

---

---

# サルモネラ簡易検出紙

使用法と評価の仕方

国際学院埼玉短期大学名誉教授

医学博士 渡 邊 昭 宣

 **サン**化学株式会社

---

---

# 目次

はじめに	1
1. サルモネラ簡易検出セットの内容と特徴	2
2. サルモネラ簡易検出セットの使い方	3
3. 判定	5
4. 使用上の注意	5
5. 簡易検出セットの性能試験	7
6. サルモネラ簡易検出紙に対する評価	10
あとがき	11

# サルモネラ簡易検出紙 使用法と評価の仕方

国際学院埼玉短期大学教授

医学博士 渡辺 昭宣

## はじめに

わが国で発生する細菌性食中毒のうち、発生件数の上位を占める原因物質をみると、第1位が腸炎ビブリオ、第2位が黄色ブドウ球菌、第3位にサルモネラがあげられる。

過去5年間（昭和57年～昭和61年）のサルモネラ食中毒発生状況を見ると、平均件数で93.6件、平均患者数 2,686名、平均死者数 0.8名となり、死者を出した病原菌としては腸炎ビブリオ、ボツリヌス菌及びサルモネラの3菌種があげられ、病原性の面からみても重要な食中毒細菌である。

サルモネラによる急性胃腸炎の発症は、食品中で増殖した大量の菌が経口的に摂取され胃内を通過するとき、ある程度は殺菌されるが、なお生残った菌が小腸に入り再び増殖する結果発症するもので、その殆んどは汚染食品の摂取によって起るものと考えられている。

とくに、食肉類のサルモネラ汚染については、世界各国がその防止対策に苦慮している問題である。わが国においても、と畜場及び食鳥処理場で生産される食肉類から高率に検出され、中でも食鳥肉は最も検出率が高いといわれ、食中毒原因食品としてもこれら食肉類及びその加工品による発生件数が最も多いといわれている。

そこで、本菌による食中毒を予防するためには、まず第1にサルモネラに汚染した食品を早く探知し排除することと、調理器具や器材のほか作業員の手指などからの汚染経路を遮断することである。それにはサルモネラの検査を日常業務の中にとり入れ、品質管理を十分に行うことである。そして、その結果により、食品を低温に保存し、汚染サルモネラの増殖を抑制するか、食品の加熱によって汚染菌の殺滅をはかるかの対策を講じなければならない。また、サルモネラに汚染したとみられる器具・器材及び従業員の手指などの洗浄殺菌を日常業務の中で徹底し、食品のサルモネラ汚染を完全に防除することである。

そのためには、営業者は自衛の立場から常に自主検査を行い、自社製品の安全を確認する義務がある。

しかし、サルモネラを含む食中毒細菌を検査するに必要な施設、設備費、人件費及び維持費などには莫大な費用がかかり、また、検査を外注すればその検査料も高く、経費的にも頻繁に、実施できないのが実状であろうと推察される。

今回、サン化学(株)ではこれらの実状を解決すべく、従来の大腸菌群簡易検出紙、ブドウ球菌簡易検出紙、一般細菌簡易検出紙及び腸炎ビブリオ簡易検出紙に加え、この度、サルモネラ簡易検出紙を考案開発することができたので、その使用法及び判定の評価の仕方などについて報告いたし参考に供するものであります。

## 1. サルモネラ簡易検出セットの内容と特徴

このサルモネラ簡易検出セットは、食品又はふきとり検体からのサルモネラをまず選択増菌させるために必要な前処理用の増菌液体培地（EEC）と定性試験を目的としたサルモネラ検出紙を1対のセットとしたもので、食品中の微量のサルモネラでも検出できるようにしたものである。

本検出セットが従来簡易検出紙と異なるところは前処理用の増菌培地を取り入れたことである。はじめは、従来簡易検出紙のように食品乳剤やふきとり洗い出し液を直接簡易検出紙に浸漬させる方法を検討したが、どうしてもサルモネラとサイトロバクター、プロテウスなどのH<sub>2</sub>S産生菌を選別して、サルモネラのみを発育させることが不可能であることがわかったためである。

そこで、公定法の前処理培養と選択増菌培養法を参考にし、液体増菌選択培地

で第1次の選別を行い、そこに増菌したサルモネラと、ある程度増菌が抑制されたサルモネラ以外のH<sub>2</sub>S産生菌を検出紙上で第2次的に選択発育させスポットを形成させるようにしたものである。従って、検出紙上に発現したスポットの数はサルモネラ菌数を表すものでなく、赤銅色のスポットが検出されたときは、その検体はサルモネラ陽性と定性的に判定する。

## 2. サルモネラ簡易検出セットの使い方

### a) 前処理増菌培地 (EEC) の調製の仕方

セット内のEECチューブには亜セレン酸ナトリウムが0.07gずつ秤量してある。そこで、別添のEEC液体培地をチューブの画線のところまで注入したのち蓋を固くしめてよく攪拌して溶かす。これで前処理増菌培地が出来る。

(EECチューブ内の粉末は医薬用外毒物でありますので取扱に注意して下さい。) なお、残ったEEC液体培地は固く蓋をして冷蔵保存すれば次の検査の時にも使用できる。

- b)〔I〕①固型検体の場合は約1gを細切してEECチューブに接種する。〔II〕②粉末検体又はふきとり検査の場合は、別添のエントル入り滅菌綿棒に水道水を入れ、湿らせた綿棒を取り出し③粉末検体中に挿入すると約1gの試料が湿った綿棒のガーゼ部分に付着する④ふきとり検査の場合は器具、器材、手指等の被検部位を湿らせた綿棒でよくふき取る⑤いずれの場合も、同じEECチューブに挿入してよく洗い出す、チューブを外側から圧して綿棒を押えながらとり出す。⑥検体を接種したEECチューブは蓋をしっかりとねじりしめ、恒温器内で43±1℃で18～20時間培養する。

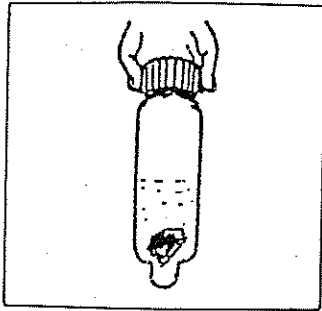
### c) サルモネラ簡易検出紙の使い方 (図2参照)

検出紙の使用法は従来からの大腸菌群用検出紙と基本的には同様であるが、サルモネラ用の場合は検出紙がEECチューブに入り易いように2つ折りになるように縦に中央部が切断してある。

①まず、手指をアルコール綿でよく消毒したのち、サンパックのチャックをよじり口を開ける。

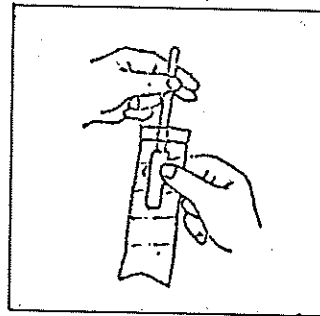
図1 前処理増菌培地 (EEC) チューブの使い方について

I 固型検体の場合

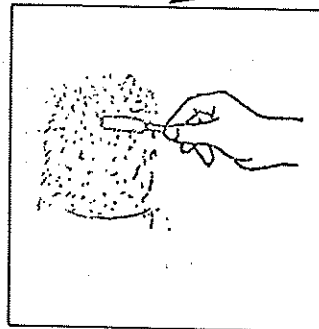


①固形検体を約1g EEC チューブに入れる。

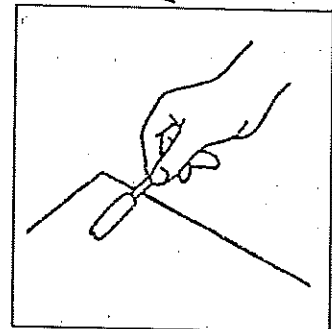
II 粉末検体またはふきとり検査の場合



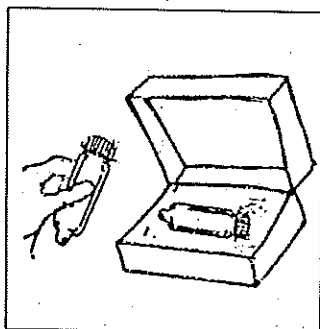
②サンパックに水道水を10の線まで入れて、ガーゼをぬらし取り出す。



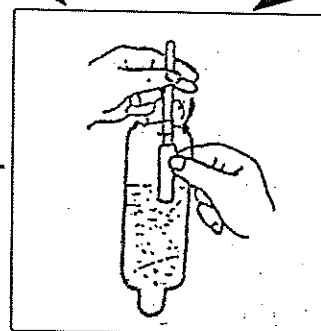
③粉末検体には、綿棒を差し込む



④ふき取り検査の時は、器具、器材、手指等を綿棒でよくふき取る。



⑥ふたをしっかりとねじり閉め恒温器内で $43 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 18~20時間培着する。



⑤綿棒のガーゼに付着した検体をチューブの中でよく洗い出す。

②～③サンパック中の検出紙を押し上げ、ミシン線の上の部分指でつまみ引き出す。

④ミシン線の部分で2つ折りにした検出紙を培養したEECチューブにさし込むと、培養液はミシン線まで吸い上げられ湿ってくる。そこで検出紙を取り出し、余分の液をチューブの口の所でふり落す。

⑤～⑥2つ折りの検出紙を広げ、検出紙のミシン線がサンパックのチャックの下になるまで入れた所で、ミシン線から上部を指でつまんで切り離す。

⑦サンパックをそのまま平らな所におき、指でこすり押すようにしながら袋の中の空気を抜き、密着させてチャックを閉じる。

⑧43±1℃の恒温器に入れ20～24時間培養する。

### 3. 判 定

培養後、フラン器から検出紙を取り出し、サンパックの袋の上から検出紙の表面及び裏面を観察し、赤銅色のスポットがみられた場合はサルモネラ陽性とする。

H<sub>2</sub>Sを産生するサルモネラは培地中の成分と反応して赤銅色のスポットを形成する、通常はサルモネラ以外のH<sub>2</sub>S産生菌は発育が抑制されスポットを形成しないが、稀にはサルモネラと類似の偽陽性反応を示すことがある。

### 4. 使用上の注意

①前処理用EECチューブ及び検出紙を操作するときは指先を消毒用アルコール綿でよく消毒する。

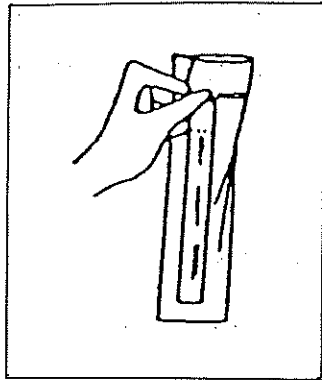
②検出紙は無菌的にとり扱い、ミシン線の上部以外は直接手指にふれない。

③試料を吸着させた検出紙はサンパック袋に戻した後、検出紙と袋が充分密着するように指で押しながら空気を抜き、袋のチャックを閉じ、内部を出来るだけ嫌気状態になるようにする。

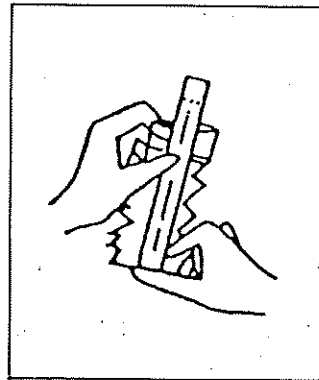
④前処理用EECチューブと検出紙は直接日光にさらさないようにし、保管は冷暗所におくようにする。

⑤使用後のEECチューブ及び検出紙は毒物の処理方法に従って処分して下さい。不明な点は当社までお問い合わせ下さい。

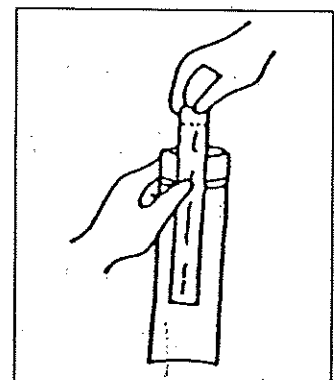
図2 サルモネラ用簡易検出紙の使用手順



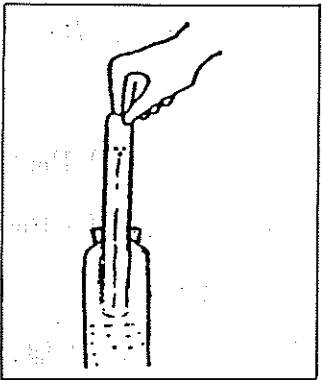
① サンバックのチャックをよじって口を開ける。



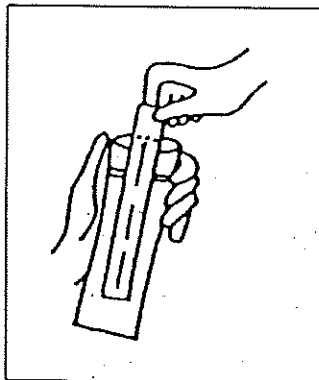
② 中のペーパーを押し上げミシンの部分を外に出す。



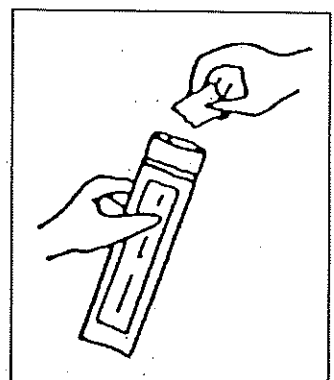
③ ミシンの上の部分を指でつまんでペーパーを引き出す。



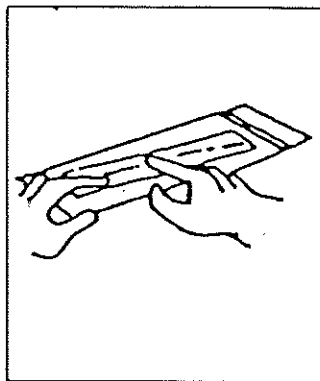
④ ミシンより下の部分を検体に浸漬したらすぐ取り出し



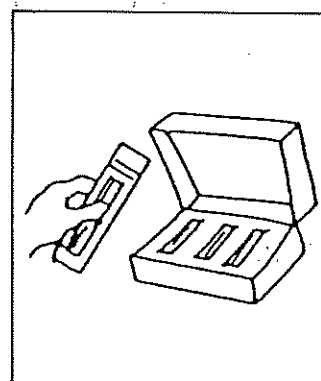
⑤ ミシンの部分がチャックより下になるように入れる。



⑥ ペーパーを袋の上から押さえて、ミシンの上の部分を指できりとる。



⑦ 平らにおき指の腹でなせるように空気をぬきペーパーと袋を密着させてチャックを閉じる。



⑧ 密封したペーパーを43 ± 1℃の恒温器に入れ、20-24時間培養する。



## 5. 簡易検出セットの性能試験

サルモネラ簡易検出のための前処理培地としてのE E C液体培地及び検出紙の選択とその検出感度などの性能をしらべるため、サルモネラ及びその他のH<sub>2</sub>S産生菌を使用して基礎実験を行った。

### a) 供試菌株

- ① *Salmonella typhimurium*. (食中毒由来株) 以下Stと略す
- ② *Salmonella enteritidis*. (食中毒由来株) 以下Seと略す
- ③ *Citrobacter freundii*. (食品由来株) 以下Cfと略す。
- ④ *Proteus mirabilis*. (食品由来株) 以下Pmと略す

### b) 試験菌液の調製

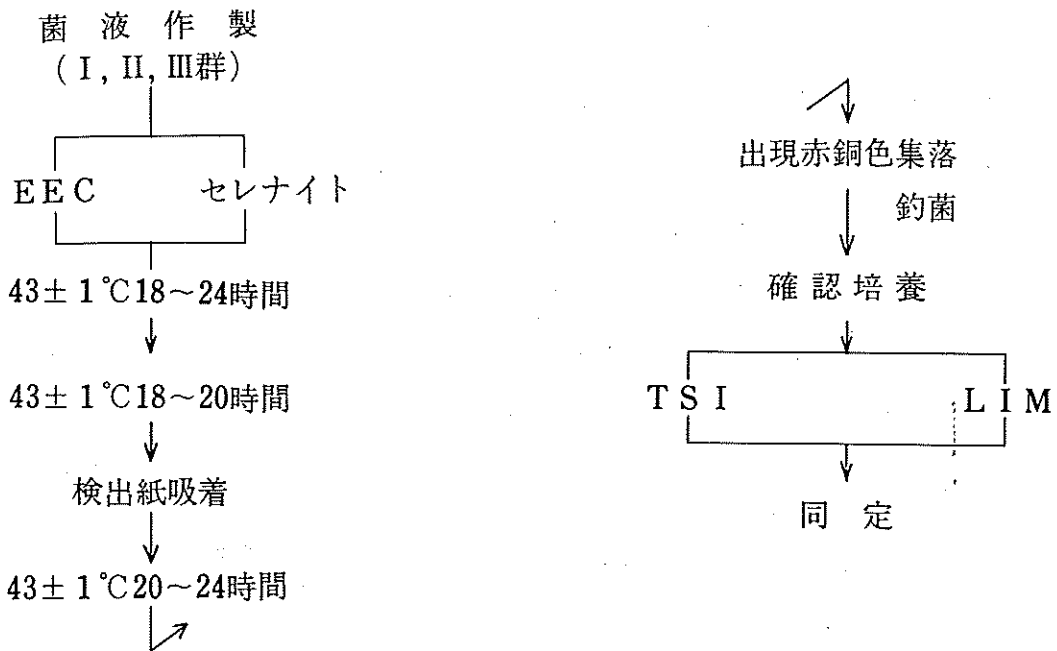
供試菌株を普通ブイオンで3回継代培養して若返りをはかったのち、普通寒天斜面培地に培養して試験菌とした。

試験菌液の調製には、StとSeを普通ブイオンに接種する。また、CfとPmも同様に普通ブイオンに接種する。これらを37°Cで24時間培養したのち、Cf+Pmはこれを試験液とした。また、St+Seについてはこれを試験原液とし、さらに滅菌生理食塩水で10<sup>-1</sup>及び10<sup>-2</sup>に希釈したものを実験に用いて、サルモネラと他のH<sub>2</sub>S産生菌との組み合わせを作った。

この菌量比による実験群は次のとおりである。

	Salmonella	:	他のH <sub>2</sub> S産生菌
I 群	1	:	1
II 群	1	:	10
III 群	1	:	100

実験手順は次のとおりである。



c) 実験結果

①各菌量比試験液における検出能の比較

サルモネラと他のH<sub>2</sub>S産生菌の各菌量比試験液をEECブイオンとセレナイト培地で前処理したのち、サルモネラ用簡易検出紙に一定量吸着させ、43 ± 1 °C 20時間培養したのち検出紙上に出現した発色スポット数を計測し比較すると表1にみられる結果を得た。

表1. 増菌培養後の試験紙上のスポット検出状況

接種菌液	前処理増菌培地	
	EECブイオン	セレナイト
St+Se : Cf+Pm		
1 : 1	1 2 2	1 2 9
1 : 10	8 7	9 3
1 : 100	2 0	1 8

発色スポット数はCf + Pmの菌量がサルモネラの菌量より多い比率になるにしたが減少する傾向がみられたが、試験液中のサルモネラの菌量が他のH<sub>2</sub>S産生菌の1/100量という少い菌量の存在であっても検出紙上には赤銅色のスポットの発現はみられサルモネラの検出が推定された。

## ②検出紙上のスポットの菌種同定

前処理用増菌培地として用いたEECブイオンとセレナイト培地についての選択性を確認するため、検出紙上に発現した5個のスポットから釣菌し、その分離菌をTSI培地及びLIM培地に接種して、その性状をしらべ、さらに、サルモネラ用診断血清で接種菌の血清型別を行い、同定確認した。結果は表2にみられるとおりで、EECブイオンで前処理培養した場合は、各菌量比のI群～III群とも検出紙上に発現したスポットはすべてサルモネラであった。

表2. 出現スポットの同定試験

接種菌液	菌種	前処理増菌培地	
		EECブイオン	セレナイト
St+Se : Cf+Pm			
1 : 1	Salmonella	5 / 5	5 / 5
	Other	0 / 5	0 / 5
1 : 10	Salmonella	5 / 5	4 / 5
	Other	0 / 5	1 / 5
1 : 100	Salmonella	5 / 5	2 / 5
	Other	0 / 5	3 / 5

\* : 出現スポットは各検出紙毎に5個を釣菌し同定した。

しかるに、セレナイト培地で前処理培養した場合は、I群の菌量比では発現スポットはすべてサルモネラであったが、II群の1 : 10菌量比の場合は発現スポットの80%がサルモネラ、20%が他のH<sub>2</sub>S産生菌であった。

また、III群の1 : 100菌量比の場合は発現スポットの40%がサルモネラで、60%が他のH<sub>2</sub>S産生菌であった。このようにセレナイト培地の場合はサルモネラの菌量が少なくなるに従って検出紙上に発現するスポットは他のH<sub>2</sub>S産生菌の方が多くなり選択性が弱くなることがわかった。

このことから、サルモネラの簡易検出のための前処理用培地にはEECブイオンの方が選択性が高く、検出紙上に選択発現したスポットはすべてサルモネラで、他のH<sub>2</sub>S産生菌は発現しないことが確認された。

## 6. サルモネラ用簡易検出紙に対する評価

このサルモネラ用簡易検出セットは、と畜場、食鳥処理場、食肉販売店、給食センター、弁当仕出し店など、食品を取扱う多くの業界で、食品や調理器具などがサルモネラに汚染されているか否かを常時検査するのに、簡易で、迅速で、しかも安価で使えるという点で利用価値が高いものとする。

また、DHLやMLCBなどの生培地では、サルモネラと他のH<sub>2</sub>S産生菌が同時に発育するので、分離後確認培地で鑑別をしなければならない。この点、このサルモネラ用簡易検出紙はサルモネラのみが赤銅色のスポットを形成するので、菌の分離、同定を省略しても発色したものはほぼ間違いなくサルモネラであると判定できる。

しかし、本検出紙は選択増菌培養という前処理を経由するため発色スポットの数は食品中のサルモネラ菌数でなく、あくまで定性試験であることを認識しておいて頂きたい。

このように、この検出紙の性質をよく理解して使用されれば、頻繁に食品や調理器具のサルモネラ汚染をチェックすることができるので、食中毒予防の上からも大いに役立つものとする。

## あ と が き

食品の加工・製造業は、毎日同じ工程で、同じ製品を製造しているも、その日その日の原料、調味料、容器の汚染状況は異なり、また調理方法、従業員の健康状態、手指の汚れ、施設、設備の環境などによって、つくられた製品の形は同じであっても、その品質は毎日異なるものである。

従って、自社製品の品質を管理するには自主検査を数多く行って、そのデータから製品に対する精度管理を十分に行わなければならない。しかし、食品衛生検査所に検査を頻繁に依頼することは非常に困難なことであり、また自社内に検査室をもつことは、もっと困難なことである。

これらのニーズに答えるように多くの簡易検査器具が販売されているが、サルモネラについての簡易検出紙は殆んど見当たらない。

今回、サン化学㈱がサルモネラ用の簡易検出セットを開発したことは食品の衛生管理、食中毒予防の対策面で大変有意義なことである。

これで、従来から販売されている一般細菌数用、大腸菌群用、ブドウ球菌用及び腸炎ビブリオ用の簡易検出紙に加えてサルモネラ用の簡易検出紙が出来たことになり、一応、わが国で発生する主な食中毒細菌や、汚染指標菌の検査が簡単にできるようになったわけである。

しかし、これらのもののすべてが完全であるというものでなく、それぞれの検出紙に対しての問題点はまだ残されていると思う。

今後、更に研究を進め、より迅速で確実でしかも簡単なものに近づけていかななくてはならないと考えている。

しかし、現段階の各簡易検出紙であっても、誰にでも簡単に検査ができることから、各業界での自主管理に利用されれば、十分にその結果は評価されるものと考えている。

著者略歴

渡 邊 昭 宣  
わた なべ あき のぶ

元：埼玉県衛生研究所  
食品衛生部長  
前：埼玉県食肉衛生  
検査センター所長  
現：国際学院埼玉短期  
大学食物栄養科名誉教授