

## B. 研究方法

1. 国内および外国における黄色ブドウ球菌検査法の現状把握
2. 直接平板培養法における選択分離培地の検討
3. 選択増菌培養法における増菌培地と培養時間の検討
4. 黄色ブドウ球菌検査法の原案作成と提案

## C. 研究結果

1. 国内および外国における黄色ブドウ球菌検査法の現状把握  
直接平板培養法と選択増菌培養法について、ISO6888-1～3【1-3】およびBAM【4】の検査法を表1に示す。

表2にはサンプル調製に用いられている主な希釈液とその組成を示した。

ブドウ球菌用の選択分離培地は種々のものが市販されているが、選択剤として、塩化ナトリウムを用いているものと、亜テルル酸カリウム、塩化リチウム、グリシンを用いているものに分けられ、表3に代表的な培地とその組成を示した。

表4にはBAMとISOで用いられているコアグララーゼ試験法

を示した。操作手順はBAMの方が簡便である。

表5には市販されている主な選択分離培地とその製造元を示した。

表6には代表的な選択増菌培地とその組成を示した。選択剤として、塩化ナトリウムを用いているものと、亜テルル酸カリウム、塩化リチウム、グリシンを用いているものに分けられる。

2. 直接平板培養法における選択分離培地の検討

- 1) 加熱損傷菌(52℃、60分)の各種選択分離培地での発育菌数比較(表7)

3菌株について、加熱損傷菌を作製して市販粉末培地であるMSEY培地とBP培地における発育菌数を比較検討した。対照としてTSAとBA培地を用いた。その結果、供試した菌株の種類や培地の製造元によって若干バラツキがみられたが、全体で見ると、発育菌数は供試した3株いずれも、BP培地がMSEY培地に比べて多かった。またMSEY培地と、本培地に1%ピルビン酸ナトリウムを添加した(MSEYP)培地を比較したとこ

ろ、発育菌数は、3株中2株ではMSEYP培地で多かった。

## 2) 市販食品におけるMSEY培地とBP培地の検出率比較

市販の食肉類およびその加工品、魚介類計94検体について両培地の検出率を比較した。検出率はMSEY培地で8.5%、BP培地で11.7%、培地間の差はみられなかった(表8)。また、両培地で黄色ブドウ球菌陽性となった検体の発育菌数(表9)についても、大きな差はみられなかったが、BP培地では検体中の菌数が少ない場合には検出できる可能性があると思われた。

## 3. 選択増菌培養法における増菌培地と培養時間の検討

### 1) 市販食肉における直接平板培養法と選択増菌培養法の検出率比較(表10)

**10g秤量検査:** 食肉全体で見ると、直接平板培養法では14.9%(30/201)であったが、選択増菌培養法では66.2%(133/201)であり、選択増菌培養法は直接平板培養法と比べて検出率が4.4倍に上昇した。

**25g秤量検査:** 食肉全体で見ると、

直接平板培養法では10.4%(10/96)、であったが、選択増菌培養法では52.1%(50/96)であり、選択増菌培養法は直接平板培養法と比べて検出率が5.0倍に上昇した。

10gおよび25g秤量いずれも、選択増菌培養法が有意に高い検出率を示した。

### 2) 選択増菌培養法(MPN法)を用いた市販Ready-to-eat食品からの黄色ブドウ球菌の検出状況

2006年4月~7月にかけて、兵庫県のスーパーマーケット9店舗と大阪府のスーパーマーケット8店舗、計17店舗で市販されていた12品目計112検体を供試した。黄色ブドウ球菌の汚染菌数は最確数(Most Probable Number;MPN)(3管)法により測定した。各種検体を無菌的に25g秤量して、滅菌フィルターバッグに入れ、次に225mlの滅菌生理食塩水を加え、ストマッカーを用いて1分間ホモジナイズし、10倍乳剤を作製した。この乳剤10ml、1mlおよび0.1mlを、それぞれ7.5%NaClおよび1%ピルビン酸ナトリウ

ム加ハートインヒュージョン (HI)ブイヨン培地 (ニッスイ) 10 ml の入った試験管 3 本ずつに接種し、35℃、24 時間培養した。なお、試料 10 ml 用の増菌培養には 2 倍濃度の増菌培地の入った三角フラスコ(100 ml 用)を用いた。各試験管の培養液をイノキュレーションループ(1 μl、SARSTEDT、ドイツ)で 3% 卵黄加マンニット食塩培地(ニッスイ)に塗抹し、35℃、48 時間培養した。

黄色ブドウ球菌の検出率は表 11 に示すように、112 検体中 17 検体 (15.2%) であった。品目別にみると、和え物 14.3%、焼き物 12.5%、揚物 20.0%、酢の物 50.0%、生食肉 25.0%、生食魚 29.6% であり、カット野菜類、煮物、蒸し物、漬物類、豆腐類、その他 (海鮮飯、冷やし中華、サケフレーク) からは検出されなかった。黄色ブドウ球菌が分離された 17 検体における汚染菌数は 0.3~4.3 MPN/g であった (表 12)。

市販 Ready-to-eat 食品からの検出率は約 15% で、汚染菌数も少なかったが、表には示して

いないが、17 検体中 13 検体 (76.5%) からエンテロトキシン産生株が分離されており、A 型 3 株、B 型 2 株、C 型 4 株、AB 型 2 株、BC 型 1 株、ABC 型 1 株であった。

### 3) 選択増菌培地の種類と食塩濃度による検出率比較 (表 13)

HIB および TSB 培地に、食塩を 5%、7.5%、10% およびピルビン酸ナトリウムを 1% の割合で添加した選択増菌培地を作製し、また選択剤として亜テルル酸カリウムが添加された GCB 培地も使用した。次に、牛、豚、鶏ミンチ肉計 30 検体の 10 倍乳剤を作製し、その 10 ml を、2 倍濃度の選択増菌培地 10 ml に添加し、35℃、24 時間培養後、その培養菌液 1 μl を MSEY 培地(ニッスイ)に塗抹し、35℃、48 時間培養後、判定を行った。

黄色ブドウ球菌検出率は、5%、7.5%、10% 食塩加 HIB 培地ではそれぞれ 50.0%、63.3%、60.0%、また 5%、7.5%、10% 食塩加 TSB 培地では 50.0%、50.0%、60.0% であり、GCB 培地では 43.3% であった。HIB

と TSB 培地に添加する食塩濃度間、両培地間で大きな差はみられなかった。

#### 4) 各種の選択増菌培地の培養時間による検出率比較

前述の各種の選択増菌培地における検出率比較の成績から、また BAM では選択増菌培地として 10%食塩+1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地、ISO では GCB 培地を使用していることから、本実験ではこれらを勘案して、7.5%食塩+1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地、10%食塩+1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB 培地および GCB 培地を選び、MPN 法(3 本法)により培養時間の比較検討を行った。検体は市販の鶏ミンチ肉 30 検体を用いた。

表 14 に示すように、黄色ブドウ球菌検出率は、7.5%食塩加 TSB 培地では、24 時間培養で 96.7%、48 時間培養で 96.7%、10%食塩加 TSB 培地では、24 時間培養で 93.3%、48 時間培養で 93.3%であった。24 時間培養と 48 時間培養とで検出率に差がみられなかった。

GCB 培地では、24 時間培養で

70.0%、48 時間培養 90.0%で、48 時間培養で検出率が上昇した。

次に、24 時間培養と 48 時間培養の MPN 値をみると(表 15)、48 時間培養で MPN 値の上昇がみられた検体は、7.5%食塩加 TSB 培地で 10 検体(34.4%)、10%食塩加 TSB 培地で 16 検体(57.1%)、GCB 培地で 18 検体(66.7%)であり、培養時間の増加に伴って、MPN 値が上昇した。

#### 5) 選択増菌培養液からの MSEY 培地と BP 培地の検出率比較

表 16 に示すように、選択増菌培地からの黄色ブドウ球菌の検出率は、MSEY 培地と BP 培地とで差がみられなかった。

#### 4. 黄色ブドウ球菌検査法の原案作成と提案

提案した黄色ブドウ球菌検査法(直接平板培養法、選択増菌培養法、菌数測定法)のプロトコールは資料 1~3 に示した。

#### D. 考察

黄色ブドウ球菌の検査法のための検体の採取と試料の調製については、標準法検討委員会および作業部会で論議された点を

ふまえて、検体量は25 gとし、サンプル調製に用いる希釈液はサルモネラと同じく緩衝ペプトン水(BPW)を使用し、10倍乳剤を調製する。また、培養温度は35℃とし、±1℃の温度幅をもたせた。培養時間も24時間および48時間に、それぞれ±2時間の時間幅をもたせた。

作業部会では、直接平板培養法における選択分離平板培地として、わが国で古くから汎用されている3%卵黄加マンニット食塩寒天培地(MSEY)と諸外国で汎用されているBaird-Parker寒天培地(BP)にしぼり、両培地の発育支持能について比較実験を行っている。加熱損傷菌を用いた基礎実験では、BP培地が加熱損傷菌に対して発育支持能が高いことが示された。また、市販の自然汚染食品を用いた応用実験では、菌検出率はBP培地がMSEY培地に比べ、わずかに高かった。さらに、選択増菌培地からの黄色ブドウ球菌の検出率は、MSEY培地とBP培地とで差がみられなかった。

作業部会では、国際的に通用する検査法を提案するに際し、

特に諸外国との整合性を考慮して、また加熱、凍結などによる損傷菌にも対応させるために、選択分離培地としてBP培地を推奨する考え方を持っているが、第8回標準法検討委員会で、培地を1本にしぼる必要があるのだろうか？ 両培地には一長一短があり、複数の培地を使用した方が良いのでは？等の意見が出され、今回、提案した検査法の原案ではMSEY培地とBP培地を並立することとした。いずれにしても、両培地の性能比較は重要な検討課題であり、今後も継続して検討していく予定である。

次に、ブドウ球菌食中毒発生時における黄色ブドウ球菌検査の場合には、直接平板培養法で十分対応できると思われるが、市販の自然汚染食品における黄色ブドウ球菌の汚染実態調査をする場合には、直接平板培養法のみでは黄色ブドウ球菌が少数の場合(100 cfu/g以下)には検出できないことが多く、最近では選択増菌培養法を取り入れた論文【6-15】が散見されるようになり、選択増菌培養を行うこと

により、検出率が明らかに上昇することが報告されている。わが国の食品衛生検査指針【5】、ISO 6888-3【3】およびBAM【4】にも、最確数(Most Probable Number;MPN)法による選択増菌培養法が記載されている。今回、市販食肉を用いた実験でも、選択増菌培養法の有用性が証明されている(表10)。

日常の黄色ブドウ球菌の検査に、選択増菌培養法を取り入れる必要があるかについては、十分に議論する余地があると思われるが、本作業部会では、ISOおよびBAMとの整合性を取るために、選択増菌培養法についても検討することにした。この際、問題となるのは選択増菌培地と培養時間の選定である。これらについて実験を行い、その結果、最終的に7.5%NaCl+1%ピルビン酸ナトリウム加TSB、10%NaCl+1%ピルビン酸ナトリウム加TSB、Girolitti-Cantoni broth(GC)の3培地が選択されたが、GC培地は検出率が前2者に比べて低く、また亜テルル酸カリウム溶液や流動パラフィンの添加など手技の煩雑性な

どを考慮して除外された。前2者については、検出率は24時間培養と48時間培養でほとんど差がみられなかった。食品検体の種類によっては議論の余地があると思われるが、7.5%NaCl+1%ピルビン酸ナトリウム加TSB培地で、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $22\pm 2$ 時間培養するものを原案として提出した。また、選択分離平板培地としては、直接平板培養法と同様に、MSEY培地とBP培地を並立することにした。

次年度は、今回提案した検査法について、黄色ブドウ球菌作業部会を中心にコラボ研究を実施し、その妥当性を検討する予定である。また、黄色ブドウ球菌の検査では、食品取り扱い施設等における衛生管理という観点から、「製造・加工・調理施設内の器械・器具の拭き取り検査」や「人の手の拭き取り検査」が一般的に行われていることから、「拭き取り検査」にも対応できる検査法を検討する予定である。さらに、黄色ブドウ球菌では、エンテロトキシンの検査が最も重要な項目であることから、この検査方法について、今

後議論しなければならないと思われる。

#### E. 結論

今回、提案した黄色ブドウ球菌検査法は規格基準を意識したものでなく、食品衛生検査をす  
るにあたっての「わが国における基本的な黄色ブドウ球菌の標準検査法」との立場で、作成したものである。検査法のプロト  
コールを提示したが、この検査法が妥当な方法であるかについ  
て、次年度では作業部会を中心  
にコラボ研究を実施する予定で  
ある。

#### F. 引用文献

1) ISO 6888-1: 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).

2) ISO 6888-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)—Part 2: rabbit plasama fibrinogen agar medium (1999).

3) ISO 6888-3: Microbiology of food and animal feeding stuffs —Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)—Part 3: Detection and MPN technique for low numbers(1999).

4) Bennett, R.W. and Lancette, G.A.:FDA Bacteriological Analytical Manual *online*, Chapter 12, *Staphylococcus aureus* (2001).

- 5) 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,  
p. 236-248, 社団法人 日  
本食品衛生協会, 東京  
(2004).
- 6) 楠 くみ子, 潮田 弘, 神 真  
知子, 新井輝義, 岩谷美枝,  
石上武, 山田澄夫: 東京都  
多摩地区における市販生食  
用魚介類の細菌汚染調査成  
績(1986-1996). 日食微誌,  
15, 161-165 (1998).
- 7) 野村秀一, 原賀壮勇, 花木  
秀明, 永山在明:市販刺身  
の黄色ブドウ球菌による汚  
染状況調査—平板培養法と  
増菌培養法の比較検討—.  
日食微誌, 19, 17-20  
(2002).
- 8) 潮田 弘:黄色ブドウ球菌  
の増菌培養について—食品  
衛生に関わる黄色ブドウ球  
菌検索に増菌培養法の普及  
を促したい—. 食衛誌, 41,  
J-335 (2000).
- 9) Wada, T., Nakayori, S.,  
Ishibashi, W., Aoki, Y.,  
Kawahira, Y., Sunada, A.  
and Murakami, K.: Rapid  
detection of  
*Staphylococcus aureus*  
for food hygiene using a  
combination of  
enrichment culture and  
gene amplification (PCR).  
*Jpn.J.Food Microbiol.*, **22**,  
72-76 (2005).
- 10) Kitai, S., Shimizu, A.,  
Kawano, J., Sato, E.,  
Nakano, E., Kitagawa, H.,  
Fujio, K., Matsumura, K.,  
Yasuda, R. and Inamoto,  
T: Prevalence and  
characterization of  
*Staphylococcus aureus*  
and enterotoxigenic  
*Staphylococcus aureus* in  
retail raw chicken meat  
throughout Japan.  
*J. Vet. Med. Sci.*, **67**,  
269-274 (2005).
- 11) 清水晃, 堀江理香: 1 スー  
パーマーケットで市販され  
ていた鶏肉・豚肉の半年間  
にわたる黄色ブドウ球菌汚  
染調査と PFGE を用いた疫  
学解析. 日食微誌, 16,  
257-261 (1999).
- 12) 中 峰松、清水 晃、河野



- 潤一、五十君静信：市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状．日食微誌、**23**, 217-222 (2006).
- 13) 清水 晃、松村浩介、藤尾公輔、河野潤一、北井 智、五十君静信：綿棒を用いた拭き取り増菌培養法による市販豚および牛スライス肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状．日食微誌、**23**, 242-246 (2006).
- 14) 小沼博隆、品川邦汎：食肉および食肉製品中の黄色ブドウ球菌とセレウス菌の汚染状況．肉の科学、**26**, 103-114 (1985).
- 15) 蔣 長苗、劉 佩紅、丁 建平、劉 旭光、胡 東良、品川邦汎：中国の動物性食品における黄色ブドウ球菌汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性．日食微誌、**18**, 43-47 (2001).
- 潤一、五十君静信 (2006)：市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状．日食微誌、**23**(4), 217-222.
- (2) 清水 晃、松村浩介、藤尾公輔、河野潤一、北井 智、五十君静信(2006)：綿棒を用いた拭き取り増菌培養法による市販豚および牛スライス肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状．日食微誌、**23**(4), 242-246.
- (3) 藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野潤一、北川 浩、五十君静信(2006)：市販食肉、ヒト、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性．日食微誌、印刷中
- 2) 学会発表**
- (1) 松村浩介、清水 晃、藤尾公輔、河野潤一、五十君静信 (2006)：培養法及びPCR法による市販食肉中の黄色ブドウ球菌検出法の検討、第 27 回日本食品微生物学会学術集会講演要旨集、p.75.

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

- (1) 中 峰松、清水 晃、河野

- (2) 藤尾公輔、清水 晃、松村 浩介、河野潤一 (2006): 市販食肉から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性、第 27 回日本食品微生物学会学術集会講演要旨集、p.76.
- (3) 齋藤悦子、上西 徹、河野潤一、吉田奈々子、村橋玲那、清水 晃 (2006):市販魚介類における黄色ブドウ球菌汚染と分離株の各種性状、第142回日本獣医学会学術集会講演要旨集、p.115.

#### H. 知的所有権の修得状況

なし

表1 外国における黄色ブドウ球菌検査法の比較表

FDA/CFSAN BAM		ISO 6888-1~3
直接平板培養法 (Direct Plate Count Method)		
対象菌	<i>S. aureus</i>	コアグララーゼ陽性ブドウ球菌 ( <i>S.aureus</i> , <i>S.intermedius</i> , <i>S.hyicus</i> など) 10倍乳剤または10倍段階希釈乳剤
サンプル調製 (表 2)	10倍乳剤または10倍段階希釈乳剤	
選択分離培地 (表 3)	10倍乳剤 1ml をBaird-Parker 寒天培地 3枚 (0.4 ml, 0.3 ml, 0.3 ml) に塗抹	0.1 ml をBaird-Parker 寒天培地(またはウサギ血漿 ファイブリンローゲン寒天培地 ISO 6888-2) 2枚に塗抹
培養温度と時間	35°C, 45-48時間好気培養	35°C又は37°C, 24±2時間と48±2時間
同定法	定型もしくは疑わしい集落 試験管法によるコアグララーゼ試験 (表 4) 補助テスト:カタラーゼテスト, リノスタフィン感受性, ブドウ糖及びマンニットの嫌氣的分解, 耐熱性ヌクレアーゼ産生	定型集落と非定型集落 試験管法によるコアグララーゼ試験 (表 4)
選択増菌培養法 (Most Probable Number Method)		
サンプル調製	10倍乳剤または10倍段階希釈乳剤	10倍乳剤または10倍段階希釈乳剤
選択増菌培地 (表 5)	10% 食塩及び1% ピルビン酸ナトリウム添加 トリプトケースソイブロス(TSB) (3本法) 35°C, 48±2時間, 好気培養	Modified Giolitti and Cantoni broth (ISO 6888-3) (滅菌パラフィンまたは寒天を重層して嫌気条件) 24時間後に陽性と推定される試験管と、48時間後に 残りの全ての試験管の培養液
選択分離培地	培養液を3mmループで、Baird-Parker寒天培地に塗抹	Baird-Parker 寒天培地(またはウサギ血漿ファイブリンローゲン 寒天培地)に塗抹
培養温度と時間	35°C, 48時間 培養	37°C, 24±2時間と48±2時間 培養
同定法	定型もしくは疑わしい集落 直接平板培養法に準ずる	定型集落と非定型集落 直接平板培養法に準ずる

表2 サンプル調製に用いられている主な希釈液

- Buffered peptone water (BPW) (緩衝ペプトン水) (食肉検体) [M192]
  - Peptone 10g
  - NaCl 5g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (リン酸水素二ナトリウム) 3.5g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (リン酸二水素カリウム) 1.5g
  - Distilled water 1000 ml
  - オートクレーブ 121°C, 15分間 pH 7.2±0.2
- Sodium citrate solution (チーズ検体)
- Peptone water (NaCl含有) (0.1% ペプトン加生理食塩水)
  - Peptone 1g
  - NaCl 8.5g
  - Distilled water 1000 ml
  - オートクレーブ 121°C, 15分間 pH 7.0±0.1
- Peptone water (Peptone diluent, 0.1%) (0.1% ペプトン水) [R56]
  - Peptone 1g
  - Distilled water 1000 ml
  - オートクレーブ 121°C, 15分間 pH 7.0±0.2
- Physiological saline solution 0.85% (生理食塩水) [R63]
  - NaCl 8.5g
  - Distilled water 1000 ml
  - オートクレーブ 121°C, 15分間
- Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 [R59]
  - NaCl 7.650g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, anhydrous (リン酸水素二ナトリウム) 0.724g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (リン酸二水素カリウム) 0.210g
  - Distilled water 1000 ml
  - 1N NaOH で pH7.4 に調整、オートクレーブ 121°C, 15分間 pH7.4
- Butterfield's phosphate-buffered dilution water [R11]
  - Stock solution KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (リン酸二水素カリウム) 34g
  - Distilled water 500 ml
  - 1N NaOH で pH7.2 に調整、精製水で全量 1000 ml にする。
  - この液 1.25 ml を採り、精製水で全量 1000 ml にする。
  - オートクレーブ 121°C, 15分間

表3 ブドウ球菌用の選択分離培地の組成比較表

選択剤:塩化ナトリウム	選択剤:亜テルル酸カリウムなど
<p>マンニツト食塩培地 (ニッスイ, 栄研)</p> <p>肉エキス* 1g                      ペプトン 10g                      塩化ナトリウム 75g                      マンニツト 10g                      フェノーールレッド 0.025g                      寒天 15g                      精製水 1,000ml                      pH 7.4±</p> <p>* 栄研:2.5g</p>	<p>ペアード・パーカー寒天培地 (OXOID製)</p> <p>トリプトン 10g                      ラブ・レムコ末 5g                      酵母エキス 1g                      ピルビン酸ナトリウム 10g                      グリシン 12g                      塩化リチウム 5g                      寒天* 20g                      精製水 1,000ml                      pH 6.8±0.2</p>
<p>卵黄液の添加</p> <p>ニッスイ                      ●食塩卵寒天基礎培地(塩化リチウム添加)                      ●フェニルエチルアルコール寒天培地                      (フェニルエチルアルコール添加)</p>	<p>フォーゲル・ジョンソン寒天培地 (OXOID製)</p> <p>トリプトン 10g                      酵母エキス 5g                      マンニツト 10g                      リン酸水素ナトリウム 5g                      グリシン 10g                      塩化リチウム 5g                      フェノーールレッド 0.025g                      寒天 16g                      精製水 1,000ml                      pH 7.1±0.2</p>
<p>栄研・ニッスイ・OXOID                      ●スタヒロコッカス培地 No.110                      (ゼラチン、リン酸水素ナトリウム添加)</p> <p>OXOID製                      ●マンニツト食塩寒天培地</p>	<p>ウサギ血液ファイブリノーゲン寒天培地 (ISO 6888-2)</p> <p>ベアード・パーカー基礎培地 90ml                      亜テルル酸カリウム溶液 0.25ml                      ウシファイブリノーゲン溶液 7.5ml                      ウサギ血漿および                      トリプシンインヒビター溶液 2.5ml                      pH 7.6</p> <p>栄研                      フォーゲル・ジョンソン寒天培地</p> <p>日本ビオメリユ                      ペアード・パーカー寒天培地+RPF</p>

表4 試験管法によるコアグララーゼ試験

FDA/CFSAN BAM

定型もしくは疑わしい集落

↓

0.2~0.3ml BHI brothに入れ、混合する  
(再テスト用に1ループをTSAなどに培養)

↓

35°C, 18-24時間培養

↓

EDTA添加ウサギプラズマ\*0.5 mlを加える

↓

35°C, 6時間以上培養

↓

完全凝固、部分凝固

\*代用品：市販の乾燥ウサギプラズマ

ISO 6888-1

定型と非定型集落

↓

BHI brothで培養

↓

35°C又は37°C, 24 ±2時間培養

↓

0.1 mlのBHI 培養液に

EDTA添加ウサギプラズマ \* 0.3 mlを加える

↓

35°C又は37°C, 培養

↓

4~6時間後に凝固を調べる, 凝固していない  
なら22±2時間後に、再び調べる

陰性対照 (0.3mlのウサギプラズマ+0.1mlの  
BHI)

\* 代用品：市販の乾燥ウサギプラズマ

表5 市販されている主要なブドウ球菌分離培地と製造元

粉末培地		生培地	
マンニツト食塩培地(日本)	ベアド・パパーカー-寒天基礎培地(Oxoid)	食塩卵寒天培地(日本)	マンニツト食塩寒天培地(BD)
マンニツト食塩培地(栄研)	ベアド・パパーカー-寒天(Merck)	卵黄加マンニツト食塩培地(日本)	卵黄加マンニツト寒天培地(BD)
マンニツト食塩寒天培地(Oxoid)	ベアド・パパーカー-寒天基礎培地(BD)	マンニツト食塩培地(栄研)	卵黄加マンニツト寒天培地
マンニツト食塩寒天(Merck)	ベアド・パパーカー-寒天基礎培地	エッグヨーク食塩寒天培地(栄研)	(ピオメリュー)
マンニツト食塩寒天培地(BD)	ベアド・パパーカー-寒天基礎培地	卵黄加マンニツト食塩寒天培地(Oxoid)	
マンニツト食塩寒天培地	(ピオメリュー)	卵黄加マンニツト食塩寒天(Merck)	

表6 ブドウ球菌用の選択増菌培地の組成比較表

選択剤: 塩化ナトリウム		選択剤: 亜テレル酸カリウムなど	
7.5%食塩加ブイオン	潮田(食衛誌, 41(5), 2000)	FDA:BAM TSB+10% NaCl+1% Sodium Pyruvate	ISO 6888-3 Modified Giolitti-Cantoni broth
HIブイオン	肉エキス 5g	トリプトケース(又はトリプトース) 17g	トリプトン 10g
BHIブイオン	ポリペプトン 10g	大豆ペプトン 3g	ラブーレムコ末 5g
トリプトソナーヤブイオン	塩化ナトリウム 50g	塩化ナトリウム 100g	酵母エキス 5g
トリプトケースソイブイオン	リン酸水素ナトリウム 5g	リン酸水素ナトリウム 2.5g	塩化リチウム 5g
	酵母エキス 3g	ピルビン酸ナトリウム 10g	マンニツト 20g
	ピルビン酸ナトリウム 10g	ブドウ糖 2.5g	塩化ナトリウム 5g
	精製水 1,000 ml	精製水 1,000 ml	グリシン 1.2g
	pH 7.0	pH 7.3±0.2	ピルビン酸ナトリウム 3g
			ツイーン80* 1g
			精製水 1,000 ml
			pH 6.9±0.2
			亜テレル酸カリウム添加
			寒天又はパラフィン <sup>の重層</sup>

\* Oxoid製 : 無添加、粉ミルク: 添加

表7 加熱損傷黄色ブドウ球菌(52°C, 60分)の各種選択分離培地での発育菌数<sup>\*1</sup>

菌株	加熱前菌数	加熱後菌数 (CFU/ml)								
		TSA <sup>*3</sup>	TSAS	BA	BP (Oxoid製)	BP (BD製)	MSEY (ニッスイ製)	MSEY (栄研製)	MSEYP (ニッスイ製)	MSEYP (栄研製)
Sal2522(A:III) <sup>*2</sup>	3.3×10 <sup>9</sup>	1.2×10 <sup>3</sup>	0	9.6×10 <sup>3</sup>	7.8×10	3.0×10 <sup>2</sup>	3.3	1.7	1.8×10	6.7
Sal2508(B:VII)	3.7×10 <sup>9</sup>	9.5×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>3</sup>	7.0×10 <sup>6</sup>	3.4×10 <sup>6</sup>	2.9×10 <sup>6</sup>	6.5×10 <sup>3</sup>	5.3×10 <sup>2</sup>	1.8×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>
CCM885T	2.9×10 <sup>9</sup>	2.6×10 <sup>4</sup>	0	1.6×10 <sup>5</sup>	9.1×10 <sup>3</sup>	2.1×10 <sup>4</sup>	0	1.7	0	1.7

<sup>\*1</sup> 3回の試験結果の平均値

<sup>\*2</sup> エンテロトキシン型:コアグララーゼ型

<sup>\*3</sup> TSA :トリプトンソーヤ寒天培地 (Oxoid)

TSAS :TSA+7.0%NaCl

BA :5% 羊血液寒天培地(Oxoid TSA base)

BP :ペアー・ド・パーカー寒天培地 (3%卵黄液添加)

MSEY :卵黄加マンニット食塩寒天培地

MSEYP :1% ピルビン酸ナトリウム加MSEY

いずれも粉末培地を使用



表8 市販食品におけるマンニット食塩 (MSEY)培地とBaird-Parker (BP)培地の検出率比較  
(直接平板培養法<sup>\*1</sup>)

検体		検体数	陽性検体数			
			MSEY培地 <sup>*2</sup>	BP培地 <sup>*2</sup>	両培地	
食肉類	鶏ミンチ肉	30	7(23.3%)	6(20%)	5	
	牛ミンチ肉	15	1(6.7%)	2(13.3%)	1	
	豚ミンチ肉	15	0	1(6.7%)	0	
	牛肉タタキ	1	0	1(100%)	0	
肉を含む加工品	シューマイ(チルド)	2	0	0	0	
	メンチカツ	3	0	0	0	
	メンチカツ(冷凍)	1	0	0	0	
	ミートコロケ	4	0	0	0	
	小籠包(チルド)	1	0	0	0	
	小籠包(冷凍)	1	0	0	0	
	餃子(チルド)	3	0	0	0	
	餃子(冷凍)	3	0	0	0	
	つみれ(冷凍)	1	0	0	0	
	つくね(冷凍)	2	0	0	0	
	肉だんご(冷凍)	1	0	0	0	
	魚介類	マグロたたき(解凍)	1	0	0	0
		マグロ短冊(解凍)	1	0	0	0
		マグロ切り落とし(解凍)	1	0	0	0
むきえび		2	0	0	0	
断頭ブラックタイガー(解凍)		4	0	0	0	
スモークサーモン		1	0	1(100%)	0	
ヤリイカげそ(解凍)		1	0	0	0	
計		94	8(8.5%)	11(11.7%)	6(6.4%)	

\*1 10倍乳剤 の0.1 mlを2枚の平板に接種、35°C、48時間培養

\*2 MSEY培地は日水製、BP培地はOxoid製、  
いずれの培地にも3%卵黄液添加

表9 黄色ブドウ球菌陽性検体におけるマンニット食塩 (MSEY)培地と  
Baird-Parker (BP)培地の菌数比較

陽性検体		菌数(CFU)/g	
		MSEY培地	BP培地
鶏ミンチ肉	1	$2.1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
	2	$1.9 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
	3	20	-
	4	$6.9 \times 10^2$	$3.3 \times 10^2$
	5	$7.0 \times 10^2$	$9.3 \times 10^2$
	6	5	-
	7	-	10
	8	15	5
牛ミンチ肉	1	-	5
	2	5	5
豚ミンチ肉	-	5	
牛肉タタキ	-	15	
スモークサーモン	-	15	

表10 市販の自然汚染食肉における直接平板培養法と  
選択増菌培養法の検出率比較

試料秤量	検体*	検体数	陽性検体数	
			直接平板培養法	選択増菌培養法
10 g	精肉	45	7(15.6%)	22(48.9%)
	ミンチ肉	156	23(14.7%)	111(71.2%)
	小計	201	30(14.9%)	133(66.2%)
25 g	精肉	60	3(5.0%)	21(35.0%)
	ミンチ肉	36	7(19.4%)	29(80.6%)
	小計	96	10(10.4%)	50(52.1%)

\* 精肉およびミンチ肉はいずれも豚肉、牛肉、鶏肉を使用

表11 選択増菌培養法を用いた市販Ready-to-eat 食品からの黄色ブドウ球菌の検出状況

品目	供試検体数	陽性検体数(%)
カット野菜類	10	0
和え物	21	3 (14.3%)
煮物	4	0
焼物	8	1 (12.5%)
揚物	15	3 (20.0%)
酢の物	2	1 (50.0%)
蒸し物	2	0
生食肉	4	1 (25.0%)
生食魚	27	8 (29.6%)
漬物類	6	0
豆腐類	10	0
その他*	3	0
計	112	17 (15.2%)

\*海鮮飯、冷やし中華、サケフレーク

表12 市販Ready-to-eat食品陽性検体における黄色ブドウ球菌の汚染菌数

品目	陽性検体数	MPN/g						
		0.3	0.36	0.73	0.91	1.5	2.3	4.3
和え物	3		2		1			
焼き物	1				1			
揚物	3		1	1			1	
酢の物	1							1
生食肉	1							1
生食魚	8	1	3		2	1	1	
計	17	1	6	1	4	1	2	2

表13 選択増菌培地の種類と食塩濃度による検出率比較

検体	検体数	HIB培地*			TSB培地*		
		食塩添加濃度			食塩添加濃度		
		5%	7.5%	10%	5%	7.5%	10%
牛ミンチ肉	10	6	6	6	7	6	7
豚ミンチ肉	10	3	6	6	3	4	5
鶏ミンチ肉	10	6	7	6	5	5	6
計	30	15	19	18	15	15	18
		(50.0%) (63.3%) (60.0%)			(50.0%) (50.0%) (60.0%)		
		(43.3%)					

\* HIB: ハートインヒュージョンブイヨン培地(ニッスイ)

TSB: トリプトンソーヤブイヨン培地 (Oxoid)

いずれの培地にも1%ピルピン酸ナトリウム添加

GCB: Giolitti-Cantoni broth (Oxoid)

表14 各種の選択増菌培地の培養時間による検出率比較  
(MPN 3本法)

選択増菌培地	検体数	陽性検体数
		24 h培養
7.5%食塩加TSB培地*	30	29(96.7%)
10%食塩加TSB培地*	30	28(93.3%)
GCB培地	30	27(90.0%)
		48 h培養
		29(96.7%)
		28(93.3%)
		27(90.0%)

\* 1%ピルピン酸ナトリウム添加