

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* 14: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
檉尾 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
小黑 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指し、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* 14: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引き続き行った。

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ベ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ュ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 *fliJB* 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 のウェ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ェ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 を用い、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