

乳における黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの 産生性とその検出

藤 川 浩*

(東京農工大学 農学部 獣医公衆衛生学 〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8)

Production of staphylococcal enterotoxin in milk and its detection

Hiroshi Fujikawa

(Veterinary public health, Faculty of Agriculture Tokyo University of Agriculture and Technology)

要旨

黄色ブドウ球菌による食中毒事件は日本国内での細菌性食中毒の発生件数においてなおも上位に位置する。本食中毒は黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシンが原因物質であり、その中でも A 型毒素 SEA による事件が最も多い。2000年に大阪で起きた SEA による大規模事件を契機に、乳・乳製品における SEA 産生とその検出法について検討した。まず、牛乳中でのブドウ球菌増殖と SEA 産生を数学モデルを用いて解析した結果、各種温度下での本菌の増殖と SEA 産生量を高い精度で予測できた。また、生乳汚染微生物のブドウ球菌増殖と SEA 産生に与える影響を明らかにした。次に、各種環境要因下での増殖および SEA 産生の有無を統計学モデルで解析した結果、増殖および SEA 産生の有無を確率論的に予測することができた。さらに、乳・乳製品中での SEA 検出のための簡便で高い回収率の前処理方法を確立した。これらの数学的予測手法および前処理方法は牛乳の SEA に対する安全管理に役立つであろう。

1. はじめに

以前、日本国内で黄色ブドウ球菌による食中毒事件は腸炎ビブリオおよびサルモネラによる食中毒とともに非常に事件数、患者も多かった。最近では大きく様相が変化し、細菌性食中毒ではカンピロバクターによる食中毒事件が最も多く、細菌性以外ではノロウイルス食中毒事件が非常に多い。

最近3年間の日本国内での細菌性食中毒の発生件数を原因物質別に並べたものが表1である¹⁾。この表では原因物質別に各年度の上位5番目まで表

している。この表に示すようにカンピロバクター・ジェジュニ/コリが毎年1位となっている。一方、2位から5位までの細菌性食中毒事件は順位は年度によって異なるが、興味深いことにすべて同じ菌種によって占められている。黄色ブドウ球菌食中毒は最近3年間でも事件数で2-4位であり、患者数で4-5位である。このように本食中毒は依然として食品衛生上重要な食中毒であることに変わりはない。2000年には大阪を中心に約14,000人が発症した、世界でもまれにみる規模の本食中毒事件が発生した。この事件は北海道で製造された脱脂粉乳が原因であったとされている。

* hifujik@gmail.com

表 1 最近 3 年間の国内で起きた細菌性食中毒事件原因物質中の事件数で上位 5 菌種を示す。

年度	順位		事件数	患者数
2016	1	カンピロバクター	339	3272
	2	ブドウ球菌	36	698
	3	サルモネラ	31	704
	4	ウェルシュ菌	31	1411
	5	腸管出血性大腸菌	14	252
2017	1	カンピロバクター	320	2315
	2	サルモネラ	35	1183
	3	ウェルシュ菌	27	1220
	4	ブドウ球菌	22	336
	5	腸管出血性大腸菌	17	168
2018	1	カンピロバクター	319	1995
	2	腸管出血性大腸菌	32	456
	3	ウェルシュ菌	32	2319
	4	ブドウ球菌	26	405
	5	サルモネラ	18	640

2. ブドウ球菌食中毒

ブドウ球菌食中毒は本菌の産生するタンパク質毒素であるブドウ球菌エンテロトキシン Staphylococcal enterotoxin, SE によって起こる。その主症状は嘔吐、嘔気である。下痢なども付随して起きる場合がある。本食中毒は典型的な毒素型食中毒であり、食品あるいはその原材料中で SE 産生性ブドウ球菌が増殖すると本毒素が産生される。その毒素に汚染された食品を喫食すると発症する。毒素型食中毒細菌には他にボツリヌス菌、セレウス菌（嘔吐型）がある。一方、腸管出血性大腸菌はヒトの大腸で増殖し、そこでベロ毒素を産生する。これらの病原細菌は生体内毒素型食中毒細菌とよばれる。

以前から国際的にもよく知られている古典的な SE は A 型から E 型までの 5 種類ある²⁾。これらのタイプは耐熱性が知られている。その後、F 型が発表されたが、これは嘔吐作用がなく、毒素型ショック症候群を起こす TSST-1 と名称が変えられた。さらに、近年いくつかの新しい毒素型が報告され、現在では古典型以外に 20 種類以上が報告されてい

るが、その中には SE の特徴である嘔吐活性が不確定なタイプも含まれている^{3,4)}。本食中毒事件の多くは世界的にもこれら 5 つのタイプの SE によって起こり、特に A 型 SEA による事件が多い⁵⁾。上述した大阪での事件も SEA によって起きた⁶⁾。

そこで、本解説では牛乳及び乳製品を含めた食品及びその原材料中でのブドウ球菌の SEA の産生性、検出法などを筆者がこれまで検討してきたことを含めて説明したい。

2. SEA 産生性の特徴

黄色ブドウ球菌の一部の菌株が SE を産生し、更にその一部が SEA を産生する。温度、栄養、水素イオン濃度（有機酸等による）、水分活性（食塩などによる）、酸素分圧など各種の環境条件下で、ブドウ球菌の SE 産生性がどのような影響を受けるかはこれまで多くの論文、報告がある^{2,7)}。ここでは、液体培地（Brain heart infusion broth）中での本菌の増殖と SEA 産生挙動を検討した結果を示す⁸⁾。なお、用いた菌株は青山等によって検討された菌株である⁹⁾。

この株の各種温度での SEA 最大産生量を振とうおよび静置培養で比較した。なお、温度帯は 14°C から 42°C とし、培養はそれぞれ最大産生量に到達するまで（2.6 日間から 22 日間まで）行なった。その結果、図 1A に示すように、振とう培養で SEA 最大産生量は 30°C にピークがあった。一方、静置培養では産生量は低く、ピークは見られず、26°C から 42°C にかけて徐々に増加が見られた。最大産生時の菌濃度は図 1B に示すように、両培養とも温度による大きな差は見られなかった。振とう培養は静置培養よりも SEA 産生量および菌濃度がともに高いが、細胞 1 個当りの毒素産生量は必ずしも高くはなかった。

この菌株の SEA 産生の最適温度（30°C）での振とうおよび静置培養での増殖と毒素産生の時間経過を調べた。その結果、図 2 のように両培養において S 字型増殖曲線を描いた。増殖対数期の傾き（増殖速度）に大きな差はないが、最大菌濃度は振

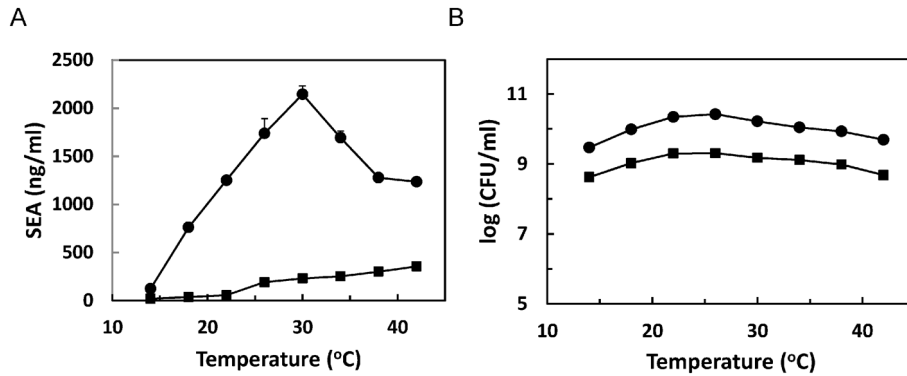


図1 菌株11658の各種温度での最大SEA産生量と増殖⁸⁾

A. 最大SEA産生量 B. 最大産生時の菌濃度

●, 振とう培養, ■, 静置培養

培養温度帯: 14°C-42°C, バーは各点での標準誤差を示す。

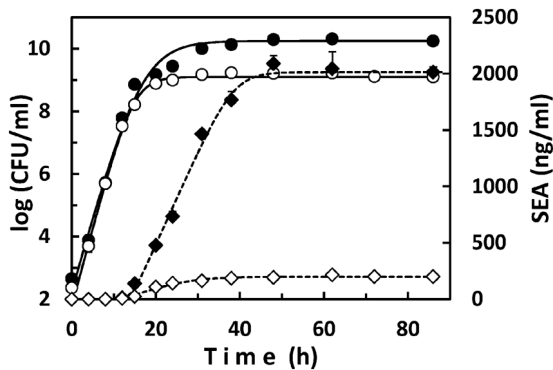


図2 菌株11658のSEA産生最適温度での増殖とSEA産生⁸⁾

●, 振とう培養での増殖, ○, 静置培養での増殖,

◆, 振とう培養でのSEA産生, ◇, 静置培養でのSEA産生

各曲線は新ロジスティックモデルで描いた。

バーは各点での標準誤差を示す。

とう培養の方が1 log, すなわち10倍ほど高かった。SEAの最大産生量は振とう培養の方が約10倍高く, 両培養とも毒素産生は対数増殖期後期から定常期にかけて見られた。

3. 牛乳中での増殖とSEA産生

2000年に大阪で起きたSEAによる食中毒事件は北海道内の工場で脱脂粉乳製造中に起きた停電事故によると推定されているが, 牛乳中でブドウ球菌はどのように増殖し, 毒素を産生するかを検討し

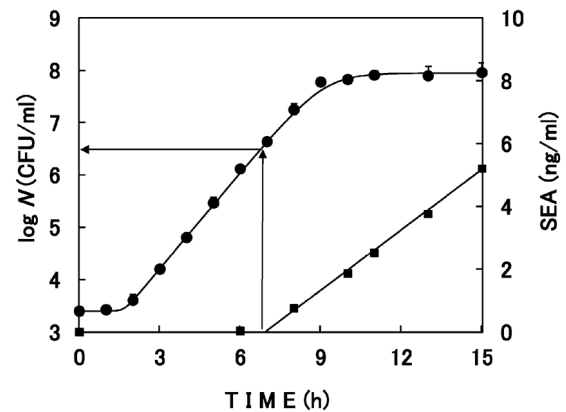


図3 牛乳中黄色ブドウ球菌12057の増殖とSEA産生量(32°C)

文献¹⁰⁾を改変した。矢印は毒素産生開始時間とその菌数を示す。

た¹⁰⁾。

市販牛乳にSEA産生株12057を接種し, 定温(32°C)で保存した結果を図3に示す。ブドウ球菌の増殖はS字型曲線を描き, 最大菌濃度は約 10^8 CFU/mlに達した。なお, 増殖は新ロジスティックモデルを用いて解析した。牛乳中では本菌と競合する微生物もほとんどいないので, 上記の液体培地中の増殖と同様な結果が得られた。SEA産生量はタイムラグの後, 時間と共に直線的な増加がみられたので, この産生は1次反応と考えた。また, 毒素産生直線とX軸との交点, すなわち見かけ上の産生開始点は図の矢印に示すように菌濃度 $10^{6.5}$

CFU/mlに相当した。この産生開始菌濃度は温度によらずほぼ一定であった。さらに保存期間が長く

なると、上記の液体培地と同様に毒素産生量は一定値に近づいた。

各種定常温度で同様な増殖およびSEA産生量を測定し、新ロジスティックモデルを用いてデータを解析した。その結果から、変動温度下における牛乳中の本菌の増殖とSEA産生量を温度履歴から予測した。その例を図4に示す。すなわち、図4Aのような温度下での本菌の増殖とSEA産生量の実測値と予測値を図4Bに示す。増殖および毒素産生共に高い精度で予測された。

これらの解析結果を基に筆者らは牛乳中におけるブドウ球菌の増殖とSEA産生量を予測するプログラムを作成し、(財)食品産業センターのウェブサイト(HACCP支援事業)上に掲載した¹¹⁾。一般ユーザーは図5に示すように温度履歴を画面右側に入力すると、中央部にブドウ球菌濃度と毒素産生量の予測値が時間によって示される。

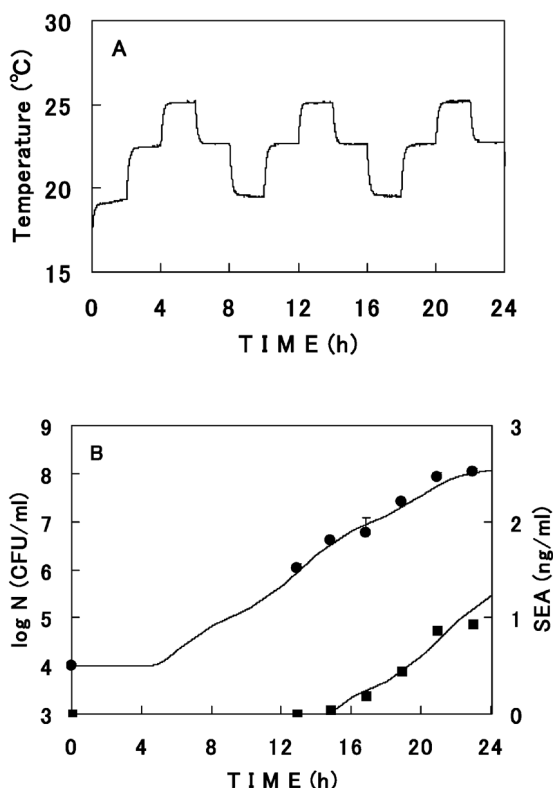


図4 変動温度下の牛乳中での増殖とSEA産生量の予測⁶⁾

A. 温度履歴(実測値),
B. 増殖とSEA産生量 ●, 菌濃度, ■, SEA濃度
増殖とSEA産生曲線は温度履歴からの予測値を示す。

4. 生乳中での増殖とSEA産生

乳牛から搾乳した生乳でのブドウ球菌の増殖とSEA産生を検討した。生乳中でのSEA産生は以前に検討されていたが、これらの報告は免疫拡散法による定性的で古い方法で毒素を測定しており、しかも温度帯は10°Cから37°Cの範囲であった^{12,13)}。そこで大阪での食中毒事件の原因解明のため、事故の起きた工場でのパイプ内温度(約40°C)を考慮して

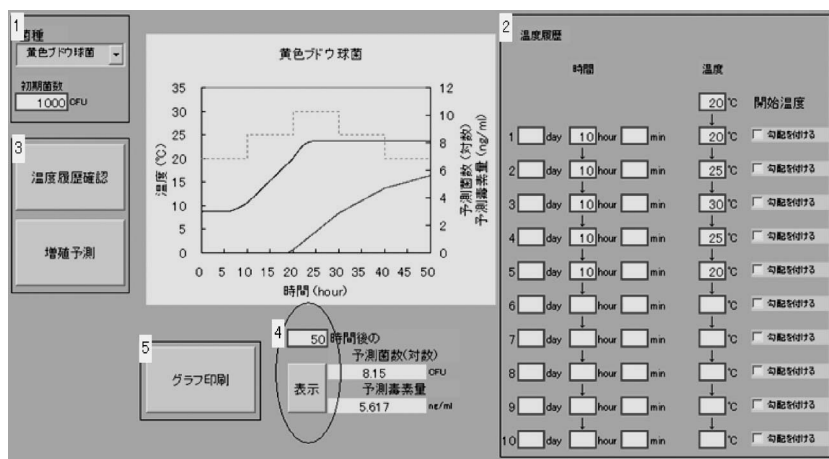


図5 牛乳中におけるブドウ球菌の増殖およびSEA産生量予測プログラム
図中の番号1-5は操作手順を示す。

比較的高温での保存を行なった¹⁴⁾。

一般に生乳は多種類の微生物によって汚染されているため、上述した牛乳とは異なり、微生物間の競合が予想される。ここでは生乳の自然微生物叢の濃度が高い試料 (10^6 CFU/ml) と低い試料 ($10^{3.3}$ CFU/ml) にブドウ球菌を接種し、36°Cから48°Cの温度帯で保存した。なお、いずれの生乳においてもブドウ球菌汚染は認められなかった。

その増殖結果を図6に示す。低微生物汚染生乳では温度36–44°Cにおいて 10^5 CFU/mlで接種したブドウ球菌に増殖がみられたが、48°Cでは徐々に菌数の減少がみられた。高微生物汚染生乳では 10^7 CFU/mlで接種したブドウ球菌に同じ温度帯でわずかの増殖がみられた。48°Cでは徐々に菌数の減少がみられたが、低汚染乳よりも速度は緩やかで、60時間後もわずかな菌数が認められた。

一方、上記の2種類の生乳中に接種したブドウ球菌のSEA産生量を図7に示す。低微生物汚染生乳中では36°Cから44°Cまで明らかな毒素産生が見られ、48°Cでは全く見られなかった。一方、高微生物汚染生乳中では36°Cから44°CまでSEA産生が認められたが、その濃度は低微生物汚染生乳中に比べて非常に低かった。また48°Cでは全く産生は見られなかった。一方、保存期間後半においては36°Cと40°C(または44°C)の間に有意な産生量の差が見られた。

一方、図7Bに示した高微生物汚染生乳をやや低い温度28°C、32°Cで保存すると、毒素産生は全く見られなかった。以上の結果から、生乳中でのブドウ球菌のSEA産生には温度が大きく影響していることが明らかとなった。

さらに、図7に示したように、生乳中でブドウ

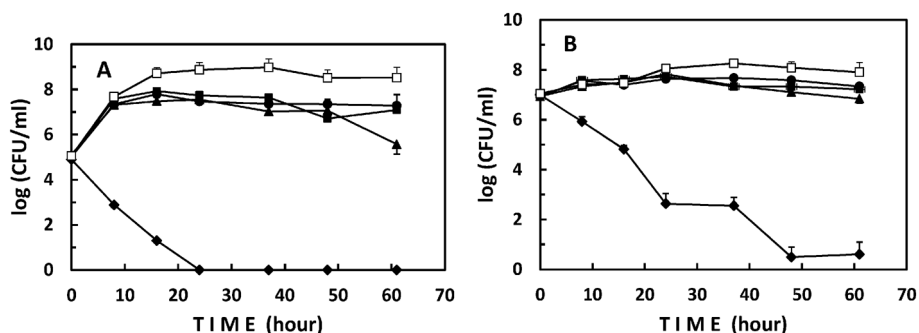


図6 生乳中でのブドウ球菌の増殖¹⁵⁾

A. 低微生物汚染生乳, B. 高微生物汚染生乳

●, 36°C; ■, 40°C; ▲, 44°C; ◆, 48°C. □, 細菌数 (A. 40°C, B. 44°C) バーは標準誤差を示す。

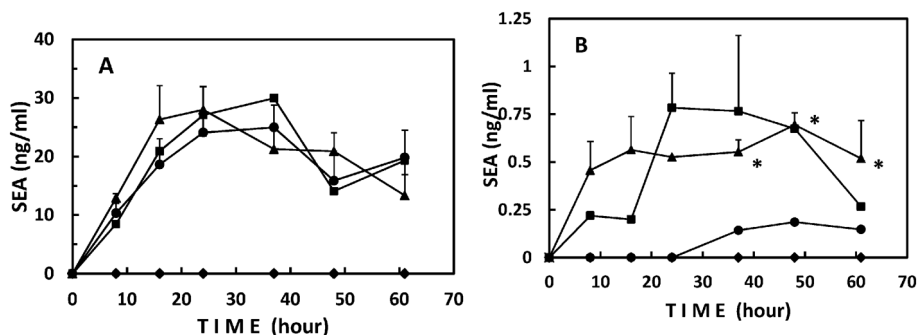


図7 生乳中でのブドウ球菌のSEA産生¹⁵⁾

A. 低微生物汚染生乳, B. 高微生物汚染生乳

●, 36°C; ■, 40°C; ▲, 44°C; ◆, 48°C. □, 細菌数 (A. 40°C, B. 44°C) バーは標準誤差を示す。

*有意差あり (36°Cとの比較)。

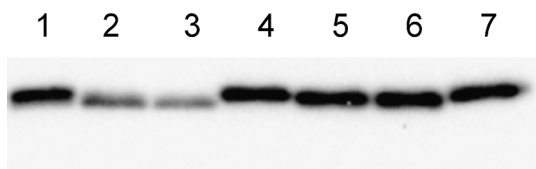


図8 イオン交換クロマトグラフィー画分で処理したSEAのウェスタンブロッティング¹⁶⁾
 レーン1：pH7.3で3時間処理， レーン2：pH7.3で24時間処理， レーン3：pH7.3で72時間処理， レーン4：pH8.7で3時間処理， レーン5：pH8.7で24時間処理， レーン6：pH8.7で72時間処理， レーン7：対照（トリス緩衝液で処理）

球菌の産生したSEA濃度は保存期間後半に徐々に低下した。これはこの期間中に毒素が分解され、失活した可能性を示している。すなわち、生乳の自然微生物叢のある微生物が増殖してある分解酵素を産生し、その酵素がSEAを失活させた可能性がある。そこで、この生乳から高いタンパク分解酵素産生微生物を検索した¹⁶⁾。すなわち、上記の結果から生乳を40℃で培養し、分離した細菌からSEA分解能をもつ細菌を分離できた。それを同定した結果、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* であった。

さらに、本菌の培養液からイオン交換クロマトグラフィーによって得られた画分についてSEA分解性を調べた。その結果、図8に示すように処理時間が長くなるほど強いSEA分解性のある画分が得られた。なお、中性pH7.3で処理した場合に失活が見られたが、pH8.7では見られなかった。

3. 各種環境下での増殖とSEA産生

食品中でのブドウ球菌の増殖とSEA産生に関して上述してきたような比較的短期間での特性を知ること重要であるが、同時に比較的長期間での増殖とSEA産生の有無に関する情報も重要である。食品の品質保持で言えば前者は消費期限、後者は賞味期限に相当する。そこで、各種環境下でのブドウ球菌の増殖とSEA産生の有無に関する特性を解析した。

一般に市販食品には製造後保存中の微生物増殖を

抑制するために、各種の保存料、有機酸、食塩、砂糖などを添加したり、冷蔵または冷凍保存を行なっている。特に、比較的長期間品質および安全性を保持するため、すなわち賞味期限を延長するためには、その期間中に汚染微生物が増殖するか否かが重要なポイントである。これは食品中のブドウ球菌にも当てはまる。さらに、本菌に対しては食品中で産生されるSEA濃度よりもSEA産生の有無が重要であろう。

これまで、多くの研究者が各種条件下のブドウ球菌増殖の有無を検討し、その結果をロジスティック回帰モデルという統計学的手法で解析してきた^{17,18)}。最近、Dingらは各種条件下でのSEA産生について同様な解析を行なった¹⁹⁾。

そこで、各種の温度と食塩濃度下で増殖/非増殖およびSEA産生/非産生を統合的にロジスティック回帰モデルを使って検討した²⁰⁾。ここでは5株の混合菌液を作成し、液体培地を用いて振とう培養と静置培養の両者を比較した。各条件で5つの試料を用い、陽性数を求めた。その結果を図9に示す。高食塩濃度および低温による毒素産生への抑制が見られた。得られたデータをロジスティック回帰分析を行うと図に示すように、産生/非産生の境界を的確に表せた。なお、この曲線は産生確率0.5で描いた。

ブドウ球菌の増殖についても同様に検討した結果を図10に示す。増殖に関しても高食塩濃度および低温による毒素産生への抑制が見られた。また、ロジスティック回帰分析を行うと図に示したように、増殖/非増殖の境界を的確に表せた。なお、この曲線は増殖確率0.5で描いた。

図9と図10の回帰曲線を同一のグラフ上に表すと、図11のように表される。この図から静置および振とう培養について①増殖も毒素産生も可能な領域、②増殖はできるが毒素産生のできない領域、③増殖も毒素産生もできない領域が示される。

このロジスティック回帰分析から新しい環境条件下での毒素産生の起こる確率を予測した。その結果、表2に示すように高い精度で実測値を予測でき

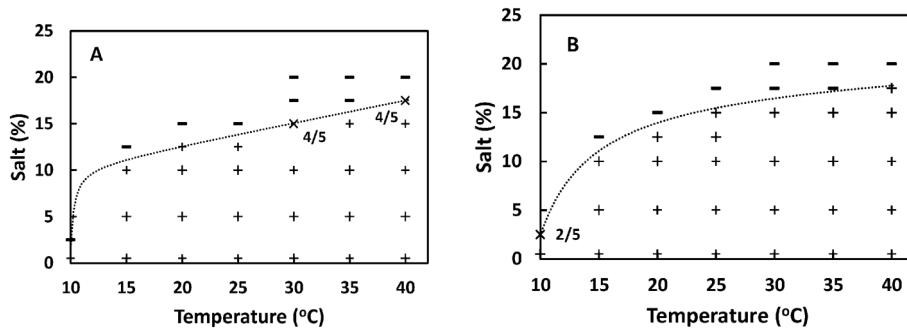


図9 各種の温度及び食塩濃度での SEA 産生/非産生²⁰⁾

A, 振とう培養, B, 静置培養

+, 産生, -, 非産生, x, 一部産生, 分数はサンプル中の陽性数を示す。

点線はロジスティック回帰曲線を示す。

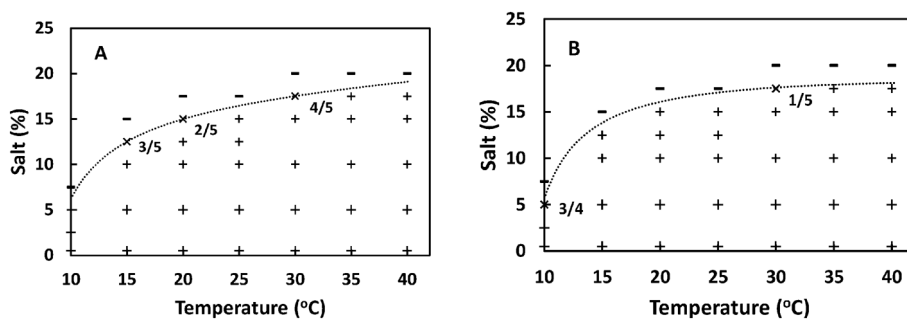


図10 各種の温度及び食塩濃度での増殖/非増殖²⁰⁾

A, 振とう培養, B, 静置培養

+, 増殖, -, 非増殖, x, 一部増殖, 分数はサンプル中の陽性数を示す。

点線はロジスティック回帰曲線を示す。

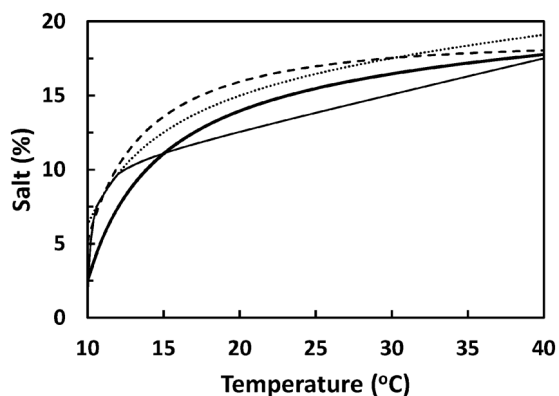


図11 SEA 産生と増殖の境界 ($p = 0.5$)²⁰⁾

太線と細線はそれぞれ静置および振とう培養での SEA 産生の境界を示す。破線と点線はそれぞれ静置および振とう培養での増殖の境界を示す。

表2 新しい温度及び食塩濃度下での SEA 産生確率の予測と実測²⁰⁾

培養	食塩 (%)	温度 (°C)	確率	
			実測値	予測値
振とう	13.5	25	1	>0.99
振とう	14	25	0.6	>0.99
振とう	16	27	0	<0.01
振とう	14.5	20	0	<0.01
静置	17	30	0	<0.01
静置	13.5	20	1	>0.99

た。増殖においても同様な高い精度の予測ができた。

同様に、食品保存料としてよく用いられる乳酸と食塩がブドウ球菌の増殖と SEA 産生に与える影響を検討した結果、図12のように増殖と毒素産生が50%の確率の境界線が示された²¹⁾。ここでは液体培地を用い、その pH は乳酸によって調整した。ま

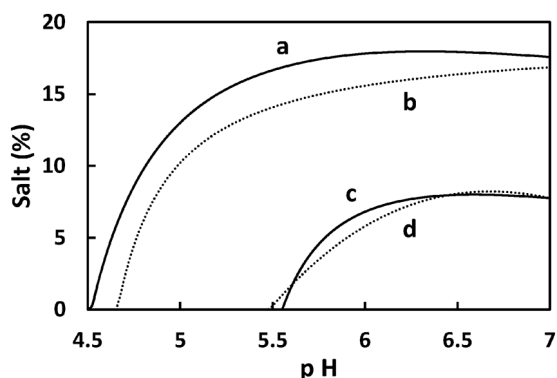


図12 食塩と乳酸によるSEA産生と増殖への影響
a. 増殖 (30°C), b. SEA産生 (30°C), c. 増殖 (10°C), d. SEA産生 (10°C)

た培養は静置で、温度は30°Cと10°Cとした。図に示すように、10°Cでは増殖と毒素産生が確率50%の線はほぼ一致した。また、ロジスティック回帰分析によって新しい条件での増殖とSEA産生を高い精度で予測できた。

4. SE 検出方法

4.1. 検出方法

食品及びその原材料中のSE検出は日常の品質および安全管理または食中毒事件の原因解明等において行われる。SEは嘔吐毒であるため、最も信頼できる検出方法は子ネコ、サルなどの実験動物を用いた投与試験である²⁾。近年はスンスを使った報告例もある³⁾。しかし、このような動物を日常的に飼育管理することは多くの労力と費用がかかる。また感度に関する課題もある。

それに替わって一般的に行われる方法が免疫学的な手法である。すなわち、例えばSEAに特異的な抗体を作成し、それを用いて検出する。以前は二重免疫拡散法(Ouchterlony法)などが行われていたが、近年は感度の高いELISAが開発され、市販キットが入手できる。その例としてBiomerieux社のVIDAS[®]等がある。なお、VIDASはSEAからSEEまでを同時に検出するキットであるが、どのタイプかは識別できない。Biopharma社のRIDASCREEN[®] SET A, B, C, Dは4タイプの識別ができる。一方、特異抗体を表面に固定させたラ

テックス粒子を用いた逆受け身ラテックス凝集反応法もある。この方法は目視で判定できるので、ELISAでのような光学的装置は不要である。市販製品としてはデンカ生研で製造販売している。このキットはSEAからSEEまでを識別できる。

ただし、動物を用いたバイオアッセイと免疫学的なアッセイの間にはその結果に相違があるという報告がある。すなわち、加熱によって免疫学的に失活したSEA試料が子ネコに嘔吐活性を示したとBennettは報告している²²⁾。したがって特に熱、酸など強い変性処理に暴露されたSEを検出する際にはこの相違を知っておいた方がよい。

4.2. 乳及び乳製品での前処理

2000年に起きた大規模な食中毒事件を契機として、乳及び乳製品中のSE検出するための前処理法(抽出・濃縮方法)が検討され、厚生労働省から通達が出された²³⁾。この方法では試料に塩酸を加え、遠心分離後、その上清にクロロホルムを添加し、再び遠心分離する。その上清にトリクロル酢酸を加えて、遠心分離し、沈査をトリス緩衝液で溶解し、濃縮サンプルとする。この濃縮したサンプルを市販の毒素検出キット(VIDAS Stap enterotoxin, Transia Plate, RIDASCREEN SET A, B, C, D, SET-RPLA「生研」)を使って検出する。

この前処理方法は処理工程が複雑で、時間がかかる。またSEA回収率も低く、特に生乳では信頼性のある値は得られていない²⁴⁾。低い回収率および数値変動の理由として、試料中のSEAがトリクロル酢酸などの化学物質によって分子内にダメージを受ける一方、複雑な工程の途中で一部のSEAが流出してしまう可能性が考えられる。さらに、上記のような免疫学的手法の特徴が関与している可能性もある²²⁾。

そこで、イオン交換クロマトグラフィーを用いた簡便な前処理法を検討した²⁵⁾。大阪での事件の際にもイオン交換クロマトグラフィーは検討された。ここではイオン交換樹脂としてはスルホン酸基を持つ強陽イオン交換体(SP Sephadex[™] C-25, GE)

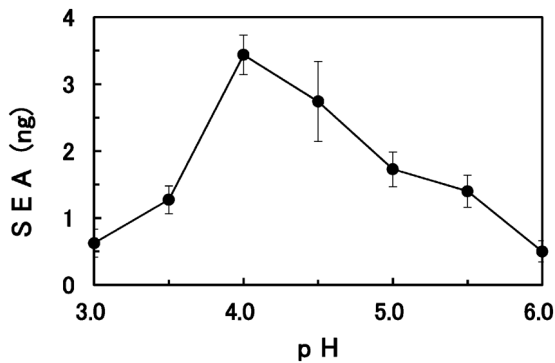


図13 各種 pH で吸着させた SEA の溶出量²⁵⁾
カラムベッド体積：4 ml。バーは標準誤差を示す。

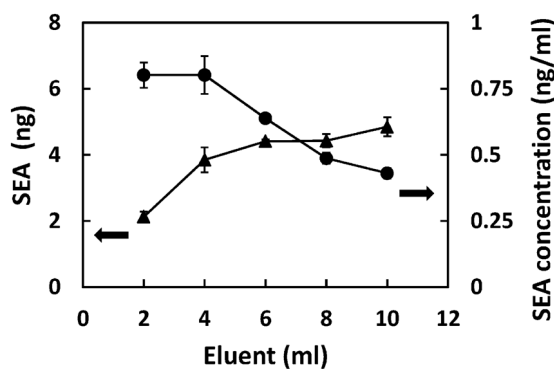


図14 各種容量の溶出液によって溶出した SEA の総量と濃度²⁵⁾
▲, 溶出した SEA 総量, ●, 溶出液中の SEA 濃度
矢印は該当する座標軸を示す。バーは標準誤差を示す。

を用いた。SP Sephadex は SEA 精製の際に使われる交換樹脂である。なお、前処理後の毒素は Vidas を用いて測定した。

最初にイオン交換樹脂に吸着させるための試料の pH を検討した。すなわち、試料 (SEA 産生株の培養上清希釈液) を pH3.0 から 6.0 まで調整し、それぞれ等しい pH の 0.05M リン酸-クエン酸緩衝液で平衡化したイオン交換樹脂に吸着させた。溶出は食塩加リン酸-クエン酸緩衝液 pH8.0 で行なった。その結果、図13に示すように pH4.0 で調整した試料で最大量の SEA を溶出できた。したがって最適な pH は 4.0 とした。

次に溶出緩衝液の体積を検討した。溶出液の体積

表3 イオン交換クロマトグラフィー前処理法による生乳および牛乳からの SEA 回収率²⁵⁾

生乳			
SEA (ng/ml)	0.5	0.1	0.05
回収率 (%)	97.5±5.3	74.6±3.7	97.4±5.6
牛乳			
SEA (ng/ml)	0.1	0.05	0.025
回収率 (%)	62.6±4.6	54.4±1.5	61.7±4.4

数値は添加した毒素濃度に対する回収率 (平均と標準誤差) を示す。

が多いほど多量の SEA が溶出されるが、プールした溶出画分全体の濃度は低くなると推測される。そこで、イオン交換樹脂に吸着した一定量の SEA を各種体積の溶出液で溶出した。その結果は図14に示すように、推測通り溶出液の体積が増すにつれて、プールした溶出液の濃度は低くなり、一方で総 SEA 量は増加した。これらの結果から、6 ml を最適な溶出量とした。以上の結果、前処理における試料の pH と溶出液の容量の最適値が得られた。

上記の条件で生乳および UHT 牛乳に添加した SEA の回収率を検討した。試料体積は 10 ml とした。その結果、表3に示すように 0.5 ng/ml 以下の非常に低い添加濃度に対して生乳では 75% から 98%、牛乳においても 54% から 63% の高い値が得られた。トリクロル酢酸を用いた濃縮法では回収率はかなり低く、Soejima らは生乳では信頼できる値は得られず、UHT 牛乳で 19% から 26% と報告している²⁴⁾。

次に、乳製品 (粉末スキムミルク、バルメザンチーズ) においても添加した SEA の回収率を検討した。その結果、表4に示すように 1 ng/g 以下の非常に低い添加濃度に対してスキムミルクで 56% から 66%、バルメザンチーズにおいて 37% から 44% の回収率が得られた。なお、冷却高速遠心分離を行なったため、試料中の脂肪分は最上層に脂肪膜として分離できた。

さらに、より少量の SEA を検出するため、操作のスケールアップを検討した。ここでは、試料体積を 60 ml にし、前述の生乳とスキムミルクで検討し

表4 イオン交換クロマトグラフィー前処理法による乳製品からのSEA回収率²⁵⁾

スキムミルク			
SEA (ng/g)	1	0.5	0.25
回収率 (%)	56.9±1.7	65.9±9.3	56.3±1.6
パルメザンチーズ			
SEA (ng/g)	1	0.5	0.25
回収率 (%)	44.0±1.2	36.9±3.0	41.9±0.23

数値は添加した毒素濃度に対する回収率（平均と標準誤差）を示す。

表5 スケールアップした試料での回収率²⁵⁾

	生乳	スキムミルク		
SEA	0.01 ^a	0.1 ^b	0.05 ^b	0.025 ^b
回収率 (%)	61.6±7.0	43.0±0.38	63.8±5.0 ^c	60.5±5.3 ^c

数値は添加した毒素濃度に対する回収率（平均と標準誤差）を示す。

a. ng/ml, b. ng/g, c. フィルター付き遠心管による濃縮

た。さらに、スキムミルクではフィルター（分子量分画用限外ろ過膜）付き遠心管で濃縮も行なった。

その結果、表5に示すように試料体積を増大することによって表3および表4で示した結果（10 ml）よりもさらに低濃度のSEAを検出できた。すなわち、生乳で0.01 ng/ml、スキムミルクで0.025 ng/gの濃度まで検出できた。これらの結果から、体積の多い試料に対してもこの前処理法は有効であり、さらにフィルター付き遠心管のような毒素にほとんど障害を与えない濃縮方法もこの前処理法に使用できることが明らかとなった。

今後はその他の代表的な古典型のSEについてもイオン交換クロマトグラフィー前処理法について検討する必要があるであろう。

5. ま と め

以上のように、牛乳等における黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの産生性とその検出方法について、著者らのデータを基に解説をした。食中毒事件の起きる最大の原因はヒューマンエラーであると考えられる。近年、食品工場では一般的衛生管理の遵守、HACCPシステムの導入により大規模食中毒事件は

あまりないが、一方、屋外のイベント会場などでは衛生管理意識も低下するせいか時々大きな事件が起きている。ブドウ球菌による事件も製造・流通過程での衛生管理の遵守等により、以前よりも事件数は減ったが、依然として表1に示したように細菌性食中毒の中では上位にランクしている。

本菌を含めた細菌性食中毒事件を未然に防ぐには日常の衛生管理の徹底とその根拠となる科学的エビデンスが重要である。本解説がそのエビデンスに関する情報として役立てば、筆者の意図は十分果たせたと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省. 食中毒統計資料, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2
- 2) Bergdoll, M. S. Food-borne Infections and Intoxications. 2nd ed. Academic Press, 443-494 (1979).
- 3) Hu, D-L and Nakane A. European Journal of Pharmacology. 722, 95-107 (2014).
- 4) 鈴木康規, 食品衛生学誌, 60, 27-37 (2019).
- 5) Huang, I.-Y., Hugh, J. L., Bergdoll, M. S., and Schantz, E. J. Journal of Biological Chemistry. 262, 7006-7013 (1987).
- 6) Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H. and Kozaki, S. Epidemiology and Infection, 130, 33-40 (2003).
- 7) New Zealand Government. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products (2012). https://www.researchgate.net/publication/280038225_Review_of_the_production_of_staphylococcal_enterotoxin_in_dairy_products
- 8) Elahi, S., Tsuchiaka, S., Mizutani, T., and Fujikawa, H. Biocontrol Science. 23, 207-214 (2018).

- 9) 青山顕司, 高橋千登勢, 山内吉彦, 酒井史彦, 五十嵐英夫, 柳平修一, 小西寛昭, 食品衛生学誌, 49, 116–123 (2008).
- 10) Fujikawa, H. and Morozumi, S. *Food Microbiology*, 23, 260–267 (2006).
- 11) 食品産業センター HACCP 関連情報データベース https://haccp.shokusan.or.jp/wp-content/uploads/2016/02/img_kanban95.png
- 12) Donnelly, C. B., Leslie, J. E. and Black, L. A. *Applied Microbiology*, 16, 917–924 (1968).
- 13) Tatini, S. R., Jezeski, J. J., Olson, J. C. and Casman, E. P. *Journal of Dairy Science*, 54, 312–320 (1971).
- 14) 厚生労働省 雪印乳業食中毒事件の原因究明調査結果について <https://www.mhlw.go.jp/topics/0012/tp1220-2.html>
- 15) Sabike, I. I., Fujikawa, H., Sakha, M. Z., & Edris, A. M. *Journal of Food Protection*, 77, 1612–1616 (2014).
- 16) Fujikawa, H., Nagaoka, K., Arai, K. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81, 1436–1443 (2017).
- 17) Vermeulen, A., Devlieghere, F., Bernaerts, K., Van Impe, J., and Debevere, J. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 258–269 (2007).
- 18) Valero, A., Rerez-Rodriguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J. M., Garcia-Gimeno, and Zurera, G. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 186–194 (2009).
- 19) Ding, T., Yu, Y-Y., Hwang, C-H., Dong, Q-L., Chen, S-G., Ye, X-Q., and Liu, D-H. *Journal of Food Protection*, 79, 148–152 (2016).
- 20) Elahi, S. and Fujikawa, H. *Journal of Food Science*, 84, 121–126 (2019).
- 21) Elahi, S. and Fujikawa, H. *Journal of Food Science*, 84, 3233–3240 (2019).
- 22) Bennett, R. W. *Journal of AOAC International* 75, 6–12 (1992).
- 23) 厚生労働省, 乳等からのエンテロトキシンの検査方法について. 平成14年 食監発第0214002号
- 24) Soejima, T., Nagao, E. Kubota, T. Yamagata, H. and Kagi, H. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 185–194 (2004).
- 25) Fujikawa, H and Hirayama, W. *Food Control*, 73, 720–725 (2017).