

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)

学位論文の内容の要約

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 真理子)

序論

油粕は飼料や肥料の原料、味噌や醤油などの醸造用原料などに幅広く用いられており、食品生産流通網において重要な役割を担っている。特に飼料原料としての需要は多く、主要なたんぱく源の一つとして古くから使用されてきた。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、実際の工場および工程を対象に、製造環境および油粕のサルモネラ汚染対策を確立した。

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、遅延二次増菌培養法（DSE法）を評価した。飼料分析基準に準じた方法（飼分法）と選択増菌培地にハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地を用いたDSE法を比較した結果、DSE法では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。試料別では、汚染菌数が高い環境拭き取り試料では飼分法と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。選択増菌培地にラポポート・バシリアディスサルモネラ増菌培地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。

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法では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。

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、日本とインドの計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、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関与していることが改めて確認された。

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界面活性剤の 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作業床の消毒の 3 つの対策を実施した。油粕製造エリアはスペースが広い為、従業員の作業負荷を考慮し、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。その結果、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消毒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、サルモネラが作業員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。

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。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。その結果、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完全に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考えられた。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。

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 培地をペプトン水 (BPW)、Enterobacteriaceae Enrichment Mannitol 培地および乳糖培地と比較することにより評価した。その結果、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、人工汚染試料および自然汚染試料を用いて、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、BPW と MP 培地は同等の検出率となった。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、クオリボックスTM システムを使用した方法 (BAX 法) とクオリボックスTM システムおよび QuickGene-mini80 を組み合わせた方法 (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、 $10^0\text{cfu}/25\text{g}$ 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であった。QuickGene-BAX 法を用いることにより前増菌培養時間を 7 時間に短縮できる可能性が示唆された。

総括

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 つが効果的であった。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、紛体を扱う多くの飼料・食品工場で応用が可能である。