

	cpe	cpb2	gyrB	plc	eno	pfoA	tcpH	tcpF	rep	can	soj	parB	topA	bcn	
Kanagawa2-2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Kanagawa2-4	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Kanagawa9-4	0	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Kanagawa10-1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Kanagawa12-6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
Kanagawa17-6	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0
KanagawaCLO-011	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	1 食中毒
KanagawaCLO-012	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	1 食中毒
}															
同一事例															
Akita1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
Akita2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Akita6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Akita9	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0	1	0
Akita55	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0 食中毒
Akita57	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0 食中毒
Akita60	1	1	1	1	0	2	0	0	0	0	1	1	1	1	1 食中毒
Akita62	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0 食中毒
Akita64	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0 食中毒
}															
同一事例															
Fukuoka1	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Fukuoka2	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	1
Fukuoka6	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Fukuoka3	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Saitama1-10	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Saitama2-10	0	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Saitama14-10	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Saitama20-10	0	0	1	1	1	1	0	0	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4 ウェルシュ菌遺伝子を対象としたPCRの結果②

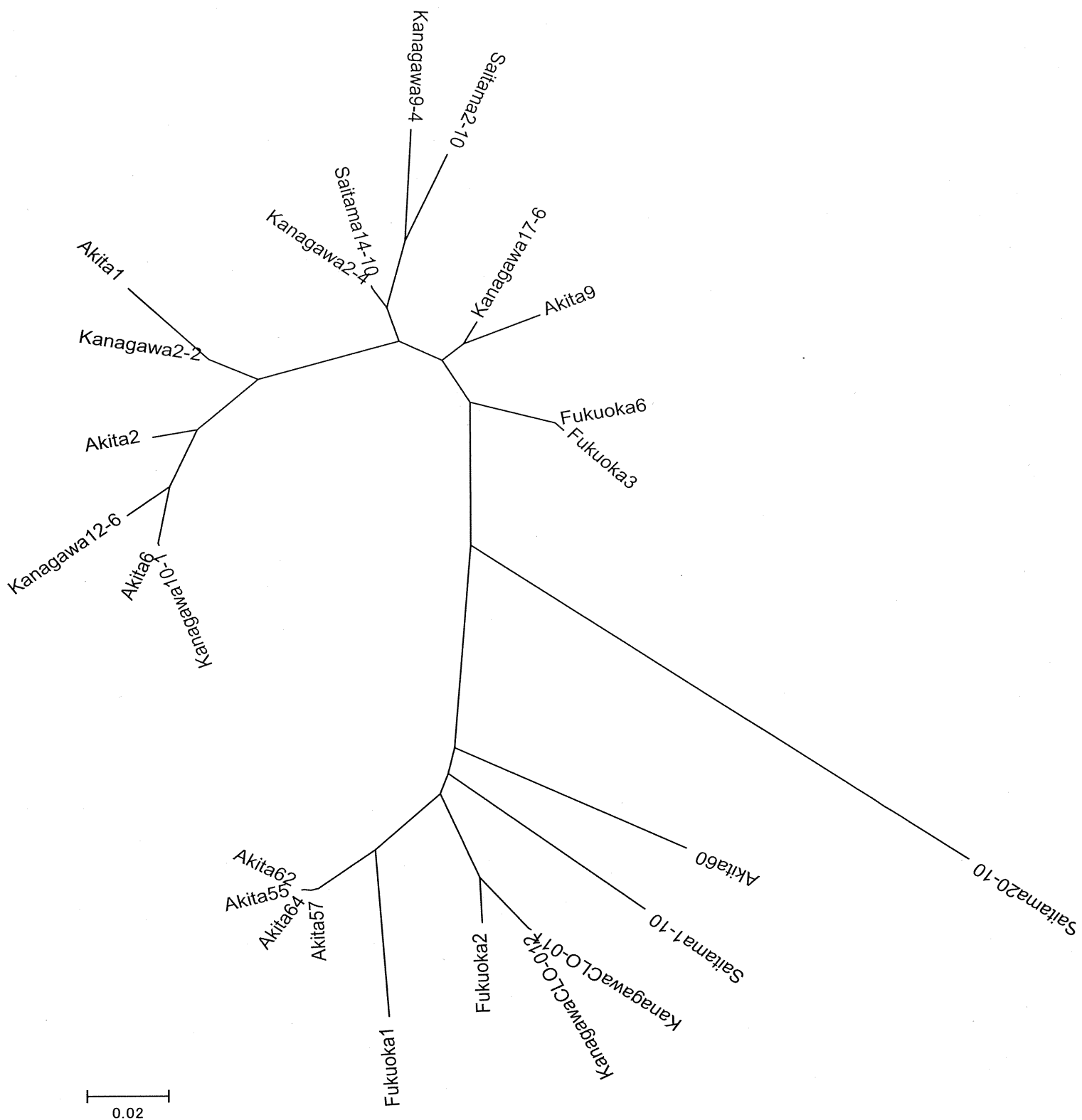


図1 今回の結果から得られた株間の遺伝的関係

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 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

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 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）

研究協力者 古川 一郎（神奈川県衛生研究所）

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 八柳 潤（秋田県健康環境センター）

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。

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

PCR タイピング

Salmonella I 4:i:-は近年欧米で報告の相次いでいる血清型であり、血清型 Typhimurium (I 4:i:1,2) の単相バリエーションであると考えられている。*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。また、J. Clin. Microbiol. 47, 3546 (2009)に記載された 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。

MLST

PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012)に記載の multilocus sequence typing (MLST) を用いて MLST 解析を行った。MLST データについては <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/> を参照し、ST の型番付けなどを行った。

PFGE

Pulsenet プロトコール (Foodbourne Pathog Dis. 3(1): 20-31 (2006), <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/>) に従い、パルスフィールドゲル電気泳動法を実施した。XbaI 消化して得られた泳動パターンを Bionumerics に取り込み、クラスター解析を行った。

MLVA

J. Microbiol. Methods 59(2): 163-172

(2004)に記載の 5 カ所の遺伝子座を用い multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) を行った。得られた結果をリピート数に換算し、Bionumerics をもちいてクラスター解析を行った。

C. 研究結果および考察

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。このうち、10 株は予想される大きさ (約 0.6kb) の増幅産物が得られた。1 株は約 1.3kb の増幅産物を生じたので、部分的に塩基配列を決定したところ、IS26 の挿入が推定された。

fliAB、*fljB* および *hin* 各 PCR の結果をまとめたものを表 1 に示す。非ヒト由来株 11 株の中で *fljB* 陽性の 8 株は *hin* も陽性であった。そこで *hin* 遺伝子増幅産物の塩基配列を決定したところ、140 番目のアミ

ノ酸においてアルギニンからロイシンへの置換 (R140L) が見出された。本変異によって 2 相目への相変換が阻害されることが示唆されており、したがって 1 相目の H 抗原しか検出されないものと推測された。

MLST 解析の結果、今回供試した 13 株は 3 つの ST から成ることが明らかとなった。すなわち、ST34、ST19 および ST99 であった。

ヒト由来株は 2 株とも ST34 であった。非ヒト由来株は 3 株が ST19、8 株が ST99 であった。ST34 株はいずれも *fljB* 陰性、*hin* 陰性であった。ST19 および ST99 はいずれも *hin* 陽性 (IS26 挿入株も含む) であり、前者は *fljB* 陽性、後者は *fljB* 陰性であった。上記 PCR タイピングの結果と MLST の結果には相関がみられることが示唆された。

PFGE および MLVA によるクラスター解析の結果を図 1 および図 2 に示す。いずれの方法でも 3-4 つほどのクラスターが形成され、これらは、ほとんど各 ST に対応した。

既報 (PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012)) では、ST19 は血清型 Typhimurium の主要な ST を占めており、ST34 は Typhimurium 単相菌の主要な ST となっている。ST99 は Typhimurium のマイナーな ST の一つである。上記のことからも本研究で供試した菌株が Typhimurium から派生する単相菌であることが示唆され、かつ、*fliAB* によるスクリーニングが妥当であることを示している。

本研究では今回ヒト由来株と非ヒト由来

株とで遺伝的特性が分かれる結果となった。今後供試菌株数を増やすことで、由来と菌型との間の傾向、関連性などが明らかになってくることが期待される。

D. 結論

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。

E. 研究発表等

1. Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*_{TEM-52}-carrying plasmids of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Dec;58(12):7545-7.
2. 泉谷秀昌：食品を介した抗生物質耐性菌の世界的感染拡大について。日本食品微生物学会、第 31 巻第 2 号、57-62、2014 年 6 月。
3. 泉谷秀昌：サルモネラ症。公衆衛生情報、第 44 巻第 5 号、20-21、2014 年 8 月。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

			ヒト	非ヒト
<i>fliAB</i> (1kb)			2	11
<i>fljB</i> 陰性	<i>hin</i> 陰性	ST34	2	0
	<i>hin</i> 陽性	ST19	0	3*
<i>fljB</i> 陰性	<i>hin</i> 陰性		0	0
	<i>hin</i> 陽性	ST99	0	8**

表 1. PCR タイピングおよび MLST の結果。

*, IS26 挿入型を 1 株含む。**, いずれも R140L 変異を持つ。

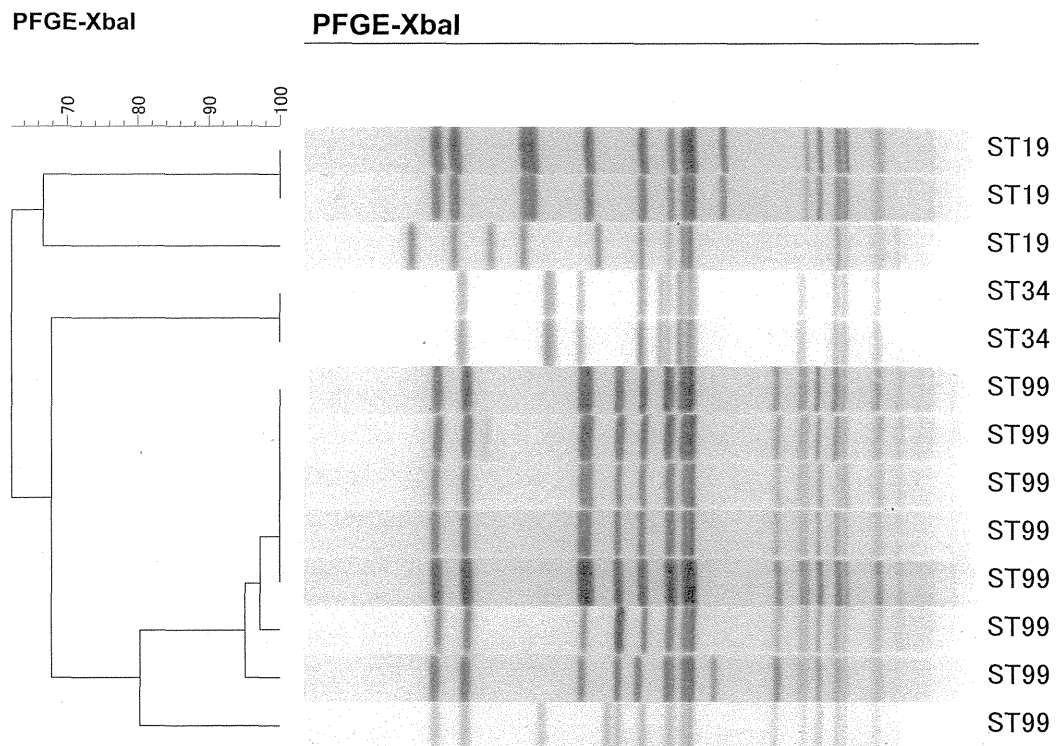


図 1. *S. I 4:i:-* 株 XbaI 消化 PFGE パターンのクラスター解析

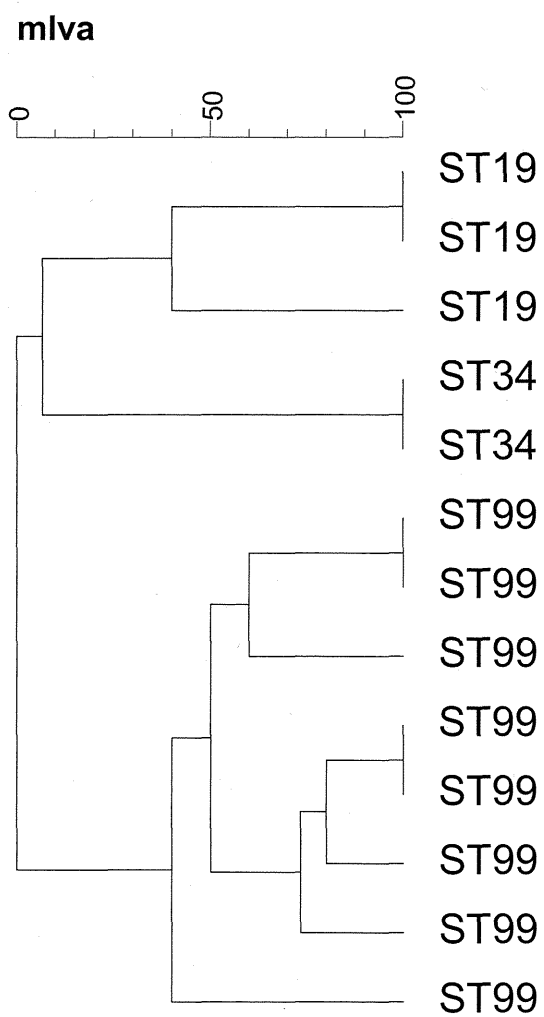


図 2. *S. I 4:i:-*株 MLVA クラスタ解析

分 担 研 究 報 告 書

ウェルシュ菌選択分離培地としての酵素基質培地の有用性

堀川 和美

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

ウェルシュ菌選択分離培地としての酵素基質培地の有用性

研究分担者	堀川和美	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	西田雅博	（福岡県保健環境研究所）
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	曾根美紀	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	加藤直樹	（さいたま市健康科学研究センター）
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	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）
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	黒木俊郎	（神奈川県衛生研究所）

ウェルシュ菌の選択分離培地として作製された酵素基質培地である CHROMagar™ C. perfringens 試作品（CCP 培地）について、発育支持能、鑑別能、選択性等の培地性能を本邦で広く用いられているカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地（ECW⁺培地）と比較、検討した。その結果、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 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。CCP 培地は、糞便より分離されることの多い大腸菌及び黄色ブドウ球菌の標準菌株に対して発育抑制が認められた。一方、ECW⁺培地では CCP 培地に比較して発育菌数が $1/10^4$ 以下であった株が 4 株に認められた。これらの株のカナマイシンに対する MIC 値は $128 \mu\text{g/ml}$ であり、対照株として用いた標準菌株の $256 \mu\text{g/ml}$ 以上に比べて低かった。また、培地作製後 6 日の ECW⁺培地による発育菌数は、これらの株では検出限界未満となり発育しなかった。このことから、カナマイシンに感受性の高いウェルシュ菌の分離において、CCP 培地はカナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地と同様に有用であると考えられた。

A. 研究目的

ウェルシュ菌による食中毒は、主に食品の加熱調理により生じる食品の酸化還元電位の低下と加熱後食品の不適切な温度管理による本菌の発育可能温度域保持時間の延長等に起因して、食品中で増殖したウェルシュ菌が腸管内で産生した毒素により発生すると考えられている。特に給食施設等で大量調理される食品が原因となった場合には、大規模な患者発生につながる危険性を有している。

食中毒細菌であるウェルシュ菌の分離には、本邦ではカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地など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。しかしながら、卵黄反応を指標とした分離培地では、ウェルシュ菌の一部に卵黄反応が弱い、または不明瞭であることに起因して鑑別・同定試験の要否判断に苦慮することがある。

そこで、本研究では、分離培地の発育支持能、鑑別能、選択性等の培地性能を、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。あわせて、培地作製後の経過日数がウェルシュ菌の発育菌数に及ぼす影響について、標準菌株を用いて、培地作製後の経過日数毎の発育菌数を比較、検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

使用菌株の由来及び検討した試験内容は表 1 に示した。

使用菌株は、クロストリジウム属の標準菌株 *Clostridium perfringens* ATCC3624 (易熱性芽胞形成・*cpe* 陰性株)、*C. perfringens* ATCC12915 (耐熱性芽胞形成・*cpe* 陽性株)、*C. bifermentans* DSM14991、*C. sporogenes* JCM1416、*C. difficile* DSM1296 及び *C. sordellii* JCM3814 の 6 株を用いた。*Escherichia coli* IF03301 及び *Staphylococcus aureus* IF012732 の 2 株は、糞便より分離される細菌の代表として用いた。食品又は食中毒患者由来のウェルシュ菌野生株は、秋田県健康環境センター分離 13 株 (検体番号 A)、神奈川県衛生研究所分離 11 株 (検体番号 K)、さいたま市健康科学研究センター分離 11 株 (検体番号 S)、福岡県保健環境研究所分離 5 株 (検体番号 F) の計 40 株を用いた。

培地作製後の経過日数毎の発育菌数の比較には、ウェルシュ菌標準菌株 ATCC3624 及び ATCC12915 の 2 株を用いた。

2. 方法

2-1 培地性能試験

使用培地は、CCP 培地及び ECW⁺培地を用い、卵黄液は卵黄乳液 EX (関東化学) を使用した。発育菌数の対照培地として、GAM 寒天培地 (以下 GAM 培地、日水製薬) を使用した。培地性能試験は、Miles&Misra ¹⁾ の方法 (以下ミスラ法) に準拠し、発育菌数の測定及び CCP 培地発育集落の色調を観察した。

2-2 培地作製後の経過日数毎の発育菌数の比較

培地作製後の経過日数が発育菌数に及ぼす影響をみるため、培地作製後、脱酸素剤（アネロキープ、三菱ガス化学）とともに密封し、5-8℃に保存した CCP 培地及び ECW⁺培地と対照培地として用時調製した GAM 培地を用いて、作製後 1 日、7 日、18 日、22 日及び 30 日の計 5 回、ミスラ法により発育菌数を測定し、比較した。

なお、培地性能試験及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数の測定で実施したミスラ法の詳細は以下のとおりである。

培養液及び培養方法：供試菌株のうち、クロストリジウム属標準菌株及びウェルシュ菌野生株については、保存菌株を変法チオグリコレート培地（日水製薬）に接種し、アネロパックケンキ（三菱ガス化学）を用いて、35±2℃で 22±2 時間嫌気培養した培養菌液を用いて発育菌数を算出した。*E. coli* IF03301 株及び *S. aureus* IF012732 株については、保存菌株を Brain heart infusion broth（栄研化学）に接種し、35±2℃で 22±2 時間、好気培養した培養菌液を用いて発育菌数を算出した。

発育菌数の算出：クロストリジウム属標準菌株及びウェルシュ菌野生株については、培養菌液を Yamamoto-Osaki ら²⁾の嫌気性希釈液を用いて 10 倍から 10⁷ 倍まで 10 倍階段希釈した。また、*E. coli* IF03301 株及び *S. aureus* IF012732 株については、滅菌生理食塩水を用いて同様に希釈した。その希釈菌液を各培地 2 枚に 10 µl または 20 µl 滴下し、アネロパックケンキ（三菱ガス化学）を用いて、35±2℃で 22±2 時

間嫌気培養した。発育した集落数を計数し、1ml あたりの菌数を算出した。

C. 研究結果

1. 培地性能試験

1-1 標準菌株による比較

標準菌株による発育菌数及び CCP 培地に発育した集落の色調を表 2 及び図 1 に示した。

ウェルシュ菌 ATCC3624 株及び ATCC C12915 株を用いた発育菌数の比較では、CCP 培地の発育菌数は、GAM 培地と同程度で ECW⁺培地の約 10 倍であった。その他のクロストリジウム属標準菌株 4 株の CCP 培地での発育菌数は、*C. sporogenes* JCM1416 株及び *C. difficile* DSM1296 株では、GAM 培地に比べてやや少なかったが、他の 2 株は GAM 培地とほぼ同じであり、4 株いずれも ECW⁺培地より多い発育菌数であった。

一方、ECW⁺培地では、*C. bifermentans* DSM14991 株及び *C. sporogenes* JCM1416 株の 2 株は発育しなかった。ECW⁺培地に発育した *C. difficile* DSM1296 株及び *C. sordellii* JCM3814 株の発育菌数は、CCP 培地の約 1/2 ないし 1/80 であり、ECW⁺培地の方がウェルシュ菌以外のクロストリジウム属標準菌株 4 株に対する抑制が強かった。

CCP 培地における発育集落の色調は、ウェルシュ菌 ATCC3624 株及び ATCC C12915 株が青緑色を呈し、その他のクロストリジウム属標準菌株 4 株は、表 2 に示すようにウェルシュ菌の青緑色とは異なる色調を示した。

E. coli IF03301 株及び *S. aureus* IF012732 株は、CCP 培地及び ECW⁺培地いずれにも発育しなかった。

1-2 ウェルシュ菌野生株による発育菌数の比較

ウェルシュ菌野生株 40 株の各培地における発育菌数を表 3 に示した。

K12 株、K13 株、K14 株及び A56 株を除いた 36 株の CCP 培地での発育菌数は、ECW⁺培地の発育菌数に比べて、ほぼ同数～ 2.5×10^2 倍の菌数であった。

K12 株、K13 株、K14 株及び A56 株の CCP 培地での発育菌数は、 $2.0 \times 10^8 \sim 6.5 \times 10^8$ CFU /ml で他の野生株 36 株と同程度であったが、ECW⁺培地での発育菌数は $1.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^4$ CFU/ml と少なかった。

なお、ウェルシュ菌野生株 40 株の CCP 培地における発育集落の色調は全て青緑色であり、今回使用したその他のクロストリジウム属標準菌株 4 株との鑑別は容易であった。

2. 培地作製後の経過日数毎の発育菌数の比較

ウェルシュ菌標準菌株 2 株を用いて測定した発育菌数を図 2 に示した。

両株の培地作製後の経過日数毎の発育菌数は、CCP 培地では約 10^8 CFU/ml のレベルで推移し、明らかな減少は認められなかった。一方、ECW⁺培地では、培地作製後の日数経過とともに図 2 に示すように発育菌数の減少がみられた。特に、易熱性芽胞形成・*cpe* 陰性株である ATCC3624 株では、作製後 7 日以上経過した培地で測定した発

育菌数が、作製後 1 日の培地で測定した発育菌数に比べて、約 $1/10^3 \sim 1/10^4$ に減少した。

3. ECW⁺培地発育不良株に対する追加試験

C. 1-2 ウェルシュ菌野生株 40 株による発育菌数の比較において、ECW⁺培地の発育菌数が CCP 培地に比べて $1/10^4$ 以下となった株（以下、ECW⁺培地発育不良株）が 4 株みられたことから、ECW⁺培地に添加されているカナマイシンがこれら ECW⁺培地発育不良株の発育に及ぼす影響をみるため、センシディスク及び Etest を用いて薬剤感受性試験を行った。あわせて、カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地（基礎培地：日水製薬、以下 ECW⁻培地）を使用培地に加えて、カナマイシンの有無による卵黄加 CW 寒天培地での発育菌数の比較及び培地作製後の経過日数が発育菌数に及ぼす影響について、培地作製後の経過日数毎の発育菌数を比較、検討した。実施した試験の方法及び結果は以下のとおりである。

3-1 ECW⁺培地発育不良株のカナマイシンに対する薬剤感受性試験

ECW⁺培地発育不良株 4 株について、センシディスク（カナマイシン $30 \mu\text{g}$ /disk、日本 BD）及び Etest（カナマイシン濃度勾配ストリップ、シスメックス・ビオメリュー）を用いて、カナマイシンに対する薬剤感受性試験を行った。ウェルシュ菌標準菌株 ATCC3624 株及び ATCC12915 株は対照株として用いた。なお、センシディスクについては、CLSI M11-A8 においてデ

ディスク拡散法による解釈基準等がないため、Etest と同一条件で参考として実施した。Etest は、添付文書に従って、ブルセラブロス（日本 BD）にマクファールランド 1.0 の濁度に調整した被検菌懸濁液をブルセラ血液寒天培地（シスメックス・バイオメリュー）に塗抹し、試験薬剤のストリップを配置後、 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ で 45 ± 3 時間、アネロパックケンキ薬剤感受性用（ CO_2 濃度 10% 相当、三菱化学）を用いて嫌気培養した。培養後、被検菌の発育を目視で確認し、最小発育阻止濃度（以下、MIC）値を判定した。

ECW⁺培地発育不良株のカナマイシンに対する薬剤感受性試験の結果を表 4 に示した。

供試した ECW⁺培地発育不良株 4 株は、いずれもセンシディスクの周囲に阻止円の形成を認めなかった。また、Etest による MIC 値は、4 株いずれも $128 \mu\text{g/ml}$ であり、対照株として用いた標準菌株の $256 \mu\text{g/ml}$ 以上に比べて感受性が高かった。

3-2 ECW⁺培地発育不良株のカナマイシンの有無による発育菌数及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数の比較

CCP 培地、ECW⁺培地、ECW⁻培地及び対照として用事調製した GAM 培地を用いて、培地作製後 1 日及び 6 日の 2 回、前述の B. 2-2 と同様に行った。

ECW⁺培地発育不良株 4 株と対照株 2 株の結果を表 5 及び図 3 に示した。

培地作製後 1 日の ECW⁺培地と ECW⁻培地による ECW⁺培地発育不良株 4 株の発育菌数の比較では、いずれも ECW⁺培地の発育菌数

が ECW⁻培地の発育菌数より少なく、その発育菌数は、ECW⁻培地の約 $1/10^4 \sim$ 約 $1/10^5$ であった。また、培地作製後 6 日の培地で測定した発育菌数と培地作製後 1 日の培地で測定した発育菌数を比較したところ、ECW⁻培地では、同数もしくは約 1/2 程度の減少であったが、ECW⁺培地ではいずれの株も発育菌数が検出限界未満となった。なお、対照株として実施した ATCC3624 株については、C. 2. と同様の結果であった。

D. 考察

ウェルシュ菌標準菌株及び野生株における CCP 培地と GAM 培地の発育菌数の比較では、CCP 培地の発育菌数は GAM 培地の 1/8 ～ 約 3 倍で、同程度の発育菌数であった。また、ウェルシュ菌の発育菌数は、用いた全ての株において、CCP 培地の方が ECW⁺培地より多かった。ウェルシュ菌以外のクロストリジウム属標準菌株については、CCP 培地では全ての菌株が発育したが、ECW⁺培地では 2 株が発育しなかった。このことから、ウェルシュ菌の選択分離培地としての発育支持能は CCP 培地が優れていた。また、選択性では ECW⁺培地の方が抑制が強かった。

CCP 培地での発育集落の色調は、本培地で発育可能であったウェルシュ菌以外のクロストリジウム属標準菌株 4 株が白色、淡紅色、淡褐色、黒色等を呈したのに対して、ウェルシュ菌では、標準菌株及び全ての野生株が青緑色を呈し、鑑別は容易であった。

このことから、ウェルシュ菌の選択分離培地として、本培地の鑑別能に特に支障となる点はみられず、発育集落の色調による

他のクロストリジウム属との鑑別において、酵素基質により発色したウェルシュ菌の発育集落は釣菌指標として有用であると考えられた。

本研究において認められた ECW⁺培地での発育菌数が CCP 培地に比べて $1/10^4$ 以下であったウェルシュ菌野生株 4 株について、その発育にカナマイシンが与える影響をみたところ、カナマイシンに対する MIC は、いずれも $128 \mu\text{g/ml}$ であり、標準菌株の $256 \mu\text{g/ml}$ 以上に比べて感受性が高かった。分離培地へのカナマイシン ($200 \mu\text{g/ml}$) の添加の有無による発育菌数の比較では、ECW⁺培地の発育菌数は、ECW⁻培地の約 $1/10^4 \sim$ 約 $1/10^5$ と少なく、また、培地作製後 6 日を経過した時点で検出限界未満となった。赤真ら³⁾は 90°C で 15 分又は 100°C で 60 分の加熱条件において、カナマイシン含有培地とカナマイシン不含培地での発育菌数を比較したところ、カナマイシン不含培地での発育菌数が優位であったと報告しており、このような株の一部では、分離培養時の加熱処理その他の要因等によりカナマイシンへの感受性が高まっている可能性も考えられた。なお、今回 $200 \mu\text{g/ml}$ のカナマイシンに感受性が認められた 4 株の分離方法は、3 株 (K12 株、K13 株及び K14 株) が検体加熱処理後に ECW⁻培地により分離されたもので、1 株 (A56 株) は加熱処理を行わず ECW⁺培地により分離されたものであった。さらに、近年ではカナマイシンに感受性を示すウェルシュ菌の食中毒事例の報告⁴⁾もあることから、食中毒事案等におけるウェルシュ菌の分離にあたっては、状況に応じた分離培地を選択し、

適切に使用することが重要であると考えられた。

E. 結論

酵素基質培地である CHROMagar™ C. perfringens 試作品の培地性能について、従来より使用されている ECW⁺培地と比較、検討した。ウェルシュ菌の選択分離培地としての本培地の発育支持能、鑑別能は、ECW⁺培地と比べて遜色ないものであった。選択性については、CCP 培地に比べて、ECW⁺培地の方が、より多くのウェルシュ菌以外の標準菌株の発育を抑制した。

本研究において認められたカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地での発育菌数が CCP 培地に比べて顕著に少ないウェルシュ菌の分離には、カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地と同様に CCP 培地が有用であることがわかった。

F. 謝辞

本研究を進めるにあたり、CHROMagar™ C. perfringens 試作品を提供いただきました関東化学株式会社の関係各位に深謝いたします。

G. 参考文献

- 1) 坂崎利一, 新 細菌培地学講座・上, 200-211, 近代出版, (1978).
- 2) Takako Yamamoto-Osaki, Shigeru Kamiya, Sadaaki Sawamura, Masanori Kai and Atsushi Ozawa: Growth inhibition of *Clostridium difficile* by intestinal flora of infant faces in continuous flow culture., J. Med.

Microbioli., 40, 179-187, (1994).

- 3) 赤真清人, 大谷 昌, 亀山昭一, 伊藤明治, 村田良介: ウェルシュ菌の分離
同定用培地の検討. 日本細菌学雑誌,
21, 564-573, (1966).

- 4) 門間千枝, 下島優香子, 小西典子, 尾畑浩魅, 石崎直人, 仲真晶子, 甲斐明美, 柳川義勢, 山田澄夫: カナマイシンに感受性を示すウェルシュ菌食中毒事例と分離菌株の性状. 日本食品微生物学会雑誌, 25, 76-82, (2008).

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

なし

J. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表 1 供試菌の由来及び実施した試験内容

菌種	由来	菌株	試験内容		追加試験の内容	
			培地性能試験	培地作製後の経過日数毎の発育菌数測定	カナマイシンに対する薬剤感受性試験	カナマイシンの有無による発育菌数及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数測定
<i>C. perfringens</i>	ATCC	ATCC3624 ^a	○	○	○	○
<i>C. perfringens</i>	ATCC	ATCC12915 ^b	○	○	○	○
<i>C. bifermentans</i>	DSM	DSM14991	○			
<i>C. sporogenes</i>	JCM	JCM1416	○			
<i>C. difficile</i>	DSM	DSM1296	○			
<i>C. sordellii</i>	JCM	JCM3814	○			
<i>E. coli</i>	IFO	IFO3301	○			
<i>S. aureus</i>	IFO	IFO12732	○			
<i>C. perfringens</i>	鶏肉、有症者便	野生株40株	○		○ ^c	○ ^c

^a 易熱性芽胞形成・*cpe*陰性株

^b 耐熱性芽胞形成・*cpe*陽性株

^c カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地に発育不良であった4株

表 2 標準菌株の各培地における発育菌数及び CHROMagar™ C. perfringens 試作品での発育集落の色調

菌 種	菌 株	発育菌数 (log CFU/ml) ^a			CCP - ECW ⁺ 発育菌数対数差 (b - c · log)	CCP 発育集落 の色調
		CCP ^b	ECW ⁺ ^c	GAM ^d		
<i>C. perfringens</i>	ATCC3624	8.54	7.40	8.00	1.15	青緑色
<i>C. perfringens</i>	ATCC12915	8.81	7.90	8.60	0.91	青緑色
<i>C. bifermentans</i>	DSM14991	8.81	発育せず ^e	8.78	> 7.41	淡褐色～淡紅色
<i>C. sporogenes</i>	JCM1416	7.30	発育せず ^e	8.60	> 5.90	白色
<i>C. difficile</i>	DSM1296	7.30	5.40	8.00	1.90	淡褐色～黒色
<i>C. sordellii</i>	JCM3814	8.18	8.00	8.40	0.18	白色～淡紅色
<i>E. coli</i>	IFO3301	発育せず ^e	発育せず ^e	8.81	—	集落の形成なし
<i>S. aureus</i>	IFO12732	発育せず ^e	発育せず ^e	7.80	—	集落の形成なし

^a 検出限界: 1.4 log CFU/ml
^b CCP: CHROMagar™ C. perfringens 試作品
^c ECW⁺: カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地
^d GAM: GAM寒天培地
^e 出発希釈である10⁻¹希釈菌液による試験において発育せず

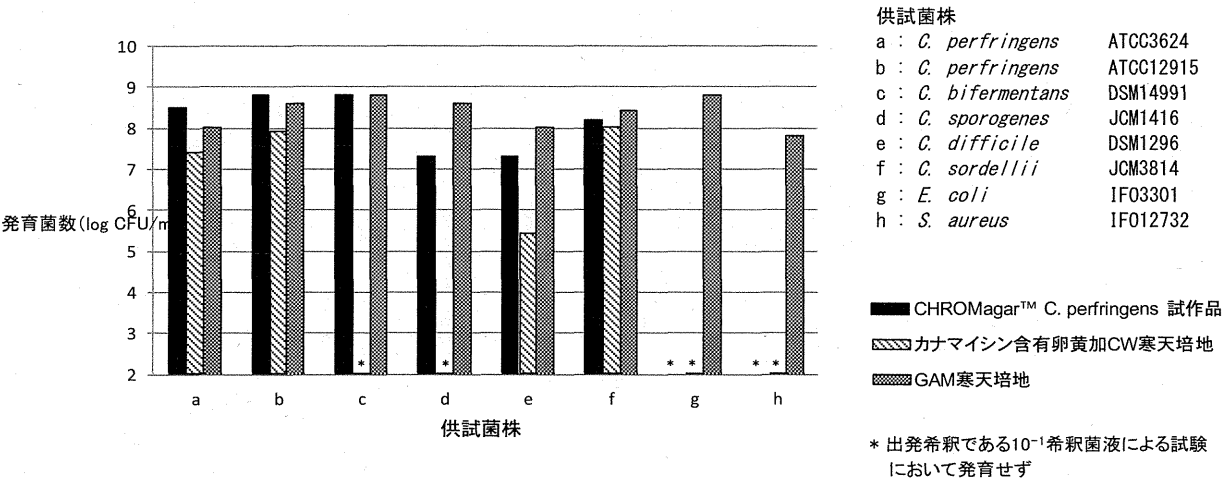


図1 標準菌株の各培地における発育菌数

表3 ウェルシュ菌野生株 40 株の各培地における発育菌数

No.	検体番号	発育菌数 (log CFU/ml) ^a			CCP - ECW ⁺ 発育菌数対数差 (b-c · log)
		CCP ^b	ECW ⁺ ^c	GAM ^d	
1	K1	8.30	7.78	8.30	0.52
2	K2	8.15	6.30	8.11	1.85
3	K4	7.70	5.98	8.04	1.72
4	K5	8.00	6.40	8.90	1.60
5	K8	8.54	6.48	9.08	2.07
6	K9	8.40	7.54	8.48	0.85
7	K10	8.85	7.81	8.78	1.03
8	K11	8.40	7.65	9.00	0.74
9	K12	8.81	3.98	9.04	4.84
10	K13	8.30	3.00	8.48	5.30
11	K14	8.60	4.48	8.95	4.12
12	A1	9.11	8.48	8.85	0.64
13	A4	8.81	7.93	8.78	0.88
14	A6	8.74	6.48	8.30	2.26
15	A9	8.78	7.81	8.48	0.97
16	A20	8.54	7.70	8.70	0.85
17	A30	8.90	7.30	8.70	1.60
18	A41	8.40	8.08	8.30	0.32
19	A43	8.70	8.20	8.90	0.49
20	A50	8.81	7.81	8.85	1.00
21	A56	8.54	3.24	8.24	5.30
22	A60	9.40	8.98	9.60	0.42
23	A61	9.18	8.98	9.85	0.20
24	A62	9.20	8.88	9.15	0.33
25	F1	8.88	7.78	8.70	1.10
26	F2	9.18	9.00	9.30	0.18
27	F3	8.70	8.08	9.18	0.62
28	F5	8.98	8.18	9.08	0.80
29	F6	9.30	6.95	9.30	2.35
30	S1	9.11	7.18	9.11	1.94
31	S2	8.60	6.81	9.04	1.79
32	S3	8.70	7.48	8.85	1.22
33	S4	8.70	7.85	8.70	0.85
34	S5	8.70	7.93	9.08	0.77
35	S6	9.00	6.60	9.08	2.40
36	S7	9.11	7.95	9.11	1.16
37	S8	7.88	6.74	8.60	1.13
38	S9	8.70	8.65	8.90	0.05
39	S10	8.74	7.11	8.48	1.63
40	S11	8.60	7.95	8.48	0.65

^a 検出限界: 1.7 logCFU/ml^b CCP: CHROMagarTM C. perfringens 試作品^c ECW⁺: カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地^d GAM: GAM寒天培地

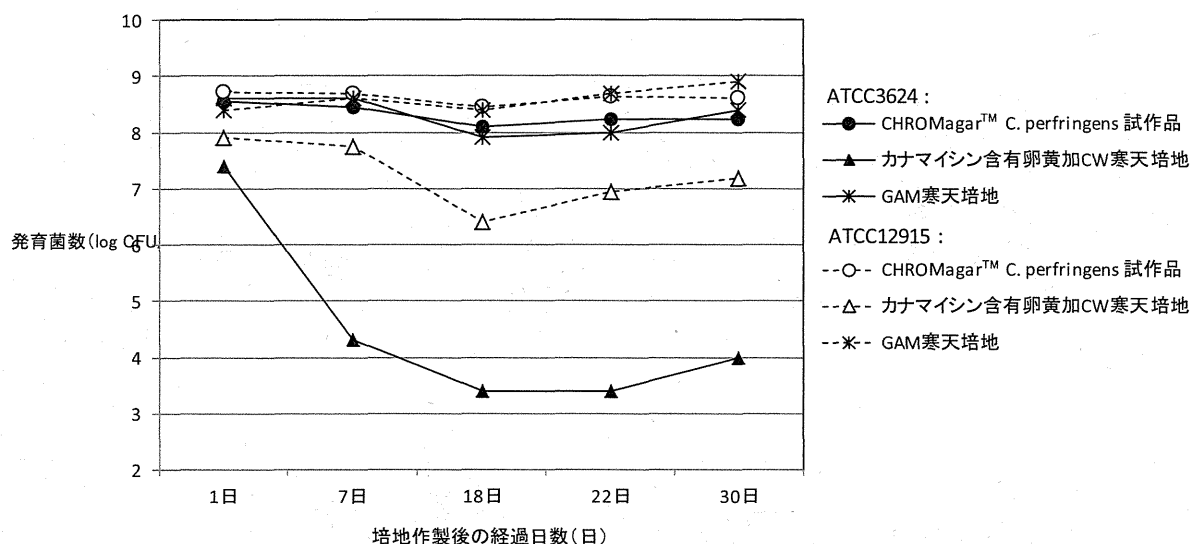


図2 培地作製後の経過日数毎のウェルシュ菌標準菌株の発育菌数

表4 カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地で発育不良を呈するウェルシュ菌の
カナマイシンに対する薬剤感受性試験

菌 株	センシディスク* 30 μ g/disk (阻止円直径・mm)	Etest* (MIC値・ μ g/ml)
K12 (野生株)	≤ 7 mm	128
K13 (野生株)	≤ 7 mm	128
K14 (野生株)	≤ 7 mm	128
A56 (野生株)	≤ 7 mm	128
ATCC3624	≤ 7 mm	≥ 256
ATCC12915	≤ 7 mm	≥ 256

[試験条件]培地:ブルセラ血液寒天、接種菌液濁度:McFarland 1.0、培養条件:35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、45 $\pm$ 3時間、嫌気培養
(アネロボックケンキ薬剤感受性用、CO₂濃度10%相当、三菱ガス化学)

* センシディスク、Etestともに、CLSIの嫌気性菌薬剤感受性試験の承認標準には、ディスク拡散法の指定及び
ウェルシュ菌の解釈基準がないため、S、I、Rの判定は行っていない。

表5 カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地で発育不良を呈するウェルシュ菌の
カナマイシンの有無による発育菌数及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数

菌 株	発育菌数 (log CFU/ml) ^a								ECW ⁺ - ECW ⁻ 発育菌数対数差 (g - i · log)	ECW ⁺ (6日 - 1日) 発育菌数対数差 (h - g · log)
	C C P ^b		ECW ⁺ ^c		ECW ⁻ ^d		GAM ^e			
	培地作製後経過日数									
	1日	6日	1日 ^g	6日 ^h	1日 ⁱ	6日	1日	6日		
K12 (野生株)	8.60	8.54	3.30	発育せず ^f	8.70	8.48	8.65	8.48	-5.40	< -1.90
K13 (野生株)	8.48	8.60	3.93	発育せず ^f	8.48	8.18	8.30	8.48	-4.55	< -2.53
K14 (野生株)	8.81	8.40	4.30	発育せず ^f	8.48	8.18	8.70	8.40	-4.18	< -2.90
A56 (野生株)	8.00	8.18	3.40	発育せず ^f	7.54	7.54	8.00	8.00	-4.15	< -2.00
ATCC3624	8.48	8.40	7.08	5.04	8.48	8.30	8.00	8.30	-1.40	-2.04
ATCC12915	8.81	8.60	7.90	7.18	8.40	8.40	8.60	8.65	-0.49	-0.73

^a 検出限界:1.4 logCFU/ml

^b CCP:CHROMagarTM C. perfringens 試作品

^c ECW⁺:カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地

^d ECW⁻:カナマイシン不含卵黄加CW寒天培地

^e GAM:GAM寒天培地

^f 出発希釈である10⁻¹希釈菌液による試験において発育せず