

7 サルモネラ陽性養鶏場における MPN 法及び

消毒感受性試験を活用した衛生指導

○肥後 茉莉香 内匠 夏奈子 関谷 友佳

要約

鶏舎環境のサルモネラ定性検査で陽性となった養鶏場に対し、最確数法（MPN 法）による環境中サルモネラの定量と分離株の消毒感受性試験を活用した衛生指導を実施。サルモネラ陽性 A 農場において採材場所および面積を固定し、MPN 法を実施したところ、菌量の推定が可能。本結果を踏まえ本法にて消毒前後で菌量を測定したところ、消毒後の菌量減少をほとんど認めず。分離菌株に消毒薬抵抗性があると推測し、A 農場に加え B、C の農場からの分離菌株を対象に消毒感受性試験を実施。まず、消毒薬抵抗性に係るバイオフィーム産生能を調査したところ、全農場の分離菌株で産生を確認。次に、農場で使用されている消毒薬、使用濃度で消毒感受性試験を実施したところ、B 農場の分離菌株（分離菌株 B）のみ消毒薬抵抗性を確認。消毒薬の濃度を上げたところ、分離菌株 B は承認されている使用濃度以上で有効と判定され、分離菌株 A、C も消毒効果が増加。試験結果を基に A 農場において消毒薬を高濃度に変更するよう指導した結果、MPN 法の菌量が指導前の約 1/25 に減少。MPN 法は現場における消毒効果の評価に有用であり、消毒感受性試験と併用することで、より実効性の高い衛生指導が可能。

東京都（以下、都）では、生食する機会の多い鶏卵の安全性確保を目的として、鶏舎環境等を対象としたサルモネラ定性検査を年 2 回実施し、生産段階における汚染状況の把握およびサルモネラが検出された養鶏農家に対する清浄化指導を実施している。しかし、7 年以上にわたり陽性が継続する農場や、消毒直後にもサルモネラが検出される農場があり、定性検査のみでは消毒前後の菌量変化を評価できず、実施した対策の効果を農場に具体的に示すことが困難であった。そこで MPN 法による菌量の推定および農場分離株を用いた消毒感受性試験により消毒効果を評価し、サルモネラ清浄化に向けた衛生指導への活用を検討した。

MPN 法による消毒効果の可視化

定性検査は、農林水産省が公表している「鶏卵のサルモネラ総合対策指針（平成 17 年 1 月 26 日付け 16 消安 26 日付第 8441

号農林水産省消費・安全局衛生管理課長通知）」に基づき実施している。定性検査では、サルモネラの有無のみが結果として示されるため、消毒前後の検査結果がいずれも陽性であった場合、消毒効果を評価するのが困難である。そこで、消毒前後の菌量変化により消毒効果を評価することを目的として、半定量的に菌量を把握する MPN 法を用いた。一般的な細菌数の測定には、寒天培地上に形成されたコロニーを計数する平板培養法が用いられる。一方、鶏舎環境試料中のサルモネラは菌数が少ないことや、夾雑菌および損傷菌の影響により、平板培養法で直接計数することが困難な場合がある。MPN 法は、段階希釈した試料の陽性管数の組合せから、確率論に基づいて試料中の微生物濃度を推定する方法であり、食品衛生分野において定量法の一つとして用いられて使用されている¹⁾。その原理を図 1 に示した。

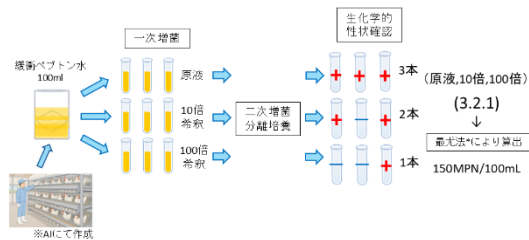


図1.MPN法の原理

1 材料および方法

MPN法は以下の方法により行った。一定面積の塵埃を滅菌ガーゼで拭き取り、緩衝ペプトン水に浸漬して試料とした。各試料について原液、10倍希釈液、100倍希釈液を調製し、各希釈段階の試料を3本ずつ試験管に分注した。各試験管について増菌、分離および同定を行い、サルモネラ陽性管数の組合せから最尤法により、試料単位量当たりのサルモネラ菌量をMPNとして算出した。

消毒前後の評価を行うため、サルモネラ陽性のA農場にて塵埃の採材を行った。消毒前後に、ケージ2か所の同一部位から塵埃を採取し、各採材地点の消毒前後のMPNを比較するとともに、定性検査を併せて実施した。

2 結果および考察

各採材場所のMPN法による定量検査および定性検査の結果を表1に示した。ケージ1のMPNは消毒前後とも53 MPN/100 mLであり、変化を認めなかった。ケージ2では、消毒前は測定上限の2,400 MPN/100 mL以上、消毒後は1,100 MPN/100 mLと低下した。定性検査は両地点ともに消毒前後で陽性であった。

当該条件下では消毒による十分な菌量低減が認められなかったことから、その要因の一つとして分離株の消毒薬感受性に着目し、消毒感受性試験を実施した。

表1.MPN結果

	ケージ1			ケージ2		
	陽性本数 (原液,10倍,100倍)	MPN/ 100mL	定性	陽性本数 (原液,10倍,100倍)	MPN/ 100mL	定性
消毒前	2, 3, 3	53	陽性	3, 3, 3	≥2400	陽性
消毒後	2, 3, 3	53	陽性	3, 3, 2	1100	陽性

消毒感受性試験による消毒効果の評価

1 材料および方法

サルモネラ陽性農場の分離菌株の性状および使用消毒薬の有効性を確認するため、消毒の感受性に関与するバイオフィーム産生能の調査および消毒感受性試験を実施した。試験は大橋郁代ら²⁾の方法に基づいて実施し、A農場由来株(A)に加え、サルモネラ陽性BおよびC農場から分離された各農場由来株(B、C)を対象に行った。各農場の分離菌株の血清型および使用消毒薬、規定量、農場使用濃度、添加剤は表2のとおりである。

表2.各農場の菌株の血清型及び使用消毒薬

	A農場	B農場	C農場
血清型	S. Infantis	S. Mbandaka	S. Senftenberg
規定量※消毒薬	X社逆性石けん 1,000~4,000倍	Y社逆性石けん 500~2,000倍	Y社逆性石けん 500~2,000倍
使用濃度	2,000倍希釈	1,000倍希釈	200倍希釈
添加剤	発泡剤 水酸化カルシウム	除菌剤	—

※各消毒薬の鶏舎消毒における用法用量

バイオフィーム産生能の調査はクリスタルバイオレット法を用いて実施した。TSB培地を添加した96ウェルプレートへ菌液を接種後、37℃3日間培養し、0.5%クリスタルバイオレットで染色後、吸光度(OD)の測定を行った。試験はA、B、Cに加え、菌液未接種の陰性コントロール(NC)を各7ウェル実施し、NCの平均ODに3標準偏差を足した値をカットオフ値(cOD)とした。各農場由来株のOD平均値がcODを上回る場合をバイオフィーム産生能陽性と判定した。調査は浮遊菌と3日培養後の2条件で行った。

消毒感受性試験は前述と同様の手順でバイオフィルムを産生した後、各農場で使用されている消毒薬、使用濃度で5分間作用させ、その後中和剤を用いて反応を停止した。反応停止後の菌液を段階希釈し、TSA培地に接種して37℃で24時間培養した。培養後、コロニー数が3～400を示す培地の平均コロニー数、希釈倍率、接種量からコロニー形成単位（CFU）を算出した。試験は未消毒時と消毒時の各3ウェル実施した。消毒薬の有効性は未消毒時と消毒時のlog₁₀CFU差により判定し、消毒効果の基準値とされる5.0 log₁₀以上を消毒効果有と判定した。³⁾

2 結果および考察

バイオフィルム産生能の調査では、ODは浮遊菌でA 0.12 (cOD: 0.24)、B 0.11 (cOD: 0.12)、C 0.14 (cOD: 0.24)、3日培養後でA 1.66 (cOD: 0.51)、B 1.04 (cOD: 0.51)、C 1.59 (cOD: 0.51)となった。ODは全農場由来株において浮遊菌ではcODより低値を示し、3日培養後ではcODより高値を示した。以上より、全農場由来株でバイオフィルム産生が確認され、消毒効果が減弱しやすい可能性のあることが示唆された。

消毒感受性試験では、log₁₀CFU差はA 5.14、B 3.20、C 6.98となり、A、Cは基準値以上であったが、Bは基準値に達しなかった。消毒薬の濃度を高めて再度試験を実施した結果を図2に示した。AはX社逆性石けんの希釈倍率を2000倍から1,000倍に変更したところ、CFU差は5.14から10.52まで上昇した。BはY社逆性石鹼の希釈倍率を1,000倍から規定量以上の400倍へ変更したところ、CFU差は6.53まで上昇した。CはY社逆性石けんの希釈倍率を200倍から100倍へ変更したところ、CFU差は8.52まで上昇した。以上より、菌株によっては、農場で使用している条件では十分な消毒効果が得られない可能性が示唆された。

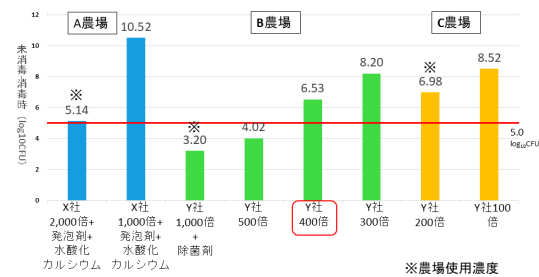


図2.消毒感受性試験の結果

消毒感受性試験をもとにした農場指導

消毒感受性試験の結果を踏まえ、A農場に対して消毒薬の使用濃度を高めるよう指導した。指導後に再度MPN法を実施したところ、表3のとおりとなった。消毒後のMPNを比較すると、ケージ1は、指導前の53MPN/100mLから指導後の43MPN/100mLに減少した。ケージ2は、指導前の1,100MPN/100mLから指導後の43MPN/100mLに減少し、約1/25となった。

表3.消毒薬変更前後のMPNの変化

	ケージ1			ケージ2		
	陽性本数	MPN/100mL	定性	陽性本数	MPN/100mL	定性
消毒前	2,3,3	53	陽性	3,3,3	≥2400	陽性
消毒後	指導前(2,000倍)	53	陽性	3,3,2	1100	陽性
	指導後(250倍)	43	陽性	3,1,0	43	陽性

まとめ

本検討では、採材部位および拭取り面積を統一したMPN法により、定性検査のみでは把握できない消毒前後の菌量変化を半定量的に評価し、農場における消毒効果の可視化を可能とした。これにより、消毒後の検査でサルモネラ陽性となった場合においても、MPNの変化を指標として消毒効果を評価することが可能となった。また、分離株を用いた消毒感受性試験により、農場で使用している消毒条件の有効性を比較し、衛生指導における具体的な検討材料を得た。特に、今回実施した消毒感受性試験では、規定濃度の消毒液であっても十分な消

毒効果が得られない可能性が示唆され、農場の実態に応じて消毒薬および使用濃度を選択する必要性が示された。さらに、これらの試験結果を提示することで、農場に対して根拠に基づく具体的な衛生指導が可能となった。農家が消毒効果を数値として把握できたことは、消毒に対する意識の向上および消毒方法の積極的な改善につながった。以上より、MPN法と消毒感受性試験を組み合わせることは、より実効性の高い衛生指導を行う上で有用であると考えられた。

disinfectant efficacy against
Salmonella biofilms, DGHM annual
meeting 2022, Germany (2022)

今後の取組

本検討により、MPN法および消毒感受性試験を活用した衛生指導の有用性が示された。一方で、今回の検討では分離菌株の消毒感受性に着目したが、農場では有機物の残存等により消毒効果が減弱している可能性も考えられた。今後は洗浄方法の改善を指導するとともに、消毒薬の規定濃度内での消毒効果を高めるため、発泡剤や水酸化カルシウム剤等の添加剤の活用についても検討していく。また、MPN法による消毒効果の評価を継続するとともに、分離菌の消毒感受性試験についても、有機物存在下など実際の農場環境に近い条件で実施し、その結果を衛生指導へ反映していく。これらの取組を通じて、農場におけるサルモネラの清浄化を目指していく。

引用文献

- 1) 藤川 浩：最確数(MPN)の計算方法およびその推定プログラムの開発，日本食品微生物学会雑誌，34(2)，131-134(2017)
- 2) Ikuyo Ohashi et al.: Disinfectant resistance of *Salmonella* in *in vitro* contaminated poultry house models and investigation of efficient disinfection methods using these models, J Vet Med Sci, 84(12), 1633-1644(2022)
- 3) Anja M. Richter et al., : Evaluating