＝技 術＝

DOX を用いた食品中のサルモネラ迅速検出法の検討

山 梨 秀 己^{*1,†}・久保田裕美^{*2}・郡 司 明 博^{*3}

吉 田 雅 一^{*4}・中 谷 正 己^{*3}・仲 西 寿 男^{*3}

(^{*1}株式会社ダイキン環境研究所, ^{*2}ヤマエ久野株式会社, ^{*3}財団法人日本食品分析センター大阪支所,

^{*4}株式会社バイオ・シータ)

(受付 平成 16 年 3 月 24 日)

(受理 平成 16 年 5 月 19 日)

Application of DOX System on the Rapid Detection of *Salmonella* in Foods

Hideki YAMANASHI^{*1,†}, Hiromi KUBOTA^{*2}, Akihiro GUNJI^{*3},

Masakazu YOSHIDA^{*4}, Masami NAKATANI^{*3} and Hisao NAKANISHI^{*3}

(^{*1}DAIKIN Environmental Laboratory, Miyukigaoka, Tsukuba-shi 305-0041; [†]Corresponding author)

(^{*2}YAMAE-HISANO Co., Ltd., Hakozaki-futou, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812-8548)

(^{*3}Japan Food Research Laboratories, Toyotsu-cho, Suita-shi 564-0051)

(^{*4}Bio-Theta, Ltd., Nishinakajima, Yodogawa-ku, Osaka-shi 532-0011)

We developed a rapid detection method for *Salmonella* in foods by the DOX system. In this system, RV broth was selected for the medium, poured into a DOX cell and incubated at 42°C. The assay reproducibility and the selectivity of this method for *Salmonella* were satisfactory. *Salmonella* was detected within 6 hours from the sample at 10⁶ cells/ml. As the pre-enrichment or selective enrichment culture medium were used as samples for the DOX method, we could detect *Salmonella* in foods with parallel procedures of conventional and DOX methods. In 84 liquid egg samples, the agreement between the conventional culture method and the DOX method for detection of *Salmonella* was over 95%, when the pre-enrichment culture medium was tested by DOX method. The result of *Salmonella* contamination in liquid egg samples was obtained within 2 days after the beginning of culture. In 32 minced chicken meat samples, the agreement between the conventional culture method and the DOX method for detection of *Salmonella* was over 90%, when the selective enrichment culture medium was tested by the DOX method. The result of *Salmonella* contamination in minced chicken meat samples was obtained within 3 days after the beginning of culture. The DOX *Salmonella* system was evaluated as a rapid and convenient screening method for food processing, particularly that of liquid egg and chicken meat.

Key words: *Salmonella*, Detection method, DOX system, Agreement

緒 言

厚生労働省の食中毒統計によると、サルモネラ事例は 1998～2002 年の 5 年間で国内発生件数の 1, 2 位を記

録している。2002 年には 465 件が発生し、これは全食中毒件数の 25.1% を占め、原因別の第 1 位であった。患者数 5,833 名、死者 2 名が記録され⁷⁾、サルモネラ食中毒は腸炎ビブリオ、カンピロバクターによる食中毒とともに大きな社会問題となっている。当然提起される食中毒の予防対策として、食品製造現場での原料受け入れ検査、製造工程の衛生管理、製品検査などによる食中毒菌汚染状況の把握と排除が重要な課題となっている。

† 連絡先

*1 ☎305-0841 つくば市御幸が丘 3

*2 ☎812-8548 福岡市東区箱崎埠頭 6-8-54

*3 ☎564-0051 吹田市豊津町 3-1

*4 ☎532-0011 大阪市淀川区西中島 3-11-26

食品汚染のサルモネラの検出は、食品衛生検査指針⁹⁾や厚生省通知^{6), 5)}に示された分離培養法に従うと、前増菌・増菌・分離および確認の4段階の培養を行うため、検査開始から結果判明までに4~5日間を要している。また、分離寒天培地からのサルモネラを疑われる菌株の釣菌操作や、TSI, LIM培地での生化学的性状の同定には煩雑な操作や目視判定が伴い、検査操作の習熟も必要とされている。これらの理由により、サルモネラ検出法の迅速化や簡便化が求められている。

細菌検査システム「DOX」は酸素電極により培地中の溶存酸素消費量を測定し、細菌数を自動計測する測定システムである。すなわち、酸素電極には培地中の溶存酸素量に比例した電流が流れるため、培地中で呼吸する培養初期菌数が多ければ、一定の電流閾値にまで低下する時間（検出時間）が短く、培養初期菌数が少なければ、低下する時間が長くなる。この原理により培養初期菌数と検出時間との間に検量線を作成することができ、酸素電極からの電流値をモニターすることで菌数の自動計測・自動判定・自動記録が可能である。DOX-60Fは容量3 mlの電極つき使い捨てセルを60チャンネルの同時測定が可能であり、現在、これを用いた一般生菌数¹²⁾および大腸菌群検査⁴⁾が報告されている。

今回、筆者らはDOX用電極つきセル内にサルモネラ選択増菌培地を充填し、液卵および鶏ミンチ肉からのサルモネラ検出を試みたので報告する。

材料および方法

1. 使用培地

緩衝ペプトン水 (BPW; 日水またはメルク), DNPBN培地 (DNPBN; 宮本らの製法¹¹⁾により自家調製), EEMブイヨン培地 (EEM; 栄研), GNブロス (GN; BD), ハーナ・テトラチオン酸塩培地 (HTT; 栄研), Preussテトラチオネート培地 (PTT; メルク), ラバポート培地 (RB; 栄研), ラバポート・バシリアデス培地 (RV; メルク), SBGスルファ培地 (SBG; 栄研), セレナイト培地 (SC; 栄研), テトラチオネート培地 (TT; 栄研), ESサルモネラ寒天培地 (ES; 栄研器材), LIM培地 (LIM; 日水), MLCB寒天培地 (MLCB; 日水) および TSI寒天培地 (TSI; 栄研または日水) を用いた。

2. 供試菌株

Bacillus cereus IFO3457, *B. subtilis* IFO13722, *Enterobacter cloacae* IFO 13535, *Salmonella* Typhimurium IFO 12529, *Staphylococcus aureus* IFO 14462, *Citrobacter freundii* JCM1657, *Enterococcus faecalis* JCM5805, *Escherichia coli* JCM1649, *Klebsiella pneumoniae* JCM1662, *Proteus mirabilis* JCM1669, *P. vulgaris* JCM 1668, *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962 および *Salmonella* Enteritidis JCM1652 を用いた。

3. DOX 操作方法

(1) 操作法

一般生菌用電極付き DOX セル（以下、DOX セルと略す）に、あらかじめ加温した各種増菌培地 2 ml を充填し、次いで菌培養液 20 μ l を接種した。DOX セルにふたをした後、各運転温度に達した DOX-60F にセルを挿入して、24 時間の溶存酸素量測定を開始した。

(2) 検出閾値

DOX セル内の酸素電極からの電流値の 300 nA を閾値とし、測定開始からこれに達するまでの時間を検出時間とした。サルモネラ検査は電流値が 300 nA 以下になったものを陽性とした。

4. 食品検体のサルモネラ検査

(1) 検査検体

殺菌液卵（殺菌冷凍液卵を含む）74 検体はヤマエ久野株式会社、サルモネラ陽性が確認された未殺菌冷凍液卵 10 検体はキューピー株式会社から入手した。鶏ミンチ肉 32 検体は市販品をスーパーマーケットから購入した。

(2) 分離培養法

厚生省通知^{6), 5)}に示された検査方法などに従った。

液卵検体 25 g に BPW (L-システイン 0.2 g/l を含む) を 225 ml 加え、36°C, 22 時間前増菌培養後、その培養液を TT 10 ml ならびに RV 10 ml にそれぞれ 0.5 ml ずつ接種して、42°C, 22 時間選択増菌培養を行った。各培養液の一金耳を DHL 寒天平板ならびに ES サルモネラ寒天平板に塗抹し、36°C, 24 時間分離培養後、平板上に発育したサルモネラを疑われる集落を釣菌し、TSI 寒天培地および LIM 培地に接種して 36°C, 24 時間確認培養を行った。TSI 寒天培地で斜面赤色、高層部黒変または黄変（硫化水素産生）、ガス産生、LIM 培地で高層部紫色（リシン陽性）、インドール陰性、運動性陽性を示した菌株をサルモネラと同定した。サルモネラと同定された菌株は、O 多価血清（デンカ生研）を用いて凝集テストを行い、凝集を確認した。

鶏ミンチ肉は検体 25 g に EEM または BPW を 225 ml 加え、35°C, 18 時間前増菌培養を行った。EEM 培養液は 1.5 ml を HTT 15 ml に接種し、また、BPW 培養液は 0.1 ml を RV 10 ml に接種して、42°C, 22 時間選択増菌培養を行った。各培養液の一金耳を MLCB 寒天平板に塗抹し、35°C, 24 時間分離培養を行った。サルモネラと同定は液卵検査に準じた。

また、一部の鶏ミンチ肉については、検体 25 g に HTT または RV225 ml を直接加え、42°C, 22 時間選択増菌培養を行った。サルモネラの分離、同定は鶏ミンチ肉検査に準じた。

(3) DOX 法

液卵検体は、分離培養法を進める上で得られる前増菌培養液 (BPW) と選択増菌培養液 (RV および TT) 各 20 μ l を、加温した RV 2.0 ml を充填した DOX セルに接種

Fig. 1. Procedure for detecting *Salmonella* from liquid egg samples

Fig. 2. Procedure for detecting *Salmonella* from minced chicken meat samples

して、DOX-60Fの運転温度を42℃で24時間の溶存酸素量測定を行った。

鶏ミンチ肉検体は分離培養法を進める上で得られる前増菌培養液（EEMおよびBPW）と選択増菌培養液（HTTおよびRV）各20μl、ならびに鶏ミンチ肉25gにHTTまたはRV 225 mlを加え42℃、20時間直接選択増菌培養を行った培養液（HTTおよびRV）各20μlを同様にDOXセルに接種して、DOX-60Fで溶存酸素量測定を行った。これらの検体からのサルモネラ分離

Fig. 3. Procedure for detecting *Salmonella* from minced chicken meat samples using direct enrichment

Table 1. Application of enrichment media for DOX *Salmonella*

Media	Oxygen consumption curve	Detection time (hr) of 10 ⁶ cells <i>Salmonella</i> at 37°C
Buffered pepton water	Applicable	2.1
DNPBN broth	Applicable	7.7
EEM broth	Applicable	3.2
GN broth	Applicable	5.4
Hajna tetrathionate broth	Inapplicable	ND
Preuss tetrathionate broth	Applicable	9.3
Rappaport broth	Applicable	6.5
Rappaport-Vassiliadis broth	Applicable	4.1
SBG sulfa broth	Inapplicable	ND
Selenite cystine broth	Inapplicable	ND
Tetrathionate broth	Inapplicable	ND

ND: Not detected

培養法およびDOX検査法をFig. 1, 2および3に示す。

結 果

1. DOX法に用いるサルモネラ増菌培地の検討

BPWで増菌した*S. Enteritidis*を11種類の培地を充填したDOX用セルに約10⁶個接種し、DOX-60Fを37℃で運転した場合の酸素消費曲線は、SC、SBG、TTおよびHTTは電流値の急激な下降や上昇が観察され、良好な酸素消費曲線が得られなかったが、それ以外の選択増菌培地ではサルモネラの検出が可能であった。サルモネラに対する選択性の高いPTT、RB、RVおよびDNPBNの中から、検出時間が短く、調製後の保存安定性が優れたRVをDOXセルに充填するサルモネラ増菌培地として選択した（Table 1）。

2. DOX運転温度の検討

BPWで培養した腸内細菌を含む13種類の菌を、DOXセル内のRVに約10⁶個接種し、DOX-60Fの運転温度を40℃および42℃で測定した検出時間は、40℃では*C. freundii*および*E. cloacae*が検出されるが、

42℃では検出されず、この運転温度でのサルモネラ以外の菌に対する選択性が確認された。しかし、運転温度の上昇に伴いサルモネラ検出時間は遅延した (Table 2)。

3. サルモネラ検出時間

S. Enteritidis および *S. Typhimurium* の約 $10^3 \sim 10^7$ 個/ml の BPW 培養液 20 μ l を DOX セル内に充填した RV 2.0 ml に接種して、DOX 運転温度 42℃で酸素消費曲線と検出時間を調べた。 10^6 個/ml のサルモネラ培養液は 8 時間以内に検出することが可能であった。しかし、 10^4 個/ml 以下では 24 時間測定しても電流の閾値以下の低下は認められなかった (Fig. 4 および 5)。

Table 2. Effect of incubation temperature on the specificity of DOX Salmonella with Rappaport-Vassiliadis broth

Bacteria (10^6 cells)	Detection time (hr)	
	Incubation temperature	
	40℃	42℃
<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i>	ND	ND
<i>Citrobacter freundii</i>	9.9	ND
<i>Enterobacter cloacae</i>	4.8	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	ND
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND	ND
<i>Proteus mirabilis</i>	ND	ND
<i>Proteus vulgaris</i>	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND	ND
<i>Salmonella Enteritidis</i>	5.0	7.1
<i>Salmonella Typhimurium</i>	NT	5.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND

ND: Not detected

NT: Not tested

4. 測定再現性

2 種類のサルモネラ陽性 (A および B) と 1 種類のサルモネラ陰性の鶏ミンチ肉 BPW 培養液を、同時に 10 回測定した検出時間の同時再現性は、陽性検体の検出時間の変動係数は 3.6% および 1.5% であり、良好な測定再現性が得られた。また、サルモネラ陰性検体はすべて陰性であった。 (Table 3)。

5. 食品検体のサルモネラ検査結果の比較

分離培養法 (以下、従来法と記す) の検査結果と、従来法を進める上で得られる前増菌培養液と選択増菌培養液を DOX 法で測定した検査結果と検出時間を比較した。感受性 (Sensitivity)、特異性 (Specificity) および一致率 (Agreement) は従来法を基準として求めた。

(1) 液卵検査

未殺菌液卵 10 検体と殺菌液卵 74 検体、合計 84 検体の従来法検査は、BPW:TT 培養および BPW:RV 培養から同じ検出結果が得られ、未殺菌液卵 10 検体がサル

Fig. 5. Detection time of DOX Salmonella

Fig. 4. Oxygen consumption curve of DOX Salmonella

Table 3. Reproducibility of DOX *Salmonella*

Assay	Detection time (hr)		
	Positive sample A	Positive sample B	Negative sample
1	2.72	4.52	ND
2	2.67	4.47	ND
3	2.68	4.33	ND
4	2.75	4.52	ND
5	2.70	4.42	ND
6	2.85	4.43	ND
7	2.88	4.42	ND
8	2.82	4.40	ND
9	2.98	4.53	ND
10	2.83	4.53	ND
Mean	2.79	4.46	ND
S.D.	0.10	0.07	
C.V. (%)	3.6	1.5	

ND: Not detected

Table 4. Comparison of DOX and conventional methods for the detection of *Salmonella* from 84 liquid egg samples using BPW : TT and BPW : RV cultures

Detection method	DOX			Conventional plating	
	Pre-enrichment	Enrichment		BPW : TT or BPW : RV	Detection rate (%)
Cultured medium	BPW	TT	RV		
Total no. of samples	84	84	84	84	(100.0)
No. of positive	11	10	10	10	(11.9)
No. of negative	73	74	74	74	(88.1)
No. of false-positive	1	0	0		
No. of false-negative	0	0	0		
Sensitivity (%)	100.0 (10/10)	100.0 (10/10)	100.0 (10/10)		
Specificity (%)	98.6 (73/74)	100.0 (74/74)	100.0 (74/74)		
Agreement (%)	98.8 (83/84)	100.0 (84/84)	100.0 (84/84)		
Conventional positive DT (hr)	4~7	3~9	3~7		
False positive DT (hr)	6	ND	ND		

DT: Detection time

Conventional method: used as a reference

モネラ陽性であった。

従来法検査結果と DOX 法検査結果の一致率は、DOX 法で前増菌培養液の BPW を測定すると 98.8%、選択増菌培養液の TT、RV を測定すると、いずれも 100% であった。BPW の測定では 1 検体が DOX 法で偽陽性（従来法：陰性、DOX 法：陽性）の結果であったが、従来法陽性の 10 検体は DOX 法でもすべて陽性を検出し、感受性は 100% であった。BPW の測定で偽陽性を検出した検体は殺菌凍結液卵で、一般生菌数が 5.8×10^3 個/ml と他に比べて高い検体であった。TT、RV を測定すると、従来法と DOX 法の検査結果は完全に一致した。DOX 法では従来法陽性検体を 3~9 時間で検出した (Table 4)。

(2) 鶏ミンチ肉検査

市販鶏ミンチ肉 32 検体の従来法検査は、EEM:HTT 培養から 11 検体の陽性が検出され、検出率は 34.4% であった。また、BPW:RV 培養から 16 検体の陽性が検出され、検出率は 50.0% であった。培養方法により検出率に差が認められ、BPW:RV 培養のほうが検出率は高

かった。

従来法検査結果と DOX 法検査結果の一致率は、DOX 法で前増菌培養液である EEM の測定で 71.9%、BPW の測定で 75.0%、選択増菌培養液である HTT の測定で 100%、RV の測定で 93.8% であり、前増菌培養液を測定するより選択増菌培養液を測定するほうが偽陽性と偽陰性（従来法：陽性、DOX 法：陰性）の検出数が減少して高い一致率が得られた。一致率が低かった前増菌培養液測定結果の感受性および特異性を比較すると、感受性は BPW の測定が 93.8% で EEM の 63.6% より高く、特異性は EEM が 76.2% で BPW の 56.3% より高かった。また、選択増菌培養液の測定結果は RV の測定で偽陽性 2 検体を検出し、特異性は 87.5% を示したが、DOX 法は HTT と RV の測定で従来法陽性検体をすべて陽性に検出し、感受性は 100% であった。従来法の検出率の違いを反映して、RV 測定のほうが HTT 測定に比べて一致率は低い、より多くの従来法陽性検体を検出することができた。

DOX 法の検出時間は、選択増菌培養液を測定すると、

Table 5. Comparison of DOX and conventional methods for the detection of *Salmonella* from 32 minced chicken meat samples using EEM:HTT and BPW:RV cultures

Detection method	DOX				Conventional plating			
Culture medium	Pre-enrichment		Enrichment		Detection		Detection	
	EEM	BPW	HTT	RV	EEM:HTT	rate (%)	BPW:RV	rate (%)
Total no. of samples	32	32	32	32	32	(100.0)	32	(100.0)
No. of positive	12	22	11	18	11	(34.4)	16	(50.0)
No. of negative	20	10	21	14	21	(65.6)	16	(50.0)
No. of false-positive	5	7	0	2				
No. of false-negative	4	1	0	0				
Sensitivity (%)	63.6 (7/11)	93.8 (15/16)	100.0 (11/11)	100.0 (16/16)				
Specificity (%)	76.2 (16/21)	56.3 (9/16)	100.0 (21/21)	87.5 (14/16)				
Agreement (%)	71.9 (23/32)	75.0 (24/32)	100.0 (32/32)	93.8 (30/32)				
Conventional positive DT (hr)	3~9	3~10	5~13	3~4				
False positive DT (hr)	3~14	3~11	ND	9~10				

DT: Detection time

Conventional method: used as a reference

Table 6. Comparison of DOX and conventional methods for the detection of *Salmonella* from 20 minced chicken meat samples using HTT and RV direct enrichments

Detection method	DOX		Conventional plating			
Culture medium	Direct enrichment		HTT	Detection rate (%)	RV	Detection rate (%)
	HTT	RV				
Total no. of samples	20	20	20	(100.0)	20	(100.0)
No. of positive	13	14	8	(40.0)	10	(50.0)
No. of negative	7	6	12	(60.0)	10	(50.0)
No. of false-positive	5	4				
No. of false-negative	0	0				
Sensitivity (%)	100.0 (8/ 8)	100.0 (10/10)				
Specificity (%)	58.3 (7/12)	60.0 (6/10)				
Agreement (%)	75.0 (15/20)	80.0 (16/20)				
Conventional positive DT (hr)	2~ 6	2~4				
False positive DT (hr)	7~13	3~8				

DT: Detection time

Conventional method: used as a reference

従来法陽性検体は HTT の測定で 5~13 時間, RV の測定で 3~4 時間であり, RV の測定のほうが短時間の検出が可能であった。また, RV の測定で偽陽性を検出した 2 検体の検出時間は 9~10 時間であり, DOX 法では偽陽性検体と従来法陽性検体とが検出時間で区別できる可能性が示された。しかし, 前増菌培養液の測定ではこのような結果は得られなかった (Table 5)。

鶏ミンチ肉 20 検体を前増菌培養せずに HTT, RV で直接培養した従来法検査は, HTT から 8 検体の陽性が検出され, 検出率は 40%, RV から 10 検体の陽性が検出され, 検出率は 50%であった。RV による直接培養のほうが検出率は高かった。

DOX 法検査結果と従来法結果の一致率は HTT の測定で 75.0%, RV で 80.0%であり, 前増菌培養と選択増菌培養の 2 段階培養液の検査結果と比べると低い一致率であった。DOX 法の検査結果は, 偽陰性は検出されず, 感受性は 100%であったが, 10 検体測定中 4~5 検体の偽陽性を検出し, 特異性は 58.3~60.0%で低い結果であった。

DOX 法の検出時間は, 従来法陽性検体では HTT の測定で 2~6 時間, RV の測定で 2~4 時間, 偽陽性検体では HTT の測定で 7~13 時間, RV で 3~8 時間であった。両培養液とも偽陽性検体の検出時間が従来法陽性検体の検出時間に比べて長い傾向は認められたが, BPW:RV の 2 段階培養液の測定結果のように, 明らかに検出時間で区別することはできなかった (Table 6)。

考 察

DOX セル内に充填する培地として RV を選択し, 運転温度を 42℃に設定することによって, 測定再現性とサルモネラ選択性に優れた DOX を用いたサルモネラ検出法を開発することができた。SC, SBG, TT および HTT が DOX セル用培地として適さなかった理由は, 亜セレン酸塩や沈降炭酸カルシウムが酸素電極に対して影響を与えるため, 良好な酸素消費曲線が作成できなかったものと考えられる。また, サルモネラに対する高い選択性を持つ RB や DNPBN が RV に比べて検出時間が遅い理由は, 塩化マグネシウム濃度¹⁰⁾や添加された

ノボビオシンの影響を受けたことが考えられる。上述した DOX セル用培地として適さなかった培地で培養した菌液を、試料として DOX 法で測定する場合には、接種量が $20\ \mu\text{l}$ ならば RV で得られるサルモネラ酸素消費曲線に影響を及ぼさないで、さまざまな培養液の DOX 法検査が可能である。

培地の調製後の保存安定性は、その培地の使用者にとって重要な問題であり、用時調製の PTT や RB に比べて冷蔵保存で 7 週間安定⁸⁾な RV を選択し、頻繁な培地調製の手間を省くことができた。

本法のサルモネラ検出時間は、簡易・迅速法であるイムノクロマト法の検出感度とされる 10^6 個/ml の菌液を 8 時間以内に検出できる結果であった。しかし、菌濃度が下がるにつれて検出時間は遅くなり、 10^4 個/ml 以下では 24 時間測定しても電流の閾値以下の低下は認められなかった。この原因は、DOX-60F が 42°C の運転を続けると、DOX セル内部の培地が徐々に濃縮された影響によるものと考えられる。これによりサルモネラの増殖が抑制され、特に初期菌数の低い検体でその影響を顕著に受け、検出時間の遅延につながったと考えられる。また、経時的な変化として観察される電流値のベースラインの上昇も培地濃縮の影響が現れたものと思われ、この結果、菌増殖に伴い低下する電流値が設定した閾値にまで到達しなくなる現象も起きていると考えられる。

検出時間を比較すると、前述したイムノクロマト法をはじめとした免疫測定法が 10~60 分であることに比べると、DOX 法は決して迅速な測定法とは言えない。しかし、免疫測定法がサルモネラの抗原決定部位を増やすために、従来法と異なった培養が新たに必要であったり²⁾、測定用試料の前処理として加熱が必要であったり¹⁾のに対して、DOX 法は新たな培養や試料の前処理は必要とせず、従来法の培養液をそのまま試料として検査を行うことができるのが特長である。

DOX セル内に RV を充填し、DOX-60F を 42°C で運転することは、従来法の選択増菌培養工程を DOX セル内で行っていることになり、この条件で増殖できる菌は DOX-60F により自動検出される。従来法が分離および同定行程を経てサルモネラを検出するのにに対して、DOX 法は DOX セル内での選択増菌培養中にサルモネラを検出するため、結果が従来法と完全に一致するわけではないが、分離培養と同定にかかる時間を短縮し、検出は機械により自動判定を可能にしたことでサルモネラ検査の迅速・簡便化を達成した。

基礎検討では、サルモネラ以外の腸内細菌を単独で DOX セル内に 10^6 個接種しても DOX 法では検出されない結果であった。しかし、実際に鶏ミンチ肉を検査してみると、前増菌培養液の測定で 32 検体中 5~7 検体の偽陽性が検出された。この原因は、多数のサルモネラ以外の腸内細菌群が高濃度で前増菌培養液中に存在すると、これを接種された DOX セル内の RV 中でも菌の増

殖を抑制できずに、偽陽性を検出したものと考えられる。また、32 検体中 1~4 検体の偽陰性を検出する原因は、鶏ミンチ肉中の多量の夾雑菌が前増菌培養中に急激に増殖したため、汚染菌数の少ないサルモネラが DOX 法で検出可能な初期菌数に達するまでの増殖を抑制され³⁾、この培養液を DOX セルに接種したことにより偽陰性を検出したものと考えられる。今回の検討で、EEM の測定で特異性が高い結果が得られた理由は、EEM の含む弱い選択性が反映したものであり、BPW の測定で感受性が高い結果が得られた理由は BPW による菌の非選択的な増殖が反映したものと考えられる。

これに対して、鶏ミンチ肉の選択増菌培養液を DOX 法で測定すると、偽陽性と偽陰性の検出が減少し、従来法との一致率の上昇も認められた。その理由は、この検出方法は、DOX セル内で 2 度目の選択増菌培養を行っていることになり、これによりサルモネラ以外の腸内細菌群の増殖抑制強化と、サルモネラの DOX 法検出可能菌数までの増殖が達成されて、偽陽性と偽陰性の検出が減少したのとも考える。また、2 度の選択増菌培養で菌数が減少した腸内細菌群は、DOX 法の検出時間が遅くなり、サルモネラ汚染検体の検出時間と偽陽性検体の検出時間が区別できる結果になったものと考えられる。選択増菌培養液の DOX 法検査により、従来法検査結果と 90% 以上の一致率が得られ、偽陰性が検出されなかったことは、本法がサルモネラ汚染のスクリーニング検査法として十分な性能であると評価できる。DOX 法により培養開始 3 日後に鶏ミンチ肉のサルモネラ汚染の自動判定が可能であった。なお、従来法は汚染菌株の分離、さらに菌株の型別の上で必ず並行して実施しなければならない。

RV と HTT の選択増菌培地による鶏ミンチ肉の直接培養液の測定では、この培養でサルモネラは DOX 法で検出可能な初期菌数に達したが、サルモネラ陰性検体中の多数の腸内細菌群も増殖して培養液中に含まれる状態となり、これを DOX セルに接種したため、多くの偽陽性を検出して特異性が約 60% の低い結果になったものと考えられる。従来法検出結果と DOX 法検出結果の一致率は 75~80% であり、偽陰性は検出しなかったものの、スクリーニング検査法としてはやや不十分な成績であった。

液卵の検査では、検体中の腸内細菌群の汚染が少ないため、前増菌培養のみでサルモネラ汚染検体中のサルモネラは DOX 法で検出可能な初期菌数まで増殖できたと考えられる。この培養液を DOX セルに接種すると、従来法の検出結果とよく一致する DOX 法検出結果が得られたが、偽陽性を検出した 1 検体は一般生菌数が他の検体と比べて高く、DOX セル内でも雑菌が増殖した結果、偽陽性を検出したと考えられる。DOX 法による液卵のサルモネラ検査は、前増菌培養液の検査で従来法検査結果と 95% 以上の一致率を示す良好な成績が得られ、培

養開始2日後にサルモネラ汚染の自動判定が可能であった。特に規格基準が設定されている殺菌液卵のスクリーニングテストとして有用と思われる。

要 約

DOX セル内に充填するサルモネラ増菌培地に RV 培地を選択し、運転温度を 42℃とすることで DOX を用いたサルモネラ検査法が開発できた。本法を評価して以下の結論を得た。

- 1) 本法の検出同時再現性とサルモネラ選択性は良好であった。
- 2) 10^6 個/ml のサルモネラ培養液を 8 時間以内に検出することができた。
- 3) 食品検体からの検出のために DOX セルへ接種する試料は従来法の検査で得られる前増菌または選択増菌培養液を用いるため、従来法と並行して検査を行うことが可能であった。
- 4) 液卵検体の検討では、本法の前増菌培養液検査結果と従来法検査結果は 95%以上の高い一致率を示し、培養開始 2 日後にサルモネラ汚染の自動判定が可能であった。
- 5) 鶏ミンチ肉検体では、選択増菌培養液の検査で 90%以上の一致率が得られ、培養開始 3 日後にサルモネラ汚染の自動判定が可能であった。
- 6) 本法が液卵や鶏肉に関わる食品製造現場において、迅速・簡便なサルモネラスクリーニング検査法として有用と評価された。

謝 辞

未殺菌液卵をご提供くださいましたキューピー株式会社ならびに本研究を進めるにあたってご尽力くださいましたヤマエ久野株式会社の渡邊 智氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Blas, B. W. and Yamazaki, H.: Extraction of *Salmonella* antigens in non-sedimentable forms for enzyme

- immunoassay. Int. J. Food Microbiol., **9**, 63-73 (1989).
- 2) Hongsheng, H., Manuel, M. G., Brian, W. B., Klaus, N. and Sze-Park, N.: Evaluation of culture enrichment procedures for use with *Salmonella* detection immunoassay. Int. J. Food Microbiol., **51**, 85-94, (1999).
- 3) Jameson, J. E.: A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. J. Hyg. Camb., **60**, 193-207 (1962).
- 4) 川崎 晋, 名塚英一, 稲津康弘, 天野義久, 吉田雅一, 一色賢司: 酸素電極 DOX system を用いた大腸菌群の迅速測定の試み. 日本食品衛生学会第 83 回学術講演回講演要旨集, p. 24 (2002).
- 5) 厚生省生活衛生局: 生食用食肉等の安全性確保について. 平成 10 年 9 月 11 日, 衛乳第 221 号 (1998).
- 6) 厚生省生活衛生局: 食品衛生法施行規則及び食品, 添加物等の規格基準の一部改正について. 平成 10 年 11 月 25 日, 生衛発第 1674 号 (1998).
- 7) 厚生労働省ホームページ, 食品安全情報, 年次別食中毒発生状況.
- 8) MERCK 微生物マニュアル, p. 142, メルク・ジャパン, 東京 (2002).
- 9) 仲西寿男: サルモネラ. 食品衛生検査指針微生物編. 厚生省生活衛生局監修, p. 118-126, (社)日本食品衛生協会, 東京 (1990).
- 10) Peters, M., Wiberg, C. and Norberg, P.: The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in home-made and in commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadias broth. J. Appl. Bacteriol., **66**, 523-528 (1989).
- 11) Tian, H., Miyamoto, T., Okabe, T. Kuramitsu, Y., Honjyo, K. and S. Hatano.: Rapid detection of *Salmonella* spp. in Foods by combination of a new selective enrichment and a sandwich ELISA using two monoclonal antibodies against dulcitol 1-phosphate dehydrogenase. J. Food Prod., **59**, 1158-1163 (1996).
- 12) 吉田雅一: 酸素電極法 (DOX) による微生物検出技術の現状と将来像. ジャパンフードサイエンス, **42**, 73-79 (2003).

本報の要旨は第 24 回日本食品微生物学会学術総会 (2003 年, 岡山) において発表した。