Q 熱コクシエラのマヨネーズおよびその構成成分中 における生残性

福士秀人^{1)†} 井上和幸²⁾ 西藤 琳¹⁾ 大屋賢司¹⁾
指原信廣²⁾ 山口剛士³⁾ 平井克哉⁴⁾

- 1) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
- 2) キューピー(株)研究所基盤技術センター (〒183-0034 府中市住吉町5-13-1)
- 3) 鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター (〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101)
- 4) 天使大学看護栄養学部 (〒065-0013 札幌市東区北13条東3-1-30)

(2008年8月25日受付・2008年12月22日受理)

要 約

マヨネーズおよびその原材料中におけるコクシエラ菌の生残性を検討した。コクシエラの感染性はマヨネーズ中で時間経過とともに減少し、室温1週間では100分の1以下になった。マヨネーズの構成成分のうち酢酸では0.5%から2%、1週間では感染性に变化はなかった。卵白では感染性が減少する傾向がみられた。また、64℃7分間の加熱ではリン酸緩衝生理食塩水中で10分の1、卵黄中では100分の1に感染性が減少した。これらの結果からマヨネーズないし構成成分にコクシエラが混入したとしても、予想される汚染菌量や通常の流通過程を考慮すると、製造後7日以内に感染性が消失すると考えられる。——キーワード：コクシエラ，マヨネーズ，生残性。

----- 日獣会誌 62, 481～484 (2009)

Q 熱はコクシエラ菌 (*Coxiella burnetii*) による熱性の人と動物の共通感染症である。欧米では家畜の流産および非加熱乳製品を感染源とした発生がみられている。コクシエラ菌の感染は多くの動物種でみられ、牛、ヤギ、羊、犬、猫、霊長類、野生げっ歯類、は虫類、両生類、鳥類をはじめ多くのダニが上げられる。動物における慢性感染では子宮および乳腺が感染部位となる。感染動物の出産では胎盤に多量のコクシエラ菌が含まれ、感染源となる。また、乳汁中にもコクシエラ菌が排泄されることがわかっている。しかしながらわが国の動物におけるコクシエラ菌感染症の実態は明確ではない。

人のコクシエラ菌感染症であるQ 熱はわが国では感染症法において四類に指定され、全数届け出となっている。感染症法が施行された1999年から数年は20から30例の届け出がなされたが、最近数年の届け出数は一桁台と非常に少ない。また、各症例における感染源は不明である。

わが国にQ 熱の感染源の一つとして卵が示唆された[1]、しかし、この報告における実験結果は追試によっ

て否定された。すなわち、市販の鶏卵の調査においてコクシエラ汚染は検出されなかった[2, 3]。さらに汚染食品としてあげられたマヨネーズについても、当初の報告よりも多数の検体を調査したにも関わらず汚染はまったく検出されなかった[4]。このようにわが国における鶏卵のコクシエラ汚染は否定された。スイスにおいてもわが国からの報告をうけ調査したが、鶏卵からはまったくコクシエラ菌は検出されなかった[5]。しかしながら、鶏卵がコクシエラに汚染された場合に、卵成分を含む食品においてコクシエラがどの程度生残するかを明らかにすることは食品公衆衛生上の意義があると考えられる。

卵を原材料とする代表的な食品としてマヨネーズがある。マヨネーズにおける微生物の生残性に関する報告は少ない。鳥インフルエンザウイルスはマヨネーズ中で速やかに不活化されるが[6]、サルモネラについては自家製マヨネーズにおいて殺菌されるまでに数時間を要するとされている[7]。コクシエラ菌の汚染についてはPCR法によりまったく検出されなかったことが報告されている[3]。しかしながら、これまでにマヨネーズにコクシ

† 連絡責任者：福士秀人 (岐阜大学応用生物科学部獣医微生物学研究室)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎・FAX 058-293-2946 E-mail: hfukushi@gifu-u.ac.jp

図1 マヨネーズ、卵成分および酢酸溶液におけるコクシエラ菌の生残性

マヨネーズ (A), 全卵・卵白・卵黄 (B) および0.5から2.0%酢酸 (C) におけるコクシエラ菌の生残性を測定した。生残性は各溶液中の封入体形成単位数として示した。いずれもコクシエラ菌と卵成分を混合後、室温で7日間調べた。対象としてPBSを用いた。

エラが混入した場合のコクシエラの感染性についての検討はない。そこで、本研究ではマヨネーズおよびその原材料中におけるコクシエラ菌の生残性を検討した。その結果、マヨネーズ中ではコクシエラの生残性は著しく低下することがわかった。

材料および方法

用いたコクシエラ菌：コクシエラ菌 Nine Mile II 相菌を実験対象とした。培養細胞としてサル腎臓由来BGM細胞およびVero細胞を用いた。両細胞にコクシエラ菌の感受性に差はなかったが、接種材料に対する耐性に応じ、いずれかの細胞を用いた。コクシエラ菌の培養はBGM細胞を用い、既報 [8] に従った。

マヨネーズ、全卵、卵黄、卵白および酢酸水溶液中における生残性の定量：市販のマヨネーズを2種類および市販の鶏卵を用いた。鶏卵は手で割り、液卵とした。全卵はビーカー中で泡立て器を用い、均一になるまで攪拌混和した。卵白および卵黄はセパレーターでそれぞれを分取した後、泡立て器で均一にした。各液卵材料に抗菌剤としてストレプトマイシンを1mg/mlとなるように加えた。

次にマヨネーズ9gに菌液1.0mlの添加、もしくは各液卵材料（全卵、卵黄、卵白）4.5mlに菌液0.5mlを加えることにより、最終菌濃度 5×10^5 IFU（封入体形成単位）/mlとなるように調整した。また、酢酸含有菌液は酢酸濃度0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、菌濃度 10^6 IFU/mlとなるように調整した。

各混合液は室温（約23℃）におき、混合直後、なら

びに2日目から7日目まで毎日、50μlを採取した。酢酸含有菌はTris水溶液を最終濃度70mMになるように加え、中和した後に定量に用いた。

コクシエラ菌含有卵黄液は、56℃ 3.5分、60℃ 3.5分、61℃ 3.5分、54℃ 10分、58℃ 10分、59℃ 10分の法定殺菌条件および64℃ 7分間の割合で加熱した。加温にあたっては、実際の液卵がそれぞれの温度に達してから一定時間加熱し、終了後は氷水で急冷した。

さらに、マヨネーズおよび液卵から50μlを採取し、450μlのPBS（0.1mg/mlストレプトマイシン含有）と混和後、10倍段階希釈した。

Vero細胞ないしBGM細胞を96穴プレートに 3.5×10^4 /穴となるようにまき、一晚培養後、検体を接種した。検体は0.1ml/穴、希釈あたり2穴、接種し、1時間吸着後、細胞を3回洗浄し液卵成分を除去した。5%牛胎児血清含有MEMを150μl/穴に加え、5%CO₂存在下で5日間培養した。

その後、培養上清を除去し乾燥させた。メタノール固定を30分間行い、除去、乾燥させ、コクシエラ菌に対するモノクローナル抗体H106（1μg/ml）[9]を50μl/穴に加え、1時間反応させた。またPBSで3回洗浄後、0.2% Evans-blue 含有FITC標識抗マウス抗体液（200倍希釈）を25μl/穴に加え、1時間反応させた。PBSで2回、蒸留水で1回洗浄し、乾燥させ、蛍光顕微鏡で観察し、1穴あたりの特異的な蛍光を発する封入体をすべて数えた。その際、各穴の平均封入体数により検体における単位体積あたりのIFU数を算出した。

それぞれの実験は2回繰り返し、平均値として示し

図2 卵黄の加熱によるコキシエラ菌の生残性
コキシエラ菌を卵黄と混合し64℃で7分間加熱した。対象としてPBSを用いた。

た。今回は実験回数が2回であり、統計検定は行わなかった。

成 績

マヨネーズおよびその構成成分におけるコキシエラ菌の生残菌数をIFU測定により定量した。マヨネーズおよび卵成分は粘性が高く、IFUの実測値にばらつきがあったが、経時的な変動には再現性がみられた。マヨネーズ中ではコキシエラの生残菌数は日をおいて減少し、7日目では1/100以下となった(図1A)。2種類のマヨネーズでコキシエラ菌の生残性に差はみられなかった。

マヨネーズの構成成分のうち、どの成分がコキシエラ菌の生残性に影響を与えているかをみるため、液卵および酢酸中における菌の生残について検討した。食用油については食用油そのものとコキシエラ菌を混入すると、細胞への感染がみられずIFUの定量ができなかったため、今回は検討できなかった。

全卵、卵白および生卵黄におけるコキシエラ菌の生残性をみたところ、全卵および卵白では5日後に1/5から1/10程度に生残菌数が減少したが、その後は生残菌数は維持された(図1B)。卵黄では生残菌数の減少はみられなかった。酢酸水溶液中でのコキシエラ生残菌数は濃度に関わらず一定で、ほとんど減少しなかった(図1C)。

マヨネーズの製造においては液卵の加熱殺菌が行われる。そこで、加熱による影響をみた。その結果、64℃7分間の加熱により生残菌数が1/100以下に減少した(図2)。いっぽう、56℃3.5分、60℃3.5分、61℃3.5分、54℃10分、58℃10分、59℃10分の法定殺菌条件では生残菌数は変化しなかった(成績は示していない)。

考 察

今回の実験によりマヨネーズ中ではコキシエラ菌は生残しにくいことがわかった。マヨネーズ中でのコキシエラ生残性が著しく低下したことから、マヨネーズの構成成分のうちどれが有効かを調べた。基本的なマヨネーズの配合についてみると卵黄17%、食用油65から79%、食用酢9.5から13%、調味香辛料3.2から5%とされている[10]。食酢の酢酸濃度は一般に約4%であることから、マヨネーズ中の酢酸濃度は0.38から0.52%となる。

マヨネーズの成分のうち、卵黄中では生残菌数は5日目までで1/5になったがその後は変化がなかった。この生残菌数の減少は対象としたPBSでも同様であったことから卵黄の効果ではないと考えられる。卵白においては卵黄よりも生残菌数は少なかったが、マヨネーズ中より生残菌数は多かった。コキシエラ菌の培養に卵黄嚢内接種法が用いられることを考えると、卵黄や卵白がコキシエラの増殖や生残性に影響があるとは考えにくく、妥当な結果であると考えられた。

もう一つの成分である酢酸についてみると、今回の実験から少なくとも2%まではコキシエラ菌の生残に影響はないことがわかった。これはコキシエラ菌が細胞に感染後、酸性条件下のリソゾーム中で増殖可能であることと矛盾しない[11]。一般に食品中の酢酸は殺菌的ないし静菌的な効果をもつとされるが[12, 13]、マヨネーズ中の酢酸濃度はコキシエラ菌には無効と考えられた。

マヨネーズ体積の大半をしめる食用油について今回は検索できなかった。これは油成分中のコキシエラ生残菌数を定量する実験系の構築が困難であったためである。

マヨネーズの製造工程で液卵の加熱処理が行われている。今回の実験から液卵の法定殺菌条件ではコキシエラ菌は死滅しないことがわかったが、64℃7分間の条件であれば、生残菌数を減ずることがわかった。今後は加熱殺菌条件をさらに検討する必要がある。

今回の実験では検体に5 × 10⁵IFU/mlとなるようにコキシエラ菌を添加した。これは通常の実験室におけるコキシエラの培養条件とほぼ同等である。野外における食品や食材への混入があるとしても混入菌数はもっと少ないと考えられる。市販の鶏卵のコキシエラ汚染量は検出限界以下であることから1個あたり10²IFU/ml以下であると考えられる。また10³~10⁴IFU/個の鶏卵が混入しても他の汚染されていない鶏卵との混和により希釈され10²IFU/ml以下となる。マヨネーズ中では数日で生残菌数が1/100以下になることを考慮すると、鶏卵にコキシエラ菌が混入したとしてもマヨネーズ製品中では製造後数日以内にほぼ死滅してしまうであろう。

さらに検討の余地があるものの、今回の実験結果から

はマヨネーズにコクシエラが混入しても人への感染源となる可能性はほとんどないと考えられた。

引用文献

- [1] 切明義孝, 喬 瑩, 巽 典之, 鷺尾政二, 山元一休, 中村尚人, 山口和男: 市販鶏卵から検出される *Coxiella burnetii* の感染力の検討, 医学のあゆみ, 209, 139-140 (2004)
- [2] 貞升健志, 新開敬行, 田部井由紀子, 平井昭彦, 鎌田信一, 甲斐明美, 諸角 聖: リアルタイムPCR法による *Coxiella burnetii* の定量法および鶏卵中におけるコクシエラ菌の増殖性について, 日本食品微生物学会雑誌, 22, 155-158 (2005)
- [3] 平井昭彦, 金子誠二, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 貞升健志, 新開敬行, 矢野一好, 諸角 聖: 市販牛乳の *Coxiella burnetii* 汚染状況および鶏卵中のコクシエラ菌検査法の検討, 食品衛生学雑誌, 46, 86-92 (2005)
- [4] 小宮智義, 齋藤純子, 荒井節夫, 平井克哉: 卵および卵製品における *Coxiella burnetii* の疫学調査, 獣医畜産新報, 57, 657-658 (2004)
- [5] Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A: Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Int J Food Microbiol, 116, 414-418 (2007)
- [6] 指原信廣, 大河内美穂, 長谷川峯夫, 伊藤壽啓: マヨネーズ中での鳥インフルエンザウイルスの不活化, 日本食品微生物学会雑誌, 21, 213-215 (2004)
- [7] 相川勝弘, 村上裕之, 猪俣恭子, 丸山 務, 藤澤倫彦, 高橋孝則, 山井志朗: 卵の保存および調理と関連する条件が *Salmonella Enteritidis* の増殖, 侵入および生残に与える影響, 食品衛生学雑誌, 43, 178-184 (2002)
- [8] Andoh M, Nagaoka H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. Microbiol Immunol, 48 (12), 971-975 (2004).
- [9] Hotta A, Zhang GQ, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens, JVMS, 66, 1289-1291 (2004)
- [10] 今井忠平: マヨネーズ・ドレッシングの知識, 107, 幸書房, 東京 (1993)
- [11] Voth DE, Heinzen RA: Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*, Cell Microbiol, 9, 829-840 (2007)
- [12] 円谷悦造, 浅井美都, 太田美智男: 調理食品での腸管出血性大腸菌 O157: H7 をはじめとする食中毒菌に対する食酢の抗菌作用, 日本栄養・食糧学会誌, 51, 101-106 (1998)

Survival rates of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and its constituents

Hideto FUKUSHI ^{*†}, Kazuyuki INOUE, Lin Saito, KENJI Ohya, Nobuhiro SASHIHARA, Tsuyoshi YAMAGUCHI and Katsuya HIRAI

** Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Yanagido 1-1, Gifu, 501-1193, Japan*

SUMMARY

The survivability of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and its ingredients, including whole egg, yolk, albumen, and vinegar as an acetic acid was investigated. The infectivity of *C. burnetii* in mayonnaise decreased over time to be 1/100 after seven days at room temperature. No change in the infectivity of *C. burnetii* was observed for 0.5% to 2.0% acetic acid for seven days at room temperature. The incubation of *C. burnetii* in the albumen lowered the infectivity to 1/10. Heating the coxiella suspension at 64 °C for seven minutes decreased the infectivity to 1/100 in yolk compared to 1/10 in PBS. These results indicated that contaminated *C. burnetii* in mayonnaise may be able to be eliminated with seven days. — Key words: *Coxiella burnetii*, mayonnaise, survivability.

[†] Correspondence to: Hideto FUKUSHI (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Yanagido 1-1, Gifu, 501-1193, Japan

TEL · FAX 058-293-2946 E-mail: hfukushi@gifu-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 481 ~ 484 (2009)