

厚生労働科学研究費補助金事業

食品の安心・安全推進研究事業

「食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究」

分担研究報告書

ブドウ球菌エンテロトキシンの食品中における産生量評価

分担研究者 重茂克彦 岩手大学農学部獣医学課程

協力研究者 長廻ゆりあ 岩手大学農学部  
品川邦汎 岩手大学農学部

研究要旨

黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシン(SEs)は、食中毒の原因毒素である。近年、多数の新型 SEs および SE 様毒素(SEIs)の存在が報告されていることから、これらの新型 SEs の食中毒原性を評価することが必要となっている。本研究では、前年度に確立した Sandwich ELISA を用い、新型 SEs および SEIs 産生量の培養温度による変動を解析し、さらに食品中における産生量評価を行った。37°C における産生量が極めて低い SEG、SEI、SEIM、SEIN、SEIO について、これらの遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌を BHI 培地にて 25 °C で 48 時間培養したところ、37°C 培養に比して有意に産生量の増加が確認された。これらの毒素の遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌をにぎりめしに接種し、25°C、12 時間培養したところ、有意な毒素産生が確認された。さらに、2000 年に発生した大規模食中毒事件の原因食品となったスキムミルク中の全毒素量を定量したところ、SEA が 0.49 ng/ml、SEH が 0.61 ng/ml の濃度で検出され、200 ml を摂取したと仮定すると総 SE 産生量が 1.1 ng/ml であることから、発症毒素量は 220 ng/ヒトであることが明らかとなった。食中毒原因食品中の総 SE 産生量を把握し、最小発症毒素量を見直すことはブドウ球菌食中毒の制御に重要であると考えられる。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は、食品内で増殖する際に嘔吐毒であるエンテロトキシン(staphylococcal enterotoxins; SEs)を

産生する毒素型食中毒原因菌である。従来、SEs は SEA～SEE の 5 型が存在することが知られていたが、近年新型エンテロトキシンが次々に報告され、現在では SEG～SEIV の

16 種の新型 SEs および staphylococcal enterotoxin-like toxins (SEIs) の存在が明らかになっている。しかしながら、その生物活性については未だ不明な点が多く、またその検出法についても新型 SEs および SEIs のための試験方法は開発されていなかった。前年度、我々は新型 SEs および SEIs の高感度な検出法を確立し、in vitro における新型 SEs および SEIs の産生量を調べたところ、毒素型によってその産生量に大きな差が存在し、特に SEG、SEI、SEIM、SEIN および SE10 の産生量が極めて低いことが明らかになった。これらの毒素遺伝子は黄色ブドウ球菌ゲノム上の vSaβ という genomic island にクラスターを形成して存在しており、enterotoxin gene cluster (*egc*) と命名された領域を形成している。これまでに、わが国において *egc* 関連毒素群 (SEG、SEI、SEIM、SEIN および SE10) のみを保有する黄色ブドウ球菌に夜食中毒が数件報告されているが、これらの毒素が食中毒を引き起こすに十分な量が生産されるかは不明である。

本年度は、*egc* 関連毒素群を中心に新型 SEs および SEIs 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌の毒素産生量に対する温度の影響を検討し、さらに食品中における毒素産生量評価を行った。

## B. 実験方法

### 1 供試菌株

本研究で用いた黄色ブドウ球菌 9 株 (リファレンス株 2 株、食中毒由来株 5 株、健康ヒト鼻腔由来株 2 株) の性状を表 1 に示す。黄色ブドウ球菌の継代には Difco™

Brain Heart Infusion Agar (Becton, Dickinson and Company) (BHI agar) を用いた。

### 2 Sandwich ELISA

固層抗体には精製 IgG 分画あるいは各 SE に対するウサギ特異抗体を使用し、検出抗体には HRP (Horseradish Peroxidase) 標識特異抗体を用いた。また SE10 検出系については、固層抗体に抗 rSE10 ウサギ特異抗体を、検出抗体には HRP 標識ニワトリ特異抗体を用いた。標準曲線用スタンダードおよび測定サンプルの希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) (以下 Solution 1 と略) を用いた。検出抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (以下 Solution 2 と略) を用いた。ブロッキングバッファーには Starting Block™ (PBS) Blocking Buffer (PIERCE) を使用した。プレートには 96F Maxisorp White Microwell (nunc) を用いた。基質溶液には SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) を用い、マイクロプレートリーダー (wallac 1420 ARVO MX/Light、Perkin Elmer) で発光測定を行った。

黄色ブドウ球菌は、ウサギを含む多くの哺乳類の IgG に結合する protein A を産生し、これが Sandwich ELISA における非特異的な反応の原因となる。そのため、protein A の影響を除去するために ImmunoPuer Normal Rabbit Serum (PIERCE) (以下 NRS と略) を測定サンプルの 20~100 % 量加えて静置した (4 °C、16~18 時間)。その後

Solution 1 を加えて 10 倍希釈し、測定サンプルの原液とした。各毒素の産生量に応じて、原液を Solution 1 で適宜希釈するか、または原液を直接測定した。protein A が結合しないニワトリ抗体を用いた SE10 検出系では、NRS による処理を行わず、培養上清を Solution 1 で適宜希釈して測定した。protein A の影響の有無は、NRS から精製した正常ウサギ IgG 分画を固層した各 Sandwich ELISA で同一サンプルを測定し、非特異な反応がブランクと同等まで低下することにより確認した。

### 3 37 °C と 25 °C における *egc* 関連毒素群産生量の測定

黄色ブドウ球菌を BHI agar で 2 回継代した後、Yeast Extract を 1% (w/w) 添加した BHI broth (1% Yeast Extract 添加 BHI broth) 5 ml に接種し Seed Culture を行った (37 °C、16~18 時間、振盪培養)。続いて、培養液 0.6 ml を 100 倍量の 1% Yeast Extract 添加 BHI broth に接種し、37 °C あるいは 25 °C で 48 時間の振盪培養を行なった。培養液を 14,000 rpm、20 分遠心して菌体を沈殿させ、上清を回収して 0.22 μm フィルター (Millex GP® 0.22 μm、Millipore) で濾過処理後、Sandwich ELISA に供した。

### 4 にぎりめしにおける総 SE 産生量の測定

菌株を BHI agar で 2 回継代したのち、Yeast Extract 1% 添加 BHI broth 5 ml に接種し Seed Culture を行い (37 °C、16~18 時間、振盪培養)、にぎりめしへの接種菌数が  $5 \times 10^4$  CFU/50g になるよう培養液を

1% Yeast Extract 添加 BHI broth で  $10^6$  倍希釈し、にぎりめし 1 サンプルにつき菌液 5 ml を接種した。接種菌液に対し、マンニット食塩培地 (ニッスイ) による定量培養を行い、実際の接種菌数を確認した。また、菌液を接種し培養終了後のにぎりめしサンプルについてもマンニット食塩培地による定量培養を行って菌数を測定した。

にぎりめしの作成は、市販の精米 1 合に対し 1.4 倍量の水を加えて 1 時間吸水させた後、米を炊き、10 分間蒸らした後、50 g を用いて作成した。にぎりめし一つを 1 サンプルとしてラップに包み、1 つの培養条件につき 3 サンプルを供した。培養温度は 25 °C、培養時間は 6 時間あるいは 12 時間とした。培養後、2 倍量の PBS を加えて 5 分間ホモジナイズ (STOMACHER Lab-Blender400) した後、ホモジナイズ溶液を 30 ml とり、1% α-Amylase from *Aspergillus oryzae* (SIGMA) を 30% 量 (v/w) 加え、37 °C で 2 時間静置した。その後、8900 rpm、15 分遠心し、0.22 μm フィルター (Millex GP 0.22 μm、Millipore) で濾過処理して 4 °C 保存した。

また、この抽出液精製方法におけるサンプル中 SEs の回収率を測定するため、回収試験を行なった。当研究室で発現・精製した rSEA 溶液を 20 · g/ml あるいは 200 ng/ml の濃度でサンプルに 1 ml 添加し、上述の処理を行って抽出液を精製し、SE 検出 Sandwich ELISA で回収率を測定した。

黄色ブドウ球菌を摂取したにぎりめしを上記の条件で培養後、米上清中の protein A の影響を除去するため NRS をサンプルの 0~100% 量加えて静置した (4 °C、16~18

時間) 後、S Sandwich ELISA を用いて SE 測定を行なった。標準曲線用スタンダードと測定サンプルの希釈には、菌液を接種せずにサンプルと同様の処理を行なった SE free のにぎりめし抽出液を使用した。

なお、にぎりめし 50 g に 2 倍量の PBS (100 ml) を加えてホモジナイズした場合、全体の容量は約 130 ml になることから、以下の式を用いて、Sandwich ELISA により得られた実測値からにぎりめし 50 g 中の各 SE 量を算出した。

SE 量 (ng/50g) = 実測値 (ng/ml) × 130 ml × 希釈率 × 回収率

#### 5. スキムミルクにおける総 SE 産生量の測定

2000 年に発生した大規模食中毒事件の原因食品と推定されるスキムミルクで、PCR 法によって SE 遺伝子の存在が確認された Sample No. 3 と、SE 遺伝子の存在が確認されなかった Sample No. 5 (negative control) を用い、総 SE 産生量を測定した。

スキムミルク 3 g を MQ 水で 10 倍希釈してよく攪拌し、4 °C、16~18 時間静置した後、1N HCl で pH3.8 にあわせて除タンパクを行なった。遠心した上清を 5N NaOH で中和し、10 %量(v/w)のクロロホルム (Wako) を加えて激しく混和し脱脂を行なった。8900 rpm、20 分遠心した上清に 30 %トリクロロ酢酸 (TCA) (Wako) を 20 %量 (v/w) 加え(最終濃度 5%)、10 回転倒混和した後、氷中で 30 分静置した。遠心 (8900 rpm、20 分) によりタンパク質を沈殿させ、さらに再度遠心して管壁の TCA を除去した後、0.1M Tris-HCl (pH8.0) (Wako) に溶解、5N

NaOH で pH7~8 に中和し、0.1M Tris-HCl (pH8.0) で 1.5 mg (= ml) にあわせて最終的に 20 倍濃縮したものを測定サンプルとした。

なお、本実験でのスキムミルク処理におけるサンプル中 SEs の回収率を測定するため、回収試験を行なった。生化学用 Skim Milk Powder (Wako) 3 g を MQ 水で 10 倍希釈したものに、当研究室で発現・精製した rSEA 溶液を 1 ng/ml になるよう添加し (30 ng/30 ml)、上述の処理を行なってサンプルを得、Sandwich ELISA を用いて回収率を測定した。

測定サンプル中の protein A の影響を除去するため NRS をサンプルの 0~100%量加えて静置した (4 °C、16~18 時間) 後、Sandwich ELISA を用いて SE 測定を行なった。標準曲線用スタンダードと測定サンプルの希釈にはサンプルと同様の処理を行なった SE free の生化学用 Skim Milk 濃縮液を使用した。

#### C. 結果

##### 1. *egc* 関連毒素群産生に対する温度の影響の検討

*in vitro* において産生量のごく少量であることが明らかにされている *egc* 関連毒素群の食中毒への関与を検討するため、従来の培養温度である 37 °C と室温に近い条件である 25 °C での培養を行い、毒素産生量を測定、比較した結果を図 1 に示す。25 °C では、37 °C の場合と比較して産生量が増加した株が殆どで、SEG では 0.9~5.0 倍、SEI では 2.0~13.9 倍、SEM では 2.5~5.0 倍、SEN では 1.1~4.6 倍、SEO では 4.0~24.0

倍の増加がみられた。なお、Ishikawa2 株は *egc* 関連毒素群遺伝子に加えて SEA 遺伝子を保有するが、Ishikawa2 株の SEA の産生量は 37 °C で 409 ng/ml、25 °C では 404 ng/ml と、温度による産生量の変化はみられなかった。*egc* 関連毒素群は、食中毒発生条件に近いと考えられる 25 °C の条件下において産生量が増加することが明らかとなった。

## 2. にぎりめしにおける総毒素産生量評価

にぎりめしへの SEA の添加・回収試験を 4 回行なったところ、20 µg 添加の場合は 4 回とも 100 % の回収率、200 ng 添加した場合は 91.0~97.5 % (平均 94.5 %) の回収率であった。食中毒由来菌株で、*egc* を保有せず SEA 遺伝子を保有する 11779 株、SEA 遺伝子と *egc* を保有する Ishikawa2 株、*egc* を含む新型 SE 遺伝子のみを保有する Hiroshima13 株の 3 株を用いてにぎりめし中の毒素産生量を評価した。25 °C、6 時間および 12 時間培養後に毒素量を測定し、各条件当たり 3 サンプルを供した。50 g のにぎりめしに対し、11779 株で  $5.9 \times 10^4$  CFU/50g、Ishikawa2 株で  $5.3 \times 10^4$ 、Hiroshima13 株では  $5.3 \times 10^4$  CFU/50g を接種した。6 時間の培養では、Hiroshima13 株を接種した 3 サンプル中 1 サンプルのみ SE10 が 178 ng 検出され、他のサンプルの SE 産生量は全て検出限界以下であった。

12 時間培養後の菌株ごとの各 SE の測定値を図 2 に示す。培養後の菌数はいずれも  $10^7$  CFU/50g 以上になり、全てのサンプルで毒素産生が確認された。11779 株については SEA 以外にも SEK の産生がみられ、総

SE 産生量の平均値は 167 ng/50g であった。Ishikawa2 株については SEA のみの産生量の平均値は 236 ng/50g であるのに対して総 SE 産生量の平均値は 1,144 ng/50g と大幅に増加することが確認された。SEA を産生しない Hiroshima13 株の総 SE 産生量の平均値は 784 ng/50g であった。この結果から、にぎりめしにおいて、25 °C、12 時間培養の条件下で新型 SEs が相当量産生されること、およびその産生総量は SEA 産生量を上まわることが明らかとなった。

## 3. 食中毒起因スキムミルクにおける総毒素産生量評価

次いで、2000 年に発生した大規模食中毒事件の原因食品となったスキムミルクにおける総毒素産生量の測定を行なった。実験に先立ち、市販スキムミルクへの SEA の添加・回収試験を 4 回行なったところ、それぞれの回収率は 100%、90%、98%、100% であった。4 回の平均は 97% であり、ほぼ 100% の回収率であった。

本実験で用いたスキムミルク Sample No. 3 に含まれている SE 遺伝子は *sea*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *selk*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq* であることが PCR 法によって確認された (図 3)、これらの SEs について産生量の測定を行なった。1 回目の測定では SEA が 0.46 ng/ml、SEH が 0.62 ng/ml、総 SE 産生量は 1.08 ng/ml の濃度で検出された。2 回目の測定では SEA が 0.52 ng/ml、SEH が 0.59 ng/ml、総 SE 産生量は 1.11 ng/ml の濃度で検出された。PCR 法によって遺伝子の存在が確認されていたその他の SEs については、全て検出限界以下の値で

あった。これらの結果から、本食中毒事例の原因毒素は SEA および SEH であり、その発症毒素量は 200 ml を摂取するとして 220 ng であることが明らかとなった。negative control として用いた SE 遺伝子陰性の sample No.5 においては、測定した全ての SEs について検出限界以下の値であった。

#### D. 考察および結論

*egc* 関連毒素群について、これらの遺伝子のみを保有する食中毒由来株が存在するにも関わらず、*in vitro*での産生量がごく少量であるという矛盾を明らかにするため、37 °C（従来の培養温度）と 25 °C（室温、食中毒事例を想定）での培養を行い、*egc* 関連毒素群の産生に対する温度の影響を検討した。その結果、25 °Cの培養条件においては、37 °Cの培養よりも産生量が増加する傾向が見られた。一方、ブドウ球菌食中毒の主要な原因毒素であるとされる SEA の産生量には変化が見られなかった。これらのことから、37°Cの培養条件における *egc* 関連毒素群の *in vitro*での産生量はごく微量であっても、食品を室温で長時間放置することによって起こる食中毒事例においては、これらの毒素も相当量産生され食中毒に関与する可能性があることが示唆された。また、にぎりめしにおいても、25 °Cの培養条件において *egc* 関連毒素群の産生が証明された。だし、実際の食中毒事例においては、食品の汚染状況や温度、pH、水分活性をはじめ様々な環境因子や食品の特性により菌の増殖が影響され、毒素産生が必ずしも本実験の結果と同じようになるとは限らない。今後、にぎりめし以外の食品もサンプルに

用いて、それぞれの食品の特性における毒素産生状況を把握することが必要である。

これまでブドウ球菌食中毒の最少発症毒素量は、1985 年アメリカで起きたチョコレートミルクを原因食品とする事例の調査に基づき原因食品中の SE 量と摂取量から平均 144 ng/ヒトとされてきた。当時、新型 SEs の存在は明らかになっておらず、この最少発症毒素量は SEA のみを対象に検討されたものである。本研究において、SEA および SEH 以外の毒素については全て検出限界以下であったことから、発症毒素量は 220 ng/ヒトと推定された。今後は、様々な培養条件における食品中での菌の増殖と毒素の産生状況を把握すると共に、実際の食中毒事例に由来する種々の原因食品の新型 SEs を含めた総毒素産生量を測定することによって全 SEs を対象とした食中毒最少発症毒素量を検討していくことが必要であると考えられる。その一方で、SEA と SEH のヒトに対する嘔吐活性が同等であるか否かは明らかにされておらず、SEA と SEH が同等に食中毒に関与したか否かについては現段階では明確な結論を下すことはできない。最少発症毒素量の見直しを進めると共に、SEs の嘔吐発現メカニズムの分子機構を明らかにし、レセプターとの結合強度や嘔吐中枢への刺激の強弱を測定することにより毒素型ごとに嘔吐活性の強弱を推定することが必要である。嘔吐メカニズムの分子機構を基盤として、毒素型ごとの食中毒への関与の度合いを定量的に推定することにより、食中毒原因毒素として重要視すべき毒素とそれほど影響を及ぼさない毒素のクラス分けが可能なのか、それとも全ての型の

毒素を同等にリスクとして扱うべきなのかを明らかにすることができる。

E. 健康危害情報

特になし。

F. 研究発表

学会発表

1. 長廻ゆりあ, 重茂克彦, 稲垣華絵, 山本裕紀, 胡 東良, 中根明夫, 品川邦汎 (2009) 新型ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) の食品中における産生量評価. 第 63 回日本細菌学会東北支部総会, 盛岡.
2. 小野久弥, 重茂克彦, 山本欣郎, 胡 東良, 中根明夫, 品川邦汎 (2009) ブドウ球菌エンテロトキシン A の消化管における動態. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜.
3. 佐藤祐介, 小野久弥, 胡 東良, 中根明夫, 重茂克彦 (2010) ブドウ球菌エンテロトキシン B 遺伝子を保有する新規 Staphylococcal pathogenicity islands の解析. 第 83 回日本細菌学会総会, 横浜.
4. 小野久弥, 重茂克彦, 胡 東良, 中根明夫, 品川邦汎 (2010) ブドウ球菌エンテロトキシン A の消化管における動態と標的細胞の解析. 第 83 回日本細菌学会総会, 横浜.

表 1. 供試菌株

由来	菌株名	遺伝子型
標準株	N315	<i>sec3, sel, seg, sei, sem, sen, seo, sep, tst-1</i>
	Mu50	<i>sea, sec3, sel, seg, sei, sem, sen, seo, tst-1</i>
食中毒由来株	Ishikawa2	<i>sea, seg, sei, sem, sen, seo</i>
	Hiroshima13	<i>seg, sei, sem, sen, seo, selj, ser, ses</i>
	Sagal	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sep</i>
	Aomori1	<i>seg, sei, sem, sen, seo, sep</i>
	11779	<i>sea, seh, sek, seq</i>
健康ヒト鼻腔由来株	IVM-20	<i>sec, sel, seg, sei, sem, sen, seo</i>
	IVM-50	<i>sec, sel, seg, sei, sem, sen, seo, tst-1</i>



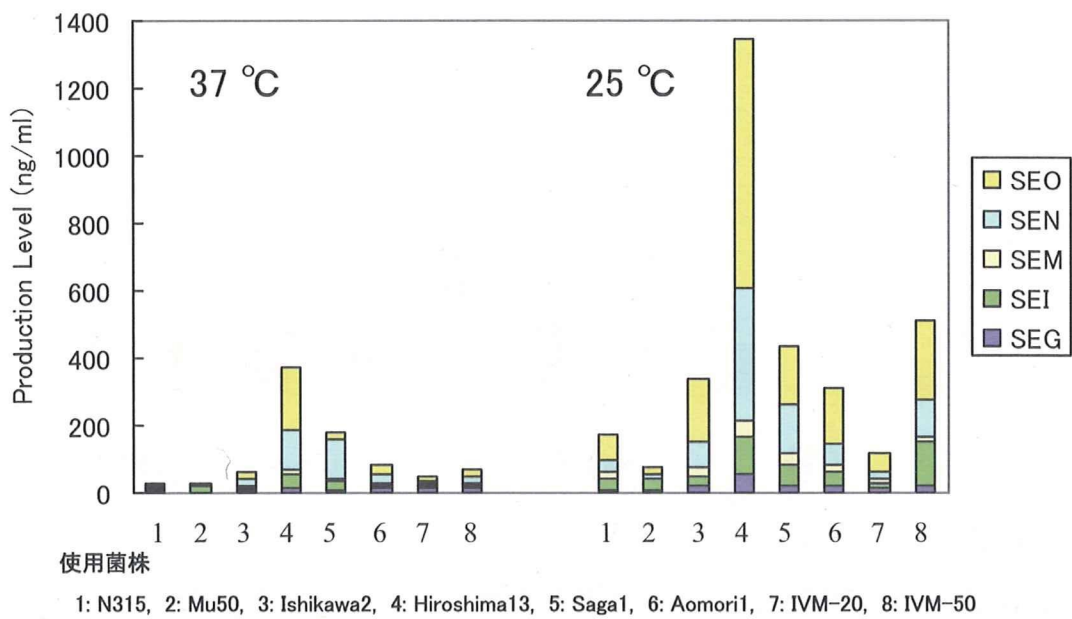
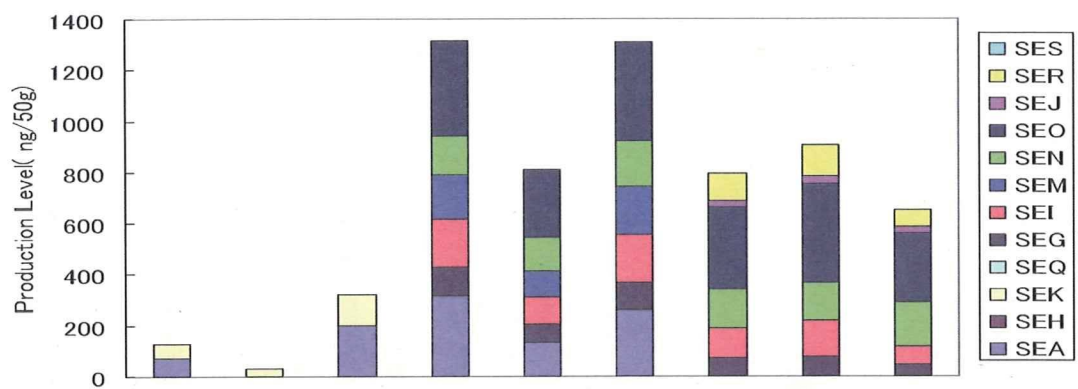


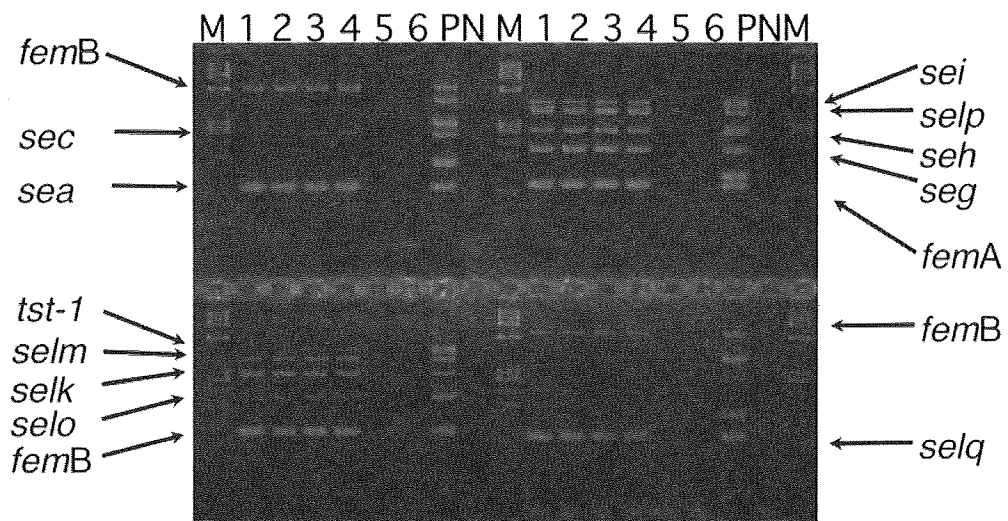
図1. 温度によるegc関連毒素群産生量の変化(*in vitro*)



11779株	Ishikawa2株	Hiroshima13株
--------	------------	--------------

接種菌数	$5.9 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$	$5.3 \times 10^4$
培養後菌数 (CFU/50g)	$2.1 \times 10^7$	$1.9 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$

図2. にぎりめしにおける総毒素産生量(25 °C、12時間培養後)



サンプル1, 2: *sea, seg, seh, sei, sek, sem, sen, seo, sep, seq*

サンプル3, 4: *sea, sec, seg, seh, sei, sek, sem, sen, seo, sep, seq, tst-1*

サンプル5, 6: SE/SEI genes negative

図3. 大規模食中毒起因スキムミルク中のSEsおよびSEIs遺伝子

# 分 担 研 究 報 告 書

エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の食品からの  
検出方法の開発に関する研究

宮原 美知子

厚生労働科学研究費補助金事業

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

エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の食品からの検出方法の開発に関する研究

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

協力研究者 門間千枝 仲間晶子 甲斐明美 東京都健康安全研究センター

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、大量調理施設での発生が多く、高齢者施設等での発生も多く見られる。エンテロトキシン産生のウエルシュ菌を検出できる試験法があれば、これらの大規模調理施設での発生を予防できると考える。新検出法を考案し、接種実験あるいは、食品に実際に適用した。結果を報告する。

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により、多くの患者が発生する状況が続いている。H14-21年では1件当たり73.4

人と推移しているが、多くの人を苦しめている食中毒菌である。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、食肉製品の成分規格として、クロストリジウム属菌が1,000/g以下が定められている。その検出法はクロストリジウム培地法と

定められている。この成分規格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。

昨年度検討したパウチ法、チオグリコール酸培地 (TGC) 培地による嫌気培養法では、検討したカレーの材料を中心とした食品からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌株を分離することはできなかった。

今年度は、当所からの目的である、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出分離できると考えられる方法を考案し、その系がうまく働くかどうか接種実験をするとともに、実際の食品検体での検出分離実験を試みた。

## B. 研究方法

### 検討検査法

図 1 に比較した検査方法を示した。

食品検体 25g を 225 mL の BPW を加えてストマッカー等で攪拌し試料原液とした。

1. TGC II (寒天の入っていないもの) 20 mL に試料原液 1mL を添加して  $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $22 \pm 2$  時間の嫌気培養を行った。
2. 試料原液そのままを普通に  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、

$22 \pm 2$  時間培養を行った。

3. 1、2 とも培養後に 1ml を採取し、PCR 用 DNA 溶液 (次項に記載) を作製した。
4. 同培養液を卵黄入り CW 寒天培地に  $10 \mu\text{L}$  塗抹し、嫌気培養を行った。

### PCR 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  $100 \mu\text{l}$  加えて、よく攪拌後に  $96^{\circ}\text{C}$ 、5 分間で熱抽出を行い、13,000 rpm, 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  $50 \mu\text{l}$  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。

### 集落の分離

培養液の PCR により、エンテロトキシンの産生が検出されたもののみ、塗抹集落より卵黄反応の見られる集落を採取し、上記記載のように集落の PCR を行って、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を分

離した。

#### 保存方法

変法 DS 培地 (大谷ら、食衛誌、28, 281-285, 1987 年)

酵母エキス 4.0 g

バクトペプトン 15.0 g

可溶性澱粉 4.0 g

リン酸一水素二ナトリウム 5.0 g

チオグリコール酸ナトリウム 1.0 g

精製水 900 mL

pH 7.5-7.6 に修正

121°C、15 分間高圧蒸気滅菌

使用時にろ過滅菌して作製した 5%炭酸水素ナトリウム液を 1/10 量加えて培地とした。

この培地に菌株を懸濁して嫌気培養後、増殖を確認した培養液に 20%量のグリセリンを加えて攪拌後、-80°Cで保存をした。

#### 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 3 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以供与された。卵黄加 CW 培地に塗抹して集落を TGC 培地で増殖させて、生理食塩液で希釈後接種菌として使用した。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。

#### 検討した食品検体

接種実験：鶏挽肉、アサリ、ブロッコリー、水菜

調査：アサリ 9 検体、むきみカキ 1 検体、しじみ 1 検体

#### C. 結果

図 1 に示した検出法で検討した結果を表に示した。鶏挽肉については表 1 と 2、アサリについては表 3、ブロッコリーについては表 4 に、水菜については表 5 に結果を示した。

表 1 と表 2 については BPW と TGC 培地の両培地で良好に菌を検出できた。しかし、ブロッコリーと水菜のや再建対の場合には、ウェルシュ菌は TGC 培地でなければ、良好に菌を検出できなかった。また、アサリ検体においては、非接種の BPW 増菌対照群よりエンテロトキシン産生ウェルシュ菌が分離できた。TGC 増菌群からは検出できなかった。分離できたエンテロトキシン産生ウェルシュ菌は TW58 の血清型であった。

また、以後に検討したアサリから再びエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を分離することができたが、分離した 6 株とも均一な TW62 の血清型であった。さらに、むきみカキよりエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を分離した。この血清型はまだ決定していない。

#### D. 考察

肉や魚などの検体よりウェルシュ菌を検出分離するには BPW 増菌より検出分離する方法が良好であった。ただし、野菜等においては TGC 培地による増菌が必要であったので、提案した検出法はウェルシュ菌においては食品種により、使い分けが必要と思われた。増菌量が BPW の 1/250 である TGC 培養では菌数の確立に従った検出が肉・貝・野菜でも検出で

きた。袋による BPW 培養が特に肉や貝の場合には有利であったと考えられる。

アサリからエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を分離できたので、二枚貝を中心に検出を試みた。今後も、この検出法によって、少なくとも貝類からのエンテロトキシン産生ウェルシュ菌分離は容易になったと思われる。ただし、この分離菌株が食中毒を引き起こすことがあるかどうかについては、今後の検討を要する。さらに、PCR で検出しても、産生菌株を分離することは容易ではなく、長い作業時間が必要であった。

#### E. 研究発表

1. 論文発表 特になし。
2. 学会発表

宮原美知子、宮崎祐典、門間千枝；ウェルシュ菌毒素産生株簡易検出法の検討  
第 30 回日本食品微生物学会学術総会  
平成 21 年 10 月

宮原美知子、門間千枝：食中毒に関わるウェルシュ菌の食品からの検出分離  
日本薬学会 130 年年会  
平成 22 年 3 月予定

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し



ウエルシュ菌による食中毒発生状況 H14-

ウエルシュ菌	都道府県名等	発生日	発生場所	原因食品	摂食者数	患者数	年度別患者数	累計
H14年	東京都区部	1月22日	東京都	ラーメン	442	10		1
	広島県	2月12日	広島県	八宝菜(推定)	271	95		2
	青森県	2月22日	青森県	ポークカレー	170	14		3
	滋賀県	3月22日	滋賀県	弁当	88	24		4
	北海道	3月30日	北海道	カツカレー	39	26		5
	大阪市	3月31日	大阪府	シチュー(弁当)	197	172		6
	京都市	4月4日	京都府	不明(バイキング料理)	76	37		7
	兵庫県	4月7日	兵庫県	小芋の煮物	155	67		8
	山梨県	4月8日	山梨県		290	94		9
	京都市	4月9日	京都府	トコブシの蒸しもの	178	118		10
	北九州市	4月11日	福岡県		25	14		11
	福岡県	4月16日	福岡県	煮ひたし	89	55		12
	京都市	4月25日	京都府	わかめとタケノコの煮物	46	29		13
	京都府	5月19日	京都府	煮豆	160	89		14
	東京都	5月30日	東京都	不明(仕出し弁当)	60	27		15
	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		16
	神奈川県	6月3日	神奈川県	不明(6/2、仕出し弁当)	28	13		17
	大阪府	6月3日	大阪府	カレー	不明	5		18
	沖縄県	6月20日	沖縄県	弁当	117	61		19
	青森県	7月2日	国内不明		39	6		20
	山口県	7月11日	山口県	会席料理	139	55		21
	群馬県	7月14日	群馬県	グラタン	125	48		22
	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		23
	鳥取県	7月31日	鳥取県		490	106		24
	岡山市	8月10日	岡山県	仕出し弁当	25	21		25
	沖縄県	8月30日	沖縄県	デイサービス昼食	105	38		26
	東京都区部	9月5日	東京都	不明(仕出し弁当)	181	44		27
	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(ホタテ身)	407	114		28
	大分市	9月12日	大分県	ハヤシライス	305	54		29
	宮城県	9月15日	宮城県	ホワイトソース	72	1		30
	東京都	11月13日	国内不明	不明(旅行中の食事)	257	70		31
	徳島県	11月14日	徳島県	法事料理	14	7		32
	青森県	11月16日	青森県	あさりの炒め煮	87	17		33
	石川県	11月18日	石川県	鶏肉と竹輪の炒り煮(弁当)	不明	540		34
	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	35
H15年	埼玉県	2月2日	埼玉県	すみつかれ	187	83		36
	福島県	2月9日	福島県	不明(会食料理)	268	67		37
	埼玉県	2月14日	埼玉県	弁当	26	26		38
	山形県	3月10日	山形県	不明(3/10、旅館の食事)	121	59		39
	大阪市	3月14日	国内不明	不明	56	7		40
	広島市	4月1日	広島県	不明(給食)	不明	337		41
	富山市	4月13日	富山県	煎り豆腐	90	67		42
	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		43
	香川県	5月19日	香川県	不明(施設調理の昼食)	98	36		44
	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		45
	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)	170	70		46
	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		47
	新潟県	7月2日	国内不明	不明	34	9		48
	千葉県	7月9日	千葉県	シーフードカレー	82	38		49
	いわき市	7月12日	福島県	不明(旅館の食事)	384	86		50
	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		51
	東京都区部	8月12日	東京都	チャーシュー丼	17	7		52
	横浜市	8月17日	神奈川県	蒸し鶏	47	30		53
	堺市	8月21日	大阪府	冷やしぜんざい	259	101		54
	兵庫県	9月15日	兵庫県	弁当	181	117		55
	宮城県	9月30日	宮城県	棒々鶏	45	14		56
	島根県	10月1日	島根県	不明(仕出し弁当)	1354	437		57
	宇都宮市	10月8日	栃木県	10月8日昼提供の給食	257	42		58
	長崎市	11月12日	長崎県	不明(飲食店作成の弁当)	122	39		59
	北九州市	11月23日	福岡県	不明(和食コース料理)	13	12		60
	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		61

	長野県	12月3日	長野県	仕出し弁当	377	78		62
	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	63
H16年	山梨県	1月9日	山梨県	カレー(推定)	115	55		64
	岩手県	1月10日	岩手県	カレーライス	53	49		65
	埼玉県	2月3日	埼玉県	カレー	47	37		66
	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		67
	福島県	2月28日	福島県	凍み豆腐のあんかけ	96	70		68
	長野市	3月1日	長野県		460	75		69
	東京都区部	3月9日	東京都	鶏肉と白菜のスープ煮	160	71		70
	京都市	3月20日	京都府	不明(3月20日のコース料理)	28	21		71
	堺市	3月27日	大阪府	お造り(まぐろ又はタイ)	99	23		72
	福井県	3月31日	福井県	海老の卵の花炒り(給食):推定	70	22		73
	茨城県	4月5日	茨城県	焼豚	192	87		74
	神奈川県	4月8日	神奈川県	あんかけ焼きそば	112	66		75
	静岡県	4月14日	静岡県	不明(旅館料理)	203	79		76
	埼玉県	4月28日	埼玉県	弁当	54	29		77
	青森県	5月3日	青森県	不明(会席料理)	51	10		78
	秋田県	5月14日	秋田県	弁当	26	11		79
	長崎県	6月3日	長崎県	不明	142	88		80
	長野県	8月5日	長野県	旅館の食事	17	10		81
	岐阜県	8月10日	岐阜県	不明(病院給食)	176	56		82
	千葉市	8月17日	千葉県	不明(仕出し弁当)	45	33		83
	宮城県	9月2日	宮城県	カレーライス	44	34		84
	大阪市	10月11日	大阪府	不明(会席料理)	46	30		85
	島根県	10月11日	島根県	10月11日の昼食	不明	26		86
	栃木県	10月13日	栃木県	不明(弁当)	93	12		87
	佐世保市	11月23日	長崎県	カレー	60	20		88
	宮崎県	12月1日	宮崎県		536	169		89
	埼玉県	12月11日	埼玉県	不明(クリスマス会弁当)	96	30		90
	埼玉県	12月24日	埼玉県	豚野菜炒め	36	25	1283	91
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		92
	長野県	3月7日	長野県	カレー	36	14		93
	大阪市	3月18日	大阪府	焼き鳥丼(事業場給食)	266	156		94
	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		95
	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		96
	神奈川県	6月4日	神奈川県	6月4日の仕出し弁当	53	36		97
	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		98
	横浜市	6月15日	国内不明	不明	5	5		99
	新潟県	6月20日	新潟県	卵焼き(推定)	83	47		100
	山形県	6月29日	山形県	鶏サラダ丼(推定)	不明	156		101
	長野県	6月29日	長野県	鴨肉の煮物	94	79		102
	東京都区部	7月12日	東京都	幕の内弁当	91	44		103
	下関市	7月18日	山口県	弁当(個別食品名は不明)	72	55		104
	横浜市	7月21日	神奈川県	野菜類と鶏肉の煮物(推定)	6	6		105
	京都市	7月26日	国内不明	不明	112	28		106
	長野県	8月4日	長野県	旅館の食事(8月3日の夕食)	302	132		107
	秋田県	8月7日	秋田県	さつま揚げの煮付け	425	151		108
	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		109
	郡山市	9月4日	福島県	9月4日の昼食弁当	193	83		110
	埼玉県	9月13日	埼玉県	不明(9月12日の病院給食)	87	28		111
	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)	295	170		112
	長崎市	10月7日	長崎県	不明	167	24		113
	広島県	10月30日	広島県	弁当	不明	238		114
	仙台市	11月2日	宮城県	不明(11月2日の朝食)	155	46		115
	愛媛県	11月6日	愛媛県	不明(仕出し弁当)	12	9		116
	千葉県	11月29日	千葉県	ずし弁当	171	74		117
	福岡市	12月15日	福岡県	不明(仕出し弁当)	186	135	1996	118
H18年	倉敷市	1月1日	岡山県	不明(おせち料理)	113	46		119
	新潟県	1月2日	新潟県	のっぺ(推定)	13	3		120
	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)	223	94		121
	金沢市	2月9日	石川県	不明(2月8日提供の夕食)	24	19		122
	旭川市	2月13日	国内不明	不明	40	19		123
	宮崎県	3月29日	国内不明	不明	2	2		124

	東京都	4月5日	東京都	給食	782	94	125
	鳥取県	4月10日	国内不明	不明	29	16	126
	埼玉県	4月13日	埼玉県		257	35	127
	神奈川県	4月15日	神奈川県	海老ボールのスープ煮	214	96	128
	富山市	4月15日	富山県	白菜とアサリの炒め煮(推定)	118	25	129
	東京都区部	4月18日	東京都	ドライカレー	187	123	130
	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	131
	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	132
	北九州市	5月18日	福岡県	不明(施設が提供した食事)	56	17	133
	旭川市	6月18日	北海道	不明(6月18日昼食)	120	66	134
	東京都区部	7月4日	東京都	不明(給食)	73	16	135
	島根県	7月4日	島根県	仕出し料理	51	34	136
	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	137
	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	138
	山形県	8月7日	国内不明	不明	不明	3	139
	和歌山県	8月14日	和歌山県	不明	不明	36	140
	東京都	8月31日	東京都	スパゲティサラダ	193	9	141
	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	142
	新潟県	9月10日	新潟県	不明	2	2	143
	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)	122	81	144
	大阪府	9月19日	大阪府	不明(9月19日の昼食)	46	31	145
	宮崎市	10月14日	宮崎県	弁当	62	56	146
	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	147
	福島県	10月18日	福島県	仕出し料理	91	17	148
	静岡県	10月18日	静岡県	麻婆豆腐	20	12	149
	新潟市	10月28日	新潟県	チキンケバブ	276	97	150
	高知市	10月31日	高知県	不明(10月30日に提供された寮食(朝・夕食)	66	31	151
	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
H19年	横浜市	2月28日	神奈川県	野菜とツナの炒め物	208	34	153
	福島県	3月7日	福島県	弁当	893	558	154
	千葉県	4月5日	千葉県	不明	479	127	155
	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	156
	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	157
	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	158
	埼玉県	5月13日	埼玉県	5月13日の宴会料理	23	13	159
	北海道	5月16日	北海道	旅館で提供された食事	44	22	160
	奈良市	5月24日	奈良県	不明(宴会料理)	184	22	161
	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	162
	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	163
	栃木県	6月13日	栃木県	6月12日給食施設提供昼食	121	32	164
	小樽市	7月18日	北海道	ロールキャベツのスープ煮	153	56	165
	埼玉県	7月28日	埼玉県	青梗菜とじゃこの煮浸し	78	39	166
	広島市	7月31日	広島県	不明(受刑者給食)	1559	524	167
	大阪市	8月14日	大阪府	不明(職員用昼食)	29	8	168
	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	169
	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	170
	大阪府	8月21日	大阪府	ロールキャベツコンソメ煮	110	35	171
	岐阜県	9月16日	岐阜県	煮物(9/16、17仕出し弁当)	1114	493	172
	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	173
	横浜市	10月23日	神奈川県	豚肉と白菜炒め煮	185	92	174
	横浜市	10月27日	神奈川県	カレー	260	89	175
	奈良県	10月27日	奈良県	幕の内弁当	485	274	176
	大分市	12月15日	大分県	不明(12月15日に提供された食事)	61	41	2759
H20年	旭川市	1月1日	北海道	不明(おせち料理)	669	49	178
	仙台市	1月23日	宮城県	宅配(白菜のクリーム煮)	184	92	179
	東京都区部	2月10日	東京都	ジャガイモとカリフラワーのそぼろ煮	100	21	180
	北海道	2月16日	北海道	昼食弁当	81	30	181
	大阪府	2月16日	大阪府	あんかけ皿うどんの「あん」	13	9	182
	長野県	2月17日	長野県	旅館の食事	137	77	183
	静岡県	3月12日	静岡県	春巻弁当	41	34	184
	広島市	4月2日	広島県	4月2日の昼食に提供された病院給食	222	41	185
	東京都区部	4月13日	東京都	会食料理	21	15	186
	長野市	4月26日	長野県	仕出し弁当	366	54	187

	高槻市	5月10日	大阪府	白菜とかまぼこのくず煮 寄宿舍一事業場	89	57		188
	福井県	5月26日	福井県	不明 寄宿舍一事業場	143	12		189
	新潟市	5月27日	新潟県	給食(肉じゃが) 仕出屋	604	397		190
	北海道	6月1日	北海道	弁当 飲食店	296	171		191
	山梨県	6月5日	山梨県	不明(旅館の食事)	178	128		192
	東京都区部	6月12日	東京都区部	弁当 飲食店	434	118		193
	長野県	8月2日	長野県	旅館の食事	207	43		194
	茨城県	8月10日	茨城県	ホテルの食事	269	64		195
	北海道	8月25日	北海道	飲食店の食事(5月5日提供)	10	9		196
	島根県	9月5日	島根県	カレーライス 飲食店	18	12		197
	長野県	9月6日	長野県	旅館の食事	116	63		198
	長野県	9月11日	長野県	仕出し弁当(カレー)	65	56		199
	横浜市	9月18日	神奈川県	不明(9月18日夕食)	79	11		200
	大阪府	10月8日	大阪府	複合調理食品(豆腐のあんかけ) 飲食店	228	66		201
	北海道	10月21日	北海道	朝食 給食	93	21		202
	京都府	11月6日	京都府	八宝菜 給食	136	30		203
	宮崎県	11月22日	宮崎県	カレーライス	592	167		204
	神奈川県	11月29日	神奈川県	豚肉とあさりのトマト煮 給食	102	48		205
	和歌山県	12月8日	和歌山県	カレー 家庭	31	28		206
	いわき市	12月14日	福島県	飲食店	214	6	1929	207
H21年	八王子市	2月7日	東京都	豆腐のくず煮 飲食店	92	53		208
	福岡県	2月19日	福岡県	不明(給食)	1858	645		209
	横浜市	2月28日	神奈川県	里芋のそぼろ煮	145	37		210
	群馬県	3月5日	群馬県	不明(旅館で提供された食事)	100	30		211
	川崎市	3月24日	神奈川県	零細・蒸し鶏	12	10		212
	長野県	4月1日	長野県	旅館の食事	87	55		213
	大津市	4月5日	滋賀県	豆類	292	169		214
	奈良市	5月3日	奈良県	不明(仕出し料理)	79	57		215
	福岡県	5月31日	福岡県	病院-その他	73	16		216
	横須賀市	7月9日	神奈川県	不明	501	31		217
	いわき市	8月14日	福島県	ランチバイキング(パスタ、ピザ) 飲食店	171	9		218
	長野県	9月20日	長野県	飲食店の食事	419	123		219
	東京都	10月3日	東京都	麻婆豆腐 事業所-給食	21	14		220
	東京都区部	10月14日	東京都	不明(弁当)	不明	13	1262	221