

鶏肉のカンピロバクター汚染の低減を目的とした、近紫外線発光ダイオード (UVA-LED) と塩素の併用による、新規殺菌システムの構築

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野
下畑 隆明

【1. 研究の目的と背景】

Campylobacter jejuni: *C. jejuni* は日本で頻発する食中毒の原因菌であり、その発生件数はノロウイルスに次いで多く、細菌性食中毒の70%を占めている。*C. jejuni* はヒトに対しては下痢や発熱などの胃腸炎症を引き起こす食中毒の起原因菌として知られているが、鶏や家禽においては腸管常在菌として存在している。そのため *C. jejuni* 食中毒は、鶏の腸管内容物で汚染された食肉を、加熱不十分な状態・生の状態で喫食する事によって発症すると考えられている。

C. jejuni 食中毒は日本に限らず世界中で蔓延しているが、その原因の一つに、食鳥処理場での本菌の汚染拡大が指摘されている。鶏肉は解体処理過程では、脱羽-チラー水への浸漬の過程で、鶏の腸管内容物が漏出するため、鶏肉表面が *C. jejuni* に汚染される。

C. jejuni 食中毒のリスクを低減させるため、既存のシステムではチラー水へ大量の塩素が投入されているが、塩素は有機物が多量に含まれる溶液では優れた殺菌効果が発揮できないことがよく知られている。そのため *C. jejuni* の汚染を低減させるためには、食鳥処理場での新たな殺菌システムの導入が必要であると考えられる。

本研究では既存の塩素殺菌と、近年注目を集めている新しい光殺菌技術、UVA-LED の併用による殺菌システムが、新しい殺菌システムとして有効な手段となりうるのか検討を行なった。

【2. 研究の方法】

菌の培養：本研究では Mueller Hinton Agar (MHA) 培地上で、微好気的環境下 (O_2 :5%, CO_2 :10%, N_2 :85%), 48時間培養した *Campylobacter jejuni* ゲノム株 (NCTC11168 株) を、リン酸バッファー (PBS) で懸濁したものを標準菌液として殺菌効率の評価に用いた。菌液の濁度は $OD_{600nm}=1.0$ の濃度に PBS を使って調整したものを実験に用いた。

UVA-LED 照射：96 well を使った *in vitro* の実験については、所属研究室の先行研究を参考に行っており (Hamamoto A, et al., 2013 *J Appl Microbiol*), 365 nm のピーク波長, 0.23 A の出力, 対象物から光源の距離は 10 mm に固定して照射を行った。肉を使った検討では UVA の照射装置 (NC4U134A; Nichia) を使い、365 nm のピーク波長, 0.5

A の出力, 平均 530 mW/m^2 の照射を 954 kJ/m^2 で 30 分照射した。対象物から光源の距離は 90 mm に固定して照射を行った。

次亜塩素酸ナトリウム溶液の調整：次亜塩素酸ナトリウム (NaClO; Wako 197-02206) は塩素計 (Kyoritsu Chemical-Check Lab., Corp. WAK-CIO, DP) を用いて遊離塩素濃度を 2 ppm に調整したものを基準液として実験を行い、また塩素処理は生理食塩水中で作用させた。

鶏肉エキスの調整：鶏肉由来の有機物や溶液の濁りが殺菌効果に与える影響を明確にする目的で、鶏肉エキスをを用いた殺菌実験を行った。鶏ササミ肉 1g に生理食塩水 9 mL に加え、ストマッカーで肉組織を粉碎し、基準肉液を作成した。塩素の殺菌実験、紫外線殺菌実験においてはこれら基準肉液を 10-40 ul/mL 生理食塩水に加えてそれぞれ実験に用いた。

***C. jejuni* 汚染肉モデルの構築**：鶏肉 (ササミ肉) を徳島市内のスーパーで購入し、基準菌液を PBS または生理食塩水で 100 倍希釈した溶液に 5 分間浸漬した。菌液浸漬後の肉は PBS、または生理食塩水で 3 分間 3 回の洗浄を行いサンプルとして UVA の照射実験に用いた。塩素を用いる実験では、さらに塩素溶液に 5 分間浸漬後、UVA の照射実験に用いた。UVA 照射後の鶏肉は、重量を秤量し、25 倍量の PBS を加え、ストマッカーで肉組織を粉碎し、サンプル肉液を作成した。鶏肉表面での *C. jejuni* 生存菌数の評価では、雑菌の検出を避ける為、プレストン選択サプリメント (シクロヘキシミド)、増殖サプリメント (ピルビン酸) を添加した MHA で評価を行った。UVA 照射群、未照射群の菌液をそれぞれ MHA に塗抹後、微好気的条件下で 48 時間培養し、コロニー形成能 (Colony forming unit: CFU) から殺菌効果の算出を行った。殺菌効率は Log 生存比として対数表記で示している。Log survival ratio = $\log_{10} (N_i/N_0)$

***C. jejuni* の酸化傷害評価**：UVA の酸化傷害の指標として、8-OHdG の測定を行った。*C. jejuni*、及び指標菌として大腸菌、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオを Brain Hart infusion (BHI) 寒天培地上で培養し、UVA 照射を行った後、DNA 抽出 kit を用いてバクテリアのゲノム DNA の抽出を行った。8-OHdG の活性は日本老化制御研究所の

kit (KOG-HS10) を用いて評価を行った。

データ処理・統計処理: すべての実験は3回以上同様の検討を行い, \pm 標準偏差 (SD) で表記を行っている。統計処理はMicrosoft Office 2011 ExcelでStudent's t testを行い, p-value of <0.05 を有効な差として解析を行った。

【3. 研究内容】

食鳥処理における既存の殺菌システムとして塩素殺菌が知られているが, 有機物が多量に存在する場所では塩素による殺菌効果は消失してしまう。申請者の所属する研究室では, 塩素殺菌と近紫外線発光ダイオード (UVA-LED) の併用が *C. jejuni* 菌懸濁液に対して相乗的な殺菌効果を示すことを明らかにしてきた (データ未発表)。

申請研究においては①塩素とUVA併用による殺菌機序に関する実験, ②鶏肉エキスを使った *C. jejuni* 殺菌実験, ③市販鶏肉を使った *C. jejuni* 汚染モデル肉の作成と, 肉の表面殺菌の評価を行った。②③実験については (I) 塩素単独, (II) UVA単独, (III) その併用, それぞれの殺菌効率を評価した。

【4. 研究の実施経過】

申請研究においては以下の通りに研究の実施を行った。
H29.4-12月①塩素とUVA併用による殺菌機序に関する実験

H29.6-12月②鶏肉エキスを使った *C. jejuni* 殺菌実験

H29.8月-H30.3月③市販鶏肉を使った *C. jejuni* 汚染モデル肉の作成と, 肉の表面殺菌の評価

【5. 研究から得た結論・考察】

申請研究においては①塩素とUVA併用による殺菌機序に関する実験, ②鶏肉エキスを使った *C. jejuni* 殺菌実験, ③市販鶏肉を使った *C. jejuni* 汚染モデル肉の構築と, 肉の表面殺菌の評価を行った。予備実験として, これまで申請者の所属研究室が大腸菌を用いた実験系で報告してきたUVA照射システムと同様のUVA照射システムを用い, *C. jejuni* に対する殺菌効果を評価し, 大腸菌がほとんど死滅しない1-4分間のUVAの光照射で優れた殺菌効果が得られることを明らかにしている。また菌の懸濁液に抗酸化成分のカタラーゼを加えてUVA照射を行ったところ, 殺菌効果が著しく減弱したため, *C. jejuni* においても酸化ストレスを介した殺菌効果を発揮していることを確認した。

①塩素とUVA併用による殺菌機序に関する実験

実験室で培養した菌をPBSに懸濁し, *in vitro* の実験系 (96 well プレート) でUVA照射を行った。UVA照射後の菌液を回収し, 一部はMHAにプレーティングした後, 48時間培養して生存菌数を評価し, 残りの菌からDNA

を抽出し, 酸化マーカーである8-OHdGの測定を行った。UVA照射1分ではLog生存比 -2.17 ± 0.74 , 4分では評価を行ったところ, Log生存比 -5.82 ± 0.97 と優れた殺菌効率を示した。しかしながら酸化マーカーである8-OHdGの測定を行ったところ, UVA非照射群と比較して有効な変化は認められなかった (データ検出限界値以下)。本実験ではコントロールとして大腸菌, 腸炎ビブリオ, サルモネラ属菌, についても殺菌効果の評価と, 8-OHdGの測定を行っているが, これらの病原性細菌はUVA照射1~4分では殺菌効果が認められず (大腸菌4分照射: Log生存比 -0.09 ± 0.02 , 腸炎ビブリオ4分照射: Log生存比 -0.02 ± 0.07 , サルモネラ属菌4分照射: Log生存比 -0.05 ± 0.03), 8-OHdGの変化も認められなかった (データ検出限界値以下)。30分以上の長期UVA照射では, いずれの病原体に対しても有効な殺菌効果と, 有意な8-OHdGの上昇を確認することができている (Hamamoto A, et al, 2013 *J Appl Microbiol*)。これらの結果から *C. jejuni* はUVA照射に対して感受性が高すぎるため, 酸化マーカーで殺菌の機序を確認することは出来ないことが明らかとなった。同様に抗酸化因子として知られている, カタラーゼ, SODについても同様に検討を行ったが, 有効なデータを得ることが出来なかった。これらの結果よりUVA光照射による酸化の優れた指標を申請研究で明らかにすることが出来ず, 塩素との併用で優れた殺菌効果が得られるメカニズムは明らかにならなかった。

②鶏肉エキスを使った *C. jejuni* 殺菌実験

これまでに, 菌をPBSに懸濁した, *in vitro* の実験系 (96 well プレート) から, UVAは *C. jejuni* に対して優れた殺菌効果を示すことが明らかとなってきたが, 肉の表面殺菌を行うためには, 肉由来有機物が多量に存在している環境下においても優れた殺菌効果を発揮する必要がある。次亜塩素酸ナトリウム (塩素) は, 既存の殺菌剤として肉の表面殺菌に利用されている。しかしながら塩素は有機物存在下で, 殺菌効果が著しく減弱することが知られている。そこで有機物存在下におけるUVAの *C. jejuni* に対する殺菌効果を評価するため, 鶏肉エキスをういた溶液中での殺菌実験を実施した。生理食塩水中で鶏肉 (ササミ) を破碎し, 上清のみを回収し, これを殺菌実験用の生理食塩水に10-40 ul/mLの割合で添加し, 紫外線の照射実験・塩素による殺菌実験を行った。興味深いことに塩素殺菌 (1 ppm, 5分間の処理) では少量 (10 ul/mL) の鶏肉エキスを加えただけで, 殺菌効果が完全に消失したが (塩素のみのControlでLog生存比 -5.50 ± 0.33 , +10 ul添加でLog生存比 0.09 ± 0.10 , +40 ul添加でLog生存比 0.21 ± 0.31), UVAの照射 (0.23 A, 4分間の処理) では添加する鶏肉エキスの量に応じて殺菌効率が低下する傾向にはあるが, 著しい殺菌効果の減弱は認められず (ControlでLog生存比 -5.45 ± 0.28 , +10 ul添加でLog生存比 -4.51 ± 0.62 , +40 ul添加でLog生存比 -4.17 ± 0.68), 強い殺菌効果が維持されていることが明らかとなった。

③市販鶏肉を使った *C. jejuni* 汚染モデル肉の作成と、肉の表面殺菌の評価

鶏肉表面の殺菌効果を評価するために、(1) *C. jejuni* 汚染モデル肉の構築と、(2) 汚染モデル肉に対する紫外線照射装置の再構築を行った。その後(3) UVA 単独、塩素との併用効果による殺菌効果について評価を行っている。

- (1) *C. jejuni* 汚染モデル肉を構築するため、本研究においては凹凸面が少なく、肉の個体差が小さい鶏肉としてササミ肉を用いて実験を行った。ササミ肉はそれぞれ 1/100 量の菌液を含んだ、500 ml の PBS または生理食塩水に浸漬し、PBS または生理食塩水で 3 回洗浄した。光照射後の肉は PBS を加え破碎し、溶液を MHA に塗り広げることで溶液中の生菌数を評価している。本研究で用いた汚染モデル肉では平均して、肉タンパク質量 1 g 当たり、1000 CFU の生菌数を確認する事が出来た。
- (2) 汚染モデル肉に対する紫外線照射を行うため、殺菌装置についても改良を行った。よりハイパワー (0.5 A) が出力出来るシステム LED のシステムに組み直し、鶏全体に光が当たるよう光源からの距離を 9 cm 離している。距離による光の拡散を防ぐため、集光性を高めるレンズを LED 表面に導入して、肉面に集中して光が当たる仕様とした。ササミ肉はステンレス製の串に刺し、これをローテーターにセットして、1 分間に 9 回転の速度で回転させながら、10-30 分 UVA の照射を行った。
- (3) 上記のシステムを用い、*C. jejuni* 汚染モデル肉に対する UVA の殺菌効果を評価すると、10 分 UVA 照射で Log 生存比 -0.33 ± 0.38 、20 分 UVA 照射で Log 生存比 -0.73 ± 0.27 、30 分 UVA 照射で Log 生存比 -1.34 ± 0.10 の殺菌効果が認められ、*C. jejuni* 汚染を 1 オーダー低下させるには 30 分の UVA 照射が必要となる事が明らかとなった。次に塩素との併用効果を見るため、塩素処理 (2 ppm)、UVA 照射 (10 min)、共に単独では強い殺菌効果が得られない条件を組み合わせる併用殺菌の効果を調べた。塩素処理 (2 ppm) では Log 生存比 -0.14 ± 0.28 、UVA 照射 (10 min) では Log 生存比 -0.42 ± 0.19 であったが、これらの 2 つを組み合わせると Log 生存比 -0.98 ± 0.40 となり、相乗的に殺菌効果が高くなる事が明らかとなった。

【6. 残された問題、今後の課題】

本研究においては、鶏ササミに対して有効な殺菌効果を得ることができた。しかしながら、実験当初予定していた、丸鶏を用いた殺菌効果の評価にまでは至ることが出来なかった。丸鶏では鶏ササミに比べ、光の照射ムラが出来易い点などから、殺菌効率が低下する可能性も考えられる。そのため、今後は丸鶏など、鶏ササミよりも大きな肉に対する UVA 照射システムの有効性を検討し、丸鶏に適した

UVA 照射システムを構築する必要があると考えられる。本研究は食肉表面での *C. jejuni* 殺菌能を示す研究報告であり、UVA 光殺菌システムの応用性を高める優れた研究報告となった。今後は鶏肉を介した *C. jejuni* 食中毒を抑制するため、鶏肉の加工から消費のいずれの段階で UVA 照射を行う事が最も食中毒のリスクを低減できるか更なる検討を進め、その条件に見合った光の殺菌システムを構築する事が必要になる。