

201327038A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 貴弘

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成26(2014)年 3月

## 目次

### 総括研究報告書

- 食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究…………… 3  
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

### 分担研究報告書

- ウェルシュ菌の疫学解析マーカーの検索、タイピング手法に関する研究…………… 13  
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

- サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法…………… 27  
泉谷 秀昌 (国立感染症研究所 細菌第一部)

- 市販の国産鶏肉におけるウェルシュ菌の汚染状況に関する調査…………… 37  
堀川 和美 (福岡県保健環境研究所 保健科学部)

- 鶏肉由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について…………… 45  
齊藤志保子 (秋田県健康環境センター 保健衛生部)

- Campylobacter jejuni*の遺伝子型別法の評価…………… 57  
黒木 俊郎 (神奈川県衛生研究所 微生物部)

- 食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング…………… 67  
小西 良子 (麻布大学 生命・環境科学部)

- 食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプラン  
-欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての情報収集-…………… 81  
久米田裕子 (大阪府立公衆衛生研究所 感染症部)

- 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 99

総括研究報告書

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

大西 貴弘

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

食品流通が多様化・広域化している現状において、食中毒予防には普段からの食中毒菌サーベイラスから得られた情報が重要である。そのために、食中毒サーベイランスに使用するタイピング手法を充実させる必要がある。また、微生物検査のためのサンプリングプランを、国際的傾向を踏まえつつ、わが国の実情に即した方法を確認する必要がある。以上の目的を達するために今年度は以下のような研究を行った。

- ウエルシュ菌の分子疫学的検査法に適したウエルシュ菌の分離法について情報収集を行った。また、検査法を検討するために使用する菌株を鶏肉より分離した。
- サルモネラに関しては原因子等および、Pathogenicity Island データベース（PAI）等を参考に、指標となりうる 69 種類の遺伝子を選択し、それに対応する PCR プライマーを設計し、PCR による（病原）因子パネルの作成を試みた。
- 欧米で報告の相次いでいる *Salmonella* I 4:i:- について、スクリーニング用 PCR の検討を行った。
- *Campylobacter jejuni* における特定の遺伝子の有無を PCR 法により検出することにより型別を行う comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) の導入を行うために、当該解析法の評価を行った。
- 黄色ブドウ球菌について POT 法、MLVA 法、PFGE 法により遺伝子型別を実施した。
- ブドウ球菌エンテロトキシンの保有状況について、新型エンテロトキシンの G, H, I 型の seg, seh, sei 遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した。
- 国際的なサンプリングプランと比べて、日本でのサンプリングプランの妥当性の有無を検討するために、蛍光ラテックスビーズを用いた微生物汚染の不均一さを推測できるモデルを構築した。
- 食中毒起因微生物を中心に、欧米の微生物規格とサンプリングプランについて情報収集した

研究分担者	
小西 良子	麻布大学
泉谷 秀昌	国立感染症研究所
堀川 和美	福岡県保健環境研究所
齊藤志保子	秋田県健康環境センター
久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
研究協力者	
黒田 誠	国立感染症研究所
関塚 剛史	国立感染症研究所
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
村上 光一	福岡県保健環境研究所
大石 明	福岡県保健環境研究所
江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
前田詠里子	福岡県保健環境研究所
岡元 冬樹	福岡県保健環境研究所
川津健太郎	大阪府立公衆衛生研究所
小林 昭彦	さいたま市健康科学研究センター
白石 理奈	さいたま市健康科学研究センター
加藤 直樹	さいたま市健康科学研究センター
相川 勝弘	神奈川県衛生研究所
古川 一郎	神奈川県衛生研究所
八柳 潤	秋田県健康環境センター
高橋 志保	秋田県健康環境センター
今野 貴之	秋田県健康環境センター
和田恵理子	秋田県健康環境センター
熊谷 優子	秋田県健康環境センター
檜尾 拓子	秋田県健康環境センター
石崎 直人	麻布大学

## A. 研究目的

食中毒の発生を未然に防止するためには、各自治体が平常時に行っている食中毒菌サーベイランスの結果から、流通食品の汚染実態をあらかじめ把握しておくことが重要である。現在、食中毒菌サーベイランスにおいて主に行われているのは、食品からの菌の分離である。しかし、単に菌がその食品から分離されたかどうかという情報だけでなく、その分離された菌株の疫学情報まで取得することができれば、サーベイランス情報をさらに有効的に活用できるようになると考えられる。そこで、本研究では主要な病原体の分子疫学マーカーを検索し、地方衛生研究所でも実施可能なタイピング手法を確立する。本年度はウエルシュ菌、サルモネラ、*Campylobacter jejuni*、黄色ブドウ球菌を対象に以下の課題を検討した。

- ウエルシュ菌に関しては、エンテロトキシン産生株は菌株全体の5%程度しか存在しないことが報告されているため、タイピングに適したウエルシュ菌分離方法の情報を収集、および本研究で今後使用する菌株の収集を行った。
- サルモネラに関しては原因子等および、Pathogenicity Island データベース (PAI) 等を参考に、指標となりうる69種類の遺伝子を選択し、それに対応するPCRプライマーを設計し、PCRによる(病原)因子パネルの作成を試みた。また、欧米で報告の相次いでいる

Salmonella I 4:i:-について、スクリーニング用 PCR の検討を行った。

- *C. jejuni* に関しては特定の遺伝子の有無を PCR 法により検出することにより型別を行う comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) の導入を行う検討を行った。
- 黄色ブドウ球菌に関しては Phage ORF typing 法 (POT 法)、MLVA 法、PFGE 法による遺伝子型別の有効性を検討した。また、新型エンテロトキシンの G, H, I 型の seg, seh, sei 遺伝子の保有状況を遺伝子型別に利用できるか検討した。

食品の衛生管理を目的とする微生物検査では、そのサンプリングプランが母集団の汚染状況を適切に反映していることが非常に重要である。コーデックス規格や EU におけるサンプリングプランは The International Commission on Microbiological Specification for Food が提唱した方法をもとに作られており、食品や微生物の違いによってサンプリングプランが設定されている。これに対して厚生労働省が行っているサンプリングプランでは 1 ロットからランダムにバッチ (1kg) を採取し、そこから 25g を n=1 で検査する方法が取られている。しかし、この方法が母集団の汚染を正確に反映しているかどうかについては科学的根拠がない。そこで本研究では食中毒起因微生物が食品を汚染している場合、汚染の不均一さを考慮に入れ、汚染量とサンプ

ル数にどのような関係があるかを検証を行う。本年度は蛍光ラテックスビーズを用いた微生物汚染の不均一さを推測するモデルを構築するとともに、欧米の微生物規格とサンプリングプランについて情報収集した。

## B. 研究方法

### 1. ウエルシュ菌分離方法の検討

既存の文献よりウエルシュ菌の分離方法を収集し、ウエルシュ菌の分離に適した分離方法を検討した。また、次年度以降に用いるウエルシュ菌株を確保するために、国内で生産され冷凍を経っていない鶏肉のモモ 34 検体、ムネ 31 検体、ササミ 14 検体およびテバ 4 検体、計 83 検体を用いてパウチ法によりウエルシュ菌の分離を試みた。

### 2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

サルモネラの病原因子等および、Pathogenicity Island データベース (PAI) 等を参考に、指標となりうる 69 種類の遺伝子を選択し、それに対応する PCR プライマーを設計し、PCR による (病原) 因子パネルの作成を試みた。サルモネラ I 4:i:- に関して、*S. Typhimurium* 様の単相菌スクリーニング PCR について検討した。また、*hin* 遺伝子の PCR 法について検討した。

### 3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

鶏肉から分離した *C. jejuni* 保存株 13 株と *C. jejuni* ATCC33560 を対象にした。

CGF40 は対象とする 40 の遺伝子を 5 つずつの 8 セットに分け、各 5 つの対象遺伝子は multiple-PCR により同時に検出するものである。既報の方法に従って、神奈川県衛生研究所微生物部と国立感染症研究所細菌第一部において実施し、結果を比較した。

#### 4. 鶏肉由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

鶏肉 32 検体由来の 107 株および食中毒 2 事例由来の 5 株をブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) 遺伝子の検出試験に供試した。これらの株から選択した 94 株を POT 法による型別に、77 株を MLVA 法による型別に、52 株を PFGE による型別に供した。エンテロトキシン A~E 型、G 型、H 型、I 型の保有状況を PCR で検出した。POT 法は菌株ごとに異なる ORF の保有パターンを Multiplex PCR によって検出する方法であり、シカジーニアス分子疫学解析 POT キット (関東化学株式会社) を用いて PCR を行った。MLVA 法は *clfA*, *clfB*, *sdr* (*sdrC*, *sdrD*, *sdrE*), *spa*, *ssp* の 7 カ所の遺伝子を対象として行った。PFGE では黄色ブドウ球菌の DNA を制限酵素 *Sma*I で消化し、比較した。

#### 5. 食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング

Latex beads amine-modified polystyrene, fluorescent yellow-green (F-LB) を食中毒起因微生物として使用した。食品検体として牛肉を用い、F-LB の検出限界、塗布量を決定した。その後、牛肉 1 g あた

りの F-LB 量を変化させて、F-LB を塗布した牛肉ブロックを作成した。それぞれの牛肉ブロックから 25g ずつとりわけ、ストマッカー処理を行い上清中の蛍光強度を測定した。

#### 6. 欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての情報収集

欧米の微生物規格とサンプリングプランについて既存の資料を基に情報収集した。また、EU において、n 数が多い検査にサンプル・プーリング法の採用を検討していたので、合わせて情報収集を行った。

### C. 結果

#### 1. ウエルシュ菌分離方法の検討

ウエルシュ菌の高感度分離法を確立するために文献などから情報収集を行った。その結果、従来の培養法に加え、パーコール濃縮法、フィルター濾過法、コロニーハイブリダイゼーション法が分離・検出感度に優れた方法であることを見出した。鶏肉の推定ウエルシュ菌数は、83 検体中 47 検体 (56.6%) から 1-49 CFU/g 検出され、残り 36 検体は 1 CFU 未満/g であった。ウエルシュ菌は 29 検体から検出されたが、いずれもエンテロトキシン産生遺伝子は保有していなかった。

#### 2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

血清型 *Infantis* に関する病原因子パネルの解析結果から、血清型 *Infantis* 内にお

ける *irp2* 遺伝子の分布差異が見出された。*Irp2* 遺伝子の有無によって2つのグループに分けることができた。そこで、本遺伝子を含む周辺遺伝子領域の構造を決定すべく、当研究所病原体ゲノム解析センターと協力して *irp2* 保有株のゲノム解析を行った。その結果、本遺伝子が約 280kb のプラスミド状に存在することが示唆された。*irp2* 遺伝子の有無をヒト、非ヒト由来で比較すると若干ながら非ヒト由来株に *irp2* 陽性株が多かった。*Salmonella* I 4:i:- のために *fliB-fliA* 遺伝子間領域および *fljB* 遺伝子を標的としているマルチプレックス PCR の有用性を検討したところ、良好な結果を得られた。

### 3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

神奈川県衛生研究所微生物部と国立感染症研究所細菌第一部の2機関で研究を行い結果を比較した。PCR で使用する Taq polymerase は3種類としたが、それぞれの Taq polymerase により PCR の結果が異なる対象遺伝子があることが明らかになった

### 4. 鶏肉由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

鶏肉 32 検体由来 94 株は POT 法により 19 種類に型別された。同 77 株は MLVA 法により 20 種、同 52 株は PFGE 法により 24 種に型別された。2 事例の食中毒由来株 5 株についても同様に型別できることが確認された。一方、分離株の *SEs* 保有については *seg*

と *sei* 遺伝子の保有率が高いことが明らかとなった。

### 5. 食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング

蛍光ラテックスビーズをり用いるモデリングは、微生物汚染のサンプリングプランのモデルとして使用可能であることがわかった。また、局在して  $4.5 \times 10^5$  個/kg の微生物汚染があった場合では 1 検体 25g として  $n = 6$  以上は採取しなければ検出出来ないことも示された。

### 6. 欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての情報収集

EU、アメリカ (FDA と FSIS) とともに規格基準には二階級法のサンプリングプランと試験法が設定されていた。摂取するヒトのリスクと食品の種類によって、カテゴリーが分けられ、規格基準が設定されていた。EU と異なりアメリカではゼロトレランス (zero tolerance) 方式が採用されていた。 $n$  数が多い検査にはサンプル・プーリングの採用が検討されていた。サンプル・プーリング法にはドライ・プーリング (dry pooling) とウェット・プーリング (wet pooling) という2種類の方法があった。

## D. 考察

### 1. ウエルシュ菌分離方法の検討

本研究の目的のひとつは環境中でのウエルシュ菌の分布を明らかにするためのタイ



ピング手法を構築することである。そのために、少量の菌を検出できる高感度な方法が必要である。増菌培養を必要とする方法では培養後の菌株の分離頻度が、自然界でのそれを反映していない可能性がある。特に目的とする菌株が非常に少量の場合、培養後、他の主要な菌株に隠れてしまい、検出できなくなる可能性がある。そのため、なるべく培養を行わずに少量の菌を濃縮し、また多くの菌株間に混在する少量の菌株を検出、分離する方法が必要である。コロニーハイブリダイゼーション法は1コロニー単位でタイピングを行うことができるため、少数の菌株も見逃すことなく検出できると考えられる。しかも菌体を回収し、今後の実験に使用することができる。一方、密度勾配遠心分離法は食品中に含まれる菌の培養を経ずにそのまま濃縮する方法であるため、培養前の菌株間の存在比率や、菌株間の増殖速度の違いなどに影響されることなく分離することができる。これらの方法は従来の培養法の欠点を補う試験法として使用することができ、より正確なタイピングを行うことができると考えられる。

## 2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

今年度の研究結果から、*irp2* 遺伝子の有無によって血清型 *Infantis* には大きく2つのグループが存在すること示唆された。

*S. I 4:i:-*は、近年欧米各国で報告が相次いでおり、その多くは *Typhimurium* の単相菌と考えられている。*fliB-fliA + fljB*

マルチプレックス PCR を検討したところ、既報の典型的な *S. I 4:i:-* のパターンがえられ、*fljB* が陰性となる株では良好な結果が得られた。一方で、*Typhimurium* や典型でない株では *fliB-fliA* のバンドが弱くしか増幅されなかった。このことから、当該プライマー (FFLIB および RFLIA) を改変し、改めて PCR を行ったところ、良好な結果を得た。今後本改変法を用いて *S. I 4:i:-* 株のスクリーニング (タイプ分け) を検討したい。

## 3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

*C. jejuni* の疫学調査では PFGE が最も多用されている。しかし、結果を得るのに3、4日かかることや、複数の機関での結果の比較に限界があるといった問題点がある。そこで、短時間で結果が得られ、複数の機関間での結果の比較を容易に行うことが可能な解析法の導入が望まれる。今回検討した CGF40 は、*C. jejuni* の染色体中の遺伝子の中から40の遺伝子を対象に、その保有の有無に基づいて型別を行う方法で、PFGEの問題点を克服する検査法として期待されている。今年度 CGF40 の検討により、2機関での結果に相違がみられたことから、結果が一致する PCR 条件を見出すことが必要となった。今後、PCR で使用する Taq polymerase を変える、PCR 条件を変えるなどの変更を加え、結果が安定する条件を探る。

#### 4. 鶏肉由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

ブドウ球菌食中毒の原因菌の SE s 型は A, B, C, D, E が 95% を占めるとされているが、近年 A~E 以外の新しい型が報告されている。今回、新型 SE s の G (seg)、H(seh)、I(sei) について検索したところ、鶏肉分離株が seg, sei を高率に保有していることが明らかとなった。さらに、食中毒由来株にも seg, sei 遺伝子保有株が存在することが確認された。今後これらの新型 SE s について、さらに食中毒への関与も含めて分離株の保有状況を把握する必要があると考えられた。

MRSA の疫学解析に有用とされている POT 法と MLVA 法を用いて鶏肉由来株、食中毒事例由来株の型別を試行した。POT 型別では鶏由来株は 19 種類に型別された。MLVA 法では 20 種類に型別された。POT 法と MLVA 法の型別の評価のため PFGE を実施したところ、鶏肉由来株は PRGE 法により 24 種類に型別され、同じ POT 型、MLVA 型が PFGE で細分化された例は極一部に認められた。このように POT 法及び MLVA 法による型別は PFGE 型別に匹敵する解析力を有することが確認された。さらに POT 法及び MLVA 法は、操作の簡便性、結果判定の迅速性が PFGE 法より優れており、食品検査等における型別法として両法の有用性は非常に高いと考えられた。

#### 5. 食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング

本研究では培養法による検査を行うことを踏まえ、微生物の代替に細菌と同じ大きさの F-LB を用いて、汚染検体のモデルを作成した。実際の菌を使用して実験を行うにはバイオハザードなどの特殊な設備や専門知識をもつ技術者の手技が必要である。しかし、今年度の結果から、蛍光ラテックスビーズを食中毒起因微生物の代替として用い、微生物汚染のサンプリングプランのモデルとして使用可能であることがわかった。また、少なくとも  $4.5 \times 10^5$  個 / 1 kg の汚染があった場合にはサンプリングプランとして  $n = 6$  は採取しなければならないことも示された。これらの結果は、現在、我が国で行われている  $n = 1$  のサンプリングプランでは、低濃度の食中毒起因微生物の検出は、不可能であることを示唆しており、今後複数の検体を採取することを視野にいれたサンプリングプランの構築する必要性が認められた。

#### 6. 欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての情報収集

プーリング法は試験法の検出感度に影響を与えるため、プールするサンプル数がどこまで可能か検討するなど、必ずそのプロトコルの妥当性を評価する必要がある。サンプルをプールし、サンプルを扱いやすい数に減らすことは、労力的にも経済的にも合理的である。ドライ・プーリングとウェット・プーリングは妥当性評価を試みるだけの価値が十分存在すると考えられた。

## E. 結論

今年度は自治体で行うことのできる食品中の食中毒菌サーベイランスに活用できるタイピング手法確立のための情報収集、基本的実験条件の検討を行った。来年度は今年度の研究成果をさらに発展させ、タイピング手法を確立させていきたい。

食中毒微生物検査のサンプリングプランに関しては、本年度は蛍光ラテックスビーズを用いたモデルの作成を行った。来年度以降はこのモデルを用い、わが国の実情に即したサンプリングプランの検討を行っていきたい。

## F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

分 担 研 究 報 告 書

ウエルシュ菌の疫学解析マーカーの検索・  
タイピング手法に関する研究

大西 貴弘

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

#### 分担研究報告書

ウエルシュ菌の疫学解析マーカーの検索、タイピング手法に関する研究

研究分担者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

研究協力者 堀川 和美（福岡県保健環境研究所 病理細菌課）

研究協力者 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所 企画情報部）

研究協力者 齊藤志保子（秋田県健康環境センター 保健衛生部）

研究協力者 小林 昭彦（さいたま市健康科学研究センター 生活科学課）

ウエルシュ菌の分離方法を通知法および論文より検索し、分類した。分離法は大きく従来の培養法、密度勾配遠心分離法、コロニーハイブリダイゼーション法に分けられた。培養法では ISO 法と科学的根拠のある妥当性確認を行った NIHSJ（標準試験）法の整備が進められており、現在、原案が示された段階にある。今後、コラボラティブスタディ等の結果を踏まえ、最終案がまとめられる予定となっている。密度勾配遠心分離法は食品中に含まれる菌を培養を経ずにそのまま濃縮する方法であるため、培養前の菌株間の存在比率や、菌株間の増殖速度の違いなどに影響されることなく分離することができる。コロニーハイブリダイゼーション法は大量の菌株の集落から、特定の菌株の集落を選択し分離することができる。これらの方法は従来の培養法の欠点を補う試験法として使用することができ、より正確なタイピングを行うことを可能にすると考えられる。

#### A. 研究目的

ウエルシュ菌 *Clostridium perfringens* は嫌気性の芽胞形成菌であり、腹痛や下痢をおもな症状とした食中毒を引き起こす。ウエルシュ菌食中毒の原因は芽胞形成時にウエルシュ菌より産生されるエンテロトキシンであると考えられている。エンテロトキシンは酸や熱で不活化されるため、トキシンの経口摂取で発症することはない。大量の栄養型ウエルシュ菌体およ

び芽胞を経口摂取すると、腸管内で増殖しエンテロトキシンが産生され発症する。

ウエルシュ菌食中毒の原因食材は肉、魚介類、野菜など広範な食材によって引き起こされると考えられている。これはウエルシュ菌が芽胞として土壌など自然環境中に存在するため多くの食材がウエルシュ菌に汚染されていることを示唆している。しかし、ウエルシュ菌による食品汚染を調査した多くの結果から、食品の中では食肉、特に鶏肉の汚染率が高いことが報告されてい

る<sup>1)</sup>。一方、野菜を原因食材と考えられるウエルシュ菌食中毒が発生しているにもかかわらず野菜からのウエルシュ菌の分離頻度は低い。このような現象が生じる原因は明らかになっていないが、野菜などを汚染しているウエルシュ菌の菌量が少ないため、従来の分離法では検出できないのが一つの原因と考えられている。また、食肉からのウエルシュ菌の分離頻度は高いが、実際にエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離される頻度は極めて低い<sup>2)</sup>。こういったことからエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の病原巢についてはさらに検討する必要があると考えられる。一方、エンテロトキシン遺伝子を保有しないウエルシュ菌による食中毒事例が報告されており<sup>3)</sup>、新型のエンテロトキシンの関与が示唆されている。そのため、エンテロトキシン非産生株の食中毒への関与についても検討し直す必要があると思われる。

エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌はエンテロトキシン遺伝子を染色体上に持つ株とプラスミド上に持つ株とに分けられる<sup>4-6)</sup>。この二つの株は代謝など多くの性状で違いが見られ、適応している環境が異なるのではないかとの指摘もある。これまでの報告では食中毒由来の菌株はエンテロトキシン遺伝子を染色体上に持つものが多く、非食品性の胃腸疾患由来株ではエンテロトキシン遺伝子をプラスミド上に持つものが多いと考えられてきた<sup>2), 7)</sup>。しかし、最近ではエンテロトキシン遺伝子をプラスミド

上に保持する株による食中毒も報告されている<sup>2), 7)</sup>。よって、これらの株の食中毒への関与や環境中での分布などについて明らかにしていく必要があると思われる。

以上のようなウエルシュ菌食中毒の問題点を明らかにしていくために、ウエルシュ菌の分子疫学的検査法を充実させる必要があると思われる。そこで本研究では1) 分子疫学的検査法に適したウエルシュ菌の高効率分離法の検討、2) エンテロトキシン遺伝子の存在部位によるウエルシュ菌タイプング法の検討、3) 新型エンテロトキシン遺伝子をマーカーとした検査法の検討をおこなう。今年度はウエルシュ菌の高効率分離法について文献調査を行った。

## B. 研究方法

一般に公開されている論文および通知法からウエルシュ菌の分離方法に関する情報を収集した。

## C. 研究結果

### 1. 培養法

従来行われてきた培養法は直接培養法、増菌培養法、パウチ法に分けられる。一般的に食品 25g と希釈液 225ml を攪拌混合し試料原液を作成する。ここから試料希釈液を作成し、試験に供する。芽胞の検出には 75°C、10 分間の加熱を行う。増殖型が多数を占めると考えられる試料では試料の加熱処理は行わない。ウエルシュ菌検査の場合には直接培養法と増菌培養法を並行して行

うことも多い。

直接培養法は塗抹培養法と混積培養法とに分かれる。塗抹培養法は国内で多く用いられており、卵黄加 CW 寒天培地で一晚培養するのが一般的である。一方、FDA 法や FSIS 法では卵黄加 TSC 寒天培地を用い  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $20 \pm 2$  時間 (FDA 法) もしくは  $35^{\circ}\text{C}$ 、24 時間 (FSIS 法) 嫌気培養を行う。TSC 寒天培地は D-シクロセリンが添加されているため発育集落を小さく抑え、ウエルシュ菌集落を黒変されるため海外でよく使用される。

混積培養法は主に海外で使用されている。試料液 1ml と TSC 寒天培地を混和し、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $20 \pm 2$  時間 (ISO 法) もしくは  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $20 \pm 2$  時間 (FDA 法) 嫌気培養する。

増菌培養は試料液を TGC 培地に接種し  $43\text{--}46^{\circ}\text{C}$ 、4-6 時間もしくは  $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ 、一晚以上培養する。海外ではクックドミート培地 (FDA 法) やチョップドレバーブイヨン (FDA 法) を用いて、 $35^{\circ}\text{C}$ 、24-48 時間での増菌が推奨されている。増菌の後、卵黄加 CW 寒天培地で  $37^{\circ}\text{C}$ 、一晚もしくは卵黄加 TSC 寒天培地 (FDA 法) で  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $20 \pm 2$  時間の分離培養を行う。培地に発育した直径 1-3 mm の黒色集落を推定ウエルシュ菌として確認試験に供する。

## 2. パウチ法

嫌気性菌培養用パウチを用いる培養方法である。培地にはハンフォード改良培地がしばしば用いられる。この方法では試料液

10ml をパウチに入れ、溶解後  $50^{\circ}\text{C}$  に保温していたハンフォード改良培地を 15ml 加え混合する。培地の気泡を抜き、寒天が固まるのを待ってからパウチをシールし、 $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  で 22 から 26 時間培養する。

## 3. NIHSJ (標準試験) 法原案

国際的な食品の規準を決めるコーデックス委員会では、各国の食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示している。この中で ISO 法を標準とし、この方法かもしくは科学的な妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。国立医薬品食品衛生研究所に事務局を置く微生物標準試験法検討委員会では国際協調の観点から、ISO 法と科学的根拠のある妥当性確認を行った NIHSJ (標準試験) 法の整備を行ってきた<sup>8)</sup>。ウエルシュ菌の試験法は現在、原案が示された段階であり、今後パブリックコメントの収集やコラボラティブスタディの実施を経て最終的な標準試験法が作成される予定である<sup>8)</sup>。図 1-3 にこの原案の概略を示す。NIHSJ (標準) 法原案では試料液 1ml と  $44\text{--}47^{\circ}\text{C}$  に保温した TSC 寒天培地を混積し、培地が固化後、さらに TSC 寒天培地を 10ml 重層する。固化後、 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $20 \pm 2$  時間嫌気培養する。培養後、TSC 寒天培地に形成された黒色集落から任意の 5 集落を選定し確認試験を実施する。確認試験は 1) LS 培地を用いた方法 (図 2) もしくは 2) NM 培地および LG 培地を用いた方法 (図 3) で行う。LS 培地を用いた確認試験では

選定した集落を液状チオグリコレート培地 10ml に接種し、 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、18-24 時間嫌気培養する。培養液をダーラム管入り LS 培地 8ml に接種した後、 $46^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、18-24 時間嫌気培養する。培養後の LS 培地が黒変し、ダーラム管内の 1/4 以上にガスの存在が認められた場合、ウエルシュ菌陽性と判定する。NM 培地および LG 培地を用いた確認試験では選定した集落を NM 培地および LG 培地に接種し、 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、24 時間嫌気培養する。NM 培地で運動性が認められず、硝酸塩還元が認められ、また、LG 培地で乳糖発酵およびゼラチンの液化が認められた場合、ウエルシュ菌陽性と判定する。

#### 4. コロニーハイブリダイゼーション法

食品から分離されるウエルシュ菌のうちエンテロトキシン遺伝子を保持する株の割合は低い。また、動物の腸管内ではエンテロトキシン産生株と非産生株が共存しているが、産生株は非産生株の 1 万分の 1 から 10 万分の 1 という非常に低い割合で存在しているとの報告もある。よって、従来の方ではエンテロトキシン産生株を分離するために非常な労力を必要とし、また見落としも多かったと思われる。こういった従来法の欠点を補うために、コロニーハイブリダイゼーション法を利用した方法が考案されている<sup>9)</sup>。この方法の概要を図 4 に示す。これらの方法ではウエルシュ菌集落を含む細菌集落を寒天平板に発育させる。この平板にナイロンメンブレンを押し当てコロニ

ーを転写する。平板は嫌気条件下で保存しておく。紫外線クロスリンカーを用いてメンブレン上に細菌の DNA を固定した後、エンテロトキシン特異的 DNA プローブをハイブリダイゼーションする。発色気質を用いてエンテロトキシン特異的 DNA プローブが結合したコロニーを特定し、対応したコロニーを保存しておいた平板から回収する。コロニーハイブリダイゼーション法では 60 万個のウエルシュ菌コロニーの中の 1 個のエンテロトキシン産生株を検出することができる。また、プローブを変更することによってエンテロトキシン産生株だけでなく様々な菌株を高効率に分離できるものと考えられる。

#### 5. 密度勾配遠心分離法

ウエルシュ菌は食肉からは比較的高率に分離されるが、野菜などからの分離率は低い。そこで、少量の菌体を効率よく回収する方法が必要である。大量の試料原液から密度勾配遠心分離を用いて菌体を濃縮方法が開発されている<sup>10)</sup>。この方法の概要を図 5 に示す。この方法ではまず試料原液を低速度で遠心分離を行い、大きな食品由来の残渣を取り除く。上清をさらに高速遠心分離する。沈査には菌体および微細な食品残渣が含まれている。菌体と沈査を分離するために沈査をパーコールを用いた密度勾配遠心分離にかける。この方法を用いると 250ml の試料原液を  $50\mu\text{l}$  にまで濃縮することができる。この濃縮液を培養法を用い



て菌を分離し、さらに PCR 検査を行うことができる。理論上、検体 1g あたり 1-10 個の菌が含まれていれば、菌を回収することができる。

#### D. 考察

ウエルシュ菌の分離方法について、通知法や文献から情報を収集した。今回収集した試験法は、従来から行われている培養法、一度にプレート全体のコロニーに対して試験を行うことのできるハイブリダイゼーション法、試料原液から菌を濃縮し検出効率を向上させた密度勾配遠心分離法に分けられた。培養法に関する最近の動きとして微生物標準試験法検討委員会からウエルシュ菌に関する NIHSJ（標準試験）法の原案が示されたことである。この試験法は基本的には ISO 法に準じたものであり、培地が従来国内ではあまり使用されていなかった TSC 寒天培地を用いるのが特徴である。今後、TSC 寒天培地上のウエルシュ菌集落の特徴や類似菌の発育や集落性状の検討、TSC 寒天培地と卵黄加 TSC 寒天培地の比較、ウエルシュ菌確認試験法の検討、ウエルシュ菌添加食品によるコラボラティブスタディなどの結果を踏まえ、最終案が提案される予定となっている。

ウエルシュ菌は分離頻度が低いため試験法の簡便性と菌の分離効率は試験法を選択するうえでの重要なポイントである。簡便性という点ではパウチ法及び TGC 培地を用いた増菌培養法が嫌気培養を必要としない

ため、試験を行いやすいと思われる。集落の分離を必要とする場合には増菌培養法ではさらに何らかの寒天平板上でコロニーを発育させる必要がある。一方、パウチ法は個々の集落を確認できるうえに、培地に接種できる試料液が 10 ml であるため、他の培養法に比べて検出感度にも優れていると思われる。このことからパウチ法は、簡便性と検出感度のバランスの取れた試験法と考えられる。

本研究の目的のひとつは環境中でのウエルシュ菌の分布を明らかにするためのタイピング手法を構築することである。そのために、少量の菌を検出できる高感度な方法が必要である。従来の培養法では感度の面で不安があった。PCR 法と組み合わせることによって少量の菌を検出できるが、菌を分離することができなくなる。また、培養という段階を経るため、培養後の菌株の分離頻度が、自然界でのそれを反映していない可能性がある。特に目的とする菌株が非常に少量の場合、培養後、他の主要な菌株に隠れてしまい、検出できなくなる可能性がある。そのため、なるべく培養を行わずに少量の菌を濃縮し、また多くの菌株間に混在する少量の菌株を検出、分離する方法が必要である。コロニーハイブリダイゼーション法は 1 コロニー単位でタイピングを行うことができるため、少数の菌株も見逃すことなく検出できると考えられる。しかも菌体を回収し、今後の実験に使用することができる。一方、密度勾配遠心分離法は

食品中に含まれる菌の培養を経ずにそのまま濃縮する方法であるため、培養前の菌株間の存在比率や、菌株間の増殖速度の違いなどに影響されることなく分離することができる。これらの方法は従来の培養法の欠点を補う試験法として使用することができ、より正確なタイピングを行うことができると考えられる。

#### E. 結論

ウエルシュ菌の分離法に関して文献調査を行った。現在、NIHSJ（標準試験）法のまとめが進んでおり、将来的には、この試験法に移行してくものと思われる。しかしながら、試験の簡便性と検出感度の良さから、パウチ法も簡易検査法として今後も利用されていくものと思われる。

環境中のウエルシュ菌の分布を明らかにするための試験ではコロニーハイブリダイゼーション法や密度勾配遠心分離法が有用であることが明らかになった。今後、これらの試験法を検査目的に合わせて選択し、また組み合わせていくことによって、高感度かつ高精度の分離を行うことができ、バイアスの少ないタイピングを行うことができるものと考えられる。

#### F. 参考文献

1. Miki Y, Miyamoto K, Kaneko-Hirano I, Fujiuchi K, Akimoto S (2008) Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl Environ Microbiol* 74:5366-5372, 74, 5366-5372
2. Lindstrom M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H (2011) Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol* 28:192-198, 28, 192-198
3. 門間千恵, 柳川義勢, 畠山薫, 小畑浩魅, 横山啓子, 新垣正夫, 甲斐明美, 諸角聖, 五十嵐英夫, 伊藤武: 新型エンテロトキシンを産生すると推定されたウエルシュ菌とその下痢原生毒素について. 日本細菌学雑誌 54: 120, 1999
4. Li J, McClane BA (2006) Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Appl Environ Microbiol* 72:7620-7625, 72, 7620-7625
5. Li J, McClane BA (2006) Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl Environ Microbiol* 72:4561-4568, 72, 4561-4568

6. Miyamoto K, Fisher DJ, Li J, Sayeed S, Akimoto S, McClane BA (2006) Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J Bacteriol* 188:1585-1598, **188**, 1585-1598
7. Lahti P, Heikinheimo A, Johansson T, Korkeala H (2008) *Clostridium perfringens* type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. *J Clin Microbiol* 46:371-373, **46**, 371-373
8. 食品からの微生物標準試験法検討委員会：食品からの微生物標準試験法。  
<http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html>, 2013
9. Heikinheimo A, Lindstrom M, Korkeala H (2004) Enumeration and isolation of cpe-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. *J Clin Microbiol* 42:3992-3997, **42**, 3992-3997
10. Fukushima H, Katsube K, Hata Y, Kishi R, Fujiwara S (2007) Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 73:92-100, **73**, 92-100
- G. 研究発表  
論文発表  
なし  
学会発表  
なし

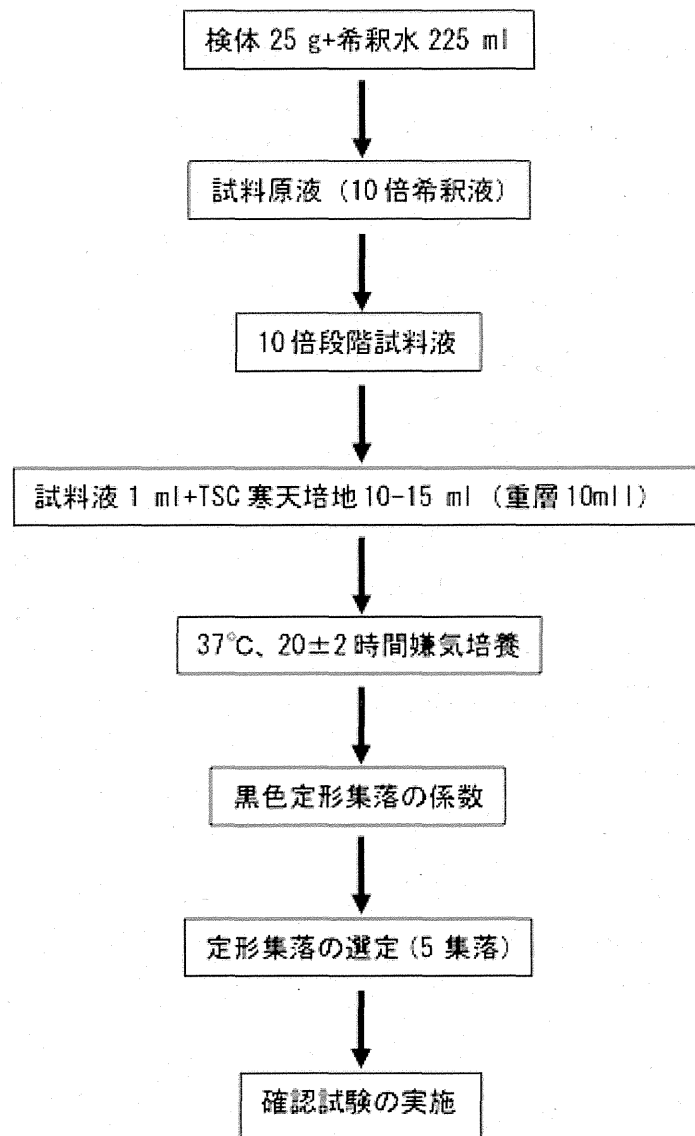


図1 NIHSJ (標準試験) 原案の概要