

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26750021

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌の毒素産生の制御：にぎり飯で食中毒を起こさないために

研究課題名(英文) Regulation of the staphylococcal enterotoxin produced by *Staphylococcus aureus* in cooked rice

研究代表者

筒浦 さとみ (TSUTSUURA, Satomi)

新潟大学・研究推進機構・特任助教

研究者番号：20708622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では米飯における黄色ブドウ球菌の増殖及び毒素エンテロトキシンA(SEA)産生の制御を目的とし、菌を添加した米飯を様々な環境下で保存し、菌の増殖やSEA量などを詳細に調べた。グリシンでは飯重量の2～5%、食塩では5～7%の添加でSEA産生を抑制する傾向がみられた。グリシンと食塩を同時に加えてもSEAの抑制効果は認められなかった。また、pH 4.0～4.5でもSEA産生を抑制する傾向が認められた。これらの結果から、米飯の味を考慮すると食品添加物単体でのSEA抑制は困難であり、これらの抑制法をいくつか組み合わせることで米飯のおいしさを保ちつつ、SEA産生を抑える必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To examine the effect of various factors on the growth of *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in cooked rice, we inoculated strains of SEA-producing *S. aureus* into cooked rice, and then quantified the bacterial number and SEA after incubating them at 37°C. Most strains produced less SEA in cooked rice added with 2-5% glycine than in the non-added control. Some strains produced less SEA in cooked rice added with 5-7% NaCl than in the non-added control. The inhibition of growth of *S. aureus* and SEA production was not apparent when NaCl was added to cooked rice at the presence of glycine. Most strains produced less SEA in cooked rice adjusted pH 4.0-4.5 than in the non-adjusted control. It is necessary to further examine the combination of these inhibition methods for the inhibition of SEA production in cooked rice while preserving good taste of cooked rice.

研究分野：食品衛生学、食品科学、家政学

キーワード：黄色ブドウ球菌 エンテロトキシンA (SEA) 毒素 米飯 Western blot グリシン 食塩 pH

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は食品中で増殖し、毒素エンテロトキシン A (SEA) を産生する。ヒトが食品とともに SEA を摂取し、食中毒を発症する。キャンプ、祭り、炊き出し等の屋外イベントや家庭、旅館施設で作られた自家製のにぎり飯等による黄色ブドウ球菌食中毒は毎年起こっており、一度に大人数が食することが多く、大規模食中毒につながる恐れがある。このように本菌による食中毒が毎年発生しているにもかかわらず、その原因である SEA をにぎり飯等から抽出し、定量した報告はほとんどない。SEA を定量し、米飯中で菌が SEA をどの程度産生するかを詳細に調べることは食品の適切な保存時間や保存条件を決定するために、必要不可欠である。

黄色ブドウ球菌による食中毒はおよそ 200~1000 ng/ヒトと少量の SEA 摂取でも発症する。米飯での研究を食中毒予防に活かすためには、特異的で高感度な定量法により微量の SEA を正確に定量し、短期間の SEA 産生について調べる必要がある。そこで、本研究では最も高感度で特異性の高い Western blot 法を SEA の定量に使用する。

また、以前に液体培養における SEA 量を比較したところ、一定の温度条件下でも菌株によって SEA 産生量に差がみられた。このことから、供試菌として SEA 産生株を複数用いてこれらを調べるのが重要であると考えられる。

SEA 産生に影響を及ぼす環境要因には温度、pH、塩分濃度等、様々な要因が考えられるが、実際の米飯を用いてそれらが菌の生育及び毒素産生に与える影響について調べることで、米飯保存における食中毒の予防に役立てることができる。

2. 研究の目的

先に述べたように、黄色ブドウ球菌の SEA 産生を米飯中で定量した研究はほとんどなく、米飯における黄色ブドウ球菌の増殖や SEA 産生を制御するためには、これらを詳細に調べる必要があると考えられた。

そこで、本研究では、米飯における黄色ブドウ球菌の増殖及び毒素産生の制御を目的として、米飯において様々な環境要因が SEA 産生に及ぼす影響を複数の菌株を用いて詳細に調べ、次に実際の食中毒を想定したにぎり飯についても、どのように菌が浸透し、SEA が産生されるかについて調べた。

また、黄色ブドウ球菌は黄色やオレンジ色のコロニーを形成し、また増殖に伴い腐敗臭を発するが、食中毒を引き起こすと考えられる SEA 量に達する程度の菌の増殖を官能的に検出できるかについては調べ

られていない。本研究では米飯における黄色ブドウ球菌の増殖と SEA の産生を調べるとともに、米飯の色または臭いを官能的に評価し、感覚的検知の限界についても同時に調べた。

3. 研究の方法

菌の生育及び SEA 産生に対する様々な環境要因の影響

グリシンの影響を調べる際には、飯重量の 0.5~5% のグリシンを添加し、食塩の影響を調べる際には 0.5~7% の NaCl を添加して、米を炊飯した。pH の影響を調べる際には、米を炊飯し、飯の pH を酢酸で pH 4.0~6.5 に調整したものを用いた。これらの炊飯米 2.5 g に黄色ブドウ球菌を 10^6 CFU/g になるように添加した。初発菌数の影響を調べる際には、炊飯米 2.5 g に黄色ブドウ球菌を 10^2 CFU/g になるように植菌し、 10^6 CFU/g のものと比較した。

いずれの場合も、黄色ブドウ球菌は SEA 産生株を複数株用い、それぞれ植菌した。菌を植菌した炊飯米を 37 °C で 24~48 時間保存し、菌数と SEA 産生を経時的に測定した。菌数はマンニット食塩寒天培地を用いた平板培養法にて測定し、SEA は BSA 溶液で抽出後、Western blot し、化学発光法で定量した。Western blot の検出限界は 0.4 ng/g 程度であった。

黄色ブドウ球菌を付着させたグリシン添加飯における色と臭いに関する官能評価

グリシンを飯重量の 0.5~5% 添加して炊飯した米飯に、黄色ブドウ球菌複数株を 10^6 CFU/g になるようにそれぞれ植菌し、37 °C で 24~48 時間保存した。保存前の米飯の色及び臭いと 4~48 時間保存後の米飯の色及び臭いの識別を、パネリスト 10 名による 3 点識別法で行った。

4. 研究成果

米飯における菌の生育及び SEA 産生に対するグリシンの影響

黄色ブドウ球菌 SEA 産生株である C-271 株の菌の生育と SEA 産生の経時的变化を Fig. 1 に示す。菌数は 0.5~2% グリシン添加飯ではコントロールと同様、 10^6 ~ 10^9 CFU/g 程度まで増加し、いずれの場合も同様の挙動を示した。一方、SEA 産生については 0.5~1% のグリシン添加飯における 48 時間後の最大 SEA 量は 40 ng/g 程度とコントロールと同程度の SEA を産生した。2% グリシン添加では SEA 産生を抑制する傾向がみられ、5% グリシン添加では菌の生育及び SEA 産生ともに効果的に抑制された。

一定の条件下でも米飯における最大

SEA 量は菌株によって大きく異なったものの、ほとんどの菌株において 0.5%及び 1%程度のグリシン添加では、コントロールと比べて、SEA 産生に差が認められなかったが、2%及び 5%のグリシン添加によりほとんどの菌株の SEA 産生が抑えられた。

食中毒発症に必要な最小 SEA 摂取量は 200~1000 ng/ヒト程度であることが知られている。菌の付着量及び菌株の種類によっては、グリシン添加の有無に関わらず、37 で 4 時間保存した米飯ではにぎり飯 1 つ (80 g) 程度でも食中毒を起こすのに十分量の SEA が含まれる可能性があると考えられた。

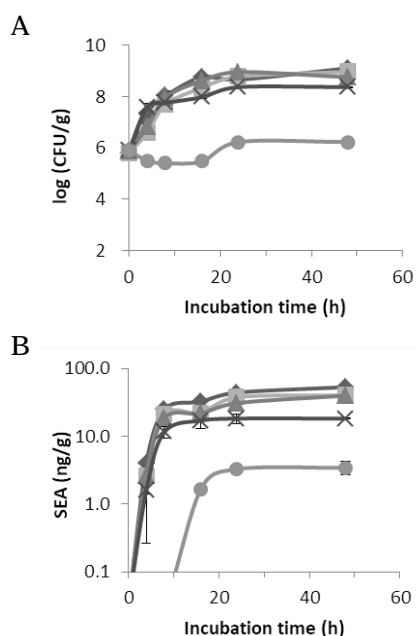


Fig. 1 グリシン添加飯 (飯重量の 0% (control; ◆), 0.5% (●), 1% (○), 2% (×), 5% (◇)) における黄色ブドウ球菌 C-271 の生育 (A) と SEA 産生 (B)

黄色ブドウ球菌を付着させたグリシン添加飯における色と臭いに関する官能評価

黄色ブドウ球菌 C-271 を付着させて保存した際の米飯の色と臭いについての 3 点識別法による官能評価の結果を Table 1 に示す。色はグリシン添加の有無にかかわらず、48 時間でも感覚的に識別することは出来なかった。一方、臭いはコントロールで 8 時間から識別可能であったのに対し、1%では 48 時間から識別可能、2%では 48 時間でも識別できなかった。

複数の菌株の結果を比較すると、米飯の色を感覚的に識別できる保存時間はコントロールにおいても、菌株により識別可能な時間に差がみられ、コントロール及び 1%グリシン添加では 16~48 時間以降であったのに対し、いずれの菌株においても 2%では 48 時間以降となった。一方、米飯

の臭いを識別できる保存時間は識別できる時間に菌株による違いによる差はなく、いずれの菌株でもコントロールで 8 時間であったのに対し、1%及び 2%グリシン添加により 48 時間以降となった。

このようにグリシンの添加により、米飯の色や臭いにおける黄色ブドウ球菌の増殖を感覚的に識別できる時間は延長されたが、先にも述べたように 0~2%グリシン添加飯では 4 時間以降に 5%のグリシン添加飯においては 8 時間以降と比較的初期段階に SEA が検出されたため、グリシン添加の有無にかかわらず、黄色ブドウ球菌の増殖が感覚的に識別される前に、食中毒を引き起こす SEA 量に達する可能性があることが明らかとなった。

Table 1 黄色ブドウ球菌 C-271 を付着させ、保存したグリシン添加飯の色と臭いの官能評価 (3 点識別法、n=10)

Incubation time (h)	color			odor		
	Glycine (%)			Glycine (%)		
	0	1	2	0	1	2
0	C	C	C	C	C	C
4	4	--	--	4	5	5
8	3	--	--	*7	4	2
16	5	3	2	--	5	3
24	1	0	4	**10	4	5
48	2	6	5	--	*7	3

C, control. --not determined. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

米飯における菌の生育及び SEA 産生に対する食塩の影響

にぎり飯は少量の塩を付けて握ることもある。黄色ブドウ球菌は耐塩性であるが、米飯における食塩の影響は調べられていない。黄色ブドウ球菌 C-271 を食塩添加飯に植菌し、保存したところ、0.5~2%ではコントロールに比べ、SEA 産生に差がみられなかった。しかし、食塩を 5~7%程度加えると SEA 産生が抑制された。

グリシン (0.5% 及び 1%) と食塩 (0.5~2%) を組み合わせ、同時に添加した際の菌の生育と SEA 産生についても調べた。グリシン添加飯 (0.5% 及び 1%) における黄色ブドウ球菌 C-271 の SEA 産生に対する NaCl の影響を Fig. 2 に示す。4 時間保存時の 0.5%グリシンと 2%NaCl の組み合わせのみ SEA 産生の減少傾向が認められたが、いずれの組み合わせにおいても菌の生育及び SEA 産生ともに抑制されなかった。他の菌株についても同様に比較したが、C-271 とほぼ同様の結果であった。

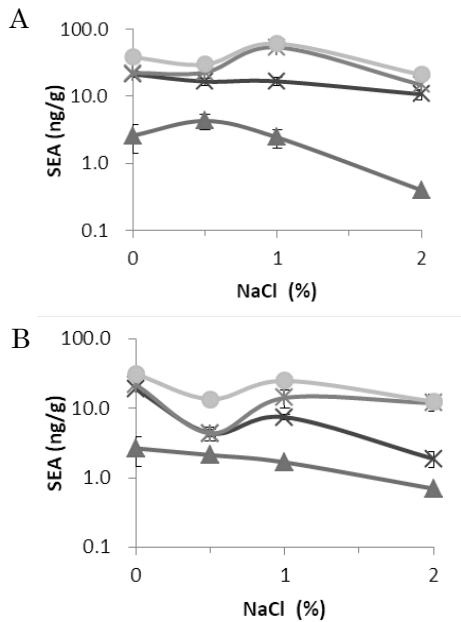


Fig. 2 グリシン添加飯（飯重量の 0.5% (A)及び 1% (B)）における黄色ブドウ球菌 C-271 を添加した際の SEA 産生に対する NaCl の影響（4 時間 (○), 8 時間 (×), 16 時間 (*), 24 時間 (□)）

米飯における菌の生育及び SEA 産生に対する初発菌数の影響

米飯における菌の生育及び SEA 産生に対する初発菌数の影響を調べた。C-271 の生育と SEA 産生を Fig. 3 に示す。初発菌数 10^2 CFU/g でも 48 時間後には 10^8 CFU/g と初発菌数 10^6 CFU/g の際と同程度の菌数に達した。SEA 産生については初発菌数 10^2 CFU/g では 8 時間から、 10^6 CFU/g では 4 時間から SEA を検出し始めた (Fig. 3B)。また、最大で初発菌数 10^2 CFU/g では 1.2~11 ng/g 程度、 10^6 CFU/g では 0.8~58 ng/g 程度の SEA を産生した。初発菌数が多い方が少ないものに比べて、早い時間から SEA の検出が認められ、産生量も多かった。このように、SEA 産生は初発菌数の影響を受け、大量に菌が付着した場合は短時間で食中毒を発症するのに十分な量の SEA を産生する可能性が認められた。

また、先にも述べたように初発菌数 10^6 CFU/g では 4 時間の保存でも喫食量によっては食中毒を発症する可能性があることが示唆されたが、初発菌数 10^2 CFU/g では 8 時間以降に延長される等、食中毒予防の観点からみても、菌の付着量が米飯保存と SEA 産生に与える影響が大きく、菌の付着をなるべく少なくすることは米飯における食中毒予防として有効であることが示唆された。

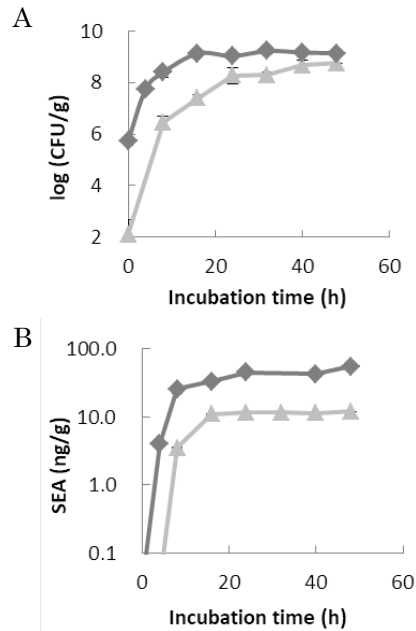


Fig. 3 初発菌数 10^2 CFU/g (△) 及び 10^6 CFU/g (◆) の際の米飯における黄色ブドウ球菌 C-271 の生育 (A) と SEA 産生 (B)

米飯における菌の生育及び SEA 産生に対する pH の影響

米飯における菌の生育と SEA 産生に対する pH の影響を調べた。pH 4.0 を除き、ほとんどの pH 調整米飯では菌の生育は SEA 産生と同様の挙動を示した。黄色ブドウ球菌 C-271 を米飯に植菌し、4 時間及び 24 時間保存後のコントロール (pH 6.5) の SEA 量を 100% とした場合の SEA 産生 (%) を Fig. 4 に示す。

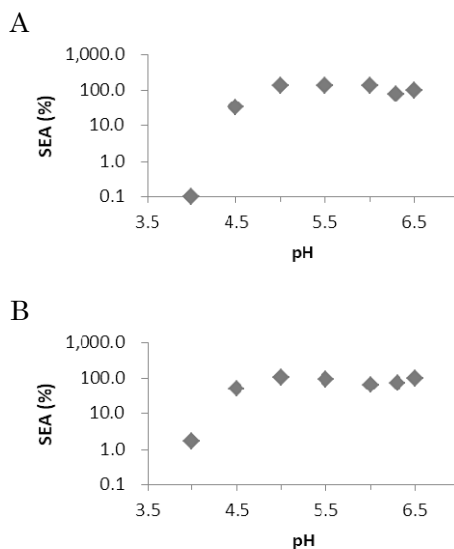


Fig. 4 pH 調整米飯 (pH 4.0~6.5) に黄色ブドウ球菌 C-271 を添加し、37℃ で 4 時間 (A) または 24 時間 (B) 保存した際の SEA 産生 (%)

pH 6.0、5.5、5.0の米飯においてはコントロールと同程度のSEAを産生したが、pH 4.5では少し抑えられ、pH 4.0ではほとんどSEAを産生しなかった。pH 4.0では菌の生育が抑制され、菌数が増加しなかったため、SEAは遅れて産生されたと考えられる。

また、いずれの菌株においても保存初期にはpH 5.0~6.0でコントロールと同程度のSEAが産生されたが、pH 4.0ではSEA産生は抑制された。pH 4.5では菌株による違いが大きく、コントロールと同様に生育できるものと抑制されるものがあったが、SEA産生量はいずれの株でも減少した。0.5~1%程度のグリシン添加では、コントロールに比べ、ほとんどの菌株のSEA産生において差が認められなかった。2~5%ではいずれの株においてもSEA産生が抑えられた。

以上の結果より、米飯のpHを調整する、グリシンを添加する等、様々な要因が米飯中における黄色ブドウ球菌の生育及びSEA産生に与える影響が明らかとなり、米飯における黄色ブドウ球菌の生育とSEA産生についての新たな知見が得られた。いずれの米飯調製法も米飯の保存時間を効果的に延長できると考えられたが、単体ではSEA産生を完全に抑制するのは困難であることが示唆された。また、本研究においてにぎり飯等のスケールを大きくした際の予備的検討を行ったところ、SEA抽出法の再検討が必要であることが示唆された。このことから、今後はこれらの抑制法を組み合わせることでSEAをより効果的に抑制する米飯調製法を探索するとともに、SEA抽出法の検討を実際のにぎり飯スケールで行い、にぎり飯におけるSEA産生とその抑制法について詳細に調べることにより、現実的に使用可能な米飯調製法を検討及び決定する必要がある。

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)

Tsutsuura S, Murata M: Production of staphylococcal enterotoxin A in cooked rice and limitation of its organoleptic detection. *Food Sci. Technol. Research*, **23** (2), 267-274 (2017) (査読有) DOI: <https://doi.org/10.3136/fstr.23.267>

[学会発表](計 8件)

日本食品科学工学会(福岡、2014)

筒浦さとみ、林田直子、村田容常

米飯保存時のstaphylococcal enterotoxin A (SEA)産生に与える影響についての黄色ブドウ球菌菌株間における比較, p 114

食品分析研究会(東京、2014)

筒浦さとみ、村田容常

保存米飯中におけるエンテロトキシンAの検出ならびに黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシンA産生の関係について, p 17

12 th Asian Congress of Nutrition (Yokohama, 2015)

Tsutsuura S, Murata M

Enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* in a liquid medium and cooked rice, p 479

日本農芸化学会 関東支部大会(東京、2015)

筒浦さとみ、村田容常

米飯による黄色ブドウ球菌食中毒の予防に対する感覚的検知の限界, p 16

日本農芸化学会 (札幌、2016)

筒浦さとみ、村田容常

米飯におけるエンテロトキシンA産生とその制御, p 43

日本食品科学工学会(名古屋、2016)

筒浦さとみ、村田容常

米飯へのグリシン添加が黄色ブドウ球菌毒素産生と色及び臭いに与える影響, p 140

日本栄養・食糧学会(沖縄、2017)

筒浦さとみ、村田容常

黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生を制御するための米飯の保存方法の検討, p 244

日本家政学会(東京、2018)

筒浦さとみ、村田容常

米飯保存時の黄色ブドウ球菌staphylococcal enterotoxin A (SEA)産生に与えるpH及びグリシンの影響についての菌株間における比較, p 59

6. 研究組織

(1)研究代表者

筒浦さとみ (TSUTSUURA Satomi)

新潟大学・研究推進機構・特任助教

研究者番号: 20708622