

財団法人伊藤記念財団

昭和59年度

食肉加工品特に非加熱並びに  
表面加熱肉製品の安全性確保に関する研究

大阪府立大学農学部

阪口玄二

財団法人  
伊藤記念財団

# ローストビーフの製造および保存時における ウェルシュ菌の制御に関する基礎的研究

## 目次

1. 緒言	
1. 1. はじめに	1
1. 2. 研究上の条件	2
2. ローストビーフの製造・保存時の温度変化	3
3. ウェルシュ菌の発育温度条件	
3. 1. 加熱によるウェルシュ菌芽胞の発芽促進	6
3. 2. 種々の温度におけるウェルシュ菌の世代時間	11
3. 3. ローストビーフの冷却時におけるウェルシュ菌の増殖	13
3. 4. ローストビーフの保存時におけるウェルシュ菌の増殖	16
4. ウェルシュ菌の加熱殺菌条件	
4. 1. 増殖型ウェルシュ菌の殺菌条件	18
4. 2. ウェルシュ菌芽胞の殺菌条件	20
4. 3. 肉汁中でのウェルシュ菌の型	21
5. 結語	
5. 1. 総合考察	23
5. 2. 勧告	31
参考文献	33
図・表	36



## 1. 緒言

### 1. 1. はじめに

ローストビーフは最もポピュラーな肉料理として、家庭料理の他、洋式宴会、テーブルサービスレストランのアイテム、ファーストフードレストランのサンドイッチの食材用に、広く行き渡っている。今後も、食生活の向上と共に、さらに需要の増大が予想される。ところで我が国では、食肉製品（乾燥食肉製品と非加熱食肉製品を除く）はその中心部分を 63℃で 30 分間加熱する殺菌法が義務付けられているが<sup>1)</sup>、このような加熱条件では良好な品質のローストビーフは製造できない。米国ではローストビーフの製造に関する規定が 1978 年に施行されている（1983 年改定）<sup>2)</sup>。製造・保存等の規定のない我が国では、ローストビーフは飲食店営業品として取り扱われているのが実情である。

欧米では、ローストビーフは、食中毒に最も頻繁に関与する食品の 1 つに挙げられている。例えば、米国では 1968 ～ 1977 年にローストビーフを原因食品とする食中毒が 226 件発生し、その中 47 件がウエルシュ菌食中毒であった<sup>3)</sup>。この件数はサルモネラ食中毒（35件）を凌いでいた。ローストビーフによる食中毒が多発する原因として、（1）原料肉がウエルシュ菌により汚染を受けていること、さらにピクル注入などの加工により肉塊内部にウエルシュ菌芽胞が侵入すること、（2）加熱により競合菌が死滅し、ウエルシュ菌芽胞が選択的に残存すること、（3）加熱によるヒートショックでウエルシュ菌芽胞の発芽が促進されること、（4）加熱によりローストビーフ内部がウエルシュ菌の発育に適した嫌気状態になること、（5）加熱及び冷却中にローストビーフがウエルシュ菌の発育に適した温度に置かれること、（6）ローストビーフは通常殺菌・静菌用添加物を用いずに製造されること、（7）製造十数時間～数日間放置後に喫食されることがあること、等が挙げられる。このような事実より、ローストビーフの製造・保管上で、ウエルシュ菌の制御は、食品衛生上極めて重要な課題とされている。

本研究は、文献を収集し、追試験あるいは新たな試験で必要なデータを集め、これらを基に考察を加えて、ローストビーフの製造・保存時におけるウェルシュ菌制御の方策を得、以って上記の課題に応えることを目的として実施した。

## 1. 2. 研究上の条件

### 1) 生牛肉のウェルシュ菌芽胞による汚染。

食中毒の原因となるエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌の汚染を受けていない生牛肉の確保は不可能である。ただし、汚染ウェルシュ菌菌数は僅かで、 $10^2/\text{g}$ を超えることは希である<sup>4)</sup>。さらに、汚染ウェルシュ菌に占めるエンテロトキシン産生菌の割合は、数%と低い<sup>5)</sup>。

2) ローストビーフの製造（加熱）中にウェルシュ菌芽胞を殺滅することは可能である。しかし、肉塊の表面部分の加熱を特徴とするローストビーフの、良好な品質を保持する加熱条件ではウェルシュ菌芽胞は殺滅できない。

### 3) ウェルシュ菌菌量の制御。

ウェルシュ菌食中毒の発病菌量は  $10^6/\text{g}$  以上と推測されている。これより逆算して、食品1グラムあたり  $10^4 \sim 10^5$  以上が危険域になる。食中毒発生に対する安全域を設定するのは不可能であるが、ローストビーフの製造から食卓に上がるまでの過程に、ウェルシュ菌菌量が生牛肉汚染菌量の1,000倍を超える製造・保存法であってはならないであろう。できれば品温管理により、ローストビーフ中のウェルシュ菌汚染菌量を初期汚染菌量以下に抑えたい。

## 2. ローストビーフの製造・保存時の 温度変化

### 目的：

ローストビーフの製造（加熱）・冷却時の温度変化を調べることにより、ウェルシュ菌の増殖に最も大きな影響を与える温度条件を把握する。

### 方法：

原料牛肉；おおよそ 0.5 ～ 5 kg にカットし、使用時まで -20 C に冷凍保存。実験に際しては、2 日前に冷蔵庫（4～5 C）に移し、解凍。

オーブン；コンベンションガスオーブン（リンナイ、RCK-10A）を使用。

図－1

### 結果および考察：

#### 2. 1

図 2.1 は、直径 10 cm、長さ 20 cm、重量 1.6 kg の牛肉塊を、150 C に設定したオーブンで、肉塊の中心温度が 60 C になるまで加熱した時の、肉塊各部の温度変化を示している。

熱伝導は肉塊の表面から中心部に向かって進むため、肉塊中心部は、肉塊を取り出した後も、しばらく温度が上昇し続ける。加熱時は、肉塊各部の温度は大きく異なるが、冷却時は、表面に近い部分を除いてはほぼ等しい温度変化をすることが分った。特に、ウェルシュ菌の増殖温度域である 50 C から 20 C の区間では、B, C, D の線は並行している。そのため、この温度域にある時間は、表面付近を除いてほぼ同じであると考えられる。

## 2. 2

表2.1 は、130 Cに設定したオーブンで、2 Cの種々の大きさの肉塊を中心温度 60 Cになるまでの時間を測定した結果をまとめたものである。同じ加熱条件で、肉塊が相似形で、内部の温度分布が同じであれば、中心温度が同一温度まで上昇する時間は、理論上重量の $(2/3)$ 乗に比例するから<sup>6)</sup>、表2.1 から

$$Y = 52.26 X^{2/3} + 69.17 \quad (r = 0.9599)$$

Y = 60 Cに到達するまでの時間 (分)

X = 肉塊の重量 (k g)

の関係式が得られた。

## 2. 3

150 Cのオーブンで加熱し、1.6 k gの肉塊を中心温度 60 Cに到達後取り出し、15 分間室温で放冷した後、4 ~5 Cの冷蔵庫内 (図2.2) あるいは-20 Cの冷凍庫内 (図2.3) で冷却時の温度変化を図にまとめた。

両者の差は 50 Cから明確になり、ウェルシュ菌の増殖温度域である 50 Cから 20 Cに要した時間は冷蔵庫内で 110 分、冷凍庫内で 85 分であった。2. 2で求めた式より一次回帰直線の傾きを求め、重両 X (k g) の肉塊の内部温度が 50 Cから 20 Cまでの冷却に要する時間 (Y分) の一次回帰直線式を求めると、

$$\text{冷蔵庫内放冷時: } Y = 29.85 X^{2/3} + 69.17$$

$$\text{冷凍庫内放冷時: } Y = 11.57 X^{2/3} + 69.17$$

となる。

## 小括

- 1) ローストビーフ製造時の温度変化は、肉塊表面から内部に向かって伝導されるので、中心部はオープンから取り出した後も温度の上昇が続く。
- 2) ローストビーフ冷却中、肉塊各部がウェルシュ菌増殖温度域である 50℃から 20℃に曝される時間は、速く冷却される表面付近を除いて殆んど同じである。
- 3) ローストビーフの加熱あるいは冷却に要する時間は重量の  $(2/3)$  乗に比例することから、理論上は一次回帰直線で求められる。

### 3. ウエルシュ菌の発育温度条件

#### 3. 1. 加熱によるウエルシュ菌芽胞の発芽促進

##### 目的：

冷蔵あるいは冷凍保管されている生牛肉を汚染しているウエルシュ菌は、多くが芽胞の型で休眠状態にあると考えられる<sup>7)</sup>。休眠状態の芽胞 (Spore) は活性化 (Activation)、発芽 (Germination)、発芽後成長 (Outgrowth) という過程を経て増殖型細胞 (Vegetative cell) になる。加熱が休眠状態のウエルシュ菌芽胞を活性化し発芽を促進することは周知の事実である。発芽・発芽後成長に続いて分裂・増殖が始まる。ウエルシュ菌芽胞が発芽するとウエルシュ菌の耐熱性は急激に低下する<sup>8)</sup>。発芽を促進するための加熱とは、細菌学では通常 70℃以上で 10～20 分程度の加熱処理をさす。ローストビーフ製造時にウエルシュ菌芽胞が曝されるであろう温度で、どの程度ウエルシュ菌芽胞が発芽を促進されるかは不明である。そこで、ローストビーフ製造時の加熱を想定し、ウエルシュ菌芽胞が 50～60℃に数十分曝された場合の、ウエルシュ菌制御上のプラス（発芽して耐熱性を失ったウエルシュ菌に対する殺菌）効果とマイナス（ウエルシュ菌芽胞の発芽促進）効果を分析する。

##### 方法：

図-2、図-3

## 結果および考察：

### 3. 1. 1

0.1% polypeptone saline 中で、ウエルシュ菌（H-3）芽胞を加熱した時の活性化の効果を調べた実験の結果を 図3.1.1 に示す。

ローストビーフ製造時にウエルシュ菌芽胞が曝されるであろう 60 C 程度でも 40 分間以上の加熱処理で、発芽を促進するために実験室内で通常行われる 75 C 20 分間の加熱処理と、ほぼ同程度の発芽促進（活性化）が、0.1% polypeptone saline 中で行われることがわかった。

### 3. 1. 2

挽き肉中で、ウエルシュ菌（H-3）芽胞を加熱した時の活性化の効果を調べた実験の結果を 図3.1.2 に示す。菌数は実数で示してある。

50 C 30 分の加熱で菌数は 1/2 程度に減少しているが、これは、栄養状態のよい肉中でウエルシュ菌芽胞が既に発芽し、耐熱性を失ったウエルシュ菌が存在するためと考えられる。加熱による活性化効果が生食中に比べて小さいのも、そのためであろう。

何れにしても、挽き肉中に於てウエルシュ菌芽胞は 60 C の加熱で活性化され、引続いて 5 時間加熱しても、ウエルシュ菌芽胞数は挽き肉中で減数しなかった。

3. 1. 1と3. 1. 2の2つの実験結果より、ローストビーフ製造工程中の加熱時に於て、ウエルシュ菌芽胞の活性化は避けられず、加熱によって芽胞数を減らすことは全く期待出来ない、との結論に達した（4. 2参照）。

### 3. 1. 3

次に、ローストビーフの製造を想定し、温度上昇中にウェルシュ菌芽胞が活性化される程度を調べた実験の結果を 図3.1.3 と 図3.1.4 に示す。

図3.1.3 は、ウェルシュ菌芽胞を接種した挽き肉を、20 Cから 60 Cまで、毎時 8 C、10 C、13.3 Cの割合で温度を上昇させた時の、それぞれの温度に於ける生菌数と芽胞数の変化を示している。

ここで見られる生菌数は、既に発芽していた芽胞の増殖、死滅による変化と考えられる。なぜなら、全過程を通して、耐熱性芽胞数はほとんど変化しておらず、変化のパターンが増殖型菌を接種した場合 (Willardsen et.al., 1978<sup>9)</sup>) と酷似しているからである。図 3.1.3. から、10 C/hまでの上昇率では、加熱が芽胞に与える影響はほとんどないことがわかる。しかし、8 C/hでは、いくらか活性化されるようである。

図3.1.4 は、ウェルシュ菌芽胞を接種した挽き肉を、芽胞が活性化される可能性の強い 50 Cから 60 Cまで、毎時 3 C、4.5 C、8 Cの割合で温度を上昇させた時の、それぞれの温度に於ける生菌数と芽胞数の変化を示している。20 Cから 50 Cまでは、8 C/hの上昇率である。

上昇率が小さくなると、増殖型菌は、致命的温度に曝される時間が長くなって死滅し、菌数（芽胞数）は、ほぼ最初の数にまで減少してしまう（4.5 C/h）。一方、休眠状態の芽胞は、55 C位から活性化され始める。芽胞数もこれに対応して減少し始める。3.0 C/hでは、死滅する菌数と活性化される芽胞数が、ほぼ同じたため、全体として生菌数に大きな変化が見られない。

結局、温度の上昇率が変わっても、最終的には、ローストビーフ中のウェルシュ菌生菌数に大差がなかった。但し、ローストビーフ中でウェルシュ菌芽胞が増殖型菌に変化し、異常増殖への態勢が備わったことを意味する。したがって、加熱調理以後のウェルシュ菌の増殖に対する温度管理はより厳重にする必要がある。その点に関する詳細な検討は、後章へゆずる。

### 3. 1. 4

芽胞が発芽すると、芽胞懸濁液の吸光度が減少することは、よく知られている<sup>10)</sup>。それを利用してウエルシュ菌芽胞の発芽を観察した結果を、図3.1.5に示す。

ウエルシュ菌芽胞は、60℃40分間加熱し、それぞれの温度へ移し、O.D.の減少を経時的に追跡した。図3.1.5より、活性化されたウエルシュ菌芽胞の発芽は、50℃以上ではほとんど起こらず、45℃前後が最適で、30℃でも起こることがわかった。

このことより、ウエルシュ菌芽胞は、増殖型菌にとって致死的な55℃以上の高温では活性化はうけても発芽せず、ローストビーフ製造中に発芽して易熱性になったウエルシュ菌が熱で死滅するということはない、と推察された。又、発芽は、広い温度帯で速やかに起こるため、調理したローストビーフの冷却過程中に、活性化されたウエルシュ菌芽胞が発芽するということも避けられないであろう、ということもわかった。

### 3. 1. 5

活性化、発芽、発芽後成長、増殖を総括してしらべた結果を 図3.1.6に示す。ウエルシュ菌芽胞をTGC培地に接種し、60℃40分間加熱した後、25℃、37℃、46℃で培養したものである。黒塗りは生菌数、白抜きは耐熱性を示す。耐熱性は、次の式より求めた。

$$\text{耐熱性} = \frac{(\text{60℃5分加熱後の残存菌数})}{(\text{生菌数})}$$

46℃、37℃では、2時間目までは、生菌数はほとんど変化していない。この間が、発芽、発芽後成長の時期であろう。2時間目には、菌は完全な増殖型となり、対数増殖期に入ることがわかる。一方、耐熱性は、発芽によりいくらか下がり、発芽後成長

中（1～2h）はほとんど変化せず、対数増殖期に入ると大きく減少するのが観察された。また、25℃では菌数、耐熱性ともに変化なく、5時間までは、対数増殖期に入らないことが示された（冷却中の菌数の変化については、3.3参照）。

#### 小括

- 1) ローストビーフ製造中におけるウェルシュ菌芽胞の活性化は、避けられない。
- 2) ローストビーフ製造中において一過性の加熱ではウェルシュ菌制御上のプラス（発芽して耐熱性を失ったウェルシュ菌に対する殺菌）効果は期待出来ない。
- 3) ローストビーフ製造中におけるウェルシュ菌芽胞の活性化にともなう、ウェルシュ菌菌数の増加は 10 倍以下であった。

### 3. 2 種々の温度におけるウェルシュ菌の世代時間

#### 目的および方法：

文献考察からウェルシュ菌の種々の温度における世代時間を整理し発育の程度を把握する。

#### 結果および考察：

ウェルシュ菌の世代時間は、菌株、培地、酸化還元電位、温度、競合菌の有無等によって違ってくる。又、ウェルシュ菌のライフサイクルは芽胞形成以外に、誘導期、対数増殖期、静止期、死滅期、生存期という過程を経、当然、それぞれの時期によって世代時間は異なる。

ローストビーフ冷却時には、発芽したウェルシュ菌が対数増殖期にはいる。この時期が最も世代時間が短い。また、加熱した肉中というのは、ウェルシュ菌にとって最良の増殖環境であることも考慮しなければならない。

ウェルシュ菌の世代時間は Smith<sup>11)</sup>をはじめ多くの研究者が測定している。例えば、Willardsen ら (1978<sup>9)</sup>) は 8 株について、挽き肉中での世代時間を調べたが、その中で最も短かったのが NCTC 8238 株であった。その世代時間を表3.2 に示す。41 Cでは、世代時間がわずか 6.9 分であり、1 個の菌が  $10^6$  個になるまで約 140 分しかかからないことを示している。また、彼らは、特に、温度の上昇率を変えたときの、挽き肉中での世代時間を測定した。ウェルシュ菌の増殖が観察された 35 C から 52 C までの間の平均世代時間は、上昇率によって異なるが、一番短くて 13 分 (6, 7.5 C/h) であった。原料肉が  $10^2$ /g のウェルシュ菌汚染を受けていたとして、 $10^6$ /g になるのに要する時間は約 170 分である。増殖型菌は、易熱性で 52 C 以上になると減少するので、肉塊中で  $10^6$ /g 以上になっても必ずしも危険というわけではない。しかし、後の殺菌を考える場合、菌数は少ないに越したことはない。

世代時間を考える場合、重要なのは冷却時においてである。Shigehisa ら (1985)<sup>12)</sup> は、挽き肉に活性化した芽胞を接種し、60 Cから 15 Cまで温度の下降率を変えた時の菌数の変化を見ている。芽胞は 50 C付近で発芽し、発芽後成長に 1 時間程度要しているため、増殖開始温度は下降率によって異なっている。但し、25 C以下では、増殖は起こっていない。彼らの実験結果から、増殖開始点から 25 C までの世代時間を求めると、10 C/hで 11.7 分、7.5 C/hで 9.1 分、5 C/hで 26.0 分である。最も短い 9.1 分で考えた場合、 $10^2/g$  が  $10^6/g$  が増えるのに必要な時間は約 120 分、これに発芽後成長の時間 60 分を加えて、180 分以内に 50 C から 25 C に冷却すれば安全圏内ということになる。これを 2. の式から逆算すると、ローストビーフを冷蔵庫内で冷却する場合、7 kg 以下の肉塊であれば、製造可能となる。

#### 小括

- 1) 加熱時は、35 Cから 52 Cに 170 分以上曝さないことが望ましい。
- 2) 冷却時は、50 Cから 25 Cに 180 分以上曝さないことが望ましい。

### 3. 3      ローストビーフの冷却時におけるウェルシュ菌の増殖

#### 目的：

ローストビーフ製造後、冷却中にウェルシュ菌の増殖は避けられない。その理由は、大きなローストビーフ肉塊を急冷することが困難なため、ローストビーフ中の活性化されたウェルシュ菌芽胞が、発芽、発芽後成長、増殖に適した 50 ～ 20 ℃ の温度に曝される時間が長くなるからである。したがって、ローストビーフの冷却中のウェルシュ菌の増殖の程度を把握しておくことは、ローストビーフのウェルシュ菌制御上重要な課題である。そこで、実際にローストビーフを製造し、異なった温度条件下で冷却した場合のローストビーフ中でのウェルシュ菌の消長をしらべた。

#### 方法：

図－4

#### 結果および考察：

##### 3. 3. 1

ウェルシュ菌芽胞を接種した肉塊（530g）をオーブンで中心温度 60 ℃ まで加熱した後、室温で放冷した時の、ローストビーフの中心温度およびローストビーフ中の生菌数と芽胞数との経時的变化を記録し、図3.3.1 に示す。データに多少のばらつきがあるが、次の様な傾向が認められよう。

室温、冷蔵共に、冷却開始 60 分後頃からウェルシュ菌菌数が増え始める。この時点までの両者の温度変化は、大差はない。ローストビーフの温度が 50 ℃ 以下に到達した時点で発芽した芽胞が増殖し始めたもので、発芽から増殖までわずか 30 分しか

かかっていない。図3.1.6 のデータと比べると、ローストビーフ中ではウエルシュ菌芽胞の活性化～増殖の過程がかなり早く進んでいると、言える。25℃付近になると増殖は急に鈍る。60分目以後から、室温放冷と冷蔵庫内放冷の間に5℃以上の温度差が現れ、より早く25℃以下まで下げられる冷蔵庫内放冷の方が、ウエルシュ菌の増殖が軽減した。

この実験では、増殖温度域である50～25℃に曝された時間は、わずか60分であったので、菌はそれほど増殖していない。しかし、世代時間は最も短いもので13分であった。また、発芽後成長の時間は30分であった。以上より、 $10^2/g$ の芽胞汚染があったとして、50℃から25℃に200分以内に冷却すれば、一応安全圏であるといえる。

芽胞数については、60分まで徐々に減り、以後は、そのままの数が維持されると判断される。

### 3.3.2

図3.3.2 は図3.3.1 と同様の実験で、横軸に温度をとってある。中心温度が、45℃、50℃、55℃または60℃に達した時点で肉塊を取り出し、室温（約20℃）で放冷した。肉塊の中心温度は、既述のように、取り出した後も上がり続け、オープンより取り出したときの温度よりも高くなる。

45℃、55℃の線が、一旦下降している理由は不明である。どの条件でも、40℃から25℃の間10倍から100倍のウエルシュ菌の増殖が見られ、25℃以下になると、それ以上の菌の増殖は起こらなかった。但し、活性化の効果の少ない45℃の加熱では、50℃以上で加熱したローストビーフ中にくらべて増殖が遅れた。また40～50℃では、増殖が起こらないのではなく、発芽、発芽後成長をしている間にその温度帯を過ぎてしまっただけであろう。従って、本実験は、ローストビーフの冷却過程中40℃以上であれば安全であるという結論を示しているわけではない。

## 小括

- 1) 加熱をやめた時の肉塊の中心温度と、冷却時の菌の増殖の間には、特に関係がない。
- 2) 冷却時は、50℃から25℃に200分以内に冷却する必要がある。但し、実際には、安全時間を見込んで、これより短くすることが望ましい。

### 3. 4   ローストビーフの保存時におけるウェルシュ菌の増殖

#### 目的：

前章までの実験結果より、ローストビーフの保存の温度条件は、衛生管理上最も重要であることが、わかった。現在、我が国で採用されている各種食品の保存温度は、冷凍（－ 15 C）以下、冷蔵（ 10 C 以下）、及び常温である。ここでは、ローストビーフをそれぞれの温度に保存し、そのときの菌数の変化を調べた。

#### 方法：

図－ 5

#### 結果：

図3.4 は、ウェルシュ菌芽胞接種後、中心温度を 54 C 又は 60 C まで加熱したローストビーフを、－ 20 C、10 C、15 C、25 C で保存したときの、生菌数の変化を示している。尚、グラフ化していないが、芽胞数は、いずれの温度で保存した場合にもほとんど変化が見られなかった。

3. 3と同様に、中心温度の違いによる差は、見られない。図3.4 より明らかなように、冷蔵（ 10 C）したものは 14 日目、冷凍（－ 20 C）したものは 49 日目でも、ローストビーフ中のウェルシュ菌菌数は変化していない。しかし、 25 Cで保存したローストビーフ中では、通常、肉を汚染している可能性のある  $10^2$  程度の菌数が、4 日目までに食中毒発生可能な  $10^6$  以上に増殖した。15 C以下の食品中でウェルシュ菌は増殖しないと言われているが、本実験では 4～6 日目までに顕著な増殖がみられた。このことは、15 C以上でのローストビーフの保存が、極めて危険であることを示している。

## 小括

製造したローストビーフを保存する場合（輸送経路を含む）は、以下のいずれかを実行する必要がある。

- 1) 冷却した製品については、10℃以下で冷蔵保存する。
- 2) 冷却工程を経ずにそのまま温蔵する製品については、中心温度 55℃以上を保つ。

## 4. ウエルシュ菌の加熱殺菌条件

### 4. 1 増殖型ウエルシュ菌の殺菌条件

#### 目的：

ローストビーフ製造時におけるウエルシュ菌制御において、冷却が最も重要な要因であることは、既述のとうりである。活性化された芽胞は、発芽、発芽後成長という過程を経るため、発育可能な温度帯になっても、直ちに増殖を始めるわけではない。しかし、増殖型菌は、発育可能な温度帯になると、直ちに増殖を始める。

ウエルシュ菌の発育至的温度は、47℃から43℃と他の一般的細菌にくらべて高い。しかも、世代時間は10分以下と、発育は極めて旺盛である。僅かな菌量による汚染といえども、ローストビーフの製造後の冷却に長時間をとれば、食中毒に結びつく菌量に達する可能性がある。従って、加熱時に増殖型菌を完全に死滅させる必要がある。

そこで、増殖型ウエルシュ菌の加熱殺菌の条件（D値、Z値）を求めることによりローストビーフ製造時に増殖型ウエルシュ菌を死滅させる可能性を検討した。

#### 方法：

図-6

#### 結果および考察：

表4.1.1は、食中毒株5株について、耐熱性を比較したものである。この中の、耐熱性の強い3株について、D値、Z値を求めた。

図4.1.1は、縦軸にD値、横軸に温度をとったものである。傾きは、Z値を示す。

更に、最も耐熱性の強いH-3株について、挽き肉中でのD値、Z値を求めた。黒塗りがそれを示す。培地条件が違うと、例えば、60℃におけるD値は、1.3分から10分前後へと、約10倍にもなってしまい、肉中での増殖型ウェルシュ菌の完全殺滅の困難さを示した。

食品が、完全に安全であると言えるためには、菌数を $1/10^{12}$ にするような殺菌(12D)が必要とされている<sup>13)</sup>。しかしウェルシュ菌に関しては、牛肉の汚染度から考えて、5Dでも十分安全ではないかと思われる。参考までに、図4.1の回帰直線より求めた値をもとに、各温度におけるD値、6D、12Dを、表4.1.2に示す。

牛肉を60℃で7時間加熱しても、品質に変化を生じないという報告がある<sup>14)</sup>。従って、ローストビーフ製造時に、増殖型ウェルシュ菌を全て死滅させることは、可能といえる。

尚、3.3、3.4の実験において、芽胞のみを用いたのは、本実験の結果をふまえた上でのことであることを、つけ加えておきたい。

#### 小括

- 1) 増殖型ウェルシュ菌のD値、Z値は菌株によって異なる。
- 2) 増殖型ウェルシュ菌のD値は環境に左右され、肉汁中では生食中に比べ、約10倍大きい値を示した。
- 3) 60～65℃の肉汁中における増殖型ウェルシュ菌 NCTC 8239 株のD値は、10分程度以下であった。

## 4. 2 ウエルシュ菌芽胞の殺菌条件

### 目的：

ウエルシュ菌芽胞殺菌の困難さは、既に3. 1で述べた。ここでは、芽胞のD値、Z値求め、ローストビーフ製造過程において、ウエルシュ菌芽胞殺菌の可能性を検討した。

### 方法：

図-7

### 結果および考察：

図4.2 は、DS培地中で形成されたH-3芽胞を生食中で加熱し、D値を求めたものである。傾きはZ値を示し、Z値は 8.66 であった。

この結果より、例えば、芽胞数を  $1/10^6$  に減らすには、90℃で 191 分、95℃で 53 分、100℃で 15 分の加熱が必要ながわかった。中心温度をこれらの温度に曝すことは、ローストビーフの品質に悪影響を与えるので実行不可能である。従って、ローストビーフ製造時に、芽胞を死滅させることは不可能である。

### 小括

ローストビーフ製造時に、ウエルシュ菌芽胞の完全な滅菌は望めない。

#### 4. 3 肉汁中でのウェルシュ菌の型

##### 目的：

ローストビーフ調理時に肉塊からしみ出る肉汁（Jus）は、調理後も肉に付着し続けるのみならず、グレービーソースの材料としても用いられる。グレービーソースは澱粉を含むため、冷却するとゲル状となり<sup>15)</sup>、それ自身嫌気状態になる。したがって肉汁はウェルシュ菌の発育の好個場となり、更には他の製品への二次汚染源となる。肉汁は、肉の外側と同じ 80℃ 以上に曝されるため、その中に含まれる増殖型ウェルシュ菌は完全に死滅する。一方、ウェルシュ菌芽胞はほぼ 100% 活性化をうけるものと考えられる。肉汁中のウェルシュ菌芽胞も肉中の芽胞と同じく、発芽、発芽後成長、増殖という過程を経る。肉汁は肉塊と違い、加熱、冷却が容易に出来る。そのため、ウェルシュ菌芽胞が肉汁中で、芽胞か増殖型かのいずれの型をとるのか知ることが出来れば、ウェルシュ菌の型に応じた殺菌法、管理法をとることが比較的容易に行える。

また、芽胞がローストビーフ中で優勢な場合には、食中毒の原因となるエンテロトキシンが形成されている可能性がある<sup>16)</sup>。

このような観点から、肉汁中のウェルシュ菌の型を知ることがウェルシュ菌制御上重要と考え、本実験を行った。

##### 方法：

図-8

## 結果および考察：

表4.3.1 は、肉汁にウエルシュ菌増殖型菌を接種し、それぞれの温度で培養したときの芽胞形成率を示したものである。尚、肉汁は滅菌していないが、結果に影響を及ぼすようなウエルシュ菌芽胞汚染はなかった<sup>17)</sup>。

肉汁中でのウエルシュ菌の芽胞形成率は 37℃ で最も高く、4℃ では芽胞はほとんど形成されなかった。従って、10℃ 以下の冷蔵保存では、芽胞形成は起こらず、発芽し増殖型となったウエルシュ菌は増殖型のままで保存されているものと思われる。

本実験で得られた芽胞のD値、Z値を求めたものが、表4.3.2 である。肉汁中で形成されたウエルシュ菌芽胞はDS培地中で形成された芽胞に比較して耐熱性が大きいことが分った。従って肉汁中で芽胞を形成させると、ウエルシュ菌の殺滅が困難になるので、芽胞形成は、出来るだけ阻止することが望ましい。そのためには、ローストビーフを 35～42℃ に長時間曝さないことである。

### 小括

- 1) 肉汁中で増殖したウエルシュ菌はほとんど全て増殖型であった。
- 2) 肉汁中にウエルシュ菌食中毒の原因となる量のエンテロトキシンは、産生されなかった。
- 3) 肉汁中のウエルシュ菌の制御は、加熱（出来れば煮沸）で容易に達成出来ることがわかった。

## 5. 結 語

### 5. 1 総合考察

Bryan が行った、1973 ～ 1976 年に米国で発生したウエルシュ菌食中毒の原因分析を 表5.1. に示す<sup>14)</sup>。ローストビーフの食中毒発生の各国共通の原因が反映されていると考えて差し支えない。この原因分析を踏まえて、以下にローストビーフのウエルシュ菌制御上必要な事項について、本研究で取り上げなかった項目も含めて、総合的に考察する。

#### 5.1.1. ローストビーフの加熱調理以前の段階におけるウエルシュ菌の汚染と増殖

牛生体中の筋肉各部は無菌であるから、原料牛肉はウエルシュ菌の汚染を受けていない筈である。そして、ローストビーフは元来、加熱調理以外の工程の少ない調理法で、ウエルシュ菌の汚染と増殖要因が殆んどなく、加熱殺菌効果で無菌状態になっていると、一部では誤って理解されている。ウエルシュ菌は自然界に常在し、健康な牛の腸内容物中にも棲息する。そのため原料牛肉を汚染する機会が多く、事実、各種調査は、牛生肉が高率にウエルシュ菌の汚染をうけていることを明らかにしている。幸いなことに、汚染菌量は極めて少なく、 $10^2/\text{g}$  以下である。ウエルシュ菌食中毒の発生には、 $10^4/\text{g}$  以上の大量の、旺盛に発育しているウエルシュ菌を必要とする。製造工程から喫食までの間に汚染ウエルシュ菌が異常に増殖して始めて食中毒が起こる。とは言え、原料牛肉は、器具や作業者の手指および製品に対する二次汚染源にもなるので、取り扱いには特に衛生的な配慮をする必要がある。

調理・整形・網かけ時の交叉汚染は避けきれないが、汚染が表面部分にとどまる限りは衛生上問題にならない。テンダライジング、折り畳んでの整形、あるいはサーマルピン（焼串）や温度計の挿入等で、表面あるいは器具に付着していたウエルシュ菌を肉塊の深部へ導入してしまうことが危険となる。肉塊の深部は、ウエルシュ菌の増殖にとって好ましい嫌気環境にあり、加熱調理時に熱が到達しにくいので殺菌力も弱

いからである。これら人為操作以外に、頻度は低いが、大きな筋肉塊で、その中にリンパ組織が含まれている場合にも深部汚染を警戒しなければならない。リンパ組織は筋肉に比べてウエルシュ菌を含む率が著しく高い。以上のように、ウエルシュ菌による肉塊の深部汚染の有無は、ローストビーフのウエルシュ菌制御上極めて重要な要因である。

原料牛肉中ではウエルシュ菌の発育は、解凍工程を含めて、まず起こらないと考えてよい。逆に、増殖型ウエルシュ菌は長期間の冷凍・冷蔵中に徐々に死滅する<sup>1)</sup>。従って、冷凍・冷蔵に耐えるウエルシュ菌芽胞の制御が相対的に重要になる。

#### 小括

- 1) 原料生牛肉のウエルシュ菌汚染は高率である。しかし汚染菌量は少ない。
- 2) 原料生牛肉は、それ自身ウエルシュ菌の汚染源であると同時に、器具や作業あるいは製品に対する二次汚染源になるので、原料生牛肉の隔離・区分等の取り扱い上の配慮が必要である。
- 3) 輸送・保蔵段階においてはウエルシュ菌の増殖はない。長期保蔵中には増殖型ウエルシュ菌は減数し、相対的に芽胞の比率が上がろう。
- 4) 肉塊深部（中心部）のウエルシュ菌汚染はローストビーフのウエルシュ菌制御上重要な意義がある。

### 5.1.2. ローストビーフの加熱調理段階におけるウェルシュ菌の殺菌と増殖

肉塊をオーブンに入れてからスイッチを切るまでの加熱調理段階におけるウェルシュ菌の増殖について先ず考察する。

表2.1 や図2.2 が示しているように、2～10 Kg 程度の肉塊を130～150 C のオーブンで中心温度が 60 C に達するには 2～5 時間がかかる。その間ローストビーフはウェルシュ菌の増殖可能温度域に 1～3 時間は曝される。表3.2. 等の世代時間と加熱時間とから算出すると、35～52 C に 170 分以上は曝さないことが望ましいことになる。この値はウェルシュ菌が増殖に対して最良の状態を想定したもので、解凍後あるいは冷蔵されていた原料を汚染しているウェルシュ菌に、そのまま当てはめることは出来ない。芽胞では、活性化、発芽、発芽後成長に数十分を要し、増殖型ウェルシュ菌でも対数増殖期に入るまでには相当の時間を必要とする。従って、現実のローストビーフの加熱調理段階におけるウェルシュ菌の増殖は無視し得るものであろう。

ついで、加熱調理段階におけるウェルシュ菌の殺菌について考察する。無芽胞食中毒細菌に対する加熱殺菌の期待は大きい。各国の勧告等も加熱時の中心温度を定めている<sup>17)</sup>。

食肉蛋白の柔軟性は 64 C 以上の加熱で急速に損なわれる<sup>18)</sup>。ローストビーフにレアからミディアムを期待する場合、65 C 以上の温度を長時間かけることは出来ない。従って、ローストビーフの良好な品質を保てるような温度条件ではウェルシュ菌芽胞に殺菌は不可能である。3. 1で既述のとおり、逆に、加熱により休眠中のウェルシュ菌芽胞が活性化され、その後の冷却・保存時に異常増殖をもたらすのではないかと懸念されたが、活性化に伴う実際の菌数増加は 10 倍以下であった。

計算上増殖型のウェルシュ菌H-3株の菌数を 1/10 にするのに、60 C で 9.8 分、65 C では 3.2 分である。したがって、ローストビーフの中心温度を 60 C に達するまで加熱すれば、その後数度の温度上昇が見込めることもあり、かなりの数のウェルシュ菌の殺滅が期待できる。加熱による芽胞の活性化というマイナス要因を加味しても、実際にローストビーフで行なわれた実験で、肉塊の中心温度を 60 C まで加熱

することにより、汚染ウエルシュ菌をかなりの程度殺滅できることが、本研究および Shigehisa ら<sup>12)</sup> のデータで証明されている。Smith ら<sup>13)</sup> は 60 C までの加熱で、2.02~5.10 Log reduction (約 1/100~1/100,000 に減少) を報告している。

#### 小括

- 1) ローストビーフの加熱調理段階におけるウエルシュ菌の増殖は無視できる程度のものである。
- 2) 加熱調理はウエルシュ菌芽胞に対して殺菌効果はない。むしろ休眠中のウエルシュ菌芽胞が活性化されるマイナス要因である。このマイナス要因を加味しても、
- 3) 肉塊の中心温度を 60 C まで加熱することにより、汚染ウエルシュ菌をかなりの程度殺滅できる。

### 5.1.3. ローストビーフの加熱調理段階以後におけるウェルシュ菌の殺菌と増殖

#### 保温と温蔵：

食肉蛋白の柔軟性喪失は、加熱温度に比らべ加熱時間の影響は少ない。即ち、64 C 以上では急速に固くなるが、64 C 以下では多少加熱時間が延びても蛋白の柔軟性は維持される。中心温度が 60 C に達した後の保温は 64 C 以下であればかなり長時間許容されよう。

増殖型ウェルシュ菌の肉汁中でのD値は 60 C で 10 分内外、65 C では 3 分前後である（図4.1）。したがって、中心温度が 60 C に達した後も ローストビーフを 60 C 以上に維持することはウェルシュ菌の殺滅に対して極めて有効な手段である。温度と時間との関係は Time Temperature ( TT ) Combination で推定できる。米国では、ローストビーフの製造基準の加熱温度の項目に TT Combination を採用している。L T L T (Low Temperature Long Time) クッキングに対しては TT Combination を採用する必要があるだろう。なぜなら、コンベンショナルなオープンでのローストと異なって、中心温度が 60 C に達した後の温度の上昇が期待できないからである。

ローストビーフを調理後直ちに喫食すれば、食中毒の懸念は皆無である。温蔵の場合、理論上はウェルシュ菌の発育が不可能な 52 C 以上にローストビーフを保つとよい。しかし、温度調節装置の欠陥、扉の頻繁な開閉あるいは庫内温度分布のバラツキ等で、中心温度の低下を招き、最も危険な温域である 50 C 以下にしばしば曝されるであろうから、中心温度を 52 C 以上とは設定できない。Bryan らの言うように、温蔵庫の室内温度 67.8 C ( 154 F ) 以上なら十分であろうが、温蔵は基本的に 55 C の中心温度を保つ手段で行えばよい。52 C と 55 C で品質に与える影響に差がないと考えられ、55 C 以上では殺菌効果も期待できる。

#### 冷却：

3.3で述べたように、ローストビーフの冷却は、ウェルシュ菌制御上重要な課題であるにもかかわらず、(1) 大きい肉塊では温度コントロールが容易でない、

(2) ウエルシュ菌芽胞はローストビーフの製造工程中に殺菌されず、逆に活性化される、(3) ウエルシュ菌の発育は極めて旺盛である、(4) 冷却中に確実にウエルシュ菌の発育至適温度を通過する、こと等からしばしば失敗し、ウエルシュ菌食中毒発生の最大要因になっている。Bryan らの現場調査では、冷却過程でローストビーフの中心部では 79~83% の割合でウエルシュ菌が増殖する可能性があった。

冷却の要点は、ウエルシュ菌の増殖可能温度範囲 (50~20 C) を如何に短時間に通過させるかである。3. 3では、55~25 C を 200 分以内で冷却したいと希望した。Shigehisa ら<sup>12)</sup>の挽き肉を用いた実験で、60 C から 20 C への冷却速度が毎時 10.4 C 以上ではウエルシュ菌の発育はみられなかったが、5 C/hr では明らかにウエルシュ菌の増殖が認められた。これらのことから判断して、50~25 C は 200 分以内に通過させたい。また 25~10 C 以下についても、発育率の低下により 1/2 以下の冷却速度が許容されるので、7.5 時間以内に冷却すればよい。他の文献からも大凡、10 C/hr での冷却がウエルシュ菌制御の目安となっている。冷却速度を上げるには、Cook-Freeze, Cook-Chill の何れで行うにせよ、冷気に接触する面積の拡大をはかることが大切である。また、冷却効果はローストビーフの重量に大きく左右されるので、可能なら、5 Kg を越えるローストビーフはカットして、フィルム包装し、冷却することである。但し、カットしても、庫内で積み重ねては冷却効果が著しく低下する低温保存：

既述のとうり、ローストビーフを 10 C 以下で保存する。

再加熱：

原料生牛肉から加熱調理する場合と冷却・低温保存ローストビーフを再加熱する場合とのウエルシュ菌衛生管理上の違いは；(1) 原料生牛肉の汚染ウエルシュ菌菌量が僅少であるのに対し、冷却・低温保存ローストビーフ中にはウエルシュ菌が大量に増殖していることがあり、 $10^5 \sim 10^8$ /g の汚染も覚悟しなければならない。(2) 原料生牛肉の汚染ウエルシュ菌は芽胞等で、対数増殖期に入るまでにかなりの時間を要するが、冷却後比較的新しいローストビーフ中のウエルシュ菌は増殖のスタンドバイ

が出来ているので、温度条件が満たされれば、直ちに旺盛な発育を開始する。(3) 冷却・低温保存ローストビーフは殺菌工程を経ているので、ウェルシュ菌が存在しないと言う誤った考えから、再加熱の役割が軽視される傾向にある。(4) 再加熱の主目的が食味の向上にあるので、比較的低温あるいは短時間の加熱で済まされることが多い。

適正な再加熱は、表5.1 からも理解されとうり、ローストビーフのウェルシュ菌制御上極めて重要な課題である。再加熱には、加熱調理時以上の厳しい温度管理が必要である。Bryan ら<sup>19)</sup>はローストビーフの再加熱のやり方を深部汚染 (5.1.1) の可能性の有無で区別し、以下のような厳しい再加熱法を提案した；

A) 深部汚染の可能性のある場合。(1) ローストを部分にカットし、ホイルで包んで、71.1 C になるまで再加熱するか、(2) カットや挽き肉にしてシチューにするか、他の料理に利用する。その場合でも、交差汚染となるから、中心温度を73.9 C (325 F)に到達するまで加熱する。

B) 深部汚染の可能性のない場合。表面だけで効果があるから、(1) ボイリングストックに浸すか、ストックがボイルするまで加熱する。(2) ホイルで包んだローストビーフあるいはスライスしたローストビーフを、163 C (325 F) のオーブンで1時間以上加熱する。(3) ローストビーフあるいはスライスしたローストビーフを、上部に蓋をした沸騰している蒸し器中で1時間以上加熱する。(4) スライスしたローストビーフを、92.8 - 100 C の肉汁中に浸す。(5) スライスしたローストビーフを、密閉したスチームインジェクション中で加熱する。

再加熱の原則は増殖型ウェルシュ菌の殺滅(少なくとも3 D)にあり、この条件を満たすためには、カットやスライスにより温度伝導効率の向上をはかる必要がある。また、レアの状態を犠牲にするのも止むをえないであろう。再加熱後は直ちに喫食に供するのは言うまでもない。肉汁(たれ、Jus)の殺菌法は既述のとうりである。

## 小括

- 1) 加熱調理によりローストビーフの中心温度が 60 ℃ に到達した後も、数十分以上はウェルシュ菌の殺菌に有効な 55 ℃ 以上に保つことが望ましい。
- 2) 温蔵は中心温度を、常に 55 ℃ 以上に保つような手法で行う。
- 3) 冷却は、ウェルシュ菌の増殖温度範囲 (50-25 ℃) を如何に速く通過させるかであり、200 分程度が望まれる。冷却効果を上げるためには循環冷氣 (水) 中で冷却すればよい。また、小片 (出来れば 1 Kg 以下) にカットすることも効果的である。
- 4) 低温保存は流通過程を含めて、10 ℃ 以下でなければならない。
- 5) 再加熱の温度管理は加熱調理以上に厳密に実施する必要がある。特に、深部汚染の可能性のあるローストビーフに対しては、品質を犠牲にしても、カット・スライスにより温度伝導効果を上げた上で、十分に加熱する必要がある。
- 6) 肉汁は沸騰するまで加熱する。また、二次汚染とならないよう取り扱いに注意する。

## 5. 2. 勧告

今回の実験結果から得られた結果及び文献資料より、ローストビーフ製造および保存時におけるウェルシュ菌制御のために、次のような取り扱いが推奨される。

### 加熱条件

1) 調理時の加熱は、肉塊のいずれの部位もが、60 C 以上に達するまで行う。

### 温蔵条件

2) 温蔵は、肉塊のいずれの部位もが、55 C 以上を保つ方法で行う。

### 冷却条件

3) 調理器内の塊周縁部位の温度が 55 C 以下まで下がる以前に冷却を開始する。

4) 肉塊のいずれの部位もが、50～25 C を 200 分以内に通過させる方法で冷却する。

5) 肉塊のいずれの部位もが、25～10 C 以下は、7.5 時間以内に通過させる方法で冷却する。

### 保存条件

6) 保存、流通、販売過程中、肉塊のいずれの部位をも、10 C 以下に保つ。

## 付記

- 1) 深部汚染の可能性のある手法で製造・保存したローストビーフをホールのまま再加熱する場合は、最深部の増殖型ウェルシュ菌を 5 log reduction 以上の条件で殺滅する。
- 2) 肉汁の再加熱は、煮沸で行う。
- 3) 二次汚染・交差汚染の防止策を講ずる。
- 4) 製造過程を記録・保存し、同一ロットの製品の履歴を指示できるようにしておく。

## 参考文献

- 1) 厚生省環境衛生局監修：食品衛生小六法，新日本法規
- 2) Food Safety and Inspection Service, USDA (1983)  
Production requirements for cooked beef, roast beef, and cooked corned beef. Fed. Register, 48;24314-24318.
- 3) Bryan, F. L. (1980)  
Foodborne disease in the United States associated with meat and poultry. J. Food Protect., 43;140-150.
- 4) Uemura, T., H. Kusunoki, K. Hosoda, and G. Sakaguchi (1985)  
A simple procedure for detection of small numbers of enterotoxigenic Clostridium perfringens in frozen meat and cod paste. Int. J. Food Microbiol., 1;335-341.
- 5) 坂崎利一編、食中毒 II、中央法規出版、1983
- 6) 江守一郎 (1980)：模型からの発想，講談社 ブルーバックス，B-439, 43-48
- 7) Fruin, J. T. and F. J. F. J. Babel (1977)  
Changes in the population of Clostridium perfringens type A frozen in a meat medium. J. Food Prot., 40;622-625.
- 8) 蜂須賀養悦他編、耐久型細胞、岩波書店、1976

- 9) Willardsen, R.R., F.F. Busta, C.E. Allen, L.B. Smith (1978)  
Growth and survival of Clostridium perfringens during constant raising temperature. J. Food Sci., 43;470-475.
- 10) Hachisuka, Y., N. Asano, N. Kato, M. Okajima, M. Kitaori, T. Kuno (1954)  
STUDIES ON SPORE GERMINATION: I. Effect of nitrogen sources on spore germination. J. Bacteriol., 69;399-406.
- 11) Smith, L. D. S. (1975)  
The pathogenic anaerobic bacteria, Charles & Thomas, Inc.,
- 12) Sige-hisa, T., T. Nakagami, and S. Taji (1985)  
Influence of heating and cooling rates on spore germination and growth of Clostridium perfringens in media and in roast beef. Jpn. J. Vet. Sci., 47(2);259-267.
- 13) Smith, A.M., D.A. Evans, and E.M. Buck (1981)  
Growth and survival of Clostridium perfringens in rare beef prepared in a water bath. J. Food Prot., 44;9-14.
- 14) Toumy, J.M., and R.J. Lechnir (1963)  
Effect of cooking temperature and time on the tenderness of beef. Food Technol., 17;1457-1460.
- 15) Cremer, M.L., and J.R. Chopley (1980)  
Time and temperature, microbiological and sensory assessment of roast beef in a hospital system. J. Food Sci., 45;1472-1477.

- 16) Naik, H. S. and C. L. Duncan (1977)  
Enterotoxin formation in foods by *Clostridium perfringens* type A.  
J. Food Safety, 1;7-18.
- 17) Hughes, H. L. (1979)  
A survey of temperature control procedures during catering operations.  
Environmental Hlth., (Aug.);177-178.
- 18) Machilic, S. M. and H. N. Draudt (1963)  
The effect of heating time and temperature on the shear of beef semitendinosus muscle. J. Food Sci., 28;711-718.
- 19) Bryan, F. L., and T. W. McKinley (1979)  
Hazard analysis and control of roast beef preparation in foodservice establishments. J. Food Protect., 42;4-18.

図-1： ローストビーフの製造・保存時の温度変化の追跡法

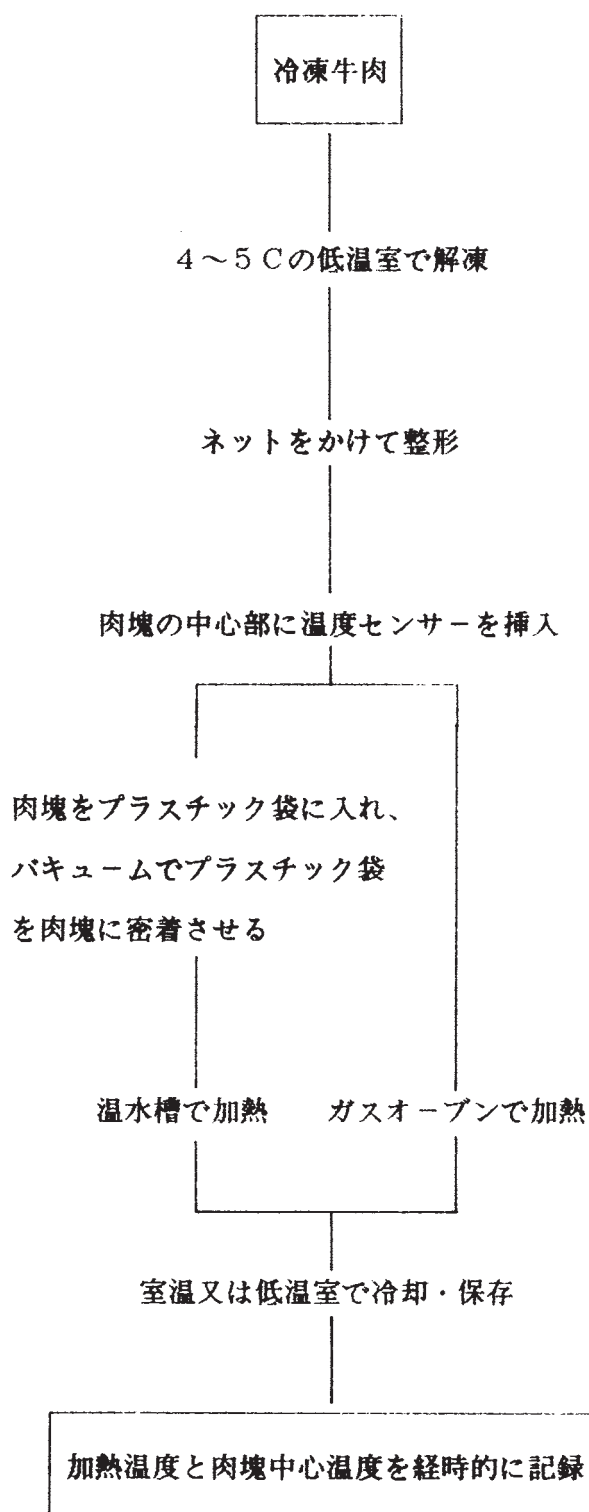


図-2： 芽胞および増殖型菌の調整法

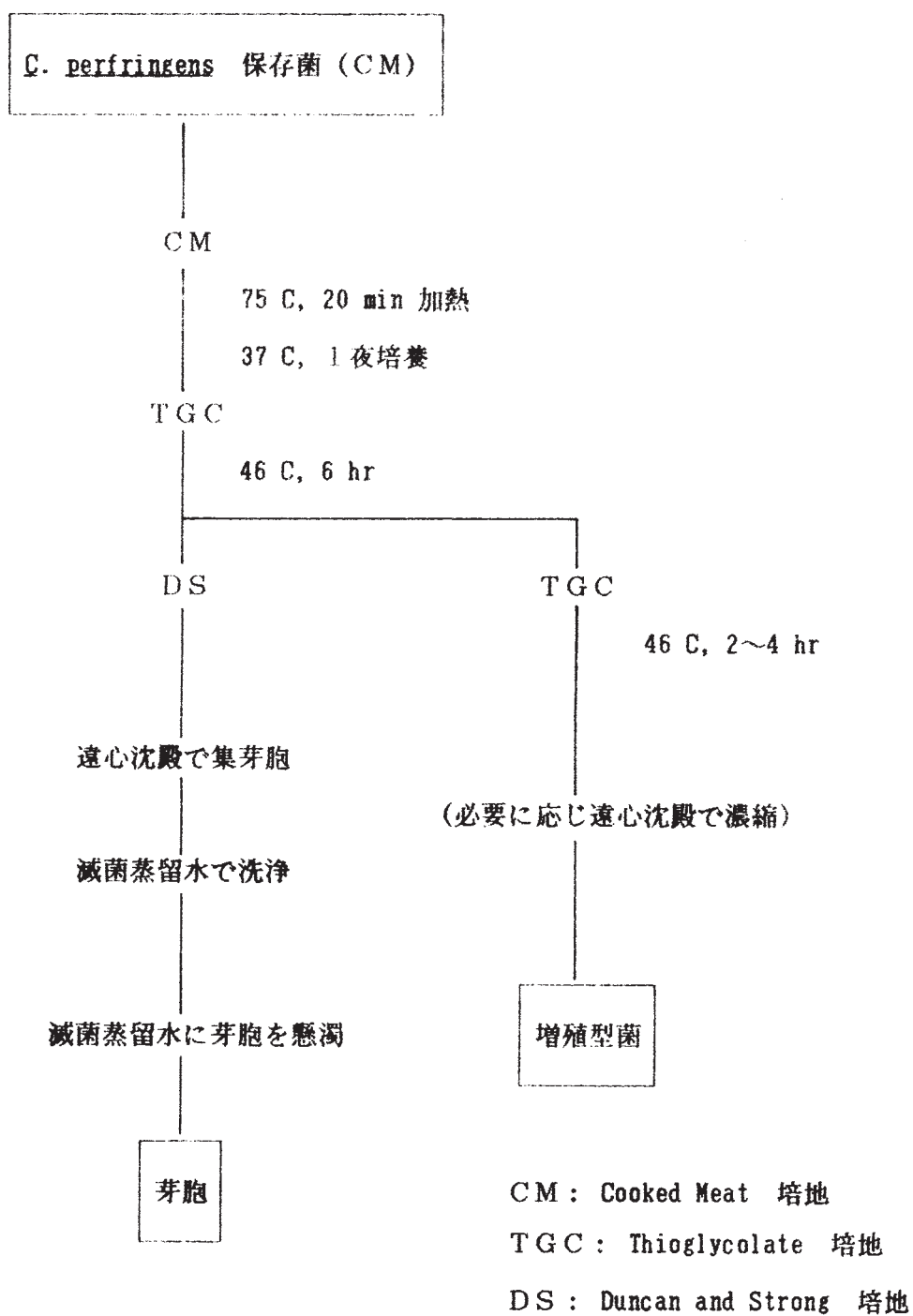
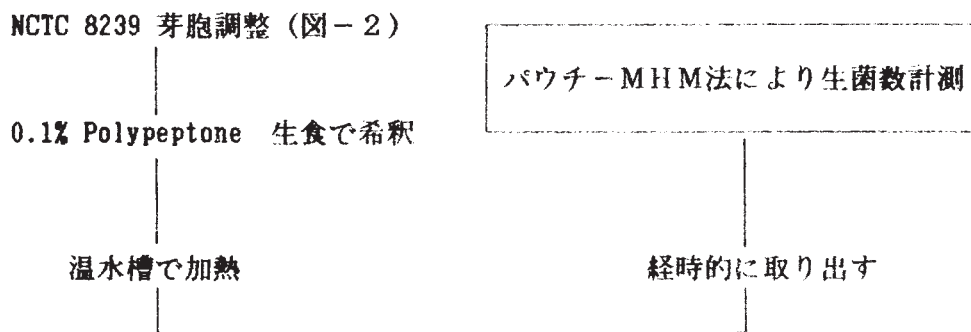
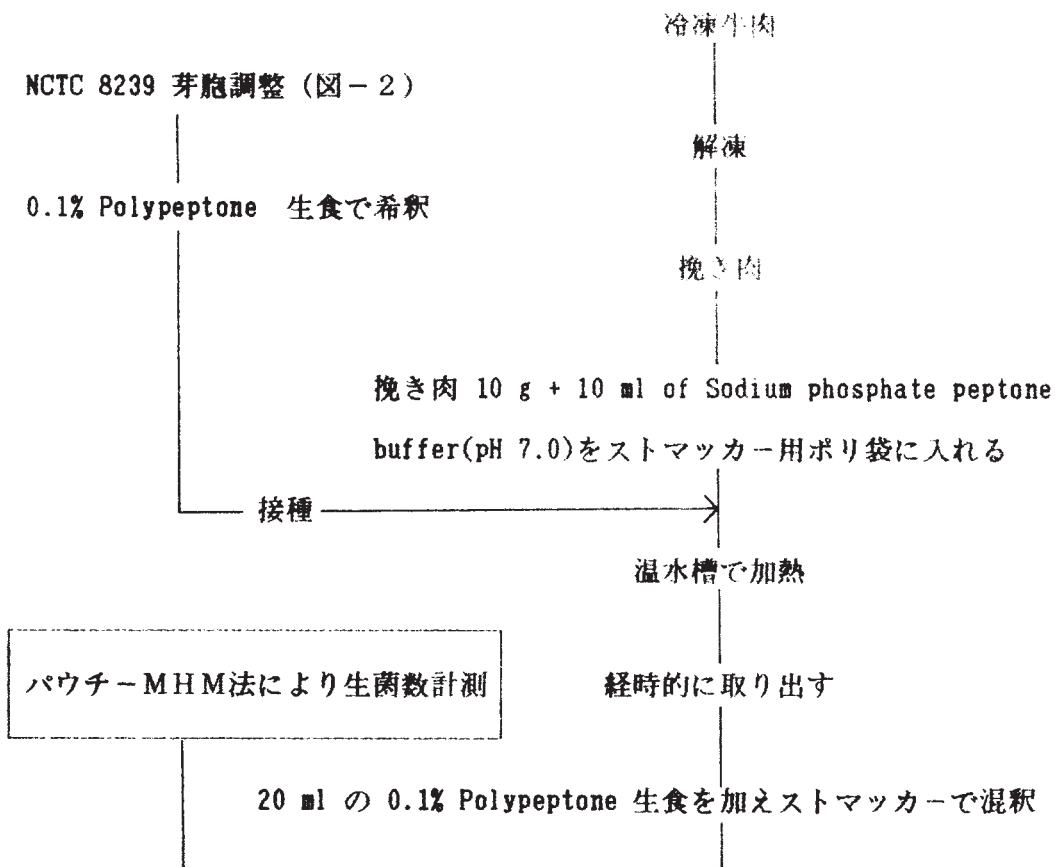


図-3： 加熱によるウェルシュ菌芽胞の発芽促進の試験法

生食中



ひき肉中



## O. D. による発芽の観察

NCTC 8239 芽胞調整 (図 - 2)

50mMKClを含む50mM potassium phosphato buffer(pH.7.0)に懸濁

60 C, 40 min 加熱

それぞれの培養温度に移す

10 分毎に O.D. を記録

図-4： ローストビーフの冷却時におけるウェルシュ菌の発育度の測定法

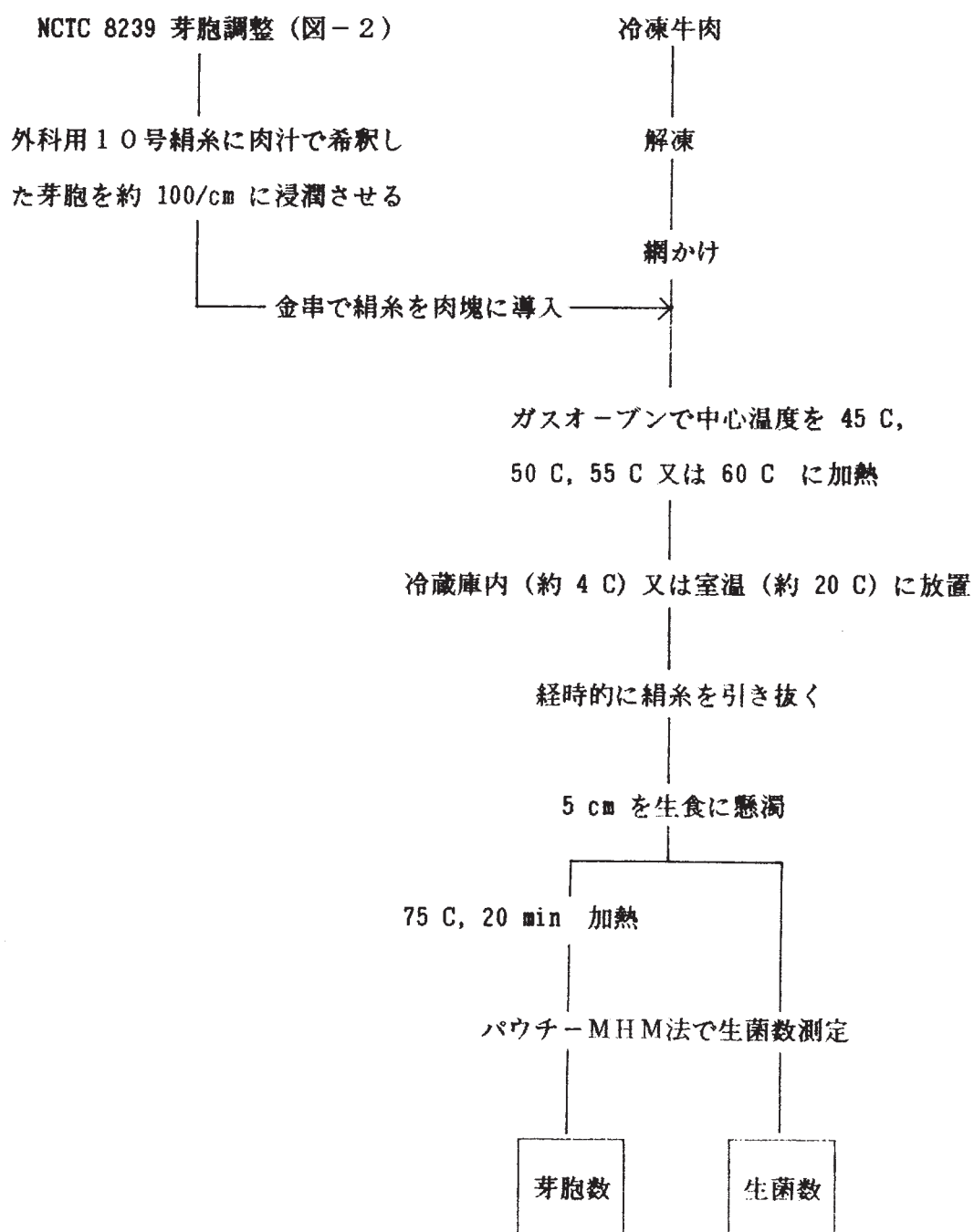
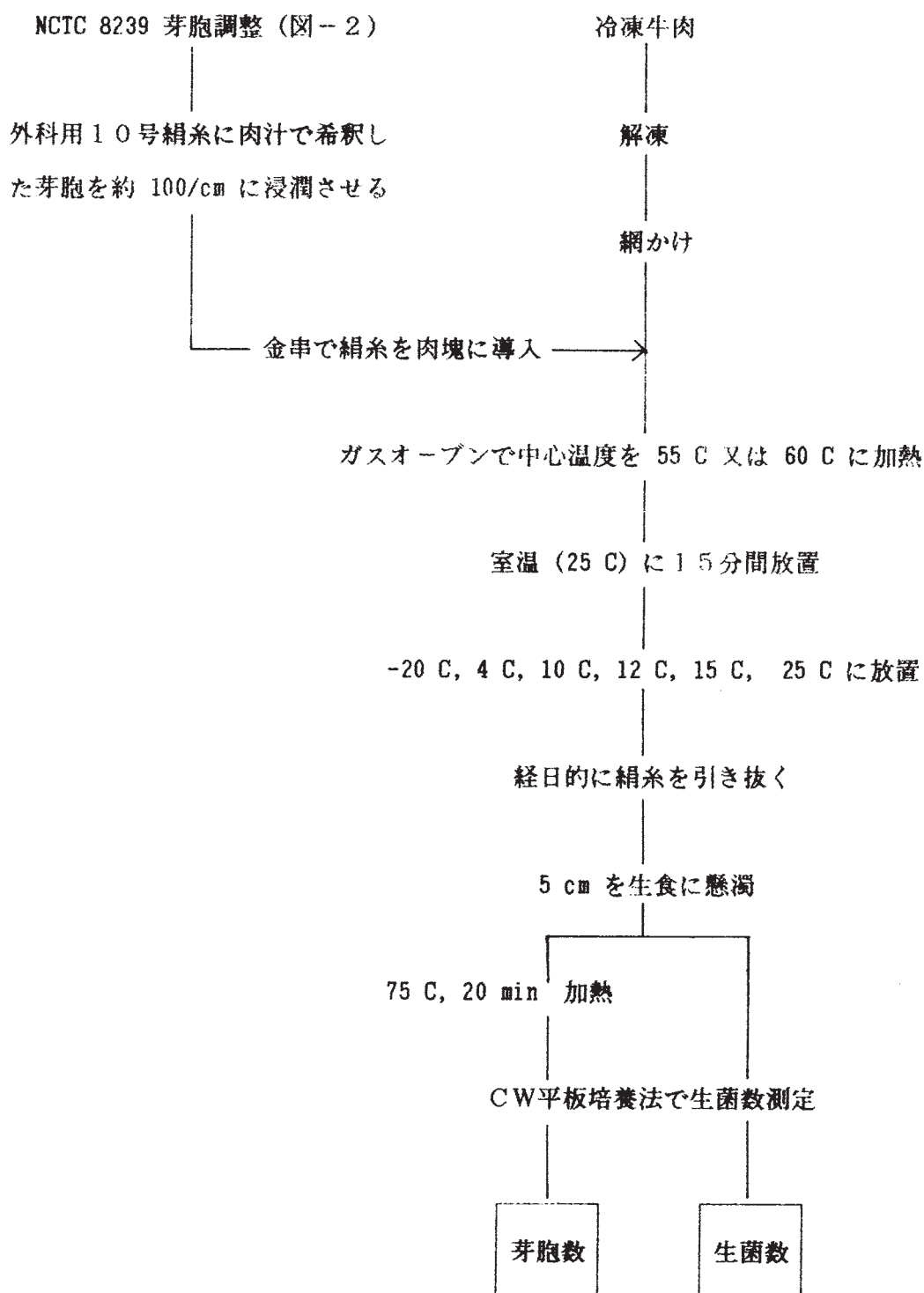


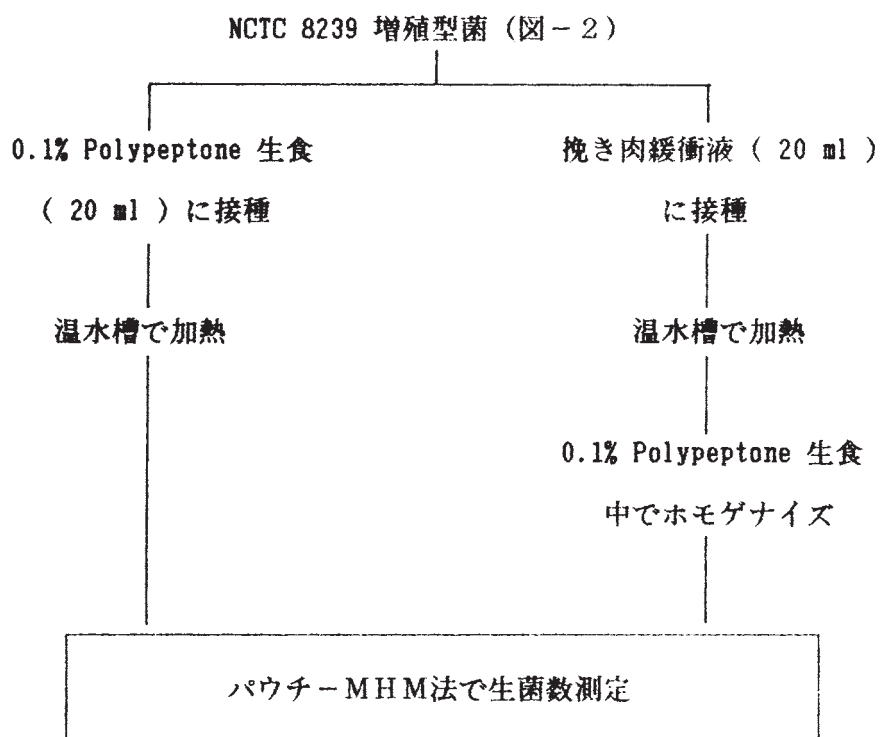
図-5： ローストビーフの保蔵中におけるウェルシュ菌の発育度の測定法



図－６： 増殖型ウェルシュ菌の加熱殺菌条件の測定法

実験１（生食中）

実験－２（ひき肉中）



図－７： ウエルシュ菌芽胞の加熱殺菌条件の測定法

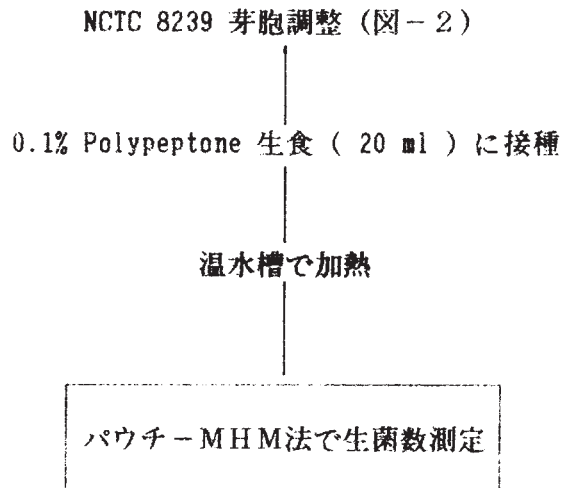


図-8： 肉汁中でのウェルシュ菌の型の検査法

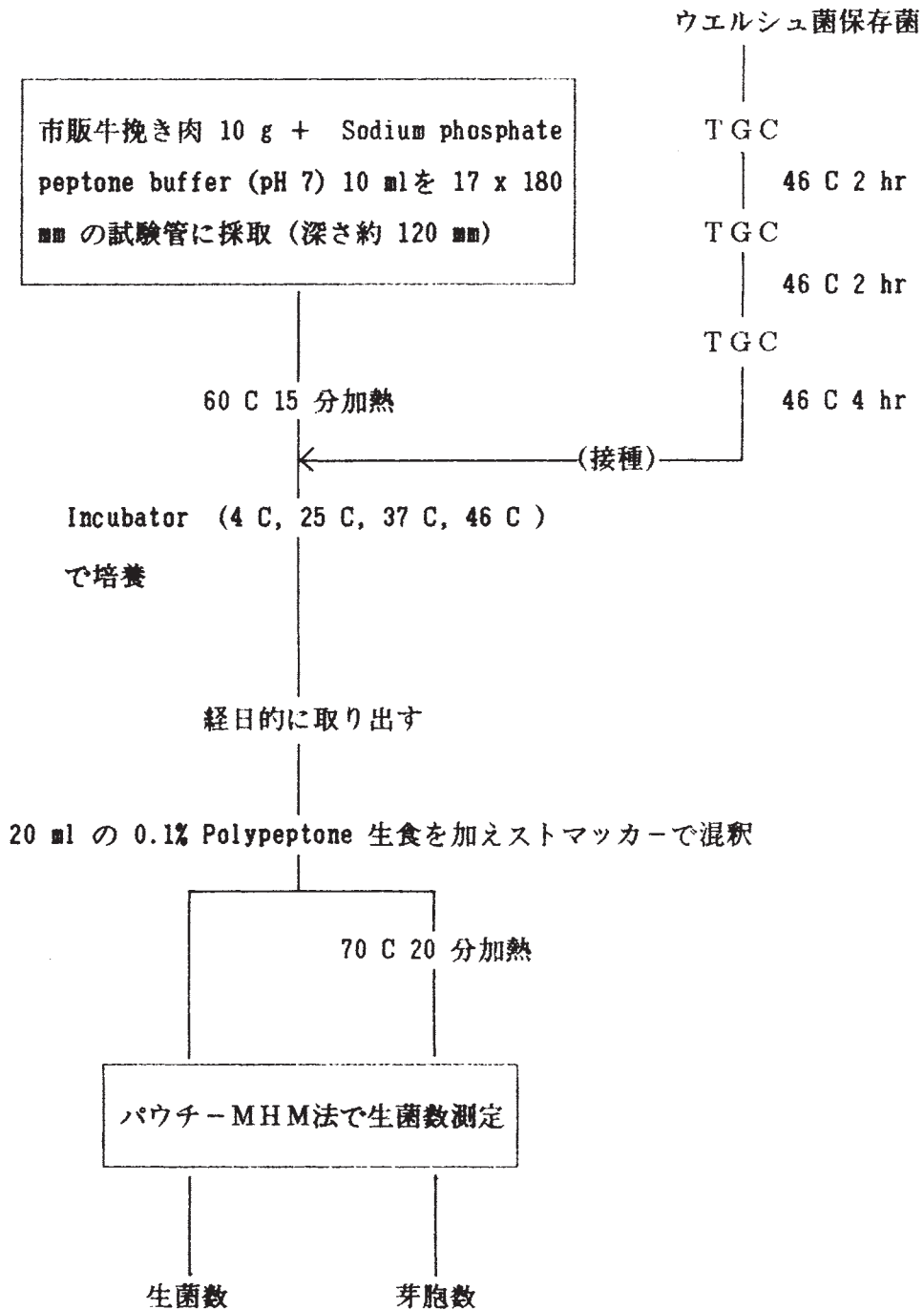


図 2. 1

重量 1. 6 k g の牛肉を 1 5 0 C のオーブンで中心温度が 6 0 C になるまで加熱した後、1 5 分放冷後、冷蔵庫内で冷却したときの、肉塊の各部の温度変化

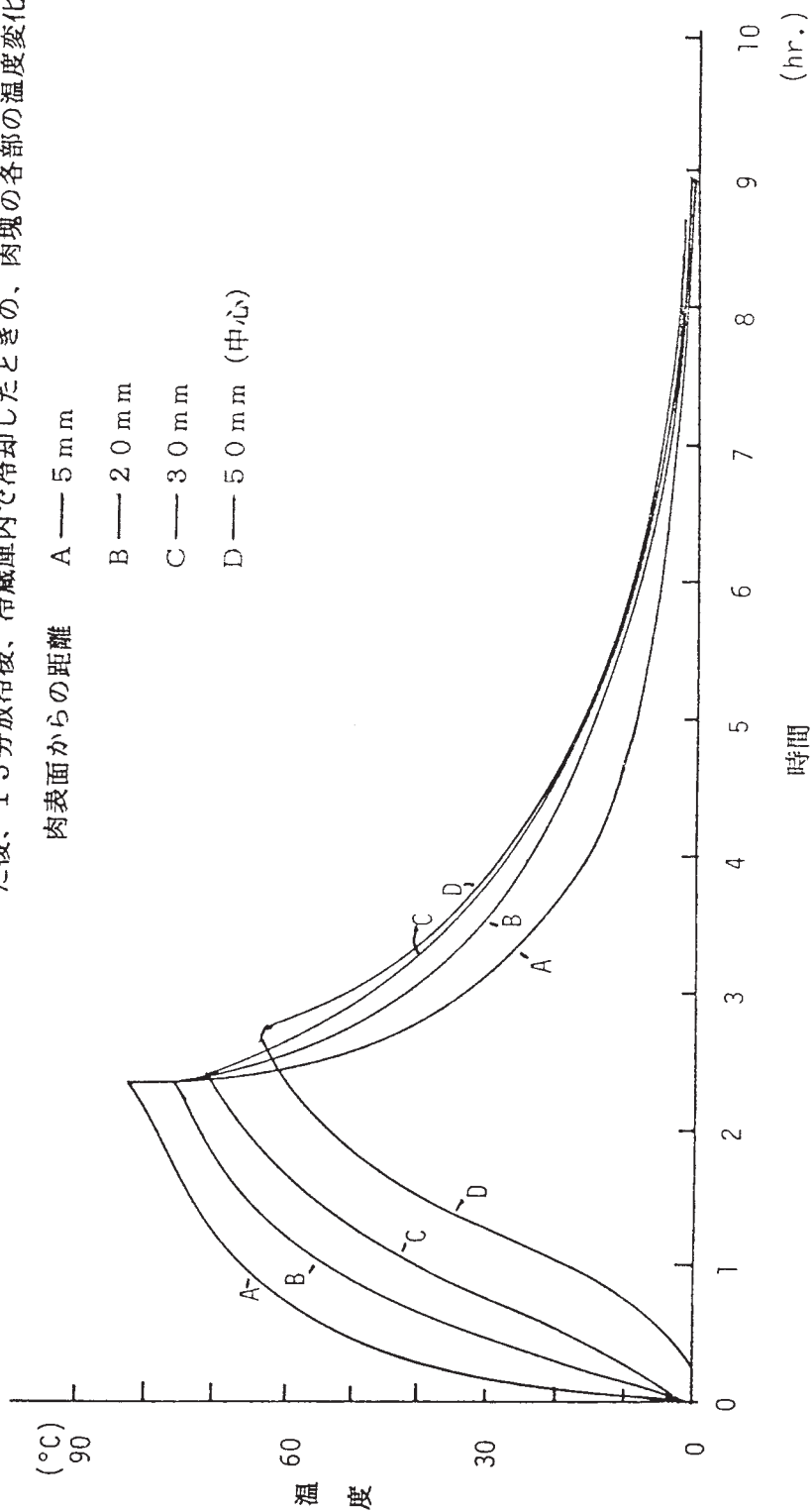


表 2. 1

種々の大きさの肉塊を 130℃ に設定したオーブンで加熱したときの中心温度が 60℃ になるまでの時間

肉塊重量	中心温度が「60℃に 上昇するまでの時間」
10.2 kg	300 分
7.2	276
3.9	222
2.0	132

図 2. 2      1. 6 kg の牛肉を 150°C のオーブンでロースト、  
 15 分間室温放冷後冷蔵庫 ( 4 ~ 5°C ) 保存

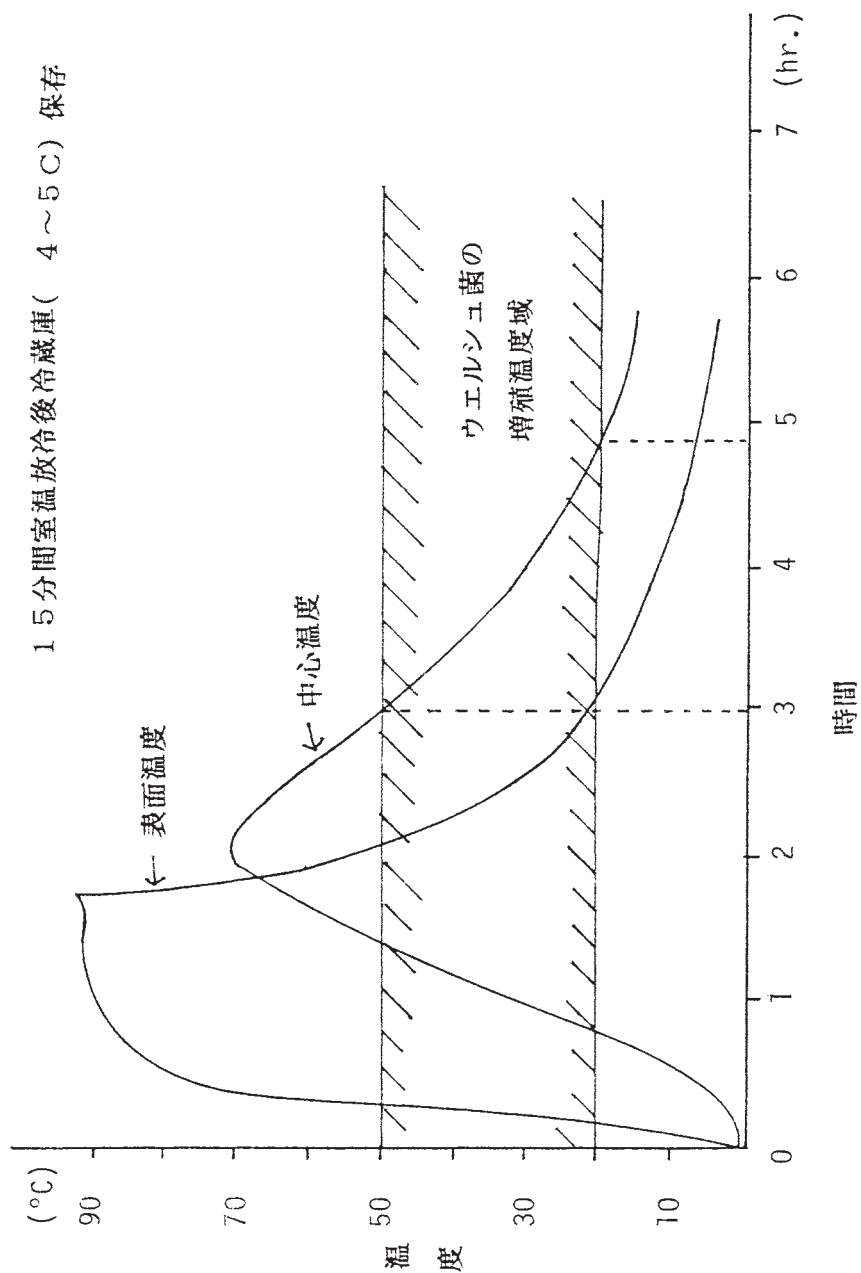


図2.3 1. 6kgの牛肉を150℃のオーブンでロースト、  
15分間室温放冷後冷凍庫( -15℃) 保存

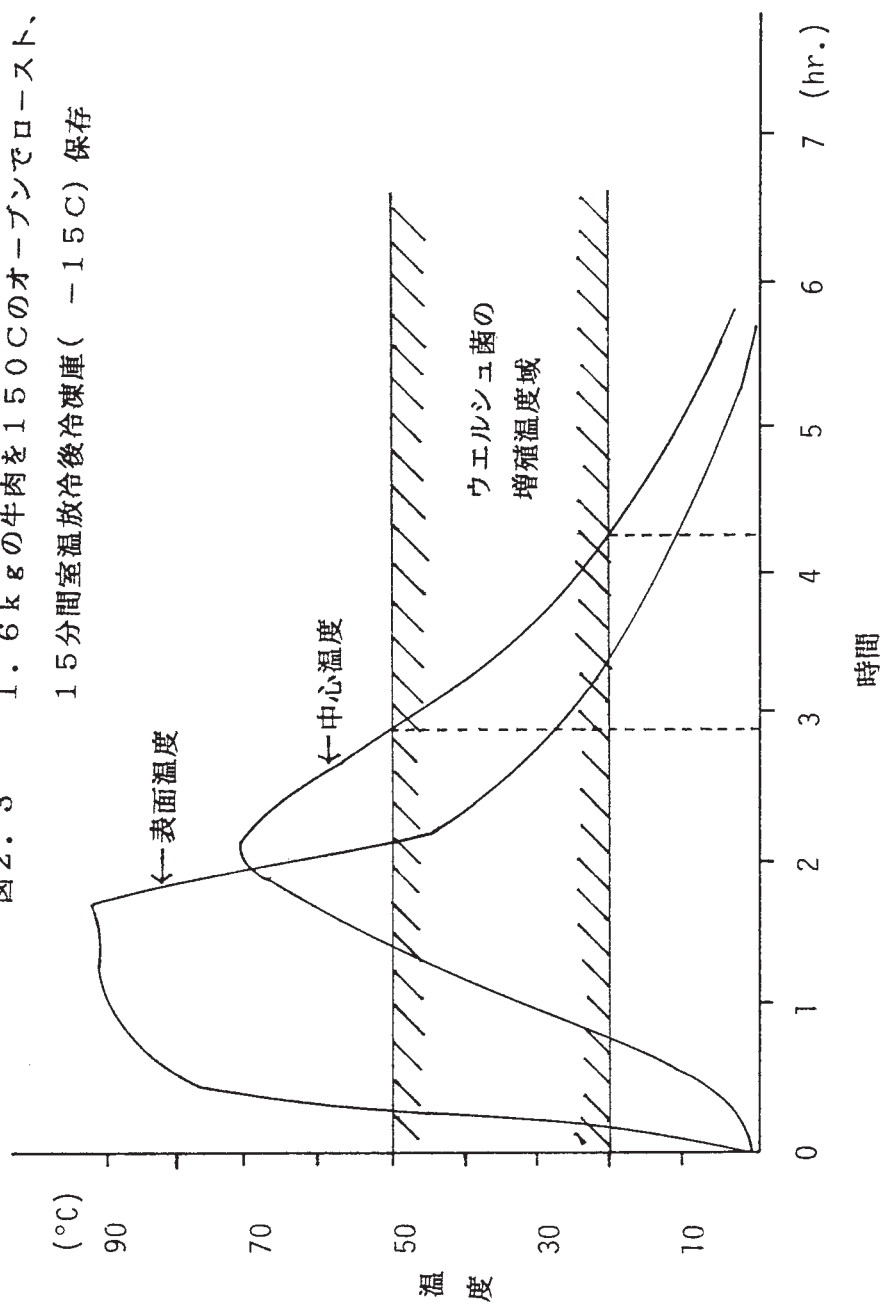
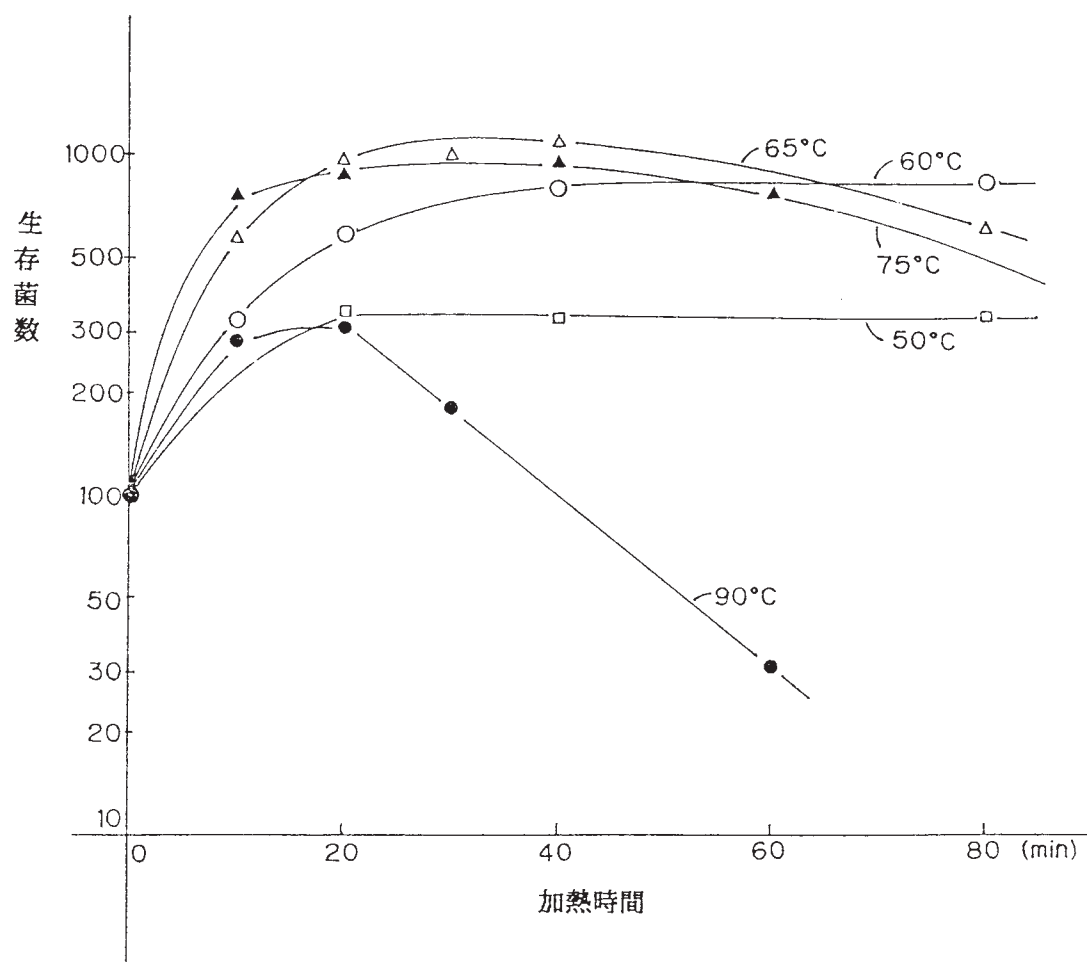


図 3. 1. 1

0.1% polypeptone saline 中における加熱によるウェルシュ菌芽胞の発芽促進（最初の菌数を100 とする。）



温度は加熱温度を示す。

図3. 1. 2 挽き肉中におけるウエルシュ菌 (H-3) 芽胞を加熱したときの消長

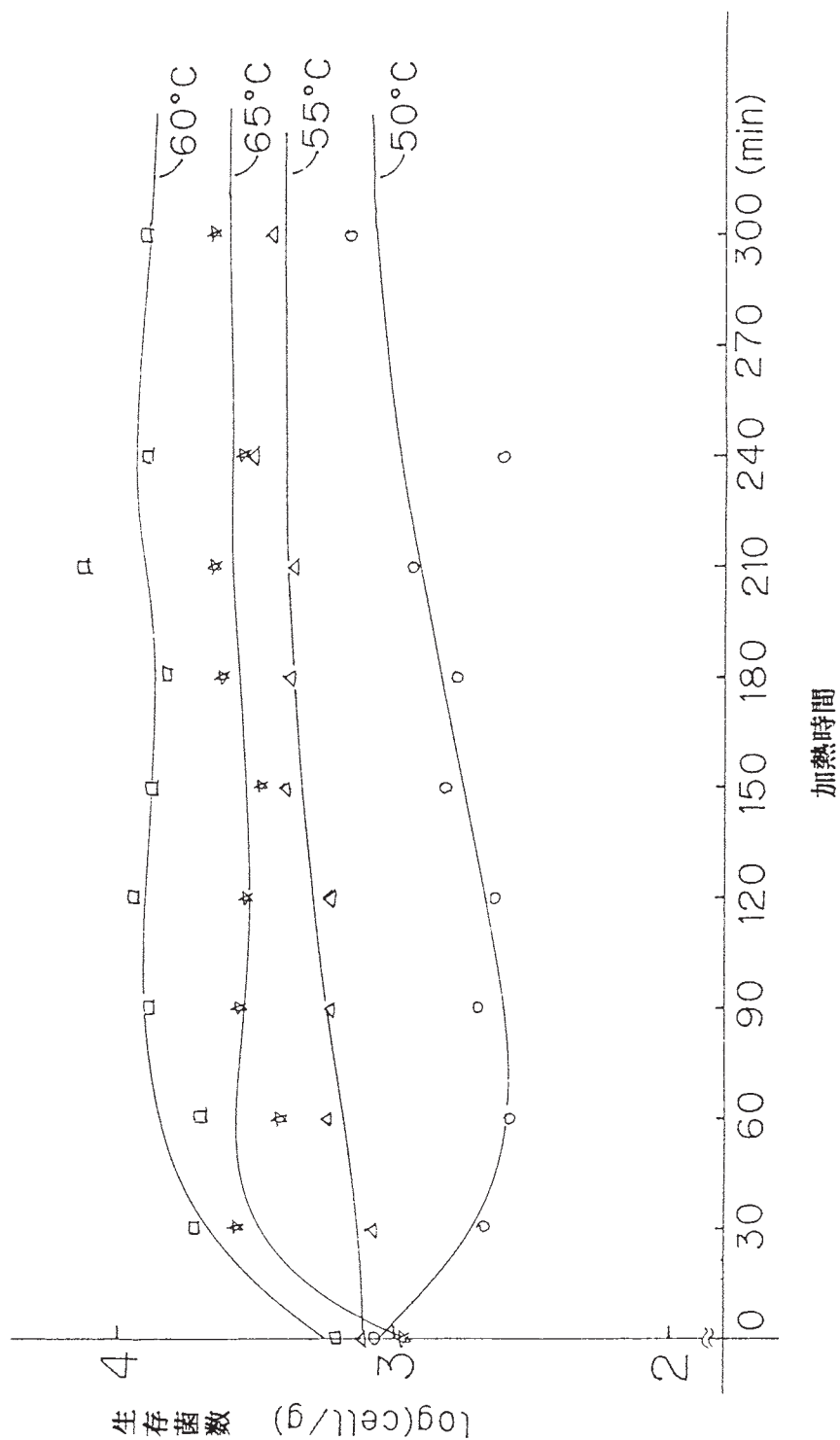
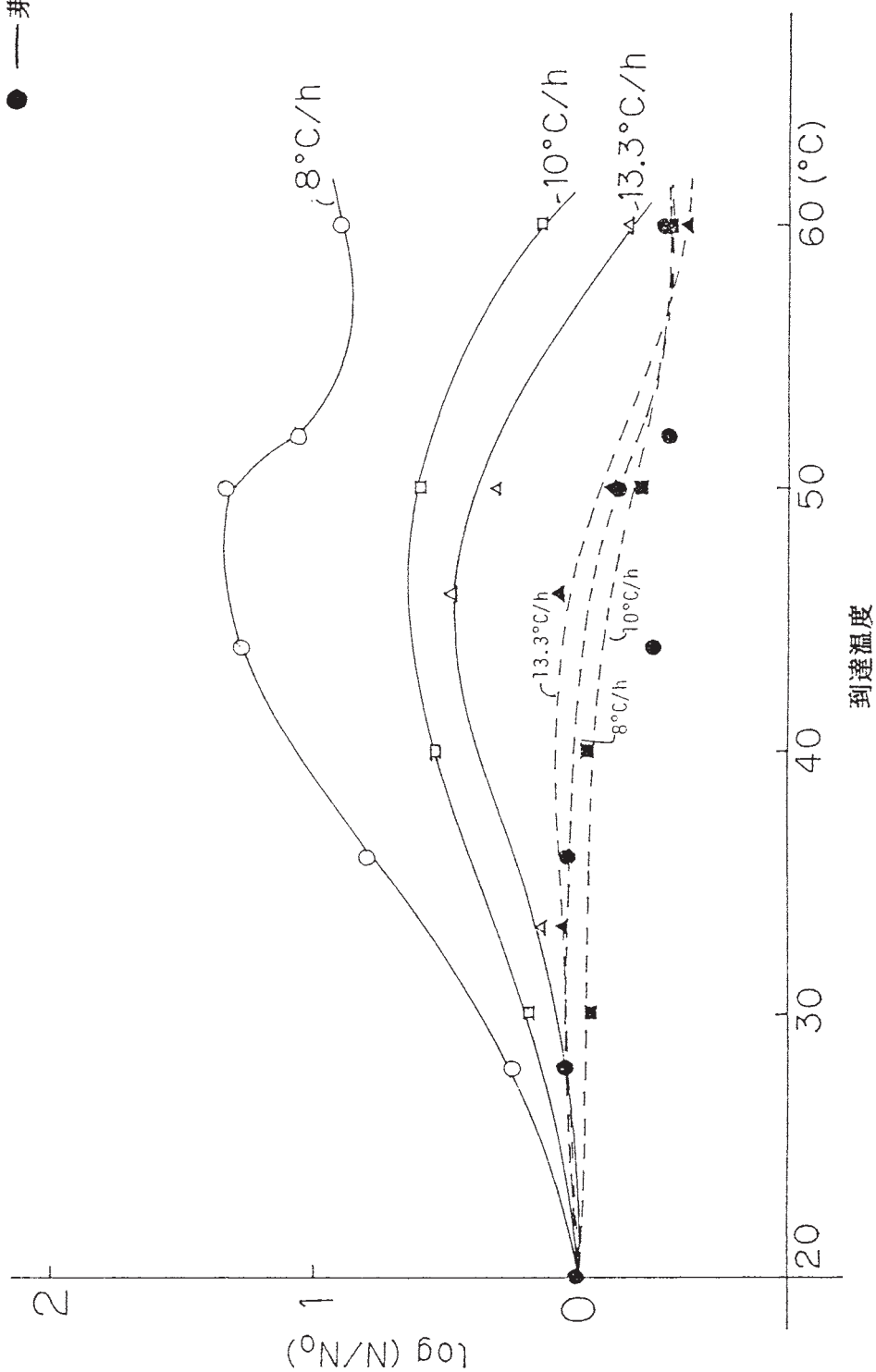


図3. 1. 3 一定割合で温度上昇中の挽き肉中におけるウエルシュ菌 (H-3) 芽胞の挙動

○ — 生菌  
● — 芽胞



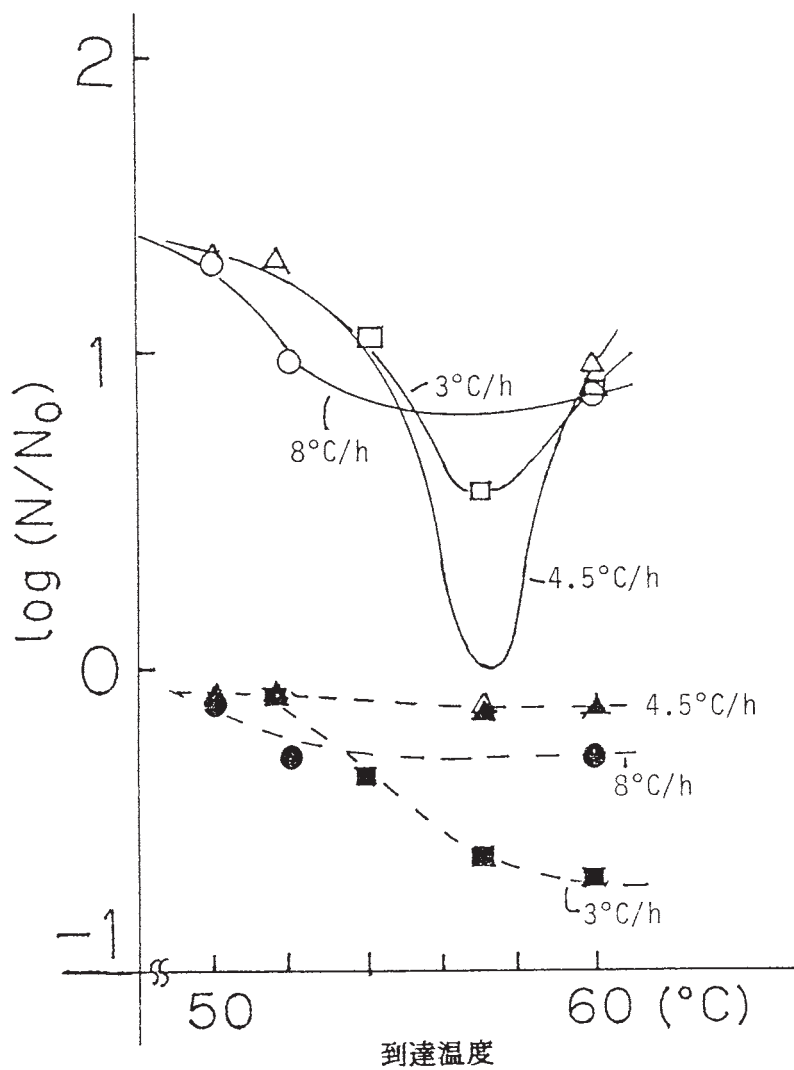


図 3. 1. 4

一定割合で温度上昇中の挽き肉中におけるウェルシュ菌 (H-3) 芽胞の挙動  
(50°Cから60°C)

○ — 生菌

● — 芽胞

(20°Cから50°Cは8°C/h)

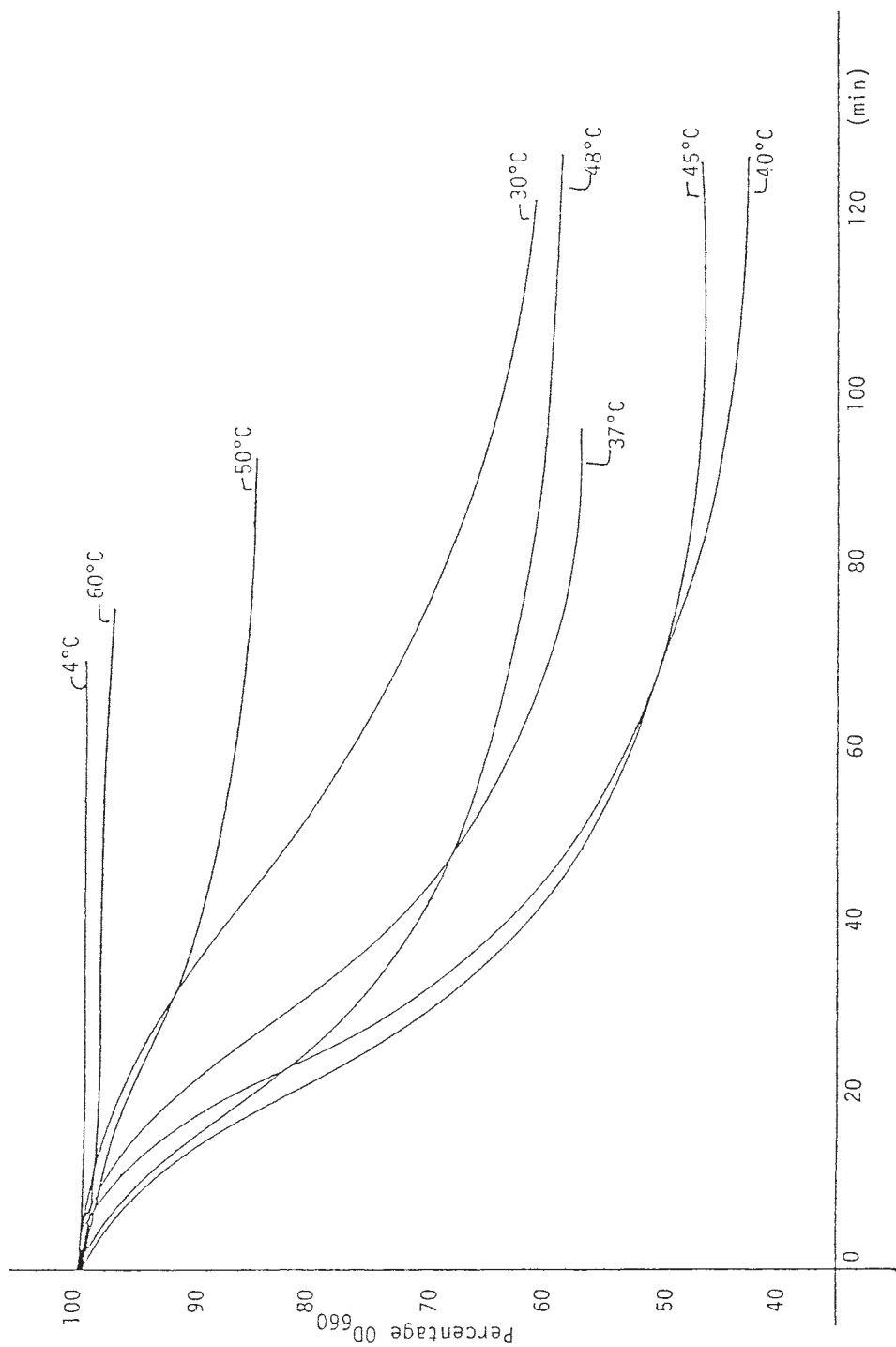


図 3. 1. 5 O. D. 減少による発芽の観察 (図-3 参照)

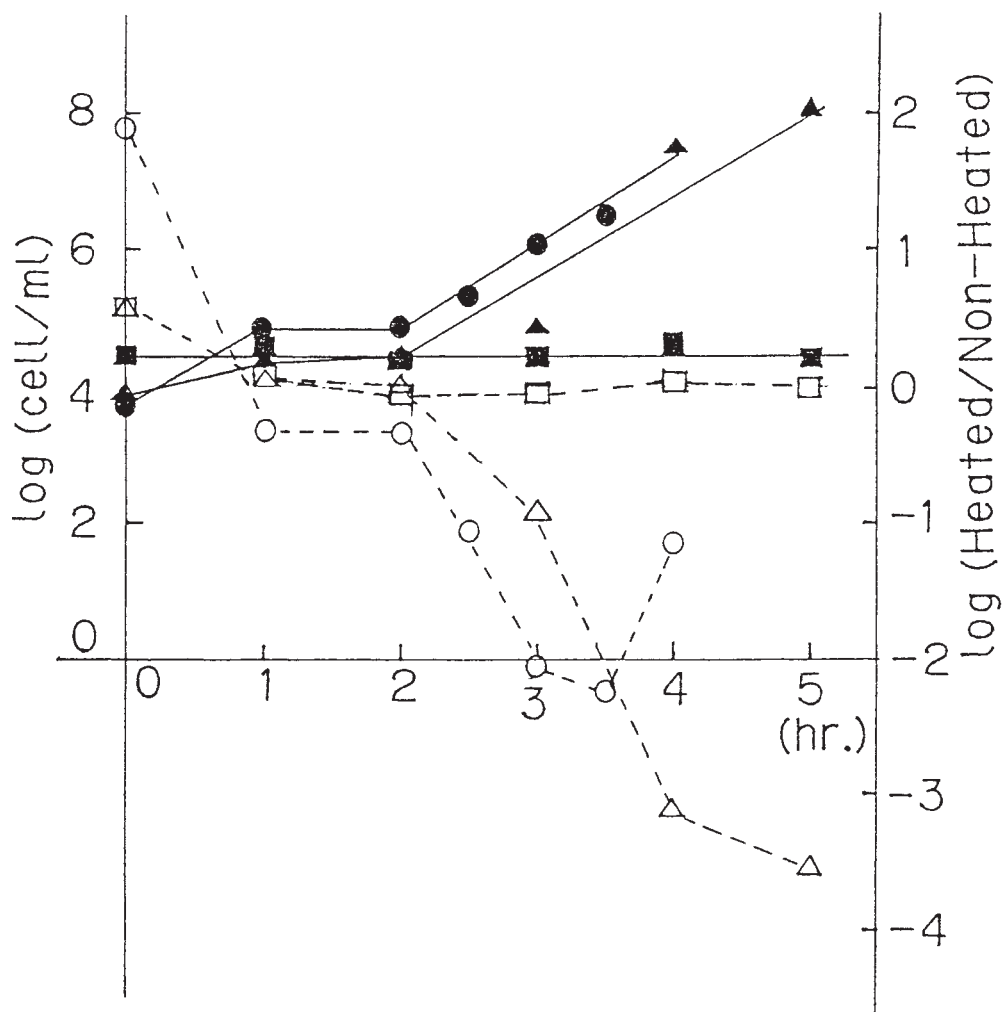


図3. 1. 6

活性化されたウエルシュ菌（H-3）芽胞の発育

TGC培地中で60℃40分加熱した芽胞をそれぞれの温度で培養

○ — 46℃

△ — 37℃

□ — 25℃

● — 生菌数

○ - - - 耐熱性（本文参照）

表 3. 2

## ウエルシュ菌の世代時間

Strain	Generation time (min)				
	33°C	37°C	41°C	45°C	49°C
NCTC 8238	15.5	8.2	6.9	7.4	11.1
	19.1	9.3	7.3	7.7	12.5

(Willardsen et. al.,1978)

ウエルシュ菌の各種培養条件下における世代時間  
(Smith )

温 度	世 代 時 間    pH 7.0
25°C	100分
30	50
35	34
40	12.5
45	10
50	15

pH	世 代 時 間,    37°C
5.0	100分
5.5	30
6.0	22
6.5	21
7.0	23
7.5	25
8.0	48

% NaCl	世代時間, pH 7.0, 45°C
0	10
1	11
2	11
3	27
4	30
5	測定不能

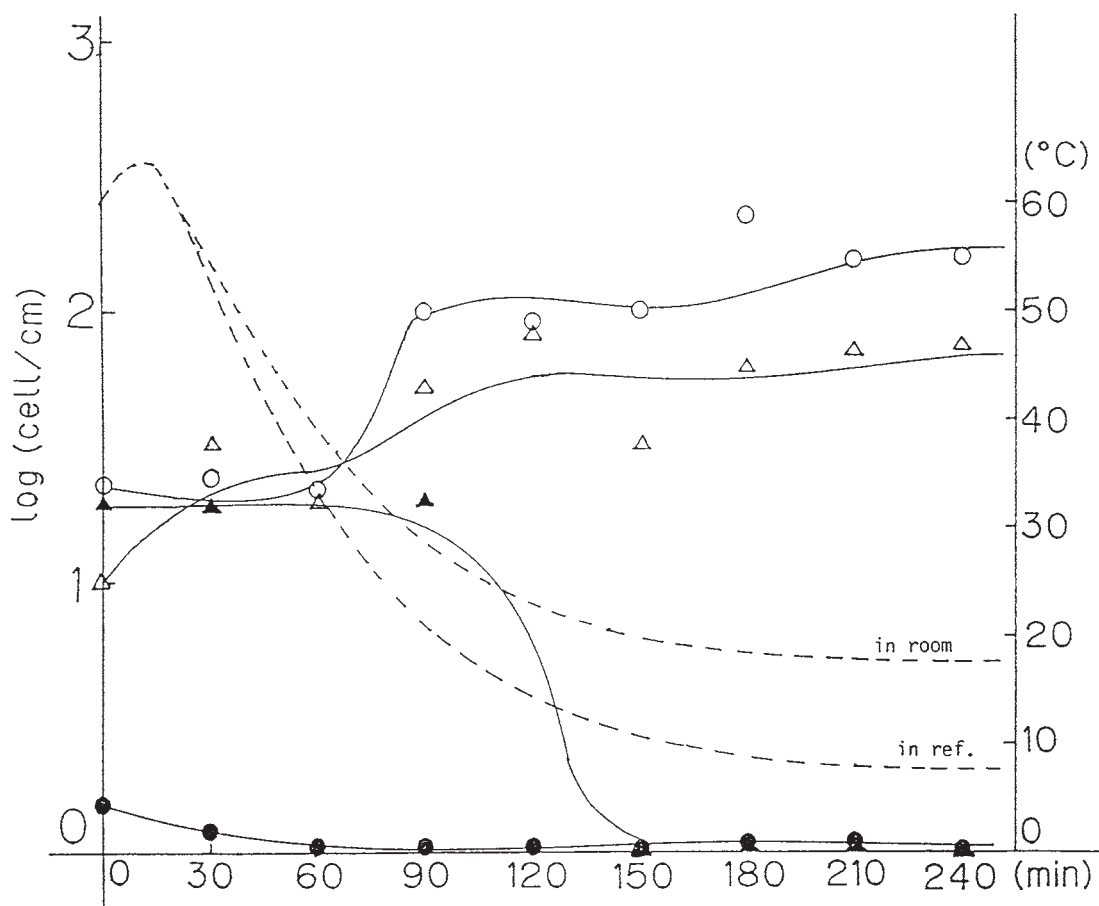


図 3. 3. 1

ローストビーフ冷却時におけるウェルシュ菌の発育

○ — 室温放冷      ○ — 生菌数      ---- 温度  
 △ — 冷蔵庫内放冷      ● — 芽胞数

530gの肉塊を中心部が60℃になるまで加熱後、オープンから取り出し、その後の菌数、芽胞数の変化を示す。

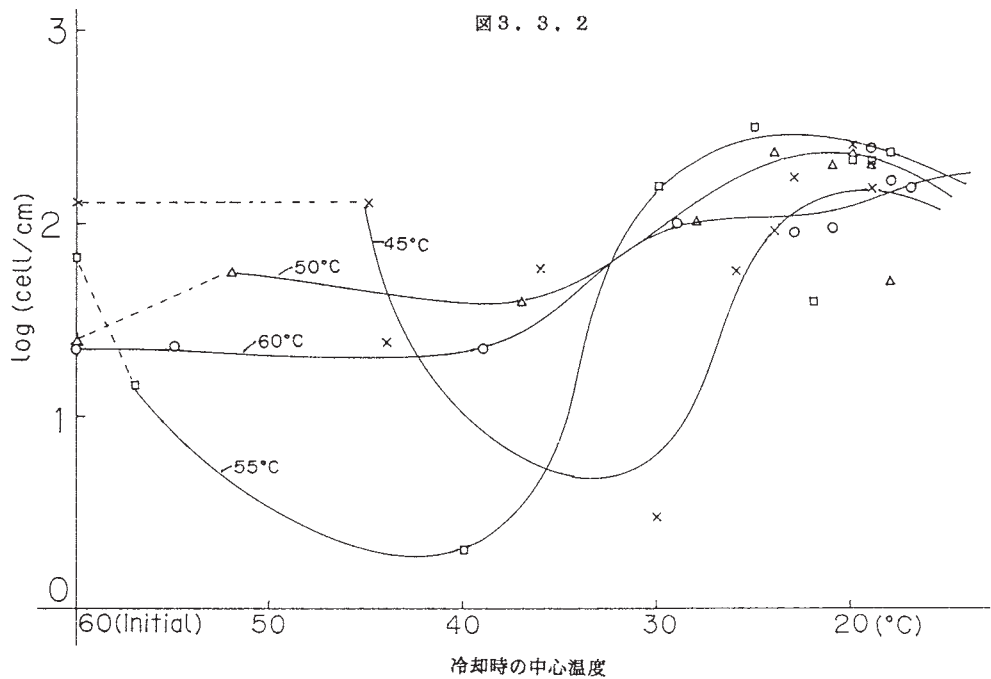


図 3. 3. 2

ローストビーフ冷却時におけるウエルシュ菌の発育

中心温度	× — 45 C	
	△ — 50 C	
	□ — 55 C	
	○ — 60 C	まで加熱

500-600gの肉塊をそれぞれの温度まで加熱後、オープンから取り出し、その後の菌数（生菌数）の変化を示す。

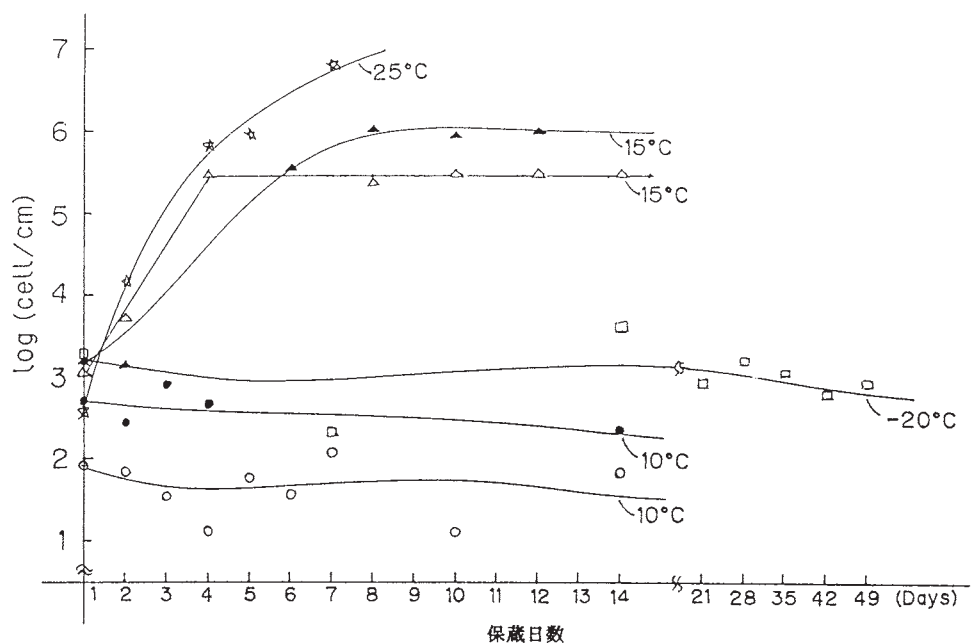


図 3. 4

ローストビーフ保蔵時におけるウエルシュ菌（生菌数）の変化

● — 肉塊の中心温度を60℃まで加熱したもの

○ — 肉塊の中心温度を54℃まで加熱したもの

図中の温度は保存温度を示す

表4. 1. 1

増殖型ウエルシュ菌の株による熱抵抗性の違い

最初の菌数を1,000 として、それぞれの条件で加熱後の残存菌数を示す。

Strain	Heating temp. and period		
	50°C 30min	55°C 10min	60°C 5min
H-3	10	7	1
H-9	2	2	
H-12	2	4	<.05
A-76	<.07	<.07	<.07
S-79	<.01	<.01	<.01

表4. 1. 2

増殖型ウエルシュ菌（H-3）の挽き肉中でのD値<sup>1)</sup>と、6D、12D<sup>2)</sup>

Temp.	D value	6D	12D
55	30.0	179.7	359.5
56	23.9	143.5	287.1
57	19.1	114.6	229.2
58	15.3	91.5	183.1
59	12.2	73.1	146.2
60	9.7	58.4	116.7
61	7.8	46.6	93.2
62	6.2	37.2	74.4
63	5.0	29.7	59.4
64	4.0	23.7	47.5
65	3.2	19.0	37.9

1) 回帰直線より求めた値 ( $R=3.992 \times 10^{-4}$ )2) 菌数を  $1/10^6$ 、 $1/10^{12}$ にするのに必要な加熱時間

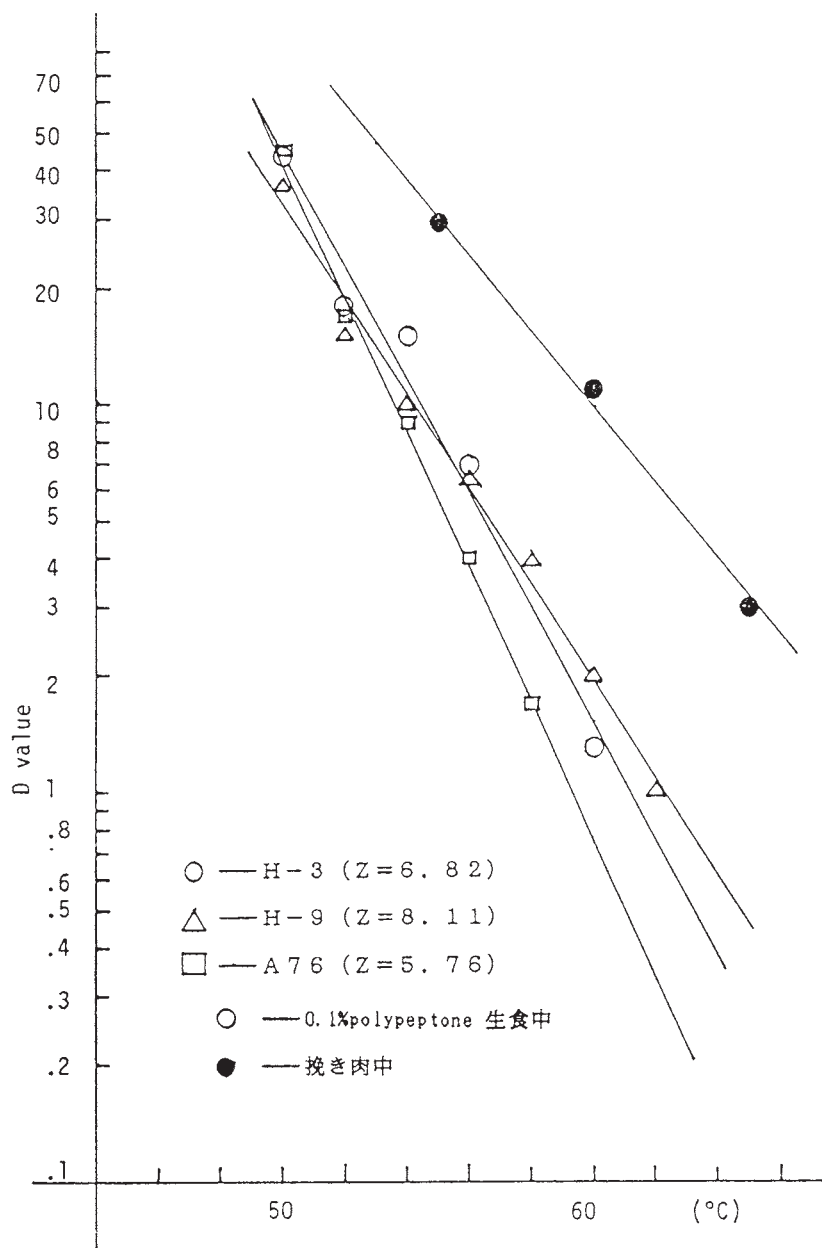


図4.1

増殖型ウエルシュ菌のD値

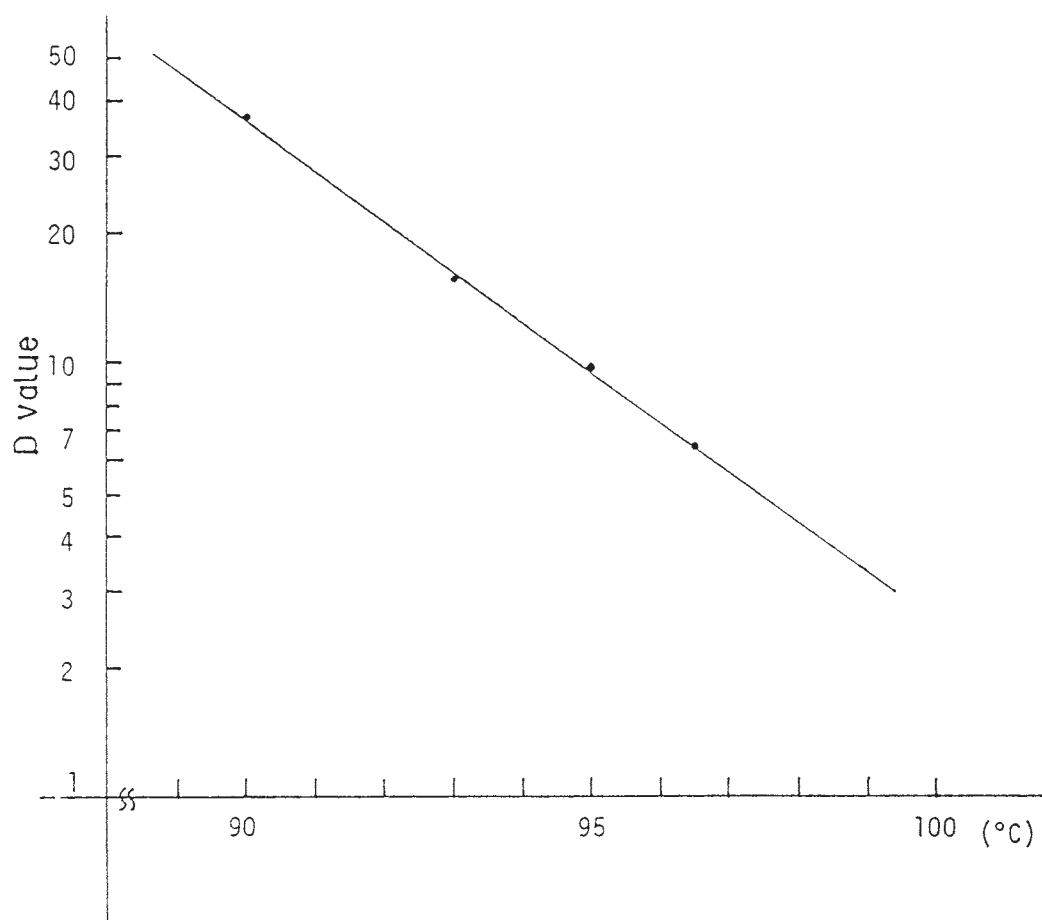


図 4 . 2

ウエルシュ菌 (H-3) 芽胞の D 値 ( $Z = 8.66$ )

表4. 3. 1

肉汁中でのウエルシュ菌 (H-3) 芽胞形成率

Incubation temp.	Incubation period		
	1 day	2 day	4 day
4°C	< .0003%	< .0003%	.003%
25°C	.02%	.002%	.0006%
37°C	1.2%	.12%	.15%
46°C	.003%	.0004%	< .005%

表4. 3. 2

D S 培地と肉汁中で形成した芽胞の熱抵抗性の違い

Temp.	D value	
	in DS	in Jus
90	31.8	68.5
91	24.6	55.9
92	19.0	45.7
93	14.7	37.3
94	11.4	30.5
95	8.8	24.9
96	6.8	20.3
97	5.3	16.6
98	4.1	13.6
99	3.1	11.1
100	2.4	9.0

(回帰直線より求めた値 in DS  $R=2.698 \times 10^{-4}$ in Jus  $R=6.618 \times 10^{-4}$ )

表5. 1. ウエルシュ菌食中毒の発生要因

食中毒の発生原因 (不適切な処理)	食中毒の発生件数
冷却	18
温蔵	9
前日以前に調理	13
残り物の利用	4
加熱・冷却時の汚染	3
再加熱	15
交差汚染	1

Bryan