

図2 NIHSJ (標準試験) 原案における LS 培地を用いた確認試験

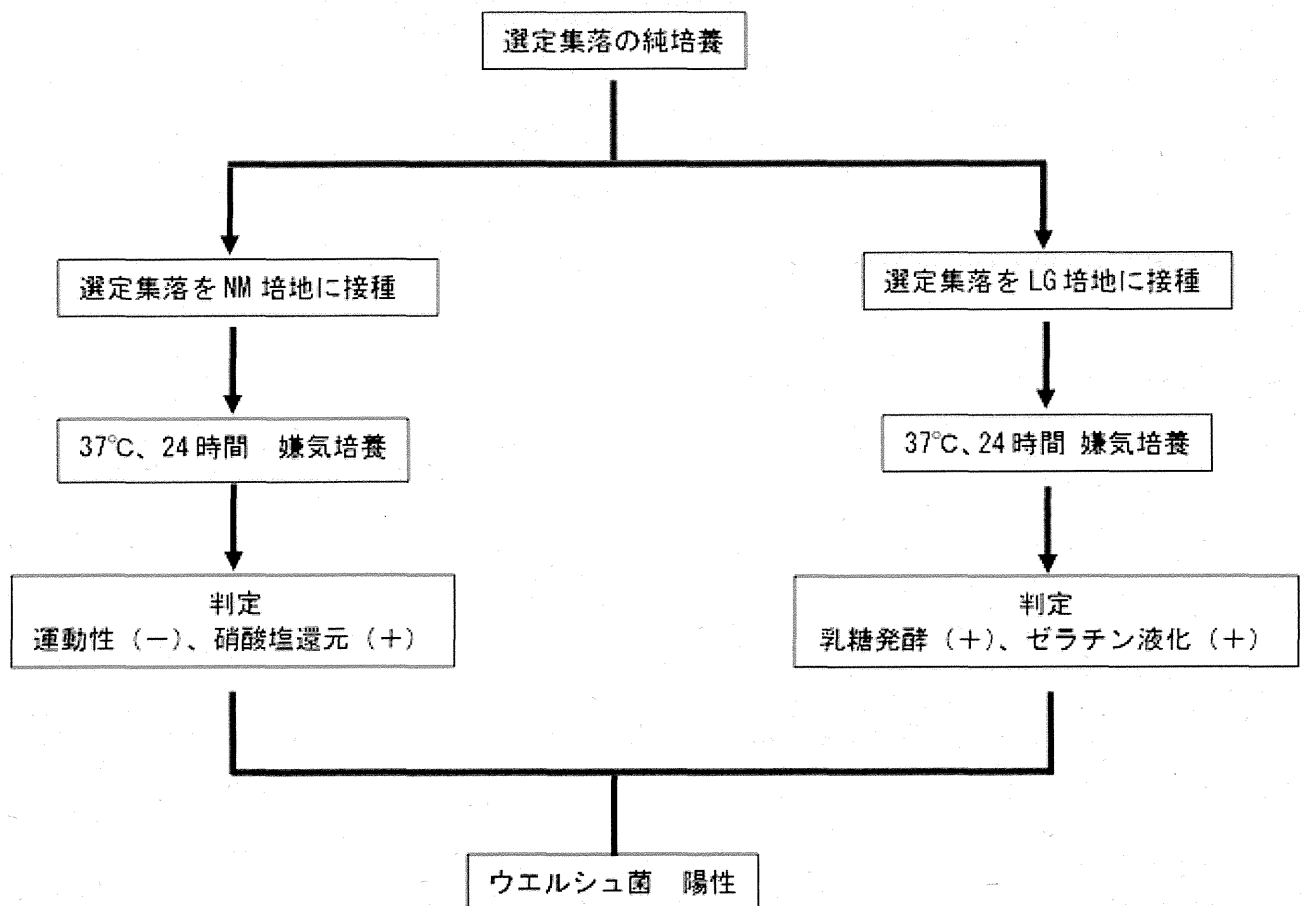


図 3 NIHSJ (標準試験) 原案における NM 培地、LG 培地を用いた確認試験

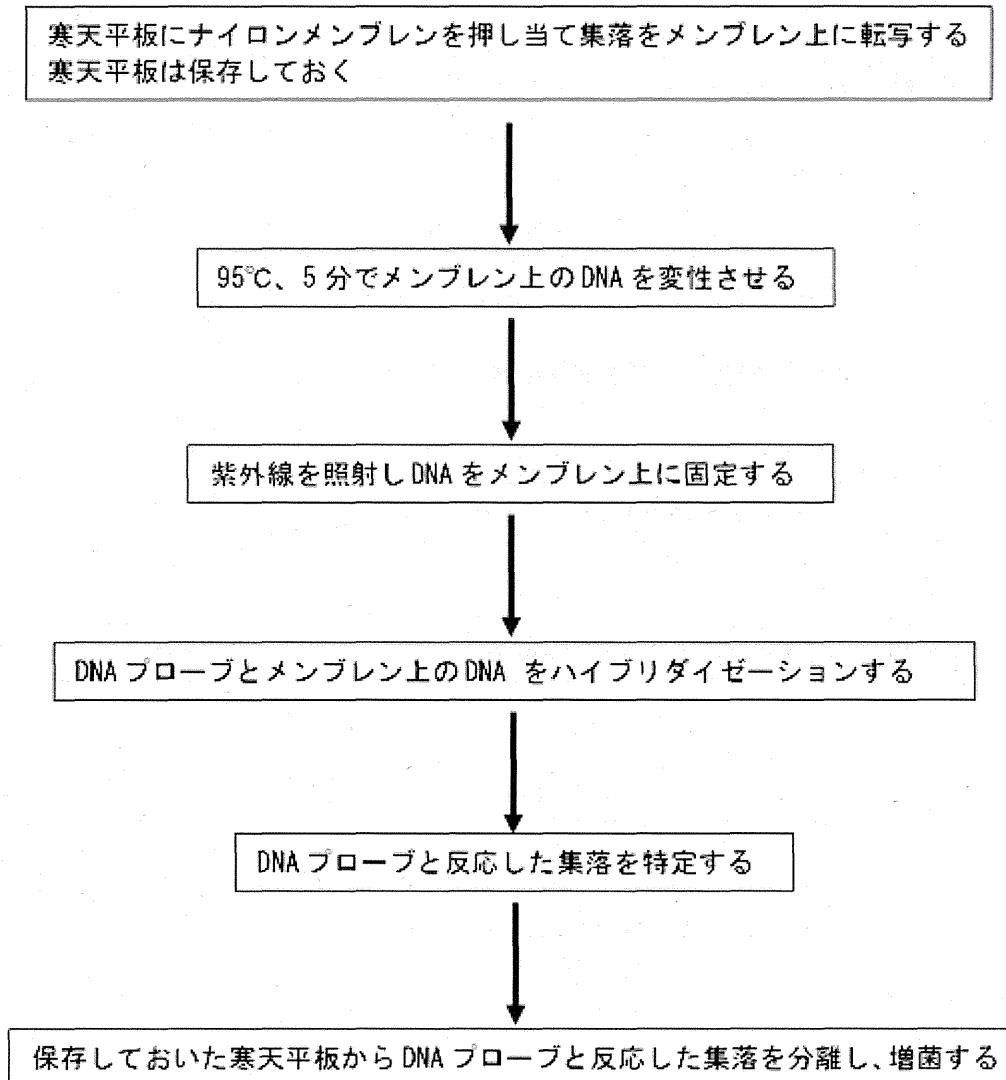


図4 コロニーハイブリダイゼーション法の概要

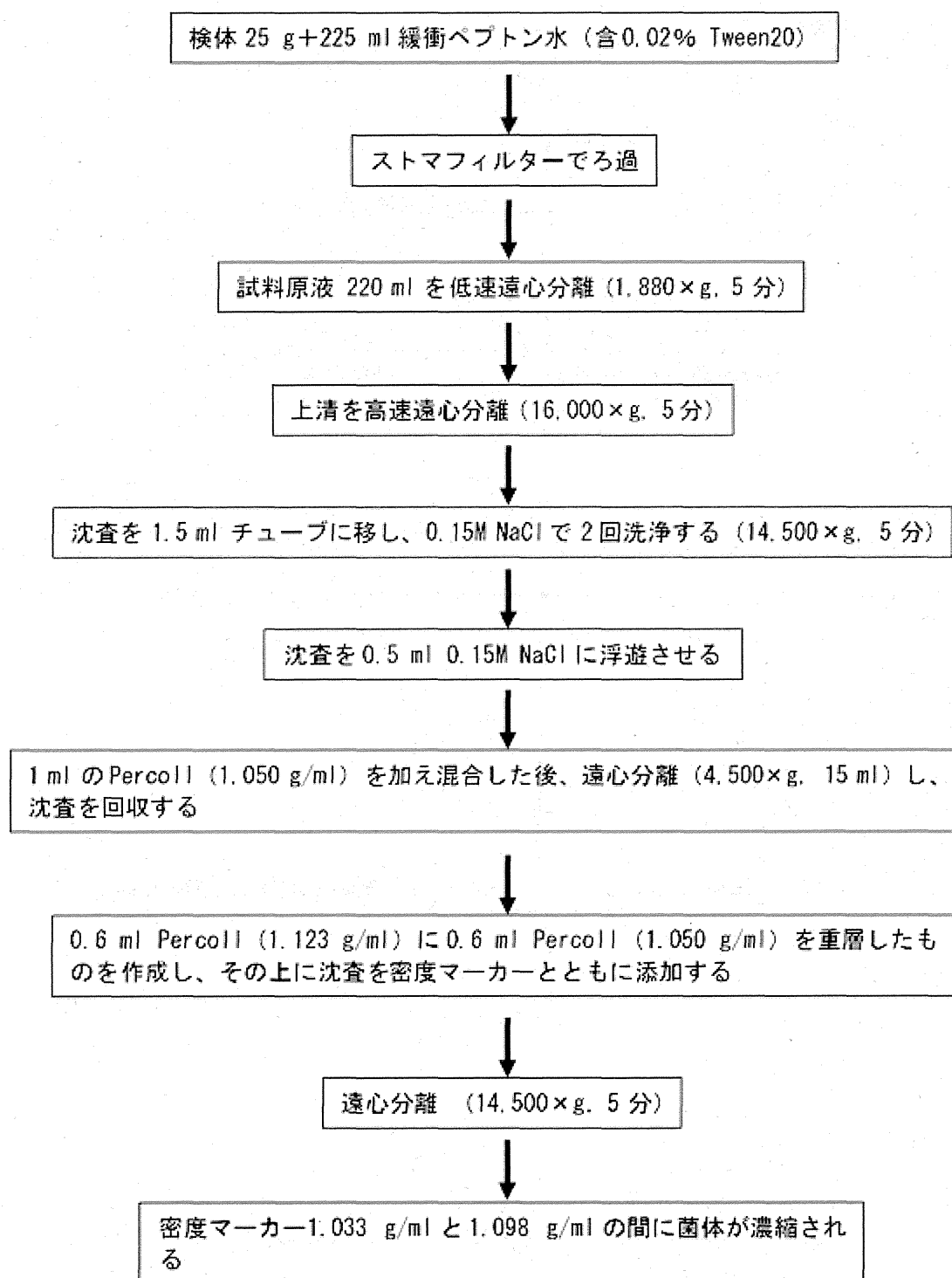


図5 密度勾配遠心分離法の概要

分 担 研 究 報 告 書

サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法

泉谷 秀昌

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

サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 黒田 誠（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

研究協力者 関塚剛史（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

本研究班では、食中毒の予防・迅速な原因食品究明に役立つ、食品中の食中毒菌の情報、とくにその遺伝的特性に関する研究を行う。本研究ではサルモネラ属菌に着目し、そのサーベイランス体制を充実させるための遺伝特性の開発およびタイピング法の検討などを行う。本年度はサルモネラの病原因子パネルに基づく *irp2* 遺伝子のマーカーとしての有用性から、本遺伝子の周辺構造の解析を行った。また、近年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。

A. 研究目的

サルモネラは国内外を問わず主要な食中毒菌の一つであり、公衆衛生上非常に重要な位置を占めている。わが国では 1990 年代から 2000 年代にかけて *Salmonella* Enteritidis による食中毒事例が多発し大きな問題となった。2000 年代以後はサルモネラによる食中毒事例および患者数は減少したものの、主要な食中毒菌であることに変わりはない。

サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれ、近年では SE 以外の血清型でも食中毒が発生しており、今後は SE 以外のサルモネラへの対応が必要となってくる。

SE 以外にヒトからの分離頻度が高い血清型としては Typhimurium、Infantis などがあり、とくに Infantis は鶏肉から高頻度に分離される。また SE は鶏卵あるいは鶏肉などの食品（加工品）が主たる感染源となっている。

このように、サルモネラに関しては本菌感染と食品の結びつきが大変強い。したがって、本菌に関して、ヒトおよび食品でサーベイランスを実施することは重要な課題であり、その遺伝特性を解析し、そこから有用なマーカーなりタイピング法なりを開発・検討することが本研究の目的である。

B. 研究方法

サルモネラには多くの病原因子あるいは病原因子と推測されている産物をコードする遺伝子が報告されている。Huehn ら (AEM, 2009, 75, 1011-1020.) は血清型 4:d:-株に着目し、Salmonella Pathogenicity Island 等の病原因子などを指標としたマイクロアレイを行い、菌株特異的な病原因子レパートリーの抽出を行った。本研究では、上記に挙げられた病原因子等および、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。PCR は 1 反応あたり 2-3 遺伝子を検出するマルチプレックス PCR で行った。

irp2 陽性株 Hd160 から、パルスフィールドゲル電気泳動法におけるプラグ調製と同様に DNA の調製を行った。当該プラグを S1 ヌクレアーゼ処理し PFGE にかけた (S1-PFGE)。約 300kb のバンドを切り出し、DNA を精製した。精製 DNA を Illumina NEXTERA XT kit にてライブラリーを作製した。Miseq シークエンサーにて解読後、情報解析を行った。

*S. I 4:-*に関して、EFSA J. 8, 1826 (2010) に記載された *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、J. Clin. Microbiol. 47, 3546 (2009) に記載された *hin* 遺伝子の PCR 法について検討

した。

C. 研究結果および考察

病原因子パネルについて、表 1 に今回標的とした遺伝子群を表す。*invA* など SPI に含まれる代表的な遺伝子のほか、SGI1 (Salmonella Genomic Island-1) など耐性遺伝子群にかかわる遺伝子、プロファージ、線毛などの遺伝子も含まれた。

図 1 に血清型 Infantis に関するパネルの結果を表す。いくつかバリエーションを示す遺伝子があったが、本解析において大きく 2 つのグループを形成させるのに寄与しているのは、*irp2* 遺伝子の有無であった。Irp2 (iron regulated protein) は、エルシニアで Yersiniabactin というシデロフォアを合成する遺伝子群に含まれていたものであり、鉄獲得に関連している。本遺伝子は当初、*Y. pestis* などの高病原性株に特異的に見出されたことから High Pathogenicity Island (HPI) とも呼ばれている。

irp2 遺伝子周辺の構造を次世代シーケンサーで解析した。当初、HPI が 35-45kb にわたる染色体性の遺伝子領域であったことから、染色体性が疑われた。しかしながら、Microb. Pathogen. 45, 110 (2008) においては *S. Senftenberg* にてプラスミド性であることが示唆されていた。このことから、S1-PFGE によりプラスミドのバンドを切り出し、ライブラリーを作製し、解析を

行った。その結果、約 300kb のバンド (図 2) 上に *irp2* が含まれていることが示された。これまでのところ、本プラスミドは 8 つの contig からなり、計 280kb の大きさとなっている。8 contig の大きさは 132kb から 1.3kb となっている。*irp2* は 132kb の contig (sc2.1) 上にあり、blast 検索の結果、本 contig は CP006050 と 23kb にわたり 99% の相同性を示した。CP006050 は *S. Typhimurium* 鶏肉株由来であり、HPI 領域を含む約 70kb にわたり sc2.1 と相同であった (図 3)。HPI 以外の contig に関しては、88kb の contig (sc1.1) が CP002968 と部分的に相同であった (図 4)。上記のことから、本プラスミドは複数の既報プラスミドのハイブリッドとなっていることが示唆された。

今回パネル作成に供試した *S. Infantis* に関し、*irp2* 遺伝子の有無をヒト、非ヒト由来でまとめると表 2 のようになる。若干ながら非ヒト由来株に *irp2* 陽性株が多かった。CP006050 は鶏肉由来のサルモネラに保有されていたプラスミドであったが、菌株の由来と *irp2* プラスミド保有との間について、何らかの相関が推測される。

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。サルモネラの血清型別において、H 型別を決めるために相誘導が必要であるが、上記単相菌を PCR によって推測することができれば、時間短縮につながる。欧州食品安全庁 EFSA では上記

Typhimurium 様の単相菌を検索するためのマルチプレックス PCR を紹介している。本 PCR においては *fliB-fliA* 遺伝子間領域および *fljB* 遺伝子を標的としている。前者は *Typhimurium* においては IS200 の挿入によって 1kb となるが、それ以外の血清型では 250bp となる。後者は、2 相目の H 抗原をコードしている。本研究では、上記マルチプレックス PCR について検討した。また、これ以外に相変換のための組換えを起こす *hin* 遺伝子の有無を調べる PCR も検討した。

hin 遺伝子の PCR については、単独では概ね機能した (図 5c) が、上記マルチプレックスに混ぜたところ、増幅効率が極端に低下しバンドは観察されなかった (図なし)。

fliB-fliA + fljB マルチプレックス PCR は、既報の典型的な *S. I 4:i:-* のパターン、すなわち 1kb のバンドのみ現れ、*fljB* が陰性となる株では、良好な結果が得られた (図 5a)。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 (表 1、図 5b)。今回供試した 15 株は、4 株の単相菌のうち 3 株が典型的なパターン、1 株が *Typhimurium* と変わらないパターンであった。また、運動性陰性の株 (*S. I 4:-:-*) も供試したが、こちらは *fliB-fliA* のバンドが約 250bp であったことから *Typhimurium* に由来するものではない、全

く別のクローンと考えられる。*hin* 遺伝子の分布についても、単相菌 4 株中 2 株は陽性であったことから、単相菌の中でも 3 種類の遺伝子構成が観察されたことになる。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。

D. 結論

病原因子パネルの検討を行い、*Infantis* には 2 つのグループが存在することが示唆された。そのグループ分けのマーカーとなる *irp2* 遺伝子は 280kb プラスミド上にコードされていた。*S. I 4:i:-* のスクリーニングについて有用と考えられる PCR の改良を行った。

E. 研究発表等

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

mp01	mp02	mp03	mp04	mp05	mp06	mp07	mp08	mp09	mp10	mp11	mp12	mp13	mp14	mp15	mp16
sefC	hlyE	sopB	prpZ	irp2	stfE	SGI1	stdB	viaB	gtrC	sodC1	siif(spi4_R)gipA	fimA	sopE1	stjB	
ruhM	staA	sugR	pefA	gp36	uidA	safA	msgA	sfaS	bim2	rrtT	ST64b	pefB	gtrA16	xylE	artA
pagJ	STY328OgtrA17	gtrB	allR												
mp17	mp18	mp19	mp20	mp21	mp22	mp23	mp24	mp25	mp26	mp27	mp28	mp29	mp30	mp31	mp32
sopE2	stgA	steB	stcC	bcfC	stiC	safC	lpfD	STY3343invAh	allB	prot6E	gogB	stkC	SPI15	mgtC	
narP	invA	Fels-2	cdtB	K88	spiC	pltA	gpiA	spvB	STM2697sefA	tcfA	sseC	agfA	csgA	STM4595	

表 1. 試験に使用した、病原性に関連する遺伝子および病原性に関連が疑われる遺伝子。設計したマルチプレックス PCR (mp 番号) ごとに分かれています。invAh は invA と同じ遺伝子でプライマーが異なる。

<i>irp2</i>	Human	nonhuman	総計
—	6	2	8
+	3	7	10
総計	9	9	18

表 2. *Salmonella* Infantis における *irp2* の有無と株の由来。

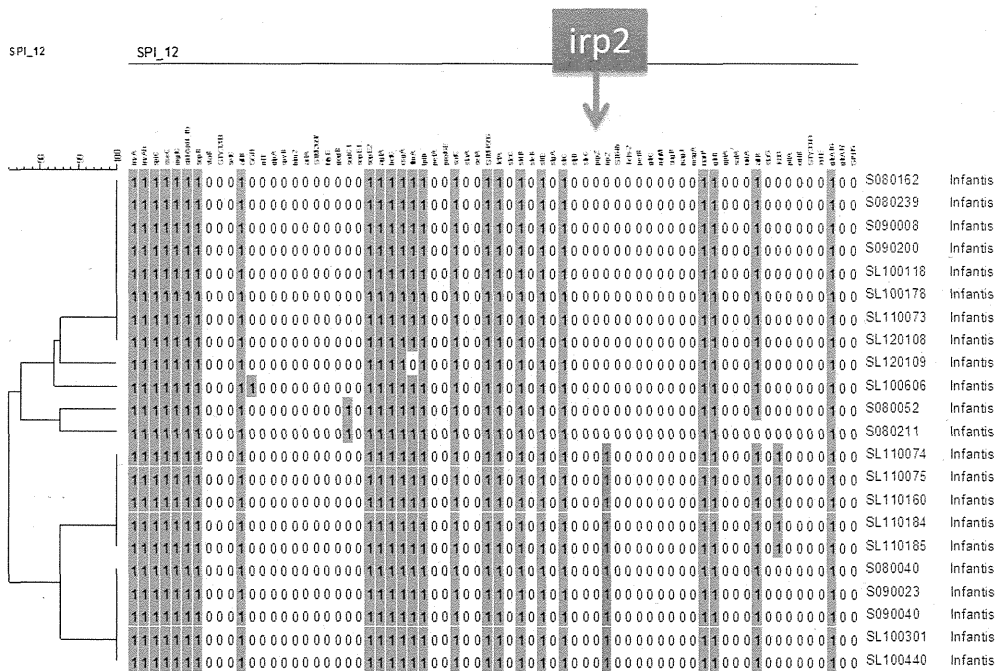


図 1. *S. Infantis* 病原因子パネルの結果に基づくクラスター解析。

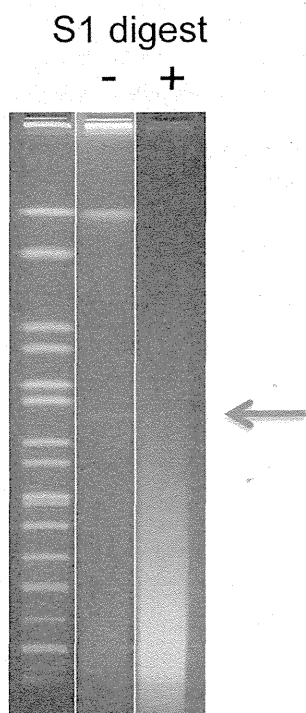


図 2. *irp2* 遺伝子の解析に供したプラスミドの泳動像。矢印は切り出したバンド。

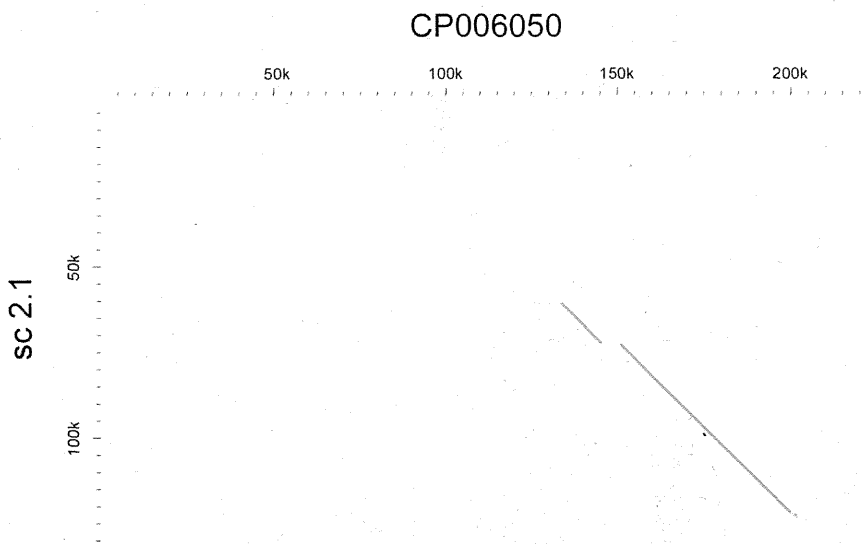


図 3. contig sc2.1 と CP006050 とのドットプロット

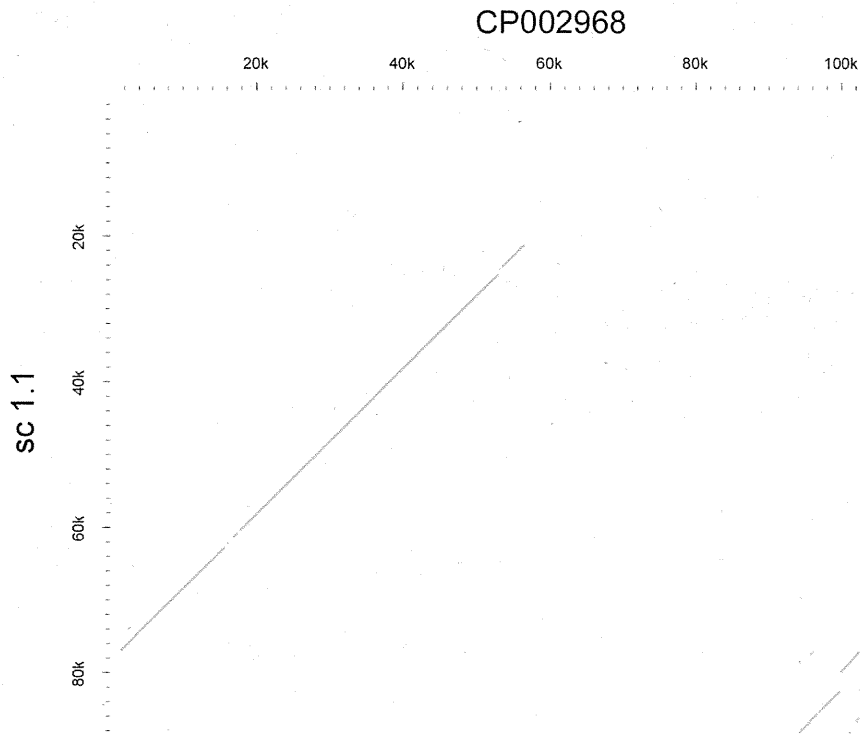


図 4. contig sc1.1 と CP002968 とのドットプロット

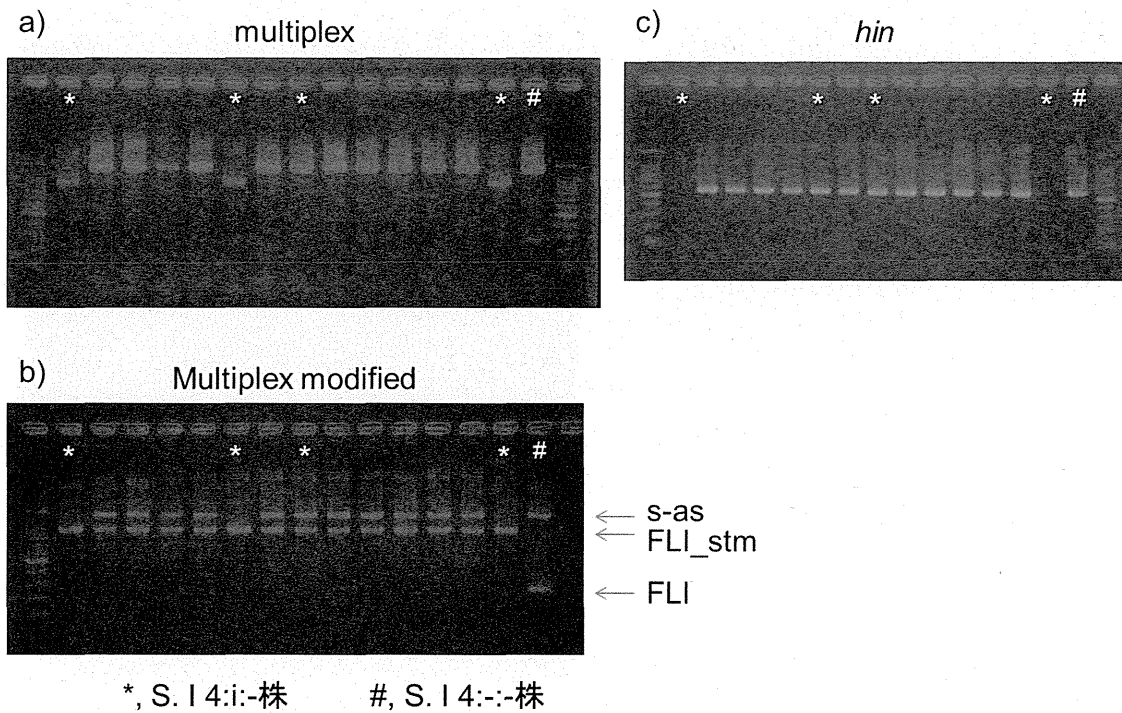


図 5. *S. I 4:i:-*スクリーニング PCR の検討。a) オリジナルマルチプレックス PCR。b) 改良型マルチプレックス PCR。c) *hin* 遺伝子 PCR。*, 単相菌、#, 運動性陰性株。FFLIB-v1/RFLIA_v1 は終

濃度 0.5 μ M、Sense-59/Antisense-83 は 0.05 μ M。a および b のサイクル条件は 95°C 2 分後、95°C 30 秒、64°C 30 秒、72°C 90 秒 (30 サイクル)。c のサイクル条件は 95°C 2 分後、95°C 20 秒、55°C 20 秒、72°C 60 秒 (30 サイクル)。

primer	sequence
FFLIB_v1	GTA CTGGCGACGATCTGTCCGATG
RFLIA_v1	TCAGCGGTATACAGTGAATTCAC
Sense-59	CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG
Antisense-83	GCCATATTTTCAGCCTCTCGCCCG

表 1. *S. I 4:i:-*用スクリーニングプライマーセット 1。

分 担 研 究 報 告 書

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

堀川 和美

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）

分担研究報告書

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

研究分担者 堀川 和美（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 齊藤志保子（秋田県健康環境センター）
研究協力者 小林 昭彦（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）
研究協力者 世良 暢之（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 村上 光一（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 大石 明（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 江藤 良樹（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 前田詠里子（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 岡元 冬樹（福岡県保健環境研究所）

「食品中の食中毒菌等の遺伝毒性及び制御に関する研究」に参加する 4 地方衛生研究所（地研）により市販されている冷凍を経ていない国産鶏肉におけるウェルシュ菌の汚染状況を調査した。各地研で購入した計 83 検体の鶏肉について、パウチ法による推定ウェルシュ菌の計測およびウェルシュ菌の検出を行った。鶏肉の推定ウェルシュ菌数は、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。ウェルシュ菌は 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。さらに、検出された菌株について Hobbs 型耐熱性 A 型ウェルシュ菌血清型別を行ったが、いずれも型別不能であった。

鶏肉の部位別にササミ、モモおよびムネのウェルシュ菌陽性率は、それぞれ 0%、35.3%および 51.6%であった。

A. 研究目的

「食品中の食中毒菌等の遺伝毒性及び制御に関する研究」のため、本年度は集団食中毒事例の多いウェルシュ菌を研究対象とした。研究参加 4 地方衛生研究所（地研）により市販鶏肉についてウェルシュ菌の汚染実態調査を実施したので、その概要を報告する。

B. 研究方法

1. 検査材料

国内で生産され冷凍を経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 検体を用いた。これら鶏肉は、平成 25 年 11 月から平成 26 年 1 月までの間に、4 地研が約 20 検体ずつ購入した。同一系列会社の店舗での重複購入はせず、同一処理業者からの購入とならないよう配慮した。

購入した鶏肉を滅菌した器具により無菌的に細切し、ストマッカー袋に 25 g 採取した。これに滅菌リン酸緩衝生理食塩水 225ml

を加え、約1分間ストマッキング処理を行い、試料原液(10倍)とした。

2. 検査方法

推定ウェルシュ菌数はパウチ法により計測した。ウェルシュ菌数は、パウチ法により検出された黒色コロニーについて生化学的性状試験を行い同定し算出した。手技はいずれも食品衛生検査指針¹⁾に準拠した。

2-1 推定ウェルシュ菌数計測

ストマッカー処理した10倍希釈液をさらに滅菌リン酸緩衝生理食塩水で10倍段階希釈し、100倍希釈液を作製した。各希釈段階について2枚のパウチに10mlずつ注入し、これに予め溶解後50℃に保温したハンドフォード改良培地(栄研化学)を15ml加え混和し、気泡が封入されないように注意してパウチの首部分をヒートシールした。寒天が固化した後、46±1℃で22-26時間培養した。直径約1-3mmの黒色集落数を計測し、推定ウェルシュ菌数を算定した。

2-2 ウェルシュ菌数計測

パウチ袋の表面をアルコール綿で消毒した後、1検体あたり最大10コロニーをカナマイシン加CW寒天培地(栄研化学)に釣菌し、36±1℃で18-24時間嫌気培養した。レシチナーゼ反応が認められたコロニーについて、同定検査を実施した。確認試験として、運動性-硝酸塩還元(MN)培地、乳糖-ゼラチン(LG)培地、好気培養試験およびGram染色を行い、非運動性、硝酸塩還元試験陽性、乳糖分解およびゼラチン液化試験陽性で好気培養非発育のGram陽性桿菌をウェルシュ菌と同定した。ウェルシュ菌数は、推定ウェルシュ菌数と同定された菌数から換算した。

2-3 エンテロトキシン産生遺伝子の確認

ウェルシュ菌と同定された菌株について、ウェルシュ菌毒素産生遺伝子検出用プライマー(TaKaRa)を用い、PCRによりエ

ンテロトキシン産生遺伝子の有無を確認した。

2-4 血清型別

ウェルシュ菌と同定された菌株について、耐熱性A型ウェルシュ菌免疫血清(デンカ生研)を用いて、血清型別を行った。抗原液は100℃で1時間あるいは121℃で15分加熱処理した。なお、被検菌株のA型毒素産生性は確認していない。

C. 研究結果

推定ウェルシュ菌数の分布を図1および表1に示した。83検体中36検体(43.4%)が1CFU/g未満であった。推定ウェルシュ菌が検出された56件のうち27検体は1-4CFU/g、9検体は6-10CFU/gおよび11検体は11-49CFU/gで、それぞれ17検体、5検体および7検体からウェルシュ菌が確認された。推定ウェルシュ菌数の最大値は東北産ムネの49CFU/gであったが、同検体からウェルシュ菌は検出されなかった。

ウェルシュ菌数の分布を図2に示した。83検体中54検体(65.1%)が1CFU/g未満であった。ウェルシュ菌の最大値は、東北産のムネから検出された24CFU/gであった。

部位別の推定ウェルシュ菌検出率はモモ58.8%、ムネ74.2%およびササミ0.0%であった(表2)。さらに、各部位のウェルシュ菌の検出率は、モモ35.3%、ムネ51.6%およびササミ0.0%で、ササミの汚染は他に比べ低かった(表2)。参考までに生産地別のウェルシュ菌検出率を表3に示した。今回の調査では、四国・九州地域で生産された鶏肉のウェルシュ菌汚染率は12.5%であり、他の地域に比べ低い傾向が見られた。

分離されたウェルシュ菌のうち237株について、PCR法によりエンテロトキシン産生遺伝子保有の確認を行ったが、すべて陰

性であった。また、これら 237 株について血清型別試験を行ったが、いずれも型別不能であった。

D. 考察

国内におけるウェルシュ菌食中毒は、厚生労働省の食中毒統計によると、その年により変動はあるものの年間約 20-40 件で平均約 30 件に留まり、全事例数の数%である。しかし、本菌による食中毒は 1 事例あたりの患者数が多く、平成 24 年ではノロウイルス、カンピロバクターに次いで多く(表 4)、26 事例中 11 例は患者数が 50 名を超える事例であった。この要因として、煮込み料理など大量に調理された食品が原因食品であることが挙げられる。特に食肉が関係した原因食品が多い²⁾。食肉製品は還元物質を多く含み、これらを使用した大量食品中では酸化還元電位が下がり易く、ウェルシュ菌の増殖に適した条件となるためである。食中毒事例の原因物質の原材料に鶏肉が多く含まれていることも報告²⁾されている。

本菌は健康なヒトや動物の腸管内、土壌、下水などの自然界に広く常在している。食肉、特に鶏肉の本菌汚染は、食肉の生産工程における鶏の腸内容物や調理・加工中の環境からの経路が考えられる。福岡県(福岡市、北九州市、久留米市および大牟田市を除く)で平成 17 年 - 24 年の 8 年間に実施した収去検査では、ウェルシュ菌が検出された検体は鶏肉のみであった³⁾。一方、平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保推進研究事業)地方衛生研究所のネットワーク構築に関する研究⁴⁾において、鶏肉を対象としたウェルシュ菌の汚染実態調査を実施、100 検体のうち 37 検体からウェルシュ菌が検出されているが、今回同様エンテロトキシン産生性遺伝子を保有

したウェルシュ菌は検出されていない。しかし、ウェルシュ菌の食中毒事例分離株はほとんどがエンテロトキシン産生性遺伝子保有株であることから、今後検査対象を変えた汚染実態調査等の検討が必要と考えられる。

E. 結論

今回の調査では、市販の冷凍を経ない国産鶏肉 83 検体中 29 検体からウェルシュ菌が検出された。しかし、エンテロトキシン産生遺伝子を保有したウェルシュ菌は、検出されなかった。また、これらの分離株は、市販血清では型別出来なかった。

F. 参考文献

1. 食品衛生検査指針 微生物編 2004. 厚生労働省監修、p297-305、社団法人日本食品衛生協会、(2004)
2. 門間千枝、伊藤武: 食品由来感染症と食品微生物. 仲西寿男、丸山務監修、p380-400、中央法規出版、(2009).
3. 福岡県保健環境研究所年報:(2005-2012)
4. 小西良子ら: 厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保推進研究事業)地方衛生研究所のネットワーク構築に関する研究、p97-100、(2013)

G. 健康危険情報

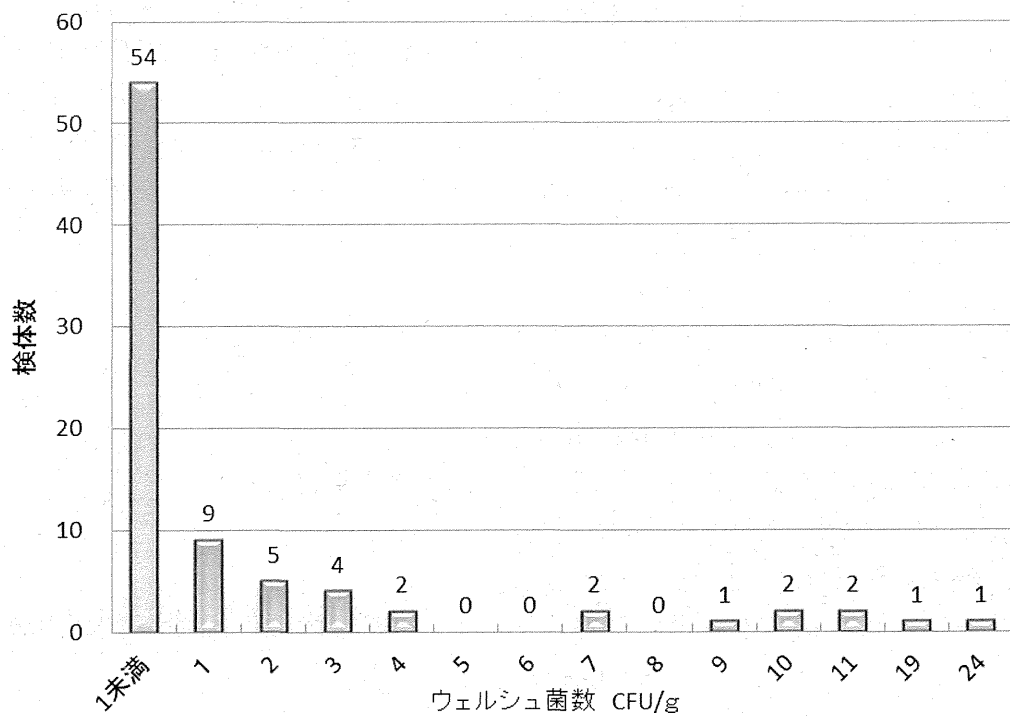
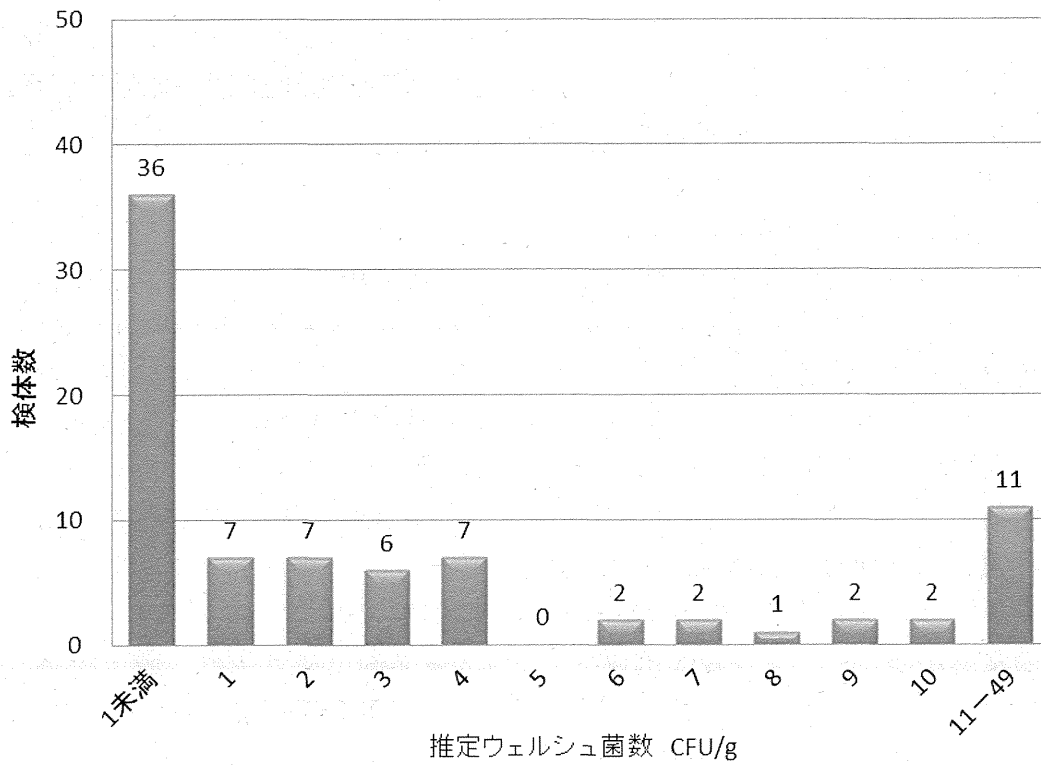
なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願、登録状況

なし



部位	検査数	検体数					
		推定ウェルシュ菌数、CFU/g					
		1未満	1-5	6-10	11-20	21-100	101以上
モモ	34	14	11	5	4	0	0
ムネ	31	8	14	4	2	3	0
ササミ	14	14	0	0	0	0	0
テバ	4	0	2	0	2	0	0
計	83	36	27	9	8	3	0

部位	検体数	陽性検体数 (%)	
		推定ウェルシュ菌	
		推定ウェルシュ菌	ウェルシュ菌
モモ	34	20 (58.8%)	12 (35.3%)
ムネ	31	23 (74.2%)	16 (51.6%)
ササミ	14	0 (0.0%)	0 (0.0%)
テバ	4	4 (100.0%)	1 (25.0%)
計	83	47 (56.6%)	29 (34.9%)

表 3. 生産地域別の推定および確定ウェルシュ菌検出検体数

生産地域	検体数	陽性検体数 (%)	
		推定ウェルシュ菌	
		推定ウェルシュ菌	ウェルシュ菌
東北	35	24 (68.6%)	19 (54.3%)
四国・九州	8	2 (25.0%)	1 (12.5%)
産地不明国産	40	21 (52.5%)	9 (22.5%)
計	83	47 (56.6%)	29 (34.9%)

表 4. 日本における平成 18 年－24 年の食中毒事例数と平成 24 年の食中毒患者数*

原因物質	事例数							患者数		
	18年	19年	20年	21年	22年	23年	24年	24年		
総数	1,491	1,289	1,369	1,048	1,254	1,062	1,100	(%)	26,699	(%)
細菌	774	732	778	536	580	543	419	(38.1)	5,964	(22.3)
サルモネラ	124	126	99	67	73	67	40	(3.6)	670	(2.5)
黄色ブドウ球菌	61	70	58	41	33	37	44	(4.0)	854	(3.2)
ウェルシュ菌	35	27	34	20	24	24	26	(2.4)	1,597	(6.0)
カンピロバクター	416	416	509	345	361	336	266	(24.2)	1,834	(6.9)
ウイルス	504	348	304	290	403	302	432	(39.3)	18,637	(69.8)
化学物質	15	10	27	13	9	12	15	(1.4)	136	(0.5)
自然毒	138	113	152	92	139	69	97	(8.8)	267	(1.0)
その他	7	8	17	17	28	68	107	(9.7)	491	(1.8)
不明	53	78	91	100	95	68	30	(2.7)	1,204	(4.5)

*厚生労働省による食中毒統計

