

201426027A

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 26 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 27 (2015) 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	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	25
泉谷 秀昌 (国立感染症研究所 細菌第一部)	

ウエルシュ菌選択分離培地としての酵素基質培地の有用性	33
堀川 和美 (福岡県保健環境研究所 保健科学部)	

食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について	47
齊藤志保子 (秋田県健康環境センター 企画管理室)	

<i>Campylobacter jejuni</i> の遺伝子型別法の評価	63
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	75
小西 良子 (麻布大学 生命・環境科学部)	

遺伝子検出法と培養法を用いたエンテロトキシン産生性 非産生性ウエルシュ菌の食品汚染実態調査	93
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	100
----------------------	-----

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 26 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、食中毒予防には日常業務における継続した食品微生物汚染のサーベイランス調査を行い、得られた情報をもとに対策を検討することが重要である。本研究では日常業務で負担が少ない簡便なタイピング手法を構築することを目標としている。また、また輸入食品等の安全性を確保するために、わが国の実情に則したサンプリング手法を検討する。今年度は以下の項目を検討した。

- 26 のウェルシュ菌遺伝子を対象とした PCR を行い、ウェルシュ菌のタイピングに有効であることを確認した。
- 乾物を対象としたウェルシュ菌芽胞の汚染実態調査を行ったところ、乾物はウェルシュ菌の汚染源として十分注意しなければならないことが明らかとなった。
- ウェルシュ菌の分離を容易にするために酵素基質培地である CHROMagar™ *C. perfringens* 試作品の培地性能について検討したところ、本培地の選択性、発育支持能、鑑別能は、ECW+培地と比べて遜色ないものであった。
- *Salmonella* I 4:i:-に対して *fliAB*、*fljB*、*hin* 遺伝子を対象としたスクリーニングが有効であることを明らかにした。
- *Campylobacter jejuni* の PFGE 法に代わるタイピング法として comparative genomic fingerprinting 40 を検討し、最適条件を決定した。
- 食中毒由来黄色ブドウ球菌を用いて POT 法や MLVA 法の有効性を確認したところ PFGE に匹敵する解析力を有し、有用な型別法と考えられた。
- 食品の輸出入時において安全な食品を確保するためのサンプリング時において、サンプリング数が少ない場合、プレエンリッチメント法とプール法が有効であることを示した。

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

西田 雅博	福岡県保健環境研究所
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
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
余野木伸哉	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
曾根 美紀	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
樫尾 拓子	秋田県健康環境センター
武沼 浩子	青森県環境保健センター
岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
小黒 祐子	福島県衛生研究所
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、対策を検討することが重要である。しかし、現在行われている検査手法の多くは検査に多くの時間を要し、日常的なサーベイランスに用いるには検査機関の負担が大きくなる。また、検査手法によっては検査機関同士データを比較したり、過去のデータとの比較が困難なものもある。そこで、簡便でかつ迅速で、日常的に行っても負担が少なく、結果の判定・比較が容易な信頼性の高い検査法が望まれている。本研究ではこのような目的に使用できるタイピング手法を開発することを目標に研究を進めている。本年度は以下の課題について研究を行った。

- ウェルシュ菌のタイピングを容易にするために26のウェルシュ菌遺伝子を対象としたPCR法について検討した。また近年、従来のエンテロトキシンとは異なる新規のエンテロトキシンを産生するウェルシュ菌株が見いだされている。そこで、ウェルシュ菌の汚染源として注目されている乾物や牛糞便からウェルシュ菌の分離を行い、毒素産生性について調査した。さらにウェルシュ菌の分離には、卵黄反応を釣菌指標とした分離培地が広く用いられている

が、卵黄反応が不明瞭であることに起因して鑑別に苦慮することがある。そこで、新しい鑑別培地の性能を検討した。

- 近年欧米で報告の相次いでいる *Salmonella* I 4:i:- について、昨年度改良を施したスクリーニング用 PCR に加えて MLST による検討を行った。
- 昨年度行った鶏肉汚染実態調査で分離された黄色ブドウ球菌について POT 法、MLVA 法が有用であることが明らかになったため、今年度は実際の食中毒事例における応用の可能性を検討するため、黄色ブドウ球菌食中毒事例由来株、有症苦情事例や他の原因物質事例で検出された黄色ブドウ球菌について同様に検討した。
- *Campylobacter jejuni* のタイピングには PFGE 法に代わる手法として、PCR 法を用いる型別法：comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) の国内への導入を目的として、CGF40 の操作法の検討ならびに評価を昨年に取り続けた。

また本研究においては、我が国の実情に即した輸入品等の病原微生物検査に適したサンプリングプランを提唱し、その妥当性を検討する。昨年度は諸外国におけるサンプリングプランの情報収集および蛍光ラテックスビーズを用いたモデルを作成し、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、低濃度汚染の病原微生物

の検出は困難であることを示した。しかし、 n 数が多い場合には多大な時間、費用および労力が課されることになる。これらの欠点を解消するためのサンプリング法として、サンプル・プーリング法が使われる場合があり、現在、プレエンリッチメント法とプール法という 2 種類の方法が報告されている。そこで今年度は、2 種類のサンプル・プーリング法（プール法、プレエンリッチメント法）を応用し、食中毒菌であるサルモネラを対象として食品から検出することが可能か検討をした。

B. 研究方法

1. ウェルシュ菌に関する研究

昨年度、鶏から分離したウェルシュ菌株および食中毒事例から分離された 25 株から DNA を抽出し、既に報告されている 26 のウェルシュ菌の病原遺伝子およびハウスキーピング遺伝子を対象とした PCR を行った。その結果から、ウェルシュ菌のタイピングに応用できるか検討を行った。

また、乾物および牛直腸におけるウェルシュ菌の汚染実態を調査するために、液体チオグリコレート培地およびナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地を用いてウェルシュ菌株を分離し、PCR によって *cpe* 遺伝子と *becA* および *becB* 遺伝子の保有を確認した。

ウェルシュ菌の分離を容易にするために、分離培地の選択性、発育支持能、鑑別能等の培地性能を、酵素基質を添加し発育集落の色調により識別を容易にした

CHROMagar™ *C. perfringens* 試作品 (CHROMagar 社、以下 CCP 培地) と従来の卵黄反応を釣菌指標とするカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地 (基礎培地: 日水製薬、以下 ECW+培地) とで比較、検討した。

2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

S. Typhimurium 様の単相菌スクリーニング PCR について昨年改良を施した PCR 法を使い、*fliAB* intergenic region および *fljB* 遺伝子について試験した。PCR による *hin* 遺伝子の試験を行い、必要に応じて塩基配列の決定を行った。また、PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012) に記載の multilocus sequence typing (MLST) を用いた MLST 解析および J. Microbiol. Methods 59(2): 163-172 (2004) に記載された multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) も合わせて検討した。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

CGF40 に用いる PCR 法の条件を設定するために CGF40 の解析結果が既知の標準株 NCTC11168 (ATCC 700819) および RM 1221 (ATCC BAA-1062) を用いて検討を行うとともに、PFGE を合わせて行い比較した。新しく設定した PCR 条件を用いて市販鶏肉からの分離した株 *C. jejuni* 74 菌株および *C. coli* 8 菌株の解析を行った。

4. ブドウ球菌の遺伝子型別

平成 25 年度に供試した 2 事例由来 5 株を

含めて、食中毒 14 事例由来 49 株、有症苦情等 11 事例由来 26 株、計 75 株の黄色ブドウ球菌についてブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の保有状況を PCR 法により調査するとともに、POT 法、MLVA 法による遺伝子型別を実施した。また、これらの株から選択した 53 株を PFGE 法による遺伝子型別に供試した。さらに平成 25 年度に実施した市販鶏肉由来黄色ブドウ球菌の遺伝子型別結果と比較検討した。

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

モデル食品としてネギトロ、食中毒菌として *Salmonella* Infantis1383-1 (鶏肉由来)、夾雑菌として *Escherichia coli* および *Citrobacter braakii* を使用し プール法およびプレエンリッチメント法を用いることによって低濃度の食中毒菌を検出できるかどうかを検討した。

C. 結果

1. ウエルシュ菌に関する研究

26 のウエルシュ菌遺伝子を対象とした PCR を行い、株間で比較することによってウエルシュ菌をタイピングできるか検討を行ったところ、26 の遺伝子を対象とした PCR を行うことによって、日常のサーベイランスに必要な解像度をもつタイピングを行えることが明らかになった。この方法は特別な機器や手技を必要とせず短時間で行うことが出来、また結果の信頼性も高く、

結果の比較が容易であることが明らかになった。

乾ししいたけ 26 検体、市販コショウ 15 検体、牛直腸スワブ 40 検体について、ウェルシュ菌芽胞の汚染実態調査を実施した。乾ししいたけでは 5 検体 (19.2%) からウェルシュ菌が分離され、そのうち、1 検体 (3.8%) から CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) 産生菌が分離された。市販コショウでは、4 検体 (26.6%) からウェルシュ菌が分離されたが、CPE 産生菌は分離されなかった。牛直腸スワブでは 23 検体 (57.5%) と高率にウェルシュ菌が検出されたが、CPE 産生菌および BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) 産生菌はともに分離されなかった。

CCP 培地の性能を検討したところ、ウェルシュ菌標準菌株 2 株及び野生株 40 株を用いた発育菌数の比較では、いずれの株も CCP 培地の発育菌数が ECW+培地より多かった。また、発育集落の色調による鑑別能については、今回用いたクロストリジウム属標準菌株 5 種 6 株では、ウェルシュ菌のみが青緑色を呈し、ウェルシュ菌の釣菌において鑑別が容易であった。また、カナマイシン感受性株の分離にも適していることが明らかになった。

2. サルモネラの疫学解析マーカーの検出

S. I 4:i:-分離株 (河川水等非ヒト由来株 11 株およびヒト由来株 2 株) を供試し、

試験を行った。PCR タイピングについて、*fliAB* 領域については全ての株で約 1kb のバンドが生じ、いずれも血清型 Typhimurium から派生したものと考えられた。*fljB* 遺伝子については、非ヒト由来株 11 株中 8 株が陽性であり、その他の 5 株は陰性であった。後者 5 株については、*fljB* 遺伝子の変異が 2 相目の H 抗原が検出されない理由の一つと考えられた。*hin* 遺伝子については、ヒト由来 2 株が陰性であったが、非ヒト由来株 11 株は何らかの増幅産物が得られた。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

昨年度の検討結果から、PCR 法に用いる taq polymerase により PCR の結果が異なることが明らかとなっていた。そこで、今年度は CGF40 による型別結果が既知の標準株 NCTC11168 および RM 1221 を使い、CGF40 に適した PCR 条件の検討を行い、良好な結果を得ることのできる条件を決定することが出来た。鶏肉由来株 (*C. jejuni* 74 菌株 および *C. coli* 8 菌株) を用いた CGF40 と PFGE 法による型別の比較では、CGF40 では *C. jejuni* 74 株は 49 パターン、*C. coli* 8 株は 5 パターンに分けられたが、PFGE 法では *C. jejuni* は 59 パターン、*C. coli* は 6 パターンに分けられた。さらに、CGF40 のパターンが一致する菌株間で異なる PFGE パターンである場合や、PFGE のパター

ンが一致する菌株間で異なる CGF40 のパターンを示す場合も認められ、互いの手法で異なる結果が得られるなど、CGF40 は PFGE 法とほぼ同等の識別能を有していることが示された。

4. 食中毒由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

食中毒事例等で分離され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。また、ブドウ球菌エンテロトキシン (SE : Staphylococcal enterotoxin) 遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した。その結果、食中毒事例等 25 事例由来 75 株は POT 法で 31 種類、SE 型と POT 型の組み合わせで 35 種類、MLVA 法で 36 種類に型別された。さらに、POT 法と MLVA 法の型別の評価のため、POT 型 24 種 (SE:POT 型 27 種)、MLVA 法 27 種に型別された 53 株について PFGE 型別を実施したところ、26 種類に型別された。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、逆に異なる POT 型、MLVA 型が同一の PFGE パターンとなる例もみられたが、POT 法と MLVA 法による型別は PFGE 法による型別とほぼ同程度の解析力を有していることが確認された。

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

サンプル・プーリング法 (プール法、プレエンリッチメント法) を応用し、食中毒

菌であるサルモネラを対象として食品から検出することが可能か検討をした。その結果、プール法とプレエンリッチメント法、何れのサンプリング法を用いても、調理済み食品 (ready-to-eat、RTE) であるネギトロではサルモネラの汚染菌量が 10^{-1} CFU/g 以上であれば検出できることが確認された。

D. 考察

1. ウェルシュ菌に関する研究

ウェルシュ菌の 26 の遺伝子を対象とした PCR の結果によってタイピングを行う今回の手法は、十分な解像度を有するにもかかわらず、一般的な手技として普及している PCR を行うだけ済む。そのため新しい技術を新たに習得する必要もほとんどなく、また必要な機器もサーマルサイクラーだけなので、非常に安価に実験を行うことが出来る。さらに結果を得るのに 1 日もあれば十分でかつ結果をデジタルデータとして表すことが出来るため、結果を得るのに時間がかかり、また他機関同士あるいは過去のデータとの比較が難しいという PFGE 法の欠点を克服することが出来る。よって、今回の方法が日常のスクリーニング業務に非常に有用な方法であることが明らかになった。今後さらに検体数を増やし検討を行うとともに、さらに省力化を図られるように改良を行っていく予定である。

乾物、牛腸スワブにおけるウェルシュ菌の汚染実態調査を行ったが、従来、汚染率の高さから食肉が汚染源として疑われるこ

とが多かったが、今回の調査の結果、和食や中華料理の食材として広く使用される乾物もウェルシュ菌芽胞の汚染源として十分注意しなければならないことが明らかとなった。

酵素基質培地である CCP 培地の性能について、従来より使用されている ECW+培地と比較、検討したところ、本培地の選択性、発育支持能、鑑別能は、ECW+培地と比べて遜色ないものであることが明らかになった。

2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

fliAB による *S. I 4:i:-* の PCR の結果から、供試菌株は Typhimurium 由来であることが示唆され、本結果は MLST の結果によっても支持された。*fljB*、*hin* 遺伝子による PCR タイピングは MLST の結果と相関し、また、PFGE および MLVA の結果ともある程度の相関性が観察された。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

C. jejuni の型別法として導入することを目的に、CGF40 の操作法の検討と評価を行った。使用する Taq ポリメラーゼの種類、PCR 反応の温度および時間の設定条件を既報の条件から変更することで良好な結果が得られた。しかし依然、マルチプレックス PCR では得られにくいバンドがあるため、さらに PCR 条件を検討する必要がある。CGF40 による型別を PFGE 法による型別と比

較したところ、ほぼ同等の識別能が得られた。

4. 食中毒由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

POT 法や MLVA 法による遺伝子型別は PFGE に匹敵する解析力を有し、操作の簡便性、結果判明の迅速性からも食中毒事例や食品等の黄色ブドウ球菌検査において有用な型別法と考えられた。

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

食品の輸出入時において安全な食品を確保するためにはサンプリング方法が重要な位置づけとなる。しかし、日本で実施されている 25g、n=1 のサンプリング方法ではこれが保証されないことが示唆されている。n 数が多くなると費用や労力がかかる。そこでプレエンリッチメント法とプール法の妥当性を検討し、これらの方法が有効であることを明らかにした。今後さらにプーリング法の実用性を多くの食品において実証をする必要性が示唆された。

E. 結論

昨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。今年度は、昨年度行った基礎研究をさらに発展させ、これらタイピング手法の信頼性を向上させ

るための検討を行った。来年度はさらに検体数を増やし、また他機関との共同研究を行い、最終的な試験方法の確立を目指す。

食中毒微生物検査のサンプリングプランに関しては、本年度の結果から、n数が少ない場合におけるプレエンリッチメント法とプール法の有用性を確認することが出来た。今後さらに多くの食品においてこれらの方法が有効であるかどうか確認を行っていく予定である。

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 26 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）

ウエルシュ菌のタイピング手法には PFGE 法が広く用いられているが、結果を得られるまでの時間がかかり、機関同士で結果の比較が困難であるなどの欠点がある。また、それ以外の方法も手法が複雑で日常のスクリーニング業務での使用は実用的でない。そのため簡便でかつ信頼性の高いタイピング法が求められてきた。そこで、既に報告されているウエルシュ菌の 26 のウエルシュ菌遺伝子を標的とした PCR の結果を総合し、タイピング法として使用できるか評価した。25 株を用いて試験を行った結果、この方法は特別な機器や手技を必要とせず短時間で行うことが出来、また結果の信頼性も高く、結果の比較が容易であることが明らかになった。これらのことから今回の方法は効果的なウエルシュ菌のタイピング法として使用できることが明らかになった。

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はエンテロトキシンによって引き起こされると考えられている。このウエルシュ菌に対するタイピング手法としては Puls field gel electrophoresis (PFGE)、amplified

fragment length polymorphism、Repetitive-Element PCR などが考案されている。しかし、この中で最も汎用されている PFGE 法は結果を得るのに 2, 3 日必要とし、また検査技術を習得するのに非常に時間を使用する。他の方法も手法が非常に複雑であり、簡便性に劣る。またこれらの方法はいずれも結果が DNA バンドの電気泳動像として得られ、DNA バンドのパターンに

よって株のグループ分けを行う。そのため、泳動条件の少しの違いによって、DNA バンドの泳動距離に変化が生じ、結果の判定が難しくなったり、同じ株でも別の株と判定されてしまう可能性もある。このようなことから同じ研究室で行った試験でも過去のデータと比較したり、他機関同士で結果を比較するのが非常に困難である。これまでの試験法はこのようにタイピングで最も重要な他株との比較という点において大きな問題を抱えていた。そこで本研究では、簡便でかつ結果の判定・比較が容易なウェルシュ菌のタイピング手法の構築を目指す。

近年、エンテロトキシン遺伝子を保有しないウェルシュ菌による食中毒事例が報告されており、新型のエンテロトキシンの関与が示唆されている¹。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。また、エンテロトキシン産生性ウェ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²。プラスミド上にエンテロトキシン遺伝子を持つものはエンテロトキシン遺伝子の下流に *IS1470*-like 配列を持つ株と *IS1151* 配列を持つ 2 株がある²。これら 3 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。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。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。そこで本研究では、3 種類のエンテロトキシン遺伝子（染色体性 1 種類、プラスミド性 2 種類）、新型エンテロトキシン遺伝子、病原遺伝子およびハウスキーピング遺伝子を標的にした PCR を行い、それらの結果を総合し、ウェルシュ菌のタイピングに使用できるか検討する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

研究に使用した菌株は福岡県保健環境研究所、秋田県健康環境センター、さいたま市健康科学研究センターで鶏肉より分離した 18 株、食中毒由来 7 株を用いた(表 1)。食中毒由来株はすべてエンテロトキシン遺伝子を保有していた。

2. DNA 試料調整

各株のグリセロールストックを液体チオグリコレート培地に接種し、37℃、一晚培養した。菌液 200 μ l を 1 ml の滅菌蒸留水に加え、攪拌後、12,000 rpm、1 分間の遠心処理を行った。上精を取り除いた後、InstaGeneDNA 精製マトリクス (Bio-rad) を 200 μ l 加え、56℃で 20 分間、加熱した。10 秒間の攪拌処理を行い、100℃で 8 分間加熱した。さらに 10 秒間の攪拌処理を行い、

10,000 rpm、3 分間の遠心処理を行った。
上精を回収し、これを DNA 溶液とした。

3. ウェルシュ菌遺伝子を標的にした PCR

今回PCRの標的にした遺伝子を表2に示す。

3 種類のエンテロトキシン遺伝子（染色体性 1 種類、プラスミド性 2 種類）、新型エンテロトキシン遺伝子（*becB*）、21 種の病原遺伝子およびハウスキーピング遺伝子、計 25 の遺伝子に関して試験を行った。エンテロトキシン遺伝子に対する PCR は、染色体上にある *cpe*、プラスミド上に存在し下流に IS1470-like 配列を持つ *cpe* および下流に IS1151 配列を持つ *cpe* の 3 種類の *cpe* を標的とし、Miyamoto らの方法によって行った²。新型エンテロトキシンを標的とした PCR は Yonogi らの方法で行った¹。ウェルシュ菌の 21 種類の病原遺伝子およびハウスキーピング遺伝子を対象とした PCR は Deguchi らの方法に従って行った³。PCR 反応後、PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、SYBR-Safe (Life Technologies) で染色し、増幅バンドの有無を確認した。株間で共通して PCR 陽性であった遺伝子を整理し、2 株間の遺伝的距離は以下の式から求めた非類似度によって表した^{4,5}。N は株 1 と株 2 で共通して PCR 陽性であった遺伝子数である。

$$\text{非類似度} = 1 - 2N/48$$

このようにして各株間の遺伝的距離を算出し、距離行列を作成した。この距離行列から Neighbor-joining 法を用いてクラスター解析を行った。クラスター解析および

系統樹作成は MEGA6（フリーソフト）によって行った。

C. 結果と考察

今回の結果を表 3 に示す。今回検討した遺伝子の内、*becB*, *sigK*, *sodA*, *groEL*, *pgk*, *nadA*, *colA*, *lonB*, *virS* は株間で変化が見られなかった。そこで今回、株間で変化が見られなかったこれらの遺伝子を取り除いた結果を表 4 に示す。今回試験した株の中で *cpe* を保有していたのは食中毒由来株のみで、鶏肉由来株は保有していなかった。また、すべての *cpe* 遺伝子保有株は染色体上に遺伝子を保有していた。今回試験した菌株の中で食中毒と関連付けられたのは *cpe* だけであった。*pfoA* は PCR 産物の長さが約 2 000bp のものと 200 bp のものとに分かれた。これらの結果から株間の遺伝的距離を求め、系統樹を作成したところ（図 1）、*tcpH*, *tcpF*, *rep* に対する PCR の結果によって大きく二つのグループに分けられた。Saitama20-10 が二つのグループの中間に位置していた。KanagawaCLO-011 と KanagawaCLO-012、Akita55 と Akita57 はそれぞれ同一の食中毒事例から分離された株であり、PCR の結果は同じパターンを示した（表 4）。一方、Akita60、Akita62、Akita64 の 3 株も同一の食中毒事例からの分離株であるが、Akita60 だけが *bcn* 陽性、*eno* 陰性で他の 2 株と異なるパターンを示した（表 4）。このことからこの事例では複数の株によって食中毒が引き起こされたことが示唆

された。また、Akita55、Akita57 と Akita60、Akita62、Akita64 は異なる事例からの株であるが遺伝的に非常に近いグループに属していた（図1）。また鶏肉由来株であるが、Fukuoka3 と Fukuoka6 も近いグループに属していた（図1）。これらのことからこれらの株間で地理的な関連性が示唆された。一方で、Kanagawa10-1 と Akita6、Kanagawa2-4 と Saitama14-10 などのように地理的に離れた株間で遺伝的な関連性が見いだされた（図1）。

今回の方法に必要な機器は PCR に必要なサーマルサイクラーだけである。サーマルサイクラーは多くの検査所で普及しており、新規に購入しても 20 万円程度で入手することが出来る。実験の手順も、菌株からの DNA 抽出、PCR 反応、ゲル電気泳動の 3 ステップだけであり、これらの手法は多くの検査所でルーチンワークとして汎用されている手法であるため、今回の方法を行うのに新たな手法を習得する必要はほとんどない。また、手法が簡便であるだけでなく、試験工程が 1 日もあれば十分であり、非常に迅速に結果を得ることが出来る。簡便、迅速な検査法であるにもかかわらず、前述のように株間の由来に関して多くの考察を行えるだけのデータを得ることが出来る。もちろん今回の方法はそれぞれの遺伝子に対するプライマーを作成し、それを用いた PCR 反応が陽性であるか、陰性であるかを判定しただけのものである。よって株間同士が本当に同一の株であるかどうかを確認する

ためにはさらに多くの試験を行う必要があるが、日常のスクリーニング業務で使用するタイピング法としては十分な解像度を持つと思われる。また、今回の方法ではすべての結果を PCR 反応陽性・陰性のデジタルデータとして表すことが出来る。そのため、PFGE 法のように結果の判定に苦労したりすることも少なく、他機関同士や過去のデータとの比較も非常に容易に行うことが出来る。よって、今回の方法は全国規模で行うスクリーニング検査などで非常に有用な方法であると思われる。

今回検討した遺伝子の内、7 つの遺伝子は株間で変化が見られなかった。さらに菌株を増やして検討を行い、これらの遺伝子に変化が見られなかった場合、試験項目から外し省力化を行う予定である。また今後、マルチプレックス化を行い検査機関の負担をさらに軽減できるように改良を行う予定である。

D. 結論

ウェルシュ菌の遺伝子を標的とした PCR ベースの検査法の検討を行った。その結果、今回の方法によって簡便・迅速にウェルシュ菌のタイピングを行うことが出来、日常のスクリーニング業務に非常に有用であることが明らかになった。今後さらに簡便性を追求するために改良を行う予定である。

E. 参考文献

1. Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T,

- Harada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T: BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks.. Infect Immun 82:2390-2399, 2014
2. Miyamoto K, Wen Q, McClane BA: Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (cpe) locus, a plasmid cpe locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid cpe locus with an IS1151 sequence.. J Clin Microbiol 42:1552-1558, 2004
3. Deguchi A, Miyamoto K, Kuwahara T, Miki Y, Kaneko I, Li J, McClane BA, Akimoto S: Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains.. PLoS One 4:e5598, 2009
4. Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Biol Evol 1990;7:478-484
5. Koichiro Kawai, Yuji Ina, Hiromichi Imabayashi. Genetic Relationships between 'Gogi', a Subspecies of Japanese Common Charr, *Salvelinus leucomaenis imbrius*, Distributed around the Watershed Borders in the Western Chugoku Mountains, Japan, on the Basis of RAPD Analysis. Bulletin of the Hiroshima University Museum 2010;2:35-41
- F. 研究発表
論文発表
なし

学会発表
なし

<i>cpe</i>	enterotoxin gene
<i>becB</i>	novel enterotoxin gene
<i>cpb2</i>	β2toxin gene
<i>gyrB</i>	DNAgyrase B subunit gene
<i>sigK</i>	sporulation-specific sigma factors gene
<i>sodA</i>	superoxide dismutase gene
<i>groEL</i>	heat shock protein gene
<i>pgK</i>	phosphofructokinase gene
<i>nadA</i>	quinolinate synthetase gene
<i>plc</i>	phospholipase C (alpha toxin) gene
<i>colA</i>	collagenase gene
<i>lonB</i>	heat shock protein gene
<i>eno</i>	enolase (Phosphopyruvate hydratase) gene
<i>virS</i>	regulator of plasmid-encoded putative virulence genes
<i>pfoA</i>	theta toxin gene
<i>tcpH</i>	plasmid transfer factor gene
<i>tcpF</i>	plasmid transfer factor gene
<i>rep</i>	replication gene on transferable plasmids gene
<i>can</i>	putative collagen adhesion protein gene
<i>soj</i>	sporulation initiation inhibitor protein gene
<i>parB</i>	putative plasmid maintenance genes
<i>topA</i>	putative plasmid maintenance genes
<i>bcn</i>	UV-induced bacteriocin gene

表 1 対象ウェルシュ菌遺伝子

分離機関	株名	由来
神奈川県衛生研究所	Kanagawa2-2	鶏分離株
神奈川県衛生研究所	Kanagawa2-4	鶏分離株
神奈川県衛生研究所	Kanagawa9-4	鶏分離株
神奈川県衛生研究所	Kanagawa10-1	鶏分離株
神奈川県衛生研究所	Kanagawa12-6	鶏分離株
神奈川県衛生研究所	Kanagawa17-6	鶏分離株
神奈川県衛生研究所	KanagawaCL0-011	同一食中毒分離株
神奈川県衛生研究所	KanagawaCL0-012	
秋田県健康環境センター	Akita1	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Akita2	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Akita6	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Akita9	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Akita55	同一食中毒分離株
秋田県健康環境センター	Akita57	
秋田県健康環境センター	Akita60	同一食中毒分離株
秋田県健康環境センター	Akita62	
秋田県健康環境センター	Akita64	
福岡県保健環境研究所	Fukuoka1	鶏分離株
福岡県保健環境研究所	Fukuoka2	鶏分離株
福岡県保健環境研究所	Fukuoka6	鶏分離株
福岡県保健環境研究所	Fukuoka3	鶏分離株
福岡県保健環境研究所	Saitama1-10	鶏分離株
さいたま市健康科学研究センター	Saitama2-10	鶏分離株
さいたま市健康科学研究センター	Saitama14-10	鶏分離株
さいたま市健康科学研究センター	Saitama20-10	鶏分離株

表 2 供試菌株

	cpe	becB	cpb2	gyrB	sigK	sodA	groEL	pgk	nadA	plc	colA	lonB	eno	virS	pfoA	tcpH	tcpF	rep	can	soj	parB	topA	bcn
Kanagawa2-2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1
Kanagawa2-4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1
Kanagawa9-4	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
Kanagawa10-1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Kanagawa12-6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Kanagawa17-6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
KanagawaCLO-011	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
KanagawaCLO-012	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
Akita1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Akita6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Akita9	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita55	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
Akita57	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
Akita60	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
Akita62	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Akita64	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0
Fukuoka1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
Fukuoka2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
Fukuoka6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0
Fukuoka3	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0
Saitama1-10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
Saitama2-10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
Saitama14-10	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1
Saitama20-10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

cpe : 0, negative; 1, chromosomal; 2, plasmid IS1470-like; 3, plasmid IS1151

pfoA: 0, negative; 1, MW. 2000bp; 2, MW. 200bp

other genes: 0, negative; 1, positive

表 3 ウェルシュ菌遺伝子を対象とした PCR の結果