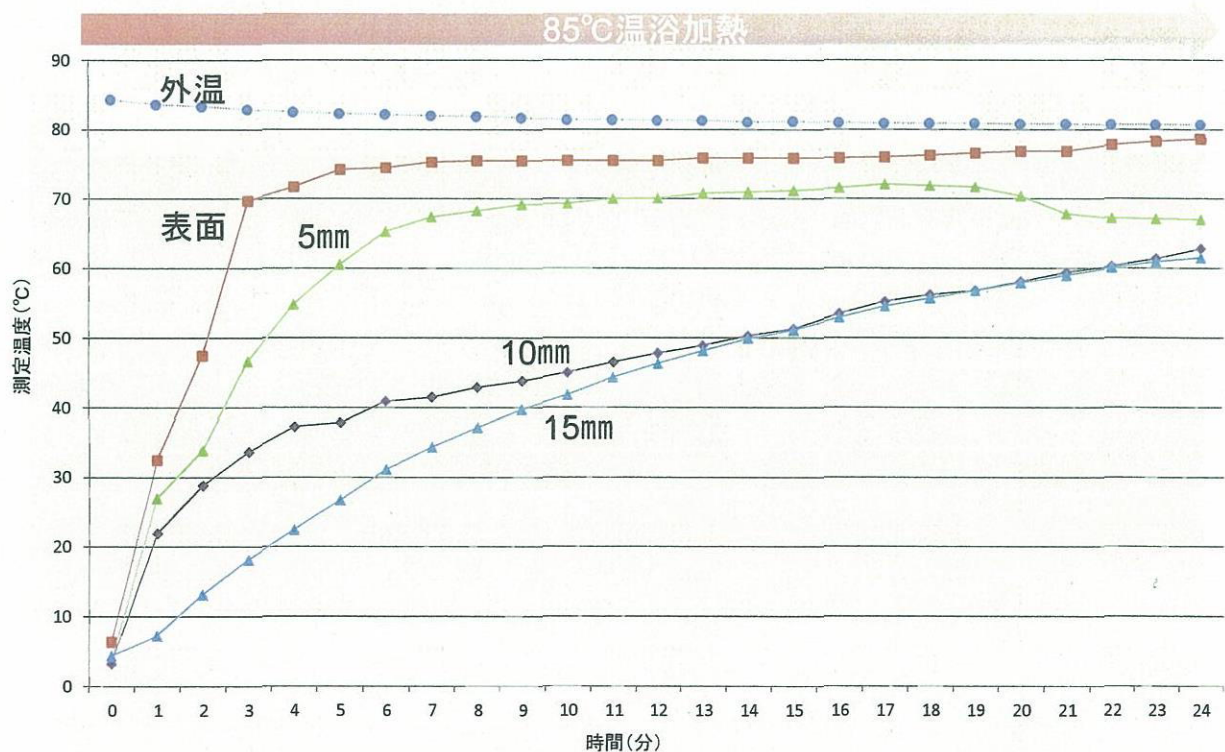
85°C温浴加熱による牛肉検体(約250g)中の温度変化



➡ 表面下10mmを60°C、2分加熱できる条件として85°C・10分加熱を設定

0分	検体A	MPN/cm ³	検体B	MPN/cm ³	検体C	MPN/cm ³
表面ふきとり	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44
0-5mm	3/3/1	102.22	3/3/3	>244.44	3/3/3	>244.44
5-10mm	1/0/0	0.8	1/0/0	0.8	2/0/0	2.04
10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
3分	検体A	MPN/cm ³	検体B	MPN/cm ³	検体C	MPN/cm ³
表面ふきとり	1/0/0	0.8	2/0/0	2.04	1/0/0	0.8
0-5mm	1/0/0	0.8	1/0/0	0.8	2/0/0	2.04
5-10mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
5分	検体A	MPN/cm ³	検体B	MPN/cm ³	検体C	MPN/cm ³
表面ふきとり	0/0/0	<0.67	1/0/0	0.8	0/0/0	<0.67
0-5mm	0/0/0	<0.67	2/0/0	2.04	0/0/0	<0.67
5-10mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
10分	検体A	MPN/cm ³	検体B	MPN/cm ³	検体C	MPN/cm ³
表面ふきとり	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
0-5mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
5-10mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
10-15mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67
15-20mm	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67	0/0/0	<0.67

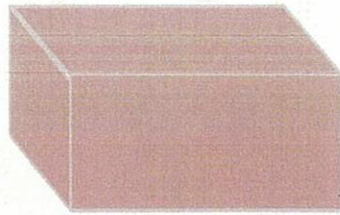
85℃温浴加熱による牛肉検体(約500g)中の温度変化



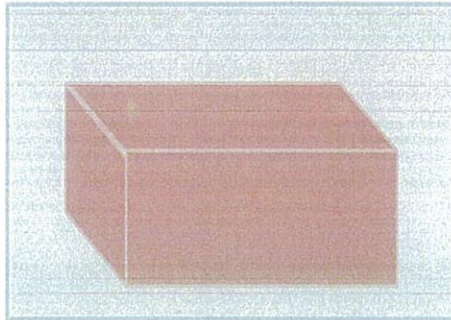
➡ 85℃、約24分加熱が表面下10mmを60℃、2分加熱できる条件として必要
(条件設定には検体要素が大きく影響する)

温浴加熱によるEnterobacteriaceae殺菌効果検討フロー

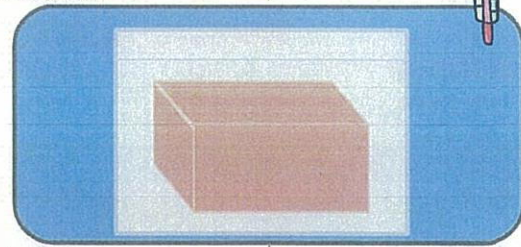
《牛肉検体》250-300g



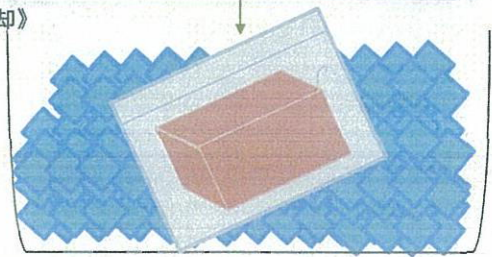
《包装》



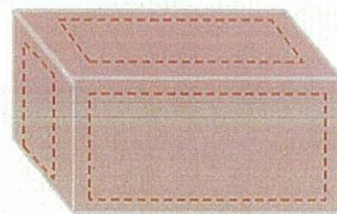
《温浴加熱》



《冷却》



《トリミング》表面下1-1.5cm



検査対象: 内部の肉検体(可食部と想定)

検査項目: Enterobacteriaceae, 一般細菌数

温浴加熱によるEnterobacteriaceaeの殺菌効果の検討

検体 種別	検体 番号	加熱処理 *の有無	一般細菌数	Enterobacteriaceae	
			(生菌数) (/g)	増菌培養法 (/25g)	混釈培養法 (/g)
シンタマ	1	+	<300	-	<10
	2	+	<300	-	<10
	3	+	<300	-	<10
	4	+	<300	-	<10
	5	-	8.7×10^2	+	<10
	6	-	5.4×10^2	+	<10
	7	-	7.2×10^2	+	<10
	8	-	<300	+	<10
内モモ	9	+	<300	-	<10
	10	+	<300	-	<10
	11	+	<300	-	<10
	12	+	<300	-	<10
	13	-	<300	-	<10
	14	-	<300	-	<10
	15	-	<300	+	<10
	16	-	<300	-	<10

* 加熱処理: 85℃・10分

温浴加熱に関するまとめと進行中の検討項目

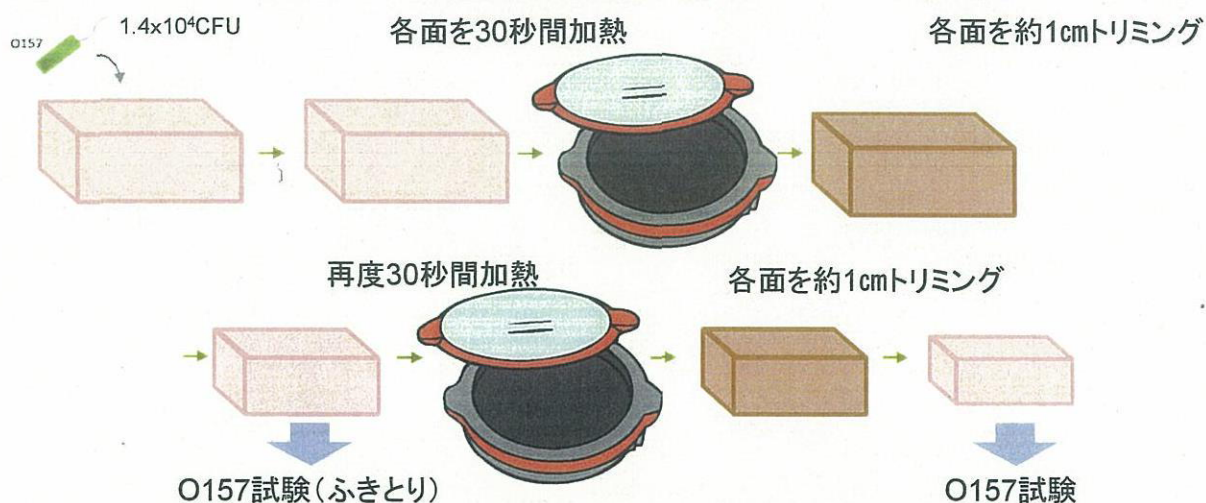
1. 約250-300gの牛肉ブロック検体においては、表面下10mmで、60℃・2分間の温度条件を満たす、加熱条件を85℃温浴にて検証
→85℃・10分として設定
2. ただし、これは牛肉検体のサイズが異なると大きく変動する要因である
→各機関における条件設定が必要である



現在検討中の課題

- ・ 約250-300gの牛肉ブロック中にO157・サルモネラ属菌を接種した場合の85℃・10分加熱条件による殺菌効果の検証
→Enterobacteriaceae, O157, サルモネラ属菌
- ・ 85℃・10分の加熱条件を適用した場合において、約250-300gの牛肉ブロック表面および内部における衛生度合の検証
→Enterobacteriaceae試験法(n=90程度)の検証も兼ねる

ホットプレートを使った加熱殺菌条件検討フロー(参考)



	検体A	検体B	検体C
温度			
鉄板表面	256.7	265.7	258.1
10mm下(15秒)	11.2	12.4	10.9
10mm下(30秒)	25.3	26.1	22.4
30秒加熱直後の外表面	95.8	93.8	96.1
30秒加熱直後の10mm下表面	94.9	95.5	97.1
O157検出試験			
10mm下からの検出(ふきとり)	+	-	-
20mm下からの検出(25gx3)	-	-	-

総括

1. 生食用として提供する牛肉は解体後、速やかに適切な工程管理を通じて表面および深部への汚染を低減できると思われる。
2. 牛肉表面10mm下における60℃・2分加温保持により、腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌の危険性を想定レベル以下に抑えると思われる。
3. 上記と同等以上の効果の得られる処理（たとえば表面を焼く）などを行うことも可能である。
4. 加熱殺菌処理の条件は、牛肉検体そして使用する加温機器・設備などにより異なるため、各機関において実効性を検証し用いること。