＝事 例＝

黄色ブドウ球菌食中毒の原因食品と推定された草大福餅の エンテロトキシン量の推定

濱田 佳子^{*1, 2, †}・奥野 純子^{*1}・井野由莉恵^{*1}・細田 豊子^{*1}

(^{*1} 川越市保健所, ^{*2} (現) 埼玉県衛生研究所)

(受付: 平成23年11月14日)

(受理: 平成24年10月23日)

Estimation of the Amount of Enterotoxins in Kusadaifukumoti Suspected to Be Food That Caused *Staphylococcus aureus* Food Poisoning

Yoshiko HAMADA^{*1, 2, †}, Junko OKUNO^{*1}, Yurie Ino^{*1} and Toyoko Hosoda^{*1}

(^{*1} Kawagoe City Health Center, Kawagoe-shi, Saitama 350-1104; [†] Corresponding author)

(^{*2} Saitama Prefectural Institute of Public Health, Sakura-ku, Saitama 338-0824)

緒 言

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)食中毒は、本菌が食品中で増殖した際に産生される耐熱性のエンテロトキシン(以下SE)を原因とする嘔吐や下痢を主症状として発症する毒素型食中毒である。

近年の代表的な*S. aureus*食中毒事件としては、2000年6月末に発生した、低脂肪乳などを原因とする有症者数13,420名の大規模な食中毒事件⁶⁾が挙げられる。原因物質は脱脂粉乳中のA型エンテロトキシン(SEA)と判明した⁹⁾が、SEA量が非常に低濃度であったために精製・濃縮なしでは検出が困難な事例であった。

2010年6月、川越市内で製造された和生菓子の草大福もち1個(約50g)を喫食し嘔吐・下痢を起こしたとする苦情があり、製造所で冷凍保存されていた同一ロット品から、SEAおよびSEC産生性の*S. aureus*が検出された。原因食品と推定された草大福餅は、苦情者が2日間室温保管後に喫食したので、*S. aureus*が保管中に増殖し、その結果生じたSEにより発症したものではないかと考えられた。そこで、原因食品と推定された草大福餅の同一ロット品を使用して6月の室温を25℃程度と推定して再現実験を実施した。また、同一ロット品中のSE量の測定も行ったので報告する。

材料および方法

(1) 材料

製造所で冷凍保存されていた苦情品の同一ロット品3個を解凍後、それぞれ無菌的に2分割し、直ちに検査するものを検体1とした。ほかの半量はストマフィルターに入れ、恒温器内で25℃、48時間培養したものを検体2とした。

(2) *S. aureus*の菌数測定および分離株のSE遺伝子、SE産生能の確認方法

検体1および2をそれぞれ細切して均一にした10gずつを採取後、生理食塩水90mlを加えてストマッキングして10倍乳剤を作製した。卵黄加マンニット食塩寒天培地(日水製薬)に100μlを直接塗布、37℃で48時間培養し、卵黄反応陽性集落を*S. aureus*として菌数を測定した。これらの集落は分離培養後、F-スタフィロ(デンカ生研)でスライドラテックス凝集反応が陽性であることを確認した。

検体1および2から分離された*S. aureus* 20株についてSE遺伝子検査を以下のように行った。各分離株を普通寒天培地(栄研化学)で37℃、18時間培養し、その適量を滅菌蒸留水100μlに懸濁後、100℃で10分間加熱後急冷した。これを15,000 rpmで3分間遠心し、上清をPCRに供した。

プライマーは Set SEA-1,2およびSet SEZ-1,2 (TaKaRa)を使用し、熱変性94℃、1分間; アニーリング55℃、1分間; 伸長72℃、1分間; 35サイクルの条件で行った。

分離菌株のSE型別は、各菌株をBHI培地(DIFCO)

[†] 連絡先

^{*1} ☎350-1104 埼玉県川越市小ヶ谷817-1

^{*2} ☎338-0824 さいたま市桜区上大久保639-1

に接種し、37℃で18時間振とう培養後、3,000 rpmで20分間遠心した上清中のSEをSET-RPLA（以下RPLA、デンカ生研）を用い、マニュアルに従い実施した。

(3) SE量の定量

検体1および検体2からSEを抽出し、以下の方法で定量した。

①検量線の作成

市販の缶詰の餡^{あん}にSEA、SECを添加した模擬試料を用いて検量線を作成した。模擬試料10 gに生理食塩水90 mlを加えた10倍乳剤にSEA (Toxin Technology SEA101)、SEC₁ (Toxin Technology SEC101)を各0～1.0 ng/mlの濃度となるよう添加し、混和した後3,000 rpmで15分間遠心分離し、その上清をVIDAS Staph Enterotoxin II（以下SET2、BioMérieux）（検出限界0.25 ng/ml）を用いてmini VIDAS（BioMérieux）で測定し検量線を作成した。

②SEAおよびSEC₁の精製・濃縮による回収率の検討

食品中の低濃度のSEを測定するため、大阪府立公衆衛生研究所で使用された精製・濃縮方法¹⁾（以下公衛研法）を参考に次のようなSEの濃縮・精製法を実施し、SEAおよびSEC₁それぞれの回収率を測定した。

模擬試料10倍乳剤20 mlに、SEA、SEC₁を0.5 ng/mlの濃度となるよう添加、混和した後3,000 rpmで15分遠心分離した、その上清中のSE量をmini VIDASを用いて定量し、これを以下の濃縮操作での回収率を求める式中の分母にあたる「試料上清中のSE量」とした。

一方、試料上清の一部を用いて次のような濃縮操作を行った。まず、0.01 Mのリン酸緩衝液pH 6.0で平衡化したPD-10カラム（GE Healthcare Bio-Sciences）2本を用いて7.5 mlずつの試料上清を処理（計15 ml）し、低分子の塩類を除去した。この液に0.01 Mのリン酸緩衝液pH 6.0で膨潤させた1.0 mlのSPセファデックスC-50（GE Healthcare Bio-Sciences）をバッチ法で30分間攪拌し、SEを吸着させた。SPセファデックスC-50全量をPD-10のエンブティカラム（内径1.7 cm、長さ7.6 cm）に詰めたのち、600 μ lの0.2 M食塩加0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.5をカラム上部に添加して、10分間室温で溶出させた後、圧をかけて溶出液を採取した（濃縮溶出液）。その液量を測定したのちSEA、SEC₁をmini VIDASで定量した。

回収率は{濃縮溶出液中のSE濃度(ng/ml)×溶出液量(ml)/試料上清15 ml中のSE量(ng)}×100の式に従って求めた。

③検体1および2のSE量測定

検体1および2の10倍乳剤の上清をmini VIDASで定量、RPLAで型別した。また、検体1および2の試料上清15 mlを②の方法で精製・濃縮し、濃縮溶出液をmini VIDASで定量、RPLAで型別した。

結 果

(1) *S. aureus*の菌数測定および分離株のSE遺伝子、SE産生能

検体1の*S. aureus*菌数は 1.6×10^3 cfu/gで、検体2の菌数は 2.2×10^8 cfu/gであった。なお、同一ロット品を解凍直後に、可能なかぎり餡と餅を分離してそれぞれの*S. aureus*菌量を測定したところ、餡の部分のみから 5.2×10^3 cfu/gの*S. aureus*が検出され、餅の部分からは検出されなかった（ 10^2 cfu/g以下）ため、SEの検量線作成には餡を模擬材料として使用した。

検体1から分離した*S. aureus* 20菌株はすべてSEA、SEC遺伝子両方を有していた。検体2から分離した*S. aureus* 20菌株についても同様であった。

これら*S. aureus* 40菌株の振とう培養液中のSEAはRPLAですべて100倍希釈液まで陽性、SECは1,000倍希釈液まで陽性となり、菌株による差は見られなかった。

(2) SE量の定量

①検量線の作成

模擬試料にSEA、SEC₁を添加して作成した検量線をFig. 1に示した。SEAの回帰直線式は $y = 2.2222x + 0.1211$ 、SEC₁は $y = 1.5807x + 0.0724$ となり、回帰直線の傾きに違いが認められた。

②精製・濃縮による型別回収率の比較

模擬試料の試料上清中のSE濃度をmini VIDASで測定した。TV値はSEAが1.46、SEC₁が0.97であり、検量線から算出した濃度はSEAが0.60 ng/ml、SEC₁が0.57 ng/mlであった。したがって、試料上清15 ml中のSE量はSEAが9.00 ng、SEC₁が8.55 ngとなった。

濃縮溶出液をそのままmini VIDASで測定したところ、TV値が検量線の直線性が失われた領域であったため、SET2添付の希釈液でSEAは25倍に希釈、SEC₁は10倍に希釈して測定するとSEAが0.80、SEC₁が0.59となった。検量線から算出した濃度はSEAが0.31 ng/ml、SEC₁が0.33 ng/mlとなり、それぞれ希釈倍数を掛けた値のSEA 7.64 ng/ml、SEC₁ 3.27 ng/mlを最終的な濃度とした。

溶出液量はSEAが0.89 ml、SEC₁が0.9 mlであったため、SEAの回収率は75.6%、SEC₁は34.5%となった（Table 1）。

③検体1および2のSE量測定

検体1の試料上清および濃縮溶出液中のSEは、mini VIDASで不検出（TV値0.13未満）であり、RPLAの結果は陰性であった。

検体2の試料上清中のSEはmini VIDASのTV値は2.02であったが、RPLAではSEA 擬陽性、SEC陰性であったため精製・濃縮を行った。濃縮溶出液はmini VIDASで25倍希釈液のTV値が1.27であり、RPLAではSEAが8倍希釈液まで陽性、SECは陰性となった。そこ

Fig. 1. Standard curves of SEA and SEC with MINI VIDAS.

Table 1. Comparison of recovery rate of SEs

Test solution	Spiked SE	TV Value (VIDAS)	Calculated SE concentration (ng/ml)	Dilution factor	Final concentration (ng/ml) ^{a)}	Volume (ml)	Amounts of SE (ng)	Recovery rate (%) ^{b)}
Sample supernatant	SEA	1.46	0.60			15.0	9.00	
	SEC ₁	0.97	0.57			15.0	8.52	
Concentrated eluate	SEA	0.80 ^{c)}	0.31	25	7.65	0.89	6.81	75.7
	SEC ₁	0.59 ^{d)}	0.33	10	3.27	0.90	.94	34.5

^{a)} Calculation by calculating formula in Fig. 1.^{b)} [Final concentration (ng/ml) × volume (ml) / Amount of SE of sample supernatant (ng)] × 100.^{c)} TV value of 25 fold dilution.^{d)} TV value of 10 fold dilution.

Table 2. Estimation of amounts of SEs in sample No. 1 and 2

Sample No.	Test solution	Enterotoxin types by RPLA	TV Value (VIDAS)	Calculated SE concentration (ng/ml) ^{a)}
1 ^{b)}	Sample supernatant	A(−) C(−)	0.00	−
	Concentrated eluate	A(−) C(−)	0.04	−
2 ^{c)}	Sample supernatant	A(±) C(−)	2.02	0.85
	Concentrated eluate	A(+)(×8) C(−)	1.27 ^{d)}	0.52

^{a)} Calculation by calculating formula of SEA in Fig. 1.^{b)} Non-incubated sample of the suspected Kusadaifukumoti^{c)} Incubated sample at 25°C for 48 hr of above.^{d)} TV value of 25 fold dilution.

で試料上清中のSEは、全量をSEAと推定してFig. 1のSEA検量線から計算したところ0.85 ng/mlとなった(Table 2)。したがって、検体2の1 g当たりのSEA量は8.5 ng/gと推定された。

考 察

苦情の原因食品と推定された草大福餅は、出荷（解凍）日から室温保存で3日間の消費期限が設定されていた。しかし、冷凍保存されていた同一ロット品からは 10^3 cfu/gの*S. aureus*が検出され、25°C 48時間保存後には 10^8 cfu/gまで増加した。したがって、この製品に含まれていた*S. aureus*が、消費期限内に喫食者に食中毒を発症させる十分な菌量に到達したものと推定された。室温で流通・保存する和生菓子によるブドウ球菌食中毒は、静岡県での大福餅の餅による食中毒³⁾や、山形県でのひな餅の食中毒⁵⁾などたびたび報告されている。今回の事例は、山形県の事例と同様、消費期限内の食品で発生した。

食品中のSEの精製・濃縮方法として使用した公衛研法では、pH 7.5の0.2 M食塩加0.1 Mリン酸緩衝液を溶出液にしている。SEAの等電点は7.3であるが、SEC₁の等電点は8.6⁴⁾と高いため、回収されにくいと考えられた。しかし模擬試料ではある程度の回収が可能であったため、pHを変更せず検体の精製・濃縮に使用した。

苦情品と同一ロットの草大福餅を25℃ 48時間保存した試料（検体2）の10倍乳剤はmini VIDASでSE検出、RPLAでSEA擬陽性、SEC陰性であった。検量線からSE量を計算するためには型別の確認を必要とした。濃縮溶出液でRPLAを行ったところ、SEA陽性、SEC陰性であることが確認できた。このことから、全量をSEAとして計算し、10倍乳剤中で0.85 ng/ml、すなわち1 gあたりに含まれるSEA量は8.5 ngと推定された。

黄色ブドウ球菌食中毒では、ヒトが発症する *S. aureus* 菌量は、原因食品中に $10^6 \sim 10^9$ cfu/g（最小でも 10^5 cfu/g）、SE量は $0.01 \sim 1.2 \mu\text{g/g}$ （最小毒素量は100 ng/成人）が必要といわれている⁷⁾。1985年のアメリカ合衆国のチョコレートミルクを原因とする事例の発症毒素量ではSEAで200 ng以下²⁾、大阪府の事例では発症毒素量は20～100 ng¹⁾と、ごく少量のSE量での発症が報告されている。今回の事例では、草大福餅1 g当たりでSE量が8.5 ngであったので、苦情者が1個（約50 g）を喫食したとのことから、SEの摂取量は425 ngとなり、症状を引き起こしうる十分な量であると考えられた。

検体1および2から分離された *S. aureus* はSEA、SEC両遺伝子を持っていたが、検体2の10倍乳剤の精製・濃縮後もSECが検出されなかった。その理由としては、SEAが *S. aureus* の対数増殖期中にも産生されるのとは比べSECは定常期に入ってから産生される⁸⁾ ことから、産生されたSECがSEAに比べ極めて少量であったためと思われる。また、SECは精製・濃縮過程で回収率が低かったことから、溶出液のpHを高くすることで回収率を上げることができれば検出された可能性も考えられた。

黄色ブドウ球菌食中毒の検査では、食品中のSEを検出するのが最も確実な方法である。今回、苦情品と同一ロットの冷凍保管品について再現実験を行い、発症SE

量を推定することができた。しかし、同時に、食品中の微量のSE検出には精製・濃縮法が不可欠であることに加えて、その精製・濃縮法の回収率がSE型によって異なるという問題点も明らかとなった。

文 献

- 1) 浅尾 努, 河合高生, 久米田裕子, 依田知子, 川津健太郎, 神吉政史, 柴田忠良, 浜田勝幸, 織田 肇: 特集ブドウ球菌食中毒, 関西地方で発生した低脂肪乳等による大規模食中毒事件, 大阪府のブドウ球菌エンテロトキシン検査. 病原微生物情報, **22**, 190-191(2001).
- 2) Evanson M. L., Hinds M. W., Bernstein R. S., Bergdoll M. S.: Estimation of human dose of Staphylococcal Enterotoxin A from a large Outbreak of Staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. Food Microbiol., **7**, 311-316 (1988).
- 3) 北條罔生, 清水浩司郎, 山本 桂, 永井幹美, 柴田陽一, 岩本修一: 「みつだんご」「あんだんご」「大福」による黄色ブドウ球菌食中毒事件—静岡県. 病原微生物情報, **22**, 192-193 (2001).
- 4) 五十嵐英夫: ブドウ球菌エンテロトキシン研究の変遷. 日食微誌, **20**, 51-62, (2003).
- 5) 石澤秀悦: ひなもちによる黄色ブドウ球菌食中毒. 食衛誌, **49**, 200-201 (2008).
- 6) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課: 平成12年食中毒発生状況. 食品衛生研究, **51**, 109-195 (2001).
- 7) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針 微生物編, p. 236-248. 社団法人 日本食品衛生協会, 東京(2004).
- 8) 櫻井 純, 本田武司, 小熊恵二: 細菌毒素ハンドブック p. 248. サイエンスフォーラム(2005).
- 9) 雪印食中毒事件に係る厚生省・大阪市原因究明合同専門家会議: 雪印乳業食中毒事件の原因究明調査結果について（最終報告）—低脂肪乳等による黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA型食中毒の原因について—. 食品衛生研究, **51**, 17-91 (2001).