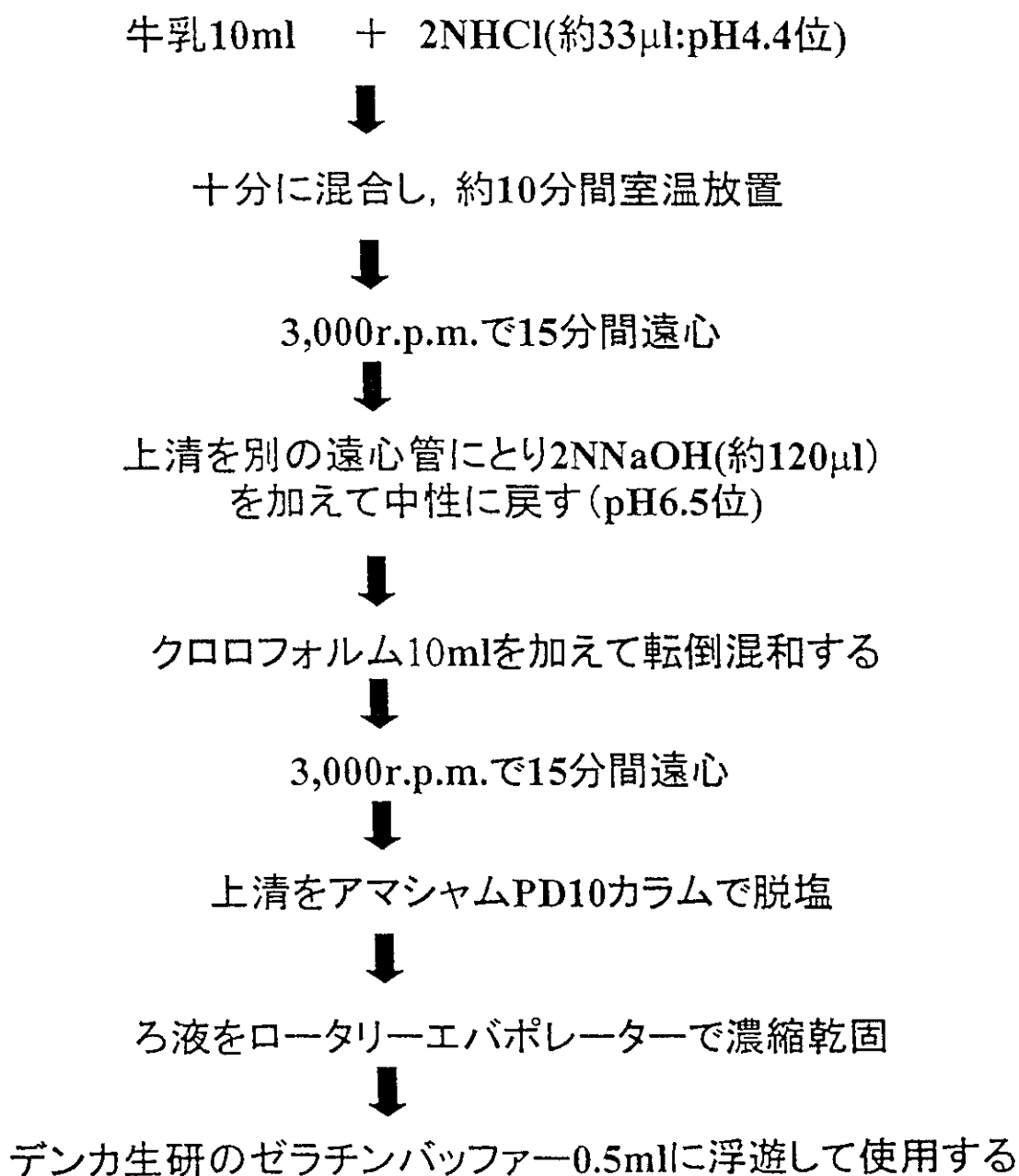


図2-2-9(2).

牛乳中の黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの精製濃縮方法



大阪府公衆衛生研究所 浅尾 務 博士
より情報提供(2000,7,6)

図2-2-10(1). ウェルシュ菌の検査法

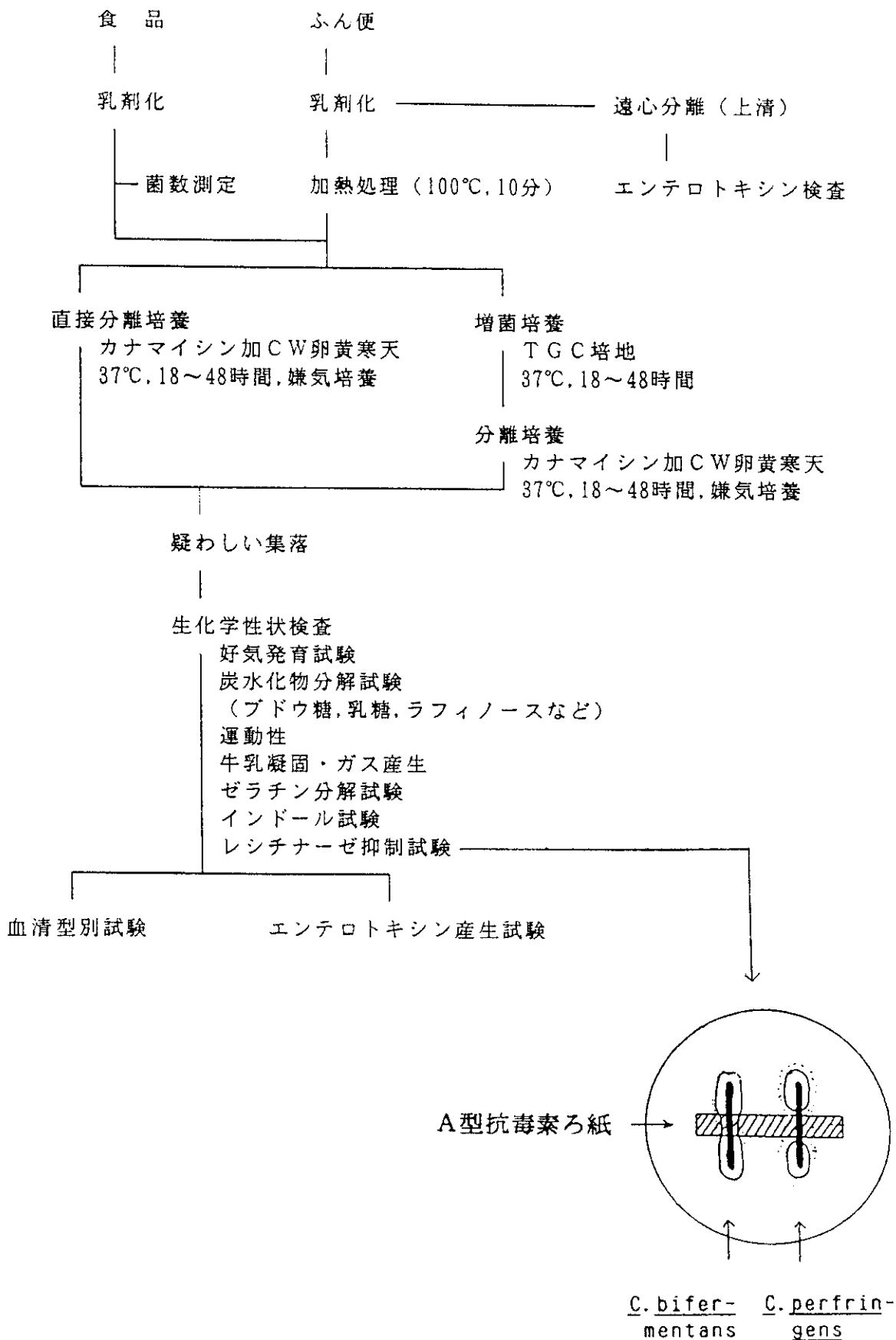
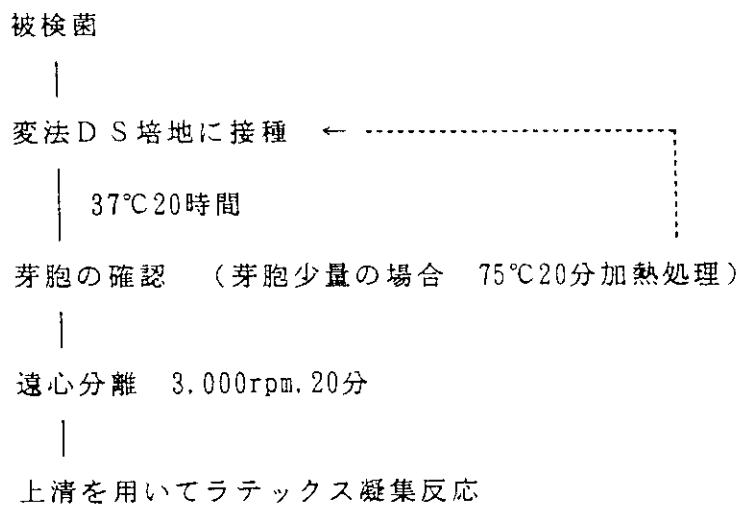


図2-2-10(2). ウェルシュ菌のエンテロトキシン検査法



変法 D S 培地 (大谷ら, 1987年)

酵母エキス	4.0 g
バクトペプトン(DIFCO)	15.0 g
可溶性デンプン	4.0 g
リン酸二水素ナトリウム	5.0 g
チオグリコール酸ナトリウム	1.0 g
精製水	900 ml

加温溶解し, pH7.5~7.6に修正し,
小試験管に3.6ml分注, 121°C 15分滅菌
使用時に別にろ過滅菌して作製した
5%炭酸水素ナトリウム液を0.4ml加えて使用する.

表2-2-10. ウエルシュ菌および類似菌の主な生化学性状

	<i>C. perfringens</i>	<i>C. barati</i>	<i>C. absonum</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. sordellii</i>
インドール	-	-	-	+	+
硝酸塩還元	+	+	+	d	d
リパーゼ	-	-	-	-	-
レシチナーゼ	+	+	+	+	+
α抗毒素血清による レシチナーゼ反応抑制	+	+	軽微	-	-
ゼラチン液化					
ゼラチン濃度 2%	+	-	+	+	+
〃 10%	+	-	-	.	.
牛乳	凝固	-	凝固	凝固・消化	凝固・消化
ブドウ糖	+	+	+	+	+
ラクトース	+	+	+	-	-
サッカロース	+	+	+	-	-
マルトース	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	-	-	-	d
イノシット	+	-	-	-	-
トレハロース	±	-	±	-	-
デンプン	+	+	-	-	-
運動性	-	-	-	+	+
芽胞	偏在性	偏在性	偏在性	偏在性	偏在性

図2-2-11. ボツリヌス菌の検査法

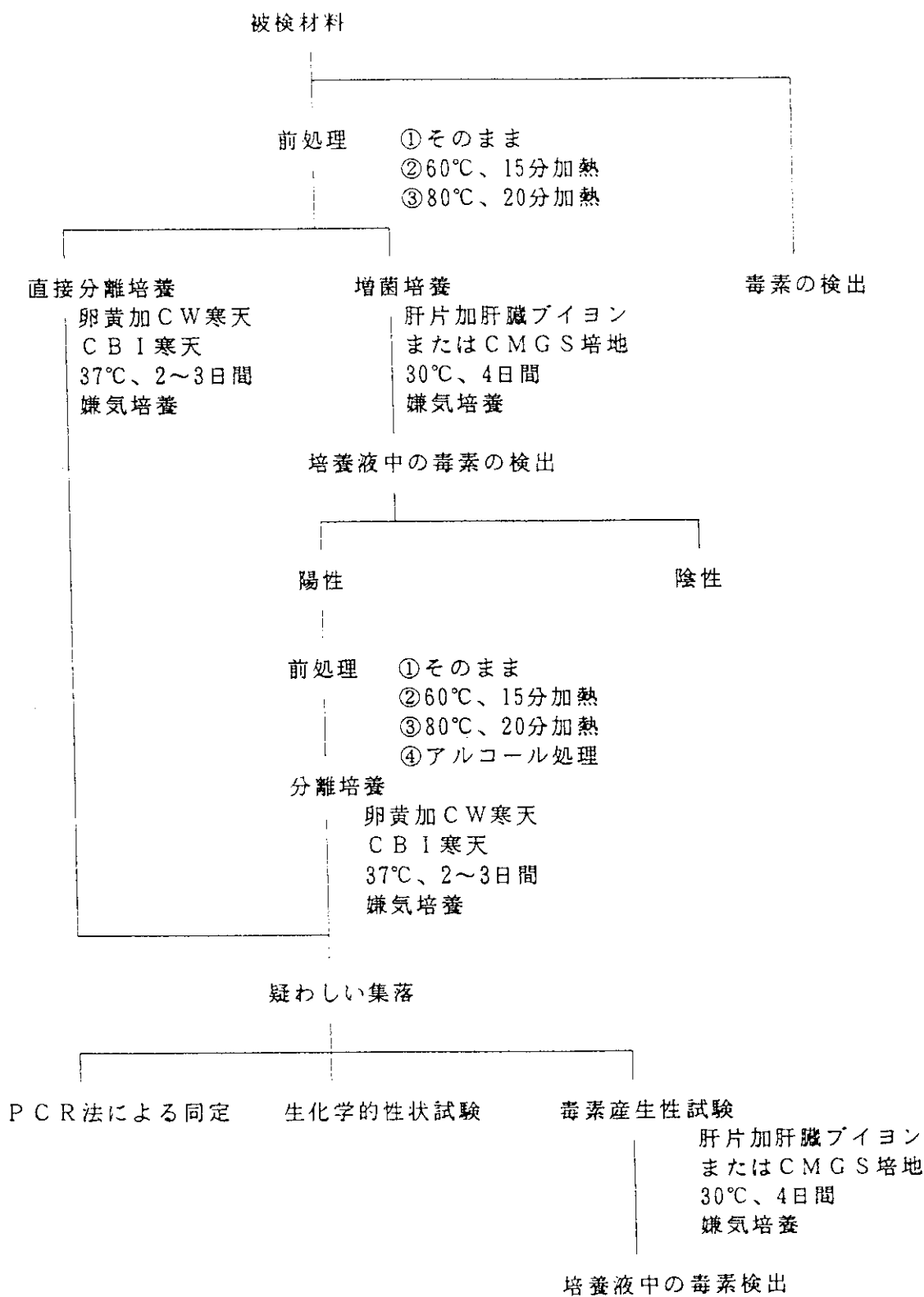


表2-2-11(1). 蜂蜜のボツリヌス菌検査法

1. ハツミツを37℃(結晶の場合は50℃前後)温湯中で10~15分加温する。
2. 十分に激しく攪拌して、その20gを秤量。
3. 37℃に加温した滅菌蒸留水を100ml加えてうすめ、10,000rpm30分間遠心分離する。
4. 沈渣を2mlの生理食塩液に浮遊し、検査原液とする。
5. 検査には原液と生理食塩液で10倍、100倍に希釈したものを用いる。
6. 肝片加肝臓ブイヨンあるいはCMGS培地のいずれかを各希釈段階2本ずつに各希釈液を等量ずつ残りなく接種する。
1本はそのまま、他の1本は80℃15分加熱処理をして、嫌気条件下30℃で培養する。
7. この後は通常の検査と同様とする。

表2-2-11(2). マウスを用いたボツリヌス毒素検査法

マウス No.	培養上澄液 (トリプシン処理)	抗毒素血清 (10 IU/ml)	備 考
1	1.2 ml	—	ゼラチン緩衝液 0.3 ml ゼラチン緩衝液 0.3 ml 80℃20分間加熱処理
2	1.2 ml	—	
3	1.2 ml	A型 0.3 ml	
4	1.2 ml	B型 0.3 ml	
5	1.2 ml	C型 0.3 ml	
6	1.2 ml	D型 0.3 ml	
7	1.2 ml	E型 0.3 ml	
8	1.2 ml	F型 0.3 ml	

ボツリヌス毒素希釈用ゼラチン緩衝液

KH_2PO_4 5.44g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58g
 ゼラチン 2.0g
 pH6.3~6.4

必要ならば、これにトリプシンを0.02%加える。

[3] 最新の免疫学的ならびに分子生物学的手法

食品から少量の食中毒起因菌を検出する方法として、免疫磁気ビーズ法が開発され、腸管出血性大腸菌 O157 の検出に汎用されるようになった。また、腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラ等の簡易迅速検出法として、各種の免疫学的方法を応用した検出キットが市販されている。これらの一覧は、後述する。

一方、食中毒起因菌の病原因子の検出には、免疫学的手法や遺伝学的手法が応用されている。免疫学的手法として汎用されているのは、ラテックス凝集反応を利用した RPLA 法や酵素抗体法による EIA 法である。遺伝学的手法では PCR 法が最も多く利用されている。以下、食中毒起因菌 11 菌種について、市販されている毒素検出用キットおよび PCR キットについてまとめた。

(1) 食中毒起因菌の病原因子検出法

表 2-3-1

(2) 免疫学的手法による食中毒起因菌の産生する毒素検査用試薬

表 2-3-2

表2-3-1 食中毒起因菌の病原因子検査法

病原菌	検出病原因子	免疫学的手法	PCR法
腸炎ビブリオ	TDH	●	●
	TRH	—	●
サルモネラ	侵入性	—	●
病原大腸菌			
腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌	LT, ST	●	●
腸管出血性大腸菌	ベロ毒素	●	●
カンピロバクター		—	—
エルシニア・エンテロコリチカ		—	○
リステリア・モノサイトゲネス		—	○
セレウス菌	嘔吐毒	—	—
	下痢毒	●	○
黄色ブドウ球菌	エンテロトキシン(A~E)	●	●
ウエルシュ菌	エンテロトキシン	●	●
ボツリヌス菌	ボツリヌス毒素(A~G)	○	●

●:市販品(TAKARA)有り, ○:自家調製, —:無し

表2-3-2. 免疫学的手法による食中毒起因菌の産生する
毒素検査用試薬キット

食中毒菌	検出毒素	検出法	市販品	メーカー
腸炎ビブリオ	T D H	RPLA法	KAP-RPLA	デンカ生研
毒素原性大腸菌	L T	RPLA法	VET-RPLA	デンカ生研
		EIA法	コリスEIA	デンカ生研
		RPLA法	ハートックス-F	デンカ生研
腸管出血性大腸菌	V T	EIA法	オ-9VT1/VT2	オ-ソ-クリカル
		EIA法	ハハスEHEC	日本ハイオラット
		免疫クロマト法	ハートキシンテストワユ-	和光純薬
セレウス菌	下痢毒	RPLA法	CRET-RPLA	デンカ生研
黄色ブドウ球菌	エンテロトキシン(A~E)	RPLA法	SET-RPLA	デンカ生研
ウェルシュ菌	エンテロトキシン	RPLA法	PET-RPLA	デンカ生研

[4] 細菌性食中毒起因菌の検査に使用する培地

食中毒起因菌の検査に使用する培地は各メーカーより数多く市販されている。本調査では、国内で市販されている製品のうち、今回対象とした菌種に該当する培地に限って菌種別に整理をおこなった。(表2の1～11)

表の項目は製品名、製造メーカー、使用目的、測定原理、培養時間とした。

本稿で取り上げた菌種別の培地数は次のとおりである。

(1) 腸炎ビブリオ	6種類	表 2-4-1
(2) サルモネラ属菌	25種類	表 2-4-2
(3) 病原大腸菌：腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌	2種類	表 2-4-3
(4) 病原大腸菌：腸管出血性大腸菌O157	17種類	表 2-4-4
(5) カンピロバクター・ジェジュニ/コリ	5種類	表 2-4-5
(6) エルシニア・エンテロコリチカ	3種類	表 2-4-6
(7) リステリア・モノサイトゲネス	7種類	表 2-4-7
(8) セレウス菌	4種類	表 2-4-8
(9) 黄色ブドウ球菌	9種類	表 2-4-9
(10) ウェルシュ菌	5種類	表 2-4-10
(11) ボツリヌス菌	2種類	表 2-4-11

表2-4-1 腸炎ビブリオの増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
食塩ポリミキシンブイオン	日水	増菌培地		8~24時間	
アルカリペプトン水	栄研・日水	増菌培地		8時間	
TCBS寒天培地	栄研・極東・日水・BBL・Difco・Merck・OXOID	分離培地		18~20時間	
ビブリオ寒天	栄研・日水	分離培地		18~20時間	
PMT寒天	日水	分離培地			
クロモアガービブリオ	クロモアガー社	分離培地	酵素基質培地	24時間	

表2-4-2 サルモネラの増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
EEMブイオン	栄研・日水	前培養培地		18時間	
緩衝ペプトン水	栄研・BBL・OXOID	前培養培地		18時間	
テトラチオネート培地	栄研・OXOID	増菌培地		24時間	
ハーナーのテトラチオン酸塩培地	栄研・日水・BBL・OXOID・Merck	増菌培地			
ラパポード培地	栄研・OXOID・Merck	増菌培地		24時間	
ラパポート・バシリアデイス培地	栄研・OXOID	増菌培地			
セレナイト培地	栄研	増菌培地			亜セレン酸添加
セレナイト・システン培地	日水・BBL・OXOID	増菌培地			
セレナイトブリアントグリーン培地	日水	増菌培地			
SBGスルファア培地	栄研	増菌培地			
サルモシストブイオン	Merck	増菌培地			
SPRINTサルモネラ増菌培地	OXOID	増菌培地	損傷菌の増菌培地	6~8時間 24時間	サブリメント添加
SS寒天培地	栄研・極東・日水・OXOID	分離培地		24時間	
SSB寒天	日水	分離培地			
SS-SB寒天	栄研	分離培地			
DHL寒天	栄研・極東・日水・BBL	分離培地		24時間	
MLCB寒天	極東・日水・OXOID	分離培地			
ブリアントグリーン寒天培地	栄研・極東・日水・BBL・OXOID	分離培地		24時間	
XLD寒天培地	栄研・BBL・OXOID	分離培地			
XLT4寒天	Merck	分離培地		18~24時間	サブリメント添加
ESサルモネラ寒天培地	栄研	分離培地	酵素基質培地	24時間	
ESサルモネラ寒天培地II	栄研	分離培地	酵素基質培地	24時間	
クロモアガーサルモネラ	クロモアガー社	分離培地	酵素基質培地	24時間	
ランバックアガー	クロモアガー社	分離培地	酵素基質培地	24時間	
レインボーアガーサルモネラ	Biolog	分離培地	酵素基質培地	24時間	

表2-4-3 腸管出血性大腸菌以外の大腸菌の分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
DHL寒天	栄研・極東・日水・BBL	分離培地		24時間	
MacConky Ager	栄研・日水・Difco	分離培地		24時間	

表2-4-4 腸管出血性大腸菌の増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
mEC培地	日水	増菌培地			サブプリメント添加
ノボピオン加mEC	栄研・極東	増菌培地			
SIB寒天	極東	分離培地			
MacConky Ager	栄研・日水・Difco・OXOID	分離培地			
MacConky Sorbitol Ager	日水・Difco	分離培地			
Sorbitol MacConky Ager	栄研・日水・BBL・Difco・MAST・OXOID	分離培地			CTサブプリメント添加
CT-SMAC寒天培地	日水・デンカ生研・ピオリュエ	分離培地			
CT-ソルビトール寒天培地	BBL	分離培地			
DHL-ソルビトール寒天	和光純薬	分離培地			
クロモアガー0157	クロモアガー社	分離培地	酵素基質培地	24時間	
クロモアガー0157 TAM	クロモアガー社	分離培地	酵素基質培地	24時間	
レインボー寒天0157	Biolog	分離培地	酵素基質培地	24時間	
BCM 0157	Biosynth	分離培地	酵素基質培地	24時間	
COLI ID寒天	ピオマリユエ	分離培地	酵素基質培地	24時間	
0157H7ID寒天培地	ピオマリユエ	分離培地	酵素基質培地	24時間	
フルオロカルト-E.coli 0157:H7寒天	Merck	分離培地	酵素基質培地	24時間	
TC-RMAC寒天培地	デンカ生研	EHEC O26分離培地	ラムノース分解性	18~24時間	

表2-4-5 カンピロバクターの増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
Prestonの培地	OXOID	増菌培地		24時間	サブリメント添加
CEM培地	栄研・樺東・日水 BBL・Difco・Merck・OXOID	増菌培地		24時間	サブリメント添加
Skirowの培地	BBL・Difco・Merck・OXOID	分離培地		48時間	サブリメント添加
Butlerの培地	BBL・Gibco・Difco・OXOID	分離培地		48時間	サブリメント添加
CCDA培地	OXOID	分離培地		48時間	サブリメント添加

表2-4-6 エルシニアの増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
1/15Mリン酸緩衝生理食塩水	日水	増菌培地		4°C 2~4週間	
CIN寒天培地	OXOID・Difco	分離培地		48時間	サブリメント添加
MacConky Ager Base	栄研・日水・Difco・OXOID	分離培地		48時間	

表2-4-7 リステリアの増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
リステリア増菌培地	Merck	増菌培地		48時間	
リステリア選択増菌培地(UVM)	OXOID・Difco・Merck	増菌培地		48時間	サブリメント添加
リステリア選択増菌培地(FDA)	OXOID・Difco	増菌培地		48時間	
PALCAM・リステリア選択寒天培地	日水・Merck・OXOID	分離培地		48時間	サブリメント添加
Oxford寒天培地	日水・Merck・OXOID	分離培地		48時間	
リステリア選択寒天培地	Merck	分離培地		48時間	
養法McBride培地	OXOID・Difco	分離培地		48時間	

表2-4-4-8 セレウス菌の増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
食塩加ポリミキシンブイオン	白水	増菌培地		18~24時間	
MYP寒天培地	Merck	分離培地		18~24時間	
NGKG寒天培地	白水	分離培地		18~24時間	
PEMBA寒天培地	OXOID	分離培地		18~24時間	

表2-4-4-9 黄色ブドウ球菌の増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
7.5%NaCl加トリブチケースノイ培地	栄研・白水・BBL・Difco・OXOID	増菌培地		18~24時間	7.5%NaCl添加
食塩卵黄寒天	白水				
PEA寒天	白水				
卵黄加マンニット食塩寒天培地	栄研・白水・BBL・Difco・OXOID	分離培地		24~48時間	
卵黄加ブドウ球菌110培地	栄研・白水・BBL・Difco・OXOID	分離培地		24~48時間	
ホアメディア・エックヨーク食塩寒天培地	生培地・栄研	分離培地		24~48時間	
Baird-Parker寒天培地	BBL・Difco・Merck・OXOID	分離培地		24~48時間	
Vogel-Johnson寒天培地	栄研・BBL・Difco・Merck・OXOID	分離培地		24~48時間	
クロモアガースタップ	クロモアガー社	分離培地	酵素基質培地	24時間	

表2-4-10 ウエルシユ菌の増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
TGC培地	栄研・日水	増菌培地		24時間	
卵黄加CW寒天培地	基礎培地:日水・栄研	分離培地		24時間	
ハンフオード改良培地	栄研	分離培地		24時間	
クロスロシア測定用培地	日水	分離培地		24時間	
DS芽胞形成培地		エンテロトキシン 試験および保存		24時間	

表2-4-11 ポツリヌス菌の増菌および分離培地

製品名	製造メーカー	使用目的	測定原理	培養時間	備考
クックドミード培地	BBL・OXOID				
卵黄加GAM寒天	日水				

II. 細菌性食中毒起因菌検査マニュアルの作成と関連情報の収集

[6] 食品別黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシン検出法簡易化の試み

研究協力者：渡辺 洋子
社団法人 日本食品衛生協会

バター・チーズ・クリームからの
黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシン検出方法

①クロロホルム処理

(バターの場合)

1. 試料10gを秤量し加温溶解する。
2. 2倍量のクロロホルムを加え、5分以上振とう器で混ぜる。
3. 10ml 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.2) を加え5分以上振とう器で混ぜる。

(チーズ・クリームの場合)

1. 試料10gを秤量し、10ml 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.2) を加える。
2. 加温溶解して、5分以上振とう器で混ぜる。
3. 2倍量のクロロホルムを加え、5分以上振とう器で混ぜる。

②酸処理

1. 10分室温で静置、遠心分離 3000 r p m,20分間
2. 水層を取る。(上層)
3. 6N塩酸でpH4.0にする。
4. 10、遠心分離 3000 r p m,20分間。
5. 5N水酸化ナトリウムでpH7.2にする。
6. 5分以上室温で静置、遠心分離 3000 r p m,20分間。
7. 沈殿物を取らないように溶液を回収する。

③限外ろ過処理

1. 限外ろ過膜付きチューブに上記の溶液を入れる。(10,000MWCO)
2. 遠心分離 3000 r p m,20分間
3. 濃縮残液を回収する。(上部チューブ)

④脱塩処理

1. 濃縮残液を2.5ml ずつ脱塩カラム (アマシャムファルマシア PD-10) に通す。
2. 溶出液を合わせる。

⑤濃縮

1. 溶出液をロータリーエバポレーター (50℃) で蒸発乾固する。
2. 測定キットの希釈液 0.5ml を加え、内容物をよく溶かし測定液とする。

⑥測定

デンカ生研 (株) ブドウ球菌産生エンテロトキシン検出キットで測定。

アイスクリームからの
黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシン検出方法

①酸処理

1. 試料 10 g を遠心管に秤量。
2. 2 N 塩酸を加え、pH4.5 に調製する。
3. 攪拌して室温に 10 分間静置する。
4. 遠心分離 3000rpm, 20 分。
5. 上清を遠心管に写し、2N 水酸化ナトリウムを加え pH6.5 にする。

②クロロホルム処理

1. 等量のクロロホルムを加える。
2. 振とう器で 10 分間混ぜる。
3. 遠心分離 3000rpm, 20 分。
4. 水層を取る（上層）。

③限外ろ過処理

1. 限外ろ過膜付きチューブに入れる（10,000MWCO）。
2. 遠心分離 3000rpm, 20 分。
3. 濃縮残液を回収する。

④脱塩処理

1. 濃縮残液を 2.5m l ずつ脱塩カラム（アマシャムファルマシア PD-10）に通す。
2. 溶出液を合わせる。

⑤濃縮

1. 溶出液をロータリーエバポレーター（50℃）で蒸発乾固する。
2. 測定キットの希釈液 0.5m l を加え、内容物をよく溶かし測定液とする。

⑥測定

デンカ生研（株）ブドウ球菌産生エンテロトキシン検出キットで測定。

ゼラチン及び多糖質を含む試料の前処理方法

1. 酵素分解法

- ① 試料 10g に水 90ml を加え、必要なら遠心分離処理を行う。
- ② 下記の適切な酵素を加え、下記条件下の pH で 5 時間以上酵素分解を行う。
- ③ 遠心分離(毎分 3000 回転、10 分)を行い、沈殿を取り除き、水槽 10ml を通常の処理に供する。

2. 酵素条件

- a) ペクチン、果汁のみ：pH4、ペクチナーゼ 10mg
- b) でんぷん、デキストリン、小麦粉など：pH6-7、
アミラーゼ(食物繊維測定用)10ml
- c) 増粘多糖類、寒天、CMC など：pH5、セルラーゼ 10mg
- d) ゼラチン：pH5、パパイン 10mg
- e) デキストリン：pH4.5、グルコアミラーゼ 10mg

離乳食・冷凍食品からの
黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシン検出方法

①試料の調製

1. 試料を 10g 秤量し DW10ml 加える。
2. ヒスコトロンで粉碎する。
3. 遠心分離 3000rpm,20 分を行う。
4. 沈殿物があれば、それを取らないようにして上清を取る。

②上記の試料を牛乳の検出方法①～③を行う。

③限外ろ過処理

1. 限外ろ過膜付きチューブに入れる。(100,000MWCO 又は 50,000MWCO)
2. 遠心分離 3000rpm,20 分。
3. 濃縮残液を回収する。
4. 以下、10,000MWCO も同様に遠心分離をかける。

④測定

デンカ生研(株)黄色ブドウ球菌産生エンテロトキシン検出キットで測定。