

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

細菌性食中毒の防止対策に関する研究

主任研究者 熊谷 進

(東京大学大学院生命科学研究科)

分担研究

食品の製造加工機器の衛生管理に関する研究

分担研究者 熊谷 進 (東京大学大学院生命科学研究科)

協力研究報告書

ステンレス表面におけるサルモネラの生残性の検討

研究要旨

食品製造加工施設等における食中毒細菌汚染防止の観点から、食品製造加工施設で汎用されているステンレス表面での食中毒起因菌の挙動を明確にするため、食中毒の発生事例が多く、比較的環境抵抗性が高いと考えられる食中毒起因菌であるサルモネラを用いて、ステンレス表面における菌の生残実験を行った。液卵由来のサルモネラ 2 株 (280 および 54) を用い、トリプトソイブイオン (TSB) および卵黄液で培養、懸濁した後、組成と研磨状況の異なる 4 種類のステンレス板に添加し、シリカゲルを入れたデシケート内に収め 22~23℃で保管した。菌株 280 は 2 日、菌株 54 は 7 日間保管した後、添加部分を綿棒で拭き取ると共に、ステンレス板を PBS で洗い出し菌を回収した。その結果、菌株 280 は、2 日間の保管により生残菌数は添加菌数の 1% 未満となった。菌株 54 は、7 日間保管した後でも、全検体から菌が回収され、一部の検体では添加菌数より回収菌数が高くなった。卵黄液懸濁は TSB 懸濁と比較すると菌の生残性が低い傾向がみられた。綿棒拭き取り及びステンレス洗い出しによる回収菌数を比較すると、綿棒による拭き取りで、ほとんどの検体で 98% 以上の菌が回収可能であった。ステンレスの組成と研磨状況の違いによる生残菌数には明確な差は認められなかった。

研究協力者

三輪憲永

東海大学短期大学部

小沼博隆、高原 理

東海大学海洋学部

A. 研究目的

食品製造施設等において、食品の製造加工に用いられる機械・器具類については、食品衛生法の下に通知として「営業施設基準の準則」が示されており、「機械器具類のうち、食品に直接接触する部分は、耐水性で洗浄し易く、加熱又はその他の殺菌が可能なものであること」とされている。また、日本工業規格（JIS）では、「食料品加工機械の安全性及び衛生に関する設計基準通則—第2部：衛生設計基準 JIS B 9650-2」に、食料品加工機械の安全性及び衛生に関する設計基準が掲げられている。この中で、構成材料については一般要求事項として、「材料は、意図した用途に適し、材料及びコーティングの表面は、意図した用途条件下で耐久性があり、洗浄・清掃しやすく、必要ならば消毒が可能で、破壊がなく、ひび割れ、傷入り、はく離、腐食、摩耗に対して抵抗力があり、好ましくない物質の浸透を防げるもの」、また食品接触部及び食品飛散部の構成材料は、「無害」「食品を汚染せず、又は食品に対して、悪影響を及ぼさない」「非吸収性」「食品、洗剤及び消毒剤に対して防食防錆」「必要に応じて、冷凍、低温殺菌、殺菌などの冷熱処理温度に耐える」との基準が掲げられている。これらの条件を満たす材質の一つとして、ステンレスが挙げられ、多くの食品製造施設等で、ステンレス製の機械・器具類が使用されているおり、JISでは300シリーズ（クロム・ニッケル含有）のステンレス鋼を使用することが望ましいとされている。JIS G0203「鉄鋼用語」

の定義によれば、「ステンレス鋼は鉄に約10.5%以上のクロムを含ませた合金を指し、しばしばニッケルも含まれる」とされており、クロムやニッケルの含有量や表面仕上げによって多くの種類がある。

ステンレス表面に食中毒菌などが付着した場合、どのような挙動をとるのかについてはいくつかの報告があるが、ステンレスの組成や表面仕上げの違いによる生残性の差に関する報告は見当たらない。

以上の背景より、食品製造施設等における食中毒細菌汚染防止の観点から、食品製造加工施設で汎用されているステンレス表面での食中毒起因菌の挙動を明確にするため、食中毒の発生事例が多く、比較的環境抵抗性が高いと考えられる食中毒起因菌であるサルモネラを用いて、JISで推奨されている300シリーズ系のステンレス鋼で、クロム及びニッケル含有量と表面仕上げの異なる4種類のステンレス鋼における菌の生残実験を行った。また併せて、添加に使用した懸濁液による生残性の違い、並びに回収方法に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. ステンレス板

JISで推奨されている300シリーズ系のステンレス鋼で、組成と研磨状況の異なる4種類のステンレス板を用いた（表1）。

2. 試験菌株

液卵由来のサルモネラ2株を用いた（表2）。

3. 試験菌のステンレス板への接種および生残状況確認方法

試験菌のステンレス板への接種および生残状況確認方法の概略を図1に示した。カジトン培地に保存した試験菌をトリプトソイブイオン培地 (OXOID LTD., Basingstoke, England, CM0129; 以下 TSB) および卵黄液 (OXOID SR0047C) 10 mL に接種し、35°C で一晚 (18 - 20 時間) 培養した後、発育菌数をブリリアントグリーン寒天培地 (OXSOID CM0263, 以下 BGM 培地) を用いた寒天平板塗抹法により確認した。培養液を TSB または卵黄液で 10 倍段階希釈し、10 倍 ~ 10⁵ 倍希釈液 50 μ L を各希釈段階 3 枚のステンレス板 (10 mm \times 10 mm) に添加し、シャーレ内に収めた後シリカゲルを入れたデシケータ内で 22 ~ 25°C で保管した。菌株 280 は 2 日目 (48 時間後)、菌株 54 は 7 日目 (168 時間後) に取り出し、PBS を 10 μ L 添加した綿棒 (日本綿棒株式会社、1A754S) で、目視で残存物が残っていない状況まで拭き取った。綿棒および拭き取り後のステンレス板をそれぞれ PBS 10 mL を入れたディスポチューブ (50 mL 容量) に入れ、ボルテックスミキサー (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA) の目盛 5 で 1 分間攪拌した後、それぞれの攪拌液 (綿棒振り出し液およびステンレス板洗い出し液) の菌数を BGM 培地により測定した。菌数が検出限界以下の検体については、増菌培養により菌の生残を確認した。すなわち、攪拌液 5 mL を 45 mL 緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water, BPW,

OXOID) に入れ、35°C で 20-24 時間培養した後、0.5 mL を 10 mL のテトラチオーネ培地 (TT broth, OXSOID) に入れ、42°C で 20 時間培養した。培養液 100 μ L を BGM 培地に塗抹し、35°C で一晚培養して菌の発育の有無を確認した。

C. 結果

1. ステンレス板への添加菌数

各ステンレスに添加した試験菌の菌数を表3に示した。培養液を 10 倍 ~ 10⁵ 倍希釈液し、50 μ L を添加した結果、各ステンレス板に 10² ~ 10⁵ オーダーの菌が添加されたが、卵黄液では TSB と比較して若干菌数が低くなった。

2. 保管中の温度及び湿度

試験菌を接種したステンレス板を保管したデシケータ内の温度及び湿度を図2~5に示した。いずれの実験でも、保管中の温度は、ほぼ 22°C に保たれていた。湿度は試験開始時には 30 ~ 40% であったが、徐々に下降し、10 ~ 15% 程度となった。

3. 菌株及び懸濁溶液による生残菌数の比較

① 菌株 280・TSB 懸濁・2 日間保存

菌株 280 を TSB で培養し、TSB で希釈懸濁してステンレス板に添加した後保存した場合の生残状況を図6~9に示した。2 日間の保管により、全ての検体で生残菌数は 1% 未満となった。いずれのステンレスでも 10⁵ オーダーの添加菌数では直接塗抹で菌を回収可能で、ステンレス No.1 および 3 では、10⁵ オーダー以下の添加菌数でも、直接塗抹で菌を検出可能な検体が多くみられ

た。ステンレス No.2 および 4 では、 10^6 オーダー以下の添加菌数では、1 検体を除いて直接塗抹で菌は検出されず、No.2 の 10^2 添加及び No.4 の 10^3 添加では増菌でも菌の生残は確認できなかった。ステンレス板の洗い出しでは、No.1 の 10^5 オーダーの 1 検体を除いて菌は検出されず、他の検体は綿棒の拭き取りにより 100% 菌を回収可能であった。

② 菌株 280・卵黄液懸濁・2 日間保存

菌株 280 を卵黄液で培養し、卵黄液で希釈懸濁してステンレス板に添加した後保存した場合の生残状況を図 10~13 に示した。保管 2 日で、全ての検体で生残菌数は 1/1000 未満となり、 10^3 以下の添加菌数では全ての検体で菌は検出不能であるなど、TSB 懸濁より生残菌数は低い傾向であった。ステンレスの違いによる生残性については明確な差は認められなかった。ステンレス板の洗い出しでは、全く菌は検出されず、綿棒の拭き取りにより 100% 菌を回収可能であった。

③ 菌株 54・TSB 懸濁・7 日間保存

菌株 54 を TSB で培養し、TSB で希釈懸濁してステンレス板に添加した後保存した場合の生残状況を図 14~17 に示した。7 日間保管した後でも、全検体から菌が回収され、菌株 280 と比較して生残性が高かった。 10^3 オーダー以上添加の検体では、すべての検体で直接塗抹により菌が回収され、添加菌数より回収菌数が高くなるものがみられた。綿棒による拭き取り後でもステンレス板の洗い出しにより 10^4 ~ 10^5 程度の菌が回収される検体が見られたが、ステンレス洗い出しによる回収菌数は

添加菌数の 2% 以下であり、98% 以上は綿棒による拭き取りで回収可能であった。ステンレスの違いによる菌の生残性には明確な差は認められなかった。

④ 菌株 54・卵黄液懸濁・7 日間保存

菌株 54 を卵黄液で培養し、卵黄液で希釈懸濁してステンレス板に添加した後保存した場合の生残状況を図 18~21 に示した。7 日間保管した後でも、全ての検体から菌が回収された。 10^3 オーダー以上添加の検体では、すべての検体で直接塗抹により菌が回収された。ほとんどの検体で接種菌数の 90% 以上の菌が生残しており、100% 以上の回収率となる検体もみられたが、TSB 懸濁と比較すると菌の生残性が低い傾向がみられた。添加菌数、綿棒拭き取り及びステンレス洗い出しによる回収菌数を比較すると、1 検体を除いてステンレス洗い出しによる回収菌数は 2% 以下であり、98% 以上は綿棒による拭き取りで回収可能であった。ステンレスの違いによる回収菌数には明確な差は認められなかった。

D. 考察

菌株 280 は、以前の研究によりバイオフィーム産生性が低く、乾燥条件下での生残期間が比較的短いことが観察された。今回の調査でも菌株 280 はステンレス板上で 2 日間保管にも関わらず、菌株 54 の 7 日間保管と比較して生残性が低かった。一方、菌株 54 はバイオフィーム産生性が高いことが確認されており、種々の条件で菌株 280 と比較して生残性が高いことを確認している。今回の実験でも生残性は極めて高

く、ステンレス板上で7日間保管しても、ほとんど菌数は減少しなかった。また、菌株54では、添加菌数より回収菌数が高くなる場合もみられ、保管時に懸濁液(TSBまたは卵黄液)が乾燥するまでの間に菌が増殖したものと考えられる。実際の食品製造施設においても、機械・器具類を汚染した菌が、状況によっては汚染部位で増殖する可能性があることが示唆された。

菌の懸濁物質についてみると、TSBと比較して卵黄液での生残性が低い傾向がみられ、菌の生残性は菌を懸濁する物質に影響される可能性が示唆された。ステンレス表面に食品残渣が存在すると菌の生残に影響する、あるいはタンパク質などの栄養源に富んだ物質に懸濁した場合は、栄養源に乏しい物質に懸濁した場合より菌が生残しやすいという報告がみられる。今回の実験で使用した懸濁物質はTSBおよび卵黄液で、どちらも栄養源を豊富に含有した物質であったが、TSBの方が卵黄液より生残性が高かった。上述のように、ステンレスに添加した菌が保管中に増殖する可能性があり、TSBは卵黄液と比較して最終発育菌数が高いことから、TSBの方が保管中に菌が増殖しやすく、このことがTSBと卵黄液による生残性の違いに影響している可能性も考えられた。

ステンレス板に付着した菌を回収する方法については、スタンプ法、綿棒やスワブによる拭き取り法あるいは液体中で洗い出すなどの方法が利用されている。スタンプ法は簡便であるが平面以外の部位では使用が困難であり、

凹凸のある場所の汚染調査には適さない。洗い出し法は高い回収率が期待されるが、採取可能なものには大きさの制限がある。綿棒による拭き取りは、曲面や入り組んだ部位でも容易に利用できることから、食品製造施設の機械・器具類の表面など汚染調査に有効な方法となるものと考えられる。今回の結果では綿棒による拭き取りによりほとんどの検体で98%以上の菌が回収可能であり、実際の汚染実態調査においても綿棒による拭き取りで十分な回収率を期待できるものと考えられる。特に菌株280ではほぼ100%回収できたが、これは菌株280の生残菌数が菌株54と比較して少なかったことが影響しているものと考えられる。一方、菌株54では100%の回収率は得られなかったが、生残菌数が多かったため、1本の綿棒では全て拭き取ることが困難であったためと考えられることから、菌数が高い場合は複数の綿棒を用いて拭き取るなど、方法を検討する必要があるだろう。

ステンレス板の違いによる生残状況をみると、菌株280ではTSBに懸濁した場合はN0.1および3のステンレスで若干生残菌数が高くなる傾向がみられたが、菌株280を卵黄液に懸濁した場合や菌株54では明確な差はみられず、実験誤差等を考慮すると、今回の実験ではステンレスの組成と表面仕上げによる菌の生残性の違いを明確にすることはできなかった。

E. 結論

ステンレスにおけるサルモネラの生

残実験を行ったところ、菌株により生残性に大きな差がみられた。生残性の低い菌株（280）では25℃・2日間の保管により生残菌数は添加菌数の1%未満となった。生残性の高い菌株（54）は、25℃・7日間保管した後でも、全検体から菌が回収された。懸濁物質についてみると、卵黄液に懸濁した場合はTSB懸濁と比較して菌の生残性が低い傾向がみられた。菌の回収方法では、綿棒による拭き取りにより、ほとんどの検体で98%以上の菌が回収可能であった。ステンレスの組成と研磨状況の違いによる生残菌数には明確な差は認められなかった。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ステンレス板組成

No.	研磨	組成	組成 (%)		
			ニッケル	クロム	モリブデン
1	320	304	8-10.5	18-20	
2	320	316L	12-15	16-18	2-3
3	400	304	8-10.5	18-20	
4	400	316L	12-15	16-18	2-3

表2 菌株

No.	血清型	由来
54	Enteritidis	液卵
280	Enteritidis	液卵

表3 ステンレス表面に添加した試験菌の菌数 ($10^2 \sim 10^6$ オーダー)

菌株	培養・懸濁液	添加菌数				
		10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
54	TSB	4.9×10^2	4.9×10^3	4.9×10^4	4.9×10^5	4.9×10^6
	卵黄液	1.0×10^2	1.0×10^3	1.0×10^4	1.0×10^5	1.0×10^6
280	TSB	4.5×10^2	4.5×10^3	4.5×10^4	4.5×10^5	4.5×10^6
	卵黄液	1.7×10^2	1.7×10^3	1.7×10^4	1.7×10^5	1.7×10^6

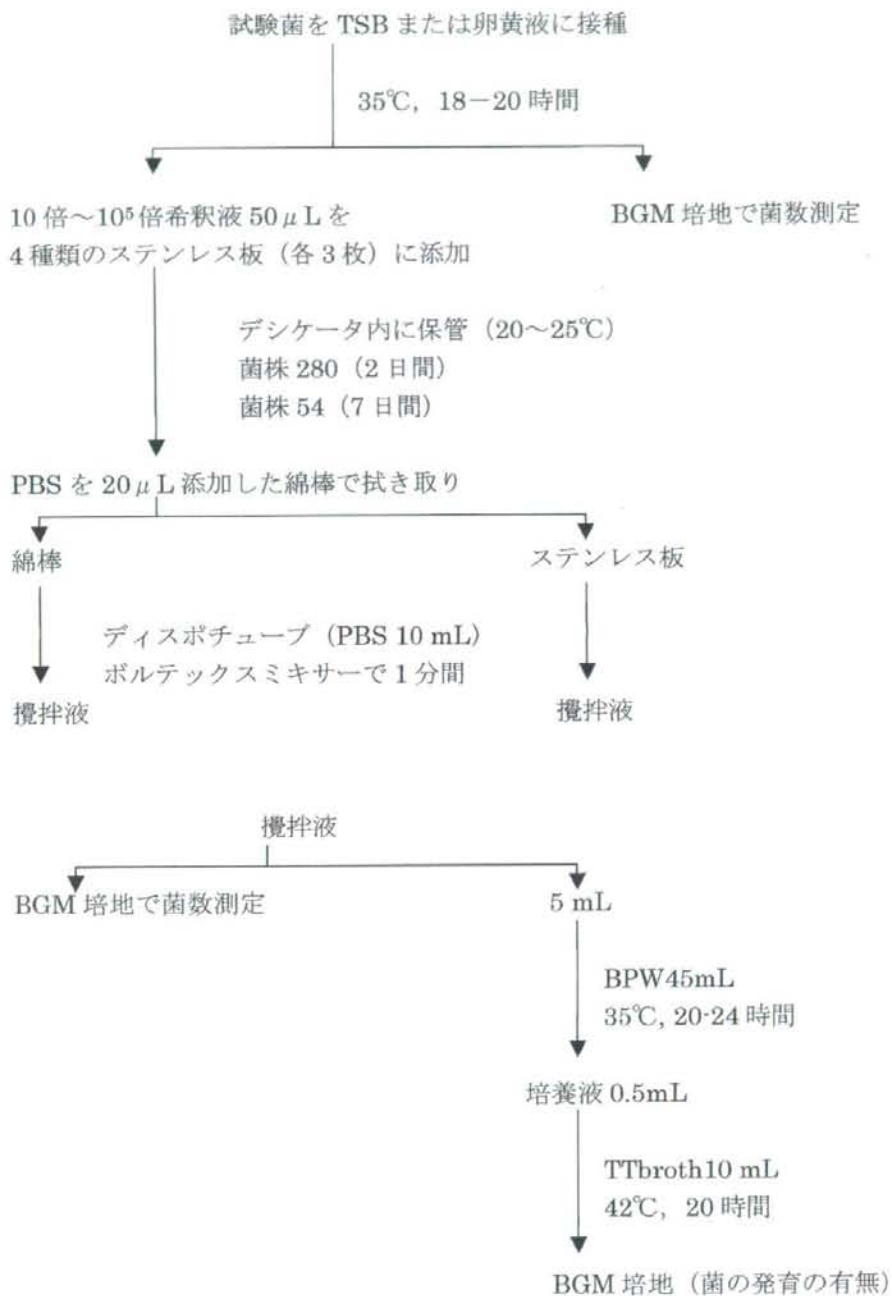
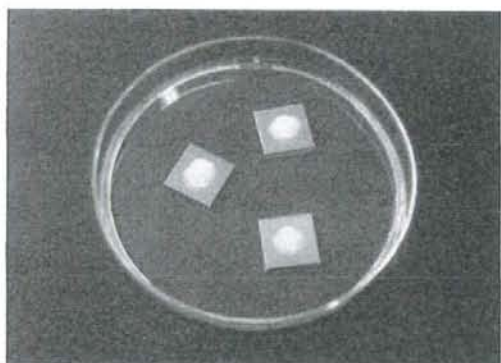
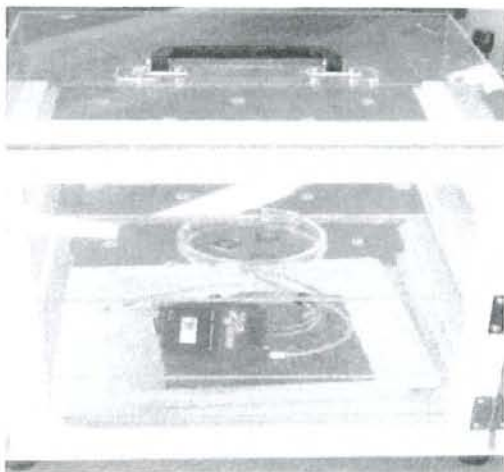


図 1 菌の接種方法および生残状況確認方法



ステンレス板 (10 mm×10 mm) に添加した菌液 (n=3)



デシケータに入れ保存した検体および温度湿度記録計 (おんどとり)



添加菌の回収

右：拭き取り綿棒の振り出し

左：ステンレス板 (10 mm×10 mm) 洗い出し

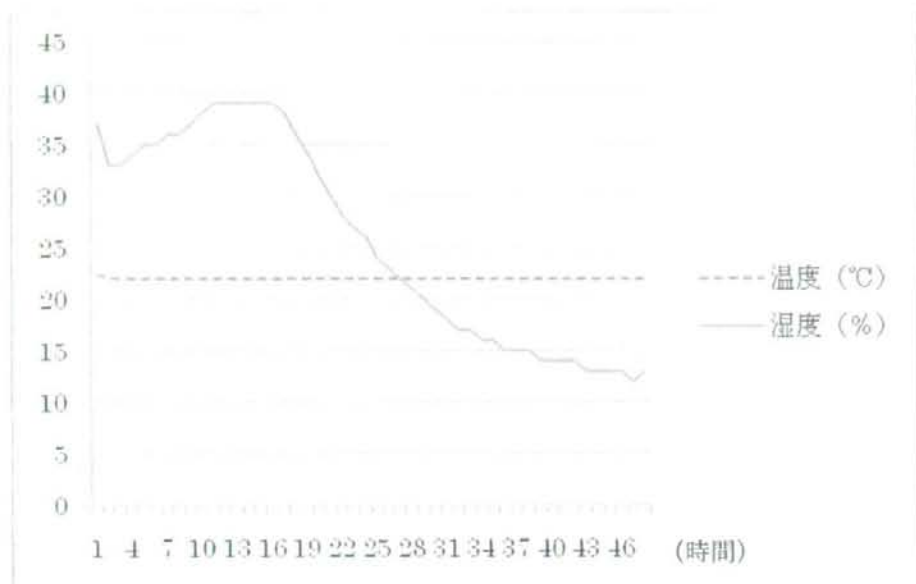


図2 菌株 280 を TSB で懸濁して添加保存した時の温度と湿度

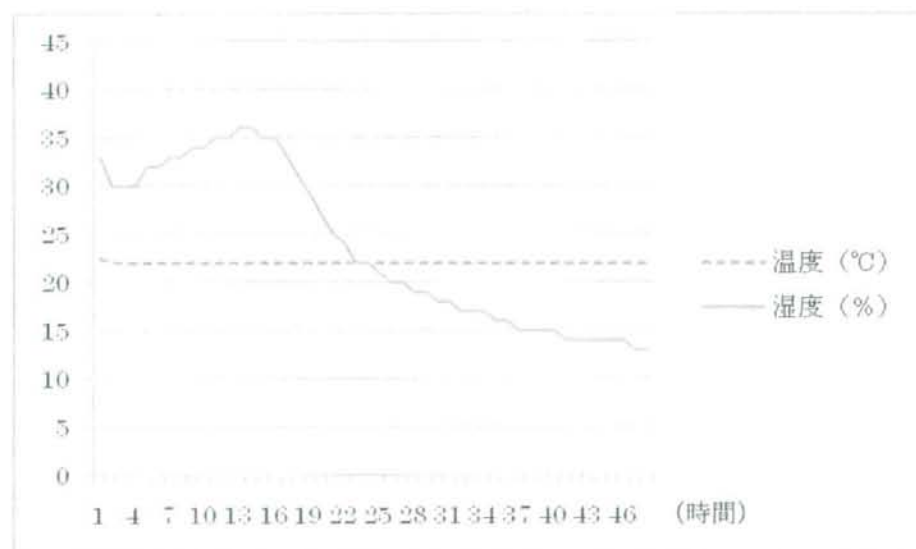


図3 菌株 280 を卵黄液で懸濁して添加保存した時の温度と湿度

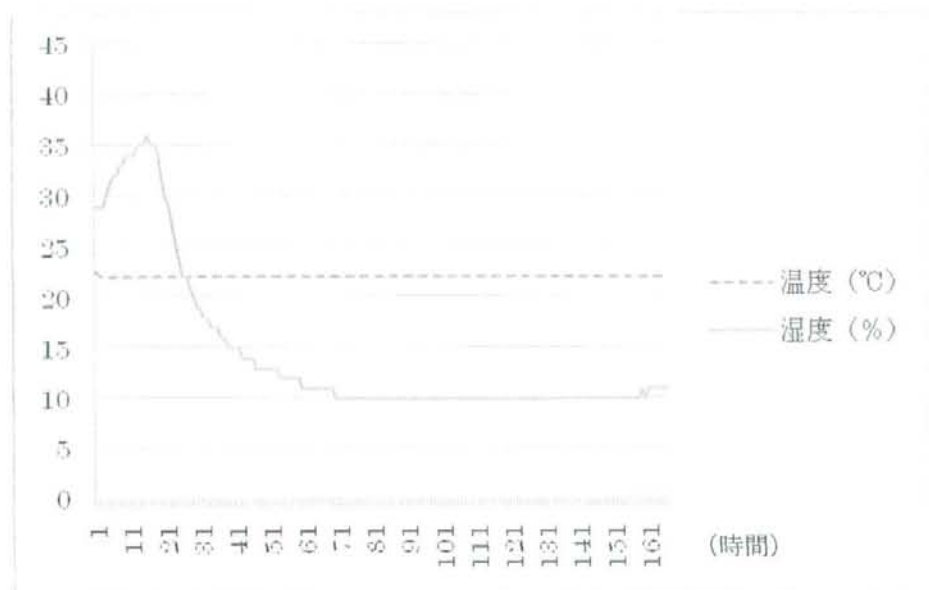


図4 菌株 54 を TSB で懸濁して添加保存した時の温度と湿度

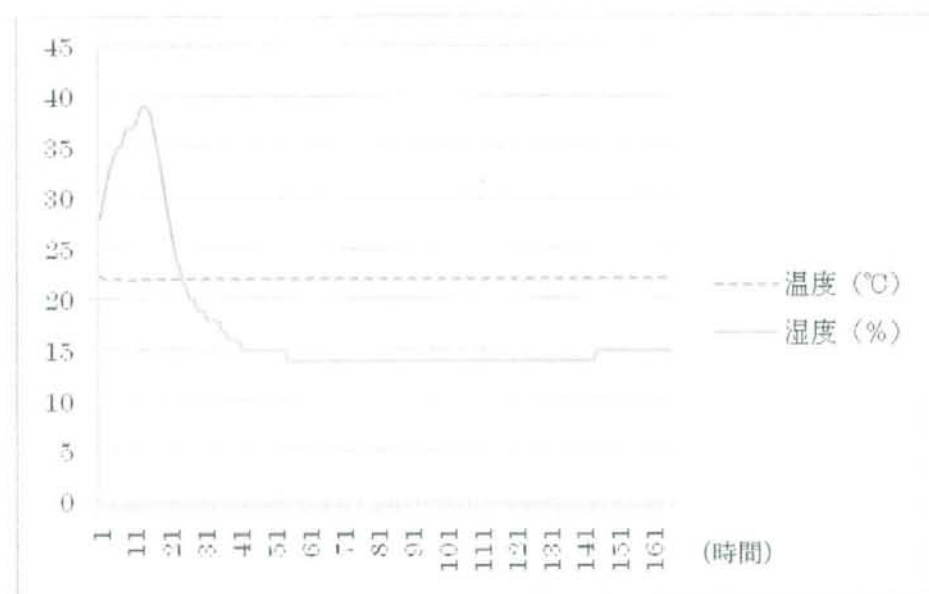


図5 菌株 54 を卵黄液で懸濁して添加保存した時の温度と湿度

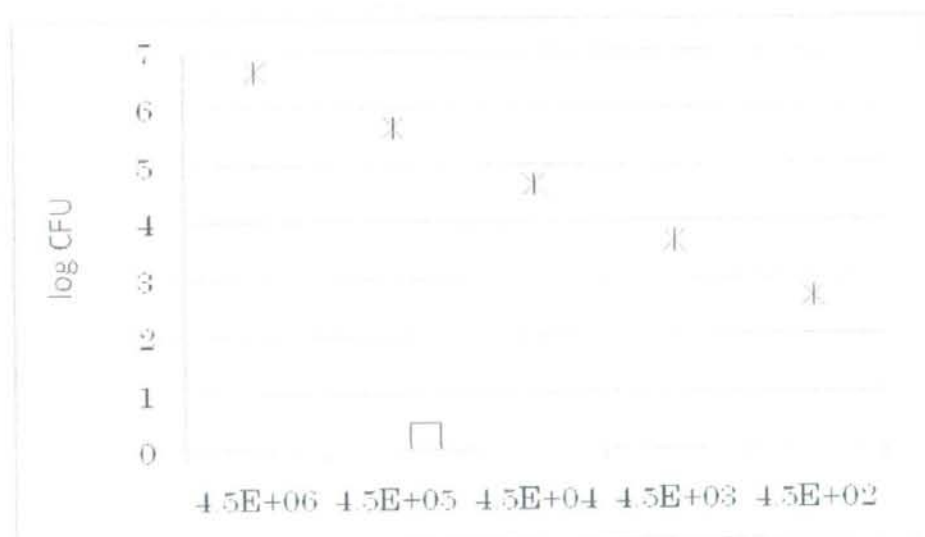
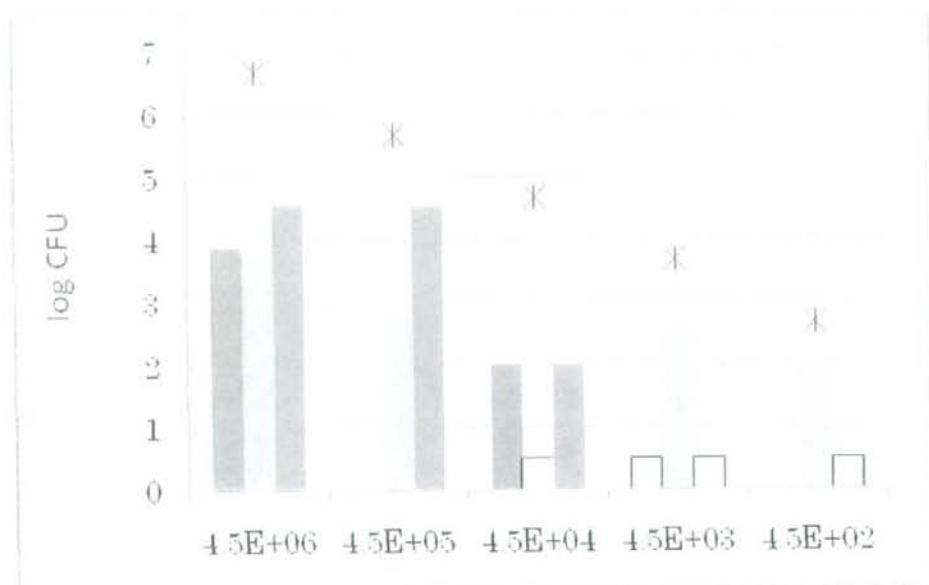


図6 菌株 280 を TSB で懸濁してステンレス No.1 に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($4.5 \times 10^6 \sim 4.5 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

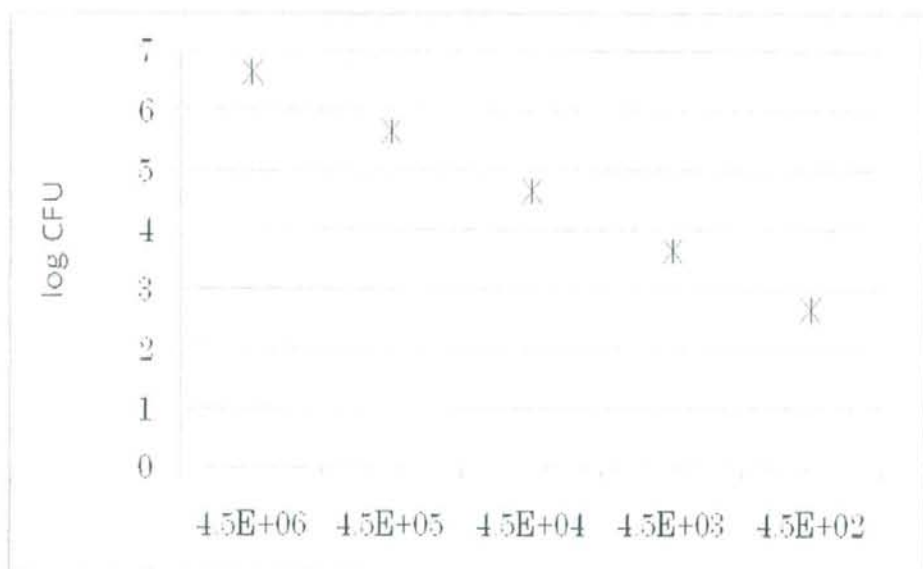
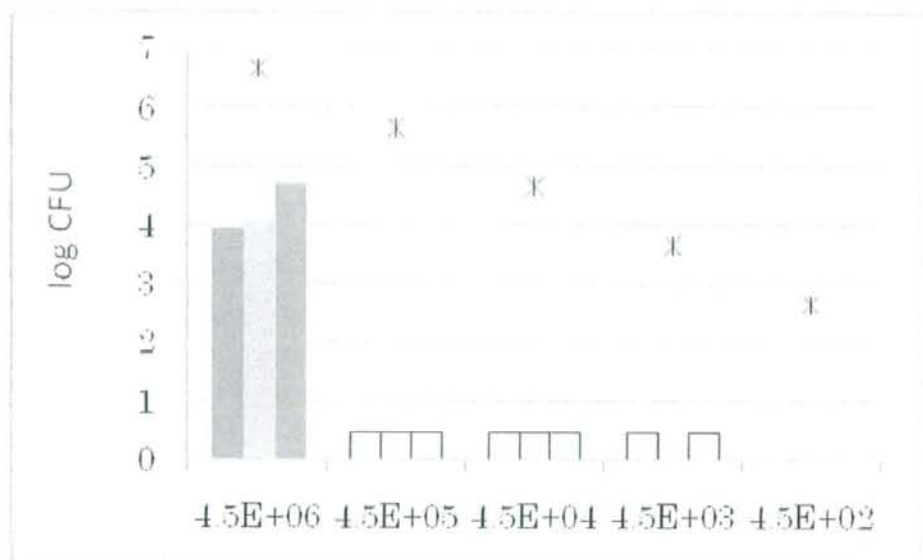


図7 菌株 280 を TSB で懸濁してステンレス No.2 に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($4.5 \times 10^6 \sim 4.5 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

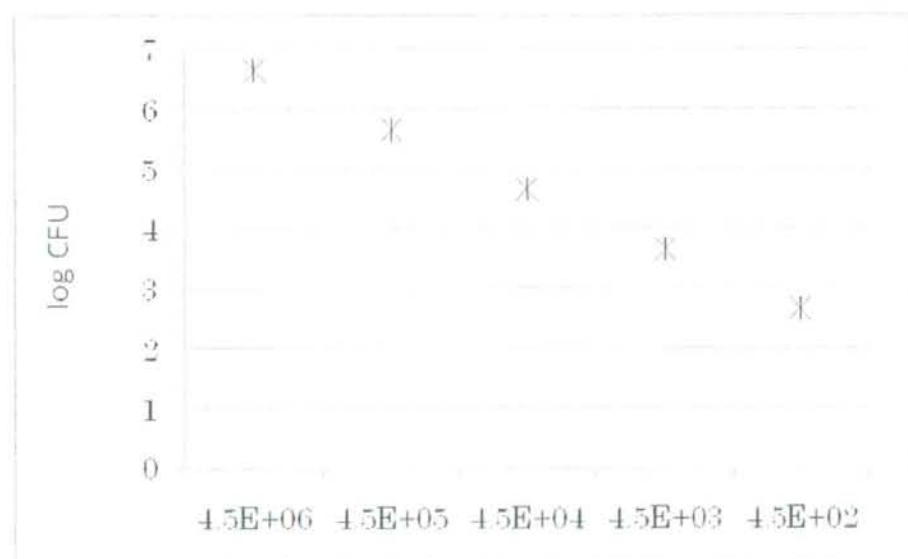
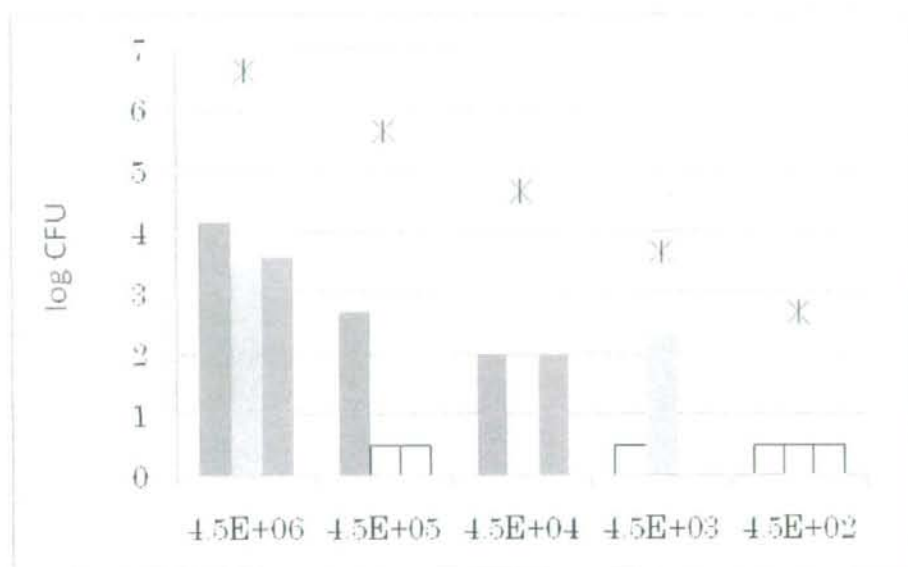


図8 菌株 280 を TSB で懸濁してステンレス No.3 に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($4.5 \times 10^6 \sim 4.5 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

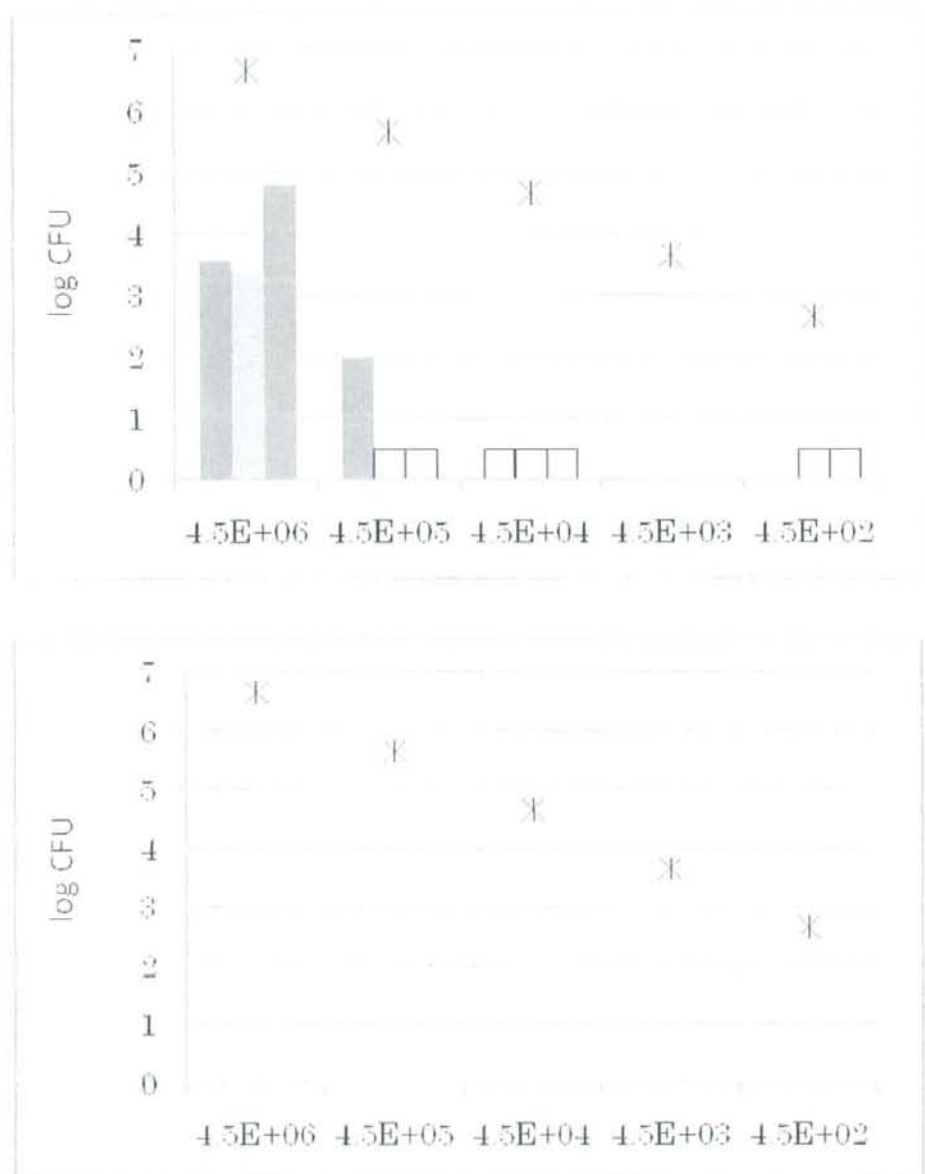


図9 菌株 280 を TSB で懸濁してステンレス No.4 に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($4.5 \times 10^6 \sim 4.5 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

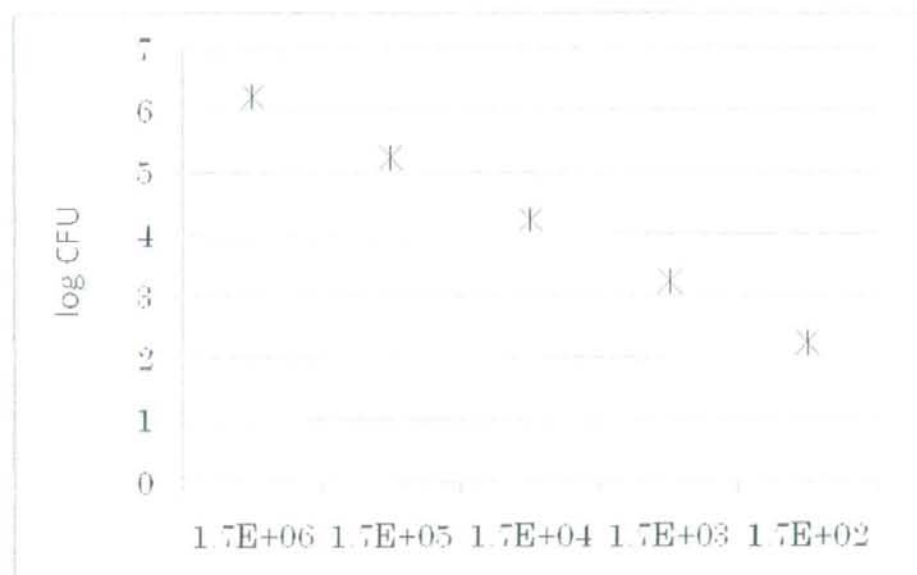
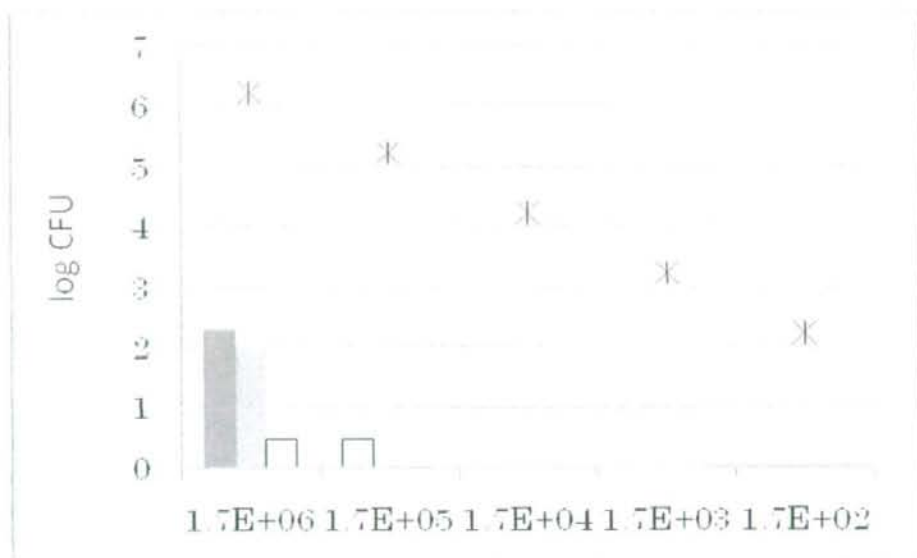


図10 菌株280を卵黄液で懸濁してステンレスNo.1に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($1.7 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

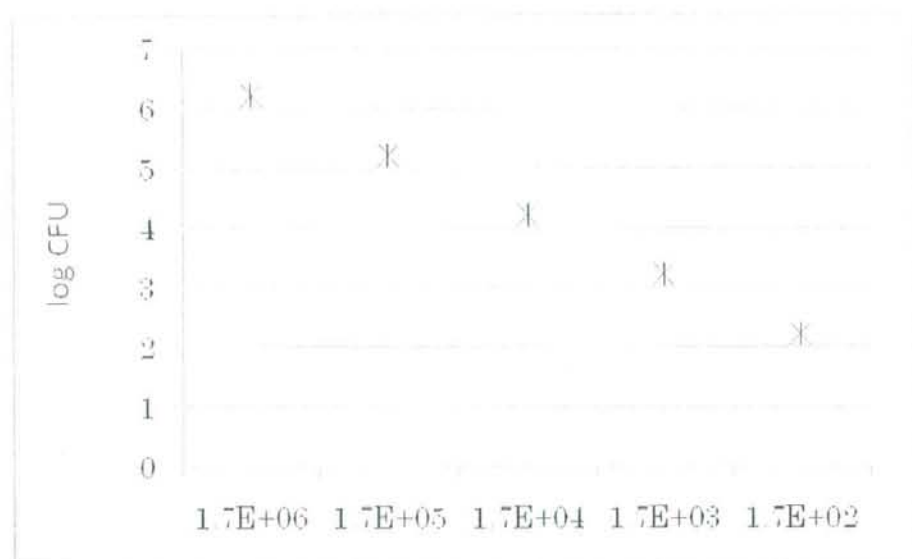
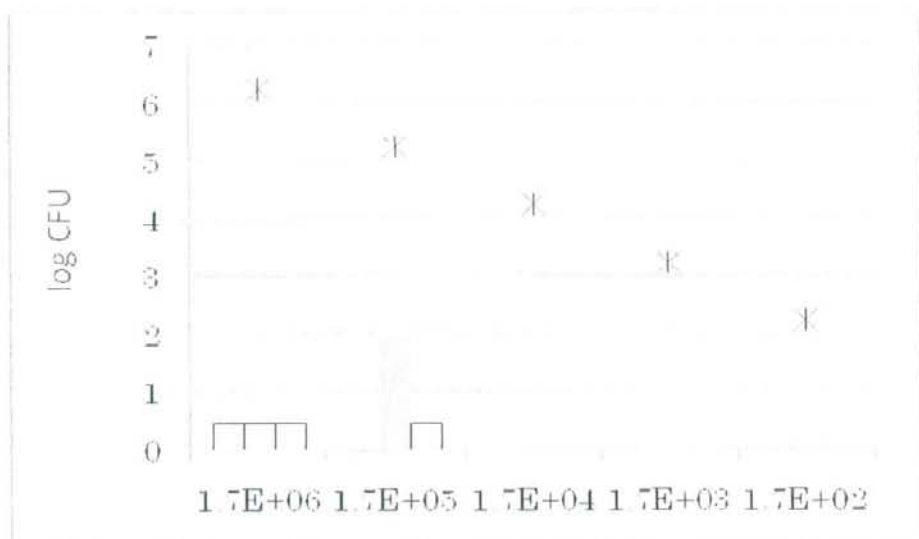


図11 菌株280を卵黄液で懸濁してステンレスNo.2に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($1.7 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

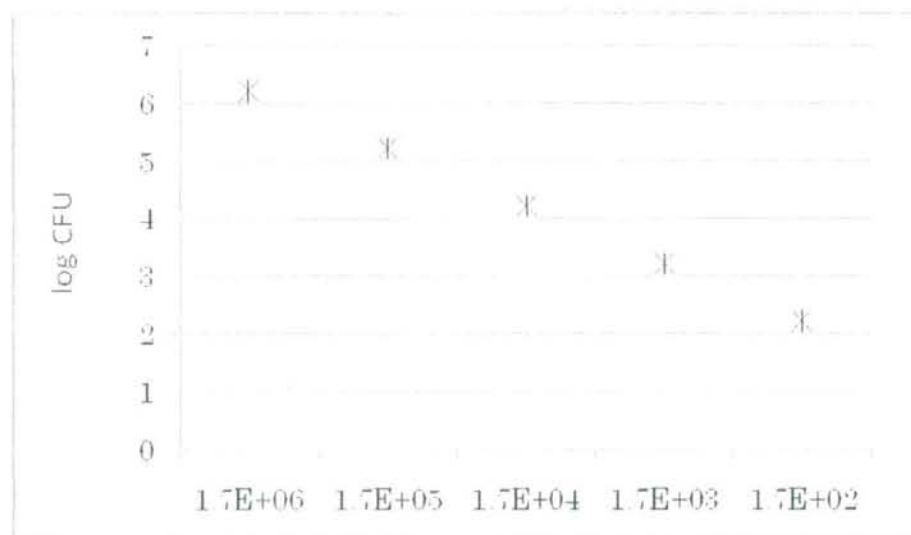
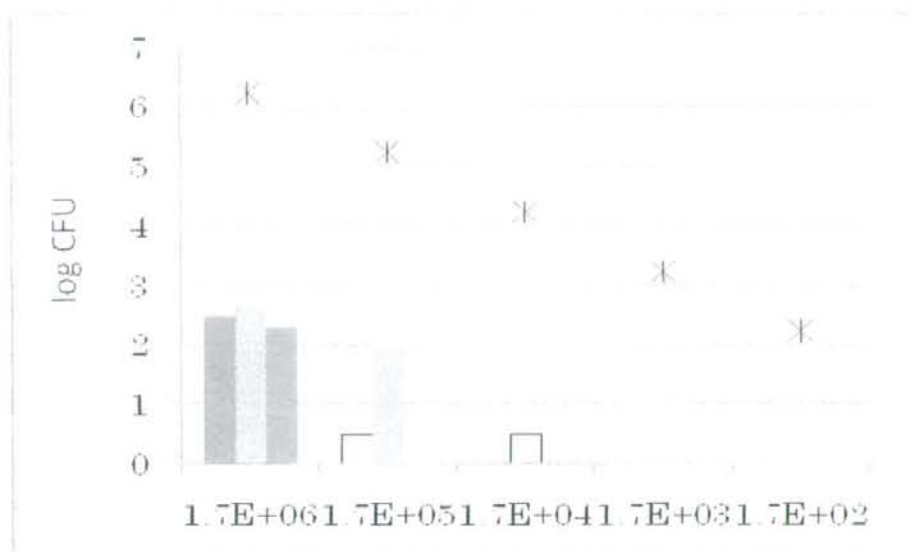


図1 2 菌株280を卵黄液で懸濁してステンレスNo.3に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($1.7 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

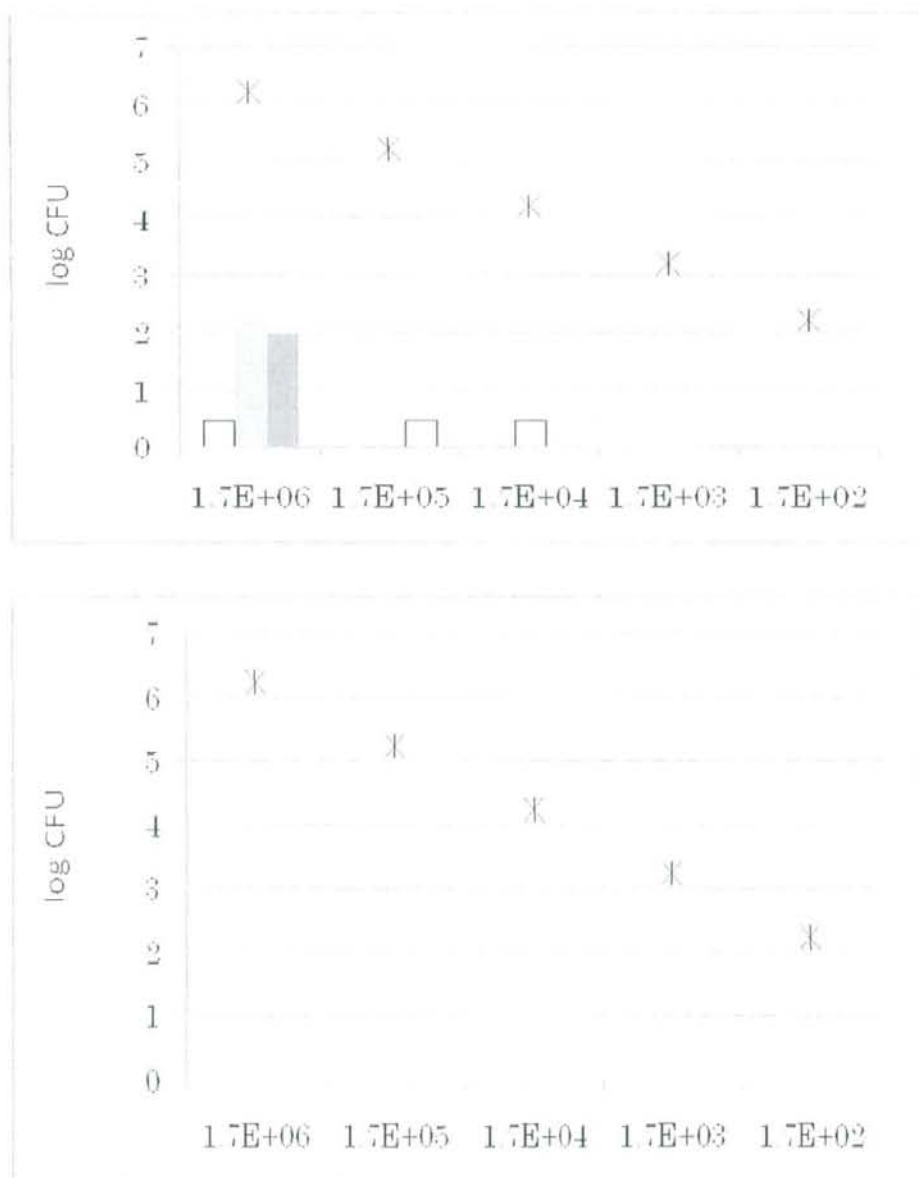


図13 菌株280を卵黄液で懸濁してステンレスNo.4に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($1.7 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し

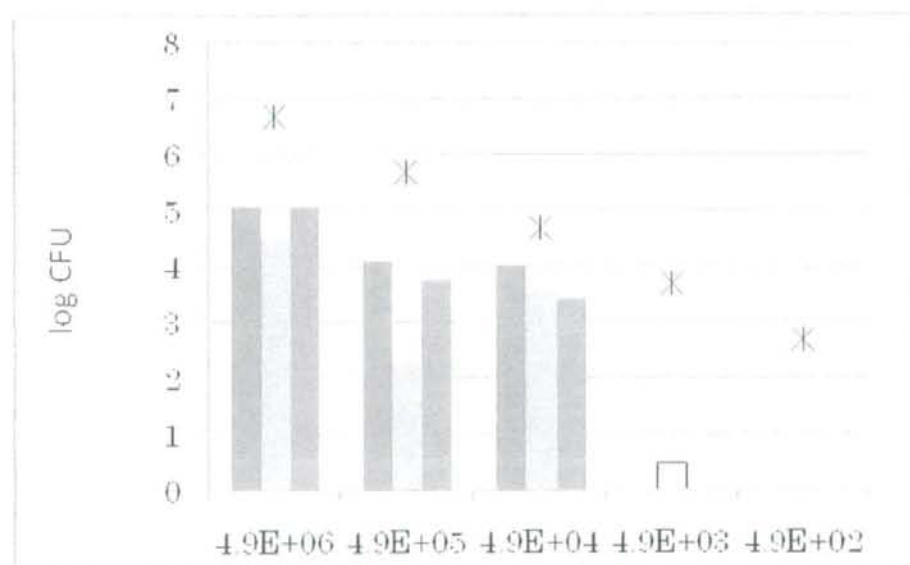
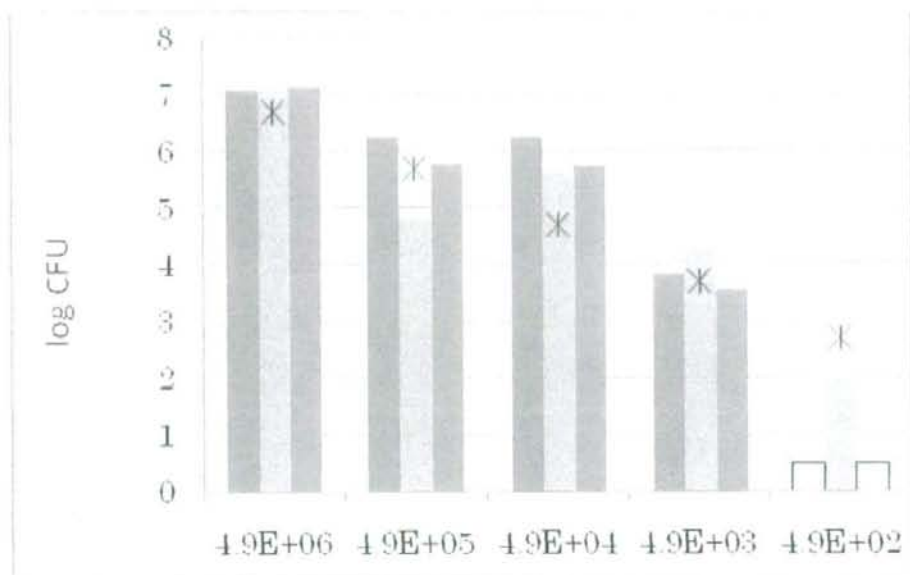


図1-4 菌株54をTSBで懸濁してステンレスNo.1に添加した場合の回収菌数 (n=3)

*印は添加菌数 ($4.9 \times 10^6 \sim 4.5 \times 10^2$)

白抜きグラフは増菌により菌の生残を確認

回収方法：上段は綿棒による拭き取り，下段はステンレス板洗い出し