

一定温度条件下における主要食中毒菌の 菌数変化について

大沼正行 野田裕之 金子通治

Cell Count of the Main Food Poisoning Bacillus under Constant Temperature Conditions.

Masayuki OHNUMA, Hiroyuki NODA and Michiharu KANEKO

キーワード：アルファルファ種子，サルモネラ，腸管出血性大腸菌，腸炎ビブリオ，生菌数

食中毒は、食品、飲料水などを媒体とする疾患であり、病因物質として細菌、ウイルス、化学物質、自然毒など、多種多様なものがあげられる。なかでも細菌による食中毒は、他の病因物質に比べ年間の発生件数が最も多く¹⁾、公衆衛生上問題となっている。

細菌性食中毒は、食品、飲食物等と共に摂取した食中毒菌が腸管内で定着、増殖することにより発症する感染型（以下、感染型）と、食中毒菌が増殖する際に産生した毒素を摂取することにより発症する毒素型（以下、毒素型）の2種類に大別されている。平成14年（2002年）の全国で発生した食中毒事件のうち細菌性食中毒の原因菌の上位を占めるのは、サルモネラ、病原性大腸菌、腸炎ビブリオ、カンピロバクターであり、すべて感染型である。それら4菌種で食中毒事件全体の66.9%を占めている。

食中毒菌がヒトに対し食中毒様症状を発現させるためには、毒素型の食中毒菌の場合、発症可能な量の毒素が食品中に産生されていれば必ずしも細菌が生残している必要はないが、感染型の食中毒菌の場合、食品原材料に付着してから冷蔵庫、冷凍庫など一定温度で保存後ヒトに摂取されるまでの間、発症に必要な生菌量を維持する必要がある。したがって菌種別の一定温度条件下における生残性を把握することは、感染型の食中毒菌による食中毒の防止に関する基礎的な資料になると考えられる。

そこで、今回は細菌性食中毒のなかでも過去10年間の食中毒発生事件数が常に上位を占めている感染型の食中毒菌であるサルモネラ〔*Salmonella* Enteritidis（以下、SE）、*Salmonella* Typhimurium（以下、ST）、*Salmonella* Oranienburg（以下、SO）〕、病原性大腸菌〔腸管出血性大腸菌 O157（以下、O157）〕および腸炎ビブリオ（以下、VP）の3菌種5血清型を用いて一定温度条件下における生菌数の変化を検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

実験に供試した菌株は、山梨県内で発生した食中毒事例から分離されたSE、ST、SO、O157（O157:HNM）、VP（O3：K6）の3菌種5血清型を使用した。供試菌株の調製は、SE、ST、SOは、Antibiotic Medium 3を、O157は、Tryptic Soy Brothを、VPは、アルカリ性ペプトン水をそれぞれ用い、35℃、18時間増菌培養を3回行い、継代後、滅菌生理食塩水（以下、滅菌生食）を用いて10倍段階希釈し、実験に使用した。

2. 種子を用いた実験

感染型の食中毒菌が食品原材料に付着してからヒトに摂取されるまでの間、菌数がどのように変化するかを検討するため、長時間腐敗せず、サルモネラ、O157等による汚染が報告されている野菜種子のアルファルファ種子を検体として使用した。冷蔵庫で保存される場合と室温で放置される場合を想定し、それぞれ4℃および25℃を一定温度条件とした。

市販されているアルファルファ種子10gを滅菌シャーレに量り取り、濃度既知（ $10^3 \sim 10^6$ 個/ml）の各菌液を1ml加え滅菌シャーレ中で混合後、4℃および25℃中に静置した。検体として用いたアルファルファ種子は、同一ロットの一部の種子について、増菌培養を行い予め今回検討する食中毒菌に汚染されていないことを確認した。

菌数の測定は、種子10gに滅菌生食90mlを加え2分間ストマッキング処理を行い、ストマッキング処理液について、3本法を用いたMPN法（以下、MPN法）と処理液を適宜希釈して直接培地に0.1ml塗抹する方法（以下、直接法）で行った。使用した培地は、MPN

法では各菌とも供試菌株の調製に用いた増菌培養液と同じ培地を、直接法では、SE, ST, SO は DHL 寒天培地, VP は TCBS 寒天培地, O157 は SMac 寒天培地を使用した。

定性試験は、ストマッキング処理液 25 ml を 225 ml の液体培地で増菌培養し、分離培地に塗抹して生菌の確認を行った。定性試験で使用した培地は、増菌培養に SE, ST, SO はセレナイトシスチン, VP はアルカリ性ペプトン水, O157 はノボビオシン加 mEC 培地を使用し、分離培地は、直接法と同じ培地を使用した。

菌数測定は、1~4 週間は毎週 1 回、その後は毎月 1 回 6 ヶ月間行った。

市販されているアルファルファ種子の袋には、空気孔が開いていたため、今回の実験はアルファルファ種子を滅菌シャーレ中に密栓せずに保存した。そのため、菌液を加えた時点から菌数測定を行うまでの間にシャーレ内のアルファルファ種子が乾燥することが予想された。そこで、菌数測定と同時にアルファルファ種子の水分活性の測定を行った。水分活性の測定は、菌液の代わりに滅菌生食 1 ml をアルファルファ種子 10 g に加え 4℃および 25℃中に保存し、菌数測定時にアルファルファ種子の水分活性を 2 回測定し平均値を水分活性値とした。

3. 水中での消長

飲料水中での食中毒菌の消長を検討するため以下の実験を行った。

水中に含まれる無機イオン、有機物の影響を排除するため超純水を検体として用いた。

3 代継代後の一夜増菌液を滅菌生食で 100 倍に希釈後、1 ml を滅菌超純水 100 ml に添加し、10 ml ずつ中試験管に分注し、ゴム栓で密栓し 4℃および 25℃中に保存した。

菌数測定は、アルファルファ種子を用いた実験と同様とした。

菌数の測定は 3 本法を用いた MPN 法と直接法で行い、培地はアルファルファ種子を用いた実験と同じ培地で行った。

VP は食塩濃度 0.5~8% で良好に発育するが、0% では死滅するため水中での菌数変化については検討しなかった。

すべてのグラフは、横軸を期間 (週単位)、縦軸を生菌数 (常用対数表示) とした。MPN 法で生菌が確認されなかった場合、菌数は <3 となるが $\log 3$ として表示した。

結 果

1. 種子を用いた実験

1-1 水分活性値

アルファルファ種子の水分活性値は実験開始時点で 0.89 であった。4℃で保存した場合、1 週目で 0.82 まで減少し、それ以降 24 週目まで大きな変動はなかった。25℃で静置した場合、1 週目で 0.47 まで減り、以降徐々に減少し 24 週目で 0.25 となった (図 1)。

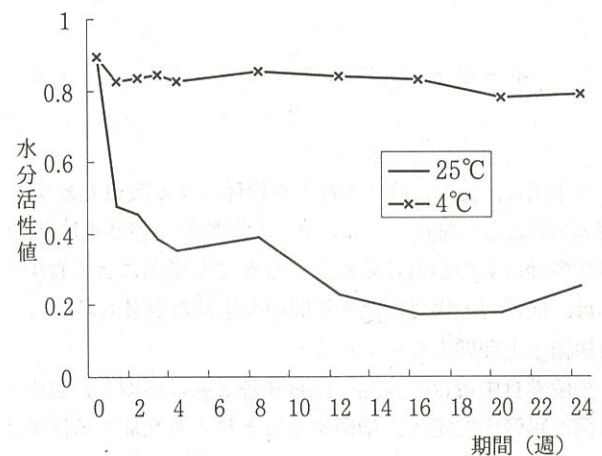


図 1 実験期間中の水分活性値の変動

1-2 各菌種の菌数変化

菌数測定の結果、25℃で静置した場合、SE, ST, SO は実験開始直後に比べ 1 週目で菌数が 10^2 オーダー減少した (図 2)。1 週目以降は血清型によらず菌数の変動が少なく生残した。直接法で菌数測定可能な期間は、SE が 8 週目、ST が 4 週目、SO が 2 週目までであった。MPN 法では 24 週目まで菌数測定可能であり、 $10^1 \sim 10^2$ 個/g の菌数が生残した (図 3)。O157 は SE, ST, SO と異なり直接法では 1 週目で菌数測定不可能となり、2 週目で 10^2 個/g 検出された後、再び菌数測定不可能となった (図 2)。MPN 法では、2 週目に 10^3 個/g であった後、徐々に減少したが 24 週目に増加し 10^3 個/g となった (図 3)。VP は実験開始直後から他の菌種に比べ菌数が 10^2 オーダー少なく、1 週目で菌数測定不可能となった (図 2)。

4℃で静置した場合、SE, ST, SO は 25℃と異なり実験開始直後に比べ 1 週目で菌数が 10^1 オーダー減少した (図 4)。SE は 8 週目、ST, SO は 4 週目まで 10^3 個/g 生残した。直接法で菌数測定可能な期間は、SE が 16 週目、ST が 20 週目、SO が 8 週目までであった。MPN 法では、SE, ST, SO すべて 24 週目まで $>10^3$ 個/g であった (図 5)。O157 は SE, ST, SO と同様に 25℃と異なり実験開始直後に比べ 1 週目で菌数が 10^1 オー

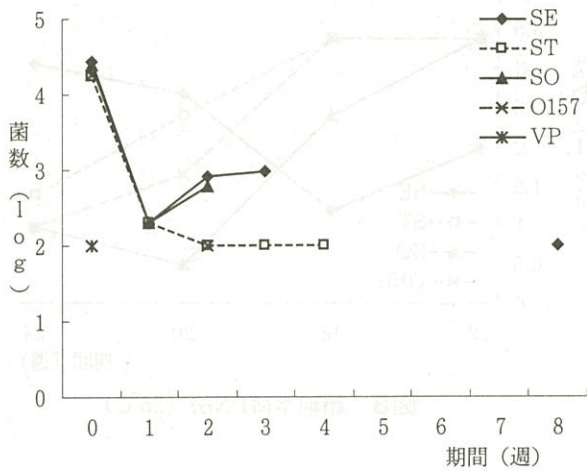


図2 アルファルファ種子直接法 (25°C)

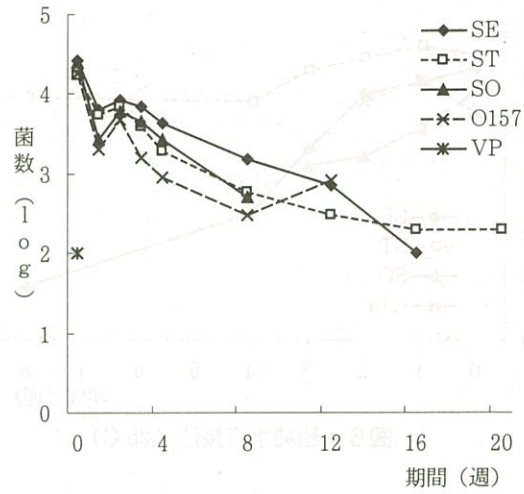


図4 アルファルファ種子直接法 (4°C)

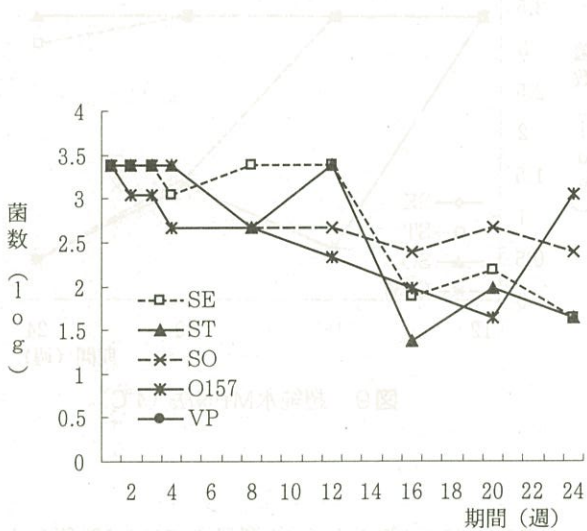


図3 アルファルファ種子MPN法 (25°C)

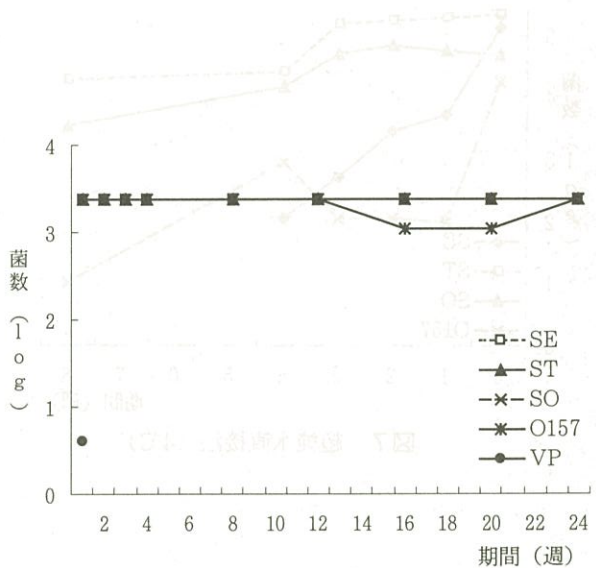


図5 アルファルファ種子MPN法 (4°C)

ダー減少し、3週目まで 10^3 個/g生残した(図4)。直接法で12週目まで菌数測定可能であった。MPN法では16、20週目に 10^3 個/gとなったが24週目に $>10^3$ 個/gとなった(図5)。VPはMPN法で1週目のみ菌数測定されたが、2週目以降は直接法、MPN法ともに測定されなかった(図4、5)。

1-3 定性試験

表1に示したとおり、SE、ST、SOは、25°C、4°Cとも24週目まですべて陽性であった。O157は、25°Cで保存した場合、12、16、20週目が陰性となったが24週目で陽性となった。VPは、25°Cで保存した場合、1週目で陰性となった。4°Cで保存した場合、1週目のみ陽性であり、2週目以降は陰性となった。

表1 アルファルファ種子定性試験の結果

試験菌株 期間(週)	SE		ST		SO		O157		VP	
	25	4	25	4	25	4	25	4	25	4
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
16	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
20	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

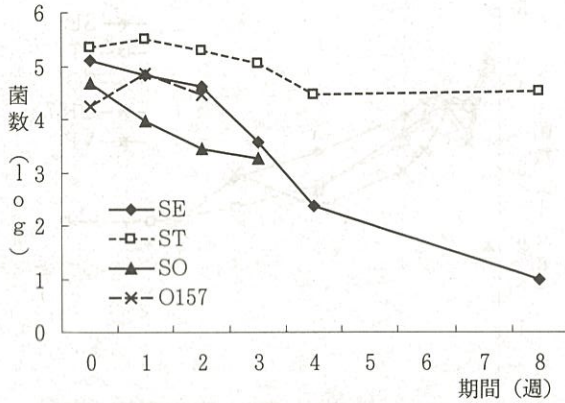


図6 超純水直接法 (25°C)

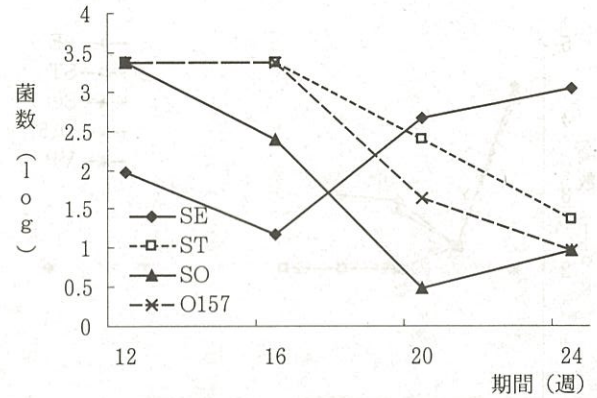


図8 超純水MPN法 (25°C)

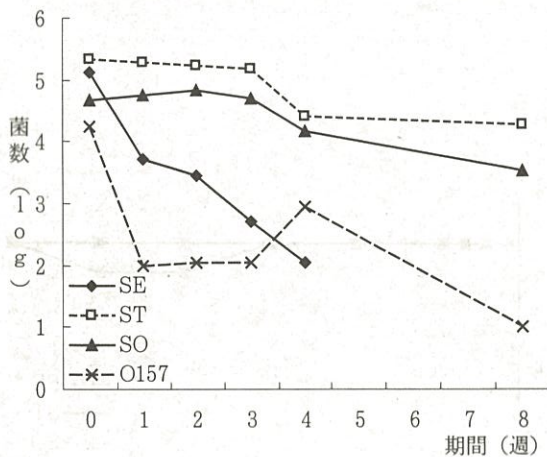


図7 超純水直接法 (4°C)

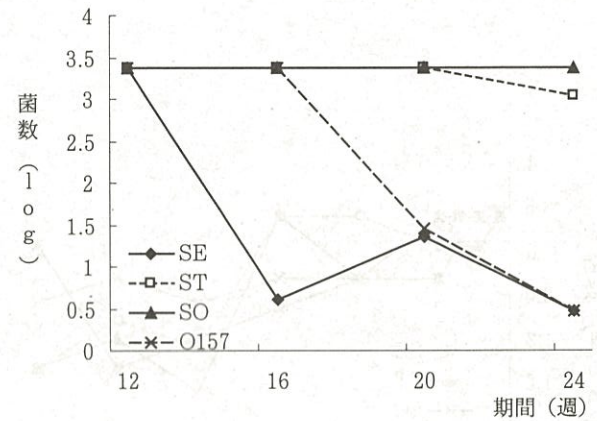


図9 超純水MPN法 (4°C)

2. 水中での消長

超純水中の菌数測定は、8週目に菌数測定不可能の検体が増えたため、8週目まで直接法で行い、12週目からMPN法で行った。

直接法で菌数測定した結果、SEは25、4°Cとも時間の経過とともに菌数が減少し、4週目で 10^3 オーダー減少した。STは25°C、4°Cとも菌数の変動は少なく8週目で 10^1 オーダー減少した。SOは4°CではSTと同様に変動が少なく、8週目で 10^1 オーダー減少したが、25°Cでは4週目で菌数測定不可能となった。O157は4°Cでは4週目で 10^2 オーダー減少し、25°Cでは3週目から菌数測定不可能となった(図6, 7)。

12週目以降、MPN法で菌数測定した結果、SEは4°Cでは減少したが、25°Cでは16週目以降増加した。STは25°Cでは徐々に減少し24週目で 10^1 個/mlになったが、4°Cでは 10^3 個/mlと大きな変化はみられなかった。SOはSTと同様に25°Cでは減少傾向を示したが、4°Cでは24週目で 10^3 個/mlと大きな変化はみられなかつ

た。O157は25、4°Cともに16週目までは $>10^3$ 個/mlと変化はみられなかったが、それ以降は $10^2 \sim 10^3$ オーダーと大きく減少した(図8, 9)。

考 察

食品が食中毒菌に汚染される場合、食品原材料が最初から汚染されている1次汚染と、調理加工直後からヒトに喫食されるまでの間に汚染される2次汚染に大別される²⁾。1次、2次汚染とも、食品に付着した感染型の食中毒菌がヒトに食中毒症状を発症させるためには食品がヒトに喫食されるまで、感染に必要な菌量を保持していなければならない。そのため、食品中の食中毒菌の菌数変化を把握することは感染型食中毒の防止を考える際の一助となる。

今回、主要な食中毒原因菌である3菌種5血清型の感染型食中毒菌を用い、一定温度条件下の菌数変化を検討した。

アルファルファ種子を用いた菌数測定の結果、4°C静

置での生残菌数は25℃静置に比べ長期間変化がみられなかった。原因として4℃で静置した方が、水分活性の値が高く、減少も緩やかであったことが考えられた。VPは早期に菌数測定、定性試験ともに陰性となったため、他の菌種に比べ今回検討した条件に対して生残性が低い菌種であることが裏付けられた。

今回、アルファルファ種子にO157を付着させただけの条件では、実験開始時点に比べ菌数の増加した例はみられなかったが、工藤らは、カイワレ大根種子にO157を実験的に付着させ、喫食可能な段階まで生育させた場合、可食部位の菌数が 10^4 倍に増加することを報告している³⁾。また、実験的にアルファルファ種子をサルモネラで汚染後、生育させた場合も同様の結果が得られたことが報告されている⁴⁾。野菜種子は、収穫されてから発芽させるまで低温で保管されるため、今回の結果から一度食中毒菌に汚染された場合、長期間食中毒菌が生残し、食中毒の原因食品になる可能性がある。実際に、国内では1997年に関東一円を中心としてカイワレ大根を原因食品としたO157散発的集団感染事例が発生し⁵⁾、海外ではアルファルファを原因食品とした様々な血清型のサルモネラによる食中毒事例が複数発生している⁶⁾。このような状況から、発芽前の種子に付着した細菌を殺菌する様々な方法が検討されているが⁷⁾、種子の発芽率を高く保ちながら完全に殺菌する方法は見つかっていない。そのため、現時点ではカイワレ大根による食中毒を防止するために、同一ロットの一部の種子を用いて微生物的な汚染を示す指標菌である大腸菌の検査を行うこととされている⁸⁾。

超純水中での菌数変化は、温度条件に関わらず長期間生残する菌種もあったが、4℃で静置した方が生残性が高かった。超純水を用いた水中での食中毒菌の菌数変化は、アルファルファ種子を用いた実験と異なり菌種によって生残性が異なっていた。今回、水中での無機イオン、有機物等の影響を除外するため超純水を用いたが、各菌種により菌体維持に必要な栄養素の組成が異なることから、各種無機塩類や糖、アミノ酸等の存在により生残性に違いがでるものと思われる。

以上の結果から、今回の条件では、アルファルファ種

子に付着させたサルモネラの生残性は血清型による違いは少なく、O157も含め4℃の条件下では長時間高い菌数を保って生残することが示唆された。VPは生残性が低く、環境変化の影響を受けやすい菌種であることが考えられた。また、同一菌種でも菌株によって環境の変化に対する生残性に違いがあるものと考えられるため、実験株数を増やして検討する予定である。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：平成14年食中毒発生状況，食品衛生研究，53(9)(2003)
- 2) 河端俊治，春田三佐夫：HACCP これからの食品工場の自主衛生管理，中央法規出版(1992)
- 3) 工藤由起子ら：腸管出血性大腸O157:H7によって実験的に汚染した野菜種子に関する研究，日食微誌，17，201～205(2000)
- 4) Howard, M. B., & S. W. Hutcheson. : Growth Dynamics of *Salmonella enterica* Strains on Alfalfa Sprouts and in Waste Seed Irrigation Water, Appl. Environ. Microbiol., 69, 548～553(2003)
- 5) 伊豫田淳ら：PFGEを用いた腸管出血性大腸菌EHEC O157:H7の分子疫学，日食微誌，15，141～146(1998)
- 6) Mohle-Boetani, J. et al. : *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* Infections Associated with Sprouts in California, 1996-1998, Ann. Intern. Med., 135, 239～247(2001)
- 7) Jaquette, C. B., L. R. Beuchat, & B.E.Mahon, : Efficacy of Chlorine and Heat Treatment in Killing *Salmonella stanley* Inoculated onto Alfalfa Seeds and Growth and Survival of the Pathogen during Sprouting and Storage, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2212～2215(1996)
- 8) かいわれ大根生産衛生管理マニュアル策定委員会：かいわれ大根生産衛生管理マニュアル(平成8年10月)