総説

主な食中毒起因細菌の食品中における増殖について

伊藤 武^{*1} 坂井 千三^{*2}

Growth of Food Borne Bacteria in Foods

Takeshi ITOH^{*1} and Senzo SAKAI^{*2}

(*Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-16-25, Shibazaki-cho, Tachikawa, Tokyo, Japan; ^{*2}Tokyo Kenbikyoin Foundation:
1-100-38, Takamatsu-cho, Tachikawa, Tokyo, Japan)

はじめに

細菌性食中毒は食品中で大量に増殖した病原細菌の摂取あるいは増殖に伴って産生された毒素の摂取により起こる。食品に病原細菌が汚染した程度の少量菌では通常ヒトは発症しない。従って細菌性食中毒予防は食品への病原菌汚染防止も重要であるが、基本的には食品中での病原菌の増殖防止であろう。

食品内での病原菌の増殖は食品の pH、水分活性、酸化還元電位、食塩などの無機物、有機酸、栄養素、食品添加物、共存細菌など食品の内的要因及び食品の保存温度や湿度など外的要因がそれぞれ相互に影響している。食品中における腸炎ビブリオ、ブドウ球菌、コレラ菌などの消長については以前に藤原¹⁾が詳細に解説しているので、ここではサルモネラ、カンピロバクター、ウエルシュ菌及びボツリヌス菌を対象に著者らが検討を行ってきた成績を中心に解説する。

1. 食中毒起因細菌の感染・発症菌量

食品中での病原菌の増殖とその制御を考えるにあたって、感染・発症に必要な菌量を把握しなければならない。病原菌を経口的に接種してヒトが発症する菌量は、食中毒発生時の原因食品中の病原菌の菌数から推定が可能であるが、ブドウ球菌やウエルシュ菌食中毒以外については適切な原因食品がなく、感染菌量を正確にとらえることができない。表 1 にはこれまでに実施されたサルモネラ、カンピロバクター、腸炎ビブリオ、大腸菌及び赤痢菌の人体感染実験の成績を示した。サルモネラについては McCullough & Eisele^{2), 3)} が多くの人体感染実験

を実施している。S. newport や S. bareilly は 10^5 個投与で発病、S. derby, S. anatum では 10^6 個ないし 10^7 個の菌量で発症しており、サルモネラの発症菌量は血清型あるいは菌株による差がみられるが、最低 10^5 個の菌量が必要であろう。ウエルシュ菌については本菌の病原性を解明するために Dische ら⁶⁾ が実施した成績がある。英国で発生した耐熱性芽胞形成ウエルシュ菌食中毒株を 10^8 個 2 名に投与したところ 1 名が、 10^9 個投与で 30 名中 24 名が発症した。Strong⁷⁾ の実験ではウエルシュ菌 10^9 個投与で 13 名中 5 名が下痢や腹痛など食中毒症状を呈した。Hauschild ら⁸⁾ はエンテロトキシン産生の易熱性芽胞形成ウエルシュ菌について検討を行い、 10^9 個投与により 6 名中 5 名が発病している。東京都内に発生した 12 事例の本菌食中毒の原因食品からは平均 7.1×10^5 /g 個のウエルシュ菌が検出されているし、英国で発生した 106 事例の調査でも原因食品から 1.0×10^6 個/g 証明されている¹³⁾。これらの成績よりウエルシュ菌の感染発症に必要な菌量は 10^6 個/g であると考えられる。これに反して、カンピロバクター食中毒の場合はコレラや赤痢と同様に少量菌で発症すると考えられる。Robinson⁴⁾ や Black ら⁵⁾ の感染実験からは 10^2 個の投与で 3~4 日後に腹痛、下痢、発熱など典型的な症状が発現している。本菌が微好気の特長な環境でなければ発育しないことや、増殖温度が 31° 以上であることから食品中で増殖できる機会は極めてまれであろう。事実、カンピロバクター食中毒の原因食品は、菌の増殖が考えられない低温で保存する牛乳や調理後直ちに喫食されるバーベキューが多くみられている¹⁴⁾。従って、カンピロバクターの食中毒予防は食品中での菌の増殖態度よりも生存要因の解析が重要であろう。

^{*1} 東京都立衛生研究所多摩支所: 東京都立川市柴崎町 3-16-25

^{*2} 東京顕微鏡院: 東京都立川市高松町 1-100-38

表 1. 主な食中毒起因細菌の人体感染実験

菌 種	投 与 菌 量									報 告 者
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	
<i>Salmonella derby</i>					—	—	+			McCullough ら ²⁾
<i>Salmonella newport</i>					+	+				McCullough ら ²⁾
<i>Salmonella bareilly</i>					+	+				McCullough ら ²⁾
<i>Salmonella anatum</i> (I)				—	+					McCullough ら ³⁾
<i>Salmonella anatum</i> (II)				—	—	—	+			McCullough ら ³⁾
<i>Salmonella anatum</i> (III)				—	—	+	+	+		McCullough ら ³⁾
<i>Campylobacter jejuni</i>		≡								Robinson ⁴⁾
<i>Campylobacter jejuni</i>		+	≡	≡	≡	≡		≡		Black ら ⁵⁾
<i>Clostridium perfringens</i> (耐)								+	≡	Dische ら ⁶⁾
<i>Clostridium perfringens</i> (耐)								+	+	Strong ら ⁷⁾
<i>Clostridium perfringens</i> (易)									≡	Hauschild ら ⁸⁾
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>					+	≡	+	—	≡	滝川 ⁹⁾
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		—			+		+			Sanyal ら ¹⁰⁾
<i>Escherichia coli</i> (EPEC 0111)						≡		≡	≡	Ferguson ら ¹¹⁾
<i>Escherichia coli</i> (EPEC 0144)				—		+		≡		Ferguson ら ¹¹⁾
<i>Shigella dysenteriae</i> (A-1)		+		+						Levine ら ¹²⁾
<i>Shigella dysenteriae</i> (M131)	+	+	≡	≡						Levine ら ¹¹⁾

—: 非発病, +: 人体投与者の 1~25%発病, ++: 26~50%発病, ≡: 51~75%発病, ≡≡: 76~100%発病
 耐: 耐熱性芽胞形成ウエルシュ菌, 易: 易熱性芽胞形成ウエルシュ菌

表 2. 主な食中毒起因細菌の発育条件

菌 種	発育可能 温 度 域 (°C)	発育可能 pH (発育可能最低)	発育可能 最 高 食塩(%)	発育可能 最 低 水分活性
<i>Salmonella</i>	5.2~45	4.0~9.6	8.0	0.95
<i>Campylobacter jejuni</i>	31~45 ^{a)}	5.5~9.5	2.0	NT
<i>Clostridium perfringens</i>	10~52 ^{b)}	5.0~8.5	6.0	0.95~0.97
<i>Clostridium botulinum</i>				
Type A, B	10~48 ^{b)}	4.6	8.0	0.93~0.96
Type E	3.3~45 ^{b)}	5.0	4.0	0.96~0.97
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5~44	4.8~11	10	0.94
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0~44	4.6~9	5.0	NT
<i>Bacillus cereus</i>	7~49	4.3~9.3	7.5	0.95
<i>Staphylococcus aureus</i>				
発 育 (+O ₂)	6.7~46	4.0	16~18	0.83~0.86
(−O ₂)		4.6	14~16	0.9
毒素産生 (+O ₂)	10~45	4.0	10	0.86
(−O ₂)		5.3	9.5	0.94

NT: 未検討, ^{a)} 微好気条件, ^{b)} 嫌気条件

毒素型食中毒であるボツリヌス菌やブドウ球菌では食品中に蓄積された毒素が発症に関わる。ボツリヌス菌についてはヒトを死にいたらしめる強力な毒素であるため人体実験はない。発症毒素量は毒素型による差異も考慮しなければならないが、我が国で発生例の多い E 型については原因食品である“いずし”から 100~16,384 MLD の毒素が証明されており¹⁵⁾、かなり微量の毒素量で発症するものといえよう。

2. サルモネラ

温度: サルモネラの発育許容最低温度はこれまでの検討から 5.2~6.8°である¹⁶⁾(表 2)。著者ら¹⁷⁾が Heart infusion ブイヨンで検討した結果では図 1 のごとく 5.5°で 5 日頃から菌の増殖が観察されている。7.5°では 3 日、10°では 2 日から発育がみられる。食品中のサルモネラについては食品の種類により発育許容最低温度が異なり、卵焼きの場合 10°では発育がみられない。15°保

図1. 各種温度における HI ブイヨン中の *S. typhimurium* の発育態度 図2. 卵焼き中における *S. typhimurium* の増殖態度

経過と共に菌の死滅がみられる。pH 4.25 でも初期には菌数の減少が観察されたが、2日頃より徐々に増殖している。発育許容最低温度も pH によって影響され、pH 6～8 は発育許容最低温度が 5～6°であるが、pH 5.0 では 9°以上でなければ発育しない¹⁹⁾ (図5)。Ferreira ら²⁰⁾が 12 種の血清型について発育許容最低 pH と培養温度との関係を検討した成績では 30°培養では pH 3.8～4.0 が最低発育 pH である。20°でもほぼ同じく pH 3.8～4.2 で発育するが、10°の低温では pH 4.4～4.8 でなければ発育しない。pH を調整している有機酸の種類によっても発育許容最低 pH も変動する。塩酸では pH 4.01 でも発育できるが、酢酸やプロピオン酸では酸による抑制が強く、pH 5.40～5.50 でなければ発育できない。市販マヨネーズ (pH 4.05) に菌を接種し、25°や 30°に保存した場合 1 日保存で 10^6 /g 個が 10^3 /g 個に減少し、2 日後では菌が検出されないが、これをマヨネーズに含まれる酢酸の影響が大きいと考えられる¹⁷⁾。

水分活性 (A_w): サルモネラは水分活性が 0.92 ないし 0.95 以下では発育しない。Matches ら²¹⁾は普通ブイヨンに食塩を 0% から 8% 添加し、8°, 12°, 22°及び 37°の各温度条件下で *S. heidelberg*, *S. typhimurium*, *S. derby* の発育を検討した。食塩による発育態度はサルモネラの血清型による相違も認められるが、培養温度の影響も高い。22°培養における発育許容最高食塩濃度は *S. heidelberg* が 8%, *S. derby* が 7.5%, *S. typhimurium* が 5.0% である。しかし、低温条件下では低い食塩濃度によって発育が抑制される。すなわち、8°培養ではこれらのサルモネラは 1～3% NaCl で発育が抑制される。

存 2 日で 2 log の増殖が観察された¹⁷⁾ (図2)。レバーの表面に塗抹した *S. typhimurium* は 10°でも徐々に増殖が観察される。25°以上の温度では急速に増殖し、保存 12 時間で 10^4 個まで増殖する (図3)。市販の卵サラダ (pH 5.07), マカロニサラダ (pH 6.46), ポテトサラダ (pH 5.05) にサルモネラを接種し、25°や 30°に保存しても菌の増殖がみられず、保存時間の経過と共に菌数の減少が観察される。これはサラダに含まれる酢酸などによる pH の影響であろう。

pH: 発育許容最低 pH は Chung ら¹⁸⁾の実験では pH 4.05 ± 0.05 である。各種の pH に調整した Heart infusion ブイヨンに *S. typhimurium* を接種し、30°で培養したところ、図4に示すごとく pH 4.0 以下では時間の

図3. 生レバー中における *S. typhimurium* の増殖態度

図4. 各種 pH における HI ブイヨン中の *S. typhimurium* の発育態度

10°に保存した ground pork では食塩濃度が3.5%では保存8日頃からサルモネラの発育がみられるが、5%濃度では増殖しない。食塩濃度、pH及び保存温度は相互に関連し、サルモネラの発育態度がより複雑となる。例えばpH 5.0, 10°では2% NaClでもほとんどのサルモネラは発育出来ないが、同一条件でもpHを5.0から6.5にした場合には発育が可能である²²⁾。

なおサルモネラは乾燥に抵抗性が強く、 A_w 0.43 のド

ライミルク、飼料や骨粉でも14週間生存できるが、同じ水分活性であってもココアではサルモネラの生存が7週以内であり、乾燥食品における本菌の生存性は水分活性のみでなく、食品に含まれる拮抗物質などの影響も考慮しなければならない²³⁾。

3. カンピロバクター

C. jejuni や *C. coli* については少量菌感染により発症するため、増殖要因と合わせて食品中での本菌の生存性

も考慮しなければならない。

1) 発育条件

温度: *C. jejuni* の発育温度域は *C. coli* とほぼ同じで、31~46°の極めて限定された温度である。図6はBHIブイオンを好気条件で振とう培養した際の *C. jejuni* の発育態度を示した。本菌株は34~43°で増殖し、30°以下では2日以内に死滅、45°以上では1日以内に死滅している。増殖速度は環境の酸素分圧や培地成分の影響が強く、好気条件にしたBHIブイオンでは世代時間が37°で、58.3~76.9分、42°では54.1~59.4分で、サルモネラの分裂時間の約2倍の時間を要する²⁴⁾。

pH: *C. jejuni* の発育可能pHは5.5~8.0で、pH 5.0以下、pH 9.0以上では発育しない(図7)。至適pHは6.5~7.5である²⁵⁾。発育許容最低pHはGillら²⁶⁾の検討

ではpH 5.7~5.8である。低酸性条件での発育はpHを調節した有機酸の種類によっても大きく変動する。塩酸、クエン酸ではpH 5.7で発育するが、酢酸ではpH 6.5以上でなければ発育しない²⁷⁾。

塩類: *C. jejuni* や *C. coli* は食塩を含まない培地では発育せず、いわゆる好塩性があるが、高濃度の食塩では発育できない。食塩濃度が0.5~2%で発育する(図8)。食塩の代わりにKCl, MgClあるいはSrClでも発育できるし、白糖でも発育できることから、カンピロバクターの発育は浸透圧の影響が大きいものと考えられる。なお、*C. jejuni* は *C. coli* と異なり、白糖 0.4M 濃度でも発育できるが、*C. coli* はこの濃度では発育できないことから、両菌種の浸透圧に対する抵抗性が違うことが推察される²⁸⁾。

2) 生存条件

温度: 好気条件ではカンピロバクターは急速に死滅するが、低温に保存した場合には長期間に渡って生存できる。例えば生理食塩液中の *C. jejuni* は保存温度が25°で3日、30°で1日以内に死滅するが15°では約15日間、10°では20日間以上も生存する。ろ紙に菌を接種し、湿度85%の湿潤な環境に保存した場合、4°では3日以上生存するが、25°では2日で死滅する²⁴⁾(図9)。

pH: 酸性条件には極めて弱い細菌であるが、温度条件の影響が高い。Doyleら²⁶⁾はpH 4.0では10°や25°保存であっても3時間以内で死滅するが、4°では2日以上生存することを報告した。酢酸は他の有機酸に比して菌の死滅を早め、pH 5.0に調整した場合、10°保存でも1~2日で死滅する²⁷⁾。

図5. サルモネラにおける最低発育温度とpHとの関係 (Matchesら¹⁹⁾)

図6. BHIブイオン中における *C. jejuni* CF1 の発育態度

図 7. 各種 pH 域における *C. jejuni* CF1 の発育態度 (培養温度: 37℃)

図 8. 各種食塩濃度における *C. jejuni* CF1 の発育態度 (培養温度: 37℃)

乾燥: カンピロバクターは乾燥に極めて弱く、ろ紙に菌を 10^7 個接種して乾燥させ、生残菌数を測定したところ、乾燥直後で 10^3 個に減少、1 時間後で 10 個となった (図 10)。同一乾燥条件のサルモネラと大腸菌は徐々に生残菌数が減少するが、15 日以上生存が確認された²⁴⁾。

この他に共存する細菌、食品添加物あるいは香辛料なども本菌の発育や生存に影響を与える。

3) 食品中におけるカンピロバクターの増殖と生存性

食肉・肉製品: 生食肉中の *C. jejuni* の生存は保存温度による影響が大きい。すなわち、 -20° 保存では 1 か月以上、 4° では 3 日以上本菌が生存、 15° や 25° 保存では 1 日以内に死滅する。滅菌された肉では生肉と異なり 25° や 37° の温度条件でも長期間本菌が生存できる。生肉中でカンピロバクターが早く死滅する一因は、共存細菌の影響によるものと考えられる。Gill ら²⁵⁾ は肉の pH

図9. 湿潤条件下における *C. jejuni*, *Salmonella* 及び *E. coli* の生存

●: *C. jejuni* CF1, △: *S. typhimurium*, ×: *E. coli*, —: 4°C,: 25°C

図10. 乾燥状態での *C. jejuni*, *C. coli*, *E. coli* 及び *Salmonella* の生存

○—○: *C. jejuni*, ●—●: *C. coli*, ×—×: *E. coli*, △—△: *S. typhimurium*

も本菌生存に影響することを指摘した。pH 6.4 と pH 5.8 の滅菌肉を -1° で保存すると前者で 40 日以上カンピロバクターが生存するが、後者では 10 日で死滅する。ただし、25°の保存では両 pH の肉とも本菌の生存は変わらず 8 日で死滅する。ソーセージ、ミートパイ、

ハンバーグ、スープ中のカンピロバクターも保存温度や添加物などの影響により生存期間がそれぞれ異なっているが、室温で 2~3 日間生存する。

食肉の包装条件の影響: カンピロバクターのエネルギー代謝に関与する酵素などが 15% 以上の酸素によって

図 11. 鶏肉中における *C. perfringens* の発育態度

阻害を受けるため、本菌は大気中に保存すると早期に死滅する。従って包装条件が本菌の生存に影響することが推察される。CO₂とN₂によるガス充てん包装や真空包装した牛肉中の本菌は、20日以上長期間にわたり生存している。肉の色調を保持するために高濃度の酸素を加えたガス充てん包装ではカンピロバクターが徐々に死滅していく²⁹⁾。

牛乳：諸外国では生牛乳が本食中毒の原因となる例が多い。牛乳中における本菌の増殖性も他の食中毒起因細菌と著しく異なり、増殖可能な温度である37°や42°であっても発育がみられず、2～3日で菌が死滅する。4°では10日以上生存する。滅菌された牛乳では生存期間が8～28日間生存できるが、生牛乳では共存細菌やpHの変動あるいは牛乳中の殺菌物質のため4°で1～8日間しか生存できない³⁰⁾。

野菜：生野菜の表面に汚染した *C. jejuni* や *C. coli* の生存性は、野菜の種類よりも保存温度や包装方法による影響がみられる。キャベツ、キュウリ、ジャガイモ、タマネギ中のカンピロバクターは生肉と同様に低温保存では3日以上生存しているが、25°や37°では早期に死滅する。野菜をビニール袋に入れて口を輪ゴムで結んで密封状態で保存した場合、開放条件よりも長期間カンピロバクターが生存できる。すなわち、25°でも3日以上本菌が生存している。これは密封により酸素や乾燥が防げられたことによると考えられる²⁴⁾。

飲料水：飲料水中のカンピロバクターも保存温度の影響が大きく、10°以下の温度では10日以上生存してい

る。しかし、25°の温度条件では5日以内に死滅する。この際飲料水中に含まれる有機物や無機塩あるいは共存細菌によって生存期間が異なることが推察される。

4. ウエルシュ菌

我が国に発生するウエルシュ菌食中毒の原因食品は、食肉や魚介類を原料とした加熱調理された惣菜がほとんどである。ウエルシュ菌はサルモネラや腸炎ビブリオの場合と異なり、加熱調理によっても生残したウエルシュ菌芽胞が嫌気的な条件の備わった食品を放冷、保管する間に発芽、増殖する。

温度：嫌気性の培養基におけるウエルシュ菌の発育許容最低温度は10°であるが、食品中では12～15°以下では発育しない。最適の発育温度は他の食中毒起因細菌より高く、43～47°である。49°以上の温度では菌株により異なる。Brown ら³¹⁾は51.1°で、Shoemaker ら³²⁾は52.3°で発育する菌株があることを報告しているが、53°以上では発育しない。47°や50°の高温条件下で cooked meat 培地で培養した際、菌数が一次的に著しく減少するが、その後急速に増殖する現象がみられ、これを“Phoenix phenomenon”と呼んでいる³³⁾。これは高温により損傷を受けた菌が時間の経過と共に回復し、正常の状態に復帰して増殖するものと考えられるが、本現象はすべての食品内で認められるものではない。鶏肉中における食中毒由来ウエルシュ菌は15°保存では24時間頃から徐々に増殖して48時間で10⁷/gに達している(図11)。25°では6時間後から増殖して24時間で10⁸/g、30°や37°では6時間後で10⁷/gに増殖する。42°や

図 12. 各種温度における鶏肉中の *C. perfringens* の増殖と芽胞形成並びにエンテロトキシン産生性
●—●: 生菌数, ○—○: 芽胞数

47°では急速に増殖し3時間で 10^6 /gである³⁴⁾。Solbergら³⁶⁾はフランクフルトソーセージ中のウェルシュ菌の増殖を検討した結果、10°以下では発育しないが、12°で5日後に、15°では3日後に 10^6 /gの増殖がみられている。Hallら³⁶⁾は調理牛肉中では15.6°で5日後でも増殖がみられないが、18.3°で初めて菌の増殖が観察されている。26.7°保存では1~2日後で 10^6 /g以上に増殖、46°では4時間以内に 10^6 /g以上に増殖する。食肉中では35°の条件では2~4時間の短い誘導期後に急速に増殖を開始するが、46°では誘導期がほとんどなく直ちに発育するが、発育後早期に菌の死滅がみられ、時間の経過に従って生菌数が減少する。

ウェルシュ菌の分裂時間は腸炎ビブリオと同様に極めて早く、調理食肉やスープ中であっても37°で10~12分、45°では8.5~12.5分である³⁷⁾。

保存温度と芽胞形成: ウェルシュ菌の芽胞形成はpHの影響が大きく、pH 6.0~9.0で芽胞を形成し、pH 5.5以下では形成しない。pHが6.0以下である食肉や魚肉では一般に菌の増殖に関わらず芽胞を作らないし、食品にウェルシュ菌が分解する炭水化物が含まれるとpHが酸性に傾き、芽胞を形成しない。しかし、調理ハンバーガーや食肉中では菌の増殖に伴って芽胞が形成されることがある。この際にも保存温度が影響し、図12に示すごとく鶏肉では15°や25°では芽胞数がほとんど増えない。30°では1日後より急速に芽胞数が増加する。37°や42°では菌の増殖に伴って芽胞が形成される³⁴⁾。しかし、47°では急速に増殖するも芽胞を全く形成しない。DS培地における芽胞形成の最適培養温度が37~40°であることが指摘されているが、食肉中でも同様の傾向で

あるといえる。

なお、ウェルシュ菌のエンテロトキシンが芽胞形成と平行して産生されるため、食品内で大量に芽胞が形成されれば当然食品に本毒素が産生される。図12に示すごとく37°では芽胞形成が顕著であり、エンテロトキシンも6時間頃より証明され、12時間で $1.0 \mu\text{g/g}$ の毒素量となっている。従って条件によっては食品内でエンテロトキシンが産生され、本中毒の発症に関連するかも知れないが、ウェルシュ菌のエンテロトキシンがpH 4.0以下では急速に失活するため、胃内で胃酸(pH 2以下)の影響によりエンテロトキシンが破壊を受け、腸管毒として作用しないものと推察される。

自然放冷と菌の増殖: ウェルシュ菌食中毒の特徴は加熱調理過程でも生残したウェルシュ菌芽胞が食品の冷却過程で速やかに増殖することである。図13のごとく加熱後2時間で75°から25°の温度に急激に降下させた場合では保存5時間でもほとんど菌の増殖がみられない。これに反し、加熱後徐々に温度を下げ、6時間後に25°にした際には保存5時間で 10^6 /gにまで増殖している。さらに興味あることは、この条件では菌の増殖に関わらず、芽胞がほとんど形成されない³⁴⁾。

pH: ウェルシュ菌の発育許容pH域は5.5~8.0で、pH 5.0以下、pH 9.0以上では発育しない。

酸化還元電位(E_h): ウェルシュ菌の発育は他の嫌気性細菌ほど厳密な嫌気度を要求しない。発育許容 E_h は-125 mV から +350 mV (pH 7.0)、最適条件は-200 mV であることが指摘されている。pHや水分活性などによる影響も高く、 A_w 0.985では発育可能最低 E_h が+189, A_w 0.975の場合は E_h +66である³⁸⁾。カ

図 13. 保存温度の降下と *C. perfringens* の増殖態度

レーライス、シューマイ、スコッチエッグ、肉団子、肉の煮付け、鶏肉などのスープ、むきえび甘煮、ますの大根煮、くじら煮付けなどがウエルシュ菌食中毒の原因食品となっており、これらの大量加熱調理食品内はウエルシュ菌が発育できるであろう酸化還元電位が保たれているものと考えられる。高い酸化還元電位であってもウエ

ルシュ菌が発育を始めると本菌が還元性の代謝物を産生し、増殖でき易い条件が整えられる。

水分活性：最低発育許容水分活性は食塩による溶液では 0.97 であるが、ブドウ糖液ではやや低く A_w 0.96、グリセリンは更に低く A_w 0.95 が最低発育許容水分活性である。食塩濃度 4% では発育を阻害されないが、NaCl 5

～6% では一部の菌株が発育できないし、NaCl 7～8% ではほとんどが発育できない³⁹⁾。発育温度や pH によっても発育許容水分活性が異なる。pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 の各 pH と A_w 0.995, 0.99, 0.98, 0.97, 0.965 におけるウェルシュ菌の増殖態度を図 14 に示した⁴⁰⁾。 A_w 0.995 の場合は水分活性よりもむしろ pH による発育阻害の影響が大きい、 A_w 0.97 では pH による影響がみられない。水分活性と 37°, 46°の培養温度並らびに pH 6.5 と pH 5.5 における発育態度を表 3 に示した⁴⁰⁾。 A_w 0.96 では 37°では発育するが、46°では pH 6.5 であっても発育が抑制され、発育許容水分活性は培養温度によっても影響を受ける。

5. ボツリヌス菌

ボツリヌス菌の増殖態度や芽胞の抵抗性がタンパク分解菌 (A 型, B 型, F 型の各ボツリヌス菌) とタンパク非分解菌 (E 型, 一部の B 型と F 型の各ボツリヌス菌) によって特徴がみられるので、両者に区別して論じる。

温度: タンパク分解菌の発育許容温度域は 10～45°で

図 14. *C. perfringens* の発育に及ぼす pH と A_w の影響 (Strong ら⁴⁰⁾)

ある。Tanner ら⁴¹⁾は 15°では A 型菌と B 型菌 17 菌株のすべてが発育したが、10°では 5 菌株が発育し、5°ではいずれの菌株も発育していない。A 型菌と B 型菌の最適発育温度は 37°であり、その際の世代時間は腸内細菌の約 2 倍の 42 分である⁴²⁾。

タンパク非分解菌はタンパク分解菌よりも低温で発育し、Schmidt ら⁴³⁾の報告では牛シチュー中の E 型菌は 3.3°で 36 日後に菌の増殖と毒素の産生がみられている。2.2°保存では 104 日観察でも陰性である。貝やカキに接種した E 型菌は 4°では発育し、2°では発育していない。タンパク非分解菌の B 型菌も E 型菌と同様に 3.3°で 129 日後に、4.4°で 33 日後、5.6°では 27 日後にそれぞれ発育と毒素の産生が観察されている。タンパク非分解菌の F 型菌も同様に 3.3°、40 日後に毒素が産生しており、タンパク非分解菌の最低発育温度は 3.3°である。発育温度には食品の pH、水分活性、酸化還元電位が相互に関連しているし、最低の発育温度も食品の種類により異なる。例えば E 型菌は培地中では 4°や 8°の低温で発育が可能であるが、かに肉中では 10°以下の温度では発育できず、12°で発育が始まる⁴⁴⁾。

著者ら⁴⁵⁾は真空包装幸子蓮根による A 型中毒の発生因子の解析として、本食品中における A 型菌の増殖態度の検討を行った (表 4)。実験に供試した蓮根の pH が 5.9, A_w 0.966, 幸子味噌の pH 6.0, A_w 0.948 であり、*Bacillus* 属などの細菌汚染が 10^6 /g みられた幸子味噌に A 菌の芽胞を 1 g 当たり 10 個、 10^2 個及び 10^4 個接種し、真空包装を行い、10°, 15°, 20°及び 25°に保存した。10°と 15°保存では接種菌量が多くても菌数の増加がみられないし、毒素も産生されていない。20°では保存 15 日後でもほとんど増殖しないが、20 日後では一部の辛子蓮根に A 型菌が 10^7 個/g に増殖し、少量の毒素 (100LD₅₀) が検出されている。25°保存では最初の接種菌量に関係なく、保存 7 日後より菌の増殖と毒素が検出され、15 日後では大量の毒素産生がみられている。

表 3. *C. perfringens* の発育に及ぼす水分活性、pH 及び培養温度の影響 (Strong ら⁴⁰⁾)

A_w	37°C				46°C			
	IU 1168		NCTC 8238		IU 1168		NCTC 8238	
	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 5.5
0.995	3.5 ^{a)}	8.0	3.5	9.5	2	5	2.0	8
0.980	5.5	19.5	8	18	3	6	4.5	11
0.975	7	11.5	12	15.5	6	9	30	18.5
0.970	10	30	21	32	6	15	12	17
0.965	16.5	36	34	— ^{c)}	25	72	NG ^{b)}	37
0.960	38	58	37	— ^{c)}	— ^{c)}	— ^{c)}	NG	— ^{c)}

a) 40 Klett units の濃度に到達する lag time (時間)

b) 発育せず

c) 72 時間培養後でも 40 Klett units の濃度に発育しない。

表4. 真空パックした“からしれんこん”中におけるボツリヌス毒素の産生 (保存温度: 25°C)

保存日数	ボツリヌス生菌数と毒素量					
	接種芽胞数: 10 個/g		接種芽胞数: 10 ² 個/g		接種芽胞数: 10 ⁴ 個/g	
	ボツリヌス 菌数/g	ボツリヌス* 毒素/g	ボツリヌス 菌数/g	ボツリヌス* 毒素/g	ボツリヌス 菌数/g	ボツリヌス* 毒素/g
1 日	2.0×10	—	1.1×10 ³	—	NT	—
2 日	2.9×10 ²	—	6.0×10 ²	—	NT	—
3 日	NT	—	NT	—	1.7×10 ⁵	—
4 日	2.0×10	—	3.0×10 ³	—	NT	—
7 日	8.4×10 ⁴	—	2.3×10 ⁵	10	1.5×10 ⁶	10
	4.9×10 ⁶	100	5.4×10 ⁶	100	1.8×10 ⁷	100
9 日	<10 ²	—	2.6×10 ⁵	100	1.8×10 ⁴	—
	1.2×10 ⁵	<10	1.9×10 ⁶	100	3.6×10 ⁴	—
15 日	1.6×10 ⁷	25,710	1.5×10 ⁶	14,850	2.4×10 ⁶	20,190
	8.4×10 ⁶	100	4.5×10 ⁶	13,020	2.4×10 ⁶	62,580

* マウス *i.p.* LD₅₀/g, NT: 検討せず
n=2

表5. 真空包装したさつま揚げ中のタンパク分解ボツリヌス菌の増殖

保存日数	20°C保存		25°C保存	
	一般生菌数	ボツリヌス毒素 (LD ₅₀)	一般生菌数	ボツリヌス毒素 (LD ₅₀)
2	6.2×10 ⁷	—	3.6×10 ⁵	—
3	1.6×10 ⁸	—	5.1×10 ⁷	<10
5	1.8×10 ⁸	<10	2.0×10 ⁷	10
7	2.3×10 ⁸	<10	6.0×10 ⁸	10 ²
10	5.7×10 ⁸	10 ²	3.6×10 ⁷	10 ³
14	1.4×10 ⁸	10 ²	7.3×10 ⁷	10 ³

さつま揚げ: pH 6.67, A_w 0.968, 一般生菌数 3.5×10²
供 試 菌: A 型 (97), B 型 (Okra)

さつま揚げの蒸煮 (85°, 20 分) や油ちょう (160~180°, 3~4 分) の処理によってもタンパク分解菌の芽胞が死滅しないことから, さつま揚げ中でのボツリヌス菌の増殖態度を検討した (表5). pH 6.67, A_w 0.968 の市販さつま揚げにタンパク分解菌を 10⁵ 菌/g 接種し, 真空包装を行って 5°, 15°, 20° 及び 25° に保存しボツリヌス毒素を検査した. 5° と 15° 保存では毒素の産生がみられなかった. 20° 保存では 5 日後から少量の毒素が検出され, 10 日では 10²LD₅₀ の毒素が, 25° 保存では 3 日後から毒素が証明された. タンパク非分解菌についてもタンパク分解菌の場合と同様に 20° 保存で 7 日後, 25° 保存では 5 日後より毒素の産生がみられた. 真空包装によりさつま揚げに汚染していた好気性菌の発育が抑制されたが, 無包装のさつま揚げでは好気性細菌が急速に発育し, ボツリヌス毒素の産生がみられても, 産生量が 10LD₅₀ あるいはそれ以下であった.

Notermans ら⁴⁶⁾は真空包装したじゃがいも中での毒素産生を検討している (表6). タンパク分解菌 (A 型と B 型) は 10°, 8 日保存で少量の毒素が証明されているし, 15° では 5 日頃より一部の食品が毒素を産生した. 14 日後では大量の毒素がみられている. これに対してタンパク非分解菌の E 型では 10° 保存で 9 日後で毒素の産生がみられている.

pH: タンパク分解菌, 非分解菌とも最低の発育 pH は 4.6 である. 食品の種類により発育可能 pH は異なり, 野菜では pH 4.86~5.2, 果物ではこれよりもやや高く pH 5.2~5.44 である⁴⁷⁾. 通常 pH 4.6 以下では発育できないが, タンパク質を多量に含んだ食品や *Bacillus* 属などの細菌の混在によって pH 4.6 以下の低い pH 値でも発育する場合がある. Smelt ら⁴⁸⁾や Tanaka⁴⁹⁾は大豆タンパクや豚肉では pH 4.2 あるいは pH 4.36 の低い pH でボツリヌス菌が発育することを指摘している. Raatjes

ら⁵⁰⁾は *B. subtilis* あるいは *B. licheniformis* が共存した大豆タンパクでは、タンパク分解菌は pH 4.0 でも毒素を産生することを報告している。

水分活性: タンパク分解菌の方がタンパク非分解菌に比して低い水分活性で発育できる。A 型菌は A_w 0.94~0.96, E 型菌は A_w 0.97 以上で発育する。グリセリンで水分活性を調節した方が食塩によって調製した A_w 値より低い A_w 値で発育が可能である。グリセリンを使用した場合、A 型菌は A_w 0.93 まで発育できるし、E 型菌の発育可能最低 A_w 値が 0.94 である。水分活性は pH による影響が高く、表 7 のごとく発育が可能な pH 5.3 であっても A_w 0.98 以下では A 型菌は発育できない。E 型

菌の場合にも pH が 6.0 であるにもかかわらず水分活性が 0.97 では発育できない⁵¹⁾。著者らの検討では pH 4.5~4.9, A_w 0.95~0.96 の真空包装した大根の漬物に A 型菌、E 型菌をそれぞれ接種し、15°や 30°に 2 か月間保存してもボツリヌス菌の発育が認められず、pH と水分活性の相乗効果が認められる。

Shigehisa ら⁵²⁾は食品の pH や水分活性を変動させ、ボツリヌス菌の発育態度を検討した。pH 5.73, A_w 0.97, NaCl 3.29% のくん製非加熱ハムに A 型菌と B 型菌を接種した場合 27°, 14 日保存で毒素の産生がみられるが、食塩濃度を 5.18% (A_w 0.94) に高めた場合には 56 日後でも毒素の産生がみられない。Ala-Huikku ら⁵³⁾のニジマスによる E 型菌の実験では pH 5.3, A_w 0.96, NaCl 2.7% の条件のニジマスでは 10°や 20°保存で、14 日後に毒素が証明される。しかし、pH を 4.9 に下げ、食塩濃度を 12.7% から 15.67% (A_w 0.94) にした場合 1 か月後でも毒素の産生がみられない。

ボツリヌス中毒は長期保存食品が原因となることが多

表 6. 真空パックしたじゃがいも中でのボツリヌス毒素の産生 (Notermans ら⁴⁶⁾)

保存温度	保存日数	ボツリヌス毒素産生		
		Type A	Type B	Type E
20°C	4	+	+	-
	7	nt	nt	+
	8	##	##	nt
	9	nt	nt	##
15°C	4	±	-	nt
	8	±	±	nt
	9	+	+	nt
	14	++	##	nt
10°C	8	±	±	nt
	9	nt	nt	+
	14	-	-	+
	23	-	-	++
4°C	9	-	-	-
	18	-	-	-
	40	-	-	-

±: <10 *i.p.* mouse LD₅₀, +: 10~10² LD₅₀,

++: 10³ LD₅₀, ##: ≥10⁴ LD₅₀, nt: not test

表 8. *C. botulinum* type A 及び B が Pork Slurry 中で毒素を産生する確率 (Roberts ら⁵⁴⁾)

NaCl (%)	NaNO ₂ (μg)	保 存 温 度 (°C)			
		15	17.5	20	35
2.5	100	48	66	76	59
2.5	200	9	16	25	13
2.5	300	1	2	3	2
3.5	100	14	25	35	20
3.5	200	2	5	8	4
3.5	300	0	1	1	1
4.5	100	3	5	9	4
4.5	200	1	1	2	1
4.5	300	0	0	1	0

pH 5.5~6.3, 芽胞数: 10 個

$$P = \frac{1}{(1 + e^{-u})}$$

表 7. ボツリヌス菌の発育と食塩濃度、水分活性及び pH の影響 (Baird-Parker ら⁵¹⁾)

A_w	NaCl 濃度 (%)	A 型菌 (pH)					B 型菌 (pH)					E 型菌 (pH)				
		7.0	6.0	5.5	5.3	5.0	7.0	6.0	5.5	5.3	5.0	7.0	6.0	5.5	5.3	5.0
0.997	0	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
0.99	1.19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
0.98	2.91	+	+	+	-	-	+	+	+	+	NT	+	+	+	-	-
0.97	4.58	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NT	+	-	-	-	-
0.96	6.10	+	-	-	-	-	+	-	-	-	NT	-	-	-	-	-
0.95	7.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-
0.94	8.93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-
0.93	10.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-

+: 発育, -: 発育せず, NT=not test

いので、温度、pH、水分活性の他に亜硫酸塩やソルビン酸塩などの発色剤や食品添加剤あるいは酸化防止剤などによるボツリヌス毒素の産生に及ぼす影響については広く検討されているが、ここでは Roberts ら⁵⁴⁾の成績をかかげるにとどめる。Roberts らは食品中でボツリヌス毒素の産生に影響を与える食塩、亜硝酸塩、硝酸塩、ソルビン酸、保存温度など各種の要因を数多くの実験データに基づいて解析し、食品中でボツリヌス毒素の産生する危険率を求めている。表 8 に示すごとく NaCl 2.5% の pork slurry に NaNO_2 の濃度が $100 \mu\text{g}$ の添加では 48~76% が毒素を産生するが、 NaNO_2 $300 \mu\text{g}$ 添加では毒素産生の危険率が 1~3% となる。食塩濃度を 4.5% にした場合には NaNO_2 の濃度に関わりなく毒素産生の危険率は極めて低い。

ま と め

細菌性食中毒の発生要因は病原菌の食品への汚染、食品中での生存性、食品中での増殖性である。食中毒起因細菌がウシ、ブタなどの家畜やニワトリなどの家禽、河川、海、土壌など自然界に広く分布するため、食品がこれらの病原菌で汚染を受ける機会が高く、食品への汚染を完全に制御することは困難である。食中毒予防対策は食品中での病原菌の増殖を温度、pH、水分活性、酸化還元電位などによって制御することであると言っても過言でなからう。ただし、カンピロバクター食中毒については少量菌感染で発症するため食品内での本菌生存性の制御対策が望まれる。

文 献

- 1) 藤原喜久夫: 食衛誌. **9**, 81~90 (1968).
- 2) McCullough, N. B., Eisele, C. W.: J. Infect. Dis. **89**, 209~213 (1951).
- 3) McCullough, N. B., Eisele, C. W.: *ibid.* **88**, 278~289 (1951).
- 4) Robinson, D. A.: Br. Med. J. **282**, 1,548 (1981).
- 5) Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., Blaser, M. J.: J. Infect. Dis. **157**, 472~479 (1988).
- 6) Dische, F. E., Elek, S. D.: Lancet **2**, 71~74 (1957).
- 7) Strong, D. H., Duncan, C. L., Perna, G.: Infect. Immun. **3**, 171~178 (1971).
- 8) Hauschild, A. H. W., Thatcher, J.: J. Food Sci. **32**, 467~469 (1967).
- 9) 滝川 巖: 横浜医学. **9**, 313~322 (1958).
- 10) Sanyal, S. C., Sen, P. C.: "Int. Sym. V. *parahaemolyticus*" p. 227~235 (1974), Saikon Publishing.
- 11) Ferguson, W. W., June, R. C.: Am. J. Hyg. **55**, 155~169 (1952).
- 12) Levine, M. M., DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Takeuchi, A., Gangarosa, E. J., Snyder, M. J., Libonati, J. P.: J. Infect. Dis. **127**, 261~270 (1973).
- 13) 善養寺 浩, 坂井千三, 伊藤 武, 丸山 務, 工藤泰雄: 食衛誌. **11**, 282~291 (1970).
- 14) 伊藤 武, 斎藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 高橋正樹, 稲葉美佐子, 高野伊知郎, 坂井千三, 大橋 誠: 感染症誌. **57**, 576~586 (1983).
- 15) 三田村 弘, 斎藤富保, 小野悌二, 森 量夫: 北海道衛研所報, **22** 70~74 (1972).
- 16) Matches, J. R., Liston, J.: J. Food Sci. **33**, 641~645 (1968).
- 17) 斎藤香彦, 伊藤 武, 柳川義勢, 丸山 務, 坂井千三: 東京衛研年報. **31**, 103~108 (1980).
- 18) Chung, K. C., Goepfert, J. M.: J. Food Sci. **35**, 326~328 (1970).
- 19) Matches, J. R., Liston, J.: J. Milk Food Technol. **35**, 49~52 (1972).
- 20) Ferreira, M. A. S. S., Lund, B. M.: Lett. Appl. Microbiol. **5**, 67~70 (1987).
- 21) Matches, J. R., Liston, J.: J. Milk Food Technol. **35**, 39~44 (1972).
- 22) Alford, J. A., Palumbo, S. A.: Appl. Microbiol. **17**, 528~532 (1969).
- 23) Juven, B. J., Cox, N. A., Bailey, J. S., Thomson, J. E., Charles, O. W., Shutze, J. V.: J. Food Prot. **47**, 445~448 (1984).
- 24) 伊藤 武: 食品と微生物 **4**, 10~22 (1987).
- 25) Doyle, M. P., Roman, D. J.: J. Food Prot. **44**, 596~601 (1981).
- 26) Gill, G. O., Harris, L. M.: Appl. Environ. Microbiol. **44**, 259~263 (1982).
- 27) 伊藤 武, 神 真知子, 鈴木敬子, 入倉喜久, 榎田隆一, 平田一郎, 池島伸至, 寺山 武: 食品と微生物 **5**, 137~143 (1988).
- 28) 高橋正樹, 伊藤 武, 斎藤香彦, 高野伊知郎, V. Ika, 大橋 誠: 東京都衛研年報. **36**, 8~15 (1985).
- 29) 伊藤 武, 高野伊知郎, 高橋正樹, 富岡芳彦, 高橋栄一: 食品と微生物 **2**, 97~101 (1985).
- 30) Boer, E., Hartog, B. J., Borst, G. H. A.: Neth. Milk Dairy J. **38**, 183~194 (1984).
- 31) Brown, D. F., Twedt, R. M.: Appl. Microbiol. **24**, 599~603 (1972).
- 32) Shoemaker, S. P., Pierson, M. D.: Appl. Environ. Microbiol. **32**, 803~807 (1976).
- 33) Collee, J. G., Knowliden, J. A., Hobbs, B. C.: J. Appl. Bacteriol. **24**, 326~339 (1961).
- 34) 稲葉美佐子, 伊藤 武, 坂井千三: 東京都衛研年報. **33**, 143~149 (1982).
- 35) Solberg, M., Elkind, B.: J. Food Sci. **35**, 126~129 (1970).
- 36) Hall, H. E., Angelotti, R.: Appl. Microbiol. **13**, 352~357 (1965).
- 37) Willardson, R. R., Busta, F. F., Allen, C. E.: J. Food Prot. **42**, 144~148 (1979).
- 38) Mead, G. C.: J. Appl. Bacteriol. **32**, 468~475 (1969).
- 39) Gough, B. J., Alford, J. A.: J. Food Sci. **30**, 1,025~1,028 (1965).
- 40) Strong, D. H., Foster, E. F., Duncan, C. L.: Appl. Microbiol. **19**, 980~987 (1970).

-
- 41) Tanner, F. W., Oglesby, E. W.: Food Res. **6**, 481 (1941).
42) Ohye, D. F., Scott, W. J.: Aust. J. Biol. Sci. **6**, 178~181 (1953).
43) Schmidt, C. F., Lechowich, R. V., Folinazzo, J. F.: J. Food Sci. **26**, 626~630 (1961).
44) Solomon, H. M., Kautter, D. A., Lynt, R. K.: J. Food Prot. **45**, 516~518 (1982).
45) 伊藤 武, 稲葉美佐子, 坂井千三: 食品と微生物 **3**, 35~38 (1986).
46) Notermans, S., Dufrenne, J., Keijbets, M. J. H.: J. Food Prot. **44**, 572~575 (1981).
47) Townsend, C. T., Yee, L., Mercer, W. A.: Food. Res. **19**, 536~542 (1954).
48) Smelt, J. P. P. M., Raatjes, G. J. M., Crowther, J. S., Verrips, C. T.: J. Appl. Bacteriol. **52**, 75~82 (1982).
49) Tanaka, N.: J. Food Prot. **45**, 234~237 (1982).
50) Raatjes, G. J. M., Smelt, J. P. P. M.: Nature **281**, 398~399 (1979).
51) Baird-Praker, A. C., Freame, B.: J. Appl. Bacteriol. **30**, 420~429 (1967).
52) Shigehisa, T., Kozaki, S., Sakaguchi, G.: Jpn. J. Vet. Sci. **46**, 917~920 (1984).
53) Ala-Huikka, K., Nurmi, E., Pajulahti, H., Raevuori, M.: Nord. Vet. Med. **29**, 386~391 (1977).
54) Robberts, F. A., Gibson, A. M., Robinson, A.: J. Food Technol. **16**, 337~355 (1981).