

3. 新しい食中毒原因菌 *Staphylococcus argenteus* による

市販食品等の汚染実態の解明

○高橋 志保 今野 貴之 鈴木 純恵 伊藤 佑歩
鈴木 忠之 熊谷 優子 (秋田県健康環境センター)

【研究目的】

ブドウ球菌食中毒の原因菌は黄色ブドウ球菌が一般的であるが、近年、本県を含め国内において類縁菌である *Staphylococcus argenteus* を原因とする食中毒が報告されている。しかしながら、感染源の特定が難しく、本菌による事例の詳細な解明には至っていない。そこで本研究では、本菌の迅速検出法を確立し、本菌による市販食品等の汚染実態を把握することで、食中毒の予防啓発につなげることを目的とする。

【研究の必要性】

ブドウ球菌が食品中で増殖する際に産生する毒素を原因とする食中毒事例は、時に発症者数が多く甚大な被害を及ぼす場合がある。食中毒の原因究明のためには、病因物質と原因食品を速やかに特定することが重要である。しかし、*S. argenteus* は 2015 年に黄色ブドウ球菌より細分化された新種¹⁾であり、明確な鑑別性状は明らかでない。そのため、現在、本菌の同定にはゲノム解析などの特殊な検査が必要とされ、結果が判明するまでに時間を要している。

さらに、*S. argenteus* を原因とする食中毒は、2018 年に秋田県で確認されているが、国内における事例は過去に 3 例しか報告されておらず、感染源等の詳細も不明であるため、地域の公衆衛生上の新たな脅威となっている（表 1）。食中毒事例発生時に本菌を確実に検出できるようにするためには、本菌の培地上での発育やその特徴を明らかにするとともに、迅速に本菌を検出できる検査法を確立する必要がある。また、本菌の食品等における汚染実態に関する報告はまだ少なく、本菌による食中毒対策を講じる上で食品等の汚染実態を把握することが重要である。

表1 国内における*S. argenteus* 食中毒の発生状況

発生年	発生場所	摂食者数	患者数
2010	東京	不明	不明
2014	大阪	306	46
2015	大阪	53	34
2018	秋田	23	18

【研究計画】

1. リアルタイム PCR 法を用いた迅速検出法の確立と分離培養法の検討

食品等からの迅速検出法として、*S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌がともに保有しており、菌種ごとの遺伝子配列の同一性が高い α -haemolysin 遺伝子²⁾を対象としたリアルタイム PCR 法を確立する。また、分離後の菌株を同定するため、Multiplex PCR 法を検討する。

食品等から *S. argenteus* を分離するのに適した増菌培地及び分離培地については、模擬食材を用いて比較検討する。

2. 食品等の汚染実態調査

市販されている食品を対象に、リアルタイム PCR により *S. argenteus* の遺伝子を検索し、食品の汚染状況を把握する。

【実施内容・結果】

1. リアルタイム PCR 法を用いた迅速検出法の確立及び分離培養法の検討

<迅速検出法の確立と同定 PCR 法の検討>

GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録された *S. argenteus* 株及び黄色ブドウ球菌株の α -haemolysin 遺伝子の配列を、オンライン解析システムの ClustalW (<https://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) により比較参照し、両菌種にそれぞれ特異的な配列部分に対応するプライマーとプローブを設計した (表 2)。

当センターで過去に分離された *S. argenteus* 2 株と黄色ブドウ球菌 9 株について、シカジーニクス DNA 抽出試薬 (関東化学) を用いて DNA 抽出液を作製し、両菌種の検出用プライマーを用いて PCR を行ったところ、それぞれに該当する菌株にのみ増幅反応が見られ、交差反応は見られなかった。また、各菌株の PCR 増幅断片のシーケンス解析 (ファスマック) 結果は、*S. argenteus* もしくは黄色ブドウ球菌の α -haemolysin 遺伝子の登録配列と一致することを確認した。

両菌種の検出用プライマーと対応するプローブを用いて試行したリアルタイム PCR では、*S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌の α -haemolysin 遺伝子 (*S. arg hly* 及び *S. aureus hly*) をそれぞれ検出可能であった。さらに、菌数を測定した *S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌の培養液を用いて検出感度を評価した。培養液をそれぞれ 10 倍段階希釈した希釈液各 100 μ L から DNA 抽出溶液を作製し (図 1)、同様にリアルタイム PCR を試行した結果、*S. argenteus*、黄色ブドウ球菌ともに 10cfu/tube まで検出可能であった。また、両菌種を同時に検索できるようにした Duplex リアルタイム PCR では、両菌種が混在していても、設計したプライマーとプローブにより *S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌を特異的に検出できることを確認した。

分離された菌株の同定には、両菌種が保有する *nuc* 遺伝子³⁾と、 α -haemolysin 遺伝子中の *S. argenteus* に特異的な塩基配列部分及び黄色ブドウ球菌に特異的な *eap* 遺伝子⁴⁾をターゲットとし、Multiplex PCR として両菌種の鑑別を可能とした (図 2 及び表 3)。

表2 リアルタイム PCR用プライマー及びプローブ

	プライマー・プローブ	配列 (5'-3')
<i>S. argenteus</i>	Staph hly F	TATAGAGTYTATAGCGAAGAAGG
	<i>S. arg hly</i> R-1n	GTATCATCAGCACTGATGCTG
	<i>S. arg hly</i> Probe-MGB	5'FAM-CTGGCATGGCCTTCTGCT-MGB
黄色ブドウ球菌	Staph hly F	TATAGAGTYTATAGCGAAGAAGG
	<i>S. aureus hly</i> R-1	TCATCACCAGTMACRTTACCG
	<i>S. aureus hly</i> Probe-MGB	5'HEX-AAGGTACAGTTGCAACT-MGB

希釈液または培養液100μL
 ↓ 13,000rpm、1min 遠心
 上清を除去後、滅菌生理食塩水100μL添加
 ↓ 13,000rpm、1min 遠心
 上清を除去
 ↓
 シカジーニアスDNA抽出試薬100μL添加
 ↓ インキュベート
 13,000rpm、1min 遠心
 ↓
 上清をDNA抽出溶液とする

図1 DNA抽出溶液の作製方法

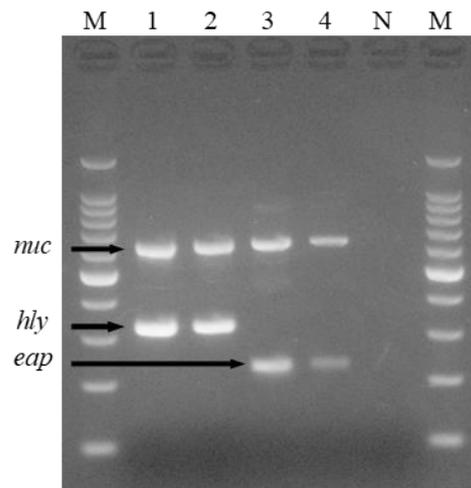


図2 Multiplex PCRバンドパターン
 M:100bp DNA ladder
 1,2:*S. argenteus*
 3,4:*S. aureus*
 N: Negative control

表3 同定用Multiplex PCR

標的遺伝子	配列 (5'-3')	備考	参考文献
<i>nuc</i>	ATGACAGAATACTTWTTAAGTGCT	<i>S. argenteus</i> 632bp	3
	TCTTTTTTYGCTTGTGCTTCACT	<i>S. aureus</i> 641bp	
<i>eap</i>	TAMTAAYGAAGCRTCTGCC	230bp	4を改変
	TTAAATCGATATCACTAATACCTC		
<i>hly</i>	GGGAAAATCGGCGGACAAATTGGYGG	328bp	本研究
	GTGCTTTTCTGTCCATCACWAG		

<分離培養法の検討について>

食品中の *S. argenteus* を検出するのに適した増菌培地を検討するため、BHI で一晚培養した *S. argenteus* 培養液を添加した3種類の模擬食材(表4)を用意した。選択増菌培地は、既報^{5,6)}を基に、

7.5%NaCl・1%ピルビン酸ナトリウム加TSBと10%NaCl加BHIの2種類を用いた。模擬食材25gに選択増菌培地100mLを加え、37℃で18時間培養した。増菌培養後の *S. argenteus* の菌数測定では、3種類の模擬食材とも大きく違わなかったが、10%NaCl加BHIでの培養と比較して、7.5%NaCl・1%ピルビン酸ナトリウム加TSBで培養した模擬食材のほうが増菌効率はよかった。この結果をふまえ、流通する食品においては加熱調理されたものや冷凍もしくは解凍されたものも多いことから、損傷菌を修復させることを目的としてピルビン酸ナトリウムが添加された7.5%NaCl・1%ピルビン酸ナトリウム加TSBを増菌培地として選択することとした。

また、増菌培養後の選択分離培地として、通常の商品検査で使用される卵黄加マンニト食塩培地とベアードパーカー寒天培地の2種類を用いて、*S. argenteus* と黄色ブドウ球菌の塗抹培養を行い、比較した。卵黄加マンニト食塩培地上では両菌種ともレシチナーゼ

表4 培養までの模擬食材の保存条件

①	培養液添加後、4℃で保存
②	培養液と枯草菌芽胞液 ^(※) 添加後、4℃で保存
③	培養液添加後、-20℃で保存

(※)夾雑菌として添加

反応が見られるものの、*S. argenteus* は白色コロニーを、黄色ブドウ球菌は黄色コロニーを形成し、容易に区別することができた。一方、ベアードパーカー培地上のコロニーは、両菌種ともに卵黄反応を示し、またブドウ球菌特有の黒色集落を形成するため、同一平板内に混在している場合、区別することができなかつた。両平板を比較した結果、*S. argenteus* の分離培地として卵黄加マンニット食塩培地を選択した。

2. 食品等の汚染実態調査

汚染実態調査は、秋田県内に流通する食品を対象とした。食品 25g をストマッカー袋に無菌的に採取し、7.5%NaCl・1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB100mL を加え、よく混和して試料液とした。直接分離培養として、各試料液 100 μ L ずつを 2 枚の卵黄加マンニット食塩培地にコンラージで塗布し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養後、レシチナーゼ反応が見られるコロニーを釣菌し、同定用 Multiplex PCR にて確認した。残りの試料液は 37 $^{\circ}$ C で 18 時間増菌培養を行い、培養液各 100 μ L をマイクロチューブに分取し、DNA 抽出溶液を作製後 (図 1)、リアルタイム PCR を行った。*S. arg hly* が検出された培養液については、卵黄加マンニット食塩培地に塗抹し、*S. argenteus* の分離を試みた。

調査した食品は、食肉 (鶏肉、牛肉、豚肉等) 120 検体、生菓子 31 検体、惣菜・漬物 25 検体、計 176 検体 (表 5) で、直接分離培養では 14 検体から黄色ブドウ球菌が分離されたが、*S. argenteus* は分離されなかつた。増菌培養後のリアルタイム PCR では、*S. arg hly* は 3 検体から、*S. aureus hly* は 59 検体から検出された。*S. arg hly* が検出された 3 検体 (鴨モモ肉、鶏モモ肉、鶏砂肝) からは同時に *S. aureus hly* も検出され、卵黄加マンニット食塩培地上に白色及び黄色コロニーを形成した。Multiplex PCR を行ったところ、それぞれ *S. argenteus* 及び黄色ブドウ球菌であった。

表5 汚染実態調査

種類	検体数	real-time PCR		直接分離培養*2
		<i>S. arg hly</i> (+)	<i>S. aureus hly</i> (+)	
鶏肉 (鴨肉含む)	74	3	44	11
牛肉	36		5	
豚肉	6		2	1
その他の肉*1	4		1	
生菓子	31		3	
惣菜	15		3	1
漬物	10		1	1
計	176	3	59	14

*1 : 馬肉、牛豚、ラム肉

*2 : *S. aureus* が分離された検体数

【考察と今後の課題】

ブドウ球菌エンテロトキシンを産生する場合がある *S. argenteus* と黄色ブドウ球菌の鑑別が可能で、かつ迅速性に優れた Duplex リアルタイム PCR 法は、ブドウ球菌食中毒が疑われる際に原因食品を迅速に推察することができ、被害の拡大を最小限にとどめることが期待できる。また、食品残品がなくとも調理前の食材等が残っていれば、増菌培養と併用する

ことで汚染源の推定につなげることも可能である。

食品等の汚染実態調査の結果、*S. argenteus* による汚染源として、若林ら⁶⁾の報告と同様に鶏肉等が示唆された。しかしながら、*S. argenteus* を原因とする食中毒事例について、感染源等の詳細な情報はまだ十分に蓄積されていないため、食品の汚染が鳥肉等の原材料に由来しているのか、ヒトもしくは環境中から混入する可能性もあるのか、という点については、今後の食中毒対策として明らかにしていかなければならない課題であると思われる。また、*S. argenteus* が検出された検体からは *S. aureus* hly も検出されていた。黄色ブドウ球菌の汚染度合いの高い食品には、*S. argenteus* も存在している可能性がある。特に、*S. aureus* hly は生菓子や惣菜等から検出されることがある。食肉類と違い、生菓子や惣菜等はそのまま喫食されるものがほとんどであり、購入後の保存条件が不適切であると食中毒を引き起こす可能性を含んでいる。今後、本法の利用により、ブドウ球菌食中毒の原因菌として黄色ブドウ球菌のみならず *S. argenteus* についても確実に検出し、本菌による食中毒の実態解明と予防啓発のための情報発信をしていくことが重要である。

【参考文献】

- 1) Tong S.Y., et al. : Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the nonpigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 15–22, 2015
- 2) Aung M.S., et.al. : Molecular characterization of *Staphylococcus argenteus* in Myanmar : identification of novel genotypes/clusters in staphylocoagulase, protein A, alpha-haemolysin and other virulence factors , *J. Med. Microbiol.* , 68 , 95-104 , 2019
- 3) 高橋志保 他 : 食中毒事例で分離された *Staphylococcus argenteus* の同定と性状解析, *日本食品微生物学会雑誌*, 37(1), 20-23, 2020
- 4) Hussain M., et.al. : *eap* gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* , 46(2) , 470-476 , 2008
- 5) 松村浩介 他 : 畜水産食品からの黄色ブドウ球菌検出のための選択分離培地および選択増菌培地の検討, *日本食品微生物学会雑誌*, 26(1), 23-27, 2009
- 6) 若林友騎 他 : 市販食品における *Staphylococcus argenteus* の汚染状況調査, 第 40 回日本食品微生物学会学術総会, 2019

【経費使途明細】

使 途	金 額
プライマー・プローブ	61,534 円
シーケンス解析料	11,968 円
食品購入費	49,626 円
試薬代 (リアルタイム PCR 用試薬、DNA 抽出試薬、粉末培地等)	182,699 円
合 計	305,827 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円