食品中のエンテロトキシン産生性黄色ブドウ球菌の 迅速簡易検査法^{*1}

(昭和 60 年 1 月 25 日受理)

小田 隆 弘^{*2*3}

Rapid and Simplified Detection Method for Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* in Food

Takahiro ODA

(Fukuoka Municipal Institute of Food Sanitation Inspection:
6-23-1, Naka, Hakata-ku, Fukuoka, Japan)

A rapid and simplified detection method for enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* in food was devised. The procedure is as follows: a homogenized food sample is added to Tellulite-Lithium-Starch-Pyruvate Brain Heart Infusion broth in a Petri dish, and incubated for 18 hrs at 37°C. Enterotoxins produced in the broth are detected by using a "SET-RPLA" kit (Reversed Passive Latex Agglutination method).

Numerous bacteria coexisting with *S. aureus* in raw milk, minced meat and potato salad did not interfere with the growth and enterotoxin production of *S. aureus*. Egg-yolk reaction-negative *S. aureus* was also detected. An excellent correlation in bacterial count of *S. aureus* was found between MPN value obtained by the above procedure and the usual plate count. When this method was applied to various commercial foods, *S. aureus* was detected more effectively than by the conventional plate method.

This method may be useful for routine laboratory tests for the detection of *S. aureus* in foods.

(Received January 25, 1985)

Key words: 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*; エンテロトキシン enterotoxin; 増菌培養液 enrichment medium; 逆受身ラテックス凝集反応法 reversed passive latex agglutination method; 迅速簡易検出法 rapid simplified detection method

はじめに

食品衛生検査指針¹⁾などで示されている黄色ブドウ球

菌(以下 黄色ブ菌と略)検査は、卵黄加マンニット食塩培地などの平板培地上で卵黄反応陽性のブ菌様コロニーを検索し、その菌のコアグラゼ産生能試験などにより確認する。この場合、卵黄反応陰性もしくはコアグラゼ微弱産生株は見落される可能性があり、逆に、コアグラゼ産生非黄色ブ菌²⁾を誤認することも予想される。従って、著者は、食中毒原性黄色ブ菌の鑑別には、その直接的性状であるエンテロトキシン(以下 ET と

^{*1} ブドウ球菌エンテロトキシン簡易検出法の応用に関する研究(第2報)

^{*2} 福岡市食品衛生検査所: 福岡市博多区那珂 6-23-1 青果市場内

^{*3} 現勤務先 福岡市衛生試験所: 福岡市中央区舞鶴 2-5-10

略) 産生性により同定する方が妥当と考え, ET 産生性を簡易に調べる方法として平板パンチ法を前報³⁾で報告した。しかし, この方法でも, 平板培地上にコロニーが形成されるまで培養する必要があるため, 食品の ET 産生黄色ブ菌検査法としては迅速性にやや欠ける。

そこで著者は, 食品から ET 産生黄色ブ菌の検出をさらに迅速に行う方法として, 食品に含まれる黄色ブ菌を選択増菌培地で培養し, 培養液中に産生される ET を特異的に検出する簡易検査法を検討した。

実験方法

1. ET 産生用増菌培地

黄色ブ菌以外の細菌が多い食品でも, その中に含まれる黄色ブ菌を選択的に増菌させ, ET を産生させる増菌培地として, Baird-Parker 培地の組成を参考にした Tellulite-Lithium-Starch-Pyruvate-Brain Heart Infusion Broth (以下 TLSP ブイヨンと略) を試作して用いた。本培地の調製法は次のとおりである。ブレインハートインフュージョン ブイヨン (栄研化学(株)) を 1L の精製水に処方通り溶解し, 塩化リチウム 5g, 可溶性デンプン 10g, ビルビン酸ナトリウム 10g を加え, 121°, 15分間滅菌後, デンプンが底部で固まらないように振りまぜながら冷却し, 亜テルル酸カリウム (Difco) 1% 液を 3 ml (最終濃度として 0.003% 量) 加えた。亜テルル酸カリウムを加えたブイヨンは保存中に選択性が低下したので, その都度調製した。

2. 細菌数測定

平板法によるブ菌数の測定には, 卵黄加マンニット食塩培地を用い, ブ菌様コロニーを卵黄反応陽性コロニーと陰性コロニーに区別して算定した。生菌数及び大腸菌群の測定は, それぞれ標準寒天 (栄研) またはデスオキシコレイト培地 (栄研) を用い常法¹⁾ 通りに行った。

3. 供試黄色ブ菌

食品への黄色ブ菌接種実験の場合は, 食品由来保存株 F 85 及び F 93 の 2 菌株を用いた。これらは卵黄反応陽性, コアグラゼ型は II 及び VII 型, ET 型はそれぞれ AD, BC 型であった。

4. 食品材料

基礎的検討には, 黄色ブ菌以外の細菌が多い食品として, 生乳, 市販生肉ミンチ及び収去検査で細菌数が多かった市販ポテトサラダを用いた。いずれも, 実験に供するまで凍結して保存した。

市販食品への応用実験では, 市販の弁当類 (にぎりめし, 寿司弁当など) 24件, サラダ類15件, 和洋生菓子15件, 魚肉ねり製品 (天ぷらかまぼこなど) 13件, 冷凍食品 (凍結前未加熱品) 4 件及びゆでめん 5 件の計76件を用いた。

5. 増菌培養液中の ET 検出法

液状食品はその 1 ml を 15 ml の TLSP ブイヨンに, 固型食品は, その10倍ホモジナイズ液 10 ml を倍濃度

の TLSP ブイヨン 10 ml に加え, よく混和後, 37° で静置培養した。一定時間培養後, 培養液の上澄液もしくは遠心 (3,500 rpm 10分) 上清をとり, その中に含まれる ET を逆受身ラテックス凝集反応法 (RPLA) により検出した。ET A~C の検出には, SET-RPLA キット (デンカ生研) と自製ラテックス試薬⁴⁾ を, ET D の検出には自製試薬のみを用いた。培養液中の ET 濃度を測定する実験を除いては, 培養上清 1 滴 (約 0.03 ml) を, キットに添付されている 0.5% ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝液にさらに正常ウサギ血清 (デンカ生研) を 1% 量加えて調製した希釈液 0.25 ml に加えて約 10 倍希釈液を作り, その希釈液についてマイクロプレート上で ET A~D の検出を行った。

6. MPN 法による菌数測定

被験材料の10倍ホモジナイズ液の原液, 10倍希釈液, 100 倍希釈液について, 各段階希釈液の 1 ml ずつをそれぞれ 3 本の TLSP ブイヨンに接種して一定時間培養後, その培養上清について ET 検出を行った。ET が検出された各希釈段階の陽性数から, MPN 表¹⁾ により被験材料に含まれた ET 産生黄色ブ菌数を MPN 値として求めた。

7. 分離菌株の ET 及びコアグラゼ産生能の確認

増菌培養液から ET が検出された場合には, その 1 白金耳を Baird-Parker 培地に塗抹培養し, 黄色ブ菌様独立コロニー数個について平板パンチ法³⁾ により ET 及びコアグラゼ産生能を確認した。

成績

1. TLSP ブイヨンにおける黄色ブ菌の増殖と ET 産生

黄色ブ菌以外の細菌が多い検体として生乳を用い, その中に含まれる ET 産生黄色ブ菌の TLSP ブイヨンにおける増殖と ET 産生について調べた。

生乳 1 ml ずつを TLSP ブイヨン 15 ml ずつを入れた中試験管 (18 × 180 mm) とシャーレ (内径 9 cm: 深さ 2 cm) に加え, 37° で静置培養したときの細菌数の変化と ET 産生状況を Fig. 1 に示した。

生乳をブイヨンに投入した直後の生菌数は 2×10^5 /ml, 大腸菌群数 8×10^2 /ml, 卵黄反応陽性ブ菌数 8×10^2 /ml, 同陰性ブ菌数 9×10^4 /ml であったが, 培養に伴い, 中試験管内培養またはシャーレ内培養を問わず, 生菌数及び卵黄反応陽性または陰性ブ菌数の急激な増加と大腸菌群数の急速な減少がみられた。中試験管内培養とシャーレ内培養の間には, 菌の増殖態度に明らかな差は認められなかった。しかし, ET 産生には顕著な差が認められ, シャーレ内培養では短時間のうちに多量の ET が検出れさたが, 中試験管内培養では同濃度の ET 産生量がみられるのに長時間を必要とした。37°, 18 時間培養の時点で産生された ET 濃度を比較すると, シャーレ内培養の方が中試験管内培養よりも約10倍高い値を示した。

Table 1. Growth and Enterotoxin Production in TLSP Broth of *S. aureus* Inoculated to Minced Meat and to Potato Salad on Petri-dish Culture

Bacterial counts (/ml) or Enterotoxin conc. (ng/ml)	Food samples <i>S. aureus</i> inoculated			
	Minced meat		Potato salad	
	0 hr	18 hr	0 hr	18 hr
Total bacteria	3×10^5	5×10^8	4×10^5	7×10^8
Coli-form organisms	2×10^4	<10	3×10^4	<10
Egg-Yolk reaction positive <i>Staphylococci</i>	1×10^3	1×10^8	1×10^3	2×10^8
Egg-Yolk reaction negative <i>Staphylococci</i>	1×10^4	2×10^8	2×10^3	4×10^8
Enterotoxin (ET) A	ND	128	ND	ND
B	ND	ND	ND	32
C	ND	ND	ND	64
D	ND	32	ND	ND

ND: less than 2 ng/ml

Fig. 1. Growth and enterotoxin production in TLSP broth of *S. aureus* contaminated in raw milk

Culture was done in test tube (I) and in Petri-dish (II) at 37°C.

Symbols; ○: total bacteria; □: coli-form organisms; △: Egg-Yolk reaction positive *Staphylococci*; ▽: Egg-Yolk reaction negative *Staphylococci*

A, B, C, D: enterotoxin A, B, C and D

シャーレ内培養の方が中試験管内培養にくらべ ET

産生が著名に高い傾向は、ロットの異なる他の2件の生乳を用いた実験でも同じ結果が認められた。従って、以後の実験では培養条件として、シャーレ内で 37°, 18時間静置培養する方法で行った。

次に、市販の生肉ミンチ及びポテトサラダ各1件に、黄色ブ菌を接種し、生肉ミンチまたはポテトサラダ中に含まれる多数の細菌の存在下で、黄色ブ菌が TLSP ブイオン増菌培養により ET を産生するかどうか調べた。

黄色ブ菌接種前の生肉ミンチの生菌数は 5×10^6 /g、大腸菌群数は 3×10^4 /g、卵黄反応陽性黄色ブ菌数は 10^2 /g 以下、同陰性ブ菌数は 2×10^4 /g で、これに黄色ブ菌保存株 F 85 (ET AD 型産生株) を 10^3 /g になるように接種した。また、ポテトサラダの生菌数は 8×10^5 /g、大腸菌群数は 5×10^4 /g、卵黄反応陽性ブ菌数は 10^2 /g 以下、同陰性ブ菌数は 4×10^3 /g で、これに黄色ブ菌保存株 F 93 (ET BC 型産生株) を 10^3 /g になるように接種した。これらの10倍ホモジナイズ液 10 ml を倍濃度の TLSP ブイオン 10 ml に加えて、シャーレ内で、37° 18時間培養したときの細菌数と ET 濃度を Table 1 に示した。

市販生肉ミンチ及びポテトサラダを用いて調べた結果も、生乳の場合と同様に、生菌数及び卵黄反応陽性または陰性ブ菌の急激な増加と大腸菌群の急速な減少が観察され、検出された ET は接種した黄色ブ菌の ET 型と同じであった。

これらの結果から、黄色ブ菌以外の細菌が多い食品でも、TLSP ブイオン中で 37°, 18時間程度、シャーレ内で培養すれば、被験食品中に含まれた ET 産生黄色ブ菌の増殖と ET 産生がみられることがわかった。すなわち、被験食品中の ET 産生黄色ブ菌の存在は、増菌培養液中に産生された ET の検出により証明できることが判明した。

前述の方法による ET 産生黄色ブ菌検索法を、以後、検討法と仮称した。

Table 2. Viable Counts of *S. aureus* by ET-detection Method and by Plate Method

Food*1	Experiment No.	<i>S. aureus</i> counts (/g)	
		ET-detection method	Plate method
Minced meat	1	2.1×10^2 *2	3×10^2
	2	2.4×10^3	5×10^3
	3	4.3×10^4	8×10^4
Potato salad	1	4.6×10^2	8×10^2
	2	4.3×10^4	2×10^4
	3	1.5×10^5	4×10^5
Raw milk	1	9.3×10^4	4×10^3
	2	4.3×10^4	9×10^3
	3	1.5×10^5	2×10^4

*1: Minced meat and potato salad were inoculated to adequate amount of *S. aureus*.

*2: MPN values/g

Table 3. Frequency of *S. aureus* Detected by ET-detection Method and by Plate Method

Food	No. of tested	No. of positive (%)	
		ET-detection method	Plate method
Luncheon	24	5 (20.8)	2 (8.3)
Salad	15	3 (20.0)	1 (6.7)
Cake	15	2 (13.3)	1 (6.7)
Fish meat paste product	13	1	0
Frozen food	4	1	0
Boiled noodle	5	1	0
Total	76	13 (17.1)	4 (5.3)

2. MPN 法による黄色ブ菌数測定への応用

前回の実験で用いた生肉ミンチ及びポテトサラダに黄色ブ菌保存株を種々の濃度になるよう接種した被験材料を調製し、それらに含まれる黄色ブ菌数を、MPN 法に検討法を応用して求めた値と、従来通りの平板法で求めた卵黄反応陽性ブ菌数の値を比較した。生肉ミンチには前記の実験と同様に F 85 株を、ポテトサラダには F 93 株を、それぞれ適量ずつ添加した被験材料各 3 件についてしらべた。また、前記の実験で用いた生乳 3 件についても同様に行った。それらの結果を Table 2 に示した。

生肉ミンチ及びポテトサラダにおける黄色ブ菌数の測定結果は、検討法で求めた ET 産生黄色ブ菌数の MPN 値と、平板塗抹法で算定した卵黄反応陽性ブ菌数に大きな差は認められなかった。しかし、生乳の場合には、検討法で求めた MPN 値の方が、平板法で求めた卵黄反応陽性ブ菌数より明らかに多かった。この結果から、生乳中には卵黄反応陰性の ET 産生黄色ブ菌が多数含まれている可能性が考えられたので、生乳を Baird-Parker 培地に塗抹し、出現した集落のうち卵黄反応陰性のブ菌様コロニーについて平板パンチ法により ET 産生性を検討したところ、卵黄反応が陰性で ET 及びコアグラ

ゼ産生黄色ブ菌が多数存在することを認めた。

3. 市販食品への応用

弁当類 24 件、サラダ類 15 件、和洋生菓子 15 件、魚肉ねり製品 13 件、凍結前未加熱冷凍食品 4 件及びゆでめん 5 件の計 76 件を対象に検討法の応用を試みた。同時に、卵黄加マンニット食塩培地を用いた平板法による黄色ブ菌の検査も実施した。検討法では、検体の 10 倍ホモジナイズ液 10 ml を増菌培養する方法で、平板法では同液 0.1 ml を 2 枚の平板に塗抹培養後、卵黄反応陽性黄色ブ菌を検索する方法で調べた。

それぞれの方法による黄色ブ菌検出率を Table 3 にまとめた。

市販食品 76 件のうち、平板法では 4 件 (5.3%) から卵黄反応陽性黄色ブ菌が、検討法では 13 件 (17.1%) から ET 産生黄色ブ菌が検出された。前者の方法で卵黄反応陽性黄色ブ菌が検出された検体は、すべて、後者の方法で ET 産生黄色ブ菌が検出された。

弁当類 24 件のうち、検討法で ET 産生黄色ブ菌の存在が確認された 5 件について、その菌数を前記の MPN 法で求めた。その結果を平板法での成績とあわせて Table 4 に示した。

検討法で ET 産生黄色ブ菌が検出された 5 件の弁当

Table 4. Enumeration of *S. aureus* and Detection of the Enterotoxin by ET-detection Method

Luncheons	ET-detection method		Plate method	
	<i>S. aureus</i> counts (MPN/g)	Detected ET	<i>S. aureus</i> counts (/g)	Et type of strain
Rice ball	4.3×10^2	AC	7×10^2	AC
Maki-zushi	9.1×10	A	$< 10^2$	
Inari-zushi	9.3×10^2	ACD	not detectable*	BC
Chirashi-zushi	4.3×10^3	BC	2×10^3	
Kashiwa-meshi	7.3×10	C	$< 10^2$	

* *S. aureus* was not detectable by interference with many *Bacilli* colonies.

類のうち、2件は平板法でも卵黄反応陽性黄色ブ菌が検出され、その菌数に差はなかった。平板法で検出された卵黄反応陽性黄色ブ菌のET型は検討法の培養液から検出されたET型に一致した。

検討法でET産生黄色ブ菌の存在が証明されたにもかかわらず、平板法で卵黄反応陽性黄色ブ菌が認められなかった3件のうち2件は、その菌数が1g当り 10^2 以下であった。他の1件は、平板法では*Bacillus*属と思われる細菌のコロニーが多数出現して卵黄反応陽性黄色ブ菌コロニーが見出せなかった。

考 察

ブ菌食中毒は、黄色ブ菌が食品中で産生したETを摂取することにより発生する。従って、食品衛生上、問題となるブ菌はET産生性黄色ブ菌である。

現行の黄色ブ菌検査法¹⁾は、卵黄反応陽性のコアグラゼ産生ブ菌を対象としているため、卵黄反応陰性もしくはコアグラゼ微弱産生のET産生黄色ブ菌は見落される可能性が高い。畜産食品由来の黄色ブ菌に卵黄反応陰性株が多いという報告^{5), 6)}や、例数は少ないが、コアグラゼ陰性ブ菌による食中毒例^{7), 8)}があることを考えると、食中毒原性黄色ブ菌検査の指標として、卵黄反応やコアグラゼ産生能は不十分と思われる。

また、従来の黄色ブ菌検査の問題点として、食品の種類によっては、平板培地上に黄色ブ菌以外の細菌が多数生育して、黄色ブ菌検索に支障をきたす場合があることや、病人食や乳幼児向食品などの厳しい衛生度が望まれる食品では微量の黄色ブ菌が検出できない点や、検査に時間がかかる点などいくつかの欠点が指摘される。

今回著者が検討した食中毒原性黄色ブ菌検索法は、食品などを黄色ブ菌の選択増菌培地中で比較的短時間培養し、被検食品中にET産生黄色ブ菌が存在した場合にのみ培養液中に産生されてくるETを検出することにより、食中毒原性黄色ブ菌検索を行うもので、ET産生性を検査の指標としているため、前記のような欠点はみられない。ただし、この方法では、ET産生黄色ブ菌が存在した場合に必ず培養液中にETが産生されることが前提であり、用いる増菌培地は重要といえる。

ここで用いた黄色ブ菌選択増菌培地は、ET産生促進作用が著明⁹⁾な可溶性デンプンとピルビン酸塩を加えたブイヨンを基礎培地に、選択抑制剤として、Baird-Parker培地に使用されている亜テルル酸カリウムと塩化リチウムを加えた試作培地である。本培地は、高濃度食塩を選択抑制剤に用いた場合にみられる¹⁰⁾ET産生抑制がなく、ほぼ所期の目的に適したものであった。しかし、選択性がやや弱い点や保存性に欠ける点などは、今後さらに改良の余地があろう。

培養条件で、試験管内培養よりシャーレを用いた水平培養の方がET産生が著明に高かったが、その理由は、好気的条件下でET産生が促進されるためと考えられる。シャーレ内培養では、37°、18時間で検出に必要なET濃度が十分に産生され、RPLA法によるET検出に要する時間とあわせても、約30時間後には結果が得られ、従来法よりかなり迅速であった。振とう培養法の併用や、増菌培地の改良、ET検出時間の短縮(RPHA法を用いるなど)により、検査に要する時間はさらに短縮できると考える。

市販食品に検討法を応用したところ、従来法では卵黄反応陽性黄色ブ菌が検出されなかった多数の検体からET産生黄色ブ菌が検出された。このことは、微量の黄色ブ菌もしくは、卵黄反応陰性などの理由で従来法では検出されない黄色ブ菌に汚染された市販食品がかなり存在することを示しており、保存条件によっては食中毒を起こす危険性も考えられる。

ブ菌食中毒は、我が国で年間200件以上発生しており、近年は増加傾向がみられる。食中毒防止に、今後は前述のような危険性をも対象とした厳しい監視行政と、製造者側の品質管理体制が必要と思われる。

ま と め

食中毒原性黄色ブ菌の食品からの検査法として、被検材料を選択増菌培地中で増菌させ、培養液中に産生されたエンテロトキシン(ET)を検出することにより、ET産生黄色ブ菌の存在を証明する簡易検索法について検討した。

1. ET産生用選択増菌培地として試作した Tellu-

lite-Lithium-Starch-Pyruvate (TLSP) プイオンは、黄色ブ菌以外の細菌が多い食品に対しても、黄色ブ菌の選択的増菌と ET 産生にほぼ適していた。また、そのときの培養条件は、シャーレを用いた水平培養の方が、試験管での垂直培養よりも ET 産生が良好であった。

2. この方法を MPN 法に応用することにより、ET 産生黄色ブ菌の定量が可能であった。

3. この方法を市販食品に応用したところ、平板法では黄色ブ菌が検出されなかった検体より ET 産生黄色ブ菌が検出された例が多数見出された。その理由は、本法では、食品中に含まれる少数の ET 産生黄色ブ菌はもとより卵黄反応陰性あるいはコア グラゼ陰性で ET 産生性の黄色ブ菌の検出が可能なためである。

謝 辞

SET-RPLA キットを恵与して頂いたデンカ生研(株) 杉山純一氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針 I” p. 87~138 (1973) (社)日本食品衛生協会。

- 2) 寺山 武: モダンメディア, **27**, 470~482 (1980)。
- 3) 小田隆弘: 食衛誌, **26**, 29~32 (1985)。
- 4) 小田隆弘, 大久保忠敬, 永井 誠, 西本幸一, 大丸健之助: 福岡市衛試報, **4**, 33~37 (1979)。
- 5) Hájek, V.: Appl. Environ. Microbiol. **35**, 264~268 (1978)。
- 6) Takeshige, K., Watanabe, K., Igarashi, H., Shingaki, M., Terayama, T.: Jpn. J. Vet. Sci. **45**, 355~362 (1983)。
- 7) Breckinridge, J. C., Bergdoll, M. S.: The New Engl. J. Med. **284**, 541~543 (1971)。
- 8) 森 正司, 安形則雄, 野村 寛, 土平一義: 名古屋市衛研報, **29**, 43~45 (1982)。
- 9) 小田隆弘, 永井 誠, 大久保忠敬, 西本幸一, 北原郁也: 福岡市衛試報, **5**, 81~95 (1980)。
- 10) 五十嵐英夫, 新垣正夫, 山田澄夫, 潮田 弘, 寺山 武, 坂井千三: 東京都衛研年報, **29-1**, 6~12 (1978)。