

短報

黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン遺伝子保有とその產生について

尾上洋一, 古川一郎, 寺西 大, 長谷川幸江

Production of Enterotoxins and Detection of Genes for Enterotoxins in *Staphylococcus aureus*

Yoichi ONUUE, Ichiro FURUKAWA, Hiroshi TERANISHI and Yukie HASEGAWA

はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトや動物などに広く分布していることから、各種食品は *S. aureus* に汚染される機会が多く、食品中に產生されるブドウ球菌エンテロトキシン (staphylococcal enterotoxin, SE) により食中毒が発生する。*S. aureus* の SE 產生能のこれまでの確認方法は、培養液中の SE 產生量を逆受身ラテックス凝集反応法 (RPLA 法) を用いて測定することにより行われてきた。近年、polymerase chain reaction (PCR) 法による SE 遺伝子の検出法が報告され¹⁾、また、プライマーも市販されるようになったが、SE 遺伝子の保有と SE 產生の関係が十分に明らかになっていない。そこで、SE 產生基準菌株、食中毒原因食品および市販食品から分離された *S. aureus* 菌株を用いて、SE 遺伝子の検出と SE 產生性との関わりを検討した。また、*S. aureus* の鑑別に特徴的な生化学性状を調べた。

材料および方法

1 供試菌株

S. aureus は Dr. Bergdoll より分与された SE 產生基

神奈川県衛生研究所食品獣疫部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

準菌株である *S. aureus* 100(SEA 產生), 196E(SEA), 243(SEB), S-6(SEB), 137(SEC), 361(SEC) の6菌株、わが国の食中毒原因食品より分離された7菌株および市販食品から分離された12菌株を用いた。

2 生化学性状試験

各供試菌株を卵黄加マンニット食塩寒天培地 (MSEY 培地; 日水) および Baird-Parker 寒天培地 (BP 培地; Difco) に塗抹し、35°C、48時間培養後、MSEY 培地においてはマンニットの分解性と卵黄反応の有無を、BP 培地においては亜テルル酸の還元による集落の黒色化と卵黄反応の有無を調べた。また、ウサギプラズマ (栄研) を用いてコアグラーーゼ試験を行った。

3 SE 遺伝子の検出および SE 產生性

Johnson らの報告¹⁾に基づき4種のプライマーセットを作成した。各プライマーおよび増幅サイズは SEA 1&2(120bp), SEB 1&2(478bp), SEC 1&2(257bp), SED 1&2(317bp) である (表 1)。試料調製は BHI 培地 (Difco) にて 35°C、24時間培養した菌体懸濁液を TE buffer を加え 95°C、10分間加熱することにより行った。

表1 *S. aureus* のエンテロトキシン遺伝子検出用プライマー

プライマー	検出遺伝子	増幅DNA
SEA 1&2	sea	120bp
SEB 1&2	seb	478bp
SEC 1&2	sec-1	257bp
SED 1&2	sed	317bp

PCR の条件は熱変性 94°C、1分、アニーリング 55°C、1分、伸長反応 72°C、1分で 35 サイクル行った。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色により確認した。SE 產生量の測定は *S. aureus* を BHI 培地に接種し、35°C、24時間培養後の遠心上清を用い、添付の希釈液で 2 倍階段希釈し、RPLA 法 (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) により行った。RPLA 法による SE の検出感度は 2ng/mL であることから、その產生量を求めた。

結果および考察

1. 供試 *S. aureus* の生化学性状

SE 產生基準菌株 6 菌株は MSEY 培地においては、すべてマンニット分解陽性であり、卵黄反応は陽性 4、陰性 2 菌株であった。欧米で多用されている BP 培地においては 6 菌株すべてが亜テルル酸を還元して黒色集落を形成し、卵黄反応は陽性 4、弱陽性 1、陰性 1 菌株であった (表 2)。わが国の食中毒原因食品由来 7 菌株およ

表2 *S. aureus* のエンテロトキシン遺伝子保有状況とエンテロトキシン産生性

由来	菌株	生化学性状					検出遺伝子				エンテロトキシン産生量(ng/ml)			
		マンニット 分解	コアグラーゼ	卵黄反応 MSEY培地	卵黄反応 BP培地	亜テルル 酸還元	sea	seb	sec-1	sed	SEA	SEB	SEC	SED
SE産生 基準菌株	100	+	+	+	+	+	+	-	-	-	320	-	-	-
	196E	+	+	-	-	+	+	-	-	+	640	-	-	80
	243	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	20,480	-	-
	S-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	320	640	-	-
	137	+	+	-	+w	+	-	-	+	-	-	-	640	-
	361	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	160	320
食中毒原因 食品(日本)	T6119	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5,120	-
	T7436	+	+	+	+	+	+	-	+	-	640	-	2,560	-
	K858	+	+	+	+	+	+	+	-	-	320	640	-	-
	A 13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	160	80	-	-
	A 14	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	320	-	-
	A 15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	640	-	-	-
	A 17	+	+	+	+	+	+	-	-	-	640	-	-	-
市販食品 (日本)	B 18	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	20	-
	B 21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	640	320	-	-
	B 23	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	640	-	-
	B 25	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B 26	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	10,240	-
	B 28	+	+	+	+	+	+	+	-	-	640	640	-	-
	B 29	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B 31	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B 33	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	320
	B 34	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1,280	-
	B 36	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	2,560	-	-
	B 37	+	+	+	+	+	+	+	-	-	640	-	-	-

MSEY培地、卵黄加マンニット食塩培地; BP培地、Baird-Parker寒天培地

+w.弱陽性

び市販食品由来12菌株は MSEY 培地および BP 培地上において、それぞれ定型的かつ明瞭な卵黄反応を示す集落を形成した。SE 産生基準菌株中には卵黄反応陰性や弱陽性の菌株が見いだされたが、わが国の食品に由来する菌株はすべて卵黄反応陽性であった。これは、わが国では *S. aureus* の分離に際して MSEY 培地が広く用いられ、卵黄反応陽性の定型的な集落のみを釣菌していることによると考えられる。コアグラーゼ試験はすべての菌株が陽性であった。

2 SE 遺伝子保有状況および SE 産生

SE 産生基準菌株6菌株においては *S. aureus* 100は sea, 196E は sea および sed, 243は seb, S-6は sea および seb, 137は sec-1, 361は sec-1および sed の遺伝子を保有していた(表2)。

食中毒原因食品由来7菌株では、複数の遺伝子を保有するものは sea および seb 保有の2菌株, sea および sec-1 保有の1菌株が見いだされ、単独保有菌株は sea 保有2菌株, seb, sec-1 保有はそれぞれ1菌株ずつであった。*S. aureus* による食中毒事例の大多数が SEA によって起こっていることが報告されている²⁾が、sea 遺伝子を保有していた菌株は今回の食中毒7事例においても5事例を占めていた。

市販食品由来12菌株における保有遺伝子は sea および seb の複数の遺伝子を保有するものが2菌株あり、単独保有菌株は sea 1菌株, seb 2菌株, sec-1 3菌株, sed 1菌株であり、SE 遺伝子保有が認められなかったも

のは3菌株であった。

S. aureus 各菌株の SE 産生量を RPLA 法により求めたところ、SEA 160~640ng/mL, SEB 80~20,840 ng/mL, SEC 20~10,240ng/mL, SED 80~320ng/mL であり、SEB および SEC 産生量の高いものが認められた。

これは SE 別の産生量について寺山らが菌株による違いもさることながら SE 型により大きな違いがみられ、SEB, SEC は大量に産生されるが、SEA はその1/10程度であり、SED はさらに産生量が低いと報告していることと一致していた²⁾。寺山²⁾, 尾上ら³⁾は、市販食品では SE 産生量の高い SEB, SEC 産生菌が多く分離されるにもかかわらず食中毒事例に SEA 産生菌株が多い要因として、水分活性を低くした培地では SEB, SEC の産生が抑制されるのに対して SEA の産生は影響されにくいことを見いだし、食品中においても同様の現象が起きるため、SEA による食中毒発生に結びつくと推察している。

SE 産生性と SE 遺伝子保有状況との関連を比較すると RPLA 法による SEA ~ SED 産生性と PCR による sea ~ sed 遺伝子保有のパターンは26菌株すべてで一致し、Johnson らのプライマーの有用性が確認された。

SE 遺伝子を保有しながら SE 産生量が RPLA の検出限界である2ng/mL 以下を示す菌株の存在も想定されたが、本実験においては SE 遺伝子を保有している *S. aureus* は BHI 培地で20ng/mL 以上の SE を産生し、SE 遺伝子の存在と SE 産生とは密接にリンクしていること

が示唆された。また、*S. aureus* 培養上清について RPLA 法による SE 産生量の測定を行うことにより、食品中の SE 産生能が推測可能となり、この方法の有用性は遺伝子解析が普及しても変わらないと考える。

(平成14年7月24日受理)

文 献

- 1) Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R. and Rozee, K. R. : Detection of genes for enterotoxin, exfoliative toxins and toxin shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29, 426-430(1991)
- 2) 寺山 武：*Staphylococcus*，食水系感染症と細菌性食中毒，坂崎利一編，p336-359，中央法規，東京(1991)
- 3) 尾上洋一，高橋孝則，森 実：水分活性と pH との相乗作用によるブドウ球菌エンテロトキシン産生の抑制効果について，日細菌誌，42, 751-755(1987)