

# 健常者（食品取扱い従事者）糞便における黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）及びセレウス菌（*Bacillus cereus*）の検出状況

吉原純子<sup>1</sup>、奥島祥美<sup>2</sup>、島村亮子<sup>1</sup>、大木旬子<sup>1</sup>、北橋智子<sup>1</sup>

（1 環境保健研究所 健康科学課 2 現 保健所 食品安全課）

**要 旨** 食中毒発生時の原因菌と対照とする目的で、健常者糞便における黄色ブドウ球菌及びセレウス菌の検出状況を調査した。平成 25 年に当所に搬入された千葉市内の健常者（食品取扱い従事者）糞便から黄色ブドウ球菌及びセレウス菌の検出を行い、分離された黄色ブドウ球菌についてはエンテロトキシン産生性及びコアグラゼ型別を、セレウス菌については下痢毒産生性及びセレウリド（嘔吐毒）遺伝子を調べた。黄色ブドウ球菌の保菌率は 18.3%で、そのうちエンテロトキシン陽性は 6.7%であった。セレウス菌の保菌率は 6.0%で、そのうち下痢毒陽性は 56.3%、嘔吐毒陽性は 12.5%であった。健常者における両菌の保有状況は比較的高く、食中毒の原因菌として判断するためには注意を払う必要がある。

**Key Words :** 健常者, 黄色ブドウ球菌, エンテロトキシン, セレウス菌, セレウリド

## 1 はじめに

黄色ブドウ球菌及びセレウス菌は、生活環境中に常在菌として存在し、健常者の腸管内にも保菌されていることから、食中毒検査においても検出頻度の高い細菌である。そこで、我々は食中毒発生時の検査の際に、食中毒原因菌と判別するために、健常者における保有状況を調査したのでその結果を報告する。

## 2 調査対象

平成 25 年 4 月から平成 26 年 3 月までの 1 年間に食中毒及び苦情調査として、当所に搬入された症状のない食品取扱い従事者（以下、従事者とする）268 名の糞便を対象材料とした。

なお、食中毒及び苦情原因として黄色ブドウ球菌及びセレウス菌が疑われる事例の従事者は対象外とした。

## 3 方法

### 3.1 黄色ブドウ球菌の分離及び同定

糞便約 0.1 g をエッグヨーク食塩寒天培地（栄研化学）に塗布し、37℃で 48 時間培養した。マンニット分解性陽性及び卵黄反応陽性の集落を釣菌し、PS ラテックス（栄研化学）にて凝集が認められたも

のを黄色ブドウ球菌と判定した。黄色ブドウ球菌陽性となった従事者 1 名あたり 3 コロニー（検出されたが 3 コロニー以下の場合は全てのコロニー）について、エンテロトキシン産生性及び型別試験とコアグラゼ型別試験（後述）に供した。

なお、エンテロトキシン産生性が無く、更にコアグラゼ型別試験で型不明の場合は、大楠らの方法<sup>1)</sup>に従い、16S rRNA 遺伝子配列から、黄色ブドウ球菌であることを確認した。

### 3.2 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン産生性及び型別試験

分離した菌株を BHI 培地（BD）2mL に接種し、37℃で 24 時間振盪培養後、3,000rpm、10 分間遠心分離し、その上清を試料とした。細菌毒素検出キット（SET-RPLA、A～D 型、デンカ生研）を添付書に従い使用した。また、上述の方法で型が不明瞭な検体については、市販プライマー（TAKARA）を使用した PCR 法により判定した。

### 3.3 黄色ブドウ球菌コアグラゼ型別試験

コロニーから DNA をアルカリ抽出し、Sakai らの PCR 法<sup>2)</sup>により I 型から VIII 型の型別を実施した。

### 3.4 セレウス菌の分離及び同定

糞便約 0.1 g を NGKG 寒天培地（ニッスイ）に塗

布し、37℃で18～24時間培養した。卵黄反応陽性のコロニーを釣菌し、グラム染色による鏡検でグラム陽性有芽胞桿菌をセレウス菌とした。セレウス菌陽性となった従事者1名あたり、3コロニー（検出されたのが3コロニー以下の場合は全てのコロニー）について、デンプン分解性の確認、下痢毒産生試験及びセレウリド（嘔吐毒）遺伝子検出に供した。

なお、*B.thuringiensis*との鑑別は行っていない。

### 3.5 セレウス菌のデンプン分解性確認

1%可溶性デンプン加普通寒天平板培地に37℃で18～24時間培養後、菌苔をかき取りルゴール液を添加した。

### 3.6 セレウス菌の下痢毒産生試験

分離した菌株をBHI培地（BD）2mLに接種し、37℃で24時間振盪培養後、3,000rpm、10分間遠心分離し、その上清を試料とした。細菌毒素検出キット（CRET-RPLA、デンカ生研）を添付書に従い使用した。

### 3.7 セレウリド（嘔吐毒）遺伝子の検出

コロニーからDNAをアルカリ抽出し、NakanoらのPCR法<sup>3)</sup>に従った。

## 4 結果

表1のとおり、従事者268名のうち、黄色ブドウ球菌は49名（計131コロニー）から検出され、検出率（保菌率）は18.3%であった。そのうち、エンテロトキシン産生株の保菌者は18名（6.7%）であった。今回は従事者1名あたり、1から3コロニーを検査したが、検出されたエンテロトキシンで最も多い型はB型で9名（単一、複数検出含む）、次いでC型で8名（同左）、A型及びD型は1名（同左）であった。また、異なるエンテロトキシン型の黄色ブドウ球菌を保菌している従事者が6名いた。なお、複数のエンテロトキシン型を産生する株は検出されなかった。

表2のとおり、最も多く検出されたコアグララーゼ型はV型で12名（複数型保有者3名）、次いでVII型が11名（同1名）で、今回の調査ではI型は検出されなかった。また、異なるコアグララーゼ型の黄色ブ

ドウ球菌保菌者が7名いた。

エンテロトキシン型とコアグララーゼ型の相関性は、エンテロトキシンB型とコアグララーゼVII型の組み合わせが10株で最も多かったが、特筆すべきものではなかった（表3）。

表4のとおり、セレウス菌については、16名（計35コロニー）から検出され、検出率（保菌率）は6.0%であった。そのうち、下痢毒産生株のみの保菌者は9名（56.3%）、セレウリド遺伝子陽性株のみの保菌者は2名（12.5%）であった。下痢毒産生株及びセレウリド遺伝子陽性株両方の保菌者は2名（12.5%）であった。なお、3株で下痢毒産生及びセレウリド遺伝子陽性と両方を示す株は検出されなかった。

## 5 考察

健常者における黄色ブドウ球菌の糞便中の保菌率は3.6%から60%であったという報告<sup>4)5)</sup>があるが、今回我々の調査では約18%であった。

健常者からの黄色ブドウ球菌の検出状況を調べた報告は、材料が鼻前庭及び手指の拭き取り、糞便と種々である。それらによるとコアグララーゼVII型が多く検出されているが、エンテロトキシンでは報告により多い型が様々である<sup>4)6)7)</sup>。今回の調査も同様にコアグララーゼVII型が多く検出され、また、エンテロトキシンではB型が多く検出された。

一方、食中毒事例では、コアグララーゼVII型、エンテロトキシンA型の報告<sup>4)8)</sup>が多い。この差は、糞便中の黄色ブドウ球菌と手指に常在する菌が違うことに由来する可能性がある。また、エンテロトキシンA型の株は食中毒を起こしやすい可能性もあると思われる。

今回は1人につき最大3コロニーを釣菌したが、同一人物から2種類および3種類の黄色ブドウ球菌エンテロトキシンが検出された場合もあり、釣菌数に比例して多くの型が検出されることが考えられた。このことから、糞便検査のみでは食中毒の判断をすることはできず、常在菌としての保菌状況を考慮し、食中毒調査を実施することが必要である。

表1 The detection number of people of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin type

Persons	<i>S.aureus</i> positive	Enterotoxigenic <i>S.aureus</i>	Enterotoxin type						
			A	B	C	D	B and (—)	C and (—)	B,D and (—)
268	49 (18.3%)	18 (6.7%)	1 (5.6%)	6 (33.3%)	5 (27.8%)	0 —	2 (11.1%)	3 (16.7%)	1 (5.6%)

(—) : Enterotoxin (type:A,B,C,D) negative

表 2 The detection number of people of the *Staphylococcus aureus* coagulase type

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0	5	2	1	9	2	10	3
—	(10.2 %)	(4.1 %)	(2.0 %)	(18.4 %)	(4.1 %)	(20.4 %)	(6.1 %)
II and V	II and VII	III and (—)	III and VI	IV and V	V and (—)	VI and (—)	(—)
1	1	1	1	1	1	1	10
(2.0 %)	(2.0 %)	(2.0 %)	(2.0 %)	(2.0 %)	(2.0 %)	(2.0 %)	(20.4 %)

(—) : coagulase type unknown

表 3 Correlation between *Staphylococcus aureus* enterotoxin type and coagulase type

Enterotoxin type	Coagulase type									Total
	(—)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
(—)	29	0	15	3	3	20	7	10	4	91
A	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3
B	0	0	0	0	1	5	1	10	3	20
C	4	0	0	3	0	1	0	8	0	16
D	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Total	33	0	18	7	4	26	8	28	7	131

表 4 The detection of number of the *Bacillus cereus* enterotoxin and cereulide

Persons	<i>B.cereus</i> positive	Enterotoxin only	Cereulide only	Enterotoxin and Cereulide	Toxigenicity negative
268	16	9	2	2	3
	(6.0 %)	(56.3 %)	(12.5 %)	(12.5 %)	(18.8 %)

セレウス菌については、健常者の 14~15%の糞便から検出されるとの報告<sup>9) 10)</sup>があるが、今回の我々の調査による保菌率は 6.0%と少なかった。セレウス菌の食中毒は臨床症状によって嘔吐型と下痢型に分けられるが、今回の健常者内でセレウリド遺伝子陽性株の保菌者は 1.5%、下痢毒陽性株の保菌者は 4.1%であった。

また、デンプン分解反応試験についてはデンプン分解反応陽性で下痢毒産生株が 10 株、デンプン分解反応陰性でセレウリド遺伝子陽性株が 3 株検出され、一般に言われているようにデンプン分解反応と毒素産生性の関連性が示唆された。

今回の調査から、健常者でも黄色ブドウ球菌とセレウス菌を約 1~2 割は保菌しており、毒素産生株も検出されることが判明した。健常者が毒素産生株を保菌していても無症状であることは多い。食中毒事例において検出された黄色ブドウ球菌やセレウス菌が、常在菌なのか原因菌なのかの判断は、疫学情報

を基に、検出菌数や食材及び患者からの菌の一致が重要である。調査担当者は従事者（健常者）における黄色ブドウ球菌、セレウス菌の保菌状況を考慮した上で、疫学的な情報と合わせて、総合的に食中毒事例を解明していくことが重要である。今回の調査結果を食中毒予防の啓発活動の資料として役立てていきたい。

## 文 献

- 1) 大楠清文, 江崎孝之 : 16S rRNA 配列のシーケンス解析による細菌の同定, 臨床と微生物, vol.39 (増刊号), pp.601-610, 2012.
- 2) Fumihiko Sakai, Atsuhiko Takemoto, Shinya Watanabe, et al : Multiplex PCRs for assignment of Staphylocoagulase types and subtypes of type VI Staphylocoagulase, journal of Microbiological Methods, vol.75, pp.312-317, 2008.

- 3) Nakano S, Maeshima H, Matsumura A, Ohno K, Ueda S, Kuwabara Y, Yamada T. : A PCR assay based on a sequence-characterized amplified region marker for detection of emetic *Bacillus cereus*. *J Food Prot.* 2004 Aug;67(8):1694-701.
- 4) 坂井千三, 潮田弘 : 黄色ブドウ球菌のプロフィール, 実務 食品衛生, 河端俊治, 春田三佐夫, 細貝祐太郎 (編), 中央法規, 東京, 1987, pp.44-45.
- 5) 森 實, 加藤英一, 浜田輔一 : 食品取扱者におけるエンテロトキシン陽性ブドウ球菌の保菌状況および分離株の各種性状, 日本細菌学雑誌, vol.32, no.3, pp.501-508, 1977.
- 6) 入倉善久, 池島伸至, 平田一郎, 他 : 各種食品取り扱い者からの黄色ブドウ球菌の検出状況および分離菌株のコアグラゼ型とエンテロトキシン産生性, 東京衛研年報, vol.38, pp.145-149, 1987.
- 7) 中野千紗, 清水晃, 河野潤一, 他 : ヒトおよび動物の鼻腔におけるエンテロトキシン産生・メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の保菌状況と分離菌株の性状, 日本食品微生物学会雑誌, vol.25, no.2, pp.83-88, 2008.
- 8) 五十嵐英夫 : 過去 15 年間の東京都におけるブドウ球菌食中毒発生の動向, 東京都微生物検査情報 (月報), 第 18 卷 9 号, 1997.
- 9) 坂井千三, 潮田弘 : セレウス菌のプロフィール, 実務 食品衛生, 河端俊治, 春田三佐夫, 細貝祐太郎 (編), 中央法規, 東京, 1997, pp.36-37.
- 10) 品川邦汎, 上田成子, 他 : 食中毒予防必携第 2 版, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京, 2007, pp.63-71. pp.113-123