

油粕および油粕製造環境のサルモネラ汚染の制御に関する研究

(Studies of the Control of *Salmonella* Contamination in Oil Meal  
and Oil Meal Production Environments)

北澤 秀基

油粕および油粕製造環境のサルモネラ汚染の制御に関する研究

(Studies of the Control of *Salmonella* Contamination in Oil Meal  
and Oil Meal Production Environments)

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

北澤 秀基

(指導教員：小林 眞理子)

# 目次

序論 .....	1
第一章 油粕工場における遅延二次増菌培養法の検討 .....	8
1-1 はじめに .....	8
1-2 材料および方法 .....	9
1-2-1 供試試料 .....	9
1-2-2 使用培地 .....	10
1-2-3 各試料からのサルモネラの検出 .....	10
1-2-4 統計処理 .....	11
1-3 成績 .....	11
1-3-1 油粕原料および環境拭き取り試料を用いた飼分法と DSE 法の比較 (調査 1) .....	11
1-3-2 油粕、油粕原料および環境拭き取り試料を用いた DSE 法に用いる選択増 菌培地の比較 (調査 2) .....	12
1-3-3 分離株の O 抗原群別 .....	13
1-4 考察 .....	13
第二章 油粕製造環境におけるサルモネラ汚染実態とその対策 .....	22
2-1 はじめに .....	22
2-2 材料および方法 .....	23
2-2-1 調査対象とした油粕工場の概要 .....	23
2-2-2 供試試料 .....	24
2-2-3 サルモネラの分離法 .....	24
2-2-4 使用薬剤 .....	24
2-2-5 作業床に使用する消毒剤の評価 .....	25

2-2-6	作業床のサルモネラ汚染対策 .....	25
2-3	成績 .....	26
2-3-1	油粕原料のサルモネラ汚染実態 .....	26
2-3-2	油粕工場のサルモネラ汚染実態 .....	26
2-3-3	作業床に使用する消毒剤の評価 .....	27
2-3-4	作業床のサルモネラ汚染対策 .....	28
2-4	考察 .....	28
第三章	油粕製造におけるサルモネラ制御技術の確立 .....	39
3-1	はじめに .....	39
3-2	材料および方法 .....	40
3-2-1	油粕工場および生産工程の概要 .....	40
3-2-2	供試試料 .....	40
3-2-3	サルモネラの分離法 .....	41
3-2-4	サルモネラ汚染対策 .....	41
3-2-5	統計処理 .....	42
3-3	成績 .....	42
3-3-1	油粕工程のサルモネラ汚染実態 .....	42
3-3-2	微粉回収工程のサルモネラ汚染実態 .....	42
3-3-3	工程内残留物除去前後の製品油粕および微粉の汚染実態 .....	42
3-4	考察 .....	43
第四章	製品油粕を対象としたサルモネラ簡易迅速検出法 .....	50
4-1	はじめに .....	50
4-2	材料および方法 .....	51
4-2-1	菌株および菌液の調製 .....	51
4-2-2	各前増菌培地の増殖速度の比較 .....	51

4-2-3	BPW と MP 培地を用いたサルモネラ検出率の比較 .....	52
4-2-4	各検出法 .....	52
4-2-5	BAX 法と QuickGene-BAX 法の比較 .....	53
4-2-6	更なる分析時間の短縮 .....	53
4-3	成績 .....	54
4-3-1	各前増菌培地の増殖速度の比較 .....	54
4-3-2	BPW と MP 培地を用いたサルモネラ検出率の比較 .....	54
4-3-3	BAX 法と QuickGene-BAX 法の比較 .....	54
4-3-4	更なる分析時間の短縮 .....	55
4-4	考察 .....	56
総括	.....	69
引用文献	.....	76
謝辞	.....	86

## 序論

サルモネラは、グラム陰性通性嫌気性の無芽胞桿菌であり、多くは周毛性鞭毛を持ち、運動性を示す（坂崎ら，1992）。ヒトに対して病原性を持つサルモネラには、腸チフスやパラチフスの原因となるものと、感染型食中毒を起こすものがある。後者のサルモネラは、1885年に Salmon と Smith によって豚コレラを発症した豚から初めて分離された。その後、1888年に Gärtner によって、病死した牛および牛の肉を喫食した食中毒患者から分離された。サルモネラの発育温度は 35～43℃で、10℃以下ではほとんど増殖できない（廣井，2014）。熱抵抗性は弱く、60℃、20分あるいは 70℃、数分の加熱で死滅する（廣井，2014）が、乾燥に強く、小麦（Crumrine ら，1969）、ピーナッツバター（Kataoka ら，2014）、乾燥ミルクやココアパウダー（Juven ら，1983）およびチョコレート（Podolak ら，2010）等、水分活性の低いさまざまな食品や飼料の中（Carlson ら，1970；Doesburg ら，1970；Morita ら，2004）および環境（Morita ら，2004）で長期間生残することが確認されている。

現在、サルモネラは分類学的に *Salmonella enterica*、*S. bongori* および *S. subterranea* の3菌種に分類され、さらに *S. enterica* は6亜種に分類される（CDC，2015）。また、血清学的には細胞壁およびその付近に存在する多糖質、たんぱく質、脂質の複合体である O 抗原と、鞭毛を構成するたんぱく質である H 抗原の組み合わせにより 2,500 種類以上に分類される（CDC，2015）。ヒトおよび動物に対して腸管系疾患またはチフス様疾患などの病原性を示すものの多くは、*S. enterica* の亜種 *enterica* に属している。我が国の動物から分離されるサルモネラの主要な血清型は、牛では Typhimurium、Dublin、Enteritidis および Naestved、豚では Choleraesuis、Derby、Typhimurium、London および Enteritidis、鶏では Sofia、Thompson、Blockley、Infantis、Typhimurium および Enteritidis など（伊藤ら，1999年）で、Enteritidis

および *Typhimurium* は、家畜からの分離でも上位を占めている（廣井、2014）。従って、*S. Enteritidis* および *S. Typhimurium* は、食中毒の原因として上位を占めている（廣井、2014）。また、*S. Choleraesuis* は豚、*S. Dublin* は牛にサルモネラ症を起こす（坂崎ら、1994）。これら 4 血清型は家畜および食品衛生上極めて重要なサルモネラであるため、家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている（農林水産省、2004 年 b）。

サルモネラ食中毒は多くの国で報告されており、大規模事例は鶏卵（Kuehn, 2010 ; Moffatt ら、2012）等を原因食品とするものが多い。米国アイオワ州の鶏卵業者がサルモネラに汚染されている恐れがあるとして、約 5 億 5,000 万個の鶏卵を回収した事例も発生している。米国疾病対策センター（CDC）によると、この汚染鶏卵が原因とみられる食中毒患者は 2,000 人以上に上ると報告されている（Kuehn, 2010）。原因食品は鶏卵以外にも、ピーナッツバター（CDC, 2013）、食肉製品（Bremer ら、2004 ; Luzzi ら、2007 ; Torres ら、2012）、野菜や果実（Brooks ら、2001 ; Mahon ら、1997 ; Miller ら、2013）など多岐にわたっている。日本国内では、1936 年に静岡県浜松市の中学校の運動会で、サルモネラに汚染された餡を使用して製造された大福餅を食べ、死者 44 名を含む患者 2,201 人を記録した大規模食中毒が発生している（小沼, 2014）。1988 年には、北海道で錦糸卵を原因とした患者数 10,476 名のサルモネラ食中毒が発生しており、本事例は 2000 年に加工乳および乳製品を原因として発生したブドウ球菌による食中毒患者数 13,420 名に続く発生患者数の多い食中毒事例として記録されている（山本、2007）。1980 年代半ばから、米国や欧州で、産卵用鶏に *S. Enteritidis* が侵入し、卵がサルモネラに汚染され、卵料理によるサルモネラ食中毒が激増した。日本国内でも、1990 年代から同様の傾向が見られるようになった（伊藤ら、1996）。このような状況を受け、国は 1998 年に鶏卵の低温保存および期限表示などの対策を施行した（厚生省、1998）。また、種鶏場、ふ卵場および採卵養鶏場に対して衛生管理のガイドラインを示し（農林水産省、1993 ; 2005）、大規模な採卵養鶏場に対して

は危害分析・重要管理点（Hazard Analysis and Critical Control Point ; HACCP）による衛生管理や *S. Enteritidis* に対するワクチンを鶏に接種することを推進し（農林水産省，2002）、飲食店に対しては、サルモネラが死滅する加熱処理の徹底を呼びかけた（厚生労働省，2016b）。以上のような対策の結果、2000 年以降は、サルモネラ食中毒は事件数、患者数ともに減少傾向を示しており、近年においてはサルモネラを原因とした食中毒患者数は年間 400 人から 4,000 人程度で推移している（厚生労働省，2016a）。しかし、現在でも鶏卵内部のサルモネラ汚染は継続的に確認されており、特に、老人施設や病院の集団給食施設におけるサルモネラ食中毒では鶏卵の関与が高い（伊藤，2009）。また、従来から問題になっている鶏肉におけるサルモネラ汚染は近年も改善が見られず、その安全性が懸念されている。最近の調査においても汚染率は国産鶏肉で 47.4%、輸入鶏肉で 17.7%に達していた（小野，2014）。汚染の原因として、家禽の飼育段階におけるサルモネラ汚染の要因が多いこと（中村，1994）が考えられる。特に配合飼料（飼料）を介した家禽の汚染は重要視されている（佐藤，1990；2003）。

たんぱく源としての飼料原料は、動物性と植物性に大別され、動物性のものには、魚粉、肉粉、肉骨粉、血粉、骨粉、フェザーミールおよび脱脂粉乳など（杉林ら，2014）がある。油粕は、植物性のたんぱく源の一つであり、食用油製造過程において大豆や菜種などの油糧種子から、圧搾またはヘキサン抽出によって油を取り除いた残渣である。油粕はヘキサン抽出後、脱溶剤、乾燥、冷却および整粒などの工程を経て製造される（佐藤ら，1999）。たんぱく質含量が高く、必須アミノ酸の含有量に優れる油粕（鎌田ら，2005）は、各動物の飼料に使用されており、特に養豚、養鶏、乳牛用飼料中での配合割合が高い（杉林ら，2014）。油粕の原料は、大豆や菜種その他、綿実、落花生、サフラワーおよびひまわりなど様々であり、それらの飼料的価値も多岐にわたる。例えば、大豆油粕を与えられた乳牛から得られたバターの硬度が低いこと、肉牛では肥育効果が高いことが指摘されている（渋井ら，2012）。しかし、汚染の程度に



差はあるものの、飼料の多くからサルモネラが検出されることも指摘されている（佐藤，1990；2003）。1948年に飼料の原材料の一つであった卵が原因となり、飼料におけるサルモネラ汚染が初めて報告された（Edwards ら，1948）。そして、1950年代から1970年代には、サルモネラの汚染・疫学調査が飼料を対象に盛んに行われた。この時の主な汚染源となった原料は、肉骨粉および魚粉などの動物性たんぱくであり、汚染率は肉骨粉で4.0～86.4%、魚粉で3.3～56.3%と報告されている（Williams，1981）。我が国においても、当時の生産量が世界第2位であった魚粉が、サルモネラの汚染源であると指摘された（橋本，1968；橋本ら，1966）。他方、油粕を含む植物性の飼料原料におけるサルモネラ汚染に関しては、1950年代後半からノルウェー、英国および米国などで報告されているものの、汚染率は10%以下と低く（Allred ら，1967；Edwards ら，1967；Grumbles ら，1961；Hauge ら，1958；Taylor，1960；Timoney ら，1970）、汚染源としての重要性は低いと考えられ、製造工場における詳細な汚染調査は行われていない。我が国では、1980年頃から油粕のサルモネラ汚染が詳細に調査され始めた。1983年から1988年のサルモネラ汚染率は、大豆粕では5.9%であったものの、大豆に比べ油分の多い菜種粕とサフラワー粕では、それぞれ30.4%と52.4%に達している（木下ら，1988；小林ら，1989a；1989b）。1979年から1996年までの調査では油粕全体の汚染率は9.4%であったが（佐藤，2003）、近年の油粕のサルモネラ汚染率は、2013年は5.6%、2014年および2015年は0%と低下傾向で推移している（農林水産省，2015；2016）。しかし、農林水産省の調査ではサンプル数が数十検体と少ないため、油粕のサルモネラ汚染の実態が正確に反映されていないと考えられる。年間数千検体を分析する油粕工場では、散発的ではあるが未だサルモネラ汚染が確認されており、実際に経済的な損失が発生している。

2001年の牛海綿状脳症（bovine spongiform encephalopathy；BSE）の発生を受けて、我が国では、牛、羊などの反芻動物用飼料原料に肉骨粉、肉粉および骨粉などの動物由来の原料の使用が禁止された（農林水産省，2003）。そのため、動物由来の

たんぱく質に代わるものとして、植物由来の油粕が使用されることとなり、飼料における油粕の重要性が増すこととなった。実際に BSE 発生前の 2000 年には、油粕の配合割合は 12.5%であったものが、発生後の 2002 年には 14.5%まで増加している（農林水産省, 2004a）。現在、我が国における国内産油粕および輸入油粕の飼料消費量は、それぞれ約 322 万 t および約 228 万 t である（農林水産省, 2016；財務省, 2016）。従って、前述した様に油粕のサルモネラ汚染率は動物性たんぱく源の飼料原料のそれよりも低いものの、その実態を把握することは畜産衛生上重要と考えられる。

油粕工場では、油粕原料、作業床、作業者の靴裏や治具、機械装置、衛生動物およびエア等の製造環境にサルモネラが常在化し（Morita ら, 2006）、製造工程内の残留物からもサルモネラが検出される場合がある。一般的に油粕工場のサルモネラは加熱、乾燥、薬剤および紫外線などのストレスを受け損傷している可能性が高い。さらに、製造環境では複合汚染が疑われるため（Morita ら, 2006）、疫学解析に用いる検出法の感度および精度を高める必要がある。損傷菌を効率的に分離するために、従来から培養条件の変更（D'Aoust ら, 1992）や濃縮法の開発（Shaw ら, 1998）が行われてきた。また、家禽衛生分野では、低濃度の汚染および損傷菌に対する検出率を高める目的で、選択増菌培地の培養時間を極端に延長した遅延二次増菌培養法（delayed secondary enrichment method : DSE 法）が推奨されている（Waltman ら, 1991）。しかし、これらの方法を用いた油粕の製造施設および製造環境を対象とした調査はほとんど行われていないのが現状である。

我が国の油粕工場は、製品油粕の保管容量が不十分な場合が多く、しばしばサルモネラ検査の判定前に、製品が出荷されている。従って、油粕工場における製品油粕のサルモネラ検査には、簡便性と迅速性が求められ、これまでに 1-2 テスト（Erdman ら, 2003）、*Salmonella*-Tek（Desmidt ら, 1994）、Singlepath *Salmonella*（Lindhardt ら, 2009）および Dynabeads anti-*Salmonella*（Shaw ら, 1998）などの簡易迅速キットが用いられてきた。しかしこれらの手法は、結果判明までに早くても 30 時間か

ら 3 日を要するため、検査時間の短縮に取り組む飼料工場ではより迅速かつ簡易な検出法の導入が課題となっていた。このような課題を受けて、近年、リアルタイム PCR を原理とする簡易迅速検出法が開発され、検査時間は 24 時間程度にまで短縮された (Belete ら, 2014)。しかし、我が国の油粕工場における生産量および保管能力を考慮すると、迅速性に関してはいまだ不十分であり、さらなる検査時間の短縮が求められている。安全な飼料または油粕を迅速に出荷できるシステムを構築するためには、10 時間程度で判定可能な検出法を確立することが必要である。しかし、時間短縮に関する報告は少なく、また検査機器および対象とする試料や菌種ごとの最適な条件は確立されていない場合が多い。一方で、試料および前増菌培地成分が PCR の増幅反応や DNA の検出を阻害する (Ganz ら, 2013) ことも報告されており、それらに影響しない PCR 用前増菌培地を選定することが重要な課題となっている。

木下ら (1988) の研究において、我が国の油粕からは、Mbandaka、Lexington、Agona および Cubana の血清型が検出されたことが指摘されている。これらの血清型は配合飼料からも同様に分離された (小林ら, 1989a) ことから、油粕が飼料汚染の要因の一つである可能性が示唆された。このため、先行研究において、国内の油粕工場を対象として詳細なサルモネラ汚染調査を行い、製造環境における特定の区域は高頻度でサルモネラに汚染されていること (Morita ら, 2006)、油粕中のサルモネラは低温、高油分および低水分活性の条件下で生残性が高まること (Morita ら, 2004) を明らかにした。一般的に、製造環境は高油分および低水分活性の状況にあり、サルモネラが常在化しやすいと考えられ、殺菌等の対策が重要である。油粕製造工場と類似する環境として養鶏場および牛舎があり、作業床、壁、土壌など、特に汚染が高いと考えられる環境を消毒、殺菌する方法として、様々な消毒方法が報告されている (中村, 1997 ; 横関ら, 1997 ; 1998)。しかし、筆者は、これらの手法の応用例に関する油粕工場における環境対策に関する十分な研究を見出すことができなかった。また、油粕製造工程におけるサルモネラの制御技術についても、ほとんど報告例がないと考

えられた。油粕中の血清型に関しても、筆者は、木下ら（1988）の研究以降のものに関して、有意な報告を見出すことができなかった。

以上のことから本研究においては、複数の国および工場において油粕工場のサルモネラ汚染実態を明らかにするとともに、製造環境および製品油粕のサルモネラ汚染を低減させることを目的として、油粕工場に適した検査方法、製造環境および製品油粕のサルモネラ汚染対策に関する検討を行った。まず第一章においては、サルモネラ分離に適した方法として DSE 法を検討した。第二章においては、日本とインドにおける計 4 箇所の油粕工場のサルモネラ汚染実態を明らかにするとともに、効果的な作業床のサルモネラ汚染対策を検討した。第三章においては、工程内残留物の除去および微粉の除去という 2 種類の対策により、油粕のサルモネラ汚染が軽減することを、実際の製造工程を対象として検討した。第四章においては、最終製品の検査に適した方法として、MP 培地およびリアルタイム PCR を組み合わせて約 10 時間でサルモネラを検出できる簡易迅速検出法を検討した。以上の検討により、油粕および製造環境のサルモネラ汚染実態とその制御法を明らかにすることを本研究の目的とした。

## 第一章 油粕工場における遅延二次増菌培養法の検討

### 1-1 はじめに

先行研究において、油粕におけるサルモネラ汚染の原因は主に油粕工場における環境からの二次汚染であることを指摘している（Morita ら，2006）が、製品油粕や油粕製造環境のサルモネラ汚染は、皆無になっていない。食の安全・安心が問われ農場から食卓（from farm to table）までの一貫した衛生管理が求められている今日、家畜、家禽の餌となる油粕のサルモネラ汚染の制御は、重要な課題の一つと考えられる。

飼料および食品の製造工程を汚染したサルモネラは、乾燥に強いいため、長期間残存すること（Morita ら，2004；対馬ら，2000）が指摘されており、油粕製造環境にもサルモネラが常在することが明らかにされている（Morita ら，2004；Morita ら，2006）。このような汚染実態を正確に把握するためには、検出感度および精度に優れた検出法が求められる。また、サルモネラの複合汚染に対処するためには、多様な血清型のサルモネラを効率良く分離できる手法を開発することが重要である。以上のような手法により、疫学的解析の精度が向上すると考えられる。しかし、一般的に環境を汚染しているサルモネラは菌量が少なく、乾燥あるいは消毒のための薬剤や紫外線などに暴露されている。また、サルモネラは製造工程においては加熱や乾燥の処理を受けている。そのため、環境や油粕中のサルモネラは損傷している可能性が高い。このような菌量が少ない環境におけるサルモネラ汚染および損傷菌に対する検出率を高めるための方法として増菌培養法があげられ、家禽衛生の分野での検討が数多くなされている（鶏病研究会，2001；Schultz ら，2012；Soria ら，2013a；2013b）。これらの手法の中でも、DSE 法（Pourciau ら，1978）は、古くから用いられている。本手法は、2段階にわたり選択増菌培養することで、公定法である飼料分析基準に準じた方法（農林水産省消費・安全局長通知，1995）（以下、飼分法）よりも検出率を上げることを目的とし、家禽衛生の分野では本法を用いた検討が多い（Brooks ら，2014；鶏病研

究会，2001；中村ら，1997；Waltman ら，1991)。しかし、今回対象とする油粕製造施設では、DSE 法を含めたサルモネラ検出法の検討はほとんど行われていない。

以上のことから、本章では、油粕工場で採取した試料を用いて、飼分法と DSE 法のサルモネラ検出率を比較するとともに、DSE 法に用いる選択増菌培地を評価した。さらに、飼分法と DSE 法で分離されたサルモネラの O 抗原を調査し、家禽およびその生育環境の汚染調査で古くから用いられている DSE 法の油粕工場への応用を評価した。

## 1-2 材料および方法

### 1-2-1 供試試料

飼分法と DSE 法の検出率の比較を調査 1、DSE 法に用いる選択増菌培地の比較を調査 2 とした。調査 1 において供試した試料は、日本の油粕工場で採取した油粕原料 34 検体（大豆 19 検体、菜種 15 検体）および環境拭き取り試料 92 検体（作業靴 48 検体、機械装置 29 検体、作業床 15 検体）の計 126 検体である。また、調査 2 において供試した試料は、油粕 14 検体（大豆粕 14 検体）、油粕原料 26 検体（大豆 5 検体、菜種 5 検体、混合 16 検体）および環境拭き取り試料 14 検体（作業靴 6 検体、作業床 8 検体）の計 54 検体である。油粕試料として、製造工程および保管施設より製品油粕を 25g 採取して用いた。原料船の船倉または工場内への搬入工程から、大豆など油粕の原料を 25 g 採取し、これを油粕原料試料とした。油粕原料試料には、埃や土等の微粉が含まれていた。環境拭き取り試料の採取には、ペプトン加生理食塩水を浸漬させた滅菌綿棒または滅菌ガーゼを使用した。作業靴は片足のみを対象とし、裏面全体を拭き取り 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 cm<sup>2</sup>の面積を拭き取った。なお、すべての試料を日本の油粕工場で採取した。

### 1-2-2 使用培地

前増菌培地として 0.6%Tween80（東京化成工業）加ペプトン水（BPW：OXOID）、選択増菌培地としてハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地（HTT：日本製薬）、セレンイットシスチン基礎培地（SC：日水製薬）、ラパポート・バシリアディスサルモネラ増菌培地（RV：日水製薬）およびテトラチオネイト・ブリリアントグリーン胆汁増菌培地（TBG：Merck）、選択分離培地として DHL 寒天培地（DHL：日水製薬）および CHROMagar *Salmonella*（CAS：CHROMagar）を用いた。また TSI 寒天培地（TSI：栄研化学）と LIM 寒天培地（LIM：栄研化学）を生化学試験に用いた。

### 1-2-3 各試料からのサルモネラの検出

調査 1 および調査 2 における飼分法と DSE 法のサルモネラ検出法のフローチャートをそれぞれ図 1-1 および図 1-2 に示した。

調査 1 では、油粕原料 25 g をストマッカー袋に秤量し、前増菌培地 BPW225 mL を加えて 2 分間ストマッキングした後、35℃で 18～24 時間培養した。また、環境拭き取り試料については、綿棒またはガーゼをストマッカー袋に入れ、BPW100 mL を加えて 1 分間揉みほぐした後、同様の条件下で培養した。選択増菌培養には、HTT および SC を用いた。以上の培地を中試験管に 10 mL ずつ分注し、HTT には 1 mL、SC には 0.1 mL の BPW 前増菌培養液を接種した。その後、42℃で 22～24 時間の条件下で培養した。それぞれの選択増菌培養液を DHL 上または CAS 上に画線し、35℃で 18～24 時間培養した。さらに、それぞれの選択分離培地上に発育したサルモネラの典型的な集落を釣菌し、TSI および LIM に接種して 35℃で 18～24 時間培養後、TSI ではブドウ糖分解能、乳糖・白糖分解能および硫化水素産生能、LIM では硫化水素産生能、インドール産生能および運動性等の性状を確認した。なお、選択分離培地 1 平板につき 1～5 集落を釣菌した。その後、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。

調査 1 における DSE 法では、HTT を用いた飼分法の選択増菌培養後、室温（20～25℃）で 5～7 日間、引き続き培養した。その後、各培養液を新たな HTT10 mL に、1 mL 接種し、同様の条件下で培養し、菌の分離を行った。

調査 2 では、調査 1 と同様の条件下で前増菌培養を行った後、選択増菌培養には HTT、RV および TBG を用いた。以上の培地を中試験管に 10 mL ずつ分注し、HTT および TBG には 1 mL、RV には 0.1 mL の BPW 前増菌培養液を接種した。その後、HTT および RV は 42℃、22～24 時間、TBG は 35℃、22～24 時間の条件下で培養した。

調査 2 における DSE 法では、飼分法の選択増菌培養後、室温（20～25℃）で 5～7 日間、引き続き培養した。その後、各培養液を新たな同種の選択増菌培地 10 mL に、1 回目の培養と同量接種し、同様の条件下で培養し、菌の分離を行った。

#### 1-2-4 統計処理

飼分法と DSE 法のサルモネラ検出率の比較には、フィッシャーの正確確率検定を用いた。

### 1-3 成績

#### 1-3-1 油粕原料および環境拭き取り試料を用いた飼分法と DSE 法の比較

##### （調査 1）

油粕原料（大豆 19 検体、菜種 15 検体）および環境拭き取り試料（作業靴 48 検体、機械装置 29 検体、作業床 15 検体）の計 126 検体からのサルモネラの検出結果を図 1-3 に示した。DSE 法では 18 検体（14.3%）がサルモネラ陽性と判定され、飼分法でサルモネラを検出できなかった 2 検体からもサルモネラを分離することができた。飼分法においては、HTT-DHL 法および HTT-CAS 法、SC-CAS 法、SC-DHL 法の順でサルモネラを多く分離することができた。しかし、全体の検討では DSE 法と各種飼



分法における検出率の間には有意な差は得られなかった ( $p>0.05$ )。

試料別に見ると、油粕原料（大豆）では DSE 法（36.8%）、HTT-DHL 法、HTT-CAS 法および SC-CAS 法（26.3%）、SC-DHL 法（21.1%）の順、油粕原料（菜種）では DSE 法、HTT-DHL 法および HTT-CAS 法（33.3%）、SC-CAS 法（20.0%）、SC-DHL 法（13.3%）の順でサルモネラを多く分離することができた。選択増菌培地では HTT、選択分離培地では CAS を用いた方が、検出率が高い傾向を示した。また、環境拭き取り試料における検出率は各種飼分法と DSE 法が同一の検出率となり、方法間に有意な差は見られなかった（図 1-3）。

#### 1-3-2 油粕、油粕原料および環境拭き取り試料を用いた DSE 法に用いる選択増菌培地の比較（調査 2）

油粕 14 検体、油粕原料 26 検体（大豆 5 検体、菜種 5 検体、大豆と菜種の混合 16 検体）および環境拭き取り試料 14 検体（作業靴 6 検体、作業床 8 検体）の計 54 検体からのサルモネラの検出結果を図 1-4 に示した。選択増菌培地には HTT に加え、飼料や食品からのサルモネラの分離にしばしば用いられる RV および TBG を採用した。また、選択分離培地には CAS を用いた。

選択増菌培地に HTT を用いた場合は、飼分法と DSE 法では検査結果は一致したが、RV および TBG を用いた場合は、DSE 法ではそれぞれ飼分法で陰性と判定された 1 検体からサルモネラを分離することができた。選択増菌培地の比較では、飼分法は HTT で 11 検体（20.4%）、RV で 10 検体（18.5%）、TBG で 9 検体（16.7%）が陽性、DSE 法では HTT および RV で 11 検体（20.4%）、TBG で 10 検体（18.5%）が陽性となった。試料別に見ると、環境拭き取り試料ではいずれの選択増菌培地を用いた場合においても飼分法と DSE 法の結果は一致した。一方、油粕および油粕原料では RV および TBG でサルモネラを分離できない試料が確認された。

### 1-3-3 分離株の O 抗原群別

調査 1 および調査 2 の分離株における O 抗原群別結果をそれぞれ表 1-1 および表 1-2 に示した。調査 1 では、HTT-DHL 法と DSE 法でともにサルモネラが分離された 16 検体（油粕原料試料番号 1、3 以外）のうち、分離株の O 抗原が異なっていたのは 7 検体（油粕原料試料番号 5～7、作業床拭き取り試料番号 1～4）（43.8%）であった。このうち、油粕原料試料番号 5～7 および作業床拭き取り試料番号 2～4 の 6 検体では、飼分法で検出されなかった O 抗原のサルモネラを、DSE 法で分離することができた。

調査 2 では、HTT を用いた場合は飼分法と DSE 法でともにサルモネラが分離された 11 検体のうち、O 抗原が異なっていたのは 2 検体（油粕原料試料番号 2、作業靴拭き取り試料番号 3）（18.2%）であった。また、RV を用いた場合は 10 検体中 1 検体（作業靴拭き取り試料番号 3）（10.0%）、TBG を用いた場合は 9 検体中 1 検体（作業靴拭き取り試料番号 3）（11.1%）で分離株の O 抗原が異なっていた。

### 1-4 考察

油粕の製造環境には複数のサルモネラが常在化している（Morita ら, 2006）。また、油粕中のサルモネラは、乾燥や熱処理などの製造工程により損傷している可能性がある。そのため、油粕工場では検出感度および精度に優れており、より多くの血清型のサルモネラを分離できる検出法が求められている。本章では、家禽を対象とした検査で使用実績のある HTT を用いた DSE 法と飼分法を比較した（調査 1）。さらに、HTT 以外の選択増菌培地を用いた DSE 法を評価した（調査 2）。

調査 1 では、作業靴および作業床の拭き取り試料については、DSE 法と飼分法の間には差は認められなかった。他方、油粕原料では、有意差は出なかったものの、いずれの飼分法よりも DSE 法で検出率が向上し、特に SC-DHL に比べ DSE 法の検出率は 2 倍であった。飼分法も、非常に検出率の高い方法であるため、DSE 法が検出率の向上に寄与するのは、試料中のサルモネラの菌数が少なく、かつ損傷している場合に

限定される。今回の作業靴と作業床の検討は、過去にサルモネラ菌数が MPN 値で  $10^3/100\text{ g}$  以上の塵芥が採取された区域 (Morita ら, 2004; 2006) で実施した。また、油粕原料は品種や産地によってサルモネラの汚染度が異なるが、そのほとんどが MPN 値で  $30/100\text{ g}$  以下であることが事前の調査で確認されている (盛田ら, 2007)。従って本研究では、サルモネラ菌数が高い作業靴と作業床の拭き取り試料では検出率に差が認められなかったが、菌数の少ない油粕原料では DSE 法で検出率が向上したものと考えられた。試料全体の中で、損傷菌が少量存在するものはごく一部であると考えられ、評価した試料全体で統計処理をした場合、有意差は出にくい。しかし、このような少量の損傷菌に汚染された試料においても、DSE 法は飼分法に比べ検出数が向上したことから、DSE 法は検出感度の高い方法であると考えられた。

D'Aoust ら (1992) は、RV、TBG および SC 培地を用いた DSE 法の検討で、検出率が、0.8~5.2% 上昇したことを報告している。そこで、調査 2 として、選択増菌培養に HTT、RV および TBG を用いて飼分法と DSE 法における検出率を比較した。結果、RV では油粕原料、TBG では大豆粕のそれぞれ 1 検体は、飼分法では陰性と判定されたが、DSE 法ではサルモネラが分離された。DSE 法に用いる選択増菌培地には HTT 法が適しているとの報告 (中村ら, 1997) があるが、RV や TBG などの選択増菌培地でも約 1 週間の培養により検出率が向上する可能性が示唆された。

次に、調査 1 および調査 2 で各試料から分離されたサルモネラの O 抗原を判別した。結果、DSE 法では、飼分法で確認できなかった O 抗原のサルモネラが、多くの試料において検出された。これは、DSE 法の長い培養時間により、時間と共に混在する多種類のサルモネラの菌叢の構成や菌数が変化し、飼分法で検出できなかった O 抗原を持つサルモネラが、DSE 法では検出できたためと考えられた。従って、飼分法とともに DSE 法を併用することで、多くの血清型のサルモネラを分離できる可能性が示唆された。

本研究により、DSE 法が油粕原料中のサルモネラの検出感度を上昇させ、飼分法で

は確認できなかった血清型が確認できた。選択分離培地にまた、DSE 法は飼分法に選択増菌培養を 1 回加えるだけ簡便な方法である。以上のことから、公定法である飼分法と DSE 法を併用することで、油粕および製造環境におけるサルモネラ汚染を、より詳細に把握できると考えられた。以下第二章と第三章における汚染調査では、選択増菌培地に HTT を用いた飼分法と DSE 法の併用により、サルモネラを分離した。

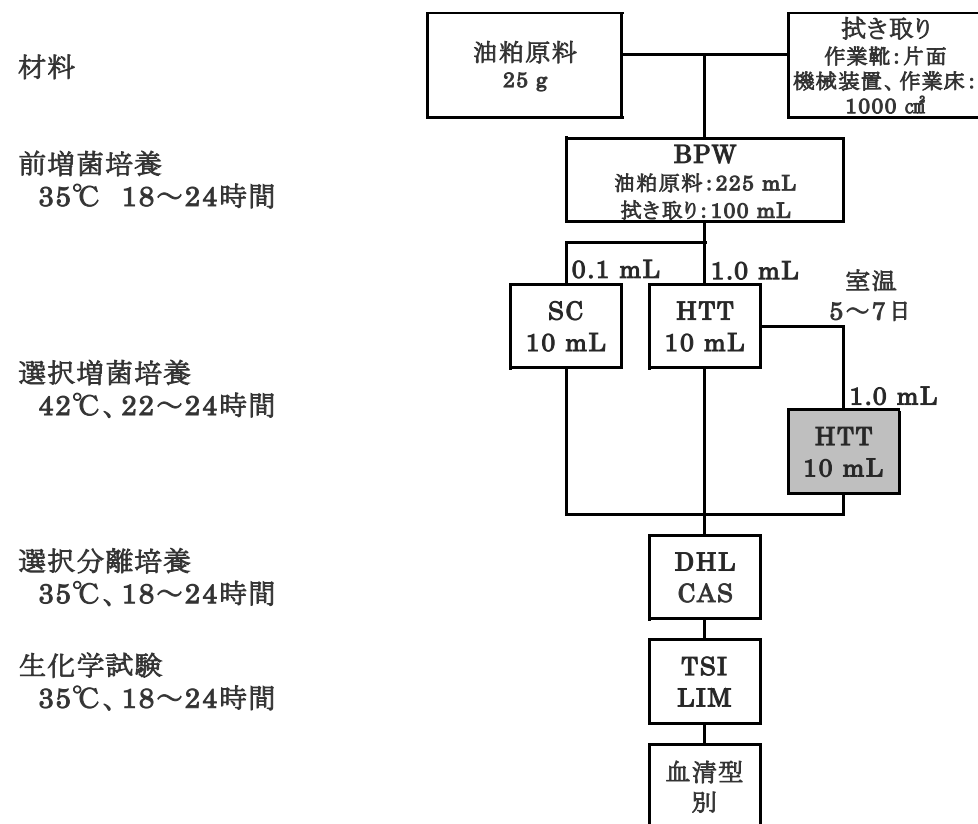


図 1-1 飼分法と DSE 法の検出率の比較におけるサルモネラ検出法

□ : 飼分法、■ : DSE 法

BPW: Buffered Peptone Water, SC: Selemote Cystine Broth, HTT: Hajna-Tetrathionate Broth, CAS: CHROMAgar Salmonella, TSI: Triple Sugar Iron Medium, LIM: Lysine Indol Motility Medium

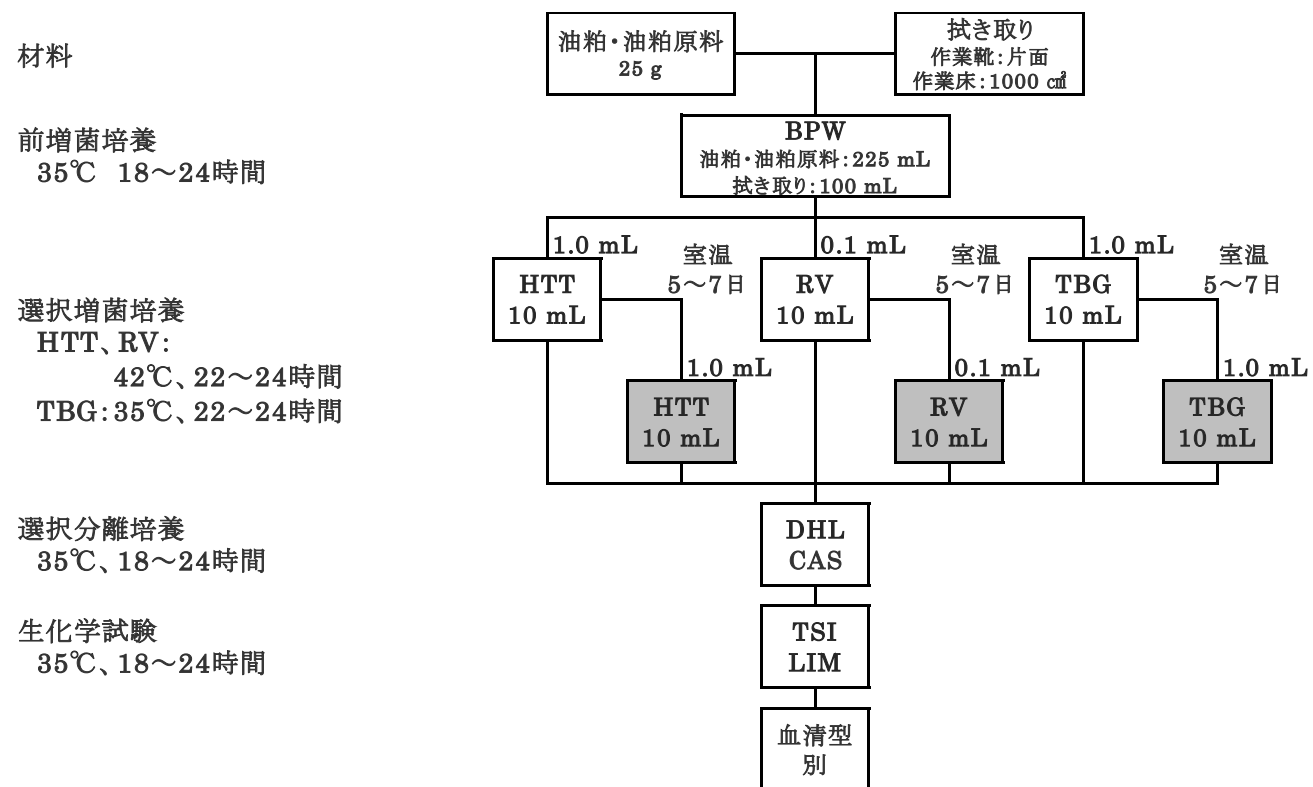


図 1-2 DSE 法に用いる選択増菌培地の比較におけるサルモネラ検出法

□ : 飼分法、■ : DSE 法

BPW: Buffered Peptone Water, HTT: Hajna-Tetrathionate Broth, RV: Rappaport-Vassiliadis Broth, TBG: Tetrathionate-Brilliant-Green Broth,

CAS: CHROMAgar Salmonella, TSI: Triple Sugar Iron Medium, LIM: Lysine Indol Motility Medium

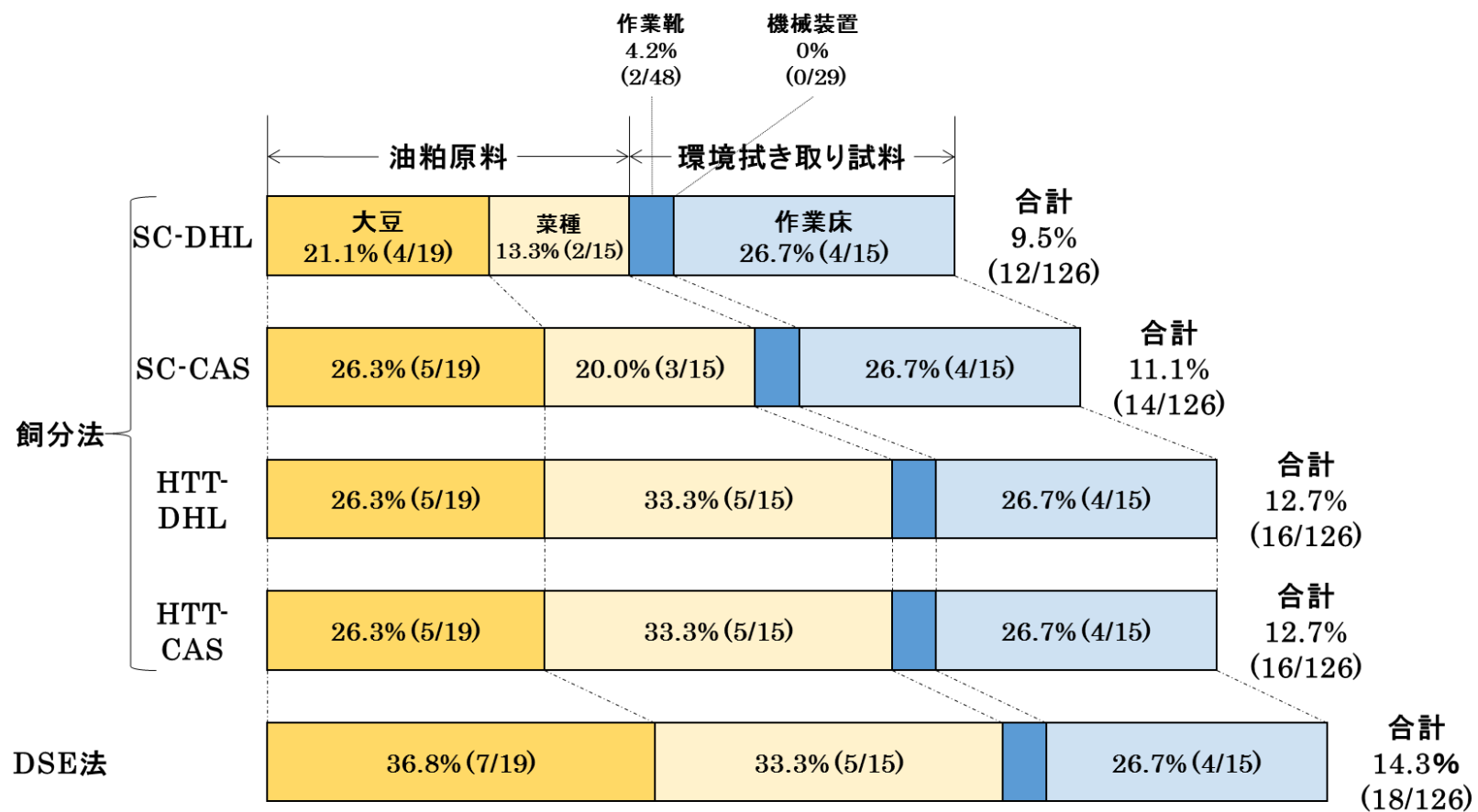


図 1-3 油粕原料および環境拭き取り試料を用いた飼分法と DSE 法の検出率の比較、盛田ら（2010）にて公表したものを改変

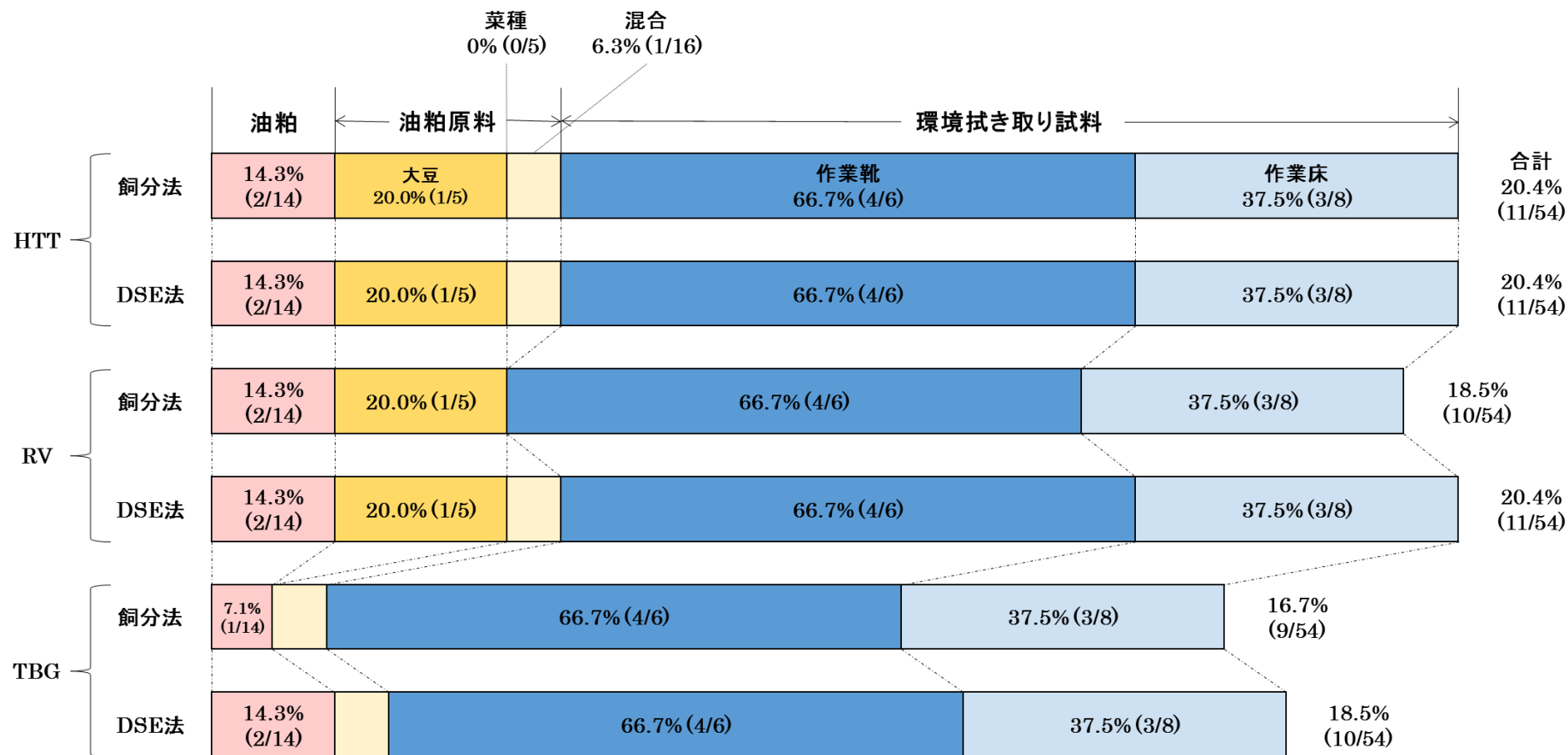


図 1-4 油粕、油粕原料および環境拭き取り試料を用いた DSE 法に用いる選択増菌培地の比較



表 1-1 飼分法と DSE 法で分離したサルモネラの O 抗原の比較

試料	試料番号	分離株の O 抗原			
		飼分法		DSE 法	
		HTT-DHL		HTT-DHL	
		分離株数	O 抗原	分離株数	O 抗原
油粕原料					
	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
作業靴					
	1	3	[1,3,19]	3	[1,3,19]
	2	3	[1,3,19]	3	[1,3,19]
作業床					
	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	[1,3,19], 13

盛田ら（2010）にて公表したものを改変

表 1-2 3 種類の選択増菌培地を用いた DSE 法で分離されたサルモネラの O 抗原の比較

材 料 番 号	分離株の O 抗原											
	飼分法						DSE 法					
	HTT-CAS		RV-CAS		TBG-CAS		HTT-CAS		RV-CAS		TBG-CAS	
	分離 株数	O 抗原	分離 株数	O 抗原	分離 株数	O 抗原	分離 株数	O 抗原	分離 株数	O 抗原	分離 株数	O 抗原
油粕												
1	5	7	5	7	5	7	5	7	3	7	5	7
2	5	7	5	7	ND	—	1	7	4	7	5	7
油粕原料												
1	5	[3,10]	4	[3,10]	ND	—	5	[3,10]	5	[3,10]	ND	—
2	5	4	ND	—	4	7	5	7	5	7	5	7
作業靴												
1	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	3	[1,3,19]
2	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	3	[1,3,19]
3	5	7, [1,3,19]	3	7	5	7	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	3	[1,3,19]
4	5	8	5	8	5	8	4	8	5	8	1	8
作業床												
1	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]	5	[1,3,19]
2	5	8	5	8	5	8	5	8	5	8	2	8
3	5	8	5	8	5	8	4	8	5	8	1	8

## 第二章 油粕製造環境におけるサルモネラ汚染実態とその対策

### 2-1 はじめに

これまでの調査において、日本の油粕工場内の作業床や作業道具、塵芥、ネズミやハトなどの小動物、環境中の塵埃など製造環境におけるサルモネラの汚染実態を明らかにしている（Morita ら，2006）。特に作業床については、数年にわたって汚染調査を継続するとともに、分子遺伝学的手法を用いた分離株の解析により、同一株が長期間生残することを示唆している（Morita ら，2006）。また、大豆や菜種などの油粕原料は、原料産地に関わらず 20~40%の割合でサルモネラに汚染されており、油粕工場へのサルモネラ侵入経路として最も重要であると考えられている（盛田ら，2007）。しかし、一般的に油粕の製造には加熱工程が存在するため、油粕原料由来のサルモネラが製造工程を通過し、製品油粕を汚染する可能性は極めて低い。一方、加熱工程以降には、乾燥、冷却および換気などの目的で、油粕が外気と接触する工程が多数存在している。すなわち、油粕のサルモネラ汚染の原因は製造環境からの二次汚染であると考えられている（Morita ら，2006）。しかし、油粕製造環境のサルモネラ汚染調査は、筆者が実施した単一の工場を対象としたもの以外はほとんど報告がなく、工場や国による汚染率や血清型の違いは明らかになっていない。また、油粕原料のサルモネラ汚染に関する報告も少なく、原産国による汚染率の差や輸送方法の違いによる油粕工場への影響は調査されていない。

一方、飼料工場におけるサルモネラ防除対策として、靴裏消毒や靴の履き替えなどのゾーニング管理（横関，1997）、作業床の定期的な清掃・消毒および作業床の材質変更や補修などが行われているが、具体的な数値データはなく、効果的なサルモネラ汚染対策は確立されていない。

そこで本章においては、第一章で検証したサルモネラ検出法を用いて、複数の油粕

工場を対象に、搬入される油粕原料および製造環境の詳細な汚染調査を実施した。油粕原料については、日本とは原料の輸送方法や保管方法が異なるインドの工場においても日本と同様の汚染調査を実施し、油粕原料におけるサルモネラ汚染の実態を明らかにすることを目的とした。また、日本の3工場およびインド1工場の原料保管エリアと油粕製造エリアを対象に、数年にわたって作業床の汚染調査を実施し、工場や国による違いを検討した。最後に、日本の1つの工場において、靴裏消毒、作業床の塗装および定期消毒の効果を検証し、これらの組み合わせによる製造環境のサルモネラ汚染対策の手法を検討した。

## 2-2 材料および方法

### 2-2-1 調査対象とした油粕工場の概要

調査対象として、日本のA、B、C工場およびインドの工場を選定した。日本の3工場は油粕原料の産地や製造工程がほぼ同じであり、A工場とC工場は、装置の配置や工場の建設年も極めて近い。日本とインドの工場における油粕の製造工程の概要を図2-1に示した。日本の3工場は油粕原料をサイロで保管しており、サイロ施設を原料保管エリアとした。一方、インドの工場は油粕原料を倉庫で麻袋または野積みの状態で保管しており、倉庫を原料保管エリアとした。また、一般的に油粕は、前処理工程として精選、粗砕（大豆など）、圧扁、圧搾（菜種など）、その後抽出、脱溶剤、乾燥、冷却、篩分けの工程を経て製造された後、計量して保管される。この一連の工程と併設されている操作室を油粕製造エリアとした。

なお、油粕原料による汚染率の違いを確認するために、各工場で以下の建屋および工程を対象とした。日本A工場には2つの建屋があり、それぞれ大豆・菜種切替工程と菜種専用工程が配置されている。日本B工場は1つの建屋に大豆専用工程と菜種専用工程が配置されている。日本C工場は1つの建屋に大豆・菜種切替工程が配置されている。一方、インドの工場は、1つの建屋に大豆専用工程が配置されている。

#### 2-2-2 供試試料

製造環境の汚染調査のために供試した試料は、インドの油粕工場で採取した油粕原料 10 検体、原料保管エリアの拭き取り試料 234 検体（日本 A 工場 71 検体、B 工場 61 検体、C 工場 72 検体、インド 30 検体）および油粕製造エリアの拭き取り試料 688 検体（日本 A 工場 250 検体、B 工場 273 検体、C 工場 135 検体、インド 30 検体）である。

油粕原料は原料船の船倉または搬入工程から、原料と埃や土の混合物を 25 g 採取した。環境拭き取り試料は生理食塩水を浸漬させた滅菌綿棒または滅菌ガーゼを使用し、約 1,000 cm<sup>2</sup>の面積を拭き取り 1 検体とした。油粕製造エリアの採取箇所は操作室、前処理工程、脱溶剤機周辺、冷却機周辺、篩周辺および計重機周辺とした。

製造環境のサルモネラ汚染対策の効果検証のために供試した試料は、日本 B 工場で採取した環境拭き取り試料 173 検体（高油分区域 71 検体、低油分区域作業動線上 76 検体、低油分区域作業動線外 26 検体）である。環境拭き取り試料は生理食塩水を浸漬させた滅菌ガーゼを使用し、約 1,000 cm<sup>2</sup>の面積を拭き取り 1 検体とした。

#### 2-2-3 サルモネラの分離法

油粕原料および環境拭き取り試料は、第一章で評価した飼分法と DSE 法を組み合わせた方法を用いて菌を分離した。なお、インドで採取した油粕原料および環境拭き取り試料は、植物防疫所を経て輸入し、日本で試験に供した。分離されたサルモネラは、サルモネラ免疫血清（デンカ生研）を用いて血清型別を行った。

#### 2-2-4 使用薬剤

作業床消毒に用いる薬剤には、塩化ベンザルコニウムを主成分とする消毒剤 a、ジデシルジメチルアンモニウムクロライドを主成分とする消毒剤 b およびクロルヘキシ

ジングルコン酸塩液剤である消毒剤 c の計 3 種を用いた。また、希釈倍率は各メーカーの推奨濃度を参考に、消毒剤 a は原液と 5 倍希釈、消毒剤 b は 10 倍、30 倍、50 倍および 100 倍希釈、消毒剤 c は 25 倍希釈となるよう調製した。

#### 2-2-5 作業床に使用する消毒剤の評価

一般的に油粕製造環境は油粕などの有機物や油分などによって汚れており、これらの汚れによる消毒効力の低下が懸念された。そこで、希釈した各消毒剤 100 mL に、高油分油粕（油分約 20%）を 1%、2%、5%および 10%となるように添加した。添加直後および 20～25℃で 24 時間保管後、それぞれ 5 mL を採取し、10<sup>8</sup>cfu/mL のサルモネラ菌液を 0.5 mL 加えてよく混合し、10 分間常温に放置した。それを 30 μL 採取し、Heart Infusion Broth (HIB: Difco) 3 mL に加え、35 °C で 24 時間培養した。培養後 DHL 培地に画線し、35 °C で 20～24 時間培養し、コロニーの有無を確認した。

#### 2-2-6 作業床のサルモネラ汚染対策

日本 B 工場の油粕製造エリアを対象として、作業床のサルモネラ汚染対策を実施し、その効果を検証した。第一段階として、2011 年から従業員の靴裏消毒を実施した。すなわち、靴裏消毒は工場への出入りの際にマットで靴裏の汚れを除去した後、消毒剤 b の 10 倍希釈液を入れた消毒槽に約 10 秒間踏み込むことによって実施した。第二段階として、2014 年 4 月上旬に高油分区域の床の塗装を実施した。塗装剤には水性硬質ウレタン材を用い、2 層で計 6mm となるよう塗装した。第三段階として、4 月下旬以降、作業床の定期的な噴霧消毒を開始した。消毒は消毒剤 b の 10 倍希釈液を用いて月 1 回の頻度で、高油分区域のみを対象に実施した。なお、1 回の散布量は約 15 L / 40 m<sup>2</sup>とした。

さらに、対策の各段階において、その効果を確認するために作業床のサルモネラ検査を実施した。

## 2-3 成績

### 2-3-1 油粕原料のサルモネラ汚染実態

インドの油粕工場に搬入されたインド産の油粕原料計 10 検体におけるサルモネラの汚染実態を、過去に実施した日本の油粕工場の成績と併せ、表 2-1 に示した。インド産大豆は 70.0% (7/10) が陽性であり、分離株は Bareilly、Bstrilly、Coeln、Gaminara、Typhimurium および Virchow の 6 血清型に型別された。

### 2-3-2 油粕工場のサルモネラ汚染実態

各工場における原料保管エリアのサルモネラ汚染の実態を図 2-2 に示した。油粕原料をサイロで保管している日本の A、B および C 工場の検出率はそれぞれ 5.6% (4/71)、1.6% (1/61) および 16.7% (12/72) であり、A、B および C 工場全体では 8.3% (17/204) であった。一方、油粕原料を倉庫で保管しているインドの工場での検出率は 60.0% (18/30) であった。また、A 工場では Mbandaka、O7 群および O1,3,19 群、B 工場では Anatum、C 工場では Havana と Tennessee が分離された。C 工場では陽性となった 12 検体中 11 検体から Tennessee が分離された。インドの工場では、Agona、Bareilly、Gaminara、Havana、Kedougou、Nchanga、Nigeria および Orion などが分離された。

表 2-2 は各工場における油粕製造エリアのサルモネラ汚染実態を示したものである。A 工場での検出率は、大豆・菜種切替工程の建屋で 59.2% (74/125)、菜種専用工程の建屋で 68.8% (86/125) であった。大豆専用工程と菜種専用工程が同一建屋にある B 工場の検出率は、大豆専用工程周辺で 7.4% (6/81)、菜種専用工程周辺で 16.7% (14/84)、両工程の共通エリアで 14.8% (16/108) であった。A 工場と B 工場では、菜種をより多く扱うエリアの検出率が高い傾向が確認された。C 工場では、大豆・菜種切替工程の建屋で 25.2% (34/135) であった。また、インドの大豆専用工程の建屋では 20.0% (6/30) であった。

血清型は A 工場の大豆・菜種切替工程の建屋では Kouka、Senftenberg、Mbandaka、菜種専用工程の建屋では Havana、Kouka、Mbandaka、Tennessee の順に多く分離された。Albany、Havana、Kouka、Mbandaka および Senftenberg は両建屋から分離されたが、Aarhus は大豆・菜種切替工程の建屋のみ、Tennessee は菜種専用工程の建屋のみから分離された。B 工場では、Tennessee、Mbandaka、Anatum の順に多く分離された。C 工場では、Havana と Tennessee が分離されたが、陽性となった 34 検体中 33 検体から Tennessee が分離された。日本 3 工場全体では、Tennessee は全工場、Mbandaka は A 工場と B 工場、Havana は A 工場と C 工場で共通して確認された。一方、インドの工場では、日本 3 工場では確認されなかった Kedougou、Kentucky などが分離された。

年別の検出されたサルモネラの血清型を表 2-3 に示した。日本 A 工場の大豆・菜種切替工程の建屋では Kouka、Mbandaka および Senftenberg、菜種専用工程の建屋では Albany、Havana、Kouka、Mbandaka および Senftenberg、日本 B 工場および C 工場では Tennessee が 3 年間にわたって継続して確認された。また、各工程各工場とも年によって検出率に大きな差はなかった。

次に、採取箇所別のサルモネラの汚染実態を表 2-4 に示した。操作室の検出率は、A 工場および C 工場では比較的高かったが、B 工場では低かった。また、3 工場とも前処理工程の検出率は高く、B 工場と C 工場では冷却機周辺の汚染率は低かった。一方、インドの工場は冷却機周辺の検出率が比較的高かった。

### 2-3-3 作業床に使用する消毒剤の評価

各消毒剤に 1%、2%、5% および 10% の有機物を混入させ、混入直後と 24 時間保管後の消毒剤を採取したものに、 $10^8$ cfu/mL のサルモネラ菌液を加えて 10 分間放置し、そのサルモネラを分析した結果を表 2-5 に示した。消毒剤 a 原液および消毒剤 b の 10 倍希釈液は、有機物を 10% 混入させ、24 時間保存後もサルモネラが陰性となっ



た。一方、消毒剤 c の 25 倍希釈液は、有機物を 1% 混入させた場合、混入直後でもサルモネラが陽性となった。

#### 2-3-4 作業床のサルモネラ汚染対策

B 工場では油粕製造エリアの作業床のサルモネラ汚染対策として、2011 年以降靴裏消毒を実施し、2014 年 4 月に高油分区域の作業床の塗装を、さらに 4 月下旬以降消毒剤 b の 10 倍希釈液による定期消毒を実施した。その各段階におけるサルモネラ汚染実態を図 2-3 に示した。作業床の塗装および定期消毒未実施の段階においては、高油分区域、低油分区域作業動線上および動線外の検出率は、それぞれ 89.5% (17/19)、45.8% (11/24) および 40.0% (2/5) であった。塗装および定期消毒の両対策実施後は、それぞれ 25.0% (13/52)、21.1% (12/57) および 19.0% (4/21) であった。

#### 2-4 考察

油粕のサルモネラ汚染の原因は製造環境からの二次汚染であると考えられている (Morita ら, 2006)。すなわち、油粕製品のサルモネラ汚染を軽減するためには、製造環境のサルモネラ汚染実態を把握し、効果的な環境汚染対策を講じることが必須である。しかし、油粕製造環境のサルモネラ汚染については、現在までほとんど調査が行われておらず、筆者らによる単一工場の汚染実態調査のみである (Morita ら, 2006)。加えて、効果的な環境汚染対策は確立されていない。そこで、日本とインドにおける計 4 箇所の油粕工場の原料保管エリアと油粕製造エリアを対象に、2012 年から 2015 年の約 4 年間にわたって汚染調査を実施した。さらに日本 1 工場の油粕製造エリアを対象に、靴裏消毒、作業床の塗装および定期的な消毒を組み合わせ、効果的な環境汚染対策を検討した。

原料保管エリアの汚染調査の結果、インドの工場の汚染率は 60.0% で、日本の 3 工場と比較して有意に高いことが判明した。油粕原料は日本ではサイロに隔離保管され

ることに対し、今回調査したインドの工場では、倉庫に麻袋または野積み状態で保管される。そのため、油粕原料とともに油粕工場に侵入したサルモネラが、原料搬入作業および作業者の移動、衛生動物を介して原料保管エリア全体に拡散したものと考えられた。

次に、油粕製造エリアの汚染調査を実施した結果、A 工場の汚染率は大豆・菜種共用工程で 60.0%、菜種専用工程で 70.0%と、B 工場や C 工場よりも高かった。また、A 工場、B 工場ともに共用工程よりも油分の多い菜種専用工程の方が汚染率が高かった。過去に単一工場の調査で油分の存在がサルモネラの生残性を高めることが明らかとなっている (Morita ら, 2004)。菜種は大豆よりも種子に含有する油分が高いため、製造環境の油汚れも高くなり、その結果、サルモネラの汚染が増加していると考えられた (Morita ら, 2004)。今回、複数の工場でも同一の傾向が確認でき、サルモネラ汚染の増加に油分の存在が深く関与していることが改めて確認された。

一方、大豆専用のインドの工場は汚染率が 20.0%であった。大豆は油分が少ないため、サルモネラの拡散および定着が低いと考えられた。他の油粕原料については胡麻やコーンなども油分が高いため (鷲, 2009)、これらの油粕工場でもサルモネラ汚染率が高い可能性が示唆された。なお、採取箇所別のサルモネラ汚染率は前処理が最も高かった。前処理エリアには種子から油を搾油する圧搾機が設置されているため、製造環境に油が飛散することが多く、サルモネラの生残性が高まったものと考えられた。

原料保管エリアで確認された血清型のほとんどは、同工場の油粕製造エリアでも確認された。今回の調査ではすべての工場で同様の傾向が見られ、特に C 工場では両エリアともに多くの Tennessee と Havana が確認された。これは油粕原料を介して油粕工場に侵入したサルモネラの一部が原料保管エリアを汚染した後、作業員や衛生動物によって油粕製造エリアに拡散したことを示唆するものである。過去に国内の油粕製品から分離された血清型 (木下ら, 1988) は、今回日本の各工場で生残した血清型と類似したものが多い。すなわち、これらの血清型は他の血清型よりも生残性が優れて

いると考えられ、工場内で常在化する可能性が考えられた。

油粕製造エリアの環境汚染対策を確立する目的で、まずは作業床に使用するための効果的な消毒剤を検討した。製造環境を対象とした消毒剤は有機物や油分の混入に影響されにくいことが重要であるため（横関，1998）、消毒剤 b の 10 倍希釈液を選定した。対象とした B 工場では、2011 年からゾーニング管理を行い、エリアの入退出時に消毒剤 b を用いて靴裏消毒を実施していた。しかし、3 年後の 2014 年 2~3 月に実施した調査の結果、高油分区域の汚染率は 89.5%であり、靴裏消毒のみでは作業床の汚染率軽減への効果はないことが明らかになった。筆者はこの原因は床面における菌の生残と考え（Morita ら，2006）、作業床を菌が残存しにくい床材に変更した。さらに、消毒剤 b を用いて高油分区域の作業床を対象に 1 ヶ月に 1 回の頻度で噴霧消毒を実施した。3 ヶ月間噴霧消毒を実施した結果、高油分区域の汚染率は 25.0%にまで低下するとともに、消毒未実施の低油分区域の汚染率に低下傾向が確認された。以上のことから、靴裏消毒に加え、床面の平滑化および定期噴霧消毒の組み合わせは、サルモネラの常在化を防止する有効な手段であることが確認された。また、今回の調査ではサルモネラが作業者を介して高油分区域から低油分区域に拡散していることが改めて確認された（Morita ら，2004）。従って、本対策の継続はサルモネラの拡散防止にも有効であると考えられた。なお、対象とする工場のスペース、作業者の人員などを考慮し、消毒対象面積の拡大や消毒頻度の増加により、さらに検出率を低減することができると考えられた。

油粕工場におけるサルモネラ汚染を低減するためには、油粕原料由来のサルモネラの侵入、拡散および常在化を防止することが重要である。そのためには、油粕原料をサイロなどで隔離保管することが効果的である。さらに、油粕製造エリアにおいてはゾーニング管理を行い、靴裏消毒、床面の平滑化および定期的な噴霧消毒が適していた。本評価は実際の現場を使った初めての報告である。

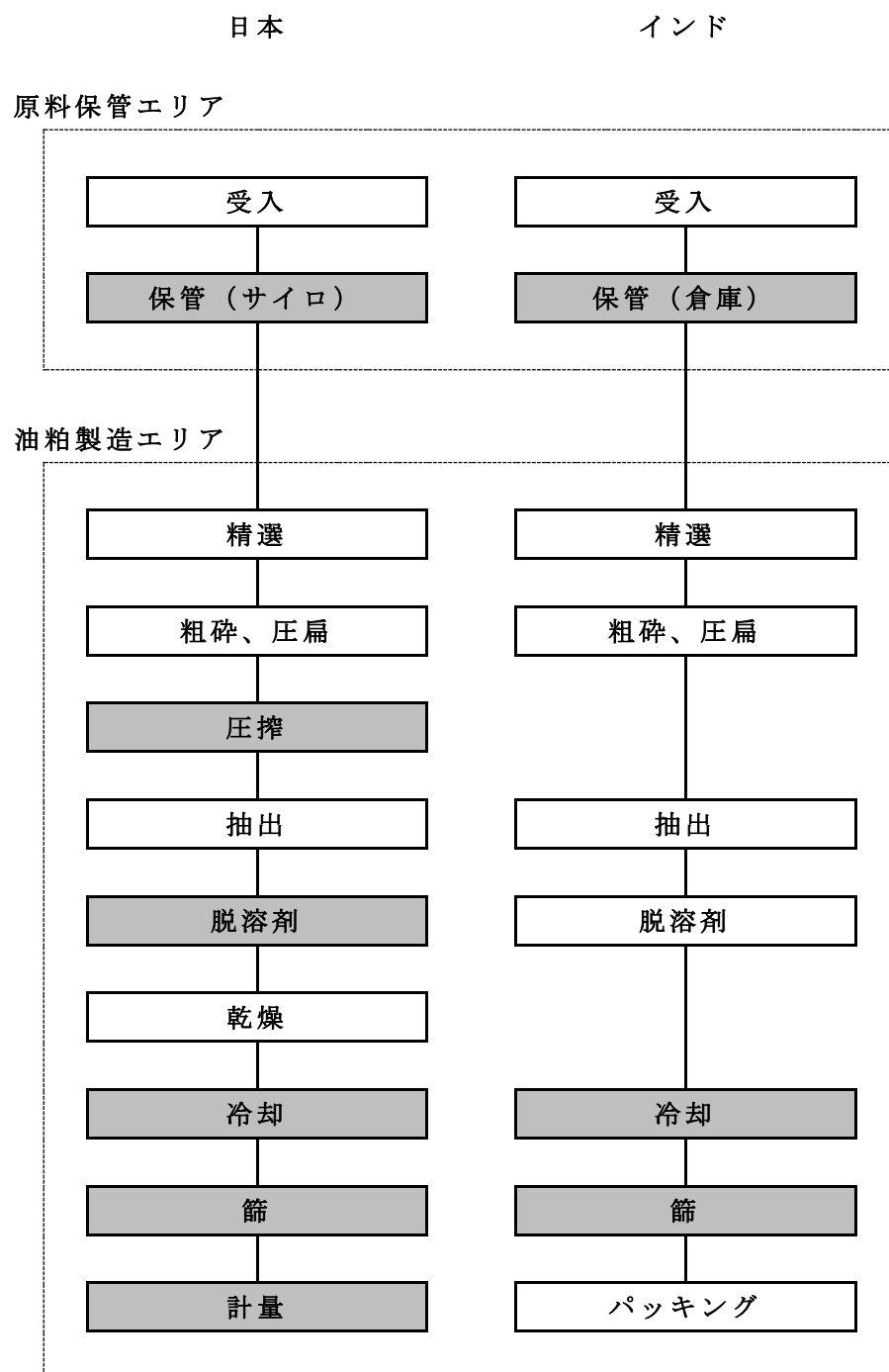


図 2-1 日本およびインドの油粕工場の製造工程の概要

■ : 試料採取箇所

表 2-1 日本およびインドの油粕工場に搬入された油粕原料のサルモネラ汚染実態

受入国	油粕原料	原産国	輸送方法	材料数	検出数 (検出率(%))	血清型※2
インド	大豆	インド	トラック	10	7 (70.0)	Bareilly (2), Bstrilly, Coeln, Gaminara, Typhimurium, Virchow
日本※1	大豆	アメリカ	大型船舶	110	43 (39.1)	Anatum(4), Bareilly, Bovismorbificans, Cubana, Give(2), Hartford(2), Havana(2), Lichfield(2), Liverpool, Mbandaka, Muenchen, Newport(6), Orion, Othmarschen(4), Senftenberg(3), Tennessee, Thompson(3), Typhimurium(3)
		ブラジル	大型船舶	32	9 (28.1)	Cubana, Kingston, Mbandaka(3), Muenchen, Senftenberg, Tennessee
	菜種	カナダ	大型船舶	111	22 (19.8)	Adelaide, Give(4), Lexinton, Rubislaw(2), Sandiego(5), Typhimurium
		オーストラリア	大型船舶	24	8 (33.3)	Give, Infantis, Mbandaka(5), Yoruba

※1 盛田ら（2007）を引用して用いた。

※2 複数の材料から分離された血清型は、その検体数を（ ）内に示した。

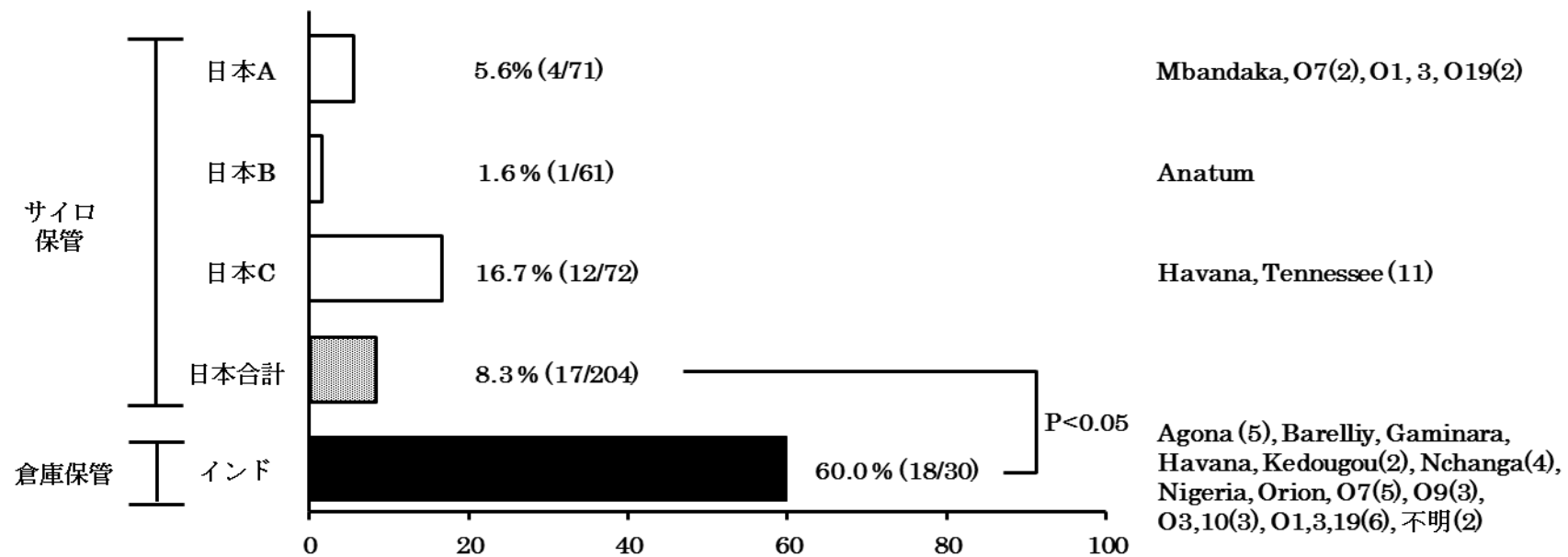


図 2-2 日本およびインドの油粕工場の原料保管エリアにおけるサルモネラ汚染実態

表 2-2 日本およびインドの油粕工場の製造エリアにおけるサルモネラ汚染実態

工場	処理原料	材料数	検出数 (検出率(%))	血清型
日本 A	大豆、菜種 (切替)	125	74 (59.2)	Aarhus, Albany(2), Havana(2), Kouka(30), Mbandaka(15), Senftenberg(24), O7(7), O8, [O3,10], [O1,3,19](18)
	菜種	125	86 (68.8)	Albany(7), Havana(49), Kouka(14), Mbandaka(11), Senftenberg(6), Tennessee(8), O7, [O1,3,19](9)
日本 B	大豆	81	6 (7.4)	Anatum, Mbandaka(2), Tennessee(3)
	菜種	84	14 (16.7)	Anatum, Mbandaka(2), Tennessee(9), O7, O18, 不明
	共用	108	16 (14.8)	Anatum(3), Mbandaka(4), Tennessee(8), O7, O18
日本 C	大豆、菜種 (切替)	135	34 (25.2)	Havana, Tennessee(33)
インド	大豆	30	6 (20.0)	Kedougou, Kentucky, O8(2), O13, 不明

表 2-3 日本およびインドの油粕工場の製造エリアにおける年別のサルモネラ血清型

工場	処理原料	血清型			
		2012 年	2013 年	2014 年	2015 年
日本 A	大豆、菜種 (切替)	-	Aarhus, Kouka(13), Mbandaka(7), Senftenberg(4), O7(2), [O3,10], [O1,3,19](6)	Havana(2), Kouka(10), Mbandaka(3), Senftenberg(7), O7(3), O8, [O1,3,19](10)	Albany(2), Kouka(7), Mbandaka(5), Senftenberg(13), O7(2), [O1,3,19](2)
	菜種	-	Albany(3), Havana(10), Kouka(2), Mbandaka(3), Tennessee(8), Senftenberg(2), [O1,3,19](4)	Albany(2), Havana(29), Kouka(8), Mbandaka(4), Senftenberg, [O1,3,19](5)	Albany(2), Havana(10), Kouka(4), Mbandaka(4), Senftenberg(3), O7
日本 B	大豆	-	Mbandaka(2), Tennessee	Tennessee	Anatum, Tennessee
	菜種	-	Tennessee(4), O18	Anatum, Mbandaka(2), Tennessee(4), O7	Tennessee, 不明
	共用	-	Anatum(3), Tennessee, O18	Mbandaka(2), Tennessee(4), O7	Mbandaka(2), Tennessee(3)
日本 C	大豆、菜種 (切替)	-	Havana, Tennessee(12)	Tennessee(18)	Tennessee(3)
インド	大豆	Kentucky, O8(2), 不明	Kedougou, O13	-	-



表 2-4 日本およびインドの油粕工場の製造エリアにおける採取箇所別のサルモネラ汚染実態

工場	処理原料	検出数 (検出率(%))					
		操作室	前処理工程	脱溶剤機 周辺	冷却機 周辺	篩周辺	計重機周辺
日本 A	大豆、菜種 (切替)	21/25 (84.0)	21/25 (84.0)	11/25 (44.0)	-	11/25 (44.0)	10/25 (40.0)
	菜種	20/25 (80.0)	18/25 (72.0)	16/25 (64.0)	-	20/25 (80.0)	12/25 (48.0)
日本 B	大豆	-	-	4/28 (14.3)	0/25 (0.0)	2/28 (7.1)	-
	菜種	-	-	11/28 (39.3)	2/28 (7.1)	1/28 (3.6)	-
	共用	2/52 (3.8)	8/28 (28.6)	-	-	-	6/28 (21.4)
日本 C	大豆、菜種 (切替)	46/123 (37.4)	54/96 (56.3)	47/127 (37.0)	5/76 (6.6)	39/127 (30.7)	35/99 (35.4)
インド	大豆	-	-	-	6/25 (24.0)	0/5 (0)	-

表 2-5 各消毒剤における有機物混入による殺菌効果への影響

殺菌剤	希釈倍率	有機物濃度							
		1%		2%		5%		10%	
		混入 直後	24 時間 後	混入 直後	24 時間 後	混入 直後	24 時間 後	混入 直後	24 時間 後
消毒剤 a	原液	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)
	5 倍	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)
消毒剤 b	10 倍	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)
	30 倍	(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	(＋)	(－)	(＋)
	50 倍	(－)	(－)	(－)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)
	100 倍	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)
消毒剤 c	25 倍	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)	(＋)

(－)：サルモネラ陰性、(＋)：サルモネラ陽性

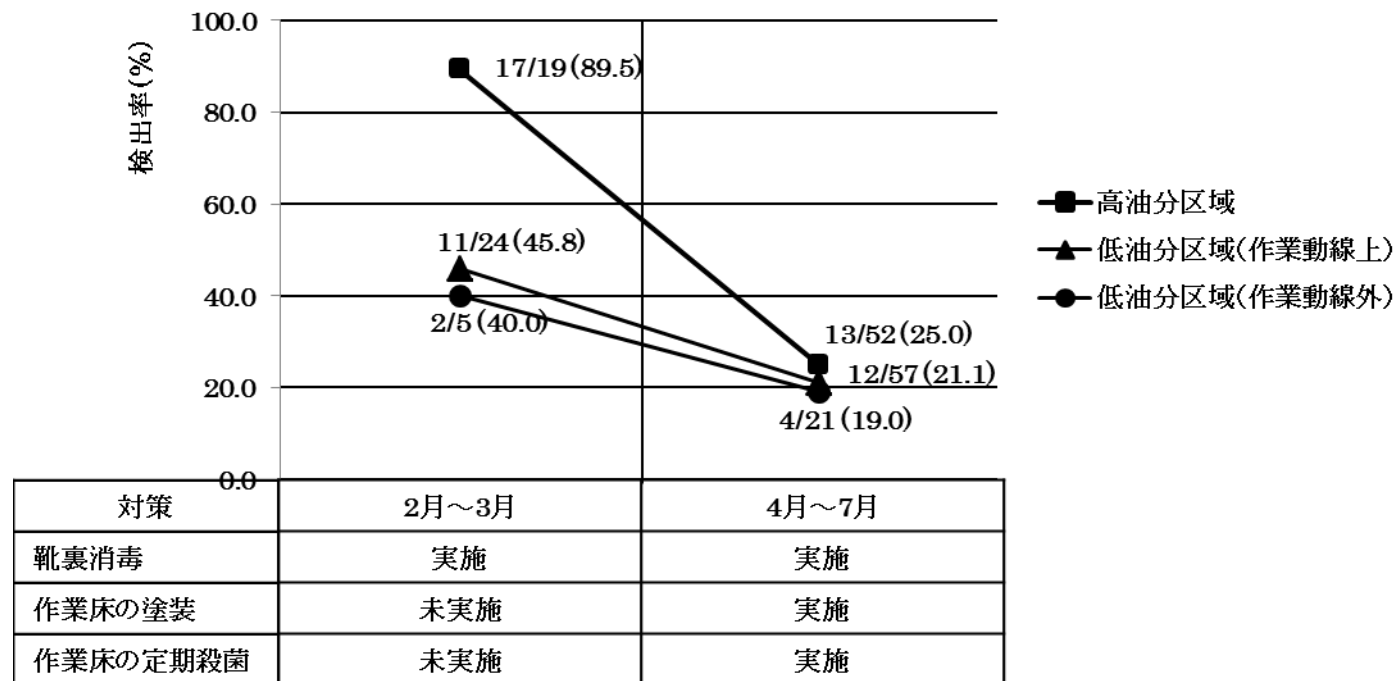


図 2-3 日本 B 工場における環境汚染対策の各段階のサルモネラ汚染実態

### 第三章 油粕製造におけるサルモネラ制御技術の確立

#### 3-1 はじめに

油粕のサルモネラ汚染は国内外で古くから知られていたが、肉骨粉、フェザーミールおよび魚粉などの動物性飼料原料よりも汚染率が低かったため、配合飼料のサルモネラ汚染源としてはあまり重要視されていなかった。しかし、1980年代後半に農林水産省肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）で実施された調査において、油分の多い菜種やサフラワーの油粕では汚染率が30%以上であることが明らかになった（木下ら，1988）。さらに、同時期に発生した鶏卵による *S. Enteritidis* 食中毒の世界的な流行を受け、油粕などの植物性飼料原料におけるサルモネラ汚染対策の重要度が認識された。

油粕原料を汚染するサルモネラは、製造中の加熱処理で死滅する可能性が高い。一方、加熱処理以降の乾燥、冷却および搬送工程では外気を工程内に取り入れている（佐藤ら，1999）ため、製造環境中のサルモネラが製造工程内に侵入し、油粕を汚染するリスクが考えられる。

そこで、第二章では、油粕製造環境の詳細な汚染実態を調査し、汚染率に差はあるものの2ヶ国4工場いずれにおいても、製造環境はサルモネラに汚染されていることを明らかにした。また、日本B工場を対象に、靴裏消毒、作業床の塗装および定期消毒を組み合わせた製造環境のサルモネラ汚染対策を評価し、効果があることを確認した。しかし、製造環境のサルモネラを完全に除去するには至らなかった。製品油粕のサルモネラ汚染を防止するためには、製造環境のサルモネラ汚染を低減すると同時に、製造における制御技術の確立が重要である。

油粕におけるサルモネラ汚染の実態については、前述の通り海外では1950年代から（Allred ら，1967；Edwards ら，1967；Grumbles ら，1961；Hauge ら，1958；

Taylor, 1960 ; Timoney ら, 1970)、また国内においても 1980 年代から報告（木下ら, 1988 ; 小林ら, 1989a ; 1989b）されているが、製造におけるサルモネラ管理および制御技術についてはほとんど調査されておらず、海外を含め報告は少ない。そこで今回、製造における制御技術を確立する目的で、インドの油粕工場を対象に、製造工程内の詳細なサルモネラ汚染調査を実施した。さらに、主要な汚染源である冷却工程で発生する微粉の除去および工程内の残留物除去の 2 つのサルモネラ汚染対策の効果を検証し、これらの組み合わせによる製造工程内の制御技術を確立した。

### 3-2 材料および方法

#### 3-2-1 油粕工場および生産工程の概要

調査はインドの大豆専用工場を対象とした。本工場では、前処理工程として精選、粗砕・圧扁、その後、油脂の抽出工程がある。さらに脱溶剤機で加熱された後、冷却機、篩、粉碎などの工程を経て製造される。その後、充袋機で袋詰めされ、製品として倉庫に保管される。脱溶剤機以降の油粕の製造工程の概要を図 3-1 に示した。また、冷却機をオーバーフローした油粕は循環工程を経て、再び冷却機に添加される（油粕循環工程）。なお、油粕循環工程には水平コンベアおよび垂直コンベアが 1 基ずつ設置されている。冷却工程は、外気と油粕を接触させることにより油粕を冷却する工程である。そのため、この工程で発生した微粉を回収する目的でサイクロンが設置されている（微粉回収工程）。なお、微粉回収工程には垂直ダクト、水平ダクト、サイクロンおよびサイクロン出口シュートが順に設置されている。

#### 3-2-2 供試試料

##### 3-2-2-1 製品油粕および微粉の汚染調査

製品油粕は充袋機で、また、微粉はサイクロン下で工程稼働中にそれぞれ約 100 g を採取した。試料は 2013 年 7 月から 8 月までに 30 検体ずつ、計 60 検体採取した。

### 3-2-2-2 装置内部の汚染調査

装置内部の汚染調査においては、工程停止中に脱溶剤機以降の装置を開放し、各所の堆積物を約 100 g 採取した。視覚的に堆積物が確認できない場合は、生理食塩水を浸漬させた滅菌ガーゼまたは綿棒を使用し装置内部の表面約 1,000 cm<sup>2</sup>を拭き取った。試料は 2013 年 8 月に、油粕工程で 46 検体、微粉回収工程で 26 検体採取した。

### 3-2-3 サルモネラの分離法

インドで採取した油粕、微粉および製造工程の堆積物は、植物検疫所を経て日本に輸入し、第一章で評価した飼分法と DSE 法を組み合わせた方法で検査した。分離されたサルモネラは、サルモネラ免疫血清（デンカ生研）を用いて血清型別を行った。

### 3-2-4 サルモネラ汚染対策

#### 3-2-4-1 工程内残留物の除去

サルモネラの除去を目的として、工程停止中に脱溶剤機以降の全装置（図 3-1 に示した脱溶剤機から充袋機までの装置）を開放し、工程内の堆積物を掃除機および掃除道具を用いて除去した。また、装置内部の壁面および底面の付着物はスクレイパーで削り取った後、掃除機で吸引した。なお、堆積物の除去作業は、作業着や作業靴、掃除道具を事前に消毒または洗浄するなど、衛生的に実施した。

#### 3-2-4-2 サイクロン微粉の除去

図 3-1 に示した通り、通常、冷却機で発生した微粉はサイクロンを経由して主工程である冷却機出口コンベアに再添加している。今回、冷却機出口コンベアへの添加工程を切り離すことにより、微粉を工程外に除去した。

### 3-2-5 統計処理

残留物除去前後の製品油粕および微粉のサルモネラ検出率の比較には、フィッシャーの正確確率検定を用いた。

## 3-3 成績

### 3-3-1 油粕工程のサルモネラ汚染実態

工程停止時の脱溶剤機以降の装置内部の汚染実態を表 3-1 に示した。また、サルモネラ検出箇所の詳細を図 3-2 に示した。脱溶剤機出口コンベアの検出率は 18.2% (4/22) であり、脱溶剤機出口および冷却機への入口付近でサルモネラが検出された。また、冷却機をオーバーフローした油粕循環工程は汚染率が高く、水平コンベアで 50.0% (1/2)、垂直コンベアで 66.7% (2/3) であった。冷却機本体の入口シュートと出口シュートは 100% (それぞれ 2/2、1/1) の割合で汚染されていたが、内部はすべて陰性 (0/9) であった。さらに冷却機出口コンベアの汚染率は 66.7% (2/3) であり、粉砕機と充袋機はすべて陰性 (ともに 0/2) であった。

### 3-3-2 微粉回収工程のサルモネラ汚染実態

工程停止時の微粉工程内の汚染実態を表 3-2 に示した。垂直ダクトはすべて陰性 (0/5) であったが、水平ダクトは 23.1% (3/13)、サイクロン出口ダンパーは 25.0% (1/4)、サイクロン出口シュートは 75.0% (3/4) が陽性となった。

### 3-3-3 工程内残留物除去前後の製品油粕および微粉の汚染実態

工程稼働中における製品油粕および微粉の汚染実態を表 3-3 に示した。工程内残留物除去前は、最終製品の汚染率が 20.0% (2/10) であったのに対し、残留物除去後はすべて陰性 (0/20) となった。一方、残留物除去前の汚染率が 30.0% (3/10) であった微粉は、残留物除去後も 10.0% (2/20) の汚染率であり、サルモネラが残存した。

血清型は残留物除去前の製品油粕で O7 群、残留物除去前後の微粉で、それぞれ Typhimurium と O7 群、O7 群と O3,10 群が確認された。なお、残留物除去前後の汚染率の有意差を確認した結果、製品油粕では有意差が認められたが ( $p<0.05$ )、微粉では有意差が認められなかった ( $p>0.05$ )。

### 3-4 考察

一般的に油粕の製造には加熱工程である脱溶剤機が存在するため、サルモネラ汚染は脱溶剤機以降で発生する。また、製品油粕へのサルモネラ汚染の原因は、汚染された残留物が工程内に存在している場合や、汚染されたサイクロン微粉が微粉回収工程から油粕工程に混入する場合、また、乾燥や冷却目的で工程内に取り込まれたエアから混入する場合が考えられる (Morita ら, 2006)。今回、インドの油粕工場をモデルとして、特に影響が大きいと考えられる工程内残留物および微粉回収工程からのサルモネラの混入を防止することを目的に、日本で実績をあげた、工程内残留物除去およびサイクロン微粉除去の二つの手法を評価した。

脱溶剤機以降の油粕工程内の残留物の汚染実態を調査した結果、水平コンベアの入口と出口、垂直コンベアの下部で汚染率が高かったが、粉砕機や充袋機ではすべて陰性となった。また、微粉回収工程内では、ダクト水平部やサイクロン出口シュートの汚染率が高く、ダクト垂直部はすべて陰性となった。検出率の高い箇所は、工程内残留物の多い箇所と一致しており、残留物中にサルモネラが長期間生残したもの (Morita ら, 2004) と考えられた。Beuchat らは低水分活性の飼料や食品において、サルモネラは長期間生残することを報告した (2013) が、工程内残留物の水分活性は 0.4 程度であるため、サルモネラが長期間生残したものと考えられた。

次に、工程内残留物除去の前後で製品油粕および微粉の汚染実態を確認した結果、製品油粕は残留物除去後にすべて陰性となった。一方、サイクロン微粉は残留物除去後に除去前より汚染率が低下したものの、有意差は確認されなかった ( $p>0.05$ )。一



般的に、微粉回収工程は構造上開放できる箇所が少ない場合が多く、残留物およびそこに生残するサルモネラを完全に除去することが困難である。このため、残留物がサルモネラに汚染された場合、サルモネラが長期間にわたって生残する可能性がある (Morita ら, 2004)。従って、サイクロン微粉からのサルモネラ混入を防止するためには、サイクロン微粉を除去または再加熱することが必要であることが示唆された。

筆者は、油粕製造工程におけるサルモネラ汚染対策について具体的な手法およびその効果を明確に示した報告を見出すことはできなかった。今回評価した定期的な工程内残留物の除去および微粉の除去は、油粕製造工程のサルモネラ汚染対策として非常に効果的であることが分かった。

本法は、大規模な設備改善や殺菌設備の導入は不要で経済性に優れた手法であり、油粕だけではなく、類似した製造工程を有し、サルモネラ汚染が問題になっているチョコレートや製粉、(Podolak ら, 2010)、配合飼料および油粕以外の飼料原料 (Binter ら, 2011 ; Jones ら, 2011) などにも応用が可能であると考えられた。

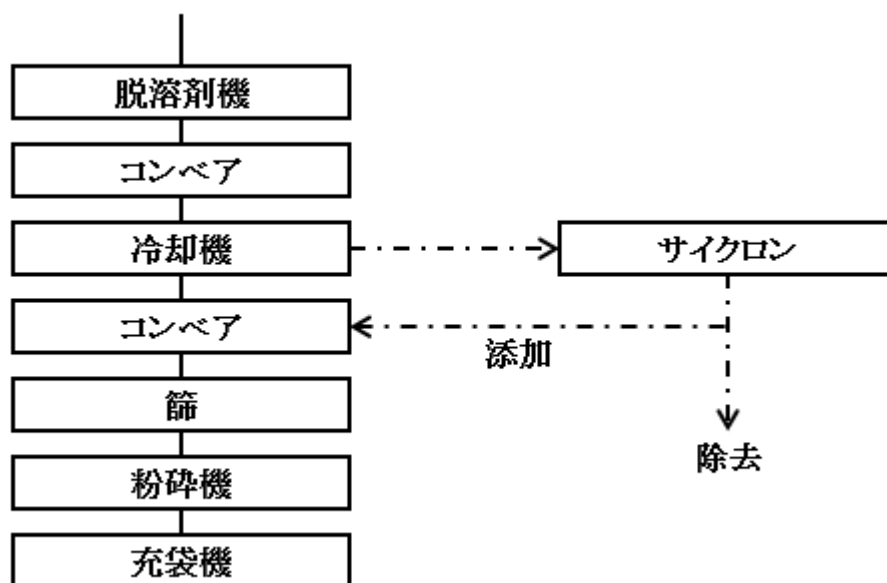


図 3-1 インドの油粕工場における脱溶剤機以降の製造工程の概要

——— : 油粕工程、- - - ➤ : 微粉回収工程

表 3-1 インド油粕工場の製造工程におけるサルモネラ汚染実態

採取箇所		試料数	検出数 (検出率(%))	血清型
脱溶剤機出口コンベア		22	4 (18.2)	Bareilly(3), O8
油粕循環ライン	水平コンベア	2	1 (50.0)	Gaminara, O8
	垂直コンベア	3	2 (66.7)	O7, O8(2)
冷却機	入口シュート	2	2 (100)	Bareilly(2)
	内部（上流部）	4	0 (0)	
	内部（中間部）	2	0 (0)	
	内部（下流部）	3	0 (0)	
	出口シュート	1	1 (100)	Kedougou
冷却機出口コンベア		3	2 (66.7)	Havana, O7, O8, [O3,10], [O1,3,19], O13, O35
粉碎機		2	0 (0)	
充袋機		2	0 (0)	
合計		46	12 (26.1)	

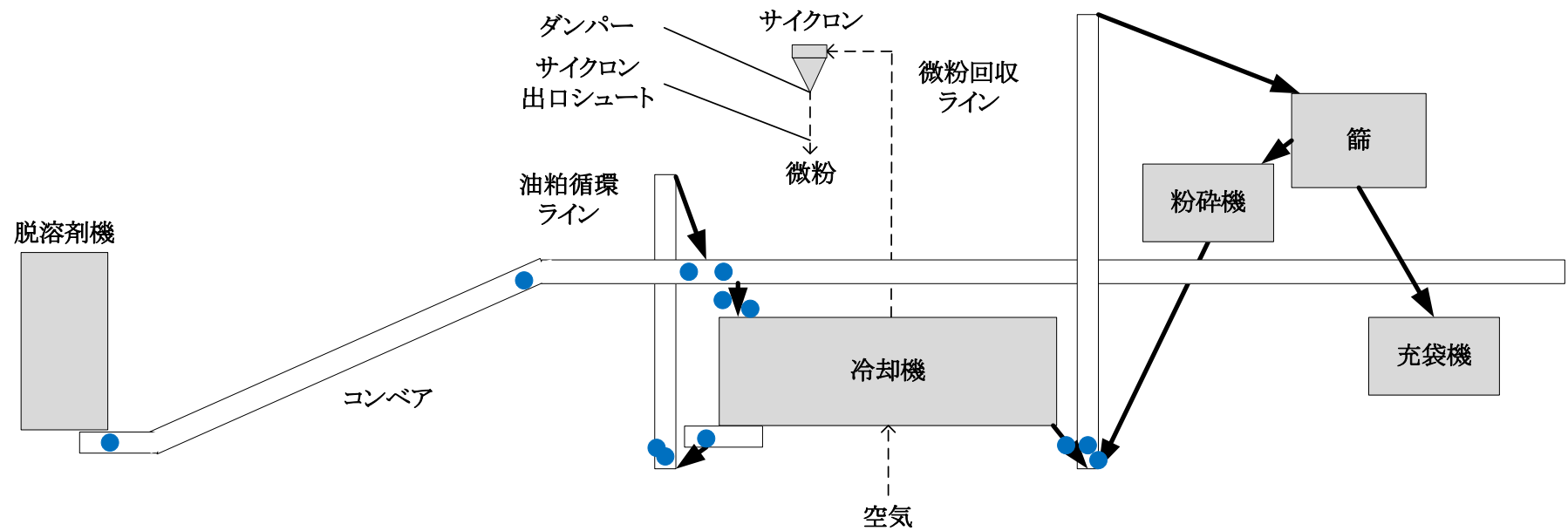


図 3-2 インドの油粕工場の製造工程におけるサルモネラ検出箇所

□ : コンベア、 □ : 装置、 → : シュート、 ----> : ダクト

● : サルモネラ検出箇所

表 3-2 インド油粕工場の微粉回収工程におけるサルモネラ汚染実態

採取箇所	試料数	検出数 (検出率(%))	血清型
垂直ダクト	5	0 (0)	
水平ダクト	13	3 (23.1)	O35, Give, O7
ダンパー	4	1 (25.0)	Typhimurium
サイクロンシュート	4	3 (75.0)	Bardo, Orion, Typhimurium
合計	26	7 (26.9)	

表 3-3 インドの油粕工場における残留物除去前後の油粕および微粉のサルモネラ汚染実態

材 料	残 留 物	材 料 数	検 出 数 ( 検 出 率 (%) )	血 清 型
油 粕	除 去 前	10	2 (20.0)	O7
	除 去 後	20	0 (0)	
微 粉	除 去 前	10	3 (30.0)	Typhimurium, O7
	除 去 後	20	2 (10.0)	O7, [O3,10]

## 第四章 製品油粕を対象としたサルモネラ簡易迅速検出法

### 4-1 はじめに

第二章および第三章では、油粕工場におけるサルモネラの汚染実態とその制御方法を明らかにした。これらの手法を用いて、サルモネラの汚染リスクの低い油粕を製造した後、製品検査を実施し、その安全性を保証する必要がある。我が国の油粕工場は製品の保管能力が不足している場合が多く、サルモネラ検査の判定前に製品を出荷することが少なくない。さらに、油粕は数千トン単位で出荷されることがあり、万が一サルモネラ汚染が発生した場合の社会的影響や経済的損失は極めて大きい。このような理由から、油粕工場ではこれまでに 1－2 テスト（Erdman ら，2003）、*Salmonella*-Tek（Desmidt ら，1994）、Singlepath *Salmonella*（Lindhardt ら，2009）および Dynabeads anti-*Salmonella*（Shaw ら，1998）などの簡易迅速キットが用いられてきた。しかし、これらの手法でも結果判明までに 30 時間から 3 日という時間を要することから、検査時間の短縮が求められる油粕工場では簡易でありながらより迅速な検出法の導入が課題となっている。この課題を受けて開発されたクオリバック<sup>TM</sup>システム（Koyuncu ら，2010）は、PCR に必要な試薬類を錠剤化したことにより簡便性が高く、試料の調製から判定までを最短約 25.5 時間で実施することが可能である。そのため、迅速な判定が求められる飼料工場の検査室で多用されている。最近、同システム専用のリアルタイム PCR 試薬キットが開発され、本システムの検査時間は約 23 時間にまで短縮された。しかし、油粕工場では安全な飼料を迅速に出荷できる生産システムの構築のため、検査開始から 10 時間程度で判定可能な検出法を確立することが求められている。さらなる短縮化のためには、検査時間の大部分を占める前増菌培養時間を短縮する必要がある、最適な培地の選定と培養条件の確立が重要である。前増菌培地の選定にあたっては、その成分が PCR の増幅反応や DNA の検出を

阻害しないことも考慮しなければならない。しかし、これらに関する報告は少なく、また検査機器および対象とする試料や菌種ごとの最適な条件は確立されていない場合が多い。

前増菌培地として大腸菌 O-157 の短時間培養の検査で実績があり、クオリバックス<sup>TM</sup> システムとの組み合わせで良好な結果が報告されている MP 培地（Guerini ら，2006；Peng ら，2011）を検討した。また、DNA の溶出および精製段階において、操作が簡易かつ特殊な膜を使用することにより前増菌培養液の影響を受けにくいことが報告されている QuickGene（牧野ら，2006；Oldham ら，2012）を採用し、クオリバックス<sup>TM</sup> システムとの組み合わせを検証し、油粕工場に適した検出法を確立した。

## 4-2 材料および方法

### 4-2-1 菌株および菌液の調製

供試菌株として、油粕の製造環境から分離した *S. Senftenberg* を用いた。菌株を、HIB を用いて 35℃ で 2 代継代培養した後、リン酸緩衝生理食塩水で 10 倍段階希釈し、必要な菌数になるよう調整した。

### 4-2-2 各前増菌培地の増殖速度の比較

人工汚染試料の調製には、日本の油粕工場で採取した大豆粕を用いた。大豆粕に *S. Senftenberg* が 10<sup>0</sup>cfu/25g となるよう添加し、均一になるまで混合した。

前増菌培地には、日本で多用されている BPW、Enterobacteriaceae Enrichment Mannitol 培地（EEM：Merck）、乳糖培地（LB：日水製薬）および大腸菌 O157：H7 の検査で実績のある MP 培地（DuPont Qualicon）を採用した。各培地に 0.6% となるように Tween80 を加えて、BPW、EEM および LB は 35℃、MP 培地は 42℃ で培養し、5～9 時間後の 1 時間毎、14 時間後および 18 時間後に菌数を測定した。各培地とも 3～4 回試験を繰り返し、菌数の平均値を算出した。なお、MP 培地とそれ以外



の培地における 7 時間培養後の菌数の有意差の検定には Tukey の多量比較検定 (SPSS Statistics 19 : 日本 IBM) を用いた。

#### 4-2-3 BPW と MP 培地を用いたサルモネラ検出率の比較

大豆粕に *S. Senftenberg* が  $10^2$ cfu/25g、 $10^1$ cfu/25g および  $10^0$ cfu/25g となるよう添加し、均一になるまで混合した (人工汚染試料)。人工汚染試料は各菌数について 20 検体ずつ作製し、このうち 10 検体には BPW、残り 10 検体には MP 培地を添加して菌の回収を試みた。

さらに、日本の油粕工場で採取した製造工程内残留物 13 検体と油粕原料 12 検体を用いた (自然汚染試料)。製造工程内残留物は、加熱機以降の装置を開放し、装置内に残留している油粕と微粉の混合物を 25g 採取した。油粕原料は原料船の船倉または搬入工程から、原料と埃や土の混合物を 25g 採取した。

前増菌培地には BPW と MP 培地を採用し、培養時間はそれぞれ 18 時間、14 時間、培養温度はそれぞれ 35℃、42℃とした。前増菌培養後は飼分法に準じて検査を行い、サルモネラの有無を確認した。

#### 4-2-4 各検出法

サルモネラ検出用自動測定装置にはクオリバックス<sup>TM</sup> システム (DuPont Qualicon)、試薬キットとして *Salmonella* RT (DuPont Qualicon) を用いた。また、DNA 濾過キットとして QuickGene-mini80 (クラボウ) を用いた。飼分法 (農林水産省, 1995) に準じた方法を培養法、クオリバックス<sup>TM</sup> システムを使用した方法を BAX 法、クオリバックス<sup>TM</sup> システムおよび QuickGene-mini80 を組み合わせた方法を QuickGene-BAX 法とし、各検出法のフローを図 5-1 に示した。また、MP 培地での前増菌培養時間を 7 時間に短縮し、クオリバックス<sup>TM</sup> システムおよび QuickGene-mini80 を組み合わせた方法を短縮 QuickGene-BAX 法とし、各検出法の

分析時間を図 5-2 に示した。培養法は、選択増菌培地に HTT、選択分離培地に DHL または CAS を用いた。さらに、発育した定型的なコロニーを TSI および LIM に接種して 35℃で 18~24 時間培養後に性状を確認した後、サルモネラ免疫血清を用いて O 抗原の群別を行った。BAX 法は前増菌培養後、Brain Heart Infusion Broth (BHI : Oxoid) で 3 時間の二次培養を行い、溶菌した後、クオリバックス™システムで検査した。QuickGene-BAX 法は、前増菌培養後、QuickGene-mini80 を用いて溶菌・濾過し、クオリバックス™システムで検査した。

#### 4-2-5 BAX 法と QuickGene-BAX 法の比較

HIB で純培養した *S. Senftenberg* を、 $10^3$ cfu/mL、 $10^2$ cfu/mL、 $10^1$ cfu/mL および  $10^0$ cfu/mL になるよう希釈し、BAX 法および QuickGene-BAX 法で検査した。なお、試験はそれぞれ 3 回実施した。

次に、自然汚染試料として日本の油粕工場で採取した製造工程内残留物 18 検体と環境拭き取り試料 11 検体を培養法、BAX 法および QuickGene-BAX 法で検査した。なお、環境拭き取り試料はペプトン加生理食塩水を浸漬させた滅菌綿棒または滅菌ガーゼを使用し、約 1,000 cm<sup>2</sup>の面積を拭き取り 1 検体とした。

#### 4-2-6 更なる分析時間の短縮

*S. Senftenberg* が  $10^0$ cfu/25g となるように調整した人工汚染油粕を、MP 培地を用いて 42℃で培養した。6 時間、7 時間および 8 時間培養後、サルモネラ菌数を測定するとともに、BAX 法および QuickGene-BAX 法で検査した。なお、試験はそれぞれ 3 回実施した。

次に、自然汚染試料として同様に採取した製造工程内残留物 6 検体と環境拭き取り試料 3 検体を MP 培地で 7 時間培養後、培養法、BAX 法および QuickGene-BAX 法で検査した。

### 4-3 成績

#### 4-3-1 各前増菌培地の増殖速度の比較

各前増菌培地における *S. Senftenberg* の菌数の変化と 7 時間培養後の菌数を、図 4-3 と図 4-4 にそれぞれ示した。7 時間培養の時点における MP 培地で培養した菌数 (N=3、平均値： $6.6 \times 10^3 \text{cfu/mL}$ ) は、BPW (N=4、平均値： $1.6 \times 10^3 \text{cfu/mL}$ )、EEM 培地 (N=4、平均値： $8.5 \times 10^2 \text{cfu/mL}$ ) および乳糖培地 (N=4、平均値： $7.5 \times 10^2 \text{cfu/mL}$ ) と比較し、有意に増殖速度が速かった ( $p < 0.001$ )。

#### 4-3-2 BPW と MP 培地を用いたサルモネラ検出率の比較

*S. Senftenberg* を  $10^0 \sim 10^2 \text{cfu/25g}$  となるように調整した人工汚染試料を用いて、BPW と MP 培地の検出率の比較した (表 4-1)。 $10^0 \text{cfu/25g}$  の試料では両培地とも 2 ～3 検体でサルモネラが検出されなかったが、 $10^1 \text{cfu/25g}$  以上の検体では両培地ともすべて陽性と判定された。

次に、自然汚染試料と用いて BPW と MP 培地の検出率を比較した結果を表 5-2 に示した。製造工程内残留物では、両培地とも 13 検体中 5 検体が陽性と判定され、検査結果は完全に一致した。一方、油粕原料では、12 検体中 BPW では 4 検体、MP 培地では 6 検体が陽性と判定され、MP 培地では BPW で陰性と判定された 2 検体からサルモネラを検出することができた。

#### 4-3-3 BAX 法と QuickGene-BAX 法の比較

*S. Senftenberg* の純培養液を用いて、BAX 法と QuickGene-BAX 法の検出率を比較した結果を表 4-3 に示した。BAX 法では、 $10^3 \text{cfu/mL}$  の濃度では 3 検体中 2 検体が陽性と判定されたが、 $10^2 \text{cfu/mL}$  以下の濃度ではすべて陰性と判定された。一方、QuickGene-BAX 法では、 $10^2 \text{cfu/mL}$  以上の濃度ではすべて陽性と判定され、 $10^1 \text{cfu/mL}$  および  $10^0 \text{cfu/mL}$  の濃度でも、それぞれ 2 検体および 1 検体が陽性と判定

された。

次に自然汚染試料と用いて、BAX 法と QuickGene-BAX 法の検出率を比較した結果を表 4-4 に示した。製造工程内残留物では、18 検体中 BAX 法では 5 検体、QuickGene-BAX 法では 6 検体が陽性と判定され、QuickGene-BAX 法では BAX 法で陰性と判定された 1 検体からサルモネラを検出することができた。一方、環境拭き取り試料では、両法とも 11 検体中 6 検体が陽性と判定され、検査結果は完全に一致した。

#### 4-3-4 更なる分析時間の短縮

*S. Senftenberg* が  $10^0\text{cfu}/25\text{g}$  となるように調整した人工汚染油粕を、MP 培地で 6 時間、7 時間および 8 時間培養後に BAX 法および QuickGene-BAX 法で検査した結果を表 5-5 に示した。BAX 法では、いずれの時間においても 3 検体中 2 検体が陰性と判定された。一方、QuickGene-BAX 法では、6 時間培養後は 3 検体中 1 検体が陰性と判定されたものの、7 時間以上の培養では各 3 検体すべて陽性と判定された。なお、6 時間、7 時間および 8 時間培養後のサルモネラ菌数は、それぞれ  $3.3\times 10^2\sim 4.5\times 10^2\text{cfu/mL}$ 、 $2.7\times 10^3\sim 5.7\times 10^3\text{cfu/mL}$ 、 $3.1\times 10^4\sim 3.0\times 10^5\text{cfu/mL}$  となった。

次に自然汚染試料を MP 培地で 7 時間培養後、BAX 法と QuickGene-BAX 法で検査した結果、および MP 培地での培養を 14 時間まで継続後、培養法で検査した結果を表 5-6 に示した。製造工程内残留物では、培養法および QuickGene-BAX 法では 6 検体中 5 検体が陽性と判定され、検査結果は完全に一致した。一方、BAX 法では 6 検体中 4 検体が陽性と判定され、培養法および QuickGene-BAX 法で陽性と判定された 1 検体からサルモネラを検出できなかった。また、環境拭き取り試料でも同様に、BAX 法では培養法および QuickGene-BAX 法で陽性と判定された 1 検体からサルモネラを検出できなかった。

#### 4-4 考察

油粕工場では製品の保管能力や検査担当者の勤務時間の制約により、前増菌培養を含めて 10 時間程度で判定できるサルモネラ検出法の確立が求められている。そのためには、検査時間の大部分を占める前増菌培養や溶菌操作の効率化が必須である。

前増菌培地として今回評価した MP 培地は、BPW、EEM および LB と比較し、サルモネラ増殖速度が速いことが判明した。また、人工汚染試料を用いて、BPW での 18 時間培養と MP 培地での 14 時間培養を比較した結果、両法とも 7 割以上の確率で  $10^0\text{cfu}/25\text{g}$  の試料からサルモネラを検出することができた。競合菌の多いミンチ肉からも MP 培地による短時間培養でサルモネラを検出できることが報告されている (Guerini ら, 2006) が、エンテロバクターやクレブシエラなどの大腸菌群の夾雑が知られている配合飼料 (伊藤ら, 1981) や油粕においても、短時間培養での検査が可能であることが示唆された。MP 培地は培養温度が  $42^{\circ}\text{C}$  に設定されているため、競合菌の発育が抑制されたことが、短時間培養での検出を可能にした要因であると考えられた。

他方、前増菌培養や選択増菌培養には、損傷菌を回復する効果があるため、前増菌培養段階における  $42^{\circ}\text{C}$  での短時間培養は、損傷菌を含む自然汚染試料からのサルモネラ検出に不向きであることが懸念された。しかし、工程内残留物を用いた比較試験では、MP 培地での 14 時間培養は、BPW での 18 時間培養と同等の結果となった。また、油粕原料では、MP 培地は BPW で陰性と判定された 2 検体からサルモネラを検出することができた。油粕原料は、サルモネラが陽性である場合においても、そのほとんどが MPN 値で  $30/100\text{g}$  以下であることが事前の調査で確認されている (盛田ら, 2007)。また、大豆や菜種などの油粕原料は、2~4 週間をかけて海外から輸入されることから、輸送期間における乾燥や高温により損傷を受けていることが想定される。以上のことから MP 培地は、少量の損傷菌に汚染された試料にも有効であることが示唆された。

次に前増菌培養後の二次増菌および溶菌操作に要する時間の短縮を検討した。PCR を原理としたサルモネラ検出法では、競合菌や試料由来の成分が DNA の増幅反応や検出を阻害する可能性がある (Ganz ら, 2013)。それらの影響を抑制するためには、前増菌培養液の洗浄や別の培地での二次培養が必要とされている。クオリバックス™ システムにおいては、前増菌培養液を BHI で 3 時間培養することが規定されている。そこで、この二次培養およびその後の溶菌操作における時間を短縮する目的で、DNA 濾過システムである QuickGene-mini80 を評価した。

サルモネラ菌液を用いて、BAX 法と QuickGene-BAX 法を比較した結果、QuickGene-BAX 法は BAX 法よりも検出感度が高かった。BAX 法では培養液 10 $\mu$ L を 500 $\mu$ L の BHI で 3 時間培養した後、BHI 培養液 5 $\mu$ L を溶菌バッファ 200 $\mu$ L に採取した。BHI での 3 時間培養により、サルモネラ濃度は供試菌液の約 10 倍になることが事前の調査で判明したが、それを考慮しても、溶菌バッファ中の最終的な濃度は、供試培養液の 10<sup>-1</sup> 倍程度である。一方、QuickGene-BAX 法では、培養液 200 $\mu$ L を同量の溶菌バッファに溶出することから、最終的な濃度は供試培養液と同等である。このため、QuickGene-BAX 法は BAX 法よりも検出感度が高かったと考えられた。さらに、BAX 法では菌液の採取が 10 $\mu$ L と少量であるため、検査結果にバラツキが発生し、10<sup>3</sup>cfu/mL の菌液でも陰性と判定されたものが存在したと考えられた。

自然汚染試料を用いた評価では、環境拭き取り試料を用いた場合の検出感度は両法で同等であったが、油粕原料を用いた場合は、QuickGene-BAX 法では BAX 法で陰性と判定された 1 試料からサルモネラを検出することができた。これは、環境拭き取り試料中のサルモネラは菌数が多かったが、油粕原料中のサルモネラは菌数が少なく損傷していたため、前増菌培養で十分に増殖せず、サンプル採取量の多い QuickGene-BAX 法の方が有効であったためと考えられた。

QuickGene-BAX 法は前増菌培養後の菌数が 10<sup>3</sup>cfu/mL 以上であれば菌を検出することができた。また、MP 培地では 10<sup>0</sup>cfu/25g のサルモネラが 7 時間培養後に

10<sup>3</sup>cfu/mL 以上に増殖することを確認した。そこで、MP 培地での培養時間のさらなる短縮を検討した。その結果、油粕中の 10<sup>0</sup>cfu/25g のサルモネラを MP 培地で 7 時間以上培養後、QuickGene-BAX 法で検査した結果、検出率は 100% となった。自然汚染試料を用いた評価においても、7 時間培養の短縮 QuickGene-BAX 法の検査結果は、培養法と同等の結果となった。7 時間培養の BAX 法は検出感度が低かったことから、QuickGene-BAX 法を用いることにより前増菌培養時間を 7 時間まで短縮できる可能性が示唆された。

図 4-2 に示した通り、短縮 QuickGene-BAX 法は検査開始当日に検査結果が判明する。本手法の導入は、サルモネラ陰性を確認した製品出荷の徹底、サルモネラ汚染発生時の被害拡大の防止、検査担当者の労働時間短縮に伴う人件費の削減などの観点で、油粕工場におけるメリットが極めて大きい。今回評価した MP 培地、QuickGene-mini80 およびクオリボックス<sup>TM</sup> システムを組み合わせた手法は、14 時間の前増菌培養、約 30 分の濾過および溶菌、約 1 時間の DNA 増幅および検出の計約 15.5 時間で培養法と同等の感度が得られた。さらに培養時間を 7 時間に短縮し、合計 8.5 時間としても、現在広く採用されている BAX 法と同等の感度でサルモネラを検出することができた。油粕工場では、製品以外にも製造工程内残留物や環境拭き取り試料、油粕原料など、さまざまな試料を検査している。これらの試料の特徴や要求される迅速性に応じて、15.5 時間と 8.5 時間の 2 種類の迅速検出法を使い分けることにより、飼料工場の品質管理レベルが向上すると考えられた。

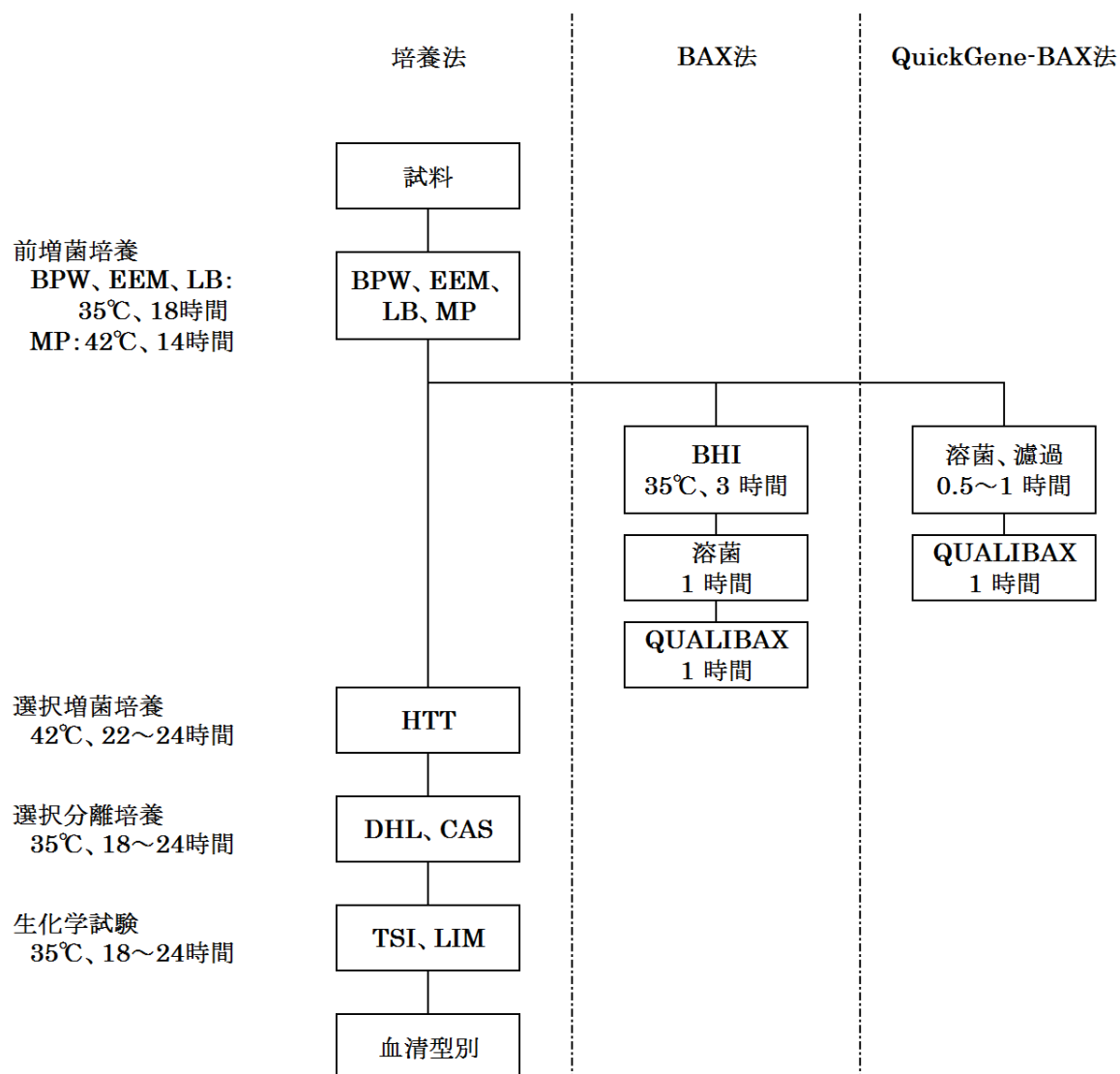


図 5-1 迅速法評価のためのサルモネラ検出法

BPW : Buffered Peptone Water, EEM: Enterobacteriaceae Enrichment Mannitol Broth, LB: Lactose Broth, HTT: Hajna Tetrathionate Broth, DHL: Diagnostic Semi-solid Salmonella Agar, CAS: CHROMAgar Salmonella, TSI: Triple Sugar Iron Medium, LIM: Lysine Indol Motility Medium, BHI: Brain Heart Infusion Broth



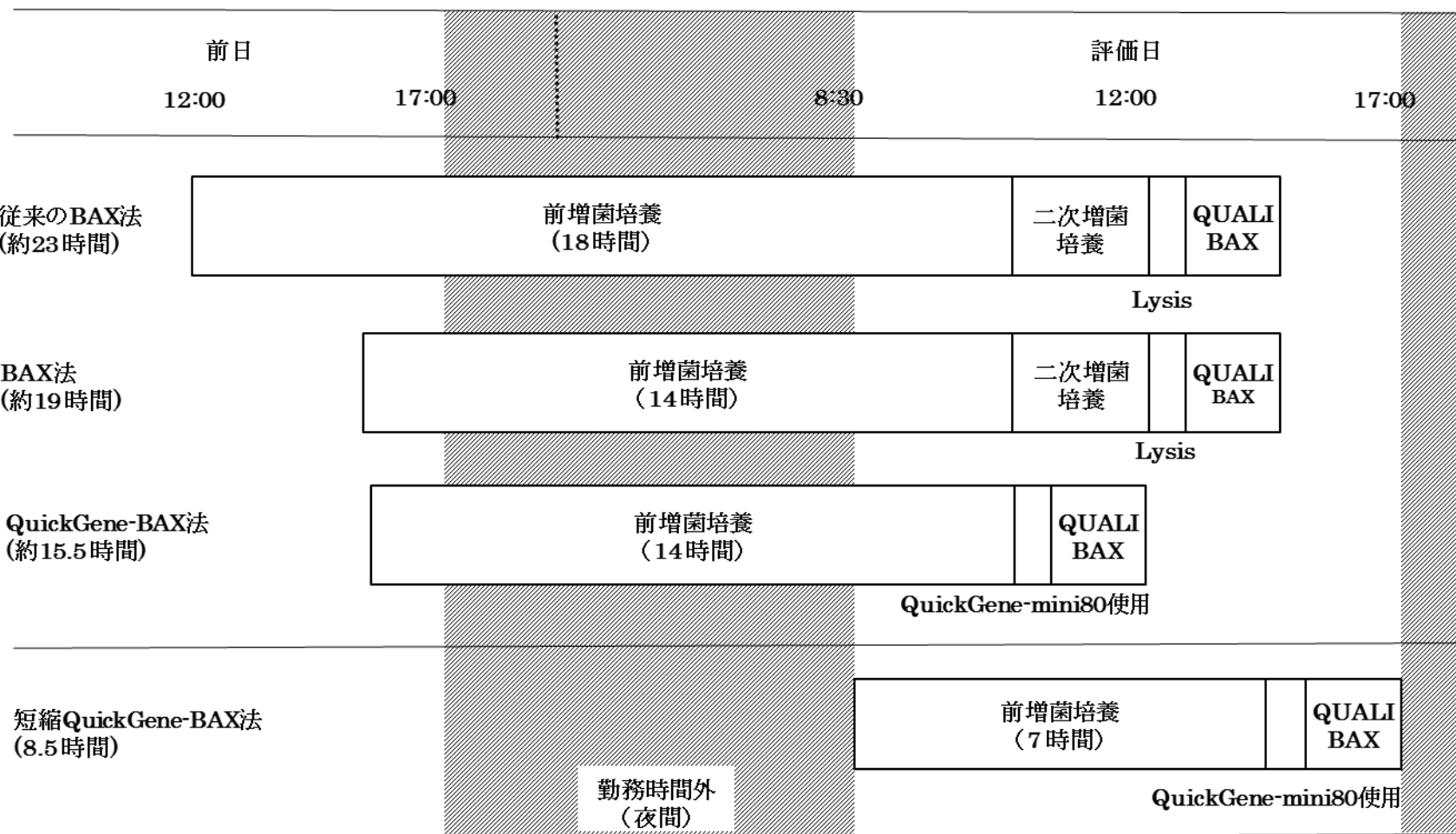


図 5-2 本章で使用した検出法の分析時間、Kitazawa ら (2017) にて公表

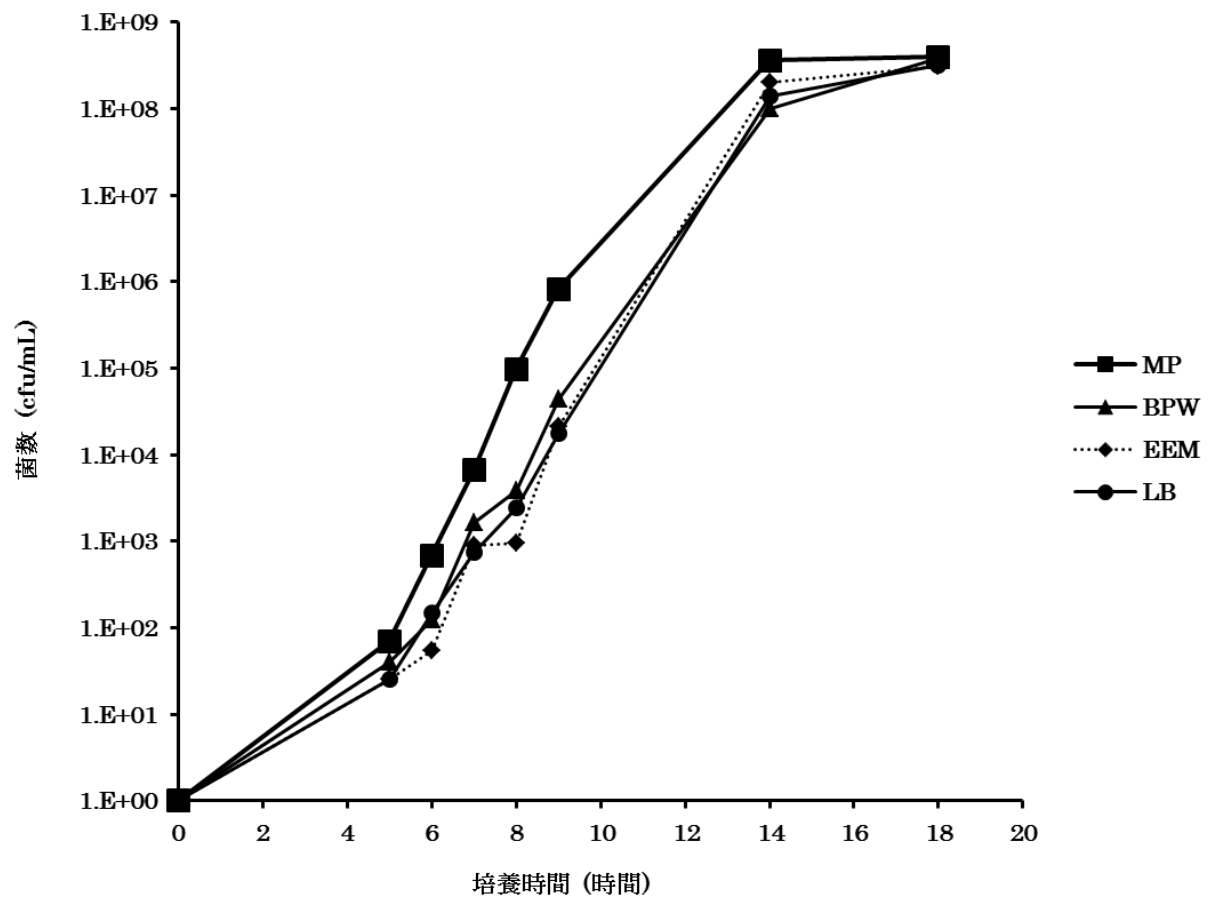


図 5-3 各前増菌培地におけるサルモネラ菌数の変化

Kitazawa ら (2017) にて公表

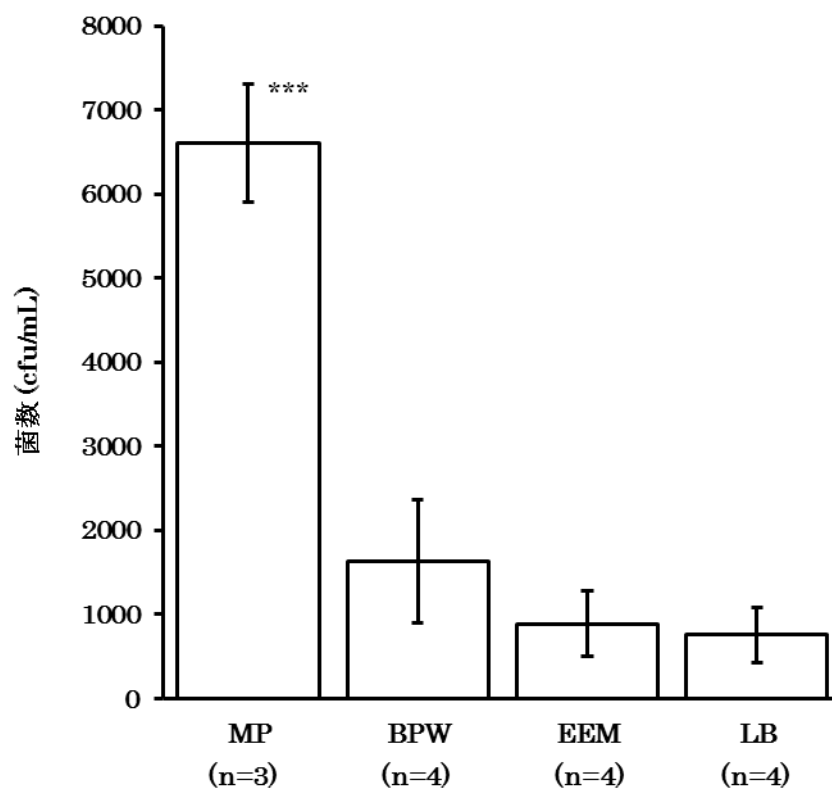


図 5-4 MP 培地と他の培地における 7 時間培養後の菌数の比較

\*データは平均値±標準誤差で示す

\*\*\* $p < 0.001$

Kitazawa ら (2017) にて公表

表 5-1 *S.senftenberg* を添加した試料を用いた BPW と MP 培地の比較

添加菌数 (cfu/25g)	試料数	検出数 (検出率(%))	
		BPW	MP 培地
		(18 時間)	(14 時間)
10 <sup>2</sup>	10	10	10
		(100)	(100)
10 <sup>1</sup>	10	10	10
		(100)	(100)
10 <sup>0</sup>	10	8	7
		(80.0)	(70.0)

表 5・2 自然汚染試料を用いた BPW と MP 培地の比較

材料	試料数	検出数	
		(検出率(%))	
		BPW (18 時間)	MP 培地 (14 時間)
製造工程内残留物	13	5 (38.5)	5 (38.5)
油粕原料	12	4 (33.3)	6 (50.0)

表 5-3 *S.senftenberg* の菌液を用いた BAX 法と QuickGene-BAX 法の比較

菌数 (cfu/mL)	結果	
	BAX 法	QuickGene-BAX 法
$10^3$	++*	+++
$10^2$	-	+++
$10^1$	-	++
$10^0$	-	+

※データは 3 回の実験から得られた。

- : 3 検体すべて陰性、+ : 1 検体陽性、++ : 2 検体陽性、+++ : 3 検体すべて陽性

表 5-4 自然汚染試料を用いた培養法、BAX 法および QuickGene-BAX 法の比較

材 料	材 料 数	検 出 数 (検 出 率(%))		
		培 養 法	BAX 法	QuickGene-BAX 法
製造工程内残留物	18	6	5	6
		(33.3)	(27.8)	(33.3)
環境拭き取り	11	6	6	6
		(54.5)	(54.5)	(54.5)

Kitazawa ら (2017) にて公表

表 5-5 *S.senftenberg* を添加した試料を用いた異なる培養時間における BAX 法と QuickGene-BAX 法の比較

培養時間 (時間)	培養後の菌数 (cfu/mL)	結果	
		BAX 法	QuickGene-BAX 法
6	$3.3 \times 10^2 \sim 4.5 \times 10^2$	+※	++
7	$2.7 \times 10^3 \sim 5.7 \times 10^3$	+	+++
8	$3.1 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^5$	+	+++

※データは 3 回の実験から得られた。

- : 3 検体すべて陰性、+ : 1 検体陽性、++ : 2 検体陽性、+++ : 3 検体すべて陽性

Kitazawa ら (2017) にて公表



表 5-6 自然汚染試料を用いた 7 時間培養における BAX 法と QuickGene-BAX 法の比較

材 料	材 料 数	検 出 数 (検 出 率(%))		
		培 養 法	BAX 法	QuickGene-BAX 法
製造工程内残留物	6	5	4	5
		(83.3)	(66.7)	(83.3)
環境拭き取り	3	2	1	2
		(66.7)	(33.3)	(66.7)

Kitazawa ら (2017) にて公表

## 総括

国際的な食品規格を策定するコーデックス委員会では、食品衛生を「食品生産流通網（フードチェーン）のすべての段階における安全性と適切性を確保するための必要なすべての条件と手段」と定義している。古くから、飼料における主要なたんぱく源として位置付けられてきた油粕の需要は多く、その衛生はフードチェーンにおける育成の段階における重要な課題の一つであると考えられる。油粕の品質上の課題としてサルモネラ汚染が指摘されており、その製造環境からは高頻度でサルモネラが分離されることが報告されている。油粕の製造工程は完全な密閉構造ではなく、冷却や換気の目的で工程の多くの箇所で外気との接触がある。そのため、油粕のサルモネラ汚染を制御するためには、製造環境のサルモネラ汚染対策を軽減する必要がある。

そこで、本研究では製品油粕および製造環境のサルモネラ汚染を制御することを目的として、油粕工場に適した検出法を評価した。さらに、実際の油粕工場および製造工程を対象に、製造環境および油粕のサルモネラ汚染対策を確立した。また、製品油粕の保管能力が不十分である我が国の油粕工場に適した簡易迅速検出法を検討した。

## 第一章 油粕工場における遅延二次増菌培養法の検討

油粕製造環境のサルモネラを効率的に分離する検出法として、DSE 法を評価した。飼分法と選択増菌培地に HTT を用いた DSE 法を比較した結果、DSE 法では 18 検体（14.3%）が陽性と判定され、飼分法で陰性と判定された 2 検体からサルモネラを分離することができた。飼分法の中では、HTT-DHL 法および HTT-CAS 法、SC-CAS 法、SC-DHL 法の順でサルモネラを多く分離することができた。試料別に見ると、汚染菌数が高い環境拭き取り試料では飼分法（HTT-DHL、HTT-CAS）と DSE 法の検査結果は一致したが、汚染菌数の低い油粕原料では、DSE 法の方が検出率は高かった。

選択増菌培地に RV および TBG を用いた場合においても、DSE 法ではそれぞれ飼分法で陰性と判定された 1 検体からサルモネラを分離することができた。選択増菌培地の比較では、飼分法では HTT で 11 検体 (20.4%)、RV で 10 検体 (18.5%)、TBG で 9 検体 (16.7%) が陽性、DSE 法では HTT および RV で 11 検体 (20.4%)、TBG で 10 検体 (18.5%) が陽性となった。試料別に見ると、環境拭き取り試料ではいずれの選択増菌培地を用いた場合においても飼分法と DSE 法の結果は一致した。一方、油粕および油粕原料では RV および TBG でサルモネラを分離できない試料が確認された。

分離株における O 抗原群別の結果、飼分法と DSE 法でともにサルモネラが分離された試料のうち 10.0%~43.8%は O 抗原が異なっていた。さらに複数検体については、飼分法で検出されなかった O 抗原のサルモネラを、DSE 法による 5~7 日の培養で分離することができた。

以上の結果から、飼分法と DSE 法の併用は油粕工場の疫学解析を目的とした検出法として効果的であることを明らかにした。また、DSE 法は選択増菌培養を 1 回追加するだけの簡便な方法であるため、従来のサルモネラ検出法と併用しやすいことも利点である。

## 第二章 油粕製造環境におけるサルモネラ汚染実態とその対策

### 油粕製造環境におけるサルモネラ汚染実態

油粕工場がサルモネラに汚染される機序を明らかにするため、日本 3 工場およびインド 1 工場の計 4 工場を対象に、製造環境のサルモネラ汚染実態を調査した。原料保管エリアの汚染調査の結果、インドの工場の汚染率は 60.0%で、日本の 3 工場と比較して著しく高いことが判明した。油粕原料は日本ではサイロに隔離保管されることに對し、今回調査したインドの工場では、倉庫に麻袋または野積みの状態で保管される。そのため、油粕原料に付着したサルモネラが油粕工場に持ち込まれた後、原料搬入作

業および作業者の移動、衛生動物を介して原料保管エリア全体を汚染したものと考えられた。

次に、油粕製造エリアの汚染調査を実施した結果、油分の高い菜種を扱う工場の方が、油分の低い大豆のみを扱う工場よりも汚染率が高い傾向を示した。サルモネラ汚染の増加に油分の存在が深く関与していることが改めて確認された。また、採取箇所別のサルモネラ汚染率は前処理が最も高かったが、これも製造環境の油汚れの度合いに影響するものと考えられた。

4 工場すべてにおいて、原料保管エリアで確認された血清型のほとんどは、同工場の油粕製造エリアでも確認された。これは油粕原料を介して油粕工場に侵入したサルモネラの一部が、原料保管エリアを汚染した後、作業者や衛生動物によって油粕製造エリアに拡散したことを裏付けた。また、これらの血清型は他の血清型よりも生残性が優れていると考えられ、工場内で常在化する可能性が示唆された。

#### **油粕製造環境におけるサルモネラ汚染対策**

油粕製造エリアの環境汚染対策を確立する目的で、作業床に使用するための効果的な消毒剤を検討した。その結果、ジデシルジメチルアンモニウムクロライドを主成分とする消毒剤 b の 10 倍希釈液が、殺菌効果、安全性および経済性に優れていることが明らかとなった。

次に日本 B 工場を対象に、靴裏消毒、床面の平滑化塗装および消毒剤 b の 10 倍希釈液による作業床の殺菌の 3 つの対策を順に実施した。なお、従業員の作業負担を軽減するため、高油分区域のみを 1 ヶ月に 1 回の頻度で消毒することとした。結果、高油分区域の汚染率は靴裏消毒のみを実施した場合は 89.5%であったが、靴裏消毒、床塗装および作業床の殺菌のすべてを実施した場合は 25.0%にまで低下した。以上のことから、これら 3 つの対策の組み合わせは、サルモネラの常在化を防止する有効な手段であることが確認された。さらに、サルモネラが作業者を介して高油分区域から低油分区域に拡散していることが改めて確認された。従って、本対策の継続はサルモネ

ラの拡散防止にも有効であると考えられた。

以上の結果から、油粕原料をサイロなどで隔離保管すること、油粕製造エリアにおいてはゾーニング管理を行い、靴裏消毒、床面の平滑化および定期的な噴霧消毒を実施することにより、油粕工場におけるサルモネラ汚染を低減することができることを明らかにした。なお、本評価は実際の現場を使った初めての報告である。

### 第三章 油粕製造におけるサルモネラ制御技術の確立

油粕製造工程のサルモネラ制御方法を確立する目的で、インドの工場を対象に、加熱工程以降の製造工程内の残留物の汚染実態を調査した。その結果、水平コンベアの入口と出口、垂直コンベアの下部で汚染率が高かったが、粉砕機や充袋機ではすべて陰性となった。また、微粉回収工程内では、ダクト水平部やサイクロン出口シュートの汚染率が高く、ダクト垂直部はすべて陰性となった。検出率の高い箇所は、工程内残留物の多い箇所と一致しており、残留物中にサルモネラが長期間生残したものと考えられた。

製造工程内にサルモネラが確認されたことから、加熱工程以降の油粕工程内の残留物を除去するとともに、本来、製造工程に添加されている汚染率の高い微粉を工程外に除去した。結果、製品油粕は残留物除去後の製造においてはすべて陰性となった。一方、微粉は残留物除去後には残留物除去前より汚染率が低下したものの、有意差は確認されなかった ( $p>0.05$ )。

微粉の工程は一般的に構造上開放できる箇所が少なく、残留物および残留物中に生残するサルモネラを除去することが困難である。すなわち、油粕のサルモネラ汚染率を低減させるためには、製造工程内、特に水平コンベアの入口と出口、垂直コンベアの下部などを集中的かつ定期的に清掃し、残留物を除去することが効果的であることが示唆された。さらに、微粉からのサルモネラ混入を防止するためには、微粉の除去が必要であることが示唆された。

現在、油粕製造工程におけるサルモネラ汚染対策について具体的な手法およびその効果を示した報告はない。今回評価した定期的な工程内残留部の除去および微粉の除去は、油粕製造工程のサルモネラ汚染対策として非常に効果的であった。

#### 第四章 製品油粕を対象としたサルモネラ簡易迅速検出法

我が国の油粕工場は製品の保管能力が不足している場合が多く、サルモネラ検査の判定前に製品を出荷することが少なくない。そのため、油粕工場では 24 時間程度で検査結果が判明する、PCR を原理とした簡易迅速検出法が広く採用されている。しかし、迅速性は不十分であり、検査開始から 10 時間程度で判定できるサルモネラ検出法の確立が求められている。

前増菌培養時間を短縮するため、MP 培地を評価した。なお、MP 培地の培養時間は 14 時間、培養温度は 42℃とした。MP 培地と BPW、EEM 培地および乳糖培地の増殖速度を比較した結果、MP 培地の 7 時間培養後の菌数は、他の培地と比較し有意に高かった ( $p<0.001$ )。また、人工汚染試料を用いて、BPW での 18 時間培養と MP 培地での 14 時間培養を比較した結果、両法とも 7 割以上の確率で 10%cfu/25g の試料からサルモネラを検出することができた。さらに、菌数が少なく損傷を受けていることが想定される自然汚染試料を用いた評価でも、BPW と MP 培地は同等の結果となった。以上のことから、MP 培地を採用することにより、前増菌培養時間を 14 時間に短縮できる可能性が示唆された。

次に前増菌培養後の二次増菌および溶菌操作に要する時間の短縮を目的に、QuickGene-mini80 を評価した。サルモネラ菌液を用いて、BAX 法と QuickGene-BAX 法を比較した結果、QuickGene-BAX 法は BAX 法よりも検出感度が高かった。自然汚染試料を用いた評価においても、QuickGene-BAX 法では BAX 法で陰性と判定された 1 試料からサルモネラを検出することができた。

以上の結果から、QuickGene-mini80 を用いることにより、BAX 法の検出感度が向

上することが明らかとなり、前増菌培養時間を短縮できる可能性が示唆された。そこで、MP 培地での培養時間を 7 時間に短縮し、 $10^6$ cfu/25g の人工汚染試料を検査した結果、QuickGene-BAX 法の検出率は 100%となった。また、自然汚染試料を用いた評価においても、7 時間培養の QuickGene-BAX 法の検査結果は、培養法と同等の結果となった。QuickGene-BAX 法を用いることにより前増菌培養時間を 7 時間まで短縮できる可能性が示唆された。

油粕工場では、製品試料以外にも工程内残留物や環境拭き取り試料、油粕原料など、さまざまな試料を検査している。これらの試料の特徴や要求される迅速性に応じて、15.5 時間と 8.5 時間の 2 種類の迅速検出法を使い分けることにより、飼料工場の品質管理レベルが向上すると考えられた。

油粕のサルモネラ汚染を完全に制御するためには、製造環境のサルモネラ汚染を軽減する必要がある。そのためには、DSE 法により製造環境から効率良くサルモネラを分離することが重要である。また、製造環境を汚染させないための手法として、1)油粕原料は原料サイロで隔離保管する、2)原料保管エリアと油粕製造エリアを可能な限り隔離し、作業員や衛生動物の往来を制限する、3)種子中の含有油分の多い油粕原料を扱う工場では、特に、油分の除去を徹底する、などが本研究から明らかとなった。さらに、汚染された製造環境を改善するためには、1)靴裏消毒、2)床面の平滑化塗装、3) 効果的な消毒剤による高油分区域の定期的な噴霧消毒、の 3 つの対策すべてを実施することが効果的であった。また、油粕のサルモネラ汚染対策として、1)工程内残留物の除去、2)微粉の除去、の 2 つの対策が効果的であることが明らかとなった。製造環境および油粕のサルモネラ汚染対策は、いずれも実際の工場および工程を対象に評価し、その効果を確認したものであり、油粕だけではなく、配合飼料、製粉およびチョコレートなど、粉体を扱う多くの飼料・食品工場で応用が可能である。本研究はフードチェーンの多くの段階で、その衛生管理手法を新たに提案したものであり、油粕

だけではなく、食の安全・安心に大いに貢献できるものとする。



## 引用文献

- Allred, J. N. Walker, J. W. Beal, Jr. V. C. and Germaine, F. W. (1967) A survey to determine the *Salmonella* contamination rate in livestock and poultry feeds. J. Am. Vet. Med. Ass. 151, 1857.
- Belete, T. Crowley, E. Bird, P. Gensic, J. and Wallace, F. M. (2014) A comparison of the BAX system method to the U.S. food and drug administration's bacteriological analytical manual and international organization for standardization reference methods for the detection of *Salmonella* in a variety of soy ingredients. J. Food Prot. 77, 1778-1783.
- Beuchat, L. R. Komitopoulou, E. Beckers, H. Betts, R. P. Bourdichon, F. Fanning, S. Joosten, H. M. and Ter Kuile, B.H. (2013) Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. J. Food Prot. 76, 150-172.
- Binter, C. Straver, J. M. Häggblom, P. Bruggman, G. Lindqvist, P. A. Zentek, J. and Andersson, M. G. (2011) Transmission and control of *Salmonella* in the pig feed chain: a conceptual model. Int. J. Food Microbiol. 145, S7-S17.
- Bremer, V. Leitmeyer, K. Jensen, E. Metzel, U. Meczulat, H. Weise, E. Werber, D. Tschaepe, H. Kreienbrock, L. Glaser, S. and Ammon, A. (2004) Outbreak of *Salmonella* Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001. Epidemiol. Infect. 132(5), 881-887.
- Brooks, B. W. Lutze-Wallace, C. L. Devenish, J. Elmufti, M. and Burke, T. (2014) Comparison of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay with bacterial culture for detection of *Salmonella* in poultry-hatchery environmental samples. Can. J. Vet. Res. 78, 68-71.
- Brooks, J. T. Rowe, S. Y. Shillam, P. Heltzel, D. M. Hunter, S. B. Slutsker, L.

- Hoekstra, R. M. and Luby, S. P. (2001) *Salmonella* Typhimurium infections transmitted by chlorine-pretreated clover sprout seeds. *Am. J. Epidemiol.* 154(11), 1020-1028.
- Carlson, V. L. and Snoeyenbos, G. H. (1970) Effect of moisture on *Salmonella* populations in animal feeds. *Poult. Sci.* 49, 717-725.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013) Notes from the field: *Salmonella* Bredeney infections linked to a brand of peanut butter united states, 2012. *MMWR* 62, 107.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015) Serotypes and the importance of serotyping *Salmonella*.  
[<https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotyping-importance.html>] 2016 年 11 月 17 日引用
- Crumrine, M. H. and Foltz, V. D. (1969) Survival of *Salmonella* Montevideo on wheat stored at constant relative humidity. *Appl. Microbiol.* 18, 911-914.
- D'Aoust, J.-Y., Sewell, A.M. and Jean, A. (1992) Efficacy of prolonged (48h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 121-130.
- Desmidt, M. Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. (1994) Comparison of the *Salmonella*-Tek ELISA to culture methods for detection of *Salmonella* enteritidis in litter and cloacal swabs of poultry. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 41, 523-528.
- Doesburg, J. J. Lamprecht, E. C. and Elliott, M. (1970) Death rates of *Salmonellae* in fishmeals with different water activities ( I .—During storage). *J. Sci. Food Agric.* 21, 632-635.
- Edwards, P. R. Bruner, D. W. and Moran, A. B. (1948) The genus *Salmonella*: Its

- occurrence and distribution in the United States. Agric. Exp. Stn. Bull. 525, 30.
- Edwards, P. R. and Galton, M. M. (1967) Salmonellosis. In Advances in Veterinary Science. eds. C. A. Brandly and C. Cornelius, Academic Press, New York, USA.
- Erdman, M. M. and Harris, D. L. (2003) Evaluation of the 1-2 test for detecting *Salmonella* in swine feces. J. Food Prot. 66, 518-521.
- Ganz, K. and Gill, A. (2013) Inhibition of polymerase chain reaction for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on walnut kernels. Food Microbiol. 35, 15-20.
- Grumbles, L. C. and Flowers, A. I. (1961) Epidemiology of paratyphoid infections in turkeys — Species encountered and possible sources of infection. J. Am. Vet. Med. Assoc. 138, 261.
- Guerini, M. N. Arthur, T. M. Shackelford, S. D. and Koohmaraie, M. (2006) Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7 growth media for use in test-and-hold procedures for ground beef processing. J. Food Prot. 69, 1007-1011.
- 橋本秀夫 (1968) サルモネラ陽性飼料の保存試験および生菌数と汚染指標菌の出現状況. 日本獣医師会雑誌 21, 109-112.
- 橋本秀夫, 広森旭, 曾我部誠, 波岡茂郎 (1966) 国産および輸入飼料のサルモネラ. 食品衛生学雑誌 7, 428-432.
- Hauge, S. and Bovre, K (1958) Forekomst av salmonellabakterier i importert vegetabilsk og proteinkraft kraftforblandinger. Nord. Veterinarmed. 10, 255.
- 廣井豊子 (2014) サルモネラ. 獣医公衆衛生学教育研修協議会編. 文英堂出版. 東京. 176-211.
- 伊藤喜久治, 大槻公一, 金子賢一, 金城俊夫 (1999) 細菌性ブーノーシス (5) サルモネラ症. 獣医公衆衛生学第2版. 小川益男, 金城俊夫, 丸山務編. 文英堂出版.

東京. 106.

伊藤均, 久米民和, 武久正昭, 飯塚廣 (1981) 配合飼料中の微生物分布と放射線殺菌効果. 日本農芸化学会誌 55, 1081-1087.

伊藤武 (2009) 最近の食品事故について－主に微生物－. 一般財団法人 東京顕微鏡院.

[<http://www.kenko-kenbi.or.jp/science-center/foods/topics-foods/3230.html>]

2016 年 11 月 8 日引用

伊藤武, 楠淳 (1996) サルモネラ食中毒の発生動向とニワトリ. 動薬研究 53. 1-10.

Jones, F. T. (2011) A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. J. Appl. Poult. Res. 20, 102-113.

Juven, B. J. Cox, N. A. Bailey, J. S. Thompson, J. E. Charles, O. W. and Shutze, J. V. (1983) Survival of *Salmonella* in dry food and feed. J. Food Prot. 47, 445-448.

鎌田信一, 押田敏雄, 酒井建夫, 局博一, 永幡肇 (2005) 第 5 章 飼養衛生. 獣医衛生学. 鎌田信一, 押田敏雄, 酒井建夫, 局博一, 永幡肇編. 文永堂出版. 東京. 224-227.

Kataoka, A. Enache, E. Black, D. G. Elliott, P. H. Napier, C. D. Podolak, R. and Hayman, M. M. (2014) Survival of *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Enterococcus faecium* in peanut paste formulations at two different levels of water activity and fat. J. food Prot. 77, 1252-1259.

鶏病研究会 (2001) サルモネラ検査法. 鶏病研報 37, 14-30.

木下光明, 寫田秀一, 草間豊子, 堀切正賀寿, 小林利男, 千原哲夫, 小山敬之 (1988) 植物性油かす類のサルモネラ汚染の状況 (第 1 報). 飼料研究報告 13, 143-151.

Kitazawa, H. Yukinawa, Y. Aoki, H. Ueda, F. Morita, T. and Mochizuki, M. (2017) A rapid method using QUALIBAX™ system for detecting *Salmonella* in oil meal. Jpn.

J. Food Microbiol. 34, 13-20.

小林利男, 畠田秀一, 草間豊子, 國分裕之, 堀切正賀寿, 小山敬之, 木下光明 (1989)

配混合飼料のサルモネラ汚染状況 (第 1 報). 飼料研究報告 14, 107-113.

小林利男, 畠田秀一, 草間豊子, 國分裕之, 堀切正賀寿, 小山敬之, 木下光明 (1989)

飼料原料のサルモネラ汚染の状況 (昭和 62 年度). 飼料研究報告 14, 115-122.

小沼博隆 (2014) サルモネラ. 中部衛生検査センターコラム.

[[http://www.chubueisei.co.jp/report/cek\\_index.php?id=60](http://www.chubueisei.co.jp/report/cek_index.php?id=60)] 2016 年 11 月 17 日引用

厚生労働省 (2016) 平成 27 年 (2015 年) 食中毒発生状況. 食中毒統計資料.

厚生労働省 (2016) 大量調理施設衛生管理マニュアル. 平成 9 年 3 月 24 日. 衛食第 85 号. 最終改正: 平成 28 年 10 月 6 日. 生食発 1006 第 1 号.

厚生省通知 (1998) 食品衛生法に基づく鶏卵の表示基準. 第 1674 号.

Koyuncu, S. Andersson, M. G. and Häggblom, P (2010) Accuracy and sensitivity of commercial PCR-based for detection of *Salmonella* enterica in feed. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2815-2822.

Kuehn, B. M. (2010) *Salmonella* cases traced to egg producers: findings trigger recall of more than 500 million eggs. JAMA. 304(12), 1316.

Lindhardt, C. Schönenbrücher, H. Slaghuis, J. Bubert, A. and Ossmer, R. (2009) Singlepath *Salmonella* Performance Tested Method 060401. J. AOAC Int. 92, 1885-1889.

Luzzi, I. Galetta, P. Massari, M. Rizzo, C. Dionisi, A. M. Filetici, E. Cawthorne, A. Tozzi, A. Argentieri, M. Bilei, S. Busani, L. Gnesivo, C. Pendenza, A. Piccoli, A. Napoli, P. Loffredo, L. Trinito, M. O. Santarelli, E. Ciofi degli Atti, M. L. (2007) An Easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104A associated with traditional pork salami in Italy. Euro Surveill. 12(4), E11-12.

- Mahon, B. E. Pönkä, A. Hall, W. N. Komatsu, K. Dietrich, S. E. Siitonen, A. Cage, G. Hayes, P. S. Lambert-Fair, M. A. Bean, N. H. Griffin, P. M. and Slutsker, L. (1997) An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J. Infect. Dis.* 175(4), 876-882.
- 牧野快彦, 森寿弘, 竹下由美子, 岩木義英, 半戸里江, 駒澤宏幸, 大友弘子, 佐々木翼, 渡邊信一, 百木康人 (2006) QuickGene-800 : 高分子多孔質メンブレンを用いた迅速かつ簡便な核酸抽出システムの開発. *FUJIFILM Res. Develop.* 51, 39-47.
- Miller, B. D. Rigdon, C. E. Robinson, T. J. Hedberg, C. and Smith, K. E. (2013) Use of global trade item numbers in the investigation of a *Salmonella* Newport outbreak associated with blueberries in Minnesota, 2010. *J. Food Prot.* 76(5), 762-769.
- Moffatt, C.R. Appuhamy, R. Kaye, A. Carswell, A. and Denehy, D. (2012) An outbreak of *Salmonella* Typhimurium phage type 135a gastroenteritis linked to eggs served at an Australian Capital Territory café. *Commun. Dis. Intell.* 36(3), E281-285.
- Morita, T. Kitazawa, H. Iida, T. and Kamata, S. (2004) Examination about survival of *Salmonella* in the environment of an oil-meal manufacturing plant. *Jpn. J. Anim. Hyg.* 30, 75-83.
- Morita, T. Kitazawa, H. Iida, T. and Kamata, S. (2006) Prevention of *Salmonella* cross-contamination in an oilmeal manufacturing plant. *J. Appl. Microbiol.* 101, 464-473.
- 盛田隆行, 北澤秀基, 村山靖之 (2010) 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. *日食微誌* 27, 21-26.
- 盛田隆行, 北澤秀基, 村山靖之, 飯田孝, 鎌田信一 (2007) 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.
- 中村政幸（1994）鶏のサルモネラ感染と環境要因．鶏病研報 30(増刊号), 15-23.
- 中村政幸（1997）*Salmonella Enteritidis* 汚染養鶏場の洗浄・消毒に関する最近の知見．鶏病研報 33, 200-209.
- 中村政幸，作田麻里，佐藤寛子，竹原一明（1997）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.
- 農林水産省生産局畜産部畜産振興課（1995）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 号．
- 農林水産省生産局畜産部畜産振興課（2004）流通飼料便覧．農林統計協会．東京．
- 農林水産省食品産業局食品製造課（2016）油粕生産実績調査（平成 27 年確報版）．
- 農林水産省消費・安全局（2002）採卵鶏における一般的衛生管理マニュアル．平成 14 年．
- 農林水産省消費・安全局衛生管理課（2004）家畜伝染病予防法関連法規集．文永堂出版．東京．
- 農林水産省消費・安全局衛生管理課長通知（2005）鶏卵のサルモネラ総合対策指針．平成 17 年 1 月 26 日．第 8441 号．
- 農林水産省消費・安全局長（2003）反すう動物用飼料への動物由来たん白質の混入防止に関するガイドライン．平成 15 年 9 月 16 日．15 消安第 1570 号．
- 農林水産省消費安全技術センター（2015）飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について（平成 26 年度）．飼料研究報告 40, 187-209.
- 農林水産省消費安全技術センター（2016）飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について（平成 27 年度）．飼料研究報告 41, 194-216.
- 農林水産省畜産局衛生課長通知（1993）採卵鶏農場におけるサルモネラ衛生対策指針．平成 5 年 9 月 10 日．通知 5-65.
- Oldham, A. L. Drilling, H. S. Stamps, B. W. Stevenson, B. S. and Duncan, K. E.

- (2012) Automated DNA extraction platforms offer solutions to challenges of assessing microbial biofouling in oil production facilities. *AMB. Express.* 2, 60.
- 小野一晃 (2014) 市販鶏肉のカンピロバクター及びサルモネラ汚染状況と分離株の薬剤感受性. *日獣会誌* 67, 442-448.
- Peng, L. X. Wallace, M. Andaloro, B. Fallon, D. Fleck, L. Delduco, D. and Tice, G. (2011) Modification of the BAX system PCR assay for detecting *Salmonella* in beef, produce, and soy protein isolate. *Performance Tested Method* 100201. *J. AOAC Int.* 94, 172-178.
- Podolak, L. Enache, E. Stone, W. Black, D. G. and Elliott P. H. (2010) Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *J. Food Prot.* 73, 1919-1936.
- Pourciau, S. S. and Springer, W. T. (1978) Evaluation of secondary enrichment for detecting salmonellae from bobwhite quail. *Avian Dis.* 22, 42-45.
- 鷺信雄 (1995) 第 10 章 油脂原料. 油脂・脂質の基礎と応用 改訂第 2 版. 鈴木平光編. 社団法人日本油化学会. 東京. 195-206.
- 坂崎利一, 田村和満 (1994) 1. *Salmonella*. 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編. 中央法規出版. 東京. 88-89.
- 坂崎利一, 田村和満 (1992) *Salmonella* 属 4. 生化学的性状. 腸内細菌<上巻>概論, *Salmonella* 属. 近代出版. 東京. 83-104.
- 佐藤将祐, 神村義則 (1999) 七. 油の製造法. 食用油脂入門. 神村義則監修. 日本食糧新聞社. 東京. 82-83.
- 佐藤静夫 (1990) 飼料とサルモネラ 1. サルモネラの分布と汚染要因. *鶏病研報* 26, 85-99.
- 佐藤静夫 (2003) 飼料のサルモネラ汚染と対策. *鶏病研報* 39, 113-132.



- Schultz, J. Jarquin, R. Ricke, S. C. and Hanning, I. (2012) Optimized culturing and nucleic acid-based methods for the detection of *Salmonella enterica* in poultry environments. *Poult. Sci.* 91, 2761-2766.
- Shaw, S. J. Blais, B. W. and Nundy, D. C. (1998) Performance of the Dynabeads anti-*Salmonella* system in the detection of *Salmonella* species in foods, animal feeds, and environmental samples. *J. Food Prot.* 61, 1507-1510.
- 渋井仁志, 中島泰治, 山根哲夫 (2012) 第2節 家畜用飼料. 配合飼料講座上巻設計篇. 緑書房. 東京. 482-561.
- Soria, M. C. Soria, M. A. and Bueno, D. J. and Colazo, J. H. (2013) A comparative study of culture methods and PCR assay for *Salmonella* detection in poultry drinking water. *Poult. Sci.* 92, 225-232.
- Soria, M. C. Soria, M. A. Bueno, D. J. and Terzolo, H. R. (2013) Comparison of 3 culture methods and PCR assays for *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* detection in poultry feed. *Poult. Sci.* 92, 1505-1515.
- 杉林孝夫, 岡本昌幸 (2014) 油粕. 配合飼料講座上巻設計篇, 配合飼料講座編纂委員会編. 緑書房. 東京. 176-211.
- Taylor, J. (1960) Food poisoning (b) *Salmonella* and salmonellosis. *Roy. Soc. Health J.* 80, 541.
- Timoney, J. Kelly, W. R. Hannan, J. and Reeves, D. (1970) A study of *Salmonella* contamination in some Dublin poultry processing plants. *Vet. Rec.* 87, 158.
- Torres, M. I. Lewis, P. Cook, L. Cook, P. Kardamanidis, K. Shadbolt, C. and Campbell, B. (2012) An outbreak of *Salmonella* Typhimurium linked to a kebab takeaway shop. *Commun. Dis. Intell.* 25(9), 1058-1066.
- 対馬典子, 杉山猛, 大友良光, 品川邦汎 (2000) 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.

Waltman, W. D., Horne, A. M., Pirkle, C. and Dickson, T.G. (1991) Use of delayed secondary enrichment for the isolation of *Salmonella* in poultry and poultry environments. Avian Dis. 35, 88-92.

Williams, J. E. (1981) *Salmonella* in poultry feeds. a world wide review. World's Poult. Sci. J. 37, 6-25. 97-105.

山本茂貴（2007）我が国における注目すべき食中毒と予防．国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部．

横関正直（1997）経営者のための養鶏場のサルモネラ対策．鶏卵肉情報センター．愛知．

横関正直（1998）酪農現場の衛生管理．デーリィ・ジャパン．東京．

財務省関税局（2016）財務省貿易統計．

## 謝辞

本博士論文の研究を行う機会を与えていただき、本研究の遂行に当たりご指導を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科 応用部門 小林真理子教授、また、多くのご指導、ご助言を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科 臨床部門 左向敏紀教授、基礎部門 近江俊徳教授、青木博史准教授、獣医学科 疫病予防獣医学部門 植田富貴子教授、日清オイリオグループ株式会社 盛田隆行博士に厚く御礼申し上げます。