



ブドウ球菌エンテロトキシンとその検査法

国際学院埼玉短期大学 食物栄養科

五十嵐英夫

1. はじめに

近年、「食の安全性」の確保を目標として、「農場から食卓まで」を合い言葉に、食に係わる様々な環境が大きく変貌しようとしている。その重要な改革の1つに、「HACCP(Hazard Analysis Critical Control Point:危害分析・重要管理点)システムによる総合衛生管理製造過程」の導入があった。最初に承認された業種は、牛乳や乳製品の製造施設であった。その牛乳や乳製品の製造施設が、わが国におけるHACCPの導入の牽引的な働きを担ってきた。その様な施設で、誰もが予想もし得なかった過去最大級の大事件が、2000年6月末から7月上旬に起こった。その雪印食中毒事件は、ブドウ球菌食中毒であった。この事件の発生を契機に、食品関係業界では急にエンテロトキシンに注目するようになった。

そこでこの様な機会に、黄色ブドウ球菌をもう一度見直し、ブドウ球菌食中毒の発生状況、エンテロトキシン検出法の変遷、エンテロトキシン検査法の応用などについて概要を記述する。

2. 発生状況

わが国の過去25年間のブドウ球菌食中毒事例数および患者数を厚生省大臣官房統計情報部編「食中毒統計」からみると、ブドウ球菌食中毒事例は1984年までは年間200事例以上の発生がみられていた。しかし、1985年以降経年的に漸次減少し、1985年には163事例、1991年には95事例、1995年には60事例となり、年間の事例数は劇的に減少している。ブドウ球菌食中毒の全食中毒事例に占める割合は、1984年以前25~35%であったが、1985年以降25%以下となり漸次減少傾向を示し、1995年には8.6%、1999年には2.6%まで減少した。

一方、ブドウ球菌食中毒患者数は食中毒の規模によって異なるが、1985年以前、ブドウ球菌食中毒患者数は5,000名以上であった。しかし、1986年以降はブドウ球菌食中毒事例の減少と同様に患者数も経年的に漸次減少傾向がみられている。

今後も雪印食中毒事件のように、一寸した不注意から想像もできない大事件に発展する可能性があることを忘れてはならない。

3. ブドウ球菌食中毒由来菌株のエンテロトキシン型

1986~1995年の10年間に、東京都で発生したブドウ球菌食中毒99事例により各事例1株を選び、その99菌株についてエンテロトキシン型別を実施した。

ブドウ球菌食中毒由来黄色ブドウ球菌99株中エンテロトキシンA産生が50株(51%)、A+B産生が23株(23%)、A+D産生が7株(7%)B産生が4株、D産生が3株、B+C産生が1株、A+C+TSST-1産生が1株、その他であった。エンテロトキシンA型単独産生や他の型との複合産生を加えると、エンテロトキシンA型産生黄色ブドウ球菌は全体の82%であった。

この様に、ブドウ球菌食中毒の原因毒素はエンテロトキシンAによるものが圧倒的に多い。この傾向は欧米においても同様である。

4. 主な原因食品

1980年～1994年の東京都衛生局生活環境部食品保健課編「東京都の食中毒概要」からブドウ球菌食中毒の原因食品を3年毎にまとめてみた。

1980年～1982年の3年間は、ブドウ球菌食中毒の原因食品の約50%は「にぎりめし」であった。この約半数は家庭で調製されていた。その後、年毎に全原因食品に占める「にぎりめし」の割合は減少し、1992年～1994年の3年間の全原因食品に占める「にぎりめし」の割合は、約24%であった。これらの「にぎりめし」の多くは、家庭で調製されたものである。

「にぎりめし」による本菌食中毒が減少した理由は、「にぎりめし」製造やラッピングの機械化および自動化が進み、調理者の手指や器具・器材からの黄色ブドウ球菌汚染を遮断することに成功したためではないかと考えている。

5. エンテロトキシン

ブドウ球菌エンテロトキシンの物理化学的性状および遺伝学的性状を表1に示した。

エンテロトキシンは分子量27000前後の単純蛋白質で、分子内に1個の-S-S-結合を有し、安定な構造である。

抗原性の違いによりA～E型の5種類に分けられている。C型は等電点の違いによりC₁、C₂、C₃の3型に分けられているが、免疫学的には同一である。エンテロトキシンA～E型以外に、F型(TSST-1)、G型、H型、I型、J型、K型、L型が追加されている。しかし、前記したようにブドウ球菌食中毒事例の80～90%は、エンテロトキシンAまたはその複合体によるものである。このような傾向はわが国だけの現象ではなく、米国でも、英国でもみられている。また、新たに追加されたエンテロトキシンの検出キットは、まだ市販されておらず、事例報告もほとんど見られない。

6. 検出法

エンテロトキシンの特徴である嘔吐作用の検査には、サル、ネコ、スナクなどの実験動物が使用される。マウスやウサギなどの実験動物では嘔吐機能がないので使用できない。

実際、エンテロトキシン検査には、エンテロトキシンに対する抗体を用いる血清学的な手法が利用されている。エンテロトキシン研究は毒素を高純度に精製し、それでウサギを免疫して特異性の高い抗血清を作製し、それを用いて微量の毒素を検出する方法の開発から始まった、その結果として、現在のような検出感度の高いキットが市販されるようになった。

高価な器具・器材を用いなくて、安価で、簡易に、そして迅速に、誰でも、何処でも、何時でもエンテロトキシンを検出できる方法の開発を目指して、現在の逆受身ラテックス凝集反応(RPLA法)が完成した、その後、酵素抗体法に関する技術開発の発展により、エンテロトキシンの迅速な検査を可能とするキットが開発され、市販されている。わが国で入手可能なキットの種類を表2に示した。

表に示したエンテロトキシン検査キットの検出感度は各社でそれぞれ表示されており、0.2～2ng/mLである。しかし、どのメーカーのキットであっても、検出限界の毒素量を正確に検出することは困難である。そのため、検出感度内まで毒素濃度を高める必要があり、濃縮操作を行うことになる。雪印ブドウ球菌食中毒事件の毒素検査においては、検体の毒素濃度が非常に低かったために、様々な濃縮法が検討され、大変苦労してエンテロトキシンを検出したと伺っている。

エンテロトキシンを検出するための所要時間は、各社のキットで異なる。バイダスSETが試料調製を含めて80分と表示されているが、この方法を実施するためには高価な自動免疫蛍光測定装置が必要である。その他の酵素抗体法(ELISA)によるキットは3～4時間である。SET-RPLA「生研」はラテックス凝集反応で、約18時間が必要である。

操作面ではバイダスSETは自動測定であり、試料調製と試料注入以外は全て自動化されており、最も簡単である。ELISAは試料、試薬の滴下や頻回の洗浄など煩雑である。一方、ラテックス凝集反応は試料、試薬の滴下後、判定まで放置するので操作は簡単である。

食品からのエンテロトキシン検出は、各社キット添付の説明書に従って試料を調製して実施する。にぎりめしや弁当などのブドウ球菌食中毒事件では、食品1g中に0.2~1.28 μ gのエンテロトキシンが検出される場合が多い。このような検査では、現在市販されているエンテロトキシン検査キットの検出感度で十分であった。

しかし、雪印ブドウ球菌食中毒事件の場合は、検査材料が牛乳などの乳製品で、黄色ブドウ球菌が検出されず、さらに含有するエンテロトキシン濃度が市販検査キットの検出感度以下であった。そのため試料の濃縮やその後の除蛋白などの前処理が必要となり、毒素の検出に時間を費やした。今回の事件はこれまで予想もしなかった乳製品が原因食品であったことをも含めて、今後のブドウ球菌食中毒の検査のあり方にも大きな課題を残した。

7. 食品の品質保証への応用

食品の品質保証へのエンテロトキシン検査の応用とは、種々の市販食品、弁当等や食品工場での原料、半製品、製品等を対象としてエンテロトキシンを検索し、エンテロトキシン陰性であることを証明することである。それではエンテロトキシンが陰性であるという場合に、以下のようなことが問題である。

検査に用いたエンテロトキシン検査法の検出感度はどうか、またエンテロトキシンを検査する場合、検査試料を何グラム使用するかなどが大変重要である。もし、エンテロトキシンを検査して、エンテロトキシンが陰性である場合、この検体に黄色ブドウ球菌の汚染が全く無いのか、あるいは存在するかと言うことも大変問題になる。菌数は少ないが黄色ブドウ球菌が汚染している食品の場合は、エンテロトキシン検査後、市販され、喫食されるまで、それらの食品がどのような環境に、どれだけの時間保存されるのかというようなことが問題となる。これらのことが解明されなければ、エンテロトキシンが陰性でも、その食品を安全であるという品質保証はできない。

さらに、ヒトに対して、ブドウ球菌食中毒症状を起こすのに、どれだけのエンテロトキシン量が必要かということである。ヒトに対してブドウ球菌食中毒症状を起こす、正確なエンテロトキシン量は明らかでない。雪印ブドウ球菌食中毒事件の原因乳製品1mL中のエンテロトキシン量は0.4~0.8ngと報道されている。この量はこれまで報告されている発症量に比べてきわめて少ない。そのためエンテロトキシンが陰性であると言うためには、エンテロトキシンの検査法の検出感度が0.1ng/mL以下でなければならないが、現在市販されているエンテロトキシン検出用キットのなかには、そのような高感度のキットはない。

上述したことを理解したうえで、エンテロトキシン検査を食品製造業に利用しようとする場合には、エンテロトキシン検出用キットの価格を考慮して、原料、製造工程、最終製品などのどの段階で利用するのが、最も効率的で、かつ効果的かを検討する必要があるだろう。

表1 ブドウ球菌エンテロトキシンの物理化学的及び遺伝学的性状

エンテロトキシン型	分子量	アミノ酸残基数	等電点 (pI)	N末端アミノ酸	構造遺伝子*1
A	27078	233+24	7.3	Ser	C or B
B	28336	239+27	8.6	Glu	C or P
C ₁	27946	239+27	8.6	Glu	C or P
C ₂	27589	239+27	7.0	Glu	C
C ₃	27563	239+27	8.1	Glu	C
D	26360	228+30	7.4	Ser	P
E	26425	230+27	7.0	Ser	B(?)
(F:TSST-1)*2	22049	194+40	7.2	Ser	C
G	27043	233+25	?	Glu	C or P
H	25145	194+24	5.65	Glu	?
I	24928	218+24	?	Glu	C or P

*1 B:バクテリオファージ C:クロモソール P:プラスミド

*2 TSST:Toxic Shock Syndrome Toxin

表2 市販ブドウ球菌エンテロトキシン検査キット

商品名	取り扱い会社	検出感度	所要時間
SET-RPLA「生研」	デンカ生研(株)	1~2ng/mL	18~20時間
バイダスSET	日本ビオメリュー(株)	0.25~1ng/g	80分
黄色ブドウ球菌毒素 ELISA kit SETVIA48 (TECRA製)	セティカンパニーリミテッド	1ng/mL	約4時間
黄色ブドウ球菌毒素 ELISA kit R4101 (R-Biopharm製)	同上	1ng/mL	約4時間
トランジアプレートブドウ球菌エンテロトキシン (Diffchamb製)	メルク・ジャパン(株)	0.25~1ng/g	約90分
RIDAスクリーン黄色ブドウ球菌エンテロトキシン	アズマックス(株)	0.2~0.7ng/mL	約3.5時間