

平成16年度農林水産省
食品製造工程管理
情報高度化促進事業

平成16年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「Biofilm 食中毒細菌に対する洗剤・殺菌剤の
洗浄・除菌・殺菌効果に関する研究」

平成17年2月
女子栄養大学
上田成子教授

1. Biofilm 食中毒細菌に対する洗剤・殺菌剤の洗浄・除菌・殺菌効果に関する研究

1.はじめに

Biofilm（微生物膜）とは、固体あるいは液体表面に、微生物あるいはそれらが産生する多糖類等の生成物が集積した構造体をいう。バイオテクノロジーの分野では、Biofilm を固体化菌体として汚水処理や工業的発酵等に有効利用している。しかし、食品あるいは医療環境では、設備、器材等の表面に形成された Biofilm はヒトに対して有害影響をもたらす可能性がある。特に、食品取扱い施設内では、施設、設備、器具等の表面に形成された種々の微生物からなる Biofilm が食品への微生物汚染源の一つとして関与する可能性がある。このことから、食品取扱い施設内の固体表面に付着・増殖して形成される Biofilm 食中毒細菌に対する洗剤・殺菌剤の洗浄・除菌・殺菌効果を実験的に検討した。

2. 実験方法

1) 供試菌株

本実験に用いた腸管病原菌は *Escherichia coli* O157:H7(VT1,2 産生食中毒由来株)、*Salmonella* Enteritidis (phage type4、食中毒由来株)、*Staphylococcus aureus* (Enterotoxin A 産生食中毒由来株)の計 3 菌株である。

2) 供試洗剤・殺菌剤および強酸化電解水

本試験に用いた洗剤は中性洗剤 (A 社)、弱酸性洗剤 (B 社) および弱アルカリ性洗剤 (C 社) である。中性洗剤の成分組成は界面活性剤 (38 %アルキルグリコシド) と安定剤である。弱酸性洗剤の成分組成は界面活性剤(43 %ポリオキシエチレンアルキルエーテル、脂肪酸アルカノールアミド、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム)と安定剤である。弱アルカリ性洗剤の成分組成は、界面活性剤 (41 %アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、アルキルアミノオキシド) ,安定剤、粘度調整剤及び酵素である。

殺菌剤は、塩素系の次亜塩素酸ナトリウム (D 社)、陽イオン界面活性剤系の塩化ベンザルコニウム(E 社)、両性イオン面活性剤系のアルキルアミノエチルグリシン塩

酸塩 (F 社)、ビグアニジン系のクロルヘキシジン (G 社)、ビグアニジンの (H 社)の 5 種殺菌剤を用いた。

また、本試験に用いた強酸化電解水 (I 社) は総残留塩素濃度 30 ppm、pH2.7、酸化還元元電位：1108mV である。

3) Biofilm の作製¹⁾

(1) ステンレス板の前処理方法

ステンレス板 (2×2cm ,No.304:Fe 74%, Cr 18%,Ni 8%) を金属性のカゴに入れ、溶媒 (エタノール : アセトン 1 : 1) に浸漬し、超音波 (BRANSON) で 1 時間処理をした。その後、50 ポリ容器 2 個に 30 の蒸留水を準備し、各容器で 50 回上下すすぎを行った。蒸留水を十分切ったステンレス板は、2%NaOH 溶液 (関東化学) に浸漬して 75℃ の浴槽中で 5 分間加温してアルカリ処理を行った。アルカリ処理したステンレス板は蒸留水で洗浄した後に、1%硝酸溶液 (和光純薬) に浸漬し 75℃ の浴槽中で 5 分間加温して酸処理を行った後、蒸留水で洗浄した。このステンレス板はろ紙をひいたガラスシャーレに入れ、121℃ 15 分間オートクレーブで滅菌した。

(2) ステンレス板上での Biofilm 食中毒細菌の作製

上述したように滅菌処理したステンレス板を 25 ml の滅菌トリプトソイブロス (BBL)を入れた試験管に無菌的に 1 枚ずつ入れた後に、試験菌の 37℃、24 時間トリプトソイ培養液を各試験管に 2ml ずつ接種した。これを 37℃、24 時間培養した後、無菌的にステンレス板をとり出し、滅菌 PBS で洗浄した。即ち、処理済ステンレス板ごとに滅菌 PBS を入れた 100ml 容ビーカーを 3 個用意し、順次 1 分間の浸漬・洗浄操作を 3 回繰り返した。PBS 洗浄後のステンレス板は、新たな滅菌済みトリプトソイブロス 25mL 入り試験管に 1 枚ずつ移し 37℃ で培養し、2 日ごとに古い培地を捨て、新しい培地と交換し、都合 10 日間培養した。10 日間培養したステンレス板は滅菌 PBS で同様に洗浄を行い、これを試験用 Biofilm とした。

4) Biofilm 食中毒細菌に対する洗剤・殺菌剤・強酸化電解水の反応および菌数測定

本試験に用いた各洗剤の使用濃度は 0、0.08、0.15 % および 1.5 % の 4 濃度であり、殺菌剤については、次亜塩酸ナトリウムは 0、0.002, 0.005, 0.01 および 0.02%、塩

化ベンザルコニウムは 0、0.05、0.1 および 1%、アルキルアミノエチルグリシン塩酸塩は 0、0.5、1、2 および 4%、クロルヘキシジンは 0、0.05、0.1 および 1%、ポリヘキサメチレンピグアナイトは 0、0.5、1 および 2% の濃度で試験を行った。強酸化電解水は 2) に述べた強酸化電解水を用いて試験した。

作製した Biofilm は、40ml の試験用薬剤液の入った試験管内に浸漬し、作用温度は 25 °C として 100 回/分の速度で 5 分間振とうした。振とう終了後直ちに、Biofilm は滅菌中和液（レシチン・大豆製（和光純薬）5.3g、Tween 80（関東化学）37.5g、KH₂PO₄（和光純薬）0.58g/l）中に移した。また、未作用の Biofilm は直接中和液に入れ対照区とした。なお、Biofilm は各試験ごと 2 枚を使用した。

中和した Biofilm の両面を滅菌綿棒で丹念に拭き取り、4.5 ml の PBS 中に拭き取った綿棒の頭部を切り落とし、これに 1% hexametaphosphate（和光純薬）0.5 ml を加え、1 分間攪拌した。各種菌の菌数測定はトリプトソイプレート上に表面塗抹して 37 °C、48 時間培養後にコロニー数を数えた。

5) Biofilm の電子顕微鏡的観察

前処理ステンレス板、培地浸漬ステンレス板および各種 Biofilm は走査型電子顕微鏡 S-4300（日立）により観察した。

3. 実験結果

1) Biofilm 食中毒細菌に対する各種洗剤の単独、次亜塩素酸ナトリウムとの併用による除菌・殺菌効果

Biofilm を中性洗剤、弱酸性洗剤あるいは弱アルカリ性洗剤でそれぞれ単独処理した結果、弱酸性洗剤は 1.5% 濃度で *S. aureus* のみが 1/10 に減少し、他の菌は減少しなかった。表 1 に示したように、中性洗剤と弱酸性洗剤では、1.5% 濃度でいずれの食中毒細菌も 1/10 ~ 1/100 に減少した。また、各種洗剤は、次亜塩素酸ナトリウムとの併用によって、0.08 ~ 1.5% 濃度で各菌とも 1/10 ~ 1/100,000 まで減少した。各濃度の次亜塩素酸ナトリウムの各菌に対する殺菌効果は表 2 に示したように、0.0025 ~ 0.02% の濃度で各菌とも 1/10 ~ 1/100,000 に減少した。

2) Biofilm 食中毒細菌に対する殺菌剤の殺菌効果

表 3 に示したように、塩化ベンザルコニウムは 0.05~1%濃度で全ての食中毒細菌に対する殺菌効果を示した。アルキルアミノエチルグリシン塩酸塩は、表 4 に示したように、0.5~4%濃度で 1/ 10,000~1/ 100,000 まで減少させた。クロルヘキシジンは、表 5 に示したように、0.1%濃度で全ての食中毒細菌を 1/ 10,000~1/ 100,000 に減少させた。表 6 に示したように、ポリヘキサメチレンピグアナイトは *E. coli* と *S. Enteritidis* に対しては 0.5%で 1/ 10,000~1/ 1,000,000 に減少させたが、*S. aureus* に対しては 2%濃度で 1/ 100,000 程度に減少させたのみで、グラム陰性菌に比較し陽性菌に対して効果が小さいようであった。

3) Biofilm 食中毒細菌に対する強酸化電解水の殺菌効果

強酸化電解水の Biofilm 食中毒細菌に対する殺菌効果を表 7 に示した。強酸化電解水は *E. coli* と *S. Enteritidis* を完全に殺菌したが、*S. aureus* は 1/ 1000 に減少したにすぎず、前述のピグアナイト系のポリヘキサメチレンピグアナイトと同様に強酸化電解水はグラム陰性菌に比較し、グラム陽性菌である *S. aureus* に対する効果は小さかった。

4) ステンレス板上に形成された Biofilm 食中毒細菌の付着状態

ステンレス板上での食中毒細菌の Biofilm 形成像は図 1 に示したように、ステンレス板上に食中毒細菌が良好に付着していることが明らかであった。

3. まとめ

本実験で使用した弱アルカリ、中性および弱酸性洗剤は、通常 0.075%程度に希釈して使用されており、本実験の最低濃度 0.08%がこれに相当する。この濃度での 5 分間曝露により Biofilm 食中毒細菌の殺菌・除菌効果を期待することは困難であった。しかしながら、0.02% 次亜塩素酸ナトリウムとの併用により、各種洗剤濃度が 0.08% でも 1/ 10~1/ 100,000 程度に減少し、明らかな殺菌効果がみられた。

陽イオン界面活性剤系の塩化ベンザルコニウム、両性イオン界面活性剤系のアルキルアミノエチルグリシン塩酸塩、ピグアナイト系のクロルヘキシジンはグラム陰性・陽性菌のいずれに対しても殺菌効果は効果的であったが、ピグアナイト系のポリヘキサメチレンピグアナイトはグラム陽性菌に対する殺菌効果は低かった。また、強酸化

電解水は、*E. coli*と *S. Enteritidis* を完全に殺菌することができたが、*S. aureus* に対しては効果は小さかった。

以上の結果、Biofilm 食中毒細菌に対する洗剤と次亜塩素酸ソーダの併用は殺菌・除菌に有効であることが示唆された。

文献

1) Jui-Sen Peng, Wei-chong Tsai, Cheng-Chun Chou. : Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent., *Int. J. Food Microbiol.*, **77**,11~18 (2002).

表 1 *E.coli* O157:H7、*S.Enteritidis*および*S.aureus* の各バイオフィルムに対する
洗剤単独と洗剤+次亜塩素酸ナトリウムの除菌、殺菌効果

| | 洗剤単独 | | | | 洗剤+次亜塩素酸ナトリウム | | | |
|-------------|-------|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|-----------------|--|
| | 濃度(%) | <i>E.coli</i> O157:H7 | <i>S.Enteritidis</i> | <i>S.aureus</i> | <i>E.coli</i> O157:H7 | <i>S.Enteritidis</i> | <i>S.aureus</i> | |
| 弱アルカリ 洗剤 | 0 | 7.3 | 4.9 | 6.8 | 7.1 | 4.9 | 6.6 | |
| | 0.08 | 7.1 | 4.8 | 5.3 | 6.4 | 1.5 | 3.8 | |
| | 0.15 | 7.4 | 4.7 | 5.3 | 1.0> | 1.3 | 2.9 | |
| | 1.5 | 7.3 | 4.2 | 5.3 | 1.0> | 1.0> | 1.0> | |
| 中性洗剤 | 0 | 6.5 | 5.3 | 7.6 | 6.7 | 5.4 | 7.6 | |
| | 0.08 | 6.3 | 5.4 | 7.6 | 1.0 | 1.0 | 6.9 | |
| | 0.15 | 6.2 | 4.2 | 7.5 | 1.0> | 1.0 | 6.4 | |
| | 1.5 | 5.5 | 4.3 | 6.5 | 1.0> | 1.0> | 2.4 | |
| 弱酸性 洗剤 | 0 | 7.3 | 5.4 | 7.3 | 7.1 | 5.3 | 7.1 | |
| | 0.08 | 6.9 | 5.2 | 7.3 | 3.4 | 1.0> | 2.3 | |
| | 0.15 | 6.1 | 5.0 | 6.5 | 3.1 | 1.0> | 1.3 | |
| | 1.5 | 5.9 | 3.7 | 6.3 | 2.6 | 1.0> | 1.0> | |

- * 菌数測定:トリプトソイ寒天(表面塗沫)
- * 菌数:log of CFU/8cm²(2cm角ステンレス板使用)
- * 10日間培養ステンレス使用
- * 反応時間:5min
- * 次亜塩素酸ソーダ濃度は0.02%で試験した。

表 2 *E. coli* O157:H7、*S. Enteritidis*および*S. aureus*の各バイオフィルムに対する次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果

| | 濃度(%) | 菌数 | 平均値 |
|------------------------|-------|-----|-----|
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 0 | 6.8 | 6.9 |
| | | 6.9 | |
| | 0.002 | 6.3 | 6.2 |
| | | 6.1 | |
| | 0.005 | 4.3 | 4.2 |
| | | 4.1 | |
| 0.01 | 2.8 | 2.6 | |
| | 2.3 | | |
| 0.02 | 1.8 | 1.4 | |
| | 1.0> | | |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0 | 5.2 | 5.2 |
| | | 5.2 | |
| | 0.002 | 4.2 | 4.3 |
| | | 4.4 | |
| | 0.005 | 3.8 | 3.6 |
| | | 3.3 | |
| 0.01 | 2.7 | 2.7 | |
| | 2.6 | | |
| 0.02 | 1.0 | 1.3 | |
| | 1.6 | | |
| <i>S. aureus</i> | 0 | 5.2 | 5.2 |
| | | 5.2 | |
| | 0.002 | 4.0 | 4.0 |
| | | 4.0 | |
| | 0.005 | 3.6 | 3.7 |
| | | 3.7 | |
| 0.01 | 3.5 | 3.4 | |
| | 3.2 | | |
| 0.02 | 3.2 | 3.2 | |
| | 3.1 | | |

* 菌数測定:トリプトソイ寒天培地(表面塗沫)

* 菌数:log of CFU/8cm²(2cm角ステンレス板使用)

* 10日間培養ステンレス使用

* 反応時間:5min

表3 *E.coli* O157:H7、*S.Enteritidis*および
S.aureus の各バイオフィルムに対する塩化ベン
ザルコニウム殺菌効果

| | 濃度(%) | 菌数 | 平均値 |
|------------------------|-------|------|------|
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 0 | 5.4 | 5.2 |
| | | 5.1 | |
| | 0.05 | ND | ND |
| | | ND | |
| | 0.1 | ND | ND |
| ND | | | |
| 1 | ND | ND | |
| | ND | | |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0 | 5.0 | 5.2 |
| | | 5.3 | |
| | 0.05 | ND | ND |
| | | ND | |
| | 0.1 | ND | ND |
| ND | | | |
| 1 | ND | ND | |
| | ND | | |
| <i>S. aureus</i> | 0 | 5.3 | 5.3 |
| | | 5.2 | |
| | 0.05 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| | 0.1 | ND | ND |
| ND | | | |
| 1 | ND | ND | |
| | ND | | |

- * 菌数測定:トリプトソイ寒天(表面塗沫)
- * 菌数:log of CFU/8cm²(2cm角ステンレス板使用)
- * 10日間培養ステンレス使用
- * 反応時間:5min
- * ND:Not detected

表4 *E. coli* O157:H7、*S. Enteritidis*および *S. aureus*の各バイオフィルムに対するアルキルジアミノエチルグリシンの殺菌効果

| | 濃度(%) | 菌数 | 平均値 |
|------------------------|-------|------|------|
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 0 | 5.8 | 5.8 |
| | | 5.7 | |
| | 0.5 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| | 1 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| 2 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |
| 4 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0 | 6.5 | 6.5 |
| | | 6.5 | |
| | 0.5 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| | 1 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| 2 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |
| 4 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |
| <i>S. aureus</i> | 0 | 6.7 | 6.5 |
| | | 6.3 | |
| | 0.5 | 1.7 | 1.9 |
| | | 2.0 | |
| | 1 | 1.0 | 1.0 |
| | | 1.0 | |
| 2 | 1.5 | 1.3 | |
| | 1.0> | | |
| 4 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |

* 菌数測定:トリプトソイ寒天(表面塗沫)

* 菌数:log of CFU/8cm²(2cm角ステンレス板使用)

* 10日間培養ステンレス使用

* 反応時間:5min

表 5 *E. coli* O157:H7、*S. Enteritidis*および*S. aureus*の各バイオフィルムに対するクロルヘキシジンの殺菌効果

| | 濃度(%) | 菌数 | 平均値 |
|------------------------|-------|------|------|
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 0 | 5.0 | 5.2 |
| | | 5.9 | |
| | 0.05 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| | 0.1 | 1.0> | 1.0> |
| 1.0> | | | |
| 1 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0 | 5.1 | 5.2 |
| | | 5.3 | |
| | 0.05 | ND | ND |
| | | ND | |
| | 0.1 | ND | ND |
| ND | | | |
| 1 | ND | ND | |
| | ND | | |
| <i>S. aureus</i> | 0 | 5.0 | 5.1 |
| | | 5.1 | |
| | 0.05 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| | 0.1 | 1.0> | 1.0> |
| 1.0> | | | |
| 1 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |

- * 菌数測定:トリプトソイ寒天(表面塗沫)
- * 菌数:log of CFU/8cm²(2cm角ステンレス板使用)
- * 10日間培養ステンレス使用
- * 反応時間:5min
- * ND:Not detected

表 6 *E. coli* O157:H7,*S. Enteritidis*および*S.a aureus*
のバイオフィルムに対するポリヘキサメチレンピグ
アナイドの殺菌効果

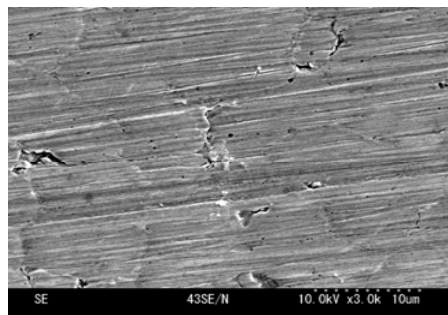
| | 濃度(%) | 菌数 | 平均値 |
|------------------------|-------|------|------|
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 0 | 5 | 5.1 |
| | | 5.2 | |
| | 0.5 | ND | ND |
| | | ND | |
| | 1 | ND | ND |
| | | ND | |
| 2 | ND | ND | |
| | ND | | |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0 | 6.2 | 6.1 |
| | | 6 | |
| | 0.5 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| | 1 | 1.0> | 1.0> |
| | | 1.0> | |
| 2 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |
| <i>S. aureus</i> | 0 | 6.2 | 6.2 |
| | | 6.2 | |
| | 0.5 | 4.8 | 4.4 |
| | | 4 | |
| | 1 | 2 | 1.9 |
| | | 1.8 | |
| 2 | 1.0> | 1.0> | |
| | 1.0> | | |

- * 菌数測定:トリプトソイ寒天(表面塗沫)
- * 菌数:log of CFU/8cm²(2cm角ステンレス板使用)
- * 10日間培養ステンレス使用
- * ND:Not detected

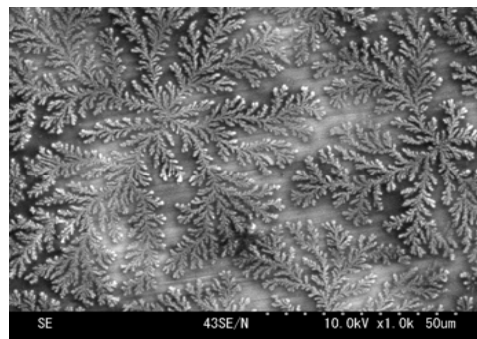
表 7 *E. coli* O157:H7、*S. Enteritidis*および*S. aureus*の各バイオフィルムに対する
強酸化電解水殺菌効果

| | <i>E. coli</i> O157:H7 | | <i>S. Enteritidis</i> | | <i>S. aureus</i> | |
|-----------|------------------------|-----|-----------------------|-----|------------------|-----|
| 強酸化電解水非曝露 | 7.0 | 7.0 | 4.9 | 4.9 | 6.9 | 7.0 |
| | 7.0 | | 4.9 | | 7.0 | |
| 強酸化電解水曝露 | ND | ND | ND | ND | 4.7 | 4.4 |
| | ND | | 4.0 | | | |

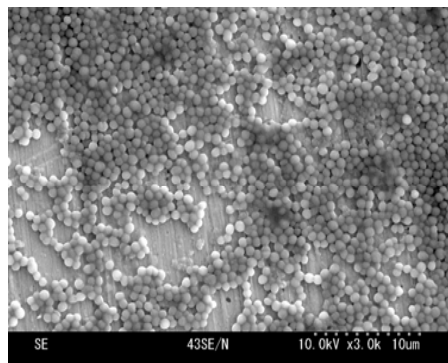
- * 菌数測定:トリプトソイ寒天培地(表面塗沫)
- * 菌数:log of CFU/8cm²(2cm角ステンレス板使用)
- * 10日間培養ステンレス使用
- * 反応時間:5min
- *強酸性水:pH2.69、塩素濃度30ppm
- *ND:Not detected



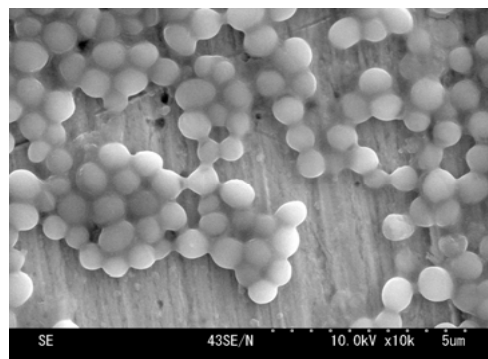
前処理ステンレス板



培地のみ浸漬



ステンレス板上の Biofilm
S.aureus ×3000 白金蒸



ステンレス板上の Biofilm
S.aureus

図 1. ステンレス板上の Biofilm *S.aureus* の走査型電子顕微鏡写真
加速電圧 10.0kV