

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エ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 µl 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 µl 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。KanagawaCL0-011 と KanagawaCL0-012、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	KanagawaCLO-011	同一食中毒分離株
神奈川県衛生研究所	KanagawaCLO-012	
秋田県健康環境センター	Aki ta1	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Aki ta2	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Aki ta6	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Aki ta9	鶏分離株
秋田県健康環境センター	Aki ta55	同一食中毒分離株
秋田県健康環境センター	Aki ta57	
秋田県健康環境センター	Aki ta60	同一食中毒分離株
秋田県健康環境センター	Aki ta62	
秋田県健康環境センター	Aki ta64	
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	Sai tama1-10	鶏分離株
さいたま市健康科学研究センター	Sai tama2-10	鶏分離株
さいたま市健康科学研究センター	Sai tama14-10	鶏分離株
さいたま市健康科学研究センター	Sai tama20-10	鶏分離株

表2 供試菌株

	cpe	hecB	gpi2	gyrB	slkA	scdA	groEL	pgk	nadA	pilC	colA	lonB	eno	wis	pilA	tcpH	tcpF	rep	can	soj	parB	topA	ben
Kanagawa2-2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kanagawa2-4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1
Kanagawa9-4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1
Kanagawa10-1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1
Kanagawa12-6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
Kanagawa17-6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	1
KanagawaCLO-011	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	0	1
KanagawaCLO-012	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita2	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Akita6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Akita9	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita55	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita57	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita60	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1
Akita62	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Akita64	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0
Fukuoka1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0
Fukuoka2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	0	1
Fukuoka6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0
Fukuoka3	0	0	0	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	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
Saitama2-10	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1
Saitama14-10	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	1
Saitama20-10	0	0	0	0	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. 2000bp

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

表4 ウェルシュ菌遺伝子を対象としたPCRの結果

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

	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	0	1	1	同一事例]
Kanagawa2-4	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	
Kanagawa9-4	0	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0	1	
Kanagawa10-1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
Kanagawa12-6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
Kanagawa17-6	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	同一事例]
KanagawaCLO-011	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	
KanagawaCLO-012	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	
Akita1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	同一事例]
Akita2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
Akita6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
Akita9	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	
Akita55	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Akita57	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	同一事例]
Akita60	1	1	1	1	1	0	2	0	0	0	1	1	1	1	
Akita62	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Akita64	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Fukuoka1	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Fukuoka2	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	同一事例]
Fukuoka6	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
Fukuoka3	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	
Saitama1-10	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
Saitama2-10	0	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	
Saitama14-10	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	同一事例]
Saitama20-10	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	

同一事例
]

同一事例
]

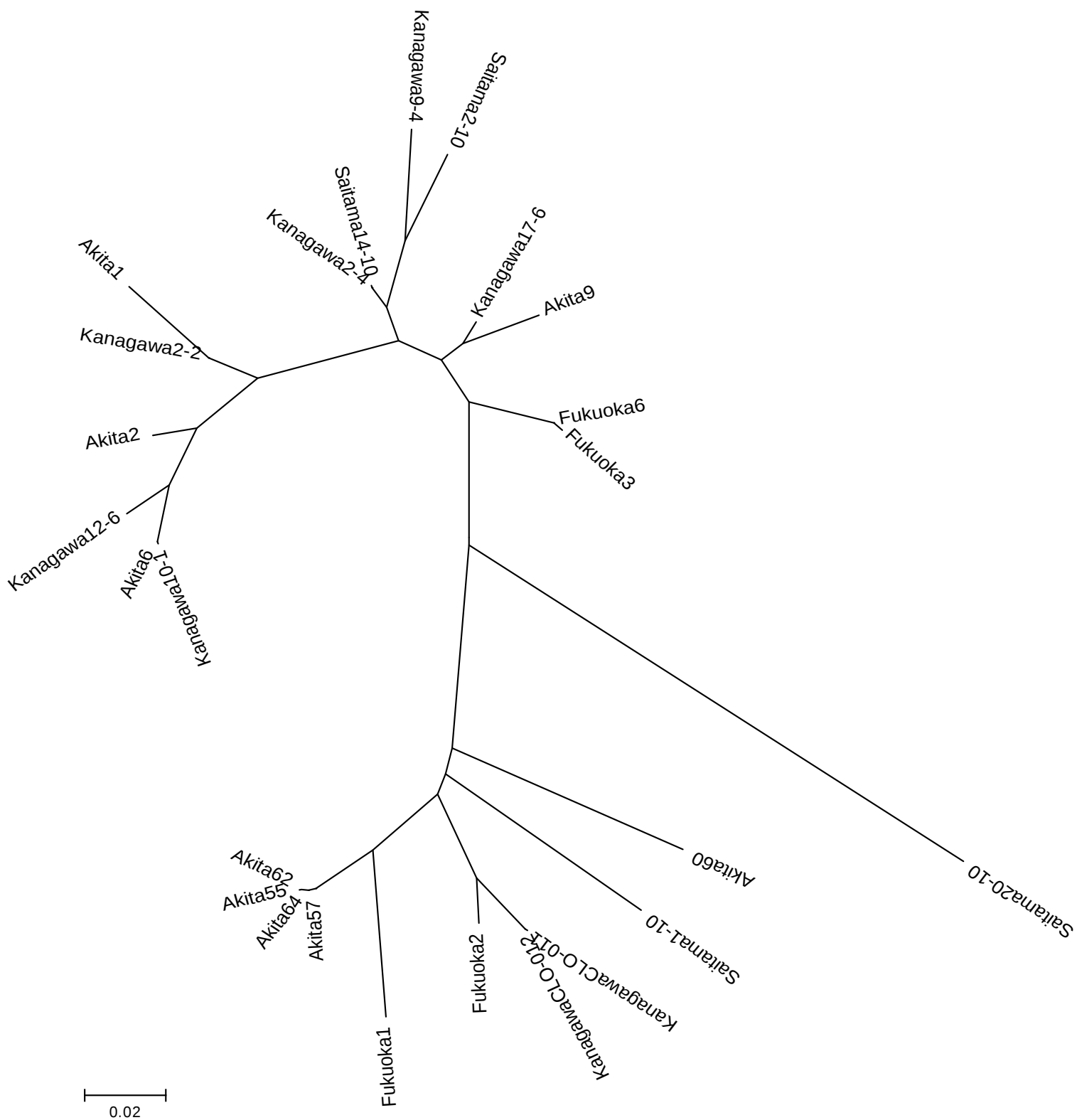


図1 今回の結果から得られた株間の遺伝的関係