

弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌効果の基礎的検討および

食品・畜産分野への適用に関する研究

Basic Study on Microbicidal Effect of Weak Acid Hypochlorous Solution
and Application in Field of Food and Livestock Industry

小野 朋子

Tomoko Ono

2014年

目次

第1章

緒言

1.1 食品製造分野における微生物制御の必要性および問題点	1
1.2 畜産分野における微生物制御の必要性および問題点	2
1.3 塩素系消毒剤の種類および特徴	3
1.4 本論文の構成と概要	4

第2章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の調整および特徴

2.1 弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌機序	6
2.2 弱酸性次亜塩素酸水溶液の安全性	8

第3章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の各種微生物に対する基礎的な殺菌効果の検証

3.1 はじめに	10
3.2 材料および方法	
3.2.1 次亜塩素酸水溶液の調製	11
3.2.2 供試微生物	12
3.2.3 菌液の調整	13
3.2.4 殺菌試験	15
3.3 結果および考察	15
3.4 まとめ	20

第4章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の浮遊芽胞菌および付着芽胞菌に対する殺菌効果

4.1 はじめに	22
4.2 材料および方法	
4.2.1 次亜塩素酸水溶液の調製	23
4.2.2 菌液の調整	23
4.2.3 水溶液中に浮遊した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌試験	24
4.2.4 各種部材表面に付着した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌試験	24
4.3 結果および考察	
4.3.1 水溶液中に浮遊した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌効果	25

4.3.2	各種部材表面に付着した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌効果	29
4.4	まとめ	31

第5章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の生鮮野菜に対する殺菌効果および界面活性剤併用効果の検討

5.1	はじめに	33
5.2	材料および方法	
5.2.1	次亜塩素酸水溶液および界面活性剤添加次亜塩素酸水溶液の調製	34
5.2.2	界面活性剤添加次亜塩素酸水溶液の性質	35
5.2.3	<i>B. cereus</i> 芽胞の調製	35
5.2.4	<i>B. cereus</i> 芽胞に対する殺菌効果	36
5.2.5	キュウリおよびアオネギの洗浄殺菌	36
5.3	結果および考察	
5.3.1	界面活性剤添加次亜塩素酸水溶液の性質	37
5.3.2	<i>B. cereus</i> 芽胞に対する殺菌効果	39
5.3.3	キュウリおよびアオネギの洗浄殺菌効果	40
5.4	まとめ	42

第6章

弱酸性次亜塩素酸水溶液のハクサイ殺菌への適用およびクロロホルム生成量の検討

6.1	はじめに	43
6.2	材料および方法	
6.2.1	弱酸性次亜塩素酸水溶液および次亜塩素酸ナトリウム水溶液の調製	44
6.2.2	ハクサイに付着する生菌数の測定	44
6.2.3	弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いたハクサイの洗浄殺菌試験	45
6.2.4	弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄した場合のクロロホルムの生成量	47
6.3	結果および考察	
6.3.1	ハクサイに付着する生菌数	47
6.3.2	弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いたハクサイの洗浄殺菌試験	48
6.3.3	弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄した場合のクロロホルムの生成量	50
6.4	まとめ	52

第7章

弱酸性次亜塩素酸水溶液を鶏への飲水に用いた場合の殺菌効果, 生産性および安全性への影響

7.1	はじめに	54
7.2	材料および方法	
7.2.1	弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製	55
7.2.2	弱酸性次亜塩素酸水溶液の供給システム	56
7.3	評価項目	
7.3.1	残留塩素濃度	58
7.3.2	生菌数の測定	58
7.3.3	育成率および生存率ならびに産卵率の算出	59
7.3.4	臓器重量・血液性状・組織学的検査	59
7.4	結果および考察	
7.4.1	残留塩素濃度および生菌数	60
7.4.2	育成率および生存率ならびに産卵率	64
7.4.3	臓器重量・血液性状・組織学的検査	66
7.5	まとめ	69
第8章		
弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による種卵消毒への適用		
8.1	はじめに	71
8.2	材料および方法	
8.2.1	弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製	72
8.2.2	弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による付着 <i>S. aureus</i> に対する殺菌試験	72
8.2.3	弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による卵殻表面の一般生菌に対する殺菌試験	73
8.2.4	種鶏場における弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧による種卵消毒	74
8.3	結果および考察	
8.3.1	弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による <i>S. aureus</i> および卵殻表面の一般生菌に対する殺菌効果	76
8.3.2	種鶏場における弱酸性次亜塩素酸水の噴霧による種卵消毒効果および孵化率	79
8.4	まとめ	82
第9章		
	総括	83
	引用文献	88

謝辞	-----	100
Summary	-----	102
摘要	-----	108
学位論文の基礎となる学術論文	-----	112
参考論文	-----	114

第 1 章

緒言

1.1 食品製造分野における微生物制御の必要性および問題点

我が国の 2013 年の食中毒の発生件数は 931 件、患者数は 20,802 人、うち死者 1 人であり、前年度 2012 年よりはいずれも減少しているものの、依然多くの食中毒が発生している¹⁾。また、2011 年に生レバー、ユッケを原因食材とした腸管出血性大腸菌 O157、O111 による集団食中毒が²⁻³⁾、2012 年には、浅漬けを原因食材とした腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒⁴⁾が、2014 年には給食用のパンを原因食材としたノロウイルスの集団食中毒⁵⁾が発生するなど、依然として大規模な集団食中毒も頻発している。特に病院、福祉施設、学校などでは、一度に大量の食事が調理されているため、有害微生物が混入・繁殖すると多くの喫食者に影響を与える。そのため、同一メニューを 1 回 300 食以上または 1 日 750 食以上を提供する調理施設では HACCP の概念に基づき大量調理施設衛生管理マニュアルが適用されている⁶⁾。

一方、2011 年度のおが国の 1 人あたりの 1 年間の野菜の消費量は 91.1 kg であり、年々減少傾向にあるものの、近年の健康志向や、生活様式の変化などから、カット野菜の消費量は逆に増加傾向にある⁷⁾。生食用カット野菜は、野菜の細胞を切断した際に細胞液が漏出し、細胞液を栄養源として微生物が増加し易い条件となる上、消費まで加熱工程がないため、微生物学的リスクが高い食品である⁸⁻⁹⁾。そのため、カット野菜製造工場では、野菜の栽培段階で付着した微生物の残存や、加工中の二次汚染のリスクを内包しており、近年、カット野菜を介した集団感染事例も多く報告されている¹⁰⁻¹¹⁾

現在、これらの食品製造現場において、食材の洗浄殺菌に最もよく使用されている殺菌剤は次亜塩素酸ナトリウムである。次亜塩素酸ナトリウムは殺菌効果が高く、抗菌スペクトルが広くかつ安価であり、大量調理施設衛生管理マニュアルでも生鮮果物および野菜の殺菌に有効塩素濃度 100～200 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを用いることが推奨されている⁶⁾。

しかしその反面、塩素臭が食材に残存し商品価値が低下する、食材成分と塩素分が反応してトリハロメタンが生成するなど等の課題を抱えている¹²⁻¹⁴⁾。また、次亜塩素酸ナトリウムは使用の都度、希釈調製する必要があるため使用現場での手間が煩雑であり、希釈ミスや不適正な使用方法によって殺菌が不十分となり食中毒が発生した事例も報告されている¹⁵⁻¹⁶⁾。そのため、次亜塩素酸ナトリウムの欠点を克服し、より確実かつ効果的に殺菌に使用できる技術が求められている。

1.2 畜産分野における微生物制御の必要性および問題点

養鶏をはじめとする畜産分野においては同種の動物を同じ場所で高密度飼育することから、感染症のリスクが非常に高い。近年では 2011 年に高病原性トリインフルエンザ (H1N1 型)¹⁷⁻¹⁸⁾ および牛口蹄疫が発生し大きな問題となった¹⁹⁻²⁰⁾。これらの感染症が発生すると、多くの動物に感染して死亡するだけでなく、感染を食い止めるために同畜舎・農場内の家畜の淘汰や発生農場から半径 10 km 圏内の農場での家畜の移動制限などが行われるため、経済的な損失も莫大である。

これまで家畜の感染症は各種抗生物質を投与することで制御してきたが、過剰の抗生物質投与は薬剤耐性微生物を産生し、畜産分野のみならず医療現場での薬剤耐性微生物による院内感染の原因にもなっていることが報告され

ており²¹⁻²²⁾，抗生物質の使用量の削減が求められている。そのため，今後は動物の飼育環境の衛生管理を徹底することで，病気の蔓延を防止する方法に転換しつつある。

また，サルモネラ菌，カンピロバクターおよび病原性大腸菌等が農場内で動物や卵等に付着し，最終食品にまで残存して食中毒の原因になる事例も報告されている²³⁻²⁶⁾。そのため，食品の安全性の観点からも飼育農場での衛生管理が重要視されており，農林水産省では生産農場における農場 HACCP を推進している。2009 年には畜産農場の飼養衛生管理向上の取り組み認証基準が公表され，畜産現場での衛生管理の取り組みはさらに進みつつある。

農場内の衛生管理には，現在多種の消毒剤が使用されているが，主として畜舎の環境消毒や出入口の靴底には逆性石鹼，畜舎内の燻蒸や受精卵の消毒にはホルマリンが使用されている²⁷⁻²⁹⁾。しかし，逆性石鹼は抗菌スペクトルが狭く，口蹄疫ウイルスや芽胞菌には効果がない³⁰⁾。また，ホルマリンはヒトに対する発がん性があり，2009 年に労働安全衛生法の第 3 類から第 2 類物質に引き上げられ，管理濃度の設定や作業環境測定の義務化など，取扱いが厳格化されている³¹⁻³³⁾。そのため，畜産分野においては殺菌効果が高くかつ安全性が高い消毒剤の開発およびその適正な使用が求められている。

1.3 塩素系消毒剤の種類および特徴

前述の食品および畜産分野で汎用されている消毒剤の 1 つとして塩素系消毒剤が挙げられる。塩素系消毒剤の殺菌因子は有効塩素であり，これは遊離塩素と結合塩素に大別される^{13, 34)}。

遊離塩素は殺菌効果が高く，抗菌スペクトルが広い反面，有機物の影響を受けやすいという性質がある。遊離塩素を利用する消毒剤としては次亜塩素

酸ナトリウム，次亜塩素酸カルシウム等があり，いずれも水溶液の pH はアルカリ性となる。

結合塩素は次亜塩素酸とアンモニアが反応したモノクロラミン (NH_2Cl)，ジクロラミン (NHCl_2)，トリクロラミン (NCl_3) の総称である³⁵⁻³⁶⁾。殺菌効果は遊離塩素と比較すると，99 %CT 値が *E. coli* で 1900～5300 倍，ジアルジアで 16～23 倍，ウイルスで 214 倍の値となることが報告されており³⁷⁾，遊離塩素よりも低い。しかし，水中での残留効果が高い特徴を持つ。消毒の過程で遊離塩素を使用した場合に，有機物やアンモニアと反応して結合塩素が生成し，副次的に殺菌に寄与する他，意図的にアンモニアを添加し結合塩素を生成させて殺菌やスライムの除去に用いる方法も一部の浄水場や温浴設備等で使用されている³⁸⁻³⁹⁾。

塩素系消毒剤は食品，畜産分野のみならず，医療，福祉施設，家庭など広範囲で使用されている。しかし，使用時の希釈の煩雑性や食品の異臭味，トリハロメタンの発生，金属の腐食などのデメリットを有する。

本研究では，塩素系消毒剤の持つデメリットを克服した消毒剤として，次亜塩素酸ナトリウムの pH を弱酸性に調整した弱酸性次亜塩素酸水溶液 (Weak Acid Hypochlorous Solution：以下，図表表記を WAHS と略す)を開発し，食品および畜産分野における消毒剤としての適用を検討した。

1. 4 本論文の構成と概要

本論文は，弱酸性次亜塩素酸水溶液の食品および畜産分野での有用な適用方法の検討を目的とした一連の研究結果を記述したものであり，全 9 章から構成される。各章の概要を以下に記す。

第 2 章では，弱酸性次亜塩素酸水溶液の調整方法およびその特徴について

記述した。

第3章では、弱酸性次亜塩素酸水溶液の基礎的な殺菌効果を確認するため、各種微生物の標準株および臨床分離株に対する殺菌、殺カビおよびウイルス不活化効果の検討を行った。また、pHを調整したことによる殺菌効果の増強を確認するため、各pHにおける殺菌効果の違いについても検討した。

第4章では、微生物の中でも特に消毒剤耐性が強い芽胞形成菌に着目し、弱酸性次亜塩素酸水溶液の各種芽胞への有効な接触時間および有効塩素濃度の探索を行った。また、実使用条件を想定し、ステンレス鋼、プラスチックおよび布に付着した芽胞に対する殺菌効果についても検討した。

第5章では、食品分野での適用の一例として、生野菜の殺菌効果について検討を行った。本章では特に、カット野菜の材料として、殺菌が特に困難なキュウリおよびアオネギの洗浄殺菌法について詳細に検討した。

第6章では、食品分野で実際の食品製造工場での製造ラインへの適用を想定し、漬物の原料となるハクサイを短時間で殺菌する方法について検討した。また、消毒副生成物であり、トリハロメタンの一種であるクロロホルムの生成量についても測定した。

第7章では、畜産分野での適用の一例として、養鶏場での衛生管理の一環に、鶏への飲用水に弱酸性次亜塩素酸水溶液を利用した場合の飲用水の殺菌効果および鶏に対する生産性および安全性への影響について検討を行った。

第8章では、畜産分野での適用の一例として、ブロイラー種鶏の種卵(受精卵)消毒に弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧を適用することを目的とし、弱酸性次亜塩素酸水溶液を噴霧した場合の卵殻表面の微生物に対する殺菌効果および孵化率について検討を行い、現行のホルマリン燻蒸法との比較を行った。

第9章では、本研究結果を総括した。

第 2 章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の特徴

2.1 弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌機序

Fig. 2-1 に次亜塩素酸の水中での存在形態と pH との関係を示す。次亜塩素酸 (HClO) の解離定数 (pK_a) は 25℃ で 7.5 であり⁴⁰⁾、溶液の pH に依存して形態が変化することが知られている。アルカリ域ではイオン形の次亜塩素酸イオン (OCl^-) の割合が大きく、pH を低下させると分子型の次亜塩素酸 (HClO) の割合が増加する。さらに強酸性域になると有効塩素の一部は塩素 (Cl_2) となり、気相に飛散する。pH 6 の弱酸性次亜塩素酸水溶液では有効塩素の 97 % が次亜塩素酸 (HClO)、3 % が次亜塩素酸イオン (OCl^-) として存在している⁴¹⁻⁴²⁾。

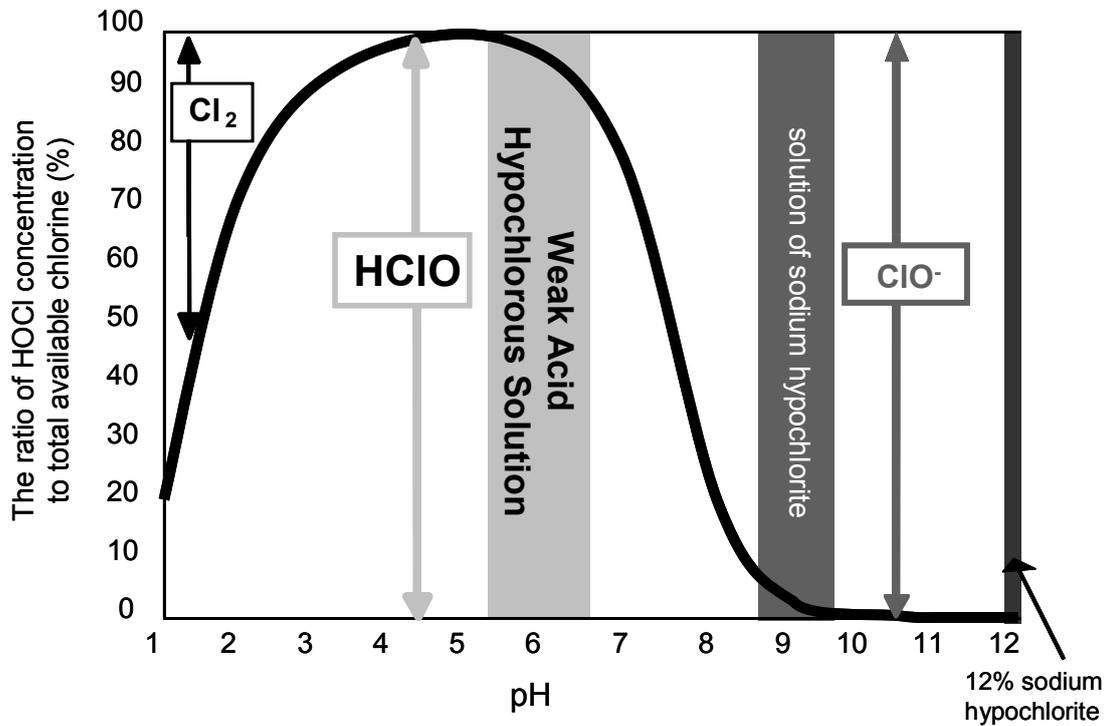


Fig.2-1 The ratio of HClO concentration to total available chlorine in water¹³⁾

次亜塩素酸水溶液の殺菌効果は、全有効塩素濃度ではなく次亜塩素酸(HClO)の濃度に強く依存する⁴³⁾。次亜塩素酸の殺菌機序は酸化による細胞壁および生体膜の損傷、酵素活性の失活、DNAの損傷、イオン透過性の障害等とされているが、特に細菌の形質膜の膜透過性がpH域によって大きく変化することが知られている。Fig. 2-2に細菌に対する次亜塩素酸の膜透過性および殺菌機能の概念図を示す。一般に、細胞の最外部には細胞壁、その内側には形質膜という生体膜が存在する。細胞壁はイオンや低分子の親水性分子を容易に透過させるのに対し、リン脂質二重層を基本構造とする形質膜はイオンや低分子量分子の透過を妨げる。そのため、負の電荷を持つ次亜塩素酸イオン(ClO⁻)は容易に形質膜を通過できず、細胞壁および形質膜の外側からのみ酸化作用を及ぼして殺菌を行う。一方、分子型の次亜塩素酸(HClO)は受動拡散によって微生物の細胞壁と形質膜を通過して菌体の内部と外部の両面から酸化作用を与える。細胞内に進入した次亜塩素酸(HClO)は、脂質二重層や膜輸送タンパク質、細胞質および形質膜に存在する酵素系、核酸、リボソームなどに酸化作用を及ぼすため、次亜塩素酸イオン(OCl⁻)よりも殺菌効果および殺菌速度が増大する³⁴⁾。

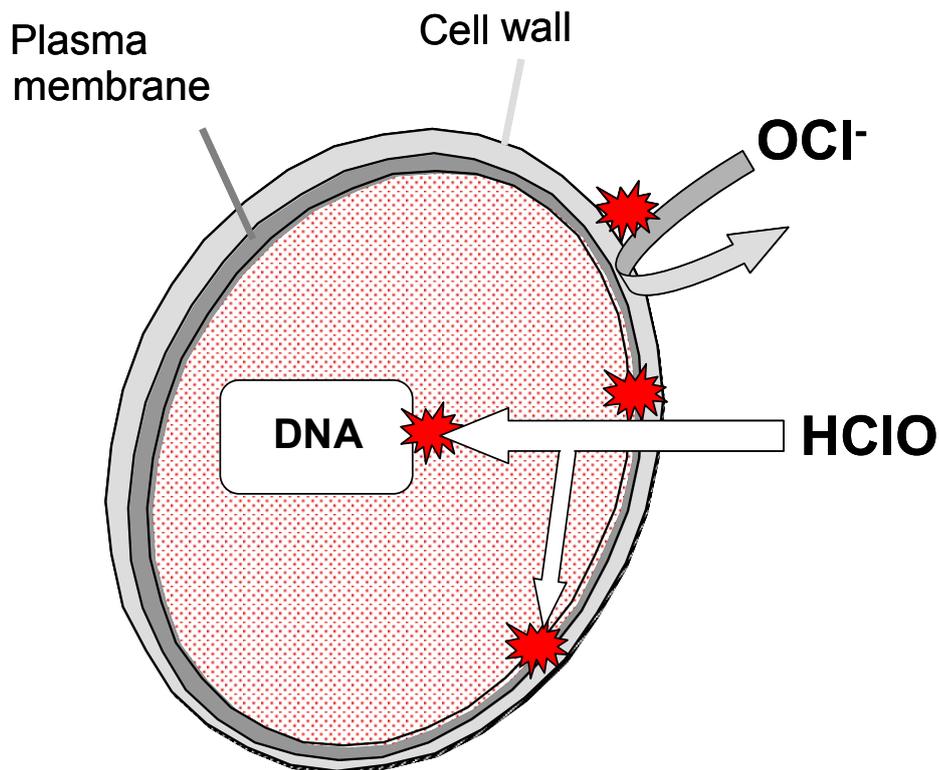


Fig.2-2 The microbicidal mechanism of OCl^- and $HClO$ ³⁴⁾

2.2 弱酸性次亜塩素酸水溶液の安全性

弱酸性次亜塩素酸水溶液の生体に対する安全性についてはマウスおよびラットを用いた経口投与試験，眼刺激試験，皮膚感作試験において検討されている。これらの試験により，有効塩素濃度 200 ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液の安全性は水道水と差がないことが確認されている ⁴⁴⁻⁴⁶⁾。また，ラットへの噴霧吸入試験により噴霧粒子の吸入の安全性も確認されているが，噴霧粒子の吸入による体重，血液性状および肺等の組織への悪影響も認められなかった ⁴⁷⁻⁴⁸⁾。そのため，空間中に霧化させて噴霧し，浮遊菌対策に使用することも可能である。

また，塩素系の消毒剤は，有機物と反応して発がん性物質であるトリハロメ

タンが生成する問題が知られている⁴⁹⁾。トリハロメタンの生成量はアルカリ域で多く、弱酸性域では次亜塩素酸ナトリウムと比較してトリハロメタンの生成量は10分の1程度となることが報告されており、安全性の高い資材である⁵⁰⁾。

弱酸性次亜塩素酸水溶液は次亜塩素酸ナトリウムと同様、有機物、温度、紫外線などの要因で次亜塩素酸が分解して塩(NaCl)になり、有効塩素濃度が低下する⁵¹⁻⁵³⁾。pHによるウシ血清アルブミン(BSA)およびペクチンに各pHの次亜塩素酸を接触させた場合、pHが4.5~6.0の範囲で有効塩素濃度の残存率が高い傾向が認められているものの、有機物の共存により殺菌効果は低下することが報告されている⁵⁴⁾。反面、環境負荷が低く高濃度で大量に使用する場合以外は排水時に中和処理の必要がない⁵⁵⁾。

弱酸性次亜塩素酸水溶液の国内の各種法的位置づけとしては、特定化学物質、危険物、毒劇物、医薬品のいずれにも該当しない。食品分野では、使用時に用事調製したものは食品添加物として認可されており、食品や器具の殺菌に用いることが可能である⁵⁶⁾。

第 3 章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の各種微生物に対する基礎的な殺菌効果の検証

3.1 はじめに

塩素は、1774年にスウェーデンの化学者 C.W. Scheele によって発見され、1810年に英国の化学者 H. Davy によって‘塩素 (Chlorine)’と名付けられて以来、世界中で使用されている消毒資材の1つである⁵⁷⁾。塩素系消毒剤の中でも、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) は高い殺菌効果と広い抗菌スペクトルを持つこと、液状で使用が容易であること、微生物や有機物と反応後は無害な塩化物イオンに還元されること、安価であるなどの長所をもつことから、医療・食品・畜産等の分野において汎用されている⁵⁸⁾。

次亜塩素酸ナトリウムは医療分野においてはリネン・医療用具・環境に有効塩素濃度 200~500 ppm での清拭あるいは浸漬で、食品製造分野においては器具や食材に有効塩素濃度 100~200 ppm での洗浄で用いられている⁵⁹⁾。しかし、これらの有効塩素濃度で次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合、使用時に接液した金属部への腐食性があること、ヒトの粘膜への刺激や異臭があることが問題となっている。また、食品分野の場合、次亜塩素酸ナトリウム特有の塩素臭が異臭味としてクレームの原因になるだけでなく、食材の有機物と反応して発がん性物質であるトリハロメタンが生成され食品中に残存するという健康上の問題も存在する⁴⁹⁻⁵⁰⁾。また、異臭味およびトリハロメタン除去のため、後段の水洗工程にて大量の水ですすぐ必要があり、製造コストの増加の一因となっている。

弱酸性次亜塩素酸水溶液は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液の pH を弱酸性に

調整することで、水中における有効塩素中の分子型の次亜塩素酸(HClO)の割合を増加させている。荷電を持たない次亜塩素酸(HClO)は微生物細胞内に速やかに浸入し、細胞内外から効果的に作用するため^{34, 53)}、次亜塩素酸ナトリウムよりも低濃度かつ短時間で殺菌が可能となる。そのため金属への腐食や異臭味が軽減され、殺菌処理後段の濯ぎの水量および時間も減少・短縮することが可能である。

本研究では、弱酸性次亜塩素酸水溶液の基礎的な殺菌効果の確認を行った。すなわち、弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌効果および抗菌スペクトルを明らかにするため、各種微生物の標準株および臨床分離株に対する殺菌およびウイルス不活化効果の検討を行った。また、次亜塩素酸ナトリウムとの殺菌効果を比較するため、pHを弱酸性～アルカリ性域に調整し、各pHにおける殺菌効果の違いについても比較した。

3.2 材料および方法

3.2.1 次亜塩素酸水溶液の調製

弱酸性次亜塩素酸水溶液の原料としては、いずれも食品添加物認可されている次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 6%)と希塩酸(8.5%)を使用した。調製は弱酸性次亜塩素酸水溶液生成装置(HSP-1000SME(株)エイチ・エス・ピー)を用いて次亜塩素酸ナトリウムと希塩酸を水道水と希釈混合して行った。

試験にあたっては、次亜塩素酸水溶液は有効塩素濃度 50 ppm, pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 に調製し、pHはEH Controller PH-51((株)IWAKI)、有効塩素濃度はハンディ水質計アクアブ AQ-102(柴田科学(株))を用いて測定した。

3.2.2 供試微生物

供試微生物として標準株は細菌 10 株，真菌 2 株，ウイルスは 1 株を用いた。
臨床分離株は細菌 7 種 33 株，真菌は 4 種 14 株を用いた。Table 3-1, Table 3-2
に各々標準株および臨床分離株の供試微生物を示す。

Table 3-1 Standard strains

Standard strains		
Bacteria	Gram negative	<i>Psuedomonas aeruginosa</i> ATCC27853 <i>Escherichia coli</i> ATCC25992 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC13637 <i>Acinetobacter baumannii</i> JCM6841 <i>Salmonella typhimurium</i> IFO12529
	Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 <i>Enterococcus faecium</i> ATCC35667 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 (spore) <i>Bacillus cereus</i> NBBC13597 (spore)
Fungi		<i>Candida albicans</i> ATCC10231 <i>Aspergillus niger</i> IFO4407
Bacteriophage		<i>Phage Q β</i>

Table 3-2 Clinical isolates

	Clinical isolate strains	No. of strains
Bacteria	<i>Psuedomonas aeruginosa</i>	10
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	5
	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	6
	<i>Enterococcus faecalis</i>	8
	<i>Enterococcus feacium</i>	2
	<i>Enterococcus avium</i>	1
Fungi	<i>Candida albicans</i>	10
	<i>Candida grabrata</i>	2
	<i>Candida krusei</i>	1
	<i>Candida tropicalis</i>	1

3.2.3 菌液の調製

微生物を実験に供すにあたり、前培養として細菌の場合は標準寒天培地上、*Candida* 属はサブロー寒天培地上にて 24 時間、*Aspergillus niger* はポテトデキストロース寒天培地上で 7 日間、いずれも 37 °C で培養した。培養後、コロニーの一部を白金耳にて採取し、滅菌精製水中に接種菌数が $1.0 \times 10^{7-8}$ CFU/mL となるよう懸濁し、供試菌液として用いた。芽胞菌 2 種 (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*) は 14 日間、35 °C で標準寒天培地上に前培養して芽胞を形成させたコロニーを白金耳にて採取して滅菌生理食塩水に懸濁し、60 °C、1 分間加熱して増殖型細胞を死滅させた後、滅菌生理食塩水にて 3000 rpm で 2 回遠心洗浄したものを芽胞懸濁液とした。実験にあたっては芽胞懸濁液を Meller 染色し、顕鏡にて 90 % 以上が芽胞であることを確認して

試験に供した。大腸菌ファージ Q β は高密度集積培養状態で冷蔵保存したものを使用した。Q β の高密度集積培養液の調整法⁶⁰⁻⁶¹⁾を以下に示す。Table 3-3 に示す大腸菌ファージ定量用液体培地 10 mL に宿主細菌である大腸菌 (*Escherichia coli* K-12F⁺ A/ λ) を移植して 37 °C, 120 rpm, 20 \pm 2 時間振とう培養した。その培養液を大腸菌ファージ定量用液体培地 200 mL に全量移植し, これに Q β 保存液 (10⁹ PFU/mL) を 10 mL 接種し, 同様に 37 °C, 120 rpm, 5 時間振盪培養し Q β を増殖させた。宿主菌体を除去するため, 培養液を遠心分離 (4 °C, 8000 rpm, 20 min) した後, 孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (ADVANTEC MEMBRANE FILTERS Cat.No. A045A047A) を用いて濾過し, Q β 高密度集積培養液 (10⁹~10¹⁰PFU/mL) を得た。試験にあたっては, 滅菌精製水に Q β 数が 10⁷ PFU/mL となるように懸濁したものを Q β 懸濁液とした。

Table3-3 Composition of liquid culture medium of phageQ β

Polypepton	10g
Yeast extract	5g
Glucose	1.5g
NaCl	5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.05g
Purified water	1000mL

3.2.4 殺菌試験

供試菌液および芽胞懸濁液 0.2 mL に有効塩素濃度 50 ppm の次亜塩素酸水溶液 1.8 mL を加えたのち速やかにボルテックスミキサーを用いて攪拌し、室温にて一定時間接触させた。一定時間後、BHI 液体培地 4.0 mL を加えて次亜塩素酸水溶液中の残留塩素を失活させた。BHI 液体培地は 72 時間、37 °C で培養後、目視にて培地の濁りの有無を確認し、濁りのあるものを陽性、ないものを陰性と判定した。*Aspergillus niger* の場合は、供試菌液に前述と同様次亜塩素酸水溶液に接触させた後、被験液の一部を経時的に採取してポテトデキストロース培地に 0.1 mL 平板塗布し、24 °C、7 日間培養した後にシャーレを観察し、コロニーが出現したものを陽性、しなかったものを陰性と判定した。Q β の場合は、前述と同様 Q β 懸濁液に次亜塩素酸水溶液に接触させた後、全量の 0.1 % となるようにチオ硫酸ナトリウムを速やかに添加して残留塩素を失活させたものを処理液とし、大腸菌ファージ定量用培地を用いた二層寒天プラーク形成法により 37 °C、24 時間培養後、Q β のプラークの有無を確認し、プラークのあるものを陽性、ないものを陰性として判定した。これらの生存菌の検出限界は細菌および *Candida. albicans* は 0.5 CFU/mL、*A. niger* は 10 CFU/mL、Q β は 10 PFU/mL であった。

殺菌効果は、標準菌株の場合は次亜塩素酸水溶液処理後に初めて陰性となった接触時間、すなわち最短殺菌時間を求め評価した。臨床分離株の場合は、次亜塩素酸水溶液の接触時間が 15 秒の条件で菌の増殖が見られたものを陽性、見られなかったものを陰性とし、陰性となった菌株数を求め評価した。

3.3 結果および考察

Table3-4 に各種標準株における細菌、カビおよびウイルスに対する次亜塩

素酸水溶液の最短殺菌時間を示す。

全ての微生物は pH 5～8 の次亜塩素酸水溶液で 15～3600 秒で殺菌・不活化されており，次亜塩素酸水溶液は本実験に供したすべての微生物に対して殺菌効果を有していた。

Table 3-4 Microbicidal effect of hypochlorous solutions against standard strains

Standard strains	Control (CFU/mL)	pH			
		5	6	7	8
		First negative (sec)			
<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	1.1-16 × 10 ⁷	15	15	15	15
<i>E.coli</i> ATCC25992	2.0-9.2 × 10 ⁷	15	15	15	15
<i>S.maltophilia</i> ATCC13637	2.1-7.0 × 10 ⁷	60	60	180	180
<i>A.baumannii</i> JCM6841	1.7-5.3 × 10 ⁷	15	15	15	30
<i>S.typhimurium</i> IFO12529	3.8-6.9 × 10 ⁷	15	30	30	30
<i>S.aureus</i> ATCC25923	2.0-16 × 10 ⁷	15	15	15	15
<i>E.faecalis</i> ATCC29212	1.1-11 × 10 ⁷	15	15	15	15
<i>E.faecium</i> ATCC35667	1.4-16 × 10 ⁷	15	15	15	15
<i>B.subtilis</i> ATCC6633 (spore)	4.7-7.2 × 10 ⁷	300	300	600	3600
<i>B.cereus</i> NBBC13597 (spore)	3.7-7.1 × 10 ⁷	600	600	1800	3600
<i>C.albicans</i> ATCC10231	1.0-3.4 × 10 ⁷	15	15	15	30
<i>A.niger</i> IFO4407	1.8-5.5 × 10 ⁶	300	300	900	1800
Phage Q β	1.0 × 10 ⁶ (PFU/mL)	15	15	15	15

The available chlorine concentration was 50 ppm

Detection limit was 0.5 CFU/mL.

(Detection limit of *A.niger* was 10 CFU/mL, and Phage Q β was 10 PFU/mL)

また、供試菌種によって殺菌効果の違いが認められた。*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* および $Q\beta$ は全ての pH 域で最短殺菌時間が 15 秒と最も短い時間で殺菌・不活化された。これらの菌種は次亜塩素酸水溶液に対して抵抗性が低かった。*Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium*, *C. albicans* は pH 5 の弱酸性域では 15 秒の接触で検出限界以下となったが、pH が上昇するにつれ最短殺菌時間が長くなり、pH 8 のアルカリ域ではいずれも 30 秒となった。この結果よりこれらの菌種は次亜塩素酸水溶液に対して中程度の抵抗性を持つことが明らかとなった。

Stenotrophomonas maltophilia, *B. subtilis*, *B. cereus*, *A. niger* は pH 6 の場合で最短殺菌時間が各々 60 秒, 300 秒, 600 秒, 300 秒と他の微生物よりも長く、次亜塩素酸水溶液に対して高い抵抗性を有していた。また、これらの菌種は次亜塩素酸水溶液の pH によって殺菌効果に大きな影響を受けた。例えば *B. subtilis* の場合、pH 5, 6 の弱酸性域では最短殺菌時間は 300 秒であったが、pH 8 のアルカリ性域では 3600 秒と大幅に長くなった。

Table 3-5 に各種臨床分離株に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌効果を示す。有効塩素濃度 50 ppm, 15 秒間接触の条件下では、本試験に供した細菌 7 種 33 株全てにおいて陰性となった。*Candida* 属については pH 5~7 の範囲では 4 種 14 株全てが陰性となったが、pH 8 では *C. albicans* が 10 株中 5 株、その他の *Candida* 属 4 種の全てが陽性となった。この結果より、*Candida* 属は細菌と比較して次亜塩素酸に対する抵抗性が高く、その殺菌効果は pH による影響を受けることが明らかとなった。

Table 3-5 The microbicidal effects against clinical isolates

	Clinical isolates	No. of strains	Control (CFU/mL)	pH			
				5	6	7	8
				Positive number of strains / Total number of strains			
Bacteria	<i>P. aeruginosa</i>	10	1.1-16 × 10 ⁷	0/10	0/10	0/10	0/10
	<i>A. baumannii</i>	1	2.0-9.2 × 10 ⁷	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>S. aureus</i> MRSA	5	2.1-7.0 × 10 ⁷	0/5	0/5	0/5	0/5
	<i>S. aureus</i> MSSA	6	1.7-5.3 × 10 ⁷	0/6	0/6	0/6	0/6
	<i>E. faecalis</i>	8	3.8-6.9 × 10 ⁷	0/8	0/8	0/8	0/8
	<i>E. faecium</i>	2	2.0-16 × 10 ⁷	0/2	0/2	0/2	0/2
	<i>E. Avium</i>	1	1.1-11 × 10 ⁷	0/1	0/1	0/1	0/1
Fungi	<i>C. albicans</i>	10	1.4-16 × 10 ⁷	0/10	0/10	0/10	5/10
	<i>C. grabrata</i>	2	4.7-7.2 × 10 ⁷	0/2	0/2	0/2	2/2
	<i>C. kurusei</i>	1	3.7-7.1 × 10 ⁷	0/1	0/1	0/1	1/1
	<i>C. tropicalis</i>	1	1.1-16 × 10 ⁷	0/1	0/1	0/1	1/1

The available chlorine concentration was 50 ppm
 Contact time was 15 s. Detection limit was 0.5 CFU/mL

以上の結果より、標準株、臨床分離株とも弱酸性域である pH 5.0, 6.0 において殺菌効果が高いことがわかった。この結果は、pH の違いによる塩素の形態の違いからくるものと考えられる⁶²⁻⁶³⁾。次亜塩素酸の殺菌効果をより詳細に検討するため、次亜塩素酸水溶液に対して抵抗性の高かった *B. subtilis*, *B. cereus*, *A. niger* の有効塩素中の次亜塩素酸 (HClO) の存在比と殺菌効果の関係を求めたものを Fig. 3-1 に示す。

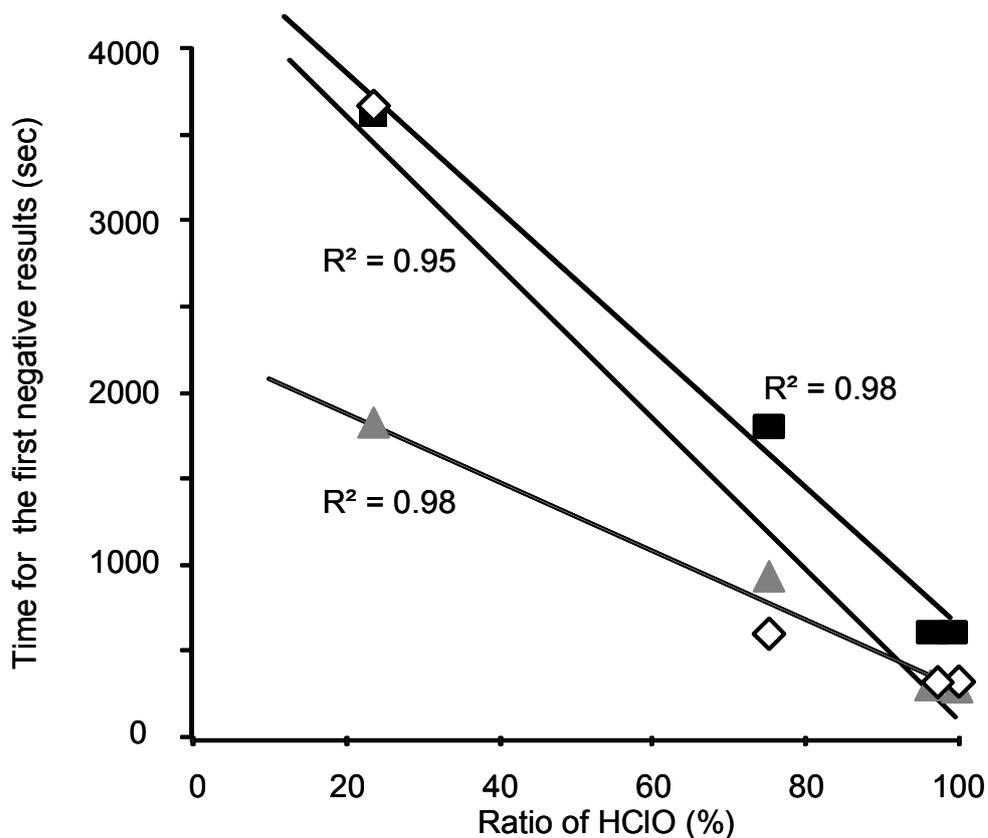


Fig.3-1 A relation between the ratio of HClO in the solution and microbicidal effects
 *The available chlorine concentration was 50ppm.
 Symbols ; ■, *B.cereus*; ◇, *B.subtilis*; ▲, *A.niger*.

すなわち縦軸に各 pH における最短殺菌濃度，横軸に pH から求めた有効塩素に占める次亜塩素酸 (HClO) の割合 (%) をプロットした。pH 5, 6, 7, 8 における次亜塩素酸 (HClO) の割合は解離定数 (pK_a) 7.5 (25 °C)³⁴⁾ から算出し，各々 99.7 %，96.9 %，76.0 %，24.0 %であった。有効塩素濃度 50 ppm の場合における 3 種の菌の最短殺菌時間と次亜塩素酸 (HClO) の存在比は線形近似し，決定係数 (r^2) は *B. subtilis*, *B. cereus*, *A. niger* が各々 0.95, 0.98 および 0.99 と強い相関が認められた。この結果は，次亜塩素酸水溶液の殺菌効果が有効塩素濃度でなく次亜塩素酸 (HClO) 濃度に依存することを示しており，福崎らの既存の研究結果とも一致する⁶⁴⁾。また Fig. 3-1 の近似直線の傾きは，各菌

種における次亜塩素酸水溶液への抵抗性の傾向を示している。芽胞菌 2 種 (*B. cereus*, *B. subtilis*) は *A. niger* と比較して近似直線の傾きが大きく、次亜塩素酸水溶液の pH によって殺菌効果に影響を受けやすい。これは芽胞表面の疎水性、電位および膜構造によるものと考えられる⁶⁵⁻⁶⁶⁾。また、本研究においては、次亜塩素酸に対して抵抗性が低い微生物は pH の違いによる殺菌効果が見られなかったが、次亜塩素酸を殺菌因子とする電解水では有効塩素濃度 1~5 ppm で弱酸性域の殺菌効果が向上することが報告されており⁶⁷⁾、弱酸性次亜塩素酸水溶液においても有効塩素濃度が低い場合は殺菌効果に差が表れると予想される。

また、臨床分離株の中には MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)をはじめとする抗生物質に対する薬剤耐性菌があることが報告されている⁶⁸⁾。病院以外の分野、すなわち畜産分野においても家畜に過剰投与された抗生物質により薬剤耐性菌が出現し、食品を介して薬剤耐性菌が伝播する危険性も報告されている²¹⁻²²⁾。そのため、畜産分野および食品製造分野でも薬剤耐性菌に対する殺菌を行うことが求められている。本試験において、弱酸性次亜塩素酸水溶液は MRSA および MSSA に対しても高い殺菌効果が確認されたことから、畜産および食品製造分野においても通常の微生物制御と同時に薬剤耐性菌対策としても有用性が高いことが示唆された。

3.4 まとめ

各種標準株および臨床分離株に対する弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌およびウイルス不活化効果の検討を行った。弱酸性次亜塩素酸水溶液は本試験で供したすべての細菌、カビおよびウイルスに対して高い殺菌・ウイルス不活化効果を有していた。また、殺菌・ウイルス不活化効果は弱酸性域である pH

5.0, 6.0 で向上し, アルカリ性である次亜塩素酸ナトリウムよりも殺菌・ウイルス不活化効果が高いことが明らかとなった。

以上の結果より, 弱酸性次亜塩素酸水溶液は殺菌剤として有用性が高いことが示された。

第 4 章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の浮遊芽胞菌および付着芽胞菌に対する殺菌効果

4.1 はじめに

Bacillus 属や *Clostridium* 属の芽胞菌による微生物汚染は医療・食品分野等において深刻な問題となっている。医療施設において、2006 年にはリネン類、特にシーツ等を介した *Bacillus cereus* による院内感染が報告されており⁶⁹⁾、偽膜性大腸炎の原因菌である *Clostridium difficile* の病院内での検出事例も年々増加している⁷⁰⁻⁷¹⁾。食品分野においては、*B. cereus*、*Clostridium botulinum* および *Clostridium perfringens* が食中毒菌として知られている⁷²⁻⁷⁴⁾。また、近年は、果汁飲料などの製造過程においてジュースや酸性飲料内で耐熱性好酸性菌 (Thermo-Acidophilic Bacilli; 以下 TAB) の一種である *Alicyclobacillus* 属菌が臭気成分グライヤコールを産生し、商品価値の低下が問題となっている⁷⁵⁻⁷⁶⁾。

芽胞は、一般的に消毒剤や熱に対する抵抗性が高く、エタノールや塩化ベンザルコニウムでは効果が十分に得られないため、殺菌には高水準消毒剤であるグルタラルや過酢酸、中水準消毒剤である次亜塩素酸ナトリウム等が使用されている⁷⁷⁻⁷⁸⁾。しかし、高・中水準消毒剤は殺菌効果が高い反面、グルタラルによる作業員への健康被害や⁷⁹⁾、次亜塩素酸ナトリウムによる金属腐食・食品への異臭味等の副次的な問題をはらんでいる^{52-53, 80)}。

第 3 章で弱酸性次亜塩素酸水溶液の各種微生物に対する殺菌およびウイルス不活化効果について検討を行ったところ、芽胞菌である *B. subtilis* および *B. cereus* は次亜塩素酸水溶液に対して高い抵抗性を有することがわかった。

しかし、pHを弱酸性域に調製することにより殺菌効果が向上することも確認された。本研究では芽胞に対する弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌効果をより詳細に検討することを目的とし、食中毒や院内感染の原因菌である *Bacillus cereus*、果汁飲料等の変敗原因となる耐熱性好酸性菌の一種である *Alicyclobacillus acidoterrestris*、偽膜性大腸炎の院内感染起因菌である *Clostridium difficile* の3種の芽胞に対する弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌試験を行った。また、弱酸性次亜塩素酸水溶液を実使用する場合、芽胞菌は水中に付着した状態だけでなく、様々な部材上に付着していることが想定される。そこで、各種部材表面に付着した芽胞に対する殺菌効果についても検討した。

4.2 材料および方法

4.2.1 次亜塩素酸水溶液の調製

次亜塩素酸水溶液の調製は3.2.1と同様の方法で有効塩素濃度10~200 ppm, pH 6.0, 9.0に調製した。pHおよび有効塩素濃度も3.2.1と同一の方法で測定した。

4.2.2 菌液の調製

供試菌株として *Bacillus cereus* (NBRC13597), *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC49025) および *Clostridium difficile* (JCM1296) を用いた。芽胞液の調製にあたっては、*B. cereus* は標準寒天培地(日水製薬(株)), *A. acidoterrestris* はYSG寒天培地(Difco社), *C. difficile* はGAM寒天培地(日水製薬(株))上に供試菌株を塗布し、*B. cereus* および *C. difficile* は37℃, *A. acidoterrestris* は45℃で5日間培養して芽胞

を形成させた。なお、*C. difficile*は嫌気培養を行った。

芽胞を含むコロニーを平板から白金耳を用いて採取して滅菌精製水に懸濁し、80℃、10分の加熱処理を行い、増殖型細胞を死滅させた後、滅菌精製水にて3000 rpmで2回遠心洗浄したものを芽胞懸濁液とした。実験にあたっては、芽胞懸濁液をMeller染色し、顕鏡にて90%以上が芽胞であることを確認して実験に供した。

4.2.3 水溶液中に浮遊した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌試験

芽胞懸濁液0.1 mLを各次亜塩素酸水溶液30 mLに添加し、一定時間接触させたものを試料液とした。試料液の初菌濃度は*B. cereus* 5.9~6.2 logCFU/mL, *A. acidoterrestris* 5.5~5.9 logCFU/mL, *C. difficile* 5.7~5.9 logCFU/mLであった。試料液の一部を経時的に採取し、速やかに0.1%チオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌生理食塩水中に混和して残留塩素を失活処理した。失活処理後、適宜10倍段階希釈して*B. cereus*は標準寒天培地、*A. acidoterrestris*はYSG寒天培地、*C. difficile*はGAM寒天培地上に平板塗抹し、37℃(*A. acidoterrestris*は45℃)48時間培養後、生存芽胞数を測定した。

4.2.4 各種部材表面に付着した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌試験

部材はポリスチレン(φ86 mm, 滅菌シャーレ)、ステンレス鋼(SUS304, 50 mm×50 mm)、布(木綿, 50 mm×50 mm)の3種を選定した。ポリスチレンおよびステンレス鋼表面に各種芽胞懸濁液0.1 mLを接種し、コンラージ棒で表面全体に塗布した後、室温にて1時間乾燥させたものを検体とした。布は芽胞懸濁液を10倍希釈したものを1 mL接種して塗布、乾燥させたものを検体とし

た。各検体の1枚あたりの初菌数は *B. cereus* 4.7~4.9 logCFU/plate, *A. acidoterrestris* 4.8 ~ 5.5 logCFU/plate, *C. difficile* 3.6 ~ 3.8 logCFU/plate であった。各検体を滅菌シャーレ内に設置し、有効塩素濃度 50 ppm および 200 ppm, pH 6 および 9 の次亜塩素酸水溶液 30 mL を接触させ一定時間静置した後、0.1 % チオ硫酸ナトリウム 1 mL を混和して残留塩素を失活させた上で次亜塩素酸水溶液を静かに除去した。検体に直接芽胞殺菌試験と同様の寒天培地を加えて混積し、48 時間培養後に検体 1 枚あたりの生菌数を測定した。

4.3 結果および考察

4.3.1 水溶液中に浮遊した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌効果

Fig. 4-1 に *B. cereus*, *A. acidoterrestris* および *C. difficile* の芽胞に次亜塩素酸水溶液を接触した場合の殺菌効果を示す。すべての系において接触時間および有効塩素濃度の増加とともに生菌数は減少した。検出限界以下 (<10 CFU/mL) にするための接触条件は、*B. cereus* の場合、pH 9 では有効塩素濃度 200 ppm, 240 分必要であったが、pH 6 では同時間条件では有効塩素濃度 10 ppm で検出限界以下となり、有効塩素濃度 200 ppm では 5 分であった。同様に、*A. acidoterrestris* の場合は、pH 9 では有効塩素濃度 200 ppm, 60 分だったのに対し、pH 6 では、有効塩素濃度 10 ppm, 240 分であった。*C. difficile* の場合では、pH 9 では、有効塩素濃度 10 ppm, 120 分であったが、pH 6 では、有効塩素濃度 10 ppm, 30 分であった。すなわち芽胞 3 種すべてにおいて pH 6 の次亜塩素酸水溶液は pH 9 の場合よりも低い有効塩素濃度あるいは短い接触時間で検出限界以下にすることが可能であった。

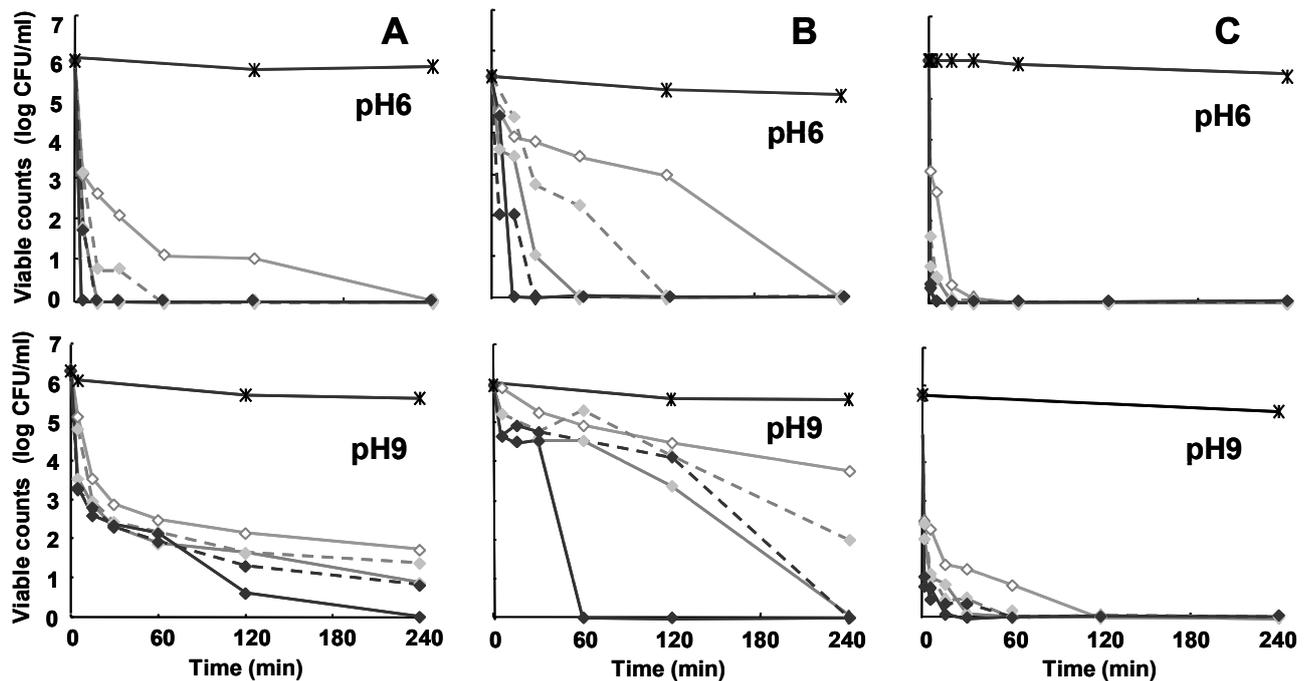


Fig.4-1 Bactericidal effect of pH9 or 6 hypochlorous solutions against suspended *B.cereus* (A), *A.acidoterrestris* (B) or *C.difficile* (C) spores. Symbols: —*—, Distilled water; —◇—, 10ppm; -◇-, 30ppm; —◆—, 50ppm; -◆-, 100ppm; —◆—, 200ppm.

消毒剤の効果を評価する際に、消毒剤濃度(C:ppm)と接触時間(T:min)を乗じた濃度時間積(CT値)が用いられる。本試験においても、芽胞に対する殺菌効果を、接触時間および有効塩素濃度から濃度時間積を求めて評価した。

Fig.4-1より、初発芽胞数(N_0)に対する一定時間後の生存芽胞数(N)から生残率を求め、以下の式より、対数生残率(S)を求めた。

$$S = \log(N/N_0) \quad (1)$$

浮遊芽胞の対数生残率(S)を算出し、縦軸にS、横軸に濃度時間積をプロットし、近似式を求めたものを Fig.4-2 に示す。Sは、濃度時間積に対して対数近似し、決定係数 $r^2=0.53\sim 0.88$ の相関が認められた。この近似式よりSを-4.0(99.99%)低下させる場合の濃度時間積の値を求めたものを Table 4-1

に示す(以下 CT 値と略す)。*B. cereus*, *A. acidoterrestris* および *C. difficile* の pH 6 の場合の 99.99 % CT 値は, 各々 250, 2800, 140 ppm·min であり, *A. acidoterrestris* が他 2 種の芽胞と比較して高い CT 値を示し, 次亜塩素酸水溶液に対して抵抗性が高いことが示された。また, 芽胞 3 種とも同有効塩素濃度の場合, pH 9 の場合の CT 値は pH 6 よりも大きく, 4.1~8.1 倍の値を示した。塩素の殺菌の主体は非解離型の次亜塩素酸 (HClO) であることが報告されている¹⁰⁻¹¹⁾。次亜塩素酸の解離定数 $pK_a=7.5$ より³⁴⁾, pH 6 および 9 の場合の次亜塩素酸 (HOC1) の濃度比率 (存在比率) を求めると, 各々 96.9 %, 3.1 % であり, pH 6 では次亜塩素酸 (HClO) の割合が大きいことから, 高い殺菌効果が得られたと考えられる。

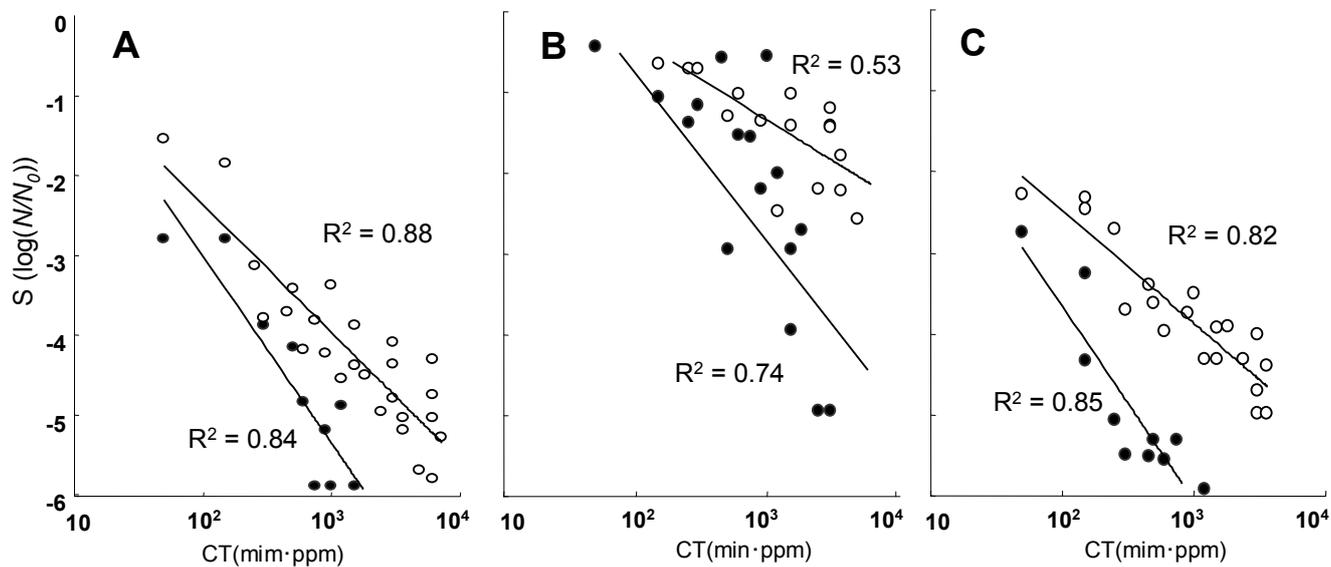


Fig.4-2 The relation of the Log survival rate of pH6(●) or pH9(○) hypochlorous solutions and CT(Time-Concentration) values in suspended *B.cereus* (A), *A.acidoterrestris* (B) or *C.difficile* (C) spores. R^2 : Coefficient of determination

Table 4-1 The CT values of hypochlorous solutions for 99.99% kill of suspended spores

pH	CT value (ppm·min)		
	<i>B.cereus</i>	<i>A.acidoterrestris</i>	<i>C.difficile</i>
6	250	2800	140
9	1000	13000	1100

4.3.2 各種部材表面に付着した芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌効果

Fig. 4-3 にポリスチレン，ステンレス鋼および布に付着させた芽胞 3 種を次亜塩素酸水溶液に接触した場合における殺菌効果を示す。すべての条件において，時間の経過とともに生菌数の減少が見られ，いずれの条件においても，同有効塩素濃度であれば pH 6 のほうが早く検出限界以下 (<1 CFU/検体) となった。*B. cereus* の場合，検出限界以下にするための接触条件は，pH 6，有効塩素濃度 200 ppm で，ポリスチレンで 5 分，ステンレス鋼で 15 分，布で 1 分以内であったのに対し，pH 9，有効塩素濃度 200 ppm では，60 分の接触が必要であった。*A. acidoterrestris* の場合も，pH 6，有効塩素濃度 200 ppm の条件では，5～15 分であったが，pH 9，有効塩素濃度 200 ppm の条件では，ステンレス鋼で 60 分，布で 120 分であり，ポリスチレンは 180 分でも検出限界以下にならなかった。*C. difficile* の場合も，pH 6，有効塩素濃度 200 ppm の条件では 5～15 分であったのに対し，pH 9，有効塩素濃度 200 ppm で 30～60 分であった。

付着芽胞菌についても浮遊芽胞と同様に，ポリスチレン，ステンレス鋼および布表面への付着菌に対する対数生残率(S)を算出し，縦軸に S と横軸に濃度時間積をプロットして近似式を求めた。S は浮遊菌の場合と同様に濃度時間積に対数近似し，決定係数は $r^2=0.67\sim 0.98$ の範囲であった。付着菌の CT 値を Table 4-2 に示すが，すべての系において，pH 9.0 の場合の方が pH 6.0 の場合と比較して CT 値の値が大きく，付着菌においても弱酸性域で殺菌効果が高かった。

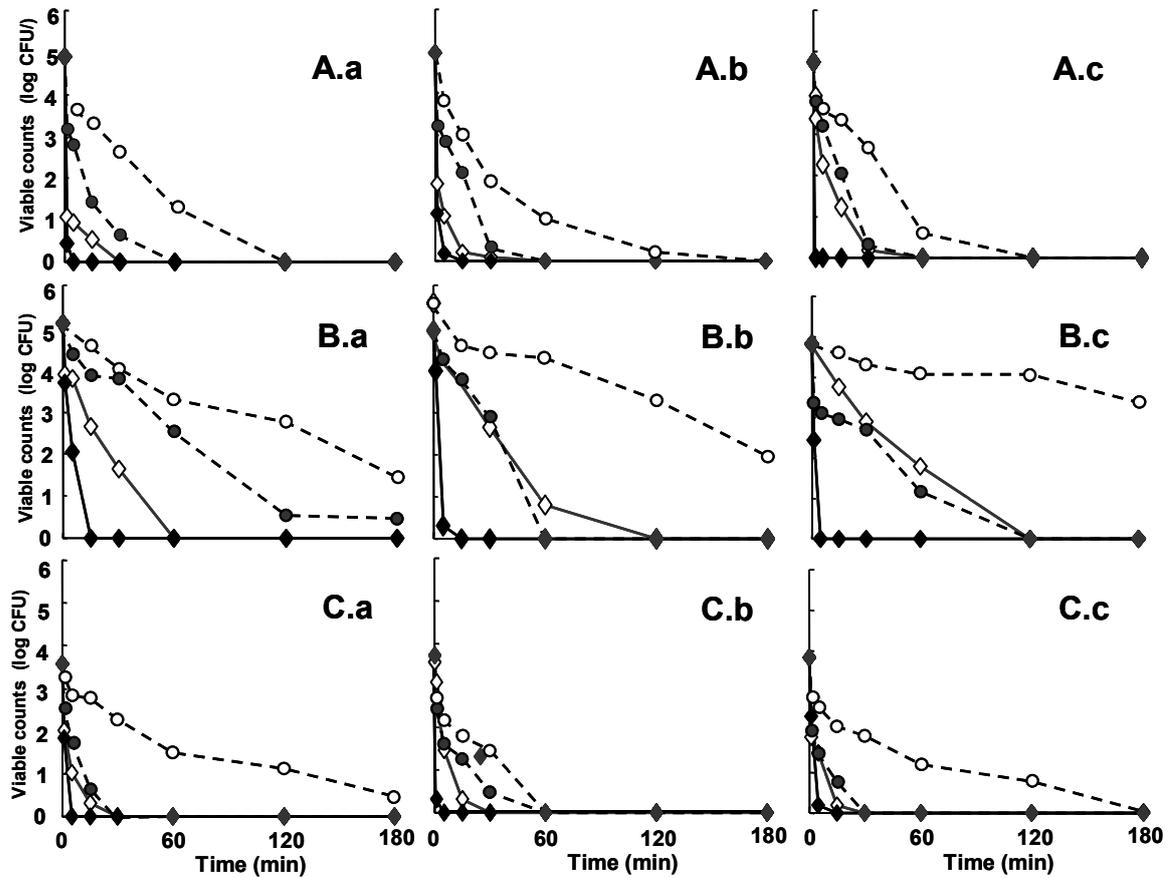


Fig.4-3 Bactericidal effect of hypochlorous solutions against attached *B.cereus* (A), *A.acidoterrestris* (B) or *C.difficile* (C) spores to polystyrene (a), Stainless steel (b) or Cotton fabric (c).
 Symbols: \diamond , 50ppm(pH6); \circ , 50ppm(pH9); \blacklozenge , 200ppm(pH6); \bullet , 200ppm(pH9).

Table 4-2 The CT values of hypochlorous solutions for 99.99% kill of attached spores

Solid surface	pH	CT value (ppm·min)		
		<i>B.cereus</i>	<i>A.Acidoterrestris</i>	<i>C.difficile</i>
polystyrene	6	130	1300	1100
	9	4000	28000	23000
Stainless steel	6	240	1500	1300
	9	3400	13000	9000
Cotton fabric	6	650	2900	1500
	9	4100	21000	13000

芽胞の種類毎に比較すると、CT 値は pH および部材に関わらず、*B. cereus*, *C. difficile*, *A. acidoterrestris* の順に増大する傾向が認められた。また、pH 6 の場合には、すべての芽胞において、布に付着させた場合に高い CT 値を示した。布は、他 2 種の部材と異なり芽胞が繊維内部にまで浸潤して存在しており、試料液が布に浸透して芽胞に接触するまでに時間を要したと考えられる。また、ポリスチレンの水に対する接触角は 84° (20°C)⁸¹⁾、ステンレス鋼 (SUS304) の水に対する接触角は表面処理によっても違い $74.1\sim 115.5^{\circ}$ (28°C)⁸²⁾ である。本試験においてはポリスチレンとステンレス鋼の間に CT 値に傾向は認められず、付着菌に対する殺菌効果は、部材のぬれ易さ、各芽胞の部材に対する吸着性、部材の表面構造等、他の要因の複合的な影響があることが考えられる。

食品・医療等実際の現場において芽胞形成菌が付着状態で存在する例としては、*B. cereus* に汚染されたリネンや食品類⁸³⁾、果汁飲料製造用 CIP (Cleaning in Place) 配管内の *A. acidoterrestris* の汚染⁷⁵⁻⁷⁶⁾、病院内にて *C. difficile* に汚染されたトイレ・床等⁸⁴⁻⁸⁵⁾ が挙げられる。バイオフィルムの内部に微生物が存在していた場合は、CT 値は増大すること報告されている^{41-42, 86)}。その場合、あらかじめ洗浄工程にて汚れやバイオフィルムを除去した後に残存する芽胞を死滅させる方法として、弱酸性次亜塩素酸水溶液は十分に有用であると考えられる。

2.4 まとめ

芽胞形成菌 3 種の芽胞に対する次亜塩素酸水溶液の殺菌効果の検討を行った。芽胞に対する対数生残率 (S) は有効塩素濃度 (ppm) と時間 (min) の積に対数近似した。CT 値は pH が弱酸性域において低い値となり、殺菌効果が高い

ことが明らかとなった。この傾向はポリエチレン，ステンレス鋼および布に芽胞を付着させた場合にも同様であった。また，*A. acidoterrestris* は，*B. cereus* および *C. difficile* と比較して，次亜塩素酸水溶液に対して高い抵抗性を示した。以上の結果より，弱酸性次亜塩素酸水溶液は食品および医療等の現場において有効性の高い殺菌資材であることが示された。

第 5 章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の生鮮野菜に対する殺菌効果および 界面活性剤併用効果の検討

5.1 はじめに

近年、野菜全体の消費量は減少傾向にあるが、健康志向の向上および生活様式の変化により、より簡便に使用でき、少量で使い切ることができるカット野菜の消費は増加している⁸⁷⁾。生鮮野菜の場合、野菜の栽培中に土壌や肥料または野鳥・野生動物からの微生物汚染を受けることがある。生食用カット野菜の場合、野菜の細胞を切断した際に細胞液が漏出し、細胞液を栄養源として微生物が増加し易い条件となる上、消費まで加熱工程がない。そのため、栽培中の汚染のリスクに加え、流通および加工段階で二次汚染されるリスクも内包している⁸⁸⁻⁹⁰⁾。海外では、生鮮野菜およびカット野菜を原因食材とした大規模な食中毒事例が頻発しており⁹¹⁻⁹³⁾、日本国内でも微生物学的リスクの制御が求められている。

本章では、非加熱で食する生鮮野菜類に着目し、カット野菜の原料として特に殺菌が困難なキュウリおよびアオネギを材料に選定し、加工工程内で弱酸性次亜塩素酸水溶液を殺菌に使用することを想定して、その使用方法の検討を行った。また、弱酸性次亜塩素酸水溶液の野菜表面の菌体への接触性を向上させることを目的とし、弱酸性次亜塩素酸水溶液に界面活性剤としてポリグリセリン脂肪酸エステルおよびショ糖脂肪酸エステル配合洗浄剤をそれぞれ混合して使用した場合の洗浄殺菌効果についても比較検討した。

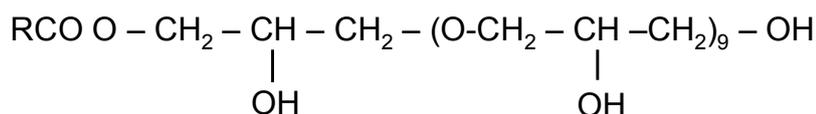
5.2 材料および方法

5.2.1 次亜塩素酸水溶液および界面活性剤添加次亜塩素酸水溶液の調製

弱酸性次亜塩素酸水溶液は 3.2.1 と同様の方法で有効塩素濃度 100 ppm, pH 6.0 に調製した。pH および有効塩素濃度も 3.2.1 と同一の方法で測定した。

界面活性剤はポリグリセリン脂肪酸エステルおよびショ糖脂肪酸エステル配合洗剤を用いた。2 剤の構造を Fig. 5-1 に示す。

Polyglycerol esters of fatty acids



RCO···Lauric acid

HLB (hydrophile-lipophile balance) value = 16

Washing agent with sucrose fatty acid esters

Components

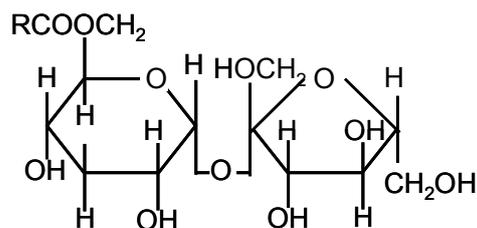
Sucrose lauric acid esters

Sodium citrate

Propylene glycol

Ethanol

Water



HLB value = 15

Fig.5-1 Chemical structural formula of the surfactants

本剤は非イオン界面活性剤で食品添加物に指定されており、食品用乳化剤および洗浄剤として使用されている⁹¹⁾。HLB(Hydrophile-lipophile balance)値は各々16, 15と親水性を示す。界面活性剤添加次亜塩素酸水溶液は、弱酸性次亜塩素酸水溶液にポリグリセリン脂肪酸エステルおよびシヨ糖脂肪酸エステル配合洗浄剤(シヨ糖脂肪酸エステル5%配合)を各々250 ppmとなるように添加して調製した(以下、P-WAHS, S-WAHSと略す)。

5.2.2 界面活性剤添加次亜塩素酸水溶液の性質

弱酸性次亜塩素酸水溶液に界面活性剤を添加することにより、界面活性効果およびpH、遊離塩素濃度が維持されるかどうかを検討した。

界面活性効果は、水道水、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度100 ppm)、弱酸性次亜塩素酸水溶液、P-WAHSおよびS-WAHSの表面張力を表面張力計CBVP-A3(協和界面科学(株))を用い、プレート法にて測定し評価した。

また、弱酸性次亜塩素酸水溶液、P-WAHSおよびS-WAHS各々100 mLを調製後、実験室内に室温、開放状態で静置した場合のpHおよび遊離塩素濃度の経時的変化を測定した。pHはEH Controller((株)IWAKI)、遊離残留塩素濃度はDPD法残留塩素測定器((株)SIBATA)を用いて測定した。

5.2.3 *B. cereus* 芽胞の調製

Plate-Count-Agar(MERCK)に*Bacillus cereus*(NBRC 13597)を塗布し、37℃で24時間培養したのち、5日間室温に静置して芽胞を形成させた。芽胞を含むコロニーを平板から採取し滅菌精製水に懸濁した後、60℃、10分の加熱処理を行い、滅菌精製水を用いて2回洗浄し、芽胞懸濁液を調製した。実験に当たっては、顕鏡にて90%以上が芽胞であることを確認した。

5.2.4 *B. cereus* 芽胞に対する殺菌効果

基礎実験として、水中に浮遊状態の *B. cereus* 芽胞に対する殺菌効果を検討した。水道水、ポリグリセリン脂肪酸エステル(250 ppm)、シヨ糖脂肪酸エステル配合洗剤(250 ppm)、弱酸性次亜塩素酸水溶液、P-WAHS、S-WAHS 各々 100 mL に、*B. cereus* 芽胞懸濁液を 6.0~6.3 logCFU/mL となるように添加したものを試料液とした。なお、P-WAHS および S-WAHS は調製後 5 分以内に実験に供した。

試料液の一部を経時的に採取し、速やかに 0.1 %チオ硫酸ナトリウム添加滅菌生理食塩水中に混和して残留塩素を失活処理した。失活処理後、適宜希釈して Plate-Count-Agar に塗抹し、37 °C、48 時間培養後、生菌数を測定した。

5.2.5 キュウリおよびアオネギの洗浄殺菌

カット野菜洗浄殺菌への適用を想定し、供試野菜として表面構造などから殺菌効果が得られにくく、かつ生食する機会の多いキュウリおよびアオネギを用いた。キュウリおよびアオネギは市販品を試験に供した。水道水、弱酸性次亜塩素酸水溶液、P-WAHS および S-WAHS を被験液とした。なお、P-WAHS および S-WAHS は調製後 5 分以内に実験に供した。

キュウリのヘタ部およびアオネギの根部をカットして除いた後、各被験液流水下で 1 分間、擦り洗いを行った。その後、キュウリは 2 分の 1 にカットしたもの(100~120 g)、アオネギは 10 cm の長さにカットしたもの約 10 本(9~11 g)を各被験液 300 mL に投入し、マグネチックスターラーを用いて攪拌しつつ 10 分間浸漬処理した。浸漬処理後、キュウリおよびアオネギの 5 g

を滅菌生理食塩水 45 mL に採取し破碎したものを試料原液とした。試料原液を滅菌生理食塩水で適宜希釈して Plate-Count-Agar に塗抹し、37 °C、48 時間培養後、生菌数を測定した。

5.3 結果および考察

5.3.1 界面活性剤添加次亜塩素酸水溶液の性質

Table 5-1 に示すように、水道水の表面張力は 71.7 N/m であり、既報の表面張力の値ともほぼ一致した⁹⁵⁾。次亜塩素酸ナトリウムおよび弱酸性次亜塩素酸水溶液の表面張力は各々 67.2, 70.6 N/m であり、水道水とほぼ同等の表面張力であった。

弱酸性次亜塩素酸水溶液に界面活性剤 2 種を加えることによって、P-WAHS および S-WAHS の表面張力は各々 31.3, 28.0 N/m まで低下した。これは、界面活性剤を蒸留水に混合した場合と表面張力はほぼ同等であり、界面活性効果に弱酸性次亜塩素酸水溶液は影響を与えないことが分かった。

Table 5-1 Surface Tension of Tap water, Sodium hypochlorite, WAHS, P-WAHS, S-WAHS, Polyglycerol esters of fatty acids or Washing agent with Sucrose Fatty Acid Esters

	Tap water	Sodium hypochlorite	WAHS	P-WAHS	S-WAHS	Polyglycerol esters of fatty acids	Washing agent with Sucrose Fatty Acid Esters
surface tension (N/m)	71.7	67.2	70.6	31.3	28.0	30.7	29.2

Fig. 5-2 に弱酸性次亜塩素酸水溶液，P-WAHS および S-WAHS の pH および遊離残留塩素濃度の経時的変化を示す。初期 pH 6.0，初期遊離残留塩素濃度 50 ppm のとき，pH は，弱酸性次亜塩素酸水溶液および S-WAHS は調製 144 時間後まで，pH 6.0 付近で安定していた。P-WAHS は調製後 24 時間以降 pH が低下し，144 時間後には pH 4.1 になった。

遊離残留塩素濃度は弱酸性次亜塩素酸水溶液の場合，48 時間以内は濃度の変化が見られず，その後 144 時間で 5 ppm 低下した。P-WAHS は 48 時間までは濃度の低下が見られなかったが，144 時間後では 26 ppm まで低下した。S-WAHS は調製直後に 50 ppm から 40 ppm まで低下するものの，24 時間は 40 ppm を維持し，144 時間後では 14 ppm まで低下した。

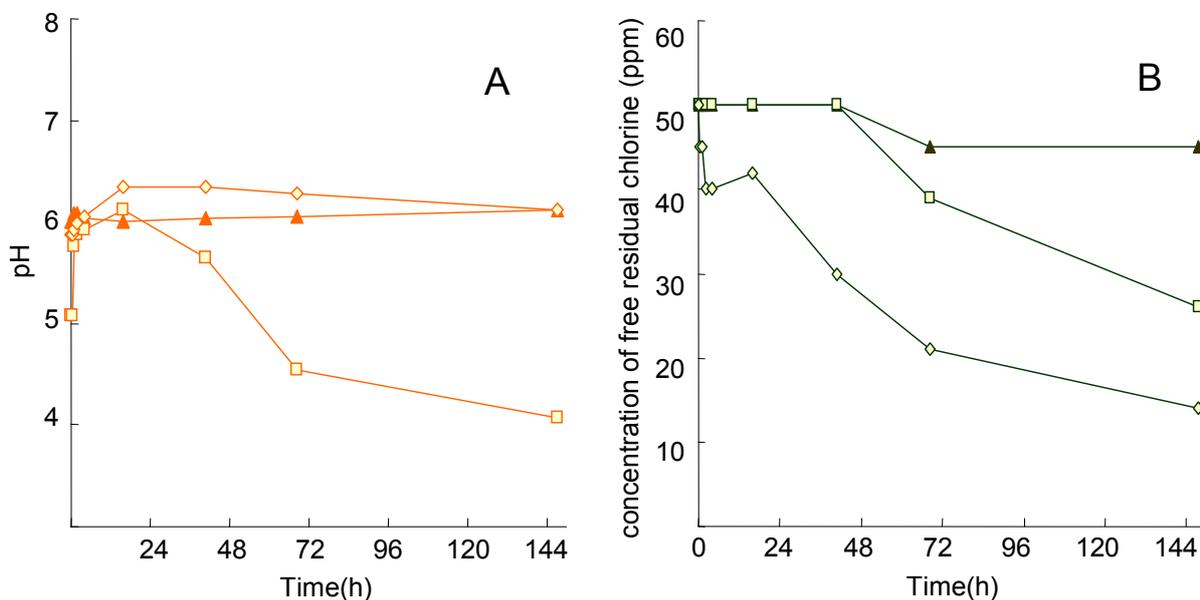


Fig.5-2 pH(A) and concentration of free residual chlorine(B) of WAHS, P-WAHS or S-WAHS (▲ WAHS □P-WAHS ◇S-WAHS)

以上の結果より，弱酸性次亜塩素酸水溶液に界面活性剤を加えることにより，表面張力は著しく減少し，かつ調製後 24 時間は pH および遊離残留塩素濃度の低下も少ないことがわかった。一般的に，塩素系の消毒剤は有機物と反応すると失活して効力を失うことが知られており⁵¹⁾，洗浄剤とも反応し，殺菌効果が低下するため，洗浄剤と混合して使用することは推奨されていない。しかし，本実験で用いた 2 種の界面活性剤は調製後 24 時間まで遊離残留塩素濃度，pH を維持し，かつ表面張力も低下しており，弱酸性次亜塩素酸水溶液との併用が可能であることが明らかとなった。

5.3.2 *B. cereus* 芽胞に対する殺菌効果

Fig. 5-3 に *B. cereus* 芽胞に対する弱酸性次亜塩素酸水溶液，P-WAHS，S-WAHS および界面活性剤単独の殺菌効果を示す。蒸留水単独および界面活性剤単独では，*B. cereus* 芽胞の生菌数は低下せず，界面活性剤自体に殺菌効果は認められなかった。弱酸性次亜塩素酸水溶液および P-WAHS，S-WAHS はいずれも高い殺菌効果が認められ，界面活性剤を添加しても殺菌効果は変化しなかった。

この結果より，界面活性剤 2 種は，弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌効果自体を増大させる効果はなく，浮遊状態の *B. cereus* 芽胞に対しては次亜塩素酸 (HC10) の単独の殺菌効果が主体であることが示唆された。

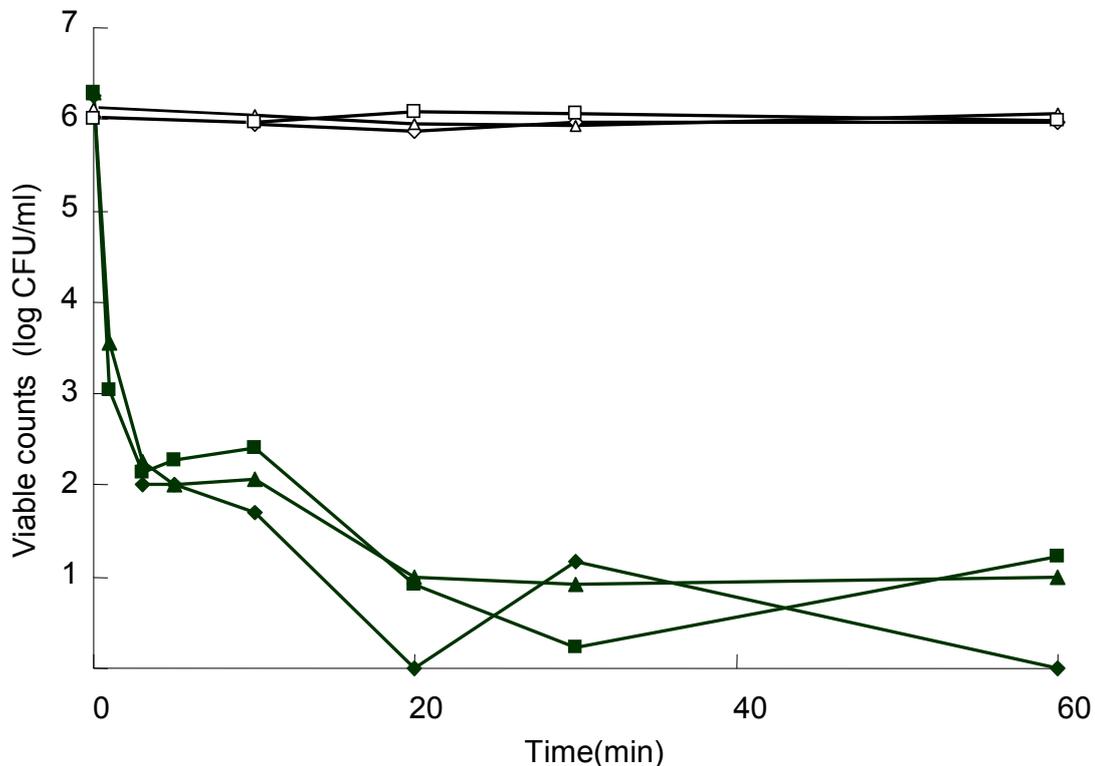


Fig.5-3 Bactericidal effect of WAHS, P-WAHS, S-WAHS against *B.cereus* spores

- ◇ Distilled water △ Polyglycerol esters of fatty acids
- Washing agent with Sucrose Fatty Acid Esters
- ◆ WAHS ▲ P-WAHS ■ S-WAHS

5.3.3 キュウリおよびアオネギの洗浄殺菌効果

Fig. 5-4 に水道水，弱酸性次亜塩素酸水溶液，P-WAHS および S-WAHS で洗浄殺菌した場合のキュウリおよびアオネギに対する殺菌効果を示す。なお有意差検定には Student's-t 検定を用いた。キュウリおよびアオネギの洗浄前の一般生菌数 (Control) は各々 5.4, 4.9 logCFU/g であった。洗浄後，アオネギの水道水洗浄を除くすべての系で生菌数が有意に減少した。また，弱酸性次亜塩素酸水溶液での洗浄後の生菌数はキュウリおよびアオネギで各々 3.8, 4.1 logCFU/g であったのに対し，界面活性剤 2 種を添加することにより，キ

キュウリは各々2.9, 2.2 logCFU/g アオネギは各々2.8, 2.1 logCFU/g まで生菌数を有意に低下させることが可能であった ($p < 0.05$)。また、キュウリにおいては P-WAHS 洗浄殺菌よりも S-WAHS 洗浄殺菌の方が生菌率が有意に低く ($p < 0.05$)、高い殺菌効果が認められた。

野菜に存在する微生物の大部分は、野菜表面に存在しているが⁹⁶⁾、キュウリおよびアオネギ表面は、疎水性クチクラ層で覆われ、細菌より遥かに大きい気孔などの植物器官が存在することから、付着微生物にとって好ましい自己防衛環境が整えられている⁸⁶⁾。そのため、殺菌剤が野菜表面の菌体に接触せず、効果が得られにくい⁹⁷⁻⁹⁹⁾。本実験では、弱酸性次亜塩素酸水溶液に界面活性剤を添加することにより、野菜表面への濡れ性が向上し、弱酸性次亜塩素酸水溶液を野菜に満遍なく接触させることができたため、野菜表面に存在する微生物に対して殺菌効果が向上したと考えられる。

また、カット野菜製造の洗浄殺菌工程は、水洗、中性洗剤で洗浄、流水すぎ、殺菌剤での殺菌、水洗という流れが推奨されている⁶⁾。界面活性剤を弱酸性次亜塩素酸水溶液に添加して使用することができれば、中性洗剤で洗浄する工程と殺菌剤で殺菌する工程を同時に行うことができ、工程の簡素化が期待される。また、界面活性剤添加弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄殺菌した場合のカット野菜の味臭の変化は、弱酸性次亜塩素酸水溶液と同程度であり、洗浄殺菌工程後の水洗によって、除去できるものと考えられた。

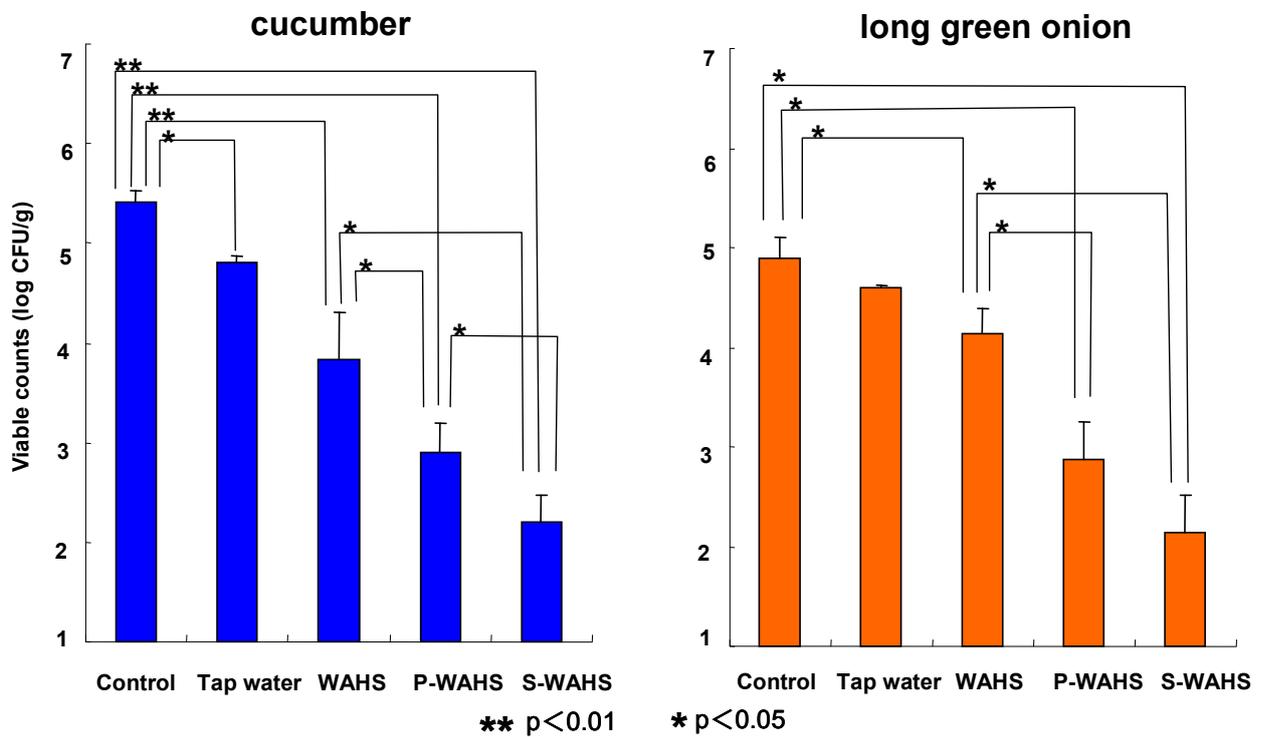


Fig.5-4 Bactericidal effect on the cucumber and the long green onion with treated Tap water,WAHS, P-WAHS or S-WAHS

5.4 まとめ

弱酸性次亜塩素酸水溶液に界面活性剤 2 種を添加した場合，殺菌効果および界面活性効果を同時に維持することが可能であった。キュウリおよびアオネギに対して弱酸性次亜塩素酸水溶液単独よりも高い殺菌効果が得られ，カット野菜製造工程において有用性が高い手法であることが示唆された。

第 6 章

弱酸性次亜塩素酸水溶液のハクサイ殺菌への適用および

クロロホルム生成量の検討

6.1 はじめに

第 5 章では弱酸性次亜塩素酸水溶液のカット野菜に対する基礎的な殺菌効果とその殺菌効果の増強技術について検討を行った。第 6 章では、実際の大規模食品製造ラインとして漬物製造ラインを想定し、弱酸性次亜塩素酸水溶液の適用を検討した。

漬物は発酵や高塩分によって食中毒菌の増殖が抑えられる保存食だが、加熱工程がないため、原材料に付着した微生物が品質や食中毒発生に与える影響は極めて大きい。さらに、近年の健康志向の高まりから、漬物の塩分濃度は減塩傾向にあり、細菌が増殖しやすい環境となっている¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁾。

2012 年には北海道でハクサイの浅漬けを原因食材とした病原性大腸菌 O157 の集団食中毒が発生しており⁴⁾、原料から製品までの一貫した衛生管理の重要性が再確認されている。それに伴って漬物の衛生規範が改訂され、原材料に付着した微生物を殺菌するため、次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm で 10 分または 200 ppm で 5 分処理という殺菌工程が追加されている¹⁰²⁾。

Fig.6-1 に漬物の製造工程を示す。本試験では実際の漬物製造ライン中の、ハクサイの洗浄殺菌工程で弱酸性次亜塩素酸水溶液を使用することを想定し、殺菌時間および殺菌方法の検討を行い、漬物衛生規範で推奨されている殺菌法との比較を行った。また、塩素系の殺菌料を食材洗浄殺菌に用いた場合に懸念される、発がん性物質の一種であるトリハロメタンの生成量についても

検討を行った。

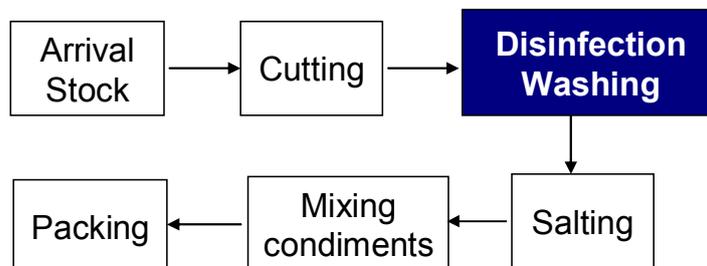


Fig.6-1 The production process of the Chinese cabbage for Japanese pickles

6.2 材料および方法

6.2.1 弱酸性次亜塩素酸水溶液および次亜塩素酸ナトリウム水溶液の調製
弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製は3.2.1と同様の方法で有効塩素濃度50 ppm, pH 6.0に調製した。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は, 有効塩素濃度12 %次亜塩素酸ナトリウムを水道水で希釈し, 有効塩素濃度100 ppm, 200 ppmとなるように調製した。pHおよび有効塩素濃度も3.2.1と同一の方法で測定した。

6.2.2 ハクサイに付着する生菌数の測定

ハクサイの洗浄殺菌を行うにあたり, どの部位に細菌が多く付着しているかを調べるため, まず原材料のハクサイの各部位ごとの菌数測定を行った。試験は, 漬物原材料のハクサイを用いて行った。検体の採集部位を Fig.6-2に示す。ハクサイの鬼葉(最外部の葉)2~3枚と根部を除去して均一に混合したものを可食部とした。採取部位は, 可食部, 鬼葉, 鬼葉の土付着部, ハクサイ内部の褐変部, 根部とした。各部位から検体10gを90mL滅菌生理食

塩水中に採取し破碎したものを、適宜滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈し、標準寒天培地（日水製薬(株)）および XM-G 培地（日水製薬(株)）に平板塗抹した。37 °C，48 時間培養後，一般生菌数，大腸菌群数および大腸菌数を測定した。

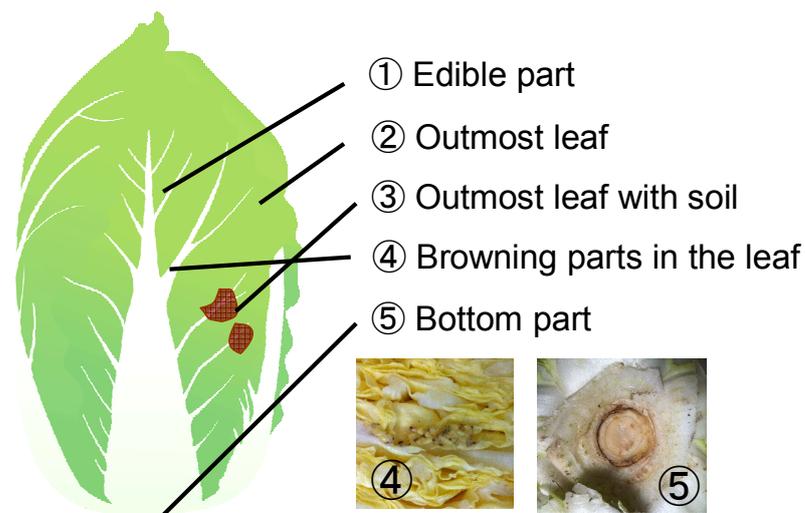


Fig.6-2 Sample points of the Chinese cabbage

6.2.3 弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いたハクサイの洗浄殺菌試験

ハクサイの洗浄試験に使用するハクサイは、6.2.2 の試験同様、漬物原材料のものを用いた。包丁は水洗いの後 70%エタノールで清拭し、十分乾燥させた清潔なものを用いた。試験にあたっては、ハクサイの鬼葉を包丁で 2~3 枚除去した後、4 分割し、1 枚ずつ葉を外したものを試料とした。被験液は、水道水、弱酸性次亜塩素酸水溶液(有効塩素濃度 50 ppm, pH 6.0)、次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度 200 ppm, pH 9.7) の 3 種とした。洗浄殺菌条件を Table 4-1 に示す。洗浄殺菌の条件は生食野菜用洗浄機での使用を想定

して設定した。洗浄殺菌は2段階で行い、ハクサイ1kgに対し、一次洗浄は各被験液10Lに20秒間攪拌し、二次洗浄はいずれも水道水10Lに20秒間攪拌浸漬した。

殺菌効果の測定にあたっては、各被験液で一次洗浄、二次洗浄後のハクサイの各々10gを検体として採取し、90mL滅菌生理食塩水中に採取し破碎した。これを滅菌生理食塩水で適宜10倍段階希釈し、6.2.2と同様に一般生菌数、大腸菌群数、大腸菌数を測定した。

また、漬物衛生規範に基づく殺菌方法との比較を行うため、10Lの次亜塩素酸ナトリウムにハクサイ1kgを有効塩素濃度200ppmは5分間、100ppmは10分間静置浸漬し、同様に殺菌効果を測定した。

Table 6-1 Treatment conditions of the Chinese cabbage

The first washing ※1	The second washing ※1
Tap water	Tap water
WAHS	
NaClO 200ppm	
NaClO 200ppm 5min static dipping ※2	
NaClO 100 ppm 10min static dipping ※2	

※1 The first washing ; 1kg Chinese cabbage was dipped 10L each first test solution, and washed at 20 seconds.

The second washing ; The Chinese cabbage was treated by tap water under the same condition as the first washing.

※2 The condition of Code of hygienic practice for pickled vegetables.

6.2.4 弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄した場合のクロロホルムの生成量

被験液で洗浄後のハクサイについて、トリハロメタンの一種であるクロロホルムの生成量の測定を行った。なお、漬物衛生規範に基づき次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm に 5 分間および 100 ppm に 10 分間静置浸漬した場合についても同様に測定した。10 mm 角にカットしたハクサイ 10 g に各被験液 100 mL を加えて、20 秒間攪拌浸漬し、同様に漬物衛生規範に基づき静置浸漬した後、速やかに被験液および次亜塩素酸ナトリウムを除去するため水切りを行なった。その後、精製水 50 mL を加え 5 分間静置し、精製水の 10 mL をバイアル瓶に採取して 30 °C で 1 時間静置した後、ヘッドスペース-GC/ECD 法 (SHIMADZU GC-14A) によりクロロホルム量の測定を行った。

6.3 実験結果および考察

6.3.1 ハクサイに付着する生菌数

Table 6-2 に洗浄前のハクサイの各部位における一般生菌数、大腸菌群数、大腸菌数を示す。なお検出限界は 1.0 logCFU/g とした。洗浄前のハクサイから採取したすべての部位の検体から一般生菌が検出され、可食部の一般生菌数は 6.4 logCFU/g であり、この値は浅漬の製造・流通管理マニュアルに記載された浅漬原料ハクサイの一般生菌数の値ともほぼ同等であった¹⁰³⁾。最も一般生菌数が多かったのは、ハクサイ内部の褐変部で、8.5 logCFU/g の一般生菌数が検出された。これは、可食部全体よりも 2 桁以上高い値であり、褐変が微生物によるものであることを示唆していた。製造時に褐変部が混入すると、漬物の浸漬液を介して、製品全体に汚染が拡大することが懸念されるため、褐変部を除去することは重要であると考えられる。

大腸菌群数は、鬼葉、鬼葉の土付着部、根部において各々 2.9, 3.3, 2.5

1logCFU/g が検出された。大腸菌数は本試験においてはすべての検体で検出限界以下であった。この結果は、ハクサイは外側から土壌を介して大腸菌群に汚染されることを示唆している。本試験においていずれの条件においても大腸菌は検出されなかったが、大腸菌については土付着部や根部を介した汚染経路が指摘されており¹⁰⁴⁻¹⁰⁵⁾、製造現場では、前処理時に土が付着した鬼葉や根部は除去することが望ましいと考えられた。

Table 6-2 Bacterial counts in the each points of the Chinese cabbage before washing

	(log CFU/g)				
	Edible part	Outmost leaf	Outmost leaf with soil	Browning parts in the leaf	Bottom part
Viable bacteria	6.4	4.8	6.6	8.5	6.1
Coliform	N.D.*	2.9	3.3	N.D.	2.5
<i>E.coli</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

※ detection limit <1 log CFU/g

6.3.2 弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いたハクサイの洗浄殺菌試験

Table 6-3 に弱酸性次亜塩素酸水溶液および次亜塩素酸ナトリウムでハクサイを洗浄殺菌した場合の一般生菌数を示す。なお本試験においては大腸菌群数および大腸菌数はすべての検体において検出限界以下 (<1.0 logCFU/g) であった。

洗浄殺菌前のハクサイの一般生菌数は 5.6 logCFU/g であったが、水道水、50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液、200 ppm 次亜塩素酸ナトリウムで 20 秒間の一次洗浄を行った場合、一般生菌数は各々 5.0, 3.7, 4.1 logCFU/g に低下し

た。さらに、水道水で二次洗浄を行なった後の一般生菌数は各々4.4, 3.2, 3.5 logCFU/gとなった。漬物衛生規範に基づき次亜塩素酸ナトリウムで静置浸漬した場合の一般生菌数は、有効塩素濃度 100 ppm で 10 分浸漬した場合 4.1 logCFU/g, 200 ppm で 5 分間浸漬した場合は 3.6 logCFU/g であった。

水道水で洗浄した場合の一次洗浄後、二次洗浄後の殺菌率を算出すると各々72.6 %, 93.8 %となった。これは攪拌による物理的な洗浄効果により、一般生菌数が低下したと考えられる。50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いた場合の殺菌率を算出すると各々98.6 %, 99.5 %となり、水道水よりも明らかに高い殺菌効果が認められた。また 200 ppm 次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合の殺菌率を算出すると、各々96.9 %, 99.1 %となり、弱酸性次亜塩素酸水溶液とほぼ同等の殺菌効果であった。pH を弱酸性に調整することにより、水中の塩素の形態が解離型の次亜塩素酸イオン (ClO^-) から非解離型の次亜塩素酸 (HClO) に変化したことから、低濃度でも同等の殺菌効果を得ることができたと考えられる。

また、50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液での攪拌洗浄は漬物衛生規範で定められた殺菌条件である、次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm で 5 分、あるいは 100 ppm で 10 分の浸漬よりも高い殺菌効果を示した。各条件における二次洗浄後および次亜塩素酸ナトリウム静置浸漬後の一般生菌数について Student's-t 検定を用い、有意差を検定したところ、二次洗浄後の水道水と 50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液での間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

生野菜の洗浄殺菌においては、静置浸漬のみよりも攪拌やバブリング、超音波など物理的な洗浄を組み合わせることによって殺菌効果が向上することが報告されている^{15,106)}。また、漬物原料やカット野菜などの大規模製造工場においては、洗浄殺菌は野菜洗浄機等のライン上で行われることが多く、

漬物衛生規範で推奨される浸漬時間を確保できない場合も多い。本試験においては、攪拌という物理的な洗浄を組み合わせることによって、20秒という短時間でも漬物衛生規範で求められる殺菌効果と同等の効果が得られており、食品製造工程においても適用が可能であると考えられる。

Table 6-3 Bactericidal effect on the Chinese cabbage with treated Tap water, WAHS or NaClO

Washing condition		(log CFU/g)		
		Before	After first washing	After second washing
Washing	Tap Water	5.6	5.0	4.4
	WHAS 50ppm		3.7	3.2
	NaClO 200ppm		4.1	3.5
Static Dipping*	NaClO 200ppm		3.6	
	NaClO 100ppm		4.1	

*The condition of Code of hygienic practice for pickled vegetables were dipping in 200ppm NaClO for 5min and in 100ppm NaClO for 10min

6.3.3 弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄した場合のクロロホルムの生成量

トリハロメタンは水道水の浄水過程や食材の洗浄過程で水中のフミン質等の有機物と有効塩素が反応して生成する物質で、日本では水道水質基準に総トリハロメタンとクロロホルム、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタンおよびブromoホルムの4物質が定められている¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾。総トリハロメタンのうち、クロロホルムおよびブロモジクロロメタンは発がん性が疑われており、IARC(国際がん研究機関)の Group2B(発がん性があるかもしれない物

質)に分類されている¹⁰⁹⁾。クロロホルムは、一般的に総トリハロメタンに占める割合が大きいことから¹¹⁰⁾、食品中へ残存し人体へ与える影響が大きいと考え、検討を行った。

Table 6-4 に水道水, 50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液, 200 ppm 次亜塩素酸ナトリウムでハクサイを洗浄殺菌した場合のハクサイに残存したクロロホルムの生成量を示す。洗浄殺菌前のハクサイのクロロホルム量は $0.09 \mu\text{g/g}$ であった。水道水, 50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液, 200 ppm 次亜塩素酸塩素酸ナトリウムで 20 秒間攪拌洗浄殺菌した後のハクサイのクロロホルムの生成量は, 各々 $0.16, 0.19, 0.89 \mu\text{g/g}$ であり, 洗浄殺菌前のハクサイよりもいずれも高い値となった。また, 漬物衛生規範に基づき次亜塩素酸ナトリウムで静置浸漬した場合のクロロホルムの生成量は, 有効塩素濃度 100 ppm で 10 分および 200 ppm で 5 分間の場合で各々 $0.71, 0.87 \mu\text{g/g}$ であった。

弱酸性次亜塩素酸水溶液と水道水を比較した場合, クロロホルムの生成量はほぼ同等であった。これに対し 200 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合では $0.89 \mu\text{g/g}$ であり, 弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄殺菌した場合の約 4.5 倍, さらに漬物衛生規範に基づく洗浄殺菌を行った場合の $0.71, 0.87 \mu\text{g/g}$ より高い生成量であり, 本試験の条件の中で最も高いクロロホルム生成量であった。クロロホルムの生成量はアルカリ域で増大することが報告されており⁴⁴⁻⁴⁵⁾, 本試験においても弱酸性域に調整することにより水道水と同程度にまでクロロホルムの生成量が抑制されたと考えられる。

なお, 食品中のクロロホルムの基準値は定められていないが, 国内の水道水の水質基準では 0.06 mg/L , WHO では 0.2 mg/L と定められており¹¹¹⁻¹¹²⁾, 本試験におけるクロロホルム生成量はこの値よりも高い。しかし, クロロホルムは水洗や空気中への揮散により減少するため¹¹³⁾, 弱酸性次亜塩素酸水溶

液処理したハクサイから消費者が摂取するクロロホルム量は、実際にはさらに低くなると考えられる。

Table 6-4 Amount of chloroform formed during each treatment condition

	Control	20s washing			Dipping	
		Tap water	WAHS	NaClO 200ppm	NaClO 200ppm 5min	NaClO 100ppm 10min
Chloroform remaining at Chinese cabbage (μ g/g)	0.09	0.16	0.19	0.89	0.87	0.71

しかし、魚介類など腐敗によって食品自体の pH がアルカリ性に変化するものもあり¹¹⁴⁾、これらに塩素殺菌を用いる場合、クロロホルムの発生による摂取リスクは高いといえる^{115,116)}。また、塩素による消毒副生成物は、他にも染色体異常あるいは形質転換誘発性が高いハロ酢酸類、また TOX に分類される未知の消毒副生成物が 50 % 以上存在する¹¹⁷⁾。そのため、弱酸性域で低濃度かつ短時間で漬物衛生規範と同等の殺菌効果を有する弱酸性次亜塩素酸水溶液は、さらなるリスク低減に有用であると考えられる。

6.4 まとめ

漬物原料であるハクサイについて弱酸性次亜塩素酸水溶液での殺菌効果および残存するクロロホルム量の検討を行った。ハクサイの最外葉や褐変部は一般生菌や大腸菌群の汚染リスクが高かった。弱酸性次亜塩素酸水溶液を用

いて攪拌洗浄を行うと 20 秒間という短時間で漬物衛生規範に推奨された方法と同等の殺菌効果を得ることができ、またクロロホルムの生成量も抑制された。よって弱酸性次亜塩素酸水溶液は、ハクサイの洗浄殺菌において作業効率を高めることができ、かつ有害な消毒副生成物の生成も抑えることができることから、有用性が高いことが示された。

第 7 章

弱酸性次亜塩素酸水溶液を鶏への飲水に用いた場合の殺菌効果， 生産性および安全性への影響

5.1 はじめに

養鶏場では同種の動物を高密度飼育することから、感染症のリスクが非常に高い。また、鳥インフルエンザや家禽コレラ等、家畜伝染病予防法で特定伝染病に指定された感染症が発生した場合、多くの鶏に感染して死亡するだけでなく、感染を食い止めるために同鶏舎・農場内の鶏の淘汰や発生農場から半径 10 km 圏内の農場での家禽の移動制限などが行われるため、その経済的な損失も莫大である¹⁷⁾。これまで感染症は飼育時に予防的に抗生物質を投与することで抑制してきたが、過剰の抗生物質投与による薬剤耐性微生物の産生が指摘されており²¹⁻²²⁾、その使用量の削減が求められている。そのため、感染症防御の手法は、鶏舎内の衛生管理を徹底することで、病気の発生および蔓延を防止する方向に転換しつつある。

鶏舎内の衛生管理の中で重要な項目の 1 つとして、飲用水の清浄性の確保があげられる。鶏舎内では複数の鶏が共用する飲水器が汎用されており、鳥インフルエンザ、大腸菌症、ニューカッスル病等の感染症に感染した鶏の鼻汁や唾液中に含まれる細菌やウイルスが給水器内に混入した場合、飲水を介して感染が拡大することが指摘されている¹¹⁸⁻¹¹⁹⁾。そのため、農林水産省の高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針の中でも「給水用の水は、飲用に適したものか消毒したものをを用いる」と規定されている¹⁷⁾。

本研究では、飲用水消毒の資材として弱酸性次亜塩素酸水溶液の検討を行

った。弱酸性次亜塩素酸水溶液は殺菌効果が高く、かつ抗菌スペクトルが広い
ため、鶏の感染症の原因となる微生物に対する殺菌・ウイルス不活化効果
を有している。また、鶏舎内洗浄や卵殻表面の洗浄でも使用の検討が進めら
れており¹²⁰⁾、高い殺菌効果を有することが報告されている。

本章では、養鶏現場における飲用水消毒資材としての弱酸性次亜塩素酸水
溶液の有効性について検討した。鶏舎内の給水システム内で弱酸性次亜塩素
酸水溶液を使用し、給水システム内の各計測ポイントにおける残留塩素濃度
および各種微生物の生菌数の測定を行った。また、生産現場での実用化のた
めに、鶏に弱酸性次亜塩素酸水溶液を長期間飲水させることによる生体およ
び生産成績へ及ぼす影響について確認しておく必要がある。既往の研究¹²¹⁾
では有効塩素濃度 50～400 ppm の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を 28 日間採卵
鶏に飲水させた場合、400 ppm 以下の濃度であれば産卵率などの生産性や血液
性状などの生理諸元に大きな影響を及ぼさないことが報告されているが、弱
酸性次亜塩素酸水溶液を長期間飲水させた場合については検討されていない。
そこで、ブロイラー種鶏に餌付けから淘汰まで(1～64 週齢)まで弱酸性次亜
塩素酸水溶液を長期間飲水させた場合の生産成績および安全性について検討
を行った。

7.2. 材料および方法

7.2.1 弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製

弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製は 3.2.1 と同様の方法で有効塩素濃度 50
ppm、pH 5.5～6.5 に調製した。pH および有効塩素濃度も 3.2.1 と同一の方法で
測定した。

7.2.2 弱酸性次亜塩素酸水溶液の供給システム

飲水試験は福田種鶏場(本社 岡山市)の鶏舎にて行った。ブロイラー用種鶏(雌:白色プリマスロック種)の雌初生ヒナ 16440羽を供試した。供試鶏は 8220羽ずつ 2群に分け,対照区と試験区に割りあて,それぞれ 1190 m²の鶏舎に収容し,平飼い飼育した。

Fig. 7-1, Pic. 7-1 に鶏舎内への弱酸性次亜塩素酸水溶液供給システムの模式図および実験風景を示す。試験区には弱酸性次亜塩素酸水溶液を,対照区には水道水を飲水させた。供試水は各々一旦給水タンクに貯めたものを,配管を通じてベル型給水器に供給し,餌付け(1週齢)から淘汰(64週齢)まで自由飲水で給与した。なお,餌付けから 1週間(0週齢)まではすべてのヒナに弱酸性次亜塩素酸水溶液を飲水させ,1週齢時より試験を開始した。

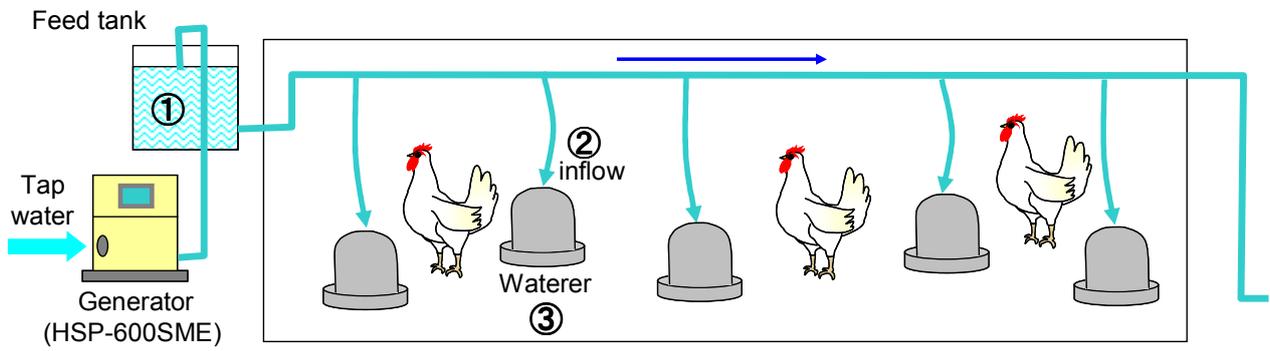


Fig.7-1 Disinfection system of drinking water



Pic.7-1 In vivo WAHS feeding trial

7.3 評価項目

7.3.1 残留塩素濃度

水中塩素における有効塩素は遊離塩素と結合塩素に大別される。遊離塩素は殺菌効力が高い半面、反応性に富むため失活しやすく、結合塩素は他の有機物との反応速度が遅く殺菌効力が低い反面、持続性がある¹³⁾。弱酸性次亜塩素酸水溶液の有効塩素はすべて遊離塩素として存在しているが、有機物と反応すると結合塩素に変化し、さらに反応が進むと失活して有効塩素濃度が低下する。

本試験では、55週齢時に試験区および対照区の給水タンク内中央部1ヶ所(n=1)、給水器の流入口2ヶ所(n=2)および給水器内部5ヶ所(n=5)から飲用水を採取した。遊離塩素濃度はDPD法残留塩素測定器((株)SIBATA)を用いてDPD法にて測定し、総塩素濃度は残留塩素比色測定器(アドバンテック東洋株式会社)を用いてKI法にて測定した。結合塩素濃度は総塩素濃度から遊離塩素濃度を差し引いて算出した。

7.3.2 生菌数の測定

生菌数は、一般生菌、真菌、ブドウ球菌、サルモネラ属菌、大腸菌群の5種を測定した。7.3.1で採取した水を滅菌生理食塩水を用いて適宜10倍段階希釈した後、それぞれ下記の各種培地に平板塗抹し、37℃、48時間培養して生菌数を算出した。使用培地は、一般生菌数では標準寒天培地(日水製薬株式会社)、真菌数ではポテトデキストロース寒天培地(日水製薬株式会社)、ブドウ球菌数ではマンニット食塩寒天培地(日水製薬株式会社)、サルモネラ属菌数ではブリリアントグリーン寒天培地(BECTON DICKINSON)、大腸菌群数ではデゾキシコレート寒天培地(MERCK)とした。統計解析はStudent's-t検

定で試験区と対照区間で有意差の検定を行なった。

7.3.3 育成率および生存率ならびに産卵率の算出

試験区ならびに対照区の鶏の斃死数ならびに淘汰数を1週間ごと調査し、試験開始(1週齢時)から24週齢時までの育成率並びに24週齢から淘汰(64週齢時)までの生存率を以下の式で算出した。なお、24週齢時に試験区ならびに対照区の鶏の生存羽数が同数になるよう調整し、生存率は24週齢時の生存羽数を母数として同様に算出した。統計解析は、1週間毎に値を求め、 χ^2 検定を行ない比較した。

$$\text{育成率} = \left(1 - \frac{\text{斃死数} + \text{淘汰数}}{\text{1週齢時生存羽数}} \right) \times 100$$

$$\text{生存率} = \left(1 - \frac{\text{斃死数} + \text{淘汰数}}{\text{24週齢時生存羽数}} \right) \times 100$$

産卵率は、24週齢時から64週齢時までの1週間毎の平均値からヘンデイ産卵率¹²²⁾を算出した。なお、同種鶏場で同月に餌付けした過去4年分のヘンデイ産卵率についても算出して平均値を求めた。統計解析は、1週間毎の平均値を角変換した後、10週毎にStudent's-t検定で有意差の検定を行なった。

7.3.4 臓器重量・血液性状・組織学的検査

臓器重量・血液性状・組織学的検査は1, 7, 20, 64週齢時に試験区、対照区から各々6羽の鶏を無作為に選び、体重測定後、採血および解剖を行い、臓

器重量 12 項目および血液性状 31 項目の測定を行った。測定項目の詳細は Table 7- 1 に示す。有意差の検定は Student' s - t 検定により行った。組織学的検査は、腎臓および肝臓の一部をブアン固定した後、ヘマトシキリン・エオジン染色を行い観察した。

Table 7-1 The measurements of the organ weights and blood test

Organ weights	Live weight, Liver, Lung, Heart, Lien, Gizzard, Pancreas, Ceca Digestive canal, Bladder, Ovary, Oviduct, Bursa of Fabricius
Blood test	Hepatic function : AST(GOT), ALT(GRT), LD(LDH), Cholinesterase γ -GT(γ GTP), LAP, Total bilirubin, Direct bilirubin, Indirect bilirubin ,ZTT, TTT, Total protein, Albumin, A/G Lipid : Total cholesterol, Neutral fat, HDL-C, LDL-C Kidney function : CK(CPK), Amylase, BUN, Creatinine, Uric acid Clinical chemistry evaluation : Na, Cl, K, Ca, Inorganic phosphorus, Serum iron, CRP Hematocrit

7.4 結果および考察

7.4.1 残留塩素濃度および生菌数

鶏舎内で採取した各計測ポイント (Fig. 7-1) の水の残留塩素濃度の平均値を Fig. 7-2 に示す。試験区の給水タンク内の残留塩素はすべて遊離塩素として存在し、遊離塩素濃度は 50.0 ppm であった。給水器の流入口では遊離塩素濃度は 30.5 ppm に低下し、結合塩素濃度は 12.0 ppm となった。さらに、給水器内では遊離塩素濃度は 1.1 ppm に低下し、結合塩素濃度は 13.5 ppm となった。一方、対照区では給水タンク内は遊離塩素濃度が 0.07 ppm、結合塩素濃度が 0.2 ppm であった。しかし、給水器の流入口ならびに給水器内部においては遊離塩素、結合塩素とも検出されなかった。

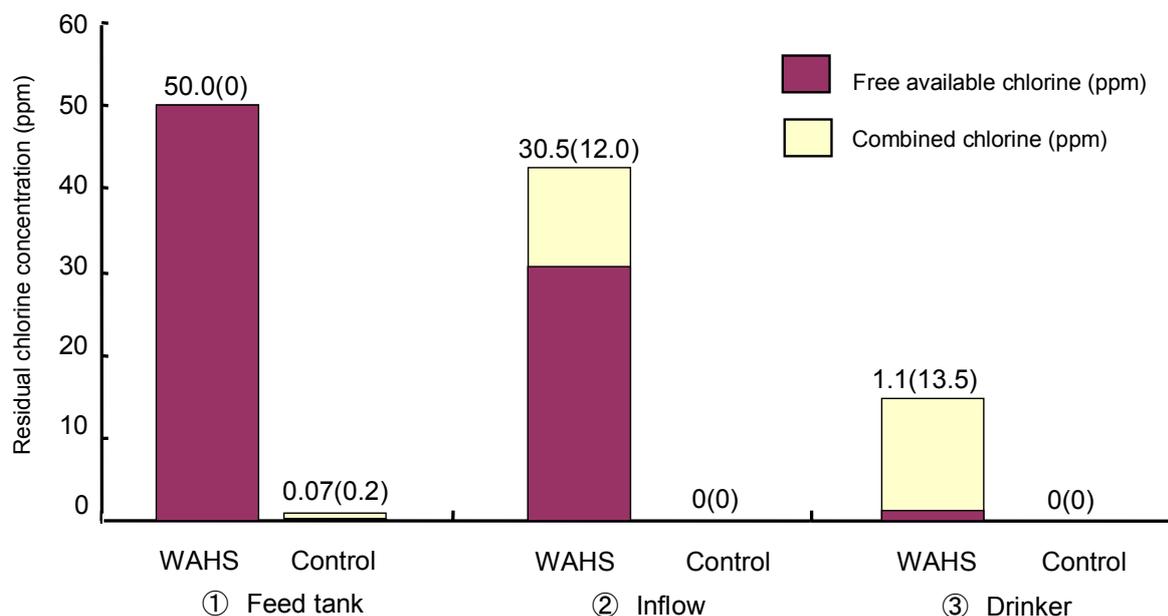


Fig.7-2 Free available chlorine and combined chlorine concentrations of the water supply system
 ※Number of parenthesis show the concentration of combined chlorine

給水システム内の各計測ポイントで検出された生菌数を Fig. 7-3 に示す。一般生菌数は試験区の給水タンクでは検出限界以下であったが、給水器内では 1.3×10^3 CFU/mL となり、給水システムの下流ほど菌数が増加した。一方、対照区では給水タンク内 2.7×10^3 CFU/mL から給水器内 4.4×10^6 CFU/mL の値となり、下流ほど著しい菌数の増加が認められ、給水器内の菌数は試験区では有意に低い値を示した。真菌数は試験区の給水タンクでは検出限界以下であったが給水器内では増加が認められた。対照区では給水タンク 1.1×10^3 CFU/mL から給水器内 8.6×10^2 CFU/mL となり、増加はほとんど認められないものの試験区よりも有意に高い値であった。ブドウ球菌数は、試験区では給水タンクが検出限界以下、給水器内 1.2×10^3 CFU/mL、これに対して対照区では給水タンク内 1.8×10^3 CFU/mL、給水器内 3.3×10^6 CFU/mL となり、一般生

菌数の場合と同様に試験区が対照区より有意に低い値となった。グラム陰性菌であるサルモネラ属菌ならびに大腸菌群の数は，試験区では給水タンク，給水器流入口，給水器内がいずれも検出限界以下(<10 CFU/mL)であったのに対して，対照区は給水システムの下流ほど増加し，給水器内では各々 2.3×10^5 CFU/mL， 2.2×10^4 CFU/mLであった。このように，試験区の生菌数は，対照区と比較して有意に低くなる傾向が認められた。

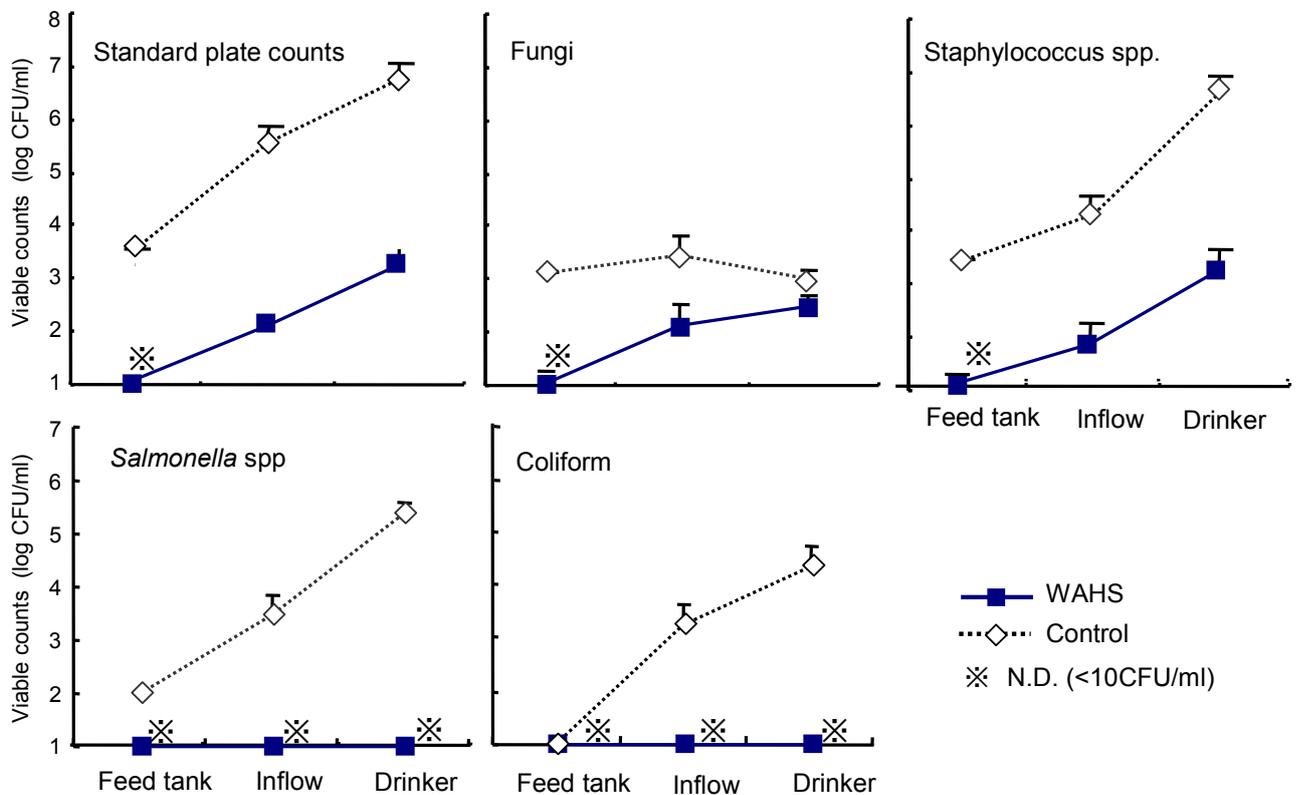


Fig.7-3 Bactericidal effects of WAHS in the water supply system

塩素系消毒剤は、有機物と容易に反応して遊離塩素が結合塩素に変化し、また還元されて残留塩素濃度が低下して殺菌効力が低下する³⁵⁻³⁸⁾。試験区では給水タンク内の残留塩素はすべて遊離塩素であったが、給水システムの下流ほど残留塩素は低下し、給水器内では給水タンクの29.2%となり、残留塩素濃度の92.5%が結合塩素として存在していた。一方、対照区の給水タンク内では水道水に含まれる残留塩素が検出されたが、給水器内部までは残留塩素濃度が維持できないことが明らかとなった。これらの残留塩素濃度の低下は、給水システム内の汚れや、鶏舎内の糞や埃などの有機物が混入したことによるものと考えられ、配管内や給水器の洗浄が重要である。

給水システム内の生菌数を調査した結果、試験区においては給水タンク内には各菌種とも生菌数は検出限界以下となり、給水システムの下流ほど生菌数が増加する傾向が認められた。試験区での大腸菌群数およびサルモネラ属菌数はすべての地点において検出限界以下であったことから、弱酸性次亜塩素酸水溶液はグラム陰性菌に対して特に殺菌効果が高いことが示された。養鶏業界ではサルモネラ菌による鶏卵の汚染や緑膿菌症、大腸菌症などグラム陰性菌が原因となって発生する疾病が多くあることから¹²³⁾、これらの衛生管理にも有効性が高いことが明らかとなった。一方、対照区の給水タンク内には残留塩素が検出されているにもかかわらず、大腸菌群を除く各種生菌が検出された。対照区でも給水システムの下流ほど生菌数が増加する傾向が認められ、ブドウ球菌を含めたグラム陽性菌が増殖した可能性が示唆された。現在、鶏舎内での飲水には水道水を使うことが推奨されているが、給水システム内では鶏舎内の粉塵や汚れの混入から飲用水中で微生物が増殖し、衛生管理が不十分となることが示唆された。

また、養鶏農家ごとに給水器の種類や配管内の汚染度が異なるため、有効

塩素濃度の低下の度合も異なることが考えられる。本実験では給水タンク内の有効塩素濃度を 50 ppm に設定したが、有効塩素濃度や pH を確認し、給水システム内での有効塩素濃度の低下を加味した上で供給する水の有効塩素濃度を設定する必要があると考えられる。

7.4.2 育成率および生存率ならびに産卵率

Fig. 7-4 に各週齢における育成率および生存率を示す。最も育成率の差が大きかったのは餌付け 2 週齢時で、試験区並びに対照区の育成率は各々 99.6 %、98.8 % となり、0.8 ポイントの差が認められた。その後、24 週齢まで全期間を通して試験区が有意に高かった。生存率は、25~27 週齢時は試験区が有意に高い値を示したが、その後は 64 週齢時まで有意な差は認められなかった。

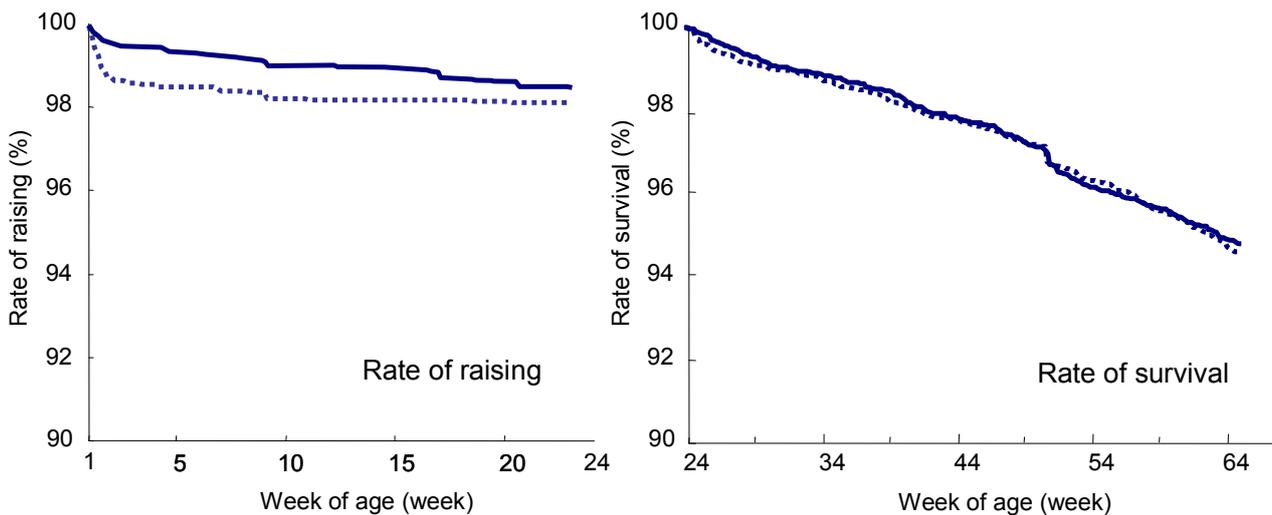


Fig.7-4 The rate of raising and survival of hens under the condition of drinking WAHS
 — WAHS Control

24～64 週齢時の 10 週毎の産卵率の平均値を Table 7-2 に示す。試験区と対照区および過去 4 年分の産卵率の値と比較したところ、対照区との比較では 35～54 週齢時に、過去 4 年分の産卵率との比較では 35～44 週齢時に有意に低い傾向が認められたが ($p < 0.05$)、全期間を通した産卵率には有意差は認められなかった。

Table 7-2 The egg production performance of hens under the condition of drinking WAHS

Week of age	WAHS	Control	Average in the past 4 years	Target value of Chunky breeding hen
25～34	68.9±21.9	69.6±22.9	66.0±27.9	68.1±26.8
35～44	74.3±2.4	77.9±1.9*	77.3±3.2 *	77.3±3.5 *
45～54	66.8±2.9	69.7±2.9*	66.8±2.8	65.4±3.7
55～64	56.5±3.1	56.3±3.6	56.4±3.6	53.0±3.8
All weeks	66.7±12.4	68.4±13.5	66.0±15.6	65.9±12.5

Average ± S.D. * $p < 0.05$

弱酸性次亜塩素酸水溶液を長期間にわたって飲水させた場合の安全性並びに生産性に及ぼす影響については今まで検討されていないが、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を採卵鶏に飲水させた場合の結果が報告されている¹²¹⁾。この報告によると、有効塩素濃度 50～400 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを 28 日間給水し、400 ppm 以下の濃度であれば産卵率などの生産性や血液性状などの生理面に大きな影響を及ぼさないことが明らかにされている。本試験で用いた飲用水は給水タンク内の有効塩素濃度が 50 ppm であり、さらに高い有効塩素濃度での利用が効果的であることが示唆された。また、本試験での

結果、試験区の育成率は対照区に比べて有意に高く、特に餌付け初期に高いことが認められた。この理由として、餌付け初期はヒナの抵抗力が弱く弱酸性次亜塩素酸水溶液の飲水効果が現れたものと考えられる。

産卵率は、35～44週齢時において、試験区の産卵率が、対照区、過去4年分平均およびチャンキー種鶏成績目標値¹²⁴⁾よりも有意に低かったが、その後増加し、全期間を通しての試験区の産卵率の推移は過去4年分の産卵率およびチャンキー種鶏の週齢別産卵率の成績目標値との間にも差は認められなかった。この産卵率の一時的な低下の原因については不明であるが、引き続き検討したい。

7.4.3 臓器重量・血液性状・組織学的検査

Table5-3 に弱酸性次亜塩素酸水溶液を飲水させた場合の生体重および臓器重量を示す。生体重については飼育期間を通して有意差は認められなかった。臓器重量については、1週目の卵巣、7週目の肝臓および卵巣、64週目の脾臓および輸卵管で試験区と対照区で有意差が認められた。Table 7-4 に血液性状を示す。1週目のクレアチニン、24週目のヘマトクリット値、64週目のアミラーゼおよびナトリウムで有意差が認められた。

臓器重量、血液性状ともに一部の項目で有意差が認められたものの、いずれの有意差も一時的なものであり、全期間を通して試験区および対照区の間が目立った違いは認められず、弱酸性次亜塩素酸水溶液の飲水による影響は認められなかった¹²⁵⁻¹²⁷⁾。

組織学的検査については、組織学的変化を観察しやすい臓器として排泄器官である肝臓および腎臓に着目し、評価を行った。Fig.7-5 に7、24、64週齢時における弱酸性次亜塩素酸水溶液および水道水を飲水させた場合の肝臓

および腎臓の組織写真を示す。肝臓は肝細胞内に空胞をわずかに認めたものの試験区対照区ともに同様の所見であった。腎臓は尿細管，糸球体構造ともに両区とも異常は認められなかった¹²⁵⁻¹²⁶⁾。

以上の結果より，弱酸性次亜塩素酸水溶液を長期間飲水することによる鶏に対する悪影響は認められず，飲水資材として利用が可能であることが明らかとなった。しかし，育成率および生存率の結果からは，餌付け初期に斃死率を抑える効果が認められていることから，抵抗性の弱い育雛期や感染症が発生する時期など，期間を限定した飲水を行うことでも生産性の向上および感染症の抑制が期待できる。また，飲水だけでなく，鶏舎内の噴霧や洗浄なども併用することにより，総合的に鶏舎内の衛生環境を改善し，感染症の拡大防止や生産成績の向上に貢献することが可能であることが示唆された。

Table 7-3 The live weight and organ weights of hens under the condition of drinking WAHS

Weights (g)	1 week		7 week		20 week		64 week	
	WAHS	Control	WAHS	Control	WAHS	Control	WAHS	Control
Live weight	148.5	139.2	829.3	832.3	1916.7	1914.3	3651.0	3742.7
Liver	5.58	4.82	22.98**	19.11	36.21	33.19	52.12	49.50
Lung	0.91	0.85	3.59	3.63	8.44	8.53	13.09	11.26
Heart	0.99	0.90	2.90	2.65	5.67	5.43	9.93	9.78
Lien	0.11	0.10	0.87	0.81	1.69	1.78	3.44	2.37
Gizzard	4.70	4.32	22.44	20.71	55.91	54.99	30.15	28.52
Pancreas	0.84	0.70	2.31	2.28	3.95	3.47	5.41**	4.37
Ceca	1.24	1.60	6.75	7.25	11.76	10.62	11.68	10.31
Digestive canal	12.58	12.13	54.71	66.06	95.42	97.87	86.20	71.24
Bladder	0.42	0.18	1.03	0.70	0.50	0.71	2.45	2.11
Ovary	0.04 *	0.02	0.19 *	0.16	0.50	0.45	61.71	71.47
Oviduct	—	—	—	—	0.20	0.17	84.50*	125.11
Bursa of Fabricius	—	—	—	—	1.42	1.35	0.19	0.13

* p<0.05 ** p<0.01

Table 7-4 The blood value of hens under the condition of drinking WAHS *p<0.05 ** p<0.01

Blood test	unit	1week		7weeks		20weeks		64weeks	
		WAHS	Control	WAHS	Control	WAHS	Control	WAHS	Control
AST(GOT)	IU/l	197.7	210.5	261.7	260.5	270.6	268.3	247.2	242.2
ALT(GPT)	IU/l	3.7	4.7	2.7	2.5	2.2	2.0	2.0	2.0
LD(LDH)	IU/l	1655.5	1384.3	2639.2	2430.2	841.4	994.3	507.7	499.0
Cholinesterase	IU/l	6.5	7.3	10.8	10.2	8.2	7.2	8.2	8.7
γ-GT(γGTP)	IU/l	11.3	12.3	29.8	31.3	29.2	30.3	29.8	26.0
LAP	IU/l	542.0	631.7	520.7	448.5	426.0	378.0	723.3	676.0
T-bilirubin	mg/dl	1.72	1.72	0.63	0.65	0.94	0.82	0.42	0.35
D-bilirubin	mg/dl	0.18	0.15	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.08
I-bilirubin	mg/dl	1.53	1.57	0.53	0.55	0.84	0.72	0.32	0.27
ZTT	U	0.10	0.12	0.22	0.25	0.30	0.92	13.15	14.48
TTT	U	0.10	0.12	0.22	0.35	0.56	0.98	19.13	20.53
T-protein	g/dl	2.63	2.68	3.15	2.93	3.96	4.28	5.10	5.33
Albumin	g/dl	1.50	1.48	1.52	1.35	1.74	1.75	2.05	2.12
A/G		1.34	1.23	0.94	0.86	0.80	0.71	0.68	0.66
T-cholesterol	mg/dl	176.2	172.5	138.7	140.3	132.4	125.2	169.3	157.2
Neutral fat	mg/dl	28.0	28.0	44.2	29.8	82.6	71.8	1087.7	1250.7
HDL-C	mg/dl	148.3	148.2	108.7	115.0	92.0	88.5	6.8	6.5
LDL-C	mg/dl	22.5	18.7	21.2	19.3	-	-	-	-
CK(CPK)	IU/l	1431.7	1501.0	3879.3	3636.5	2919.0	3180.3	2951.0*	3614.0
Amylase	IU/l	1657.8	2289.8	675.3	778.0	1055.3	898.5	461.7	628.7
BUN	mg/dl	3.0*	3.0	2.3	2.3	2.0	2.0	1.3	1.7
Creatinine	mg/dl	0.115	0.092	0.090	0.085	0.084	0.087	0.298	0.392
Uric acid	mg/dl	7.20	4.45	5.30	5.18	7.44	7.38	4.77*	4.42
Na	mEq/l	149.8	147.0	151.0	155.0	155.4	150.5	152.3	156.0
Cl	mEq/l	114.0	113.8	111.7	116.2	118.2	116.5	119.5	121.2
K	mEq/l	5.82	4.94	5.03	4.93	5.44	5.32	4.85	4.48
Ca	mg/dl	5.48	5.17	7.95	7.73	-	-	21.78	23.92
Inorganic P	mg/dl	3.55	3.57	6.62	5.70	4.36	4.90	5.40	4.92
Serum iron	ug/dl	51.3	48.2	95.3	92.7	66.6	61.2	593.3	626.3
CRP	mg/dl	0.058	0.063	0.060	0.067	0.083*	0.097	0.087	0.097
Hematocrit		32.25	33.92	31.42	29.33	33.83	30.25	32.58	33.75

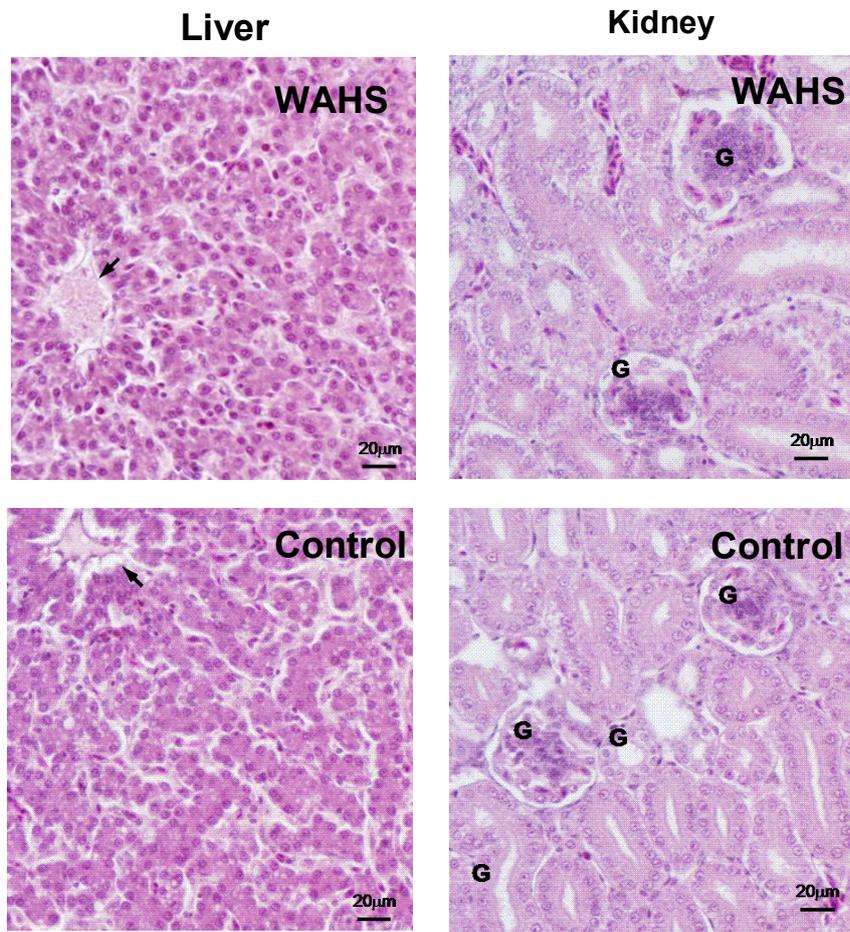


Fig.7-5 The photomicrograph of liver and kidney of 64 weeks hens in the condition of drinking WAHS (× 40 ↓ ; Central vein G; Glomus)

7.5 まとめ

弱酸性次亜塩素酸水溶液を鶏への長期間飲用水に利用した結果，給水システム内の生菌数を低く抑えることが可能であり，特にグラム陰性菌に対する殺菌効果が高かった。また，生産性については餌付け初期の育成率に向上が見られ，生存率および産卵率は水道水を飲水させた場合と同等であった。各成長段階における組織重量・血液生化学値および組織学的検査においても異常は認められなかった。以上の結果より，弱酸性次亜塩素酸水溶液は殺菌効

果が高くかつ安全性の高い飲水資材であることが明らかとなり，特に餌付け初期に適用することで生産性が向上することが示唆された。

第 8 章

弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による種卵消毒への適用

8.1 はじめに

我が国におけるブロイラー鶏および採卵鶏の生産システムにおいては、種鶏場にて種鶏が産卵した種卵(受精卵)を孵化させて得られた雛を、各生産農家に供給して育成することで鶏肉や鶏卵を得ている。そのため、種鶏場からの安定した雛の供給は、国内の鶏肉・鶏卵の安定供給および生産性に非常に重要であると言える。その一環として、種鶏場では種卵の孵化率の向上、衛生対策の徹底の観点からふ卵衛生対策指針および鶏卵のサルモネラ総合対策指針に基づき、卵殻表面を消毒することが推奨されている¹²⁸⁻¹²⁹⁾。

種卵消毒の方法としては消毒薬に直接種卵を浸漬して殺菌するディッピング法および消毒ガスを充満させた室内で種卵を殺菌する燻蒸法が行われているが、殺菌効果、コストおよび操作性に優れていることから、パラホルムアルデヒドやホルマリンを用いたホルマリン燻蒸が多く行われている²⁷⁻²⁹⁾。しかしホルマリンは、発癌性があるため、作業員への健康被害が懸念されており、(社)日本産業衛生学会は 2A(人間に対して発癌性があると考えられる物質)に定めている³¹⁻³²⁾。また、2007 年には労働安全衛生法の改正によって、ホルムアルデヒドは第 3 類物質から第 2 類物質に引き上げられ、発生源の密閉化や局所排気装置などの発散抑制措置の設置や定期的な作業環境測定が義務付けられた³³⁾。このため、近年ホルマリン燻蒸に替わる人体や環境に安全でかつ殺菌効果の高い種卵の消毒法の開発が求められている¹³⁰⁻¹³²⁾。

そこで、ホルマリン燻蒸の代替殺菌法として弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴

霧による種卵消毒の検討を行った。弱酸性次亜塩素酸水溶液は殺菌効果が高く、抗菌スペクトルが広いとともに、空間に噴霧粒子を充満させることで空气中の浮遊菌や付着菌の殺菌も可能であることから¹³³⁻¹³⁶⁾、種卵の卵殻表面についても消毒効果が期待される。

本章では弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による付着菌への殺菌効果を基礎的に検討するとともに、実際に種卵消毒に弱酸性次亜塩素酸水溶液を適用した場合の卵殻表面の殺菌効果および孵化率について、従来のホルマリン燻蒸法と比較した。

8.2 材料および方法

8.2.1 弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製

弱酸性次亜塩素酸水溶液の調製は3.2.1と同様の方法で有効塩素濃度30～200 ppm, pH 5.8～6.2に調製した。pHおよび有効塩素濃度も3.2.1と同一の方法で測定した。なお、弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧条件については有効塩素濃度、噴霧量および噴霧時間より単位容積あたりの濃度時間積($\text{mg}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$)を求め、評価した。

8.2.2 弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による付着 *S. aureus* に対する殺菌試験

供試微生物は *Staphylococcus aureus* FDA209P (以下 *S. aureus* と略す) を用いた。実験にあたっては、Plate-Count-Agar (MERCK) に *S. aureus* を塗布し、37℃で24時間培養した後、コロニーを平板から採取し滅菌精製水に懸濁したものを菌懸濁液とした。

Fig. 8-1 に本実験で使用した実験用ブース (容積 0.3 m³) を示す。菌懸濁

液を直径 90 mm の滅菌ガラスシャーレ上に 10^7 CFU/plate となるよう薄く塗布し風乾させたものをビニールブース内の 5 地点に設置した。ビニールブース内で有効塩素濃度 30~200 ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液を超音波式噴霧装置 MicroFogger300 ((株) エイチ・エス・ピー)) を用いて一定時間噴霧を行った。なお、MicroFogger300 の噴霧量は 50 mL/h であった。

殺菌効果の評価に当たっては噴霧前後のガラスシャーレ表面の *S. aureus* を標準寒天スタンプ培地(日水製薬)にて採取し、37 °C、48 時間培養した後生菌数を測定した。5 地点の生菌数の平均値を求め、噴霧前の生菌数に対する噴霧後の生菌数の割合を残存率として評価した。

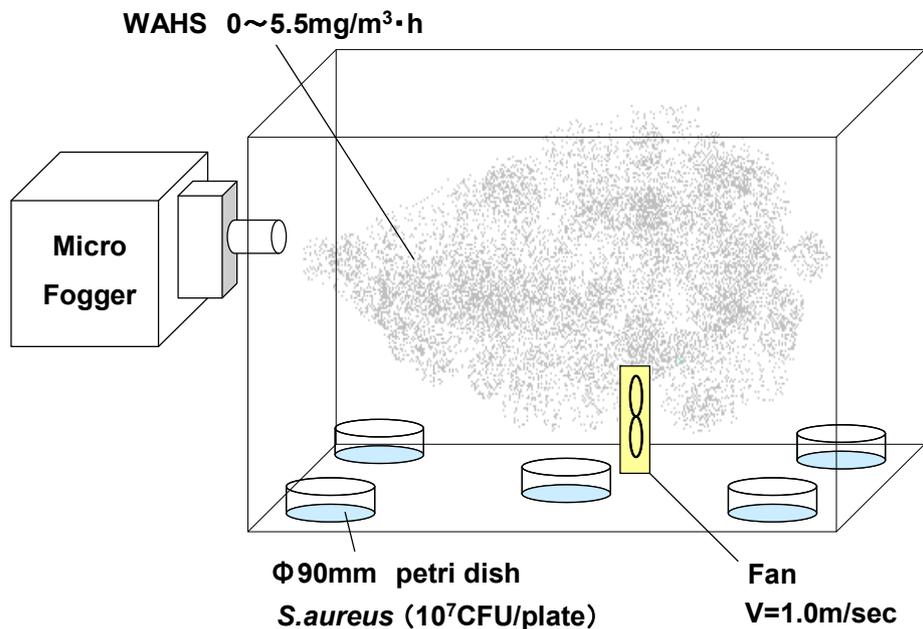


Fig.8-1 The experimental booth (Capacity: 0.3m³)
WAHS: Weak Acid Hypochlorous Solution

8.2.3 弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による卵殻表面の一般生菌に対する殺菌試験

種卵はチャンキー純系種のものを用いた。実験にあたっては、鶏舎より採取した種卵の卵殻表面を滅菌綿棒でふき取り、標準寒天培地で 37 °C、24 時間培養し、出現したコロニーを平板からランダムに採取し生理食塩水に懸濁したものを菌懸濁液とした。種卵を菌懸濁液に浸漬した後、風乾させたものを試験卵として実験に供した。

実験用ブース（容積 0.3 m³）内の 5 地点に試験卵を設置した。有効塩素濃度 30～200ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液を噴霧装置 MicroFogger600（（株）エイチ・エス・ピー）を用いて一定時間噴霧を行った。なお、MicroFogger600 の噴霧量は 80 mL/h であった。

殺菌効果の評価にあたっては、噴霧前後の試験卵の表面を滅菌綿棒を用いて卵全周をふき取ったものを滅菌生理食塩水に懸濁し、適宜滅菌生理食塩水で 10 倍希釈したものを標準寒天培地に平板塗抹した。37 °C、48 時間培養した後生菌数を測定し、5 地点の生菌数の平均値を求め、噴霧前の生菌数に対する噴霧後の生菌数の割合を残存率として評価した。

8.2.4 種鶏場における弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧による種卵消毒

実用試験は種鶏場の種卵燻蒸室にて行った。Fig. 6-2, Pic. 6-1 に燻蒸室内の配置図および写真を示す。容積 24 m³ の燻蒸室に 168～1848 個の種卵を詰めたワゴン、攪拌扇 4 台およびポータブル式噴霧装置（（株）エイチ・エス・ピー製 Trans Fogger）2 台を設置した。噴霧は弱酸性次亜塩素酸水溶液（有効塩素濃度 200 ppm, pH 6.0～6.5）を噴霧量 570 mL/h の条件で 90 分間行った。

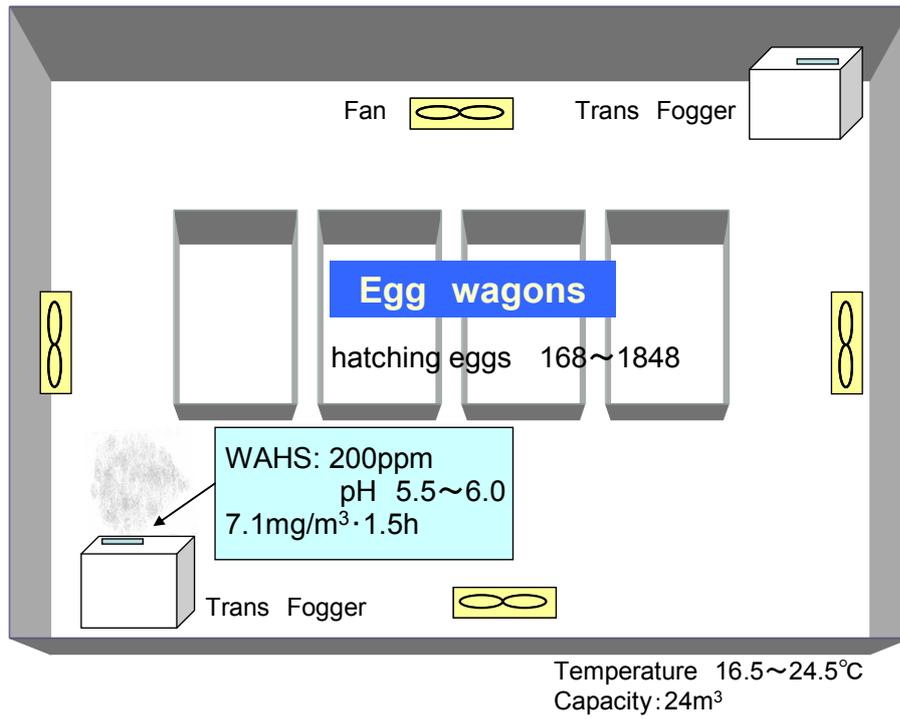
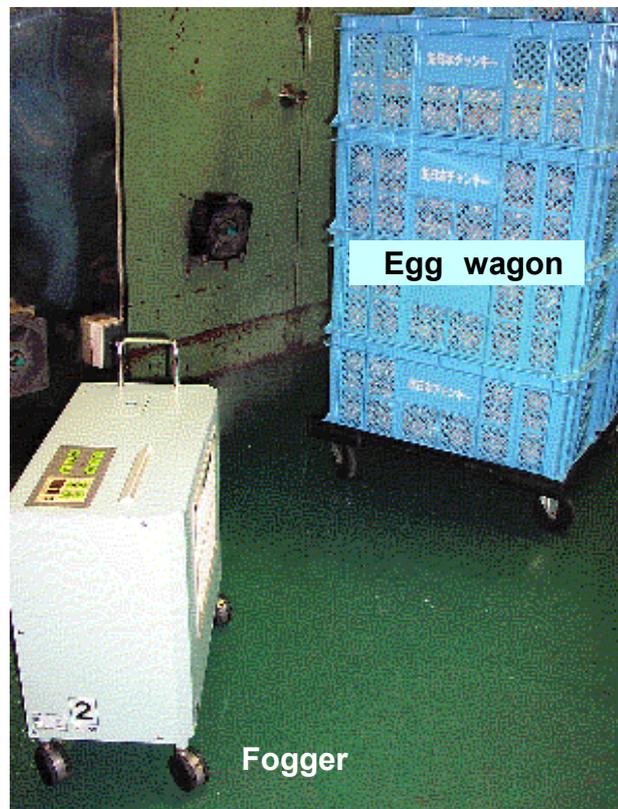


Fig.8-2 The fumigation chamber



Pic.8-1 The fumigation chamber

殺菌効果の評価にあたっては、噴霧開始前および噴霧開始後のワゴンから種卵を10個ずつ採取し、滅菌綿棒を用いて卵全周をふき取ったものを滅菌生理食塩水に懸濁し、適宜滅菌生理食塩水で10倍希釈したものを標準寒天培地に平板塗抹し、37℃、48時間培養した後生菌数を測定し、噴霧前の生菌数に対する噴霧後の生菌数の割合を算出した。また、消毒した種卵の孵化率についても検討を行った。

対照として、同燻蒸室でパラホルムアルデヒド 10 g/m³ の条件でホルマリン燻蒸を20分間行った後、70分換気を行い、殺菌効果および孵化率について比較した。

8.3 結果および考察

8.3.1 弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による *S. aureus* および卵殻表面の一般生菌に対する殺菌効果

Fig. 8-3 に WAHS を噴霧した場合におけるガラスシャーレ表面の *S. aureus* の残存率を示す。噴霧前の生菌数は $1.2 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^3$ CFU であった。滅菌蒸留水を噴霧した場合の残存率は 41.5% であったが、有効塩素の濃度時間積が増加するとともに残存率は減少し、濃度時間積 $4.5 \text{ mg/m}^3 \cdot \text{h}$ 以上の条件では残存率は 0.69%、0.33% と高い殺菌効果が認められた。

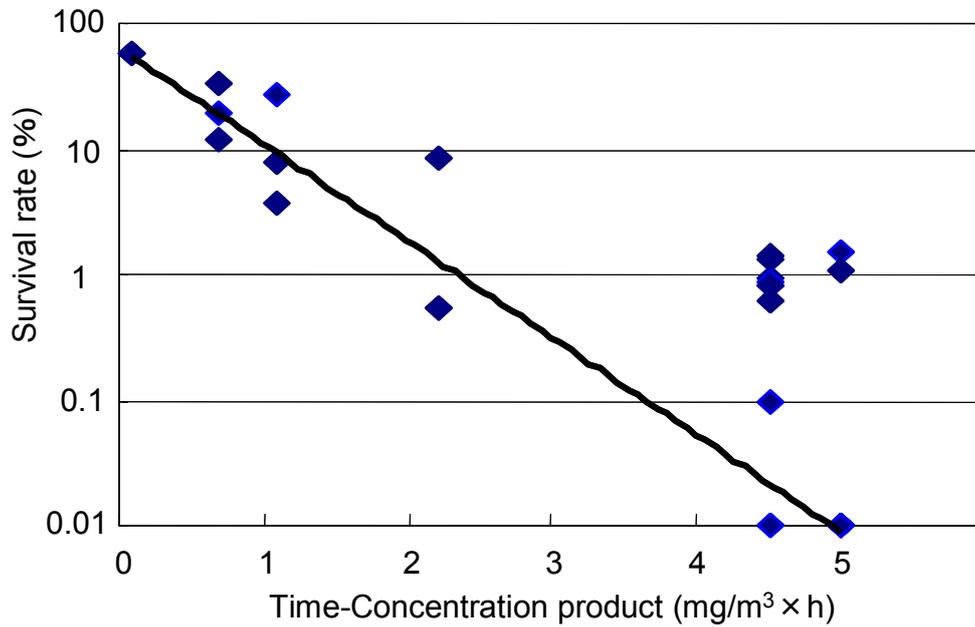


Fig.8-3 Survival rate of *S.aureus* on the surface of the petri dish treated with WAHS mist

Fig. 8-4 に弱酸性次亜塩素酸水溶液を噴霧した場合における卵殻表面の一般生菌の残存率を示す。噴霧前の一般生菌数は $2.9 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^5$ CFU/卵 1 個であった。卵殻表面の一般生菌数の残存率は濃度時間積が増加するとともに減少し、濃度時間積 $6.4 \text{ mg/m}^3 \cdot \text{h}$ の条件では残存率は 0.2 % となり、卵殻表面に付着した一般生菌に対しても高い殺菌効果が認められた。

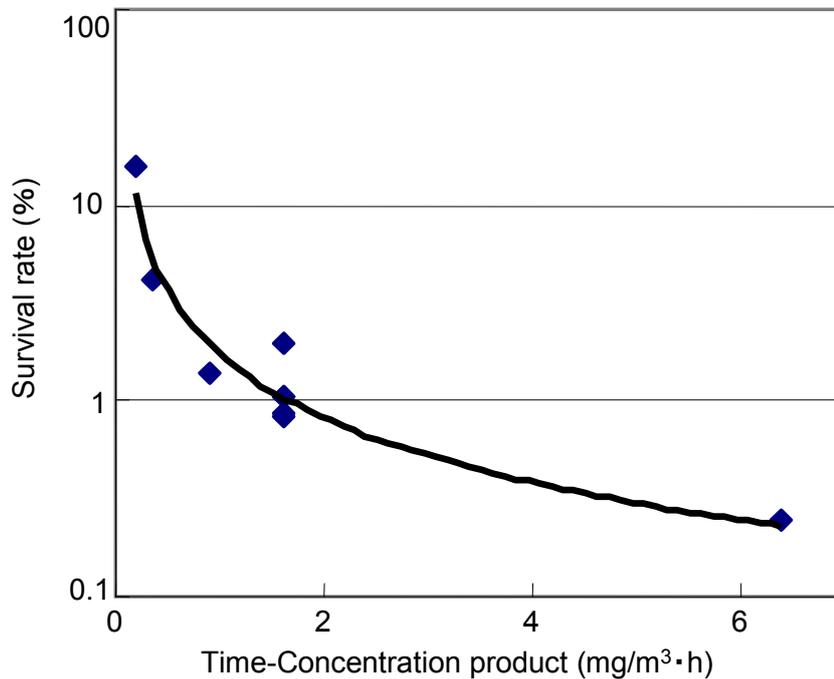


Fig.8-4 Survival rate of microorganism on the Egg shell surface treated with WAHS mist

以上の実験により、弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧はガラス表面に塗布した *S. aureus* および卵殻表面に存在する一般生菌に対して高い消毒効果を有することが明らかとなった。これは消毒対象物の表面に弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧粒子が付着することにより消毒効果を発揮したと考えられる。一般的に、卵殻表面の菌相については *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae* などが卵殻汚染の主力菌として報告されているが¹³⁷⁾、本実験で用いた *S. aureus* も乾燥に強いため卵殻表面での寿命が長く、かつ食中毒の原因菌であることから留意が必要な菌種とされている。本実験では弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧により *S. aureus* および卵殻表面菌に対して消毒効果を有しており、これら卵殻汚染の原因菌に対しても効果があることが示唆された。

安定した殺菌効果を得るための噴霧条件は、ガラスシャーレ上の *S. aureus* では濃度時間積 $4.5 \text{ mg/m}^3 \cdot \text{h}$ 以上、卵殻表面の一般生菌では濃度時間積 $6.0 \text{ mg/m}^3 \cdot \text{h}$ 以上であり、卵殻表面の方が高い値となった。これは、硬質な非孔質のガラスと比較して、卵殻表面は気孔などの細孔を有していることから、噴霧粒子が一般生菌に接触しにくい構造であるためと考えられる。また、本試験で用いた鶏卵は有機物が付着していない物を使用した。実際の種卵は卵殻表面に土や糞などの有機物が付着していることが想定されることから、実試験においては、濃度時間積 $6.0 \text{ mg/m}^3 \cdot \text{h}$ 以上で噴霧する必要があると考えられた。

8.3.2 種鶏場における弱酸性次亜塩素酸水の噴霧による種卵消毒効果および孵化率

Table. 8-1 に弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧および対照としてホルマリン燻蒸した場合の種卵の除菌率および孵化率を示す。処理前の種卵表面の一般生菌数は卵 1 個あたり $1.0 \times 10^3 \sim 2.7 \times 10^5$ CFU であった。弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧およびホルマリン燻蒸を行った場合の卵殻表面の除菌率は、各々平均 99.83 %、99.73 %、標準偏差は各々 0.1 %、0.27 % で、ほぼ同等であった。対熟孵化率（孵化数 / (全種卵数 - 無精卵数) × 100）は弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧およびホルマリン燻蒸を行った場合、各々 95.0 %、92.6 % であり、同等の孵化率を示した。また、標準偏差は弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧およびホルマリン燻蒸が各々 1.0 %、4.2 % であり、弱酸性次亜塩素酸水溶液を噴霧した系はばらつきが小さい傾向が認められた。

Table 8-1 The comparison in the disinfection effect and the hatchability between spraying WAHS and formaldehyde fumigation

Egg Age (day)	Ratio of eradication (%)		Hatchability of Fertile eggs(%)	
	WAHS	formaldehyde	WAHS	formaldehyde
6.5	99.95	99.92	94.9	94.3
8	99.70	99.25	96.3	97.5
8.5	99.77	99.78	94.1	91.8
12	99.90	99.90	95.7	86.0
13	99.85	99.79	94.0	93.4
15	99.79	99.79	93.4	94.0
average	99.85±0.09※	99.75±0.29	94.6±1.6	92.9±3.4

※ standard deviation

以上の結果より、濃度時間積 $7.1 \text{ mg/m}^3 \cdot 1.5 \text{ h}$ の条件で弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧は、現行のホルマリン燻蒸とほぼ同等の消毒効果あることが明らかとなった。また対熟孵化率についてもホルマリン燻蒸と同等であり、弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧による種卵に対する悪影響は認められなかった。対熟孵化率は一般的に貯卵日数が長くなると低下する傾向が見られるが¹³⁸⁾、貯卵日数の違いによる対熟孵化率の違いも見られず、安定した孵化率が得られている。

一方、実用化に当たっての課題として、弱酸性次亜塩素酸水溶液は噴霧粒子が水滴状態の場合に殺菌効果があることより、種卵の配置やトレイの形状および攪拌方法などにより、消毒効果にばらつきが生じる可能性がある。殺菌のばらつきを現場で簡易に判定するため、Pic.8-2 に示す模擬鶏卵表面にヨウ化カリウムでんぷん溶液を付着乾燥させた殺菌インジケーターを考案し、これをトレイの各場所に設置した。噴霧粒子が接触した箇所は無色から紫色

に変色するため、表面の色の変化によって噴霧粒子の到達の程度を確認できるため、噴霧粒子を全体に効率よく接触させる噴霧条件および攪拌方法の確認が可能となった。



Pic.8-2 Indicator stimulant eggs

また、種卵表面が糞や泥などで汚染されていた場合は噴霧粒子が接触せず、また接触しても有機物によって速やかに有効塩素が失活し十分な消毒効果が得られない可能性があるため、泥や糞などで汚染された汚卵は種卵として用いないことが必要である。

8.4 まとめ

鶏の種卵消毒に、ホルマリン燻蒸の代替法として弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧を検討した結果、卵殻表面の殺菌効果および対熟孵化率は現行のホルマリン燻蒸と同等の効果を得ることができた。したがって、弱酸性次亜塩素酸水溶液は新たな種卵消毒法として有用性が高いことが示唆された。

第 9 章

総括

本研究では、食品および畜産分野で弱酸性次亜塩素酸水溶液の適用を目的とし、その基礎的検討および実使用条件での効果検証を行った。弱酸性次亜塩素酸水溶液は、次亜塩素酸ナトリウムに塩酸を希釈混合して、pH を 5.5～6.5 の弱酸性に調製したものである。弱酸性に調整することにより、水中の分子形の次亜塩素酸(HClO)の割合を増加させ、殺菌効果の向上を期待した。また、生体や環境に対する安全性が高いことも確認されていることから、食品、畜産分野での適用に適している。

第 3 章では、弱酸性次亜塩素酸水溶液の基礎的な殺菌効果を確認するため、各種微生物の標準株および臨床分離株に対する殺菌、殺カビおよびウイルス不活化効果の検討を行った。また、pH を調整したことによる殺菌効果の増強を確認するため、各 pH における殺菌効果の違いについても検討した。その結果、有効塩素濃度 50 ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液は本試験で供したすべての標準株の細菌、カビおよびウイルスを 15 秒～600 秒で検出限界以下とする高い殺菌・不活化効果が認められた。また本試験で用いた臨床分離株はすべて 15 秒以内に殺菌が可能であった。さらに、*B. subtilis*, *B. cereus* および *A. niger* では、弱酸性域である pH 5, 6 の条件で殺菌に要する時間が短く、水中の次亜塩素酸の存在比が多いほど最短殺菌時間は短くなり、その決定係数(r^2)は 0.95～0.99 と高い相関が認められた。これにより次亜塩素酸ナトリウムを弱酸性に調整することにより殺菌・ウイルス不活化効果が向上することが確認された。

第4章では、弱酸性次亜塩素酸水溶液の殺菌効果をさらに詳細に検証するため、微生物の中でも特に消毒剤耐性が強い芽胞菌での検証を行った。院内感染および食中毒の原因菌である *B. cereus*、耐熱性好酸性菌(TAB)の一種で果汁飲料の変敗の原因となる *A. acidoterrestris* および院内感染菌であり偽膜性大腸炎の原因菌である *C. difficile* を用いて弱酸性次亜塩素酸水溶液の有効な接触時間および有効塩素濃度の探索を行った。また、実際の使用現場を想定し、各芽胞をステンレス鋼、プラスチックおよび布などの各種部材に付着させた場合の殺菌効果についても検討した。その結果、本試験で用いた3種の芽胞菌に対して弱酸性次亜塩素酸水溶液は高い殺菌効果を示し、特に *B. cereus* および *C. difficile* は *A. acidoterrestris* と比較して短時間で殺菌が可能であった。また、芽胞菌に対する対数生残率(S)は有効塩素濃度(ppm)と時間(min)の積に対数近似した。また、濃度時間積(CT値)はpHが弱酸性域で低い値となり、弱酸性域では殺菌効果が向上することが確認された。この傾向はポリエチレン、ステンレス鋼および布に芽胞を付着させた場合にも同様であった。これにより、弱酸性次亜塩素酸水溶液は食品および医療等の現場において食中毒や院内感染の原因となる芽胞菌に対して有効性の高い殺菌資材であることが示された。

第5章では 実際に弱酸性次亜塩素酸水溶液を食品分野で使用することを想定し、カット野菜工場での生野菜の殺菌効果について検討を行った。本章では特に、カット野菜の材料として、殺菌が特に困難なキュウリおよびアオネギの洗浄殺菌について検討した。弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄殺菌することによりキュウリおよびアオネギの一般生菌数は有意に減少し、1桁程度の低下が認められた。さらに、殺菌効果を増大させるため、食品用の界面活性剤の添加を検討した。まず、界面活性剤2種を添加した場合の弱酸性次亜

塩素酸水溶液の液性の変化を確認したところ、表面張力が低下して濡れ性の向上が確認できた。また、添加後 24 時間は有効塩素濃度および pH の変化は認められず、安定性も高いことがわかった。界面活性剤添加弱酸性次亜塩素酸水溶液は弱酸性次亜塩素酸水単独よりも 1~2 桁高い殺菌効果が得られ、一般生菌数は有意に低下した。これにより、弱酸性次亜塩素酸水溶液はカット野菜製造工程において有用性が高く、界面活性剤を添加することでさらに高い殺菌効果が得られることが明らかとなった。

第 6 章では弱酸性次亜塩素酸水溶液を漬物製造ラインに適用することを目的とし、実際の食品用洗浄機での洗浄条件と同条件でハクサイの殺菌試験を行い、漬物衛生規範の殺菌条件(次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm で 10 分または 200 ppm で 5 分)での殺菌効果との比較を行った。また、弱酸性次亜塩素酸水溶液で食材を洗浄殺菌した場合のトリハロメタン類の発生および食品への残存を確認するため、トリハロメタンの一種であるクロロホルム量の測定も行った。弱酸性次亜塩素酸水溶液でハクサイを攪拌洗浄することによって、20 秒間という短時間で一般生菌数を 5.6 logCFU/g から 3.7 logCFU/g まで減少させることができ、その効果は 200 ppm の次亜塩素酸ナトリウムで洗浄殺菌した場合と同等であった。また、漬物衛生規範に推奨された方法(次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm 10 分浸漬または 200 ppm 5 分浸漬)とも同等の殺菌効果を得ることができた。また洗浄後にハクサイに残存するクロロホルム量も、次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合の約 22%であり、水道水で洗浄した場合とほぼ同等であった。よって弱酸性次亜塩素酸水溶液は、ハクサイの洗浄殺菌において作業効率を高め、かつ有害な消毒副生成物の生成も抑えることが明らかとなり、有用性が高いことが示された。

第 7 章では、畜産分野での適用の一例として、ブロイラー種鶏の飲水へ弱

酸性次亜塩素酸水溶液を利用した場合の飲水の殺菌効果および鶏に対する生産性および安全性への影響について検討を行った。飲水消毒に 50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いた場合、給水システム中の残留塩素濃度は、徐々に低下する傾向にあった。しかし、給水器内の菌数を測定したところ、特に大腸菌群数およびサルモネラ属菌などグラム陰性菌を検出限界以下となっており、給水器内まで高い殺菌効果を維持していた。生産性について育成率および生存率ならびに産卵率で評価したところ、餌付け直後の育成率が向上した。生存率ならびに産卵率については有意な差は認められなかった。鶏への安全性について、臓器重量、血液性状および組織学的検査を行ったところ、弱酸性次亜塩素酸水溶液の飲水による悪影響は認められなかった。以上の結果より、弱酸性次亜塩素酸水溶液は飲水資材として利用が可能であることが明らかとなった。特に、感染症に対する抵抗性の弱い育雛期や感染症が発生する時期など、期間を限定して飲水を行うことで効率よく生産性の向上および感染症の抑制ができると考えられる。

第 8 章では、同じく畜産分野での適用の一例として、ブロイラー種鶏の種卵(受精卵)消毒に弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧の適用を検討した。弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧により種卵消毒を行った場合の卵殻表面の殺菌効果および孵化率について検討を行い、現行のホルマリン燻蒸法との比較を行った。その結果、弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による除菌率は 99.85 %となり、ホルマリン燻蒸での除菌率 99.75 %と同等であった。除菌率のばらつきは弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧のほうが小さく安定した除菌率が得られた。孵化率も弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧およびホルマリン燻蒸で各々 94.6 %、92.9 %と同等の孵化率が維持できた。これらの結果より種卵消毒において弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧はホルマリン燻蒸の代替法として利用性が高い

ことが示された。

以上の結果より,弱酸性次亜塩素酸水溶液は食品及び畜産の分野において,有用性が高いことが示された。今後の課題としては,現場で使用した場合の腐食性や薬剤コスト,作業者の簡便性をさらに向上させる必要があると考えられる。より簡便かつ効率的に弱酸性次亜塩素酸水溶液を活用する方法およびシステムの構築を進めていく所存である。

【引用文献】

- 1) 厚生労働省食品安全部 (2014) 平成 25 年(2013 年)食中毒発生状況.
- 2) 佐多徹太郎, 綿引正則, 磯部順子(2012)ユッケによる腸管出血性大腸菌 0111 の集団食中毒事例, 食品衛生研究, 62, (7), 7-16.
- 3) 厚生労働省食品安全部(2012)飲食チェーン店での腸管出血性大腸菌食中毒の発生について 資料 2-1.
- 4) 坂本裕美子, 廣地敬, 大西麻実(2013)白菜浅漬による腸管出血性大腸菌 0157食中毒事例について, 病原微生物検出情報, 34, (5), 4.
- 5) HACCP編集部(2014)委託製造のパンを原因とする広域ノロウイルス食中毒が発生, 月刊HACCP, 20, (3).
- 6) 厚生労働省(1997)大量調理施設衛生管理マニュアル(最終改正:2013年2月1日付け食安発 0201 第2号).
- 7) 農林水産省(2013)野菜の消費をめぐる状況について.
- 8) 薩田清明, 山本美穂, 柴田真理子(2006)飲食物の安全性に関する細菌学的研究(第6報)ーカット野菜を対象としてー, 東京家政学院大学紀要, 46, 7-15.
- 9) 泉秀実(2009)カット野菜の安全性と微生物制御技術, 食品微生物学会雑誌, 26, (2), 60-67.
- 10) 染谷孝(2012)生鮮野菜による食中毒を防ぐ, 食品と容器, 53, (6), 385-391.
- 11) 川本伸一(2013)生鮮野菜の安全性確保のための微生物対策(特集 最近の食中毒事故とその対策), 食品と開発, 48, (1), 4-7.
- 12) 金子光美(1996)水質衛生学, 282-286, 技報堂出版.

- 13) 丹保憲仁, 小笠原紘一 (1999) 浄水の技術, 101-106, 技報堂出版.
- 14) 相沢貴子 (1998) 浄水処理における塩素代替消毒技術. 水環境学会誌, 21, (9), 571-576.
- 15) 宮尾茂雄 (2012) 浅漬け製造における食中毒菌対策: 原料野菜の洗浄殺菌を主に, 食品と科学, 54, (10), 16-27.
- 16) 片岡郁夫, 江湖正育, 寺島寛樹 (2013) 浅漬による腸管出血性大腸菌O157の集団食中毒事例 (中間報告), 食品衛生研究, 63, (1), 27-35.
- 17) 農林水産大臣公表 (2011) 高病原性鳥インフルエンザおよび低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針.
- 18) 社団法人全国家畜畜産物衛生指導協会 (2006) 養鶏における生産システムと疾病の防除対策.
- 19) 筒井俊之, 早山陽子 (2011) 2010年に宮崎県で発生した口蹄疫について: 2000の発生との比較から, 獣疫学雑誌, 14, (2), 148-153.
- 20) 農林水産大臣公表 (2011) 口蹄疫に関する特定家畜伝染病防疫指針.
- 21) 高橋敏雄, 浅井鉄夫, 小島明美 (2006) 家畜衛生分野における耐性菌の現状と今後の対応, 感染症学会誌, 80, (3), 185-195.
- 22) 浅井鉄夫 (2008) 家畜における薬剤耐性菌のモニタリングと調査成績, 獣疫学雑誌, 12, (2), 93-98.
- 23) 田村豊 (2013) 食卵によるサルモネラ食中毒の現状と対策, 食品科学工学, 60, (7), 375-379.
- 24) 五十君静信 (2010) サルモネラ食中毒の発生状況とその分析, 食品衛生研究, 60, (5), 7-12.
- 25) 三澤尚明 (2013) カンピロバクター食中毒の現状と対策, 食品と開発, 48, (1), 12-14.

- 26) 甲斐明美, 横山敬子 (2007) 鶏の汚染実態 (特集 カンピロバクターをめぐる最近の話題), 獣医畜産新報, 60, (11), 891-894.
- 27) 古田賢治 (1993) 養鶏施設における消毒に関する諸問題, 家禽学会誌, 30, (5), 325-335.
- 28) K., FURUTA, S., Sato (1975) Studies on the Disinfection of Hatching Eggs -The Effect of Formaldehyde Fumigation on Bacteria Contaminating the Egg Shell Surface, Japan.Poultry Sci, 14, (1), 27-32.
- 29) K., FURUTA, K., WATANABE (1978) Studies on the Disinfection of Hatching Eggs, Hatchability of Eggs Disinfected by Formaldehyde or by Certain Kinds of Disinfectant Solution, Japan.Poultry Sci, 15, (1), 25-30.
- 30) 白井淳資 (2002) 口蹄疫ウイルスに対する市販消毒薬の効果, 獣医師会誌, 55, (9), 575-579.
- 31) 山下光治, 三宅真名 (2003) 弱酸性次亜塩素酸水を用いた動物実験施設での衛生管理の可能性, 岡山実験動物研究会報, 20, (9), 28-32.
- 32) 末永義明 (2005) 燻蒸殺菌後のホルマリンガス対策, 化学装置, 47, (4), 69-74.
- 33) 厚生労働省 (2009) 労働安全衛生法施行令の一部を改正する政令及び特定化学物質障害予防規則等の一部を改正する省令等の施行等について, 基発第 0229002 号.
- 34) 福崎智司 (2005) 次亜塩素酸を基盤とする洗浄・殺菌の理論と実際, New Food Industry, 47, (6), 9-22.
- 35) T., Asano, F., L. Burton, H., L. Leverenz, R., Tsuchihashi, G., Tchobanoglous (2007) Water Reuse, 625-628.

- 36) 小野朋子(2009) 環境菌に対する塩素系消毒剤の殺菌事例, 防菌防黴, 37(2), 129-138.
- 37) Health Canada (2012) Guidelines for Canadian Drinking Water Quality.
- 38) 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣邦雄, 遠藤卓郎(2010)モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策, 保健医療科学, 59, (2), 109-115.
- 39) 関秀行(2014)微生物の分類とその消毒機構, 用水と廃水, 56, (2), 98-106.
- 40) 日本化学会(2005)化学便覧 基礎編 改訂5版.
- 41) 小野朋子(2013)衛生管理における弱酸性次亜塩素酸水溶液(スーパー次亜水)の新たな用途展開, 食品調理と技術, 19, (2), 28-42.
- 42) 福崎智司(2012)次亜塩素酸の科学-基礎と応用-, 米田出版.
- 43) 福崎智司(2009)次亜塩素酸による洗浄・殺菌機構と細菌の損傷, 日本食品微生物学会誌, 26, (2), 76-80.
- 44) 試験報告書(2001)ラットを用いたスーパー次亜水の経口投与試験, 岡山大学歯学部小児歯科, 社内資料.
- 45) 試験報告書(2001)ラットを用いたスーパー次亜水の噴霧試験, 岡山大学歯学部小児歯科, 社内資料.
- 46) 試験報告書(2001)スーパー次亜水のラットを用いた皮膚刺激試験, 岡山大学歯学部小児歯科, 社内資料.
- 47) 三宅真名, 山下光治(2003)ラットにおける噴霧弱酸性次亜塩素酸水吸入による血液一般及び生化学値に及ぼす影響, 実験動物と環境, 11, (1), 42-47.
- 48) 鈴木大輔, 野澤康平, 米崎孝広(2013)中性電解水で加湿した空気供給によるラット亜慢性吸入毒性, 実験動物と環境, 21, (2), 99-108.

- 49) 梶野勝司(1982)塩素処理過程におけるトリハロメタン中間体の生成とトリハロメタン生成に及ぼす影響, 水道協会誌, 51, (7), 33-39.
- 50) 土井豊彦(2001)弱酸性電解水の特性と食品産業での利用, 防菌防黴, 29, (6), 379-388.
- 51) 竹原淳彦, 福崎智司(2006)有機物共存下および凍結処理における次亜塩素酸ナトリウム溶液の有効塩素の減少と pH の関係. 岡山県工業技術センター報告, 32, 10-13.
- 52) 尾家重治(2007)中水準消毒薬シリーズ(1)次亜塩素酸ナトリウム, 感染制御, 3, (4), 328-332.
- 53) pH 調整次亜塩素酸ナトリウム水の殺菌効果検証とその応用研究 (2001) 岡山県産業振興財団, 平成 13 年度地域技術起業化推進助成事業.
- 53) 福崎智司(2010)次亜塩素酸ナトリウムを用いた洗浄・殺菌操作の理論と実際, 調理食品と技術, 16, (1), 1-14.
- 55) 日本能率協会(2005)経営力を磨く ISO(7)ISO14001 活動が医療現場のプロ意識につながる-津山慈風会津山中央病院, JMA マネジメントレビュー, 11(10), 64-67.
- 56) 厚生労働省医薬食品局(2004)食安基発第 0825001 号.
- 57) WHO (2008) Guidelines for drinking-water quality, third edition, 325.
- 58) 小林寛伊(2004)〔改訂〕消毒と滅菌のガイドライン, 80-82, へるす出版.
- 59) 厚生労働省(2004)感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き.
- 60) S., Sunayama, T., Sato, A., Kawamoto(2002)Disinfection effect of Hydrotalcite compounds containing antimicrobial metals against microorganisms in water, Biocontrol Science, 7, (2), 75-81.
- 61) 村山智美, 佐藤利夫(2011)弱酸性次亜塩素酸水溶液のウイルス不活化の

検討, 第 38 回日本防菌防黴学会年次大会要旨集.

- 62) Le Dantec, C., Duguet, J., Montiel (2002) Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water
- 63) Leyer, J. G., Johnson, E. A. (1997) Acid adaptation sensitizes *Salmonella typhimurium* to hypochlorous acid. Appl. Environ. Microbiol., 63, 461-467.
- 64) S., Fukuzaki, H., Urano, and S., Yamada (2007) Effects of pH on the efficacy of sodium hypochlorite solution as cleaning and bactericidal agents. Surface Sci., 58, 465-469.
- 65) H., Busscher, A., Weerkamp (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion, Appl. Environ. Microbiol., 48, 980-983.
- 66) Wiencek, K. M., Klapes, N. A., and Foegeding, P. M. (1990) Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2600-2605.
- 67) 児玉佑希子, 渡辺瑞希, 竹下朱美 (2011) 水道水の電解水による環境微生物の殺菌効果, 防菌防黴, 39, (5), 279-283.
- 68) H., Ohara, V., H., Nguyen (2007) Report on Japan-Vietnam collaboration in nosocomial infection control at Bach Mai Hospital, Hanoi from 2000 to 2006. Trop. Med. Health, 35, 253-259.
- 69) S. Dohmae (2008) *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan, Journal of Hospital Infection, 69, (4), 361-367.
- 70) J., Perez (2005) Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: Relevance to environmental

- control, American Journal of Infection Control, 33, (6). 320-325.
- 71) 加藤はる(2007)院内感染としての *Clostridium difficile* 感染症, 最新医学, 62, (2), 228-236.
- 72) 浅尾努(2010)ボツリヌス菌, 防菌防黴, 38, (2), 237-287.
- 73) 門間千枝(2008)ウエルシュ菌, 防菌防黴, 36, (4), 231-240.
- 74) 上田成子(2007)食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法(12)セレウス菌, 35, (11), 761-777.
- 75) 社団法人日本果汁学会(2005)耐熱性好酸性菌統一検査法ハンドブック.
- 76) 古畑勝則(2005)果汁飲料からの耐熱性好酸性菌の分離状況, 防菌防黴, 33, (9), 447-452.
- 77) 大久保憲(2002)消毒剤テキスト, 79-80.
- 78) 近藤雅臣, 渡部一仁(1995)スポア実験マニュアル, 107-110.
- 79) 厚生労働省労働基準局長基発第 0224008 号(2005)医療機関におけるグルタルアルデヒドによる労働者の健康障害防止について.
- 80) 藤井哲雄(2005)腐食と劣化(2)金属材料の腐食・防食と水質. 空気調和・衛生工学, 79, (8), 725-731.
- 81) 安田武夫(2000)プラスチック材料の各動特性の試験法と評価結果(5), 51, (6), 120-127.
- 82) ステンレス協会(1995)ステンレス鋼便覧.
- 83) 石川美根子, 西原守邦(2013)ICT が介入した *Bacillus cereus* アウトブレイク, 第 28 回日本環境感染学会総会抄録集, p454.
- 84) 尾家重治, 小林晃子, 古川裕之(2012)*Clostridium difficile* の芽胞に対する次亜塩素酸ナトリウムおよびジクロルソシアヌール酸ナトリウムの消毒効果, 環境感染, 27, (2), 2012.

- 85) D., J., Weber, W., A., Rutala (2010) Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care associated pathogens: *Norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*, 38, (5), S25-S33.
- 86) 磯部 賢治 (2001) 微生物の生存戦略－固体表面への付着. *表面科学*, 22, (10), 652-662.
- 87) 吉田隆 (1999) カット青果物と切り花の生産及び品質管理技術, 5-38, エヌ・ティー・エス.
- 88) 泉秀実 (2001) カット野菜の品質特性と微生物学的安全性, *食品保蔵科学*, 27, (3), 145-156.
- 89) 泉秀実 (2009) カット野菜の安全性と微生物制御技術, *食品微生物学会誌*, 26, (2), 60-67.
- 90) 森哲也, 田中廣行, 和田真太郎 (2010) 市販の生食用カット野菜 カット果実およびスプラウトの微生物汚染調査, *食品微生物学会誌*, 27, (3), 163-170.
- 91) 西川禎一 (2003) 野菜の非加熱殺菌法, *防菌防黴*, 31, (8), 427-439.
- 92) S., Rubino, P., Cappuccinelli and D. J., Kelvin (2011) *Escherichia coli* (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5, (6), 437-440.
- 93) P., Aurass, R., Prager and A., Flieger (2011) EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief, *Environmental*

- Microbiology, 13, (12), 3139-3148.
- 94) 中川良二, 藪内裕子 (2004) カットキュウリの次亜塩素酸ナトリウム殺菌における食品用界面活性剤の前処理効果, 食品科学工学, 51, (7), 367-369.
- 95) 福崎智司, 兼松秀行, 伊藤日出生 (2011) 化学洗浄の理論と実際.
- 96) H., Izumi, M., Nagano, Y., Ozaki (2004) Microbial Evaluation of Fresh Marketed Vegetables, Mem., School, B, O, S, T. Kinki University, 13, 15-22.
- 97) 小関成樹, 伊藤和彦 (2000) カット野菜の電解水殺菌における強アルカリ性電解水の前処理効果. 食品化学工学, 47, (12), 907-913.
- 98) 小関成樹, 伊藤和彦 (2000) 強酸性電解水を用いたカット野菜の殺菌 (第1報), 食品科学工学, 47, (9), 722-726.
- 99) 吉田恭一郎, 阿知波信夫, 片寄政彦 (2005) カットネギ製造現場における電解水処理の効果, 食品科学工学, 52, (6), 273-277.
- 100) 宮尾茂雄 (2004) 漬物の品質安定化における微生物の総合的制御, 食品保蔵科学, 30, (1), 29-38.
- 101) 堀口恵子, 高橋雅子, 生井有紀, 永井由美子 (2010) 食品中の塩分濃度・定量分析, 明和学園短期大学紀要, 20, 13-29.
- 102) 厚生労働省 (2012) 漬物衛生規範の改正等について, 食安監発 1012 第1号.
- 103) 全日本漬物協同組合連合会 (1988) 浅漬の製造・流通管理マニュアルー白菜漬けを中心としてー, 6-7.
- 104) H., Izumi (2010) Microbiological Safety of Fresh Produce from the Farm-to-Table Food Chain, Memoirs of the Faculty of Biology-Oriented Science and Technology of Kinki University, 26, 3-11.
- 105) Public Health England (2011) Press Releases UK *E. coli* 0157 outbreak

associated with soil on vegetables

- 106) 宮尾茂雄(1998)加工用原料野菜の除菌技術,日本食品保蔵科学会誌,24,(4),267-280.
- 107) 多田弘,大戸時喜雄(1998)トリハロメタンの検出と低減化技術,富士時報,71,(6),342-346.
- 108) 食品安全委員会化学物質・汚染物質専門調査会(2009)清涼飲料水評価書 総トリハロメタン,1-7.
- 109) 健康影響評価検討委員会 有機塩素系化合物・炭化水素類評価作業小委員会(2004)クロロホルムの健康影響について,大気環境,39,S3-S25.
- 110) 有賀孝成,川本厚子,岡本寛,押田裕子,安田和男(2003)遊泳用屋内プールの水及び空気中トリハロメタン調査,東京健安研七年報,54,283-289.
- 111) 厚生労働省(1997)水道水基準に関する省令(平成15年5月30日厚生労働省令第101号)
- 112) WHO(1996)Guidelines for drinking water quality, 2nd. End. Health criteria and other supporting information.
- 113) 市川富夫,飯沢裕美,津田明子(1987)野菜類の次亜塩素酸ソーダによる殺菌処理時におけるトリハロメタンの生成とその除去方法ならびにビタミン類の変化について,調理科学,20,(4),400-402.
- 114) 林誠(1970)食品と腐敗—主として腐敗アミンの消長を中心とした魚介類の腐敗機構—,食品衛生学会誌,11,(6),429-438.
- 115) 食品安全委員会化学物質・汚染物質専門調査会(2009)清涼飲料水評価書 総トリハロメタン.1-7.
- 116) 健康影響評価検討委員会 有機塩素系化合物・炭化水素類評価作業小委員会(2004)クロロホルムの健康影響について,大気環境,39,S3-S25.

- 117)伊藤貞彦, 越後信哉 (2008)「水の消毒副生成物」, 技報堂, 82-84, 184-186.
- 118)横関正直(1985)「飲水消毒—呼吸器病の伝染防止」. 鶏友, 572, p60-66.
- 119)Tahseen A(2005)Chlorinating drinking water on poultry farms. World Poultry, 21(5), p24-25.
- 120)山内章江, 森尚之, (2000)よりよい鶏卵肉の生産管理技術—鶏舎消毒における弱酸性次亜塩素酸ソーダ水の効果の検討—, 岡山県総合畜産センター研究報告 11号, 63-65.
- 121)合田修三, 松岡三知世, (2005)「飲水の塩素濃度が採卵鶏へ及ぼす影響」. 京都府畜産技術センター試験研究成績第2号, 74-84.
- 122)奥村純市, 藤原昇(2000)家禽学.
- 123)社団法人全国家畜畜産物衛生指導協会(2006)「養鶏における生産システムと疾病の防除対策」.
- 124)日本チャンキー(2002)チャンキー種鶏管理マニュアル.
- 125)佐藤勝紀, 内藤一郎(2006)「弱酸性次亜塩素酸水がブロイラー種鶏の体重, 臓器重量, 血液性状に及ぼす影響」, 2006年度秋季大会総会要旨集.
- 126)小野朋子(2010)「弱酸性次亜塩素酸水溶液の養鶏分野での適用事例」, 鶏の研究, 85, (6), 14-17.
- 127)三船和恵, 笠原猛(1999)「採卵鶏の血液生化学性状の推移」, 徳島県畜産試験場研究報告, 40, 1-17.
- 128)農林水産省畜産局(1975)「ふ卵衛生対策指針」.
- 129)農林水産省消費・安全局(2005)「鶏卵のサルモネラ総合対策指針」.
- 130)横関正直(2004)「熱煙霧消毒専用除菌剤「ハイペロックス」の鍋加熱式煙霧と微粒子噴霧による効果の検討」, 畜産の研究, 58, (12), 1284-1286.

- 131) 松下幸広, 池谷守司, 池谷昌久 (2002) 養鶏現場における弱酸性電解水の消毒効果. 静岡県中小家畜試験場研究報告, 13, 15-18.
- 132) 伊藤裕和, 中谷洋 (1999) オゾンガス消毒によるウズラ卵(種卵)への影響とサルモネラ殺菌効果, 愛知県総合試験研究報, 31, 305-310.
- 133) 福崎智司, 浦野博水, 中山幹男 (2013) pH 調整次亜塩素酸ナトリウム水溶液の超音波霧化による固体表面上の A 型インフルエンザウイルスの不活化, 防菌防黴学会誌, 41, (1), 11-17.
- 134) 浦野博水, 福崎智司 (2010) 固体表面の *Escherichia coli* に対する次亜塩素酸水溶液の超音波霧化の殺菌効果, 防菌防黴, 38, (9), 573-580.
- 135) J., Clark, S., P., Barrett (2006) Efficacy of super-oxidized water fogging in environmental decontamination. Journal of Hospital Infection, 64, 389-390.
- 136) 巽俊彰, 後藤正和 (2010) 中性次亜塩素酸水の浸漬および噴霧による消毒効果の検討, 家禽学会誌, 47, (1), J8-J13.
- 137) 箕口重義, 荒木裕子 (1976) 鶏卵卵殻の細菌叢に関する研究 (第 1 報) 殻付卵の貯蔵条件下で保蔵した鶏糞の細菌叢について, 聖徳栄養短期大学紀要, 7, 24-30.
- 138) 野田賢治 (2001) 技術情報 1 ニワトリ種卵の効率的保存技術, 畜産技術, 558, (11), 25-28.

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導並びにご鞭撻をたまわりました島根大学生物資源科学部教授、佐藤利夫博士に深く感謝いたします。

同じくご校閲の労をとっていただき、有益なご助言を賜りました三重大学生物資源学部教授、福崎智司博士、鳥取大学農学部教授、猪迫耕二博士、島根大学生物資源科学部教授、一戸俊義博士、島根大学生物資源科学部准教授、桑原智之博士に心よりお礼申し上げます。

株式会社エイチ・エス・ピー取締役開発部長、山下光治氏は、筆者の入社した時からの上司であり、研究全般および論文取りまとめにおいて、懇切丁寧なご指導を賜りましたことを深く感謝いたします。また、研究に協力して頂いた同社研究開発部、濱本裕司氏、安田悠人氏、三宅真名氏(現(株)めん楽)、安本良氏(現旭化成ケミカルズ(株))には、心より感謝いたします。

養鶏場での飲水試験および種卵消毒の試験の際には、(株)福田種鶏場の中山英治氏、藤井秀家氏に、試験場の提供および試験への多大なる協力を頂きました。佐藤勝紀博士(元岡山大学農学部)、内藤一郎博士(岡山大学医学部客員研究員)には生理学および組織学的見地から試験協力および多大なるご指導並びにご鞭撻を賜りました。心より感謝いたします。

島根大学生物資源科学部の村山智美氏(現中国環境(株))および Thinh Minh Hong 氏には殺菌の基礎試験において試験協力およびデータ解析等をして頂きました。心より感謝いたします。

また、研究の遂行および論文執筆を暖かく見守り、応援して頂いた増田礎氏(株)エイチ・エス・ピー代表取締役会長)をはじめとする株式会社エイチ・エス・ピー社員の皆さんにも心より感謝いたします。

最後に、私の研学生生活を応援し、支えてくれた先輩方、友人、知人の皆様、そして私の家族に心から感謝いたします。

本論文が完成したのも、これらの方々のご指導ならびにご協力の賜物です。以上の方々に、心よりお礼を申し上げます。

Summary

We investigated the microbicidal effect of weak acid hypochlorous solution (WAHS) against several microorganisms *in vitro* and its disinfection effect in the fields of animal husbandry and food production. WAHS was prepared by mixing NaClO and HCl in water, with the pH adjusted to 5.5–6.5.

It is known that a form of chlorine can be changed to undissociated hypochlorous acid (HClO) by controlling the pH values of a solution, and that HClO is a more effective disinfectant than ClO⁻. HClO can penetrate the lipid bilayer of the plasma membrane faster than ClO⁻, because both ClO⁻ and bacterial surfaces are negatively charged. Moreover, HClO can attack the microbial cell both extracellularly and intracellularly. This leads to an enhanced bactericidal effect of HOCl as compared with that of ClO⁻.

We confirmed the safety of WAHS for contact with both of the human body and environment. Moreover WAHS can be used as an additive for washing foods and it is appropriate for use in the field of animal husbandry and food production.

We investigated the microbicidal effect of WAHS against bacteria, viruses and fungi. In this test, we used 57 bacterial strains (10 standard strains and 47 clinical isolates), two standard fungal strains, and a standard viral strain. Using WAHS with 50ppm of the available chlorine, all the strains were killed with a contact time of 10 to 3,600 s.

Bacillus subtilis, *B. cereus* and *Aspergillus niger* had a higher resistance to WAHS compared with that of other bacteria and fungi. WAHS was capable of killing these strains within a short time at pH 5 and 6 than at pH 8. This indicated that the bactericidal effects of WAHS are higher under weak acidic pH conditions, and the microbicidal effects of WAHS did not depend on the concentration of the available chlorine but instead on that of HClO.

We found that bacterial spores had a high level of resistance against WAHS. The bactericidal effects of WAHS against three species of spore-forming bacteria (*B. cereus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, and *Clostridium difficile*) were investigated. These bacteria are known to be harmful in the medical and food industries. We prepared 10-200 ppm hypochlorous solutions, with the pH adjusted to 6-9. Further, we facilitated a contact of hypochlorous solutions with the spores and measured the time-dependent change in the viable count of bacteria. In addition, we evaluated the bactericidal effects against the spores attached to polyethylene, stainless steel, and cotton fabric.

The bactericidal effect of WAHS of pH 6 was more effective than that of pH 9. The log survival rates against spores were log approximated by the product of the available chlorine concentration (ppm) and contact time (min). CT values for the solution of pH 9 were 4.1-8.1 times higher compared with those of pH 6. These tendencies were similar for the spores attached to the three different materials.

We considered applying the WAHS in the field of food production. Major

concerns in this field include the degradation and deterioration of foods and the outbreak of food poisoning with *Norovirus* and *Escherichia coli* 0157. Therefore, it is very important to control microorganisms in food production. We evaluated the use of WAHS in freshly cut vegetables and a pickle production line that do not use heating during processing.

We first evaluated the freshly cut vegetables such as green long onion and cucumber. The total viable count of bacteria on the surface of green long onion and cucumber was significantly reduced from 5.4, 4.9 log CFU/g to 3.8, 4.1 log CFU/g by washing with WAHS (pH 6, 100ppm of the available chlorine). Two types of nonionic surfactant, polyglycerol esters of fatty acids and a washing agent with sucrose fatty acid esters, were added to WAHS (P-WAHS and S-WAHS, respectively) to allow the contact of bacteria on the surface of vegetables with WAHS. P-WAHS and S-WAHS remained unchanged in term of pH and the concentration of free residual chlorine for 24 hours, and decreased the surface tension. P-WAHS and S-WAHS decreased the viable count of bacteria by 1-2 orders of magnitude, as compared with that by WAHS. The bactericidal effect of P-WAHS and S-WAHS were significantly higher than that of WAHS. Therefore, we suggest that this can be an effective disinfection method for the processing shredded vegetables.

Furthermore, we tried to disinfect the Chinese cabbages on the washing line in pickle manufacturing plants under the same conditions. The purpose of this study was to try to quickly disinfectant the Chinese cabbages used in pickles production by applying WAHS. The Chinese

cabbages were mixed with WAHS for 20 s, with an eradication rate of 98.6%. The disinfection effect was equivalent to the effects of the accepted code of hygienic practice for pickled vegetables (NaClO, 100 ppm for 10 min or 200 ppm for 5 min). The chloroform production by the sample after treating with WAHS was less than that with NaClO, and equivalent to that with tap water. Therefore, we suggest that WAHS is suitable for washing the Chinese cabbages in the process of pickles production.

Finally, we investigated the use of WAHS on poultry farms in order to evaluate the effectiveness of WAHS in the field of animal husbandry. Antibiotics are routinely used for disease prophylaxis in poultry farms, and it is becoming increasingly important to control microorganisms by hygiene control in the farm to prevent diseases such as avian influenza.

There has recently, been an increased focus on the disinfection of drinking water in poultry farms to prevent a spread of diseases. Therefore, we evaluated the bactericidal effect and productivity of WAHS in drinking water and the safety of chickens. Broiler chicks were divided equally into two groups, from 1-64 weeks of age: the experimental group was given 50 ppm WAHS and the control group was given tap water. In the experimental group, an adequate amount of chlorine was kept in the water supply bells, from where the hens drank water. The number of bacteria and fungi were evaluated at three different points along the water supply system. *Salmonella* spp. and coliform bacteria were not detected at any point in the water supply, and a small number of other types of bacteria and fungi were found, which were comparable with those found in the tap

water supply. The viability of the experimental group was significantly higher than that of the control group at 24 weeks of feeding. There was no significant difference in the egg-laying rate between the two groups, and we could not observe any adverse effects on organ weights, blood properties, or histological examinations throughout the study period in either of the two groups. Therefore we suggest that WAHS is effective in improving the rate of chick maturation and preventing bacterial spread.

Next, we investigated the viability of spraying WAHS mist as an alternative to formaldehyde fumigations in order to disinfect hatching eggs. We sprayed WAHS mist in an experimental booth, and it contacted both the surface of a glass Petri dish and egg shells. The survival rate of *Staphylococcus aureus* on the surface of the glass Petri dishes and of bacteria on the surface of egg shells were both reduced to <1% with WAHS mist. In a practical trial, 168-1848 hatching eggs were sprayed with WAHS mist for of 7.1 mg/m³ for 1.5h. The effects of disinfection on the surface of egg shells and on the hatching of fertile eggs were approximately equal to those treated by formaldehyde fumigation. Moreover, we suggest that spraying WAHS is a viable option for the disinfection of hatching eggs as an alternative to formaldehyde fumigations.

We found that WAHS had a high disinfection effect and was useful in both the fields of animal husbandry and food production. In the future, we would like to continue to promote the development and validation of

a disinfection method according to the characteristics of WAHS in several fields.

摘 要

本研究では、食品および畜産分野で弱酸性次亜塩素酸水溶液の適用を目的とし、その基礎的検討および実使用条件での効果検証を行った。弱酸性次亜塩素酸水溶液は、次亜塩素酸ナトリウムを水道水で希釈し、塩酸で pH を 5.5～6.5 の弱酸性に調製したものである。弱酸性に調整することにより、水中の塩素の形態がイオン型の次亜塩素酸イオン (OCl^-) から分子形の次亜塩素酸 (HClO) に変化する。細菌の形質膜はイオンや低分子量分子の透過を妨げるため、荷電を持つ次亜塩素酸イオン (OCl^-) よりも荷電を持たない次亜塩素酸 (HClO) のほうが細菌の形質膜に対する透過性が高い。ゆえに次亜塩素酸 (HClO) は受動拡散によって微生物の細胞壁と形質膜を速やかに通過し、菌体の内部と外部の両面から酸化作用を与え、殺菌効果および速度が増大するといわれている。また、弱酸性次亜塩素酸水溶液は人体や環境に対する安全性が高いことも確認されており、食品添加物としても使用できることから、食品および畜産分野での適用に適している。

まず、弱酸性次亜塩素酸水溶液の基礎的な殺菌効果を確認するため、細菌、カビ、ウイルスの各種標準株および臨床分離株に対する殺菌、殺カビおよびウイルス不活化効果の検討を行った。その結果、有効塩素濃度 50 ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液は本試験で供したすべての標準株の細菌、カビおよびウイルスを 15 秒～600 秒で検出限界以下とする高い殺菌・不活化効果が認められた。*B. subtilis*, *B. cereus* および *A. niger* は有効塩素に対して抵抗性が高かったが、pH 5.0, 6.0 の弱酸性域の条件で殺菌に要する時間が短縮された。

次に、有効塩素に対して高い抵抗性が認められた芽胞菌のうち、医療や食

品分野で問題となっている *B. cereus*, *A. acidoterrestris* および *C. difficile* を用いてさらに詳細に検討を行った。有効塩素濃度 10~200 ppm, pH 6 および 9 の次亜塩素酸水溶液を調整して各種芽胞液に接触させ、その生菌数の経時的変化を測定した。また、芽胞をステンレス鋼, プラスチックおよび布などの各種部材に付着させた場合の殺菌効果についても検討した。pH 6 の次亜塩素酸水溶液は pH 9 の場合と比較して, 短時間で殺菌が可能であった。また, 芽胞菌に対する対数生残率 (S) は有効塩素濃度 (ppm) と時間 (min) の積である濃度時間積に対数近似し, その値は pH が弱酸性域で低い値となった。この傾向はポリエチレン, ステンレス鋼および布に付着した芽胞でも同様であった。

次に弱酸性次亜塩素酸水溶液の食品分野への適用について検討を行なった。食品分野はノロウイルスや病原性大腸菌などによる集団食中毒や, 食品の品変敗および質劣化などの観点から, 製造時における微生物管理が大きな課題となっている。本研究では特に, 製造中に加熱工程を持たないカット野菜や漬物製造ラインでの弱酸性次亜塩素酸水溶液の使用を目指し, 検討を行なった。

まず, カット野菜の材料として, 殺菌が困難なキュウリおよびアオネギを用いた。有効塩素濃度 100 ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液で洗浄することによってキュウリおよびアオネギの一般生菌数は 5.4, 4.9 logCFU/g から 3.8, 4.1 logCFU/g に有意に減少した。さらに殺菌効果を増大させる試みとして, 界面活性剤の添加も検討した。弱酸性次亜塩素酸水溶液に 2 種の非イオン型界面活性剤を添加したところ, pH および有効塩素濃度を 24 時間維持することができ, 表面張力の低下が確認された。また, 殺菌効果も弱酸性次亜塩素酸水溶液単独よりも 1~2 桁減少させることができ, 殺菌が困難な野菜に対す

る殺菌方法として有用性が高いことが示された。

さらに、実際の漬物製造工場での適用を想定し、食品用洗浄機での殺菌条件に即し、漬物の原料となるハクサイの殺菌を試みた。50 ppm の弱酸性次亜塩素酸水溶液で 20 秒間攪拌洗浄を行なった場合、漬物衛生規範の殺菌条件（次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm で 10 分または 200 ppm で 5 分）での殺菌条件と同等の殺菌効果が得られた。また、発がん性物質として問題となるトリハロメタンの一種であるクロロホルムの生成量は水道水と同程度であった。

最後に畜産分野への適用を目指し、養鶏場での弱酸性次亜塩素酸水溶液の使用について検討を行った。養鶏分野では、農場の衛生管理を徹底することで鳥インフルエンザをはじめとする疾病の抑制を行い、かつ鶏肉および鶏卵の食品としての微生物学的安全性を確保することが求められている。

まず、ブロイラー種鶏への飲水へ弱酸性次亜塩素酸水溶液を利用した場合の、飲水の殺菌効果および鶏に対する生産性および安全性への影響について水道水と比較して評価した。飲水殺菌に 50 ppm 弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いた場合、給水ライン中の残留塩素濃度は、徐々に低下するものの、給水器内でも総塩素濃度 14.6 ppm を維持していた。飲水中の生菌数を測定したところ、特に大腸菌群数およびサルモネラ属菌などグラム陰性菌を検出限界以下となっており、水道水と比較して菌数を抑制できた。生産成績については、餌付け初期の育成率を 0.8 % 向上した。また、飲水期間を通して、鶏の臓器重量、血液性状および組織学的検査において悪影響は認められなかった。

ブロイラー種鶏の種卵（受精卵）消毒への弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧の適用を検討し、現行のホルマリン燻蒸法との比較を行った。弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧により種卵消毒を行った場合の卵殻表面の殺菌効果および孵化率について検討を行った。弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧による除菌率は

99.85 %となり，ホルマリン燻蒸での除菌率 99.75 %と同等であった。除菌率のばらつきは弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧のほうが小さく安定した除菌率が得られた。孵化率も弱酸性次亜塩素酸水溶液噴霧およびホルマリン燻蒸で各々 94.6 %，92.9 %と同等の孵化率であった。これらの結果より種卵消毒においても弱酸性次亜塩素酸水溶液はホルマリン燻蒸の代替法として利用性が高いことが示された。

本研究により，弱酸性次亜塩素酸水溶液は食品及び畜産の分野において，衛生管理をする上で有用性が高いことが示された。今後は様々な分野において弱酸性次亜塩素酸水溶液の持つ特性に応じた殺菌方法の開発およびその検証を進めていきたい。

学位論文の基礎となる学術論文

1. 非イオン界面活性剤を添加した弱酸性次亜塩素酸水の野菜に対する殺菌効果

小野朋子, 三宅真名, 山下光治

防菌防黴 2005年6月 第33巻 第6号 pp.257-262

【第5章】

2. 弱酸性次亜塩素酸水の噴霧による種卵消毒に関する研究

小野朋子, 三宅真名, 山下光治

防菌防黴 2006年8月 第34巻 第8号 pp.465-469

【第8章】

3. 弱酸性次亜塩素酸水を飲水消毒に用いた場合の殺菌効果およびブロイラー育成率と産卵率への影響

小野朋子, 三宅真名, 安本良, 山下光治, 藤井秀家, 中山英治, 内藤一郎, 佐藤勝紀

日本家禽学会誌 2007年11月 第44巻 第4号 J148-J153

【第7章】

4. 弱酸性次亜塩素酸水溶液の各種芽胞に対する殺菌効果

小野朋子, 山下光治, 佐藤利夫

防菌防黴 2010年8月 第38巻 第8号 pp.509-514

【第4章】

5. Microbicidal Effect of Weak Acid Hypochlorous Solution on Various
Microorganisms

Tomoko Ono, Koji Yamashita, Tomomi Murayama, Toshio Sato

Biocontrol Science 2012.9 Vol.17 No.3 p.129-133

【第3章】

6. 弱酸性次亜塩素酸水溶液の白菜殺菌への適用

小野朋子, 山下光治, 佐藤利夫

防菌防黴学会誌 2014年8月 第42巻 第6号 pp.289-293

【第6章】

参考論文

1. 非イオン界面活性剤添加弱酸性次亜塩素酸水溶液の噴霧によるニワトリ
種卵表面の消毒効果

小野朋子, 三宅真名, 山下光治

防菌防黴 2006年9月 第34巻 第9号 pp.537-542