

201522013A

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27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28(2016)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の比較検討 (食品、糞便等への添加回収) ..... 33  
世良 暢之 (福岡県保健環境研究所 保健科学部)

### 地方衛生研究所のネットワーク構築：

- 健康者由来黄色ブドウ球菌の遺伝子型別及び POT 法のコラボ試験について ..... 49  
齊藤志保子 (秋田県健康環境センター 企画管理室)

- Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価 ..... 59  
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 ..... 71  
小西 良子 (麻布大学 生命・環境科学部)

- マルチプレックス PCR によるウエルシュ菌エンテロトキシン CPE 遺伝子と  
新規エンテロトキシン BEC 遺伝子の同時検出法 ..... 83  
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 ..... 92

# 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 27 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。今年度は以下のような結果が得られた。

- 15 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。
- ウェルシュ菌のエンテロトキシン、ウェルシュ菌の新型エンテロトキシン、ウェルシュ菌  $\alpha$  毒素遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法を構築した。
- *Salmonella* I 4:b:- に対して *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、PFGE 法同等の性能を有することを明らかにした。
- 黄色ブドウ球菌のタイピングに関して複数機関におけるコラボ試験を行い POT 法の有効性を確認した。
- 食品の輸出入時における食品の安全確保のためのサンプリング法として、n 数が多い場合は、プレエンリッチメント法とプール法が試験を効率的に進めるために同等に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
世良 暢之	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

前田詠里子	福岡県保健環境研究所
西田 雅博	福岡県保健環境研究所
重村 洋明	福岡県保健環境研究所
丸田 直子	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
鈴木 美雪	神奈川県衛生研究所
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
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15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、ウェルシュ菌食中毒の病原因子としてはCPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin)が不可欠とされていたが、2014年に新型エンテロトキシンとしてBEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*)が同定された。そこで今年度は、従来の病原因子であるCPE遺伝子に加え、BECa、BECb、そしてウェルシュ菌 $\alpha$ 毒素のPLC遺伝子を同時に検出できるマルチプレックスPCR法も構築した。

さらに、ウェルシュ菌の分離を容易にするために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 (CCP培地)が実際の試験検査(食品或いは糞便)で使用可能かどうかを検証した。

- サルモネラ属菌のサーベイランス体制を充実させるための遺伝特性に関する試験法の開発および検討などを行う。昨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、解析法を検討した。本年度は Salmonella I 4:b:- について、昨年度 Salmonella I 4:i:- で使用した解析法をベースに検討を行った。
  - 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、同じサンプルを用いて 5 機関で POT 法を行い、結果を比較し信頼性を確認した。
  - *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引き続き行った。これまでの検討では multiplex PCR により本来検出されなければならないバンドが得られない事象がみられたため、複数の taq polymerase を用いて、適切に結果が得られるかを評価した。さらに、鶏肉からの分離株を用いて、菌株の薬剤感受性と鶏肉の生産地域のデータと合わせて、CGF40 と PFGE によりクラスター解析を行った。
  - 細菌性食中毒の原因を取り除くためには適切な衛生管理が必要であり、検体の採取方法が重要である。このサンプリングプランは科学的根拠に基づかなければいけない。現在、我が国では  $n=1$  のサンプリングを行っているが、諸外国では複数のサンプリングを行うのが主流となっている。そこで、効率的に複数の検体を検査するために 2 種類のサンプル・プーリング法（プール法、プレンリッチメント法）の検出感度を検討した。
- B. 研究方法
1. ウェルシュ菌に関する研究
 

ヒト、ニワトリ、ウシ、食品由来の毒素産生性および非産生性 44 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。昨年度の結果から 26 の対象遺伝子を 15 に減らしても解像度が変わらないことが明らかになったため、今年度は 15 の遺伝子を対象に PCR を行った。この結果から、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、CPE、BECa、BECb、PLC 遺伝子を同時に検出するマルチプレックス PCR は PCR 反応液に QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit(QIAGEN) 用いて構築し、その感度、特異性を検討した。

CCP 培地の評価に関しては、ウェルシュ菌及びその夾雑菌であるクロストリジウム

属菌 4 菌種を食品或いは糞便等に添加し、効率的に回収できるかどうかについて、3 種類の培地 (ECW<sup>+</sup>培地、CCP 培地及び TSC 培地) を用いて検討した。

## 2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

*Salmonella* I 4:b:-に関して 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、PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012)に記載の multilocus sequence typing (MLST) を用いた MLST 解析および PFGE 解析も合わせて行った。

## 3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

CGF40 の multiplex 化を図るために Taq polymerase の検討を行った。Emerald Amp PCR Master Mix (タカラバイオ)、Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ)、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ) および KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye (Kapa Biosystems) を用いて検討した。また、鶏肉から分離した *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* を CGF40 及び PFGE により型別し、薬剤感受性及び鶏肉の産地のデータと合わせてクラスター解析した

## 4. ブドウ球菌の遺伝子型別

POT 法の信頼性を確認するために鶏肉由来株 5 株、ヒト糞便由来株 5 株計 10 株を用いて、複数機関における POT 型別結果の比較を行った。

## 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

食品中に存在する微生物は流通、保管等において何らかの損傷を受けているため、損傷サルモネラを用い、プール法とプレエンリッチメント法の検出感度を比較した。今年度はカット野菜を対象として研究を行った。

## C. 結果

### 1. ウェルシュ菌に関する研究

15 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、15 の遺伝子を対象とした PCR を行うことによって、本検査法が菌株の由来、毒素産生性など菌株の特徴をうまく表現してタイピングできることが明らかになった。

さらに CPE、BECa、BECb、PLC 遺伝子を同時に検出するマルチプレックス PCR の構築に成功した。本 PCR 法の感度は、CPE 遺伝子陽性株で  $10^4$  cfu/ml、BECa および BECb 遺伝子陽性株で  $10^3$  cfu/ml であり、エンテロトキシン遺伝子検出法としては十分な感度を有していることがわかった。特異性も非常に高くウェルシュ菌以外の 166 株に対して増幅産物は全く確認できなかった。

CCP 培地の評価に関しては、ウェルシュ菌を単独で食品に添加した際には CCP 培地が最も回収率が優れているが、夾雑菌が含まれている可能性がある食品等の試験検査の場合には TSC 培地のほうがより優れてい

ることが示された。しかし、糞便からの分離を行う場合、ECW<sup>+</sup>培地に加え、CCP 培地を併用することで、その可能性が上昇すると思われた。

## 2. サルモネラの疫学解析マーカーの検出

サルモネラ 44 株を供試した。8 株は血清型参照株であり、内訳は Paratyphi B 4 株、Paratyphi B var Java 2 株、Schleissheim 1 株、S. II 4:b:- 1 株であった。36 株は試験菌株で、うち 29 株はヒト由来株、7 株は非ヒト由来株であった。試験菌株のうち、3 株が Paratyphi B、23 株が Paratyphi B var Java (酒石酸陽性) であった。残り 10 株は S. I 4:b:- であった。解析の結果、Paratyphi B var Java が複数のクローンから成ることが MLST および PFGE 解析から明らかになった。また、本研究で供試した試験菌株の S. 4:b:- も、複数のクローンから成り、Paratyphi B var Java に由来し、*hin* 遺伝子 (および/もしくは *fljB* 遺伝子) を欠いたために単相菌になったことが示唆された。

## 3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

CGF40 の実施に最も適した taq polymerase を選ぶために、4 種の市販の taq polymerase を比較検討したところ、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 により最も多くのバンドが得られた。しかし、一部のバンドを得ることが出来なかった。

また、鶏肉分離株薬剤感受性及び鶏肉の産地のデータと合わせてクラスター解析し

たところ、CGF40 は PFGE と同等の識別能力を示し、特定の菌グループが薬剤耐性あるいは生産地域との関連性があることが示された。

## 4. 食中毒由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

黄色ブドウ球菌株について POT 法による遺伝子型別を地方衛生研究所 5 機関において実施した。その結果を比較したところ、供試 10 株中 1 株における 2 つのバンドの判定に不一致が認められた。広域の重要事例等の場合は POT 型の数値に加えて写真情報の相互確認も必要と考えられた。

## 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

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、サルモネラの汚染菌量が  $10^1$  CFU/g 以上であればカット野菜から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 15 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。さらに結果をデジタルデータとして表すことが出来るため、これまでの PFGE 法の欠点を克服することが出来る。これらのことから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、多くの研究機関に参加を呼びかけ、データを蓄積することによって本検査法の有用性が増すと思われる。

また今回作成した CPE、BECa、BECb、PLC 遺伝子を同時に検出するマルチプレックス PCR は感度、特異性共に非常に高く、スクリーニング法として有効であると考えられた。

さらに CCP 培地は夾雑菌であるクロストリジウム属菌との鑑別が容易であることから、食中毒発生時のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を分離するのに有用であると思われた。

## 2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

サルモネラは主要な食中毒起因菌であり、血清型別を含めた迅速なタイピングは疫学調査に欠かせない。*hin* 遺伝子等の PCR タイピング、MLST 解析などの遺伝的特性を利用した解析法は、単相菌をはじめとしたサルモネラの血清型の推定ならびにクローンの同定に有用であることが示された。

## 3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

Multiplex PCR Assay により型別を行う CGF40 では、PCR に用いる taq polymerase

を適切に選択する必要が認められた。しかし、CGF40 を用いたクラスター解析は、遺伝子型と薬剤耐性との間に関連性があり、また、特定のクラスターに属する菌グループが特定の地域に分布し、薬剤耐性を示すものもあることが示された。このことから CGF40 による解析は *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別に非常に有効な方法であることが明らかになった。

## 4. 食中毒由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

今回実施した POT 法のコラゴ試験においては、供試した 10 株中 9 株がすべての機関で一致した。また、判定の難しいバンドも見られたため広域事例等で複数の機関での型別結果を比較する場合、できれば写真情報も共有しそれぞれで確認する必要があると考えられた。POT 法による型別は PFGE や MLVA 法と比べるとやや型別種数が少なかったが、操作の簡便性、型別結果が数値標記されること等から POT 法も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適切なサンプリングが重要である。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これまでの結果から確認された。諸外国との整合性を考え n 数が多くす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

今年度は、これまで行ってきた各種細菌のタイピング手法に関する研究を発展させ、さらに信頼性を確認した。本研究で構築したタイピング手法はいずれも簡便で特別な手技や機器を必要とせず、また結果の判別が非常に容易である。さらに、デジタルデータとして結果を表せられるため、他機関同士で結果の比較が容易である。いずれのタイピング法もすぐに現場で使用できるものばかりである。今後、自治体などの現場での普及を進めて行きたいと思う。

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、サンプリング数が増加した場合でも、カット野菜においてはプレエンリッチメント法とプール法の適用が可能であることが確認された。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必要があると思われる。

#### F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 西田ら、ウェルシュ菌の選択分離を目

的とした酵素基質培地の基礎的検討、  
第41回九州衛生環境技術協議会、平成  
27年10月8日、熊本市、

2. 余野木伸哉，久米田裕子：マルチプレックス PCR 法によるウェルシュ菌エンテロトキシン CPE 遺伝子と新規エンテロトキシン BECab 遺伝子の同時検出法，日本防菌防黴学会第42回年次大会，大阪（2015）

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 27 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

ウェ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 久米田裕子（大阪府公衆衛生研究所 細菌課）  
研究協力者 余野木伸哉（大阪府公衆衛生研究所 細菌課）  
研究協力者 世良 暢之（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）  
研究協力者 曾根 美紀（さいたま市健康科学研究センター 生活科学課）  
研究協力者 加藤 直樹（さいたま市健康科学研究センター 生活科学課）

ウェルシュ菌のタイピング手法には多くの方法が開発され使用されているが、手技が煩雑で、結果が得られるまでに時間を要し、複数の研究機関における結果の比較が困難なものが多い。本研究ではウェルシュ菌の毒素遺伝子、病原遺伝子、ハウスキーピング遺伝子の計 15 の遺伝子を PCR し、その結果を総合しタイピングに利用できないか検討を行ってきた。ヒト、ニワトリ、ウシ、食品由来の毒素産生性および非産生性 44 株を用いて検討したところ、本検査法がウェルシュ菌の由来、特徴をうまく現してタイピングでき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った。今後、多くの菌株を本検査法でタイピングし、多くのデータを蓄積することによって、本検査法はウェルシュ菌のタイピングに非常に有効な検査法になると思われる。

A. 研究目的

ウェルシュ菌の簡便な分子疫学手法を行う。これまでウェルシュ菌に対する多くの分子疫学的解析手法が考案されているが、多くのものは操作が煩雑で結果が得られるまで長時間を要するものが多かった。また、

得られた結果に再現性がなかったり、検査機関同士で結果を比較するのが困難な手法が多い。そこで昨年度は 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、さらに 21 の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した。昨年度はニワトリ分離株を用いてこの方法の有効性を検討した。その結果、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。今年度はニワトリ由来株に加えて、食中毒事例株、ヒト分離株、ウシ分離株、さらに毒素産生株などを用い、これらのタイピングに本方法が有用であるかどうかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

研究に使用した菌株は昨年度、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。さらに本年度は大阪府公衆衛生研究所で分離されたヒト、ウシ、食品由来の 19 株を追加し 44 株を使用した (表 1)。

### 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°C、一晚培養した。菌液 200  $\mu$ 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  $\mu$ l 加え、56°C で 20 分間、加熱した。

10 秒間の攪拌処理を行い、100°C 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。昨年度検討した 25 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て、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*)<sup>1</sup>、11 種の病原遺伝子およびハウスキーピング遺伝子、計 15 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<sup>2</sup>。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<sup>1</sup>。ウェルシュ菌の 11 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<sup>3</sup>。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<sup>4,5</sup>。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。今回使用した 44 株は大きく 6 つのグループに分けられた。菌株の由来ごとに結果を見てみると、ヒト由来株は 6 グループ全体にわたって分布していた。一方、鶏由来株はグループ 4 及び 6 に集中して分布していることが明らかになった。ウシ由来株は、グループ 3 に集中することが明らかになった。

毒素産生性で見ると、CPE 遺伝子を染色体に持つ株はグループ 2、CPE 遺伝子をプラスミド持つ株はグループ 5 に分類された。また、新型 CPE 遺伝子保有株はグループ 3 に集中している傾向が認められた。同じ CPE 遺伝子保有株でも染色体に持つ株とプラスミドに持つ株との間で遺伝的距離が大きく離れていることが明らかになった。グループ 3, 4, 6 に分類される株で CPE 遺伝子を保有している株は一つもないことから、グループ 5 に分類されるプラスミドに CPE を持つ株は外部からプラスミドを取り込んだと思われる。

ニワトリからは多くのウェルシュ菌株が

分離されることがこれまでに報告されている。しかしながらニワトリ分離株から CPE 遺伝子保有株の分離頻度は高くないことが知られている。今回の結果からも CPE 遺伝子を染色体に持つ株とニワトリ分離株の間には大きな遺伝的距離が認められ、ニワトリ由来の菌株の大部分は食中毒と関係がない可能性が示唆された。今後さらに菌株を増やし、データを蓄積することによって、食中毒分離株の由来を明らかにできるかもしれない。

今回の結果から、本検査法が菌株の由来、毒素産生性など菌株の特徴をうまく表現してタイピングできることが明らかになった。本検査法でデータを蓄積していけば、試験菌株の由来について十分な考察を行うことが出来るようになると思われる。昨年度も述べたが、本試験法に必要なのは PCR に必要なサーマルサイクラーだけである。また、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。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。

#### D. 結論

本検査法はPCRだけの簡便な方法で高解像度にウェルシュ菌をタイピングできる方法である。今後、多くの研究機関に参加を呼びかけ、データを蓄積することによって本検査法の有用性が増すと思われる。

#### 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 imbricus*, 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

表 1 A 供試菌株

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 1 B 供試菌株

分離機関	株名	由来
大阪府公衆衛生研究所	Osaka1	食中毒患者便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka2	食中毒患者便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka3	牛直腸スワブ
大阪府公衆衛生研究所	Osaka4	牛直腸スワブ
大阪府公衆衛生研究所	Osaka5	牛直腸スワブ
大阪府公衆衛生研究所	Osaka6	牛直腸スワブ
大阪府公衆衛生研究所	Osaka7	牛直腸スワブ
大阪府公衆衛生研究所	Osaka8	ヒト糞便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka9	ヒト糞便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka10	ヒト糞便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka11	ヒト糞便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka12	ヒト糞便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka13	干しシイタケ
大阪府公衆衛生研究所	Osaka15	そばつゆに使用した使用済み 乾ししいたけ 食中毒由来株
大阪府公衆衛生研究所	Osaka16	ヒト糞便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka17	ヒト糞便
大阪府公衆衛生研究所	Osaka18	ヒト糞便 ウェルシュ菌以外 の食中毒由来
大阪府公衆衛生研究所	Osaka19	ヒト糞便 ウェルシュ菌以外 の食中毒由来

cpe	enterotoxin gene
becB	novel enterotoxin gene
cpb2	$\beta$ 2toxin gene
gyrB	DNAgyrase B subunit gene
plc	phospholipase C (alpha toxin) gene
pfoA	theta toxin gene
tcpF	plasmid transfer factor gene
can	putative collagen adhesion protein gene
soj	sporulation initiation inhibitor protein gene
parB	putative plasmid maintenance genes
topA	putative plasmid maintenance genes
bcn	UV-induced bacteriocin gene

表2 対象ウェルシュ菌遺伝子

	cpe	bec	cpb2	gyrB	plc	eno	pfoA	tcpF	can	soj	parB	topA	bcn	
Kanagawa2-2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Kanagawa2-4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Kanagawa9-4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Kanagawa10-1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Kanagawa12-6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Kanagawa17-6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
KanagawaCLO-011	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	食中毒
KanagawaCLO-012	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	食中毒
} 同一事例														
Akita1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Akita2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Akita6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Akita9	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Akita55	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	食中毒
Akita57	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	食中毒
Akita60	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	食中毒
Akita62	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	食中毒
Akita64	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	食中毒
} 同一事例														
Fukuoka1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Fukuoka2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Fukuoka6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Fukuoka3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Saitama1-10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Saitama2-10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Saitama14-10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Saitama20-10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
Osaka1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	患者便
Osaka2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	患者便
Osaka3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	牛直腸スワブ
Osaka4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	牛直腸スワブ
Osaka5	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	牛直腸スワブ
Osaka6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	牛直腸スワブ
Osaka7	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	牛直腸スワブ
Osaka8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便
Osaka9	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便
Osaka10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便
Osaka11	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便
Osaka12	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便
Osaka13	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	乾しいたけ
Osaka15	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	そばつゆに使用した使用済み乾しいたけ 食中毒由来株
Osaka16	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便
Osaka17	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便
Osaka18	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便 別の食中毒由来株
Osaka19	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便 別の食中毒由来株
Osaka20	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	ヒト糞便 別の食中毒由来株

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 ウェルシユ菌遺伝子を対象としたPCRの結果

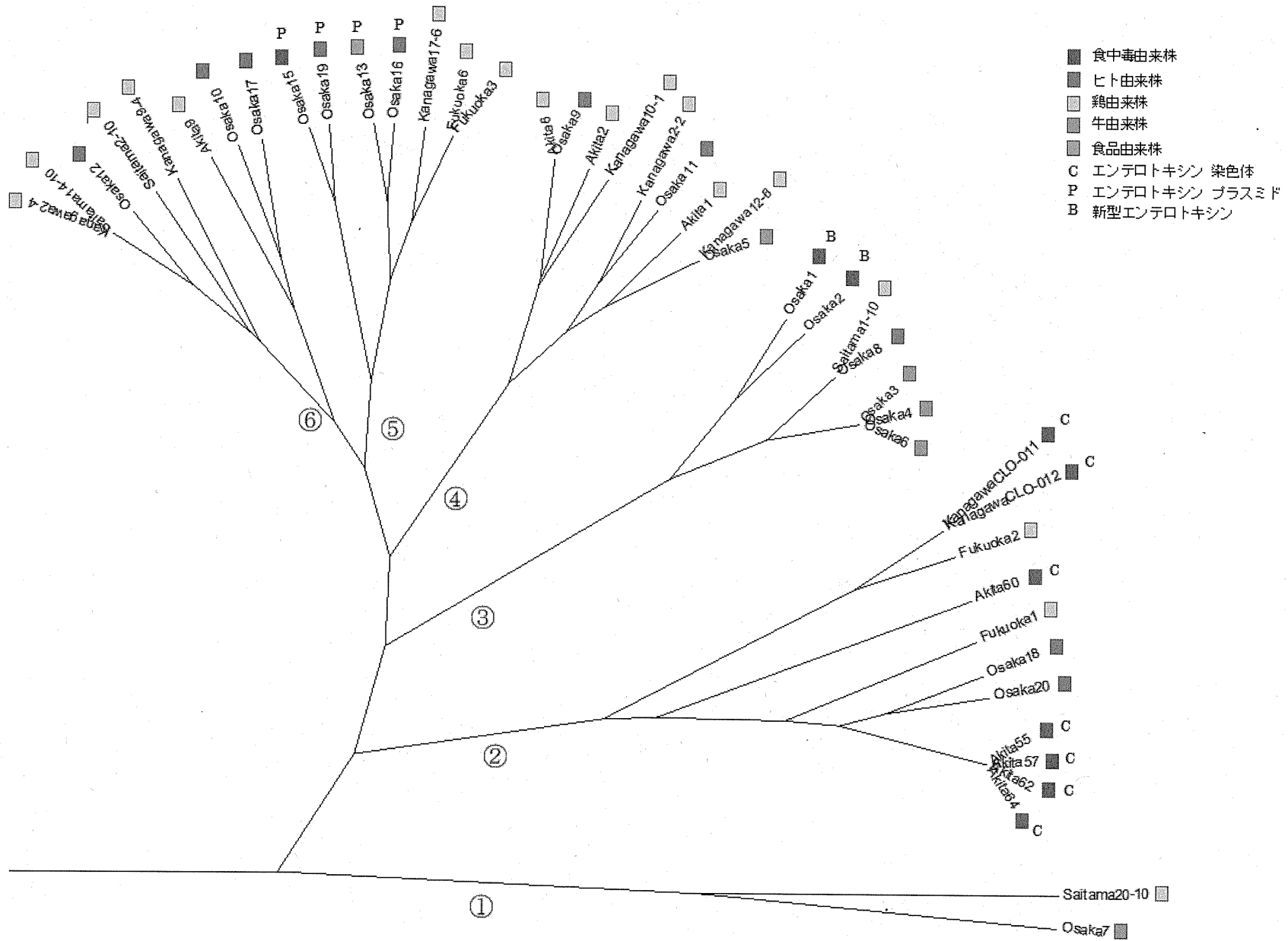


図1 今回の結果から得られた株間の遺伝的関係