ホタルルシフェラーゼ発光法を利用した 黄色ブドウ球菌迅速検出キットの評価

中西陽子^{*1}・桜井直美^{*1}・熊田 薫^{*2}・小池和子^{*1}

(^{*1}茨城県立医療大学医科学センター, ^{*2}つくば国際短期大学)

(受付 平成 11 年 5 月 19 日)

(受理 平成 11 年 9 月 22 日)

An Evaluation of a Kit Applied Bioluminescence Method for the Detection of *Staphylococcus aureus*

Yoko NAKANISHI^{*1}, Naomi SAKURAI^{*1}, Kaoru KUMADA^{*2}
and Kazuko A. KOIKE^{*1}

(^{*1}Ibaraki Prefectural University Center for Medical Sciences,
4669-2 Ami, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0394)

(^{*2}Tsukuba International Junior College, 6-7-10 Manabe,
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0051)

A kit to detect *Staphylococcus aureus*, which often causes food poisoning and some other diseases, has been developed and commercially available. In the present study, the *S. aureus* rapid detection kit named "Check Lite BH" (Kikkoman Corporation) was evaluated and compared with the conventional method. This kit was designed based on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which the bioluminescence method is applied. If protein A of *S. aureus* is detected, it can be judged that the existence of *S. aureus* was verified. This method began to be sold as a kit product, so we evaluated the application of this kit in a food microbiological test.

(1) One hundred forty strains were examined. Ninety-five strains, which were identified to be *S. aureus* by traditional biochemical tests, were positive for bioluminescence activity by the kit. Thirty-five strains of *Staphylococcus* spp. except for *S. aureus* and 10 strains belonging to other genera of bacteria, which were identified by traditional tests, were all negative by this method, and cross reactions were not observed.

(2) By "direct method" (not enrichment), about 10^4 cfu/ml of *S. aureus* FRI196E were detectable from cross-contamination samples with other bacteria in about 2 hours. Marked influences due to the contamination of other bacteria were not observed. Moreover there was a significant correlation between relative light units (RLU) and colony forming units (CFU) in the range of 10^4 to 10^6 cfu/ml of *S. aureus*.

(3) By the "enrichment method" (culture for 7 hours), 10^1 cfu/ml of *S. aureus* FRI196E that was not detected on Egg-Yolk Mannitol Salt agar plate was detectable from the samples highly contaminated with 10^5 cfu/ml of other mixed bacteria within a total of 9 hours.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Bioluminescence, Protein A, Rapid detection kit

緒 言

腸管出血性大腸菌食中毒の多発や、流通の国際化、食

品業界への HACCP 方式導入などに伴い、食品衛生微生物検査においては、より簡便かつ迅速で特異性が高く、検出感度の優れた試験法の開発が求められている。迅速で高感度に微生物を検出する、あるいは菌数の推定を可能とする方法の一つとして、バイオルミネッセンス法の

^{*1} ☎300-0394 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4669-2

^{*2} ☎300-0051 土浦市真鍋 6-7-10

Fig. 1. The principle of the assay.

開発が進められている^{1-5, 8, 9, 11)}。バイオルミネッセンス法は、ホタルルシフェラーゼが、ルシフェリンを基質として、アデノシン三リン酸 (ATP) および酸素の存在下で光子を発生する反応を利用したものである。したがって、発光試薬としてルシフェリンルシフェラーゼを添加することにより、有酸素下で微生物中の ATP 量を、発光量として測定することができる。

この原理を応用し、食中毒起因菌となり得る黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* 以下 *S. aureus* と略す) を迅速かつ高感度に検出する目的で、*S. aureus* の約 90% が産生するプロテイン A を検出指標とした ELISA 法が開発された。この方法では、ビオチン標識抗プロテイン A 抗体を用い、検出酵素にビオチン化ルシフェラーゼとストレプトアビジンを 1:1 で結合させた複合体を反応させる。さらに発光試薬としてルシフェリン、ATP 混合溶解液を添加することで、検体中に含まれるプロテイン A、すなわち *S. aureus* の有無を、発光量測定値より判定するものである (Fig. 1)。今回、このバイオルミネッセンス法を利用したプロテイン A の検出法が、*S. aureus* 検出用キット、ルシフェール BH (英名 Check Lite BH・キッコマン(株)) として市販化されたため、本キットの食品衛生微生物検査における有用性を検討する目的で、ブドウ球菌食中毒由来株、methicillin 耐性株 (MRSA)、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS)、並びに他菌属の細菌を用いて、従来法との比較も含めて評価を行った。さらに、清浄度の検査、モニタリングを行おうとする食品衛生環境や食品などは、通常、「多種の微生物が混在している」⁶⁾ ことが予想されるため、他菌属の細菌が多量に混在する混合汚染検体からの *S. aureus* 検出試験を行い、検出の可否および検出限界について検討を行った。

材料および方法

1. 供試菌株

試験に使用した *S. aureus* は、209P, FRI196E, FRIS-6, FRI100, FRI184, FRI243, FRI361, FRI472 および食中毒事例由来株 85 株、茨城県立医療大学付属病院環境より分離された MRSA 2 株の計 95 株であった。その他

の供試菌株は、食品より分離されたコアグララーゼ陰性 *Staphylococci* (CNS) 11 菌種 35 株 (Table 1) と、*Staphylococci* 以外の細菌 10 菌種 10 株 (Table 2) であり、合計 22 菌種 140 株であった。

2. 従来法によるブドウ球菌検査

従来法として、卵黄添加マノンニット食塩 (MSEY) 培地 (日水製薬(株)) での培養^{7, 12)}、ウサギプラズマ (栄研化学(株)) を用いた遊離コアグララーゼ試験¹⁾、DNA 培地 (栄研化学(株)) による DNase 試験¹²⁾ を各々常法に従い行った。

3. キット操作手順

ルシフェール BH に添付記載されている操作手順は以下のとおりである。

- 1) 検体 100 μ l を 2 ml の増菌用培地*に接種し 37°C, 5 時間静置培養する。
- 2) 培養液または検体希釈液を 100°C, 15 分間加熱殺菌処理後、室温まで放冷する。
- 3) 固相を固定化したウェル*に、陰性対照*, 陽性対照*, 殺菌済みの検体を各 100 μ l 分注後、ビオチン標識抗プロテイン A 抗体*を 50 μ l 添加し室温で 60 分間反応させる。
- 4) 洗浄液*でウェルを 4 回洗浄する。
- 5) ビオチン化ルシフェラーゼとストレプトアビジン 1:1 の複合体*を 100 μ l 添加し、室温で 15 分間反応させる。
- 6) 洗浄液*でウェルを 4 回洗浄する。
- 7) 各ウェルを切り離し、専用チューブにセットする。このウェルに発光基質*を添加し、発光検出器ルミテスター K-210 (キッコマン(株)) を用いて、発光量を Relative Light Units (RLU) として測定する。
- 8) 陰性対照の 1.5 倍以上の発光量が検出された場合を *S. aureus* 陽性と判定する。

本キットでは、5 時間の増菌培養時間が設定されているが、培養せずに ELISA により直接測定を行う場合を「直接法」(手順 2~8) とした。なお、「直接法」での操作時間は約 2 時間であった。また、手順中、*を印した試薬等はキットに付属のものを使用した。

4. 本キットでの *S. aureus* の判定と交差反応性について

供試菌株計 22 菌種 140 株を、普通寒天培地 (日水製薬(株)) で 37°C, 24 時間培養後、各コロニーをキット付属の増菌用培地に接種し、本キット手順に従い測定を行った。*Staphylococci* 以外の細菌 10 株 (Table 2) については、本キットで指定されている 5 時間増菌培養に加えて、24 時間増菌培養後の検体についても、キットによる測定を行った。増菌後の各検体については、標準寒天

培地（日水製薬(株)）を用いて、常法により菌数を測定した。

5. *S. aureus* の菌数と発光量の関係

S. aureus FRI196E, 同 FRI361, 同 FRI472（いずれもエンテロトキシン産生株）の3株を、各々普通ブイヨン（日水製薬(株)）で37℃、一夜振とう培養後、滅菌生理食塩水で10倍段階希釈を行った。この各希釈菌液を検体とし、本キットを用いて「直接法」で測定を行った。菌数算定は、標準寒天培地を用い常法により行った。

6. 検体中に混在する他種の細菌が及ぼす影響について

S. aureus FRI196E を普通寒天培地で37℃、24時間培養したコロニーを、滅菌生理食塩水にOD₅₅₀=1.5になるよう懸濁した。これについて10倍段階希釈を行い、10²~10⁷ cfu/ml の *S. aureus* FRI196E 希釈菌液を調製した。検体中に混在させる他の細菌は、Table 2 の10菌種の細菌を用いた。各々の普通寒天培地37℃、24時間培養コロニーを滅菌生理食塩水でOD₅₅₀=1.5となるよう懸濁後、10⁰, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁸ cfu/ml の各細菌希釈菌液を調製し、各濃度ごとに10菌種混合菌液（9 ml）を調製した。このそれぞれに、*S. aureus* FRI196E が10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ cfu/ml の6通りずつ含まれるよ

う *S. aureus* FRI196E 希釈菌液を添加して検体とした。混合前の各添加菌数は標準寒天培地にて確認を行った。本キットの「直接法」で常に陽性と判定された *S. aureus* FRI196E を10⁴ cfu/ml 以上含む検体については「直接法」で測定を行った。*S. aureus* FRI196E が10⁴ cfu/ml 未満の検体については、キット手順で指定されている5時間増菌培養のほか、さらに2時間延長した7時間増菌培養後の両方で測定を行った。増菌培養後の各検体は、マニット食塩培地にて *S. aureus* の菌数を測定した。

結 果

1. 本キットによる *S. aureus* 判定結果と従来法との比較

本キットにより供試菌株の判定を行った結果は、Table 1 に示したとおり *S. aureus* 計95株すべてが *S. aureus* 陽性と判定されたが、CNS 計35株はすべて陰性と判定された。従来法による試験結果では、*S. aureus* 95株中2株（2.1%）がMSEY寒天上で卵黄反応陰性を示した以外は、コアグララーゼ試験、DNase試験結果ともすべて陽性で *S. aureus* の性状に一致した。また、CNS 35株ではいずれの試験結果もすべて陰性であり、*S. aureus* に該当しなかった。これらのことから、本キットでの *S. aureus* の判定結果は従来法での結果と一致することが確認された。

Table 1. Number of the positive strains judged by current and traditional methods to detect and identify *S. aureus* and related strains

Bacteria	Number of strain	Method			
		Check Lite BH	Egg yolk reaction on MSEY agar	Coagulase test	DNase test
<i>S. aureus</i> 209P	1	1	1	1	1
FRI196E	1	1	1	1	1
FRIS-6	1	1	1	1	1
FRI100	1	1	1	1	1
FRI184	1	1	1	1	1
FRI243	1	1	1	1	1
FRI361	1	1	1	1	1
FRI472	1	1	1	1	1
<i>S. aureus</i> from food poisonings	85	85	83	85	85
<i>S. aureus</i> (methicillin resistant strains)	2	2	2	2	2
Total	95	95	93	95	95
Coagulase negative <i>Staphylococcus</i> spp.					
<i>S. auricularis</i>	10	0	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	7	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	4	0	0	0	0
<i>S. simulans</i>	3	0	0	0	0
<i>S. caprae</i>	3	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	2	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	1	0	0	0	0
<i>S. hominis</i>	1	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	0	0	0
<i>S. saccharolyticus</i>	1	0	0	0	0
<i>S. warneri</i>	1	0	0	0	0
<i>S. sciuri</i>	1	0	0	0	0
Total	35	0	0	0	0

また、供試の *Staphylococci* 以外の細菌 10 株については、本キットの指定培養時間である 5 時間培養後の検体においても、また 24 時間培養後の $6.4 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{11}$ cfu/ml と顕著に菌数が増加した検体においても、発光量はいずれもカットオフ値を下回り、陽性反応は認められなかった (Table 2).

2. *S. aureus* の菌数と発光量の関係

供試の *S. aureus* 3 株について、本キットを用いて「直接法」で測定を行った結果は、株により若干の発光量の差異が認められたが、 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml 以上のとき、発光量がいずれもカットオフ値以上となり、3 株とも陽性と判定された。また、 10^4 cfu/ml から 10^6 cfu/ml の間では *S. aureus* 菌数と発光量に相関がみられた。しかし、 10^6 cfu/ml 以上の菌数では、菌数が増加しても発光量は増加せず、 10^{10} cfu/ml 以上では逆に発光量の低下が観察された (Fig. 2).

3. 検体中に混在する他種の細菌が測定に及ぼす影響について

清浄度のモニタリングを行おうとする環境あるいは食品は、通常、多様な細菌に汚染されていると考えられる。そこで、*S. aureus* 以外の菌種の細菌が混在する検体を調製して測定を行い、本キットの検出感度と特異性について検討を行った。

$10^4 \sim 10^6$ cfu/ml の *S. aureus* FRI196E を含む各検体を本キットの「直接法」で測定したところ、検体中に供試の混合菌数が 10^8 cfu/ml 混在した場合も比較的安定した測定値が得られ、いずれの検体も *S. aureus* 陽性と判定された。また、*S. aureus* FRI196E 単独の場合 (Fig. 2) と同様に *S. aureus* FRI196E 菌数と発光量に相関が見られた (Table 3).

次に、さらに少量の *S. aureus* の検出を試みるべく、 10^4 cfu/ml 未満の *S. aureus* FRI196E を含む検体について増菌培養を行い、本キットで測定を行った結果と培

Table 2. The judgement about other genera of bacteria from bioluminescence values using by the kit after 5 hrs enrichment and 24 hrs enrichment

Bacteria	Number of strain	After 5 hrs enrichment		After 24 hrs enrichment	
		RLU (judgement)	cfu/ml	RLU (judgement)	cfu/ml
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	136 (-)	7.2×10^7	188 (-)	6.4×10^9
<i>Bacillus cereus</i>	1	123 (-)	1.7×10^8	173 (-)	2.8×10^{10}
<i>Bacillus subtilis</i>	1	180 (-)	1.7×10^8	166 (-)	3.5×10^{10}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	83 (-)	1.1×10^8	96 (-)	2.5×10^{10}
<i>Escherichia coli</i>	1	200 (-)	3.7×10^8	96 (-)	4.0×10^{10}
<i>Morganella morganii</i>	1	78 (-)	2.4×10^8	97 (-)	1.6×10^{10}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	87 (-)	1.8×10^8	103 (-)	1.0×10^{11}
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	117 (-)	1.5×10^8	93 (-)	3.0×10^{10}
<i>Serratia marcescens</i>	1	82 (-)	1.4×10^8	111 (-)	2.7×10^{10}
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	121 (-)	4.8×10^8	98 (-)	1.0×10^{11}

RLU: Relative light units (-): Negative of *S. aureus*
The cut off bioluminescence value was 285RLU.

Fig. 2. Relationship between bioluminescence value and total colony count

Average bioluminescence values of each *S. aureus* FRI196E (●), FRI361 (■), FRI472 (△) were shown. The straight dotted line showed the cut-off bioluminescence value that was $1.5 \times$ the bioluminescence value of the negative control. Upper were positive of *S. aureus* and lower were negative of *S. aureus*.

養後の *S. aureus* FRI196E 菌数測定値を Table 4 に示した。本キット指定の 5 時間培養を行った結果では、*S. aureus* FRI196E の増殖が混合菌の多寡によって大きく影響され、発光量からの判定結果が安定しなかったので、培養時間を 7 時間に延長して検討を行った。その結果、検体中の「混合菌数: *S. aureus* FRI196E 菌数」が

「 10^5 cfu/ml 以下: 10^1 cfu/ml 以上」であれば、*S. aureus* 陽性と判定可能であった。一方、増菌検体を従来のマンニット食塩培地で培養した結果は、検体中の「混合菌数: *S. aureus* FRI196E 菌数」が「 10^0 cfu/ml 以下: 10^1 cfu/ml 以上」, または「 10^4 cfu/ml 以下: 10^2 cfu/ml 以上」のときに、*S. aureus* コロニーが検出された。このことより、混合菌が多量に混在する場合は本キットが比較的高感度であることが示された。

考 察

代表的な食中毒起因菌の一つである *S. aureus* を、より迅速で簡便に検出するため、特異蛋白であるプロテイン A の検出を指標とした測定法が報告されている¹⁰⁾。長原ら¹⁰⁾は、ペルオキシダーゼ標識抗プロテイン A 鶏卵抗体を用いた ELISA で吸光度測定による検出を行ない、3~6 時間の測定で $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml の *S. aureus* を検出することが可能であると報告した。さらに迅速性と感度の向上をはかるべく、ビオチン標識抗プロテイン A 抗体、およびビオチン化ルシフェラーゼを用いて、バイオルミネッセンス法を利用した ELISA による検出法が開発された。このバイオルミネッセンス法では発光反応が瞬時に生じることから、本キットでは最短 5 時間の増菌培養と約 2 時間の測定時間を併せて合計約 7 時間で $10^1 \sim 10^2$ cfu/ml の *S. aureus* が検出可能であるとされている。

今回、本キットを用いて従来法との比較を含めて評価を行った結果は、本キットでは従来法で不可欠とされている平板培地での菌の分離が不要で、検体を直接測定で

Table 3. Detection of *S. aureus* FRI196E using the kit from cross-contamination samples by "direct method"

Sample (100 μ l)		RLU (mean $\pm$ SD)		Judgement of <i>S. aureus</i>
Number of <i>S. aureus</i> FRI196E (cfu/ml)	Total number of other bacteria* (cfu/ml)			
10^4	10^0	229 $\pm$ 13.5	13.5	+
	10^4	265 $\pm$ 56.6	56.6	+
	10^6	222 $\pm$ 20.5	20.5	+
	10^8	244 $\pm$ 32.0	32.0	+
10^5	10^0	350 $\pm$ 50.6	50.6	+
	10^4	485 $\pm$ 77.3	77.3	+
	10^6	607 $\pm$ 167.4	167.4	+
	10^8	891 $\pm$ 250.6	250.6	+
10^6	10^0	7323 $\pm$ 1958.0		+
	10^4	8040 $\pm$ 2045.8		+
	10^6	7368 $\pm$ 2858.0		+
	10^8	7169 $\pm$ 1074.9		+

*: Ten other bacteria (Table 2) were mixed.

RLU: Relative light units.

The cut-off bioluminescence value was 136RLU.

+: Positive

Table 4. Detection of *S. aureus* FRI196E using the kit from cross-contamination samples after 5 hrs enrichment and 7hrs enrichment

Sample (100 μ l)		After 5 hrs enrichment		After 7 hrs enrichment	
Number of <i>S. aureus</i> FRI196E (cfu/ml)	Total number of other bacteria* (cfu/ml)	RLU (mean $\pm$ SD)	Number of <i>S. aureus</i> (cfu/ml)	RLU (mean $\pm$ SD)	Number of <i>S. aureus</i> (cfu/ml)
10^3	10^0	309 $\pm$ 86.6	6.8×10^3	892 $\pm$ 56.1	1.4×10^4
	10^4	326 $\pm$ 96.0	3.7×10^3	694 $\pm$ 68.1	1.0×10^4
	10^5	268 $\pm$ 113.5	2.0×10^3	414 $\pm$ 39.1	4.2×10^3
	10^6	172 $\pm$ 111.5 (—)	ND	277 $\pm$ 8.5	2.1×10^3
10^2	10^0	231 $\pm$ 32.0	1.6×10^2	352 $\pm$ 9.6	2.3×10^3
	10^4	228 $\pm$ 64.8	ND	269 $\pm$ 9.6	1.2×10^3
	10^5	145 $\pm$ 98.8 (—)	ND	230 $\pm$ 20.2	ND
	10^6	153 $\pm$ 66.2 (—)	ND	209 $\pm$ 1.6 (—)	ND
	10^8	160 $\pm$ 81.7 (—)	ND	236 $\pm$ 12.1	ND
10^1	10^0	228 $\pm$ 51.6	ND	262 $\pm$ 17.2	2.0×10^3
	10^4	159 $\pm$ 70.9 (—)	ND	231 $\pm$ 11.1	ND
	10^5	146 $\pm$ 75.4 (—)	ND	228 $\pm$ 17.0	ND
	10^6	98 $\pm$ 50.9 (—)	ND	176 $\pm$ 6.6 (—)	ND
	10^8	121 $\pm$ 43.7 (—)	ND	225 $\pm$ 38.2 (—)	ND

*: Ten other genus bacteria (Table 2) were mixed. RLU: Relative light units ND: Not detected

The cut-off bioluminescence value was 228RLU. ND: Not detected. (—): These mean bioluminescence values were lower than the cut-off value, and these samples were judged negative of *S. aureus*. The counts of *S. aureus* were detected on Egg-Yolk Mannitol Salt agar plate.

きるため、供試菌株中3株においても若干の差異は見られたが、 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml の *S. aureus* が含有されていれば、約2時間の操作時間で発光量測定値から *S. aureus* の存在の有無が判定可能であった。また、 10^4 cfu/ml 以上の *S. aureus* FRI196E が含まれる検体では、同一検体中に、供試した *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahaemolyticus* などの細菌が多量に混在しても、測定値に顕著な影響は見られず、約2時間で *S. aureus* FRI 196E を検出することが可能であり、特異性が示された。

次に、このような多様な細菌が混在する検体から、さらに少量の *S. aureus* の検出を試みるべく、検体の増菌培養を行い本キットによる測定を行った。プロテイン A の生産量は *S. aureus* の株によって差異があるため、本キットでは検出可能な菌数を得るために、最低でも5時間の増菌培養時間が設定されている。今回、*Staphylococci* 以外の10菌種混合菌液に、*S. aureus* FRI196E を加えた検体を測定した結果では、検体中に *S. aureus* 以外の混合菌がわずかし存在しない場合は、5時間の増菌培養を行うことにより、 10^1 cfu/ml すなわち、検体試料 100 μ l 中数個の *S. aureus* FRI196E を検出することが可能であった。しかしながら、検体中の混合菌数が増加するに従い、発光量が顕著に低下して *S. aureus* 検出が困難となったため、増菌時間を延長する必要がある。増菌培養後の菌液での測定値の低下は、培地成分による ELISA の反応阻害などが考えられるとの報告¹⁰⁾もある。今回、増菌検体をマニット食塩培地で培養した結果では、検体中の混合菌数の増加に伴って、培地上の *S. aureus* のコロニー数が減少する傾向が見られ、 10^5 cfu/ml 以上の混合菌が混在する検体では、*S. aureus* のコロニーは、検出困難であった。このことより、検体中に混在する混合菌数に応じて *S. aureus* FRI196E の増殖が抑制され、測定可能な菌数に達しなかったと推察された。しかしながら、現行のキットを用いた試験では、7時間の増菌培養を行えば、測定時間の2時間を含めて合計約9時間で、*S. aureus* 以外の細菌数が 10^5 cfu/ml 混在する検体中からも、従来のマニット食塩培地では検出不可能であった 10^1 cfu/ml の *S. aureus* FRI196E を検出できた。この検出限界菌数は、プロテイン A 生産量の差異から *S. aureus* の株によって若干異なると考えられ、測定可能な菌数を得るため、さらに培養時間の延長を要する場合もあろう。また、増菌培養方法についても今後、選択性や増菌性などの培地成分、培地容量、接種量などの条件について改良の余地があると思われる。

以上より、*S. aureus* 検出用キット・ルシフェール BH は、多数の細菌に汚染されている食品や衛生環境の検体からも迅速で感度良く、特異的に供試の *S. aureus* を検

出できることが確認された。ただし、実際の食品中に存在する菌は、必ずしも生菌とは限らない。したがって、今後本キットを食品検査や環境検査へ適用する場合には、死菌検出の問題、あるいは、加熱、冷凍、乾燥などによる損傷菌についても考慮する必要があると考えられる。

要 約

S. aureus の迅速検出法として、バイオルミネッセンス法を応用した ELISA により、*S. aureus* 特有のプロテイン A を検出する方法が開発され、迅速検出キットとして市販されたので本キットの有用性について評価を行った。

- 1) 本キットにより、供試の *S. aureus* 95 株はすべて *S. aureus* 陽性、CNS 35 株はすべて陰性と判定され、従来法での結果と一致した。*Staphylococci* 以外の細菌 10 株も、菌数にかかわらず、いずれも陰性と判定された。
- 2) 供試の *S. aureus* 菌液を、本キットで測定した結果は、約2時間で $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml の *S. aureus* が検出可能であった。また、 10^4 cfu/ml から 10^6 cfu/ml の間で、*S. aureus* 菌数と発光量に相関関係があった。
- 3) 食品や環境サンプルなどを想定した混合菌検体の試験結果は、増菌を行わない「直接法」では、 10^4 cfu/ml 以上の *S. aureus* FRI196E が含まれる場合は、混在する混合菌による顕著な影響は見られず、約2時間で判定可能であり、 10^4 cfu/ml から 10^6 cfu/ml の間では *S. aureus* FRI196E 菌数と発光量に相関関係が見られた。一方、増菌培養を行った場合は、検体中の混合菌数の増加にともない *S. aureus* FRI196E の増殖が抑制される傾向が認められたが、7時間の増菌培養を行えば、測定時間と併せて合計9時間で 10^5 cfu/ml の混合菌が混在する検体から、マニット食塩培地では検出不可能な 10^1 cfu/ml の *S. aureus* FRI196E を検出することが可能であった。今後、増菌時の培地成分や培養方法などに改良を加えることで、さらに迅速性や感度の向上が期待される。

以上より本キットは、通常多数の細菌に汚染されていると考えられる食品や環境などの検体からも、迅速で感度良く *S. aureus* を検出できる可能性が示された。

本報の要旨は、第19回日本食品微生物学会学術総会(平成10年10月、神戸)において報告した。

謝 辞

本研究を行うに当たり、貴重な情報および資料を提供頂きました、キッコーマン株式会社 辰巳宏樹氏、中島基雄氏、福田 賢氏、並びに株式会社盛進 斉藤 渉氏

に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Graumlich, T. R.: Estimation of microbial populations in orange juice by bioluminescence. *J. Food Sci.*, **50**, 116-117 (1985).
- 2) Griffith, J., Blucher, A., Fleri, J. and Fielding, L.: An evaluation of luminometry as a technique in food microbiology and a comparison of six commercially available luminometers. *Food Sci. and Technol. Today*, **8**, 209-216 (1994).
- 3) Hattori, N. and Nakajima, M.: Rapid judgement of microbiological cleanliness in clean rooms by ATP-bioluminescent method. *International Confederation of Contamination Control Societies, Proceedings*, 500-505 (1996).
- 4) 金子 勉, 横山弘美, 高橋 強: ATP 測定による生乳・ヨーグルト中微生物の迅速検出法. *食衛誌*, **25**, 193-197 (1997).
- 5) Kennedy, J. E. and Oblinger, J. L.: Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. *J. Food Protect.*, **48**, 334-340 (1985).
- 6) 倉田 浩, 坂井千三: 食品衛生と微生物. 食品の衛生微生物検査, p. 1-62, 講談社, 東京 (1989).
- 7) 倉田 浩, 坂井千三: 病原細菌の検査法. 食品の衛生微生物検査, p. 242-334, 講談社, 東京 (1989).
- 8) LaRocco, K. A., Galligan, P., Little, K. J. and Spurgash, A.: A rapid bioluminescent ATP method for determining yeast contamination in a carbonated beverage. *Food Technol.*, **39**, 49-52 (1985).
- 9) Little, K. J., Pikelis, S. and Spurgash, A.: Bioluminescent ATP assay for rapid estimation of microbial numbers in fresh meat. *J. Food Protect.*, **49**, 18-22 (1986).
- 10) 長原 歩, 福田 賢, 菊地 護, 五十君静信, 五十嵐英夫: 抗プロテイン A 鶏卵抗体を用いた黄色ブドウ球菌の簡易検出法. *食衛誌*, **39**, 318-323 (1998).
- 11) 小高秀正, 福田佳子, 水落慎吾, 堀米一己: 食品の変敗に関わる微生物中の ATP 含量. *日食微誌*, **13**, 29-34 (1996).
- 12) 寺山 武, 五十嵐英夫: ブドウ球菌. 微生物検査必携細菌・真菌検査第 3 版. 厚生省監修, 133-142, 日本公衆衛生協会, 東京 (1993).