

# ブドウ球菌簡易検出紙

(4 MUP - Type)

使用法と評価の仕方

国際学院 埼玉短期大学 名誉教授

医学博士 渡 邊 昭 宣

 **サン化学株式会社**

# 目 次

1	ブドウ球菌簡易検出紙の改良目的 .....	1
2	使用目的 .....	3
3	使用方法 .....	4
	簡易検出紙の使い方 .....	4
	使用上の注意 .....	5
4	検出紙の性能試験 .....	6
5	新黄色ブドウ球菌簡易検出紙（4MUP-Type）の評価とまとめ .....	13

# ブドウ球菌簡易検出紙

(4 MUP - Type)

使用法と評価の仕方

国際学院 埼玉短期大学 名誉教授  
医学博士 渡 邊 昭 宣

## I ブドウ球菌簡易検出紙の改良の目的

従来から病原菌を選択的に分離検出しようとする培地には、それぞれの病原菌のもつ特徴的な生化学的性状を応用した生化学的反応を培地の中にとりいれ、同時に目的とする病原菌以外の細菌を抑制する成分を加えて発育を阻止し、特異的に目的の病原菌を検出する方法が使われてきた。

また、検出紙にこれら選択培地の特性を応用したのは1955年 F.J.Förgで、大腸菌群の検出紙（ペーパーストリップ）を考案し現場検査法として広く使われるようになったのが始まりである。

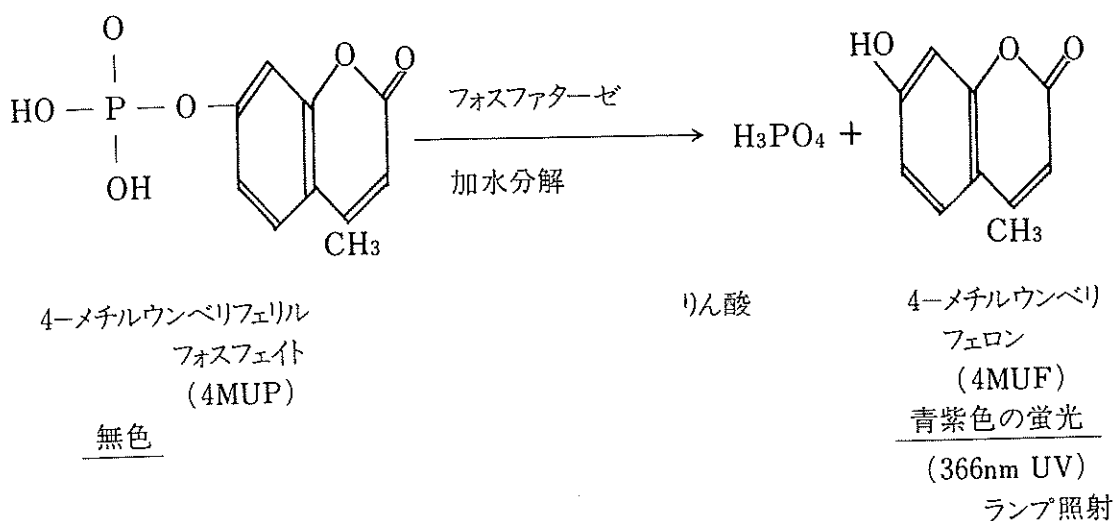
わが国でも、同様な研究が行われ、現在では大腸菌群をはじめ、多くの病原菌に対する検出紙が開発、販売され、食品業界の自主管理のための現場検査法として広く使われている。

弊社においても大腸菌群簡易検出紙を初めとして黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ、一般細菌数、サルモネラなどを開発し広く利用されている。しかし、これらの検出紙は目的菌の生化学的反応を応用したものが多く、そのため類似菌も同時に検出されてしまう難点があった。

近年、その点を解決するため大腸菌群簡易検出紙に大腸菌群及びE.coliのもつ酵素活性をとりいれ、吸着培地組成に発光基質を加え、両菌の鑑別を容易にしたものがすでに利用されている。

そこで、今回は黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌の鑑別が困難であった従来の黄色ブドウ球菌簡易検出紙にこの原理を応用してみた。今回の検出紙は

従来の検出紙の特性はそのまま活かし亜テルル酸カリウムと塩化リチウムでブドウ球菌以外の細菌の発育を阻止し、ブドウ球菌が亜テルル酸塩を還元して黒色化する性質を利用する点は変わらないが、これに発光基質である4-Methylumbelliferyl Phosphateを加えて、黄色ブドウ球菌が産生するPhosphatase酵素により加水分解させ、遊離した4-Methylumbellifereomeを長波長紫外線で発光させるものである。



黄色ブドウ球菌のフォスファターゼの活性についてはBarber & Kuper (1951) により病原ブドウ球菌の同定に用いられたもので、ブドウ球菌の病原性はフォスファターゼ及びコアグララーゼの産生と高度に相関性のあることが報告されている。Cowan の医学細菌同定の手びきによる Staphylococcus, Micrococcus, Aerococcus の鑑別で、フォスファターゼ産生の陽性率は S.aureus では100%の陽性を示し、S.epidermidis では若干陽性株がみられ、Micrococcus, Aerococcus は全く陰性であり、S.aureus の特異性の高いことが示されている。従来の黄色ブドウ球菌簡易検出紙では、生培地のMSEY培地のように卵黄反応によってS.aureus とS.epidermidis を鑑別することができないため、S.epidermidis も黒色集落を形成してしまうことからMSEY培地との一致性が低いとか、また、その選択性を強化することによっては黄色ブドウ球菌の発現菌数がでなかったり、または菌数が少なく出るなどの欠点が指摘

されていた。今回の4 MUP-Type黄色ブドウ球菌簡易検出紙ではS.aureusの産生する酵素活性を応用したため、培地組成による発現菌数の抑制は行わず、長波長紫外線により発生する蛍光の有無で菌数を測定するためS.aureusを特異的に簡易鑑別することが出来るようになった。

そこで、本紙では改めて4 MUP-Typeの黄色ブドウ球菌簡易検出紙の使い方と結果判定についての評価を説明し、利用上の参考に供する次第である。

## Ⅱ 使用目的

わが国における細菌性食中毒の発生率は毎年総件数の90%以上を占め、その中ブドウ球菌を原因菌とする食中毒は以前は常に上位にランクされていたが、最近では衛生管理の行き届きからか発生率は低下し平成10年の統計をみると85件（2.9%）で7位に低迷するようになった。しかし、本菌は環境汚染菌として到るところに存在していることから、また何時再興するかわからない病原菌である。そのため食品の検査には常時自主検査を行わなければならない。

ブドウ球菌はヒト・動物をはじめ自然界に広く分布し、健康な人でも鼻腔や鼻前庭、腸管内に約30%は保菌され、また、頭髮、手指、便からも約25%前後検出され、とくに夏から秋にはその分布は上昇すると言われている。従ってブドウ球菌の食品汚染にはヒトや動物が関与することが多く、特に調理人の手指や傷口を介して食品や調理器具を汚染する機会が常に存在していることが窺われる。

また、生鮮の肉や魚からも50～80%の検出がみられることから原料からの汚染も常に存在していると考えていなくてはならない。しかし、ブドウ球菌の毒素産生は食品中で $10^6$ /g以上に増殖するときに産生されることから、本菌の汚染を早い段階で探知し食品の殺菌や増殖防止の対策を完全に行うことによって本菌による食中毒は防げるものと信じる。そのため、検査室や実験設備のない施設でも簡単に検査ができるブドウ球菌簡易検出紙を使って、常に食品の原料や従業員の手指、調理器具を検査し関係者の健康管理と食品の

品質管理をおこなっていかななくてはならない。

### Ⅲ 使用方法

4 MUP-Type黄色ブドウ球菌簡易検出紙は極めて簡便に病原ブドウ球菌を検出できる試験紙で、食品の黄色ブドウ球菌汚染を簡単に検査できるスクリーニングテスト用に開発されたものである。また、定性試験は勿論、定量的にもある程度の汚染菌数を把握することもできる。

この検出紙は黄色ブドウ球菌を選択的に発育させ、肉眼では黒色斑として発育コロニーを観察することもできるが、更に、病原性の黄色ブドウ球菌のみを検出するためにはUVランプで長波長紫外線（366nm）照射を行いライトブルーの蛍光を発したコロニーの有無及びコロニー数を数えることによって確実に病原ブドウ球菌の汚染を把握することができることから従業員の衛生教育には視覚的に強烈に汚染の実態をアピールすることができ最適と考えられる。また、生培地と違い陽性を示したペーパーはアイロンなどをかけて乾燥することによって保存がきくことから長期資料として保存し、衛生教育の資料に利用することができる利点もある。しかし、検査済みの検出紙は病原ブドウ球菌が生きていることから必ず焼却処分をしブドウ球菌をまき散らさないようにすることが肝要である。

#### 簡易検出紙の使い方

- 1) 手を清潔にした後、サンパックのチャックをよじって口を開ける。
- 2) サンパック中の検出紙をパックの外側から押し上げ、ミシンの部分を外に出す。
- 3) ミシン線より上の部分を指でつまんで検出紙を引き出す。
- 4) ミシン線より下の部分を用意した検体中にそのまま浸漬し、すぐ取り出し、余分の試料液をおとす。（浸漬する場合、一気に試料液中に検出紙を漬けるのが「コツ」である）
- 5) ミシン線の部分がチャックより下になるようにサンパックに入れる。
- 6) 検出紙を袋の上から押さえて、ミシン線より上の部分を指で切り取る。

- 7) そのまま平らに置き、指で押しながら袋の中の空気を抜き検出紙と袋を密着させてチャックを閉じる。
- 8) 密封したのち、35℃～37℃の恒温器に入れて必ず24～48時間培養する。  
(24時間未満の培養では、集落が小さいことが多い)
- 9) 培養後、恒温器から取り出し袋の上から検出紙の表面及び内部の黒色集落を数える。
- 10) 室内の照明を消し暗くし、袋の上からUVランプを用いて長波長紫外線(366nm)を照射する。ライトブルーの蛍光を認めた場合に黄色ブドウ球菌の存在を表わす。  
ごく若干であるが表皮ブドウ球菌の中にフォスターゼ産生し、蛍光を呈するものがある。

#### 使用上の注意

- 1) 検出紙を操作する時は指先をよく洗った後、アルコール綿などでよく消毒すること。
- 2) 検出紙は完全に滅菌してあるため、ミシン線の上部以外には直接手を触れないこと。
- 3) 試料液中に検出紙を浸漬したら、試料の余液を自然によく落とすこと。
- 4) 元の袋に検出紙を入れて、指の腹で袋の上から軽く押さえるように撫でて袋と検出紙が密着するようにして中の空気を抜く。この場合、あまり強く押して検出紙中の試料が押し出されて袋の中に出ることのないように注意すること。
- 5) 培養後の黒色集落を数える場合、袋に検出紙を入れたまま、上からマジックインキ等で黒色集落の上に印をつけながらかぞえる。検出紙の内部にある集落をかぞえる場合は、光線にすかしながらかぞえると内部のものまでかぞえることができる。
- 6) UVランプ照射は室内を暗くしないと蛍光が見にくく、またごくまれに、酵母が集落を作る場合がありますが、集落の色は茶色で、黄色ブドウ球菌との鑑別は容易です。

## IV 検出紙の性能試験

本検出紙の特性は亜テルル酸塩に対し、ブドウ球菌は強い抵抗性を示し、さらに、これを還元して黒色化する性質を利用して黒色集落を形成させることと亜テルル酸カリウムと塩化リチウム及び7.5%塩化ナトリウムでブドウ球菌以外の細菌の発育を阻止することは従来の黄色ブドウ球菌の検出紙と同様であるが、特徴としては4 MUPを加え、黄色ブドウ球菌の産生するフォスファターゼによって4 MUPを加水分解し、遊離した4 MUFの蛍光物質をUVランプで照射することにより蛍光反応を示させ、ライトブルーの蛍光斑を提示させるところにある。

### A 基礎実験

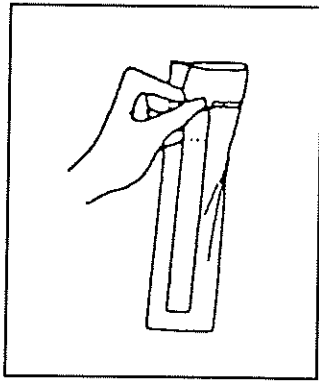
当社で保存する次の菌株を用いて、本検出紙の検出感度を測定した。

- |      |    |                            |          |
|------|----|----------------------------|----------|
| 供試菌株 | 1) | Staphylococcus aureus      | (Saと略す)  |
|      | 2) | Staphylococcus epidermidis | (Seと略す)  |
|      | 3) | Staphylococcus Spp         | (Sspと略す) |
|      | 4) | Escherichia coli           | (Ecと略す)  |
|      | 5) | Klebsiella aerogenes       | (Kaと略す)  |

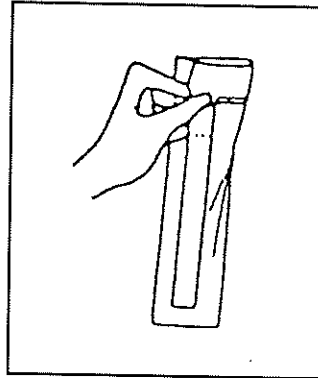
実験の方法は、まず供試菌株5菌種をトリプトソイブイヨンに接種し35℃24時間培養した菌液を用いて、滅菌生理食塩水で1ml中の菌量が10,100,1000及び1000個以上になるように階段希釈し、それぞれの希釈液を試験液としてこの中に検出紙を挿入した。検出紙の使用方法は前記の通りの操作でおこなった。これを35℃の恒温器で24時間と48時間培養し、各培養時間毎に取り出し初めに肉眼で検出紙上に形成された黒色斑を観察し菌数を測定した。その結果は表1に示すように、接種菌量ごく少ない場合は24時間培養では黒色斑は見られなかったが、48時間後では陽性を示すようになった。



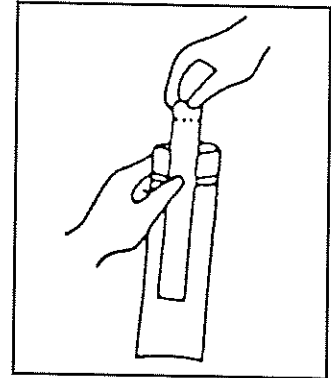
## ブドウ球菌検出用紙の使い方



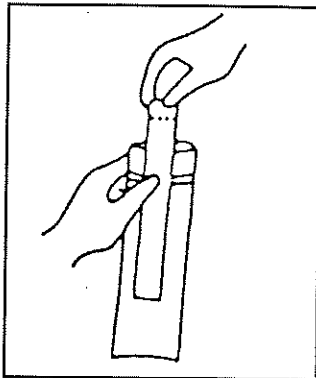
①サンパックのチャックをよじって口を開ける



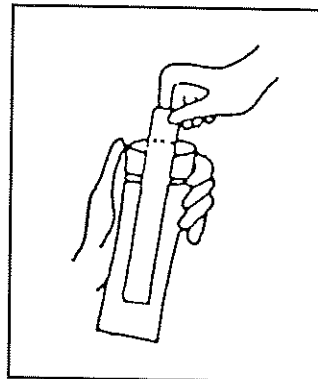
②中の検出紙へを押し上げミシンの部分を外に出す



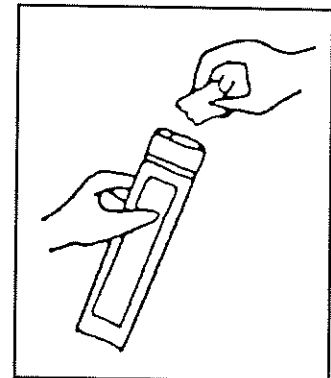
③ミシンの上の部分を指でつまんで検出紙を引き出す



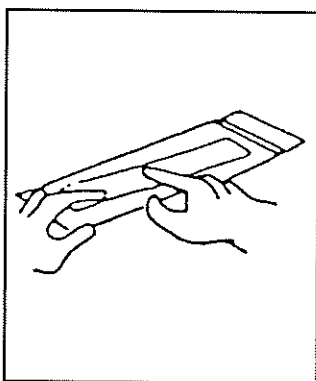
④ミシンより下の部分を検体に浸漬したらすぐ取り出し



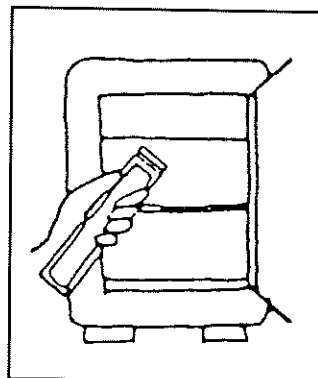
⑤ミシンの部分がチャックより下になるように入れる



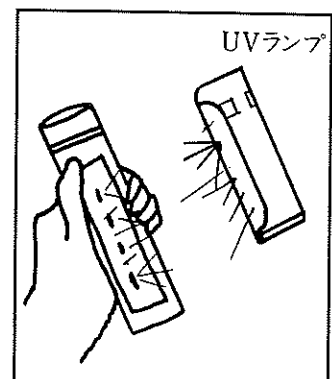
⑥検出紙袋の上から押さえて、ミシンの上の部分を指できりとる



⑦平らにおき指の腹でなぞるように空気をぬき検出紙と袋を密着させてチャックを閉じる



⑧密閉した検出紙を35～37℃の恒温器に入れ、24～28時間培養する



⑨室内を暗くし袋の上からUVランプを照射する

表1. 検出紙の黒色斑検出状況

	接 種 菌 量							
	1～10		10～100		100～1000		1000<	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Sa	-	+	+	++	+	++	++	+++
Se	-	-	-	-	-	+	+	++
Ssp	-	-	-	-	+	+	+	++
Ec	-	-	-	-	-	-	-	-
Ka	-	-	-	-	-	-	-	-

接種菌量が100個までの場合は24時間培養でも検出されるが48時間後のほうがスポット数もふえ黒色斑が明瞭となった。しかし、1000個または1000個以上の菌量になるとSe及びSspの菌種が24時間培養でも黒色斑を形成するようになり、48時間培養では若干菌数は少ないが明らかに黒色斑が見られるようになった。

表2 検出紙上の蛍光反応陽性斑の検出状況

	接 種 菌 量							
	1～10		10～100		100～1000		1000<	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Sa	-	+	+	++	+	++	++	+++
Se	-	-	-	-	-	-	-	-
Ssp	-	-	-	-	-	-	-	-
Ec	-	-	-	-	-	-	-	-
Ka	-	-	-	-	-	-	-	-

注   +++   : 黒色斑または蛍光陽性斑 100以上  
       ++    :           同上           30～100  
       +     :           同上           1～30  
       -     :           同上           0

次に同様の方法で実験した検出紙にUVランプを照射したところ結果は表2に示すように、肉眼で黒色斑を形成したSeおよびSspは蛍光を發せず、その他の菌種も勿論蛍光を發しなかった。そして黄色ブドウ球菌のみが蛍光を發した。しかし、黄色ブドウ球菌の中でも24時間培養では蛍光反応に強弱がみられるものがあるので、48時間培養するとその点の問題は解消され確実に強い蛍光を發するようになった。

## B. 応用実験

基礎実験につづいて、本検出紙の検出感度を実際に野外の試料を用いて評価した。

### 1. 検査試料の種類

食品類としては、米飯類 8件、食肉類 5件、卵焼き類 3件、サラダ類 6件及び惣菜類 8件の計 30検体を用い、また、ヒト由来試料として従業員の手指2件及び鼻前庭部2件のふきとり試料とうがい水 14件の計18件を用いた。

表3 食品からのブドウ球菌検出率の比較

	検出紙				MSEY	
	24時間		48時間		24時間	48時間
	黒色 集落	蛍光 集落	黒色 集落	蛍光 集落	卵黄反応 集落	卵黄反応 集落
米飯類 (8)	4	1	8	3	1	2
食肉類 (5)	5	5	5	5	5	5
卵焼き類 (3)	1	1	3	1	0	1
サラダ類 (6)	2	1	6	2	0	2
惣菜類 (8)	3	1	8	2	1	1
計 (30)	15	9	30	13	7	11
	(50%)	(30%)	(100%)	(43.3%)	(23%)	(37%)

## 2. 試料の調整

食品類は、各検体の10gをストマッカー用ビニル袋に無菌的に秤量し、これに滅菌生理食塩水90mlを加え約1分間ストマッキングして10倍希釈乳剤をつくり試料原液とした。

手指及び鼻前庭部のふきとり試料については、本社商品の滅菌綿棒を用いてそれぞれの部位をふきとり、これを滅菌生理食塩水20ml中でよく振出したものを試料原液とした。うがい水については、滅菌生理食塩水30mlを用いて約10秒間程度うがいをし、ストマッカービニル袋内に喀出したものを試料原液とした。

## 3. 実験方法

各試料原液について、本検出紙は本紙の使用方法に従って使用した。本検出紙の吸着量は約1mlである。また、対照として卵黄加マンニット食塩培地(MSEY培地)の平板に試料原液0.1mlを滴下し、滅菌コンラージ棒で万遍なく培地表面に塗布した。

培養時間は35℃で24時間と48時間とし、判定は各培養時間毎に本検出紙では黒色集落及びUVランプ照射下で蛍光を発した集落数を測定した。MSEY培地については白濁環の卵黄反応(リパーゼ反応)を呈した集落数を測定した。

## 4. 実験結果

食品類の10倍希釈試料についての検出率をみると表3に見られる結果となった。総体的には検出紙での肉眼的黒色集落検出数は24時間培養では15検体、48時間培養すると30検体中すべてのものに陽性がみられた。しかし、蛍光反応を示したものについてみると、24時間培養では9検体、48時間培養では13検体が陽性となり陽性数は約半数になった。この黒色集落検出の検体数とUVランプ照射による蛍光反応陽性を示した検体数との差は黒色集落の中には黄色ブドウ球菌のほかに表皮ブドウ球菌又はその他のブドウ球菌が検出されたため、蛍光反応を示した検体は黄色ブドウ球菌のみが蛍光を発したためであることが確認された。また、対照のMSEY培地による卵黄反応陽性を示したコロニーの検出された検体数は、24時間培養では7検体であったが、48

時間培養後では11検体と増えた。このMSEY培地での陽性数と検出紙の蛍光反応陽性数を比較すると両培養時間ともよく一致したが、常に検出紙の方が若干陽性数は多くみられた。この事は検出紙でも、生培地でもブドウ球菌の発育時間は48時間培養を行う方が良いことを示唆している。また、48時間培養後のMSEY培地と検出紙での陽性検体数の差で検出紙の方が高くでたのは接種された試料の量が検出紙では1ml、MSEY培地では0.1mlであることの量的差によって現れたものではないかと推察される。その量的差による検出感度の差を見たものが表4である。

表4 食品類の汚染菌量と培養時間による検出率の比較

培養時間 希釈倍数		24時間			48時間		
		$\times 10^{-1}$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-1}$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$
食 品 類 (30)	検出紙	15(9)	8	1(1)	13(13)	14(10)	5(3)
	MSEY	7	3	1	11	5	3

注：検出紙の数字は黒色斑の検出された検体数，（ ）内の数字は蛍光反応を示した検体数

MSEYの数字は卵黄反応をしめした検体数

この表から、検査試料の10倍希釈、100倍希釈および1000倍希釈について汚染菌量の差による検出感度を比較してみると、MSEY培地による卵黄反応陽性コロニーの検出された検体と、これに相当する検出紙の蛍光反応陽性の検体とは非常によく一致したが10倍希釈と100倍希釈では検出紙の方が陽性数は高く、1000倍希釈のものでは24時間および48時間培養とも全くよく一致した。このことは希釈倍数が低い場合には試料の接種量が検出紙の方が10倍多く接種されるため、その中に含まれる菌量の差によって現れたものと考えられる。また、検出紙での肉眼的黒色斑の検出数はMSEY培地での卵黄反応を示さなかったコロニー数を測定しなかったので比較することが出来なかつ

たが、どの検体についても黄色ブドウ球菌以外の球菌類に汚染されていたことは推測される。

次に、ヒト由来ブドウ球菌の汚染状態をみるため手指などのふきとり試料とうがい水について同様の検査を行ったところ表5のような結果になった。ヒト由来ブドウ球菌の検出状況は、鼻前庭及びうがい水からは検出紙では24時間培養でも全試料からブドウ球菌が検出され、48時間培養でも同様の結果となったが、手指については汚染菌量が微量のためか24時間培養では検出されなかったものが48時間培養で全試料から検出されるようになった。この結果は生培地のMSEYでも同様であったが、ただ、24時間培養では検出紙の検出率に比べMSEYでは検出率が低かった。しかし、48時間培養では検出紙とMSEYの結果は全く一致した。この事から検出紙の性能評価はMSEYに比較して全く遜色ないものと考えられた。

次に、このヒト由来試料についての汚染菌量差による検出感度をみると表6にみられるように、希釈倍数を高くして汚染菌量が低い場合でもMSEY培地での卵黄反応陽性検出率よりも検出紙の検出率の方が上回る結果となり、また24時間培養よりも48時間培養の方が両者とも検出率は高く、MSEY培地より検出率が優れていることがわかった。この事から汚染菌量が少量になっても検出紙の感度は低下しないことがわかった。

表5 ヒト由来ブドウ球菌検出率の比較

	検出紙				MSEY	
	24時間		48時間		24時間	48時間
	黒色 集落	蛍光 集落	黒色 集落	蛍光 集落	卵黄反応 集落	卵黄反応 集落
手 指 (2)	0	0	2	2	0	2
鼻前庭 (2)	2	2	2	2	2	2
うがい水 (14)	14	14	14	14	10	14
計 (18)	16	16	18	18	12	18
	(89%)	(89%)	(100%)	(100%)	(67%)	(100%)

表6 ヒト由来試料の汚染菌量と培養時間による検出率の比較

培養時間		24時間			48時間		
		×原液	×10 <sup>-1</sup>	×10 <sup>-2</sup>	原液	×10 <sup>-1</sup>	×10 <sup>-2</sup>
試 (18) 料	検出紙	16(16)	13(13)	8(8)	18(18)	18(18)	16(16)
	MSEY	12	10	6	18	16	14

注：表4と同じ

## V 黄色ブドウ球菌簡易検出紙 (4MUP-Type) の評価とまとめ

ブドウ球菌はマイクロコッカス科に属すグラム陽性菌で現在多くの種類 (23菌種・4亜種) に分類されているが、その中でヒトや動物の化膿性疾患や食中毒の原因となるのは主に黄色ブドウ球菌である。これらのブドウ球菌は自然界に広く分布し、健康なヒトの皮膚や鼻腔粘膜、糞便、土壌、下水などからも多く検出されるので食品を汚染する機会も非常に多い。従って、食品や調理人の皮膚などを検査すると黄色ブドウ球菌以外の球菌も必ず検出される。黄色ブドウ球菌を検査するときは実験室内では種々のブドウ球菌選択用生培地に卵黄を加え、ブドウ球菌の産生するリパーゼが反応する卵黄反応 (リパーゼ反応とレシトビテリン反応の総称) を鑑別の指標として黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌や他のマイクロコッカスと区別することを容易にしている。しかし、簡易検出紙では技術的に卵黄を濾紙に吸着させ乾燥することは困難であるため、検出紙上では卵黄反応を取り入れることができなかった。そのため、ブドウ球菌の検出紙については黄色ブドウ球菌のみを発育させ、それ以外のブドウ球菌を抑制するため培地組成の改変を行って黄色ブドウ球菌のみを発育させようと試みてきたが、MSEY培地による結果との一致性が低く信頼性を損なう例がしばしばみられてきた。

今回は、従来の発想とは異なり黄色ブドウ球菌の産生するフォスファターゼ酵素を利用して発光基質である 4-Methylumbelliferyl Phosphateを加水

分解して、遊離した 4-Methylumbelliferone を長波長紫外線で発光させる方法を取り入れた。この事により、MSEY培地での卵黄反応を示す黄色ブドウ球菌検出率と検出紙で蛍光反応のみられた検出率とは非常によく一致することがみられた。

また、MSEY培地より検出紙の方が検出率が高くするのはMSEY培地では試料接種量が0.1mlであるのに対し、検出紙では試料の約1mlが吸着されるため、汚染菌量が微量の場合にはMSEY培地では試料中に100個以上がなければ検出されないのに対し、検出紙の場合は10個以上あれば検出可能であることの差によるものと考えられる。また、食品検査の場合は検査結果を1日でも早く知りたいのが実情である。本検出紙の場合でも24時間培養より48時間培養の方が勿論正確な結果が得られるのは当然であるが、24時間培養でも汚染菌量が30個以上あれば蛍光反応がみられるので1次スクリーニングとして、まず、判定をつけ汚染食品を早く対処し、さらに、48時間培養後に最終判定をすれば確実である。

以上のように、簡易検出紙でも容易に黄色ブドウ球菌とそれ以外の球菌類とを紛らわしくなく判定することができるようになったので、食品工場の現場検査や食品検査にとりいれ、黄色ブドウ球菌の汚染を早く探知し食中毒予防に役立てていただきたいと願うものである。