

も O3:K6 株は O1:K56 株に比較して誘導期が短い傾向を示し、また、増殖能が高いことが推察された。昨年度の成績では、20℃pH5.8 で速やかな増殖が認められたが、本研究の結果 pH が 5.2 以下であれば実質上増殖が起らないことが判明した。

前年度、培養温度 15℃、食塩濃度 1%，pH5.8 の BPW 中においては、2 日までには半数の菌株が 10^8 まで菌数が増加したことが認められた (図 6)。今年度さらに菌株数をふやして同じ条件下で増殖を調べた結果、概ね前年度と同じ成績が得られた (図 5)。pH5.5 においては、BPW へ 10^2 /ml または 10^3 /ml オーダ接種した O1; K56 株 ('98, 新潟患者由来, '99 静岡患者由来), O4:K8 株 ('99, 静岡, 患者由来, '98 新潟患者由来), O3:K6 株 ('98, 秋田患者, '98, 新潟患者由来 1998, '99 静岡患者由来) のうち、O4:K8 株 ('99, 静岡, 患者由来) は 2 日目で検出限界以下になったが、他の株は培養 8 日目には 10^6 ml, 10^8 /ml オーダに達した。また培養 30 日後にも 10^6 ml, 10^9 /ml オーダの菌数を示した (図 3, 4)。本実験においても O3:K6 株は O1:K56 株, O4:K8 株に比較して誘導期が短い傾向を示した。

前年度、O3:K6 株は、増殖に影響する要因である pH、温度、食塩濃度が、菌の増殖に不利な条件下では、O3:K6 以外の株よりも増殖しやすい傾向が認められたが、今年度の成績からも O3:K6 株が他の血清型に比較して誘導期が短い傾向があることが認められた。このことより、O3:K6 株が近年増加したことは、腸炎ビブリオの増殖に不利な環境において、同株の増殖能が比較的高いことによってもたらされた可能性が考えられた。

4. 結論

O3K6 を含めた腸炎ビブリオの 1%ペプトン水中における増殖に及ぼす温度、pH、食塩濃度の影響を実験的に調べた結果、O3:K6 株を含め腸炎ビブリオは、中性域で10℃下では4日間増殖が見られず、食品の保存期間を考慮すると、実質上10℃下での保存で安全性が確保できるものと考えられた。15℃においては、pH5.5 で初期菌数が $10^2 \sim 10^3$ であれば、誘導期が若干長いものの6日目には大部分の菌株で顕著な増殖が認められた。20℃においては、pHが5.2以下であれば実質上増殖が起こらないことが判明した。

5. 発表

堀坂知子、工藤由起子、川澄俊之、熊谷 進：食品からのPCR法による腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の検出法の検討。第21回日本食品微生物学会、平成12年10月、東京。

長谷川順子、仁科徳啓、工藤由起子、小沼博隆、熊谷 進：酸性下における *Vibrio parahaemolyticus* の消長。第21回日本食品微生物学会、平成12年10月、東京。

仁科徳啓、工藤由起子、中川弘、小沼博隆、熊谷進。酵素基質培地を用いた腸炎ビブリオの検出方法の検討。第20回日本細菌学会関東支部会、平成12年11月、東京。

図1. 10℃または12℃、pH7.2、NaCl3%での増殖。

- ▲ : O3K6、秋田、食品由来、TDH+、12℃
- : O1K56、新潟、患者由来、TDH+、12℃
- △ : O3K6、秋田、食品由来、TDH+、10℃
- : O1K56、新潟、患者由来、TDH+、10℃

図2. 20℃、pH5.0、pH5.2、pH5.5、NaCl3%での増殖。

- ◆ : O3K6、秋田、食品由来、TDH+、pH5.5
- : O3K6、秋田、食品由来、TDH+、pH5.2
- ▲ : O3K6、秋田、食品由来、TDH+、pH5.0
- ◇ : O1K56、新潟、患者由来、TDH+、pH5.5
- : O1K56、新潟、患者由来、TDH+、pH5.2
- △ : O1K56、新潟、患者由来、TDH+、pH5.0

図3. 15℃、pH5.5、NaCl1%での増殖（一回目）。

- ◇ : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
- : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
- △ : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
- : O3K6、新潟、患者由来、TDH+
- : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
- : O1K56、静岡、患者由来、TDH+
- ◆ : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

図4. 15℃、pH5.5、NaCl1%での増殖（二回目）。

- ◇ : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
- : O3K6、秋田、患者由来、TDH+

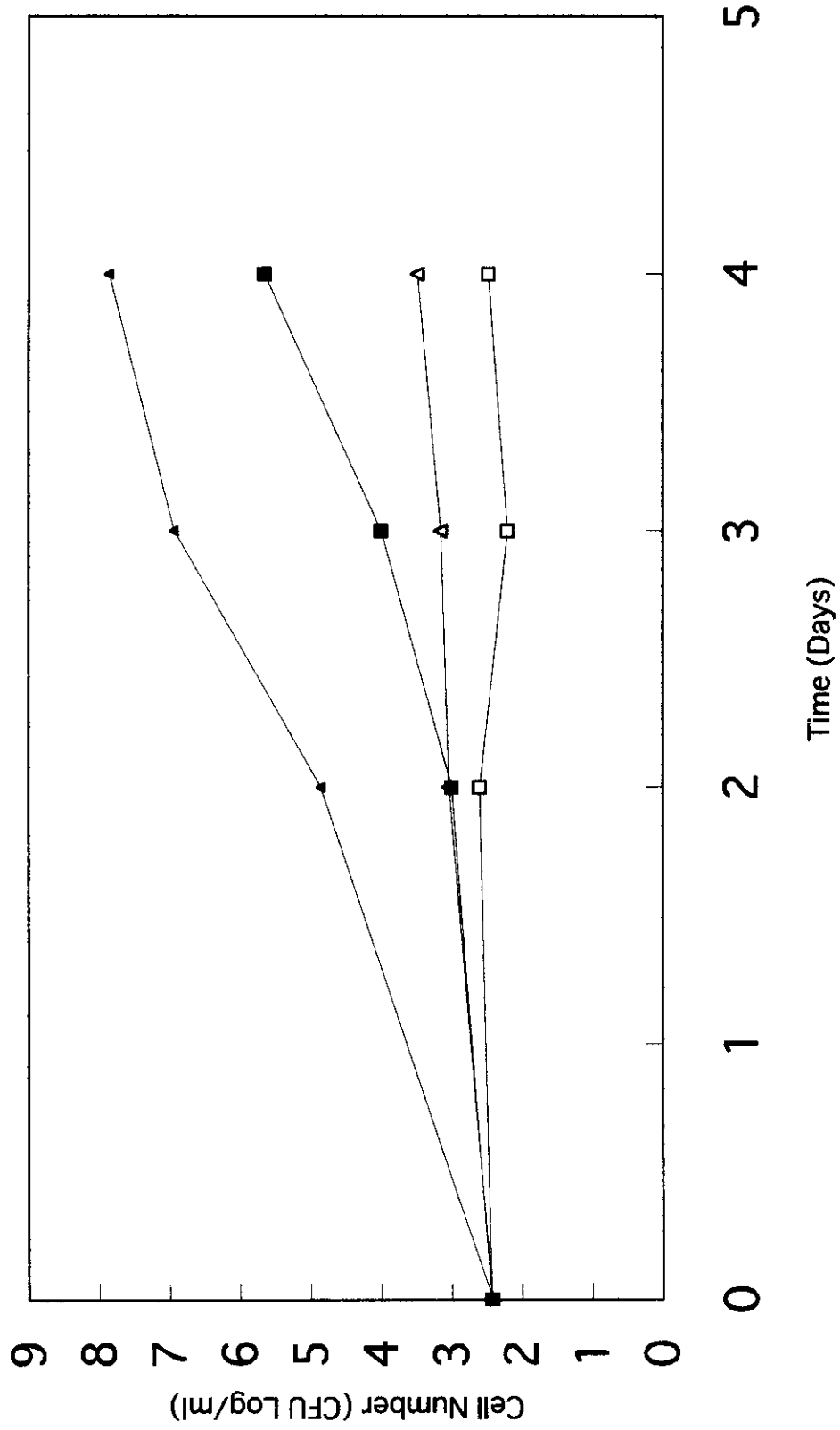
- △ : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
- : O3K6、新潟、患者由来、TDH+
- : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
- : O1K56、静岡、患者由来、TDH+
- ◆ : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

図5. 15℃、pH5.8、NaCl1%での増殖。

- ◇ : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
- : O1K56、静岡、患者由来、TDH+
- △ : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
- : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
- : O3K6、秋田、食品由来、TDH+
- : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
- ▲ : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

1

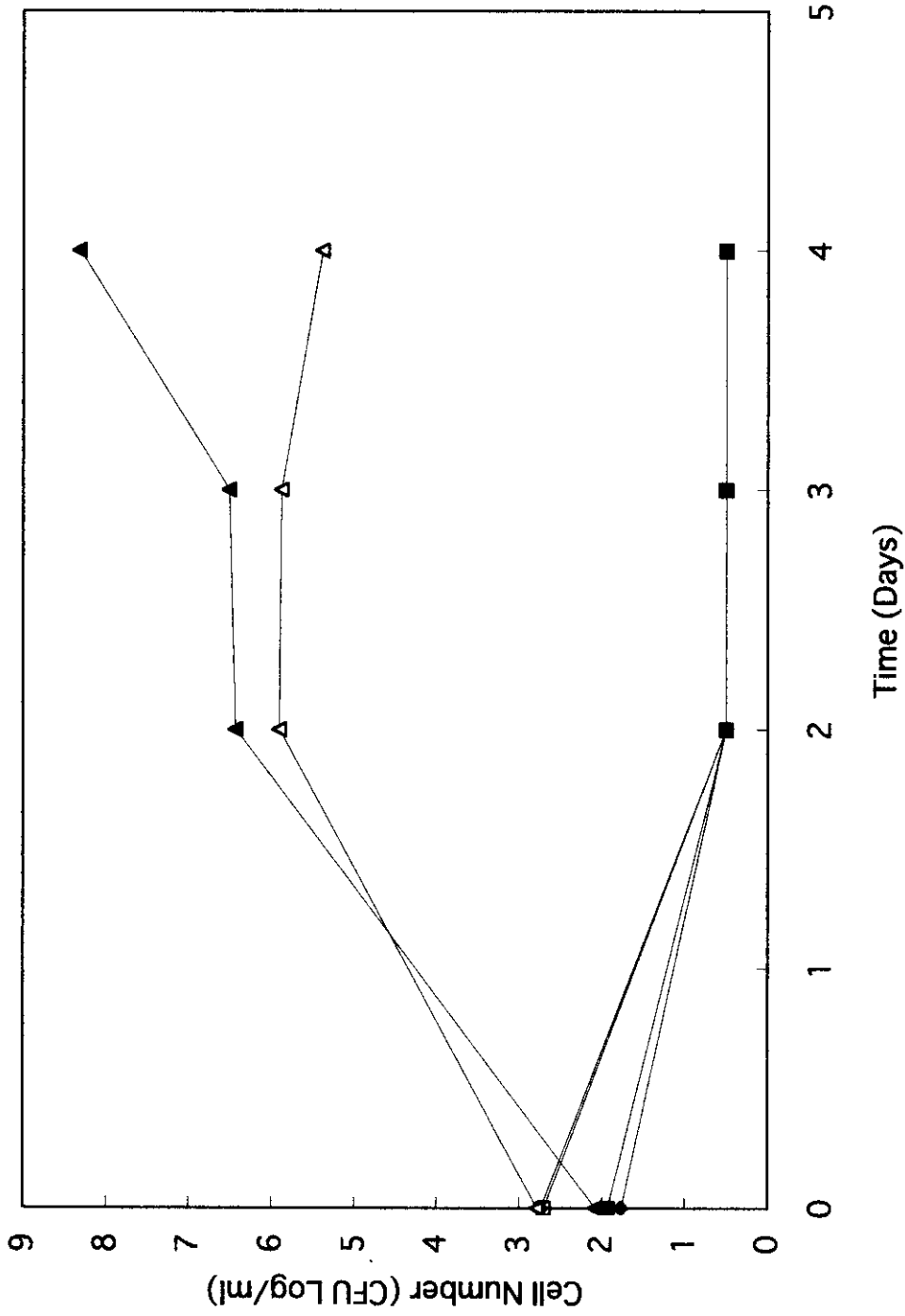
10C, 12C, pH7.2, NaCl3%



2

20C, pH5.0, 5.2, 5.5, NaCl3%

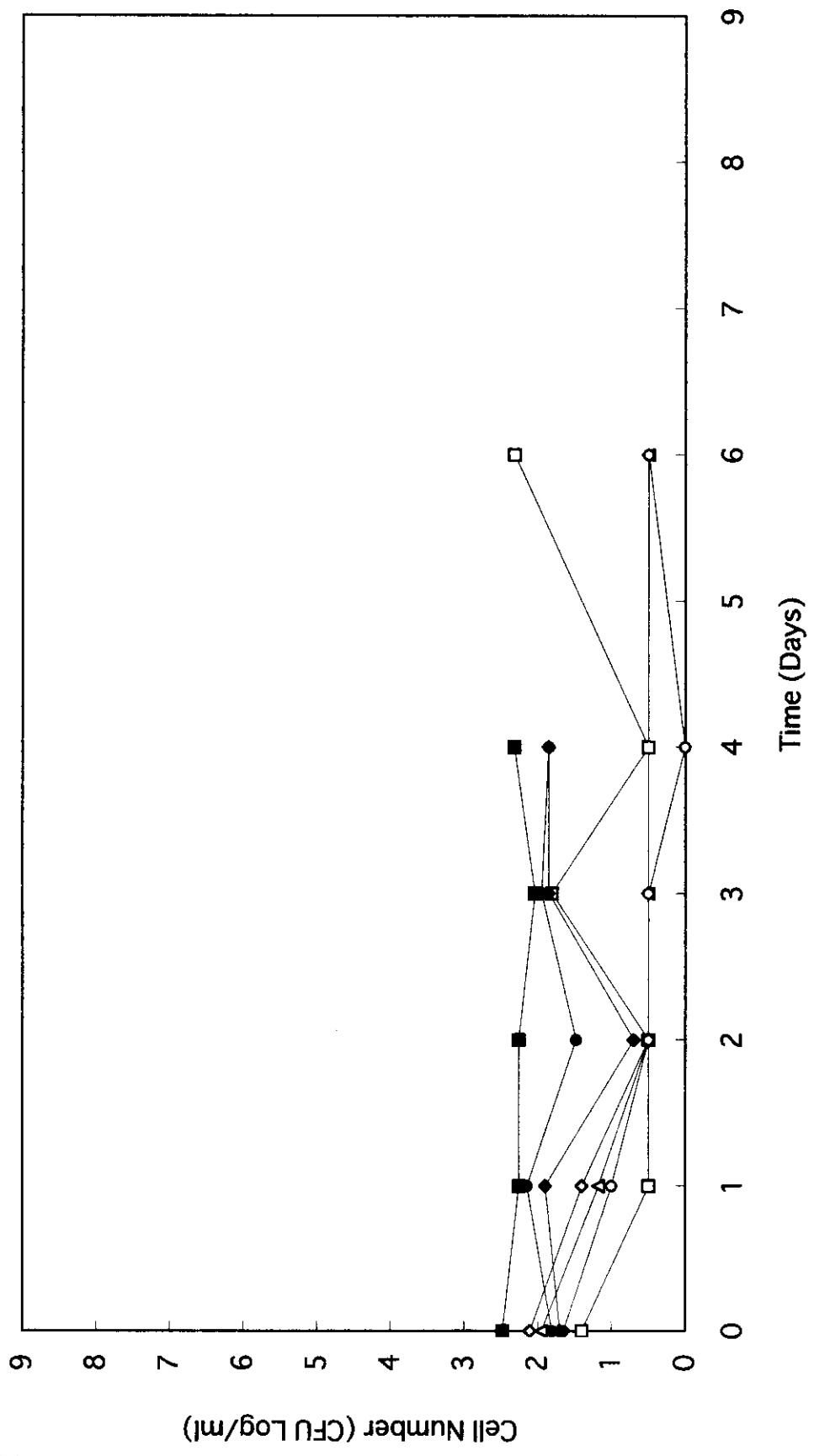
- 系列1
- 系列2
- 系列3
- 系列4
- 系列5
- 系列6



3

15C,pH5.5, NaCl1%

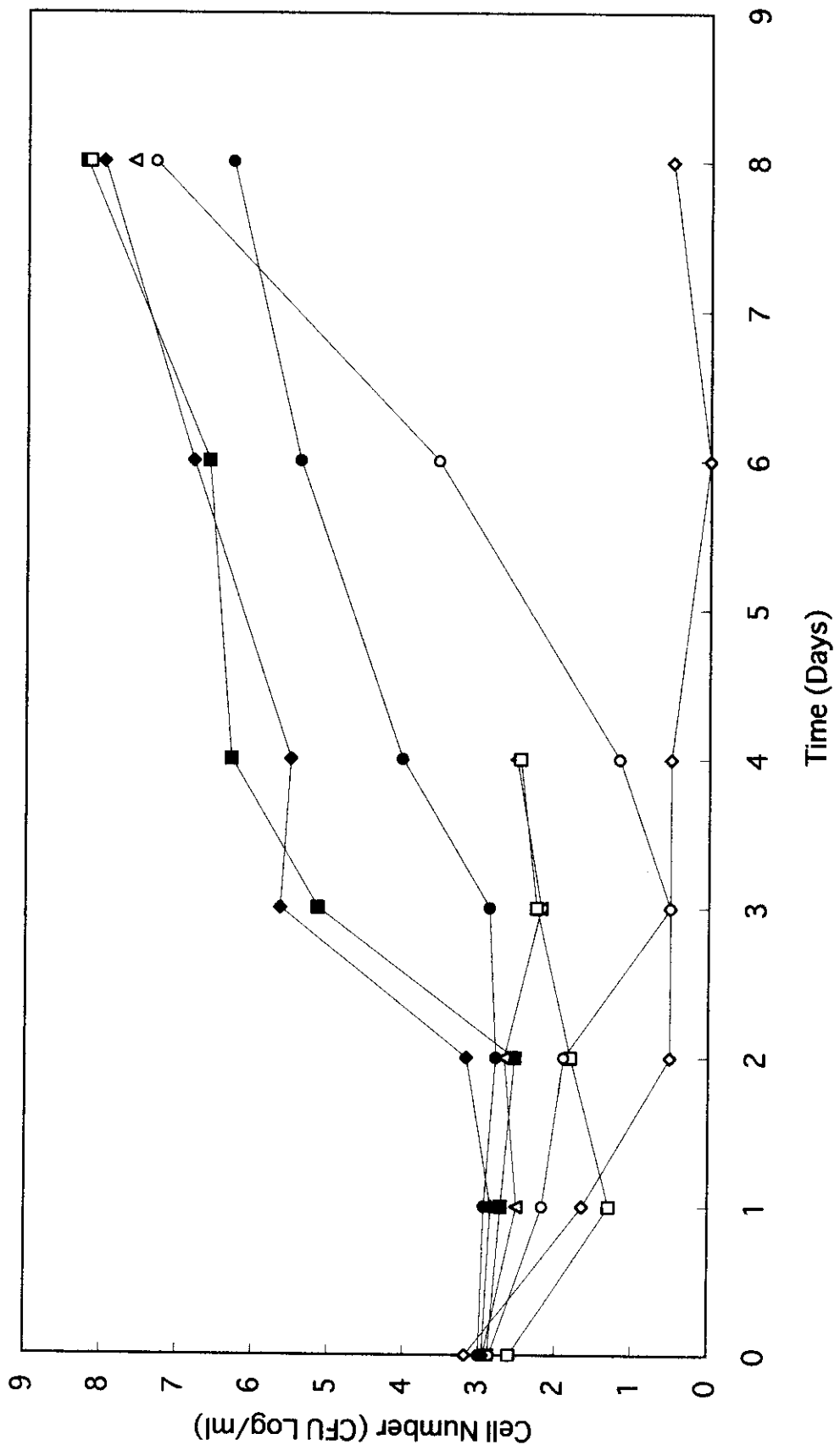
- 系列1
- 系列2
- 系列3
- 系列4
- 系列5
- 系列6
- 系列7



15C, pH5.5, NaCl1%

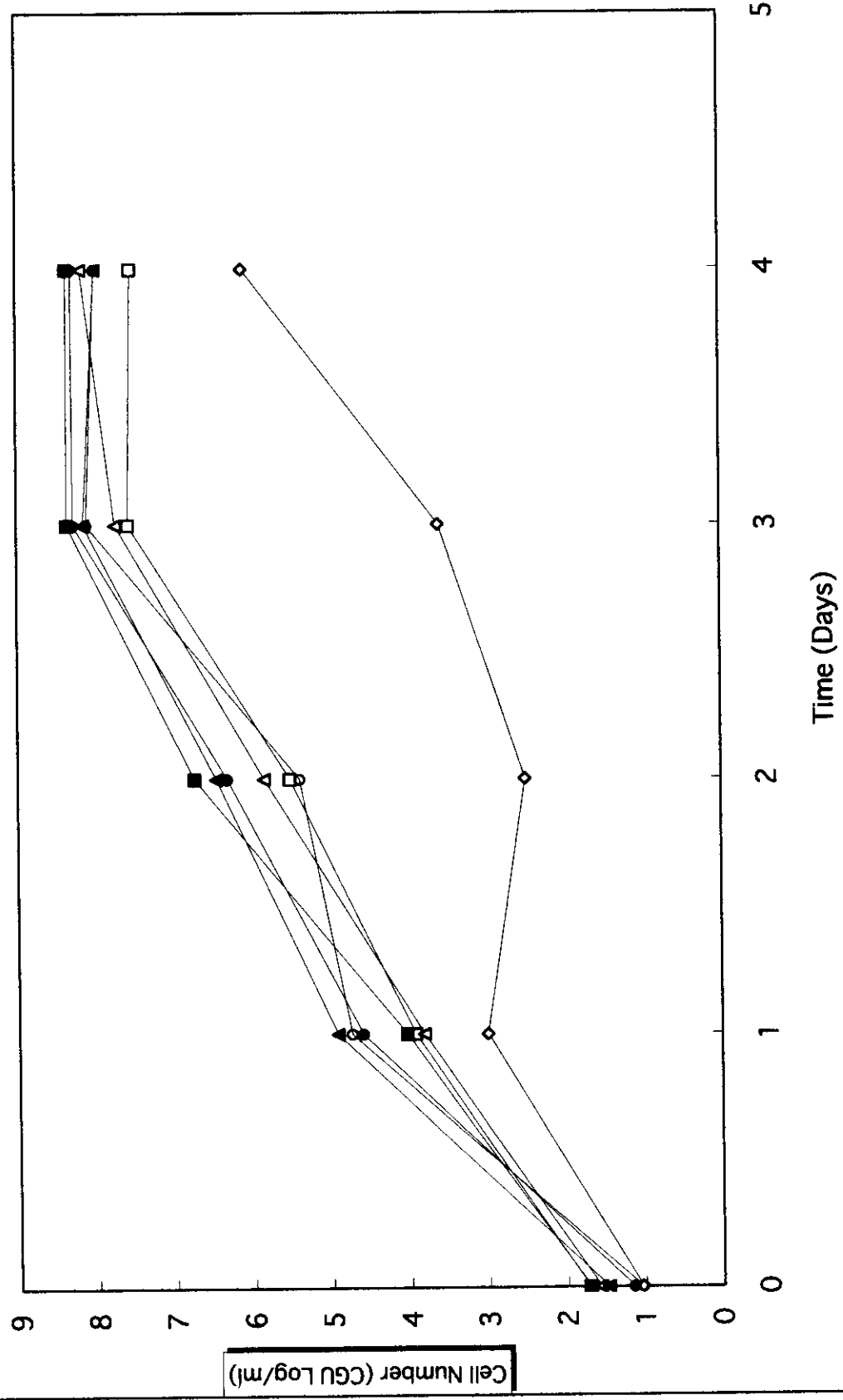
4

- ◇ 系列1
- 系列2
- △ 系列3
- 系列4
- 系列5
- 系列6
- ◆ 系列7

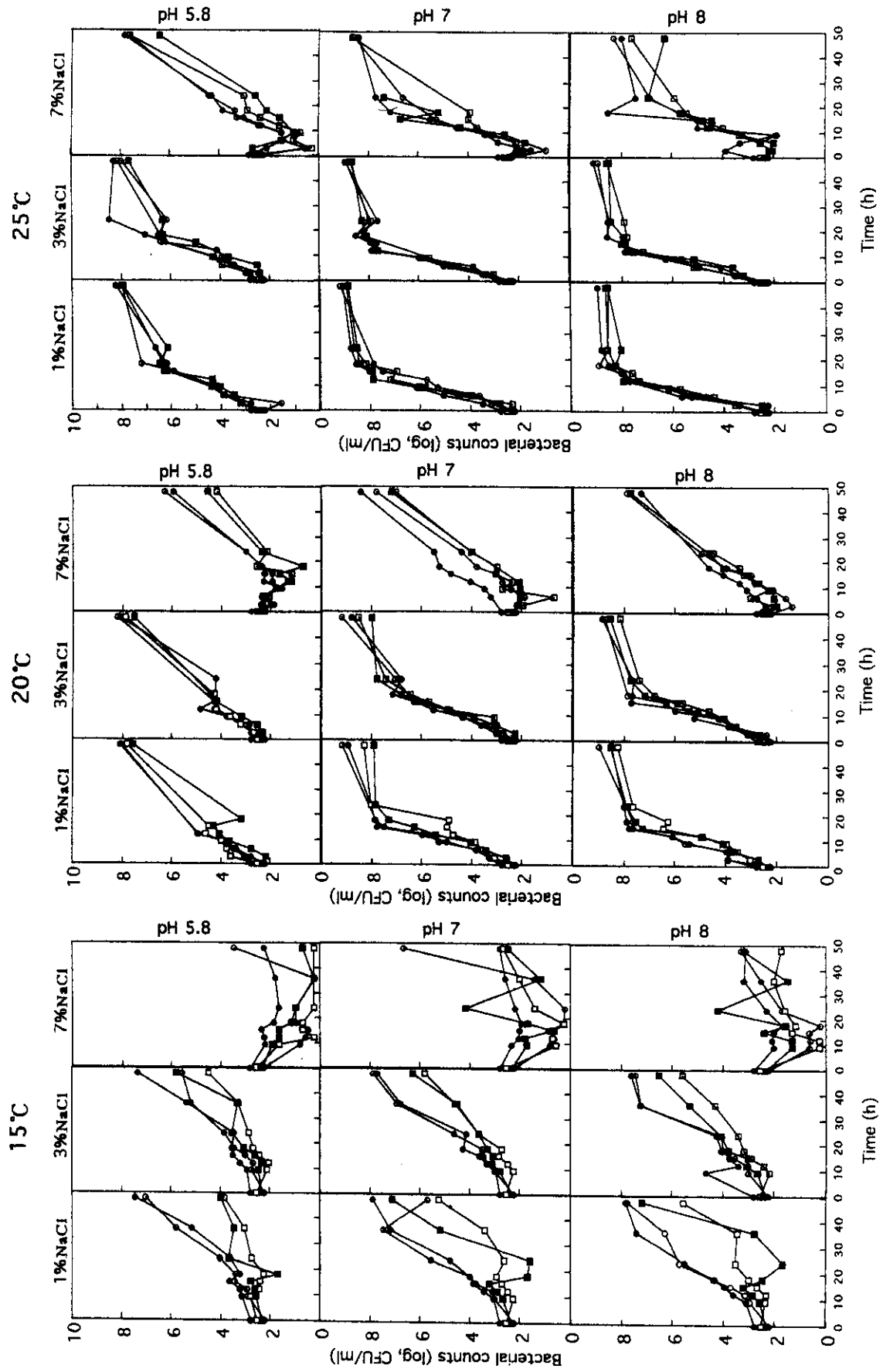


5

15C, pH5.8, NaCl1%



- 系列1 (◇)
- 系列2 (□)
- 系列3 (△)
- 系列4 (○)
- 系列5 (■)
- 系列6 (●)
- 系列7 (▲)



6

表 1 10℃&12℃におけるV. pの増殖態度 (pH 7.2, NaCl 3%)

血清型	由来	菌株No.	培養温度	培養時間 (CFU/ml)				
				接種菌数	48時間後	72時間後	96時間後	
培養基の pH	(菌未接種)			7.2	7.22	7.25	7.2	
培養基の pH	(菌接種)			7.2	7.23	7.25	7.22	
O3 : K6,	' 98	秋田ボイロホクダテB-52	10℃	2.6×10 ²	1.1×10 ³	1.4×10 ³	3.0×10 ³	
培養基の pH	(菌接種)			7.2	7.22	7.25	7.23	
O1:K56,	' 98	新潟ヒト, C-3		2.7×10 ²	4.0×10 ²	1.6×10 ²	3.0×10 ²	
培養基の pH	(菌未接種)			7.2	7.2	7.25	7.18	
培養基の pH	(菌接種)			7.2	7.22	7.24	7.17	
O3 : K6,	' 98	秋田ボイロホクダテB-52	12℃	2.6×10 ²	7.2×10 ⁴	8.6×10 ⁵	7.2×10 ⁷	
培養基の pH	(菌接種)			7.2	7.2	7.25	7.22	
O1:K56,	' 98	新潟ヒト, C-3		2.7×10 ²	9.9×10 ²	1.0×10 ⁴	4.6×10 ⁵	

(注) 培養基質 : 1% 緩衝ペプトン水 (OXOID)

表2 20℃におけるV. pの増殖態度 (pH 5.0, 5.2, 5.5, NaCl 3%)

血清型	由来 菌株No.	培養温度	時間 (CFU/ml)				
			pH	接種菌数	48時間後	72時間後	96時間後
O3:K6, '98秋田ポイルホルタテB-52, TDH+		20℃	5.0	6.0×10 ¹ (5.0)	<10 (5.09)	<10 (5.06)	<10
			5.2	8.5×10 ¹ (5.2)	<10 (5.28)	<10 (5.28)	<10
			5.5	1.2×10 ² (5.5)	2.7×10 ⁶ (5.63)	3.2×10 ⁶ (5.63)	2.1×10 ⁸
O1:K56, '98新潟ヒト, TDH+	C-3	20℃	5.0	5.5×10 ² (5.0)	<10 (5.08)	<10 (5.06)	<10
			5.2	5.0×10 ² (5.2)	<10 (5.28)	<10 (5.29)	<10
			5.5	6.1×10 ² (5.5)	8.0×10 ⁵ (5.65)	7.5×10 ⁵ (5.61)	2.4×10 ⁵

培養基質: 1%緩衝ペプトン水 (OXOID)

表 4. 15°Cにおける*V. p* の増殖態度 (pH 5.8, NaCl 1%)

血清型 由来 菌株No.	培養時間 (CFU/ml)				
	接種菌数	24時間後	48時間後	72時間後	96時間後
O1:K56, '98新潟ヒト, C-3	1.1×10^1	1.0×10^3	3.2×10^2	4.1×10^3	1.3×10^6
O1:K56, '99静岡ヒト, C-18	5.2×10^1	8.5×10^3	3.3×10^5	3.8×10^7	3.5×10^7
O4:K8, 97' 静岡ヒト, B-31	3.8×10^1	6.6×10^3	7.0×10^5	5.5×10^7	1.5×10^8
O4:K8, 98' 新潟ヒト, C-6	1.1×10^1	5.5×10^4	2.5×10^5	1.3×10^8	1.0×10^8
O3:K6, '98秋田ポイルホルタテ B-52	5.1×10^1	1.1×10^4	5.5×10^6	2.3×10^8	2.3×10^8
O3:K6, '98秋田ヒト, B-53	1.4×10^1	4.0×10^4	2.1×10^6	1.9×10^8	2.0×10^8
O3:K6, '99静岡ヒト, C-19	3.0×10^1	8.4×10^4	2.9×10^6	1.4×10^8	1.0×10^8

∞: 各希釈段階で形成された集落が多く、菌数測定不能, 培養基質: 1%緩衝ペプトン水 (OXOID)

平成12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日から施行した。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。

前年度の研究では、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(保管温度や期間及び季節)によって卵内に存在するサルモネラ(SE: *Salmonella Enteritidis*)が何時の時点で急激に増殖するのかを夏、秋及び冬季の殻付き卵(産卵後2日目)にSEを接種して調べたところ、殻付き卵中のSE増殖は季節を問わず、いずれも31~34%の殻付き卵中で増殖する傾向がみられた。

そこで、新鮮殻付き卵(産卵後2日目)の約三分の一にSEが増殖する原因を探るべく、今年度は生産農場から消費者に渡るまでの鶏卵輸送中の取り扱い、特に輸送時の振動などにより、卵黄成分が卵白中に溶け出し、それがSE増殖の原因とな得るのではないかと考え確認の実験を行った結果、振動はSE増殖の原因とは関係ないような結果を得た。

以上の結果から、殻付き卵は新鮮卵(産卵後2日目)であっても、また、産卵季節にも関係なくSEが卵内に汚染していれば増殖する可能性の強いことが明らかとなった。したがって、わが国のSE食中毒防止対策を進めるための一つの方策としては、産卵後速やかにSEが増殖できない温度(7.2℃以下)にまで下げて保管、流通させる殻付き卵のコールドチェーン化を確立することが必要と考えられる。

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

卵の日付表示

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。

そこで前年度の研究では、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（保管温度や期間及び季節）によって卵内に存在するサルモネラ（SE：*Salmonella Enteritidis*）が何時の時点で急激に増殖するのかを調べるために、夏、秋及び冬季の殻付き卵（産卵後2日目）にSEを接種して調べたところ、殻付き卵中においてSEが増殖する割合は、季節とは無関係にいずれも31～34%の殻付き卵中で増殖することを見いだした。

そこで、今年度は新鮮殻付き卵（産卵後2日目）の約三分の一にSEが増殖する原因を探るべく、生産農場から消費者に渡るまでの鶏卵輸送中の取り扱い（振動）がSE増殖の原因になり得るのか否かを確認すべく実験を行った。

2. 材料および方法

2-1 検査材料

実験に供試した鶏卵は、東京農業大学短期大学畜産学研究室に飼育された白色レグホンから採卵したもので確実に当日産卵されたもののみを採卵し、卵に振動を与えないように丁寧に取り扱い実験に供した。

2-2 実験方法

実験室に持ち込まれた殻付き卵をコンシューマーパック（小売り用10個パック）に納めた後、振盪培養器（トーマス科学社製）に卵が縦揺れするようにセットし、1分間に120回、振幅幅100mmのレシプロ運転で5時間室温処理したものを振動群とした。

振動処理後、殻付き卵へのSE接種は、殻の表面のより平らに見える頂上に電動ドリルにより無菌的に直径約1.7mmの穴を開け、0.1ml当たり $0.8 \sim 1.2 \times 10^5$ 個の*Salmonella Enteritidis* PT4 E930448(国立感染研より分与)をマウス用胃ゾンデにより行った。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1.3cm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、30℃に24時間保管してから実験に供した。また、対照区（無処理群）として実験室に持ち込まれた殻付き卵のうち振動を与えない卵にも同様にSEを接種し、上記と同様に3

0℃に24時間保管してから実験に供した。

SEの検出方法は、無処理及び振動処理した殻付き卵1個ずつを無菌的に割卵した2.5gをそれぞれのストマッカー袋に入れた後、BPW (Difco : buffered peptone water) 225 mlを各ストマッカー袋に加えて35～37℃で24時間培養する。その培養液1mlをラポポートバシリアディス プロス (Oxoid : 10 ml) 及びテトラチオネート プロス (Oxoid : 10 ml) の1白金耳をMLCB平板培地 (日水) に塗抹し35～37℃で24時間培養後、発育形成した黒色コロニーを釣菌し、TSI斜面寒天に接種し35～37℃で24時間培養した。培養後、斜面赤色、高層部黄色、硫化水素産生、ガス発生のみられたものをサルモネラ推定陽性として、リシン脱炭酸試験、マロン酸塩試験、血清学的試験など所定の同定試験を行った。

3. 結果および考察

平成11年11月1日に生食用の鶏の殻付き卵の日付表示が施行された。したがって、卵生産業者及び販売業者等は、殻付き卵に消費期限 (日付表示) を表示しなければならなくなった。そこで、卵の協会では英国のHumphreyらのデータを基にして、日本の夏場の平均気温などを考慮し、室温に7日間以上は放置せずに、以後は10℃以下に保存する計14日間の消費期限を設定し、現在に至っている。そこで、卵内に存在するSEが何時の時点で急激に増殖するのかを調べるために、殻付き卵中におけるSEの増殖性に関する研究を行った。すなわち、夏、秋及び冬季に産卵した新鮮殻付き卵にSEを接種してその増殖態度を調べてみた。

3-1 夏季の殻付き卵中におけるSEの増殖性

夏季の産卵後2日目の殻付き卵50個にSE (6.2～15.8個/0.1ml) を上記のごとく接種し、20～30℃で3日間培養 (保管) したところ、50個中17個 (34.0%) にSEの増殖が認められた。SEの増殖菌数は、 $10^7/g$ 以上が50個中2個、 $10^6/g$ 以上が50個中2個、 $10^1/g$ 以上が50個中6個、 $10^1/g$ 以下が50個中7個であった (表1, 3, 別添資料表1～20)。

3-2 秋季の殻付き卵中におけるSEの増殖性

秋季の産卵後2日目の殻付き卵70個にSE (6.2～15.8個/0.1ml) を接種し、20～30℃で3日間培養 (保管) したところ、70個中22個 (31.4%) にSEの増殖が認められた。SEの増殖菌数は、 $10^1/g$ 以上が70個中1個、 $10^1/g$ 以下が70個中21個であった (表1, 2, 別添資料表1～20)。

3-3 冬季の殻付き卵中におけるSEの増殖性

冬季の産卵後2日目の殻付き卵70個にSE (6.2～15.8個/0.1ml) を上記のごとく接種し、20～30℃で3日間培養 (保管) したところ、70個中24個 (34.3%) にSEの増殖が認められた。SEの増殖菌数は、 $10^6/g$ 以上が70個中1個、 $10^2/g$ 以上が70個中1個、 $10^1/g$ 以下が70個中22個であった (表1, 4, 別添資料表1～20)。

3-4 殻付き卵中のSE増殖と振動の影響

上記(3-1~3-3)の調査研究結果から、新鮮殻付き卵(産卵後2日目)の約三分の一にSEが増殖する原因を探るべく、今年度は生産農場から消費者に渡るまでの鶏卵輸送中の取り扱い、特に輸送時の振動などにより、卵黄成分が卵白中に溶け出し、それがSE増殖の原因とな得るのではないかと考え確認の実験を行った。

産卵当日の新鮮殻付き卵50個について1分間に120回、振幅巾100mmのレシプロ運転で5時間室温処理したものにSEを接種し、30℃・24時間保管した後にSE増殖の有無を調べた。また、対照として振動を与えない卵50個についても同様にSEを接種し、上記と同様に30℃・24時間保管した後にSE増殖の有無を調べた。

その結果、30℃・24時間保管した振動処理群では、SEが $10^6/g$ 以上に増殖した卵数は3個/50個(6%)、 $10^5/g$ 以上は5個/50個(10%)、 $10^4/g$ 以上は10個/50個(20%)、 $10^3/g$ 以上は26個/50個(52%)及び $10^2/g$ 以上は5個/50個(10%)であった。一方、無処理群では、SEが $10^6/g$ 以上に増殖した卵数は7個/50個(14%)、 $10^5/g$ 以上は0個/50個(0%)、 $10^4/g$ 以上は10個/50個(20%)、 $10^3/g$ 以上は27個/50個(54%)及び $10^2/g$ 以上は6個/50個(12%)であった。これらの結果から、殻付き卵中のSE増殖に関しては、振動処理群と無処理群の間には顕著な差はみられなかった。

4. 結論

新鮮殻付き卵(産卵後2日目)の約三分の一にSEが増殖する原因を探るべく、今年度は生産農場から消費者に渡るまでの鶏卵輸送中の取り扱い、特に輸送時の振動などにより、卵黄成分が卵白中に溶け出し、それがSE増殖の原因とな得るのではないかと考え確認の実験を行った結果、振動はSE増殖の原因とは関係ないような結果を得た。

殻付き卵は新鮮卵(産卵後2日目)であっても、また、産卵季節及び振動にも関係なくSEが卵内に汚染していれば増殖する可能性の強いことが明らかとなった。したがって、わが国のSE食中毒防止対策を進めるための一つの方策としては、産卵後速やかにSEが増殖できない温度(7.2℃以下)にまで下げて保管、流通させる殻付き卵のクールチェーン化を確立することが必要と考えられる。

表1 産卵後2日目の殻付卵中におけるS.Eの増殖性

夏秋冬季の産卵(11~12月)

	夏	秋	冬
SE増殖個数	17/50	22/70	24/70
(%)	34.0%	31.4%	34.3%

産卵後2日目の殻付き卵にSE接種後, 20~30°Cで3日間培養

接種菌量: 6.2~15.8個/0.1ml

表2 産卵後2日目の殻付卵中におけるS.Eの増殖性

秋季の産卵(11~12月)

卵の番号	SE菌数	卵の番号	SE菌数	卵の番号	SE菌数	卵の番号	SE菌数
1	1.7E+00	21	1.7E+00	41	0.0E+00	61	3.3E+00
2	3.3E+00	22	0.0E+00	42	0.0E+00	62	0.0E+00
3	0.0E+00	23	0.0E+00	43	0.0E+00	63	1.7E+00
4	1.7E+00	24	0.0E+00	44	0.0E+00	64	0.0E+00
5	1.7E+00	25	1.7E+00	45	0.0E+00	65	0.0E+00
6	0.0E+00	26	3.3E+00	46	0.0E+00	66	0.0E+00
7	1.7E+00	27	1.7E+00	47	3.3E+00	67	0.0E+00
8	1.7E+00	28	5.0E+00	48	0.0E+00	68	0.0E+00
9	0.0E+00	29	0.0E+00	49	0.0E+00	69	0.0E+00
10	0.0E+00	30	1.7E+00	50	0.0E+00	70	0.0E+00
11	1.7E+00	31	0.0E+00	51	0.0E+00	71	NT
12	0.0E+00	32	0.0E+00	52	6.7E+00	72	NT
13	0.0E+00	33	0.0E+00	53	5.0E+00	73	NT
14	0.0E+00	34	0.0E+00	54	0.0E+00	74	NT
15	0.0E+00	35	0.0E+00	55	1.7E+00	75	NT
16	0.0E+00	36	0.0E+00	56	0.0E+00	76	NT
17	0.0E+00	37	0.0E+00	57	0.0E+00	77	NT
18	0.0E+00	38	0.0E+00	58	0.0E+00	78	NT
19	1.7E+00	39	0.0E+00	59	0.0E+00	79	NT
20	0.0E+00	40	1.2E+01	60	1.7E+00	80	NT
SE陽性数	8検体	SE陽性数	7検体	SE陽性数	5検体	SE陽性数	2検体

産卵後2日目の殻付き卵にSE接種後, 20~30°Cで3日間培養

NT: 試験せず

接種菌量: 15.8個/0.1ml