

[食品科学部]

バイダスを用いたサルモネラ迅速検出法の検討

財団法人 沖縄県環境科学センター 中川 弘、福村 圭介
麻布大学 中村 菜美子
日本バイオメリュー株式会社 澤口 勸、内田 和之
財団法人 東京顕微鏡院 伊藤 武

901-2111 沖縄県浦添市経塚 720 番地 *1
229-8501 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71*2
107-0061 東京都港区北青山 2-12-28*3
103-0015 東京都中央区日本橋箱崎町 44-1*4

Study of simple and rapid detection of *Salmonella* spp. using VIDAS

Hiroshi Nakagawa*1, Keisuke Fukumura*1, Namiko Nakamura*2, Susumu Sawaguchi*3,
Kazuyuki Uchida*3, Takeshi Ito*4

(*1 Okinawa Environmental Research & Technology Center, 720 Kyoduka, Urazoe, Okinawa 901-2111)

(*2 Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa-ken, 229-8501)

(*3 bioMerieux Japan Ltd., 2-12-28 Kita-Aoyama, Minato-ku, Tokyo, 107-0061)

(*4 Tokyo Kenbikyoin Foundation, 44-1 Hakozaeki-cho, Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, 103-0015)

第 26 回 日本食品微生物学会学術総会発表

日本食品微生物学会雑誌 原著論文受理 (平成 18 年 6 月 2 日)

Number of both incidence and patient of food-borne diseases caused by *Salmonella* are still higher rank in total food-borne diseases, although they have been decreasing in years. Needs of simple and rapid alternative method for *Salmonella* testing have been very high in food industry because conventional culture method includes two enrichment procedures and takes more than five days to isolate typical colony of *Salmonella*, its identification etc. from food samples. VIDAS is an enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) system which consists of instrument for fully automation and its reagents. In this study, we compared two protocols of VIDAS methods and conventional culture method for detecting *Salmonella* by using 40 food samples. Performances of protocols "VIDAS ICS + plate" and "VIDAS SLM AFNOR validated method" especially showed higher sensitivity than conventional culture method. These protocols were excellent also in terms of rapidity on time to results in addition to gain higher sensitivity. We also compared SMID2, new chromogenic agar plate for selective isolation of *Salmonella* with DHL agar, traditional agar plate for *Salmonella* testing. On SMID2, typical colonies of *Salmonella* were much easier to identify (mainly by its characteristic color) , and frequency of appearance of typical colony by bacteria other than *Salmonella* were much lower, although recovery rate of *Salmonella* were not different between the two media.

1. 緒言

近年、サルモネラ食中毒は減少傾向にあるが依然として件数、患者数共に上位を占めている。サルモネラ食中毒の主要な原因食品としては鶏卵とその加工品、その他食肉類とその加工品等があげられる。食品中に存在するサルモネラは共存する他の菌と比較して菌量が少なく、また加熱、冷凍あるいは乾燥等によって損傷を受けている場合があるため、本菌を検出する際には従来から前増菌と選択増菌の2段階の培養が行われている。そのため食品からのサルモネラの分離、同定には5日間以上を要することから、迅速で簡易なサルモネラ検出法の確立が望まれている。近年、分離培養では酵素基質培地が、確認試験ではELISA等の免疫学的手法、DNAプローブ法やPCR法等の病因遺伝子検索、さらに生化学的性状試験を応用したものと等さまざまな迅速検査法が開発、実用化されている^{1) 2)}。

自動免疫蛍光測定装置（ミニバイダス）およびその専用試薬を用いたサルモネラの検出は、海外で高く評価されており、その報告も多い^{3) 4) 5)}。

本研究は食品中のサルモネラの検出について、自動免疫蛍光測定装置（ミニバイダス）およびその専用試薬を用いたプロトコールを、日本における公定法と比較し、その有用性について検討した。また、新たに開発されたサルモネラの分離培地であるSMID2寒天平板培地の評価もあわせて行った。

2. 材料および方法

2-1サルモネラ検出用自動測定装置および

専用試薬

ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) を原理とするミニバイダス (日本ビオメリュー) を用いた。また、専用サルモネラ用試薬として、バイダスアッセイキットサルモネラ (VIDAS assay kit *Salmonella*、以下 VIDAS SLM) およびバイダス ICS サルモネラ濃縮用キット (VIDAS Immuno-

Concentration *Salmonella*、以下 VIDAS ICS) を用いた。

2-2測定原理 バイダス (ミニバイダス)

バイダス (ミニバイダス) は、ELFA を原理とする自動免疫蛍光測定装置である。

専用試薬はスパーとストリップから構成されている。スパーの内壁には抗体が固相されており、検体中の特異抗原を捕捉する。この抗原にストリップ中のアルカリフォスファターゼ標識抗体が結合し、さらにアルカリフォスファターゼがストリップ中の4-メチルウンベリフェリルリン酸を加水分解する。続いて蛍光強度が測定され、判定まで自動で行われる。なお上述した VIDAS ICS は、本原理によりサルモネラを特異的に集菌するための試薬である。

ミニバイダスの検出項目 (食中毒関連) には *E. coli* O157^{6) 7)}、サルモネラ^{3) 4) 5)}、キャンピロバクター⁸⁾、黄色ブドウ球菌由来エンテロトキシン⁹⁾、リステリア¹⁰⁾、リステリアモノサイトゲネス^{11) 12)} があり、目的によって専用試薬を使い分ける。測定時間は検出項目によって異なり、約 40 ~ 70 分である。

2-3供試菌株

Salmonella Enteritidis IFO3313 (以下 SE)

Salmonella Typhimurium ATCC14028 (以下 ST)

2-4供試材料

卵類 (鶏卵、温泉卵)、卵加工品 (プリン、カスタード菓子、ポテトサラダ)、冷凍食品 (餃子、グラタン、ピラフ、鶏から揚げ)、肉類 (豚肉、生姜焼き用豚肉、馬肉、ハンバーグパティ)、肉加工品 (ソーセージ、ローストビーフ、生ハム)、野菜類 (カット野菜 3 件)、鶏肉類 (もも 3 件、手羽先、骨付き肉、軟骨、チキンパティ、鶏ミンチ、正肉ミンチ、ささみミンチ、皮 2 件、砂肝 2 件、もつ、きんかん、ハート、レバー 3 件) きのこ類 (まいたけ)

の合計 40 検体を用いた。

2-5 供試材料の細菌数確認

供試材料の汚染度合を確認するため、一般生菌数および大腸菌群数を以下の方法で測定した。供試材料 25g を滅菌ストマッカー袋に採取し、これに滅菌済み生理食塩水 225ml を加えて 230rpm で 30 秒間ストマッキングし、必要に応じて 10 倍ずつ段階希釈した後シャーレ 2 枚に 1ml ずつ分注した。一般生菌数は標準寒天培地（栄研化学）で混釈して 35℃ で 48 時間、大腸菌群数はデソキシコレート寒天培地（栄研化学）で混釈して 35℃ で 20 時間培養した後常法に従って菌数を算出した。

2-6 サルモネラ接種試験法

(1) 接種菌液の調製と菌数確認

接種菌液は前述 2 菌株を 10 ~ 30cfu/100 μ l になるよう調製し各供試材料に接種した。接種菌液の菌数の確認は、菌液をトリプトソイ寒天培地（日本ビオメリュー：以下 TSA）平板 10 枚にそれぞれ 100 μ l ずつ滴下しコンラージ棒で表面塗抹後、35℃ で 24 時間培養後に出現した集落を数え算出した。

(2) 供試材料の調製と菌液の接種

供試材料の可食部 25g を、検体 1 種類につき 3 件、それぞれ滅菌ストマッカー袋に無菌的に採取した。うち 2 件には SE または ST の菌液をそれぞれ 100 μ l 接種し、1 件はサルモネラ未接種で試験に供した。

2-7 サルモネラの検出法

(1) 検体の希釈および前増菌

検体 25g に 225ml の滅菌ペプトン緩衝液（栄研化学：以下 BPW）を加え、230rpm で 30 秒間ストマッキングした。その後、公定法における卵と卵加工品（後述 7-4-1）は 35℃ で 20 ~ 24 時間、

それ以外は 35℃ で 16 ~ 20 時間培養した。

(2) バイダス ICS+plate 法 (Fig. 1)

前増菌液 0.8ml をバイダス ICS で濃縮し、濃縮液を DHL 寒天培地（栄研化学：以下 DHL）および SMID2 寒天培地（日本ビオメリュー：以下 SMID2）に塗抹し、35℃ で 22 ~ 26 時間培養した。サルモネラ未接種試験で出現したサルモネラと疑われる集落は TSI 培地（栄研化学：以下 TSI）および LIM 培地（栄研化学：以下 LIM）に接種し、35℃ で 22 ~ 26 時間培養した。この確認試験でサルモネラの生化学性状を示した場合は O 多価血清（デンカ生研）で凝集したものをサルモネラ陽性とした。サルモネラを接種した供試材料について分離培地上に出現したサルモネラが疑われる集落は、SE を接種したのものについては O 多価血清で、ST を接種したのものについては O4 血清（デンカ生研）で凝集したものをサルモネラ陽性とした。

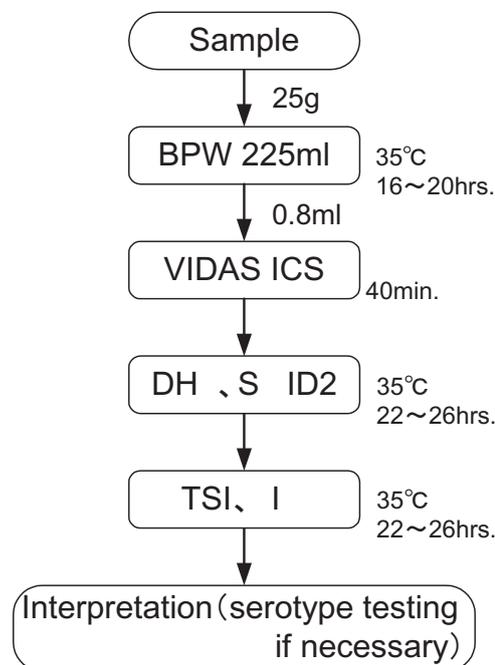


Fig. 1. VIDAS ICS+plate method

(3) バイダス SLM; AFNOR (仏名: Association Francaise de Normalisation) 承認法 (Fig. 2)

前増菌液 0.1ml を 10ml のラパポートバシリアディスソイブイオン (日本ビオメリュー: 以下 RVS) へ、別途 1ml を 10ml のミューラーコフマンテトラチオネートブイオン (日本ビオメリュー: 以下 MKTTn) へそれぞれ接種した。前者は 42°C、後者は 35°C でそれぞれ 6 ~ 8 時間培養した培養液を前者は 1ml、後者は 0.1ml それぞれ 10ml の M ブイオン (日本ビオメリュー) に接種し、42°C で 16 ~ 20 時間培養した。培養後、各々の培養液から 1ml ずつ採取し混ぜ合わせた 2ml を 100°C で 15 分熱処理し、その 0.5ml をバイダス SLM に分注し、ミニバイダスで測定した。

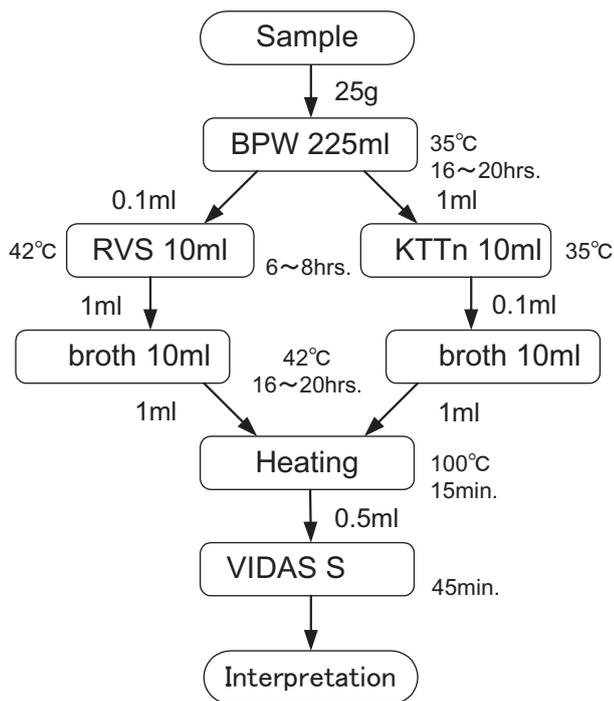


Fig. 2. VIDAS S
AFNOR validated method

(4) 公定法

(4)-1. 卵と卵加工品 (Fig. 3)

前増菌液 0.5ml を 10ml のラパポートバシリアディスブイオン (日本ビオメリュー: 以下 RV) とテ

トラチオネートブイオン (栄研化学: 以下 TT) にそれぞれ接種し、42°C で 20 ~ 24 時間培養した。これら培養液 1 白金耳を DHL および SMD2 にそれぞれ画線塗抹し、35°C で 18 ~ 24 時間培養した。サルモネラ未接種試験で出現した集落のうちサルモネラが疑われる集落は TSI および LIM に接種し、35°C で 18 ~ 24 時間培養した。これらの確認培地でサルモネラの生化学性状を示した場合、およびサルモネラを接種した供試材料について分離培地上に出現したサルモネラが疑われる集落については血清学的試験でサルモネラの有無を判定した。

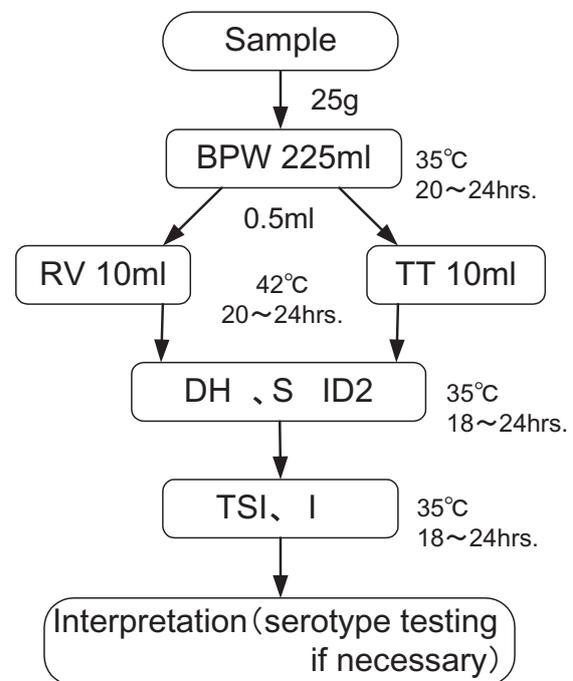


Fig. 3. Conventional culture method
(For Eggs)

(4)-2. 卵以外の食品 (Fig 4)

前増菌液 1.5ml を 15ml のハーナテトラチオネートブイオン (栄研化学: 以下 HTT) に接種し 42°C で 18 ~ 22 時間培養した後、その 1 白金耳を DHL および SMD2 に画線塗抹し、35°C で 22 ~ 26 時間培養した。サルモネラ未接種試験で出現した集落のうちサルモネラが疑われる集落を

TSIおよびLIMに接種し、35°Cで22～26時間培養した。これらの確認培地でサルモネラの生化学性状を示した場合、およびサルモネラを接種した供試材料から出現したサルモネラと疑われる集落については前述の血清学的試験でサルモネラの有無を判定した。

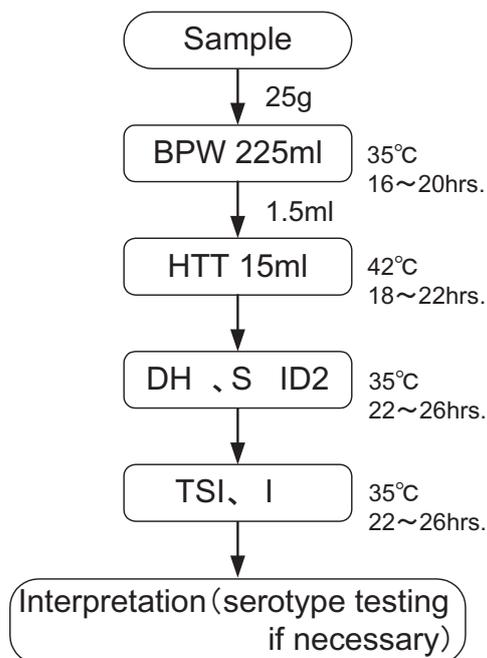


Fig. 4. Conventional culture method (For samples except eggs)

3. 結果

3-1供試材料からのサルモネラの検出

合計 40 検体中、サルモネラが検出されたものは公定法で 7 件、バイダス ICS+plate 法で 3 件、バイダス SLM; AFNOR 承認法で 10 件であった (Table 1)。

3-2食品にサルモネラを添加した場合の

各法によるサルモネラの検出

各検体に SE (8.2 ~ 16.9 cfu/100 μl)、ST (10.3 ~ 14.3 cfu/100 μl) を接種し、公定法、バイダス ICS+plate 法およびバイダス SLM; AFNOR 承認法の 3 法でサルモネラの検出状況を比較した

結果をそれぞれ Table 2 および Table 3 に示した。

SE を接種した場合にサルモネラが検出されたのは、公定法では 36 件 (90.0%) であったが、バイダス ICS+plate 法およびバイダス SLM; AFNOR 承認法では 39 件 (97.5%) であった。ST を接種した場合は、公定法では 39 件 (97.5%)、バイダス ICS+plate 法では 38 件 (95.0%)、バイダス SLM; AFNOR 承認法では 40 件 (100%) からサルモネラが検出され、いずれの菌を接種した場合においてもバイダス SLM; AFNOR 承認法が最も検出率が高い結果であった。サルモネラを接種した合計 80 試験におけるサルモネラの検出は、公定法では 75 件 (93.8%)、バイダス ICS+plate 法では 77 件 (96.3%)、バイダス SLM; AFNOR 承認法では 79 件 (98.8%) で、バイダスを用いた両プロトコールは公定法よりも検出率が高い結果が得られた。

3-3公定法との一致率

サルモネラ接種および未接種の合計 120 試験における公定法との一致率は、バイダス ICS+plate 法では 91.7%、バイダス SLM; AFNOR 承認法では 92.5% であった。また、サルモネラを接種した合計 80 試験における公定法との一致率は、バイダス ICS+plate 法、バイダス SLM; AFNOR 承認法ともに 95.0% であった。

3-4分離培地の検討

サルモネラ未接種の試験品 40 検体およびサルモネラを接種した試験品 80 検体について、公定法およびバイダス ICS+plate 法での合計 240 試験検体のうち DHL では 150 検体、SMID2 で分離した場合は 155 検体からサルモネラが分離され、両培地間で検出率には著しい差は認められなかった。分離培地の鑑別能を比較するため、分離培地上でサルモネラが疑われた検体と培地別の結果を Table 4 に示した。サルモネラ未接種の 40 検体において培地上でサルモネラが疑われたが確認試

験で陰性と判定された検体（偽陽性）について分離培地別にみると、DHL は公定法では 15 検体、バイダス ICS+plate 法では 20 検体認められたのに対し、SMID2 は公定法では 3 検体、バイダス ICS+plate 法では 19 検体と、SMID2 は偽陽性

数が少ない結果であった。またこれらサルモネラが疑われる集落を形成した検体は一般細菌数の菌数が高いものや大腸菌群が検出されるなど細菌の汚染度が高い傾向であった。

Table 1. Detection of *Salmonella* from food samples tested

Category of food	The name of foods	Results			Microbiological flora of samples (cfu/g)	
		Conventional culture method	VIDAS		Total viable count	Total coliforms
			ICS+plate	S (AFNOR)		
Egg	Onsen tamago	-	-	-	300	10
	Raw egg	+	-	-	300	10
Egg-processed food	Pudding	-	-	-	300	10
	Custard cake	-	-	-	7.9×10^2	10
	Potato salad	-	-	-	3.2×10^4	6.5×10
Frozen food	Gyoza	-	-	-	300	10
	Gratin	-	-	-	300	10
	Pilaf	-	-	-	300	10
	Fried chicken	-	-	-	300	10
eat	Pork	-	-	-	1.2×10^4	10
	Pork seasoned with ginger	-	-	-	1.2×10^5	1.4×10^3
	Horse meat	-	-	-	9.7×10^2	10
	Hamburger patty	-	-	-	1.4×10^4	9.5×10
Processed meat product	Sausage	-	-	-	300	10
	Roast beef	-	-	-	1.2×10^3	10
	Uncured ham	-	-	-	300	10
Vegetables	Cut vegetables 1	-	-	-	5.1×10^5	1.9×10^4
	Cut vegetables 2	-	-	-	300	10
	Cut vegetables 3	-	-	-	4.6×10^6	4.1×10^5
Chicken meat	Thigh 1	-	+	+	2.2×10^4	3.0×10
	Thigh 2	-	-	-	5.4×10^3	8.3×10^2
	Thigh 3	-	-	-	1.1×10^4	1.7×10^2
	Wing	+	-	+	2.7×10^6	1.3×10^4
	Drumstick	-	-	-	5.1×10^3	2.4×10^2
	Cartilage	-	-	-	2.4×10^4	5.1×10^2
	Chicken putty	+	+	+	9.9×10^3	2.5×10^2
	Ground meat 1	+	-	+	4.5×10^4	5.3×10^2
	Ground meat 2	-	-	-	9.5×10^4	5.1×10^3
	Ground breast tender	-	-	+	1.2×10^5	2.8×10^3
	Skin 1	-	-	-	4.4×10^4	7.5×10^1
	Skin 2	+	-	+	1.5×10^6	9.5×10^1
	Gizzard 1	-	-	-	1.5×10^5	6.6×10^2
	Gizzard 2	-	-	-	3.6×10^3	2.5×10^2
	Giblets	+	-	+	2.1×10^5	1.6×10^4
	Ovary	-	-	-	4.0×10^4	4.1×10^3
	Heart	-	-	-	2.7×10^4	2.1×10^2
	iver 1	-	-	-	7.8×10^4	4.9×10^3
	iver 2	-	-	+	5.6×10^3	1.8×10^2
	iver 3	+	+	+	1.4×10^4	7.5×10^2
ushroom	aitake mushroom	-	-	+	1.1×10^4	5.1×10^3
Number of tests		40	40	40		
Number of positive samples		7	3	10		
Accordance with conventional culture method (number of samples)		-	34	35		
Accordance rate with conventional culture method		-	85.00%	87.50%		

Table 2. Comparison of each method for detection of *Salmonella* from food samples spiked with SE*

Category of food	The name of foods	Results			Number of cells inoculated
		Conventional culture method	VIDAS		
			ICS+plate	S (AFNOR)	
Egg	Onsen tamago	+	+	+	8.2
	Raw egg	+	+	+	11.8
Egg-processed food	Pudding	+	+	+	16.9
	Custard cake	+	+	+	9.9
	Potato salad	-	+	+	8.2
Frozen food	Gyoza	+	+	+	9.9
	Gratin	+	+	+	9.9
	Pilaf	+	+	+	16.1
	Fried chicken	+	+	+	16.1
eat	Pork	+	+	+	8.2
	Pork seasoned with ginger	+	+	+	16.1
	Horse meat	+	+	+	9.9
	Hamburger patty	+	+	+	16.1
Processed meat product	Sausage	+	+	+	16.9
	Roast beef	+	+	+	16.9
	Uncured ham	+	+	+	11.8
Vegetables	Cut vegetables 1	-	-	+	8.2
	Cut vegetables 2	+	+	+	16.9
	Cut vegetables 3	-	+	-	11.8
Chicken meat	Thigh 1	+	+	+	11.8
	Thigh 2	+	+	+	14.3
	Thigh 3	+	+	+	11.2
	Wing	+	+	+	11.2
	Drumstick	+	+	+	14.3
	Cartilage	+	+	+	14.3
	Chicken putty	+	+	+	14.3
	Ground meat 1	+	+	+	11.2
	Ground meat 2	+	+	+	14.3
	Ground breast tender	+	+	+	14.3
	Skin 1	+	+	+	11.2
	Skin 2	+	+	+	11.2
	Gizzard 1	+	+	+	14.3
	Gizzard 2	+	+	+	11.2
	Giblets	+	+	+	14.3
	Ovary	-	+	+	14.3
	Heart	+	+	+	11.2
	iver 1	+	+	+	14.3
	iver 2	+	+	+	11.2
	iver 3	+	+	+	11.2
mushroom	aitake mushroom	+	+	+	11.2
Number of tests		40	40	40	
Number of positive samples		36	39	39	
Positive rate		90.00%	97.50%	97.50%	
Accordance with conventional culture method (number of samples)		-	37	37	
Accordance rate with conventional culture method		-	92.50%	92.50%	

*SE: *Salmonella* Enteritidis

Table 3. Comparison of each method for detection of *Salmonella* from food samples spiked with ST*

Category of food	The name of foods	Results			Number of cells inoculated (cfu/25g)
		Conventional culture method	VIDAS		
			ICS+plate	S (AFNOR)	
Egg	Onsen tamago	+	+	+	12.6
	Raw egg	+	+	+	13.6
Egg-processed food	Pudding	+	+	+	11.8
	Custard cake	+	+	+	10.3
	Potato salad	+	+	+	12.6
Frozen food	Gyoza	+	+	+	10.3
	Gratin	+	+	+	10.3
	Pilaf	+	+	+	10.6
	Fried chicken	+	+	+	10.6
eat	Pork	+	+	+	12.6
	Pork seasoned with ginger	+	+	+	10.6
	Horse meat	+	+	+	10.3
	Hamburger patty	+	+	+	10.6
Processed meat product	Sausage	+	+	+	11.8
	Roast beef	+	+	+	11.8
	Uncured ham	+	+	+	13.6
Vegetables	Cut vegetables 1	-	-	+	12.6
	Cut vegetables 2	+	+	+	11.8
	Cut vegetables 3	+	+	+	13.6
Chicken meat	Thigh 1	+	+	+	13.6
	Thigh 2	+	+	+	11.9
	Thigh 3	+	+	+	14.3
	Wing	+	+	+	14.3
	Drumstick	+	+	+	11.9
	Cartilage	+	+	+	11.9
	Chicken putty	+	+	+	11.9
	Ground meat 1	+	+	+	14.3
	Ground meat 2	+	+	+	11.9
	Ground breast tender	+	+	+	11.9
	Skin 1	+	+	+	14.3
	Skin 2	+	+	+	14.3
	Gizzard 1	+	+	+	11.9
	Gizzard 2	+	+	+	14.3
	Giblets	+	+	+	11.9
	Ovary	+	+	+	11.9
	Heart	+	+	+	14.3
	iver 1	+	-	+	11.9
	iver 2	+	+	+	14.3
	iver 3	+	+	+	14.3
ushroom	aitake mushroom	+	+	+	14.3
Number of tests		40	40	40	
Number of positive samples		39	38	40	
Positive rate		97.50%	95.00%	100.00%	
Accordance with conventional culture method (number of samples)		-	39	39	
Accordance rate with conventional culture method		-	97.50%	97.50%	

*ST: *Salmonella* Typhimurium

Table 4. Samples detected typical colony of *Salmonella* on selective agar plate

Category of food	The name of foods	Results			
		Conventional culture method		VIDAS ICS+plate	
		DH	S ID2	DH	S ID2
Egg-processed food	Potato salad	—	—	±	—
Frozen food	Glutin	—	—	—	±
eat	Pork seasoned with ginger	—	—	±	—
	Horse meat	—	—	—	—
	Hamburger patty	±	—	±	±
Vegetable	Cut vegetables 1	—	—	±	±
	Cut vegetables 2	—	—	—	±
	Cut vegetables 3	—	—	±	±
Chicken meat	Thigh 1	±	—	±	+
	Thigh 2	±	—	±	±
	Thigh 3	±	±	±	±
	Wing	±	+	±	±
	Drumstick	—	—	±	—
	Cartilage	±	—	±	±
	Ground meat 1	±	+	±	±
	Ground meat 2	±	—	—	±
	Ground breast tender	±	±	±	±
	Skin 1	±	—	±	±
	Skin 2	+	+	±	±
	Gizzard 1	±	—	±	±
	Gizzard 2	±	±	±	±
	Giblets	±	+	±	—
	Heart	±	—	±	±
	iver 1	±	—	—	±
iver 3	+	+	±	+	
mushroom	aitake mushroom	—	—	—	±
Total number		26		26	
Number of false positive samples**		15	3	20	19

± Sample confirmed negative by confirmation testing, although detected typical colonies on selective agar plate

4. 考察

食材 40 検体を用い、公定法、バイダス ICS+plate 法、バイダス SLM; AFNOR 承認法の 3 法を比較検討した。その結果、バイダス SLM; AFNOR 承認法が公定法およびバイダス ICS+plate 法よりも高い検出率を示し、他の 2 法より優れた方法であることが示唆された。バイダス SLM; AFNOR 承認法は、選択増菌に ISO (International Organization for Standardization) のサルモネラ検査 (ISO6579)¹³⁾ に指定されている RVS と MKTTn の 2 種類の液体培地を用いており、公定法の HTT だけでは増菌され難かったサルモネラが増菌されたと考えられると共に、M ブイヨンでの増菌過程を加えることにより鞭毛の発育が促進され、少量のサルモネラでも検出が可能となったと考えられる。M ブイヨンは培地成分のマンノースとクエン酸ナトリウムが栄養素となりサルモネラの発育を促進し、マンノースが鞭毛の非特異的な凝集を抑制し鞭毛の発育を促進することが知られている¹⁴⁾。

バイダス ICS+plate 法も、サルモネラを接種した場合の検出率は公定法よりも高い結果であった。このプロトコールでは ICS で集菌することで集落形成に十分な量のサルモネラが集菌できるとともにサルモネラ以外の菌を効率よく排除することができ、これが良好な結果につながったものと考えられる。

しかしながら、今回試験に供した食材は大腸菌群による汚染度が高いものも多く、ICS で集菌したにもかかわらず分離培地でサルモネラを分離するのが困難なものも認められた。サルモネラ未接種時に三法いずれでもサルモネラが検出された検体の大腸菌群数は $10^1 \sim 10^2$ オーダーであったのに対し、バイダス ICS+plate 法のみでサルモネラが検出できなかった検体の大腸菌群数は $10^1 \sim 10^4$ オーダーであった。検体に大腸菌群などの夾雑菌が多い場合、バイダス ICS での集菌の際に類属反応等の影響を受けることで、分離平板培地の選択と塗抹方法がサルモネラの検出に影響を与え

ることが推察される。

食品では、増菌培養後には多種類の菌が存在しており全体に占める目的菌の数は少ないと報告されている¹⁵⁾。本研究ではサルモネラ損傷菌の回復を目的として前増菌に BPW を用いたが、これにより食品中に存在する大腸菌群等の夾雑菌の生育が優勢になりやすかったことも考えられる。特に大腸菌群数の高かったカット野菜 1 および 3 等では、サルモネラを接種しても検出できない例がみられた。夾雑菌の増殖抑制と損傷菌を含めたサルモネラの回収どちらがより重要かを本結果から明確にすることは困難であるが、いずれにせよサルモネラの検出率は選択増菌培地により大きく変動することから¹⁶⁾、サルモネラを検出可能な菌量にまで確実に増殖させ、さらに夾雑菌の影響を抑えることができる増菌法がサルモネラの検出率の向上につながるものと考えられる。

今回分離培地として 2 種類の培地を用いた。そのうち SMD2 は日本ビオメリューが新たに開発した培地で、前身の SMID と比較すると *Salmonella Arizonae* 等の鑑別が可能になる等の改良がなされたものである。この SMD2 および DHL の比較において、検出率に大きな差は認められなかった。しかし、サルモネラ集落の鑑別の容易さは DHL と比較し SMD2 は定形集落の色調が明瞭であり、かつ偽陽性の頻度も低く、鑑別が容易な点が優れた結果であった。この要因としては、DHL でのサルモネラの検出は硫化水素の産生による黒色集落を指標にするが、多くの菌が抑制されるとはいえ、*Citrobacter freundii* および *Proteus spp.* もまた黒色集落を形成し、しばしばサルモネラと見誤られることがあげられる。本研究でも、いくつかのサンプルで DHL に発育した黒色集落がアピマニュアルキット (日本ビオメリュー) で *Proteus* と同定された。一方、SMD2 ではサルモネラに特異的なエステラーゼ活性により集落はピンク～赤紫色を呈するが、本試験では青紫色の集落についても全てを疑わしい集落と

判定した。これらのうちサルモネラの血清による判定が陰性となった集落は *Proteus*、*Serratia*、*Enterobacter*、*Aeromonas*、*Pseudomonas* と同定された。これらの菌を SMID2 に画線塗抹し集落を形成させサルモネラの集落と比較したところ、*Pseudomonas* についてはサルモネラ集落との鑑別は困難であったが、それ以外は色調等の鑑別が可能であった。したがって、判定に慣れることにより、SMID2 に発育した集落の判定が容易になると考えられる。また最近、サルモネラの代表的な生化学的性状である硫化水素産生能を有さない株が食中毒の原因となることが危惧されていることから、硫化水素非産生のサルモネラであってもサルモネラと判定できる SMID2 は有効であると考えられる。

以上、バイダス SLM; AFNOR 承認法は比較したプロトコール中最も検出感度が高く、検出時間も公定法より約 2 日短縮となった。また、バイダス ICS+plate 法も検出時間は公定法より約 1 日短縮でき、検出感度も公定法より高い結果が得られた。さらに分離培地として DHL に加え SMID2 を併用することで平板上のサルモネラ集落の鑑別も容易かつ確実となることから、これらは食品からのサルモネラの検出に有効な検査法と考えられる。

5. まとめ

食品からのサルモネラの検出について、公定法とバイダスを用いた 2 通りの検出法を比較検討した。また、サルモネラの分離培地 SMID2 の実用性についても併せて検討したところ次のような結果を得た。

- 1) 供試材料からのサルモネラの検出は、合計 40 検体中、公定法で 7 件、バイダス ICS+plate 法で 3 件、バイダス SLM; AFNOR 承認法で 10 件であった。
- 2) SE および ST をそれぞれ接種した合計 80 試験におけるサルモネラの検出は公定法では 75

件 (93.8%)、バイダス ICS+plate 法は 77 件 (96.3%)、バイダス SLM; AFNOR 承認法は 79 件 (98.8%) であった。

- 3) バイダスを用いた 2 法の公定法との一致率は、91.7 ~ 92.5% であった。
- 4) サルモネラの分離培地 SMID2 は DHL と比較し検出率に著しい差は認められなかったが、サルモネラ集落の色調が明瞭であり鑑別が容易で、かつ偽陽性も少なかった。

文献

- 1) 大畑克彦・本田敬康・仁科徳啓：電気ビーズを用いたサルモネラ検出法の評価 日食微誌, 14 (2), 97-100 (1997).
- 2) 中川弘：食品衛生及び公衆衛生における微生物迅速検出法の課題, 食品工業, 46 (16), 22-31 (2003).
- 3) Kuang-Sheng, Y. : Comparison between VIDAS Automatic Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay and Culture Method for *Salmonella* Recovery from Pork Carcass Sponge Samples. J. Food Prot., 65, 1656-1659 (2002).
- 4) Michael S. C. and Wendy A. L. : Evaluation of VIDAS Immuno-Concentration *Salmonella* Assay Plus Selective Plate Method (Hektoen, Bismuth Sulfite, *Salmonella* Identification) for Detection of *Salmonella* in Selected Food. Collaborative Study. J. of AOAC Int., 85, 576-592 (2002).
- 5) VIDAS SLM kit for the rapid detection of *Salmonella*. AFNOR VALIDATION CERTIFICATE.
- 6) Vernozy-Rozand, C. : Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDAS™ *E.coli* O157. Letters in Appl. Micro., 25, 442-446 (1997).
- 7) Vernozy-Rozand C. : Evaluation of the VIDAS Methodology for Detection of *Escherichia coli* O157 in Food Samples. J. Food Prot. 61 (7), 917-920 (1998).
- 8) Michael T. M. and Norman J. S. : Vidas Detection of *Campylobacter* spp. in Poultry Samples. bioMerieux Regional Customer Symposium (1996).
- 9) Dean C. and Pacita I. : Comparison of the TECRA and VIDAS immunoassay system for the detection of Staphylococcus Enterotoxins in Foods. Australian Government Analytical Laboratories (1999).
- 10) VIDAS LIS kit for the rapid detection of *Listeria*. AFNOR VALIDATION CERTIFICATE.
- 11) Graves, L.M. : Identification of *Listeria monocytogenes* by the VIDAS-system. American Society of Microbiology Annual Meeting in New Orleans, LA (1996).
- 12) 酒井史彦、青山顕司、篠澤映子、山縣尚、丸山務、五十君静信、柳平修一：ナチュラルチーズからの *Listeria monocytogenes* 検出における自動免疫蛍光測定装置の利用。日食微誌, 22 (1), 17-23 (2005).
- 13) ISO6579-Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., (2002)
- 14) SPERBER W. H., DEIBEL R. H. - Accelerated Procedure for *Salmonella* detection in dried food and feeds involving only broth cultures and serological reactions - Appl. Microbiol., 17, 533-539 (1969).
- 15) 吉敷ゆみこ・石崎直人・草野友子・金子誠二・宮崎春之：ダイナビーズおよびヤトロンビーズを併用した食肉からのサルモネラ分離法の検討 日食微誌, 17 (3), 189-193 (2000).
- 16) 楠淳・伊藤武：ELISAKit「Locate」による食肉からのサルモネラ検出法 日食微誌, 11 (4), 223-236 (1995).