

マイクロプレートDNA/RNAサンドイッチハイブリダイゼーション法を用いた黄色ブドウ球菌迅速検出キットの評価

小岩井健司 内村真佐子, 久門 勝利, 鶴岡 佳久¹⁾

Evaluation of a Rapid *Staphylococcus aureus* Detection Kit by the Colorimetric DNA/RNA hybridization Method in Microtiter Wells

Kenji KOIWAI, Masako UCHIMURA, Katsutoshi KUMON and Yoshihisa TSURUOKA

1 はじめに

食品の安全性を求める場合、食品中に存在する病原微生物の検索は当然のことながら迅速性が要求される。近年の分子遺伝学の発展は多くの病原微生物に対して迅速な検査法を提供してきた。特に、サルモネラあるいは腸管出血性大腸菌O157などでは数多くの迅速検査法が報告¹⁻³⁾されている。しかしながら、黄色ブドウ球菌(以下黄色ブ菌)は主要な食中毒起因菌ではあるが迅速検査法の報告あまりされていないのが現状である。

今般、黄色ブ菌のrRNAをターゲットとし、マイクロプレート内でDNA/RNAハイブリダイゼーションを行う黄色ブ菌迅速簡易検出キット「核さんテスト 黄色ブドウ球菌：日本製粉(株)」を使用する機会を得た。そこで各種の食品と食中毒の喫食残品等の検査に本キットを使用した成績について報告する。

2 材料および方法

1) 黄色ブ菌検出用キット

23S rRNAの黄色ブ菌特異領域をターゲットとしたDNA/RNAサンドイッチハイブリダイゼーションによる検出キット「核さんテスト 黄色ブドウ球菌：日本製粉(株)」(以下キット)を使用した。

2) キットの特異性と検出感度

キットの特異性は、当所に保存してあった食中毒あるいは食品由来の黄色ブ菌80株、その他の細菌5株(表1)を用いて行った。検出感度は以下の方法で測定した。

① 菌株間の誤差をなくすために、黄色ブ菌5株をトリプトソイブイオン(以下TSB)と黄色ブ菌の増菌培養に使用される7.5%NaCl加TSBで37℃、20時間振盪培養し、TSB培養液はTSBで、7.5%NaCl加TSB培養液は7.5%NaCl加TSBで10倍段階希釈し、10¹から10⁸cfu/mlの菌液を調製した。この菌液を用いて検出感度と測定時における食塩の影響を観察した。

② 市販のケーキ、トリ肉およびおにぎりの10%乳剤に黄色ブ菌を段階的に添加して10¹から10⁸cfu/gの試料を作成し、食品中での検出感度を測定した。また、この黄色ブ菌添加食品5mlを45mlの7.5%NaCl加TSBで37℃、24時間増菌培養し、キッ

ト法と培養法による増菌後の黄色ブ菌の検出を試みた。

③ 黄色ブ菌95013株(エンテロトキシンB産生株)および3-12株(エンテロトキシン非産生株)をTSBで37℃、20時間培養した培養液と95013株をおにぎりの10%乳剤10mlに添加し、37℃、20時間培養した試料についてキットによる測定とエンテロトキシンの検出を行った。次いでそれぞれを95℃、10分加熱し、試料加熱後のキットの反応性とエンテロトキシンの検出を試みた。なおこの実験は、加熱直後と加熱後室温および5℃に4日間保存後に測定した。

3) 食品からの黄色ブ菌の検出

市販のサラダ、カット野菜20件、学校給食の惣菜19件、調理パン21件、豚肉20件および牛肉24件、計104検体について、キット法と卵黄加マンニット食塩寒天培地による直接培養法、7.5%NaCl加TSB培地による増菌(食品の10%乳剤1mlを使用)後培養法とキット法による検査を行い、それぞれの検出率の比較を行った。

4) 食中毒への応用

千葉県内で発生した食中毒の喫食残品あるいは同一ロット品を用いて、本キットの有用性を検討した。

3 成績

1) キットの特異性

本キットで黄色ブ菌80株はいずれも陽性の結果が得られた。一方、黄色ブ菌の類縁菌や*Streptococcus* sp.等はすべて陰性であり、本キットの特異性が確認された。(表1)

表1 「核さんテスト・黄色ブドウ球菌」の特異性

| 供試株 | 菌株数 | 陽性 陰性 | |
|-----------------------------------|-----|-------|----|
| | | 陽性 | 陰性 |
| 黄色ブドウ球菌 | 80 | 80 | 0 |
| その他の細菌 | 5 | 0 | 5 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | | |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> | | | |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | | |

2) 検出感度

使用説明書に従い、650nmにおける吸光度0.05以上を陽性とした場合、図1に示すようにTSB中の黄色ブ菌はおよそ10⁵cfu/ml以上の菌量で陽性の結果が得られた。また、図には示さな

千葉県衛生研究所

1) 現木更津保健所

(2000年11月10日受理)

いが7.5%食塩加TSB中でもほぼ同様な検出感度が得られ、本キットに対する食塩の影響は認めなかった。

図2に食品の10%乳剤に黄色ブ菌を添加した場合の検出感度を示す。トリ肉でやや感度の低下がみられたがTSBの場合とほぼ同様な検出感度を示した。

表2は検体を加熱し、菌が培養で検出できない状況下でのキットの反応性をみたものである。95013株、3-12株の培養液および95013株をおにぎり中で培養した検体は培養法、キット法とも黄色ブ菌陽性の結果が得られた。また、95013株の培養液からはエンテロトキシンBが検出されたが、同菌を添加したおむすび中ではエンテロトキシンは検出されなかった。これらの検体を95℃、10分間加熱後黄色ブ菌の検出を試みたところ、培養法では3検体とも陰性となったが、キット法では加熱直後および表には示さないが室温、5℃に4日間放置した後の検体のいずれもが陽性であった。さらに、95013株の培養液中のエンテロトキシンも陽性であった。

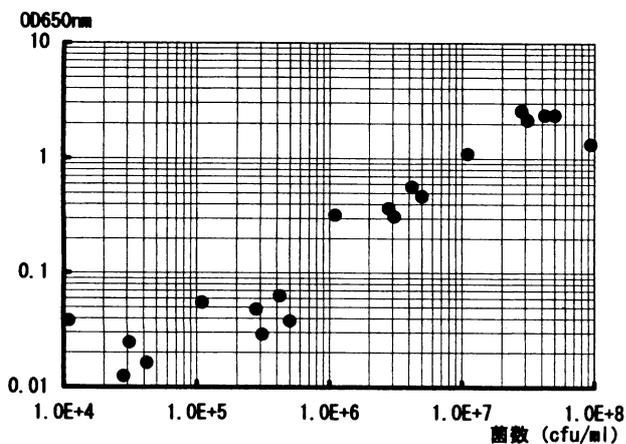


図1 培養液中の黄色ブドウ球菌検出感度

3) 食品への応用

各種の食品104検体を検査した結果を表3に示す。サラダ・カット野菜と学校給食の総菜は培養法、キット法とも黄色ブ菌はすべて陰性であった。調理パンは直接培養法では8検体が陽性となったが、キット法ではすべて陰性であった。直接培養法で黄色ブ菌が陽性となった検体中の菌数を測定したところ、いずれも10³cfu/g以下と本キットの検出限界以下であり、このため陰性になったものと考えられた。この調理パンを増菌培養したところ、培養法、キット法とも同一の9検体が陽性となった。

豚肉及び牛肉では、直接培養法でそれぞれ1検体が陽性となったが、キット法は陰性であった。このときの黄色ブ菌数は調理パンと同様に10³cfu/g以下であり、本キットの検出限界以下であった。これらの検体を増菌培養した結果、培養法、キット法とも4検体が陽性となった。ただ、調理パンと豚肉及び牛肉では陽性結果に差が認められた。すなわち、調理パンでは増菌培養後の陽性検体は培養法、キット法とも全く同じであったが、豚肉と牛肉で

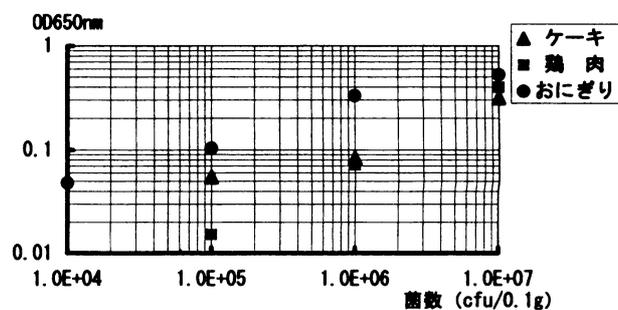


図2 食品中での黄色ブドウ球菌検出感度

表2 加熱死菌との反応性

| 試料 | 加熱前 | | | 加熱 (95℃, 10分) 後 | | |
|-------|-----------------------|--------------------|--------------|-----------------|--------------------|--------------|
| | 培養法 (cfu/ml) | キット法 (OD 650nm) | エンテロ トキシン | 培養法 (cfu/ml) | キット法 (OD 650nm) | エンテロ トキシン |
| 95013 | 1.0×10 ⁸ < | 0.944 | + | 0 | 0.972 | + |
| 3-12 | 1.0×10 ⁸ < | 0.739 | - | 0 | 0.941 | - |
| おにぎり | 1.0×10 ⁸ < | 0.871 | - | 0 | 1.148 | - |

ブローブ法 : 0.05 以上陽性

表3 各種食品からの黄色ブドウ球菌の検出 (培養法とキット法の比較)

| 検体名 | 検体数 | 結果 | 直接法 | | 増菌法 | |
|-----------|-----|----|-----|------|-----|------|
| | | | 培養法 | キット法 | 培養法 | キット法 |
| サラダ・カット野菜 | 20 | 陽性 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 陰性 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 学校給食総菜等 | 19 | 陽性 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 陰性 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| 調理パン | 21 | 陽性 | 8 | 0 | 9 | 9 |
| | | 陰性 | 13 | 21 | 12 | 12 |
| 豚肉 | 20 | 陽性 | 1 | 0 | 4 | 4 |
| | | 陰性 | 19 | 20 | 16 | 16 |
| 牛肉 | 24 | 陽性 | 1 | 0 | 4 | 4 |
| | | 陰性 | 23 | 24 | 20 | 20 |
| 計 | 104 | 陽性 | 10 | 0 | 17 | 17 |
| | | 陰性 | 94 | 104 | 87 | 87 |

は培養法とキット法の陽性結果が一致しない結果が得られた。1例は増菌培養を行ったにもかかわらず菌数がキットの検出限界以下までしか増加せず、培養陽性、キット陰性の検体で、豚肉、牛肉に共に1検体ずつ認められた。他の1例は卵黄反応陰性の黄色ブドウ球菌が検出された例であり、卵黄反応を指標として黄色ブドウ球菌を選択すると培養陰性、キット陽性となる場合があることも確認された。

4) 食中毒への応用

表4及び5に本キットを食中毒事例に応用した結果を示す。表4の事例では検体搬入当日にキット法で4検体が陽性となり、こ

のキットの検出感度から10⁶cfu/g以上の黄色ブドウ球菌の存在が推定され、黄色ブドウ球菌による食中毒の可能性が強く示唆される結果となった。実際に菌数を測定したところ、いずれも10⁶cfu/g以上であり、また、残品のおにぎりからエンテロトキシンA (160-320 ng/g) も検出された。

表5の事例では検査した検体からエンテロトキシンは検出されなかったものの、本キットによりハムカツと豚肉としらたきに10⁶cfu/g以上の黄色ブドウ球菌が存在することを検査開始後約3時間で推定する事ができ、黄色ブドウ球菌による食中毒の可能性を迅速に推定することが可能であった。

表4 食中毒事例への応用 I

| 検体 | 黄色ブドウ球菌数 (cfu/g) | キット法 | エンテロトキシン (ng/g) | コアグラーゼ型 |
|----------------|---------------------|------|-----------------|---------|
| おにぎり (鮭) : 残品 | 9.0×10 ⁴ | - | - | VII |
| おにぎり (梅) : 残品 | 陰性 | - | - | |
| おにぎり (梅) : 保存品 | 10 ⁸ < | + | - | VII |
| おにぎり (梅) : 保存品 | 1.1×10 ⁵ | - | - | VII |
| 鮭フレーク : 材料 | 2.8×10 ⁸ | + | - | VII |
| 鮭フレーク : 材料 | 3.4×10 ⁸ | + | - | VII |
| 卵焼き | 陰性 | - | - | |
| かまぼこ | 陰性 | - | - | |
| フライドポテト | 陰性 | - | - | |
| きんぴら | 5.7×10 ³ | - | - | VII |
| ウインナー | 陰性 | - | - | |
| たくあん | 陰性 | - | - | |
| おにぎり : 喫食残品 | 10 ⁸ < | + | A:160-320 | VII |

表5 食中毒事例への応用 II

| 検体 | 黄色ブドウ球菌数 (cfu/g) | キット法 | エンテロトキシン (ng/g) | コアグラーゼ型 |
|---------|---------------------|------|-----------------|---------|
| カレー | 陰性 | - | - | |
| 納豆 | 陰性 | - | - | |
| ハムカツ | 7.8×10 ⁸ | + | - | VI |
| 塩鮭 | 1.0×10 ⁴ | - | - | VI |
| カキ揚げ | 5.1×10 ³ | - | - | VI |
| 豚肉としらたき | 8.0×10 ⁸ | + | - | VI |
| 細切り昆布 | 1.0×10 ² | - | - | VI |
| 漬物 | 陰性 | - | - | |
| レタス | 陰性 | - | - | |

4 考察

近年の食品流通の形態は、食品中に存在する食中毒細菌の迅速な検出を要求している。従前のように培養法だけに頼る検査では、結果が明らかになったときにはその食品が既に食されている可能性が強いからである。

細菌のrRNAをターゲットとし、マイクロプレート内でDNA/RNAハイブリダイゼーションを行う迅速簡易検出キットとして既に「核さんテスト サルモネラ」が開発⁹⁾されているが、今回他の主要な食中毒起因菌である黄色ブドウ球菌について「核さんテスト黄色ブドウ球菌」を使用し、その特異性、検出感度等を検討した。さらに市販食品や黄色ブドウ球菌による食中毒事例で得られた残品等についても本キットを応用しその評価を行った。

まずキットの特異性について検討を行った。その結果、食品あるいは食中毒の患者や残品などを由来とする黄色ブドウ球菌は本キットですべて陽性の結果が得られた。一方、*Staphylococcus epidermidis*,

*S.intermedius*等のブドウ球菌属や*Bacillus cereus*等は陰性であり、本キットの特異性が確認された。次に本キットの検出感度測定したところ、およそ10⁵cfu/ml以上の黄色ブドウ球菌があれば目視によっても陽性と判定可能であった。また、わが国では黄色ブドウ球菌の増菌培地とし7.5%NaCl加TSBが使用⁹⁾されることが多いが、このNaCl濃度の影響を懸念して本キットの測定を行ったが、結果に影響はなく、7.5%NaCl加の増菌培地からの黄色ブドウ球菌の検出も可能であった。更に、食品中の黄色ブドウ球菌の検出感度を測定するために、食品の10%乳剤に黄色ブドウ球菌を添加し、黄色ブドウ球菌の検出を試みたところ、トリ肉でやや感度の低下がみられたがTSBの場合とほぼ同様な検出感度を示し、食品中の黄色ブドウ球菌の検査に十分使用できることが確認された。

これらの結果を基に、市販食品等からの黄色ブドウ球菌の検査に本キットを応用した。104検体について直接培養法とキット法で検査したところ、本キットで陽性となる検体は認められず、直接培養法でのみ9.6% (10/104) から黄色ブドウ球菌が検出された。このときの黄色ブドウ球菌数は、キットの検出感度である10⁵cfu/ml (0.1g) 以下

であった。一方、これらの検体を7.5%NaCl加TSBで増菌培養を行った場合は、培養法、キット法とも16.3% (17/104) の検体から黄色ブ菌を検出した。このように本キットを食品検査に応用するには増菌培養が必須と思われた。わが国では通常、食品中の黄色ブ菌の検査を行う場合、直接培養法のみで行われることが多い。しかし、今回の結果にみられるように、増菌培養を行うことにより検出率が9.6%から16.3%へと約1.7倍程度高くなったことを考えると、黄色ブ菌の検査は増菌培養も行うべきものと思う。その際、問題となるのは結果が得られるまでの時間であるが、本キットの様な迅速検査法を導入すれば直接培養法(卵黄加マンニット食塩寒天培地で24時間~48時間)と同等かより以前(増菌培養20時間~24時間とキットによる測定時間約3時間)に結果を得ることができるため大きな問題とはならないと考えられる。

このように本キットは、食品等の黄色ブ菌の管理に非常に有用と思われる。ただ、今回の検体では増菌培養を行ったにも関わらず、培養法陽性、本キット陰性の結果も認められた。これは増菌培養後でも 10^4 cfu/ml程度までしか菌数が増加しなかった検体であるが、損傷菌等の存在を考慮すると、増菌培地の改良や変更と共にキットの感度をより高めることも必要であろう。

本キットを黄色ブ菌の食中毒と推定された事例に応用した。黄色ブ菌の食中毒では残品等に本キットの検出感度以上に菌が存在していることが推定され、そのため検体搬入当日に黄色ブ菌の存在を確認できることが期待される。実際、本県で発生した1例では、エンテロトキシン⁹の存在と黄色ブ菌の存在が検体搬入当日に決定でき、他の1例でも、エンテロトキシンは検出されなかったものの黄色ブ菌の存在を速やかに明らかにすることができた。

この2事例では培養法によっても菌が確認されたが、黄色ブ菌の食中毒では食品などに対して加熱処理が行われたために、菌が検出されない事例⁹⁾も散見される。このような事例に本キットが応用可能であるか否かを試験した。その結果、黄色ブ菌の培養液

や菌が存在する食品を加熱した後、菌は分離されなくても黄色ブ菌の存在を推定することができた。これは原因決定の一助となる可能性を示すものである。

このように本キットは食品等の衛生管理や食中毒事例に十分利用できるものと思われた。

本論文の要旨は第18回日本食品微生物学会学術総会(平成9年12月、東京)で発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、食中毒事例に関する試料を提供いただいた船橋保健所、木更津保健所の関係者に深謝します。

5 文 献

- 1) 石崎直人, 金子誠二, 伊藤武(1993): PATH-STIK Rapid Salmonella Testによる鶏肉からのサルモネラ迅速検査法の検討, 食品と微生物, 9, 95-100
- 2) 伊藤武, 甲斐明美, 尾畑浩魅, 貫名正文, 黒木学, 仲西寿男(1997): 食品からの腸管出血性大腸菌O157検出法, 日本食品微生物学雑誌, 13(4), 205-219
- 3) 並松孝憲, 綱美香, 今井康雄, 布藤聡, 三瀬静男, 阪野哲也, 佐藤静男(1998): マイクロプレートDNA/RNAサンドイッチハイブリダイゼーション法を用いた, サルモネラ簡易検出キットの開発, 日本食品微生物学雑誌, 15(1), 47-53
- 4) 食品衛生検査指針微生物編: 厚生省生活衛生局監修, 日本食品衛生協会, 東京(1990)
- 5) 久門勝利, 小岩井健司, 鶴岡佳久(1996): 1995~96年に千葉県で発生した黄色ブドウ球菌による食中毒について, 千葉衛研報告, 20, 4-8