

ブドウ球菌食中毒に関する研究 (第1報)

環境由来株のエンテロトキシン産生性とその他の性質

松 浦 康

緒 言

ブドウ球菌食中毒は、日本においては、発生件数、患者数ともに第2位を占めている毒素型の細菌性食中毒であり、その原因食品は穀類とその加工品に多い傾向がみられる¹⁾。黄色ブドウ球菌の食品への汚染源はヒトである場合が多く、その対策を複雑にしている。食中毒の原因となるブドウ球菌は黄色種のうちのエンテロトキシン産生株であるが、従来はエンテロトキシンの検出が困難であったため、食中毒原因菌の検索は卵黄加マンニット食塩培地などの平板培地上での卵黄反応陽性コロニーについて、そのコロニーのコアグララーゼ産生性、マンニット分解性、食塩耐性およびその他の性質を検討することによって行ってきた²⁾。近年、免疫学的方法の開発により^{3,4)}、エンテロトキシンの検出が比較的容易となった。

そこで今回、健康なヒトが保有しているブドウ球菌について、エンテロトキシン産生性をはじめ生理的な性質を検討したので報告する。

実験方法

1 菌株の分離

健康な本学学生を対象として、1986年5月14日と1986年9月11日の2回に分けて、その鼻前庭と手指より拭き取り法により菌を採取し、卵黄加マンニット食塩寒天培地に塗抹した。38℃、36時間培養後、卵黄反応陽性株を釣菌し、更に48時間培養して、黄色色素を産生する株および、無色の株を釣菌し、それぞれを同一培地上で再分離後、保存菌株とした。

2 コアグララーゼの検出と型別

分離したブドウ球菌を普通寒天斜面培地に38℃、24時間培養し、その1白金耳をとり、市販のウサギブラズマを用いて試験管法で検出した。必要なものについては、ブレイン・ハートインフュージョン培地に38℃、24時間培養したものを3500rpm、15分間、遠心沈殿しその上清について、潮田の方法⁵⁾に従って、マイクロプレート上で

行った。すなわち、培養液上清を1滴ずつパスツールピペットで、マイクロプレートに分注し、それに型別血清を1滴ずつ加え、よく混和し、38℃、1時間、湿潤箱中で保温した後、20%ウサギブラズマ液2滴を加えて、混和し、湿潤箱中で38℃に保温し、72時間まで経続的に観察し、ゲル化していない血清型を、そのコアグララーゼ型とした。

3 タンパク質分解試験

スタヒロコッカスNo.110培地(ニッスイ製)上に菌を接種し、38℃、24時間培養後、飽和硫酸アンモニウム液を培地上に流し込み、10分後にコロニーの周囲に透明環ができたものを陽性とした。

4 マンニット分解性

マンニット培地(ニッスイ製)を平板とし、菌を接種して、38℃、24時間培養後、コロニーの周囲が黄色となったものを陽性とした。

5 溶血性試験

溶解して、60℃とした普通寒天培地に5%の割合に牛の血液(市販の脱繊維血液)を加えて平板とした血液寒天培地に菌を接種し(血液を加えた直後の培地を使用すること)、38℃、24時間培養した後、コロニーの周囲に溶血環のできたものを陽性とした。

6 カタラーゼの検出

普通寒天斜面培地に38℃、24時間培養した菌を白金耳でとり、3%過酸化水素水溶液中に投入し、直に盛んに発泡するものを陽性とした。

7 エンテロトキシンの検出と型別

ブレイン・ハートインフュージョン培地(栄研化学製)に菌を接種し、38℃、24時間培養後、3500rpmで15分間遠心沈殿した上清中に含まれるエンテロトキシンを逆受身ラテックス凝集反応⁴⁾によって検出した。培養上清1滴をパスツールピペットで小試験管中に採取し、稀釈液0.6mlを加えてよく混和したのち、その1滴ずつをパスツールピペットでマイクロプレートに分注し、市販の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㈱)のエンテロトキシン検出用ラテックス試薬

1滴ずつを加えて、よく混和後、室温に24時間静置し（湿潤箱中）たのち判定した。判定は、未感作ラテックス液では凝集がみられず、感作ラテックス液でのみ凝集のみられる場合を陽性とした。未感作ラテックス液に対して凝集がみられた場合は、被検液に未感作ラテックス液を等量加え、吸収操作により非特異凝集素を除去した液を用いた。

結果と考察

1 分離菌株の生理的性質

卵黄加マンニット食塩寒天培地に分離した菌株120株

表Ⅰ 鼻前庭ならびに手指より分離した黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生性と生理的性質

	試験菌株数		E T		コアグララーゼ	タンパク質	マンニット	DNase	溶血
卵黄反応陽性株	35	34	A, 25 AB, 8 ABC, 1		35	33	34	34	33
卵黄反応陰性・黄色色素産生株	20	6	A, 5 ABC, 1		9	6	11	6	7

試験菌株数以外の数値は陽性菌株数を示す。E T, エンテロトキシン。
A, AB, ABC, エンテロトキシン型。

表Ⅱ 鼻前庭ならびに手指より分離した黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型

試験菌株数	コアグララーゼ型								型別不能	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
卵黄反応陽性株	31*	0	6	6	0	0	0	11	0	8
卵黄反応陰性・黄色色素産生株	9	0	0	2	0	0	0	1	1	5

*表Ⅰのコアグララーゼ陽性株のうち、型別試験ができたもの。

卵黄反応陽性株は35株中34株がエンテロトキシンを産生し、コアグララーゼ産生性はじめ、その他の生理的性質もエンテロトキシン産生性とよく一致した。特に溶血反応もエンテロトキシン産生性とよく一致することを示した。一方、卵黄反応陰性であるが、黄色色素を産生する株は20株中6株がエンテロトキシンを産生し、卵黄反応陰性株もエンテロトキシンを産生することが示された。卵黄反応陰性で黄色色素を産生する株では、コアグララーゼ産生性、タンパク質分解性およびその他の生理的性質の陽性率が小さいが、この株のエンテロトキシン産生株との関連をみると(表Ⅲ)、コアグララーゼ産生性、タンパク質分解性などの陽性率は高くなり、間接的なエンテロトキシン産生性の検定の場合には、これらコアグララーゼ産

(1986年9月11日分離したもの)はすべて、グラム陽性の球菌であり、カタラーゼ陽性であった。このうち38株は卵黄反応陽性株であり、20株は卵黄反応陰性で黄色色素を産生するものであり、残り62株は卵黄反応陰性で、黄色色素も産生しないものであった。これらのうち卵黄反応陽性株のうち35株と黄色色素産生株20株について、タンパク分解性、マンニット分解性、DNase産生性、溶血性、コアグララーゼ産生性およびエンテロトキシン産生性とその型別について表Ⅰに示した。

表Ⅲ 卵黄反応陰性・黄色色素産生株のエンテロトキシン産生株の生理的性質

菌株番号	E T型	コアグララーゼ	タンパク質	マンニット	DNase	溶血
8614Y	A	+	+	+	+	+
8615Y	A	-	-	+	-	-
8618Y	A	+	+	+	+	+
8634Y	ABC	+	+	+	+	+
8641Y	A	+	-	+	+	+
8699Y	A	+	+	+	+	+

E T, エンテロトキシン。DNase, デオキシリボスクレアーゼ。

生性、タンパク質分解性などの性質を合わせ検査することが良好な結果を与えることがエンテロトキシンの産生性との関連で確かめられた。

2 分離菌株のコアグララーゼ型

卵黄反応陽性株と卵黄反応陰性・黄色色素産生株のコアグララーゼの型別の結果を表Ⅱに示した。自然界に分布する黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型はコアグララーゼⅠ型からコアグララーゼⅧ型まで分類されているが、善養寺⁵⁾は食中毒事例由来株のコアグララーゼ型は、Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅳ型およびⅦ型の4型に限られると報告している。今回鼻前庭と手指から検出された卵黄反応陽性株31株のうち6株がⅡ型、6株がⅢ型、11株がⅦ型であり、8株が型別不能であった。このように食中毒原性を有するとされて

いるコアグラゼ型の黄色ブドウ球菌が健康な人から高率に検出された。一方、これらの株はエンテロトキシンの産生性が証明されており(表I), 手指から食品へのブドウ球菌の汚染があれば、食中毒につながる可能性が大きいと考えられる。

3 黄色ブドウ球菌の保有

1986年5月14日分離の場合は、卵黄反応陽性菌株保有者は92名中23名であり、そのうち鼻前庭より21株、手指より7株が分離された。また、鼻前庭よりの21株中エンテロトキシン産生株は17株、手指からのものは7株中6株であった。

1986年9月11日分離の場合は、92名中卵黄反応陽性株保有者は34名であり、そのうち鼻前庭より分離されたもの26株、手指より分離されたもの12株であった。

1986年5月14日分離の場合と1986年9月11日分離の場合において、同一個体で鼻前庭または手指から両期日に関わってエンテロトキシン産生株が検出されたものは19例であり、5月14日のエンテロトキシン産生株保有者23名中19名が4ヶ月後においても保有していたことがわかった。

鼻前庭と手指の両方から同時にエンテロトキシン産生菌が分離された場合の両方の菌のコアグラゼ型とエンテロトキシン型の関係を表IVに示した。コアグラゼ型とエンテロトキシン型ともに、鼻前庭と手指の菌の間でよく一致し、両者の間に強い相関性が示された。従って、手指の場合、エンテロトキシン産生菌の保有率は小さいが、鼻前庭にその菌を保有する場合は常に手指への汚染の危険性が大きいと考えられる。

表IV 鼻前庭と手指から同時に検出された黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型とエンテロトキシン型

菌株番号	コアグラゼ型		エンテロトキシン型	
	鼻前庭	手指	鼻前庭	手指
8618	II	II	A	A
8621	III	III	A B C	A B C
8624-1* ¹	III	III	A	A
8625	III	III	A B C	A B C
8681	III	III	A C	A B C
8624-2* ²	III	III	A	A
8646	II	II	A B	A B
8654	VII	VII	A	A
8658	VII	VII	A B	-
8688	VII	VII	A	A

*1, 1986年5月分離。*2, 1986年9月分離

要 約

1 健康なヒトの鼻前庭から黄色ブドウ球菌を分離し、それらのエンテロトキシン産生性、コアグラゼ産生性およびその他の生理的性質を検討した。その中で特に、溶血性もエンテロトキシン産生性とよく一致することを示した。

2 卵黄反応陰性で、黄色色素を産生する株を20株分離した。そのうち6株はエンテロトキシンを産生した。

3 健康なヒトの手指からの食品への汚染が食中毒の発生につながる可能性のあることを、コアグラゼ型とエンテロトキシンの産生を証明することによって、改めて指摘した。

4 鼻前庭の菌と手指の菌は同一株であることを示した。従って、手指からの黄色ブドウ球菌の検出率は小さいが、鼻前庭にそれを保有する場合は(今回は26%の保有率)手指も汚染される可能性が大きい。また、エンテロトキシン産生株を長期にわたって保有することも明らかにした。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局食品衛生課編：全国食中毒事件録昭和53年，昭和59年，日本食品衛生協会。
- 2) 厚生省環境衛生局監修：食品衛生検査指針I，日本食品衛生協会，昭和48年，P135。
- 3) S. Yamada, H. Igarashi and T. Terayama: Improved reversed passive hemagglutination for simple and rapid detection of staphylococcal enterotoxins A~E in food: Microbiol. Immunol., 21, 675~682 (1977)。
- 4) 小田隆弘，大久保忠敬，永井誠，西本幸一，大丸健之助：ラテックス凝集反応を用いたブドウ球菌エンテロトキシンの食品等からの検出，福岡市衛試報，4，33 (1979)
- 5) 潮田 弘，寺山 武，坂井千三，善養寺浩：黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別簡易法とその応用，東京都衛研年報，26-1，1~6 (1975)。
- 6) 善養寺浩，寺山 武，潮田 弘，五十嵐英夫，丸山 務，坂井千三：ブドウ球菌食中毒に関する研究(第1報)，食衛誌，12，311~314 (1971)。

昭和61年11月29日受理