

＝短 報＝

## ニューカッスル病ウイルス (NDV) の卵黄中加熱処理による不活化とマヨネーズにおける生残性

指原 信廣<sup>\*1,†</sup>・長谷川 峯夫<sup>\*1</sup>・井土 俊郎<sup>\*2</sup>

伊藤 啓史<sup>\*3,4</sup>・伊藤 壽啓<sup>\*3,4</sup>

(<sup>\*1</sup> キューピー株式会社研究所, <sup>\*2</sup> (財)日本生物科学研究所, <sup>\*3</sup> 鳥取大学農学部付属  
鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター, <sup>\*4</sup> 鳥取大学農学部獣医公衆衛生学教室)

(受付: 平成 19 年 8 月 27 日)

(受理: 平成 19 年 12 月 7 日)

## Heat Inactivation of Newcastle Disease Virus (NDV) in Egg Yolk and Its Survivability in Mayonnaise

Nobuhiro SASHIHARA<sup>\*1</sup>, Mineo HASEGAWA<sup>\*1</sup>, Toshiro IZUCHI<sup>\*2</sup>,

Hiroshi ITO<sup>\*3,4</sup> and Toshihiro ITO<sup>\*3,4</sup>

(<sup>\*1</sup>R & D Division, Q. P. Corporation, 5-13-1 Sumiyoshi-cho, Fuchu, Tokyo 183-0034;

† Corresponding author)

(<sup>\*2</sup>Nippon Institute for Biological Science, 9-2221-1 Shin-machi, Ome, Tokyo 198-0024)

(<sup>\*3</sup>Avian Zoonosis Research Center, <sup>\*4</sup>Department of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture,  
Tottori University, 4-101 Minami, Koyama-cho, Tottori 680-8553)

From the perspective of food safety and risk, we attempted to determine survivability of Newcastle Disease Virus (NDV) in egg products. We investigated the heat inactivation of NDV in egg yolk, and also the inactivation of NDV in mayonnaise. The egg yolks used in this study were SPF-(Specific Pathogen Free)-egg yolk and a typical commercially available type. SPF-egg was derived from un-vaccinated hens. Two types of model mayonnaise were made of salad oil, vinegar, egg yolk and salt, similar to commercial products, using either commercial-egg yolk or SPF-yolk. The NDV strain used in this experiment was the B1/47 (vaccine strain). NDV in commercial egg yolk was inactivated immediately. After model mayonnaise and NDV were mixed, NDV in mayonnaise with commercial egg yolk was inactivated after one day. However, with the SPF-egg yolk, it took 5 days for the virus titre to drop below the detection limit. These findings suggest that NDV in commercial egg yolk may be rapidly inactivated, in part because of antibodies derived from the vaccination of hens against NDV. In addition, these findings suggest that mayonnaise is not a vehicle for the import and export of NDV.

**Key words:** Newcastle disease virus, Inactivation, Mayonnaise

### 緒 言

家禽に対して疾病を引き起こす原因ウイルスとして鳥インフルエンザウイルス (AIV) 以外にニューカッスル

病ウイルス (NDV) がよく知られている。NDV はパラミキソウイルス科に属し、鶏に対し重篤な疾病を引き起こすことがあり、その高死亡率や、強い伝染性によって、養鶏事業者にたいへん恐れられている。

ウイルス粒子構造からみると、NDV の外被は脂質二重膜と糖蛋白質の突起などから構成され、赤血球凝集活性および溶血性をもっていることが知られている<sup>1)</sup>。NDV にはその病原性から家禽類、特に鶏に対しては高

† 連絡先

\*1 ☎183-0034 東京都府中市住吉町 5-13-1

\*2 ☎198-0024 東京都青梅市新町 9 丁目 2221-1

\*3, \*4 ☎680-8553 鳥取県鳥取市湖山町南 4-101

死亡率を示す強毒株,あるいは産卵率の低下,呼吸器症状などを示す中等毒株の存在が知られている。一方,本ウイルスのヒトへの病原性は軽微であり,高濃度で感染した場合,結膜炎を起こすことが知られている<sup>1)</sup>。

わが国では,ニューカッスル病は家畜の法定伝染病に指定されており,本病が発生した場合,鶏群への疾病の蔓延を防止するために全数淘汰される。わが国ではニューカッスル病予防の目的でほとんど全羽数がワクチンを接種されているが,まれには不適切なワクチン接種により,本病が発生することがある。

NDVの発生がない国では,鶏肉および鶏卵製品を輸入する場合,国内に病原体を持ち込まないようにすることが重要である。鶏卵製品であるマヨネーズやほかの鶏卵加工品も,輸出入の際には鶏病ウイルスによる汚染の可能性が問題にされる場合がある。

市販のマヨネーズの製造工程では,厚生労働省によって定められた殺菌液卵の製造基準(卵黄は連続式で61°C×3.5分)を満たす殺菌卵黄が使用される。筆者らはAIVに関しては,マヨネーズ中では30分以内に不活化すること<sup>2)</sup>,卵黄中では60°C達温で不活化することを報告した<sup>3)</sup>。NDVの加熱による生残性に関して,DiGioiaらは60°Cでは5分以内に赤血球凝集活性を失い,10分以内に感染性を失うと報告している<sup>4)</sup>。Kingは60°Cでは30分以内に感染性を失うと報告している<sup>5)</sup>。Swayneらは,全卵中では57°C,59°CのD値(所定の温度で処理した場合に90%死滅させるのに必要な時間)はそれぞれ88.3~228秒,22.4~96.3秒であったと述べている<sup>6)</sup>。

筆者らはマヨネーズの原料である卵黄液中のNDVの挙動についてのデータが見られないことから,卵黄液中での加熱によるNDVの不活化およびマヨネーズ中でのNDVの挙動を調べた。

## 材料および方法

### 1. 供試ウイルス株

添加に用いたウイルス株は,NDV B1/47株(ワクチン作製用弱毒株)である。本ウイルスは(財)日本生物科学研究所および鳥取大学農学部獣医公衆衛生学教室で保有されている株である。

### 2. 供試卵黄液

**通常卵黄液:**市販の殻付鶏卵を無菌的に割卵し,卵黄部のみを集め均質化して調製した。

**SPF-卵黄液:**NDV予防ワクチンを未接種の産卵鶏が産卵した殻付卵(SPF)を無菌的に割卵し,卵黄部のみを集め均質化して調製した。

### 3. 供試マヨネーズ

モデルマヨネーズとして基本配合率,植物油70%,卵黄15%,醸造酢12%,調味料3%からなる卵黄タイプマヨネーズ(pH4.1)を作製し,それを実験に供した。なお%はそれぞれ重量比(w/w)で表した。

使用した卵黄液の違いにより市販の殻付卵から調製した卵黄液を使用した通常マヨネーズと,SPF-卵黄液を使用して調製したSPF-マヨネーズを用いた。

卵黄タイプマヨネーズはそのままでは粘度が高いため,滅菌生理食塩水で2倍に希釈し(以下マヨネーズ2倍希釈原液),ウイルス添加試験を行った。

### 4. 感染価測定

感染価測定には10日齢SPF発育鶏卵を使用した。試料の10倍段階希釈液を10日齢発育鶏卵の漿尿膜腔に0.1mlずつ接種した。試料接種発育鶏卵は38°C,2日間培養した後,赤血球凝集(HA)試験により漿尿膜腔でのウイルス増殖の有無を確認し,試料中のウイルス力価をReed and Muenchの方法により算出した<sup>7)</sup>。

### 5. 60°Cの卵黄液中でのNDVの耐熱性

あらかじめ5mlのウイルス液( $10^7$  EID<sub>50</sub>/ml)と45mlの卵黄液をガラス製滅菌ピーカーに採り,湯温を63°Cに保持した恒温水槽に浸漬した。10分30秒後に卵黄液の温度が60°Cに達温した。達温後経時的にサンプリングをして,生残ウイルス量を測定した。25°C保存区を対照区とした。

### 6. マヨネーズ中におけるNDVの生残性試験

マヨネーズ2倍希釈原液45mlを50ml容滅菌遠心管に入れ,NDV液( $10^7$  EID<sub>50</sub>/ml)5mlを加えて,マヨネーズ-NDV混合液(以下試料とする)が均質化するまで(約1分間)よく攪拌混和した。

試料が均質化された時点を0日として,試料の一部を採取し,速やかに10倍段階希釈を行い感染価の測定を行った。原液から $10^{-7}$ までの10倍段階希釈液を4~5個ずつの10日齢発育鶏卵の漿尿膜腔に0.1mlずつ接種した。

試料を室温(25°C)に静置し,添加直後から7日目まで同様の操作を行った。市販マヨネーズのNDVについては0日目および1日目の試験結果から3日目以降の接種は行わなかった。

なお,試験に先立ち,あらかじめマヨネーズ2倍希釈原液接種による発育鶏卵の生死に及ぼす影響を確認した。その結果,発育鶏卵の死亡は見られず,感染価が正確に測定できることが確認された。

## 結果と考察

### 1. 卵黄中での耐熱性

対照区(通常卵黄液,25°C)では,通常の卵黄液中ではウイルス添加直後から,感染性NDVは検出されなかった(データ記載せず)。一方,SPF卵黄中では感染性NDVは検出された(表1)。これは通常卵黄中にはワクチン接種を原因とする移行抗体が含まれることから,この移行抗体による中和によって感染性ウイルスが検出されなかったものと考えられる。加温実験(通常卵黄液,60°C)でも同様であった。SPF卵黄でのウイルスの挙動を見ると,10分30秒後,60°Cに達した時点でNDVは

Table 1. Heat inactivation of NDV in SPF-egg yolk

SPF-egg yolk									
Holding time (min)	The number of positive eggs/the number of eggs examined								EID <sub>50</sub> /0.1 ml (Log)
	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
at 60°C									
0	5/5	3/5	0/5	0/5	0/4	0/5	0/5	0/4	1.17
3	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	≤ -0.17
6	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/4	0/5	0/5	0.17
9	4/5	3/5	0/5	0/5	0/4	0/5	0/5		1.00
12	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			≤ -0.5
at 25°C									
12	—	—	5/5	5/5	5/5	5/5	3/4	0/5	6.25

\*: EID<sub>50</sub>/0.1 ml (50% Egg Infectious Dose/0.1 ml)

Table 2. Survival of NDV in mayonnaise made from SPF- or commercial-egg yolk

SPF-egg yolk									
Storage time at 25°C (day)	The number of positive eggs/the number of eggs examined								EID <sub>50</sub> /0.1 ml (Log)
	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4	0/4	0/4	5.5
1	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5		4.38
2	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5			2.68
3	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5				1.38
4	2/5	1/5	1/5	0/5					0.2
5	0/5	0/5	0/5	0/5					≤ -0.5
6	0/5	0/5							≤ -0.5
7	0/5	0/5							≤ -0.5
Commercial-egg yolk									
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/4	0/4	0/4	5.0
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		≤ -0.5
2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4			≤ -0.5

\*: EID<sub>50</sub>/0.1 ml (50% Egg Infectious Dose/0.1 ml)

若干活性を残し、達温して9分後には活性は残存したが、12分後には不活化されることがわかった(表1)。AIVが卵黄中では60°C達温で不活化する<sup>3)</sup>の<sup>3)</sup>に比べ、耐熱性があると考えられる。しかしながら、通常の市販鶏卵では上述のように移行抗体の影響でウイルスの残存の可能性は低いと思われる。

## 2. マヨネーズ中での生残性

マヨネーズには卵黄を使用する卵黄タイプのもものと全卵を使用する全卵タイプがある。本実験では卵黄タイプマヨネーズをモデルマヨネーズとして、供試マヨネーズの2倍希釈原液にNDVを添加して25°Cで保存し、経日的に感染価の測定を行い、NDVの生残性を調べた(表2)。

その結果、NDVはSPF-卵黄のマヨネーズでは10<sup>5.5</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 ml添加ウイルス量が翌日から対数的に減少し、1日当たり約16分の1に減少した。5日後に検出限界以下になった。通常の市販卵黄を用いたマヨネーズでは添加直後に急激に不活化し、翌日には検出限界以下になった。市販の鶏卵卵黄液では免疫鶏の卵黄中に含まれるNDVに対する移行抗体の影響を受けたものと考えられる。

仮に市販のマヨネーズの製造工程中にNDVが迷入したとしても、鶏卵の移行抗体による不活化(中和)が期待できるが、移行抗体がない場合でも5日後には不活化することがわかった。AIVがマヨネーズに迷入した場合は添加後30分で不活化されることがわかっている<sup>2)</sup>が、NDVのほうが若干の耐性はあるというものの、5日で不活化する。通常の市販マヨネーズでは移行抗体をもった鶏卵を使用し、しかも熟成期間として1週間程度工場や集荷場で保管されるため、本ウイルスの残存の恐れは極めて低いことが示唆される。

多くの細菌についてはマヨネーズ中で死滅していくことが知られている。栗原らは市販マヨネーズ中では、10<sup>5</sup>/g添加された *Salmonella* Enteritidisが30°C 1日で10/g以下に減少し<sup>8)</sup>、その菌数減少効果は、マヨネーズ中の植物性油脂、酢酸、食塩濃度によるものと考えられている。

細菌の場合と同様に、ウイルスが減少する要因は、本製品の化学的性状、例えば食塩濃度、酸度あるいはpH等がウイルスに直接作用したと考えられる。あるいは、卵黄タイプのマヨネーズが水中油滴型の乳化状態であるため、ウイルス粒子の脂質二重膜からなるエンベロープ

が乳化状態の油部分で破壊され、ウイルスが不活化する可能性も推察される。

以上のことから、マヨネーズは AIV の場合と同様に<sup>2)</sup> NDV の迷入があったとしても、速やかに不活化することがわかった。マヨネーズはヒトに感染する家禽由来のウイルスとして代表的な AIV および NDV に対して、安全かつ安心できる食品であることが強く示唆された。

## 文 献

- 1) 植竹久雄：パラミキソウイルス科. ウイルス学第 4 版. 植竹久雄編, p. 341-374, 理工学社, 東京 (1992).
- 2) 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. *Jpn. J. Food Microbiol.*, **21**(3), 213-215 (2004).
- 3) 伊藤壽啓, 伊藤啓史, 大槻公一, 指原信廣, 長谷川峯夫: 加熱した卵黄内における鳥インフルエンザウイルスの生残性. *食品衛生研究*, **54**(7), 21-24 (2004).
- 4) DiGioia, G. A., Licciardello, J. J., Nickerson, J. T. R. and Goldblith, S. A.: Thermal inactivation of Newcastle Disease Virus. *Appl. Microbiol.*, **19**(3), 451-454 (1970).
- 5) King, D. J.: Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle Disease Virus and Avian Influenza Virus in egg fluids and serum. *Avian Diseases*, **35**, 505-514 (1991).
- 6) Swayne, D. E. and Beck, J. R.: Heat inactivation of avian influenza and Newcastle disease viruses in egg products. *Avian Pathology*, **33**(5), 512-518 (2004).
- 7) Reed, L. J. and Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493-497 (1938).
- 8) 栗原健志, 水谷 宏, 野村裕子, 武田典子, 今井忠平: 自家製マヨネーズおよびサラダ中における *Salmonella* Enteritidis の消長. *Jpn. J. Food Microbiol.*, **11**, 35-41 (1994).