

氏名	大森 康雄
学位の種類	博士（学術）
学位授与年月日	平成30年3月22日
学位論文名	生ハムの新規迅速製法に関する食品衛生学的研究 —微生物学的安全性の検証と <i>Listeria monocytogenes</i> 制御のための留意点—
論文審査委員	主査 西川 禎一 教授
	副査 佐伯 茂 教授
	副査 増田 俊哉 教授

論文内容の要旨

ドイツのラックスシンケンの様な生ハムは、生肉（豚ロース肉など）を塩水に漬けた後、湿度調整された風や燻煙により乾燥させ、風味と保存性を付与することで製造される。しかしながら、製造には長い時間を要し、その間の食中毒菌による汚染リスクや製品の食塩濃度のバラつきが課題となっている。

L. monocytogenes（リステリア）が1980年代初頭に食中毒菌として認知されて以降、リステリア症の大流行や散発事例が相次いでおり、2017年に発生した南アフリカの大流行では死者100名を超え、スペインでは今世紀に入ってから発症者が急激に増加している。食中毒の原因となった食品には、野菜、チーズ、果物、食肉製品などがあり、リステリアは食品だけでなく、環境中至る所に生息していることが明らかとなった。リステリアは、グラム陽性、通性嫌気性の桿菌で、低温、高塩濃度、幅広いpH条件下で増殖することができる。そのため、制御が難しく、食品中での生育や食品製造現場への定着を許してしまうリスクが高い食中毒菌となっている。

第1章：生ハムの新規迅速製法における食中毒菌の消長

わが国における生ハムの製造は、通常1ヶ月程度を要する。そこで、製造の効率化を図るために予めスライスした原料肉を塩漬するという生ハムの新規迅速製法（迅速製法）を開発

した。これにより、製造時間は従来のおよそ 5%と大幅に短縮された。本章では、この迅速製法の安全性を従来の製造法（従来製法）と比較検証することを目的とした。方法として、代表的な食中毒菌であるリステリア、腸管出血性大腸菌 0157: H7、サルモネラ エンテリティディス、黄色ブドウ球菌を食肉に接種し、迅速製法と従来製法に供試し、消長を追跡した。別途、食中毒菌を接種していない食肉で製造を行い、衛生指標菌の消長も確認した。結果、迅速製法において食中毒菌は増殖することなく、むしろ減少する傾向であった。衛生指標菌についても増殖は観られなかった。本研究の結果より、迅速製法は従来製法と比較して、遜色ない安全な製法であると判断した。

第 2 章：原料肉の細菌検査

第 1 章の結果より、迅速製法では食中毒菌は増殖せず、減少する傾向にあることが分かったが、初発の菌数が高値であった場合にはリスクとなる可能性が考えられたため、迅速製法で用いる原料肉の清浄度について細菌検査を実施し、評価を行った。結果、食中毒菌はほとんどが検出限界以下であること、リステリアが僅かではあるが検出される場合があることが分かった。

第 3 章：乳酸による *L. monocytogenes* の殺菌

第 2 章で、低率ではあるがリステリアが原料肉を汚染することが判明したので、リステリアを乳酸で殺菌する方法について検討した。乳酸のリステリアに対する殺菌効果を乳酸水溶液、あるいは有機物が含まれている液体培地に乳酸を溶解させた系で確認した。その結果、水溶液では 1%以上の濃度でリステリアを約 1/100 以下に 5 分以内に殺菌できることが分かったが、培地の系ではその効果は大きく減弱した。さらに複数のリステリア株で培地の系における殺菌効果を検証したが、株によってもその効果は異なり、総じて、少なくとも 3%以上の濃度がリステリアを殺菌する為には必要であった。

第 4 章：乳酸処理による *L. monocytogenes* の耐熱性増強

リステリアには弱い酸や熱に長時間曝されると、続いて強い酸や熱で処理しても耐性を示す場合があることが知られている。本研究における乳酸短時間処理で生残したリステリアについても、この様な耐性増強のリスクがあるかどうか検証する試験を行った。1%乳酸トリプトソーヤブイオンでリステリアを 1 分処理した後に加熱処理を行った。また、加熱前に 10 分から 360 分の回復時間を設けた試験を実施した。その結果、乳酸処理直後に加熱を行った検体では、乳酸処理をせずに加熱を行った検体に比べて D 値が約 1/3 に縮小し耐熱性が弱くなったのに対し、室温で回復時間を 120 分設けた検体では、D 値が約 3 倍に延長され、耐熱性の増加が示唆された。回復時間を低温で保持した場合にはこの様な耐熱性の増強は起こらなかった。これらのことは製造工程における低温保持や工程間の待機時間の短縮等、ハードル理論の實踐に際して製造管理の重要性を再認識させるものであった。

第 5 章：乳酸処理による *L. monocytogenes* 耐熱性増強機構の解明

乳酸短時間処理による耐熱性増強について、遺伝子レベルでのメカニズム解明を試みた。耐熱性に関与することが知られているヒートショック遺伝子について、定量リアルタイムPCRで発現変化を確認した。その結果、回復時間 60 分で、分子シャペロン *c1pB* および *c1pE* の発現が有意に上昇した。加えて、RNA-sequencing による網羅解析を行った結果、SOS 応答タンパク、熱感受性に関与するタンパクなどが本研究の耐熱性増強に影響を与えていることが示唆された。一方、ストレス応答に強く関わりとされている SigB に制御される遺伝子群は発現が上昇していなかった。これらのことは、本研究で観られた乳酸短時間処理に伴う耐熱性増強が、これまで一般に考えられていたものとは異なる機構を介してもたらされる可能性を示唆している。

以上、本研究により、生ハムの新規迅速製法が微生物学的に安全な製造方法であることが示された。迅速製法に使用する原料肉は比較的清浄度の高いものであったが、乳酸処理を行うことで、さらにリスクを低減することが可能であることが分かった。しかしながら、不適切な条件下では、乳酸処理後、リステリアの耐熱性が増強することが示唆され、それは、これまでに知られていなかった機構によるものであると考えられた。

論文審査結果の要旨

生ハムは、ブロック肉を長時間塩漬し乾燥後にスライスして包装することで製品となるが、この方法では塩の浸透具合にばらつきが生じやすく製造に要する時間も長い。そこで申請者らは、予めスライスした肉を塩漬乾燥することで従来法の 1/20 以下に製造時間を短縮でき、なおかつ品質にむらのない生ハムを製造する技術を開発し特許を取得した。しかしながら、食肉製品については、その安全性を担保するために食品衛生法によって製造基準が細かく定められており、非加熱食肉製品の規格基準が 1982 年に告示されて以来 30 年以上が経過しているが新規製法の提案はなかった。申請者は、開発した新規迅速製造法の安全性を実証、さらなる改善に寄与するために本研究を行った。

第 1 章において生ハムの迅速製法が、従来製法と遜色無い安全な製法であることを示している。食肉製品と関係の深い危害微生物が従来製法と同様に製造工程中で減少すること、水分活性なども従来製法と同等の値にできる上に、これらを極めて迅速に目標値まで到達させることが可能であることを証明した。これは、加工工程中の危害微生物の増殖や汚染の可能性を最小限に抑制できることを意味している。しかしながら、従来法に比べて製造に要する時間が短いため、製品として包装されるまでに減少させうる菌数は、菌種によっては逆に小さくなった。包装後も菌数が減少し続けることは確認されたが、加工前の原料肉が清浄なものであることの重要性を示した。

第 2 章では、迅速製法に使用する原料肉の汚染状況を調査し、これらが衛生的に管理された清浄なものであることを示した。各衛生指標菌数の分布が小さく、変則的に高値を示す検体も無かったこと、腸内容物の汚染指標である大腸菌・大腸菌群の値も低値であったこと、危害微生物についてもほとんどが検出限界以下であり、僅かに検出された *Listeria*

monocytogenes（リステリア）も一般的な汚染率よりも低値であることを確認した。すなわち、実際の製品が包装される時点においては、その菌数を極めて低く制御することが可能な原料肉と推察できるデータを提示している。

第3章では、僅かではあるが汚染の可能性があるリステリアのリスクをさらに低減するために、乳酸による殺菌の可能性を検証し、有機物の存在下でも3%以上の濃度があれば10分以内に有意にリステリアの菌数を減少させることができることを、多様な分離菌株で比較しながら示した。原料肉を乳酸処理することにより、迅速製法で製造される生ハムの安全性はさらに高まると期待できる。

第4章では、ハードル理論に基づいて乳酸と加熱処理を併用した場合に殺菌をより効率的にできるか調べている。その結果、乳酸処理後にはリステリアの熱感受性が3倍に上昇することを見出し、併用の効果を明示した。しかしながら、乳酸処理後に室温で放置すると熱ストレスに対する抵抗性が上がり、加熱処理をしても殺菌効果が現れ難くなることを示した。その対策として、乳酸処理後から加熱処理までの間を冷蔵管理することで抵抗性獲得を阻止できることを発見した。これは、食品製造・流通における一般的衛生管理プログラム特にワールド・チェーンの重要性を再喚起する結果となっている。

第5章では、第4章で見出されたリステリアの耐熱性増強機構について遺伝子レベルでの解明を試みている。RT-PCR やリステリアでは未だ実施報告のなかった RNA-seq を用いて遺伝子発現を調べている。その結果、乳酸処理後のリステリアが室温条件下で獲得する耐熱性は、ストレス耐性に主要な役割を担うとされている sigma factor B に制御される遺伝子群によるものではなく、複合的な別の機構によるものであることを示唆している。この機構がどのようなものであるかを明らかにするためには今後の研究成果を待たねばならないが、殺菌あるいは静菌を目的とするときにどのような手法をどのような順序で実施するのが良いか、ハードル理論の応用に重要な知見に発展することが期待できる。

以上、本研究により、新しい生ハムの製造方法が微生物学的に安全な製造方法であり、原料肉を乳酸処理することで、さらにリスクを低減することが可能であることを明らかにしつつ、乳酸処理後に室温で放置するとリステリアの耐熱性が増強することを示して製造工程における低温管理の重要性を指摘した。本論文は、より高品質で衛生的な食品製造方法の創意工夫と工程改善につなげるために、食品微生物学を応用した極めて実践的な研究で、食品衛生法の枠にとどまらず食肉製品の新たな製造方法を開くものと評価できる。よって、審査委員会は本論文を博士（学術）の学位を授与するに値するものと認めた。