

表9 MPN法における実測値(3本あたりの陽性試験管数)

検体	菌株	接種菌量 (CFU/g)	Baird-Parker			Mannitol salt			
			10 ml	1 ml	0.1 ml	10 ml	1 ml	0.1 ml	
11	CCM885T	970	3	3	3	2	3	3	2
12		970	3	3	3	1	3	3	1
13		97	3	3	2		3	2	
14		97	3	3	2		3	2	
15	NCTC9314	590	3	3	3	1	3	3	1
16		590	3	3	2	0	3	3	0
17		59	3	2	0		3	2	
18		59	3	3	1		3	3	
19	None	0	0	0	0	0	0	0	0
20		0	0	0	0	0	0	0	0

表10. 鶏肉由来株の培養上清におけるエンテロトキシンおよびエンテロトキシン遺伝子の検出

RPLA		PCRによる 遺伝子型	菌株数
SEs	RPLA titer		
A	64-128	sea	10
-		sea	3
B	64-256	seb	12
B	64	sea, seb	1
-		seb	13
C	128-256	sec	2
C	256	sec, seg, sei	1
-		sec	1
-		seb, seg, sei	5
-		seg, sei	5
-		sei	4
-		sea, seb	3
-		seb, sei	3
-		seg	3
-		sed, seh	2
-		sea, sec	1
-		sea, sec, seh	1
-		sea, seg	1
-		sec, seg, sei	1
-		seh	1

RPLAは市販のキットを用い、PCRは既報のプライマーセットを用いて multiplex PCR を行って同定した。

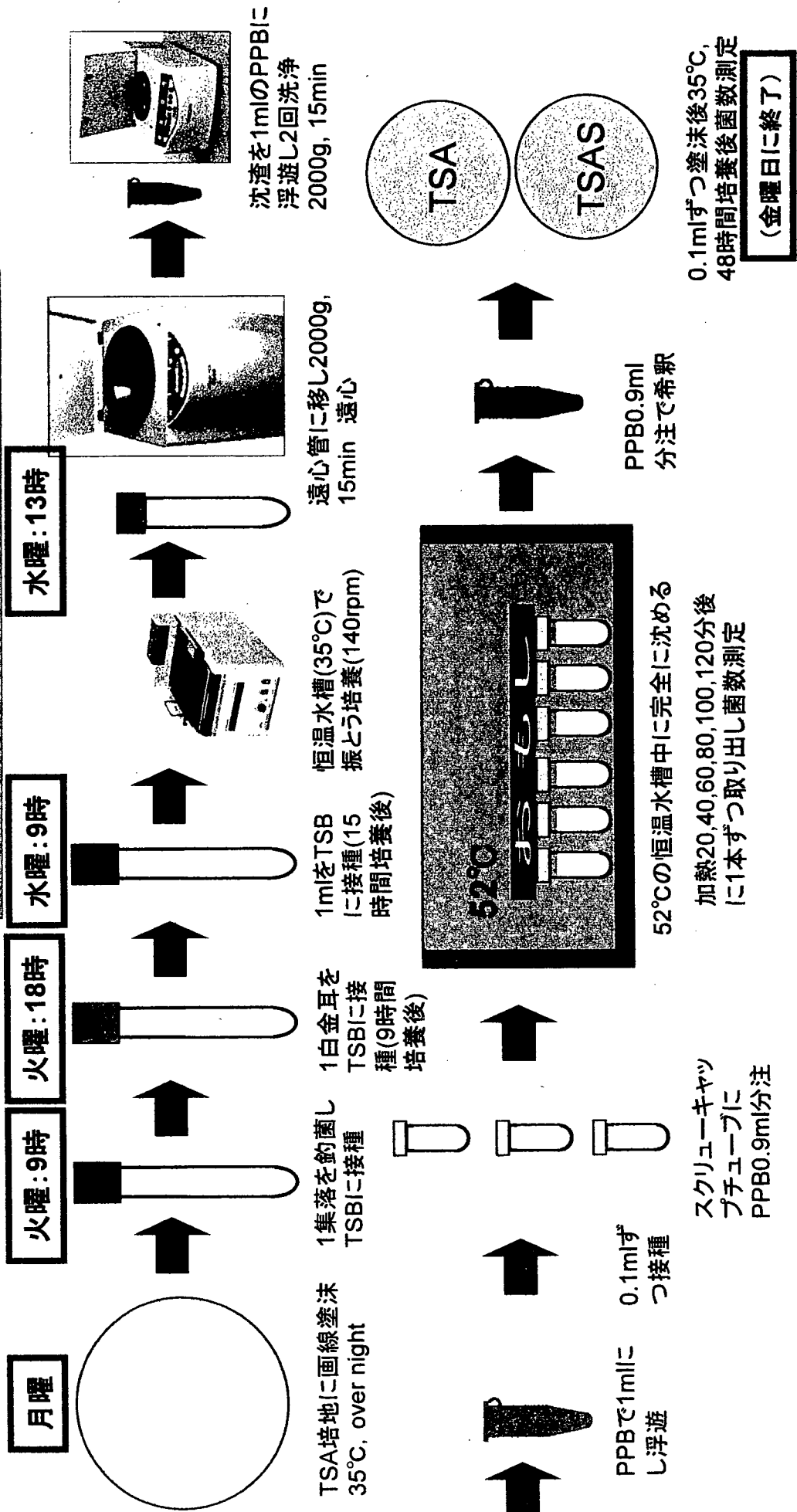
黄色ブドウ球菌加熱損傷菌の作成方法および菌数測定

使用菌株

Sa12522(A, III)
Sa12508(B, VII)
CCM885T

培地とBuffer

TSA Tryptone Soya Agar(Oxoid)
TSB Tryptone Soya Broth(Oxoid) 10ml分注
TSAS TSA+7.0%NaCl
100mM Potassium Phosphate Buffer(PPB pH7.2)



資料 1

黄色ブドウ球菌試験法 コラボスタディー実行案

Method for enumeration of
coagulase-positive staphylococci in foods

黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法

目 次

1. コラボ試験の目的
2. 参考引用規格
3. 実施予定試験所数
4. 試験方法
5. 試験検体
6. 試験菌株
7. 菌接種試料の調製
8. 試料の輸送
9. 試験
10. 試験試料の処理方法
11. 結果の提示
12. 統計

別添. 黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法

(ステージ3 : コラボ案) NIHSJ-03-ST3

1. コラボ試験の目的

食品流通経済のグローバル化にある現状を背景として、国際的に互換性のある試験を行うことは重要であり、このような観点からわが国における食品微生物試験法の見直しを行い、信頼性の高い試験法について検討を行ってきた。本コラボ試験においては、黄色ブドウ球菌試験法について検証を行うことを目的とする。本試験においては以下の再現性を確認することを目的とする。

- ①室内再現性 (Repeatability)
- ②室間再現性 (Reproducibility)

2. 参考引用規格

国際的に通用する検証を実施するために、コラボの国際規格である ISO16140 に準拠し、また、ISO の考え方を取り入れている AOAC 法のコラボレートスタディーの実施例を参照し実行する。

3. 実施予定試験所数

10ヶ所程度で実施予定

4. 試験方法

以下の試験法について、使用培地等試験法詳細を特定して検査を行い、それぞれの妥当性を検証する。

直接平板培養法における菌数測定法

5. 試験検体

本試験において、SIC コードに基づき、どのカテゴリーに対して検証するか決定する。黄色ブドウ球菌による危害の可能性が高い食材を用いて試験を行う。食品検体は食肉 1 種類につき行う。

6. 試験菌株

本試験では 2 種類の菌株を使用する。

7. 菌接種試料の調製

スパイクによる 2 段階の菌量レベルを検討する。菌液濃度は

- ① 10000-99999 CFU/g × 6 サンプル
- ② 1000-9999 CFU/g × 6 サンプル
- ③ 非スパイク試料 × 6 サンプル

8. 試料の輸送

アイスパックで7℃以下(冷蔵)に保って輸送し、各試験室に到着後は当該菌の増殖しない2-7℃で冷蔵保存。温度記録をとる。

9. 試験

別添のプロトコールによる。Baird-Parker 寒天培地と3%卵黄加マンニット食塩寒天培地を併用する

試験は、試料が到着後、速やかに開始する。

試験試料の処理方法

10. 試験試料の処理方法

- ① 試料の包装表面をアルコール綿で拭く。
 - ② 滅菌したピンセット、ハサミを用い、包装を開く。
 - ③ 試料 10g をストマッカー袋に入れる。
 - ④ 希釈液 90 ml を加え、1 分間ストマッキングして、10 倍乳剤とする。
- 注：コラボでは、試料をストマッカー袋で配布予定のため、①～③は省略

11. 結果の提示

試験結果は、直接平板培養法における菌数測定法では試料 1g あたりの黄色ブドウ球菌菌数を示し、生データと共に解析担当者に提出する。

12. 統計

すべての生データを、解析担当者が集め、統計解析を行う。

別添. 黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法

(ステージ3:コラボ案)NIHSJ-03-ST3

1. 黄色ブドウ球菌の定義

本試験法でいう黄色ブドウ球菌は、選択培地上で定型的あるいは非定型的な発育集落を示すコアグラールゼ陽性のグラム陽性球菌を指す。分類学的には黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*) のほか *S. intermedius*、*S. hyicus*、*S. schleiferi* subsp. *coagulans* など数種のコアグラールゼ陽性ブドウ球菌菌種が検出される可能性がある。

2. 試験の概要

本試験は、試料中にどの程度の黄色ブドウ球菌が存在するかを、直接平板培地に接種した後、形成された黄色ブドウ球菌の集落数を計測することにより定量する定量試験である。試料を秤量し、その9倍量の緩衝ペプトン水 (BPW) を加えて均質化し、BPW を用い 10 倍階段希釈液を作製する。その 0.1ml をそれぞれ 2 枚の選択分離平板培地に塗抹、培養し、黄色ブドウ球菌の典型的な集落を計数する。試料 1g あたりの菌数を選択分離培地上の集落数と希釈値から算出する。試験法は選択分離培地として ISO6888-1 にある Baird-Parker 培地を用いる。なお、わが国で従来から広く行われているマンニット食塩寒天培地による検査法は実績、信頼性の上から否定されるものではなく同等に扱われるべきものとした。疑わしい集落は、純培養を行った後、コアグラールゼ試験等で性状を確認し同定する。

3. 使用機器、器具

- ① 乾熱滅菌器、オートクレーブ
- ② ふらん器 (35 ± 1℃)
- ③ 寒天平板用乾燥器あるいはふらん器 (25 ~ 50℃)
- ④ 恒温水槽 (35 ± 1℃)
- ⑤ pH メーター
- ⑥ 天秤
- ⑦ メスシリンダー
- ⑧ 除菌フィルター (0.22 μm)
- ⑨ ストマッカー、ストマッカー袋
- ⑩ 滅菌ハサミ、ピンセット
- ⑪ 試験管 (小、中)、試験管立て
- ⑫ 三角フラスコ

- ⑬ 滅菌シャーレ (90 mm)
- ⑭ 白金耳、パスツールピペット
- ⑮ 滅菌ピペット (1、2、10 ml)
- ⑯ 滅菌コンラージ棒 (スプレッター)

4. 直接平板培養法 (表1)

4-1 検体の調製

検体 X g をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマッカー一袋に入れ、9 倍量の BPW 9X ml を加え、1 分間ストマッキング処理を行う。得られた懸濁液を 10 倍乳剤として菌分離に用いる。また、10 倍乳剤の 10 倍階段希釈液 (100 倍、1,000 倍) を作製する。

4-2 菌選択分離試験

4-2-1 Baird-Parker 寒天培地法

検体各希釈につき 0.1 ml ずつそれぞれ 2 枚の Baird-Parker 寒天培地に接種し、コンラージ棒を用いて塗抹する。この時シャーレ側面には触れない。15 分間乾燥させた後、平板を逆さにして培養する。35±1℃にて 48 時間培養する。途中 24 時間にて観察、定型的集落があればシャーレ裏面にマークしておく。

定型的集落とは、周囲に透明帯が存在する、黒あるいは灰色で、光沢のある隆起した円形集落を指す。集落の大きさは 24 時間培養では 1~1.5 mm、48 時間培養では 1.5~2.5 mm くらいである。培養 24 時間以降では透明帯の内側で集落の周囲直に白濁帯が観察される。

非定型的集落は透明帯や白濁帯がきわめて小さいか確認し難いもので、乳製品、エビ類、内臓の検査では注意が必要となる。

疑わしい集落はラテックス凝集反応で調べる。

菌数測定においては総集落数 300 個以下で、定型および非定型集落数が 150 個未満 (少なくとも 1 枚の平板は 15 個以上であること) の平板を対象として算出する。なお、希釈 2 段階に応じた菌数変化を示すことが信頼性は高い。

4-2-2 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地法

Baird-Parker 寒天培地法と同様、検体各希釈につき 0.1 ml ずつそれぞれ 2 枚の平板に接種、塗抹し、48 時間培養する。

定型的集落は、黄色で、集落周囲に卵黄反応による白濁帯がみられる光沢隆起した直径 1~2 mm の集落を指す。

非定型的集落は卵黄反応陰性のものであり、乳製品などでは注意が必要である。

4-3 確認試験

4-3-1 純培養

選択分離培地上に発育したブドウ球菌を疑う集落を 1 平板につき 2~5 個釣菌し、非選択性のトリプトケースソイ寒天培地平板培地に塗抹、純培養を行う。35±1℃で 22±2 時間培養する。

4-3-2 同定

4-3-2-1 グラム染色

常法に従う。

4-3-2-2 コアグララーゼ試験

試験管法によるコアグララーゼ試験（表 2）は、純培養した集落を釣菌し、0.2~0.3 ml のブレインハートインヒュージョンブイヨン（BHI）の入った小試験管に懸濁し、35±1℃で 22±2 時間培養する。同時に懸濁液の一部を非選択平板培地に培養し、コアグララーゼ再試験用および菌株保存用とする。

次に、BHI 培養試験管にウサギ血漿 0.5 ml を加え、かるく混和して、35±1℃の恒温水槽（ふらん器でも可）で培養、24 時間まで観察する。

培養後 1 時間間隔で 4~6 時間まで血漿凝固の有無を調べ、完全凝固（全体がゼリー状）または部分凝固（一部がゼリー状）した時点で陽性と判定する。観察時に試験管を強く振らないこと。陰性のものは再び 24 時間まで培養して判定する。疑わしい反応が出た場合は、非選択平板培地に増殖させた菌を用いて再試験を行う。

ウサギ血漿は市販の乾燥ウサギ血漿を使用書のとおり希釈して用いる。

本試験では市販のラテックス凝集反応試薬についても同時に試験する。

グラム陽性球菌で、コアグラゼ陽性であれば、黄色ブドウ球菌と同定する。

4-4 菌数測定

4-4-1 平板上における黄色ブドウ球菌菌数

定型的な集落のみが観察され、釣菌した集落がすべて黄色ブドウ球菌と同定されれば、定型的集落をすべて数えて、黄色ブドウ球菌菌数とする。

定型的集落が一部コアグラゼ陰性であったり、非定型的な集落がコアグラゼ陽性であるときは釣菌集落数を増やし、以下の算出式により黄色ブドウ球菌菌数とする。

$$a = b_c \div A_c \times c_c + b_{nc} \div A_{nc} \times c_{nc}$$

a ブドウ球菌数

A_c コアグラゼ試験に供試した定型的集落数

A_{nc} コアグラゼ試験に供試した非定型的集落数

b_c コアグラゼ陽性の定型的集落数

b_{nc} コアグラゼ陽性の非定型的集落数

c_c 平板上の定型的集落の総数

c_{nc} 平板上の非定型的集落の総数

4-4-2 検体試料中のブドウ球菌菌数

総集落数 300 個以下で定型的あるいは非定型的集落数が 150 個未満の平板につき、各希釈の平板上のブドウ球菌数を算出した後、検体試料 1 g あたりのブドウ球菌数を以下の式で求める。小数 1 位の有効数字 × 10 の累乗で表す。

$$N = \sum a \div V \div (n_1 + 0.1 \times n_2) \div d$$

N 試料 1 g あたりのブドウ球菌菌数

∑a 算出した平板すべてのブドウ球菌数の総和

V 接種量 (ml) 本法では 0.1

n₁ 2 段階で高濃度の希釈の平板枚数

n₂ 2 段階で 10 倍低濃度希釈の平板枚数

d 高濃度希釈の希釈値

(希釈 1 段階でのみ計測したときは $n_2 = 0$)

例 10 倍乳剤で 2 枚の平板におけるブドウ球菌数がそれぞれ 65、48
であり、100 倍乳剤で 2 枚の平板でそれぞれ 5、11 であったとき、
試料 1 g あたりのブドウ球菌菌数 N は

$$\begin{aligned} N &= (65+48+5+11) \div 0.1 \div (2+0.1 \times 2) \div 10^{-1} \\ &= 5.9 \times 10^3 \end{aligned}$$

5. 希釈液、培地、試葉

5-1 希釈液

緩衝ペプトン水 Buffered pepton water (BPW)

市販の BPW を使用

5-2 Baird-Parker 寒天培地

5-2-1 基礎培地

市販品を使用

5-2-2 亜テルル酸カリウム溶液 Potassium tellurite solution

本試験では市販品 3.5% 溶液を使用

5-2-3 卵黄液 Egg yolk emulsion

本試験では市販品 30% 溶液を使用

5-2-4 培地調製

組成

基礎培地	100 ml
亜テルル酸溶液 (3.5%)	0.3 ml
卵黄液 (30%)	5.0 ml

基礎培地を 121°C 15 分間オートクレーブした後約 50°C に保温。亜テルル酸カリウム溶液、卵黄液を加え、培地の厚さが >4 mm となるように滅菌シャーレに分注する (市販の 90 mm シャーレでは約 20 ml 分注)。

4°C で 24 時間まで保存可。使用前に寒天乾燥 (25~50°C、培地表面の水滴が消えるまで)。

5-3 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地

5-3-1 基礎培地

本試験では市販品を使用。基礎培地量は 1,000 ml 分を 900 ml に調整する。

5-3-2 培地調製

基礎培地を 121°C 15 分間オートクレーブした後、卵黄液 (5-2-3) を

100 ml 加えて混合、滅菌シャーレに分注、固めた後乾燥して用いる。

5-4 選択増菌培地

市販のトリプトケースソイブロス (TSB) に 7.5%NaCl および 1%ピルビン酸ナトリウムを添加して用いる。

5-5 非選択平板培地

本試験では市販のトリプトケースソイ寒天培地 (TSA) を用いる。

5-6 コアグラゼ試験用ブレインハートインヒュージョンブイヨン (BHI)

市販品を用いる。

5-7 コアグラゼ試験用ウサギ血漿

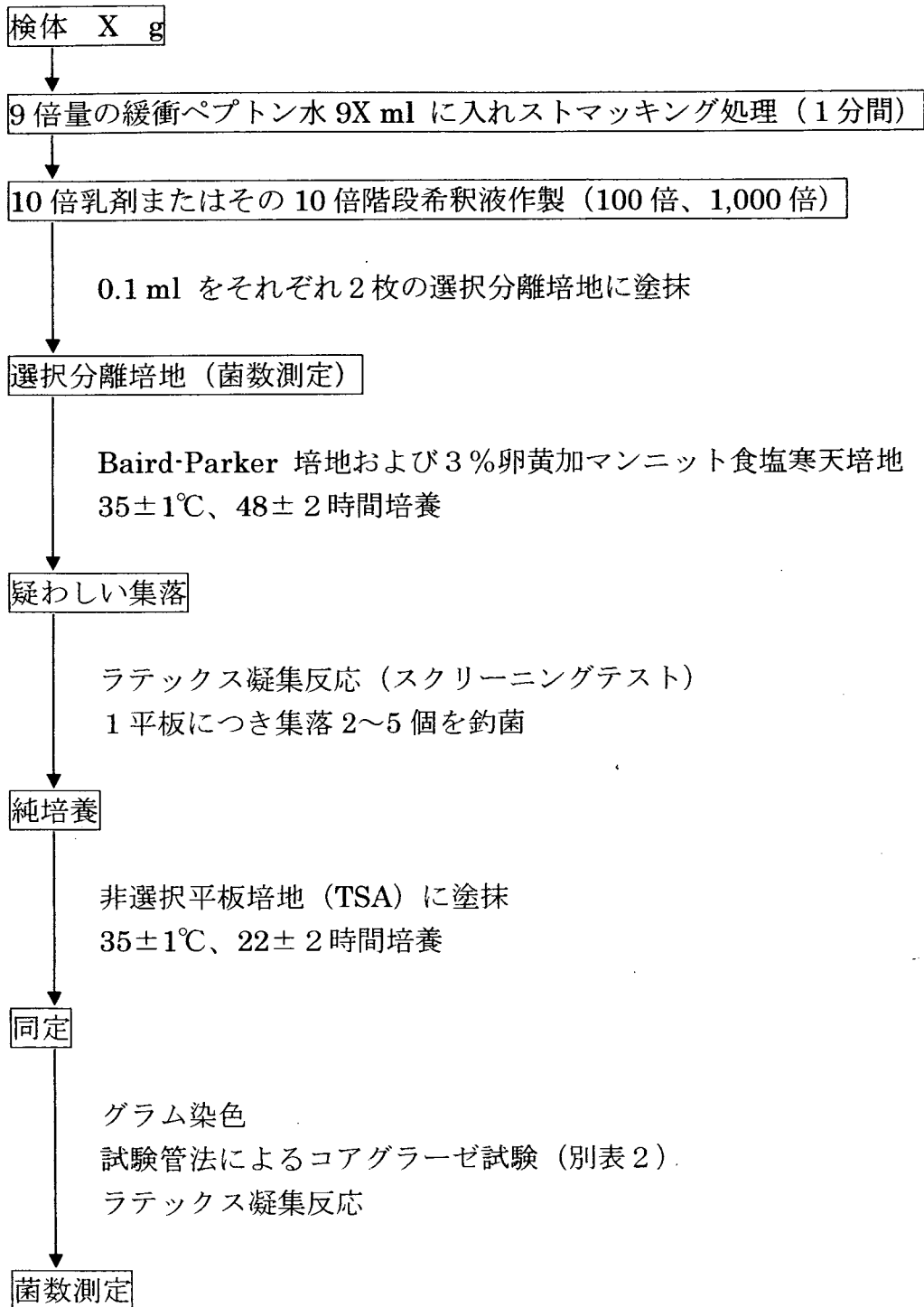
市販品を用いる。

5-8 ラテックス凝集反応試薬

市販品を用いる。

表 1

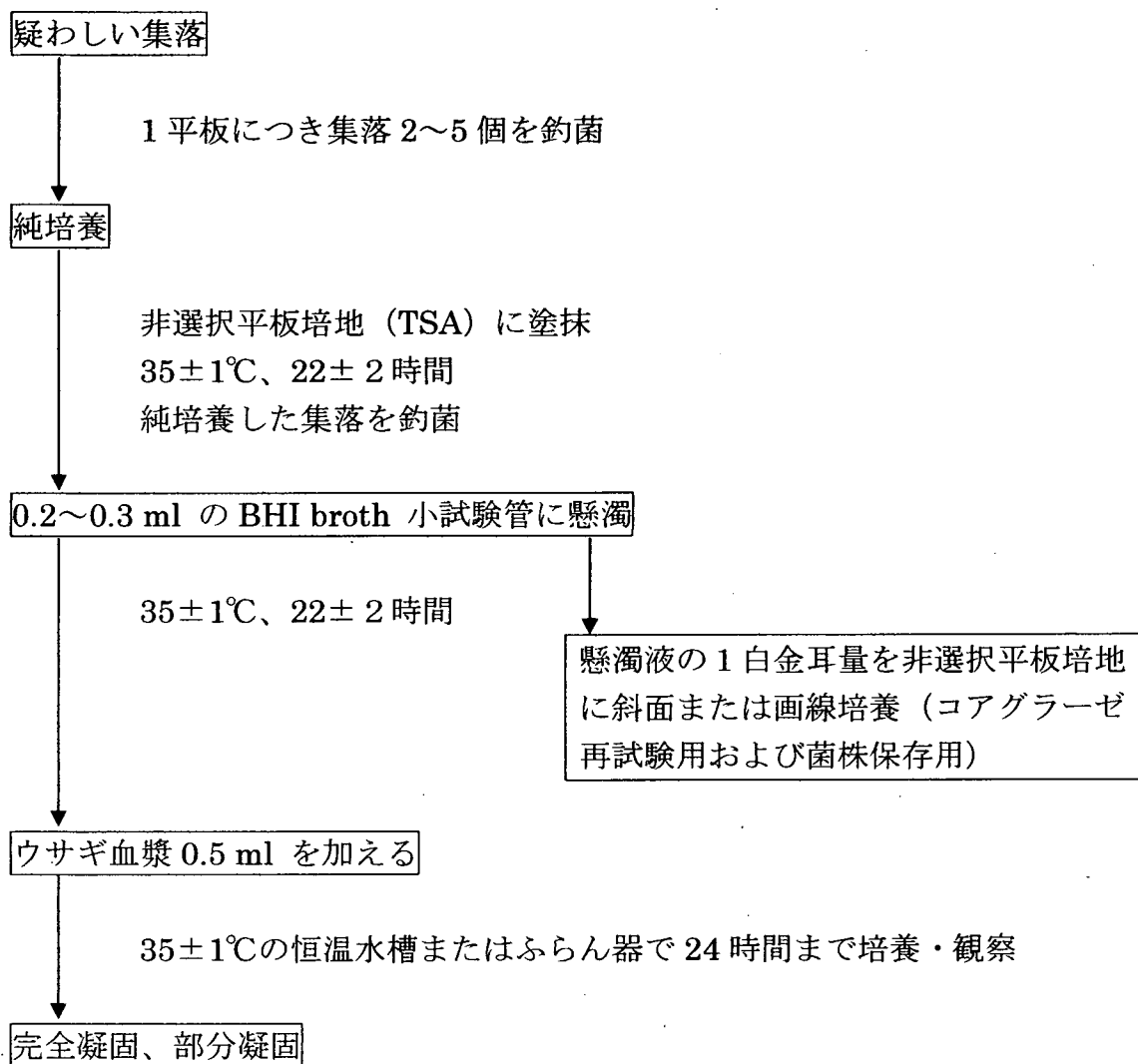
黄色ブドウ球菌の試験法・直接平板培養法



検体試料 1 g あたりの菌数を選択分離培地上の集落数と希釈値から算出する

表 2

試験管法によるコアグララーゼ試験



コアグララーゼ陽性と判定する

添付資料

希釈液、培地および試薬の組成と調製

1. 希釈液

緩衝ペプトン水 Buffered pepton water (BPW) [M192]

組成

ペプトン	10 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄ (リン酸水素二ナトリウム)	3.5 g
KH ₂ PO ₄ (リン酸水素一カリウム)	1.5 g
精製水	1,000 ml
pH 7.2 ± 0.2	
オートクレーブ 121°C、15 分間	

市販の BPW でも可

2. Baird-Parker 寒天培地

2-1 基礎培地

組成

カゼイン胨消化物 (Tryptone)	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
肉エキス	5.0 g
ピルビン酸ナトリウム	10.0 g
L-グリシン	12.0 g
塩化リチウム	5.0 g
カンテン (ゲル強度により)	12 ~ 22 g
精製水 (最終)	1,000 ml
pH 7.2 ± 0.2	

市販品 Oxoid CM0275 など

2-2 亜テルル酸カリウム溶液 (1%) Potassium tellurite solution

組成

K ₂ TeO ₃	1.0 g
精製水	100 ml
溶解 (微加熱可) 後、0.22 μm フィルターにてろ過滅菌、4°C で 1 ヶ月まで保存可	

市販品 Oxoid SR030 (3.5%溶液) など

2-3 卵黄液 (20%) Egg yolk emulsion

新鮮卵で卵殻に傷のないものを選び、洗剤でブラシ洗浄する。流水で水洗後、70%エタノールに30秒間浸漬後に風乾するか、あるいはエタノールを噴霧後に火炎滅菌する。無菌的に割卵して卵白を除去する。この場合、市販のステンレス製の黄身取り器を滅菌して使用すると容易である。卵黄を滅菌した広口びん（希釈びん等）に入れ、4倍量の無菌精製水を加え、例えば滅菌ガラス棒を用いてエマルジョンを作製する。保存する場合は4°Cで、3日以内に使用する。

(注) 基礎培地に卵黄液を加えて混合すると泡立つが、市販のステンレス製連続分注器を使用すれば、平板作製時に泡を消す手間が省ける。

市販品 Oxoid SR047 (30%溶液) など

2-4 スルファメサジン (スルファジミジン) 溶液 (0.2%)

Sulfamezathine (sulfamethazine, sulfadimidine)

プロテウス *Proteus* による汚染がある時にのみ使用可。

組成

スルファメサジン	0.2 g
NaOH 0.1M	10 ml
精製水	90 ml
溶解後、0.22 μ m フィルターにてろ過滅菌、4°Cで1ヶ月まで保存可	

2-5 培地調製

組成

基礎培地	100 ml
亜テルル酸溶液 (最終 0.01%)	1.0 ml
卵黄液	5.0 ml
(スルファメサジン溶液 2.5 ml)	

基礎培地を121°C15分間オートクレーブした後約50°Cに保温。亜テルル酸カリウム溶液、卵黄液を加え、滅菌シャーレに培地圧が>4mmとなるように分注する(市販の90mmシャーレを使う場合は約20ml分注)。組成中市販品使用の時は使用書にあるとおり所定濃度にて調整する(卵黄最終1.5%などが異なる)。

4℃で保存1日までとする（自家製の場合は、培地性能が低下しないことを確認した期間内であればこの限りではない）。

使用前に寒天乾燥（25～50℃、培地表面の水滴が消えるまで）。

市販生培地の使用を可とする。ただし、市販の生培地については、業者の示す使用期限を越えないように冷蔵で保存する。

3. 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地

3-1 基礎培地

組成

肉エキス	1 g
ペプトン	10 g
NaCl	75 g
マンニット	10 g
カンテン	15 g
フェノールレッド（0.2%溶液）	12 ml
精製水（最終）	850 ml
pH 7.4 ± 0.2	

市販品 ニッスイ、栄研など

3-2 培地調製

基礎培地を121℃15分間オートクレーブした後、卵黄液（2・3）を150 ml 加えて混合、滅菌シャーレに分注、固めた後乾燥して用いる。

市販の30%卵黄液を用いる時は基礎培地量を900 ml とし、卵黄液100 ml を添加する。

市販生培地の使用を可とする。

4. 選択増菌培地

市販のトリプトケースソイブロス（TSB）を基礎培地として、これに7.5%NaClおよび1%ピルビン酸ナトリウムとなるよう添加して用いる。

5. コアグラージェ試験用ウサギ血漿

ウサギ血漿は市販の乾燥ウサギ血漿を使用書のとおり希釈して用いる。あるいは新鮮ウサギ血漿を3倍量の滅菌精製水を用いて希釈したものをを用いてもよいが、凝固防止剤にクエン酸塩を用いた場合はEDTAを0.1%加えて使用する。

資料 2

黄色ブドウ球菌試験法 コラボスタディー実行案

Method for enumeration of
coagulase-positive staphylococci in foods

黄色ブドウ球菌の試験法・MPN 法による菌数測定法