＝調 査＝

畜水産食品からの黄色ブドウ球菌検出のための 選択分離培地および選択増菌培地の検討

松村 浩介^{*1}・清水 晃^{*1,†}・河野 潤一^{*1}・五十君 静信^{*2}

(^{*1}神戸大学農学部感染症制御学教室・^{*2}国立医薬品食品衛生研究所)

(受付 平成 20 年 6 月 4 日)

(受理 平成 20 年 12 月 5 日)

Selective Media for Detection of *Staphylococcus aureus* in Commercial Raw Meat and Fish

Kosuke MATSUMURA^{*1}, Akira SHIMIZU^{*1,†},
Junichi KAWANO^{*1} and Shizunobu IGIMI^{*2}

(^{*1} Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Agriculture, Kobe University,
1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657-8501; [†] Corresponding author)

(^{*2} Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Science,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 185-8501)

緒 言

食品の細菌試験法の基本となるのは培養法である。わが国の食品衛生法で規定された黄色ブドウ球菌の試験法では、増菌培養ではなく、食品の 10 倍乳剤を選択分離培地に直接塗抹することになっている。選択分離培地は食塩を選択剤とした、また黄色ブドウ球菌の指標である卵黄反応を確認するために卵黄液を添加した卵黄加マンニット食塩 (MSEY) 培地が一般的に用いられている。しかし、この直接平板培養法は食品検体中に黄色ブドウ球菌が少数の場合 (100 cfu/g 以下) には検出できないことがあることから、一部の検査室では黄色ブドウ球菌の検出率を上げるために、5% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加普通ブイヨン培地^{5, 8, 13)}、7.5% 食塩加トリプトケースソイブイヨン (TSB) 培地¹⁴⁾、7.5% 食塩加ハートインフュージョンブイヨン (HIB) 培地^{7, 11)}、7.5% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 HIB 培地¹⁰⁾、5% 食塩および 1% マンニット加ブレインハートインフュージョンブイヨン (指示薬として 0.2% フェノールレッド溶液を 1.2% の割合に添加したもの) 培地⁴⁾ による選択増菌培養が試みられ、本菌の検出率が直接平板培養法に比べて著しく増加することが報告されている。

一方、国際標準化機構 (ISO) の ISO 6888-1²⁾ および米国食品医薬品局 (FDA) の Bacteriological Analytical Manual (BAM)¹⁾ の黄色ブドウ球菌試験法では直接平板培養法における選択分離培地として、亜テルル酸カリウム、グリシン、塩化リチウムを選択剤とした Baird-Parker (BP) 培地が採用されている。この BP 培地には加熱や凍結などによる、いわゆる損傷菌に対する修復力を有するピルビン酸ナトリウム、また鑑別剤として卵黄液が添加されており、食品材料から黄色ブドウ球菌を効果的に検出できるとして、諸外国では BP 培地が主流となっている。また、ISO 6888-3³⁾ および BAM¹⁾ では黄色ブドウ球菌の汚染菌数が少数と推定される食品、競合菌が多数含まれていると推定される食品、菌が加熱や凍結などによって損傷を受けていると想定される食品の検査に、最確数 (MPN) 法による選択増菌培養法を薦めており、その試験方法や増菌培地などが細かく規定されている。わが国の食品衛生検査指針¹²⁾ にも MPN 法による菌数測定の実用性が記載されているが、増菌培地の種類については指定していない。

以上のように、わが国と外国では直接平板培養法に用いられている選択分離培地の種類が異なっていることや、ISO 法³⁾ や BAM 法¹⁾ のような規格化された選択増菌培養法のプロトコールも確立されていない。食品流通のグローバル化にある現状において、国際的に互換性のある黄色ブドウ球菌試験法を早急に整備する必要がある。

† 連絡先

^{*1} ☎657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

^{*2} ☎158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

そこで、筆者らは市販の食肉類およびその加工品と魚介類を用いて、直接平板培養法における MSEY 培地と BP 培地の検出比較、選択増菌培養法における増菌培地の食塩添加濃度と培養時間について検討した。

材料および方法

1. 検査材料

2005 年 4 月から 2006 年 11 月にかけて、兵庫県および大阪府のスーパーマーケットで市販されていた食肉類およびその加工品と魚介類を検査材料とした。なお、1 トレイパックを 1 検体とした。

2. 検査試料の調整法と分離培養法

検体を無菌的に 25 g ひょう量して、滅菌フィルターバックに入れ、次に 225 ml の滅菌生理食塩水を加え、ストマッカーを用いて 1 分間ホモジナイズし、10 倍乳剤を作製した。直接平板培養法では前記乳剤 0.1 ml を選択分離培地 2 枚に接種し、コンラージ棒で全面に広げ、35℃、48 時間培養を行った。MPN (3 段階 3 本法) 法による菌数測定は、前記 10 倍乳剤 10 ml, 1 ml, 0.1 ml を、それぞれ 10 ml の選択増菌培地の入った試験管 (15×180 mm) 3 本ずつに接種し、35℃、24 時間または 48 時間培養を行った。なお、試料 10 ml 用の増菌培養には 2 倍濃度の増菌培地の入った三角フラスコ (100 ml 用) を用いた。各試験管の培養液の 1 白金耳量を選択分離培地に画線塗抹し、35℃、48 時間培養後、本菌の有無を調べた。

3. 黄色ブドウ球菌の同定法

MSEY 培地上では黄色集落で、その周囲に卵黄反応による白濁帯を示したもので、BP 培地上では黒色あるいは灰色集落で、その周囲に透明帯を形成し、集落辺縁に白濁帯が観察されたものを 1 平板当たり 2~5 個釣菌し、HI 寒天培地 (ニッスイ) で純培養した菌株について、グラム染色、カタラーゼ試験、VP 試験、コアグラゼ試験を行い、黄色ブドウ球菌の同定を行った。

4. 統計処理

各種培地および培養時間に関する統計学的有意差検定は、黄色ブドウ球菌が検出された検体はスコア 1、検出されなかった検体は 0 として、Mann-Whitney の U 検定を行った。

結果および考察

1. 直接平板培養法における MSEY 培地と BP 培地の検出比較

食肉類およびその加工品と魚介類 94 検体について、MSEY 培地 (ニッスイ) と BP 培地 (Oxoid) の検出率を比較した。黄色ブドウ球菌検出率は MSEY 培地が 8.5% (8/94)、BP 培地が 11.7% (11/94) であり、培地間で有意な差は認められなかった ($p > 0.1$) (表 1)。また、両培地で黄色ブドウ球菌陽性となった検体の発育菌数についても大きな差は見られなかった (表 2)。

尾上ら⁹⁾ および金子ら (第 27 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, p. 79, 2006 年) は加熱損傷黄色ブドウ球菌を用いた実験で、BP 培地が MSEY 培地に比べて加熱損傷黄色ブドウ球菌に対して発育支持能が優れていることを報告し、損傷菌が存在する加工食品の黄色ブドウ球菌検査には BP 培地の使用を推奨している。今回、加熱、冷蔵、冷凍および解凍処理を施した自然汚染検体を用いた実験では、MSEY 培地と BP 培地の発育能に大きな差が見られなかった。今後わが国の黄色ブドウ球菌検査の標準培地として、外国との整合性を考慮した BP 培地を指定するにしても、本培地の性能については多くの自然汚染検体を用いた検証が必要であろう。

2. 選択増菌培養法における増菌培地の種類と食塩添加濃度

Lancette⁶⁾ は加熱損傷黄色ブドウ球菌 4 株を用いて、10% 食塩加 TSB 培地と、10% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地の回収菌数を比較したところ、4 株とも後者で多かったこと、また、非加熱菌体でも同様の成績を観察している。この報告は増菌培地にピルビン酸ナトリウムの添加が有用であることを示しており、本実験でも HIB 培地 (ニッスイ) および TSB 培地 (BBL) にピルビン酸ナトリウムを 1% の割合で添加したものをベースにして、これに食塩の最終濃度が 5% および 7.5% になるように添加した 4 種類の培地を作製した。これらの増菌培地 (2 倍濃度に調整したもの) 10 ml に自然汚染食肉 (牛、豚、鶏ミンチ肉 60 検体) の 10 倍乳剤 10 ml を接種し、24 時間培養後、MSEY 培地に塗抹し、黄色ブドウ球菌の検出率を比較した (表 3)。その結果、検出率は 5% および 7.5% 食塩加 HIB 培地ではそれぞれ 66.7% (40/60)、75.0% (45/60) で、また、5% および 7.5% 食塩加 TSB 培地ではそれぞれ 61.7% (37/60)、75.0% (45/60) であり、検出率は HIB 培地および TSB 培地ともに 7.5% 食塩添加濃度で高かったものの、統計学的有意差はなかった (ともに $p > 0.1$)。

3. 選択増菌培養法における 3 種類の増菌培地の検出比較

本実験では、BAM¹⁾ で採用されている 10% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地、ISO³⁾ で採用されている Giolitti-Cantoni broth (GCB, Oxoid) 培地、および前述の実験結果から 7.5% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地を選び、MPN 法による黄色ブドウ球菌の検出比較を行った (表 4)。なお、選択分離培地には MSEY 培地を用いた。

鶏ミンチ肉 30 検体からの黄色ブドウ球菌の検出率は、7.5% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地では 24 時間および 48 時間培養ともに 96.7% (29/30)、10% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地では 24 時間および 48 時間培養ともに 93.3% (28/30) であり、両培地とも培養時間による検出率には差が見られなかった。一方、GCB 培地では 24 時間培養で

表 1. 直接平板培養法^{*1}における MSEY 培地と BP 培地の検出比較

検体		検体数	陽性検体数		
			MSEY 培地 ^{*2}	BP 培地 ^{*2}	両培地
食肉類	鶏ミンチ肉	30	7 (23.3%)	6 (20.0%)	5
	牛ミンチ肉	15	1 (6.7%)	2 (13.3%)	1
	豚ミンチ肉	15	0	1 (6.7%)	0
肉を含む加工品	牛肉タタキ	1	0	1 (100%)	0
	シューマイ (チルド)	2	0	0	0
	メンチカツ	3	0	0	0
	メンチカツ (冷凍)	1	0	0	0
	ミートコロケ	4	0	0	0
	小籠包 (チルド)	1	0	0	0
	小籠包 (冷凍)	1	0	0	0
	餃子 (チルド)	3	0	0	0
	餃子 (冷凍)	3	0	0	0
	つみれ (冷凍)	1	0	0	0
	つくね (冷凍)	2	0	0	0
	肉だんご (冷凍)	1	0	0	0
	マグロたたき (解凍)	1	0	0	0
	マグロ短冊 (解凍)	1	0	0	0
魚介類	マグロ切り落とし (解凍)	1	0	0	0
	むきえび	2	0	0	0
	断頭ブラックタイガー (解凍)	4	0	0	0
	スモークサーモン	1	0	1 (100%)	0
	ヤリイカげそ (解凍)	1	0	0	0
	計	94	8 (8.5%)	11 (11.7%)	6 (6.4%)

^{*1} 10 倍乳剤の 0.1 ml を 2 枚の平板に接種, 35℃, 48 時間培養.

^{*2} MSEY 培地はニッスイ製, BP 培地は Oxoid 製, いずれの培地にも 3% 卵黄液添加.

表 2. 黄色ブドウ球菌陽性検体における MSEY 培地と BP 培地の菌数比較

陽性検体		菌数 (CFU)/g	
		MSEY 培地	BP 培地
鶏ミンチ肉	1	2.1×10^2	1.1×10^2
	2	1.9×10^2	1.1×10^2
	3	20	—
	4	6.9×10^2	3.3×10^2
	5	7.0×10^2	9.3×10^2
	6	5	—
	7	—	10
	8	15	5
牛ミンチ肉	1	—	5
	2	5	5
豚ミンチ肉	—	—	5
牛肉タタキ	—	—	15
スモークサーモン	—	—	15

70.0% (21/30), 48 時間培養で 90.0% (27/30) であった. また, 培養時間と MPN 値との関係を見ると, 24 時間と 48 時間で MPN 値が一致した検体数は 7.5% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地で 65.5% (19/29), 10% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地で 42.9% (12/28), GCB 培地で 33.3% (9/27) であったが, いずれの培地も 48 時間培養で MPN 値が上昇する検体が見られたことから, 48 時間培養が必要であると思われた.

FDA¹⁾ では増菌培地として 10% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地を採用しているが, 今回の成績で, 7.5% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地でもほぼ同等の検出率が得られた. また, ISO³⁾ が採用している GCB 培地については, 48 時間培

表 3. 選択増菌培地の種類と食塩添加濃度による検出率の比較

検体	検体数	HIB 培地 ^{*1} 食塩添加濃度		TSB 培地 ^{*1} 食塩添加濃度	
		5%	7.5%	5%	7.5%
牛ミンチ肉	20	15	14	13	15
豚ミンチ肉	20	12	18	12	16
鶏ミンチ肉	20	13	13	12	14
計	60	40 (66.7%)	45 (75.0%)	37 (61.7%)	45 (75.0%)

^{*1} ピルビン酸ナトリウムを 1% の割合で添加.

表 4. MPN 法による各種選択増菌培地の培養時間による検出率の比較

選択増菌培地	検体数	陽性検体数		MPN 値	
		24 時間培養	48 時間培養	24 時間=48 時間* ¹	24 時間<48 時間* ²
7.5% 食塩+1% ピルビン酸 ナトリウム加 TSB 培地	30	29 (96.7%)	29 (96.7%)	19	10
10% 食塩+1% ピルビン酸 ナトリウム加 TSB 培地	30	28 (93.3%)	28 (93.3%)	12	16
GCB 培地	30	21 (70.0%)	27 (90.0%)	9	18

*¹ 3 本法での MPN 値が 24 時間培養と 48 時間培養で等しかった。*² 3 本法での MPN 値が 48 時間培養のほうが高くなった。

表 5. 市販食肉における直接平板培養法と MPN 法による選択増菌培養法の検出比較

検体	検体数	陽性検体数	
		直接平板培養法* ¹	選択増菌培養法* ²
精肉* ³	60	3 (5.0%)	21 (35.0%)
ミンチ肉* ⁴	36	7 (19.4%)	29 (80.6%)
計	96	10 (10.4%)	50 (52.1%)

*¹ 選択分離培地には MSEY 培地を用いた。*² 選択増菌培地には 7.5%食塩および 1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地、選択分離培地には MSEY 培地を用いた。*³ 豚肉、牛肉、鶏肉各 20 検体。*⁴ 豚ミンチ肉、牛ミンチ肉、鶏ミンチ肉各 12 検体。

表 6. 黄色ブドウ球菌陽性検体における直接平板培養法と MPN 値との関係

検体* ¹	MPN/g	検体数	直接平板培養法と選択増菌培養法		
			共に陽性	直接法：陰性	増菌法：陽性
精肉	<9.3	16	1		15
	15~24	3			3
	46~>110	2	2		
	小計	21	3		18
ミンチ肉	<9.3	17			17
	24	1	1		
	46~>110	11	6		5
	小計	29	7		22

*¹ 表 5 の備考欄を参照。

養では前述の 2 種類の増菌培地とほぼ同等の検出率が得られたが、この GCB 培地は嫌気環境下での培養のため、滅菌流動パラフィンの添加あるいは嫌気ジャーや炭酸ガスふらん器の使用が必要であり、多数の検体を処理する場合を考えると、食塩を選択剤とした増菌培地を用いたほうが簡便と考えられた。

4. 選択増菌培養液からの MSEY 培地と BP 培地の検出比較

前述の実験で用いた鶏ミンチ肉 30 検体の 10 倍乳剤 10 ml を 7.5%食塩および 1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地 (2 倍濃度に調整したもの) 10 ml に接種し、48 時間培養後、MSEY 培地と BP 培地に塗抹し、検出率を比較した。黄色ブドウ球菌の陽性検体数は MSEY 培地と BP 培地ともに 29 検体 (96.7%) であり、同等の検出率が得られ、両培地の性能に差がないものと考えられた。

5. 直接平板培養法と MPN 法による選択増菌培養法の検出比較

精肉およびミンチ肉 96 検体について、両培養法による黄色ブドウ球菌の検出比較を行った (表 5)。本実験では選択増菌培地として 7.5%食塩および 1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地、選択分離培地として MSEY 培地を使用した。食肉全体で、黄色ブドウ球菌の検出率は直接平板培養法が 10.4% (10/96)、選択増菌培養法では 52.1% (50/96) であり、検出率は後者で有意に高かった ($p<0.001$)。次に、黄色ブドウ球菌陽性検体における直接平板培養法と MPN 値の関係をみると (表 6)、MPN 値が 9.3/g 以下を示した 33 検体では 1 検体のみが直接平板培養法で検出され、また、46~>110/g を示した 13 検体でも 8 検体が直接平板培養法で検出されたにすぎなかった。このように、選択増菌培養法は汚染菌数が非常に少ないことが予想される検体に有用な培養法であ

り、この選択増菌培養法を導入することで、検出率が増加するとともに、食品従事者、食品や食品の製造・調理環境における黄色ブドウ球菌の汚染実態がより明らかになると思われる。

要 約

市販の食肉類およびその加工品と魚介類を用いて、黄色ブドウ球菌検査法における選択分離培地および選択増菌培地の検討を行った。その結果、直接平板培養法における選択分離培地として MSEY 培地と BP 培地はほぼ同等の性能を有した。選択増菌培養法における増菌培地としては 7.5% 食塩および 1% ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地で十分対応でき、また、選択増菌培地からの黄色ブドウ球菌の分離には MSEY 培地と BP 培地いずれも十分な性能を有した。

なお、本研究の概要は第 27 回日本食品微生物学会学術総会(2006 年 9 月、大阪府立大学)で発表した。また、本研究は平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究(課題番号 H18-食品-009)」(主任研究者 宮原美知子)の分担研究として行われた。

文 献

- 1) Bennett, R. W. and Lancette, G. A.: FDA Bacteriological Analytical Manual *online*, Chapter 12, *Staphylococcus aureus* (2001).
- 2) ISO 6888-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)—Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (1999).
- 3) ISO 6888-3: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)—Part 3: Detection and MPN technique for low numbers (2003).
- 4) 蔣 長苗, 劉 佩紅, 丁 建平, 劉 旭光, 胡 東良, 品川邦汎: 中国の動物性食品における黄色ブドウ球菌汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性. 日食微誌, **18**, 43-47 (2001).
- 5) 楠 くみ子, 潮田 弘, 神 真知子, 新井輝義, 岩谷美枝, 石上 武, 山田澄夫: 東京都多摩地区における市販生食用魚介類の細菌汚染調査成績(1986-1996). 日食微誌, **15**, 161-165 (1998).
- 6) Lancette, G. A.: Current resuscitation methods for recovery of stressed *Staphylococcus aureus* cells from foods. J. Food Protect., **49**, 477-481 (1986).
- 7) 中 峰松, 清水 晃, 河野潤一, 五十君静信: 市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状. 日食微誌, **23**, 217-222 (2006).
- 8) 野村秀一, 原賀壮勇, 花木秀明, 永山在明: 市販刺身の黄色ブドウ球菌による汚染状況調査—平板培養法と増菌培養法での比較検討—. 日食微誌, **19**, 17-20 (2002).
- 9) 尾上洋一, 新戸理恵, 寺西 大, 古川一郎, 長谷川幸江, 丸山 務: 加熱および凍結損傷黄色ブドウ球菌検出のための選択分離培地の検討. 食衛誌, **43**, 239-242 (2002).
- 10) 清水 晃, 市場智子, 河野潤一, 五十君静信: 調理済み食品における黄色ブドウ球菌の汚染実態. 食衛誌, **48**, J-341-J-344 (2007).
- 11) 清水 晃, 松村浩介, 藤尾公輔, 河野潤一, 北井 智, 五十君静信: 綿棒を用いたふき取り増菌培養法による市販豚および牛スライス肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状. 日食微誌, **23**, 242-246 (2006).
- 12) 品川邦汎: 黄色ブドウ球菌. 食品衛生検査指針 微生物編. 厚生労働省監修, p. 236-248, 社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2004).
- 13) 潮田 弘: 黄色ブドウ球菌の増菌培養について—食品衛生に関わる黄色ブドウ球菌検索に増菌培養法の普及を促したい—. 食衛誌, **41**, J-335 (2000).
- 14) Wada, T., Nakayori, S., Ishibashi, W., Aoki, Y., Kawahira, Y., Sunada, A. and Murakami, K.: Rapid detection of *Staphylococcus aureus* for food hygiene using a combination of enrichment culture and gene amplification (PCR). Jpn. J. Food Microbiol., **22**, 72-76 (2005).