

# 卵成分中のサルモネラ・エンテリティディスに対する

## 紫外線殺菌効果とその長期生存性

### Ultraviolet Sterilization Effect on *Salmonella* Enteritidis of Egg

#### Ingredients and the Long-term Viability

横田陽子 坂野智恵子\* 木本彩美\* 石岡大成\*\* 下田雅昭 小澤邦壽

Yoko YOKOTA, Chieko SAKANO, Ayami KIMOTO, Taisei ISHIOKA,

Masaaki SHIMODA, Kunihisa KOZAWA

#### 1. はじめに

平成 23 年 2 月下旬、群馬県内の学校給食センターの給食を原因とするサルモネラ・エンテリティディス (SE) による集団食中毒が発生した。原因食品は「もやしのナムル」であり、その調味液 (醤油、ごま油、ラー油、いりごま) の調製に泡立て器を使用していた。調査の結果、この泡立て器は、原因食品を提供した日の 2 日前に「かき玉汁」を作るため鶏卵の泡立てに使用していた。当該給食センターでは、泡立て器についての洗浄殺菌の記録がなく使用后洗浄され紫外線 (UV) 殺菌保管庫内で 2 日間保管 (室温) されたものの、洗浄殺菌が十分でなかったことが集団食中毒につながったと推察された。そこで、卵成分中に存在する SE に対する UV 殺菌の効果と乾燥した卵成分中の SE の長期生存性について調査した。

#### 2. 材料及び方法

##### 2.1. 卵成分中の SE の UV 殺菌効果試験

###### 2.1.1. 材料

試験には、当該集団食中毒で検出された SE 株を使用した。最初に、市販の鶏卵を無菌的に割卵し、ストマッカーで 30 秒間処理し卵液を作製した。次に、この卵液及び滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に SE を  $10^6$ cfu/ml となるよう添加し、各々 SE 卵液及び PBS-SE とした。UV 殺菌器は、安全キャビネット (AIR TECH : BHC-1303 CLASS IIA/B3) 内の UV 殺菌灯[東芝

\* 現 群馬県食肉衛生検査所

\*\* 現 国立感染症研究所

: GL-15 (2 本) ]を使用した。UV 強度は、UV 強度計 (ケニス社 : YK-37UVSD) を用いて UV-C (254nm) を測定した。SE 培養には組織培養用 24 穴マイクロプレート (マイクロプレート) を使用した。増菌培養には L-システイン加ペプトン緩衝溶液 (BPW) を、選択培地には SBG スルファ培地、DHL 平板培地を使用した。

###### 2.1.2. SE卵液の調整とUV照射

卵液を PBS で段階的に希釈し、卵液原液、5 倍、10 倍、100 倍、1,000 倍、および 10,000 倍に希釈し、さらに卵成分なし (PBS のみ) の系列を作成した。各々 SE を  $10^6$ cfu/ml 添加した。これらをマイクロプレートの各ウエルに  $20\mu\text{l}$  ずつ分注し、安全キャビネット内の UV 強度が約  $0.1\text{mW}/\text{cm}^2$  の位置において、0.08 (5 分)、0.25 (15 分)、0.5 (30 分)、1、3、6、24 時間及び 48 時間の UV 照射を実施した。

###### 2.1.3. SEの培養と生存の判定

最初に、マイクロプレートへ  $2\text{ml}$  ずつ BPW を分注し、 $35^\circ\text{C}$  で 20 時間、増菌培養を行った。増菌培養後の培養液  $1\text{ml}$  を SBG スルファ培地に接種し、 $42^\circ\text{C}$  で 18 時間培養後、1 白金耳量を DHL 平板培地に塗布し、 $35^\circ\text{C}$  で 24 時間培養した。DHL 平板培地上にサルモネラを疑う集落が発育した場合、グラム染色、性状確認試験、血清型を実施し SE を検出した場合を生存とした。

##### 2.2. 卵成分中の SE の長期生存性試験

試験には、2.1 と同じ SE 株、SE 卵液を使用しマイクロプレートの各ウエルに SE 卵液  $50\mu\text{l}$  ずつ分注したものを試験回数分用意した。冬期 (平成 24 年 12 月 ~ 平成 25 年 3 月) は室温  $20$

～25℃、湿度 20～30%、春夏期（平成 25 年 4 月～平成 25 年 9 月）は室温 25～30℃、湿度 30～45%に保ち、約 1 ヶ月に一度 2.1.3 と同様の方法で培養し SE の生存性を確認した。

### 2.3. 卵成分中の SE の観察

乾燥・凝固状態の SE 卵液（乾燥 SE 卵液）を 20%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、定法により組織切片を作成し、グラム染色を行い鏡検した。また、乾燥 SE 卵液を 2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し蒸着後、走査型電子顕微鏡により観察した。

## 3. 結果

### 3.1. 卵成分中の SE の UV 殺菌効果試験

卵成分濃度の変化による UV の殺菌効果の結果を表 1 に示した。卵液原液の場合は、48 時間の UV 照射でも SE の生存が確認された。また、卵成分の PBS による段階希釈においては、5 倍希釈では 1 時間後まで、10 倍及び 100 倍希釈では 15 分後まで、さらに 1,000 倍希釈では 5 分後まで SE の生存が確認された。

### 3.2. 卵成分中の SE の長期生存性試験

PBS-SE は 1 ヶ月以上 2 ヶ月未満の範囲まで生存が確認された。一方、SE 卵液では 250 日以上過ぎても生存が確認された（表 2）。

### 3.3. 卵成分中の SE の観察

グラム染色した切片の観察では、赤く染色（グラム陰性）された多数の SE が、卵成分に混じり封じ込められた様子が認められた（図 1）。走査型電子顕微鏡による観察では、表面の乾燥した卵成分が多数の皺を形成し、その表面から SE の菌体の一部が突出している像も数カ所確認されたが、多くの菌体は卵成分に混じり存在すると思われた（図 2）。

## 4. 考察

サルモネラ属菌に対する UV 殺菌の効果は、コマーシャルベースにおいて多く示されている。例えば腸チフス菌では、UV 強度 0.15mW/cm<sup>2</sup>（15W 殺菌ランプ 50cm から寒天培地上からの照射）、90 秒で殺菌率が 100%となるとの報告がある（<http://www.as-1.co.jp/academy/11/11-2.html>）。

今回、我々は普段使用している安全キャビネットの UV 殺菌装置を使用し、卵成分の濃度を

変化させ UV 強度約 0.1mW/cm<sup>2</sup>での殺菌効果を調査した。その結果、卵成分を 10 倍以上希釈した SE 卵液は、卵成分がない PBS-SE と同様に UV 照射 15 分未満の生存であったが、卵成分を 5 倍希釈した SE 卵液及び卵液原液中の SE は、各々 UV 照射 1 時間後、48 時間後も生存が確認されたことから、卵成分が希釈されない状態では SE の生存性は高まり UV 殺菌効果が十分ではないことが推察された。

また、サルモネラ属菌の熱抵抗性についても、食品の組成が関係しているといわれる（坂崎利一ら, 2000）。例えばサルモネラ属菌が含まれる卵の加熱では、菌が死滅するより先に卵のタンパク質が凝固して熱の伝導が妨げられ、特に殻付き卵では凝固タンパク質中に封じ込められた菌は通常の殺菌時間の数百倍も生残するとの報告がある（坂崎利一ら, 2000）。

今回の実験では加熱操作はしていないが、卵成分の濃度が高い方が SE の生存性は長期になったことから、卵成分により菌体が封じ込められ UV が深部まで到達せず殺菌から免れていると推察された。これは、グラム染色での鏡検及び電子顕微鏡観察において、卵成分が乾燥・凝固し SE が内部に閉じ込められている像からも示唆された。

元来、UV 殺菌装置は対象となる物質の表面の殺菌に効果を示すものである。また我々は、透明プラスチック製の蓋などの物品の下や物の陰の部分では、UV 強度は極端に低下していることを UV 強度測定により確認している。従って、安易に UV 殺菌装置を過信せず、その機能と効果を熟知し適切に使用する必要がある。

サルモネラ属菌は通常乾燥に強いと言われていている（梁川良ら, 1989）。ステンレスボウルに 2.2×10<sup>8</sup>cfu/100cm<sup>2</sup>の SE を付着させ室温で 14 日間保管した実験があり、保管日数の経過とともに SE 菌数は減少したが、保管 14 日目でも平均 2.5×10<sup>3</sup>cfu/100cm<sup>2</sup>の生存が認められたという報告もある（相川勝弘ら, 2002、食品安全委員会, 2010）。本調査でも、卵成分の無い乾燥した PBS-SE であっても 1 ヶ月以上の生存が確認された。乾燥した卵成分中の SE はさらに生存が長期に及び、250 日以上であっても生存していた。この結果から何らかの原因で卵の中に

SE が入り増殖した場合、極めて長期生存の可能性があることを示唆する。以上のことから、卵料理に使用した調理器具等は、卵成分の完全な除去、すなわち十分な洗浄と適切な殺菌及び衛生的な保管が一層重要となる。

## 文献

相川勝弘、村上裕之、猪俣恭子、丸山努、藤澤倫彦、高橋孝則、2002: 卵の保存及び調理と関連する条件が *Salmonella Enteritidis* の増殖、侵入及び生残に与える影響、食品衛生学雑誌、43(3)、178-184.

坂崎利一、2000: 新訂食水系感染症と細菌性食中毒 96-98、中央法規出版(株)、東京.

食品安全委員会、2010: 食品健康影響評価のためのリスクプロファイル～鶏卵中のサルモネラ・エンテリティディス～(改訂版)、www.fsc.go.jp/sonota/risk\_profile/risk\_salmonella.pdf.

梁川良、1989: 新編獣医微生物学、206-213、(株)養賢堂、東京.

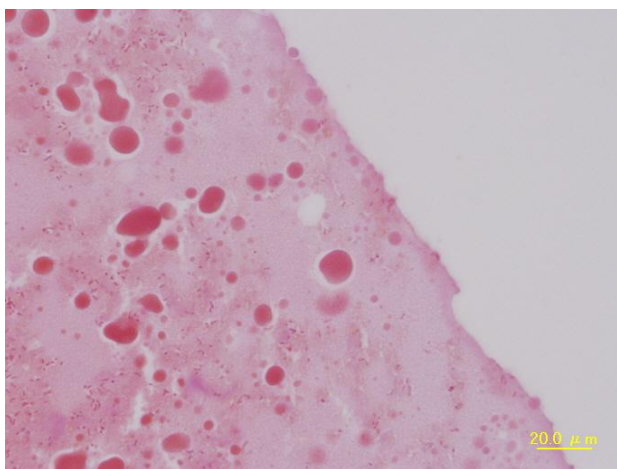


図1 グラム染色 ×400

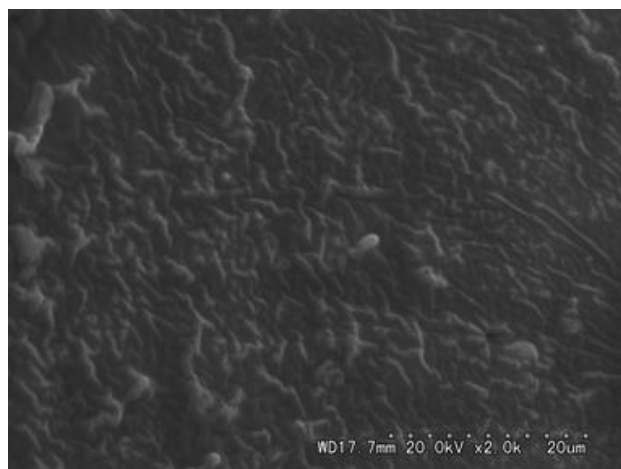


図2 走査型電子顕微鏡写真 ×12000

表1 卵成分濃度の変化におけるSEのUV殺菌効果

UV照射時間 (時間)	SE卵液の卵成分希釈倍率						卵成分無
	原液	×5	×10	×100	×1000	×10000	PBS-SE
0.08 (5分)	3/3*	3/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/6
0.25 (15分)	3/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3	2/6
0.5 (30分)	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6
1	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6
3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6
6	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6
24	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6
48	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6

\*陽性数/検査数

表2 卵成分の有無によるSEの長期生存試験結果

経過(日)	1	2	3	8	10	11	23	30	51	58	104	144	151	275
SE卵液	3/3*	3/3	ND	ND	ND	ND	ND	3/3	ND	3/3	ND	ND	3/3	3/3
PBS-SE	2/3	ND	3/3	2/3	1/3	0/3	2/3	2/3	0/3	ND	0/3	0/3	ND	ND

\*陽性数/検査数、ND: no data