

平成 15 年度厚生科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業  
食品製造の高度衛生管理に関する研究

脱脂粉乳製造の高度衛生管理に関する研究

脱脂乳および濃縮脱脂乳中での黄色ブドウ球菌の増殖特性および  
エンテロトキシン産生

分担研究者 高谷 幸 社団法人日本乳業協会理事

食中毒由来、コアグラゼ型の異なる黄色ブドウ球菌 4 株 [IWATE (Ⅲ)、SBH-51 (Ⅵ)、SBH-57 (Ⅶ) および SBH-67 (Ⅳ)] を用いて乳固形濃度の異なる脱脂乳 (10%、25% および 35%) での危害分析を行なった。予備実験として、各菌株の特性を把握するためブレインハートインフュージョン培地 (BHI) により各菌株の 10°C~55°C (12 水準 10、16、20、23、26、30、34、37、40、45、50 および 55°C) における増殖特性およびエンテロトキシン (以下 SEA) 産生量を振盪温度勾配培養装置により試験した。本実験に用いた各菌株の増殖可能な温度帯はいずれの株も 20°C から 45°C の範囲内であり至適温度は 40°C であった。

各菌株の各温度における SEA 産生量を比較した結果、IWATE (Ⅲ) 株および SBH-51 (Ⅵ) 株の SEA 産生温度帯は 20°C~45°C の範囲内であり、16°C 以下あるいは 50°C 以上では SEA の産生が確認されなかった。しかしながら、SBH-57 (Ⅶ) および SBH-67 (Ⅳ) 株において、50°C 培養では菌数の増加が認められなかったものの、SEA の産生はわずかに確認された。さらに、SEA 産生の至適温度は菌株によって異なる (30°C~40°C) ことが明らかとなった。培養 24 時間後の SEA 産生量は IWATE (Ⅲ) が 10 687 ng/ml (40°C) で最も多く、次いで SBH-67 (Ⅳ) が 8,280 ng/ml (30°C)、SBH-57 (Ⅶ) が 3,696 ng/ml (37°C)、SBH-51 (Ⅵ) が 466 ng/ml (40°C) の順であった。

一方、乳固形濃度の異なる脱脂乳を用いた 40°C 培養の実験において、SEA 産生時間と菌数との関係を調べたところ、いずれの菌株においても 10% 脱脂乳では菌数が約  $10^7$  cfu/ml、25% 脱脂乳では約  $10^6$  cfu/ml、35% 脱脂乳では約  $10^5$  cfu/ml に達した時点から SEA の産生が確認された。また SEA が検出された時間は、いずれの菌株も固形濃度の影響を受けずに培養開始から 6 時間後であった。24 時間後の SEA 産生量は 10% 脱脂乳では IWATE (Ⅲ) が 1,065 ng/ml、SBH-67 (Ⅳ) が 501 ng/ml、SBH-57 (Ⅶ) が 415 ng/ml および SBH-51 (Ⅵ) が 118 ng/ml であった。また 25% 脱脂乳では IWATE (Ⅲ) が 243 ng/ml、SBH-67 (Ⅳ) が 451 ng/ml、SBH-57 (Ⅶ) が 275 ng/ml および SBH-51 (Ⅵ) が 164 ng/ml であった。さらに、35% 脱脂乳では IWATE (Ⅲ) が 265 ng/ml、SBH-67 (Ⅳ) が 168 ng/ml、SBH-57 (Ⅶ) が 207 ng/ml および SBH-51 (Ⅵ) が 129 ng/ml であった。

以上の実験結果から、各菌株の脱脂乳中での SEA 産生量は BHI 培地と比較して約 1/5 から 1/10 以下であり、また乳固形濃度が高くなるに伴い減少する傾向にあった。

#### 協力研究者

柳平修一 雪印乳業株式会社  
酒井史彦 雪印乳業株式会社  
守田大 雪印乳業株式会社

## A 研究目的

牛乳やクリームおよび乳飲料などの製造では、HACCPシステムによる総合衛生管理製造過程により高度な衛生管理が行われている。しかし、2000年6月に発生した低脂肪乳などによる食中毒の原因は、原料に用いられていた

脱脂粉乳が黄色ブドウ球菌エンテロトキシンに汚染していたことであった。このため、脱脂粉乳の製造にも早急なHACCPシステムによる衛生管理の導入が望まれていた。この様な背景から、平成14年12月に脱脂粉乳の製造基準が改定された(平成16年4月施行)。

本研究ではHACCPシステムによる衛生管理の導入に向け、脱脂粉乳製造工程の危害微生物に係わる基礎データを得ることを目的として行なった。本実験では危害微生物のモデル菌として食中毒由来の黄色ブドウ球菌4株(コアグラセ型の違い)を用いて、BHI培地および固形濃度(10%、25%および35%)の異なる脱脂乳中での増殖特性およびエンテロトキシン産生量を調べた。

## B 研究方法

### 1 供試菌株

*Staphylococcus aureus* は岩手大学品川教授より分与されたコアグラセⅢ型の1株{IWATE(Ⅲ)}と東京都立衛生研究所より分与された食中毒由来のコアグラセ型の異なる3株{SBH-51(Ⅵ)、SBH-57(Ⅶ)およびSBH-67(Ⅳ)}を用いた。上記の*S. aureus* 4菌株は全てエンテロトキシンA(SEA)のみを産生す

ることが確認されている。

### 2 エンテロトキシン標準品

標準品はトキシノテクノロシー社製のSE-Aを用いた。

### 3 エンテロトキシンの測定

培養液中のSEAは試料を一定量に希釈した後、ヒオメリュー社製のminiVIDASおよびVIDAS Staph enterotoxin SET kitにより測定した。SEAの定量は0.05、0.1、0.25、0.5、1.0 ng/mlの濃度に調製した検量線より求めた。なお、直接希釈法の検出限界はBHI培地で0.05 ng/mlであり、脱脂乳培地では0.1 ng/mlであった。

### 4 黄色ブドウ球菌生菌数の測定

脱脂乳培地中の黄色ブドウ球菌の菌数は、試料を滅菌生理食塩水で一定量に希釈した後、希釈液0.1 mlを卵黄加マンニト食塩寒天培地に接種し、35℃で48時間培養して計測した。

### 5 BHI培地を用いた各菌株の各温度における増殖特性およびエンテロトキシン産生試験

各菌株の各温度帯における増殖特性はBHI培地を用いてADVANTEC社製の振盪温度勾配培養装置(バイオフィオトレコーダーTVS126MA)により測定した。各菌株はBHIにて温度37℃、16時間振盪下で前培養した。初発菌数が $10^3$  cfu/mlになるように調製したBHI培養液はL型培養管12本に、それぞれ16mlずつ採取し各温度下で24時間振盪温度勾配装置にて培養した。温度勾配は低温側を10℃、高温側を55℃に設定(12水準:10、16、20、23、26、30、34、37、40、45、50および55℃)し、回転数50 rpmで行った。培養中の菌数の変化は

OD 660nmによる濁度を連続的に計測した。SEA 測定のためのサンプリングは培養開始から 12 時間までを 2 時間ごとに、その後 24 時間目に、それぞれの培養管から 10 ml ずつ採取した。各試料中の SEA は検量線の範囲内の濃度になるように VIDAS SET kit の緩衝液で一定量に希釈した後、miniVIDAS で定量した。

## 6 乳固形濃度の異なる脱脂乳における各菌株の増殖特性およびエンテロトキシンの産生試験

脱脂乳の実験には生産工場（北海道）より乳固形濃度が 48% のもの入手し、一般細菌数が 10 cfu/g 以下、また黄色ブドウ球菌が陰性であることを確認してから用いた。これを滅菌水により乳固形濃度が 10%、25% および 35% になるように調製し、それぞれに初発菌数が  $10^3$  cfu/ml になるように前培養にて調製した培養液を添加した。各脱脂乳は 1 菌株につき 3 本の L 型培養管に 16ml ずつ採取した（1 菌株につき 3 本×4 菌株、計 12 本）。培養は温度勾配バイオフォトレコーダー（ADOVANTEC TN2612）により温度を 40°C に固定し、回転数 50 rpm の条件下で 24 時間連続培養した。サンプリングは培養開始から 12 時間までを 2 時間ごとに、その後 24 時間目に 10 ml ずつ採集し、それぞれ菌数計測と SEA 産生量を測定した。各試料中の SEA は検量線の範囲内に入るように VIDAS SET kit の緩衝液で一定量に希釈し測定した。

## C 研究結果

### 1 BHI 培地における各菌株の増殖特性および SEA 産生量の比較

IWATE (Ⅲ) 株の各温度における増殖特性を図-1 に、また SEA 産生量に及ぼす温度の影響を表-1 にまとめた。IWATE 株の増殖可能な

温度帯は 20°C~45°C の範囲内であり、至適温度は 40°C であった。したがって、16°C 以下の場合には増殖が著しく遅く、また 50°C 以上では増殖が不可能であるものと判断された。

一方、各温度における SEA の産生において、SEA の産生が確認された時間は 30°C から 45°C の温度帯では培養開始 4 時間後、26°C では 8 時間後、23°C では 10 時間後、20°C では 24 時間後であり、これ以外の温度帯では SEA の産生が認められなかった。また培養開始 24 時間後の SEA 産生量は 40°C が 10,687 ng/ml で最も多く、次いで 37°C (6,454 ng/ml)、45°C (6,067 ng/ml)、30°C と 34°C (4,845 ng/ml)、26°C (2,329 ng/ml)、23°C (21 ng/ml) および 20°C (12 ng/ml) の順であった。

SBH-51 (Ⅵ) 株の各温度における増殖特性を図-2 に、また SEA 産生量の実験結果を表-2 に示した。SBH-51 (Ⅵ) 株の増殖可能な温度帯は 23°C~45 の範囲内であり、SEA の産生量は各温度帯とも IWATE 株と比較して約 1/20 以下であった。24 時間後の SEA 産生量は 40°C が 466 ng/ml で最も多く、次いで 30°C (423 ng/ml)、34°C (370 ng/ml)、26°C (354 ng/ml)、37°C (278 ng/ml) および 45°C (159 ng/ml) の順であった。

SBH-57 (Ⅶ) 株の各温度における増殖曲線を図-3 に、また SEA 産生量の実験結果を表-3 にまとめた。本菌株の増殖可能な温度帯は 20°C から 45°C の範囲内であるが、IWATE 株や SBH-51 と比較して 45°C での増殖が悪い傾向にあった。なお、菌増殖の至適温度は 40°C であった。SEA の産生において、増殖の至適温度は 40°C であるのに対して、SEA 産生の至適温度は 33°C から 36°C の温度領域であった。また培養開始 24 時間後の SEA 産生量は 37°C が 3,700 ng/ml で最も多く、次いで 34°C (3545 ng/ml)、40°C (2051 ng/ml)、30°C (1608 ng/ml)、

45°C (1575 ng/ml)、26°C (971 ng/ml)、23°C (13 ng/ml) および 50°C (0.05 ng/ml) の順であった。

SBH-67 (IV) の各温度における増殖曲線を図-4 に、また SEA 産生量の実験結果を表-4 にまとめた。本菌株の増殖可能な温度帯は SBH-57 (VII) 株と非常に類似していた。一方、各温度における SEA の産生では培養開始 12 時間後に最大となった温度は 40°C であったが、24 時間後では 30°C と異なっていた。この理由については不明であり、今後の研究課題として精査する必要がある。

以上の実験結果から、BHI 培地において黄色ブドウ球菌<sup>1</sup> SEA 産生の温度帯は菌株により若干異なるものの培養開始 12 時間目では 23°C ~ 45°C の範囲内であり、20°C 以下あるいは 50°C 以上では SEA の産生を確認できなかった。しかしながら、24 時間後では 20°C および 50°C においても SEA の産生が僅かながら認められた。

BHI 培地において、エンテロトキシン産生の至適温度は各菌株により僅かに異なるものの、菌数増加の至適温度はいずれの株も 40°C であることから、濃縮脱脂乳中での実験では培養温度を 40°C に固定して試験した。

## 2 乳固形濃度の異なる脱脂乳における各菌株の増殖特性およびエンテロトキシンの産生

各黄色ブドウ球菌の増殖および SEA 産生に及ぼす脱脂乳固形濃度の影響について試験した。その実験結果は図-5 から図-8 にまとめた。初発菌数約  $10^3$  cfu/ml 接種において、いずれの菌株も 40°C では培養開始 2 時間目より菌数の増加が観察された。定常期に達した時間は IWATE (III)、SBH-51 (VI) および SBH-67 (IV) が 8 時間目であったが、SBH-57 (VII) は 10 時

間後であった。また、菌数増加の程度は、いずれの菌株も乳固形濃度が高くなるに伴い遅くなる傾向にあった。

一方、SEA の産生において、SEA 産生時間と菌数との関係を調べたところ、いずれの菌株においても 10% 脱脂乳では菌数が約  $10^7$  cfu/ml、25% 脱脂乳では約  $10^6$  cfu/ml、35% 脱脂乳では約  $10^5$  cfu/ml に達した時点から SEA の産生が確認された。また SEA が検出された時間は、いずれの菌株も固形濃度の影響を受けずに培養開始から 6 時間後であった。

次に、各菌株の SEA 産生量に及ぼす乳固形濃度の影響について解析した。

IWATE (III) 株の 12 時間後の SEA 産生量は 10% 脱脂乳で最も多く約 322 ng/ml、25% 脱脂乳では約 76 ng/ml、35% 脱脂乳では約 41 ng/ml であり、乳固形濃度が高くなるにしたがって減少する傾向にあった。また 24 時間後では 10%、25% および 35% 脱脂乳で、それぞれ約 1065 ng/ml、243 ng/ml および 265 ng/ml であり、25% および 35% 脱脂乳では差が認められなかった (図-5)。さらに、BHI 培地での SEA 産生量 (40°C、24 時間培養で 10686 ng/ml) と比較すると、10% 脱脂乳では約 1/10 以下、また 25% と 35% 脱脂乳ではおおよそ 1/40 以下であることが判った。

SBH-51 (VI) 株の SEA 産生量は乳固形濃度の影響をほとんど受けず、培養開始 12 時間後では 26~47 ng/ml、また 24 時間後でも約 120~160 ng/ml の範囲内であった (図-7)。BHI 培地での SEA 産生量 (40°C、24 時間培養で 466 ng/ml) との比較では IWATE 株よりも大きな差はなく、約 1/3 程度であった。

SBH-57 (VII) 株の培養開始 12 時間後の SEA 産生量 (図-7) は乳固形濃度に影響し、10%、25% および 35% 脱脂乳では、それぞれ約 98 ng/ml、77 ng/ml および 15 ng/ml であった。

また 24 時間後では 414 ng/ml、275 ng/ml および 207 ng/ml であり、BHI 培地 (2051 ng/ml) と比較して、各乳固形濃度とも、約 1/5 から 1/10 程度低い SEA 産生量であった。

SBH-67 (IV) において培養開始 12 時間後の SEA 産生量 (図-8) は乳固形濃度に影響し、10%、25% および 35% 脱脂乳では、それぞれ約 295 ng/ml、65 ng/ml および 30 ng/ml であった。しかしながら、24 時間後においては 10% と 25% 脱脂乳で差がなく、ともに約 500 ng/ml 程度の産生量であった。また BHI 培地 (6542 ng/ml) との比較では、10% および 25% 脱脂乳では約 1/13、35% 脱脂乳では約 1/40 以下の低い産生量であった。

## D 結論

### 1 BHI 培地での実験結果

食中毒由来の黄色ブドウ球菌 4 株 [IWATE (Ⅲ)、SBH-51 (VI)、SBH-57 (VII) および SBH-67 (IV)] について、最初に各菌株の特性を把握するために、BHI 培地を用いて振盪温度勾配培養装置により増殖曲線とエンテロトキシン産生量を試験した。

- 1) BHI 培地を用いた 24 時間培養において、黄色ブドウ球菌 SEA 産生の温度帯は 20°C ~ 50°C の範囲内であり、16°C 以下あるいは 55°C では SEA の産生を確認できなかった。
- 2) 各菌株の増殖の至適温度は 40°C であったが、SEA 産生量が最大となる温度は菌株により異なり、IWATE (Ⅲ) と SBH-51 (VI) は 40°C であるのに対して、SBH-57 (VII) は 36°C、SBH-67 (IV) では 30°C と 40°C の 2 極化が認められた。
- 3) 培養開始 24 時間後の SEA 産生量は IWATE (Ⅲ) が 10,687 ng/ml (40°C) でもっとも多く、次いで SBH-67 (IV) が 8,280 ng/ml

(30°C)、SBH-57 (VII) が 3,696 ng/ml (36°C) および SBH-51 (VI) が 466 ng/ml (40°C) の順であった。

### 2 脱脂乳での実験結果

BHI 培地において、エンテロトキシン産生の至適温度は各菌株により異なるものの、菌数増加が最も早い温度は 40°C であることから、濃縮脱脂乳中での実験では培養温度を 40°C に固定して試験した。

- 1) 10% 脱脂乳において、24 時間後の SEA 産生量は IWATE (Ⅲ) が 1,065 ng/ml でもっとも多く、次いで SBH-67 (IV) が 500 ng/ml、SBH-57 (VII) が 414 ng/ml および SBH-51 (VI) が 118 ng/ml の順であった。
- 2) 25% 脱脂乳の実験において、24 時間後の SEA 産生量は SBH-67 (IV) が 451 ng/ml、SBH-57 (VII) が 275 ng/ml、IWATE (Ⅲ) が 243 ng/ml および SBH-51 (VI) が 164 ng/ml の順であった。
- 3) 35% 脱脂乳の実験において、24 時間後の SEA 産生量は IWATE (Ⅲ) が 265 ng/ml でもっとも多く、次いで SBH-57 (VII) が 207 ng/ml、SBH-67 (IV) が 168 ng/ml、および SBH-51 (VI) が 129 ng/ml の順であった。
- 4) 各菌株の SEA 産生量に及ぼす脱脂乳固形濃度の影響結果を表-5 にまとめた。

以上の実験結果から各黄色ブドウ球菌の脱脂乳中での SEA 産生量は、BHI 培地と比較して約 1/5 ~ 1/10 以下であり、また乳固形濃度が高くなるに伴い減少する傾向にあった。

なお、各菌株の培養開始 12 時間後および 24 時間後の SEA 産生量の比較を表-6 にまとめた。

## E 考察

平成 16 年 4 月から施行される脱脂粉乳の製造基準では、加熱殺菌後から乾燥を行なうまでの工程において原料を摂氏十度以下又は摂氏四十八度を超える温度に保たなければならない。ただし、当該工程において用いるすべての機械の構造が外部からの微生物による汚染を防止するものである場合又は原料の温度が摂氏十度を超え、かつ、摂氏四十八度以下の状態の時間が六時間未満である場合に合っては、この限りでない。といった改正がなされた。

本実験に用いた黄色ブドウ球菌 4 菌株のうち、2 菌株はわずかではあるが BHI、50°C 培養下でも SEA を産生した。しかしながら、脱脂乳中での SEA 産生量は BHI と比較して 1/5 から 1/10 以下であることから、この程度の SEA 産生量では、脱脂乳中では危害にならないものと推察された。したがって、上記の規格基準（原料を摂氏十度以下又は摂氏四十八度を超える温度に保たなければならない）を十分反映した結果であるものと判断された。また、乳固形濃度の異なる脱脂乳の実験においてもエンテロトキシンの産生が確認された時間は 6 時間目からであり、規格基準を支持する結果が得られた。

## F 参考資料

- 1) 乳及び乳製品等の規格基準の改正について(1)－脱脂乳の製造基準、乳の殺菌基準について 鶴見和彦、食品衛生研究、Vol 53(2)7－19、(2003)

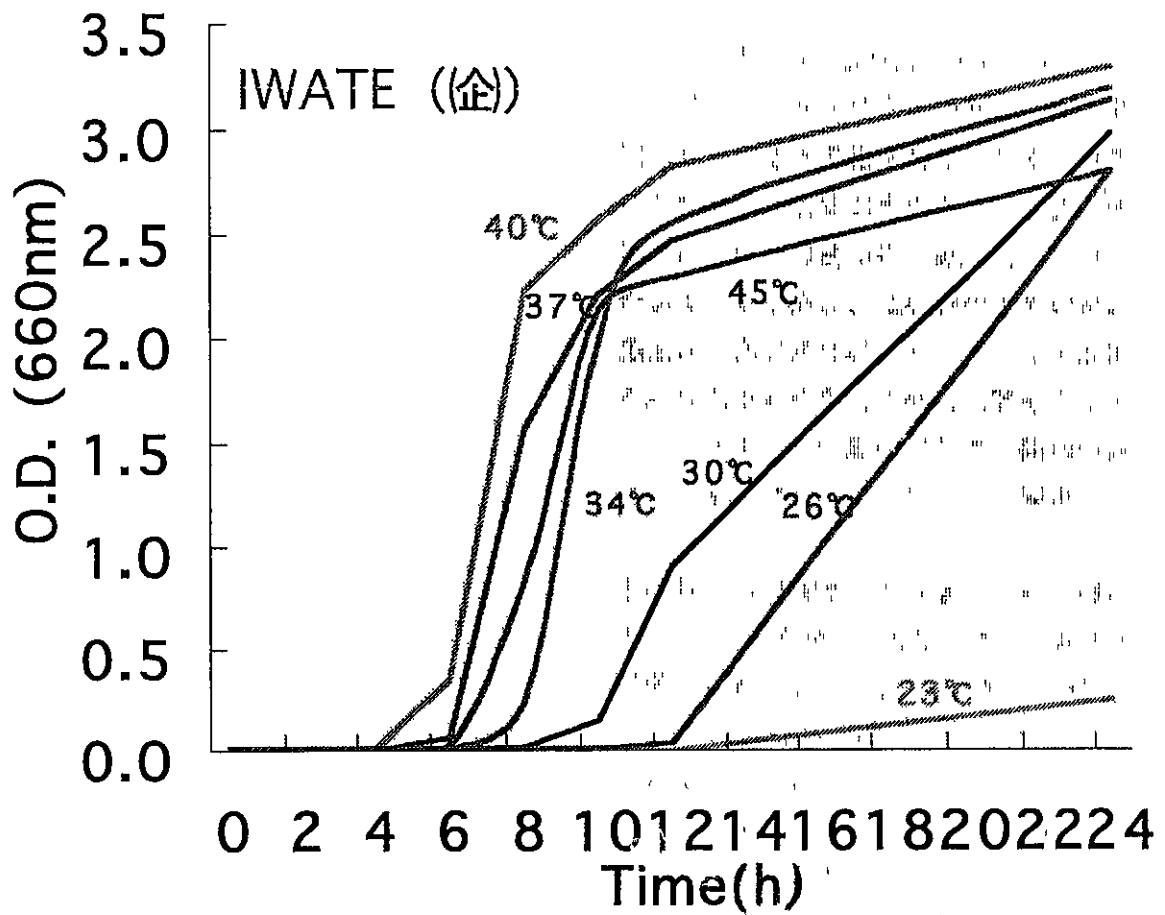


図-1 IWATE (III) 株の各温度における増殖曲線

表 - 1 IWATE (III) 株の各温度におけるSEA産生量  
単位(ng/ml)

培養時間 (h)	培養温度(°C)											
	10	16	20	23	26	30	34	37	40	45	50	55
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0.05	0.07	0.14	0.38	0.16	0	0
6	0	0	0	0	0	0.13	0.58	4.96	33.87	4.20	0	0
8	0	0	0	0	0.09	0.73	301.54	227.89	512.57	119.04	0	0
10	0	0	0	0.07	0.33	7.70	574.76	922.01	1149.35	999.54	0	0
12	0	0	0	0.12	2.36	95.10	1164.34	1904.22	2970.75	1683.48	0	0
24	0	0	1.18	20.52	2329.79	4845.33	4845.33	6454.49	10686.86	6066.85	0	0

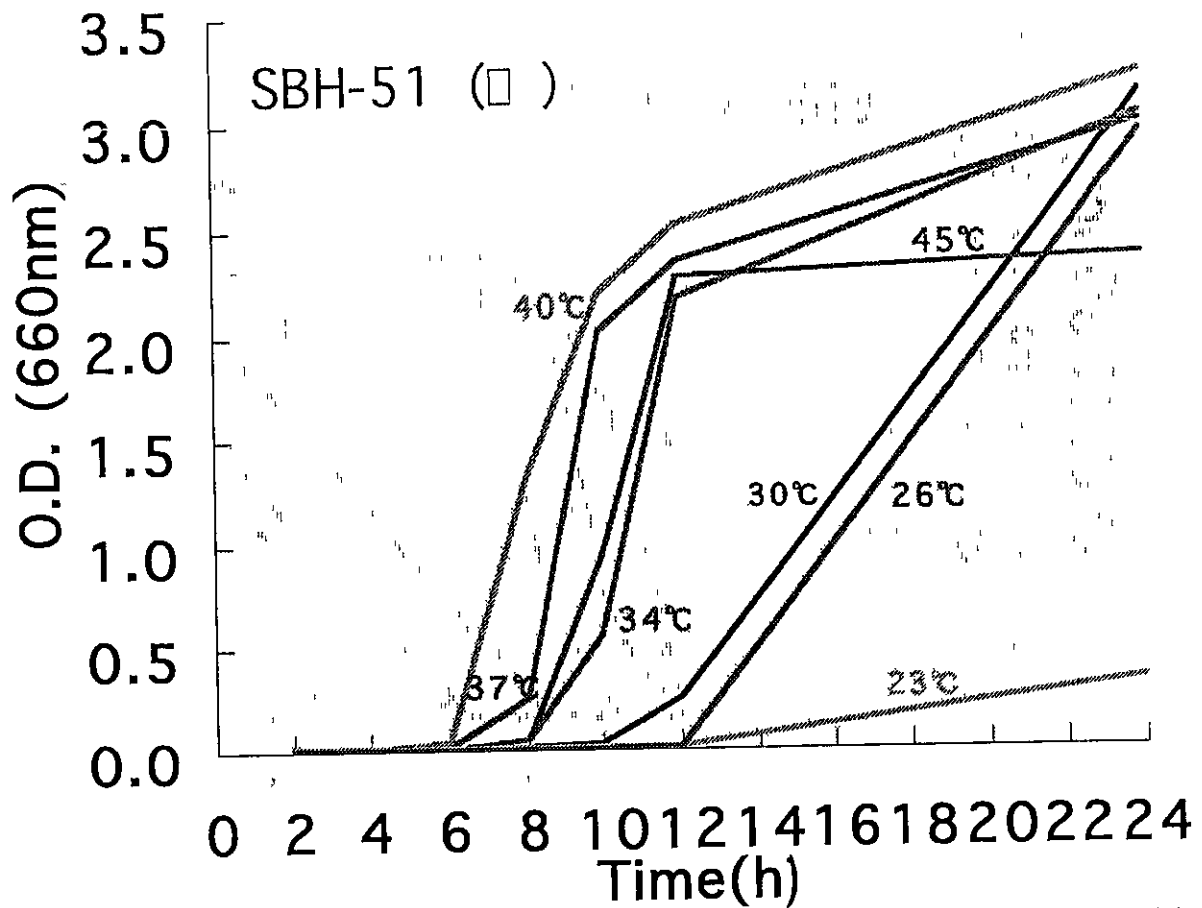


図-2 SBH-51 (VI) 株の各温度における増殖曲線

表 - 2 SBH-51 (VI) 株の各温度におけるSEA産生量

単位 (ng/ml)

培養時間 (h)	培養温度(°C)											
	10	16	20	23	26	30	34	37	40	45	50	55
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0.05	0.05	0.06	0.05	0	0
6	0	0	0	0	0	0.05	0.10	0.30	0.99	0.09	0	0
8	0	0	0	0	0.05	0.10	1.47	16.02	46.56	1.18	0	0
10	0	0	0	0	0.08	3.51	84.05	132.40	140.85	23.99	0	0
12	0	0	0	0	0.24	12.42	202.83	172.18	157.66	126.20	0	0
24	0	0	0	8.56	354.45	423.01	370.49	278.54	466.03	158.87	0	0



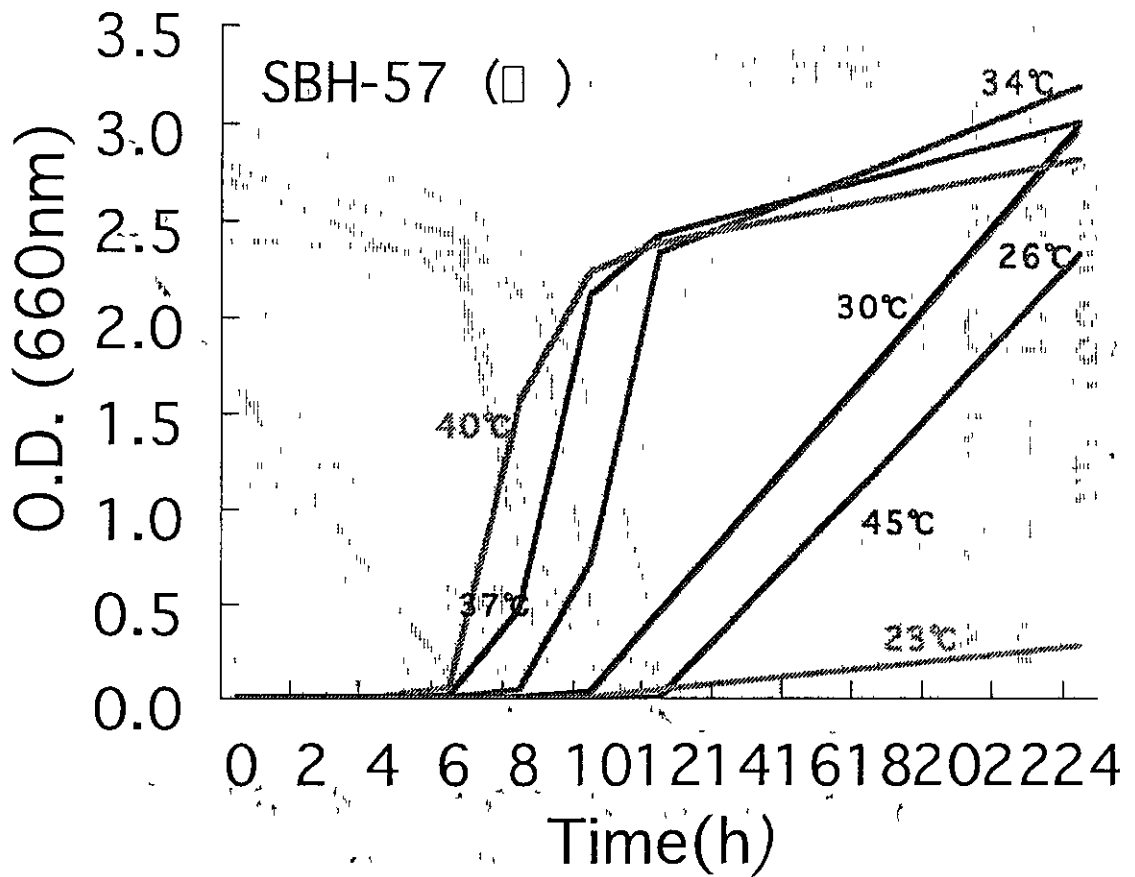


図-3 SBH-57 (VII) 株の各温度における増殖曲線

表 - 3 SBH-57 (VII) 株の各温度におけるSEA産生量  
単位 (ng/ml)

培養時間 (h)	培養温度(°C)											
	10	16	20	23	26	30	34	37	40	45	50	55
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0.05	0.06	0.09	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0.12	0.52	2.82	0	0	0
8	0	0	0	0	0.06	0.17	1.75	31.62	204.27	0	0	0
10	0	0	0	0	0.11	1.69	52.73	465.88	159.32	0.05	0	0
12	0	0	0	0	0.47	15.58	626.07	756.33	700.89	0.27	0	0
24	0	0	0	13.30	971.42	1607.75	5354.54	5369.98	2051.28	1574.62	0.05	0

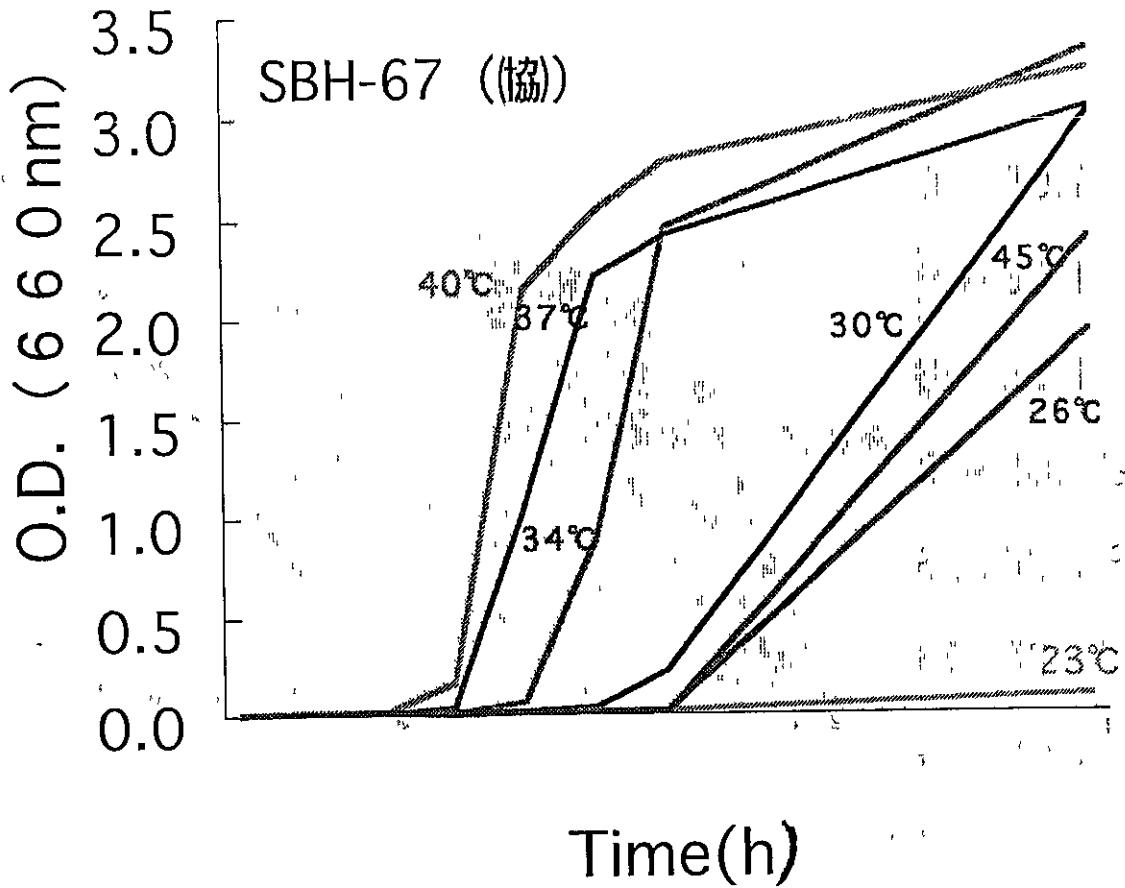


図-4 SBH-67 (IV) 株の各温度における増殖曲線

表 - 4 SBH-67 (IV) ) 株の各温度におけるSEA産生量  
単位(ng/ml)

培養時間 (h)	培養温度(°C)											
	10	16	20	23	26	30	34	37	40	45	50	55
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0.06	0.10	0.18	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0.07	0.24	2.63	10.23	0	0	0
8	0	0	0	0	0.06	0.25	3.37	86.81	629.41	0	0	0
10	0	0	0	0	0.13	2.46	86.25	932.47	1916.05	0.05	0	0
12	0	0	0	0.26	0.71	21.90	1185.61	1586.12	22827.41	0.25	0	0
24	0	0	0.35	8.62	1258.81	8279.82	25832.46	5603.56	542.38	853.86	0.11	0

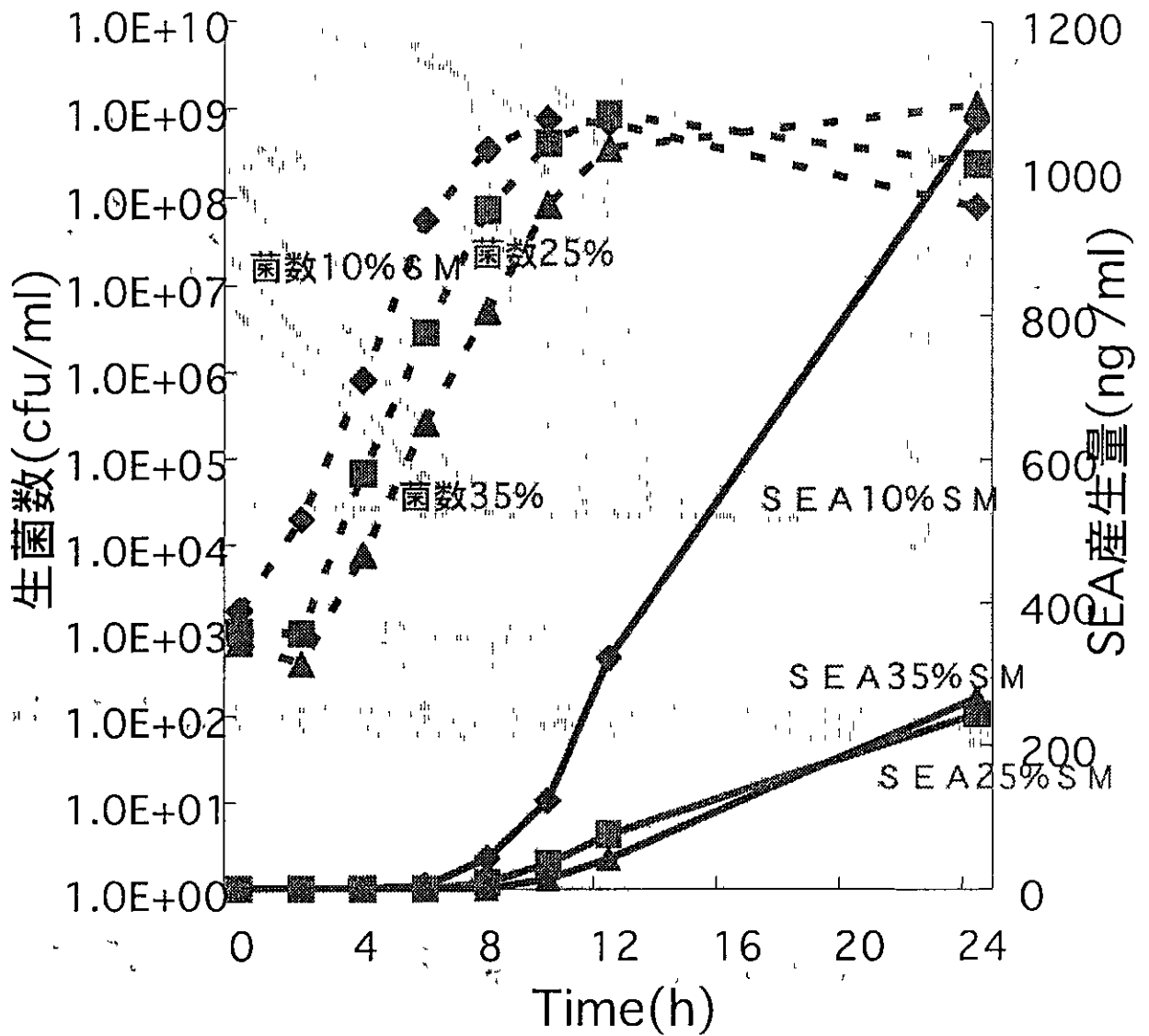


図-5 IWATE (III) 株の増殖およびSEA産生に及ぼす脱脂乳固形濃度の影響

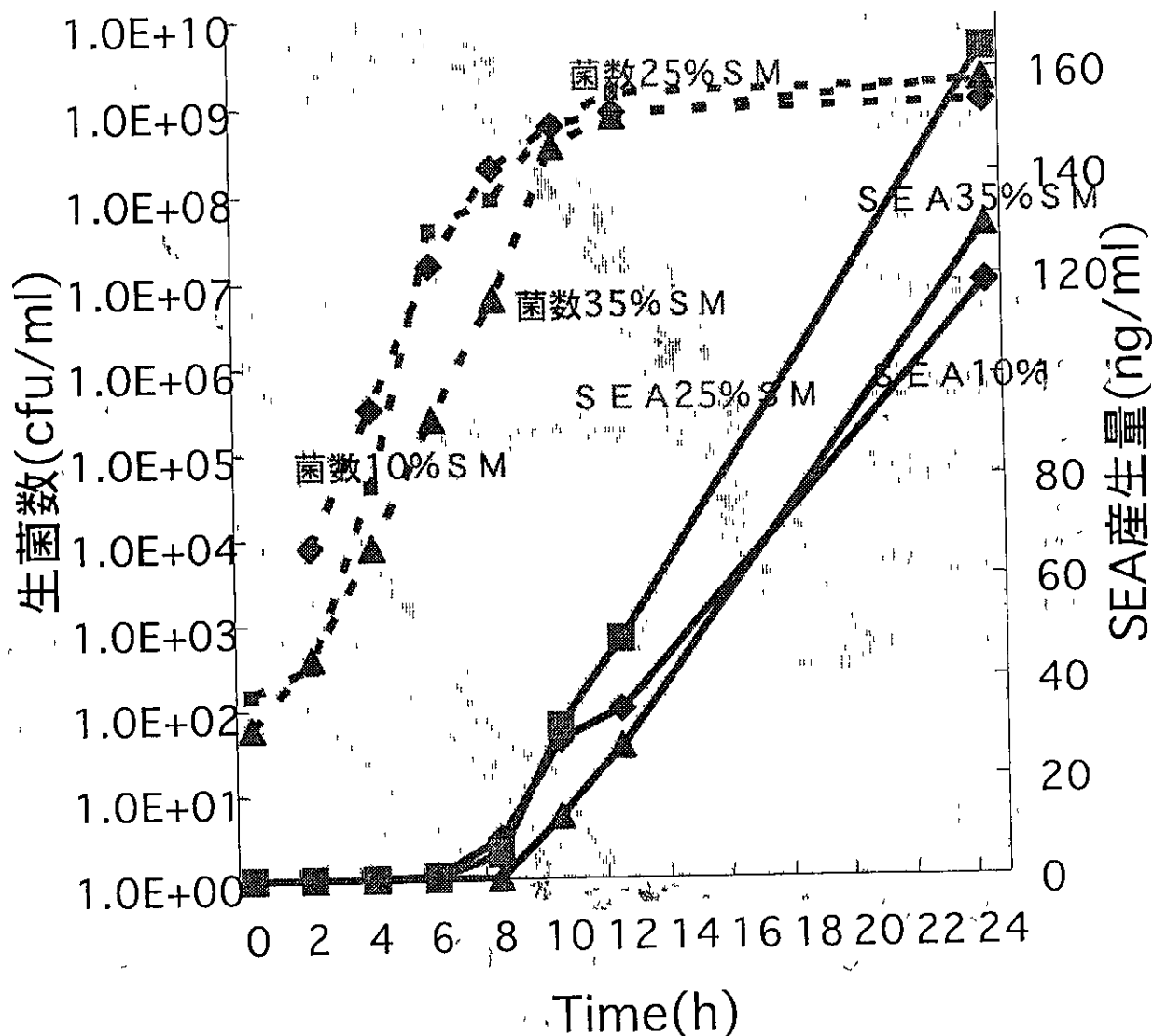


図-6. SBH-51 (VI) 株の増殖およびSEA産生に及ぼす脱脂乳固形濃度の影響

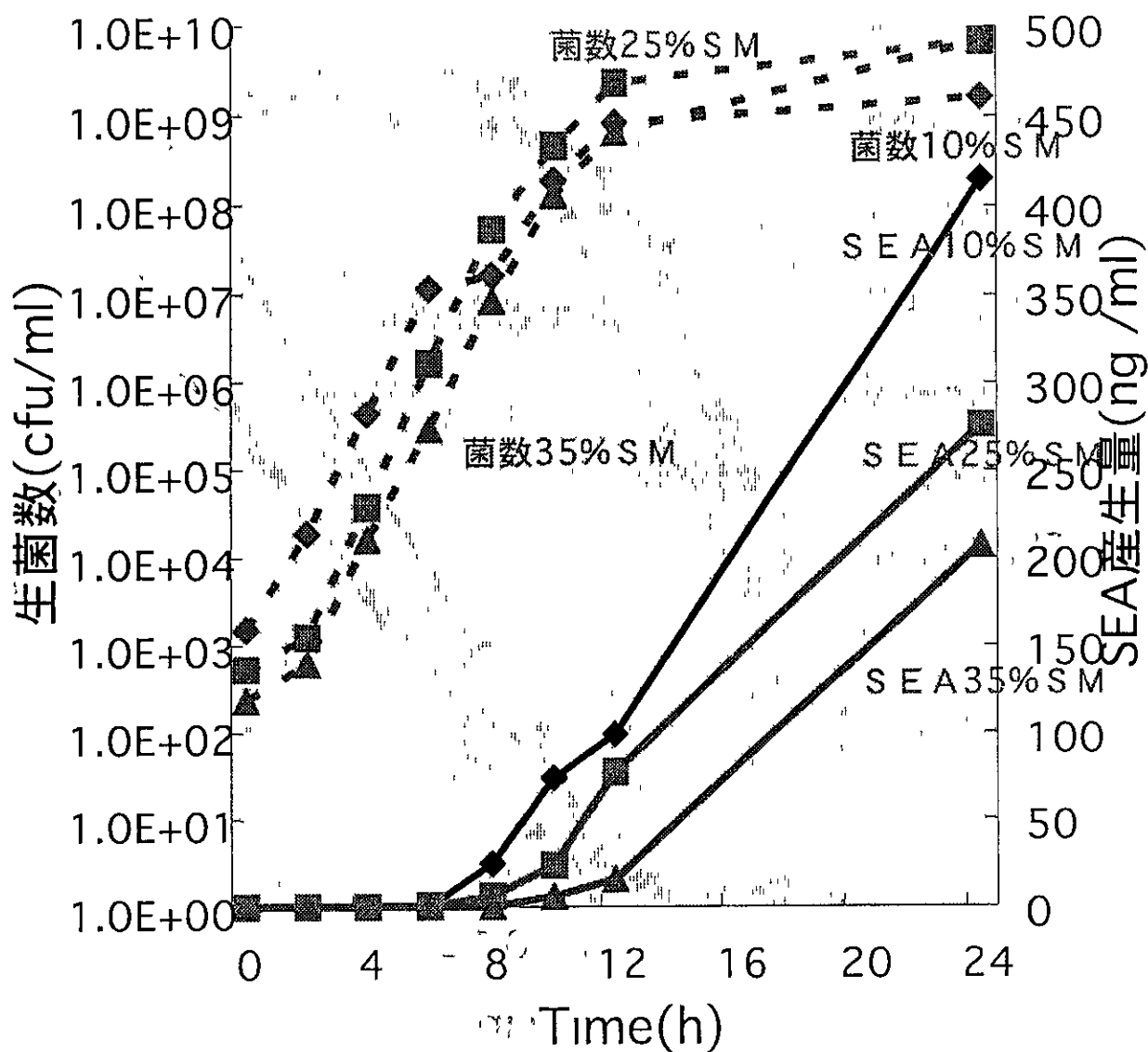


図-7 SBH-57 (VII) 株の増殖およびSEA産生に及ぼす脱脂乳固形濃度の影響

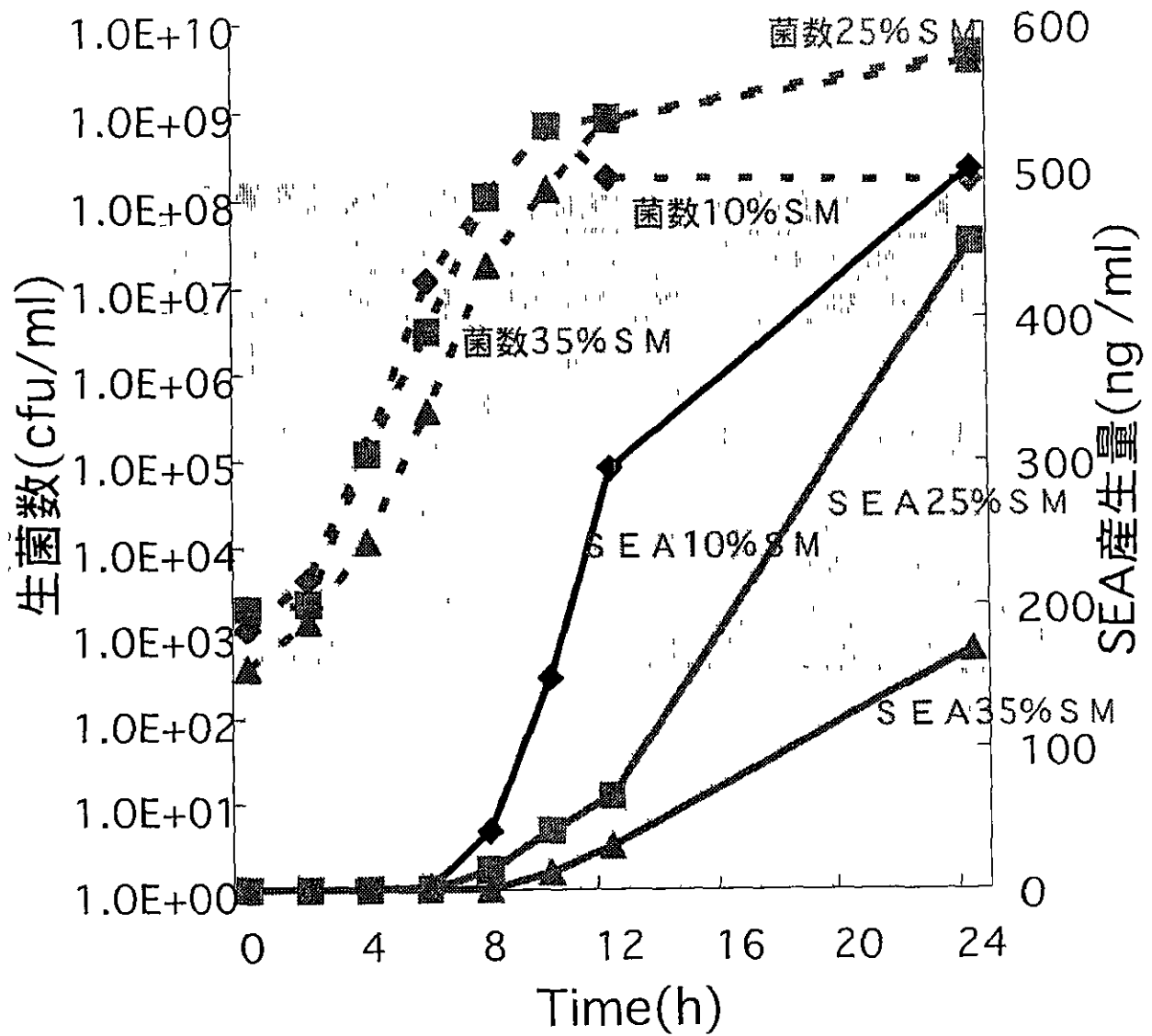


図-8 SBH-67 (IV) 株の増殖およびSEA産生に及ぼす脱脂乳固形濃度の影響

表-5 各菌株のSEA産生に及ぼす脱脂乳固形濃度の影響

時間 (h)	IWATE (金)			SBH-51 (口)			SBH-57 (口)			SBH-67 (金)		
	10%	25%	35%	10%	25%	35%	10%	25%	35%	10%	25%	35%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5.8	0.3	0.1	0.7	0.4	0.1	0.4	0.2	0.1	1.5	0.2	0.1
8	41.8	8.8	0.2	8.0	4.9	0.7	24.3	5.9	0.5	54.1	13.5	0.1
10	163.1	34.6	13.5	27.7	30.5	12.4	73.6	23.3	5.6	148.5	40.9	12.0
12	322.4	75.5	41.1	33.8	47.9	26.5	98.4	76.7	15.3	294.7	65.3	30.0
24	1064.9	242.6	265.1	118.4	163.8	129.2	415.0	275.4	207.0	500.9	451.3	168.2

単位 ng/ml

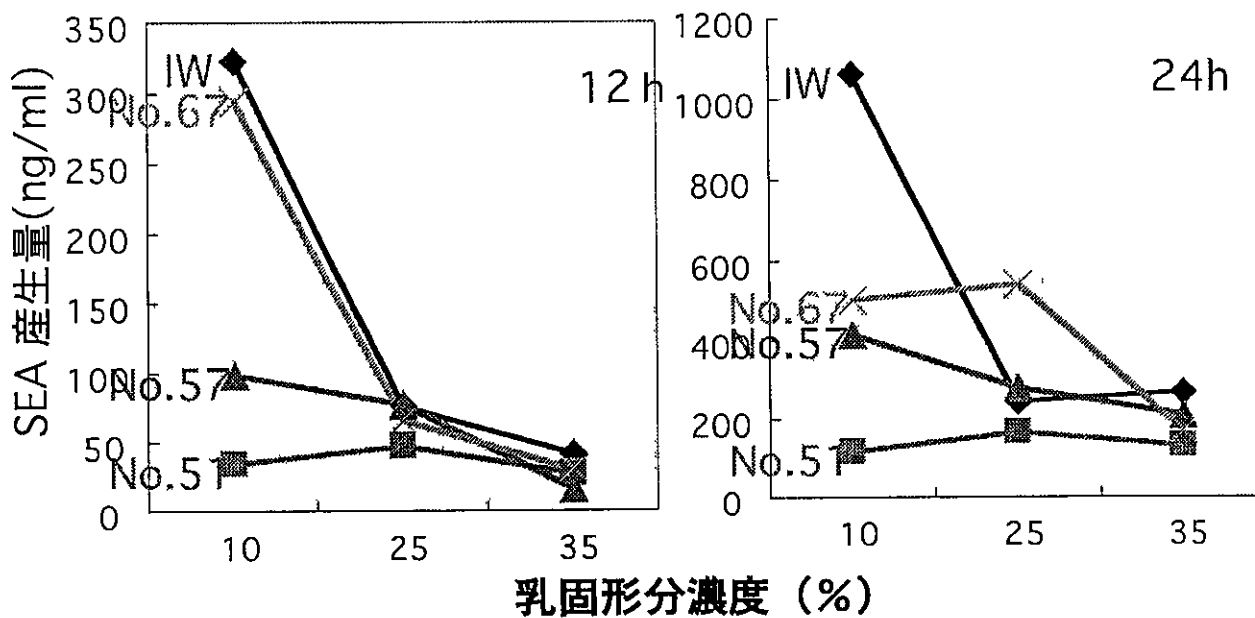


表 - 6 各菌株のSEA産生量の比較

培地	IWATE(III)		SBT51株(VI)		SBT57株(VII)		SBT67株(IV)	
	12h	24h	12h	24h	12h	24h	12h	24h
BHI	2970.75	10686.80	157.65	466.08	700.89	2051.23	2827.41	6542.38
10%SM	322.40	1064.90	33.80	118.37	98.37	415.08	294.68	500.90
25%SM	75.55	242.68	47.84	163.84	76.69	275.48	65.33	537.48
35%SM	41.03	265.08	26.48	129.47	15.30	206.96	29.96	168.21

培養温度40℃での比較

(ng/ml)



## II. 分担研究報告書

### II-1.

#### 食鳥肉のカンピロバクターの定量的危害評価と処理工程でのコントロール方法

- II-1-1 鶏におけるカンピロバクター汚染  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-2 食鳥処理場カット室内におけるカンピロバクター汚染状況と保菌ロットとの関係についての研究  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-3 大規模食鳥処理場併設食肉処理施設におけるカット鶏肉のカンピロバクター汚染状況  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-4 食鳥処理場におけるカンピロバクターの定量的汚染調査  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-5 一食鳥処理場の処理・加工工程における *Campylobacter jejuni* 汚染実態と制御法に関する調査研究  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-6 *Campylobacter jejuni* の凍結・解凍処理に対する生残性  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-7 迅速検査キット「シングルパスカンピロバクター」を用いた鶏糞便からのカンピロバクター直接検出の試み  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-8 食鳥処理場におけるカンピロバクターの定量的汚染調査  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-9 *Campylobacter jejuni* ヒト及び市販鶏肉由来株の鶏腸管内における増殖性  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-10 *Campylobacter jejuni* のハイオフィルム形成能と市販鶏肉皮膚への付着性との関連性について  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-11 カンピロバクターによる食中毒事件発生時の検査法に関する研究  
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-12 パルスフィールド ゲル電気泳動 (PFGE) 法による Penner D 群及び O 群 *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別に関する研究  
品川邦汎（岩手大学農学部）

平成15年度厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

3 液卵製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究者 高鳥浩介 国立医薬品食品衛生研究所

液卵製造の高度衛生管理に資する調査研究を以下の3項目について実施した。

(1) 中小規模の液卵製造工場における高度衛生管理に向けた HACCP 作成を目的として製造工程、作業ライン、導線の現場を確認し、その現状を解析した。手割りによる小規模液卵工場において協力を得て実際の工程を調査し年間を通して検体を採取し、解析した。

(2) 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や流通液卵の現状について解析した。液卵による最近5年間（平成10 - 14年度）の食中毒事例をまとめ、摂取菌数に関する情報を整理した。また、国内の流通液卵1327検体についての調査データから細菌学的解析を行った。

(3) 液卵および鶏卵に関連する食中毒細菌であるサルモネラに関する基礎研究では、製造工程環境を模する条件下でのサルモネラの生存性に関する研究および Looped-mediated isothermal amplification 法を用いた液卵のサルモネラ検査法の検討および分離菌株の細菌学的解析を行い、サルモネラ汚染制御に資する成果を得た。また、鶏卵の汚染を防御するための養鶏場での調査が行われた。さらに、製造後の液卵の保存において業務用の大型容器入り液卵の温度を下げるには長時間を要し、その間にサルモネラ汚染のある液卵においては増殖がおこる可能性が明らかになった。

研究協力者

工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所  
尾上洋一 神奈川県衛生研究所  
古川一郎 神奈川県衛生研究所  
柳川敬子 埼玉県衛生研究所  
大塚加代子 埼玉県衛生研究所  
杉山 明 三重県科学技術振興センター  
山内昭則 三重県科学技術振興センター  
岩出義人 三重県科学技術振興センター  
甲斐明美 東京都立衛生研究所  
小西典子 東京都衛生研究所  
下島優香子 東京都衛生研究所  
尾畑浩魅 東京都衛生研究所

中川 弘 (財)東京顕微鏡院  
高橋淳子 (財)食品薬品安全センター  
青森県健康福祉部  
秋田県生活環境文化部  
宮城県環境生活部  
栃木県保健福祉部  
神奈川県衛生部  
長野県衛生部  
静岡県健康福祉部  
大阪府健康福祉部  
兵庫県県民生活部  
広島県福祉保健部  
山口県環境生活部 (次頁に続く)

(研究協力者続き)

徳島県保健福祉部

長崎県生活衛生課

福岡県保健福祉部

仙台市健康福祉局

大阪市環境科学研究所

神戸市保健福祉局

広島市保健所

倉敷市保健所

福岡市環境局

下記の地方自治体の担当部局

北海道、札幌市、小樽市、函館市、青森県、秋田県、秋田市、宮城県、仙台市、山形県、福島県、栃木県、宇都宮市、群馬県、茨城県、埼玉県、さいたま市、川越市、千葉県、千葉市、船橋市、東京都、東京特別区（足立区、荒川区、板橋区、江戸川区、大田区、北区、江東区、(次項に続く)

杉並区、墨田区、世田谷区、台東区、豊島区、中央区、千代田区、中野区、港区)、神奈川県、横浜市、相模原市、横須賀市、新潟県、新潟市、富山県、富山市、石川県、金沢市、長野県、長野市、山梨県、岐阜市、静岡県、静岡市、浜松市、愛知県、豊田市、豊橋市、名古屋市、岡崎市、三重県、滋賀県、京都府、京都市、大阪府、大阪市、堺市、高槻市、兵庫県、神戸市、西宮市、尼崎市、奈良県、奈良市、和歌山市、広島県、広島市、福山市、呉市、岡山県、岡山市、倉敷市、山口県、香川県、高松市、愛媛県、松山市、徳島県、高知県、高知市、福岡県、福岡市、北九州市、大牟田

市、長崎県、長崎市、佐賀県、大分県、大分市、熊本県、熊本市、宮崎県、宮崎市、鹿児島市、沖縄県

#### A 研究目的

中小規模の液卵製造工場における高度衛生管理は今までほとんど調査研究されておらず、特に食中毒原因菌として注目されるサルモネラに焦点を合わせて研究を以下の目的で行った。

- 1) 中小規模液卵工場の衛生管理の現状に関する研究では、中小規模の液卵製造工場の衛生管理をして HACCP マニュアルを作成するにあたり、製造工程、製造基準の遵守および衛生管理状況の現状を把握する。さらに小規模液卵工場の製造工程および作業内容全体から製造工程での問題点を抽出し、年間を通して検体を採取し、解析した。
- 2) 食中毒および液卵製造の現状に関する研究では、厚生労働省の細菌性食中毒事例の統計から、最近5年間の液卵を原因食品とした事例を収集し解析した。日本ではサルモネラ食中毒が長年多く発生し、特に鶏卵に関連した食中毒が主である。また、血清型 Enteritidis が食中毒の病因として主である。サルモネラの感染を引き起こす菌数についてはこれまでにホランティアによる摂取実験や食中毒事例が

らの推定など情報があるか、特に血清型 Enteritidis に限定してのデータは少ない。また、国内の液卵 1327 検体についての調査データから細菌学的解析を行った。

- 3) サルモネラに関する研究として、サルモネラ食中毒防止のための基礎研究を行った。Salmonella は低水分活性下での生残性が高いことから、食品工場の環境条件と S Enteritidis の生残性を探るため、相対湿度の影響を検討した。特に原料卵に由来する Salmonella Enteritidis が卵黄、卵白に包含され製造環境を汚染した時の生残性について、モデル試験を行った。また、液卵製造施設のサルモネラ汚染を管理するにあたり、遺伝子学的手法を用いた LAMP (Looped-mediated isothermal amplification) 法が有効な検査方法であるかを公定法と比較検証した。さらに、養鶏場に由来する Salmonella sp による食中毒防止を図るための基礎資料を得た。加えて、未殺菌液卵製造におけるサルモネラコントロールに関する研究を行った。業務用液卵 (大容量の液卵) が室温、特に夏季の高温下等に放置されて温度が上昇した後冷蔵庫に移した場合を想定して、冷却に要する時間について検討し、得られた冷却曲線とサルモネラの増殖曲線を比較することで、食中毒予防のための科学的根拠

を得た。

## B 研究調査方法

- 1) 中小規模液卵工場の衛生管理の現状に関する研究

手割りによる割卵作業を主とした小規模液卵工場において、年間を通して工場内機器・器具や製品の細菌についてモニタリングを行った。製造前、製造途中、製造後の時点において製造液卵、割卵台、沈殿槽、液卵保存容器などを検体とし、サルモネラ、一般生菌、グラム陽性菌、グラム陰性菌等を計測した。分離されたサルモネラ株について解析を行った。

- 2) 液卵・鶏卵に関連する食中毒発生や流通液卵の現状について

- (1) 液卵による最近 5 年間 (平成 10 - 14 年度) の食中毒事例における摂取菌数に関する研究

過去 5 年間 (平成 10 - 14 年度) において Salmonella による液卵由来の食中毒事例について特に摂取菌数が判明しているものを含めて収集した。調査は全国の自治体を対象とした。発生年月日、事件番号、食品名、加工方法、原因食品からの菌 (一般生菌数、サルモネラ菌数、血清型) の分離状況、液卵の情報 (殺菌の有無、凍結の有無、加糖・加塩の有無、液卵の種類)、液卵からの菌 (一般生菌数、サルモネラ菌数、血清型) の分離状況、液卵を用いるまでの状況、液卵の原料卵の情報などについて