

9 愛玩動物用飼料中のサルモネラ検査法の適用範囲を成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）に拡大するための妥当性確認

高橋 亜紀子*¹, 橋本 仁康*¹, 渡辺 ちとせ*², 増井 亮太*¹

Validation Study on Application of *Salmonella* Detection Method for Pet Food to Formed Jerky and Dried Jerky (Hard Type and Soft Type)

Akiko TAKAHASHI*¹, Yoshiyasu HASHIMOTO*¹, Chitose WATANABE*² and Ryota MASUI*¹

(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

*² Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Sendai Regional Center, FAMIC))

We have made a validation study on the applicability of an existing *Salmonella* detection method for pet food to jerky type pet food.

For this purpose, we first tried the use of sterilized scissors or similar tools for cutting jerky type pet food, and weighing out samples of 25 g each. It was, however, not possible to aseptically cut out all samples of dried jerky (hard type) using scissors or others.

On the other hand, *Salmonella* spike test was performed by adding 1 mL of *Salmonella* bacteria solution (100, 10, 1 CFU/mL) to 25 g of formed jerky and dried jerky (hard type and soft type). As a result, in the tests in which *Salmonella* bacterium solutions of 100 CFU/mL and 10 CFU/mL were added, *Salmonella* was detected from all samples. In contrast, in the tests in which 1 CFU/mL of *Salmonella* was added, *Salmonella* was not detected in 6 of 25 samples. The detection sensitivity was about 10 CFU in 25 g of formed jerky and dried jerky (hard type and soft type), which was equivalent to that of dry food, semi-dry food and wet food.

Detection method of salmonella in pet food was thus validated as useful for formed jerky and dried jerky (hard type and soft type), except for some dried jerky (hard type) that cannot be cut out aseptically.

As for three samples of dry jerky (hard type) that cannot be cut out aseptically, pieces of about 25 g each of them were put into a sterilized stomacher bag individually, and buffered peptone water and the surfactant solution were added, and subsequently pre-enrichment culture without stomacher processing was conducted. As a result of the *Salmonella* spike test of the dried jerky (hard type) that cannot be cut out aseptically, 10 CFU of *Salmonella* was successfully detected on a 25 g sample surface.

Key words: *Salmonella*; pet food; formed jerky; dried jerky; validation study

キーワード：サルモネラ；愛玩動物用飼料；成型ジャーキー；素材乾燥ジャーキー；妥当性確認

1 緒 言

サルモネラは、家畜、家きん及びペット等の腸管内をはじめ、河川や下水等自然界に広く分布し

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 仙台センター

ている細菌であり，その一部は病原性の高さから家畜衛生や公衆衛生上の大きな問題となっている．平成30年9月に第161回日本獣医学会学術集会において，国内で流通する一部の犬用ジャーキー製品からサルモネラが検出されたとの発表¹⁾があり，これを受けて農林水産省において市販のジャーキー製品（成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー）のサルモネラ汚染の実態調査を実施し，その結果，100製品中，素材乾燥ジャーキー4製品からサルモネラが確認された²⁾．

ペットフードを対象としたサルモネラの検査法は，愛玩動物用飼料等の検査法³⁾にドライ製品，セミドライ製品及びウェット製品を適用範囲とする方法（以下「ドライ製品等検査法」という．）が記載されているが，サルモネラの汚染事例が認められたジャーキー製品は対象となっていなかったため，ジャーキー製品を対象とするサルモネラの検査法の確立が必要となっていた．そこで今回，ドライ製品等検査法をジャーキー製品へ適用拡大するための妥当性確認を行ったので，その概要について報告する．

2 実験方法

2.1 試料

市販の愛玩動物用飼料（成型ジャーキー9 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ 10 検体及びソフトタイプ 9 検体））を用いた．

なお，検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1-1 及び 1-2 に示した．

Table 1-1 List of pet foods (formed jerky) used in this study

| Pet food types | Ingredients |
|-------------------------|--|
| Formed jerky for dogs 1 | Meats (chicken, beef), wheat flour, wheat protein, D-sorbitol, glyceline, flavour, salt, seasoning, phosphates (Na, K), preservative (sorbic acid), antioxidants (sorbic acid, extracted V. E, V. C, Na), color former (sodium nitrite) |
| Formed jerky for dogs 2 | Beef tongue, beef cattle, wheat flour, soybean protein, sugar, salt, starch, sorbitol, propylene glycol, sodium polyphosphate, coloring (food red no.102, food yellow no.5, food red no.106, food blue no.1) |
| Formed jerky for dogs 3 | White fish, meat (chicken), gelatin, defatted soybean, pork collagen, modified starch, D-sorbitol, glyceline, propylene glycol, baking powder, phosphates (Na, K), salt, seasoning, oligosaccharide, preservative (sorbic acid), antioxidant (extracted V. E) |
| Formed jerky for dogs 4 | Meats (chicken, pork), gelatin, defatted soybean, yeast, pork collagen, modified starch, D-sorbitol, glyceline, propylene glycol, baking powder, phosphates (Na,K), salt, seasoning, flavour, oligosaccharide, antioxidants (V. C Na, extracted V. E), preservative (sorbic acid), color former (sodium nitrite), coloring (food red no.106) |
| Formed jerky for dogs 5 | Meats (chicken, mutton, lamb), gelatin, defatted soybean, yeast, pork collagen, modified starch, D-sorbitol, glyceline, propylene glycol, baking powder, phosphates (Na, K), salt, seasoning, flavour, oligosaccharide, antioxidants (V. C Na, extracted V. E), preservative (sorbic acid), color former (sodium nitrite), coloring (food red no.106) |
| Formed jerky for dogs 6 | Grain, meats (chicken, cartilage etc.), vegetables (carrot, pumpkin, etc.), thickening stabilizer (glyceline), flavour, preservative (potassium sorbate), coloring (food red no.40, food yellow no.4) |
| Formed jerky for dogs 7 | Meats (beef, gelatin), soybean protein, bread crumb, wheat flour, saccharides, vegetable oil, glyceline, sorbitol, propylene glycol, mineral (Na), preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), smoked liquid, sodium polyphosphate, color former (sodium nitrite), antioxidant (V. E), coloring (food red no.106) |
| Formed jerky for cats 1 | Meats (chicken, beef), soybean protein, wheat flour, fish meat, beef tallow, actinidia polygama, glyceline, thickening stabilizer (modified starch), sorbitol, minerals (Ca, P, Na), preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), seasoning, color former (sodium nitrite), sodium polyacrylate, coloring (caramel, food red no.106), V. E |
| Formed jerky for cats 2 | Meats (chicken, beef), soybean protein, saccharides, wheat flour, fish meat, oils and fats, chicken extract, glyceline, sorbitol, thickening stabilizer (modified starch, sodium polyacrylate), dietary fibers (cellulose, CMC-Na), minerals (Ca, Na), seasoning, preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), sodium polyphosphate, color former (sodium nitrite), coloring (caramel, food red no.106), V. E |

Table 1-2 List of pet foods (dried jerky) used in this study

| Pet food types | Ingredients |
|---|---|
| Dried jerky for dogs (hard type) 1 | Ribs of calf, soybean protein, glyceline, propylene glycol, sorbitol, mineral (Na), color former (sodium nitrite), antioxidants (V. C, sodium erythorbate), phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), V. E |
| Dried jerky for dogs (hard type) 2 | Chicken breast meat, propylene glycol, glyceline, salt, sodium dehydroacetate, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (hard type) 3 | Chicken breast meat, starch, plant protein, glyceline, sorbitol, calcium carbonate, phosphate, minerals (Na, Cl), color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (hard type) 4 | Chicken breast meat, starches, soybean meal, albumen powder, pork collagen, trehalose, glyceline, minerals (Na, Ca), phosphate (Na) |
| Dried jerky for dogs (hard type) 5 | Cervus hortulorum meat, D-sorbitol, glyceline, phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (hard type) 6 | Turkey muscle, salt, glyceline, phosphate (Na), antioxidant (V. C), color former (sodium nitrite), seasoning (amino acid) |
| Dried jerky for dogs (hard type) 7 | Pork ears |
| Dried jerky for dogs (hard type) 8 | Beef muscle |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1 | Cod, preservative (sodium dehydroacetate) |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2 | Cod, preservative (sodium dehydroacetate) |
| Dried jerky for dogs (soft type) 1 | Chicken breast meat, salt, sorbitol, glyceline, sodium lactate, propylene glycol, antioxidant (sodium erythorbate), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (soft type) 2 | Chicken gizzard, salt, sorbitol, glyceline, propylene glycol, color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (soft type) 3 | Cartilage containing veal, soybean protein, glyceline, sorbitol, mineral (Na), antioxidants (sodium erythorbate, V. C, V. E), phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (soft type) 4 | Chicken cartilage containing collagen, beef extract, salt, vegetable glyceline, propylene glycol, preservative (potassium sorbate), antioxidant (V. C), color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (soft type) 5 | Chicken breast meat, glyceline, propylene glycol, sodium hexametaphosphate, salt, preservative (potassium sorbate), sodium polyphosphate, antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (soft type) 6 | Chicken breast meat, salt, propylene glycol, glyceline, sorbitol, color former (sodium nitrite) |
| Dried jerky for cats (soft type) | Chicken breast meat, skipjack extract, scallop extract, glyceline, sodium lactate, pH adjuster, phosphates (Na, K), taurine, flavour, antioxidant (sodium nitrite) |
| Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 1 | Chicken breast meat, Sheet of cod, propylene glycol, trehalose, sodium lactate, vegetable oil, phosphates (Na, K), salt, preservative (sorbic acid) |
| Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 2 | Chicken breast meat, sweet potato, soybean meal, corn starch, trehalose, glyceline, propylene glycol, phosphates (K, Na), salt, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite) |

2.2 試薬

- 1) 界面活性剤溶液, ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液, 生理食塩液及び緩衝ペプトン水は, ドライ製品等検査法に記載のとおり調製した. 水は AQUARIUS RFD240RA (東洋製作所製) により蒸留した蒸留水 (JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水) を用い, 必要に応じ, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌し滅菌水として用いた. なお, 調製に用いた試薬は, 等級があるものは特級を用いた.

また, 以下の市販の培地を用いた.

ハーナ・テトラチオン酸塩培地 (ハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地 “栄研”, 栄研化学製, 以下「HTT 培地」という.)

ラパポート・バシリアディス培地 (RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) ENRICHMENT BROTH, Oxoid 製, 以下「RV 培地」という.)

DHL 寒天培地 (パールコア DHL 寒天培地 “栄研”, 栄研化学製)

ブリリアントグリーン寒天培地 (Difco Brilliant Green Agar, Becton, Dickinson and Company 製, 以下「BG 寒天培地」という.)

クロモアガーサルモネラ寒天培地 (CHROMagar Salmonella, CHROMagar 製, 以下「CAS 寒天培地」という.)

- 2) ブレインハートインフュージョン寒天培地 (以下「BHI 寒天培地」という.) Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 52 g 又は Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company 製) 37 g 及び Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 15 g を水 1000 mL に加え, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌し, これをプラスチック製滅菌シャーレに均様に広がるように 20 mL 分注し, 水平に静置して凝固させた後, 倒置してふたをわずかにずらし, 37 ° C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させた.
- 3) ハートインフュージョン液体培地 (以下「HI 液体培地」という.) Heart Infusion Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 25 g を水 1000 mL に溶かし, 大試験管に 20 mL ずつ分注した後, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 4) ハートインフュージョン寒天培地 (以下「HI 寒天培地」という.) Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 40 g を水 1000 mL に溶かし, 121 ° C で 15 分間高圧蒸気滅菌し, 菌数測定用培地に用いた.
- 5) リファンピシン原液 リファンピシン (生化学試験用, 富士フイルム和光純薬製) 1 g を 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ, メタノール 100 mL を加えてかき混ぜて溶かし, 0.20 µm の滅菌済みセルロースアセテートフィルターでろ過し, リファンピシン原液 (10 mg/mL) を調製した. 使用に際して, リファンピシン原液を滅菌水で 10 倍希釈し, リファンピシン添加用溶液 (1 mg/mL) を調製した.
- 6) リファンピシン添加 HI 液体培地 3) の HI 液体培地 20 mL にリファンピシン添加用溶液 (1 mg/mL) を 2 mL 加えた.
- 7) サルモネラ培養液 北里大学から分与されたリファンピシン耐性の *Salmonella enterica* serovar Enteritidis HY-1rif^r 株 (以下「SE」という.) を BHI 寒天培地に画線塗抹し, 倒置して 37 ° C で 18~24 時間培養した. BHI 寒天培地表面の SE の集落 1 個を釣菌し, 生理食塩液 30 µL に希釈した. 希釈菌液の 1 白金耳を BHI 寒天培地に画線塗抹し, 倒置して 37 ° C で 18~24 時間

純粋培養した．純粋培養した BHI 寒天培地表面の SE の集落を 1 白金耳リファンピシン添加 HI 液体培地に加え，37 °C で 20 時間静置して培養し，サルモネラ培養液を調製した．

使用に際し，生理食塩水で 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} ， 10^{-7} ， 10^{-8} 及び 10^{-9} 希釈菌液を調製した．

- 8) リファンピシン添加 DHL 寒天培地 DHL 寒天培地 63 g を水 1000 mL に加え，110 °C で 10 分間高圧蒸気滅菌して溶かした．これを，あらかじめリファンピシン添加用溶液（1 mg/mL）2 mL を分注したプラスチック製滅菌シャーレに一様に広がるように 18 mL 分注してリファンピシン添加用溶液と混合し，水平に静置して凝固させた後，倒置してふたをわずかにずらし，37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させ，リファンピシン添加 DHL 寒天培地（リファンピシン濃度 100 µg/mL）を調製した．
- 9) リファンピシン添加 BG 寒天培地 BG 寒天培地 58 g を水 1000 mL に加え，110 °C で 10 分間高圧蒸気滅菌して溶かした．以下 8) と同様に操作し，リファンピシン添加 BG 寒天培地（リファンピシン濃度 100 µg/mL）を調製した．
- 10) リファンピシン添加 CAS 寒天培地 CAS 寒天培地 34.9 g を水 1000 mL に加え，沸騰水浴中で加熱して溶かした．以下 8) と同様に操作し，リファンピシン添加 CAS 寒天培地（リファンピシン濃度 100 µg/mL）を調製した．

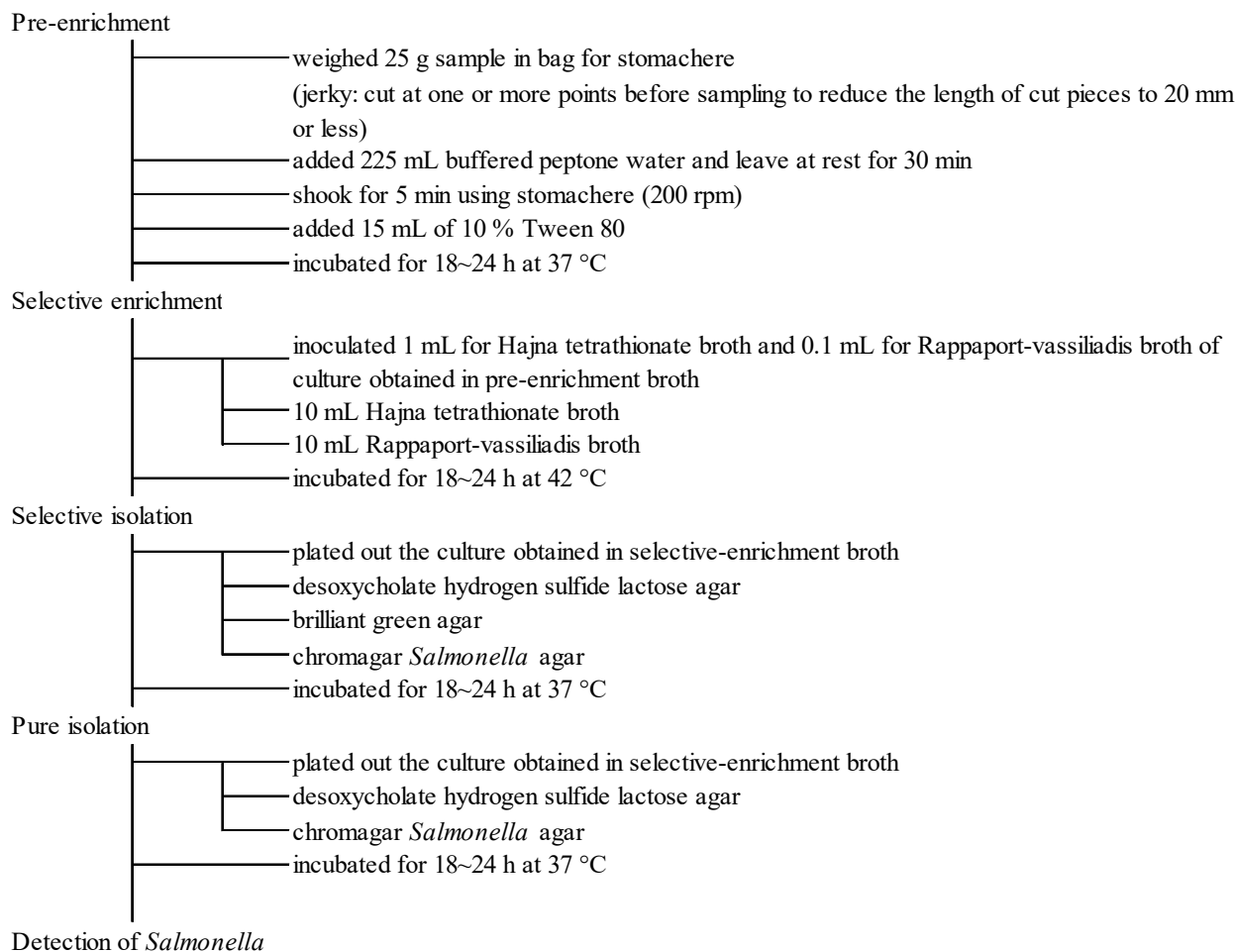
2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：LTI-1001ED 東京理科器械製，REX-C410 佐竹化学機械工業製，FMU-130I 福島工業製
- 2) ストマッカー：EXNIZER400 オルガノ製
- 3) ストマッカー袋：CWB ワイヤバック 3019 (γ線滅菌済) セントラル科学貿易製
- 4) その他：試験に用いた器具のうち，試料，培地及び菌液に接触するものは，滅菌済みのものを用いた．

2.4 試験方法

ドライ製品等検査法（愛玩動物用飼料等検査法 第 8 章の 1，令和 2 年 4 月 1 日付け改正前の方法）によった．ただし，切断可能な試料は滅菌済みのはさみを用いて無菌的に 1 カ所以上を切断し，切断片の辺の長さを 20 mm 以下とした後に 25 g を量ってストマッカー袋に入れた．

なお，試験方法の概要を Scheme 1 に示した．

Scheme 1 Analytical procedure of *Salmonella* in pet foods inspection method

2.5 サルモネラ添加試験

成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）を 2.4 の方法で 25 g 量ってストマッカー袋に入れ、サルモネラ培養液の 10^{-7} 希釈菌液、 10^{-8} 希釈菌液及び 10^{-9} 希釈菌液を 1 mL を添加し、ドライ製品等検査法のとおり前増菌培養及び選択増菌培養を行った。各選択増菌培養液をリファンピシン添加 DHL 寒天培地、リファンピシン添加 BG 培地及びリファンピシン添加 CAS 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 37 °C で 18~24 時間培養し、サルモネラの集落が確認された場合、陽性と判断した。

なお、添加に用いたサルモネラ培養液中の菌数は平板混積培養法⁴⁾により測定した。

3 結果及び考察

3.1 ドライ製品等検査法によるサルモネラ試験

2.1 の試料について 2.4 によりサルモネラ検出試験を行い、同時に前増菌培養段階の試料の状態を観察した。子牛肋骨を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1、豚の耳を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）7 及び牛筋を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）8 の 3 検体は、滅菌済みのはさみ等により無菌的な切断が行えなかった。これらの試料は、ストマッカー処理によりストマッカー袋の破れやストマッカーの動作不良が生じるため、ストマッカー処理は行わないこととし、25 g 程度となる量をストマッカ

一袋に入れ、緩衝ペプトン水を 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL を加え、前増菌培養を行った。

ドライ製品等検査法によるサルモネラ検出試験の結果、全ての試料においてサルモネラと疑われる菌の集落は検出されなかった。

ストマッカー処理による試料の崩壊状態を確認した結果、Table 2 のとおり、崩壊が不十分な試料があることが認められた。成型ジャーキーは、ストマッカー処理により全ての試料が完全に崩壊した。切断できた素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、ストマッカー処理により完全に崩壊しない試料があったが、切断面及び一部崩壊した部分において緩衝ペプトン水と組織内部が接触し、組織の膨潤が認められた。切断できずストマッカー処理を行わなかった素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、前増菌培養後には組織表面は柔らかくなっていたが、緩衝ペプトン水の組織内部までの浸透は確認できなかった。素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）は、ストマッカー処理による崩壊が不十分な試料があったが、切断面及び一部崩壊した部分において緩衝ペプトン水と試料内部が接触し、組織の膨潤が認められた。

以上より、切断可能なジャーキー製品については、ドライ製品等検査法にはさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、試料表面及び内部のサルモネラの検出が可能であると考えられた。

はさみ等を用いて無菌的に切断及びストマッカー処理を行えない牛肋骨、豚の耳及び牛筋等の硬い組織を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、試料内部のサルモネラの検出は難しく、ドライ製品等検査法の適用はできないが、試料表面のサルモネラの検出は可能と考えられた。通常、菌は動物体内においては気道や消化管に存在し、愛玩動物用飼料に用いる筋肉及び骨には生息していないため、愛玩動物用飼料のサルモネラ汚染は、製造、保管及び流通段階における接触汚染の可能性が高いと考えられる。素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品及び成型ジャーキーのように原料を混合する工程が無い場合、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）の内部のみが微生物汚染している可能性は低いと考えられる。一方、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）の試料表面は、農林水産省のサルモネラ汚染の実態調査においてサルモネラが確認された4製品が鶏ささみ等の素材のみを原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）であった⁵⁾ことから微生物汚染の可能性は高いと考えられる。よって、汚染の可能性の高い素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）表面のサルモネラの汚染確認は、愛玩動物用飼料のサルモネラ汚染実態の把握を効率的に行える手段と考えられる。

Table 2 Collapse of sample by pet foods inspection method

| Pet food types | Cutting with scissors | Collapse by stomacher processing |
|---|--------------------------|-------------------------------------|
| Formed jerky for dogs 1 | Possible | ○ |
| Formed jerky for dogs 2 | Possible | ○ |
| Formed jerky for dogs 3 | Possible | ○ |
| Formed jerky for dogs 4 | Possible | ○ |
| Formed jerky for dogs 5 | Possible | ○ |
| Formed jerky for dogs 6 | Possible | ○ |
| Formed jerky for dogs 7 | Possible | ○ |
| Formed jerky for cats 1 | Possible | ○ |
| Formed jerky for cats 2 | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs (hard type) 1 | Impossible | Not processing |
| Dried jerky for dogs (hard type) 2 | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs (hard type) 3 | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs (hard type) 4 | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs (hard type) 5 | Possible | △ |
| Dried jerky for dogs (hard type) 6 | Possible | △ |
| Dried jerky for dogs (hard type) 7 | Impossible | Not processing |
| Dried jerky for dogs (hard type) 8 | Impossible | Not processing |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1 | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2 | Possible | △ |
| Dried jerky for dogs (soft type) 1 | Possible | △ |
| Dried jerky for dogs (soft type) 2 | Possible | × |
| Dried jerky for dogs (soft type) 3 | Possible | △ |
| Dried jerky for dogs (soft type) 4 | Possible | △ |
| Dried jerky for dogs (soft type) 5 | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs (soft type) 6 | Possible | ○ |
| Dried jerky for cats (soft type) | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 1 | Possible | ○ |
| Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 2 | Possible | ○ |

○: completely collapsed, △: partially collapsed, ×: Did not collapse

3.2 サルモネラ添加試験

2.1 の試料について 2.5 によりサルモネラ添加試験を実施した。滅菌済みのはさみ等を用いて無菌的に切断を行えない、子牛肋骨を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1、豚の耳を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）7 及び牛筋を原料とする素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）8 の 3 検体は、25 g 程度となる量をストマッカー袋に入れ、サルモネラ培養液の希釈菌液を 1 mL 添加し、試料 25 g に対して緩衝ペプトン水 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL の割合で加え、振り混ぜた後、前増菌培養を行った。サルモネラ培養液中の菌数の測定結果は、 1.0×10^9 CFU/mL から 1.8×10^9 CFU/mL であり、 10^{-7} 希釈菌液、 10^{-8} 希釈菌液及び 10^{-9} 希釈菌液 1 mL には、それぞれ 100 CFU、10 CFU 及び 1 CFU 程度サルモネラが含まれていた。サルモネラ添加試験の結果は Table 3 のとおり、試料 25 g にサルモネラを 100 及び 10 CFU 相当量を添加した場合は、全ての試料でサルモネラが検出された。1 CFU 相当量を添加した場合は、切断した試料 25 試料中 6 試料、切断できなかった試料 3 試料中 2 試料からサルモネラは検出されなかった。検討に用いた試料の原料（Table 1-1 及び 1-2）を確認した結果、サルモネラの検出率に影響する原料の違いは認められなかった。

よって、検出感度は、ジャーキー 25 g 中に 10 CFU 程度であり、ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品の結果⁶⁾と同等であり、分析試料 25 g を量る前に、はさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、ドライ製品等検査法をジャーキー製品に適用可能と考えられた。

はさみ等を用いて無菌的に切断ができない素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）については、試料内部のサルモネラの検出が難しいためドライ製品等検査法を適用できなかったが、その検出感度は、試料 25 g 程度の表面に 10 CFU 程度であり、試料表面のサルモネラの汚染確認に使用可能と考えられた。

Table 3 Results of *Salmonella* ^{a)} spike test

| Pet food types | Test result | | |
|---|-----------------------|----------------------|---------------------|
| | 100 CFU ^{b)} | 10 CFU ^{c)} | 1 CFU ^{d)} |
| Formed jerky for dogs 1 | + | + | + |
| Formed jerky for dogs 2 | + | + | + |
| Formed jerky for dogs 3 | + | + | + |
| Formed jerky for dogs 4 | + | + | + |
| Formed jerky for dogs 5 | + | + | + |
| Formed jerky for dogs 6 | + | + | - |
| Formed jerky for dogs 7 | + | + | + |
| Formed jerky for cats 1 | + | + | + |
| Formed jerky for cats 2 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (hard type) 1 ^{e)} | + | + | - |
| Dried jerky for dogs (hard type) 2 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (hard type) 3 | + | + | - |
| Dried jerky for dogs (hard type) 4 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (hard type) 5 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (hard type) 6 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (hard type) 7 ^{e)} | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (hard type) 8 ^{e)} | + | + | - |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1 | + | + | - |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (soft type) 1 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (soft type) 2 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (soft type) 3 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (soft type) 4 | + | + | - |
| Dried jerky for dogs (soft type) 5 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (soft type) 6 | + | + | - |
| Dried jerky for cats (soft type) | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 1 | + | + | + |
| Dried jerky for dogs (soft type, two types materials) 2 | + | + | + |

+: detected of *Salmonella* colonise, -: absenced of *Salmonella* colonise

a) Rifampicin resistant *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

b) *Salmonella* culture solutions (1.0×10^9 CFU/mL ~ 1.8×10^9 CFU/mL) were diluted 10⁷-fold and 1 mL added to sample 25 g.

c) *Salmonella* culture solutions (1.0×10^9 CFU/mL ~ 1.8×10^9 CFU/mL) were diluted 10⁸-fold and 1 mL added to sample 25 g.

d) *Salmonella* culture solutions (1.0×10^9 CFU/mL ~ 1.8×10^9 CFU/mL) were diluted 10⁹-fold and 1 mL added to sample 25 g.

e) Aseptic cutting was not possible. About 25 g of the sample was put into a sterilized stomacher bag, buffered peptone water and the surfactant solution were added, and pre-enrichment culture was performed without stomacher treatment.

4 まとめ

ドライ製品等検査法の適用範囲を成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）に拡大するための妥当性確認を行った結果、分析試料 25 g を量る前に、滅菌済みのはさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、以下の結果が得られ、切断ができない一部の素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）を除いてドライ製品等検査法の適用が可能と考えられた。

また、はさみ等を用いて無菌的に切断を行えない素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）については、試料内部のサルモネラの検出が難しいためドライ製品等検査法を適用できなかったが、25 g 程度となる量をストマッカー袋に入れ、試料 25 g に対して緩衝ペプトン水 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL の割合で加え、振り混ぜた後、前増菌培養を行うことにより、試料表面のサルモネラの汚染確認に使用できると考えられた。

1) 成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）のサルモネラ検出試験を行い、同時に前増菌培養段階の試料の状態を観察した。素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）のうち、子牛肋骨、豚の耳及び牛筋を原料とする 3 検体は、はさみ等を用いて無菌的に切断する操作を行えなかった。これらの試料は、25 g 程度となる量をストマッカー袋に入れ、緩衝ペプトン水を 225 mL 及び界面活性剤溶液 15 mL を加え、ストマッカー処理を行わず前増菌培養を行った。全ての試料においてサルモネラ不検出であった。

切断可能なジャーキー製品については、ドライ製品等検査法にはさみ等を用いて無菌的に切断する操作を加えることで、ジャーキー製品中のサルモネラの検出が可能であると考えられた。切断ができない一部の素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）については、組織内部のサルモネラ汚染の検出は、難しいと考えられた。

2) 成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）にサルモネラ培養液の 10^7 希釈菌液、 10^8 希釈菌液及び 10^9 希釈菌液を 1 mL（これら希釈菌液には、それぞれ 100 CFU, 10 CFU, 1 CFU 程度のサルモネラが含まれていた。）添加し、サルモネラ検出試験を行った結果、試料 25 g にサルモネラを 100 及び 10 CFU 相当量を添加した場合は、全ての試料でサルモネラは検出された。1 CFU 相当量を添加した場合は、切断した試料 25 試料中 6 試料、切断できなかった試料 3 試料中 2 試料からサルモネラは検出されなかった。検出感度は、成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）25 g 中に 10 CFU 程度であり、ドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品と同等であった。

はさみ等を用いて無菌的に切断ができない素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）の検出感度については、試料 25 g 程度の表面に 10 CFU 程度であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり菌株を提供していただいた北里大学並びに本研究に対して御助言いただいた一般財団法人生物科学安全研究所参与の宮崎茂先生、信頼性保証室の丸山賀子先生、公益社団法人中央畜産会の高木昌美先生に感謝の意を表します。

文 献

1) 湯川 尚一郎, 内田 郁夫, 田村 豊, 大島 誠之助, 長谷川 貴史: 日本におけるイヌ用トリーツのサルモネラ属菌汚染状況, 第 161 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 391 (2018).

- 2) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：ペットフードの病原微生物汚染防止対策の徹底について，令和元年7月12日，元消安第1178号(2019).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成21年9月1日(2009).
- 4) 東京大学医科学研究所学友会編：第2版微生物学実習提要，東京，丸善，60(1998). (ISBN4-621-04465-6).
- 5) 一般財団法人東京顕微鏡院，平成30年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業（ペットフード（犬猫用おやつ製品）からのサルモネラ属菌の分離調査）報告書(2018).
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：平成20年度ペットフードの安全監視体制構築に係る予備調査(2009).