

平成 30 年度・衛生研究所研究費事業報告

食品からの溶血性レンサ球菌の効率的な分離に関する検討

(計画年度：平成 30 年度)

研究代表者

食品微生物担当 門脇奈津子*

共同研究者

食品微生物担当 瀬川由加里 佐藤実佳 中川佳子 大塚佳代子
副所長兼食品微生物検査室長 石井里枝

はじめに

溶血性レンサ球菌（以下、溶レン菌）は *Streptococcus pyogenes* を主とし、菌の侵入部位によってさまざまな臨床症状を引き起こす。食中毒の病因物質としては A 群溶レン菌及び G 群溶レン菌が報告されている。菌検出法は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルには咽頭ぬぐい液等の臨床検体からの検出法が記載されているが、食品からの確立された検出法は当検出マニュアルや他の報告等にも記載されていない。そこで今回、検出マニュアル等をもとに、食品からの溶レン菌分離方法について検討を行った。

材料、方法及び結果

1 検討する増菌培地及び分離平板培地の選択

(1) 増菌培地の発育試験：ヒト由来の A 群溶レン菌（菌株 SP1）を供試し①Pike 培地、②Q（キノリン）培地、③EUB 培地、④SEB 培地における発育状態を調べた。EUB 培地では全く増殖がみられず他の 3 培地は増殖可能であったため、以降の試験に使用することとした。なお 3 培地間では増菌数に差がみられ、Pike 培地、SEB 培地、Q 培地の順で菌数が多かった。

(2) 分離平板培地の発育試験：①CNA 血液寒天培地（以下、CNA 培地）、②N-0 培地両培地とも A 群溶レン菌（SP1）の発育は良好であり差はみられなかったため、以降の試験で両培地を使用することとした。

(3) 夾雑菌の発育試験：増菌培地及び分離平板培地における夾雑菌の発育の有無を確認した。想定夾雑菌として *Klebsiella* 等 10 菌種を使用した。増菌培地に菌液を添加し培養後、TSA 培地にて発育の有無を確認した。また、菌液を分離平板培地に塗抹し、発育の有無を確認した。結果は、供試した 10 菌種すべて 3 種類の増菌培地で発育した。しかし SEB 培地は現在製造中止であり、SEB 培地が他の培地に比べて夾雑菌の抑制に優れている等の利点はみられなかったため、食品添加試験は Pike 培地及び Q 培地について比較検討することとした。分離平板培地は、2 培地間で発育の有無に差がみられ、N-0 培地の方が CNA 培地より夾雑菌の抑制に優れていた。

2 SYBR Green リアルタイム PCR による溶レン菌遺伝子スクリーニング検出法の検討

既報告のプライマーをもとに、リアルタイム PCR による A 群及び G 群溶レン菌特異遺伝子をターゲットとした検出を行ったところ、遺伝子検出が可能であった。

3 食品添加試験

(1) 材料及び方法：A 群溶レン菌（菌株 SP1）及び G 群溶レン（菌株 G1）を供試した。ナムル及び卵サラダに菌液を数十 cfu/g 添加し、増菌培地（Pike 培地又は Q 培地）を加え培養した。増菌培養液をアルカリ熱抽出し、SYBR Green リアルタイム PCR を行い、Cp 値を求めた。また、増菌培養液を分離平板培地（CNA 培地又は N-0 培地）に塗抹培養し、発育したコロニーが溶レン菌であるかの確認を SYBR Green リアルタイム PCR にて行った。

(2) 結果：増菌培養液の Cp 値は、2 菌種及びいずれの食品も Pike 培地の方が Q 培地より低い値であった。分離平板培地については、ナムルにおいては CNA 培地では溶レン菌以外の溶血コロニーが多数発育し 2 菌種とも分離ができなかったが、N-0 培地ではほぼ溶レン菌のみが発育し分離が可能であった。卵サラダにおいてはいずれの分離平板培地とも溶レン菌以外の溶血コロニーの発育がみられず、培地間の差はなかった。

考察

食品からの溶レン菌の分離のため、増菌培地 4 種類及び分離平板培地 2 種類について検討を行ったところ、Pike 培地にて増菌培養後 N-0 培地に塗抹する方法がよいと考えられた。また今回の検討では、1g あたり数十個の汚染菌数でも菌分離が可能であった。また、食中毒の原因食品究明検査時には、分離培養と並行して SYBR Green リアルタイム PCR 検査を行い、溶レン菌特異遺伝子スクリーニング陽性となった検体について特化し釣菌数を増やすこと等により、効率的に菌分離ができると考えられた。

* 現 食肉衛生検査センター