＝原 著＝

飼料および食品製造施設で用いるサルモネラ属菌 分離のための遅延二次増菌培養法の評価

盛田 隆行^{*1,†}・北澤 秀基^{*2}・村山 靖之^{*2}

(^{*1} 攝津製油株式会社, ^{*2} 日清オイリオグループ株式会社)

(受付: 平成 21 年 2 月 20 日)

(受理: 平成 21 年 11 月 23 日)

Evaluation of Delayed Secondary Enrichment Method for *Salmonella* Isolation in Feed and Food Manufacturing Plant

Takayuki MORITA^{*1,†}, Hideki KITAZAWA^{*2} and Yasuyuki MURAYAMA^{*2}

(^{*1} SETTU OIL MILL, INC., Chikkoshinmachi, Nishi-ku, Sakai 592-8331;

[†] Corresponding author)

(^{*2} The Nisshin Oil Group, Ltd., Shinmori-cho, Isogo-ku, Yokohama 235-8558)

To establish an efficient method for detection and isolation of *Salmonella* in feed and food manufacturing plant, we evaluated the delayed secondary enrichment (DSE) method, which has already been acknowledged in the field of poultry hygiene. In order to evaluate the detection rate by the increase of pre-enrichment culture and selective enrichment broth, the oilmeal samples ($n=182$) were examined using different volume (10 ml and 90 ml) of the Hajna-tetrathionate broth (HTT). As a result, the sample with different result was only two (1.1%). The detection sensitivities of these 2 methods were same ($p < 0.05$). We examined oilseed ($n=34$) and swab samples ($n=92$) of environment in the oilmeal manufacturing plant. The DSE method alone showed the highest rate of *Salmonella* detection at 14.3% (18/126), followed by the HTT-DHL method and HTT-CHROMagar *Salmonella* method, both at 12.7% (16/126). Moreover, O antigen group of isolates detected by the DSE method was different from those of HTT-DHL method in 7 samples. It was found that the detection sensitivity of the DSE method was high. Our findings suggest that O antigen group of isolates detected by the DSE method may differ from those of conventional enrichment methods. We conclude that DSE method is a simple and efficient method for epidemiological investigations of *Salmonella* in environments, such as food manufacturing plants.

Key words: *Salmonella*, delayed secondary enrichment, Hajna-tetrathionate broth, food manufacturing plant, epidemiological investigation

緒 言

サルモネラ属菌は爬虫類、鳥類および哺乳類の腸管内のほか、河川や土壌など自然界に広く分布し、食品を汚染することもあるため、食品衛生上重要視されている食中毒起因菌である¹⁾。また、サルモネラ属菌は乾燥に強い

存することが問題になっている^{3,4,12)}。

これらの製造環境を汚染するサルモネラ属菌は菌量が少なく、また、菌体は乾燥、熱、薬剤および紫外線など物理的、化学的なストレスを受けている可能性がある。幼鶏は少量菌の汚染飼料によってサルモネラ症を引き起こす可能性があることから¹⁰⁾、家禽およびその生育環境を対象としたサルモネラ属菌の検出では、低濃度の汚染および損傷菌に対する検出率を高めるための増菌培養法が数多く検討されている²⁾。選択増菌培地を用いて2段階で培養する遅延二次増菌培養法 (delayed secondary

[†] 連絡先

^{*1} ☎592-8331 堺市西区築港新町 3-37

^{*2} ☎235-8558 横浜市磯子区新森町 1

enrichment method: 以下, DSE 法) は古くから知られており⁹⁾, 従来から使用されている飼料分析基準に準じた方法 (以下, 飼分法)⁸⁾ よりも検出率が向上することが報告されている^{2, 6, 13)}. 一方, 飼料や食品の製造施設を対象としたサルモネラ属菌検出のための増菌培養法の検討はほとんど行われていないのが現状である. 菌を効率的に回収できる増菌培養法の確立は, 実際の汚染状況を把握し, 疫学解析を行ううえで非常に重要な課題であると考えられる.

今回われわれは, 飼料および食品の製造施設で用いるサルモネラ属菌の効率的な分離法を確立するために, 飼料と食品の共通原料である大豆, 菜種などの油糧原料と, 油粕製造工場の環境材料を用いて DSE 法の併用の評価を行った. また, 飼分法において, 検出率を高めるために採用している前増菌培養液および選択増菌培地の容量を増加したときの検出状況を, 油粕を用いて比較したので併せて報告する.

材料および方法

1. 供試材料

供試した材料は, 国内の油粕製造工場で採取した油粕

182 検体, 油糧原料 34 検体 (大豆 19 検体, 菜種 15 検体) および環境ふき取り材料 92 検体 (靴裏 48 検体, 製造装置 29 検体, 作業床 15 検体) の計 308 検体である.

油粕は品質不良品を含む中間製品を, 製造工程および保管施設から 25 g 採取した. 油糧原料は原料船の船倉から直接採取し, 原料とダストが混合した 25 g を実験に供した. 環境ふき取り材料は 0.1% ペプトン加生理食塩水を浸漬させた滅菌綿棒を使用し, 靴裏は片方の靴の裏面全体をふき取り 1 検体とした. また, 製造装置および作業床は, それぞれ約 1,000 cm² の面積をふき取り 1 検体とした.

2. 使用培地

本評価に使用した培地は, 前増菌培養に 0.6% Tween 80 加 Buffered Peptone Water (以下, BPW: OXOID), 選択増菌培養にハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地 (以下, HTT: 日本製薬) およびセレンナイト・シスチン基礎培地 (以下, SC: 日水製薬), 選択分離培養に DHL 寒天培地 (以下, DHL: 日水製薬) および CHROMagar Salmonella (以下, CAS: CHROMagar) を用いた.

3. 各試料からのサルモネラ属菌の検出

評価に用いた各試料からサルモネラ属菌の検出方法を

Fig. 1. Procedure for the isolation and detection of *Salmonella* using conventional enrichment methods and DSE method.

DSE: delayed secondary enrichment, BPW: buffered peptone water supplemented with 0.6% Tween 80, HTT: Hajna-tetrathionate broth, SC: selenite cystine broth, DHL: desoxycholate hydrogen sulfide lactose agar, CAS: CHROMagar Salmonella, TSI: triple sugar iron medium, LIM: lysine indol motility medium.

Fig. 1 に示した。

1) 前増菌培養

油粕および油糧原料は 25 g をストマッカー袋に秤量し、BPW 225 ml を加えて 2 分間ストマッキング後、35℃ で 18～24 時間培養した。また、環境ふき取り材料は BPW 100 ml を分注したストマッカー袋に綿棒を入れ、1 分間手で揉みほぐし、同様の条件で培養した。

2) 前増菌培養液および選択増菌培地の容量が検出率に及ぼす影響

前増菌培養液の接種量および選択増菌培養に用いる HTT の容量が検出率に及ぼす影響を確認するための評価を行った。Fig. 1 に示したとおり、HTT は所定の処方に準じて作製し、中試験管および 100 ml スクリューキャップ付きバイアルビンに、それぞれ 10 ml および 90 ml 分注した。この 2 種類の HTT に、油粕 182 検体の前増菌培養液をそれぞれ 1 ml および 10 ml 接種し、42℃ で 22～24 時間培養した。評価は簡易迅速検出キット“核さんテストサルモネラ”（科学飼料研究所）を用い、その検出状況を比較した。なお、検出結果は χ^2 -検定による有意差検定を行った。

3) 油糧原料および環境ふき取り材料からの検出

選択増菌培地は従来から食品中のサルモネラ属菌の検出に用いられてきた SC、また飼分法⁸⁾ および食品衛生検査指針⁷⁾ で推奨されている HTT を採用し、中試験管に 10 ml 分注して用いた。BPW 前増菌培養液を SC では 0.1 ml、HTT では 1 ml を接種し、42℃ で 22～24 時間培養した。その後、それぞれの選択増菌培養液を DHL および CAS に塗抹し、35℃ で 24 時間培養した。サルモネラ属菌の確認はそれぞれの選択分離培地上の疑わしい集落を選択分離培地 1 平板につき 3 集落を釣菌し、TSI および LIM 培地に接種して 35℃ で 24 時間培養後に性状を確認した。さらに、サルモネラ免疫血清

（デンカ生研）を用いて、O 抗原の群別を行った。

DSE 法は HTT の 42℃ 22～24 時間培養液を室温 (20～25℃) で 5～7 日間培養後、その 1 ml を新たな HTT に接種し、42℃ 22～24 時間培養後 DHL を用いて菌の分離を行った。

結 果

1. 前増菌培養液および選択増菌培地の容量が検出率に及ぼす影響

油粕の計 182 検体を用いて、培地容量の違いによる検出状況を比較したところ Table 1 に示した結果が得られた。それぞれの培地容量とともに陽性になった試料は 38 検体 (20.9%) であった。また、HTT が 10 ml または 90 ml のいずれかの培地容量で陽性になった試料はともに 1 検体 (0.5%) のみであり、 χ^2 -検定の結果、両培地容量を用いた方法に有意差はなかった ($p < 0.05$)。

2. 油糧原料および環境ふき取り材料からのサルモネラ属菌の検出

油糧原料および環境ふき取り材料の計 126 検体からのサルモネラ属菌の検出状況を Table 2 に示した。DSE 法は 18 検体 (14.3%) からサルモネラ属菌が検出

Table 1. *Salmonella* detection in oilmeal samples by selective enrichment in different volume of HTT

	Volume of HTT		Number of samples
	10 ml	90 ml	
<i>Salmonella</i> detection	+	+	38
	+	—	1
	—	+	1
	—	—	142

HTT: Hajna-tetrathionate broth

Table 2. Comparison of *Salmonella* detection using conventional enrichment methods and DSE method from oilseed and environmental samples in oilmeal manufacturing plant

Sample	Number of total examined sample	Number of <i>Salmonella</i> positive sample (%)				
		Conventional enrichment method				DSE method
		SC-DHL	SC-CAS	HTT-DHL	HTT-CAS	
Oilseed						
Soybean	19	4 (21.1)	5 (26.3)	5 (26.3)	5 (26.3)	7 (36.8)
Rapeseed	15	2 (13.3)	3 (20.0)	5 (33.3)	5 (33.3)	5 (33.3)
Subtotal	34	6 (17.6)	8 (23.5)	10 (29.4)	10 (29.4)	12 (35.3)
Swab from oilmeal manufacturing plant						
Shoes	48	2 (4.2)	2 (4.2)	2 (4.2)	2 (4.2)	2 (4.2)
Equipment	29	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Floor	15	4 (26.7)	4 (26.7)	4 (26.7)	4 (26.7)	4 (26.7)
Subtotal	92	6 (6.5)	6 (6.5)	6 (6.5)	6 (6.5)	6 (6.5)
Total	126	12 (9.5)	14 (11.1)	16 (12.7)	16 (12.7)	18 (14.3)

DSE: delayed secondary enrichment, SC: selenite cystine broth, DHL: desoxycholate hydrogen sulfide lactose agar, CAS: CHROMagar Salmonella, HTT: Hajna-tetrathionate broth

され、最も検出率が高かった。次いで、HTT-DHL 法および HTT-CAS 法で、ともに 16 検体 (12.7%) から検出された。最も検出率の低かった増菌培養法は SC-DHL 法で、サルモネラ属菌の検出は 12 検体 (9.5%) であった。

試料別に見ると、油糧原料における検出率は DSE 法、HTT-DHL 法および HTT-CAS 法、SC-CAS 法、SC-DHL 法の順で高かった。菜種および大豆ではともに DSE 法の検出率が高く、SC-DHL 法が最も低かった。DSE 法陽性試料 12 検体のうち、2 検体 (16.7%) は HTT の 1 回培養の HTT-DHL 法および HTT-CAS 法では陰性、2 回培養である DSE 法で陽性となった。油粕製造工場の環境ふき取り材料における検出率はすべての増菌培養法が同一の結果となり、方法間に差は見られなかった。サルモネラ属菌の検出は 6 検体 (6.5%) であった。なお、選択分離培地の DHL および CAS では、サルモネラ属菌の検出率は CAS のほうがわずかに高い傾向を示した。

4. 分離株の O 抗原群別

分離株における O 抗原群別結果を Table 3 に示した。HTT-DHL 法と DSE 法でともにサルモネラ属菌が分離された 16 検体 (油糧原料 No. 1 および 3 以外) のうち、7 検体 (油糧原料 No. 5~7, 床ふき取り材料 No. 1~4)

(43.8%) で分離株の O 抗原群が異なっていた。なお、油糧原料の試料 No. 5~7 および床ふき取り材料の試料 No. 2~4 の 6 検体 (37.5%) では、HTT の 24 時間培養で検出されなかった O 抗原群の菌を、DSE 法による約 1 週間の培養で分離することができた。

考 察

近年、飼料や食品の製造施設を対象とした汚染調査や食中毒事例における原因食品の特定に、Random amplified polymorphic DNA 法および Pulsed-field gel electrophoresis 法などの分子遺伝学的手法を用いた疫学解析が行われ、成果を上げている。これら疫学解析では、対象とする菌の分離が前提になるため、検出率の高い増菌培養法が必要とされている。今回、飼料や食品の製造施設で用いるサルモネラ属菌の効率的な分離法を確立する目的で、家禽衛生の分野で使用され実績のある HTT を用いた DSE 法の併用を評価した。

飼分法はサルモネラ属菌の検出率を高める目的で、選択増菌培地の容量を 100 ml とし、そこに接種する前増菌培養液の容量を 10 ml に増加させた方法で、ともに食品のサルモネラ属菌検査の 10 倍量を用いている。しかし、油粕を用いた今回の評価では、培地容量の増加による検出率向上の効果は確認されなかった。そこで、今

Table 3. O antigen group in *Salmonella* strains isolated from oilseed and swab samples from oilmeal manufacturing plant

Sample	Sample No.	O antigen group of isolated strains			
		Conventional enrichment method		DSE method	
		HTT-DHL			
		Number of isolated strains	O antigen group	Number of isolated strains	O antigen group
Oilseed	1	ND	—	2	21
	2	3	4	3	4
	3	ND	—	3	7
	4	3	21	3	21
	5	3	8	3	[3, 10]
	6	2	8	3	4
	7	2	[3, 10]	3	4
	8	3	8	2	8
	9	2	4	3	4
	10	3	11	3	11
	11	3	11	1	11
	12	1	21	2	21
Swab of shoes	1	3	[1, 3, 19]	3	[1, 3, 19]
	2	3	[1, 3, 19]	3	[1, 3, 19]
Swab of floor	1	3	[1, 3, 19], 13	3	[1, 3, 19]
	2	3	13	3	[1, 3, 19]
	3	3	[1, 3, 19]	3	13
	4	3	13	3	13, [1, 3, 19]

DSE: delayed secondary enrichment, HTT: Hajna-tetrathionate broth, DHL: desoxycholate hydrogen sulfide lactose agar, ND: Not detected

回は選択増菌培地の容量を 10 ml として検討を行った。

DSE 法は 1 次選択増菌培養後、約 1 週間室温で放置し、その培養液を新たな選択増菌培地に接種、2 次培養を行う手法である。油粕製造工場から入手した試料を用いて、飼分法や食品衛生検査指針などで従来から使用されている SC および HTT を用いた増菌培養法と DSE 法における検出率を比較した。作業靴および作業床のふき取りは、過去の検討において、サルモネラ属菌の菌数が MPN 値で $10^3/100$ g 以上の塵埃が採取された区域^{3,4)}で実施した。検出率に差が認められなかったのは、試料におけるサルモネラ属菌の菌数が高かったためであると考えられた。一方、油糧原料は品種や産地によってサルモネラ属菌の汚染度が異なり、そのほとんどが MPN 値で 30/100 g 以下であることが事前の調査で確認された⁵⁾。汚染菌数の低い試料において、DSE 法は他の増菌培養法よりも高い検出率を示したことから、DSE 法は検出感度の高い方法であることが確認された。

選択増菌培養の延長により検出率が高まる傾向は、HTT 以外の培地でも確認されており、D'Aoust らは Tetrathionate Brilliant Green 培地、Rappaport Vassiliadis (RV) 培地および SC などの培地を用い、培養時間を 48 時間に延長した結果、検出率が 24 時間培養よりも 0.8~5.2% 高まったことを報告している¹⁾。また、中村らは DSE 法には HTT が適しており、特に低濃度の汚染試料に効果的であることを明らかにした⁶⁾。乾燥している油糧原料において、DSE 法は他の増菌培養法よりも高い検出率を示したことから、乾燥試料からのサルモネラ属菌の検出に効果的であることが示唆された。DSE 法の長い培養時間は少量菌の増殖だけでなく、乾燥試料中の損傷菌の回復も支持していることが考えられた。

油糧原料および環境ふき取り材料の分離株における O 抗原群別を実施した。HTT の培養時間を延長した DSE 法は、HTT の 1 回培養である HTT-DHL 法で確認できなかった O 抗原群菌を多くの試料で確認することができた。DSE 法の長い培養期間においては、混在する異なる O 抗原群菌の菌叢が変化する可能性がある。このことが HTT の 1 次培養と 2 次培養で分離された O 抗原群菌が異なった原因の一つと考えられた。複数の血清群菌の汚染が疑われる試料では、DSE 法を併用することにより多くの血清群菌を分離できる可能性が高いと考えられた。

DSE 法は通常より約 1 週間長く培養を行うため、迅速性が要求される最終製品の検査には適さない。しかし、製造環境から飼料や食品への汚染を防ぐためには、環境中のできる限り多くの菌を効率よく分離し、調査する必要がある。飼料や食品工場の環境材料は乾燥している場合があり、サルモネラ属菌の汚染量は低いことが多い。今回、油糧原料と油粕製造工場の環境材料で DSE 法の有効性が確認されたことから、本法は飼料や食品工

場の疫学解析を目的とした増菌培養法として効果的であると考ええる。また、DSE 法は選択増菌培養を 1 回追加するだけの簡便な手法であるため、従来のサルモネラ属菌検査法と併用しやすいことも利点である。今後、さまざまな環境材料を用い、RV 培地や Tetrathionate broth 培地など他の選択増菌培地との検出率の比較および分離株の血清群について調査を継続し、DSE 法の有効性を確認する予定である。

要 約

飼料および食品製造施設で使用するサルモネラ属菌の効率的な分離法を確立するために、家禽衛生の分野で実績のある HTT を用いた DSE 法の評価を行った。

油粕の計 182 検体を用いて、前増菌培養液および選択増菌培地容量の増量による検出状況を評価した。検査結果が異なった検体は 2 検体 (1.1%) であり、 χ^2 -検定の結果、両培地容量を用いた方法に有意差はなかった ($p < 0.05$)。

油糧原料および環境ふき取り材料の計 126 検体を用いた評価では、DSE 法は 18 検体 (14.3%) からサルモネラ属菌が検出され、最も検出率が高かった。次いで、HTT-DHL 法および HTT-CAS 法で、ともに 16 検体 (12.7%) から検出された。なお、DSE 法は HTT の 1 回培養では分離できなかった O 抗原群菌を複数の試料で確認することができた。DSE 法は検出感度が高く、分離株の血清群は従来の増菌培養法とは異なる可能性のあることが示唆された。また、簡便な手法であるため、疫学解析を目的とした増菌培養法として非常に有効であると考ええる。

文 献

- 1) D'Aoust, J.-Y., Sewell, A. M. and Jean, A.: Efficacy of prolonged (48h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol., **15**, 121-130 (1992).
- 2) 鶏病研究会: サルモネラ検査法. 鶏病研報, **37**, 14-30 (2001).
- 3) Morita, T., Kitazawa, Y., Iida, T. and Kamata, S.: Examination about survival of *Salmonella* in the environment of an oil-meal manufacturing plant. Jpn. J. Anim. Hyg., **30**, 75-83 (2004).
- 4) Morita, T., Kitazawa, H., Iida, T. and Kamata, S.: Prevention of *Salmonella* cross-contamination in an oilmeal manufacturing plant. J. Appl. Microbiol., **101**, 464-473 (2006).
- 5) 盛田隆行, 北澤秀基, 村山靖之, 飯田 孝, 鎌田信一: 輸入油粕原料を介して油粕工場に侵入するサルモネラの汚染リスク. 家畜衛生学雑誌, **32**, 79-85 (2007).
- 6) 中村政幸, 作田麻里, 佐藤寛子, 竹原一明: 鶏盲腸内容からのサルモネラ分離培養法の検討. 鶏病研報, **33**, 143-151 (1997).
- 7) 仲西寿男: 4 サルモネラ. 食品衛生検査指針微生物編. 厚生労働省監修, p. 180-191, 日本食品衛生協会, 東京

- (2004).
- 8) 農林水産省畜産局長：飼料分析基準の制定について．平成7年11月15日，7畜B第1660(1995).
- 9) Pourciau, S. S. and Springer, W. T.: Evaluation of secondary enrichment for detecting salmonellae from bobwhite quail. *Avian Dis.*, **22**, 42-45 (1978).
- 10) 佐藤静夫：飼料のサルモネラ汚染と対策．鶏病研報，**39**, 113-132 (2003).
- 11) 田村和満，坂崎利一：1 *Salmonella*. 食水系感染症と細菌性食中毒．坂崎利一編，p. 82-109，中央法規出版，東京 (1994).
- 12) 対馬典子，杉山 猛，大友良光，品川邦汎：イカ菓子食中毒事件におけるサルモネラ汚染実態に関する疫学的考察．日食微誌，**17**, 225-234 (2000).
- 13) Waltman, W. D., Horne, A. M., Pirkle, C. and Dickson, T. G.: Use of delayed secondary enrichment for the isolation of *Salmonella* in poultry and poultry environments. *Avian Dis.*, **35**, 88-92 (1991).