＝短 報＝

バイダスを用いたサルモネラ迅速検出の検討 第二報 新たな選択増菌法の検討

仲里 尚子^{*1,†}・屋比久善昭^{*1}・上間 優子^{*1}・福村 圭介^{*1}
内田 和之^{*2}・澤口 勸^{*2}・中川 弘^{*3}

(^{*1} (財)沖縄県環境科学センター, ^{*2} 日本バイオメリー株式会社,

^{*3} 株式会社 BML フード・サイエンス)

(受付: 平成 19 年 6 月 1 日)

(受理: 平成 19 年 9 月 19 日)

Study of Simple and Rapid Detection of *Salmonella* spp. Using VIDAS

Second Report; The New Protocol with Unique Enrichment Broth

Naoko NAKAZATO^{*1,†}, Yoshiaki YABIKU^{*1}, Yuko UEMA^{*1},
Keisuke FUKUMURA^{*1}, Kazuyuki UCHIDA^{*2},
Susumu SAWAGUCHI^{*2} and Hiroshi NAKAGAWA^{*3}

(^{*1} Okinawa Environmental Research & Technology Center, 720 Kyoduka, Urasoe,
Okinawa 901-2111; [†] Corresponding author)

(^{*2} bioMerieux Japan Ltd., 2-12-28 Kita-Aoyama, Minato-ku, Tokyo 107-0061)

(^{*3} BML Food Science Solutions, Inc., 2-51-13 Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-0014)

In our previous report, we evaluated and reported some VIDAS protocols for the detection of *Salmonella*. In this report, we evaluated the new additional protocol “Easy SLM” with “SX broth”, a new unique enrichment broth. This method needs about 2 days to complete the total protocol, 1-2 days less than the conventional culture method. We tested 77 food samples with and without artificial inoculation with *Salmonella* strains. The positive rate for each method of testing food samples with and without artificial inoculation of *Salmonella* strains were almost the same, and as a result, the sensitivity and specificity of the Easy SLM protocol and the conventional culture method were equal. Therefore, the Easy SLM protocol is useful for routine quality control for the detection of *Salmonella* because of its rapidity, ease of handling and automation for standardization.

Key words: *Salmonella*, mini VIDAS, Easy SLM

緒 言

現在、食品からのサルモネラの分離、同定には、損傷菌の回復を考慮して前増菌培養を行った後に選択増菌培養し、分離平板培地に画線塗抹して出現した集落について

確認試験を行う方法が採用されているが、結果が確定するまでに 5 日間程度を要する。そのため、増菌、分離、同定の各段階で迅速かつ簡便な検出法として、免疫学的検査法（免疫拡散法、酵素抗体法、イムノクロマト法、免疫磁気ビーズ法）、遺伝学的検査法（DNA プローブ法、PCR 法）、自動機器による方法等が開発、実用化されている^{2~7,10)}。自動免疫測定装置バイダスは、AOAC や AFNOR から承認され、国内外で広く用いられており、その研究報告も多い^{4,5,8,9)}。

[†] 連絡先

^{*1} ☎901-2111 沖縄県浦添市経塚 720 番地

^{*2} ☎107-0061 東京都港区北青山 2-18-28

^{*3} ☎171-0014 東京都豊島区池袋 2-51-13

中川らは本学会誌〔日食微誌, 23(3), 156-164 (2006)〕において、本機器を用いた食品からのサルモネラの簡易迅速検出法のうち、感度、特異性ともに最も優れていた方法が2種類の選択増菌培地を使用する VIDAS SLM: AFNOR 承認法であることを報告した^{5,8)}。しかし、本法は培地を多く使用し操作が煩雑であることから、その方法をより簡便にすることを目的に、新たな選択増菌培地を用いたプロトコルである Easy SLM 法が開発されている。Easy SLM 法は既に AFNOR での承認を受け⁹⁾ 有用性が確認された方法であるが、その評価には比較対照法として ISO 法¹⁾ が用いられている。本研究では、Easy SLM 法を日本国内で広く使用されている公定法と比較検討を行った。

材料および方法

1. 使用機器

測定機器は日本ビオメリュー(株)の自動免疫測定装置「ミニバイダス」を用い、専用試薬は同社のバイダスアッセイキットサルモネラ (VIDAS SLM) を使用した。

2. 供試菌株

試験には *Salmonella* Enteritidis IFO 3313 (以下 SE) および *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (以下 ST) を用いた。

3. 供試材料

供試材料は市販の生肉類(鶏肉, 豚肉, 牛肉, 豚レバー, 豚ハツ), 肉加工品(ハム, ベーコン, ローストビーフ), 冷凍食品(ミックスベジタブル, フレンチフライポテト, ホウレンソウ, コロッケ), カット野菜, 卵加工品(洋菓子, ポテトサラダ)など, 合計 77 検体を用いた。

4. 供試材料の細菌数測定

供試材料の汚染の度合いを確認するため、一般生菌数および大腸菌群数を測定した。供試材料 25 g を滅菌ストマッカー袋に採取し、これに滅菌リン酸緩衝液 225 ml を加えて 30 秒間ストマッカーを用いて粉碎し、必要に応じて 10 倍段階希釈した試料液を調製し、シャーレ 2 枚に 1 ml ずつ分注した。一般生菌数は標準寒天培地(栄研化学(株))で混釈して、35℃ で 48 時間培養後、大腸菌群はデソキシコレート寒天培地(栄研化学(株))で混釈後重層し、35℃ で 20 時間培養した後、出現した集落数から菌数を測定した。

5. 接種菌液の調製

SE および ST を 10 ml のトリプトソイブロス (TSB, Becton, Dickinson and Company) に 1 白金耳接種し、35℃ で 24 時間培養した後、 $10^0 \sim 10^2$ cfu/100 μ l になるように菌液を調製した。

接種菌液の菌数は、調製した菌液をトリプトソイ寒天培地 (TSA, 日本ビオメリュー(株)) 10 枚にそれぞれ 100 μ l ずつ表面塗抹し、35℃ で 24 時間培養した後、出現した集落数を計数し算出した。

6. 試料の調製および菌液の接種

供試材料 25 g を、検体 1 種類につき 3 件、それぞれ滅菌ストマッカー袋に無菌的に採取し、うち 2 件には SE または ST の調製菌液をそれぞれ 100 μ l 接種した。残り 1 件はサルモネラ未接種で試験に供した。

7. サルモネラの検出法

7-1 Easy SLM 法

検体を 25 g 採取し、滅菌ペプトン緩衝液 (BPW, 栄研化学株式会社) 225 ml を加え、30 秒間粉碎した後、35℃ で 24 時間培養した。この培養液 0.1 ml を SX ブイヨン (*Salmonella* Xpress ブイヨン, 日本ビオメリュー(株)) 10 ml に接種し、42℃ で 24 時間培養した後、その 1 ml を採取して 100℃ で 15 分間熱処理した 0.5 ml を VIDAS SLM のキットに含まれる試薬ストリップ中のサンプルウェルに分注し、ミニバイダスで測定した (Fig. 1)。SX ブイヨンは種々のペプトン、緩衝剤、選択剤を含み、サルモネラの増殖およびその後の VIDAS による検出を効果的に行う目的で開発された培地である。

7-2 公定法

検体を 25 g 採取し、BPW 225 ml を加え、30 秒間粉碎した後、35℃ で 24 時間培養した。この培養液 1.5 ml をハーナーテトラチオネートブイヨン (HTT, 栄研化学(株)) 15 ml に接種し、42℃ で 24 時間培養した後、その 1 白金耳を DHL 寒天培地 (DHL, 栄研化学(株)) および SMID2 寒天培地 (SMID2, 日本ビオメリュー(株)) に画線塗抹し、35℃ で 24 時間培養した。サルモネラ未接種試験で出現したサルモネラが疑われる集落は、TSI 培地 (栄研化学(株)) および LIM 培地 (栄研化学(株)) の確認培地に接種し、35℃ で 24 時間培養した。これらの確認培地でサルモネラの性状を示した場合は、O 多価血清 (デンカ生研) で凝集試験を行い、凝集が見られた

Fig. 1. Two methods examined in this study.

Table 1. Comparison of the conventional and VIDAS Easy SLM methods for detection of *Salmonella* from food samples

	Not spiked with <i>Salmonella</i>		Spiked with SE*		Spiked with ST**	
	Conventional culture method	VIDAS Easy SLM	Conventional culture method	VIDAS Easy SLM	Conventional culture method	VIDAS Easy SLM
Number of tests	77	77	77	77	77	77
Number of positive tests	6	7	57	62	76	70
Positive rate	7.8%	9.1%	74.0%	80.5%	98.7%	90.9%
Accordance with conventional culture method (number of tests)	—	76	—	67	—	66
Accordance rate with conventional culture method	—	98.7%	—	87.0%	—	85.7%

* SE: *Salmonella* Enteritidis.** ST: *Salmonella* Typhimurium.

ものについてサルモネラ陽性とした。また、SE および ST を接種した供試材料については、DHL および SMID 2 の分離培地上に出現したサルモネラが疑われる集落について、SE を接種したものについては O 多価血清で、ST を接種したものについては O4 血清 (デンカ生研) で凝集試験を行い、凝集が認められたものについてサルモネラ陽性とした (Fig. 1)。

結 果

1. 接種試験におけるサルモネラの検出

Table 1 に、サルモネラ未接種検体と SE および ST

接種検体からのサルモネラの検出状況を示す。

供試材料 77 検体からのサルモネラの検出数は、公定法では 6 検体、Easy SLM 法では 7 検体であり、公定法

Table 2. Paired results of the conventional and VIDAS Easy SLM methods

		Conventional culture method	
		Positive	Negative
VIDAS	Positive	130	9
Easy SLM	Negative	9	83

Fig. 2. Comparison of microbiological flora and positivity rate (spiked with SE).

Fig. 3. Comparison of microbiological flora and positivity rate (spiked with ST).

との一致率は 98.7% であった。

接種品からのサルモネラの検出率は、SE の場合は公定法で 74.0%, Easy SLM 法で 80.5% であり、公定法との一致率は 87.0% であった。一方、ST の場合は公定法で 98.7%, Easy SLM 法で 90.9% が検出され、公定法との一致率は 85.7% であった。サルモネラを接種した 154 試験品における検出率は、公定法では 86.4%, Easy SLM 法では 85.7% となり、ほぼ同等の結果が得られた。

今回の全試験における公定法と Easy SLM 法での各測定結果について、両法間での一致度合いを Table 2 に示す。Easy SLM 法で陽性、公定法で陰性を示した検体数は 9 件、その逆で、公定法で陽性、Easy SLM 法で陰性を示した検体数も 9 件であった。

2. 自然汚染菌量と陽性率との比較

供試材料の一般生菌数および大腸菌群数と SE, ST の陽性率を比較したグラフを Fig. 2 および Fig. 3 に示した。SE は、公定法では一般生菌数が 10⁵ cfu/g 以上では陽性率が 42% であるのに対し、Easy SLM では 54% であった。大腸菌群数で比較すると、公定法では、10³ cfu/g 以下において陽性率が 88% であるのに対して、Easy SLM では 93% であった。10³ cfu/g 以上での検出は、公定法での陽性率は 28%, Easy SLM の場合は 39% であり、Easy SLM 法の方が高い結果であった。一方、ST では、一般生菌数が 10⁵ cfu/g 以上では、

公定法の陽性率は 96%, Easy SLM 法の陽性率は 80% であった。大腸菌群数での比較では、10³ cfu/g 以上での検出は、公定法での陽性率は 94%, Easy SLM の場合は 67% であり、公定法が高い結果であった。一般生菌および大腸菌群ともに汚染度が高い場合は、公定法、Easy SLM 法共に検出率が低下する傾向が認められた。

考 察

Easy SLM 法の有用性について公定法と比較検討を行った結果、検出率についてはほぼ同等の結果が得られた。公定法と Easy SLM 法の測定結果の一致度合いにおいては、両方法間で測定結果が異なる検体数は同じとなり、同等の結果が得られた。359 検体を用いて実施された Easy SLM の AFNOR での評価においては、Easy SLM 法と比較の対照に用いられた ISO 法とで測定結果が異なる検体数は、近似した値となっており⁹⁾、本研究においても同等の結果が得られたと考えられる。AFNOR での評価で比較対照法として用いられた ISO 法と本研究で用いた公定法では、使用する培地や培養条件が異なるが、Easy SLM 法が平板培養法に対して広く相関性を有していることを示唆するものと考えられる。人為的に接種したにもかかわらずサルモネラが検出されなかった検体が認められた。公定法のみで検出できた食材には鶏砂肝、豚レバーなどがあり、逆に Easy SLM 法のみで検出できた食材は鶏挽肉、豚レバー、豚挽肉、

豚ハツ、豚もつなどであった。両法で検出できなかった食材は、生野菜、鶏団子（生）であった。これらの食材では、一般生菌数が 10^5 cfu/g 以上、大腸菌群数が 10^3 cfu/g 以上のものが多く、生野菜や生肉類等のような大腸菌群などによる汚染度が高く、きょう雑菌が多い場合にはいずれの方法ともその影響を受けることが示唆された。一般に、食品中に存在するサルモネラの菌数は少量なため、検出目的菌に対するきょう雑菌の影響を抑え、前増菌培地、選択増菌培地で検出可能な菌数にまで増菌することが重要である。今回、前増菌培地に BPW を用いたが、EEM 培地などの他の培地での検討も必要と考えられる。

前報と同様、選択分離培地に DHL および SMID2 を用いたが、サルモネラ未接種の 77 検体および接種した 154 検体、計 231 検体のうち、DHL では 131 検体、SMID2 では 136 検体からサルモネラが分離された。サルモネラ未接種の 77 検体では、DHL 平板上でサルモネラが疑われた検体は 23 検体で、そのうち確認試験で陰性と判定された検体（偽陽性）は 19 検体（82.6%）であったのに対し、SMID2 ではサルモネラが疑われた 7 検体のうち、偽陽性は 1 検体のみであった。

SMID2 はサルモネラによりピンク～紫色の定型集落を形成し、色調による他の菌との鑑別が可能である。そのため、平板上の集落の鑑別を容易かつ確実に行うことができることから、確認試験の手間を省くこともでき、また、硫化水素を産生しないサルモネラも検出できることから、サルモネラ検査に有効であると考えられる。

従来のサルモネラ検査では試験結果の確定まで 5 日間程度を要するのに対し、Easy SLM 法は 2 日あまりで結果が得られ、迅速性に優れる。また、Easy SLM 法では選択増菌培地（SX ブイヨン）による増菌後の検出工程はミニバイダスによりすべて自動で行われるため、操作が簡便であるとともにその標準化と結果の客観性に

も優れている。

以上の結果から、Easy SLM 法はその迅速性、簡便性、客観性から、日常の食品中のサルモネラ検査に有効であると考えられる。

参考文献

- 1) International Standard EN ISO 6579 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., ISO, Geneva (2002).
- 2) 伊藤 武, 中川 弘: 迅速・簡易化が進む食中毒検査の最新動向. 食品と開発, **34**(5), 9-11 (2001).
- 3) 伊藤 武, 中川 弘: 食品病原菌の迅速測定法の最近の進歩—免疫学的検出法を中心として. 乳業技術, **51**, 77-88 (2001).
- 4) Yeh, K.-S., Tsai, C.-E., Chen, S.-P., and Liao, C.-W.: Comparison between VIDAS automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples. J. Food Prot., **65**, 1656-1659 (2002).
- 5) 中川 弘, 福村圭介, 中村菜美子, 澤口 勲, 内田和之, 伊藤 武: バイダスを用いたサルモネラ迅速検出法の検討. 日食微誌, **23**, 156-164 (2006).
- 6) 大畑克彦, 本田敬康, 仁科徳啓: 磁気ビーズを用いたサルモネラ検出法の評価. 日食微誌, **14**, 97-100 (1997).
- 7) 寺元忠司, 仲西寿男, 盛田隆行, 中谷真人, 高倍正典: 食鳥肉からのコンダクタンス法によるサルモネラ検出. 日食微誌, **18**, 57-60 (2001).
- 8) VIDAS *Salmonella* (VIDAS SLM) kit for the rapid detection of *Salmonella*. AFNOR VALIDATION CERTIFICATE.
- 9) VIDAS Easy *Salmonella* kit for the rapid detection of *Salmonella*. AFNOR VALIDATION CERTIFICATE.
- 10) 吉敷ゆみこ, 石崎直人, 草野友子, 金子誠二, 宮崎奉之: ダイナビーズおよびヤマトロンビーズを併用した食肉からのサルモネラ分離方法の検討. 日食微誌, **17**, 189-193 (2000).