

【報文】

食品検体における黄色ブドウ球菌検査の迅速化および
特異性向上に関する合成酵素基質培地の検討

古川 理予¹, 中野 直人¹, 上野 克之^{1, 2},
石井眞砂美², 坂本 道生³, 金子 孝昌³

Evaluation of Chromogenic Medium for the Rapid and Presumptive
Identification of *Staphylococcus aureus* from Food Specimens

Riyo FURUKAWA¹, Naoto NAKANO¹, Katsuyuki UENO^{1, 2},
Masami ISHII², Michio SAKAMOTO³ and Takamasa KANEKO³

¹Sefco Foods Co., Inc., 1-1, Kouyoudai 1-chome, Ryugasaki City, Ibaraki 301-0852, Japan

²Senba Foods Co., Inc., Chiyoda BLDG. 5-18, Enrakucho 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0064, Japan

³Kanto Chemical Co., Inc., Marusan BLDG. 11-5, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku,
Tokyo 103-0023, Japan

I S S N 0385-5201

防 菌 防 黴 誌

Bokin Bobai

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

【報文】

食品検体における黄色ブドウ球菌検査の迅速化および 特異性向上に関する合成酵素基質培地の検討

古川 理予¹, 中野 直人¹, 上野 克之^{1, 2},
石井眞砂美², 坂本 道生³, 金子 孝昌³

Evaluation of Chromogenic Medium for the Rapid and Presumptive Identification of *Staphylococcus aureus* from Food Specimens

Riyo FURUKAWA¹, Naoto NAKANO¹, Katsuyuki UENO^{1, 2},
Masami ISHII², Michio SAKAMOTO³ and Takamasa KANEKO³

¹Sefco Foods Co., Inc., 1-1, Kouyoudai 1-chome, Ryugasaki City, Ibaraki 301-0852, Japan

²Senba Foods Co., Inc., Chiyoda BLDG. 5-18, Enrakucho 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0064, Japan

³Kanto Chemical Co., Inc., Marusan BLDG. 11-5, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku,
Tokyo 103-0023, Japan

CHROMagar Staph aureus (CSA), a new chromogenic medium, was more effective for the isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* than Mannitol Salt Agar (MSA) and Vogel-Johnson Agar (VJA). We conducted a preliminary study with 4 *S. aureus* stock strains inoculated on CSA. All *S. aureus* strains yielded mauve colonies after 24 hours incubation at 35°C and CSA supported their growth ability as well as MSA or VJA did. To evaluate the comparison between CSA and conventional media (MSA and VJA), we used quality control samples (n=454) for detection of *S. aureus* from April to July in 2003. The sensitivity and specificity of recognition of *S. aureus* on CSA were respectively 100%. The ability to detect *S. aureus* on CSA promises to improve and streamline the quality control of the work flow in the laboratories of the food industry.

(Accepted 3 December 2003)

Key words : *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) / Quality control (品質管理) / Chromogenic medium (合成酵素基質培地) / CHROMagar Staph aureus (クロモアガー・スタッフアウレウス).

緒 言

従来食品中の黄色ブドウ球菌の検査法¹⁾は、検体の10倍量の乳剤0.1mLを黄色ブドウ球菌選択分離培地に塗抹し、陰性であることを確認する方法が推奨されている。しかしながら、粉体食品中の本微生物汚染は、微量かつ不均一ではないかと思われる現象を何度も経験している。例えば、日

常品質管理検査にて陽性となったロットにおいて、再検査で陰転するという現象である。食品中の黄色ブドウ球菌の汚染は少量であっても、1) 過去に原料等が汚染された可能性を示唆していること、2) 本微生物が耐熱性の毒素型食中毒原因菌であることからより安定した高感度な検査法が必要と考え、本汚染を的確に把握できるよう増菌培養法を取り入れてきた。しかし、増菌培養法は高感度

¹セフコフーズ(株) 〒301-0852 茨城県竜ヶ崎市向陽台1-1-1 ☎0297-60-1300

²仙波フーズ(株) 〒101-0064 東京都千代田区猿楽町1-5-18 千代田ビル2階 ☎03-3295-7550

³関東化学(株) 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3-11-5 ☎03-3667-8061

化が得られる一方で、続く分離培養における偽陽性集落出現率が増加していた。選択分離培地は標的とする微生物を選択的に発育させるための組成が組まれているが、それ以外の供雑菌も発育し、しかも標的とする微生物と酷似する集落を形成することが多い。近年、大腸菌、大腸菌群検査をはじめとする多くの微生物検査に、合成酵素基質培地法が取り入れられるようになり、これら問題を軽減し、検査の簡易化・迅速化に貢献してきている。今般、我々は黄色ブドウ球菌に対する合成酵素基質培地であるクロモアガー・スタッフアウレウスを従来の分離培地と比較し、迅速かつ特異性の高い成績を得ることができたので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

Staphylococcus aureus ATCC25923, *S. aureus* FDA209P, *S. aureus* MS353, *S. aureus* Terajima をトリプトンソーヤ寒天培地 (TSA, 関東化学) にて35°Cで培養し、定常期のものを供した。

2. 供試検体

平成15年3月31日～7月24日における食品に供試する原料品質管理用検体を本検討に供した。

3. 選択分離培地の発育支持能試験

純培養した *S. aureus* 標準菌株を滅菌生理食塩水に懸濁し、McFarland 0.5に調製したものを浮遊原液とした。Miles-Misra 法²⁾に準じ、本浮遊原液を滅菌生理食塩水にて 10^{-8} まで10段階希釈し、マンニット食塩寒天培地 (MSA, 日本製薬)、フォーゲルジョンソン寒天培地 (VJA, 日本製薬)、クロモアガー・スタッフアウレウス (CSA, 関東化学) および TSA に一定量 (20 μ L) 滴下した。前者従来培地2種類の培養は35°Cにて48時間、後者は24時間行い菌数測定に供した。

4. 合成酵素基質培地法と従来法との比較試験

生理食塩水にて10倍希釈した試験液を用い、その5 mLを7%食塩

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Method 1	7%NaCl-TSB	MSA/VJA		TSA	Rapid agglutination Test
Method 2		CSA	Rapid agglutination Test		

Fig.1. Comparison of the work flow for *Staphylococcus aureus* detection in the two methods.

TSB, Tryptone Soya Broth; TSA, Tryptone Soya Agar; CSA, CHROMagar Staph aureus; MSA, Mannitol Salt Agar; VJA, Vogel-Johnson Agar

加トリプトンソーヤブイオン (TSB, 関東化学) 45mL にて35°C, 24時間増菌培養した。増菌培養後の培養液を、従来培地の MSA および VJA, 合成酵素基質培地として CSA へそれぞれ塗抹し、前者従来培地2種類は35°C, 48時間、後者は35°C, 24時間培養した (Fig.1)。各選択分離培地にて陽性が疑われる集落は、黄色ブドウ球菌の同定試験を行った。

5. 黄色ブドウ球菌の同定

各選択分離培地にて陽性を疑う所見が得られた場合、TSA にて35°C, 24時間純培養し、ドライスポットスタフィテクトプラス (関東化学) を用いて黄色ブドウ球菌表面抗原検査を行った。本検査キットにて検出される表面抗原には、クランピングファクターの他にプロテイン A および膜抗原が含まれる³⁾。表面抗原陽性の場合、グラム染色、遊離コアグラウゼ試験を実施し黄色ブドウ球菌の確定を行った。

Table 1. Growth ability of *Staphylococcus aureus* on CHROMagar Staph aureus, Mannitol Salt Agar and Vogel Johnson Agar after 2days incubation at 35°C.

Strain	<i>S. aureus</i> counts $\times 10^8$ CFU/mL			
	TSA	CSA ^{*1}	MSA	VJA
<i>S. aureus</i> ATCC25923	8.0	2.5	8.5	6.5
FDA209P	1.2	1.8	1.9	1.7
MS353	1.7	1.0	2.4	1.7
Terajima	1.1	0.6	0.7	0.7

TSA, Tryptone Soya Agar; CSA, CHROMagar Staph aureus; MSA, Mannitol Salt Agar; VJA, Vogel-Johnson Agar

*¹For CSA, viable counts were measured after 24 hours incubation at 35°C.

実験結果

1. 各選択分離培地の発育支持能

S. aureus 標準株 4 株における各選択分離培地の発育支持能成績を Table 1 に示す。非選択分離培地である TSA と比較し、MSA, VJA および CSA と同等の回収率が得られ、各選択分離培地における発育支持能差は認められなかった。

2. 合成酵素基質培地法と従来法との比較

各試験方法における分離培地上の陽性を疑う集落の出現率を Table 2 に示す。MSA および VJA 両培地間において、陽性を疑う集落の出現率の差は認められなかったが、CSA と両培地では明瞭な差が認められた。CSA における陽性結果は、続く迅速凝集試験で全て陽性と判断されたが、MSA および VJA 両培地における陽性集落の 9 割以上が偽陽性と判断された。

検査法による一致率を Table 3 に示す。MSA および VJA の両培地で陽性の所見が得られた場合に陽性とする従来法と CSA を用いた合成酵素基質培地法との陽性一致率は 8.7%、陰性一致率 100% として両検査法の一致率は 90.7% となった。各選択分離培地で陽性を疑った集落は全て、ドラ

Table 4. Comparison of three culture media for the isolation of *Staphylococcus aureus*.

	True Positives	True Negatives	False Positives	Fals Negatives	Sensitivity (%)	Specificity (%)
CSA	4	450	0	0	100	100
MSA	4	408	42	0	100	90.5
VJA	4	410	40	0	100	90.9

CSA, CHROMagar Staph aureus ; MSA, Mannitol Salt Agar ; VJA, Vogel-Johnson Agar

イスロットスタフィテクトプラスによる迅速凝集試験を行い、各試験方法とも共通した 4 検体から凝集する集落が得られた。本試験にて凝集が認められた集落は、その後の確認試験により黄色ブドウ球菌と同定された。また、CSA 上の紫色集落は全て黄色ブドウ球菌であり、検出感度、特異性とも 100% であったが、MSA および VJA 上の典型的集落のほとんどが偽陽性と判断された (Table 4)。

3. 黄色ブドウ球菌の検出状況

当検査室における原料受入品質管理検査では、2003年2月までは増菌培養法を利用しない検査法 (直接平板塗抹検査法) であったが、2003年3月より増菌培養法を導入した。本比較検討を実施した2003年4月から7月における黄色ブドウ球菌検出状況を Fig.2 に示す。増菌培養法を導入することにより、黄色ブドウ球菌汚染原料入荷を 4 件防止できた。

Table 2. The number of positive results for samples using different detection methods based on the phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus*.

	Positive Results No.		
	CSA	MSA	VJA
Isolation plate	4	46	44
Rapid agglutination Test	4	4	4
Tube Coagulase	4	4	4

CSA, CHROMagar Staph aureus ; MSA, Mannitol Salt Agar ; VJA, Vogel-Johnson Agar

Table 3. Comparison of the two detection methods for the isolation of *Staphylococcus aureus*.

		MSA/VJA		Total
		Positives	Negatives	
CSA	Positives	4	0	4
	Negatives	42	408	450
Total		46	408	454

CSA, CHROMagar Staph aureus ; MSA, Mannitol Salt Agar ; VJA, Vogel-Johnson Agar

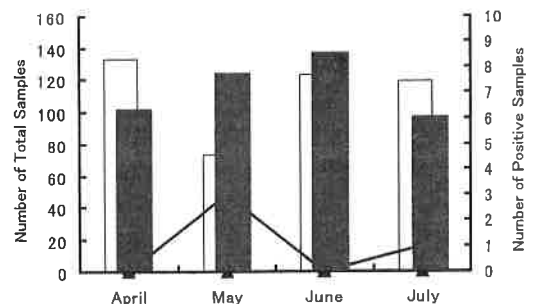


Fig.2. Monthly incidence of *Staphylococcus aureus* detected in the same months in 2002 and 2003. The closed triangles and closed circles respectively represent the number of *S. aureus* positive samples in 2002 and 2003. The open columns and closed columns respectively show the number of total samples in 2002 and 2003.

考 察

食品中の黄色ブドウ球菌の汚染は、例え極微量であっても、過去に原料等が汚染された可能性を示唆し、また本微生物が耐熱性の毒素型食中毒原因菌であることから、安定した高感度な検査法が要求されている。さらに食品中の微生物は加熱や乾燥といった様々な要因により損傷を受けており、損傷菌の検出には温和な増菌培養等により回復させるのが良いとされる⁴⁾。続く分離培養には、高濃度の食塩により選択性をもたせた培地 (MSA) や亜テルル酸カリウムと塩化リチウムにより選択性をもたせた培地 (VJA) 等が利用され、一般的にはこれらの培地に卵黄を添加して用いる。培養時間は、少なくとも35から37°Cで36時間以上必要とされ、小さな円形集落で卵黄反応陽性 (白濁ハロー形成) であれば黄色ブドウ球菌陽性と推定される。ただし、これら培地にはかなりの率で偽陽性が認められており⁵⁾、可能な限り確認試験を行うことが薦められる。

我々はより安定したより高品質の食品を提供するため、原料受入品質管理検査へ増菌培養法を取り入れた。従来の黄色ブドウ球菌検査法における検出限界は約100CFU/gと考えられるが、我々の検査方法では検出限界を理論上約2 CFU/gとし、従来法の約50倍の検出感度にて入荷可否分岐点を設定している。しかしながら増菌培養法を取り入れてから、検出感度の向上を得ることができる反面、偽陽性検体が増加し、再検査が増え、入荷可否までの時間と労力が増大した。近年開発された合成酵素基質培地 CSA は、培養時間の短縮、検出感度の向上、特異性の向上が報告されていたが^{6, 6)}、評価先は臨床検査分野に向けられており、食品分野での報告は皆無であった。さて我々の結果であるが、臨床検体における Merlino らの報告⁶⁾と同様、CSA における黄色ブドウ球菌の検出感度および特異性は、それぞれ100%と非常に高い値を示した。また、黄色ブドウ球菌は紫色の円形集落を形成しコントラストが良く、他の集落との鑑別が容易であり、合成酵素基質培地の最大のメリットである客観的な鑑別能に関して非常に優れていると判断された。また Merlino らの同報告では、臨床検体における MSA の特異性は63.5%とされており、我々の得た結果とは大きく異なるものであった。これは用いる検体による

検体特有の細菌叢があるためと考えられた。

CSA は近年の流通の激化に適し、我々の目的に合った分離培地であると言える。当初、我々は入荷可否の最終判断をするためには5日間を必要としてきたが、本培地を取り入れることにより、3日目の判定が可能となり、実に2日間の短縮に成功した。迅速に、感度よく、特異性高く検査を行うことは、人件費を含めた総合的なコストの削減にも貢献できた。

結 論

この度、合成酵素基質培地クロモアガー・スタッフアウレウスを評価し、特異性および客観性に優れた分離培地であることを確認した。迅速かつ精度の高い CSA を品質管理に導入することは、より高品質の食品を提供するための手段として有用であると考えられた。

文 献

- 1) 財団法人日本食品衛生協会 (1990) 食品衛生検査指針, p.160-167.
- 2) 坂崎利一 (1978) 新細菌培地学講座 (上), 近代出版, p.201-210.
- 3) Fournier J.M., Boutonnier A., Bouvet A. (1989) *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1372-1374.
- 4) Stephens P.J., Joynson J.A., Davies K.W., Holbrook R., Lappin-Scott H.M., Humphrey T.J. (1997) The use of an automated growth analyzer to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 445-455.
- 5) Merlino J., Leroi M., Bradbury R., Veal D., Harbour C. (2000) New Chromogenic Identification and Detection of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2378-2380.
- 6) Gaillot O., Wetsch M., Fortineau N., Berche P. (2000) Evaluation of CHROMagar Staph. Aureus, a New Chromogenic Medium, for Isolation and Presumptive Identification of *Staphylococcus aureus* from Human Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1587-1591.