

米飯における黄色ブドウ球菌の食中毒発生要因の検討

Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*, under various culture conditions in rice

坂上 亜希恵 中村 久子*1 小林 妙子 渡邊 節 島山 敬

Akie SAKAGAMI, Hisako NAKAMURA, Taeko KOBAYASHI, Setsu WATANABE,
Takashi HATAKEYAMA

食品の製造・保管時における食中毒発生要因を検討するため、食中毒事件由来黄色ブドウ球菌（エンテロトキシン A 産生株）を供試菌とし、米飯（容器包装詰加圧加熱殺菌食品）へ接種した。培養開始時の菌数・温度・米飯の種類等の条件を設定し、菌数とエンテロトキシン量を経時的に測定した。その結果、培養開始時菌数、温度に加え米飯の種類によりエンテロトキシン産生量が異なることが明らかになった。また、製造直後に電子レンジによる加熱を行った検体は 24 時間培養後も菌数やエンテロトキシンが検出されなかったことから、菌数抑制に一定の効果があることが示唆された。

キーワード：黄色ブドウ球菌；食中毒；おにぎり

Key words : *Staphylococcus aureus* ; foodborne diseases ; rice ball

1 はじめに

黄色ブドウ球菌による食中毒の原因食品は、おにぎり・寿司などの米飯類の他、肉・乳・卵などの調理加工品、菓子類など多岐にわたる。黄色ブドウ球菌が産生する毒素であるエンテロトキシンは耐熱性が高く、通常の加熱調理では活性を失わないため、食品中で毒素を産生させないように、汚染や増殖を防ぐことが重要である。黄色ブドウ球菌による食中毒は、過去には年間 200 件以上発生していたが、近年では衛生的な取扱いや適切な保存管理により事例数は減少しつつある。しかし、依然として毎年食中毒の発生が見られ、2000 年代には加工乳による全国的な食中毒事例の原因菌となり、本県においてもソフトクリームやおにぎりによる食中毒事例がある。

宮城県ではお祭りやイベントへの屋台等の出店（仮設店舗）に際しては、食中毒予防の観点から提供できる食品に制限を設けている。しかし、「仮設飲食店等事務取扱要領の取扱いについて」（平成 26 年 12 月 1 日付食と暮号外）により、これまで提供できなかったおにぎりの製造販売が条件付きで新たに認められることとなった。これにより、不適切な取扱いによる食中毒発生が懸念され、改めて注意喚起を行う必要があると考えられた。そこで、製造および保管における様々な要因が食品に与える影響を調査し、黄色ブドウ球菌による食中毒発生のリスクを明らかにすることを目的として本調査を実施した。

2 材料および方法

2.1 対象

供試菌：当所に保存されている黄色ブドウ球菌による食中毒事件由来株（エンテロトキシン A 産生）を用いた。

逆受身ラテックス凝集反応によるブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット SET-RPLA（デンカ生研）を用い、エンテロトキシン A 産生を再度確認した。

供試検体：容器包装詰加圧加熱殺菌食品の米飯を用いた。白米については実際のおにぎりに準じ、塩分濃度が 1% になるよう NaCl を添加した。

2.2 方法

2.2.1 培養による菌数推移と温度の検討

供試菌をブレインハートインヒュージョンブイヨン（BHI ブイヨン）で一夜振とう培養後、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で段階希釈した菌液を 10^6 CFU/g、 10^4 CFU/g となるよう白米 10 g へ接種した。接種直後、培養開始 6 時間後、24 時間後の各検体 10 g に、滅菌 PBS90 mL を加え、ストマッカー処理を行い 10 倍希釈液とした。10 倍希釈液を滅菌 PBS で段階希釈し、0.1 mL を卵黄加マンニット食塩培地 2 枚に接種し、36°C で 48 時間培養した。培地上に発育したマンニット陽性および卵黄反応陽性のコロニーを算定し、検体 1 g あたりの菌数を求めた。エンテロトキシン量は、10 倍希釈液を用い、エンテロトックス F（デンカ生研）で測定した。キットの感度は 0.1 ng/mL とし、1 mL あたりの量を求めた。各条件の検体数は $n=3$ とし、培養温度は 30°C と 36°C に設定した。菌を添加しない検体を陰性対照とした。

2.2.2 米飯の種類別の検討

米飯の種類による菌の増殖と毒素産生への影響を検討するため、供試検体として白米ととり五目ご飯を用いて試験を実施した。検体 10 g へ調整菌液を 10^6 CFU/g となるよう接種し、接種直後、培養開始 2 時間後、4 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後に 2.2.1 と同様に菌数とエンテロトキシン量を測定した。各条件の検体数は $n=3$ とし、培養温度は 36°C に設定した。菌を添加しない

*1 現 仙台保健福祉事務所若沼支所

検体を陰性対照とした。

2.2.3 加熱による影響の検討

培養前後の加熱による菌の増殖と毒素産生への影響について検討するため、菌液添加後に電子レンジによる加熱（500 W, 1分）を行った検体と、培養開始 24 時間後に電子レンジによる加熱を行った検体を作成し、培養開始 24 時間後の菌数とエンテロトキシン量を 2.2.1 と同様に測定した。供試検体は白米を用い、実際のおにぎりの重量（約 100 g）により近づけるため、検体 50 g へ調整菌液を 10^6 CFU/g となるよう接種した。各条件の検体数は $n=2$ とし、培養温度は 36°C に設定した。加熱を行わない検体を陽性対照とした。

また、培養開始時の菌数による違いを検討するため、 10^8 CFU/g から 10^3 CFU/g までの各検体を作成し、培養開始 24 時間後に電子レンジによる加熱を行い、菌数とエンテロトキシン量を同様に測定した。

2.2.4 加熱条件の検討

加熱条件による毒素への影響について検討するため、検体 50 g へ調整菌液を 10^6 CFU/g となるよう接種し、培養開始 24 時間後に電子レンジによる加熱（500 W, 1分）を行った検体と、煮沸（2分, 5分）を行った検体を作成し、菌数とエンテロトキシン量を 2.2.1 と同様に測定した。供試検体はとり五目ご飯を用いた。また、供試菌を BHI ブイヨンで一夜振とう培養した菌液 1 mL について同様の条件で加熱を行い、エンテロトキシンを SET-RPLA を用いて確認した。加熱を行わない検体および菌液を陽性対照とし、陰性対照として水を用いて中心温度を測定した。

3 結果

3.1 培養による菌数推移と温度の検討

培養開始時の菌数と温度の検討では、時間経過に伴う菌数およびエンテロトキシン量の推移は 30°C 培養より 36°C 培養で増加傾向であった（図 1）。また、培養開始時の菌数が 10^6 CFU/g の検体において、 36°C で 6 時間培養後に 1.0 ng/mL のエンテロトキシン量となった。陰性対照では黄色ブドウ球菌およびエンテロトキシンは検出されなかった。

3.2 米飯の種類の見直し

米飯の種類による菌の増殖と毒素産生への影響の検討では、白米よりとり五目ご飯において、時間経過に伴う菌数およびエンテロトキシン量の増加が多い傾向であった（図 2）。陰性対照では黄色ブドウ球菌およびエンテロトキシンは検出されなかった。

3.3 米飯の種類の見直し

培養前後の加熱による菌の増殖と毒素産生への影響の検討では、陽性対照において培養開始から 4 時間後にエンテロトキシン量が 1.0 ng/mL に達した（表 1）。

菌液添加時に電子レンジによる加熱を行った検体、培養開始から 24 時間後に電子レンジによる加熱を行った

検体ともに黄色ブドウ球菌およびエンテロトキシンは検出されなかった。また、培養開始時の菌数に関わらず、培養開始から 24 時間後に電子レンジによる加熱を行った検体は黄色ブドウ球菌およびエンテロトキシンは検出されなかった。

3.4 加熱条件の検討

加熱条件による毒素への影響の検討では、菌液ではいずれの加熱条件後もエンテロトキシンが検出されるのに対し、検体では検出されなかった（表 2）。検体の陰性対照においては、電子レンジ加熱後に中心温度が 94°C 、煮沸では 4 分で 85°C に達した。菌液の陰性対照においては、電子レンジ加熱 40 秒で沸騰が見られ、煮沸では 2 分 20 秒で 85°C に達した。

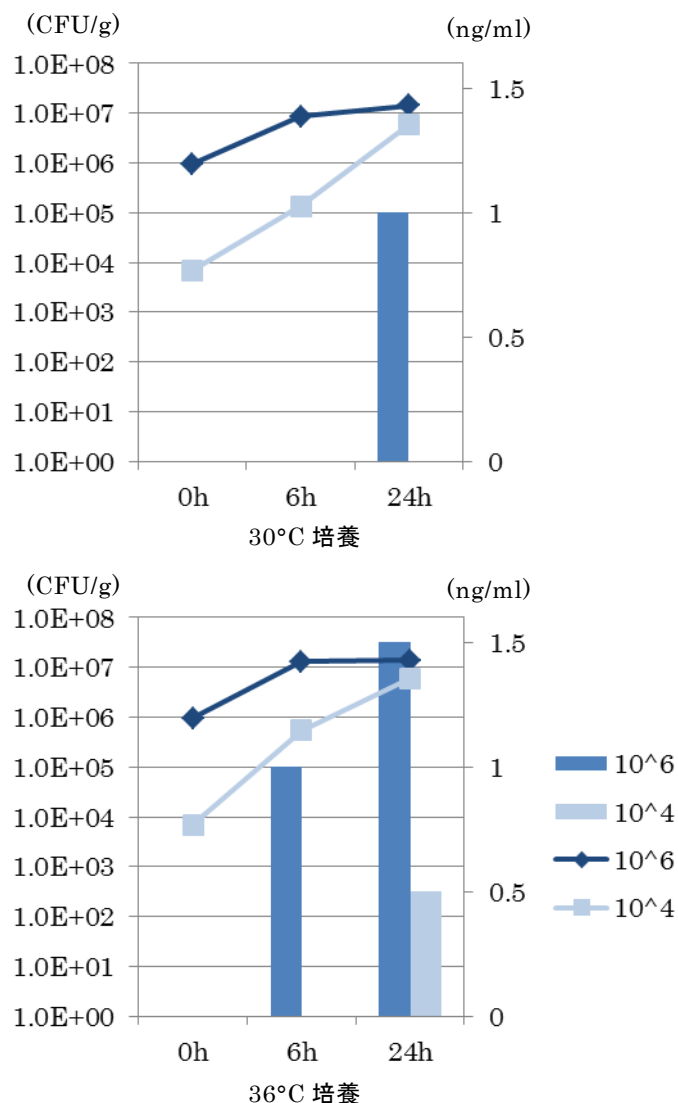


図 1 培養による菌数推移と温度（上： 30°C 培養，下： 36°C 培養）

$n=3$, 折れ線グラフ：菌数，棒グラフ：エンテロトキシン量

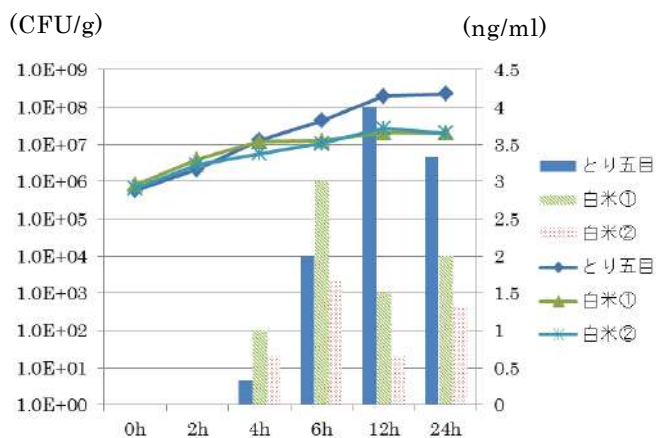


図 2 米飯の種類による比較

36°C 培養, n=3, 折れ線グラフ: 菌数, 棒グラフ: エンテロトキシン量

表 1 菌数とエンテロトキシン量の推移 (n=2)

	菌数 (CFU/g)	エンテロトキシン量 (ng/mL)
接種直後	8.0×10 ⁵	0
2 時間後	3.9×10 ⁶	0
4 時間後	1.2×10 ⁷	1.0
6 時間後	1.2×10 ⁷	3.0
12 時間後	2.1×10 ⁷	1.5
24 時間後	2.0×10 ⁷	2.0
加熱 (培養前)	0	0
加熱 (培養後)	0	0

表 2 加熱条件による菌数とエンテロトキシン量 (n=1)

検体	菌数 (CFU/g)	エンテロトキシン量 (ng/mL)
未処理	3.7×10 ⁸	2.0
電子レンジ	0	0
煮沸 (5 分)	0	0
煮沸 (2 分)	2.4×10 ²	0
菌液		
未処理	NT	4.0≦
電子レンジ	NT	4.0≦
煮沸 (5 分)	NT	4.0≦
煮沸 (2 分)	NT	4.0≦

NT; Not tested

4 考察

黄色ブドウ球菌によりヒトが発症する最小エンテロトキシン量は約 100 ng と推定されており, 菌が食品中で増殖し 10⁶~10⁸ CFU/g 以上になると, その過程で産生されるエンテロトキシンが発症量に達すると考えられている¹⁾。

時間経過に伴う菌数およびエンテロトキシン量の推移は, 培養温度が高く, 培養開始時の菌数が多い検体が, より短時間で食中毒を起こすエンテロトキシン量 (1.0 ng/mL, おにぎり 1 個あたり約 100 ng) に達した。

米飯の種類を検討では, とり五目ご飯が白米よりも菌数およびエンテロトキシン量がより増加する傾向であった。全国の食中毒統計資料においても, チャーハン, 炊き込みご飯のおにぎり, 西日本特有のかしわおにぎり (しょう油と鶏肉の炊き込みごはんのおにぎり) が黄色ブドウ球菌食中毒の原因食品として散見されることから²⁾, 白米のみのおにぎりよりも注意が必要な食品であると推察される。以上より, 培養開始時菌数, 温度および米飯の種類がエンテロトキシン産生量の大きな要因と考えられた。

過去の報告では, 培養開始時の菌数が 10⁴~10⁵ CFU/g 程度になるよう米飯へ接種した検体においても, 培養開始から 4 時間後には菌数が 10⁷ CFU/g 以上となり, 食中毒を起こすエンテロトキシン量に達した例がある³⁾。本調査でも同様の菌数で保存試験を行ったが, 同様の結果は得られなかった。これは, 食品の水分活性, pH, 塩分量, 食品成分, 細菌叢等が複雑に関与するためと言われており⁴⁾, 製造条件により菌の増殖速度やエンテロトキシン産生性が異なることによると考える。

また, 菌液添加後に電子レンジによる加熱を行った検体は培養開始から 24 時間後も黄色ブドウ球菌やエンテロトキシンが検出されなかったことから, 菌数抑制に一定の効果があることが示唆された。一方, 培養開始から 24 時間後に加熱を行った検体は, 培養開始時の菌数や加熱条件に関わらず, エンテロトキシンが検出されなかった。しかし, 未処理の検体および菌液での加熱実験において, エンテロトキシンが検出されており, 過去の報告でも電子レンジ加熱後の検体でエンテロトキシンが検出されている例があることから³⁾, 何らかの原因で検体においてエンテロトキシンが検出できなかったものと考えられるが, 詳細は不明である。

宮城県では, 仮設店舗での米飯の提供について, これまで「仮設飲食店等事務取扱要領の改正について」(平成 22 年 3 月 24 日付食と暮第 681 号)に基づき, 「原則としてその場で喫食させるものとし, 概ね炊飯後 2 時間以内に使い切ること」と指導を行っている。本調査において, 最短で 4 時間後に食中毒を起こすエンテロトキシン量に達する検体が確認されたことから, この指導の科学的根拠として少なからず寄与できるものと考えられる。さらに, 仮設店舗においては, 通常の製造環境と異なる屋外等で調理や陳列が行われ, 普段食品業務に携わっていない不慣れた従事者も散見される。本調査では供試検体として無菌である容器包装詰加圧加熱殺菌食品を用いたが, 実際の製造・保管工程ではより菌の付着や増殖が起こる危険性が考えられる。

提供される食品の種類は年々多岐に及んでおり、その全てにおける食中毒発生リスクを明らかにすることは困難ではあるが、食品の調理加工、製造、保管や販売工程の各段階において、対象とする危害に応じて HACCP 等を用いたポイントを押さえた衛生管理を行うことが重要である。

参考文献

- 1) 社団法人畜産技術協会：“平成 21 年度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書」”(2010)
- 2) 厚生労働省：“4. 食中毒統計資料 (3) 過去の食中毒事件一覧”，
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bu>

<http://www.fda.go.jp/kenkou/iryoushokuhin/syokuchu/04.html> ,

(2018 年 8 月確認)

- 3) 須藤律子，町田 護，久保雅敏，山口道子，松本寿男，佐藤和雄：平成 8 年度全国食品衛生監視員研修会発表等抄録，98 (1997)
- 4) 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 (1980)