

食品からの黄色ブドウ球菌検査における発色酵素基質培地の評価

Evaluation of Chromogenic Mediums for Isolation *Staphylococcus aureus* from Food Samples

渡邊 節 菅原 直子 小林 妙子
山田 わか 齋藤 紀行 廣重 憲生

Setsu WATANABE, Naoko SUGAWARA, Taeko KOBAYASHI
Waka YAMADA, Noriyuki SAITO, Norio HIROSHIGE

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は食中毒原因菌の一つとして重要な細菌である。食中毒事例では潜伏時間が短く、食中毒の症状が食品摂取後短時間で発現するため、原因食品の推定あるいは検査検体の入手は容易であるが、食品等から黄色ブドウ球菌を定法により分離し同定するのに数日を要することが原因究明の遅れにつながっている。検査の迅速性、鑑別性を目的に近年販売された発色酵素基質培地X-SA寒天 (XSA) 培地、クロモアガースタッフアウレウス (CSA) 培地をフォーゲルジョンソン (VJ) 培地および従来から用いている卵黄加マンニット食塩 (MSEY) 培地とを比較した結果、XSA培地およびCSA培地の発色酵素基質培地は特徴的な色調で他の菌と容易に区別ができ、迅速性、鑑別性に優れていた。同時に、他属菌の培地発育性、エンテロトキシン型別による発育性、調理済み食品を用いての検出性および食品添加物の影響について比較検討し、黄色ブドウ球菌検出にはXSAやCSA培地の発色酵素基質培地が有用であることが確認された。

キーワード : 黄色ブドウ球菌 ; 発色酵素基質培地 ; 食品 ; 迅速鑑別

Keywords : *Staphylococcus aureus* ; chromogenic medium ; food samples ; rapid identification

1 はじめに

黄色ブドウ球菌は、ヒトや動物、環境中に広く分布しているだけではなく、食品の製造・調理環境からも比較的高率に分離され、わが国における食中毒起因菌として重要な細菌の一つである。黄色ブドウ球菌による食中毒は摂食後比較的短時間で吐き気、嘔吐、腹痛および下痢等を主徴とする特異的な症状を呈するため、推定原因食品および患者の吐物や便の入手は容易である。反面、検体からの黄色ブドウ球菌の分離には時間がかかる。これは黄色ブドウ球菌分離用選択培地としてMSEY培地を用い、その後非選択性の培地を経由して生化学性状試験等を行っているためである。黄色ブドウ球菌はMSEY培地で黄色集落周囲に白濁環の卵黄反応を呈し、その他のコアグラゼ陰性ブドウ球菌等と明確に区別される。しかしMSEY培地は調整時の煩雑さ、陽性菌の判定に経験が必要なこと、判定までの時間が48~72時間かかること、直ちに生化学性状試験に用いることができないなどが問題となっている。近年、20~24時間で菌分離が可能とされるXSA培地、CSA培地およびVJ培地が開発されている。XSA培地とCSA培地はともに発色酵素基質培地で、発育集落の色調で他の菌との鑑別が容易である。これらの培地が黄色ブドウ球菌分離の迅速化に寄与できるかを

MSEY培地と比較したので報告する。

2 方法と材料

2.1 使用培地と黄色ブドウ球菌の発育性

MSEY培地 (日水製薬) : マンニット食塩寒天培地を滅菌後無菌卵黄液 (極東製薬工業) を10%の割に加えた培地で、黄色ブドウ球菌はマンニットを分解し黄色集落となり集落周囲は卵黄反応で不透明な光沢輪を形成する。

X-SA培地 (日水製薬) : 発色酵素基質培地で黄色ブドウ球菌は約20時間培養で青色から明るい青色集落を形成する。

CSA培地 (CHROM) : 発色酵素基質培地で約20時間培養すると黄色ブドウ球菌は藤色から明るい藤色の集落を形成する。

VJ培地 (OXOID) : フォーゲルジョンソン培地を溶解、滅菌後、亜テルル酸カリウムを添加した培地で、黄色ブドウ球菌は亜テルル酸カリウムを還元して集落周囲にやや黄色を帯びた黒色から黒灰色の集落を形成する。

ブレインハートインヒュージョンブイヨン (BHI : 日水製薬) : 黄色ブドウ球菌およびその他の菌の増菌用として使用した。

2.2 分離培地の発育性比較に使用した菌株

黄色ブドウ球菌 (CPSA) として20株, その他のブドウ球菌として *Staphylococcus epidermidis* 3株, コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) 10株, グラム陽性球菌6株 (*Micrococcus luteus* 1株, *Enterococcus faecium* 3株, *Enterococcus casseli* 1株, *Lactococcus garviaea* 1株), グラム陰性桿菌15株 (*Escherichia coli* 1株, *Citrobacter freundii* 1株, *Enterobacter cloacae* 1株, *Klebsiella pneumoniae* 1株, *Serratia marcescens* 1株, *Serratia foticola* 1株, *Aeromonas hydrophila* 1株, *Aeromonas sobria* 1株, *Morganella morganii* 1株, *Alcaligenes faecalis* 1株, *Proteus mirabilis* 1株, *Proteus vulgaris* 1株, *Providencia rettgeri* 1株, *Bacillus cereus* 2株, *Bacillus subtilis* 1株, *Vibrio parahaemolyticus* 3株,) の22菌種58株を供試菌株とし, それぞれの菌株をBHIブイオンに接種し37°C で20時間培養し, これを被検菌液として用いた。

なお, 食品添加実験には黄色ブドウ球菌A255株(CPSA)を用いた。

2.3 分離培地の発育性比較に用いたエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌の産生エンテロトキシンの型別に分離培地での発育性比較を行うため, エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌 (SEA) 18株, エンテロトキシンB産生黄色ブドウ球菌 (SEB) 15株, エンテロトキシンC産生黄色ブドウ球菌 (SEC) 15株, エンテロトキシンD産生黄色ブドウ球菌 (SED) 5株およびエンテロトキシン非産生黄色ブドウ球菌 (SEN) 8株を用いた。

2.4 発育性比較方法

各被検菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で約2,000cfu/mlとなるよう希釈し, 4種類の分離培地2枚ずつに100 μ l接種しコンラージ棒で培地全面に塗布後37°Cで培養後24時間および48時間後に各菌の発育の有無と集落の色調・大きさを観察した。XSA, CSAおよびVJ各培地の発育性はMSEY培地48時間培養後の出現集落数を100とし, 各培地の発育集落数との比率で表した。

2.5 黄色ブドウ球菌添加食品からの菌分離

市販食品および自家調理食品50検体は20gを無菌的にストマッカー袋に秤量しPBSを20ml加え, 2倍乳剤とした。この乳剤に約1000cfu/gになるよう黄色ブドウ球菌A255株菌液を添加し30秒間ホモジナイズし, その100 μ lをMSEY, XSA, CSAおよびVJ培地2枚ずつに接種し37°C24時間および48時間培養後の黄色ブドウ球菌の発育確認と標準平板菌数測定法により集落数を測定した。それぞれの培地の菌出現数を求め, MSEYの平均を100とし, これに対する割合で他の培地の発育性を比較した。

2.6 食品添加物影響下の黄色ブドウ球菌の発育性

無菌マッシュポテトを疑似食品とし, これに砂糖 (新三井製糖) を5, 10, 30%, 食塩 (関東化学) を5, 10, 20%, 食用油 (日清) を5, 10, 20%の割合に添加して食品試料を調製した。これらには約500cfu/gになるよう黄色ブ

ドウ球菌A255株菌液を添加した。また, 滅菌PBSにソルビン酸 (関東化学)0.5, 5, 50, 500 μ g/ml, エリソルビン酸ナトリウム (関東化学) 0.5, 5, 50, 500 μ g/mlおよび食用赤色3号 (関東化学) 1mg/mlを添加した。さらに滅菌PBSをpH 3, 5, 7に設定した試料とした。これらには約20,000cfu/mlになるように黄色ブドウ球菌A255株菌液を添加し, 4°C24時間保存後, 各試料の100 μ lをMSEY, XSA, CSA培地に接種し24時間および48時間後に発育確認と出現集落数を測定した。

2.7 発色酵素基質培地からの直接迅速診断法

XSAとCSA培地上の集落から直接エンテロトキシン判定およびコアグララーゼ試験を実施するとともに, 菌量を測定を行う迅速診断を試みた。食中毒由来のSEA, SEB, SEC, SEDおよびエンテロトキシンA/B型産生 (SEA/B) 株をBHIブイオンで37°C24時間培養しXSA培地に塗抹し37°C24時間培養した。培地上の集落から1.5mlのBHIブイオン6本に1白金線菌量を接種し37°Cで振盪培養した。0, 2, 4, 6, 8および20時間後にBHIブイオンを3,000rpm20分遠心しその上清を逆受身ラテックス凝集反応 (SET-RPLA: デンカ生研) を用いて各培養時間のエンテロトキシン量を測定した。同時に採取したBHIブイオンを1ml採り, 希釈を行い, 普通寒天培地に塗抹し標準平板菌数測定法により菌数を求めた。また, 直接結合型コアグララーゼ試験は, 滅菌整理食塩水を1滴のせたスライド上に直接XSAまたはCSA培地上の集落を釣菌して混和した後, ウサギプラズマを滴下し両者を混合して行った。

2.8 菌の同定

菌の同定は, グラム染色により形態を確認するとともに, カタラーゼ試験, コアグララーゼ試験, Vp試験, スライド凝集試験の他, BBL CRYSTAL GP Gram-Positive およびGram-Negative ID Systemを用いて菌の同定を行った。

3 結果

3.1 菌種による培地の発育性

表1に菌種による各培地での発育性を示した。MSEY, XSA, CSAおよびVJの4種類の分離培地に22菌種58菌株を接種し菌の発育性を観察した結果, 14菌種16菌株のグラム陰性桿菌は4種類の分離培地に全く発育しなかった。MSEY培地はブドウ球菌, *Lactococcus garviaea*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*が発育したが, 卵黄反応やマンニト分解能を示したのは黄色ブドウ球菌と*B.subtilis*であった。しかし, 黄色ブドウ球菌の一部に卵黄反応陰性を示す菌株が7株認められた。XSA培地は, 黄色ブドウ球菌, *S.epidermidis*, *L.garviaea*, *M.luteus*, *Bacillus*属, *Bacillus cereus* 1株が発育したが, 青色集落を形成したのはコアグララーゼ陽性黄色ブドウ球菌のみで, コアグララーゼ陰性黄色ブドウ球菌, 他の発育菌は白色, 水色, 緑色の集落であった。CSA培地では, 黄色ブドウ

球菌のほか、*L.garviaea*, *M.luteus*, *Enterococcus*属および*Bacillus cereus*が発育した。コアグラールゼ陽性黄色ブドウ球菌は藤色集落を形成したが、コアグラールゼ陰性黄色ブドウ球菌、*L.garviaea*や*B.cereus*は紺色、青色、薄い藤色集落であった。また、*M.luteus*はオレンジ色集落を示した。VJ培地では黄色ブドウ球菌の大部分は発育し

黒色集落を形成した。さらに*Lactococcus garviaea*と*Micrococcus luteus*も発育し黒色集落となった。エンテロコッカス属の2株も発育したが透明微小集落であった。ほかの*Enterococcus*属、*S.epidermidis*, グラム陰性桿菌、グラム陽性桿菌は発育しなかった。

表1 菌株による発育評価

| 供試菌株種 | 菌株 | 対象培地 | | | | 備考 ^{a)} | |
|-------------------------------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------------|-----------|
| | | MSEY 色調 | 卵黄反応 | XSA 色調 | CSA 色調 | | VJ 色調 |
| 1 Staphylococcus aureus | 4FP10 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 2 Staphylococcus aureus | SSA7 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 3 Staphylococcus aureus | A177 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 4 Staphylococcus aureus | A220 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 5 Staphylococcus aureus | B115 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 6 Staphylococcus aureus | B259 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 7 Staphylococcus aureus | C391 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 8 Staphylococcus aureus | C362 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 9 Staphylococcus aureus | D111 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 10 Staphylococcus aureus | D143 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA |
| 11 Staphylococcus aureus | C274 | 黄 | - | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 12 Staphylococcus aureus | C275 | 黄 | - | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 13 Staphylococcus aureus | C276 | 黄 | - | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 14 Staphylococcus aureus | C277 | 黄 | - | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 15 Staphylococcus aureus | C285 | 黄 | - | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 16 Staphylococcus aureus | C266 | 黄 | - | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 17 Staphylococcus aureus | C267 | 黄 | - | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 18 Staphylococcus aureus | C268 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 19 Staphylococcus aureus | C269 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 20 Staphylococcus aureus | C290 | 黄 | + | 青 | 藤 | 黒 | CPSA/MRSA |
| 21 Staphylococcus | 4FP17 | 黄 | - | - | 紺 | 黒 | CNS |
| 22 Staphylococcus | 4FP172 | 黄 | - | - | 紺 | 黒 | CNS |
| 23 Staphylococcus | 4FP21 | 黄 | - | - | 紺 | 黒 | CNS |
| 24 Staphylococcus | SI014 | 黄 | - | 水色 | 水色 | 黒 | CNS |
| 25 Staphylococcus | SI142 | 黄 | - | - | 青 | 黒 | CNS |
| 26 Staphylococcus | 5FP12 | 黄 | - | - | 青 | - | CNS |
| 27 Staphylococcus | SO001 | 黄 | - | 薄緑 | 薄青 | 黒 | CNS |
| 28 Staphylococcus | SKU004 | 黄 | - | 白 | 薄緑 | 黒 | CNS |
| 29 Staphylococcus | SKU005 | 黄 | - | 白 | 薄藤 | 黒 | CNS |
| 30 Staphylococcus | SSE2610 | 黄 | - | 白 | 薄藤 | 黒 | CNS |
| 31 Staphylococcus epidermidis | SS1 | 黄 | - | - | - | - | - |
| 32 Staphylococcus epidermidis | FS1 | 黄 | - | 青 | - | - | - |
| 33 Staphylococcus epidermidis | C273 | 白 | - | 青 | - | - | - |
| 34 Lactococcus garviaea | SX16 | 黄 | + | 青緑 | 薄青 | 黒 | - |
| 35 Micrococcus luteus | SX18 | 黄 | + | 緑 | オレンジ | 黒 | - |
| 36 Enterococcus easseli | Sent13 | - | - | - | 青 | - | - |
| 37 Enterococcus faecium | Fent1 | - | - | - | 薄青 | - | - |
| 38 Enterococcus faecium | Sent14 | - | - | - | 青 | 透明 | - |
| 39 Enterococcus faecium | Sent15 | - | - | - | 青 | 透明 | - |
| 40 Escherihia coli | ATCC25922 | - | - | - | - | - | - |
| 41 Citrobacter freundii | SP001 | - | - | - | - | - | - |
| 42 Enterobacter cloacae | SI001 | - | - | - | - | - | - |
| 43 Klebsiella pneumoniae | SS001 | - | - | - | - | - | - |
| 44 Seratia marcescens | SX10 | - | - | - | - | - | - |
| 45 Seratia foticola | SX11 | - | - | - | - | - | - |
| 46 Aeromonas hydrophila | SA1 | - | - | - | - | - | - |
| 47 Aeromonas sobia | SA2 | - | - | - | - | - | - |
| 48 Morganella morgani | JCM1672 | - | - | - | - | - | - |
| 49 Alcaligenes faecalis | SX12 | - | - | - | - | - | - |
| 50 Proteus mirabilis | SX13 | - | - | - | - | - | - |
| 51 Proteus vulgaris | SX3 | - | - | - | - | - | - |
| 52 Providencia rettgeri | SX4 | - | - | - | - | - | - |
| 53 Bacillus cereus | 5FP5 | - | - | - | 青 | - | - |
| 54 Bacillus cereus | FO013 | - | - | 薄黄緑 | 薄藤 | - | - |
| 55 Bacillus subtilis | LK1000 | 黄 | + | - | - | - | - |
| 56 Vibrio parahaemolyticus | SV11 | - | - | - | - | - | - |
| 57 Vibrio parahaemolyticus | 5FP10 | - | - | - | - | - | - |
| 58 Vibrio parahaemolyticus | SV20 | - | - | - | - | - | - |

a)CPSA:コアグラールゼ陽性ブドウ球菌、MRSA:メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 CNS:コアグラールゼ陰性ブドウ球菌

3.2 エンテロトキシン型別菌株の発育性

エンテロトキシン産生性の異なる黄色ブドウ球菌をMSEY, XSA, CSAおよびVJの4種の分離培地に等量ずつ接種して、24時間および48時間後の菌数を算出し発育性を比較した結果を表2に示した。XSA, CSAおよびVJ培地は24時間で特徴的な集落が確認できたが、MSEY培地では菌特有の卵黄反応を確認するには48時間かかった。各エンテロトキシン型別のMSEY培地の平均出現菌数を100とした場合、各分離培地での集落発現率はCSA培地が65, VJ培地が56とMSEY培地に比べ発育が抑制されたが、XSA培地では119で発育性に優れていた。エンテロトキシン陽性菌株のうちSEDではXSA培地の発育がMSEY培地の84と抑制されたが、CSA培地の54やVJ培地の51より発育性はよかった。SED以外の菌発育は同様の傾向を示し、エンテロトキシン型別の違いによる差は認められなかった。

3.3 黄色ブドウ球菌添加食品からの菌分離

黄色ブドウ球菌を添加した市販食品および調理済食品からの菌の検出結果を表3に示した。食品に黄色ブドウ球菌を1,000cfu/gになるよう接種したが、検出された菌量は少なかった。検出率が低いものはブルーベリーケーキ, トマトジュース, イタリアンドレッシング, 野菜いため, 味付けたこなどであったが、分離培地別の菌の発育性はMSEY培地での発育性を100とした時、XSA培地は207, CSA培地は84, VJ培地は73でXSA培地での発育性が優れていた。

3.4 各添加物質影響下の黄色ブドウ球菌の培地発育性

無菌マッシュポテトを疑似食品とし、これに5, 10, 30%砂糖, 5, 10, 20%食塩, 5, 10, 20%食用油を添加した試料を調整した。また滅菌PBSに各0.5, 5, 50, 500μg/mlのソルビン酸とエリソルビン酸, 1mg/mlの食用赤色3号を調製した。また、pHを3, 5, 7に調製したPBSを用い、各分離培地での黄色ブドウ球菌の発育性を比較した結果、食塩20%, ソルビン酸500μg/mlおよび食用赤色3号1mg/mlを添加した条件下では、24時間後黄色ブドウ球菌は発育しなかったが、ソルビン酸50μl/ml, 5μl/ml, 0.5μl/ml, エリソルビン酸50μl/ml, 5μl/ml, 0.5μl/ml, pHを3, 5, 7の試料では添加割合あるいはpHに関係なく検出できた。なお、砂糖5%, 10%, 30%, 食塩5%, 10%, 食用油5%, 10%, 20%も検出できたが、出現集落数は少なかった。分離培地の比較ではMSEY培地の発育集落数を100とした場合、XSA培地での発育集落数は124, CSA培地は93であった(表4)。

3.5 発色酵素基質培地からの直接迅速診断法

BHIで培養したSEA, SEB, SEC, SEDおよびエンテロトキシンA・B(SEA・B)の菌株を、XSA, CSA培地に塗抹し37℃24時間培養し、各培地に発育した集落を用い、エンテロトキシン産生性およびコアグラゼ試験を実施した。XSA培地とSEAを用いた場合の結果を図1に

示した。集落をBHIで培養して4時間目からエンテロトキシンが確認された。また、培地の集落から直接結合型コアグラゼを実施したところ、菌液は生理食塩水とスムーズに混和し、凝集反応が確認できた。

表2 エンテロトキシン型別の発育性

| 型 | 供試株数 | 対象培地 | | | |
|-------|------|-----------|-----|-----|----|
| | | MSEY(48h) | XSA | CSA | VJ |
| SEA | 18 | 100 | 109 | 78 | 45 |
| SEB | 15 | 100 | 120 | 68 | 46 |
| SEC | 15 | 100 | 135 | 42 | 57 |
| SED | 5 | 100 | 84 | 54 | 51 |
| ET(-) | 8 | 100 | 148 | 84 | 79 |
| 検出割合 | | 100 | 119 | 65 | 56 |

表3 食品からの黄色ブドウ球菌の分離

| 食品名 | 使用培地 | | | |
|-------------|-----------|------|------|-----|
| | MSEY(48h) | XSA | CSA | VJ |
| 白飯 | 9 | 29 | 8 | 2 |
| ごはん | 11 | 32 | 5 | 14 |
| はらこ飯 | 19 | 33 | 9 | 16 |
| おにぎり(鮭) | 15 | 37 | 14 | 15 |
| みそおにぎり | 20 | 21 | 18 | 4 |
| そば | 19 | 40 | 14 | 16 |
| サンドイッチ | 25 | 45 | 14 | 12 |
| 煮物 | 10 | 25 | 8 | 5 |
| 煮大根 | 12 | 25 | 12 | 4 |
| かぼちゃ煮物 | 4 | 26 | 14 | 5 |
| 煮豆 | 14 | 15 | 6 | 10 |
| 五目煮 | 11 | 41 | 11 | 16 |
| ほうれん草おひたし | 9 | 32 | 10 | 5 |
| 春菊ごま和え | 26 | 23 | 33 | 43 |
| カレー和え | 13 | 18 | 23 | 1 |
| カレー | 15 | 25 | 5 | 13 |
| メンチカツ | 9 | 42 | 11 | 1 |
| 鶏唐揚げ | 15 | 32 | 10 | 2 |
| 野菜炒め | 2 | 14 | 7 | 2 |
| きんぴら | 13 | 38 | 21 | 36 |
| 酢豚 | 8 | 21 | 6 | 4 |
| 味付けたこ | 4 | 16 | 6 | 2 |
| 竜田揚げ | 10 | 37 | 20 | 3 |
| ハンバーグ | 9 | 21 | 12 | 11 |
| 揚げギョーザ | 24 | 29 | 10 | 17 |
| ロールキャベツ | 7 | 27 | 6 | 5 |
| 天ぷら | 20 | 39 | 9 | 11 |
| オムレツ | 12 | 36 | 16 | 8 |
| 卵焼き | 11 | 16 | 10 | 14 |
| クリーム煮 | 14 | 12 | 6 | 2 |
| 豆腐 | 11 | 19 | 5 | 15 |
| 揚げ豆腐 | 10 | 12 | 7 | 0 |
| ロールケーキ | 5 | 17 | 9 | 11 |
| チーズケーキ① | 12 | 35 | 13 | 16 |
| チーズケーキ② | 15 | 27 | 14 | 14 |
| チーズケーキ③ | 15 | 39 | 19 | 10 |
| チョコレートケーキ | 3 | 31 | 7 | 12 |
| ビスケット | 13 | 35 | 7 | 12 |
| シュークリーム | 17 | 26 | 11 | 5 |
| ブルーベリーケーキ | 7 | 8 | 3 | 1 |
| まんじゅう | 13 | 22 | 12 | 4 |
| プリン | 6 | 29 | 13 | 15 |
| 豚肉 | 25 | 19 | 12 | 4 |
| ウインナーソーセージ | 13 | 31 | 15 | 3 |
| ピザ | 33 | 48 | 11 | 15 |
| 牛乳 | 9 | 11 | 4 | 6 |
| クリームチーズ | 24 | 36 | 11 | 12 |
| トマトジュース | 7 | 7 | 5 | 4 |
| イタリアンドレッシング | 9 | 11 | 1 | 3 |
| ごまドレッシング | 7 | 24 | 5 | 10 |
| 平均出現菌数 | 12.9 | 26.7 | 10.8 | 9.4 |
| 発育性 | 100 | 207 | 84 | 73 |

表4 各種添加物のSAの発育性に及ぼす影響(出現菌数)

| 材料 (接種菌量) | 添加物 | 濃度等 | 使用培地 | | |
|-----------------------|--------------|-----------|------|------|------|
| | | | MSEY | XSA | CSA |
| マッシュポテト (500cfu/g) | 砂糖 | 5% | 127 | 173 | 109 |
| | | 10% | 126 | 170 | 113 |
| | | 30% | 132 | 114 | 91 |
| | 食塩 | 5% | 47 | 56 | 50 |
| | | 10% | 22 | 38 | 14 |
| | | 20% | 0 | 0 | 0 |
| | 油 | 5% | 150 | 325 | 90 |
| | | 10% | 190 | 255 | 160 |
| | | 20% | 175 | 195 | 195 |
| 検出割合 | | | 100 | 137 | 85 |
| PBS (20000cfu/ml) | ソルビン酸 | 0.5 μg/ml | 780 | 850 | 810 |
| | | 5 μg/ml | 1190 | 1350 | 1490 |
| | | 50 μg/ml | 820 | 1060 | 820 |
| | | 500 μg/ml | 0 | 0 | 0 |
| | エリソルビン酸 | 0.5 μg/ml | 820 | 900 | 480 |
| | | 5 μg/ml | 720 | 910 | 790 |
| | | 50 μg/ml | 1250 | 1190 | 650 |
| | | 500 μg/ml | 380 | 550 | 470 |
| | 食用赤色3号 pH | 1mg/ml | 0 | 0 | 0 |
| 3 | | 330 | 330 | 260 | |
| 5 | | 650 | 1130 | 790 | |
| | 7 | 120 | 390 | 120 | |
| 検出割合 | | | 100 | 119 | 92 |

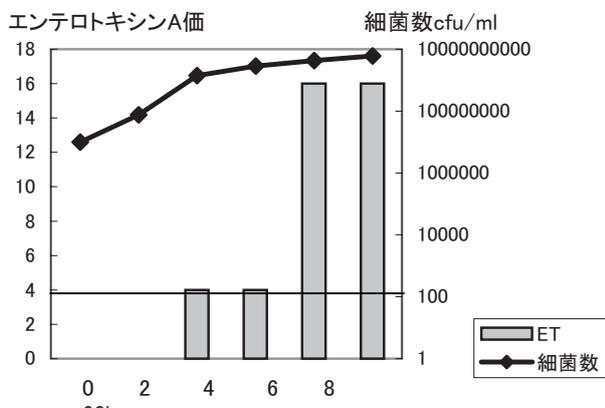


図1 エンテロトキシンA産生性

4 考察

黄色ブドウ球菌は臨床や環境からよく検出される細菌であり、化膿性疾患の原因菌であるだけでなく、敗血症および院内感染の原因菌としても重要で、近年はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が病院内に広く蔓延し医療上の大きな問題となっている。一方、本菌は食品中で増殖するとエンテロトキシンを産生し、嘔吐を主徴とする食中毒を引き起こす食品衛生上重要視される細菌でもある。黄色ブドウ球菌による食中毒は吐き気、嘔吐、腹痛、下痢等の症状が食品摂取後短時間で発現するため、原因推定食品や検査検体の入手は容易である。しかし、黄色ブドウ球菌の場合は健康なヒトでもふん便中にかなりの割合で黄色ブドウ球菌を保有し市販食品でも10%前後に汚染が認められることから¹⁾ 食中毒の原因物質として特定するためには推定原因食品および患者材料から高率かつ多数の黄色ブドウ球菌が検出され、エンテロトキシンが検出されることが必須である。エンテロトキシン自体の毒性検査は煩雑で時間がかかるため、エンテロトキシンの証明の検査は通常遺伝子解析手法により検査の迅速化が進められている。それゆえ黄色ブドウ球菌検査における更なる迅速化は菌分離の短縮化と言える。通常黄色ブドウ球菌の検査にはMSEY培地が用いられ、培地

上で黄色集落を形成し、周囲に卵黄反応による白濁環を示すことで、コアグララーゼ陰性の他のブドウ球菌等と区別される。しかしMSEY培地での黄色ブドウ球菌分離には48時間の培養を必要とする。さらにはラテックス凝集反応やコアグララーゼテストなどにより当該菌であることを確認するため、MSEY培地から非選択培地へ継代が必要で、検査に時間を要する。近年、20~24時間で菌分離が可能とされるXSA培地、CSA培地およびVJ培地が開発されている。XSAとCSA培地はともに発色酵素基質培地で、発育集落の色調で他の菌との鑑別が容易である。また、VJ培地は亜テルル酸カリウムを添加した、コアグララーゼ陽性菌のみ発育する培地とされている。本研究では、菌分離の迅速化を目的とし各培地の有用性を22菌種について比較検討した。黄色ブドウ球菌以外の28菌株の発育は、腸内細菌科10菌種13菌株、*Vibrio parahaemolyticus* 3株がいずれの培地でも発育が抑制された。発育した集落が黄色ブドウ球菌と鑑別できないものはMSEY培地では*Lactococcus*属、*Micrococcus*属、*Bacillus cereus*各1株ずつ、XSA培地では*Lactococcus*属1株のみ、VJ培地では*Lactococcus*属1株と*Micrococcus*属1株でCSA培地ではすべて鑑別が可能であった。黄色ブドウ球菌20株をみると、MSEY培地が鑑別困難であるのに対し、XSA培地とCSA培地の発色酵素基質培地ではCNSは発育しないか発色が別の色で容易に区別でき、VJ培地は集落周囲の黄色のハローが微妙で鑑別が困難であった。また、近年問題となっているMRSAの分離ではXSA培地、CSA培地、VJ培地で黄色ブドウ球菌として分離できるが、MSEY培地で卵黄反応を示さず、分離対象集落の特徴を示さない株があった。

黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシンにはいくつかの型がある。今回SEA, SEB, SEC, SEDのエンテロトキシン産生菌株および非産生菌株SENについて各培地での発育性の相違を検討したが、型別で差違は認められなかった。

実際の市販食品あるいは調理食品での発育性に及ぼす影響を各培地での発育性ととも検討した。その結果、栄養、水分活性、食塩や糖類、pH、混在する細菌やガス分圧など各因子が複雑に影響すると思われる、食品からの黄色ブドウ球菌の分離率は全般に低かったが、MSEY培地での分離を100とした場合、検出率が上回ったのはXSA培地の207、CSA培地は84、VJ培地は73であった。また、食塩と糖類、油分、食品保存料としてソルビン酸、酸化防止剤としてエリソルビン酸、着色料として食用赤色3号を添加した場合および各pHでの菌分離について比較した。20%食塩や赤色3号1mg/mlといった通常の食品の添加量を超えた条件では黄色ブドウ球菌はいずれの培地でも発育しなかった。しかし、それ以外の条件では菌は発育し、XSA、CSA培地はともにMSEY培地と同等またはそれ以上に発育した。CSA培地は咽頭ぬぐい液や痰等の臨床検体からの菌分離に優れているとの報告

はあるが²⁾、雑菌で汚染された食品や菌の増殖を抑制する添加物を含む食品でもMSEYと同等に検査できることが分かった。

黄色ブドウ球菌検査で迅速化を図るためには、MSEYなどの分離培地上の集落から直接コアグラゼ試験等が実施できることが1つにあるが、MSEY培地上の集落を直接用いると粘着性を有するため菌が均一にならず、凝集試験が不明瞭となる。普通寒天培地などの非選択性の培地に継代が必要となる。しかし、XSA、CSA培地の発色酵素基質培地上集落を直接用いてラテックス凝集テストやコアグラゼテストを行った結果、これらは直接スライド凝集反応ができ、更に集落を釣菌し、BHIで4時間以上の振盪培養でエンテロトキシン型別試験が可能であった。

結果をまとめると、発色酵素基質培地のXSA培地やCSA培地は約20時間培養で従来用いてきた48時間培養の

MSEY培地と比較して菌の分離に優れ、現在問題となっているMRSAも分離できた。調理食品や添加物を含む食品からの検出比較もMSEYより優れた。さらに培地上の集落を直接性状試験等に用いることができ、トータルでMSEY培地の従来法より2日程度検査時間を短縮することができ、判定の迅速性が高かった。今後は、実際の食中毒検査や食品収去検査にこれらの培地を併用して効果を検証していきたい。

参考文献

- 1) 坂崎利一：食中毒 中央法規出版株式会社 p334 (1981)
- 2) Diane Flayhart, Clara Lema, Anita Borek, Karen C.Carroll : Journal of Clinical Microbiology, 42 3566 (2004)