

スプラウトの食中毒起因菌汚染水による生育試験とスプラウト殺菌方法の検討

微生物部

関口 明子¹ 船渡川 圭次 桐谷 礼子¹ 現食肉衛生検査所

要旨

本研究は、加熱せずに食べられることの多いスプラウトについて、食中毒起因菌（腸管出血性大腸菌）汚染水で栽培し、食中毒起因菌のスプラウト内部への移行、経時的推移を調査し、安全なスプラウト生産のための殺菌方法を検討した。その結果、腸管出血性大腸菌がスプラウト内部に移行し、増菌することが示された。さらに、スプラウト種子を、腸管出血性大腸菌に対する殺菌効果が確認された殺菌方法で加熱又は殺菌剤処理を行っても、発芽にほとんど影響を与えないことが判明した。

キーワード：スプラウト、腸管出血性大腸菌、殺菌方法

1 はじめに

1996年大阪府堺市で発生した腸管出血性大腸菌を原因とする大規模食中毒では、原因食品としてカイワレ大根が強く疑われた。また、2005年宮城県においてサルモネラ属菌に汚染されたカイワレ大根を原因食品とする食中毒が発生し、2011年ドイツ、ヨーロッパにおいて腸管出血性大腸菌に汚染されたフェヌグリークのスプラウトを原因食品とする大規模食中毒が発生した。このように食中毒菌に汚染されたスプラウトを原因食品とする食中毒は、世界規模で発生しており社会問題化している。

そこで今回、腸管出血性大腸菌汚染水でスプラウトを栽培し、汚染菌のスプラウトへの移行等、経時的推移と、効果的に実施可能な殺菌方法を検証したので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

供試菌株は、ストレプトマイシン耐性腸管出血性大腸菌（EHEC-SMR）を用いた。EHEC-SMRは、ブレインハートインフュージョンブロス（BHIB）に接種、37°C24時間培養した後、菌液の吸光度（波長630nm）を計測し、予め作成した検量線から菌数を求め、供試菌数を調整した。

生菌数確認培地は、100 µg/mL ストレプトマイシン加クロモアガー0157TAM 平板培地を用いた。

スプラウト種子は、市販の豆苗、カイワレ大根の種子を用い、水耕栽培には、株式会社リッチェル社製のスプラウト栽培キット（スプラウトファーム12型N）を使用した。

2.2 方法

2.2.1 EHEC-SMR 汚染水によるスプラウト生育試験

豆苗、カイワレ大根の種子を、EHEC-SMR が添加された水（EHEC-SMR 汚染水）で水耕栽培し、EHEC-SMR のスプラウト内への経時的移行を観察した。栽培したスプラウトはエタノールへの1分間浸漬により表面の細菌汚染を除き、破碎し段階希釈後、生菌数確認培地に塗布し、37°C24時間培養を行い、生菌数を測定した。

2.2.2 EHEC-SMR の殺菌条件

加熱殺菌における有機物共存の有無、感作温度、感作時間について、90%死滅時間（D値）を用いて評価した。

殺菌剤（エタノール、次亜塩素酸ナトリウム、乳酸）における、濃度、有機物共存の有無、曝露温度等、有効な殺菌条件について評価した。殺菌剤の曝露停止方法は、菌懸濁液1mLを陰圧状態のミリポアメンブレンフィルター（孔径0.45 µm）上に滴下し、直ちに100mLの滅菌リン酸緩衝液（PBS）を注いで菌体を洗浄する方法を用いた。²⁾

確認された有効な殺菌条件で、スプラウト種子を殺菌処理し、発芽生育に及ぼす影響を確認した。

3 結果

3.1 EHEC-SMR 汚染水によるスプラウト生育試験

3.1.1 豆苗

5.3×10⁴CFU/mL EHEC-SMR 汚染水で豆苗種子を水耕栽培した場合、14日後には種根茎葉を含めたスプラウト全体でEHEC-SMRは1.5×10⁶CFU/gまで増菌した。5.3×10³CFU/mL EHEC-SMR 汚染水で豆苗種子を水耕栽培した場合、14日後

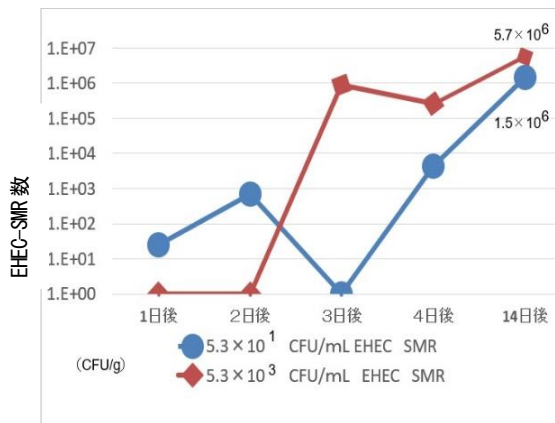


図1 豆苗生育における EHEC-SMR の経時的推移

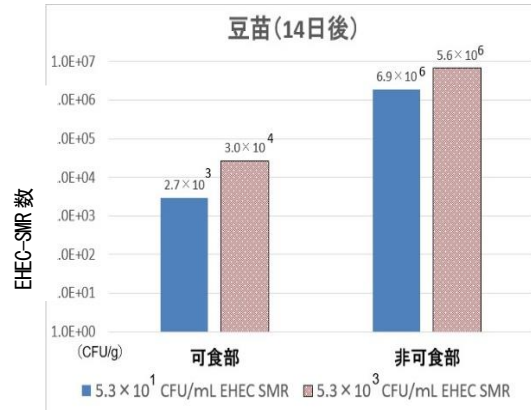


図2 豆苗における部位別 EHEC-SMR 検出状況

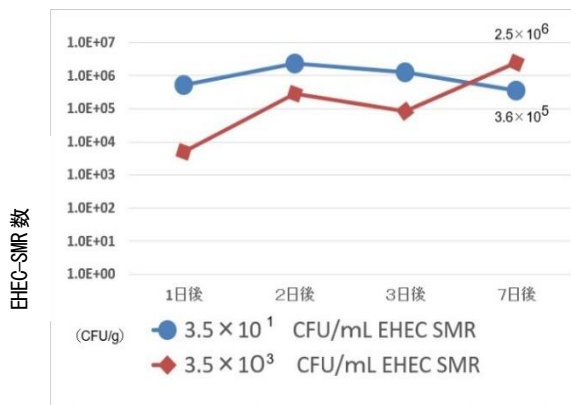


図3 カイワレ大根生育における EHEC-SMR の経時的推移

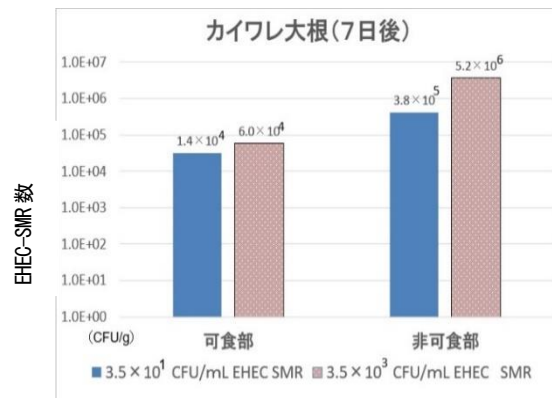


図4 カイワレ大根生育における部位別 EHEC-SMR 検出状況

には、スプラウト全体で 5.7×10^6 CFU/g まで増菌した (図1)。

可食サイズに育った 14 日後の豆苗スプラウトを可食部・非可食部に分けて試験を行ったところ、豆苗スプラウト可食部は、 5.3×10^1 CFU/mL EHEC-SMR 汚染水で水耕栽培した場合、EHEC-SMR は 2.7×10^3 CFU/g まで増菌し、 5.3×10^3 CFU/mL EHEC-SMR 汚染水で水耕栽培した場合、 3.0×10^4 CFU/g まで増菌した (図2)。

3.1.2 カイワレ大根

3.5×10^1 CFU/mL EHEC-SMR 汚染水でカイワレ大根種子を水耕栽培した場合、7 日後には種根茎葉を含めたスプラウト全体で EHEC-SMR は 3.6×10^5 CFU/g まで増菌し、 3.5×10^3 CFU/mL EHEC-SMR 汚染水でカイワレ大根種子を水耕栽培した場合、7 日後にはスプラウト全体で 2.5×10^6 CFU/g まで増菌した (図3)。

可食サイズに育った 7 日後のカイワレ大根スプラウトを、可食部・非可食部に分けて試験を行ったところ、カイワレ大根スプラウト可食部では、 3.5×10^1 CFU/mL EHEC-SMR 汚染水で水耕栽培した場合、EHEC-SMR は 1.4×10^4 CFU/g まで増菌し、 3.5×10^3 CFU/mL EHEC-SMR 汚染水で水耕栽培した場合、 6.0×10^4 CFU/g まで増菌した (図4)。

3.2 EHEC-SMR の殺菌条件検討

3.2.1 加熱

有機物が共存しない場合、4°C24 時間保存した菌液の D_{61} は 10.9 秒、45°C30 分間保存した菌液の D_{61} は 12.9 秒であった。有機物が共存する場合 (20%牛血清加 BHIB)、4°C24 時間保存した菌液の D_{61} は 24.7 秒、45°C30 分間保存した菌液の D_{61} は 23.0 秒であった (表1)。

殺菌に必要な時間は一般的に D 値の 6 倍とされていることから、今回の 61°C における最大の D 値であった 24.7 秒の 6 倍を求め、「61°C で 148.2 秒以上」を効果的な殺菌条件とした。

3.2.2 エタノール

接種菌数 (1.0×10^6 CFU/mL) に調整した供試菌を 70%エタノールに曝露させた場合、有機物共存の有無にかかわらず、生菌は 1 分間曝露で検出限界未満 (<100CFU/mL) へ減少した (表2)。

表1 61°CにおけるD値

	D ₆₁	
	4°C24時間保管菌液	45°C30分間保管菌液
有機物が共存しない場合	10.9秒	12.9秒
有機物が共存する場合	24.7秒	23.0秒

表2 殺菌剤による殺菌活性

殺菌剤	有機物の共存	曝露時間/生菌数(CFU/mL)			
		0分	1分	4分	10分
70%エタノール	無	1.0×10 ⁶	<100		
	有	1.0×10 ⁶	<100		
100ppm 次亜塩素酸ナトリウム	無	1.0×10 ⁶	<100		
	有(25°C)	1.0×10 ⁶	5.0×10 ⁵		3.7×10 ⁵
	有(50°C)	1.0×10 ⁶	5.0×10 ⁴	<100	
1%乳酸	無	3.6×10 ⁶	1.2×10 ⁴		
	有	3.6×10 ⁶	7.8×10 ⁵		
3%乳酸	無	3.6×10 ⁶	<100		
	有	3.6×10 ⁶	<100		

3.2.3 次亜塩素酸ナトリウム

接種菌数 (1.0×10⁶CFU/mL) に調整した供試菌を、有機物が共存しない条件下で 100ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液に暴露させた場合、生菌は 1 分間曝露で検出限界未満 (<100CFU/mL) へ減少した。一方、有機物として 10%BHIB を添加した 100ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液に、25°C の条件下で曝露させた場合、曝露時間を 10 分間に延長しても、3.7×10⁵CFU/mL の菌が生残した。しかし、薬剤温度を 50°C に加温すると、4 分間曝露で検出限界未満 (<100CFU/mL) へ減少した (表 2)。

3.2.4 乳酸

接種菌数 (3.6×10⁶CFU/mL) に調整した供試菌を、有機物が共存しない条件下で 1%乳酸に 1 分間曝露させた場合、1.2×10⁴CFU/mL の菌が生残り、有機物として 10%BHIB を添加した 1%乳酸に 1 分間曝露させた場合、7.8×10⁵CFU/mL の菌が生残した。一方、3%乳酸に曝露させた場合、有機物共存の有無にかかわらず、生菌は 1 分間曝露で検出限界未満 (<100CFU/mL) へ減少した (表 2)。

3.3 殺菌処理種子の発芽試験

豆苗及びカイワレ大根の種子を、EHEC-SMR に対する殺菌効果が確認された各種条件 (①熱 (温湯) 61°C で 148.2 秒以上、②70%エタノールに 1 分間曝露、③50°C 加温 100ppm 次亜塩素酸ナトリウムに 4 分間曝露、④3%乳酸に 1 分間曝露) で殺菌処理をした後、常温の水道水で十分に流水洗浄を行って温湯や各殺菌剤を除去してから栽培したところ、どの殺菌条件で処理をした種子も発芽し、発芽への殺菌処理の影響はほとんど見られなかった。

4 考察及び結論

スプラウト生育試験において、EHEC-SMR はスプラウト内部へ移行することが示された。また、スプラウト内部の菌について、汚染水単位あたりの菌量、生育に用いた汚染水の量、スプラウト中の汚染菌量、大腸菌の世代交代時間から、スプラウト内部で増菌することが示された。

加熱せずに食べられることが多いスプラウトは、スプラウト内部に菌が移行していると、洗浄・消毒による除菌が困難となる¹⁾ため、種子の殺菌と水耕栽培の衛生管理が重要であることが示された。

EHEC に対する種子の効果的な殺菌条件は次のとおり設定できた。

- ・加熱処理では、D 値の 6 倍の加熱時間が必要であるため、61°C 149 秒の加熱が有効である。
- ・70%エタノールは細菌のタンパク質凝固作用、3%乳酸は有機酸の酸化作用による殺菌活性であるため、有機

物共存下でも1分間の曝露でEHEC-SMRを殺菌できる。

・有機物共存下における100ppm次亜塩素酸ナトリウム水溶液は、50℃4分間の曝露が必要である。これは50℃の温度触媒により、遊離塩素から活性酸素の放出量が増大し、細菌の殺菌に十分な活性酸素が供給されるためと思慮される。

設定した条件での種子の殺菌処理では、加熱処理は発芽に影響せず、また、殺菌剤を用いた殺菌法についても、処理後殺菌剤を流水で十分に洗い流せば、種子の発芽に影響しないことがわかった。

スプラウトによる食中毒予防のためには、生産者がスプラウト種子殺菌及び水耕栽培の衛生管理を適切に実施する必要がある。

5 参考文献

- 1) 船渡川圭次他、生野菜の効果的な殺菌方法と中性洗剤の病原菌に及ぼす影響、食品衛生研究、Vol. 49, No. 8、71-78、1999.
- 2) 船渡川圭次他、食肉中における腸管出血性大腸菌の挙動と殺菌方法の検証、食品衛生研究、Vol. 53, No. 4、63-67、2003.