

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 北澤 秀基

## 序論

植物油製造過程において、大豆や菜種などから油を取り除いた残渣である油粕は、家畜に与える飼料原料として使用されている。タンパク質に富み、必須アミノ酸が豊富な油粕は、家畜用飼料における有用なタンパク源の一つである。さらに牛海綿状脳症の発生以降、動物性タンパク質に代わるものとして植物由来である油粕が注目され、飼料原料としての重要性が増している。他方、近年最終製品である油粕のサルモネラ汚染率は、低い傾向で推移しているものの、輸入される原料や製造環境におけるサルモネラの汚染率は未だ高い状況にある。しかし、油粕工場におけるサルモネラ汚染の実態やその制御方法についての報告は少ない。さらに本邦の油粕製造現場の保管能力は劣っており、サルモネラ検査の判定が出る前に製品として出荷される場合もあることから、迅速に判定を可能とする検査方法の開発が望まれる。

そこで本研究では、第一章で遅延二次増菌培養（DSE）法の有用性を検討した後、第二章で日本とインドにおける合計4つの油粕製造工場のサルモネラ汚染の実態を調査した。第三章においては、インドの工場におけるサルモネラ汚染の制御方法を検討した。第四章において、最終製品の油粕に対する迅速な検査方法の開発に関する検討を行った。

## 第一章 油粕工場における遅延二次増菌培養法の検討

本研究の第三章および第四章におけるサルモネラ検査法の一つとして用いられる DSE 法の検討を行った。DSE 法は、二段階にわたり選択増菌培養を行うことで、菌量の少ない試料中のサルモネラやその損

傷菌が存在すると考えられる状況に対処する手法であり、家禽衛生の分野での報告が多い。家禽を対象とした検査で実績のある **Hajna-Tetrathionate Broth (HTT)**を用いた **DSE** 法と、公定法である飼料分析基準に準じた方法（飼分法）を比較したところ、飼分法では陰性と判定された検体中のサルモネラを捉えることができた。油粕や油粕製造環境のサルモネラは、熱や乾燥、紫外線、薬剤の影響で損傷している可能性が高いことが考えられ、このような試料に対する **DSE** 法の有用性を確認できた。他方、**HTT** 以外を用いた **DSE** 法の検討では、**Rappaport-Vassiliadis Broth** や **Tetrathionate-Brilliant-Green Broth** などの選択増菌培地を用いても **HTT** を用いた **DSE** 法と同等の成績を得ることができた。他方、飼分法と **DSE** 法により分離された、分離株の **O** 抗原の種類が異なる場合が観察された。同様に、**DSE** 法の各選択増菌培地を変えた場合、異なる血清型が得られた。以上のことは、飼分法と併用して各選択増菌培地を変えた **DSE** 法を用いることで、様々な種類の血清型を持つサルモネラを捉えることができることを示唆している。油粕工場における複合的なサルモネラ汚染の疫学解析に、貢献できる可能性が示唆された。

## 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

日本の **A**、**B** および **C** 工場とインドの一工場におけるサルモネラ汚染を比較し、日本の一工場において、汚染の制御法を検討した。油粕製造環境において、サルモネラは高油分区域に残存しやすいことが知られている。実際に、一つの工場で大豆、菜種および大豆・菜種共用ラインを持つ **B** 工場で、汚染率の比較を行った。大豆、菜種および大豆・菜種共用ラインにおける汚染率は、それぞれ **7.4**、**16.7** および **14.8%** であり油分の多い菜種のラインにおける汚染率が高かった。従って、高油分区域の衛生を制御することが製造環境全体のサルモネラ汚染の制御に重要と考えられ、**B** 工場でその制御法を検討した。**B** 工場では、エリア退出時に靴裏消毒をしていたが、そのみの対処では高油分区域の汚染率は **89.5%** と効果が得られていなかった。高油分区

域の作業床に平滑化塗装を施し、定期的な消毒を行った。消毒に用いる消毒剤は、各消毒剤に高油分油粕とサルモネラ菌液を添加し、その消毒効果を検討した結果、消毒効果が高いもの、かつ安全性、経済性に優れているものを用いた。結果、汚染率は25%まで低下した。さらに消毒を実施していない低油分区域においても汚染率が減少する傾向が得られた。以上の成績より、高油分区域の衛生管理が、作業エリア全体のサルモネラ汚染の低下に寄与すると考えられた。

### 第三章 油粕製造におけるサルモネラ制御技術の確立

前章において、日本の一工場を対象とし、靴裏消毒、作業床の平面塗装および定期消毒を行うことで、製造環境のサルモネラ汚染の制御に効果があることを示唆したが、製品油粕の汚染を完全に制御するには至らなかった。材料の加熱処理以降の工程において、乾燥、冷却および輸送工程で接触する外気を介してサルモネラが侵入する可能性が考えられる。本章では、インドの油粕工場を対象とし、その汚染源と考えられる冷却工程で発生する微粉の除去と工程内残留物除去を行い、製品油粕のサルモネラ汚染の制御における効果を検証した。各工程における汚染率を観察したところ水平コンベアの入出口など工程内残留物の多い箇所において、サルモネラの汚染率が高い傾向が得られた。加熱工程以降の工程内残留物質を除去した。また、製造工程において、冷却機より除去され、サイクロンで回収、製造中の製品に再添加されていた微粉を再添加せず、工程外に除去した。結果、工程内残留物の除去後、製品油粕におけるサルモネラの汚染率は低下した。以上のことから、製造工程内における残留物の定期的な除去と清掃、冷却工程で発生する微粉の製品工程への再添加を行わないことで、サルモネラ汚染を低減できることが示唆された。

### 第四章 製造油粕を対象としたサルモネラ簡易迅速検出法

油粕中のサルモネラ汚染の検査には、PCRを原理とした簡易迅速検出法が広く用いられている（従来のBAX法）。本法は、リアルタイムPCRを原理とした手法であり、PCRに必要な試薬類を錠剤化したもの

で簡便性に優れるが、前増菌培養に 18 時間かかり、結果の判明まで約 23 時間を要する。前増菌培養に O-157 の培養で実績のある MP 培地を用いることで前増菌培養時間を 14 時間に短縮することが可能となった (BAX 法)。しかし、いずれの BAX 法でも、QUALIBAX での判定前に、二次増菌培養の工程が必要であり、その培養時間に 3 時間を要し、その後溶菌をおこなわなければならない。そこで、前増菌培養後の菌液より直接 DNA の抽出、精製を行うことを可能とした QuickGene-mini80 を用いてさらなる時間短縮をおこなったところ、約 15.5 時間で結果を判定することが可能となった (QuickGene-BAX 法)。QuickGene-BAX 法は、検出感度にも優れており、大豆粕に *S.senftenberg* を添加した試料に対し、BAX 法では菌数が  $10^2\text{cfu/mL}$  の時点で検出ができなくなったが、QuickGene-BAX 法では、検出することが可能であった。以上のように、QuickGene-BAX 法は、迅速性と感度に優れた手法であると考えられた。しかし、本法を用いても、夕方に前増菌培養を開始し、結果が判明するのは、次の日の 12 時頃となることから、更なる時間短縮を検討した。MP 培地の検討において、 $10^0\text{cfu}/25\text{g}$  のサルモネラが 7 時間後には  $10^3\text{cfu/mL}$  に達することから、MP 培地による 7 時間の前培養と組み合わせることで、8.5 時間後に判定 (短縮 QuickGene-BAX 法) が可能となり、最終製品の油粕中を対象としたサルモネラ検査に有用な手法であることが示唆された。

以上のように、本研究は、家畜に与える飼料原料となる油粕の衛生に関する成果であり、農場から食卓までの一貫した衛生管理手法が求められる今日、家畜衛生、食品衛生および公衆衛生上、意義あるものとして、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (獣医保健看護学) の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。