

「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素直接試験法の研究」

分担研究報告書

ニワトリ IgY 抗体を用いてのブドウ球菌エンテロトキシン定量法の開発

分担研究者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

協力研究者 鎌田 洋一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

要旨：ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) を食品や培養菌液から検出するためのサンドイッチ ELISA には、同菌が産生するプロテイン A が IgG 抗体と結合するため強い非特異反応が起こる。これを解消するため、プロテイン A には結合しない IgY 抗体の利用を検討した。SEA および SEIO について検討を加えた。IgY 抗体を用いてのサンドイッチ ELISA は、両 SE に対して、比較的良好的信頼性を示す検量線が得られた。また、10～1,000 ng/ml と広い検出範囲を示した。一方、検出感度が 1～10 ng/ml と低かった。SEA と SEIO 間では交差反応は見られなかった。以上から、SE の検出に関して、IgY 抗体は毒素を認識する高い特異性は認められるので、検出感度を向上させることにより、IgY 抗体をサンドイッチ ELISA に適応できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、健康なヒトの手指、鼻腔、咽喉、腸管内などに分布し、各種動物 (食肉産生動物など) も保菌している。食品の製造・調理環境などからも比較的高率に分離され、食中毒起因菌として食品衛生上重要である¹⁾。わが国における食中毒発生病数は 500～3,000 件ほどで、2.5～4.5 万人程度の患者が出ている。このうち、微生物生

食中毒は事件数の約 90%、患者数でも約 90%を占める¹⁾。その中で、ブドウ球菌食中毒の発生病数は年間約 50～100 件前後、患者数 1,000～3,000 人で、食品衛生の発展に伴い年々減少傾向にある。しかし、発生病数ではカンピロバクター、ノロウイルス、サルモネラ、腸炎ピブリオに次いで 5 番目、患者数でもサルモネラ、腸炎ピブリオ、病原性大腸菌、ノロウイルスに次いで 5 番目であり、依然と重要な食中毒である¹⁾。

黄色ブドウ球菌は直径0.8~1 μ mの球状のグラム陽性菌で、菌体がブドウの房状に配列している。菌の増殖温度域は7~50 $^{\circ}$ C、至適増殖温度は35~37 $^{\circ}$ C、水分活性の下限は0.86である。増殖pH域は4.0~10.0、増殖の至適pHは6.5~7.5である。黄色ブドウ球菌は、食品中で増殖する際にエンテロトキシンを産生し、これが食品とともに摂取されて嘔吐を引き起こす²⁾。

ブドウ球菌エンテロトキシン Staphylococcal enterotoxin (SE) は、分子量約28,000のタンパク質で、毒素産生の至適pHは6.8~7.2にあり、pH5.0以下または9.0以上では産生されない。毒素産生の温度域は10~48 $^{\circ}$ C(至適40~45 $^{\circ}$ C)であり、食塩10%以上では著しく抑制される。毒素は耐熱性が強く、120 $^{\circ}$ C、20分の加熱でも完全に破壊されない²⁾。

SEには抗原性の異なる複数の型が存在することが報告されており、1963年に抗原性が確認された順にSEA、SEB、SEC~とアルファベット順に命名することが提唱された。この時点でSEAおよびSEBが存在することが明らかにされており、1965年にはSEC、1967年にSED、1971年にSEEが報告された。さらに、SECには抗原性は同一だが、物理化学的性状が異なる亜型(SEC1、SEC2、SEC3)が存在することも明らかになっている³⁾。現在までにSEG、SHE、SEI、SEJ、SEK、SEL、SEM、SEN、SEO、SEP、SEQ、SER、SEUの存在が報告されており^{4~13)}、SEは極めて多様性のある毒素群であることがわかる。2004年に International Nomenclature Committee for Staphylococcal Super

antigen (INCSS) が提唱した命名規約によると¹⁴⁾、SEと命名するには、サルへの経口投与による嘔吐活性の証明が義務付けられている。構造上SEと近縁と考えられるスーパー抗原であっても、サルでの嘔吐実験で嘔吐活性陰性のもの、あるいはまだサルでの嘔吐実験が行われていないものについては"staphylococcal enterotoxin-like (SEI) ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素"と命名され、サルにおける嘔吐活性が証明された時点で、likeの"l"をはずし、SEとする。多くの新型SEの嘔吐活性は十分に調べられておらず、これらの新型SEの食中毒に対する危害評価は、いまだ十分になされていないため、新型SEの嘔吐活性の解析は急務である。また、厚生労働行政の側面からは、新型SEを効率よく特異的に検出し定量する方法の開発が急務となる。

ブドウ球菌検査としては、食品およびその原材料、製造・調理環境などから分離された黄色ブドウ球菌の食中毒原性を調べるため、SE産生性・型別試験と、食品(原料)中のSE量を調べるための定量試験がある。後者には、感作ラテックス粒子を用いる逆受身ラテックス凝集反応と、標識抗体を用いる Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 法の2つの方法がある¹⁾。ELISA法に用いられる抗体としては、免疫グロブリンG(以下IgG)があるが、IgG抗体は黄色ブドウ球菌の表層抗原であるプロテインAと結合する性質を持つ¹⁵⁾。1分子のプロテインAは、IgG抗体6分子と結合する能力があることがわかっている。IgG抗体を用いてELISAを構築した場合、特に、サンドイッチ

ELISA を構築した場合、プレートに吸着させた抗 SE 抗体にプロテイン A が結合し、SE (検体) 添加後に加える、抗 SE IgG 抗体が、SE と結合せず、プロテイン A に結合してしまい、SE が存在しないのに陽性反応を誘起してしまう危険性がある (図 1)。

鳥類は機能的に哺乳類の IgG 抗体に相当する主要抗体 IgY 抗体を産生する。IgY 抗体の特徴としては、哺乳類の補体を活性化しない、哺乳類 Fc レセプターと結合しない、哺乳類 IgG 抗体と交差反応しない、プロテイン A および G と結合しない、IgY が選択的に卵黄に移行する、モノクローナル抗体の生成が可能である、などがあげられる。IgY 抗体はブドウ球菌が産生するプロテイン A とは結合しないため、上述した IgG 抗体に置き換えると、特異性の高い SE 検出用サンドイッチ ELISA が構築できる可能性がある (図 2)。

本研究では、食品から SE を喫食前に特異性高く試験する方法を開発するために、ニワトリ IgY 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法の確立を検討した。

B. 実験方法

1. SE

組換え SEA および SE10 は、岩手大学農学部の高茂克彦博士より供与された。タンパク質濃度 1 mg/ml で、リン酸緩衝生理的食塩水 (以下 PBS) 中に溶解して実験に供した。

2. SE に対する IgY 抗体

ニワトリ免疫血清の作製は、株式会社医学生物研究所 (東京) に依頼した。ニワトリ (WL-M/O) に、1 mg/ml の SE ある

いは SE10 溶液 0.1 ml と、フロイントアジュバント (SIGMA) 0.1 ml でエマルジョンにした混合物を、10 週齢時より 1 週間間隔で 4 回腹腔注射した。5 回目はアジュバントを用いず、抗原 0.1 ml を鶏翼下静脈に注射した。最終免疫の 1 週間後に、翼下静脈から採血し、抗血清を分離した。

ニワトリ抗血清 1 ml に対し、71 mg の割合で硫酸ナトリウム (Wako) を加え、4℃、15,000×g、20 min 遠心分離した。得た上清を 0.45 μm のフィルターに通し、不溶物を除いたものを Thiophilic Adsorbent Columns (Pierce Thiophilic Adsorption Kit; Thermo) に全量添加した。カラムを洗浄後、キット中の溶出液をカラム内に添加した。溶出液を 3 ml ずつ試験管に分画し、Nano Drop (LMS) を用いて波長 280 nm における吸光度を測定、吸光度 0.1 以上のフラクションを回収した。PBS 中で 4℃、一晚透析を行い、精製 IgY 抗体として使用時まで -30℃ で保存した。IgY 抗体のタンパク濃度は BCA 法で Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC 社) を用いて測定した。IgY 抗体の純度は SDS-PAGE で確認した。

3. ELISA

3-1. ビオチン標識 IgY 抗体のビオチン標識

IgY 抗体を、Ultra Centrifugal Filter Devices (MILLIPORE 社) で、1 mg/ml になるように濃縮した。NHS-LC-ビオチン (Pierce 社) を Diethyl sulfoxide (DMSO, Wako) に溶かし、ビオチン試薬とした。IgY 抗体にビオチン試薬を加え (最終添加濃度

は $\mu\text{g/ml}$)、室温で30分間反応させた。反応液を4°CのPBS中で一晩透析した。回収した反応物と同容量のグリセリンを加え-30°Cで保存した。

3-2. サンドイッチ ELISA プロトコール

ELISAのプレートはNunc社のものを用いた。以下、吸着用IgY抗体の濃度、ブロッキング剤、毒素や抗体の希釈液、ビオチン標識IgY抗体濃度、Streptoavidin-HRP (Pierce社)の希釈濃度について検討した。各反応は室温で1時間行い、その後5回ウェルを洗浄し、次の試薬を反応させた。発色にはTMB Substrate Reagent (BD Biosciences社)を用いた。2N硫酸添加によって発色を停止させ、Trister (LB 941, BERTHOLD TECHNOLOGIES)を用い、波長450 nmにおける吸光度を測定した。

3-3. 検量線と交差反応

上述のELISAで得たSEAおよびSEIOの吸光値について、EXCEL (Windows)を用いて、一次線形近似解析により検量線を得た。ブランクとエンテロトキシン添加wellの吸光値との間でt検定を行い、有意な最少検出量を求めた。

SEAとSEIOとの間で、IgY抗体が交差反応を示すかどうかを検定した。すなわち、抗SEIOを固相化したwellにSEAを加えた。SEAの添加濃度は、1、10、100および1,000 ng/mlとした。

C. 結果および考察

1. SEおよびSEIOに対するIgY抗体の精製

ニワトリ免疫血清からThiophilic Adsorbent Columnsを用いたアフィニテ

ィークロマトグラフィーでIgY抗体を精製した。図にクロマトグラフを示す。波長280 nmにおける吸光度が0.1以上のフラクション(図の中の \leftarrow で示す)を回収した。この回収物のタンパク濃度をBCA法で測定したところ、抗SEA IgY抗体は419 $\mu\text{g/ml}$ 、抗SEIO IgY抗体は1,012 $\mu\text{g/ml}$ であった。抗SEA IgY抗体は、ニワトリ血清0.98 mlから6.3 mg、抗SEIO IgY抗体は、ニワトリ血清0.95 mlから9.1 mgを得られた。抗SEIO IgY抗体についてSDS-PAGEを行った。1レーンあたり0.5 μg のタンパク質量で分析したところ、250 kDaの位置に一本のバンドが見られた。ほかにバンドは確認されず、精製したIgY抗体は高い純度をもつことが確認された(図)。

2. 条件設定

各反応試薬について、その種類と使用濃度(希釈率)を検討し、以下の結果を得た。すなわち、希釈液およびブロッキング剤には10%スキムミルク、吸着用IgY抗体濃度は10 $\mu\text{g/ml}$ 、検出用ビオチン標識IgY抗体濃度は10 $\mu\text{g/ml}$ とした。

Streptoavidin-HRPの希釈倍率はSEAの検出の場合は12,500倍、SEIOについては8,000倍とした。

3. 検出感度と検量線

1測定点あたり4 wellを用い、0-1,000 ng/mlまでのSEAあるいはSEIOを反応させ、各々の吸光値から検量線を作成した。0 ng/mlの値と有意差があるかどうかについてt検定を行った(表)。SEAおよびSEIOともに、10 ng/mlで有意差が認められた($P < 0.05$)。10-1000 ng/mlまで、SEA

については $r^2=0.9673$ の検量線が得られた (図5)。一方、SEIO については $r^2=0.940$ の検量線が得られた (図)。

以上の結果は、ニワトリ IgY 抗体を用いてのサンドイッチ ELISA は、広い範囲の SEA あるいは SEIO を測定できることを示している。現在、SE 検査には、ラテックス凝集反応キット (デンカ生検) が採用されている。このキットの検出感度は 1-2 ng/ml を保証している。このことは、本研究で構築させた IgY 抗体による ELISA では検出感度については不十分であることを示している。

4. SEA と SEIO 間の交差性

吸着抗体に SEIO IgY 抗体を用い、0 から 1,000 ng/ml の SEA を反応させた。その結果、SEA 濃度が 0-100 ng/ml までは、抗 SEIO IgY 抗体に対して全く交差反応性を示さなかった。SEA 濃度が 1,000 ng/ml の時には抗 SEIO IgY 抗体に対して 8.6 % の交差反応性を示した ()。

以上の結果は、非常な高濃度でない限り、ニワトリ IgY 抗体に関して、SEA と SEIO 間で交差反応性は無視してよいことを示している。

図 8 に、本検討結果から推奨される IgY 抗体利用の SE 検査用サンドイッチ ELISA のプロトコルを示す。本プロトコルは、標準精製 SEA あるいは SEIO を用いているため、ブドウ球菌培養液や食品からの SE 検出の基礎となる方法と考える。

D. 結論

ブドウ球菌が産生するプロテイン A は IgG 抗体と結合するために、SE を効率良く

検出するサンドイッチ ELISA を組み立てるには制限がある。SE を検出する際、ブドウ球菌が産生するプロテイン A に結合しないという IgY 抗体の特性の利用を鑑み、SE の試験法の確立に同抗体を応用した。具体的には SEA および SEIO について検討を加えた。両 SE に対して、10-1,000 ng/ml と広い検出範囲を示したが、検出感度は低いという結論をえた。また、SEA と SEIO 間では交差反応が見られたなかった。以上から、SE の検出に関して IgY 抗体は、検出感度の改善によって、良好なものとして利用できる可能性が認められた。今後は、IgY 抗体の更なる精製やモノクローナル抗体の利用などを通じ、感度の改善に取り組む必要がある。

E. 文献

- 1) 品川邦汎, 8 黄色ブドウ球菌 食品衛生検査指針, 厚生労働省, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
- 2) 山中英明, 藤井建夫, 塩見一雄, 第 3 章 微生物性食中毒 食品衛生学, 恒星社 恒星閣, 東京 (2007)
- 3) Bergdoll, M.S. : *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens (Doyle, M.P. ed.), pp. 463-523, Marcel Dekker, Inc., New York, NY (1989)
- 4) Fitzgerald J.K., Monday S.R., Foster T.J., Bohach G.A., Hartigan P.J., Meaney W.J., and Smyth C.J. : Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding

- multiple superantigens. *J Bacteriol.* 183:63-70 (2001)
- 5) Jarraud S., Peyrat M.A., Lim A., Tristan A., Bes M., Mougel C., Etienne J., Vandenesch F., Bonneville M., and Lina G. : *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 166:669-677 (2001)
 - 6) Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H., and Hiramatsu K.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357:1225-1240 (2001)
 - 7) Letertre C., Perelle S., Dilasser F., and Fach P.: Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl. Microbiol.* 95:38-43 (2003)
 - 8) Munson S.H., Tremaine M.T., Beteley M.J., and Welch R.A.: Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin Type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 66:3337-3348 (1998)
 - 9) Omoe K., Hu D.-L., Takahashi-Omoe H., Nakane A, and Shinagawa K. : Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun.* 71:6088-6094 (2003)
 - 10) Orwin P.M., Leung D.Y.M., Donahue H.L., Novick R.P., and Schlievert P.M. : Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun.* 69: 360-366 (2001)
 - 11) Orwin P.M., Leung D.Y., Tripp T.J., Bohach G.A., Earhart C.A., Ohlendorf D.H., and Schlievert P.M. : Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* 41:14033-14040 (2002)
 - 12) Orwin P.M., Fitzgerald J.R., Leung D.Y., Gutierrez J.A., Bohach G.A., and Schlievert P.M. : Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect Immun.* 71:2916-2919 (2003)
 - 13) Zhang S., Iandolo J.J., and Stewart G.C. : The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a

- second enterotoxin determinant (sej).
 FEMS Microbiol Lett 168:227-233
 (1998)
- 14) Lina G., Bohana G.A., Nair S.P.,
 Hiramatsu K., Jouvin-March E., and
 Mariuzza R. : Srtandard
 nomenclature for the superantigens
 expressed by Staphylococcus. J Infect
 Dis. 189:2334-2336 (2004)
- 15) 梅田昭子, 1.ブドウ球菌とその関連球
 菌 戸田新細菌学, 吉田眞一, 柳雄介.
 吉開泰信, 南山堂, 東京 1939)
- F. 健康危害情報
 特になし。
- G. 研究発表
 1. 学会発表
 特になし。
- H. 知的財産権の出願登録状況
 特になし。

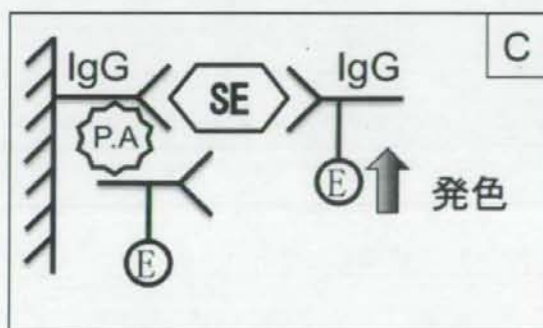
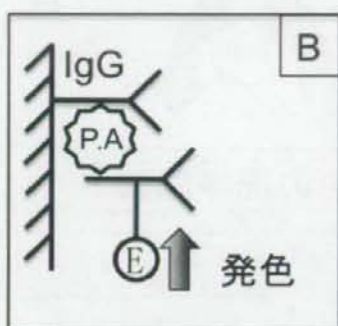
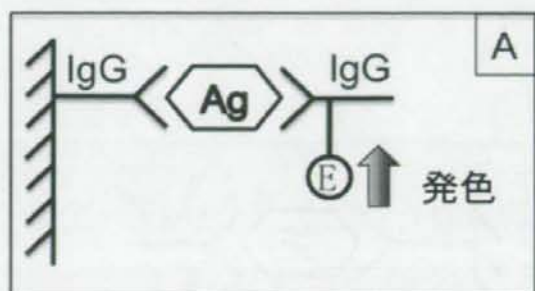


図1 サンドイッチ ELISA における IgG 抗体とプロテイン A の関係

SE : ブドウ球菌エンテロトキシン

IgG : IgG 抗体

P.A : プロテイン A

E : 標識した酵素

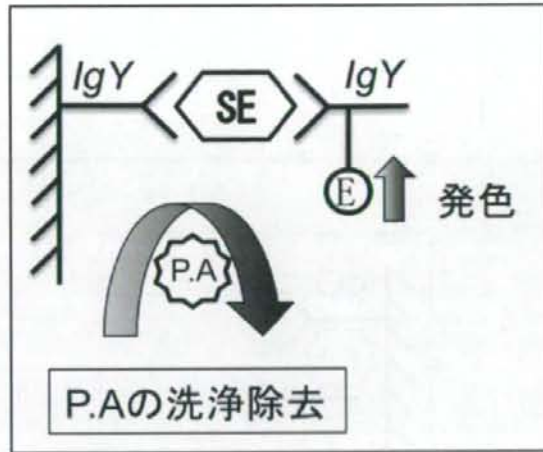


図2 IgY抗体によるサンドイッチELISA

SE : ブドウ球菌エンテロトキシン

IgE : IgE抗体

P.A : プロテインA

E : 標識した酵素

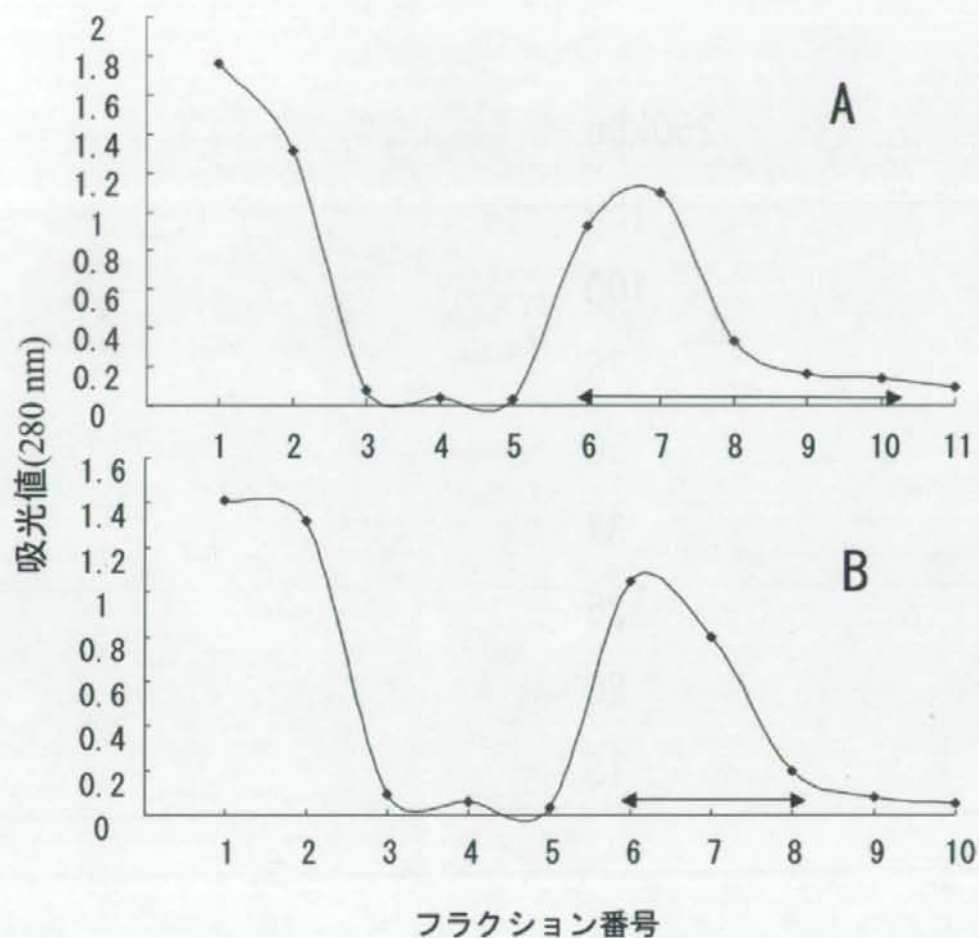


図3 Thiophilic Adsorbent Column アフィニティークロマトグラフィーによるニワトリ抗血清からの IgY 抗体の精製

パネル A : 抗 SEA IgY 抗体、パネル B : 抗 SE10 IgY 抗体
 ←→部のフラクションを精製 IgY として回収した。

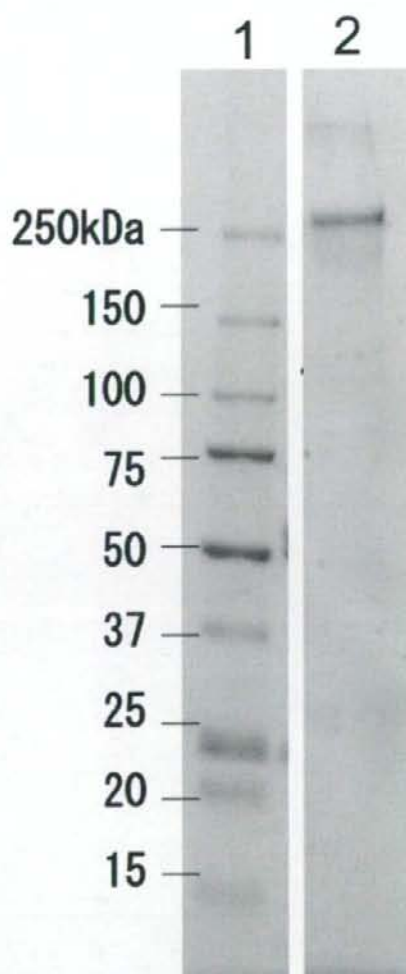


図4 ブドウ球菌エンテロトキシンに対するニワトリ IgY 抗体の SDS 電気泳動像

レーン1：分子量マーカー

レーン2：Thiophilic Adsorbent Column クロマトグラフィーで精製した抗 SE10 IgY 抗体

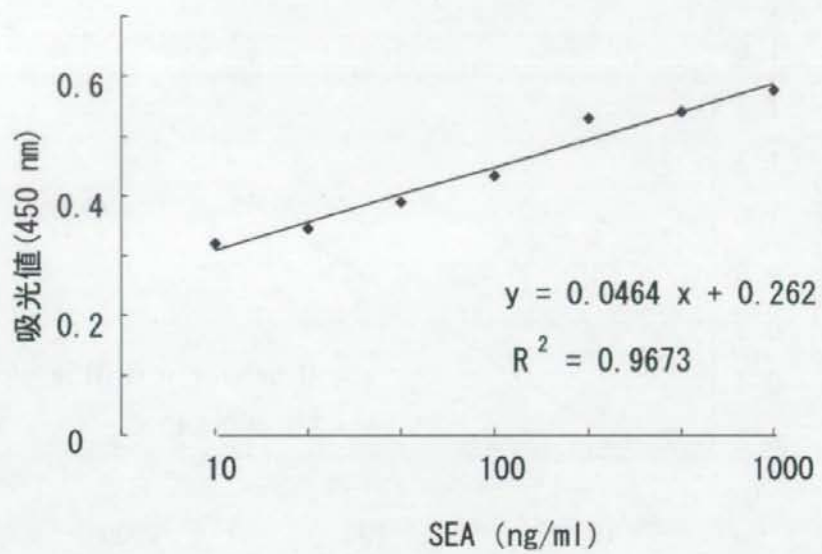


図5 ブドウ球菌エンテロトキシンA定量におけるIgY抗体を用いたELISAの検量線

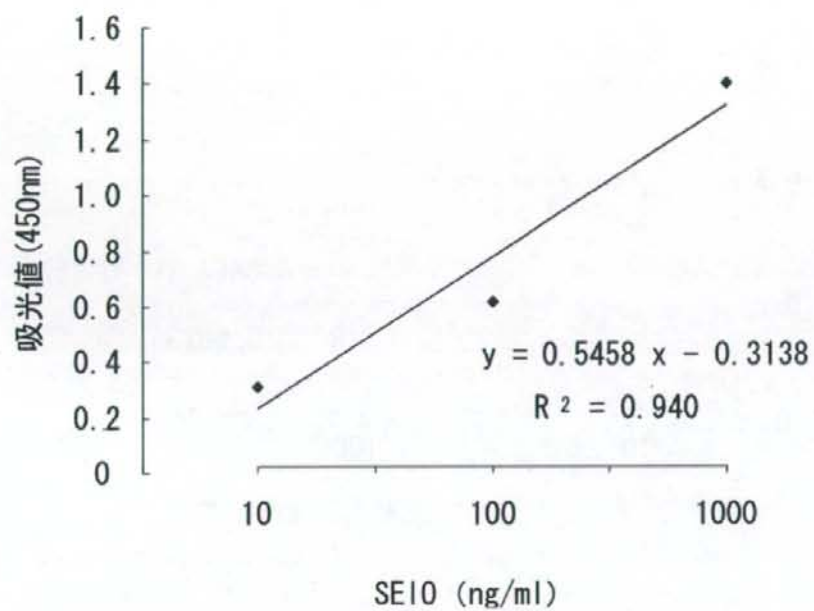


図6 ブドウ球菌エンテロトキシン SE10 定量における IgY 抗体を用いた ELISA の検量線

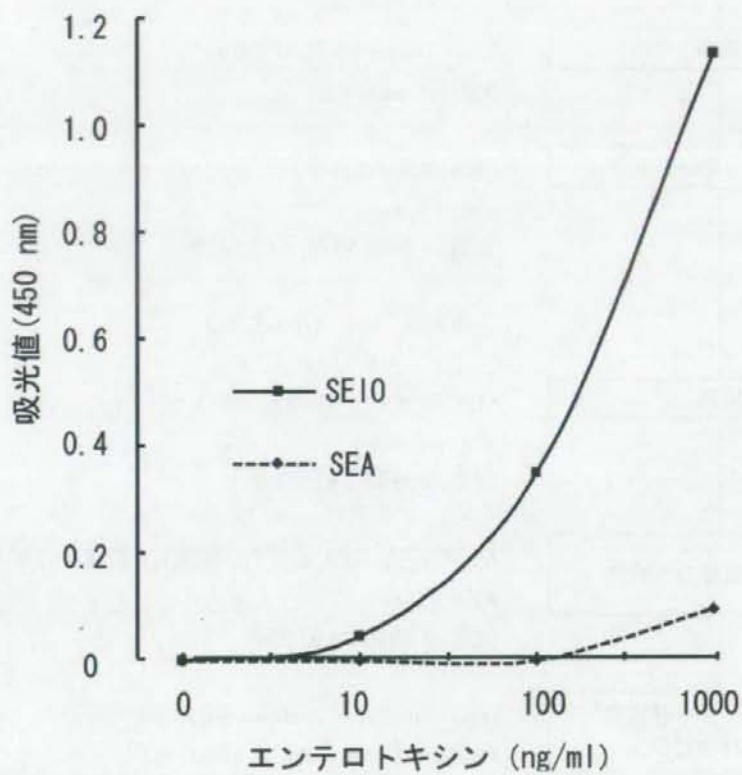


図7 ブドウ球菌エンテロトキシン SE10 に対するニワトリ抗 IgE 抗体の SEA への交差反応

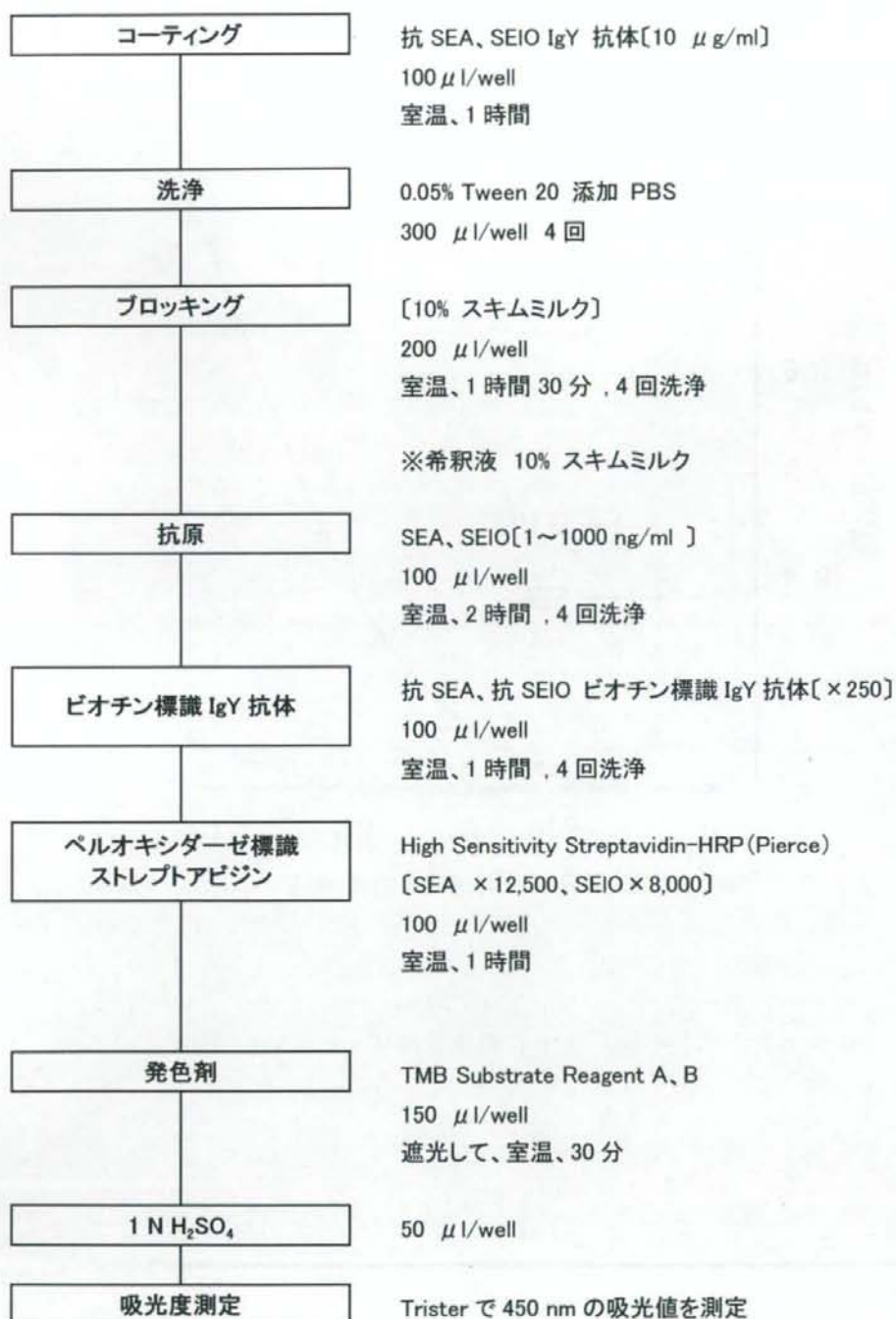


図 8 IgY 抗体を用いてのブドウ球菌エンテロトキシン検出用 ELISA プロトコール

表1 ブドウ球菌エンテロトキシンを定量するための、ニワトリ IgY 抗体を用いる ELISA の検出限界

検定対象の抗原 (ng/ml)	Pvalue ¹⁾	
	SEA	SE10
1	0.144	0.643
3	0.199	— ²⁾
5	0.196	— ²⁾
10	0.014	0.002

1) 抗原濃度 0 ng/ml と比較し、t-検定を行った

2) 検定を実施しなかった

分 担 研 究 報 告 書

ウェルシュ菌食中毒統計の解析と各種食材における
エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌汚染調査

宮原美知子

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素直接試験法の研究

分担研究報告書

分担研究者 宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室長

研究要旨

食中毒細菌の中で、発生件数は限られるが、1件あたりの発生患者数の多い原因菌として、ウエルシュ菌がある。この菌による食中毒は食品摂取後の腸管内で芽胞形成時のエンテロトキシン産生による食中毒発生が知られている。ウエルシュ菌による食中毒は、大量調理されて供される施設での発生が多く、高齢者施設等での発生が多く見られる。この状況を打開するために、ウエルシュ菌で汚染されたかつエンテロトキシン産生遺伝子を有するウエルシュ菌を食品から検出する方法を検討した。

A. 研究目的

厚生労働省の食中毒統計によれば、発生件数での順位はカンピロバクター、ノロウイルス、サルモネラ属菌、ブドウ球菌、腸炎ビブリオ等が上位を占めている。しかしながら、患者発生数で検討するとウエルシュ菌による発生患者数は上位となる。ウエルシュ菌による食中毒では、一件あたりの患者発生数が(H14・19年では)79.3人となり、ノロウイルスによる1件あたり44.3人を大幅に上回ることであり、多くの患者が発生する状況が続いている(表1)。このことから、ウエルシュ菌による食中毒発生予防のための検討を行うことは意義があることと考えられる。また、このウエルシュ菌による食中毒発生には、エンテロトキシンが作用すると考えられていること、また、この

エンテロトキシンは芽胞形成時に産生が見られること、ウエルシュ菌の栄養細胞自体は胃酸等により死滅し、エンテロトキシンも胃酸にて分解することなどが知られている。現在、食肉製品の規格基準として、クロストリジウム属菌が1,000/g以下が示されている。クロストリジウム培地法での検出と定められている。この規格基準とエンテロトキシン産生による食中毒被害への予防効果の関連について考え、効果的な検出法について検討を試みた。食品中におけるウエルシュ菌数の規制よりも、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出すること、あるいは、衛生管理により、エンテロトキシン産生の機会を無くすことにより、ウエルシュ菌食中毒の予防が達成されると思われる。

そこで、ウエルシュ菌の検出法とエンテロトキシン産生遺伝子の検出法について検討することとした。

さらにウエルシュ菌による食中毒の発生原因食品を検討したところ、煮物やスープ類が多く、特にカレーによるものが多いことが分かった(表2)。H14-19年でのウエルシュ菌による食中毒事件発生の177件の内、13件がカレーによるものと判明している(7.3%)。カレーは肉類と野菜そして香辛料が含まれる料理であるので、その材料を中心に原因となる食材を検討を行った。肉類としては、豚肉、鶏肉や牛肉がカレーには使用され、香辛料としては、ターメリック、ペッパー、シナモン、オールスパイス、ナツメグ、ローリエ、スターアニス、クローブ、ブラックペッパー、カルダモン、クミン、キャラウェイ、コリアンダー、フェンネルシーズやタイム等があげられる。これらの中から、多くの品目についてウエルシュ菌とエンテロトキシン産生遺伝子の検出法について、検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

検討検査法

ウエルシュ菌の検出法は以下の3通りの方法で検討を行った。

1. クロストリジウム属菌検出法としてのパウチ法

0.1%ペプトン加生理食塩水で希釈後、パウチ袋に10mlの検体希釈液を2枚のパウチ袋に入れ、15mlの滅菌後45-50℃に保温したクロストリジウム培地を加え、気泡を除去しながらパウチの入り口をシ

ーラーにて封印した。室温にて冷却し、35℃にて24時間培養を行った。典型的な黒色集落をクロストリジウム属菌として、カウントするとともに、その集落を卵黄加CW寒天培地に塗抹して、嫌気培養を行って、卵黄反応の有無により、ウエルシュ菌を特定した。

2. 直接塗抹法

10希釈液を卵黄CW寒天培地に塗抹し、嫌気培養を行って、卵黄反応の有無により、ウエルシュ菌を特定した。TGC培地にはカナマイシンあるいは寒天が含まれない培地もあるが、カナマイシン不含かつ寒天の含まれる培地での検討を行った。

尚、一部検体については芽胞菌分離のための熱処理を行った。75℃、10分間処理を行った。

PCRの検討

培養液、あるいは卵黄反応の見られる集落より、DNAを採取し、ウエルシュ菌毒素遺伝子検出用プライマー(TaKaRa CPE-1/2, 456bp Amplicon)とPositive control template (S041) 667bpを使用したPCRを試みた。Negative controlとPositive controlも入れて検出反応を行った。

1) 培養液の場合

1ml採取、5,000rpm、2分間遠心後に上清を除去し、滅菌水を100 μ l加えて、よく攪拌後に96℃、5分間で熱抽出を行い、13,000rpm、10分間遠心後、上清をDNA溶液として分離した。この液をPCRにて検討した。

2) 集落の場合

マイクロチューブに50 μ lの滅菌水を

入れ、滅菌楊枝等で採取した菌の DNA を分離した。培養液の場合と同様に熱抽出を行って、13,000 rpm, 10 分間遠心後、上清を DNA 溶液として分離した。

検討香辛料および食品

- 黒胡椒 6 検体
- ターメリック 6 検体
- 赤唐辛子類 6 検体
- フェネグリーク 3 検体
- クミン 1 検体
- コリアンダー 10 検体
- スターアニス 1 検体 (ホール)
- ローレル 1 検体 (ホール)
- ナツメグ 1 検体 (パウダー)
- カルダモン 1 検体 (パウダー)
- シナモン 1 検体 (パウダー)
- オールスパイス 1 検体 (ホール)
- フェンネル 1 検体 (パウダー)

* 香辛料については、原産国はほとんどが外国産であった。

- 豚肉 7 検体
- 鶏挽肉 13 検体
- 牛肉 1 検体

* * 検体によっては細菌数を標準寒天培地の混積法により測定した。

接種実験

東京都健康安全研究センターより供与されたエンテロトキシン産生株を使用し、接種実験を行った。供与株は DS 変法培地中芽胞の状態で供与された。供与された菌液をクックドミート培地にて嫌気培養し、保存株とし、TGC 培地に接種し培養後に接種実験に用いた。菌数について

は卵黄加 CW 寒天培地に希釈液を塗抹して嫌気培養後に集落数を計測して、菌数を推定した。接種検体は市販のスライスハムを用いて、接種実験を行った。検出方法は、パウチ法 (15ml クロストリジウム培地に 10ml 希釈液接種) から卵黄 CW 寒天培地での確認と TGC 増菌後 (20ml TGC に 2ml 希釈液を接種して嫌気培養) の卵黄 CW 寒天培地での確認の 2 方法での比較実験とした。

C. 研究結果

検討香辛料および食肉より、ウエルシュ菌を検出できたが、エンテロトキシン産生のウエルシュ菌を検出することはできなかった。(表 3-6)。

TGC 培養後の cpe 遺伝子産生検出について、コリアンダー、ナツメグ、カルダモン、シナモンやオールスパイスにおいて、PCR が進行しない結果が得られた。

接種実験

2 回の接種実験を行った。

1 回目 C (非接種群)

L: (低菌数接種) 780 個

H (高菌数接種) 7800 個

2 回目 C

L 440 個

H 4400 個

1 回目の結果:

パウチ法では L 群では 1 回目の実験群では検出数としては実際の接種数より約 1/10 の検出数ではあったが、L, H 群ともに検出可能であるとともに、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌として確認できた。TGC の培養液からも効率よく、