

深紫外 LED を用いた卵殻および液卵の *Salmonella* に対する 非熱的殺菌効果

北海道大学大学院農学研究院・准教授 小関 成樹

■ 緒 言

現在、日本国内の卵は Grading and Packing (GP) センターでの温湯または次亜塩素酸ナトリウム溶液による洗卵選別工程を経て流通している。しかし、卵をお湯または次亜塩素酸ナトリウムなどの液体で濡らすことは、雑菌の卵殻内への侵入などの原因にもつながることから、濡らさない(ドライな)状態での殺菌方法が期待されている。また、液卵は 60～63°C での加熱殺菌が求められているが、加熱による品質低下を抑制した高品質な液卵を要求する食品会社も少なくない。

ドライかつ非熱的な殺菌技術として、古くから紫外線殺菌が用いられている。従来の紫外線殺菌は紫外線ランプによるもので、形状が限定され照射効率が悪いことや、設置場所が限定されること、さらには有効波長域以外の波長も少なからず発していることから照射対象物の発熱の問題、さらには水銀を使用していることから環境への影響など、課題が多い。そのため、利用用途は極めて限定的であった。しかし、Light Emitting Diode (LED) 技術の進歩によって、ここ数年で、殺菌に有効な波長 (UVC 領域、深紫外) のみを発光する LED が開発され始めている¹⁾。UVC-LED は、従来の紫外線ランプの課題を解決できる可能性を有しており、省エネ、環境に優しい、高効率な殺菌と、次世代を担う非熱的殺菌手法と言え、この先進的な技術をもって、従来克服できなかった殺菌技術の開発を検討する。

本研究では、UVC-LED の卵殻のドライ殺菌や液卵の殺菌への適用可能性を明らかにすることを目的とした。

■ 方 法

1. 供試 UVC-LED

UVC-LED (UV-EC910ZA, パナソニックフォト・ライティング株式会社製) を本研究では供試 LED として用いた。装置の外観および紫外線照射特性を図 1, 図 2 にそれぞれ示した。ピーク波長は 270 nm であり、殺菌波長として知られる 260nm より多少長波長である。UVC 照射強度は紫外線強度計 (株式会社カスタム製 UV-37SD) を用いた。本計測装置は 254nm を校正波長として照射強度を測定する。また、LED による単対照射だけではなく、LED 素子を 8 個配置した殺菌チャンバーを試作して、その特性についても検討した。

2. UVC-LED による *Salmonella* の殺菌

1) 供試細菌

過去にサルモネラ食中毒の原因となった以下の *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Stanley* (以上、大阪大学微生物病研究所より分譲), *S. Chester* および *S. Oranienburg* (青森県環境保健センターより分譲) を用いた。各菌株を個別に Tryptic soy broth (TSB) 中にて 37°C で 24 時間の培養を 3 回継代することで、一様な菌集団を獲得した。増菌培養液を遠心分離 (×3,000g, 10 分間) により菌体を沈降させた後、上澄み液を捨て滅菌蒸留水で再度分散し、供試菌液 (～10⁸CFU/ml) とした。

2) 卵殻表面上における各種 *Salmonella* の殺菌

事前に加圧加熱滅菌処理 (121°C, 15 分) を施して無菌化した鶏卵殻の表面に前述のように調製した供試菌液を菌株毎に別々に 10 μl 滴下接種した。安全キャビネット内で 40 分間乾燥させることで菌体を定着させ、*Salmonella* 汚染卵殻とした。

Salmonella 汚染卵殻に対して、UVC-LED を用いて種々の強度で紫外線照射を行い、照射前後における *Salmonella* 生菌数の変化を検討した。生菌数の確認はクラッシュ法により行った^{2,3)}。すなわち、卵殻を 30ml の TSB 中に浸漬し、滅菌ガラス棒にて 1 分間粉碎し、その上澄み液を菌懸濁液とした。本懸濁液を適宜 0.1% ペプトン水で希釈した後、Tryptic soy agar (TSA) 培地に塗抹して、37°C 24 時間培養後に発生したコロニー数を計測することで、生菌数とした。また、コロニー数が検出限界以下であった場合には、TSB に分散した上述の菌懸濁液を 37°C で 24 時間保存することで、生菌の有無

を確認した。

3) 液卵中における各種 *Salmonella* の殺菌

卵黄と卵白を溶き混ぜて均質化した全液卵(50ml)に、前述のように調製した供試菌液を菌株毎に別々に1ml接種して、*Salmonella* 汚染液卵($\sim 10^7$ CFU/ml)を調製した。この*Salmonella* 汚染液卵に対してUVC-LEDを用いてUVC照射を行った。照射方法はUVC-LEDを液卵外部から照射する方法(外部照射)と、シリコン樹脂で被覆したUVC-LEDを液卵中に浸漬して照射する方法(内部照射)の2つの方法を検討した。なお、照射強度は供試UVC-LEDの出力上限値とした。

4) 水中における各種 *Salmonella* の殺菌

滅菌蒸留水(40ml)に、前述のように調製した供試菌液を菌株毎に別々に1ml接種して、*Salmonella* 汚染水($\sim 10^7$ CFU/ml)を調製した。パイレックスガラス製のビーカ(50ml容量)に*Salmonella* 汚染水を入れ、試作した殺菌チャンバー内での照射試験を行った。照射強度は195mAの印加電流で、ガラスによる遮蔽効果を加味すると汚染水中心部では10分間の照射で、 $30\text{mW}/\text{cm}^2$ ($300\text{J}/\text{m}^2$)程度の照射を施した。

■ 結果

1) 卵殻表面上における各種 *Salmonella* の殺菌

(a) 清浄な条件下におけるUVC照射効果

蒸留水に分散した細菌液を接種した場合の卵殻上における*Salmonella*の菌数変化を検討した。照射強度 $1.0 \sim 1.2\text{mW}/\text{s}/\text{cm}^2$ (照射距離としては5mmと近接)を確保して照射時間を10秒ごとに検討した結果、いずれの菌種も10秒、すなわち $10\text{mW}/\text{cm}^2$ ($100\text{J}/\text{m}^2$)でコロニーカウントでは検出限界以下(<10)にまで生菌数が低下して、5桁以上の殺菌を達成した(図3A)。さらに、菌懸濁液を増菌培養したが、増殖は確認できなかったことから完全に死滅していたことが確認された。これらの結果から的確にUVCが照射されていれば、卵殻上に付着した*Salmonella*を極めて短時間内に、乾燥した状態で5桁以上の殺菌が可能であることが示された。

(b) 有機物(汚れ)が付着した状態におけるUVC照射効果

TSB液体培地中に分散した細菌液を直接卵殻表面に接種した場合の卵殻上における*Salmonella*の菌数変化を検討した。(a)の実験条件と同様とするために、照射強度 $1.0 \sim 1.2\text{mW}/\text{s}/\text{cm}^2$ (照射距離としては5mmと近接)を確保して照射時間を10秒毎に検討した結果、いずれの菌種も20秒以内の照射、すなわち $20\text{mW}/\text{cm}^2$ ($200\text{J}/\text{m}^2$)で初発菌数から $1.0 \sim 1.5$ 桁の菌数低下しか認められず、 $90\text{mW}/\text{cm}^2$ ($900\text{J}/\text{m}^2$)にまでUVC照射量を増大しても菌数減少は認められなかった(図3B)。

2) 液卵中における各種 *Salmonella* の殺菌

Salmonella 汚染液卵に対してUVC-LEDを用いて2つの方法でUVC照射を行った。いずれの照射方法においても、照射強度 $1.0 \sim 1.2\text{mW}/\text{s}/\text{cm}^2$ を確保して照射時間を10分、すなわち $600\text{mW}/\text{cm}^2$ ($6000\text{J}/\text{m}^2$)にまで照射量を増大しても*Salmonella*の生菌数に有意な減少は認められなかった(図4)。また、この際、液卵の外観上の変化すなわち色調の変化なども認められなかった。

3) 水中における各種 *Salmonella* の殺菌

滅菌蒸留水中に分散した*Salmonella* 汚染水に対して試作したUVC照射チャンバー内での殺菌効果を検討した。UVCの照射強度は $0.1 \sim 0.2\text{mW}/\text{s}/\text{cm}^2$ (照射距離は中心部までで40mm)を確保して5分間、すなわち $30\text{mW}/\text{cm}^2$ ($300\text{J}/\text{m}^2$)まで照射した。その結果、時間経過すなわち、積算照射量の増加に伴い死滅率は増大し、照射2分間すなわち $12\text{mW}/\text{cm}^2$ ($120\text{J}/\text{cm}^2$)で初発菌数から4桁の低下を示し、照射4分すなわち $24\text{mW}/\text{cm}^2$ ($240\text{J}/\text{m}^2$)の照射量では検出限界以下、すなわち7桁の低下を示した。さらに、増菌培養による生存確認試験でも増殖が認められず、完全に死滅させることができた(図5)。

■ 考察

UVC照射による微生物の殺菌は150年以上前から知られており、その殺菌のメカニズムも直接的にDNAを損傷することが知られている。これまでに、UVC照射による微生物の殺菌に関する膨大な研究報告がなされている。従来のUVC殺菌は、主に254nmに約86%のエネルギー出力が集中する

水銀ランプによる UVC 照射による効果の検討であった。UVC 照射による殺菌効果は *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., などをはじめとする種々の栄養細胞型の細菌, さらには各種の *Bacillus* 属細菌の芽胞に対する殺菌効果が報告されている。Coohill *et al.* (2008)⁴⁾は各種細菌の UVC 照射への感受性を過去の文献データをもとにまとめている。これによると, 栄養型細胞の細菌は 11 ~ 80J/m² の UVC 照射によって 1 桁の菌数低下が, 25 ~ 200J/m² の UVC 照射によって 4 桁の菌数低下が認められることが報告されており, UVC 照射が幅広い抗菌スペクトルを有することが確認されている。

従来の水銀ランプは安価ではあるが, その形状を自由に変えることができず, 殺菌対象物との距離を近接することが困難であったり, 照射の影になってしまう部分が生じて, 十分な殺菌効果が得られない, などといった問題点があった。また, 水銀ランプを使用することから, ランプの破損によって水銀が食品素材を汚染してしまう可能性が否定できず, 工業的には食品素材自体に直接適用することは積極的には行われてこなかった。

ところが, 近年(2011 年以降)になって LED の開発技術の向上によって, 従来困難であった UVC 領域の紫外光のみを発光する LED の開発が進み, 2014 年に日本では初めてチップ化された UVC-LED が市販されるようになった。LED 化することによって小型化だけでなく, 有害な水銀の使用を止めることができ, 食品自体への積極的な適用が可能になる。本研究では食品表面の殺菌として卵殻表面の殺菌を, 食品そのものの殺菌として液卵の殺菌を UVC-LED で実現可能かを検討した。

卵殻の表面殺菌の結果から, UVC-LED は極めて高い殺菌効果を示すことが明らかとなった。照射強度 1.0 ~ 1.2mW/s/cm² (照射距離としては 5mm と近接)を高く維持できることから, 10 秒以内の短時間の照射, 10mW/cm²(100J/m²)によって卵殻表面に付着している細菌を 5 桁以上の殺菌を達成した。このことから, UVC 照射を LED 化することで殺菌対象物と近接させることが可能となり, 極短時間で高効率な殺菌を実現できることが示唆された。殺菌効果の比較として, 現在 GP センターで実施されている次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度 200ppm)での浸漬殺菌処理を検討したが, 10 分間の浸漬処理でも 2 桁の菌数減少にとどまった。この結果は川崎ら(2007)³⁾の結果と同様であったことから, UVC-LED による UVC 照射が高い殺菌効果を発揮することが示された。

しかし, 一方で UVC 照射そのものの限界も明らかとなった。卵殻表面に細菌を付着させる際に TSB を分散媒として付着させた場合, UVC による殺菌効果は 1 ~ 1.5 桁の菌数減少に留まった。この原因は, 卵殻表面に TSB 成分が乾燥して固着してしまい, その固着物質内部に存在する細菌にまで UVC が到達しなかったことが原因であると考えられる。すなわち, 汚れなどによって細菌がその内部で UVC 照射から保護されてしまうものと考えられる。したがって, UVC 照射の効果を実確なものにするためには, 有機物等の汚れを予め除去しておく必要があることが, 本研究結果からも示された。菌株間の違いは認められなかった。

UVC 照射による液卵に対する殺菌効果は照射方法によらず, 全く認められなかった。この原因として, UVC 領域の紫外線がタンパク質に吸収されてしまうことが一つ考えられる。すなわち, 生化学分野におけるタンパク質の定量に 280nm における吸光度を利用する方法が一般的に用いられている⁵⁾ことから推察できるように, UVC 領域の紫外線はタンパク質に吸収されてしまうことから, 液卵においても紫外線が吸収されてしまい, 細菌にまで紫外線が到達しなかったものと考えられる。また, 液卵自体が懸濁液であることから, 紫外線の透過が困難であったことも殺菌がなされなかった要因として考えられる。したがって, UVC 照射によって液卵中の細菌を殺菌することは困難であることが明らかとなった。

一方, 蒸留水中に分散させた細菌液は UVC 照射がパイレックスガラス製のビーカで阻害されているにもかかわらず, 完全に死滅に至った。照射強度も低く抑えられていることから, 卵殻表面における殺菌効果ほど迅速な殺菌はなされなかったが, 5 分間の照射で 7 桁以上の菌数低下, さらには完全に死滅させることが可能であった。このことから, 紫外線照射強度が低くても, 確実に細菌細胞に UVC が到達していれば殺菌が可能であることが示唆された。微弱な照射でも長時間連続することで, 環境によっては十分な殺菌効果を得られることが示唆された。

■ 要 約

UVC 照射のための新たな手法として, UVC-LED の利用可能性について種々検討した結果, 以下の 4 点を明らかにした。

- ・卵殻表面における *Salmonella* の殺菌は, 照射強度 1.0 ~ 1.2mW/s/cm² (照射距離としては 5mm と近接)を確保することで, いずれの菌種も 10 秒, すなわち 10mW/cm²(100J/m²)で 5 桁以上の殺

菌を達成できる。

- ・卵殻表面に汚れ等の有機成分と細菌が共存した場合には、UVC照射による殺菌効果は著しく減少する。
- ・UVC照射による液卵中の *Salmonella* の殺菌はできない。
- ・水中であれば、微弱なUVC照射でも水中の *Salmonella* を十分に殺菌することが可能

以上の点を考慮し、さらにはUVC-LEDの小型化という特徴を活かして、卵殻のみならず各種食品表面の殺菌を効率的に実施可能であることが示された。

■ 文 献

1. Hirayama, H., Tsukada, Y., Maeda, T., Kamata, N.(2010)Marked Enhancement in the Efficiency of Deep-Ultraviolet AlGaIn Light-Emitting Diodes by Using a Multi-quantum-Barrier Electron Blocking Layer. Appl. Phys. Express. 3, 031002.
2. Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K., Harrison, M.A., Cox, N.A., Ingram, K.D., A J Hinton, J.(2005)Recovery of Salmonella from commercial shell eggs by shell rinse and shell crush methodologies. Poultry Sci. 84, 1955-1958.
3. Kawasaki, T., Murata, M., Tominaga, N., Kawamoto, S.(2007)Evaluation of Crush Method for Salmonella Recovery from the Inoculated Egg Shell Sanitized with Sodium Hypochlorite. Jpn. J. Food Microbiol. 24, 171-177.
4. Coohill, T.P., Sagripanti, J.L.(2008)Overview of the Inactivation by 254 nm Ultraviolet Radiation of Bacteria with Particular Relevance to Biodefense. Photochemistry and Photobiology. 84, 1084-1090.
5. Whitaker, J.R., Granum, P.E.(1980)An Absolute Method for Protein Determination Based on Difference in Absorbance at 235 and 280 nm. Analytical Biochemistry. 109, 156-159.

	部品名	材質
①	ガラス	ガラス
②	カバー	ステンレス
③	フランジ	アルミニウム
④	基板	アルミニウム
⑤	コネクタ	耐熱性樹脂
⑥	電極	ニッケル+金メッキ

【部品名称・材質】

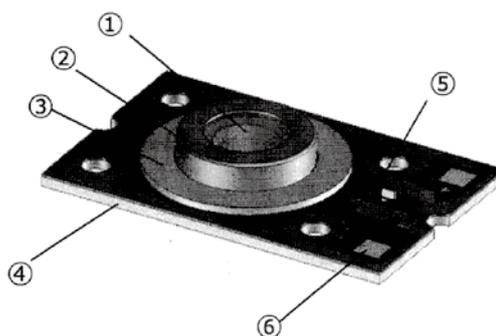


図1 UVC-LEDの概要

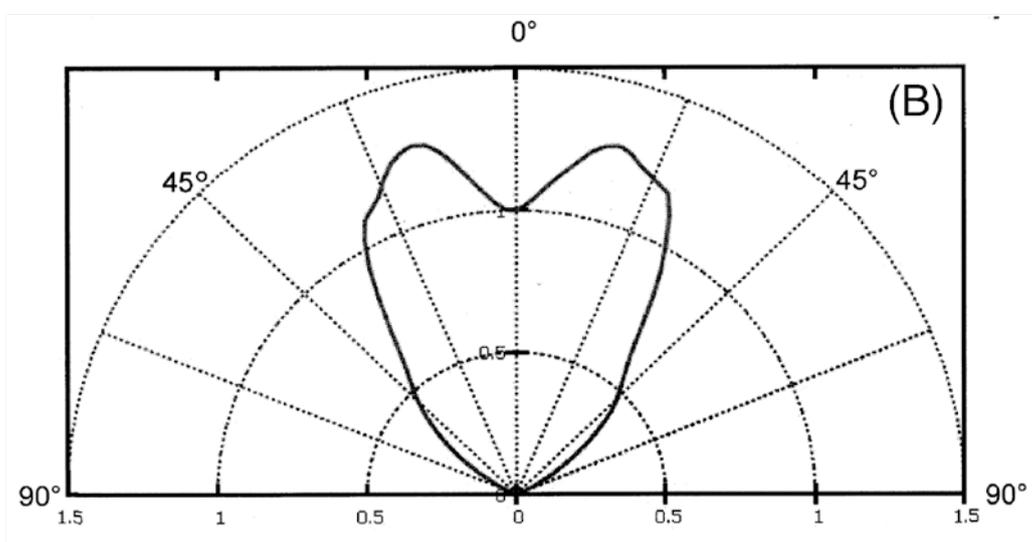
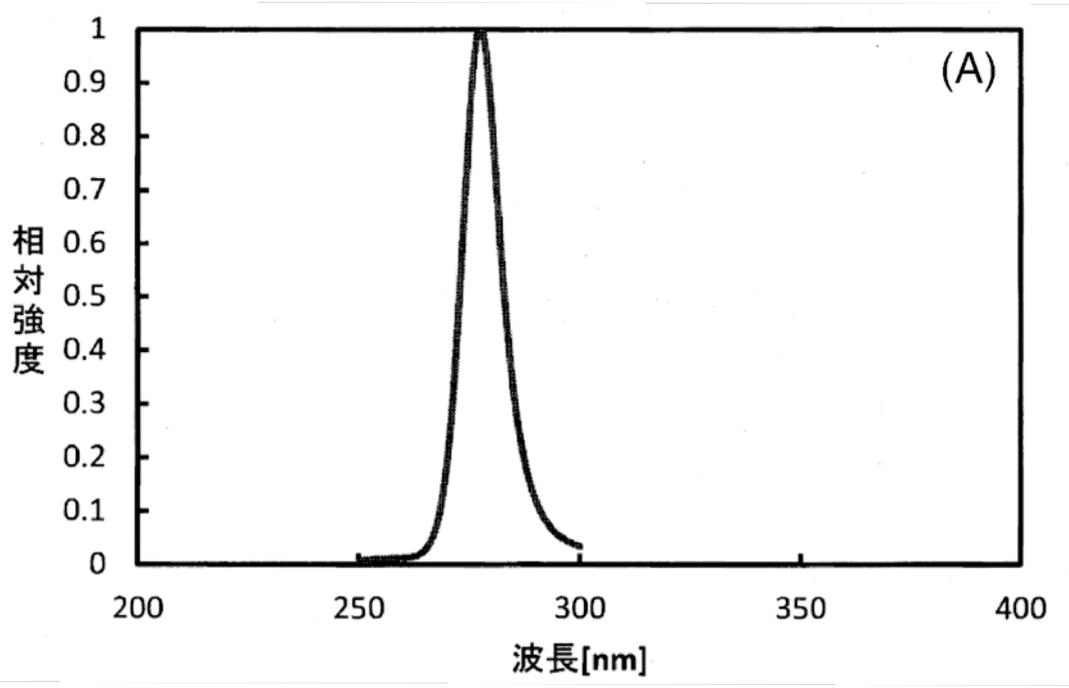


図2 UVC-LEDの基本特性 (A) 波長スペクトル (B) 配光曲線

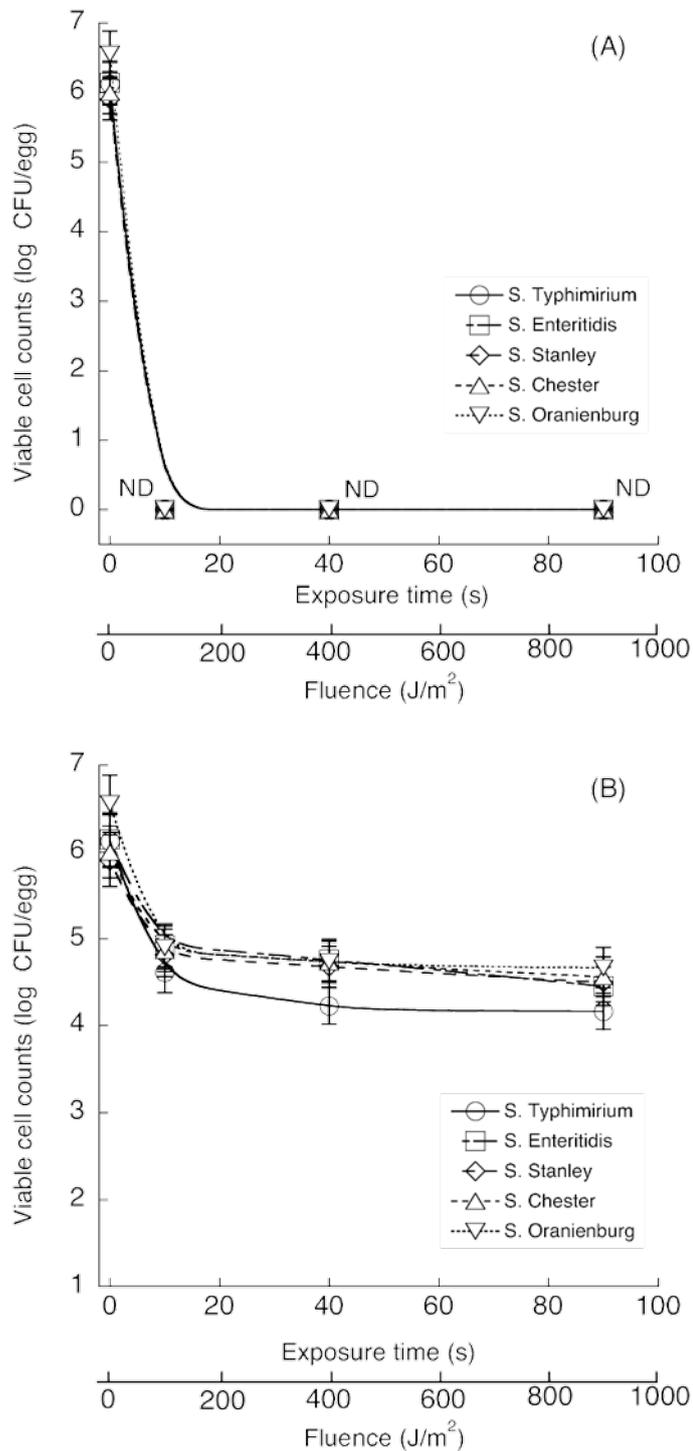


図3 卵殻表面における UVC 照射による *Salmonella* の殺菌効果の比較
 (A) 汚れなし、蒸留水による接種 (B) 汚れあり、TSB による接種
 ND : Not detected (< 30 CFU/egg)

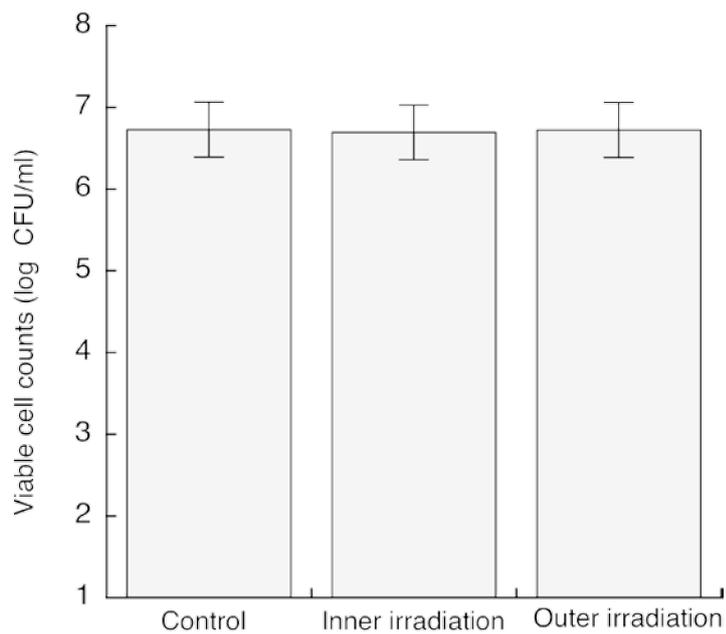


図4 UVC 照射による液卵中の *Salmonella* の殺菌効果

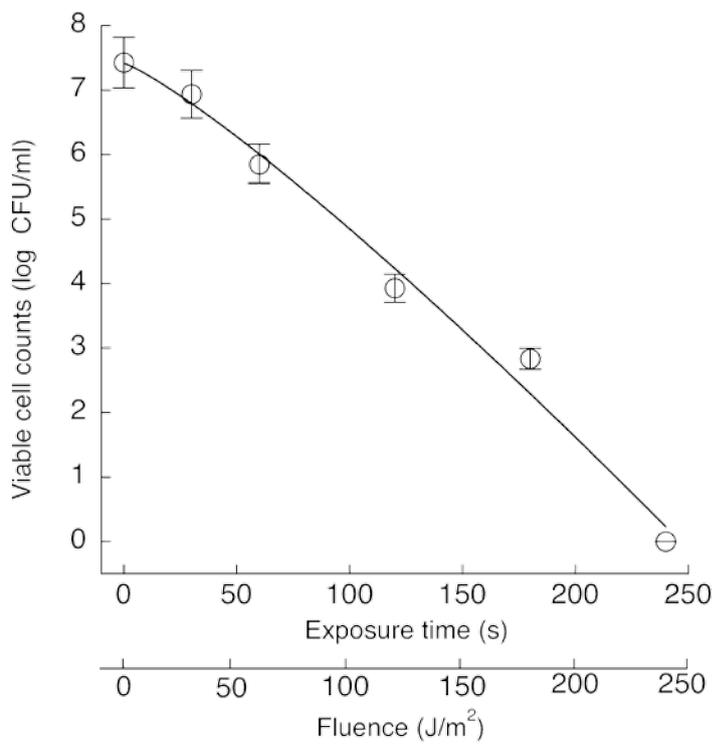


図5 UVC 照射による蒸留水中の *Salmonella* の殺菌効果