

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450164

研究課題名(和文) 原乳における黄色ブドウ球菌の増殖および毒素産生量予測

研究課題名(英文) Estimation of Staphylococcus aureus growth and its enterotoxin production in raw milk

研究代表者

藤川 浩 (Fujikawa, Hiroshi)

東京農工大学・(連合) 農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90456252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は2000年に起きた黄色ブドウ球菌エンテロトキシンに汚染された乳製品による大規模な食中毒事件の科学的な解明を目的とした。第一に、原乳に黄色ブドウ球菌を接種し、比較的高い温度(36-48℃)で保存した結果、事件と同じ40℃(または44℃)で保存した場合が、最も多くの毒素量を産生した。この温度は事件の起きた北海道の工場内の保管温度と等しかった。

第二に、乳、乳製品からの本毒素測定に対する公定法では煩雑で、時間がかかるため、より簡便で、低濃度の毒素を測定するための前処理法を開発した。すなわち、陽イオン交換体を用いたイオンクロマトグラフィーで簡便で感度の良い方法が開発できた。

研究成果の概要(英文)：The present study was done to scientifically find the reasons for the outbreak by Staphylococcal enterotoxin incriminated in dairy products in Osaka and 2000. when staphylococcal cells were inoculated in raw milk and stored at the temperatures ranging from 36 C to 48C, the most production of the toxin was observed at 40 C (or 44 C). That temperature was the same as that of the causative milk in the outbreak.

Then the pretreatment for the toxin measurement in dairy products were improved, because it takes a lot of time and work in the present pretreatment. As a result, the application of cation-exchange ion chromatography was successful in recovery, the amount of work, and sensitivity.

研究分野：食品衛生学

キーワード：ブドウ球菌食中毒 エンテロトキシン産生 微生物増殖 原乳

1. 研究開始当初の背景

2000年大阪で世界的にもまれな大規模食中毒事件が市販低脂肪乳によって起き、その原因物質は原乳中で増殖した黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンであった。一方、日本国内で細菌性食中毒事件で本菌による事件はなおも3位4位に位置している。また、本毒素の中でもA型による事件が国内外においてもかなり多い。

大阪での大規模食中毒事件を基に、私たちは殺菌市販乳に接種した本菌の増殖およびそれに伴う本毒素産生を数学モデルを用いて予測してきた。しかし、殺菌牛乳と比べ、様々な微生物に汚染された原乳中では微生物間の競合などの影響を受けるため、本菌の増殖および毒素産生性は殺菌市販乳とは本質的に大きく異なると考えられる。また、上記の事件の原因となった北海道工場で40程度で保管された原乳中での本菌の増殖と毒素産生に関する知見はこれまでなかった。

さらに、乳製品中の本毒素測定のための前処理法が現在の工程法では操作が煩雑で、回収率も低い。そのため、より良い前処理方法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

上記の事件の原因を科学的に解明し、同様な事件が再び起こらないようにする必要があった。そのため、各種微生物に汚染された原乳中での黄色ブドウ球菌の増殖と毒素産生量について、特に事故の原因となった北海道工場での加工中の乳温度と関連させた温度条件での知見を得ることを目的とした。

次に、乳製品中の本毒素測定のための前処理法が現在、煩雑で回収率も低いため、より良い前処理方法を開発し、簡便迅速に測定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 原乳中での接種実験

新鮮で黄色ブドウ球菌汚染のない原乳を東京農工大学内農場のホルスタイン種乳牛から得た。なお、一般細菌汚染濃度の高い試料と低い試料を用いた。各原乳中にエンテロトキシン(A型)産生黄色ブドウ球菌を接種し、36、40、44、48の比較的高温で保存した。その期間中、一定時間毎にサンプルを取り出し、その試料中の細菌数、黄色ブドウ球菌数およびエンテロトキシン濃度を測定した。

細菌数は標準寒天培地平板を、ブドウ球菌数はベアードパーカー培地平板を用いてそれぞれ測定した。原乳中の毒素量は試料を13,000gで15分間遠心後、その上清と沈査について個々に蛍光酵素抗体法(バイダス、ピオメリュー社)によって高感度に測定した。なお、沈査はバイダス用希釈液を用いて溶解し、その溶解液中の毒素濃度を測定した。その後、上清と沈査中の毒素濃度を合計した。

さらに、ブドウ球菌を各種菌濃度で接種し、

同様に検討した。すなわち、上記2種の原乳に 10^2 から 10^7 個/mlまでのブドウ球菌を接種し、40または44で保存した。保存中、一定時間ごとに試料を取り、試料中のブドウ球菌数と産生毒素濃度を上気した方法で測定した。

(2) 新たな前処理法の開発

乳製品からのエンテロトキシンの簡便前処理法の開発については、陽イオン交換樹脂(C-25、GEヘルスケア社)をカラムに詰めた。試料の前処理に最適なpHを検討するため、エンテロトキシン(A型)産生黄色ブドウ球菌を液体培地で37で24時間振とう培養後、13,000gで15分間遠心し、上清を得た。その上清を1M塩酸で各種のpHに調整した。

エンテロトキシン(A型)を各種濃度で牛乳、原乳、脱脂粉乳、ナチュラルチーズに添加し、溶出後、毒素量を測定し、その回収率を求めた。溶出液中の毒素は蛍光酵素抗体法(バイダス、ピオメリュー社)で測定した。

4. 研究成果

(1) 原乳中での黄色ブドウ球菌の増殖と毒素産生性

自然微生物が低汚染及び高汚染した原乳にそれぞれ毒素産生黄色ブドウ球菌を接種し、36、40、44、48で保存した。その結果、図1に示すように36、40、44ではブドウ球菌が増殖したが、48では徐々に死滅した。ただし、図1Bの高汚染原乳ではブドウ球菌の接種菌濃度が高かったため、明らかな菌数増加はみられなかった。

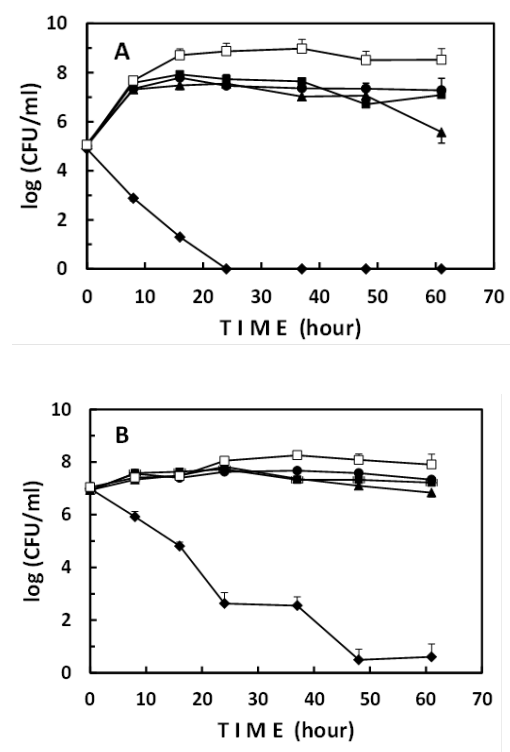


図1. 原乳に接種した黄色ブドウ球菌の各種温度での増殖

A. 低汚染乳、B. 高汚染乳
 , 36 ; , 40 ; , 44 ; , 48 ;
 , 一般細菌数(Aでは40、Bでは44)
 バーは標準誤差を示す。

一方、この条件下で低汚染原乳では、エンテロトキシン産生量は図2に示すように、特に温度による有意差はみられなかったが、40と44でやや高い産生がみられた。48では全く産生されなかった。高汚染原乳では36に比べて40と44で毒素産生量が高く、36との有意差が認められた。

また、二つの原乳を比べると、自然微生物の低汚染原乳の方が毒素産生量は高かった。

さらに、28および32で同様な保存を行っても本菌の増殖はみられたが、毒素産生は認められなかった。

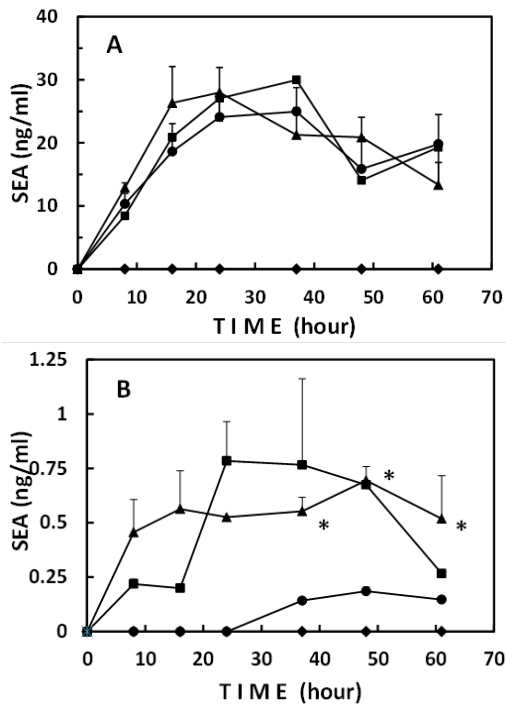


図2. 原乳に接種した黄色ブドウ球菌の各種温度でのエンテロトキシンA産生性
 A. 低汚染乳、B. 高汚染乳
 , 36 ; , 40 ; , 44 ; , 48
 *, 36との有意差あり (P<0.05)

次に、各種菌濃度で黄色ブドウ球菌を高汚染及び低汚染原乳に接種し、同様に保存した。その結果、本菌の増殖は図3に示すように低汚染乳では大きな差は認められず、高汚染乳においては低い接種菌濃度の場合、やや増殖に抑制がみられた。

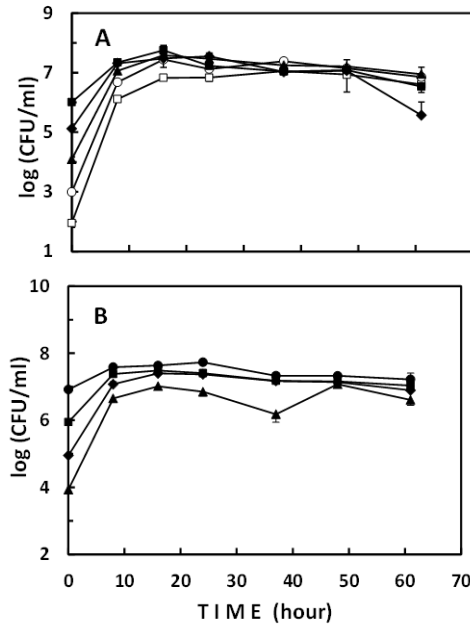


図3. 原乳における各種濃度で接種した黄色ブドウ球菌の増殖
 A. 低汚染乳 (44) B. 高汚染乳 (40)
 , 10²; , 10³; , 10⁴; , 10⁵; , 10⁶;
 , 10⁷ 個/ml

各種接種菌濃度下での黄色ブドウ球菌エンテロトキシン産生は図4にみられるように接種菌濃度が高いほど産生量も高かった。すなわち、濃度依存性が認められた。

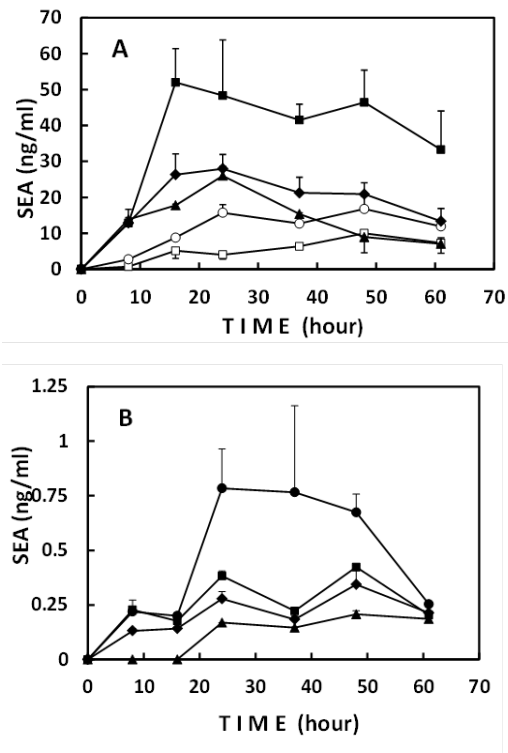


図4. 原乳における各種濃度で接種した黄色ブドウ球菌の毒素産生

A. 低汚染乳 (44) B. 高汚染乳 (40)
 , 10²; , 10³; , 10⁴; , 10⁵; , 10⁶;
 , 10⁷ 個/ml

以上のように、原乳中では自然汚染微生物の影響を受けるため、ブドウ球菌の毒素産生は 40 または 44 で特に高い産生がみられたが、それ以外では抑制された。この結果は高汚染原乳で顕著であった。なお、北海道工場での事故の際の乳温度は同じ 40 程度であったことが知られている。

(2) 新たな乳製品中の毒素測定のための前処理法開発

最初に試料の pH 検討するため、エンテロトキシン(A型)を含む試料の pH を各種の pH に調整した。洗浄、溶出後の回収した毒素量は pH4.0 で最大であったので、これを最適な値として、以後用いた。

実際の市販乳製品に精製毒素を添加して (0.5ng/ml-0.025ng/ml および 1ng/g-0.25ng/g)、回収実験を行なった。その結果、添加毒素濃度に関わらず、牛乳、スキムミルク、ナチュラルチーズにおいておよそ 60%、60%、40%の回収率であった。

さらに、大型カラムを使って試料の体積を増すと、より低濃度の毒素を検出できた。

以上のように、陽イオン交換イオンクロマトグラフィーによって乳製品中の本毒素を簡便迅速に、高い回収率で測定できることが明らかとなった。今後、この処理法を用いて、乳製品中の本毒素の測定が期待できる。

また、市販の陽イオン交換体用の固相抽出カラムでは 10%程度の非常に低い回収率であった。これは、市販カラムは農薬などの低分子を対象としているため、本毒素のような高分子のタンパク質は不適合であったためと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

I. I. Sabike, H. Fujikawa, M. Z. Sakha, and A. M. Edris Production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in raw milk at high temperatures. Journal of Food Protection. Vol.77, No.9, 2014. pp.1612-1616. 査読有 Doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-527

〔学会発表〕(計 2 件)

藤川 浩、サビケ イスラム、ザッハザヘル、エドリス アボバクル 高温下における生乳中での黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA産生性 日本食品衛生学会 2014年12月5日 金沢歌劇座(石川県金沢市)

平山 若菜、藤川 浩 イオン交換クロ

マトグラフィーを用いた乳・乳製品中のブドウ球菌エンテロトキシンAの検出 日本食品微生物学会 2015年11月13日 川崎市教育文化会館(神奈川県川崎市)

〔図書〕(計 1 件)

藤川 浩 オーム社 Excel で学ぶ食品微生物学 2015 181

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤川 浩 (FUJIKAWA Hiroshi)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：90456252