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——

野村 秀一^{*1}・原賀 壮勇^{*2}・花木 秀明^{*3}・永山 在明^{*2}

(^{*1}中村学園大学食物栄養学科, ^{*2}福岡大学医学部微生物学教室, ^{*3}順天堂大学医学部細菌学教室)

(受付 平成 13 年 9 月 21 日)

(受理 平成 14 年 5 月 28 日)

Staphylococcus aureus Contamination of Commercial Slices of Raw Fish — Comparison of Direct Plate Culture and Enrichment Culture —

Shuichi NOMURA^{*1}, Isao HARAGA^{*2}, Hideaki HANAKI^{*3} and Ariaki NAGAYAMA^{*2}

(^{*1}Department of Food and Nutrition, Nakamura Gakuen University, 5-7-1 Befu,
Jonan-ku, Fukuoka 814-0198)

(^{*2}Department of Microbiology, School of Medicine, Fukuoka University, 7-45-1 Nanakuma,
Jonan-ku, Fukuoka 814-0180)

(^{*3}Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, 2-1-1 Hongo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421)

緒 言

ブドウ球菌食中毒は黄色ブドウ球菌によって産生された毒素(エンテロトキシン)を食品とともに喫食することによって発症する毒素型食中毒であり, 激しい吐き気, 嘔吐, 下痢などを主症状とし, 発症率の高いのが特徴である。この原因菌である黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)は健康なヒト, 動物の鼻腔, 咽頭, 皮膚など, さらにこれらを取り巻く自然環境に広く分布し, 食品を汚染する機会も多く, 種々の食品から高率に検出されることが報告されている⁶⁾。本菌の各種食品における汚染状況の実態を把握することは, ブドウ球菌食中毒を防止するうえからも重要である。

生食用魚介類である刺身はその特性からヒトの手で直接処理加工されることから, 黄色ブドウ球菌の汚染を受ける機会が多いと考えられる。しかし, 黄色ブドウ球菌は生食用魚介類の検査対象細菌ではないため, 生食用魚介類の黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査した報告は少ない^{1, 7)}。また, 黄色ブドウ球菌が検査対象となっている食品における本菌の検出法は, 直接分離培養法である平板培養法のみである。しかし, 腸炎ビブリオやサルモネラなどの主要な食中毒原因菌の検出法には選択増菌培養法

が実施されている。潮田ら⁴⁾は黄色ブドウ球菌の検出法に増菌培養法を取り入れることによって, 本菌の検出率が平板培養法に比べて, 増加することを報告している。

これらのことから, 我々は市販刺身の黄色ブドウ球菌による汚染状況を把握するとともに, 検出法によって本菌の検出率に違いがあるか否かを明らかにするために, 福岡市内のスーパーマーケットと鮮魚店から購入した刺身について, 平板培養法と増菌培養法を用いて, 黄色ブドウ球菌の汚染状況について検討した。

材料および方法

1. 検査材料

1999 年 9 月から 11 月の 3 カ月の間に福岡市内および近郊のスーパーマーケット(90 店舗)と鮮魚店(90 店舗)で市販されているトレイパック詰め刺身をそれぞれ 90 パック(1 店舗につき 1 トレイパック)購入し, 1 トレイパックを 1 検体として, 計 180 検体を供試した。刺身の種類はスーパーマーケットと鮮魚店ではほぼ同種で同数になるように購入した。また, 刺身はすべて午後 1 時から 5 時の間に購入し, 冷蔵保存して持ち帰り直ちに実験に供した。

2. 試料の調製法

試料原液は刺身 25 g をストマッカー用ポリエチレンバックに無菌的に秤量採取し, 0.1% ペプトン加滅菌生理食塩水 225 ml を加えてストマッカー処理を行って調

^{*1} ☎814-0198 福岡市城南区別府 5-7-1

^{*2} ☎814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1

^{*3} ☎113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

製した。

3. 黄色ブドウ球菌の検出法

1) 平板培養法: 試料溶液の 0.1 ml を 3% 卵黄加マンニット食塩寒天平板培地 (ニッスイ) に全面塗抹し, 37℃, 48 時間, マンニットを分解し, 卵黄反応陽性の集落を黄色ブドウ球菌とした。

2) 増菌培養法: 潮田ら⁴⁾の改良増菌培地を 50 ml 用三角フラスコに 10 ml ずつ分注したものを作製し, これに試料溶液 10 ml を加え, 37℃, 24 時間培養した。これをよく攪拌し, 1 白金耳量を 3% 卵黄加マンニット食塩寒天平板培地に塗抹し, 分離培養を行い, 37℃, 48 時間培養後, マンニットを分解し, 卵黄反応陽性の集落を認めたものを黄色ブドウ球菌陽性と判定した。

4. 黄色ブドウ球菌の同定

平板培養法および増菌培養法で得られたマンニット分解, 卵黄反応陽性を示した集落を平板培地より釣菌した。この分離菌株について, アピスタフ (日本バイオメリュー) 同定キットを用いて同定した。

5. エンテロトキシンの産生性

被検菌株を BHI ブイヨン培地 (Difco) 4 ml に接種し, 37℃, 24 時間振とう培養後, 培養液を遠心し (10,000 rpm, 5 分間), その上清について, ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット, (A~D 型, デンカ生研) を用いてエンテロトキシンの検出を行った。

結 果

1. 黄色ブドウ球菌の検出率の比較

スーパーマーケットと鮮魚店から購入した刺身からの黄色ブドウ球菌の検出率を平板培養法と増菌培養法で比較検討した結果を Table 1 に示した。

平板培養法において, スーパーマーケットでは 6.7% (6/90), 鮮魚店では 50.0% (45/90) で, 本菌の全体としての検出率は 28.3% (51/180) であった。一方, 増菌培養法においては, スーパーマーケットでは 33.3% (30/90) で, さらに 24 検体が陽性となり, 鮮魚店では 90.0% (81/90) で, さらに 36 検体が陽性となった。全体としての検出率は 61.7% (111/180) で, 60 検体が追加陽性となり, 平板培養法に比べて 2.2 倍の検出率であった。また, 両培養法においても, 黄色ブドウ球菌の検出率はスーパーマーケットよりも鮮魚店で販売されていた刺身の方が高率であった。

2. 黄色ブドウ球菌の汚染菌数の比較

平板培養法における汚染黄色ブドウ球菌の菌数の比較において, スーパーマーケットでは 6 検体すべてが 1 g 当たり 10^2 個オーダーであった。鮮魚店では 1 g 当たり 10^2 個オーダーのものが 33 検体, 10^3 個オーダーのものが 12 検体であった。黄色ブドウ球菌による市販刺身の汚染菌数はスーパーマーケットよりも鮮魚店で販売されていた刺身が多かった。

3. エンテロトキシン産生性

平板培養法のみによって検出した黄色ブドウ球菌 51 株について, エンテロトキシン産生性を検討した結果を Table 2 に示した。全体として, 51 株中 25 株 (49.0%) がエンテロトキシンを産生した。スーパーマーケットでは 6 株中 6 株 (100.0%) すべてが産生し, A 型 4 株, B 型 1 株, A,C 型 1 株であった。また, 鮮魚店では 45 株中 19 株 (42.2%) が産生し, A 型 12 株, B 型 3 株, C 型 2 株, A, C 型 2 株であった。

一方, 平板培養法および増菌培養法によって検出した黄色ブドウ球菌 111 株 (増菌培養法によって追加された株; 60 株) のエンテロトキシン産生性を Table 3 に示した。全体として, 111 株中 60 株 (54.1%) がエンテロトキシンを産生した。スーパーマーケットでは 30 株中 18 株 (60.0%) が産生し, A 型 9 株, B 型 6 株, C 型 2 株, A, C 型 1 株であった。また, 鮮魚店では 81 株中 42 株 (51.9%) が産生し, A 型 24 株, B 型 11 株, C 型 3 株, A, C 型 4 株であった。増菌培養法でさらに陽性になった 60 株中 35 株 (58.3%) がエンテロトキシンを産生しており, A 型 17 株, B 型 13 株, C 型 3 株, A, C 型 2 株であった。また, エンテロトキシン型別では A 型産生株が最も多く 60 株中 38 株 (63.3%) であった。

考 察

生食用魚介類である刺身の黄色ブドウ球菌による汚染状況を 2 つの検出法, すなわち, 直接分離培養法である平板培養法と増菌培養法を用いて比較検討した。

平板培養法における黄色ブドウ球菌の検出率は, スーパーマーケットでは 6.7% (6/90), 鮮魚店では 50.0% (45/90) であった。増菌培養法においては, スーパーマーケットでは 33.3% (30/90), 鮮魚店では 90.0% (81/90) であり, 増菌培養法において, 平板培養法よりもスーパーマーケットでは 5 倍, 鮮魚店では 1.8 倍, 検

Table 1. Detection of *S. aureus* in commercial slices of raw fish

Method for isolation	Shop	Detection ratio	Total
Direct plate culture	Supermarket	6/90 (6.7%)	51/180 (28.3%)
	Fish shop	45/90 (50.0%)	
Enrichment culture	Supermarket	30/90 (33.3%)	111/180 (61.7%)
	Fish shop	81/90 (90.0%)	

Table 2. Enterotoxin types of *S. aureus* isolated from slices of raw fish by direct plate culture

Shop	No. of strains	No. of enterotoxigenic strains (%)	Enterotoxin type				
			A	B	C	D	A.C
Supermarket	6/6	100.0	4	1	0	0	1
Fish shop	19/45	42.2	12	3	2	0	2
Total	25/51	49.0	16	4	2	0	3

Table 3. Enterotoxin types of *S. aureus* isolated from slices of raw fish

Shop	No. of strains	No. of enterotoxigenic strains (%)	Enterotoxin type				
			A	B	C	D	A.C
Supermarket	18/30	60.0	9	6	2	0	1
Fish shop	42/81	51.9	24	11	3	0	4
Total	60/111	54.1	33	17	5	0	5

出率が増加した。全体としての検出率の比較では、平板培養法は28.3%，増菌培養法では61.7%であり、2.2倍の検出率の増加が認められた。さらに、平板培養法で黄色ブドウ球菌が陰性と判定された129検体から増菌培養法により60検体が黄色ブドウ球菌陽性となった。また、本菌の検出率はスーパーマーケットよりも鮮魚店で販売されていた刺身が高かった。楠ら¹⁾は市販生食用魚介類における黄色ブドウ球菌の汚染状況調査において、黄色ブドウ球菌の増菌培養法を導入することによって、平板培養法の検出率よりもその検出率が5～7倍に増加したことを報告している。これらの結果は検査検体から黄色ブドウ球菌を確実に検出するには平板培養法だけでは不十分であることを示唆している。

平板培養法による汚染黄色ブドウ球菌の菌数の比較においては、スーパーマーケットでは6検体すべてが1g当たり 10^2 個オーダーであったが、鮮魚店においては、33検体が 10^2 個オーダー、12検体が 10^3 個オーダーであった。小田³⁾は食品1g当たりの黄色ブドウ球菌数の評価において、黄色ブドウ球菌の規格基準がない食品については、未(非)加熱食品では1g当たり 10^3 個以上は不適であるとしており、鮮魚店で販売されていた刺身のうち12検体が生食用としては不適であることが明らかになった。また、市販されている刺身の黄色ブドウ球菌による汚染菌数は、スーパーマーケットよりも鮮魚店で販売されている刺身の方が多い結果であった。これらの結果は店舗様式における環境、設備、衛生管理、および従事者の衛生知識などの違いに起因するものと考えられる。

わが国でのブドウ球菌食中毒原因菌のエンテロトキシン型の大多数はA型産生菌である²⁾。そこで、分離株のエンテロトキシン産生性について検討した。平板培養法で分離された51株中25株(49.0%)がエンテロトキシンを産生した。増菌培養法によってさらに分離された60株を合計すると全体で111株中60株(54.1%)が産生株で、増菌培養法によってエンテロトキシン産生株の

検出率も増加した。また、エンテロトキシン産生株60株中38株(63.3%)がエンテロトキシンA型を産生していた。

黄色ブドウ球菌による食中毒発生にはその菌数が1g当たり 10^6 個以上必要とされていることから、市販刺身が食中毒の原因になる可能性は極めて少ないと考えられる。しかし、今回の調査において、市販刺身は黄色ブドウ球菌によって高率に汚染されており、さらにエンテロトキシンA型を産生する株が多いという結果であった。これらのことを考慮すると、刺身の保存状態によっては黄色ブドウ球菌の菌数が食中毒を発生させるに足る菌数に増加し、刺身がブドウ球菌食中毒の原因食品になりうる可能性も十分に考えられることから、刺身の冷蔵保存の徹底をはじめとする十分な衛生管理の必要性が示唆される。

楠ら¹⁾はすし種や刺身を汚染している黄色ブドウ球菌はヒト由来であり、すし種や刺身の原材料から販売までの処理過程におけるHACCP対策において、黄色ブドウ球菌をヒト汚染指標菌と位置づけコントロールすることにより、一般細菌数や大腸菌群数を抑えることが可能であり、より衛生的な食品を提供できるであろうと述べている。しかし、これらのことを実行するためには検査検体から確実に黄色ブドウ球菌を検出する必要がある。今回の我々の平板培養法と増菌培養法による市販刺身からの黄色ブドウ球菌の検出率の比較において、平板培養法で黄色ブドウ球菌が陰性と判定された129検体からさらに60検体が増菌培養法によって陽性となったことから、検査検体から黄色ブドウ球菌を確実に検出するには増菌培養法を実施する必要があると考えられる。

最近、潮田⁵⁾は食品衛生にかかわる黄色ブドウ球菌検査に増菌培養法を導入すべきであることを提言しているが、今回得られた結果から、我々もより安全な食品を提供するためには黄色ブドウ球菌が検査対象細菌であるかどうかにかかわらず、すべての食品において、本菌の検出法として増菌培養法を導入すべきであると考えられる。

現在、黄色ブドウ球菌の増菌培養用の培地組成に関する規定はなく、今回、我々は潮田ら⁴⁾の改良増菌培地を用いて検討し、高い検出率を得た。しかし、増菌培養用の培地の組成によってはさらに検出率を高めることができる可能性もあり、今後、培地組成のさらなる検討が必要であると思われる。

要 約

スーパーマーケットと鮮魚店で市販されていた刺身(180 検体)について、黄色ブドウ球菌の汚染状況を平板培養法と増菌培養法の 2 つの検出法を用いて比較検討した。

平板培養法において、黄色ブドウ球菌は 180 検体から 51 検体 (28.3%) が検出された。一方、増菌培養法では 180 検体から 111 検体 (61.7%) が検出され、平板培養法で黄色ブドウ球菌が陰性と判定された 129 検体から、さらに 60 検体において黄色ブドウ球菌が検出された。

分離された黄色ブドウ球菌 111 株中 60 株 (54.1%) がエンテロトキシンを産生しており、その中で 60 株中 38 株 (63.3%) がエンテロトキシン A 型を産生していた。また、増菌培養法でさらに検出された 60 株中 35 株 (58.3%) がエンテロトキシン産生株であり、増菌培養法によってエンテロトキシン産生株の検出も増加した。

これらの結果は市販刺身が黄色ブドウ球菌によって高率に汚染されていること、さらに、黄色ブドウ球菌を検

体から確実に検出するには平板培養法だけでは不十分であり、増菌培養法が必要であることを示唆している。

文 献

- 1) 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).
- 2) 小田隆弘: ブドウ球菌食中毒の最近の動向. 食衛誌, **39**, J-179-185 (1994).
- 3) 小田隆弘: 食品中の食中毒検査法 3, 黄色ブドウ球菌. 防菌防黴, **29**, 595-600 (2001).
- 4) 潮田 弘, 新井輝義, 神 真知子, 楠 くみ子, 石上武, 山田澄夫, 田村行弘: 各種食品からの黄色ブドウ球菌の高感度迅速検出法の開発. 東京都衛生局学会誌, **98**, 250-251 (1997).
- 5) 潮田 弘: 黄色ブドウ球菌の増菌培養について. 食衛誌, **41**, J-335 (2000).
- 6) 品川邦汎, 浅尾 努, 石橋正憲, 本 博之, 国田信治, 日佐和夫: ブドウ球菌エンテロトキシンに関する研究 (2) —各種食品におけるブドウ球菌の分布及びエンテロトキシン産生について—. 大阪府公衆衛生研究所研究報告 食品衛生編, 第 4 号, 97-101 (1973).
- 7) 安田勝彦, 川坂修亮, 藤井義文, 馬淵亜吉, 菱田祐二, 伊藤靖之: 中央卸売市場を流通するむき身のすしだね類の細菌汚染状況について. 食品衛生研究, **41**, 57-62 (1991).