

cpe 遺伝子を検出できた。つまり両方法ともに上記接種菌数では回収が可能であった。

2 回目の結果：

パウチ法と TGC の増菌培養法ともに良好なウエルシュ菌の回収が得られた。得られた集落より、cpe 産生遺伝子検出も確認された。

D. 考察

検出方法としては従来のパウチ法、あるいは TGC 増菌培地方法ともに g あたり数十個のウエルシュ菌は検出可能であることが分かった。香辛料や肉について検討した結果はウエルシュ菌の検出としては充分であると考えられる。にもかかわらず、cpe 産生遺伝子検出が無かったことは、検討した範囲での食材には食中毒の起こる可能性は少ないと考えられる。特に、香辛料については輸入物が多く、輸入業者についても限られることから、検討した数社の香辛料で実際に出荷している多くを検討したと考えられる。食肉については、検討数も限られることから、今後のさらなる検討が必要であると考えられる。食肉については 3 種の食肉について静岡衛研での検討結果を参照するとウエルシュ菌の検出では、鶏肉、牛肉、豚肉での検出がみられ、cpe 遺伝子検出についても同様の順位での検出がみられることが報告されている¹⁾。

今回の検討で行った食肉検体について、ウエルシュ菌特に cpe 産生遺伝子検出が無かったことにより、ウエルシュ菌食中毒の可能性が少ないと結論を出すには検体数が不十分であると考えている。今後

はさらに検体数を増やして検討を行う必要があると考える。また、cpe 産生遺伝子の検討については、当初は TGC 培養後での検討を行っていたが、食肉では PCR 反応がどの検体でも進行したが、香辛料のコリアンダー、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、熱抽出物での PCR 反応が進行しなかったことから、TGC 液体培地培養状態での cpe 産生遺伝子の検討はできなかったことになり、その後の卵黄 CW 寒天培地への塗抹・培養が必要であった。この原因について検討し、培養状態での PCR 判定が可能となる検査方法あるいは、PCR への DNA 抽出方法の検討が必要であると考える。

E. 文献

- 1) Miwa, et al. (1998) Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR (Inter. J. Food Microbiol., 42, 195-200.

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

- 1) 宮原美知子、内藤理恵子、野口陽一郎、宮原誠。ウエルシュ菌の食中毒事件原因検討。日本防菌防黴学会第 35 回年次大会 平成 20 年 9 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 平成14-19年わが国における1件あたりの食中毒患者発生数

原因物質	1件あたりの患者数 (人)	事件数(件)	患者数(人)
ウエルシユ菌	79.3	188	14,914
ノロウイルス	44.3	1,940	85,964
ぶどう球菌	21.9	380	8,306
サルモネラ	17.8	1,434	25,494
腸炎ビブリオ	15.2	768	11,644
腸管出血性大腸菌	15	116	1,739
セレウス菌	13.9	86	1,193
カンピロバクター・ジエジュニ/コリ	5.2	2,973	15,411

表2 平成14から19年におけるわが国のウエルシュ菌食中毒発生状況

累計	発生前年	報告都道府県	発生日	発生場所	原因食品	喫食者数	患者数	年度別患者数
1	H14年	東京都区部	1月22日	東京都	ラーメン	442	10	
2		広島県	2月12日	広島県	八宝菜(推定)	271	95	
3		青森県	2月22日	青森県	ポークカレー	170	14	
4		滋賀県	3月22日	滋賀県	弁当	88	24	
5		北海道	3月30日	北海道	カツカレー	39	26	
6		大阪市	3月31日	大阪府	シチュー(弁当)	197	172	
7		京都市	4月4日	京都府	不明(バイキング料理)	76	37	
8		兵庫県	4月7日	兵庫県	小芋の煮物	155	67	
9		山梨県	4月8日	山梨県		290	94	
10		京都市	4月9日	京都府	トコブシの蒸しもの	178	118	
11		北九州市	4月11日	福岡県		25	14	
12		福岡県	4月16日	福岡県	煮ひたし	89	55	
13		京都市	4月25日	京都府	わかめとタケノコの煮物	46	29	
14		京都府	5月19日	京都府	煮豆	160	89	
15		東京都	5月30日	東京都	不明(仕出し弁当)	60	27	
16		東京都区部	5月30日	東京都	海老のチリソース炒め(中華弁当)	2340	887	
17		神奈川県	6月3日	神奈川県	不明(6/2、仕出し弁当)	28	13	
18		大阪府	6月3日	大阪府	カレー	不明	5	
19		沖縄県	6月20日	沖縄県	弁当	117	61	
20		青森県	7月2日	国内不明		39	6	
21		山口県	7月11日	山口県	会席料理	139	55	
22		群馬県	7月14日	群馬県	グラタン	125	48	
23		岐阜県	7月14日	岐阜県	不明(7/14、7/15、立食パーティー料理)	183	78	
24		鳥取県	7月31日	鳥取県		490	106	
25		岡山市	8月10日	岡山県	仕出し弁当	25	21	
26		沖縄県	8月30日	沖縄県	デイサービス昼食	105	38	
27		東京都区部	9月5日	東京都	不明(仕出し弁当)	181	44	
28		長野県	9月7日	長野県	9月7日及び9月8日の仕出し料理(ホタテ貝煮物)	407	114	
29		大分市	9月12日	大分県	ハヤシライス	305	54	
30		宮城県	9月15日	宮城県	ホワイトソース	72	1	
31		東京都	11月13日	国内不明	不明(旅行中の食事)	257	70	
32		徳島県	11月14日	徳島県	法事料理	14	7	
33		青森県	11月16日	青森県	あさりの炒め煮	87	17	
34		石川県	11月18日	石川県	鶏肉と竹輪の炒り煮(弁当)	不明	540	
35		愛知県	11月26日	愛知県	不明(平成14年11月26日の弁当)	163	113	3149
36	H15年	埼玉県	2月2日	埼玉県	すみつかれ	187	83	
37		福島県	2月9日	福島県	不明(会食料理)	268	67	
38		埼玉県	2月14日	埼玉県	弁当	26	26	
39		山形県	3月10日	山形県	不明(3/10、旅館の食事)	121	59	
40		大阪市	3月14日	国内不明	不明	56	7	
41		広島市	4月1日	広島県	不明(給食)	不明	337	
42		富山市	4月13日	富山県	煎り豆腐	90	67	
43		栃木県	4月17日	栃木県	不明(刑務所の炊場で調理された食品)	810	294	
44		香川県	5月19日	香川県	不明(施設調理の昼食)	98	36	
45		堺市	6月29日	大阪府	さごしのしょうが煮(仕出し弁当)	198	66	
46		愛知県	6月30日	愛知県	豆腐の冷やしあんかけ(平成15年6月30日の昼食)	170	70	
47		長野県	7月1日	長野県	ローストビーフ及びそのソース	63	33	
48		新潟県	7月2日	国内不明	不明	34	9	
49		千葉県	7月9日	千葉県	シーフードカレー	82	38	
50		いわき市	7月12日	福島県	不明(旅館の食事)	384	86	
51		北海道	8月2日	北海道	不明(平成15年8月2日の昼食)	73	60	
52		東京都区部	8月12日	東京都	チャーシュー丼	17	7	
53		横浜市	8月17日	神奈川県	蒸し鶏	47	30	
54		堺市	8月21日	大阪府	冷やしぜんざい	259	101	
55		兵庫県	9月15日	兵庫県	弁当	181	117	

累計	発生年	報告 都道府県	発生日	発現場所	原因食品	喫食者数	患者数	年度別 患者数
56	H15年	宮城県	9月30日	宮城県	棒々鶏	45	14	
57		鳥根県	10月1日	鳥根県	不明(仕出し弁当)	1354	437	
58		宇都宮市	10月8日	栃木県	10月8日昼提供の給食	257	42	
59		長崎市	11月12日	長崎県	不明(飲食店作成の弁当)	122	39	
60		北九州市	11月23日	福岡県	不明(和食コース料理)	13	12	
61		山形県	11月25日	国内不明	不明(11/25~11/26、旅行中の食事)	251	87	
62		長野県	12月3日	長野県	仕出し弁当	377	78	
63		長野県	12月8日	長野県	老人ホームの給食(12月7日夕食)	114	20	2322
64	H16年	山梨県	1月9日	山梨県	カレー(推定)	115	55	
65		岩手県	1月10日	岩手県	カレーライス	53	49	
66		埼玉県	2月3日	埼玉県	カレー	47	37	
67		東京都区部	2月14日	東京都	チキンクリームシチュー(推定)	261	45	
68		福島県	2月28日	福島県	凍み豆腐のあんかけ	96	70	
69		長野市	3月1日	長野県		460	75	
70		東京都区部	3月9日	東京都	鶏肉と白菜のスープ煮	160	71	
71		京都市	3月20日	京都府	不明(3月20日のコース料理)	28	21	
72		堺市	3月27日	大阪府	お造り(まぐろ又はタイ)	99	23	
73		福井県	3月31日	福井県	海老の卵の花炒り(給食)推定	70	22	
74		茨城県	4月5日	茨城県	焼豚	192	87	
75		神奈川県	4月8日	神奈川県	あんかけ焼きそば	112	66	
76		静岡県	4月14日	静岡県	不明(旅館料理)	203	79	
77		埼玉県	4月28日	埼玉県	弁当	54	29	
78		青森県	5月3日	青森県	不明(会席料理)	51	10	
79		秋田県	5月14日	秋田県	弁当	26	11	
80		長崎県	6月3日	長崎県	不明	142	88	
81		長野県	8月5日	長野県	旅館の食事	17	10	
82		岐阜県	8月10日	岐阜県	不明(病院給食)	176	56	
83		千葉市	8月17日	千葉県	不明(仕出し弁当)	45	33	
84		宮城県	9月2日	宮城県	カレーライス	44	34	
85		大阪市	10月11日	大阪府	不明(会席料理)	46	30	
86		鳥根県	10月11日	鳥根県	10月11日の昼食	不明	26	
87		栃木県	10月13日	栃木県	不明(弁当)	93	12	
88		佐世保市	11月23日	長崎県	カレー	60	20	
89		宮崎県	12月1日	宮崎県		536	169	
90		埼玉県	12月11日	埼玉県	不明(クリスマス会弁当)	96	30	
91		埼玉県	12月24日	埼玉県	豚野菜炒め	36	25	1283
92	H17年	神奈川県	3月7日	神奈川県	ほうれん草の煮浸し	250	83	
93		長野県	3月7日	長野県	カレー	36	14	
94		大阪市	3月18日	大阪府	焼き鳥井(事業場給食)	266	156	
95		神奈川県	3月30日	神奈川県	3月29日夕食の豚肉のオイスター炒め	282	76	
96		東京都区部	5月15日	東京都	鶏肉と野菜のクリーム煮(弁当)	不明	30	
97		神奈川県	6月4日	神奈川県	6月4日の仕出し弁当	53	36	
98		宇都宮市	6月8日	栃木県	平成17年6月8日夜提供の宴会料理	193	65	
99		横浜市	6月15日	国内不明	不明	5	5	
100		新潟県	6月20日	新潟県	卵焼き(推定)	83	47	
101		山形県	6月29日	山形県	鶏サラダ丼(推定)	不明	156	
102		長野県	6月29日	長野県	鴨肉の煮物	94	79	
103		東京都区部	7月12日	東京都	幕の内弁当	91	44	
104		下関市	7月18日	山口県	弁当(個別食品名は不明)	72	55	
105		横浜市	7月21日	神奈川県	野菜類と鶏肉の煮物(推定)	6	6	
106		京都市	7月26日	国内不明	不明	112	28	
107		長野県	8月4日	長野県	旅館の食事(8月3日の夕食)	302	132	
108		秋田県	8月7日	秋田県	さつま揚げの煮付け	425	151	
109		秋田市	8月25日	国外	ソコギジャンジョリム(韓国の煮物)	32	26	
110		郡山市	9月4日	福島県	9月4日の昼食弁当	193	83	
111		埼玉県	9月13日	埼玉県	不明(9月12日の病院給食)	87	28	
112		熊本県	9月23日	熊本県	平成17年9月23日昼に提供された弁当(推定 煮しめ)	295	170	

累計	発生年	報告 都道府県	発生日	発生場所	原因食品	喫食者数	患者数	年度別 患者数
113	H17年	長崎市	10月7日	長崎県	不明	167	24	
114		広島県	10月30日	広島県	弁当	不明	238	
115		仙台市	11月2日	宮城県	不明(11月2日の朝食)	155	46	
116		愛媛県	11月6日	愛媛県	不明(仕出し弁当)	12	9	
117		千葉県	11月29日	千葉県	ずし弁当	171	74	
118		福岡市	12月15日	福岡県	不明(仕出し弁当)	186	135	1996
119	H18年	倉敷市	1月1日	岡山県	不明(おせち料理)	113	46	
120		新潟県	1月2日	新潟県	のっぺ(推定)	13	3	
121		熊本県	1月18日	熊本県	平成18年1月18日に提供された昼食(バイキング料理)	223	94	
122		金沢市	2月9日	石川県	不明(2月8日提供の夕食)	24	19	
123		旭川市	2月13日	国内不明	不明	40	19	
124		宮崎県	3月29日	国内不明	不明	2	2	
125		東京都	4月5日	東京都	給食	782	94	
126		鳥取県	4月10日	国内不明	不明	29	16	
127		埼玉県	4月13日	埼玉県		257	35	
128		神奈川県	4月15日	神奈川県	海老ボールのスープ煮	214	96	
129		富山市	4月15日	富山県	白菜とアサリの炒め煮(推定)	118	25	
130		東京都区部	4月18日	東京都	ドライカレー	187	123	
131		横浜市	5月11日	神奈川県	不明(5月10日、11日の会食料理)	843	9	
132		熊本県	5月13日	熊本県	平成18年5月13日に提供された食事	118	65	
133		北九州市	5月18日	福岡県	不明(施設が提供した食事)	56	17	
134		旭川市	6月18日	北海道	不明(6月18日昼食)	120	66	
135		東京都区部	7月4日	東京都	不明(給食)	73	16	
136		島根県	7月4日	島根県	仕出し料理	51	34	
137		北海道	7月13日	北海道	7月13、14日に提供された食事	78	69	
138		名古屋市	7月30日	愛知県	不明(平成18年7月30日の昼食)	75	28	
139		山形県	8月7日	国内不明	不明	不明	3	
140		和歌山県	8月14日	和歌山県	不明	不明	36	
141		東京都	8月31日	東京都	スバゲティサラダ	193	9	
142		大阪府	9月7日	大阪府	不明(9月7日の配食サービス弁当)	344	196	
143		新潟県	9月10日	新潟県	不明	2	2	
144		広島県	9月18日	広島県	煮物(しいたけ、にんじん、こんにゃく、里芋)(敬老会弁当)(推定)	122	81	
145		大阪府	9月19日	大阪府	不明(9月19日の昼食)	46	31	
146		宮崎市	10月14日	宮崎県	弁当	62	56	
147		山形県	10月15日	山形県	不明(芋煮会で提供された食品)	65	23	
148		福島県	10月18日	福島県	仕出し料理	91	17	
149		静岡県	10月18日	静岡県	麻婆豆腐	20	12	
150		新潟市	10月28日	新潟県	チキンケバブ	276	97	
151		高知市	10月31日	高知県	不明(10月30日に提供された朝食(朝・夕食))	66	31	
152		佐賀県	12月10日	佐賀県	牛バラ肉のゆっくり煮(推定)	113	60	1530
153	H19年	横浜市	2月28日	神奈川県	野菜とツナの炒め物	208	34	
154		福島県	3月7日	福島県	弁当	893	558	
155		千葉県	4月5日	千葉県	不明	479	127	
156		宮城県	4月25日	宮城県	不明(学校食堂で提供した食事)	50	8	
157		神奈川県	5月5日	神奈川県	飲食店の食事(5月5日提供)	162	54	
158		奈良県	5月5日	奈良県	不明(5月5日 夕食バイキング料理)	136	73	
159		埼玉県	5月13日	埼玉県	5月13日の宴会料理	23	13	
160		北海道	5月16日	北海道	旅館で提供された食事	44	22	
161		奈良市	5月24日	奈良県	不明(宴会料理)	184	22	
162		旭川市	5月31日	北海道	不明(施設内給食施設で調理された給食)	19	10	
163		神奈川県	6月3日	神奈川県	旅館の食事(6月3日及び5日提供)	73	37	
164		栃木県	6月13日	栃木県	6月12日給食施設提供昼食	121	32	
165		小樽市	7月18日	北海道	ロールキャベツのスープ煮	153	56	
166		埼玉県	7月28日	埼玉県	青梗菜とじゃこの煮浸し	78	39	
167		広島市	7月31日	広島県	不明(受刑者給食)	1559	524	
168		大阪市	8月14日	大阪府	不明(職員用昼食)	29	8	

累計	発生年	報告 都道府県	発生日	発現場所	原因食品	喫食者数	患者数	年度別 患者数
169	H19年	大阪府	8月15日	大阪府	カボチャの含め煮、不明(8月15日の夕食)	93	34	
170		福岡市	8月16日	福岡県	前菜3種盛(蒸し鶏、クラゲの酢物、チャーシュー)	7	4	
171		大阪府	8月21日	大阪府	ロールキャベツコンソメ煮	110	35	
172		岐阜県	9月16日	岐阜県	煮物(9/16、17仕出し弁当)	1114	493	
173		京都市	9月26日	京都府	南瓜と高野の煮物(9月26日昼食)	273	80	
174		横浜市	10月23日	神奈川県	豚肉と白菜炒め煮	185	92	
175		横浜市	10月27日	神奈川県	カレー	260	89	
176		奈良県	10月27日	奈良県	幕の内弁当	485	274	
177		横浜市	12月18日	神奈川県	不明(12月18日会食料理)	20	9	2727

表 3 黒胡椒におけるウエルシュ菌およびエンテロトキシ菌遺伝子保有ウエルシュ菌の検出

衛研#	原産国	SPC (cfu/g)	卵黄CW寒天培地 クロストリジ ア測定用培地	パウチ	PCR判定エン テロトキシ菌	TGC-PCRエンテ ロトキシ菌
			加熱後検出嫌気 性菌(芽胞菌) cfu/g	加熱後検出嫌 気性菌(芽胞 菌) cfu/g		
1		9.7x10 ⁶	7.0x10 ³		—	—
2	ブラジル	1.0x10 ⁷	1.2x10 ⁴		—	—
3	インド	<10 ⁴	N.D.	N.D.	N.T.	—
4	マレーシア	<10 ⁴	N.D.	N.D.	N.T.	—
5		1.7x10 ⁶	1.2x10 ³	6.2x10 ²	—	—
		<10 ²	N.D.	N.D.	N.T.	—

—: 検出されなかった
N.T.: 検査しなかった

表 4 主な番辛料中のウェルシュ菌およびエテロトキシ菌遺伝子保有ウェルシュ菌の検出

検体名	衛研#	原産国	SPC (cfu/g)	卵黄CW寒天培地		クロストリジ		パウチ		PCR判定エエンテ ロトキシ菌	TGC-PCRエエンテ ロトキシ菌
				加熱後検出嫌 気性菌(芽胞 菌) cfu/g	加熱後検出嫌 気性菌(芽胞 菌) cfu/g	ア測定用培地 未加熱嫌気性 菌 cfu/g	加熱後検出嫌 気性菌(芽胞 菌) cfu/g	加熱後検出嫌 気性菌(芽胞 菌) cfu/g			
クミン	6		<10 ⁴	1.0x10 ²	N.D.	Many	Many	—	—	—	—
ターメリック	7	中国	<10 ⁴	1.0x10 ²	Many	Many	Many	—	—	—	—
ターメリック	8	インド	8.8x10 ⁵	N.D.	1.7x10 ¹	1	1	—	—	—	—
ターメリック	9	インド	1.2x10 ⁶	N.D.	2	2	2	—	—	—	—
ターメリック	10	マドラス	2.8x10 ⁵	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.T.	N.T.	—	—
ターメリック	11		1.5x10 ⁷	N.D.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	—	—
			8.0x10 ⁵	N.D.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	—	—
赤唐辛子	12		2x10 ¹	5x10 ²	5x10 ²	5x10 ²	5x10 ²	—	—	—	—
			1x10 ¹	1x10 ³	1x10 ³	1x10 ³	1x10 ³	—	—	—	—
レッドベルペッパー	13		1.4x10 ⁵	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.T.	N.T.	—	—
タカノツメ	14		1.4x10 ⁵	1.0x10 ²	1.0x10 ²	1.0x10 ²	1.0x10 ²	—	—	—	—
粉唐辛子	15	韓国	9.9x10 ⁴	5x10 ¹	5x10 ¹	5x10 ¹	5x10 ¹	—	—	—	—
赤唐辛子	16		5.0x10 ²	5x10 ¹	5x10 ¹	5x10 ¹	1.3x10 ¹	1.1x10 ¹	—	—	—
フェネグリーク	17		<10 ⁴	5x10 ¹	5x10 ¹	5x10 ¹	2	3	—	—	—
フェネグリーク	18	インド	<10 ⁴	5x10 ¹	5x10 ¹	5x10 ¹	Many	3	—	—	—
フェネグリーク	19		9.0x10 ²	N.D.	N.D.	N.D.	8	4	—	—	—
コリアンダー	20		4.2x10 ⁵	2.3x10 ³	2.3x10 ³	2.3x10 ³	6.9x10 ¹	6	—	—	PCR検出不可*
コリアンダー	21			2.6x10 ¹	2.6x10 ¹	2.6x10 ¹	3x10 ¹	—	—	—	PCR検出不可*
コリアンダー	22			1.5x10 ¹	1.5x10 ¹	1.5x10 ¹	1.5x10 ¹	—	—	—	PCR検出不可*

表 5 挽肉におけるウェルシュ菌およびエンテロトキシ菌遺伝子保有ウェルシュ菌の検出

検体名	クロストリジウム測定用培地		パウチ		PCR判定 エンテロトキシ菌	TGC-PCR エンテロトキシ菌
	SPC (cfu/g)	未加熱嫌気性菌 (cfu/g)	加熱後検出嫌気性菌 (芽胞菌) (cfu/g)	エンテロトキシ菌		
豚肉	1.3x10 ⁵	Many	—	—	—	—
豚肉	3.5x10 ⁵	Many	—	—	—	—
豚挽肉		1.2x10 ³				
豚挽肉		—				
豚挽肉		6.4x10 ¹				
豚挽肉		1.2x10 ³				
豚挽肉		7.2x10 ²				
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
鶏挽肉						—
牛挽肉						—

表 6 その他の香辛料中のウェルシュ菌およびエンテロトキシン遺伝子の検出

検体名	原産国	SPC (cfu/g)	PCR検出エンテロトキシン	TGC-PCRエンテロトキシン
スターアニス	中国	4.0x10 ²	—	—
ローレル	トルコ	2.0x10 ³	—	—
ナツメグ	インドネシア	1.1x10 ⁴	—	*
カルダモン	スリランカ	5.6x10 ⁴	—	*
シナモン	ベトナム	5.2x10 ³	—	*
オールスパイス	ジャマイカ	4.9x10 ⁴	—	*
フェンネル	インド	5.4x10 ³	—	—

*:反応不良

分 担 研 究 報 告 書

ウェルシュ菌食中毒予防のためのエンテロトキシン遺伝子

検出法の基礎的検討と毒素作用から考える

ウェルシュ菌食中毒発現機構の解析

山本 茂貴

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の直接試験法の研究」

分担研究報告書

ウェルシュ菌食中毒予防のためのエンテロトキシン遺伝子検出法の基礎的検討と
毒素作用から考えるウェルシュ菌食中毒発現機構の解析

分担研究者 山本 茂貴

国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部長

協力研究者 堀口 安彦

大阪大学微生物病研究所 分子細菌毒素学領域

協力研究者 山本 茂一、宇治家 武史、林 司

株式会社カイノス研究所 開発部

要旨： ウェルシュ菌食中毒は食品とともに取り込まれた生菌が胃を通過し、腸管で定着増殖後芽胞を形成、その結果産生されたエンテロトキシンが腸管上皮細胞を攻撃、電解質とともに水分を細胞から放出させ、結果下痢症状が発現するとされている。本食中毒の原因食品中には、ウェルシュ菌の生菌が多く含まれることが一般に認められている。食品中のエンテロトキシン遺伝子を検出すれば、その後のウ菌食中毒発生を防止できる可能性があることから、食品中のエンテロトキシン遺伝子の検出法を検討する事とした。遺伝子の相補性を利用する簡易迅速遺伝子検査法に核酸クロマト法がある。核酸クロマト法における検出感度および検出核酸種について検討した。その結果、核酸種としては RNA がよく、次に変性した DNA 断片、変性した直線状プラスミド DNA の順で核酸クロマト法に応用できた。検出コピー数としては、 10^9 から 10^{10} コピーが必要で、食品中の遺伝子を検出するには大幅な感度向上が必要であることが明らかにされた。ウェルシュ菌食中毒の発生機序を考える際、エンテロトキシンの行動・動態が重要となる。その解析は同菌食中毒発生予防に還元できると考える。エンテロトキシンは腸管上皮細胞膜に分布するクローディングタンパク質を受容体とすることがわかっている。クローディングには、細胞外領域として 2 カ所のループがあり、その C 末端側の第 2 ループがエンテロトキシンによって認識される事が明らかにされた。さらに第 2 ループ内の 149 から 160 番のアミノ酸領域が、毒素を受容体としてのクローディングを認識するのに重要な部分である実験結果が得られた。

A. 研究目的

ウェルシュ菌食中毒は下痢腹痛を主徴とし、1事件あたりの患者数が多い大規模型発生を特徴とする。潜伏期間が平均12時間で、毒素による食中毒とするには長く、感染し、胃腸炎の症状として食中毒症状がでるタイプのものとしては短い潜伏期を示す。本食中毒は、生体内毒素型食中毒に分類されている。本食中毒発生の要因として、1)食品内での大量の生菌の存在、2)食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3)生菌の腸管内での増殖、4)芽胞とエンテロトキシン¹⁾の産生、5)毒素の腸管上皮細胞への攻撃、があげられ、結果として、エンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている¹⁾。本食中毒は、非常に複雑な機序を経て発生することとなり、多方面からの分析調査解析がウェルシュ菌食中毒の予防には必要となる。

ウェルシュ菌は、土壌や動物の腸管内に棲むグラム陽性嫌気性芽胞形成性の桿菌で、種々の毒素を産生する。そのうち、食中毒に関与するのは、エンテロトキシン産生性のものに限られ、したがって、エンテロトキシン遺伝子保有のウェルシュ菌生菌および芽胞が食中毒予防の対象となる。ウェルシュ菌の食品への汚染の機会が多いが、毒素遺伝子を保有しているウェルシュ菌は非常に少ない²⁾。この事実は、ウェルシュ菌食中毒が事件数としては多いものでないことを支持する。一方、事件あたりの患者数が多いという現象は、ウェルシュ菌食中毒の原因食および原因食喫食時の食品の状況が説明する。ウェルシュ菌の

原因食には、弁当、惣菜、給食、仕出し食品があげられる。いずれも一度に大量に製造されるもので、家庭で調製されるものとは異なる。具体的なメニューとしては、カレー、シチューなどの煮込み料理が多い。何十人分を調整する大きな調理機器が用いられて製造されている。調理から喫食までに長時間(多くは室温で翌日まで)放置されている場合が多い¹⁾。現在までに集積された知見からは、原因食品中にはグラムあたり 10^8 cfu以上のウェルシュ菌生菌が検出されることが、原因食品が示すウェルシュ菌食中毒発生の条件になっている。非常に大量のウェルシュ菌生菌が取り込まれ、その大半は死滅するものの、胃を通過して腸に達した生菌が増殖し、その後芽胞が形成される。その際、下痢原性毒素であるエンテロトキシンが合成され、腸管上皮細胞を攻撃し、下痢を引き起こす機構が考えられている。エンテロトキシンはアミノ酸319個からなる、分子量が35kDaのタンパク質で、糖や脂質の修飾を受けていない。上述したように、エンテロトキシンは芽胞形成の際に合成されることがわかっている。エンテロトキシンは、腸管上皮細胞のタイトジャンクションを構成するタンパク質クローディンを受容体として結合し、5から6分子が集合したオリゴマーとなって細胞膜に強く結合する。細胞膜に埋まる状態になる。その際、集合したエンテロトキシン分子の中央に小さな穴が形成される。小孔、ポアー、あるいはチャネルと称される構造物で、小孔部分から、細胞質内の電解質が水分子と共に漏出する。

これが下痢になり、症状が誘発される状態になる³⁾。したがって、ウェルシュ菌食中毒は、まず大量の生菌が必要であること、菌の感染、腸管内増殖が起こること、芽胞形成がありエンテロトキシン産生が腸管内で起こることが発生条件となる。以上から、ウェルシュ菌が生体内毒素型の食中毒を起こすことがわかる。ところが、ウェルシュ菌食中毒では、菌が感染し、芽胞形成し、毒素産生しなければ症状の発現はないので、本食中毒の特徴になっている「短い潜伏期」が理解されない。

本分担研究においては、平成 20 年度は次の 2 点について検討した。上述したように、ウェルシュ菌食中毒の発生の基本的条件として、喫食した食品中に多量のエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が存在することがあげられている。大量の生菌の存在は、大量のエンテロトキシン遺伝子の存在を示す。このことから、喫食直前に食品中からウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子を検出すれば、ウェルシュ菌食中毒を予防できる可能性が考えられる。特定遺伝子を検出する方法には、ポリメラーゼチェーン反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) があるが、これには遺伝子を増幅させる過程があり、そのために時間を要するという、喫食直前の検査には不適切な部分がある。特定遺伝子を検出する方法に核酸クロマトという手法がある⁴⁾。検体から核酸を抽出後、10 分程度で反応を終了させ、目的遺伝子が検出されるかを見る。特異性は核酸の 2 本鎖間におけるハイブリダイゼーションによって担保されている。本法

はノロウイルスの検出キットとして、すでに市販されている方法で、市場の信頼性もある。しかし、ノロウイルスはその遺伝子が RNA であって、核酸クロマト法が DNA についても適応できるかは検討されていない。同法の細菌毒素遺伝子の適応性についても、何ら研究がなされていない。本年度は、核酸クロマト技術について、その検出感度について検討した。第 2 の目的は、エンテロトキシンの作用機構解析を解明し、ウェルシュ菌生菌、その芽胞、およびエンテロトキシンの、ウェルシュ菌食中毒全体の発生機序を明確にし、同食中毒の予防法に貢献するものである。具体的にはエンテロトキシンが認識する受容体で、腸管上皮細胞に分布しているクローディン分子中の、エンテロトキシンがその毒性発揮に必要な部分をアミノ酸レベルで明確にする。クローディンは細胞間を結合させるタイトジャンクションを構成するタンパク質で、20 種類以上のサブタイプからなる大きなファミリーとして構成している分子群である。すべてのクローディンは 4 回細胞膜を貫通して配置することが知られており、この特異的な配置のため、細胞膜の外側に 2 つのループが存在する。クローディンに関する研究は、クローディンがウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体であったという発見から始まっている⁵⁾。ウェルシュ菌エンテロトキシンを腸管腔内に投与した場合、下痢につながる腸管腔への液体貯留が起こる。Vero 細胞その他の特定の培養細胞を同エンテロトキシンで処理すると、細胞死が誘導される⁵⁾。ヒ

ト胎児の腎臓由来である HEK293 細胞ではエンテロトキシンによる細胞死は見られないが、同細胞にクローディン遺伝子を導入するとエンテロトキシン感受性になる。20 種以上あるクローディンのうち、クローディン 3 あるいは 4 遺伝子を導入するとエンテロトキシンによる細胞死が誘導され、クローディン 1 あるいは 2 では毒素感受性は示さないことがわかっている⁶⁾。毒素感受性の有無の解析からクローディン分子内で毒素作用発現に必要な部位の同定を試みる。

B. 実験方法

1 核酸クロマトに用いる検定用の核酸

1: DNA についての検討

メチシリン耐性ブドウ球菌から分離した *mec* 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を調製し、環状の DNA 鎖として検定に用いた。また、同環状プラスミドに制限酵素によって一カ所切断し、線状化させたプラスミドも検定材料とした。さらに、2 種類の制限酵素を用いて、*mec* 遺伝子を含んだ 1000bp の DNA フラグメントを調製し検定に用いた。

2: RNA についての検討

ノロウイルスおよび *mec* 遺伝子を NASBA 法⁴⁾ (カイノス社) でそれぞれ増幅した。Nucleic acid sequence based-amplification (NASBA) 法はキットのプロトコルに従って実施した。結果、両遺伝子の RNA 産物が得られた。

検定する DNA および RNA について、260 nm による吸光値から濃度を換算した。塩

基配列から各対象遺伝子のコピー数を求めた。

2 核酸クロマト

カイノス社のキットに従い、核酸クロマトを実施した。DNA サンプルは 2 本鎖のため、95°C 5 分間の熱変性後、急速冷却して一本鎖とした。各検定核酸 100 μl 供試の核酸クロマトキットサンプルウェルに添加した。10 分後に目視にてバンドの出現があるかないかによって、検出の有無を判定した。核酸クロマトの原理を図 1 に示した。

3 クローディン遺伝子の細胞への導入と、毒素活性

1: HEK293 細胞を、クローディン 1、4、1 の前半部分と 4 の後半部分、およびその逆のパターンで調整したプラスミドでトランスフェクトし、恒常的にクローディンあるいはクローディンキメラを発現した細胞を調整した。各細胞を 96 ウェルプレートに播種し、37°C 5%CO₂ 下で 24 時間培養後、エンテロトキシンを添加した。

2: エンテロトキシンは以下の方法で精製した。ウェルシュ菌 NCTC8239 株をヒートショック後、クックトミート培地で 37°C 一晚静置培養後、培養液を TGC 培地に植え 37°C で 4 時間静置培養した。その培養液を芽胞産生用のダンカン-ストロング培地に植えさらに 8 時間培養を続けた。芽胞を回収、音波処理して芽胞を破碎した後遠心分離し、その上清に 40% になるように硫酸アンモニウムを加えてタンパク質を沈殿

させた。20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.7) に沈殿を溶解後、同緩衝液を用いてセファクリル S-200 カラムによるゲルろ過を行った。分画したフラクションを SDS 電気泳動して、分子量約 35 kDa のタンパク質バンドを持つフラクションを回収した。毒素は Vero 細胞を用いての毒素活性の検定を行った後、凍結して保存した。タンパク質濃度は、Lowry 法を用いて測定した。

3: 毒素活性の測定

細胞障害アッセイとして WST-8 法を用いた。簡単には、上記の毒素処理細胞を含んだ各ウェルに、キット (同人化学) 中の反応液を加え、4 時間 37°C CO₂ インキュベータ内で処理後、450 nm の波長の吸光度を測定した。毒素非処理のそれと比較し、相対値として細胞死の割合を算出した。

C. 結果と考察

1 核酸クロマト法の検出核酸種とその感度

DNA の検出に関して検討した結果以下の事を得た。MRSA 遺伝子を挿入したプラスミドは、その塩基数は 4000bp で、核酸クロマトに適用した場合、環状状態でも線状状態でも一本鎖にすれば検出可能だった。検出には 3×10^{11} コピーを必要とした。制限酵素で mec 遺伝子部分を切り出し、核酸クロマトに適応したところ、同じ 3×10^{11} コピーにおいて、より明瞭なバンドが検出された (図 2)。

RNA を検出するときの感度について検討した。NASBA においては、RNA は一本鎖として合成されるため、DNA のような変性に

よる一本鎖化は必要なかった。mec 遺伝子の NASBA 産物を希釈し核酸クロマトに適応したところ、 9×10^{11} 、 2.7×10^{10} 、 1.8×10^{10} コピーの mec 遺伝子の NASBA 産物 (RNA 転写産物) が検出された。 9×10^9 コピーの産物は検出されなかった (図 3)。ノロウイルスを対象とし、その 2×10^{10} 、 5×10^9 、 1×10^9 、 1×10^8 コピーについて核酸クロマトで検出できるか否かを検討した。その結果、 1×10^9 コピーのノロウイルスの NASBA 増幅産物では陽性バンドが検出されたが、 1×10^8 コピーでは、陽性バンドは得られなかった (図 4)。

2 ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構

Vero 細胞や MCF-7 細胞など、エンテロトキシン感受性の細胞では、毒素濃度が 10 µg/ml もあれば、全細胞が死滅する。一方 HEK293 細胞は同毒素濃度でも 10% 以下の細胞障害にとどまることが既に知られている。HEK293 細胞にクローディン 1 あるいは 4 を持続発現する細胞を調整した。毒素処理後の細胞致死率は、前者が 5%、後者の細胞が 75% だった。クローディンが持つ 2 つの細胞膜外ループ部分をつなぐ部分について遺伝子工学的工夫を施し、クローディン 1 と 4 とのキメラを作製、持続発現細胞を調整した。第 1 ループをクローディン 1、第 2 ループをクローディン 4 由来の物と、その逆のクローディンキメラ保有細胞に対して、毒素処理を行った。前者の第 2 ループがクローディン 4 の場合、第 1 ループがクローディン 1 であるのに

細胞致死率は70%を示した。一方、第2ループにクローディン1のアミノ酸配列を配備すると第1ループがクローディン4であるにもかかわらず、毒素処理後の細胞致死率は3%を示すに過ぎなかった。以上の結果はクローディン分子中に2カ所ある細胞外領域としてのループのうち、その第2ループ、すなわち、よりC末端に近いループがエンテロトキシンによって認識される事を示している。そこで、さらに第2細胞外ループでクローディン1(毒素非感受性)とクローディン4(毒素感受性)のキメラ受容体を構築し、持続発現させる細胞を樹立した。各キメラ受容体持続発現細胞が示す毒素に対する50%効果濃度(EC₅₀)を比較した。オリジナルのクローディン4を発現した細胞のEC₅₀は0.176 µg/mlだった。クローディン4のアミノ酸配列をもとにして、その149位のアスパラギンから160位のメチオニンまでをクローディン4の配列にし、残りをクローディン1の配列としたキメラの場合、そのEC₅₀は0.456 µg/mlを示した。149位から160位までを1アミノ酸でも変換すると1.74 µg/mlのEC₅₀を示した。以上の結果から、エンテロトキシンが認識する受容体であるクローディン4のうち、第2細胞外ループ中の149から160番までのアミノ酸領域が、毒素がクローディンを認識することを示している。

D. 結論

核酸クロマトにおける検出感度を検討した。核酸種としてはRNAがよく、次に

変性したDNA断片、変性した直線状プラスミドDNAの順で検出が可能だった。検出コピー数としては、10⁹から10¹⁰コピーが必要で、食品中の遺伝子を検出するには大幅な感度向上が必要であることが明らかにされた。エンテロトキシンは腸管上皮細胞膜に分布するクローディンタンパク質を受容体とすることがわかっている。クローディンには、細胞外領域として2カ所のループがあり、その第2ループがエンテロトキシンによって認識される事が明らかにされた。さらに第2ループ内の149から160番のアミノ酸領域が、毒素が受容体としてのクローディンを認識するのに重要な部分である実験結果が得られた。これらの実験事実は、直ちにウェルシュ菌食中毒の発生予防に寄与する物ではないが、複雑な同食中毒の発生機構解明の解明を通じて、食品の安全性担保に貢献するものであろう。

E. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京(2007)
- 2) Miwa, et al. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR, *Inter. J. Food Microbiol.*, 42, 195-200 (1998)
- 3) 片平じゅん、ウェルシュ菌エンテロトキシン、細菌毒素ハンドブック、桜井純ら編集、サイエンスフォーラム、東京(2002)

- | | |
|---|--|
| <p>4) 宇治家武史、簡単な遺伝子検査のツール「核酸クロマト法」、臨床化学 36: 19-24 (2007)</p> <p>5) Katahira, J. et al. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin, J. Cell Biol. 136: 1239-1247 (1997)</p> <p>6) Fujita, K. et al. <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein, FEBS Lett. 476: 258-261 (2000)</p> <p>7) McDonel, J.L. and McClane, B.A. Characterization of membrane permeability alterations induced in Vero cells by <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin. Biochim. Biophys. Acta 600:974-985 (1980)</p> | <p>なし</p> <p>2. 実用新案取得</p> <p>なし</p> <p>3. その他</p> <p>なし</p> |
|---|--|

F. 健康危害情報

特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

木村 淳、安倍 裕順、神谷 重樹、戸嶋 ひろ野、福井 理、三宅 真実、堀口 安彦、ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析、第 82 回日本細菌学会 (平成 21 年 3 月)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

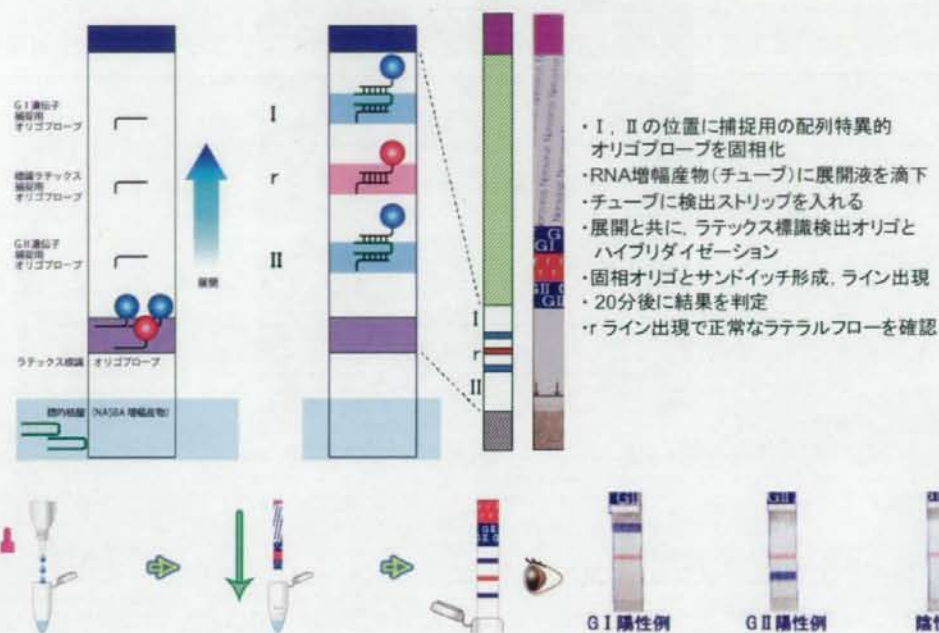


図1 核酸クロマトの原理とノロウイルスを例とした反応図

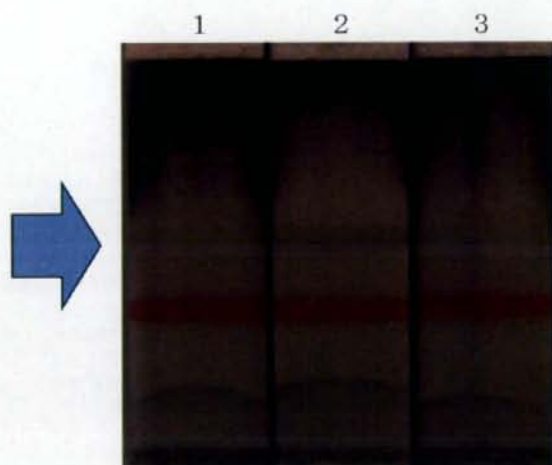


図2 DNAの核酸クロマトにおける検出感度

レーン1：環状のプラスミド。4,000 bp。レーン2：制限酵素で切り出した *mec* 遺伝子
フラグメント。1000 bp。レーン3：線状化したプラスミド、4000 bp。

反応陽性の場合、→部分にバンドが検出される。