調 査 資 料

黄色ブドウ球菌分離用培地の性能に関する基礎的検討^{*1}

(昭和 58 年 7 月 7 日受理)

加藤 良一^{*2}   沢浦 芳樹^{*2}

Examination on the Property of Selective Medium for Isolating *Staphylococcus aureus*

(Studies on a selective medium for isolating *Staphylococcus aureus* in stamp agar method. I)

Ryoichi KATO and Yoshiki SAWAURA

(Quality Control Laboratory, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.: 1075-2,
Hokunanmoro, Yuhki, Ibaraki, Japan)

Key words: スタンプアガー法 stamp agar method; 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*; 卵黄反応 egg yolk reaction; 亜テルル酸塩 tellurite

緒 言

Staphylococcus aureus の分離培地として、これまで多くの報告がみられるが、それぞれ一長一短があり目的に応じて使い分けられている。とくに食品及び環境の簡便な細菌学的衛生管理の方法として採用されているスタンプアガー法において、著者らは従来、スタヒロコッカス培地 No. 110 を選択使用してきたが、安定性はともかく抑制力がきわめて弱いため分離鑑別能に問題があった。

一方、鈴木ら¹⁾は *S. aureus* の簡易検出紙に関する報告の中で、Baird-Parker²⁾ による ETGP 寒天をもとに亜テルル酸塩、塩化ナトリウム及びグリシンにより選択性をもたせた処方を採用している。ただしその検出紙では当然のことながら卵黄反応はみられず、その同じ処方ではいわれる平板培地にしたときの性能に関しても不明である。

そこで、著者らは前述のスタンプアガー法の改良のために、卵黄反応による鑑別能を加味し、かつ生培地（調

製済みの培地）としての経時的な安定性と簡易検査に必要と思われる選択性について総合的に検討した。今回は新たに考案した培地を従来より知られる 4 種類の培地と比較した結果について報告する。

実験材料

1. 培 地

新たに考案したテルライト・グリシン・食塩卵寒天 (TGSE) を用いた。TGSE の組成上の特徴は食塩卵寒天に亜テルル酸カリウムとグリシンを加えて抑制効果を高めたことにある (Table 1)。比較のためにスタヒロコッカス培地 No. 110 (No. 110) ニッスイ、食塩卵寒天ニッスイ、テルライト・グリシン寒天 (TG) BBL 及び Baird-Parker²⁾ による ETGP 寒天 (ETGP) Difco を用いた。いずれの培地も用法に従って調製後、ペトリシャーレに凝固し平板とした。

2. 菌 株

S. aureus は当室保存のヒト由来 26 株、動物由来 1 株及び東京都立衛生研究所より分与を受けた動物由来の 4 株、計 31 株を供試した。*S. aureus* 以外の Staphylococci としてヒト由来の *S. epidermidis* 12 株、動物由来の *S. intermedius* と *S. hyicus* あわせて 28 株を含む 53 株、*Micrococcus* 5 株、その他として腸内細菌及び酵母

^{*1} スタンプアガー法における黄色ブドウ球菌分離用培地に関する研究 (第 1 報)

^{*2} 日水製薬 (株) 品質管理室: 茨城県結城市北南茂呂 1,075-2

Table 1. Composition of Various Media for Isolating *Staphylococcus aureus*

(g/L)	TGSE ^{a)} agar	Salt egg yolk agar	Staph. medium No. 110	Tellurite ^{b)} glycine agar	ETGP ^{c)} agar	Suzuki ^{d)} Haruta
Peptone	15.0	10.0	10.0	10.0	10.0	5.0
Soya peptone	2.0	—	—	—	—	10.0
Yeast extract	—	—	2.5	5.0	1.0	10.0
Meat extract	3.0	—	—	—	5.0	—
Heart extract	—	5.0	—	—	—	—
Casamino acid	—	—	—	—	—	5.0
Mannitol	5.0	10.0	10.0	5.0	—	10.0
Lactose	—	—	2.0	—	—	—
Sodium pyruvate	—	—	—	—	10.0	—
Sodium chloride	65.0	70.0	75.0	—	—	75.0
Lithium chloride	5.0	5.0	—	5.0	5.0	5.0
Calcium chloride	1.0	—	—	—	—	—
Dipotassium phosphate	—	—	5.0	5.0	—	—
Glycine	5.0	—	—	10.0	12.0	8.0
Potassium tellurite	0.1	—	—	0.2	0.1	0.15
Egg yolk	5%	5%	—	—	1.5%	—
Gelatin	—	—	30.0	—	—	—
Agar	15.0	15.0	15.0	16.0	20.0	—
pH	7.2	7.0	7.2	7.2	7.2	6.9

^{a)} Tellurite-glycine-salt-egg yolk agar, ^{b)} manufactured by BBL, ^{c)} egg yolk-tellurite-glycine-pyruvate agar, manufactured by Difco, ^{d)} test paper for detection of *S. aureus*

様真菌など29株を供試した。

実験方法

1. 培養方法

供試菌株はハートインヒュージョンブイヨン（真菌はブドウ糖ペプトン水）で 37°, 1 夜前培養後, Miles and Misra の方法に準じて生理食塩水で 10 倍ずつの段階希釈をし, 各希釈段階の 0.05 ml を平板培地上に接種した。これを 37° で40時間培養後に判定した。対照にはトリプトソーヤ寒天（真菌はサブロー寒天）を用い同様に接種, 培養した。

2. 発育支持力の判定方法

対照のトリプトソーヤ寒天に比べて集落数が 1 オーダー未満の差, すなわち対照と同等の発育を示したときに発育支持力ありとした。

実験結果

1. *S. aureus* に対する発育支持力の比較

コアグラゼ (+), 卵黄反応 (+) の 26 株と, コアグラゼ (+), 卵黄反応 (-) の 5 株に対する各培地の発育支持力の結果を Table 2 にまとめた。*S. aureus* は食塩卵寒天及び No. 110 では帯黄色（レモン色）の集落を形成し, TG では黒色, TGSE 及び ETGP では黒色かつ卵黄反応を伴った集落を形成した。発育は TG がもっとも悪く, 合計31株のうち12株 (39%) に対して発育支持力を示したのみであった。これは亜テルル酸塩が ETGP の 2 倍量 (0.2 g/L) 添加されていることから予想された結果であった。ついで ETGP が 25 株 (81%)

でやや不良となり, TGSE と No. 110 はほぼ十分な, 食塩卵寒天は十分な発育支持力があった。

2. *S. aureus* 以外の *Staphylococci* に対する抑制力の比較

食品衛生検査指針などで一般的に *S. aureus* と同定するためには, 卵黄反応 (+) の菌を分離しそのコアグラゼが (+) であることを確認することとされているが, *S. aureus* 以外の *Staphylococci* でも同様の成績を示す菌種がある。このような菌種には *S. intermedius* あるいは *S. hyicus* などが含まれる。これらの *Staphylococci* に対する抑制力は No. 110 と食塩卵寒天では極めて弱く, それぞれ 53 株 (100%), 52 株 (98%) が発育した。ついで ETGP の抑制力が弱く, 28 株 (53%) が発育を示した。TG と TGSE はほぼ同じで 24 株 (45%), 23 株 (43%) の発育であった。また, これらの菌種が TGSE で発育した場合でも, その集落は *S. aureus* に比べて極めて小さく, 中心部のみが黒色となった。従って集落全体が黒色となり卵黄反応 (+) の *S. aureus* の集落との鑑別は容易であった。

3. その他の菌株に対する抑制

Micrococcus などのグラム陽性球菌 7 株, *Bacillus subtilis* などのグラム陽性桿菌 3 株, *Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* などのグラム陰性桿菌 21 株及び *Candida albicans* などの酵母様真菌 3 株の合計 34 株に対する抑制力の程度は, 全般的に *Staphylococci* に対するそれよりもかなり強かった。

Table 2. Growth of Microorganisms on Various Selective Medium

	No. of strains	No. of strains showed growth				
		TGSE agar	No. 110 ^{a)}	SEY ^{b)} agar	TG ^{c)} agar	ETGP agar
<i>S. aureus</i> coag. ^{d)} (+), egg yolk ^{e)} (+)	26	26	26	26	11	20
coag. (+), egg yolk (-)	5	4	4	5	1	5
Total (%)	31	30 (97)	30 (97)	31 (100)	12 (39)	25 (81)
Other staphylococci						
<i>S. intermedius</i>	5	2	5	5	3	3
<i>S. hyicus</i>	23	9	23	22	12	16
<i>S. epidermidis</i>	12	4	12	12	2	1
Others	13	8	13	13	7	8
Total [A] (%)	53	23 (43)	53 (100)	52 (98)	24 (45)	28 (53)
<i>Micrococcus</i>	5	3	4	4	1	2
<i>Streptococcus faecalis</i>	2	0	1	0	1	1
Gram positive bacilli	3	0	1	3	0	0
Gram negative bacilli	21	0	4	5	0	3
Yeasts	3	0	2	0	2	2
Total [B] (%)	34	3 (9)	12 (35)	12 (35)	4 (12)	8 (24)
Total [A]+[B]	87	26 (30)	65 (75)	64 (74)	28 (32)	36 (41)

^{a)} Staphylococcus medium No. 110, ^{b)} salt egg yolk agar, ^{c)} tellurite glycine agar, ^{d)} coagulase, ^{e)} egg yolk reaction

ここでも Staphylococci に対すると同様に TGSE と TG の抑制力が優れており、ついで ETGP がやや弱く、No. 110 と食塩卵寒天はさらに弱かった。ETGP は塩化ナトリウムを含まないためか *Proteus* が抑制されず、*S. aureus* のような黒色の集落を形成した。しかしながら塩化ナトリウムを同じく含まない TG では *Proteus* の十分な抑制が観察されたが、これは亜テルル酸塩が ETGP の2倍量添加されていることによるものと思われる。

以上の結果から *S. aureus* に対する発育支持力とそれ以外のすべての菌株 (Staphylococci も含む) に対する抑制力をまとめると、No. 110 と食塩卵寒天は発育は良いが抑制が弱く、逆に TG は抑制は強いが、それによって目的とする *S. aureus* の発育も抑えられていることがわかる。一方、ETGP は発育及び抑制のいずれの点とも中間的な性能を示した。今回新たに考案した TGSE は供試培地中、抑制はもっとも優れており、発育支持力もまた十分満足すべきものであり、従来の培地の長所が良く取り入れられていることが示された。

4. 考 察

Baird-Parker によって報告された ETGP は、現在国際的にその性能が認められている培地であるが、*Proteus* が *S. aureus* と同程度に発育してしまうという欠点 (ただし卵黄反応は陰性) が指摘されている。このことは Baird-Parker 自身によっても示されている³⁾。

ETGP のこの抑制不良は亜テルル酸塩とグリシンに依存している結果であり、高濃度のグリシンがさらに *S. aureus* の発育にも影響している可能性が考えられる。そこで著者らは、グリシンを減量し、その補充として塩化ナトリウムを添加することで前述のような良好な結果を得ることができた。

L. Mintzer-Morgenstern ら⁴⁾ はピルビン酸塩とともにブドウ糖を1%に加え、損傷菌の回収に良い効果をあげたと報告している。この際の塩化ナトリウム濃度は5%と比較的少ない量に設定されているが、これは加熱損傷菌に対して塩化ナトリウムはやはり阻害的に作用するという基礎実験の報告⁵⁾に基づいたものである。TGSE もこの点を考慮して塩化ナトリウム濃度を通常より低めにした。一方、ピルビン酸塩と同等の損傷菌修復能をもつ物質としてカタラーゼ⁶⁾が報告されているものの、この酵素は加熱による滅菌ができないためにろ過滅菌を必要とし、操作性に難点があると言わざるを得ない。

今回新たに考案した TGSE では、これらの報告を背景にして、抑制力に幅のある多様性をもたせるために、作用機序の異なると思われる物質を組み合わせた。その結果、前述のように TGSE は、*S. aureus* の発育支持力及びその他の菌に対する抑制力に関して、供試した培地の中でもっとも良好であることがわかった。あわせて、調製後の経時的安定性すなわち保存性も良好*であ

* 未発表

り、生培地として冷所で6か月間以上有効であることを確認した。

要 約

Staphylococcus aureus 分離培地として新たに考案したテルライト・グリシン・食塩卵 (TGSE) 寒天を従来より知られるスタヒロコッカス培地 No. 110, 食塩卵寒天, テルライト・グリシン寒天及び Baird-Parker による ETGP 寒天と比較し, スタンプアガー法への応用について検討した。

1) TGSE 寒天の *S. aureus* に対する発育支持力は, 食塩卵寒天及びスタヒロコッカス培地 No. 110 と並んで良好であった。一方, テルライト・グリシン寒天はもっとも悪く, ETGP 寒天はこれらの中に位置した。

2) *S. aureus* 以外の菌に対する抑制力は, TGSE 寒天がもっとも強く, テルライト・グリシン寒天もこれとほぼ同等であった。食塩卵寒天及びスタヒロコッカス培地 No. 110 はかなり弱い抑制力しかもたず, ETGP 寒天はこの場合も中間的であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始ご指導いただいた国立予防衛生研究所・坂崎利一先生, 神戸市環境保健研究所・寺本忠司先生並びに菌株をご分与いただいた東京都立衛生研究所・寺山 武先生に深謝致します。

文 献

- 1) 鈴木 昭, 春田三佐夫: 食品衛生研究, **31**, 863~871 (1982).
- 2) Baird-Parker, A. C.: J. Appl. Bacteriol. **25**, 12~19 (1962).
- 3) Baird-Parker, A. C.: *ibid.*, **25**, 441~444 (1962).
- 4) Mintzer-Morgenstern, L., Katzenelson, E.: J. Food Protection **45**, 218~222 (1982).
- 5) Iandolo, J. J., Ordal, Z. J.: J. Bacteriol. **90**, 134~142 (1966).
- 6) Brewer, D. G., Martin, S. E., Ordal, Z. J.: Appl. Environ. Microbiol. **34**, 797~800 (1977).