

- 2) 2%NaCl 加 TSB (37°C 6 時間) 1 ml 食塩ポリミキシンプイオン (37°C 18 時間)
- 3) アルカリペプトン (37°C 6 時間)
- 4) 食塩ポリミキシンプイオン (37°C 18 時間)

ストマッカー袋に入れた 2.5 g の検体に 37°C に暖めた各 1 次増菌培地 2.25 ml を加え、手でもんだ後に培養した。2%NaCl 加 TSB については培養後、1 ml を二次増菌培地 9 ml に加えさらに 37°C 18 時間培養した。

増菌培養後、各培養液 10 μ l を TCBS およびクロモアガー・ピプリオに各 2 枚ずつ画線培養した後、疑わしいコロニーを K6 抗血清にあて凝集反応で確認した。なお、各検体について 10 g を用いて混釈培養法にて大腸菌群数、一般生菌数を測定した。

(実験 2)

検体として市販のアサリむきみその他魚介類食品を用いた。アジは表面とえらを含めたものを検体とした。増菌培地として、2%NaCl 加 TSB(Difco)、アルカリペプトン(日水)、食塩ポリミキシンプイオン(日水)を、平板培地として、TCBS(Oxoid)、クロモアガー・ピプリオを用いた。

増菌方法として以下の 2 方法を用いた。

一次増菌	二次増菌
2%NaCl 加 TSB (37°C 6 時間)	食塩ポリミキシンプイオン (37°C 18 時間)
食塩ポリミキシンプイオン (37°C 18 時間)	

検体に 37°C に暖めた各 1 次増菌培地 2.25 ml を加え手でもんだ後に 37°C で培養した。2%NaCl 加 TSB については培養後、1 ml を二次増菌培地 9 ml に加え 37°C 18 時間培養した。

各培養液 10 μ l を TCBS およびクロモアガー・ピプリオに各 2 枚ずつ画線培養した。また、2%NaCl 加 PBS にて $0 \sim 10^6$ 希釈し塗抹した。培養後、疑わしいコロニーを TSI, 0 or 8%NaCl Nutrient broth にて培養し確認した。検体 10 g を用いて混釈培養法にて大腸菌群数、一般生菌数を測定した。

C. 結果と考察

実験 1 (表 1-3)

分離平板 TCBS (Oxoid)、TCBS (日水)、クロモアガー・ピプリオの中では、クロモアガー・ピプリオ(表中 CV)が、いずれの増菌方法との組み合わせにおいても最も菌分離率が高いことがわかった。クロモアガー・ピプリオを用いての菌分離率を指標として増菌培養方法を比較すると、2%NaCl 加 TSB (37°C 6 時間)後に食塩

ポリミキシンプイオン (37℃18 時間)、または食塩ポリミキシンプイオン (37℃18 時間) が他よりも優れていることが認められた。

実験 2 (表 5-7)

実験 1 で比較的優れていることが認められた食塩ポリミキシンプイオンを用いる増菌方法により、分離平板の性能を比較した。その結果、顕著な差異は認められないものの、クロモアガー・ビブリオのみによって増菌培養物から腸炎ビブリオが検出された検体が 4 検体あった。逆の場合は見られなかったことから、クロモアガー・ビブリオの方が分離平板培地として優れているものと考えられた。

実験 1 と実験 2 を通じ、クロモアガー・ビブリオ上の腸炎ビブリオの紫色コロニーは、時間とともに変化し難いこと、鑑別を困難にさせる類似色のコロニーが少ないことなどから、従来よりよく使われてきた TCBS と比較して実用的であると考えられた。

D. 結論

食品からの腸炎ビブリオ検出に必要な選択分離培地として酵素基質を利用した培地および増菌方法について、腸炎ビブリオにより自然汚染されている魚介類を検体として比較検討した結果、増菌培養方法としては 2%NaCl 加 TSB (37℃6 時間) 後に食塩ポリミキシンプイオン (37℃18 時間)、または食塩ポリミキシンプイオン (37℃18 時間) が、選択分離培地としては TCBS よりも酵素基質を利用した培地コロモアガー・ビブリオの方が、分離の容易さにおいて比較的優れていることが認められた。

表1

	アサリ					アジ						
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
1)	CV*	0	3	17	0	3	15	0	2	3	15	0
	TCBS (H) *	2	0	8	0	0	1	0	5	4	1	0
	TCBS (Ox) *	8	6	6	0	0	2	0	7	11	2	0
2)	CV	0	1	16	3	0	19	1	0	0	19	1
	TCBS (H)	1	1	8	0	0	4	0	2	4	4	0
	TCBS (Ox)	9	8	3	0	0	5	0	9	6	5	0
3)	CV	0	4	15	1	1	7	1	1	11	7	1
	TCBS (H)	1	2	7	0	0	2	0	4	4	2	0
	TCBS (Ox)	6	10	4	0	0	2	0	4	14	2	0
4)	CV	0	1	10	9	0	14	3	0	3	14	3
	TCBS (H)	0	0	9	1	1	5	0	2	3	5	0
	TCBS (Ox)	3	3	12	2	2	6	0	6	5	6	0

* : CV、クロモアガー；(H)、日水；Ox、オキシソイド

- : ビブリオオのコロニーなし

+ : 1~10コロニー

++ : ビブリオオのコロニー多い

+++ : ほとんどがビブリオオのコロニー

表2. (一般生菌数 $10^5 \sim 10^7 / g$)

		アサリ					アジ						
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
1) TSB→A	CV	0%	5	85	0	10	15	75	0				
	TCBS (H)	20	0	80	0	50	40	10	0				
	TCBS (Ox)	40	30	30	0	35	55	10	0				
2) TSB→P	CV	0	5	80	15	0	0	95	5				
	TCBS (H)	10	10	80	0	20	40	40	0				
	TCBS (Ox)	45	40	15	0	45	30	30	0				
3) A	CV	0	20	75	5	5	55	35	5				
	TCBS (H)	10	20	70	0	40	40	20	0				
	TCBS (Ox)	30	50	20	0	20	70	10	0				
4) P	CV	0	5	50	45	0	15	70	15				
	TCBS (H)	0	0	90	10	20	30	50	0				
	TCBS (Ox)	15	15	60	10	30	25	30	0				

-: ピブリオのコロニーなし
 +: 1~10コロニー
 ++: ピブリオのコロニー多い
 +++: はほとんどがピブリオのコロニー

表3. 陽性検体数/供試検体数

一般生菌数 $10^5 \sim 10^7 / g$

	アサリ				アジ			
	TCBS(H)	TCBS(Ox)	C V		TCBS(H)	TCBS(Ox)	C V	
1) TSB→A	8/10 (80%)	12/20 (60%)	20/20 (100%)		5/10 (50%)	13/20 (65%)	18/20 (90%)	
2) TSB→P	9/10 (90%)	11/20 (55%)	20/20 (100%)		8/10 (80%)	11/20 (55%)	20/20 (100%)	
3) A	9/10 (90%)	14/20 (70%)	20/20 (100%)		6/10 (60%)	16/20 (80%)	19/20 (95%)	
4) P	10/10 (100%)	16/20 (80%)	20/20 (100%)		8/10 (80%)	14/20 (70%)	20/20 (100%)	

表 4. 陽性検体数 / 供試検体数 (10² ~ 10⁴ / g)

	アサヒ		アジ	
	TCBS(Ox)	C V	TCBS(Ox)	C V
1) TSB→A	2/3 (67%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)
2) TSB→P	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)	3/3 (100%)
3) A	1/3 (33%)	3/3 (100%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)
4) P	2/3 (67%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)

表 5. 検体

		一般生菌 (log.CFU/g)	大腸菌群 (log.CFU/g)
1	アサリ	5.09	4.09
2	アサリ	6.90	4.14
3	アサリ	6.81	3.98
4	アサリ	4.18	2.21
5	ホタテ	3.06	2.44
6	ホタテ	3.83	3.02
7	イカ	3.68	1.90
8	イカ	4.48	3.62
9	タコ	6.08	5.70
10	サザエ	3.99	0.9
11	タラ	3.86	2.93
12	アジ	3.24	ND
13	アジ	5.48	3.99
14	アジ	6.03	4.12
15	カレイ	5.83	4.51
16	サンマ	3.13	1.78
17	イワシ	4.46	2.51
18	イワシ	4.62	3.16
19	サバ	4.73	1.53
20	イサキ	5.62	3.65

表6. 塗抹平板法

		TSB(6h)→P(18h)		P(18h)	
		TCBS	CV	TCBS	CV
1	アサリ	7.79*	7.93	8.40	8.38
2	アサリ	7.49	7.49	7.30	7.04
3	アサリ	7.67	7.85	8.26	8.04
4	アサリ	7.70	7.60	8.43	8.56
5	ホタテ	6.00	6.48	ND	5.60
6	ホタテ	6.30	6.46	ND	ND
7	イカ	ND	ND	6.30	ND
8	イカ	6.00	6.00	6.70	ND
9	タコ	6.78	6.65	8.23	8.28
10	サザエ	ND	6.48	ND	5.00
11	タラ	7.89	7.83	7.70	7.70
12	アジ	5.30	ND	ND	ND
13	アジ	6.56	6.36	7.46	7.88
14	アジ	6.60	6.30	6.00	6.48
15	カレイ	6.30	7.28	ND	ND
16	サンマ	7.85	7.81	8.40	7.60
17	イワシ	7.18	7.43	7.34	7.79
18	イワシ	7.28	7.58	8.30	8.57
19	サバ	8.34	8.15	8.72	8.68
20	イサキ	6.30	6.85	7.00	7.60

* log, CFU/ml

表 7. 画線培養

	TSB(6h)→P(18h)		P(18h)	
	TCBS	CV	TCBS	CV
1 アサリ	++	+++	++	+++
2 アサリ	++	+++	++	+++
3 アサリ	++	+++	+++	+++
4 アサリ	+	++	++	+++
5 ホタテ	+	+	—	+
6 ホタテ	+	+	—	—
7 イカ	—	—	—	—
8 イカ	—	—	—	—
9 タコ	+	++	+	++
10 サザエ	—	+	—	—
11 タラ	+	++	+	+
12 アジ	—	—	—	—
13 アジ	+	++	—	+
14 アジ	—	—	—	—
15 カレイ	++	+	—	—
16 サンマ	+	++	++	++
17 イワシ	—	+	+	++
18 イワシ	+	+	+	++
19 サバ	+	+++	++	+++
20 イサキ	+	+	—	+

— : ビブリオのコロニーなし

+: 1~10コロニー

++ : ビブリオのコロニー多い

+++ : ほとんどがビブリオのコロニー

平成11年度分担研究報告書

卵の日付表示設定に関する基礎的研究

分担研究者 小沼博隆 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

協力研究者 宮原美知子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

研究要旨

最近のサルモネラによる食中毒の発生状況は、平成8年では事件数350件、患者数16,334名、死者数3名、平成9年では、事件数521件、患者数10,926名、死者数2名、平成10年では、事件数757件、患者数11,471名、死者数1名、平成11年では、事件数825件、患者数11,888名、死者数3名を出している。これら食中毒原因食品の多くは、鶏卵およびその加工品の関与が指摘されている。

厚生省は食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正（平成10年11月25日 厚生省省令第90号及び厚生省告示第259号）を行い、平成11年11月1日から施行された。したがって、鶏卵の生産・流通業界は、鶏卵を生で食する場合の賞味期限（例；産卵後あるいはパック後、2週間）を自主的に決め、表示しなければならなくなった。

そこで、今年度は殻付き卵が農場で産卵された後、GPセンター、問屋等の流通経路を経て店頭で陳列され、消費者の手に渡り喫食されるまでに殻付き卵が取り扱われる条件（保管温度や期間）や季節によって卵内に存在するサルモネラ（SE：*Salmonella Enteritidis*）がどの時点で急激に増殖するのかを調べた。実験方法は、特定の農場で生産された産卵後2日目の殻付き卵を20℃、30℃、27～33℃、10℃で3週間保存した後に30℃に保存したなど、各温度に保存された殻付き卵を経日的に取り出し、卵殻に電動ドリルを用いて小さな穴を開け、注射針を挿入して少量（10個/200μl程度）のSEを卵黄膜付近へ接種した後、その卵を20～30℃で48時間培養後、SE陽性の有無及びSE菌数計測を行い、以下の結果を得た。

殻付き卵が農場で産卵された後、GPセンター、問屋等の流通経路を経て店頭で陳列され、消費者の手に渡り喫食されるまでに殻付き卵が取り扱われる条件（保管温度や期間）や季節によって卵内に存在するサルモネラ（SE：*Salmonella Enteritidis*）がどの時点で急激に増殖するのかを調べ、以下の結論が得られた。

1. 夏、秋及び冬場の鶏卵（産卵後2日目）にSEを接種した場合は、季節を問わず約1/3の鶏卵中で増殖する傾向がみられ、保存日数とともにSEの増殖する割合は増加した。

2. 夏、秋及び冬場の鶏卵（産卵後2日目）を各保存温度（湿度60～65%）に保存後、殻付き卵を経日的に取り出しSEを接種した場合は、20℃に比べ30℃保存した鶏卵にSEが著しく増殖する傾向が認められた。

3. 夏、秋及び冬場の鶏卵（産卵後2日目）にSEを接種してから各保存温度（湿度60～65%）に保存した場合は、1週間保存した時期には卵によってはSEの増殖するものがみられたが、2～5週間保存では増殖しにくくなる現象がみられた。しかし、冬場の鶏卵では5週間保存であってもSEの増殖はみられなかった。

4. 保存鶏卵のSEの生残について増菌培養法を用いて調べたところ、1週間保存

では、10個中1個、2週間保存では、10個中0個、3及び4週間保存では、10個中2個は接種したSEは検出されなかった。また、5週間保存では、10個中6個は接種したSEは検出されなかった。保存中にSEが死滅するという現象については不明である。

以上の結果から、鶏卵中にSEを接種した場合には、新鮮な鶏卵では産卵シーズンにあまり関係なくSEは増殖する傾向が認められた。また、保存温度は20℃より30℃で、より強くSEは増殖する傾向が認められたことから、特に夏場の鶏卵は、産卵後室温に放置する時間を極力短くし冷蔵保存することが、SE食中毒防止のキーポイントになると考える。

1. 研究の目的

最近のサルモネラによる食中毒の発生状況は、平成8年では事件数350件、患者数16,334名、死者数3名、平成9年では、事件数521件、患者数10,926名、死者数2名、平成10年では、事件数757件、患者数11,471名、死者数1名、平成11年では、事件数825件、患者数11,888名、死者数3名を出している。これら食中毒原因食品の多くは、鶏卵およびその加工品の関与が指摘されている。厚生省は平成9年6月、食品衛生調査会食中毒サーベイランス分科会を開催した。当該分科会は、最近のサルモネラ食中毒について分析・評価を行い、サルモネラによる食中毒を予防するための衛生管理について、その原因究明、汚染実態調査等の結果を踏まえ、必要な対策を食品衛生調査会でさらに検討する必要があると勧告した。この勧告に基づき、食品衛生調査会に「卵によるサルモネラ食中毒の防止に関する分科会」が発足、平成9年7月25日から10月30日までの間に3回の検討会を開催し、本分科会として卵及び卵加工品によるサルモネラ食中毒を防止するための報告書を取りまとめた（平成10年7月21日 食調第49号）。これらの報告書に基づき厚生省は食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正（平成10年11月25日 厚生省省令第90号及び厚生省告示第259号）を行い、平成11年11月1日から施行された。したがって、鶏卵の生産・流通業界は、鶏卵を生で食する場合の賞味期限（例；産卵後あるいはパック後、2週間）を自主的に決め、表示しなければならなくなった。

そこで、今年度は殻付き卵が農場で産卵された後、GPセンター、問屋等の流通経路を経て店頭で陳列され、消費者に渡り喫食されるまでに殻付き卵が取り扱われる条件（保管温度や期間）や季節によって卵内に存在するサルモネラ（SE：*Salmonella Enteritidis*）がどの時点で急激に増殖するのかを調べた。

2. 材料および方法

2-1 検査材料

実験に供試した鶏卵は、すべてA鶏卵農場にて生産された。夏場の鶏卵は6月～9月、秋場の鶏卵は10月～12月および冬場の鶏卵は1月～2月に生産されたものである。産卵後2日以内に実験室に運び入れ、ヒビ、汚れなどを確認した後、当日試験あるいは保存試験用にわけるなどして実験に供した。運搬の方法は、農場で産卵された後、GPセンターを経て箱詰めされ、トラック輸送された実験室まで届けられた。したがって、

温度管理はされていない、いわゆる一般的な輸送方法である。

2-2 実験方法

殻付き卵へのSE菌接種は、殻付き卵の表面のより平らに見える頂上に無菌的に電動ドリルにより直径約1.8mmの穴をあけ、0.1ml当たり5-10個の *Salmonella Enteritidis* PT4 E930448(国立感染研より分与)(以後SEと省略)をラット用胃ゾンデにより接種した。接種場所は卵白の中で、卵黄により近い場所と推測される場所、すなわち、殻にあけた穴より平均して約1.5cmの深さの場所に接種した。接種後に穴を粘着テープで塞ぎ、それぞれの保存条件に保管して実験に供した。

SE菌の接種時期は、殻付き卵の保存温度30℃、27-33℃(12時間おきに2つの温度帯を繰り返した)、10℃・3週間後に30℃に保存温度を変えろという4種類の保存温度を設定した。保存期間は、スタート時、4日、7日、11日、14日、保存条件によっては47日間保存まで行った。しかし、実際には保存35日目以降は鶏卵の品質が劣悪になり腐敗臭が激しいので実験は中止した。

培養条件は、各保存温度と同じ温度に設定したものと培養温度を20℃および30℃に設定した。

被検用卵液の保存方法は、SE検出に使用した卵液は直ちにストマッカー袋に移しヒートシールして、-20℃で冷凍保存した。

SEの検出方法は、培養後の殻付き卵1個ずつを無菌的に割卵し、ストマッカー袋に1個の全量を割り入れた後にストマッカーにかけて均一液とした後に0.3mlずつを2枚のMLCB(平板培地)に塗布し、35-37℃で24時間培養することによって、黒いコロニーをサルモネラの検出陽性として、コロニー数を計測した。また、直接塗布して菌が検出されなかった卵液は冷凍保存液を室温にて解凍した後に、BPW(buffered peptone water)225mlを各ストマッカー袋に加えて、35-37℃で24時間培養後に、その0.1あるいは0.5mlの培養液を10mlのRV(ravaport vaciliadis)あるいはTT(tetra thionate)に添加して、さらに42℃、24時間選択増菌培養を行った。その増菌培養液をエーゼで各1枚のMLCB(平板培地)に塗布し、菌が生存していたか否かの定性試験も行った。

3. 結果および考察

3-1 夏場の鶏卵(産卵後2日目)

夏場(6月~9月)に入手し実験室に搬入した産卵後2日目の鶏卵720個の中からランダムに30個を選び、卵殻にドリルで穴を開け、マウス胃ゾンデを用いて注射器でSE菌液0.1ml(接種菌量:5~11.2個/0.1ml)を接種し、穴の部分にテープを貼った後、殻付き卵のまま20あるいは30℃で3日間培養した。培養後、1個ずつを無菌的に割卵し、ストマッカー袋に1個の全量を割り入れた後にストマッカーにかけて均一液とした後に0.3mlずつを2枚のMLCB(サルモネラ検出用分離平板培地)に塗布し、35-37℃で24時間培養することによって、黒いコロニーをサルモネラとして、コロニー数を計測した。また、菌数が多くて計測できない場合は卵黄液を適宜10倍段階希釈してSEの定量試験を行った。さらに、菌が検出されないものについては25gを225ml

BPWに投入してストマッカー処理して均一化し、25g中にSEが存在するか否かの定量試験もおこなった。その結果、実験室搬入直後の卵30個にSE菌液0.1mlを接種（接種菌量：9.6個/0.1ml）し、殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した場合は、30個中6個の卵中にSE菌が増殖した（表1）。その菌数は、 $1.7E+00 \sim 3.3E+07$ ($1.7 \sim 3.3 \times 10^7$ /g)の範囲であった（表2～5）。これらの結果から、夏場の卵は、産卵後2日目という新鮮卵であっても、卵中にSEが存在すれば10個中2個は増殖し、しかも $10^5 \sim 10^7$ /gにまでも著しく増殖する卵がある可能性を示唆する結果を得た。

3-2 夏場の鶏卵を20℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま20℃・3日間培養した場合

前述のような鶏卵（100個以上）を20℃保存（湿度60～65%）した後、3から4日間保存毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した後、14日保存までは4日保存の1個を除いて卵中にSE菌の増殖は認められなかったが、18日保存では5個中2個、21日保存では15個中7個の卵中にSE菌が増殖した（表1）。その菌数は、 $1.0E+05 \sim 1.0E+08$ ($1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$ /g)の範囲であったが、 10^8 /g以上の菌数を示す卵は10個中1個であった（表2）。この結果から、夏場の卵は、産卵後2日目という新鮮卵を20℃に保管しても、卵中にSEが存在すれば18日保存では10個中2個は急激に増殖する可能性が示唆された。しかし、前述の30℃保存の結果では、実験室搬入直後の卵（産卵後2日目）にSEが存在すれば10個中3個は増殖する可能性があったが、20℃保存すると4日保存で10個中1個に若干の増殖が認められた以外には14日保存まで増殖は認められなかった。このことから、殻付き卵にSEを接種して間もない時期には卵白内での抗菌物質（リゾチム、コンアルブミン、アビデイン、オボフラボプロテイン等）と接触時間が短いために、抗菌物質のSEに対する増殖抑制効果が発揮できないためか、あるいはSEを接種して長時間経過すると抗菌物質の影響により菌が弱ってくるためとも考えられる。しかし、この結果は、Humphreyらの実験結果を基に平成10年6月1日に鶏卵日付等検討委員会が作成した生食用殻付き卵の日付表示は、夏場の気温を考慮した上で室温に最長1週間、その後冷蔵庫へ保存し最長1週間、合計2週間としている「鶏卵の日付表示マニュアル」では、SE食中毒を効率よく防ぐには不適切であり、夏場には産卵後即冷蔵保存する必要性を示唆しているものと思われる。

3-3 夏場の鶏卵を30℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま20℃・3日間培養した場合

3-2の場合と同様に鶏卵（100個以上）を30℃保存（湿度60～65%）した後、3から4日間保存毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した場合は、4日保存では10個中6個の卵中にSE菌が増殖し、7日保存では10個中10個と全ての卵中にSE菌が増殖した（表1）。その菌数は、4日保存では、 $1.7E+00 \sim 4.3E+07$ ($1.7 \sim 4.3 \times 10^7$ /g)の範囲で、陽性卵6個中3個は 10^6 /g以上に達していた。7日保存では、 $9.3E+03 \sim 1.0E+08$ ($9.3 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8$ /g)の範囲で、陽性卵9個中7個は 10^6 /g以上に達していた（表3）。

3-4夏場の鶏卵を30℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま30℃・3日間培養した場合

3-2の場合と同様に鶏卵(100個以上)を30℃保存(湿度60~65%)した後、3から4日間保存毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態です30℃・3日間培養した場合は、4日保存では10個中4個の卵中にSE菌が増殖し、7日保存では10個中10個と全ての卵中にSE菌が増殖した(表1)。その菌数は、4日保存では、 $3.3E+00 \sim 1.3E+02$ ($3.3 \sim 1.3 \times 10^2/g$)の範囲で、7日保存では、 $9.3E+03 \sim 1.0E+08$ ($9.3 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8/g$)の範囲で、10個中全てが $10^7/g$ 以上に達していた(表4)。

これらの結果から、夏場の鶏卵を30℃保存後した場合は、SE菌液を接種後、殻付きの卵のまま20℃あるいは30℃の環境に保存した場合には、4日後には卵内のSEは著しく増殖するものがみられ、特に30℃の環境に保存した場合には、7日保存で全ての卵内のSE菌数は $10^7/g$ 以上に増殖することが明らかとなった。

3-5夏場の鶏卵を27℃・12時間、33℃・12時間保存後、SEを接種し、殻付きのまま20℃・3日間培養した場合

鶏卵の流通環境を考慮して保存条件を検討するために、わが国の夏場(盛夏)の温度・湿度(湿度60~65%)状況を考慮に入れてフラン器を27℃で12時間、33℃で12時間の培養を保存期間中交互に繰り返すモードにセットした。試験方法は、前述の方法と同様に3から4日間保存毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態です20℃・3日間培養した。4日保存では、10個中5個の卵中にSE菌が増殖し、5個中1個のSE菌数は $10^7/g$ 以上に達していた。7日保存では10個中2個にSE菌が増殖し、8個中1個のSE菌数は $10^8/g$ 以上に達していた。11日保存では10個中10個と全ての卵中にSE菌が増殖し、全てが $10^7/g$ 以上に達した(表5)。

3-6夏場の鶏卵を27℃・12時間、33℃・12時間保存後、SEを接種し、殻付きのまま30℃・3日間培養した場合

3-4の場合と同様に鶏卵をわが国の夏場(盛夏)の温度状況を考慮に入れてフラン器を27℃で12時間、33℃で12時間の培養を保存期間中交互に繰り返すモードにセットした。試験方法は、3から4日間毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態です30℃・3日間培養した。4日保存では、10個中7個の卵中にSE菌が増殖し、7個中2個のSE菌数は $10^6/g$ 以上に達していた。7日保存では10個中8個にSE菌が増殖し、8個中6個のSE菌数は $10^6/g$ 以上に達していた。11日保存では10個中10個と全ての卵中にSE菌が増殖し、10個中8個が $10^7/g$ 以上に達していた(表6)。これらの結果から、30℃(湿度60~65%)ならびに27-33℃(湿度60~65%)保存の鶏卵にSEを接種後、20℃培養した場合は、4日保存ではSE菌が著しく増殖する個数は少ない傾向にあるが、30℃培養した場合は、著しく増殖する卵個数が多くなる傾向がみられた。しかしながら、いずれの培養温度でも7日保存以降は著しく増殖する卵数の割合も増加することが明らかとなった。

3-7 夏場の鶏卵を10℃・3週間保存後に30℃保存, SEを接種し, 殻付きのまま
20℃・3日間培養した場合

鶏卵の保存性を長くするために冷蔵保管が一般的に用いられている。そこで, 冷蔵保管されていた鶏卵が夏場の気温あるいは暖房された部屋に暴露された場合のことを考慮して, 鶏卵を10℃・3週間保存後に保存温度を30℃に変更した。試験方法は, 保存3から4日間毎にSE菌液を接種し, 殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した。冷蔵保管から取り出した直後では, 10個中2個の卵中にSE菌が増殖し, 2個中1個のSE菌数は $10^6/g$ 以上に達していた。2日保存では, 10個中4個の卵中にSE菌が増殖し, 4個中2個のSE菌数は $10^5/g$ と $10^8/g$ 以上に達していた。9日保存では10個中9個にSE菌が増殖し, 9個中7個のSE菌数は $10^5/g$ 以上に達していた(表7)。

3-8 夏場の鶏卵を10℃・3週間保存後に30℃保存, SEを接種し, 殻付きのまま
30℃・3日間培養した場合

3-7と同様, 冷蔵保管されていた鶏卵が夏場の気温に暴露された場合のことを考慮して, 鶏卵を10℃・3週間保存後に保存温度を30℃に変更した。試験方法は, 保存3から4日間毎にSE菌液を接種し, 殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した。冷蔵保管から取り出した直後では, 10個中5個の卵中にSE菌が増殖し, 5個中2個のSE菌数は $10^6/g$ 以上に達していた。2日保存では, 10個中2個の卵中にSE菌が増殖し, 2個中1個のSE菌数は $10^8/g$ 以上に達していた。6日保存では10個中6個にSE菌が増殖し, 6個中1個のSE菌数は $10^7/g$ 以上に達していた(表8)。

これらの結果から, 長期間冷蔵保存された卵を30℃保存した場合は, 一般に流通している鶏卵の成績(表1~7)と比べて際だった差は認められず, 30℃に2日間暴露してもSE陽性卵数は少ないが, そのSE菌数は $10^8/g$ 以上に達するなど, 冷蔵状態から30℃保存に移行させた中に少数ではあるが著しく増加する卵が認められたことは注目に値する。

3-9 産卵後2日目の夏場の鶏卵にSEを接種し, 殻付きのまま20℃保存した場合

産卵鶏卵がSE汚染を受け, SE汚染卵を生産している状況に近づけるために, 実験室に到着した産卵後2日目の鶏卵にSEを接種し, 殻付きのまま20℃保存し, 各週毎に卵10個ずつ取り出しSEの有無と菌数を調べた。その結果, 7日保存では10個中1個にSE菌が増殖したが $10/g$ 以下であった。14日保存では, 10個3個の卵中にSE菌が増殖し, 3個中1個のSE菌数は $10^8/g$ 以上に達していた。21日保存では10個中2個にSE菌が増殖したが $10/g$ 以下であった。27日保存では10個中2個にSE菌が増殖したが $10/g$ 以下であった(表9)。この結果から, 産卵後2日目の鶏卵にSEを接種し20℃保存した場合には, 表2の実験結果と3週間保存までは同様の傾向を示したが, 4~5週間保存では10個中8個のSE死滅していた。このことは, 3-2で述べたように, SEは産卵後間もない時期の卵中では比較的容易に増殖できるが, 時間の経過とともに抗菌物質やpHの影響を受けて増殖抑制あるいは死滅の道をたどるのではないかと思われる。

3-10 秋葉の鶏卵（産卵後2日目）

秋場（11月～12月）に入手し実験室に搬入した産卵後2日目の鶏卵720個の中からランダムに60個を選び、卵殻にドリルで穴を開け、マウス胃ゾンデを用いて注射器でSE菌液を接種し、穴の部分にテープを貼った後、20℃で3日間培養した。培養後、1個ずつ割卵し、ストマッカー袋に全量を割り入れた後にストマッカーにかけて均一液とした後に0.3mlずつを2枚のMLCB平板培地に塗布し、35～37℃で24時間培養した。培養後、黒いコロニーをサルモネラ検出として、コロニー数を計測した。また、直接塗抹法で菌が検出されなかった卵液（約25g）はBPW (buffered peptone water) 225 mlを各ストマッカー袋に加えて、35～37℃で20～24時間培養後に、その0.1あるいは0.5 mlの培養液を10mlのRV(rappaport vaciliadis)あるいはTT(tetra thionate)に添加して、さらに42℃、20～24時間選択増菌培養を行った。その後、2次増菌液をエーゼで各1枚のMLCB平板培地に塗布し、35～37℃で24時間培養した。培養後、黒いコロニーが検出された場合はサルモネラ陽性（生存）とし、検出されない場合を陰性（死滅）と判断した。

その結果、実験室搬入直後の卵60個にSE菌液0.1mlを接種（接種菌量：15.8個/0.1ml）し、殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した場合は、60個中20個の卵中にSE菌が増殖した（表10）。その菌数は、 $1.7E+00 \sim 1.2E+01$ ($1.7 \sim 1.2 \times 10^1 / g$) の範囲であった（表11）。これらの結果から、秋場の卵は、産卵後2日目という新鮮卵であっても、卵中にSEが存在すれば60個中20個（3個に1個）は増殖する可能性が示唆された。その増殖菌数は最大で38倍程度と推測される。なぜなら、卵内容物を50gとした場合に、その卵中に15.8個/0.1mlのSEを接種後、20℃・3日間培養した場合は、最も菌数の高かったものが $1.2 \times 10^1 / g$ であったことから、これを単純計算して卵内容重量（約50g）で乗すると $50 \times 12 \text{個} = 600 \text{個}$ となる。一方、接種したSE菌数は15.8個であるから、 $600 \div 15.8 = 38$ となるからである。

3-11 秋場の鶏卵を20℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま20℃・3日間培養した場合

表10、11のような鶏卵を20℃保存（湿度60～65%）し、3から4日間毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した場合は、4日保存では10個中2個にSE菌が増殖し、そのうち1個の菌数は $10^6 / g$ 以上に達した（表12）。その後、11日保存までは、増殖傾向はみられなかったが、14日保存では10個中2個にSE菌が、18日保存では10個中5個にSE菌が増殖した。また、28日保存では10個中7個にSE菌が増殖し、その菌数は $1.7E+00 \sim >1.0E+08$ ($1.7 \sim >1.0 \times 10^8 / g$) の範囲であり、10個中6個は $10^7 / g$ 以上に達した（表12）。この結果から、秋場の卵は、産卵後2日目という新鮮卵を20℃に保管しても、卵中にSEが存在すれば4日保存では10個中1個は急激に増殖する可能性があり、その後11日目まではSEが認められなくなり、18日保存から再び増殖する傾向が認められ、25日保存では10個中2個は急激に増殖した。

3-12 秋場の鶏卵を30℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま20℃・3日間培養

した場合

表10, 11のような鶏卵を30℃保存(湿度60~65%)し, 3から4日間毎にSE菌液を接種し, 殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した場合は, 4日保存では10個中7個の卵中にSE菌が増殖し, その菌数は $1.7E+00 \sim 1.6E+06$ ($1.7 \sim 1.6 \times 10^7$ /g)の範囲であり, 10個中5個は 10^7 /g以上に達した(表13). 7日保存では10個中8個にSE菌が増殖し, その菌数は $1.7E+00 \sim 6.3E+06$ ($1.7 \sim 1.2 \times 10^7$ /g)の範囲であった.

3-13秋場の鶏卵を30℃保存後, SEを接種し, 殻付きのまま30℃・3日間培養した場合

表10, 11のような鶏卵を30℃保存(湿度60~65%)し, 3から4日間毎にSE菌液を接種し, 殻付き卵の状態で30℃・3日間培養した場合は, 4日保存では9個中8個の卵中にSE菌が増殖し, その菌数は $1.2E+01 \sim 1.0E+08$ ($1.2 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^8$ /g)の範囲であり, 9個中3個は 10^5 /g以上に達した(表14). 7日保存では10個中8個にSE菌が増殖し, その菌数は $1.2E+02 \sim 1.0E+08$ ($1.2 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ /g)の範囲であった.

3-14産卵後2日目の秋場の鶏卵にSEを接種し, 殻付きのまま20℃保存した場合

鶏卵にSEが汚染している状況に近づけるために, 実験室に到着した産卵後2日目の鶏卵にSEを接種し, 殻付きのまま20℃保存し, 各週毎に卵10個ずつ取り出しSEの有無と菌数を調べた. 7日保存では, 10個中4個にSE菌が増殖したが全て 10^1 /g以下であった. 14日保存では, 10個4個の卵中にSE菌が増殖したが全て 10^1 /g以下であった. しかし, 21日及び28日保存ではSE増殖する卵が認められず, 35日保存では10個中2個にSE菌が増殖し, そのうちの1個はSE菌数 10^8 /g以上に達していた(表15).

以上のように, 産卵後2日目の鶏卵にSEを接種し, 殻付きのまま20℃保存し, 各週毎に卵10個ずつ取り出してSEの有無と菌数を調べた実験では, 1~2週間保存した時期には卵によってはSEの増殖するものがみられるが, 3~4週間保存では増殖しにくくなり, 5週間保存で増殖するものがみられた夏場の成績と似通っていた. そこで, 3及び4週間保存鶏卵のSEの生残について増菌培養法を用いて調べたところ, 4週間保存までは全て生残していたが, 5週間保存では8個中3個にSEは検出されなかった(表15). したがって, 鶏卵に接種されたSEは, その環境が増殖に適していれば増殖するが, 適していなければ増殖しないで4週間程度は死滅しないがそれ以降は死滅する可能性のあることが明らかとなった. しかしながら, SE接種後間もない卵中ではSEは増殖できるチャンスはありそのような傾向が伺えるが, その理由については全く不明である.

3-15冬場の鶏卵(産卵後2日目)

冬場(2月~4月)に入手し実験室に搬入した産卵後2日目の鶏卵720個の中からランダムに10個を選び, 卵殻にドリルで穴を開け, マウス胃ゾンデを用いて注射器で

SE菌液を接種し、穴の部分にテープを貼った後、20℃で3日間培養した。培養後、1個ずつ割卵し、よく混ぜ合わせた後、その25mlを225ml BPWに投入してストマツカー処理して均一化し試料原液を作成した。作製した試料原液を適宜希釈し、SEの定量試験を行うと同時に25ml中にSEが存在するか否かの定量試験もおこなった。その結果、実験室搬入直後の卵10個にSE菌液0.1mlを接種（接種菌量：9.0個/0.1ml）し、殻付き卵の状態で20℃・3日間培養した場合は、10個中6個の卵中にSE菌が増殖した（表16,）。その菌数は、 $1.7E+00 \sim 1.7E+02$ ($1.7 \sim 1.7 \times 10^2 / g$) の範囲であった（表17）。

3-16 冬場の鶏卵を20℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま20℃・3日間培養した場合

表16, 17のような鶏卵を20℃保存（湿度60～65%）し、3から4日間毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態20℃・3日間培養した場合は、4日及び7日保存では10個中1個にSE菌が増殖し、その菌数は $10^1 / g$ レベルであった（表17）。その後、11日保存では、10個中3個にSE菌が増殖し、その菌数は $10^1 / g$ レベルであった。しかし、14日保存では10個中5個にSE菌が増殖し、その菌数は $3.3E+00 \sim 1.1E+07$ ($3.3 \sim 1.0 \times 10^7 / g$) の範囲であり、10個中2個は $10^6 / g$ 以上に達した。

（表17）。この結果から、冬場の卵は、産卵後2日目という新鮮卵を20℃に保管しても、卵中にSEが存在すれば10個中1個は急激に増殖する可能性があったが、その後11日目まではSEが認められても増殖菌数は10個程度と少数であった。しかし、14日保存では著しく増殖する卵が認められた。以上の結果から、冬場の鶏卵でのSE増殖態度は夏、秋場と同様の傾向が認められた。

3-17 冬場の鶏卵を30℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま20℃・3日間培養した場合

表16, 17のような鶏卵を30℃保存（湿度60～65%）し、3から4日間毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態20℃・3日間培養した場合は、4日保存では10個中3個の卵中にSE菌が増殖し、その菌数は $1.7E+00 \sim 8.3E+05$ ($1.7 \sim 8.3 \times 10^5 / g$) の範囲であった。（表18）。7日保存では10個中6個にSE菌が増殖し、その菌数は $1.7E+00 \sim 3.4E+06$ ($1.7 \sim 3.4 \times 10^6 / g$) の範囲であった。11日保存では10個中7個にSE菌が増殖し、その菌数は $1.0E+01 \sim 2.1E+07$ ($1.0 \sim 2.1 \times 10^7 / g$) の範囲であり、10個中4個が $10^6 / g$ 以上に達していた。これらの結果から、冬場の鶏卵でのSE増殖態度は夏、秋場と同様の傾向が認められた。

3-18 冬場の鶏卵を30℃保存後、SEを接種し、殻付きのまま30℃・3日間培養した場合

表16, 17のような鶏卵を30℃保存（湿度60～65%）し、3から4日間毎にSE菌液を接種し、殻付き卵の状態30℃・3日間培養した場合は、4日保存では10個中2個の卵中にSE菌が増殖し、そのうちの1個は $10^8 / g$ 以上に達した。（表19）。7日保存では10個中2個にSE菌が増殖したが、その菌数は $10^1 / g$ 以下であった。1

1日保存では10個中9個にSE菌が増殖し、その菌数は $1.7E+00 \sim 1.0E+08$ ($1.7 \sim 1.0 \times 10^8/g$)の範囲であり、10個中3個が $10^7/g$ 以上に達していた。14日保存ではさらに増殖菌数の高い卵が増加し、10個中10個にSE菌が増殖し、その菌数は $1.3E+05 \sim 1.0E+08$ ($1.3 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8/g$)の範囲であり、10個中8個が $10^6/g$ 以上に達していた。以上結果から、冬場の鶏卵を30℃保存後、SEを接種して殻付きのまま30℃・3日間培養した場合のSE増殖態度は、7日保存で大部分の鶏卵中にSE菌が急激に増殖を示す夏、秋場に比べ、冬場の鶏卵は少ない傾向がみられた。

3-19産卵後2日目の冬場の鶏卵にSEを接種し、殻付きのまま20℃保存した場合鶏卵にSEが汚染している状況に近づけるために、実験室に到着した産卵後2日目の鶏卵にSEを接種し、殻付きのまま20℃保存し、各週毎に卵10個ずつ取り出しSEの有無と菌数を調べた。7日保存では、10個中2個にSE菌が増殖したが全て $10^1/g$ 以下であった。14日及び21日保存では、SEの増殖は認められなかった。しかし、28日保存ではSE増殖する卵が10個中1個認められたが、35日保存では認められなかった(表20)。

以上のように、産卵後2日目の鶏卵にSEを接種し、殻付きのまま20℃保存し、各週毎に卵10個ずつ取り出してSEの有無と菌数を調べた実験では、1週間保存した時期には卵によってはSEの増殖するものがみられたが、2~5週間保存では増殖しにくくなる現象のみられた夏場の成績と似通っていたが、冬場の鶏卵では5週間保存であってもSEの増殖はみられなかった。そこで、1から5週間保存鶏卵のSEの生残について増菌培養法を用いて調べたところ、1週間保存では、10個中1個、週間保存では、10個中0個、3及び4週間保存では、10個中2個は接種したSEは検出されなかった。また、5週間保存では、10個中6個は接種したSEは検出されなかった(表15)。したがって、鶏卵に接種されたSEは、その環境が増殖に適してれば増殖するが、適していなければ増殖しない。そして3週間以降は死滅するSEが増加する傾向が認められ、秋葉より冬場の鶏卵によりその傾向が顕著に認められることが明らかとなった。同様の傾向のあることは、Baker R.C. and Bruce C.(1990) The microbiology of eggs. International Egg Commission も述べているがその理由については全く不明である。

4. 結論

殻付き卵が農場で産卵された後、GPセンター、問屋等の流通経路を経て店頭で陳列され、消費者の手に渡り喫食されるまでに殻付き卵が取り扱われる条件(保管温度や期間)や季節によって卵内に存在するサルモネラ(SE: *Salmonella Enteritidis*)がどの時点で急激に増殖するのかを調べ、以下の結論が得られた。

1. 夏、秋及び冬場の鶏卵(産卵後2日目)にSEを接種した場合は、季節を問わず約1/3の鶏卵中で増殖する傾向がみられ、保存日数とともにSEの増殖する割合は増加した。
2. 夏、秋及び冬場の鶏卵(産卵後2日目)を各保存温度(湿度60~65%)に保存後、殻付き卵を経日的に取り出しSEを接種した場合は、20℃に比べ30℃保存した鶏卵にSEが著しく増殖する傾向が認められた。

0～65%)に保存した場合は、1週間保存した時期には卵によってはSEの増殖するものがみられたが、2～5週間保存では増殖しにくくなる現象がみられた。しかし、冬場の鶏卵では5週間保存であってもSEの増殖はみられなかった。

4. 保存鶏卵のSEの生残について増菌培養法を用いて調べたところ、1週間保存では、10個中1個、2週間保存では、10個中0個、3及び4週間保存では、10個中2個は接種したSEは検出されなかった。また、5週間保存では、10個中6個は接種したSEは検出されなかった。保存中にSEが死滅するという現象については不明である。
5. 長期間冷蔵保存された卵を30℃保存した場合は、一般に流通している鶏卵の成績と比べて際だった差は認められなかったが、冷蔵状態から30℃保存に移行させた中に少数ではあるが著しく増加する卵が認められたことは注目に値する。

以上の結果から、鶏卵中にSEを接種した場合には、新鮮な鶏卵では産卵シーズンにあまり関係なくSEは増殖する傾向が認められた。また、保存温度は20℃より30℃で、より強くSEは増殖する傾向が認められたことから、特に夏場の鶏卵は、産卵後室温に放置する時間を極力短くし冷蔵保存することに加え、冷蔵庫から出した卵は室温に長期間放置させないことなどが、SE食中毒防止のキーポイントになると考える。