

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4275735号  
(P4275735)

(45) 発行日 平成21年6月10日 (2009. 6. 10)

(24) 登録日 平成21年3月13日 (2009. 3. 13)

(51) Int. Cl.

F I

**A 2 3 B 4/08 (2006. 01)**

A 2 3 B 4/08 E

**A 2 3 B 7/153 (2006. 01)**

A 2 3 B 7/156

**A 2 3 L 3/349 (2006. 01)**

A 2 3 L 3/349

**A 2 3 L 3/3526 (2006. 01)**

A 2 3 L 3/349 5 O 1

A 2 3 L 3/3526

請求項の数 16 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平9-537357

(86) (22) 出願日 平成9年4月14日 (1997. 4. 14)

(65) 公表番号 特表2000-508541 (P2000-508541A)

(43) 公表日 平成12年7月11日 (2000. 7. 11)

(86) 国際出願番号 PCT/US1997/006360

(87) 国際公開番号 WO1997/038586

(87) 国際公開日 平成9年10月23日 (1997. 10. 23)

審査請求日 平成16年4月12日 (2004. 4. 12)

(31) 優先権主張番号 08/631, 578

(32) 優先日 平成8年4月12日 (1996. 4. 12)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508220261

ユニバーシティ オブ アーカンサス  
アメリカ合衆国 7 2 2 0 4 アーカンサ  
ス州, リトル ロック, サウス ユニバー  
シティ 1 1 2 3, スート 6 0 1, ユ  
ニバーシティ タワー ビルディング

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食品の微生物汚染の第四級アンモニウム化合物による広域スペクトルの予防および除去

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肉製品上での微生物の増殖を予防する方法であって、50～20,000ppmの量のセチルピリジニウムクロリドと該肉製品とを20秒～5分間接触させて該肉製品上での微生物の増殖を予防することを含み、該微生物がスタヒロコッカス (Staphylococcus)、カンピロバクター (Campylobacter)、アルコバクター (Arcobacter)、リステリア (Listeria)、エロモナス (Aeromonas)、バシラス (Bacillus)、毒素非産生エシェリキア (Escherichia) および病原毒素産生エシェリキア (Escherichia) からなる群から選択される細菌である、上記方法。

【請求項 2】

上記病原毒素産生エシェリキア (Escherichia) が大腸菌 O157 : H7 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

セチルピリジニウムクロリドの微生物の増殖の抑制に有効な量が、500～5,000ppmである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記接触が、セチルピリジニウムクロリド中に肉製品を浸漬することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

上記接触が、セチルピリジニウムクロリドを肉製品に噴霧することを含む、請求項 1 に記

載の方法。

【請求項 6】

海産食品、野菜または果物製品上での微生物の増殖を予防する方法であって、50～20,000 ppmの量のセチルピリジニウムクロリドと海産食品、野菜または果物製品とを20秒～5分間接触させて海産食品、野菜または果物製品上での微生物の増殖を予防することを含み、該微生物がスタヒロコッカス（Staphylococcus）、カンピロバクター（Campylobacter）、アルコバクター（Arcobacter）、リステリア（Listeria）、エロモナス（Aeromonas）、バシラス（Bacillus）、毒素非産生エシェリキア（Escherichia）および病原毒素産生エシェリキア（Escherichia）からなる群から選択される細菌である、上記方法。

【請求項 7】

上記病原毒素産生エシェリキア（Escherichia）が大腸菌0157：H7である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

セチルピリジニウムクロリドの微生物の増殖の抑制に有効な量が、500～5,000ppmである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

上記接触が、セチルピリジニウムクロリド中に海産食品、野菜または果物製品を浸漬することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

上記接触が、セチルピリジニウムクロリドを海産食品、野菜または果物製品に噴霧することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

食品上での病原毒素産生エシェリキア（Escherichia）の増殖を予防する方法であって、50～20,000ppmの量のセチルピリジニウムクロリドと該食品とを20秒～5分間接触させて食品上での病原毒素産生エシェリキアの増殖を予防することを含む、上記方法。

【請求項 12】

上記病原毒素産生エシェリキア（Escherichia）が大腸菌0157：H7である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

肉製品が、予め冷却され、内臓除去された鳥屠体であり、接触時間が20秒～90秒間である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

(a) 鳥肉または獣肉組織を用意し、  
(b) 該鳥肉または獣肉組織での微生物の増殖を予防するために該鳥肉または獣肉組織と、50～20,000ppmの量のセチルピリジニウムクロリドとを20秒～5分間接触させ、  
(c) 処理した鳥肉または獣肉組織から食品を製造することを含む方法によって製造された食品であって、該微生物がスタヒロコッカス（Staphylococcus）、カンピロバクター（Campylobacter）、アルコバクター（Arcobacter）、リステリア（Listeria）、エロモナス（Aeromonas）、バシラス（Bacillus）、毒素非産生エシェリキア（Escherichia）および病原毒素産生エシェリキア（Escherichia）からなる群から選択される細菌である、上記食品。

【請求項 15】

(a) 食品としての鳥肉または獣肉組織を用意し、  
(b) 上記食品と50～20,000ppmの量のセチルピリジニウムクロリドとを20秒～5分間接触させて、食品上での微生物の増殖を予防することを含む方法によって製造された製品であって、該微生物がスタヒロコッカス（Staphylococcus）、カンピロバクター（Campylobacter）、アルコバクター（Arcobacter）、リステリア（Listeria）、エロモナス（Aeromonas）、バシラス（Bacillus）、毒素非産生エシェリキア（Escherichia）および病原毒素産生エシェリキア（Escherichia）からなる群から選択される細菌である、上記製品。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

150,000ppm～250,000ppmの範囲の濃縮された量のセチルピリジニウムクロリドおよび少なくとも1種の溶解促進剤を含む、食品上での微生物の増殖予防用濃縮組成物であって、食品と20秒～5分間接触させることを特徴とし、該微生物がスタヒロコッカス (*Staphylococcus*)、カンピロバクター (*Campylobacter*)、アルコバクター (*Arcobacter*)、リステリア (*Listeria*)、エロモナス (*Aeromonas*)、バシラス (*Bacillus*)、毒素非産生エシェリキア (*Escherichia*) および病原毒素産生エシェリキア (*Escherichia*) からなる群から選択される細菌である、上記濃縮組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 発明の背景

本出願は、1996年4月12日付け出願の係属中の米国特許出願第08/631,578号（その全体を参考として本明細書に援用する）の一部継続出願である

## 1. 発明の分野

本発明は、概して、食品上での広範囲の微生物の増殖を予防する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、食品の外観、テクスチャーおよび品質に有害な影響を及ぼすことなく本発明の水性処理方法を用いて処理しうる肉製品（例えば、鳥肉、牛肉、豚肉、ラム肉、シカ肉および他の食用肉製品）、海産食品（例えば、魚類および甲殻類）、果物、野菜および他の食品などの食品上での広域スペクトルの微生物の増殖を予防するために第四級アンモニウム化合物（QAC）を使用する方法に関する。より詳しくは、本発明は、食品上の微生物の付着を抑制し、該微生物を除去し、該微生物の増殖を予防するためにQACを使用する方法に関する。特に、該使用は、食物媒介性（foodborne）汚染を引き起こす微生物に対するQACの効果に関する。より詳しくは、これらの微生物には、スタヒロコッカス属（*Staphylococcus*）、カンピロバクター属（*Campylobacter*）、アルコバクター属（*Arcobacter*）、リステリア属（*Listeria*）、エロモナス属（*Aeromonas*）、バシラス属（*Bacillus*）、サルモネラ属（*Salmonella*）、毒素非産生エシェリキア（*Escherichia*）属および病原毒素産生エシェリキア（*Escherichia*）属（例えば、O157:H7）からの微生物が含まれる。より詳しくは、本発明は、これらの食品上での広域スペクトルの微生物の増殖を予防するために該食品上にQACを噴霧する改良された処理方法に関する。本発明はまた、該処理方法を食品加工施設における商業的使用に一層適したものにすることをQACの製剤に関する。

## 2. 従来技術の説明

微生物汚染による食品媒介性疾患の予防は、食品加工業、規制機関および消費者にとって大きな関心事である。米国農務省のFood Safety & Inspection Service (FSIS) からの最近の報告（Federal Register, 1995年2月3日）は、米国では毎年、食品媒介性疾患の200万を超える症例が微生物汚染により発生し、それに伴う経費が10億ドルを超えると推定している。食品媒介性微生物汚染は、加工施設に入る前と、加工環境における交差汚染との両方で生じる。FSISは、食品媒介性病原体の発生およびその数を減少させるために新たなHazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) 要件を制定している。食品加工業者は、これらの規則に従わなければならない。この微生物の減少を達成する手段は加工業者の判断に委ねられているが、FSISは、抗微生物処理がHACCP計画の重要な要素であると考えている。本発明の処理方法は、QACの水性製剤を使用するものであり、HACCP要件を満たすのに有用である。

鳥肉および獣肉の加工業者は、微生物汚染が全くない製品を提供しようと努力する過程で、食品として意図される鳥肉および獣肉の組織に強力に接着または付着する微生物の除去において大きな問題に直面している。汚染微生物は、食品の表面に付着しなければ、容易に洗い落とすことができる。しかしながら、強力に付着している微生物は、洗っても除去することができず、化学的または物理的手段による除去に非常に耐性を有している。

肉製品中の微生物を減少させるために、塩素または二酸化塩素、オゾン、過酸化水素、乳酸、炭酸ナトリウム、リン酸三ナトリウムおよび電気刺激の利用などのいくつかの化学的および物理的方法が提案されている。一般には、これらの方法は、微生物汚染の減少において限定された有効性を示しており、肉製品の物理的外観に影響を及ぼしうる。

サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) による汚染は、この微生物が生きた鳥に存在することが多いため、鳥肉加工業においては特に懸念されている。鳥肉加工業者は、鳥肉組織に付着または接着するサルモネラ・ティフィムリウム (*Styphimurium*) などの微生物の除去に非常に手を焼いている。屠体のサルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) 汚染を排除し屠体間の交差汚染を最小限に抑えるために、鳥肉加工中に種々の化学的および物理的アプローチを用いることが示唆されている。サルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) を抑制するために、リン酸三ナトリウム (TSP) が鳥肉加工において使用されている。しかしながら、研究は、サルモネラ (*Salmonella*) に対する TSP の効力に関して相反する結果を報告している。TSP は、その水溶性のため、鳥肉から洗い落とされうするため、TSP は微生物の付着を抑制することができない。

10

参考として本明細書に援用する米国特許第 5,366,983 号は、有効量の QAC 水溶液での処理により、肉製品のサルモネラ (*Salmonella*) 汚染を排除または予防する方法を開示している。特に、アルキルピリジニウム (特に、セチルピリジニウムクロリド (CPC) およびセチルピリジニウムブロミド (CPB)) などの第四級アンモニウム陽イオン界面活性剤が、鳥肉からサルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) を除去するのに有効であった。しかしながら、この特許は、QAC が、サルモネラ (*Salmonella*) 以外のいずれかの属の食品汚染微生物に対する、より広い抗微生物スペクトルを有することを開示していない。さらに、それは、この処理方法が肉以外の食品に有効だとは示唆していない。

食品物質は、それらのタンパク質含量、多孔性、親油性、表面 pH、透水性、表面積、表面実効電荷によって化学的および物理的に異なっている。食品の多孔性が細菌の隔離において重要と考えられる一方で、食品物質上の強固で不透性の外層は食品の細菌汚染を減少させると考えられる。食品間でのこれらの化学的および物理的相違のため、肉製品上で或る抗微生物剤が成果をおさめても、それが果物、野菜、海産食品などの他の食品上で成果を示唆するか否かを予測するのは困難である。

20

例えば、CPC はタンパク質に結合することが公知であるが、食品に対する CPC の抗微生物効力がほとんどタンパク質結合によるものであれば、非タンパク質性の果物および野菜を処理するための本方法が成功するとは予測されなかったであろう。

サルモネラ (*Salmonella*) 以外の病原細菌および腐敗細菌が引き起こす食品媒介性疾患が、食品加工業者にとって益々問題になりつつある。これらの細菌と、それらが同定されている製品との一覧を、表 1 に示す。

30

表 1

## 病原細菌および腐敗細菌の発生

微生物	鳥肉	牛肉	豚肉	病原体	腐敗
エロモナス・ヒドロフィア ( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	X	X	X		X
アルコバクター・ブツレリ ( <i>Arcobacter butzleri</i> )		X	X	X	
バシラス・セレウス ( <i>Bacillus cereus</i> )	X	X	X	X	
カンピロバクター・ジェジュニ ( <i>Campylobacter jejuni</i> )	X	X	X	X	
大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) O157:H7	X	X	X	X	
リステリア・モノサイトゲネス ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	X	X	X	X	
サルモネラ・ティフィムリウム ( <i>Salmonella typhimurium</i> )	X	X	X	X	
スタヒロコッカス・アウレウス ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	X	X	X	X	

この表に挙げたこれらの汚染微生物のなかで、大腸菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 に対しては、その毒力、生じる疾患の重症度、およびそれに伴う死亡率のため、特に関心が持たれている。大腸菌 (*E. coli*) O157:H7 は、血液凝固異常、腎不全 (溶血性尿毒症症候群) および死につながる強力な「志賀様」毒素を産生する。その急性疾患からの回復が完全であったとしても、溶血性尿毒症症候群の感染者の 15 ~ 30 % に慢性腎疾患の徴候が生じる。大腸菌 (*E. coli*) O157:H7 による汚染に伴うリスクは、抗生物質に対するその耐性が報告されていることから益々増大する。1993 年には、食品媒介性疾患の 8,000 ~ 16,000 の症例が大腸菌 (*E. coli*) O157:H7 により生じ、2 億 ~ 5 億ドルの推定経費がかかった。

もう 1 つの強毒食品汚染菌であるリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、肉、野菜および種々の乳製品中に見出されており、敗血症、髄膜炎および散在性膿瘍を引き起こすことがある。リステリア・モノサイトゲネス (*L. monocytogenes*) は、冷凍下で増殖しうる耐寒性微生物である。1993 年には、食品媒介性疾患の約 1,700 の症例が、リステリア・モノサイトゲネス (*L. monocytogenes*) により生じ、1 億 ~ 2 億ドルの推定経費がかかった。

食品業において懸念されているもう 1 つの微生物は、食品および肉加工業において腐敗を引き起こしこれらの製品の貯蔵寿命を縮めるエロモナス・ヒドロフィア (*Aeromonas hydrophila*) である。

現在、広域スペクトルのグラム陽性、グラム陰性、好気性、通性嫌気性および微好気性微生物に対して、広範囲の食品において汚染を予防し除去する有効な殺微生物化合物は知られていない。本発明者らは、広範囲の食品に付着して食品媒介性疾患を引き起こす広域スペクトルの種々の微生物に対して QAC が有効であることを確認した。広域スペクトルの病原微生物に対するこの感受性の予測は不可能であったであろう。

ある特定の抗微生物剤に対する微生物の感受性から、同じ抗微生物剤に対する他の微生物の感受性を予測することはできない。防腐剤または殺菌剤は、連続スペクトルの活性を有すると考えられるが、異なる微生物の相対感受性を考慮しなければならない。例えば、殺菌剤であるヘキサクロロフェンは主にグラム陽性微生物に対して有効であり、陽イオン防腐剤は孢子形成生物には有効でない。シュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*) などのいくつかのグラム陰性微生物は、薬物塩化ベンザルコニウムの溶液中で増殖することが公知である。70 % エタノール中で増殖しうる他の細菌も公知である (Harvey, S.C.,

10

20

30

40

50

Antimicrobial Drugs in Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co., pp.1163-1241 1990)。

食品の処理に関して、リステリア (*Listeria*) は、サルモネラ (*Salmonella*) または大腸菌 (*E.coli*) よりTSPの作用に対して耐性であると報告されている (Somers, E.B. ら, Int.J. Food Microbiol., 22:269-276, 1994)。さらに、Breenら, J.Food Sciences, 60:1991-1996, 1995は、サルモネラ (*Salmonella*) の増殖の抑制に対してTSPが、サルモネラ (*Salmonella*) の脱離よりもその有効性ははるかに低いことを実証している。同様に、TSPIは、ニワトリ屠体上の大腸菌 (*E.coli*) O157:H7の数を減少させたが、この微生物の他のニワトリへの交差汚染の抑制には無効である。

本発明は、食品に付着した大腸菌 (*E.coli*) O157:H7の数を減少させるのに、また、食品に対するこの細菌の付着を抑制するのに、QACが、液体に懸濁した大腸菌 (*E.coli*) O157:H7に対して有効であることを示す。大腸菌 (*E.coli*) O157:H7は、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、スルフィソキサゾール (Kimら, J. Infect. Dis., 170:1606-1609, 1994) およびオキシテトラサイクリン (Ciosekら, Med. Weter., 40:335, 338:1984) などの広域スペクトル抗微生物剤に対して耐性を示す一方、これらの抗微生物剤は、大腸菌 (*E.coli*) の通常の毒素非産生株に対しては非常に活性であると報告されている。

ある特定の微生物に対する抗微生物剤または殺生物剤の有効性を、異なる微生物に対するその有効性に基づいて予測できないことは明らかである。ある特定の微生物に対する抗微生物剤の有効性において役割を果たしている可能性がある微生物特性など、考慮すべき多数の因子がある。これらの特性には、(1) 或る種の付着微生物によるグリコカリックス形成の程度、(2) グラム陰性菌中の、リポ多糖およびリン脂質を含有する細胞エンベロープの存在、(3) ほとんどの腸管内細菌およびシュードモナス (*Pseudomonas*) などにおけるリボタンパク質の存在、および(4) 例えば大腸菌 (*E.coli*) およびサルモネラ (*Salmonella*) におけるポーリンタンパク質チャンネルの存在 (Fultonら, Structure in Medical Microbiology, 第3版, pp.37-54, 1991) が含まれるが、これらに限定されるものではない。

食品加工業においては、多数の異なる食品上での広範囲の汚染微生物の増殖を予防するためのより有効な方法が必要とされている。これは、食品の表面に付着した微生物に関して特に言えることである。食品媒介性病原微生物が引き起こす疾患の数がますます増加しているため、食品加工業においては現在、食品汚染により重篤なヒト疾患を引き起こすことが知られている毒素産生エシェリキア (*Escherichia*) (すなわち、大腸菌 (*E.coli*) O157:H7) などの病原微生物に関して特に、広域スペクトルの微生物の除去および予防のためのより有効な方法が必要とされている。本発明者らは、加工施設内での交差汚染の予防、食品からの付着微生物の除去、食品に対する微生物の付着の抑制、および食品に付着しつづける微生物の増殖の予防における重要な目標である、食品関連液中の微生物の増殖を予防する方法を提供する。さらに、本発明の方法は、食品加工施設での使用に容易に適合させることができる。

また、本発明は、本発明方法で使用する使用液に希釈して用いる濃縮QAC製剤を提供する。本発明の製剤は、該製剤と食品とのより長時間の接触をも可能にしうる溶解促進成分を含有する。

#### 発明の要旨

本発明は、食品上での広域スペクトル微生物の増殖を予防するための方法を提供する。食品上での微生物の増殖の予防により、ヒトまたは動物における疾患または摂取前の食品の腐敗を引き起こしうる生存微生物を含有しないか又はその含有数が最低限に抑えられた食品が提供されると意図される。食品上の微生物の増殖の予防は、以下のメカニズムを含む(それらに限定されるものではない)と意図される：(1) 食品からの付着微生物の除去、(2) 食品に対する微生物の付着の抑制、(3) 食品上の付着微生物の殺微生物または不活性化、および(4) 食品に付着していないが食品関連液(例えば、冷蔵タンク)中に加工中に存在する微生物の殺微生物または不活性化。

QACに感受性の微生物には、ヒトまたは動物が消費する食品の食品媒介性微生物汚染を引

10

20

30

40

50

き起こしうるスタヒロコッカス属 (Staphylococcus)、カンピロバクター属 (Campylobacter)、アルコバクター属 (Arcobacter)、リステリア属 (Listeria)、エロモナス属 (Aeromonas)、バシラス属 (Bacillus)、サルモネラ属 (Salmonella)、毒素非産生エシェリキア (Escherichia) 属、病原性毒素産生エシェリキア (Escherichia) 属 (例えば、0157:H7) および他の食品媒介性微生物からの微生物が含まれる。

同様にQACに感受性の追加的な微生物としては、アスペルギルス・フラブム (Aspergillus flavum)、ペニシリニウム・クリソゲナム (Penicillium chrysogenum) などの真菌、および赤痢アメーバ (Entamoeba histolytica) などの寄生体が挙げられる。

本発明の組成物は、微生物の増殖の抑制に有効な量のQACを水溶液中に含む。本発明のQACは、広域スペクトルの病原性および腐敗性微生物の増殖を予防するのに有効である。QAC (特に、セチルピリジニウムクロリド (CPC)) は、広範囲の食品上の広域スペクトルの微生物の増殖を予防するのに特に有効である。

本発明は、食品加工業および家庭での使用において重要な用途を有する。QACは容易に入手可能であり、本発明方法の実施にかかる経費は、既存の抗微生物方法と比べて高くない。例えばTSPを使用する既存の処理とは異なり、QACの使用は、食品の外観、色、味またはテクスチャーを変化させない。ある範囲の濃度のQACが、食品上の広域スペクトルの微生物の増殖の予防に有効である。AmesアッセイにおいてCPCの変異原性がないことから示されるとおり、QACは安全である。さらに、CPCは、20mg/日以下の量で経口摂取されるCepacol R トローチ剤などの製剤にされた経口摂取用製品中でのヒトに対する使用が既に承認されている。

本発明はまた、本発明方法と共に使用するための、食品の処理のためのQACの製剤、例えば、CPCが溶解促進剤 (例えば、エチルアルコールおよび/またはグリセリン) と共に製剤化されている製剤に関する。

本発明はまた、食品をQACと5分未満、さらには僅か20~90秒間接触させて、食品上の微生物の増殖を有意に予防する改良された方法に関する。

本発明はまた、QACを食品に噴霧することによりQACを食品と接触させる改良された方法を含む。この噴霧方法は、水溶液中のQACを使用して又は溶解促進剤と共に製剤化されたQACを含有する新規製剤を使用して実施することができる。

さらに、本発明の方法は、所望により、処理前の食品上の微生物の存在を測定するための測定工程を、食品をQACと接触させる前に含むことが可能である。例えばPRCおよびイムノアッセイを含む、微生物の存在を迅速に測定するための通常の任意の方法を、測定工程として利用することができる。

さらに、本発明の方法は、所望により、QACと接触させた後の食品の表面上のQACの存在を測定するための工程を含むことが可能である。この測定は、接触工程の直後またはいくつかの洗浄工程の後に実施することができる。例えば、QACは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に適した形態で食物の組織から抽出することができる。該方法は、食物組織のエタノール抽出、およびそれに続く、HPLC分析を妨害するマトリックス中の他の化合物からQACを選択的に分離する弱陽イオン交換カラムを使用する固相抽出を含む。QAC残基の定量のためのHPLCアッセイでは、逆相シアノカラムを使用し、内標準としてQAC類似体を使用する。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、CPCでの処理後の牛の脾臓肉組織に対する大腸菌 (E.coli) 0157:H7の付着の抑制を示す棒グラフである。

図2は、非選択培地上での5%水性グリセリン中のCPCでの処理後の、ナマズの皮膚上の生存微生物の減少を示す棒グラフである。

図3は、選択培地上での5%水性グリセリン中のCPCでの処理後の、ナマズの皮膚上の生存サルモネラ・ティフィムリウム (S.typhimurium) の減少を示す棒グラフである。

図4は、5%水性グリセリン中のCPCでの処理後の、黒ブドウ (black grapes) 上の生存サルモネラ・ティフィムリウム (S.typhimurium) の減少を示す棒グラフである。

図5は、5%水性グリセリン中のCPCでの処理後の、ブロッコリ上の生存サルモネラ・テ

10

20

30

40

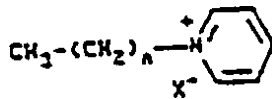
50

ィフィムリウム (*S. typhimurium*) の減少を示す棒グラフである。

#### 発明の詳細な説明

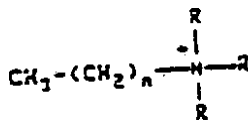
本発明は、広範囲の食品上の広域スペクトルの食品媒介性微生物汚染を軽減するためにこれらの食品を処理するのに、QACを使用することができるという確認に基づく。また、本発明は、広範囲の食品媒介性病原微生物を除去し、殺し、不活性化し、食品に対するその付着を抑制するのにQACが有効であるという知見に基づく。これらの微生物には、サルモネラ属 (*Salmonella*)、スタヒロコッカス属 (*Staphylococcus*)、カンピロバクター属 (*Campylobacter*)、アルコバクター属 (*Arcobacter*)、リステリア属 (*Listeria*)、エロモナス属 (*Aeromonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、毒素非産生エシェリキア (*Escherichia*) 属およびビルレント毒素産生エシェリキア (*Escherichia*) 株 (例えば、O157:H7) に属する細菌；およびアスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*)、ペニシリニウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) などの真菌；および赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) などの寄生体が含まれるが、これらに限定されるものではない。

本発明の組成物は、有効量のQACを水溶液中に含む。QACは、アルキルピリジニウム、テトラアルキルアンモニウムおよびアルキル脂環式アンモニウム塩よりなる群から選ばれる。アルキルピリジニウムは、構造式 (I)：



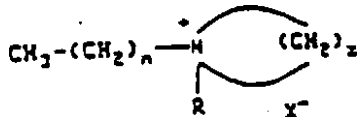
(式中、n は 9 ~ 21、X はハロゲン化物を示す) で表される。

テトラアルキルアンモニウムは、構造式 (II)：



(式中、n は 9 ~ 21 を示し、R は、CH<sub>3</sub> および C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> よりなる群から選ばれ、X はハロゲン化物を示す) で表される。

アルキル脂環式アンモニウム塩は、構造式 (III)：



(式中、n は 9 ~ 21、Z は 4 ~ 5 を示し、R は、CH<sub>3</sub> および C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> よりなる群から選ばれ、X はハロゲン化物を示す) で表される。

種々のQAC (それらはすべて、陽イオン界面活性剤である) を、種々の食品からの付着微生物の除去および該微生物の付着の抑制におけるそれらの有効性に関して評価した。調べたQACのうち、セチルピリジニウムクロリド (CPC) が最も有効であり、それを後記実施例で使用する。しかしながら、QACの他のメンバーも食品媒介性病原微生物に対する同様の特性を有するため、本発明の意義の範囲内において、QACの使用をCPCに限定するものではない。

さらに、本発明は、浸漬方法において食品とQACとの接触時間を1分にまで減少させることができ、それでもなお、サルモネラ (*Salmonella*) などの食品媒介性微生物に関して微生物付着の有意な抑制が得られるという確認に基づくものであり、このことは、この方法の産業上の使用における有意な改良および商業的利点である。

本発明はまた、種々の圧力下で食品上にQACを20 ~ 90秒間噴霧する新規方法が、これらの食品上の食品媒介性生存微生物を有意に減少させるという確認に基づく。

本発明はまた、種々の濃度の少なくとも1つの溶解促進剤 (例えば、エチルアルコールまたはグリセリン) を含有する溶液中のQACの新規製剤が、食品の処理に有用であるという確認に基づく。これは、該QAC溶液を塩と併用したり、高度に濃縮したり、あるいは食品加工施設内などの低温に付す場合に、特に言えることである。この新規製剤は、濃縮されたQACを貯蔵し、ついで、加工施設内での抗微生物処理方法で使用するためにそれを容易に希釈することを可能にするものであり、このため、使用前に混合する粉末QACが不要と

10

20

30

40

50



なる。QACのこの新規製剤は、産業上の使用に有利な使用し易い濃縮物を提供するものである。この新規QAC製剤は、標準的な浸漬方法または該新規噴霧方法の両方において使用することができる。

本発明の前記態様は、図1～5に関して後記で詳しく説明する。

以下の実施例は、本発明をその好ましい態様において更に例示するものであり、本発明を限定するものではない。これらの実施例では、該方法で処理する食品として鳥肉、牛肉、ナマズ、ブロッコリおよびブドウを使用するが、該処理方法により悪影響を受けない他の食品の処理も、本発明に含まれると意図される。

#### 実施例

以下の実施例で使用する微生物は以下のとおりである：スタヒロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) ATCC 29213、カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) ATCC 29428、大腸菌 (Escherichia coli) (毒素非産生株) ATCC 25922、大腸菌 (Escherichia coli) 0157:H7 (毒素産生株) ATCC 43895、アルコバクター・ブツレリ (Arcobacter butzleri) ATCC 49616、リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) ATCC 49594、エロモナス・ヒドロフィア (Aeromonas hydrophila) ATCC 49140、バシラス・セレウス (Bacillus cereus) ATCC 49063、サルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium) ATCC 14028およびNCTC 12023、ならびにアスペルギルス・フラブス (Aspergillus flavus) およびペニシリニウム・クリソゲナム (Penicillium chrysogenum) の商業的に入手可能な培養。

#### 実施例 1

懸濁培養（肉製品に付着していない）中の第四級アンモニウム化合物の殺菌活性

#### 第四級アンモニウム化合物の最小阻止濃度 (MIC)

1987 National Committee for Clinical Laboratory Standardにより確立されたマクロダイリューション法 (macrodilution) を用いて、ミュラー・ヒントンブロス (BBL Microbiology System) 中でQACの最小阻止濃度 (MIC) を測定した。実験は、スタヒロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、大腸菌 (Escherichia coli) 0157:H7、リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) およびサルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium) については、37℃で16時間のインキュベーションにより行なった。エロモナス・ヒドロフィア (Aeromonas hydrophila) およびバシラス・セレウス (Bacillus cereus) については、30℃でインキュベーションを行なった。可視濁度を有さない最低希釈により、MICを測定した。表2は、前記実験からのデータを示す。

表 2

## 最小阻止濃度 (MIC)

セチルピリジニウムクロリド (CPC) μg/mL	CPC 対 E. coli O157:H7	CPC 対 B. cereus	CPC 対 S. aureus	CPC 対 S. typhi- murium	CPC 対 A. hydro- phila	CPC 対 L. mono- cytogenes
125	-	-	-	-	-	-
62.5	-	-	-	-	-	-
31.25	-	-	-	+	+	-
15.63	-	-	-	+	+	-
7.81	+	-	-	+	+	-
3.91	+	+	-	+	+	-
1.96	+	+	-	+	+	-
0.98	+	+	-	+	+	-
0.50	+	+	-	+	+	+
0.25	+	+	-	+	+	+
0.00	+	+	+	+	+	+

(-)増殖なし、(+)増殖あり

マクロダイリューションブロス法(National Committee for Clinical Laboratory Standard)により MIC を得た。

## 第四級アンモニウム化合物の最小殺菌濃度 (MIC)

カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) およびアルコバクター・ブツレリ (Arcobacter butzleri) に対するQACの最小殺菌濃度 (MBC) を、1987 National Committee for Clinical Laboratory Standardにより確立されたマクロダイリューション法 (macrodilution) を用いてミューラー・ヒントンブロス (BBL Microbiology System) 中で測定した。実験は、37℃で48時間の微好気性インキュベーションにより行なった。各希釈のアリコートをし、寒天中にポアプレートし、微好気性条件中、37℃で48時間インキュベートした。増殖を起こさない最低希釈により、MBCを測定した。表 3 は、前記実験からのデータを示す。

表 3

## 最小殺菌濃度 (MBC)

セチルピリジニウムクロリド, μg/mL	CPC 対 Campylobacter jejuni	CPC 対 Arcobacter butzleri
125	-	-
62.5	-	-
31.25	-	+
15.63	-	+
7.81	-	+
3.91	+	+
1.96	+	+
0.98	+	+
0.50	+	+
0.25	+	+
0.00	+	+

(-)増殖なし、(+)増殖あり

マクロダイリューションブロス法(National Committee for Clinical Laboratory Standard)により MBC を得た。

10

20

30

40

50

これらのMICおよびMBCのデータは、CPCが広範囲の微生物に対して有効であることを示している。

#### プランクトン細胞における第四級アンモニウム化合物の活性

トリプチケース・ダイズブロス中で大腸菌 (*E. coli*) 0157:H7のそれぞれを16時間培養して得られた培養物を、遠心 (15,000rpm、10分、4 ) した。上清を除去した後、該ペレットを10mlの0.04Mリン酸カリウム緩衝液 (PPB、pH7.0) で洗浄し、PPBに懸濁して、 $1 \sim 2 \times 10^9$  細胞/mlの最終懸濁液を得た。アリコート (1.0ml) を遠心 (14,000rpm、3分) し、上清を除去した。各ペレットを、種々の濃度 (100~1,000  $\mu$ g/ml) の試験組成物 (CPC) の水溶液 1mlまたはPPB1.0mlに懸濁し、ボルテックス (30秒) し、25 で1分間インキュベートし、遠心 (14,000rpm、3分) した。上清を除去した後、各ペレットを0.5mlのPPBに懸濁した。各サンプルからの細胞を、2通りの0.05mlのアリコートおよび標準的な系列希釈法 (トリプチケース・ダイズ寒天上) を用いて計数し、該データを平均コロニー形成単位 (CFU) /mlとして記録した。

前記実験の結果は、懸濁している生存大腸菌 (*E. coli*) 0157:H7の完全な減少が、試験したCPCの全濃度 (100、250、500および1000  $\mu$ g/ml) で得られたことを示している。この実験の結果は、肉の産業的加工における大腸菌 (*E. coli*) 0157:H7による交差汚染の予防にとって特に重要である。前記のとおり、毒素産生大腸菌 (*E. coli*) のこの株は、多数の広域スペクトル抗微生物剤に対する耐性を示す。QACは、交差汚染を引き起こす伝播因子となる液体中の生物を殺すため、QACでの肉製品の処理が、1つの汚染小片が他の未汚染小片を汚染するのを予防するという証拠を、これらの結果は提供している。

#### 実施例 2

##### ニワトリの皮膚に付着した生存細菌の減少に対する第四級アンモニウム化合物の効果

ドラムスティックから切除し、電子源からの45K Gyの線量の照射により滅菌したニワトリの皮膚 (2.5×2.5cm) を、6ウェル組織培養プレートの各ウェル中に上皮側を上にして配置した。PBS 5mlのみで処理するバックグラウンド対照群を除き、 $6 \sim 8 \times 10^3$  CFU/mlの細菌を含有する5mlの0.008Mリン酸緩衝食塩水 (PBS、pH7.2) を各皮膚片に接種した。該プレートをインキュベートし (30分、35 )、各皮膚片をリンス (2×、5ml PBS) して、緩く結合している (未付着) 微生物を除去した。接種を受けた各皮膚を、CPCを含有する5mlのPBSで処理した。3個の皮膚片を、CPCの各濃度について使用した (これらには、該皮膚を5mlのPBSのみで処理したもの (濃度0) が含まれる)。該プレートを、振とう (100rpm) しながら25 で30分間インキュベートした。インキュベーション後、各皮膚片をリンス (5ml PBS) し、80mlの食塩水または1%ペプトンを含む無菌ビニール袋に入れ、実験用ブレンダー (Stomacher R 400, Seward Medical, London, England) を用いて2分間ホモジナイズした。該ホモジネート (1ml) の3個のアリコートをポアプレートし、インキュベートした (37 、18~24時間)。細菌コロニーを計数し、希釈に関して補正し、CFU/皮膚として記録した。

これらの研究は、50~1000ppmの濃度のCPCでの処理の後の生存細菌 [サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、スタヒロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、大腸菌 (*Escherichia coli*) (毒素非産生株) および大腸菌 (*Escherichia coli*) 0157:H7] の減少を示している。より高い濃度 (8,000ppmまで) のCPCを、大腸菌 (*Escherichia coli*) 0157:H7に対して試験したところ、該CPCは付着細菌の数を0.1%未満に減少させることが判明した。これらの研究は、ニワトリの皮膚上のこれらの5種類の細菌の増殖の有意な抑制を示している。

#### 実施例 3

##### ニワトリの皮膚への細菌の付着の抑制に対する第四級アンモニウム化合物の効果

ドラムスティックから切除し、電子源からの45K Gyの線量の照射により滅菌したニワトリの皮膚 (2.5×2.5cm) を、6ウェル組織培養プレートの各ウェル中に上皮側を上にして配置した。CPCを含有する5mlの0.008Mリン酸緩衝食塩水 (PBS、pH7.2) を各皮膚片に接種した。3個の皮膚片を、試験化合物の各濃度について使用した (これらには、該皮膚を5

mlのPBSのみで処理したもの（濃度0）が含まれる）。該プレートを、振とう（100rpm）しながら25℃で種々の時間（1分または10分）インキュベートした。該インキュベーション溶液を吸引により除去し、該皮膚をリンス（5ml PBS）し、ついで $6 \sim 8 \times 10^3$ CFU/mlの細菌を含有する5mlのPBSと共に35℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、各皮膚片をリンス（2×、5ml PBS）して、緩く結合している（未付着）微生物を除去し、80mlの食塩水または1%ペプトンを含む無菌ビニール袋に入れ、実験用ブレンダー（Stomacher R 400, Seward Medical, London, England）を用いて2分間ホモジナイズした。該ホモジネート（1ml）の3個のアリコートポアプレートをインキュベートした（37℃、18~24時間）。細菌コロニーを計数し、希釈に関して補正し、CFU/皮膚として記録した。

10

これらの研究は、50~1000ppmの濃度のCPCでの処理の後のニワトリの皮膚に対する細菌〔サルモネラ・ティフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）、スタヒロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、大腸菌（*Escherichia coli*）（毒素非産生株）および大腸菌（*Escherichia coli*）O157:H7〕の付着の抑制を示している。これらの研究におけるデータは、ニワトリの皮膚をCPCで前処理すると、ニワトリの皮膚に対するこれらの微生物の付着が有意に抑制されることを示している。

ニワトリの皮膚をCPCで僅か1分間処理することにより、500ppmおよび1000ppmでサルモネラ・ティフィムリウム（*S. typhimurium*）の付着の有意な抑制が得られる。QACと肉製品とのこのより短い接触時間は、有効だとこれまでに報告されているものより短い接触時間を用いることを支持するものである。一般に、冷蔵タンクの浸漬は60分間までは可能であるが、本発明で示すデータは、生存微生物の数の有意な減少を依然として与える、より短い接触または浸漬時間を用いることができることを支持している。本発明の接触工程は、約20秒~約60分間実施することができるが、本発明は、10分未満、好ましくは約20秒~約9分間、より好ましくは約20秒~約5分間、最も好ましくは約20秒~約90秒間のより短い接触時間の方法も開示する。

20

#### 実施例 4

牛フランクステーキに付着した生存細菌の減少に対する第四級アンモニウム化合物の効果  
電子源からの45K Gyの線量の照射により滅菌した厚さ約0.5cmの正方形の牛脾腹組織（2.5×2.5cm）を、6ウェル組織培養プレートの各ウェル中に配置した。PBS 5mlのみで処理するバックグラウンド対照群を除き、 $6 \sim 8 \times 10^3$ CFU/mlの細菌を含有する5mlの0.008Mリン酸緩衝食塩水（PBS、pH7.2）を各組織片に接種した。該プレートをインキュベート（30分、35℃）し、各正方形片をリンス（2×、5ml PBS）して、緩く結合している（未付着）微生物を除去した。接種を受けた正方形片を、CPCを含有する5mlのPBSで処理した。3個の組織片を、試験化合物の各濃度について使用した（これらには、該正方形片を5mlのPBSのみで処理したもの（濃度0）が含まれる）。該プレートを、振とう（100rpm）しながら25℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、各正方形片をリンス（5ml PBS）し、50mlの1%ペプトンを含む無菌ビニール袋に入れ、実験用ブレンダー（Stomacher R 400, Seward Medical, London, England）を用いて2分間ホモジナイズした。該ホモジネート（1ml）の3個のアリコートポアプレートをインキュベート（37℃、18~24時間）した。細菌コロニーを計数し、希釈に関して補正し、CFU/正方形片として記録した。

30

40

この研究の結果は、50~1000ppmの濃度のCPCでの処理後にビーフフランク組織上の生存大腸菌（*Escherichia coli*）O157:H7が減少し、500および1000ppmのCPCで付着細菌が62~64%減少することを示している。

#### 実施例 5

##### 牛脾腹組織への細菌の付着の抑制に対する第四級アンモニウム化合物の効果

電子源からの45K Gyの線量の照射により滅菌した厚さ約0.5cmの正方形の牛脾腹組織（2.5×2.5cm）を、6ウェル組織培養プレートの各ウェル中に配置した。各組織片を、CPCを含有する5mlの0.008Mリン酸緩衝食塩水（PBS、pH7.2）で処理した。3個の牛組織片を、試

50

験化合物の各濃度について使用した（これらには、該正方形片を5mlのPBSのみで処理したもの（濃度0）が含まれる）。該培養プレートと、振とう（100rpm）しながら25℃で10分間インキュベートした。該インキュベーション溶液を吸引により除去し、該正方形片をリンス（5ml PBS）し、ついで $6 \sim 8 \times 10^3$  CFU/mlの細菌を含有する5mlのPBSと共にインキュベート（30分、35℃）した。インキュベーション後、各組織片をリンス（2×、5ml PBS）して、緩く結合している（未付着）微生物を除去し、50mlの1%ペプトンを含む無菌ビニール袋に入れ、実験用ブレンダー（Stomacher R 400, Seward Medical, London, England）を用いて2分間ホモジナイズした。該ホモジネート（1ml）の3個のアリコートポアプレートし、インキュベートした（37℃、18~24時間）。細菌コロニーを計数し、希釈に関して補正し、CFU/正方形片として記録した。

10

この研究の結果は、50~1000ppmのCPCでの処理後に大腸菌（*Escherichia coli*）0157:H7の付着が抑制され、該牛肉に付着した細菌の数が1000ppmの濃度のCPCで76%減少することを示している。図1は、より高濃度のCPCおよび同じ実験方法を用いる別の試験の結果を示している。20,000ppmのCPCで、牛肉に対する該細菌の付着は完全に抑制された。

#### 実施例6

##### 予め冷却された鳥肉に対する0.1%セチルピリジニウムクロリドの噴霧

鳥肉パイロットプラントにおいて使用するための噴霧試験槽を設計し、組み立てた。該噴霧試験系は、試験槽、噴霧水貯蔵タンク、圧力ポンプ、フィルター、圧力調整器、8個のノズルが四面に位置するプラスチック噴霧槽、および使用済み水捕集器よりなるものであった。前方および後方噴霧用の各パイプ上には、3個のノズルがあった。上方噴霧用に1個のノズルを使用し、下方噴霧用に1個のノズルを使用した。該槽の寸法は、好ましくは、3×3×3フィートである。高圧ブースターポンプにより、圧力を0~140psiに調節することができた。該噴霧ノズルとニワトリ屠体との間の距離は12~15インチであった。ニワトリ屠体の内部に噴霧するためには、上部ノズルを使用した。平-錐（flat-cone）噴霧ノズル（1/8TK-SS1 Spraying Systems Co.）を使用した。

20

貯蔵タンク中の噴霧溶液を圧力調整器に送り出し、ついで該槽内のノズルから噴霧した。噴霧槽中には、ステンレス鋼ノズルとパイプとよりなるいくつかの噴霧層を設備し、該槽をプラスチックシートで被覆して、化学ドリフトを防いだ。シャックルを使用して、該槽内にニワトリ屠体を吊るした。

地元の鳥肉加工施設から、予め冷却されたニワトリ屠体入手した。それらを内臓除去加工ラインの末端から採取し、研究室に運び、直ちに試験に使用した。該加工施設と研究室との間で経過した時間は、30分未満であった。ニワトリ屠体の温度は、32~37℃であった。

30

$1 \times 10^6$  CFU/mlのサルモネラ・ティフィムリウム（*S. typhimurium*）1mlを噴霧することによりニワトリ屠体に接種し、ついで該屠体を室温で30分間インキュベートした。水道水を30psi、22℃で5秒間噴霧することにより、接種を受けたニワトリ屠体をリンスして、緩く付着したサルモネラ（*Salmonella*）細胞を洗い落とす。ついで各屠体を噴霧槽内に吊るし、該屠体に該試験化合物の1つを噴霧した。噴霧後、各ニワトリ屠体を水道水で20秒間リンスした。ついで該ニワトリ屠体を、自動振とう器上、ビニール袋中で緩衝化ペプトン水で洗浄して、微生物分析用のサンプルを得た。QACなどの試験化合物で処理したニワトリを未処理のニワトリと比較することにより、ニワトリの皮膚の色を目視検査した。種々の噴霧圧および持続時間にて1000ppmの濃度のCPCを使用した。噴霧水温度を、22℃の室温に設定した。圧力を30、50および120psiに、持続時間を30および90秒に設定した。各試験を3回繰返した。ニワトリ屠体上のサルモネラ・ティフィムリウム（*S. typhimurium*）の減少を、噴霧試験化合物、噴霧水および未噴霧群の間で比較した。

40

噴霧処理の後、各屠体を100mlの緩衝化ペプトン水（BPW）で機械的に1分間振とうし、ついで該洗浄水を集めた。該サンプルを希釈し、富化し、XLT寒天またはPetriFilm（3M, Inc.; St. Paul, MN、総好気菌計数プレート用）上にプレーティングし、37℃で18~24時間インキュベートした。ついでコロニー形成単位を計数した。付着細菌の数を、最確数法で計算した。サルモネラ（*Salmonella*）の最確数および総好気性プレートの計数を、洗浄水サン

50

ブルを使用して各層体について行なった。分散分析を用いて実験データを分析して、処理群および対照間の有意差を求めた (SAS/STAT User's Guide, SAS Institute, Inc., Cary, NC 1993)。

この実験の結果は、30、50および120psiの圧力での30および90秒の1000ppmのCPC溶液の噴霧が、ニワトリ層体上のサルモネラ (Salmonella) 数の有意な減少を引き起こすことを示している。このデータは、30～120psiの範囲の圧力で0.1%のCPC濃度にて30秒～90秒間噴霧する場合、該噴霧方法が、ニワトリの浸漬または液浸の標準方法に代わる実施可能な方法であることを示している。30～120またはそれを超えるpsiの開示範囲内の種々の噴霧圧および種々の噴霧時間でより低濃度のCPCを使用して、食品媒介性微生物の有意な減少を引き起こす最も効率的な方法を得ることが可能かもしれない。多数のニワトリ層体に自動的に短時間噴霧することが可能であり、そのような場合にもなお、病原菌の有意な減少を得ることが可能であるため、該噴霧方法は、産業的方法での使用に有利であろう。

#### 実施例 7

#### ニワトリの皮膚上のサルモネラ・ティフィムリウム (S. typhimurium) に対する第四級アンモニウム化合物の効果の有効濃度および時間の研究

ニワトリの皮膚上の生存サルモネラ・ティフィムリウム (S. typhimurium) の抑制および減少に対するCPCの効果調べた。試験溶液は、0.008M (pH7.2) リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の5% (v/v) グリセリン中に種々の濃度のCPC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を含むものであった。該溶液は、グリセリン - PBS混合物中に適当な量のCPCを溶解することにより調製した。新鮮に凍結された未加工のニワトリのドラムスティックからの正方形の皮膚片 (2.5×2.5cm) を、45kGyの線量の照射 (Iowa State Universityの直線加速器からの電子線) により滅菌した。サルモネラ・ティフィムリウム (S. typhimurium) の起源は、ATCC株#14028またはNCTC株#12023であった。トリプチック (tryptic) ダイズ寒天 (TSA; DIFCO, Detroit, MI) プレート上で、全コロニーの計数を行なった。サルモネラの貯蔵はTSA上で行なった。接種物の調製は、以下のとおりに行なった。50mlのトリプチックダイズブロスを含有するフラスコに、単コロニーからのサルモネラ・ティフィムリウム (S. typhimurium) を接種し、ついで振とう (150rpm) しながら一晩インキュベート (37℃) した。該培養の1mlのアリコートに9mlのPBSで2回洗浄 (4800rpm、10分) した。該ペレットをPBSに再懸濁して、 $1 \sim 2 \times 10^6$  コロニー形成単位 (CFU) /mlの最終細胞濃度 (分光光度的、420nm) を得た。

ニワトリの皮膚をドラムスティックから切除し、6ウェル組織培養プレートの各ウェル中に上皮側を上にして配置した。PBS 5mlのみで処理するバックグラウンド対照群を除き、1ml当たり  $1 \sim 2 \times 10^6$  CFUのサルモネラ・ティフィムリウム (S. typhimurium) を含有する5mlのPBSを皮膚片に接種した。該皮膚片を含有する培養プレートをインキュベート (30分、37℃) し、ついで該インキュベーション溶液を吸引により除去した。接種を受けた皮膚を、5mlの試験溶液で処理した。3個の皮膚片の組を、試験溶液の各濃度について使用した (これらには、該皮膚をPBS中の5% (v/v) グリセリン5mlのみで処理した1組 (濃度0) が含まれる)。該プレートを、振とう (100rpm) しながら25℃で1、3または10分間インキュベートした。インキュベーション後、各皮膚片を吸引によりリンス (5ml PBS) し、50mlの0.1% (w/v) ペプトンを含む無菌ビニール袋に入れ、Stomacher R 400 実験用ブレンダー (Seward Medical Co., London, England) を用いて2分間ホモジナイズした。その袋の角を無菌的に切り、全内容物を無菌遠心管に移し、ついでそれを10分間遠心 (12,000rpm、20℃) した。該ペレットを5mlの0.1% (w/v) ペプトン / 水に再懸濁した。その適当な希釈物1mlをTSA寒天上に3通りにポアプレートし、ついで37℃で24時間インキュベートし、ついでコロニーを計数し、希釈に関して補正し、CFU/皮膚として記録した。その結果は、サルモネラ (Salmonella) の減少がCPC濃度および曝露時間の両方に左右されたことを示している。4000および8000ppmのCPC溶液で僅か3分間の接触時間で処理することにより、約  $5 \log_{10}$  の汚染除去が達成された。

皮膚の正方形片を、6ウェル組織培養プレートの各ウェル中に上皮側を上にして配置した。皮膚片を5mlの試験溶液で処理した。3個の皮膚片の組を、試験溶液の各濃度について

使用した（これらには、該皮膚をPBS中の5%（v/v）グリセリン5mlのみで処理した1組（濃度0）が含まれる）。該皮膚片を含有する培養プレート（100rpm）を振とうしながら25℃で1、3または10分間インキュベートした。該インキュベーション溶液を吸引により除去し、該皮膚を吸引によりリンス（5ml PBS）し、ついで1ml当たり $1 \sim 2 \times 10^6$ CFUのサルモネラ・ティフィムリウム（*S. typhimurium*）を含有する5mlのPBSと共にインキュベート（30分、35℃）した。インキュベーション後、各皮膚片を吸引によりリンス（5ml、PBS）し、50mlの0.1%（w/v）ペプトンを含む無菌ビニール袋に入れ、Stomacher R 400実験用ブレンダーを用いて2分間ホモジナイズした。該ホモジネート（1ml）の3個のアリコート（30個）をTSA寒天（DIFCO, Detroit, MI）上にポアプレートし、ついで37℃で24時間インキュベートし、ついでコロニーを計数し、希釈に関して補正し、 $\log_{10}$ CFU/皮膚として記録した。その結果は、CPCでの前処理によるサルモネラ（*Salmonella*）汚染の予防もまた、濃度および時間依存性を示すことを示している。最も顕著な効果は、10分の前処理時間で認められ、この場合、サルモネラ（*Salmonella*）付着の $4.9 \log_{10}$ の抑制が8,000ppmの濃度で示された。交差汚染の予防は食品加工において極めて重要であるため、この結果は重要である。

対照についての $\log_{10}$ CFU/皮膚の値は、4.61~5.03の範囲内であった。処理サンプルと対照との差を、ANOVA、ついでNewman-Keuls複数範囲分析（multiplerange analysis）を用いて分析したところ、それは統計的に有意であった（ $p < 0.01$ ）。

もう1つの噴霧実験では、5,000ppmのCPC溶液をニワトリ屠体に90秒間噴霧した後に、サルモネラ（*Salmonella*）の $3.3 \log_{10}$ の減少が得られた。

#### 実施例 8

##### ニワトリの皮膚に付着した生存リスティア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）の減少に対する第四級アンモニウム化合物の効果

ニワトリの皮膚に接種するのにリスティア・モノサイトゲネス（*L. monocytogenes*）を使用し、Stomacher 400中で使用するビニール袋中の媒体が0.1%ペプトンを含むことを除き、実施例2の工程に従った。2000ppm以上のCPC濃度で、リスティア・モノサイトゲネス（*L. monocytogenes*）の $4 \log_{10}$ を超える減少が生じた。

#### 実施例 9

##### ニワトリの皮膚に付着する生存リスティア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）の付着の抑制に対する第四級アンモニウム化合物の効果

ニワトリの皮膚に接種するのにリスティア・モノサイトゲネス（*L. monocytogenes*）を使用し、Stomacher 400中で使用するビニール袋中の媒体が0.1%ペプトンを含むことを除き、実施例3の工程に従った。この研究の結果は、50ppmで付着細菌の82%の減少、100ppmで92%の減少、および500および1000ppmで100%の減少を示している。

#### 実施例10

##### ナマズ、黒ブドウおよびブロッコリに付着した生存サルモネラ・ティフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）の減少に対する第四級アンモニウム化合物の効果

ナマズ、黒ブドウ（black grapes）およびブロッコリ上の生存サルモネラ・ティフィムリウム（*S. typhimurium*）の減少に対するCPCの効果を調べた。試験溶液は、0.008M（pH7.2）リン酸緩衝食塩水（PBS）中の5%（v/v）グリセリン中に種々の濃度のCPC（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）を含むものであった。該溶液は、グリセリン-PBS混合物中に適当な量のCPCを溶解することにより調製した。

食品サンプルは、小さな無傷のマッシュルーム、小さな無傷の黒ブドウ、ブロッコリの小房、および新鮮に凍結された未加工のナマズから切除されたナマズの正方形皮膚片（ $2.5 \times 2.5$ cm）であった。該果物および野菜は地元の食料品店から購入し、一方、該魚は地元のナマズ供給業者から凍結状態で送られた。サルモネラ・ティフィムリウム（*S. typhimurium*）の起源は、ATCC株#14028またはNCTC株#12023であった。

サルモネラ（*Salmonella*）選択XLD寒天（DIFCO, Detroit, MI）プレートを用いて、全コロニーの計数を行なった。さらに、ナマズの実験では、非選択培地であるトリプトニック（tryptic）ダイズ寒天（TSA; DIFCO, Detroit, MI）を用いて、全好気性コロニーの計数を行なった。サルモネラの貯蔵はTSA上で行なった。

10

20

30

40

50

サルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) の接種物の調製は、前記実施例 7 に記載のとおりに行なった。食品サンプルを、6 ウェル組織培養プレートの各ウェル中に入れた。PBS 5 ml のみで処理するバックグラウンド対照群を除き、1 ml 当たり  $1 \sim 2 \times 10^6$  CFU のサルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) を含有する 5 ml の PBS を該サンプルに接種した。該食品サンプルを含有する培養プレートをインキュベート (30 分、35 ) し、ついで該インキュベーション溶液を吸引により除去した。接種を受けたサンプルを、5 ml の試験溶液で処理した。3 個の食品サンプルの組を、試験溶液の各濃度について使用した (これらには、該食品サンプルを PBS 中の 5 % (v/v) グリセリン 5 ml のみで処理した 1 組 (濃度 0) が含まれる)。該プレートを、振とう (100rpm) しながら 25 で 3 分間インキュベートした。インキュベーション後、各食品サンプルを調製し、前記実施例 7 に記載のとおり、Stomacher R 400 実験用ブレンダーと共に使用する無菌ビニール袋に入れた。その袋の角を無菌的に切り、全内容物を無菌遠心管に移し、ついでそれを 10 分間遠心 (12,000rpm、20 ) した。該ペレットを 5 ml の 0.1 % (w/v) ペプトン / 水に再懸濁した。その適当な希釈物 1 ml を、ブドウおよびブロッコリの実験の場合には XLD 寒天上に、ナマズの場合には XLD 寒天および TSA 寒天の両方に 3 通りにポアプレートした。37 で 24 時間インキュベートした後、コロニーを計数し、希釈に関して補正し、ナマズの場合には CFU/皮膚として、その他の食品サンプルの場合には CFU/グラムとして記録した。これらの実験の結果を図 2 ~ 5 に示す。ナマズに対する照射を行なわなかったため、図 2 は、非選択培地上の総好気細菌数を示しており、一方、図 3 は、サルモネラ (*Salmonella*) の数のみを示している。

10

20

#### 実施例 11

##### 全ニワトリ体上の生存細菌の減少に対する第四級アンモニウム化合物の噴霧の効果

これらの実験では、市販の噴霧器を使用して全ニワトリ屠体上に QAC を噴霧することが生存細菌の減少に及ぼす効果を試験した。細菌接種溶液を以下のとおりに調製した。大腸菌 (*E. coli*) (ATCC#25922) を、ブレインハートインフュージョンブロス (BHI) 中で 20 ~ 24 時間増殖させ、ついで 500 ml の生理食塩水 (PSS) に 0.5 ml の大腸菌 (*E. coli*) 培養物を加えることにより 1:1000 の濃度に希釈した。サルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) を、BHI 中で 20 ~ 24 時間増殖させ、ついで 500 ml の生理食塩水 (PSS) に 0.1 ml のサルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) 培養物を加えることにより 1:5000 の濃度に希釈した。5,000 ppm の濃度までの該 CPC 処理溶液を調製した。予め冷却されたニワトリ屠体を、各試験のために地元の鳥肉加工施設から入手した。該屠体をシャックルライン上に配置し、1 ml の該細菌接種溶液を該屠体の乳房に噴霧し、1 ml を背中に噴霧した。室温で 30 分かけて、該細菌を付着させた。付着後、該屠体を該シャックルライン上で水道水で 20 秒間リンスした。該屠体を 10 個の群に分割した。各実験について、水道水のみを噴霧した 10 匹のニワトリの一群を作ったが、サルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) の場合には、該噴霧の効果を評価するために、接種後に噴霧されていない一群を作った。該細菌のすべてに関して、屠体の一群を、Johnson<sup>TM</sup> 洗浄剤とコップ 35 杯の水道水とで 60 psi で 20 秒間処理した。このリンスの後、該屠体を 90 秒間固化 (set) させ、ついでコップ 20 杯の水道水で 80 psi で 20 秒間リンスした。このリンスサイクルを 2 回または 3 回繰返した。また、各リンスの間隔は 90 秒間であった。もう 1 つの屠体群を、Johnson<sup>TM</sup> 洗浄剤中、5,000 ppm の CPC で 60 psi で 20 秒間処理し、ついで 90 秒間固化 (set) させ、ついでコップ 20 杯の水道水で 80 psi で 20 秒間リンスした。このリンスサイクルを 2 回または 3 回繰返した。処理後、該屠体をビニール袋に入れ、100 ml の 0.1 % 緩衝化ペプトン水 (BPW) を各袋に加えた。該袋を機械的に振とうし、該リンス液を集めて、最確数 (MPN) 法に用いた。また、総好気性プレート数 (TPC) の評価には、PetriFilm<sup>TM</sup> を使用した。既に存在していた (接種していない) カンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*) を MPN 法により、大腸菌 (*E. coli*) を PetriFilm<sup>TM</sup> により計数した。

30

40

以下に記載する結果は、該 CPC 処理がカンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*)、大腸菌 (*E. coli*) およびサルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) の数を減少させるのに有効であることを示している。サルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) の

50



実験の洗浄水を調べたところ、該洗浄水中のCPCがサルモネラ (Salmonella) を 1 log 減少させることが判明した。したがって、以下に示すサルモネラ (Salmonella) に関する殺菌データから 1 log 差し引くことが可能である。

存在細菌				
		水対照	5,000ppm CPC	Log <sub>10</sub> 単位の 減少
C. jejuni	試験 1	2.613	0	2.613
	試験 2	2.643	0.629	2.014
E. coli	試験 1	1.974	0.386	1.588
	試験 2	1.380	0.460	0.920

10

S.typhimurium	非噴霧 対照	噴霧対照	5,000ppm CPC	Log <sub>10</sub> CFU 単位の減少	
				非噴霧対 CPC 処理	噴霧対 CPC 処理
1 (12/02/96)	5.342	5.039	4.295	1.047	0.744
2 (12/09/96)	5.304	4.932	1.977	3.327	2.955
3. (12/16/96)	5.001	5.154	2.606	2.395	2.548
4. (01/27/97)	4.72	4.48	1.03	3.69	3.45
5. (02/03/97)	4.185	4.212	1.426	2.76	2.79

20

#### 実施例 1 2

##### 食品媒介性真菌に対する第四級アンモニウム化合物の効果

この研究では、食品媒介性真菌に対するCPCの効果を試験した。アスペルギルス・フラウス (Aspergillus flavus) およびペニシリニウム・クリソゲナム (Penicillium chrysogenum) の斜面培養を馬鈴薯ブドウ糖寒天 (PDA) プレート上にストリークした。接種の30分後または接種 (および室温でのインキュベーション) の24時間後、2個の円形フィルター (直径7mm) を各プレート上に載せた。200ppm、1000ppm、5000ppmおよび25,000ppmのCPC溶液または蒸留脱イオン (DD) 水を、該フィルターに10μl/フィルターで加えた。全プレートを、蓋側を上にして室温で48時間インキュベートした。阻止円の直径を測定した。以下に記載する結果は、CPCが食品媒介性真菌に対して有効であることを示している。

30

Aspergillus flavus2 に対する CPC の効果		
CPC の濃度(ppm)	阻止円(mm)	
	即時処理	遅延処理
25,000	1.63	1.00
5,000	2.00	0.92
1,000	0.38	1.00
200	0.25	0.33
0	0	0

10

Penicillium chrysogenum に対する CPC の効果		
CPC の濃度(ppm)	阻止円(mm)	
	即時処理	遅延処理
25,000	4.13	1.83
5,000	3.38	1.92
1,000	1.00	1.67
200	0	1.17
0	0	0

CPCは、試験した食品媒介性真菌に対して有効である。

20

#### 第四級アンモニウム化合物の製剤

産業的方法において組成物を使用する場合には、大容量の液体溶液ではなく小容量の液体濃縮物で実施するのが好ましい。水単独中で調製された製剤中で現在利用可能なQAC濃度の1000倍までのQAC濃度を可能にするQAC製剤を開発した。少なくとも1つの溶解促進剤を含有するこの製剤は、大規模な産業的加工で用いる最終濃度にまで容易に希釈される可溶性濃縮物を提供する。溶解促進剤は、QACが溶液から沈殿しないようにQACの溶解度を維持するように機能する。許容しうる任意の溶解剤を使用することができるが、エチルアルコールまたはグリセリンが好ましい。該製剤は、エチルアルコール、グリセリンまたはその両方を含有することができる。この製剤は、約100,000ppm～約300,000ppmのQAC、約0%～約49%のエチルアルコールおよび約0%～約20%のグリセリンを水中に含有する。好ましい製剤は、約150,000ppm～約250,000ppmのQAC、約10%～約40%のエチルアルコールおよび約0.5%～約10%のグリセリンを水中に含有する。より好ましくは、エチルアルコールの濃度は約15%～約30%となることが可能であり、グリセリンの濃度は約0.5%～約5%となることが可能である。好ましくは、この製剤は、約200,000ppmのQAC、約20%のエチルアルコールおよび約1%のグリセリンを水中に含有する。この製剤は、QACでの食品の浸漬処理で使用する貯蔵タンクに加える濃縮物として特に有用であるが、それは、約5,000ppm QACの最終濃度での噴霧方法においても有用である。

30

加工中の食品上でのQAC溶液（特に噴霧方法により運搬される場合）の接触時間を増加させるために、もう1つの製剤を開発した。この製剤は、加工時間を増加する工程を更に加えなくても、製品とのより長い接触時間を潜在的に可能にする。該製剤は、その特性のため、該方法の抗微生物的有効性を潜在的に増加させる。この製剤は、好ましくは、約50ppm～約20,000ppmのQACと、約0%～約10%のエチルアルコールおよび約0%～約20%のグリセリンまたはその両方から選ばれる少なくとも1つの溶解促進剤とを含有する。より好ましくは、この製剤は、約50ppm～約5,000ppm、約0%～約10%のエチルアルコールおよび約1.0%～約10%のグリセリンを水中に含有する。より好ましくは、この製剤は、水中に約500ppm～約5,000ppmのQAC、約0%～約10%のエチルアルコールおよび約1.0%～約5%のグリセリン、より好ましくは約1.0%～約3%のグリセリンを含有する。

40

前記教示を考慮すれば、開示されている発明に対する種々の修飾が可能であるため、本発明の好ましい実施態様の以上の説明は例示のためのものであり、実施例で使用する特定の組成物に本発明を限定するものではない。本発明は、QACが広域スペクトルの食品媒介性

50

微生物汚染による細菌汚染を従来公知のものより有意に予防し減少させるという知見に基づく。本発明は、添付の請求の範囲により定められる本発明の精神および範囲内に含まれる変形、修飾および均等物を包含すると意図される。

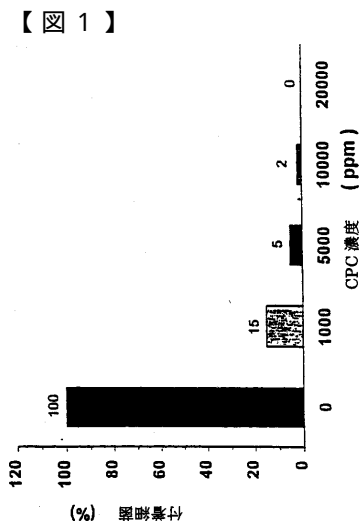


FIG. 1

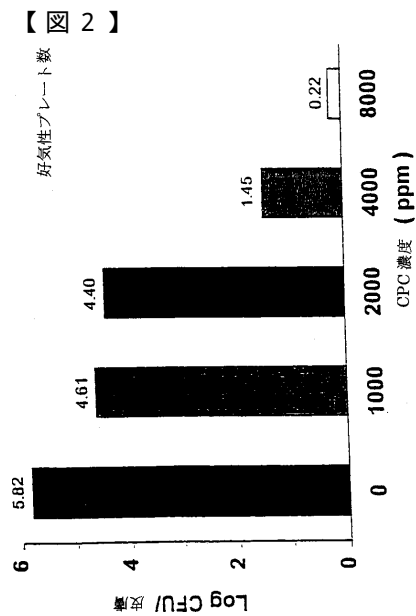


FIG. 2

【図 3】

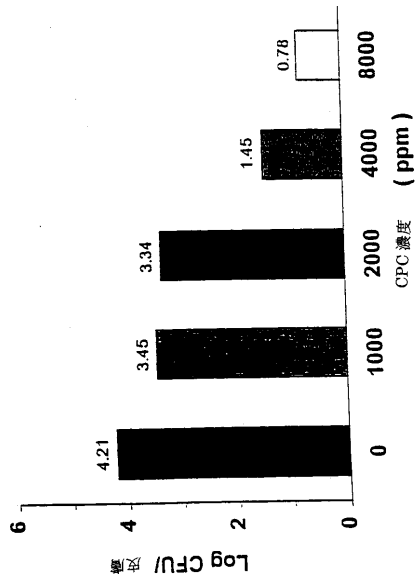


FIG. 3

【図 4】

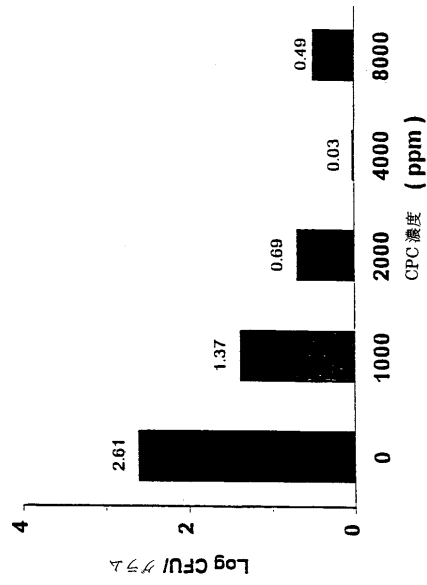


FIG. 4

【図 5】

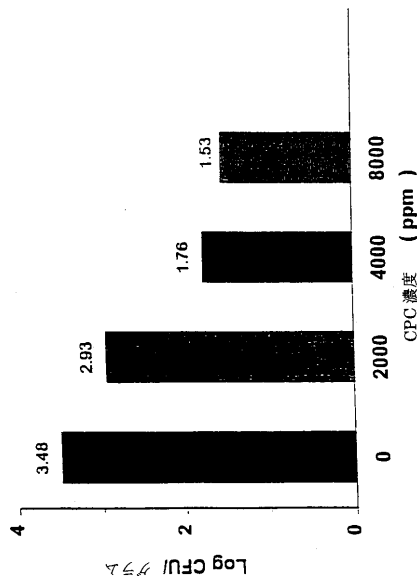


FIG. 5

## フロントページの続き

- (72)発明者 コンパドア, シーサー  
アメリカ合衆国 7 2 2 0 5 アーカンサス州, リトル ロック, ゲーブル 7 2 1 5
- (72)発明者 ブリーン, フィリップ  
アメリカ合衆国 7 2 2 1 1 アーカンサス州, リトル ロック, ウッドロア サークル 9 4
- (72)発明者 サラリ, ハミッド  
アメリカ合衆国 7 2 2 2 7 アーカンサス州, リトル ロック, サンフォード ドライブ 3 番  
1 7 2 0
- (72)発明者 フィファー, イー., キム  
アメリカ合衆国 7 2 1 1 6 アーカンサス州, リトル ロック, イーグル クリーク ロード  
5 9 0 8
- (72)発明者 ラティン, ダニー  
アメリカ合衆国 5 7 0 0 6 サウス ダコタ州, ブロッキングス, ピクトリー ストリート 1  
9 3 8
- (72)発明者 スラヴィック, マイク  
アメリカ合衆国 7 2 7 6 2 アーカンサス州, スプリングデール, リジェビュー ドライブ, 1  
7 1 3
- (72)発明者 リー, ヤンビン  
アメリカ合衆国 7 2 7 0 1 アーカンサス州, ファイエットビル, グレンズブロック プレイ  
ス 1 8 3 8
- (72)発明者 オブライアン, ティモシー  
アメリカ合衆国 7 2 2 0 7 アーカンサス州, リトル ロック, グリストミル ロード 2 6 2  
5

審査官 森井 隆信

- (56)参考文献 特開昭53-009318(JP, A)  
特表昭59-501534(JP, A)  
特開平08-040810(JP, A)  
米国特許第05366983(US, A)  
J. Food. Sci., 1995年, Vol.60, No.6, 1191-1196

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23B 4/08

A23B 7/153

A23L 2/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed