

## 食水系感染症病原体の検査法-1

### 黄色ブドウ球菌

おも え かつ ひこ  
重 茂 克 彦  
Katsuhiko OMOE

#### I. 病原体： *Staphylococcus aureus*

*Firmicutes* 門 *Bacilli* 綱 *Bacillales* 目 *Staphylococcaceae* 科に属するグラム陽性通性嫌気性球菌である。ブドウ球菌属 *Staphylococci* は現在 36 菌種 19 亜種が知られており、哺乳動物、鳥類などの温血動物に広く常在している。黄色ブドウ球菌 *S. aureus* はヒトのみならずウシ、ニワトリといった家畜・家禽に保有されているが、時として宿主に種々の疾病を引き起こす。黄色ブドウ球菌は極めて多数の毒素を産生し、ブドウ球菌属の中で最も病原性の高い菌種と考えられている。ヒトにおいては、種々の化膿性疾患、呼吸器感染、毒素性ショック症候群、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群を引き起こすと共に、重要な食中毒起因菌である。

#### II. 疫学

ブドウ球菌食中毒は広く世界中で発生している。黄色ブドウ球菌はヒト、家畜、家禽に分布しているが、ほとんどの食中毒はヒトに定着している黄色ブドウ球菌が食品を汚染することにより発生していると考えられている。健康ヒトの約 40% が鼻腔粘膜上に黄色ブドウ球菌を保菌しており、鼻腔からヒトの手指に移行し、手指を介して食品を汚染する。また、手指に傷口等が存在するとその化膿巣には黄色ブドウ球菌が大量に存在することから、食品を汚染する機会が増大する。わが国においては本食中毒は年間を通じて発生しているが、特に 5～10 月に増加するとされている。発症率（患者数／摂食者数）は他の食中毒に比べて低い（15～20%前後）傾向がある。本食中毒は、食品の汚染防止と保存中の本菌

増殖阻止を徹底することにより、比較的予防しやすいと考えられる。実際に、食品製造、販売段階での食品の衛生的な取り扱いおよび適切な保存管理により、わが国では発生事件数も劇的に減少した。しかしながら、2000 年 6 月から 7 月に加工乳を原因食品とする大規模食中毒事件が発生しており、十分な衛生管理が行われなければ、大規模かつ社会的影響が甚大な事件を引き起こしうる重要な食中毒である。

#### III. 原因毒素

ブドウ球菌食中毒の原因毒素はブドウ球菌エンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins, SEs) であり、黄色ブドウ球菌が食品中で増殖する際に産生された SEs を摂食することにより発症する。典型的な食品内毒素型食中毒である。SEs は極めて耐熱性が高いことから、殺菌処理あるいは加熱調理により汚染している黄色ブドウ球菌を死滅させても、すでに食品中に SEs が産生されている場合は原因食品となり得る。SEs は従来その抗原性により SEA, SEB, SEC (SEC は物理化学的性状の違いにより C1, C2, C3 の亜型が存在する)、SED, SEE の 5 種類が知られており、何れもヒトの食中毒の原因となることが明らかになっている。さらに近年、多数の新型 SEs の存在が明らかになってきており、現在までに SEH, SEG, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIU および SEIV が報告されている<sup>1,2)</sup>。これらの新型毒素の食中毒への関与については未だ明らかではないが、SEA-SEE による食中毒はブドウ球菌食中毒の 95% とされており、残る 5% の型別不明食中毒はこれら新型毒素によって発生している可能性がある。また、多くの黄色ブドウ球菌が複数の SEs 遺伝子を保有すること

## 食水系感染症病原体の検査法 - 1

が明らかになっており、今後これらの新型 SEs の食中毒原性を評価していく必要がある。

### IV. 症状

ブドウ球菌食中毒は、潜伏時間 0.5～6 時間（平均 3 時間）で発症し、悪心・嘔吐を主徴とする。嘔吐の頻度は個体の感受性や摂食した SEs 量の違いにより異なるとされている。下痢を伴う場合もあるが必発症状ではない。本食中毒は一般的に発熱を伴わないとされているが、患者の 16% 程度に弱い発熱が観察されたとの報告もある。通常、予後は良好であり、症状は通常 24 時間以内に改善し、特別な治療の必要はないとされている。しかしながら、重症例では嘔吐および下痢回数も多く、脱水症状や血圧の低下、脈拍微弱などを伴ってショックや虚脱におちいることもあるため、重症例の場合には医師の診断を受け適切な対症療法（十分な補液、ショックへの対応）を受ける必要がある。死亡例はほとんどなく、患者が高齢であったり、幼少であったり、あるいは重篤な基礎疾患を有する場合に限られるとされている。

### V. 検査法

#### 1. 培養法

食品や患者材料からの分離法は食品衛生検査指針を参照されたい。わが国においては分離培地として 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寒天培地が汎用されているが、損傷菌に対しては増殖抑制が見られる場合があることが指摘されている。海外では、ベアード・パーカー (Baird-Parker) 寒天培地が汎用されている。いずれも、培地に卵黄を添加することによりコロニー周囲の卵黄反応 (リパーゼ反応) を観察することができ、他菌との鑑別が容易となる。マンニット食塩卵黄寒天培地での典型的な黄色ブドウ球菌コロニーはマンニット分解による培地の黄色化と卵黄反応による白濁環を呈する (図 1)。ベアードパーカー卵黄寒天培地では、亜テルル酸カリウムの還元によりコロニーが

黒色化し、さらにコロニー周囲に卵黄反応による白濁および透明帯が形成される (図 2)。

また、簡易迅速検査用培地やフィルム状乾燥培地も多数開発されており、簡易に黄色ブドウ球菌の検出・分離が可能となっている。

#### 2. 遺伝子診断法

PCR 法による遺伝子診断においては、適切な鋳型 DNA 調整法を用い、また適切な内部陽性対照を設定することが重要である。黄色ブドウ球菌から熱抽出で調製した genomic DNA 溶液は Taq polymerase の阻害物質を含んでいることが多く、偽陰性が生じやすい。スピнкаラムなどを用いて精製するか、あるいは Pierce 社の Lyse-N-Go PCR reagent など、阻害物質をマスクする試薬を用いて DNA を調製すべ



図 1 *S. aureus* のマンニット食塩卵黄寒天培地上のコロニー 35℃, 48 時間培養で培地の黄変と卵黄反応が観察される。

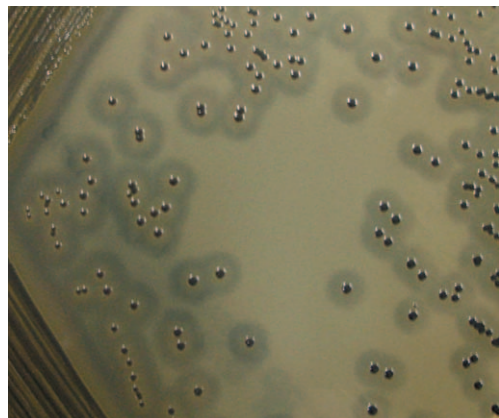


図 2 *S. aureus* のベアードパーカー卵黄寒天培地上のコロニー 35℃, 48 時間培養で灰黒色のコロニーが形成され、周辺に卵黄反応が観察される。

きである。

#### 1) PCR法による黄色ブドウ球菌特異遺伝子の検出

・標的遺伝子：*nuc* (thermostable nuclease)<sup>3)</sup>

・プライマー：

5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3'

5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'

増幅産物 279 bp

・PCR条件：37サイクル (94℃ 1分；55℃ 30秒；72℃ 1分30秒)、72℃ 3.5分

#### 2) DNAプローブ法による黄色ブドウ球菌の検出

黄色ブドウ球菌の16S rRNA配列に相補的なDNAプローブを用い、ハイブリダイゼーションにより黄色ブドウ球菌を検出するキットが市販されている。

・核さんテスト 黄色ブドウ球菌 ((株) 科学飼料研究所)

#### 3) ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の検出

タカラバイオ株式会社から、SEA-SEE遺伝子を検出できるプライマーが市販されている。プライマー配列は公表されていない。

・標的遺伝子：*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*

・PCR条件：35サイクル (94℃ 1分；55℃ 1分；72℃ 1分)

また、筆者らはSEA-SEIR遺伝子と内部陽性対照として*femA*, *femB*遺伝子を検出するmultiplex PCRの系を構築した<sup>4)</sup>。本法を用いることにより、4セットのmultiplex PCRにより17種のSEsおよびSEIs遺伝子を検出可能である(図3)。プライマー配列、PCR条件については論文を参照されたい。なお、本法はQIAGEN社のMultiplex PCR master mixを用いて至適化してある。

### 3. 免疫学的診断法

ブドウ球菌食中毒の診断においては、原因毒素であるSEsを検出・型別することが重要となる。遺伝子診断によるSEs遺伝子の検出は、遺伝子保有菌株の毒素産生性を証明するものではないことを注意すべきである。SEA-SEEに対する特異抗体を用いた逆受身ラテックス凝集反応やELISA等が開発され、種々のキットが市販されている。

・エンテロトックス-F「生研」(デンカ生研)

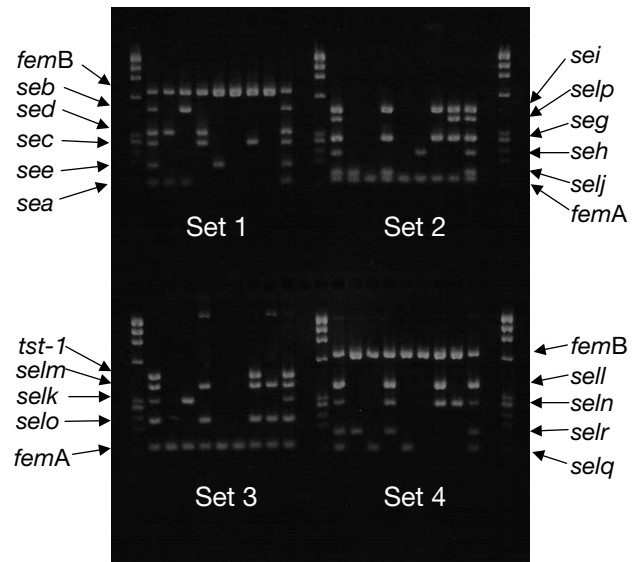


図3 multiplex PCRによるSEA-SEE, SEG-SEIRおよびTSST-1遺伝子の検出4セットのmultiplex PCRにより、18種の毒素遺伝子の検出が可能である。内部陽性対照として、*femA*および*femB*遺伝子を同時に検出している。

逆受身ラテックス凝集反応。SEA-SEEを検出・型別可能。

・黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (SET A, B, C, D, E) ELISA キット (アズマックス株式会社、セティ株式会社 (製造：r-Biopharm 社))

ELISAによるSEA-SEEの検出と型別。

・スタフィロ毒素 (SET) ヴィジュアルイムノアッセイ (アズマックス株式会社、セティ株式会社 (製造：TECRA 社))

ELISAによるSEA-SEEの検出。型別はできない。

・バイダスSET2 (日本ビオメリュー株式会社)

ELISAによるSEA-SEEの検出。型別はできない。免疫蛍光法を採用しているため高感度だが、専用の機器が必要である。

### 4. その他

黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別を行うための免疫血清キット、およびクランピングファクター試験により黄色ブドウ球菌を鑑別するためのキットがデンカ生研から市販されている。

なお、私たちの研究グループでは、multiplex PCRによるSEsおよびSEIsの網羅的検出法と、種々のSEsおよびSEIs蛋白の免疫学的検出法を確立して

## 食水系感染症病原体の検査法－1

います。*S. aureus*のSE genotypeの決定および毒素産生性評価が可能ですので、興味ございましたら、岩手大学農学部獣医課程食品安全学研究室 (phone : 019-621-6221, e-mail : omo@iwate-u.ac.jp) までお問い合わせください。

### 文 献

- 1) Lina, G. et al.: Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J. Infect. Dis. **189** : 2334-2336, 2004.
- 2) Thomas, D. Y. et al.: Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect. Immun. **74** : 4724-4734, 2006.
- 3) Brakstad, O.G. et al.: Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J. Clin. Microbiol. **30** : 1654-1660, 1992.
- 4) Omoe, K. et al.: Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiol. Lett. **246** : 191-198, 2005.