

散らし寿司による食中毒事例と冷凍及び加熱処理した 検体からの黄色ブドウ球菌の分離状況

小 野 一 晃[†]

埼玉県衛生研究所 (〒338-0824 さいたま市桜区上大久保639-1)

(2013年7月5日受付・2013年11月15日受理)

要 約

食中毒事例において、残品の散らし寿司から 7.5×10^7 cfu/g の *Staphylococcus aureus* が分離された。食品中の菌数は、凍結・解凍による変化は少なかったが、52℃の加熱条件下では大きく減少し、菌分離には、食塩選択性の培地よりも Baird-Parker (BP) 培地の方が優れていた。加熱処理した検体においては、培養時間を48時間よりも72時間あるいは96時間と長くした方が培地上に発育する集落数が高くなることが示された。

——キーワード：凍結・加熱処理、黄色ブドウ球菌、散らし寿司。

----- 日獣会誌 67, 143~146 (2014)

黄色ブドウ球菌の分離培地としては、わが国においては7.5%塩化ナトリウムにより選択性を持たせたマンニット食塩培地が汎用されている [1]。しかし、食塩選択性の培地は、加熱などによって損傷を受けた菌に対しての増殖抑制がみられることが指摘されていることから [2-4]、海外では亜テルル酸カリウムの還元性により鑑別する Baird-Parker (以下BP) 培地が広く用いられている (ISO 688-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)-Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (1999))。

黄色ブドウ球菌による食中毒は例年発生しているが (厚生労働省ホームページ; 全国食中毒統計)、原因食品を特定するに当たり、凍結・解凍や加熱処理された食品中での菌の挙動や、これら条件下における有効な菌分離法については、十分には検討されていない。

そこで、実際の食中毒事例の原因食品 (残品) を用いて、①凍結・解凍を繰り返した場合と、②食品乳剤を加熱処理した場合、それぞれにおける菌分離状況を食塩選択性の培地とBP培地で比較し、有効な菌分離法の検討を行った。

材料及び方法

食中毒事例の概要：4月に花見をし、昼食に散らし寿司 (施設での調理品) や、おでん (レトルト食品) などを食べたところ、15時頃から数名が吐き気を訴えている旨、保健所に通報があった。調査の結果、参加者54名中12名 (22.2%) が喫食してから3~5時間後におう吐、下痢などの症状を呈していたことが判明した。当所に搬入された患者便6検体、食品残品の散らし寿司1検体 (未開封品1パック) 及び施設の拭き取り5検体 (冷蔵庫取手、コールドテーブル取手、作業台、包丁、まな板) について、食中毒細菌を対象として検査を行った。患者便については、赤痢菌、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、病原大腸菌、ウエルシュ菌及びセレウス菌を対象として、常法に基づき [5]、糞便中の食中毒細菌検査を行った。また、拭き取り検体については、綿棒を卵黄加マンニット食塩培地 (栄研化学株、東京) に塗抹し、37℃で48時間培養した。なお、分離された *Staphylococcus aureus* については、市販の細菌検査試薬 (ブドウ球菌コアグラゼ型別用免疫血清生研、デンカ生研株、東京) 及び細菌毒素検出キット (SET-RPLA 生研株、デンカ生研株、東京) により、添付のプロトコルに従い、コアグラゼ型別とエンテロト

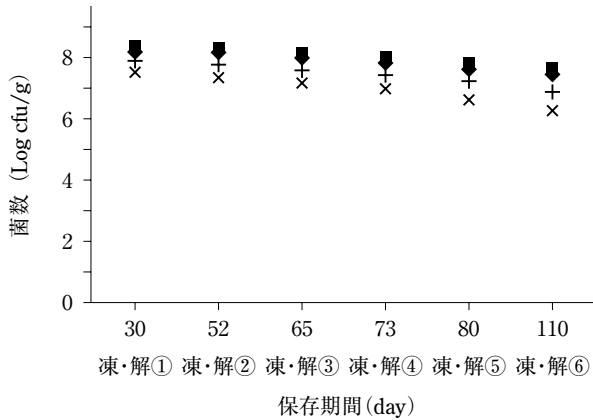
[†] 連絡責任者：小野一晃 (埼玉県衛生研究所)

〒338-0824 さいたま市桜区上大久保639-1

☎048-853-7196 FAX 048-853-5164

E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

凍結・加熱処理による黄色ブドウ球菌数の変化



■ : Baird-Parker培地 (Oxoid製)
 ◆ : Baird-Parker培地 (日本ベクトン・ディッキンソン製)
 + : エッグヨーク食塩培地
 × : 卵黄加マンニット食塩培地

図1 凍結・解凍を繰り返した際の食品中の *S. aureus* の菌数変化

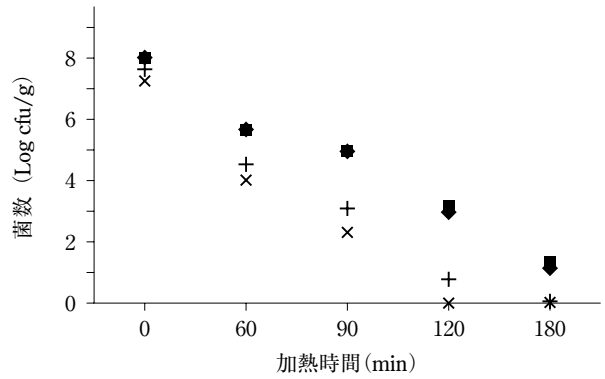
キシシン産生性について調べた。

凍結・解凍処理による食品中の *S. aureus* 菌数変化: 残品の散らし寿司1検体から25gを採取して菌数を測定した後、 -30°C で冷凍した。保存30, 52, 65, 73, 80, 110日後に 25°C フラン器内で1時間解凍し、食品中の *S. aureus* 菌数の変化を調べた。すなわち、食品25gに滅菌リン酸緩衝液(和光純薬工業(株), 大阪)225mlを加え10倍希釈乳剤を作成し、この乳剤1mlを9mlのリン酸緩衝液で段階希釈した。次に、卵黄加マンニット食塩培地、エッグヨーク食塩培地(栄研化学(株), 東京)、及び2種のメーカーのBaird-Parker培地(Oxoid, UK及び日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京)の計4種類の培地に、各試料の0.1mlをそれぞれ2枚ずつ塗抹後、 37°C で48時間培養後に各平板上に発育した集落の算術平均により菌数を測定した。

加熱処理による食品乳剤中の *S. aureus* 菌数変化: 食品の10倍希釈乳剤1検体を滅菌チューブ(日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京)に2mlずつ分注後、以下のように加熱試験を行った。

各チューブを 52°C の恒温水槽(柴田化学(株), 埼玉)に60, 90, 120, 180分間浸漬後、試料の1mlを9mlの滅菌リン酸緩衝液で段階希釈後、同様に48時間培養後に各平板上に発育した集落の算術平均により菌数を測定した。

加熱処理後に凍結・解凍を繰り返した際の食品乳剤中の *S. aureus* 菌数変化: 食品の10倍希釈乳剤(*S. aureus* 菌数: $7.5 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$)をチューブに2mlずつ分注後、 52°C の恒温水槽で60分間加熱処理したものと加熱処理をしないもの2種類に分け、それぞれを -30°C で冷凍保存した。これら試料を1週間後に 25°C のフラン器内



■ : Baird-Parker培地 (Oxoid製)
 ◆ : Baird-Parker培地 (日本ベクトン・ディッキンソン製)
 + : エッグヨーク食塩培地
 × : 卵黄加マンニット食塩培地

図2 加熱試験による食品乳剤中の *S. aureus* の菌数変化

で解凍し、試料の1mlを9mlの滅菌リン酸緩衝液で段階希釈後、48時間, 72時間, 96時間培養後に各平板上に発育した集落の算術平均により菌数を測定した。試料の凍結・解凍操作を計5回繰り返し、菌数の変化を比較した。

なお、上述した各試験については、すべて1回のみ行った。

成 績

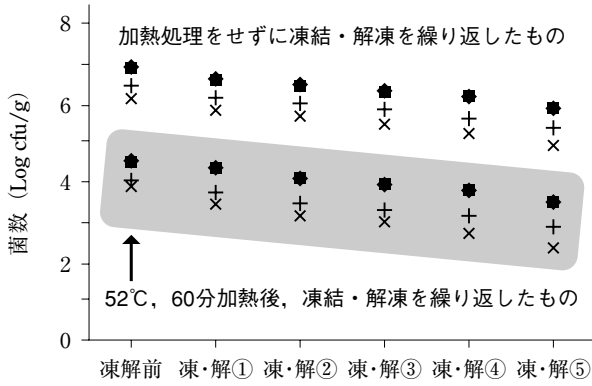
食中毒事例: 患者便6検体中2検体及び当該施設の冷蔵庫取手、コールドテーブル取手、作業台、包丁の拭き取り検体から *S. aureus* が検出され、また、残品である散らし寿司の菌数 (cfu/g) は卵黄加マンニット食塩培地で 7.5×10^7 であった(他の分離培地については実施せず)。なお、分離された菌株は、いずれもコアグラゼII型、エンテロトキシシンA産生で共通であった。

凍結・解凍処理による食品中の *S. aureus* 菌数変化: 図1に食品中の *S. aureus* の菌数変化を示す。

凍結・解凍を繰り返しても、食品中の菌数変化は少なかった。食塩選択性の培地に比べてBP培地の方が平板上に発育した集落数が多かったが、分離培地の培養時間(48~96時間)により発育した集落数に差は認められなかった。

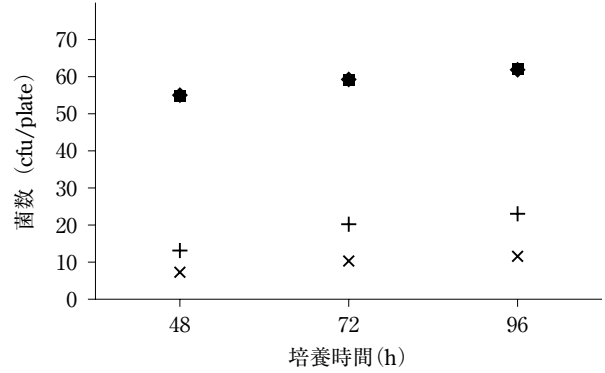
加熱処理による食品乳剤中の *S. aureus* 菌数変化: 加熱試験による食品乳剤中 *S. aureus* の菌数変化を図2に示す。

加熱処理により食品乳剤中の菌数が大幅に減少した。食塩選択性の培地に比べてBP培地の方が平板上に発育した集落数が多かったが、加熱時間が60分, 90分, 120分と長くするほどその傾向が強かった。また、分離培地上に発育した菌の集落は大小さまざまであり、特にBP培地には小さな黒色集落が多数認められた。



■：Baird-Parker培地 (Oxoid製)
 ◆：Baird-Parker培地 (日本ベクトン・ディッキンソン製)
 +：エッグヨーク食塩培地
 ×：卵黄加マンニット食塩培地

図3 凍結・解凍及び加熱処理後に凍結・解凍を繰り返した際の食品乳剤中の *S. aureus* の菌数変化



■：Baird-Parker培地 (Oxoid製)
 ◆：Baird-Parker培地 (日本ベクトン・ディッキンソン製)
 +：エッグヨーク食塩培地
 ×：卵黄加マンニット食塩培地

図4 培養時間による分離培地上の *S. aureus* 集落数の変化

加熱処理後に凍結・解凍を繰り返した際の食品乳剤中の *S. aureus* 菌数変化：凍結・解凍及び加熱処理後に凍結・解凍を繰り返した際の食品乳剤中の *S. aureus* の菌数変化 (平板の培養時間は48時間) を図3に示す。

加熱処理により菌数は大幅に減少したが、凍結・解凍による菌数の変化は少なかった。加熱処理により損傷を受けた場合においても凍結・解凍条件により菌数が大幅に減少することはなかった。

分離培地の培養時間による *S. aureus* 集落数の変化：加熱処理した検体 (10倍希釈液) を各分離培地に塗抹後、培養時間の違いによる平板上に発育した *S. aureus* 集落数の変化を図4に示す。

いずれの培地においても、48時間培養したものよりも72時間あるいは96時間培養したものの方が発育した集落数が多かった。一方、凍結・解凍を繰り返した検体では、48時間培養したものと96時間培養したもので、平板上に発育した集落数の差は認められなかった。

考 察

残品の散らし寿司から 7.5×10^7 cfu/g の *S. aureus* が分離され、患者便及び施設の拭き取り検体から分離された菌は、いずれもコアグラールゼII型、エンテロトキシンA産生と共通であった。本事例は、4月ということでもまだ気温もそれほど高くないことから、食品を室温放置しておいたことが原因と考えられた。本菌による食中毒は、食品業者の衛生設備や製造方法の改善、衛生思想の向上などに伴い、近年減少傾向にあるが [6]、冬から春への季節の変わり目の時期に、調理従事者のちょっとした油断から事故につながる場合があるので注意が必要である。

本菌は、凍結・解凍条件下では食品中の菌数変化は少

なかった。食塩選択性の培地よりもBP培地の方が発育した集落数が多かったが、培養時間を48時間から72時間、96時間と長くしても、培地上に発育した集落数に差はみられなかった。これに対して、52℃の加熱条件下では菌数は大きく減少し、食塩選択性の培地よりもBP培地の方が発育した集落数が多く、この傾向は加熱時間が長くなるほど顕著に認められた。一方、本菌は加熱処理により損傷を受けた場合でも凍結・解凍条件には比較的強いことが示された。

加熱処理を行う前の検体は、BP培地上に発育した集落の大きさは、おおむね均一であったが、加熱処理後の検体では、発育した集落は大小さまざまであった。これは、加熱処理により菌が損傷を受けたことによると考えられるが、BP培地では亜テルル産カリウムの還元により黒色を示す小さな集落が多数認められた。一方、卵黄加マンニット食塩培地やエッグヨーク食塩寒天培地ではこのような小さな集落はほとんどみられず、7.5%の食塩により菌の発育が抑制されたことが示唆された。BP培地の方が食塩選択性の培地よりも菌検出率が優れていることは、他の調査によっても報告されている [7, 8]。

加えて、加熱試験の場合には、培養時間は48時間よりも72時間あるいは96時間後の方が培地上に発育した集落数が多く、この傾向は食塩選択性の培地とBP培地のどちらにおいても認められた。

以上のことから、食品からの菌分離には、損傷菌等を考慮すると、食塩選択性の培地よりもBP培地の方が優れており、培養時間を長くすると発育する集落数が高くなることが示された。

引 用 文 献

[1] 品川邦汎：黄色ブドウ球菌，食品衛生検査指針 微生物

- 編, 厚生労働省監修, 236-248, 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
- [2] Baird-Parker AC, Davenport E : The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after storage of frozen or dried cells, *J Appl Environ*, 28, 390-402 (1965)
- [3] Gray RJH, Gaske MA, Ordal ZJ : Enumeration of thermally stressed *Staphylococcus aureus* MF 31, *J Food Sci*, 39, 844-846 (1974)
- [4] Van Doorne H, Pauwels HP, Mossel DAA : Selective isolation and enumeration of low numbers of *Staphylococcus aureus* by a procedure that relies on elevated-temperature culturing, *Appl Environ Microbiol*, 44, 1459-1462 (1982)
- [5] Bernard KA, Dumler JS, Petti CA, Richter SS, Vandamme PAR : *Bacteriology, Manual of Clinical Microbiology*, Versalovic J, et al eds, 10th ed, 308-899, ASA press, Washington DC (2011)
- [6] 小田隆宏 : ブドウ球菌食中毒の最近の動向, *食衛誌*, 39, 179-185 (1998)
- [7] Niskanen A, Aalto M : Comparison of selective media for coagulase-positive enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*, *Appl Environ Microbiol*, 35, 1233-1236 (1978)
- [8] Saito E, Yoshida N, Kawano J, Shimizu A, Igimi S : Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation to culture methods, *J Vet Med Sci*, 73, 287-292 (2011)

A Food-Poisoning Case Involving Vinegared Rice Topped with Fish and Isolation of *Staphylococcus aureus* from Frozen and Heat-Treated Samples

Kazuaki ONO[†]

* *Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiohkubo, Sakura-ku, Saitama-shi, 338-0824, Japan*

SUMMARY

The aim of this study is to reveal a suitable medium and incubation time for isolation of *Staphylococcus aureus* under stress conditions. This bacterium was isolated at 7.5×10^7 cfu/g from samples of leftover vinegared rice topped with fish in a food-poisoning case. The bacterium was reduced in large numbers, not by a condition of freezing and thawing but by the condition of heating at 52 °C. Baird-Parker agar had an advantage in detecting *S. aureus* with a direct plate culture compared to those media based on salt tolerance (mannitol salt agar). In this study, the bacterium increased in number by increasing the length of the incubation time from 48 hours to 72 or 96 hours. It is suggested that longer incubation times (72 or 96 hours) are necessary to isolate this bacterium for maximum growth on the medium.

— Key words : freezing and heat treatment, *Staphylococcus aureus*, vinegared rice topped with fish.

[†] Correspondence to : Kazuaki ONO (*Saitama Institute of Public Health*)

639-1 Kamiohkubo, Sakura-ku, Saitama-shi, 338-0824, Japan

TEL 048-853-7196 FAX 048-853-5164 E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

—*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67, 143 ~ 146 (2014)