

分 担 研 究 報 告 書

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

小西 良子

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

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

研究分担者 小西 良子（麻布大学 生命・環境科学部）

研究協力者 石崎 直人（麻布大学 生命・環境科学部）

我が国で起きている細菌性食中毒の発生状況は、平成20年以降で平均事件数500、患者数8,000人を超えており、国民の健康を脅かす深刻な問題となっている。これら食中毒の原因となる危害物質を取り除くためには適切な衛生管理手法が必要となり、検体の採取方法が最も重要となる。これらサンプリングプランは母集団の汚染を正しく反映して、合否を判定する必要があるため、科学的根拠に基づき確立されなければならない。現在、衛生管理における微生物のサンプリングプランは、The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) が提唱した2階級法と3階級法に基づいている。ICMSFの提案している微生物規格の基本的な特徴は、微生物の危害度および食品の取り扱い条件による危害度の両者を考慮した微生物の危害度分類を行い、それに対応したサンプリングが設定されていることであり、コーデックス、EU諸国および米国ではサンプリングプランが定められている。

そこで、日本でも今後複数検体を採取するサンプリングプランが主流になることが予想されるため、複数検体を効率的に検査する手法の検討を本研究の目的とし、Priceらが提唱したプレエンリッチメント法とプール法を比較検討した。前年度は日本で多く喫食され、かつサルモネラの汚染が確認されているRTE食品のネギトロを対象とし、サルモネラの汚染菌量が 10^{-1} CFU/g 以上であれば、両手法とも同等の検出感度が担保されていることが明らかになった。本年度はRTE食品でかつネギトロと夾雑菌の菌叢が異なるカット野菜を対象として、両サンプル・プーリング法の検出感度を検討した。その結果、カット野菜においてもネギトロと同様に、サルモネラ汚染菌量が 10^{-1} CFU/gであれば両手法において同等の結果が得られた。

本研究においてサンプリング数が増加した場合でも、ネギトロと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。本法を他の食品に適用する際には、夾雑菌の菌叢や菌量などを科学的に把握し、使用する選択増菌培地を数種類用いることにより、効率的かつ簡易に検査が可能になると考えられた。

A. 研究目的

我が国の食品衛生法に記載されている食肉製品におけるサルモネラ検査のサンプリング法は、1検体当たり約1kgを採取し、その断面の中央部から25gをn=1で無菌的に採り、試料とする方法が採用されている¹⁾。

諸外国の規格基準は原則ICMSFの考え方を基に作られており²⁾、EUにおけるサルモネラの規格基準は、25gのn=5~30となっておりISOに試験法が記載されている^{3, 4)}。

Listeria monocytogenes については乳幼児および特別医療目的のRTE食品において25gのn=10が設定されている^{2, 3)}。

アメリカのFood and Drug Administration (FDA) と Food Safety and Inspection Service (FSIS) もEU同様、摂取する人のリスクと食品の種類によって、カテゴリーを分けており、サルモネラのサンプリング数として25gのn=15~60が設定され、試験法はBacteriological Analytical Manual (BAM) に掲載されている⁵⁾。*L. monocytogenes* については食品特性などにより分類され、25gのn=5~60であり、FSISのLaboratory Guidebookに試験法が掲載されている^{6, 7)}。

近年、国際ハーモナイゼーションの必要性から、我が国では平成23年には生食用食肉を対象食品として腸内細菌科菌群が、平成26年には非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ（ソフト及びセミハードに限る。）を対象食品として*L. monocytogenes* の規格基準が策定された⁸⁾。それに伴い、サンプリング数も国際的規準にハーモナイズするように変更された⁹⁾。*L. monocytogenes* では、予備試験において試験試料の25gを3箇所以上から採取し、定量試験と定性試験が行われる。定量試験において試料原液1ml当たり*L. monocytogenes* が1~10コ存在した場合か、定性試験で陽性であった場合は、本試験においてn=5で定量試験を実施することとされた。腸内細菌科菌群では加工工程全体の妥当性を確認するため、25gで25検体以上の検査を実施する方法が採用されている⁹⁾。

現在、日本の公定法においては25gのn=1のサンプリング法が大部分を占めているが、今後、このようにサンプリング数の改正が進められていくと考えられる。

しかしn数が増えた場合には、従来のサンプリング法と比較し、より多大な時間、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ル・プーリング法として、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¹⁰⁾。プレエンリッチメント法とは、n数分の検体をそれぞれの容器で増菌培養し、各増菌培養液の一部を採取し、1つの選択液体培地で増菌する検査法である。プール法とは、n数分の検体を1つの容器に集め増菌培養する方法である。しかし、対象となる食品により、夾雑菌の菌叢に影響を受ける可能性があるとの報告があるため¹⁰⁾、妥当性の評価が必要となる。

前年度はネギトロにおいて両サンプル・プーリング法の有用性が確認されたため、今回は、ネギトロと菌叢の異なるRTE食品のカット野菜を対象とし、プレエンリッチメント法とプール法におけるサルモネラ試験法の妥当性の評価を目的とした。

B. 研究方法

1. 供試材料

市販カット野菜：平成27年10月10日～平成28年1月12日に小売店で茨城、北海道、愛知、秋田産カット野菜（キャベツ）を購入した。何れの消費期限も4日間であった。

2. 供試菌株

Salmonella Infantis1383-1（鶏肉由来）

3. 損傷サルモネラの作製方法（損傷度）

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、本実験で使用する接種菌については、損傷を与えたサルモネラを用いた。損傷方法は *S. Infantis* 1383-1 を Brain Heart Infusion (BHI) で35°C、24h培養後、ブロックヒーター (EYELA MG-2000) を用いて、スパイクプロトコール (annex D in draftISO 16140-2) に基づいて50°C、15分加熱処理を行って作製した⁸⁾。

損傷度の評価は加熱処理した増菌培養液をDHL選択培地とSPC非選択培地を使用して菌数を測定し、それらの相違が0.5 logCFU以上であれば損傷菌と判定した。

4. カット野菜10gを用いたプレエンリッチメント法によるdサルモネラの検出方法の検討 (n=5)

実験はdサルモネラ接種量が 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} CFU/gとした4群でおこなった。それぞれの群でカット野菜10gを5検体採取し、ストマッカー袋に入れた。5つのストマッカー袋のうち1つのストマッカー袋に、1g当たりdサルモネラの菌数をそれぞれ $10^1 \sim 10^{-2}$ CFUに調整し接種した後に、Buffered Peptone Water (BPW) を90mlずつ加えて、37°C、22±2時間培養した。培養後、各ストマッカー袋からBPW 0.1mlをRV選択増菌培

地10ml、1mlをTT選択増菌培地10mlに加えて42°C、22±2時間培養した。その後、各増菌培養液10μlをDHLとCHSに画線し37°C、22±2時間培養しコロニーの有無を確認し、サルモネラと疑われるコロニーについてはサルモネラ免疫0血清を用いて血清学的試験を行った。カット野菜の細菌数は試料原液を用いて標準寒天培地で37°C、48±2時間培養後、発育した集落数から算出した。

5. カット野菜10gを用いたプール法によるdサルモネラの検出方法の検討 (n=5)

プレエンリッチメント法と同様にそれぞれのカット野菜から5検体ずつ採取し、その1つにdサルモネラを接種した後に、1つの三角コルベンに50g 全てを集約し、BPW450mlを加え、37°C、22±2時間培養した。以下、サルモネラの確認についてもプレエンリッチメント法と同様に行った。

6. カット野菜25gを用いたプレエンリッチメント法およびプール法によるdサルモネラの検出方法の検討 (n=5)

サンプル量を25gとして10gの場合と同様にdサルモネラを接種し、両方法の検出方法の検討を行った(図1、2)。

C. 研究結果

1. カット野菜10gを用いた各サンプル・プ

ーリング法を用いたdサルモネラの検出 (n=5)

10g を採取した場合、各サンプリング法において5回中4回は、カット野菜中のサルモネラ接種菌量が $10^1 \sim 10^{-1}$ CFU/g、何れの濃度においても検出することが可能であった。1回のみプール法ではRV選択増菌培地を用いた場合の検出感度が 10^1 CFU/gであったが、TT選択増菌培地では 10^{-1} CFU/gまでサルモネラを検出することが出来た(表1)。

2. カット野菜25gを用いた各サンプル・プーリング法によるdサルモネラの検出 (n=5)

10gにおいては一部の濃度ではdサルモネラが検出されない場合も認められたが、我が国を初め世界各国で採用されているサンプル量を25gにして、5回実験を実施した。その結果、5回全てにおいてサルモネラ汚染菌量が 10^{-1} CFU/gであれば両方法において同等の検出感度であることが確認できた。このことから、カット野菜を対象食品とする場合では、両方法に差が無いことが明らかになった(表2)。

D. 考察

生ハムやナチュラルチーズなどのRTE食品の消費量は年々増加の一途をたどってい

る。カット野菜においても同様の傾向が認められ、カット野菜購入個数は平成21年度の千人当たり20個から平成24年度にはほぼ倍増している¹¹⁾。しかし、RTE食品は加熱工程無しで喫食するため、海外においては、これらRTE食品の二次汚染による食中毒事件が発生している^{12, 13)}。厚生労働省が実施している食品の食中毒菌汚染実態調査の平成24年度の結果では、カット野菜から大腸菌が7.5%、カイワレヤやみつばからはサルモネラが検出されている¹⁴⁾。日本のサンプリングプランが食に起因する健康被害を減少させるために、国際社会と調和を計るには、科学的根拠に基づきサンプリングプランのn数を設定しなければならない。

平成25年に我々は、国際的なサンプリングプランと比べて、日本のサンプリングプランの妥当性の有無を検討することを目的として、病原微生物の代替として蛍光ラテックスビーズ (F-LB、1.0 μ m) を用い、1ロットから採取する検体1kg (バッチという) に一定量を塗布し、食品内での微生物の存在の不均一性がバッチ全体の汚染検出率にどのように反映するかを評価した。この結果、1バッチ (1kg) から1検体25gをn=6採取すれば、ロット全体の汚染を反映できると考察した。F-LBで得られたデータを基に、ネギトロではn=6で検討をしたが、国際的なサンプリングプランではn=5を採用してい

る場合が多いため、RTE食品のカット野菜では、n=5の条件でプレエンリッチメント法とプール法の妥当性を評価した。カット野菜で用いた野菜の種類は、カット野菜原料の年間使用量で最も多く、3割以上を占めるキャベツを用いた¹¹⁾。

サンプル量を10gとしたプレ実験においては、5回中4回においてはプレエンリッチメント法とプール法の何れのサンプリング法においても、1g当たり 10^{-1} CFUの接種濃度までdサルモネラを検出することが出来た。しかし、1回でのみプレエンリッチメント法とプール法においてdサルモネラを検出することの出来ない、選択増菌培地と分離培地の組み合わせがあった。この理由としては、カット野菜の細菌数が他の場合と比較し著しく多かつたわけではないが、汚染していた夾雑菌を、今回使用した培地では制御することが出来なく、dサルモネラの増殖を阻害したためと考えられた。

次いで、サンプル量を公定法などで採用されている25gとして両サンプル・プーリング法の妥当性を評価した。その結果、カット野菜25g中のサルモネラ汚染菌量が、 10^{-1} CFU/gであれば両手法でサルモネラを検出できることが確認できた。

本研究において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。本法を他の食品に適用する際には、夾雑菌の菌叢や菌量などを科学的に把握し、使用する選択増菌培地を数種類用いることにより、効率的かつ簡易に検査が可能になると考えられた。

E. まとめ

食品の輸出入時において食中毒菌などの危害物質に汚染されている可能性のある食品を取り除き、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確認された。諸外国との整合性を計るにはn数が多くなると考えられるが、費用や労力がかかるため、プレエンリッチメント法とプール法の妥当性を検討した。

その結果、何れのサンプル・プーリング法を用いても、カット野菜25g中のサルモネラ汚染菌量が 10^{-1} CFU/gであれば検出できることが確認できた。

平成26年にナチュラルチーズなどの成分規格にリステリアの基準値が設定され、定量試験法によりn=5で評価することとなった¹⁰⁾。今後、我が国におけるサンプリング法においてこの様な傾向が続くと予想されるため、両サンプ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。

F. 参考文献

1. 食品衛生検査指針 微生物編 厚生労働省監修 2015 (社) 日本食品衛生協会
2. 食品安全管理における微生物学的検査基準と設定の考え方 ICMSF/編 春日文子/監訳 小久保彌太郎/監訳 島原義臣/監訳 中央法規出版
3. Corrigendum to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of November 2005 on microbiological criteria for foodstuff.
4. COMMISSION REGULATION (EU) No 209/2013 of 11 March 2013. Amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for sprouts and sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat. Official Journal of the European Union. 12. 3. 2013.
5. BAM: Food Sampling/preparation of Sample Homogenate. April 2003.
6. September 2012. FSIS *Salmonella* Compliance Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry

- Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products.
7. FSIS Compliance Guidelines :Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. January 2014.
 8. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：リステリア・モノサイトゲネスの検査について、平成26年11月28日、食安発1128第3号（2014）
 9. 食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件について，食安発0912第7号平成23年9月12日
 10. W. R. PRICE, R. A. OLSEN, and J. E. HUNTER APPLIED MICROBIOLOGY, Apr. 1972, p. 679-682 Vol. 23, No. 4 *Salmonella* Testing of pre-enrichment Broth Cultures for Screening Multiple Food Samples
 11. 平成24年度カット野菜需要構造実態調査事業、報告概要、平成25年1月、（独）農畜産業振興機構。
 12. Sagoo, S.K., Little, C.L., Ward, L., Gillespie, I.A., Mitchell, R.T. J Food Prot. 2003 Mar;66(3):403-9. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments
 13. Vestrheim, D.F., Lange, H., Nygård, K., Borgen, K., Wester, A.L., Kvarme, M.L., Vold, L.. Epidemiol Infect. 2015 Nov 20:1-5. Are ready-to-eat salads ready to eat? An outbreak of *Salmonella* Coeln linked to imported, mixed, pre-washed and bagged salad, Norway, November 2013.
 14. 平成26年度食品の食中毒菌汚染実態調査の結果について、食安監発0327第13号、平成27年3月27日
- G. 研究発表
なし
- H. 健康危険情報
なし

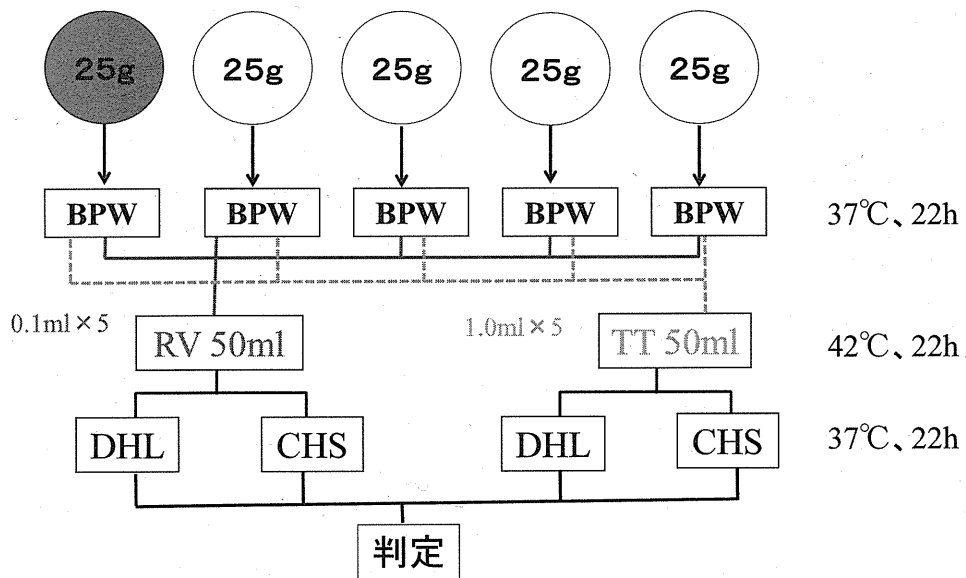


図1 プレエンリッチメント法を用いたdサルモネラの検出方法

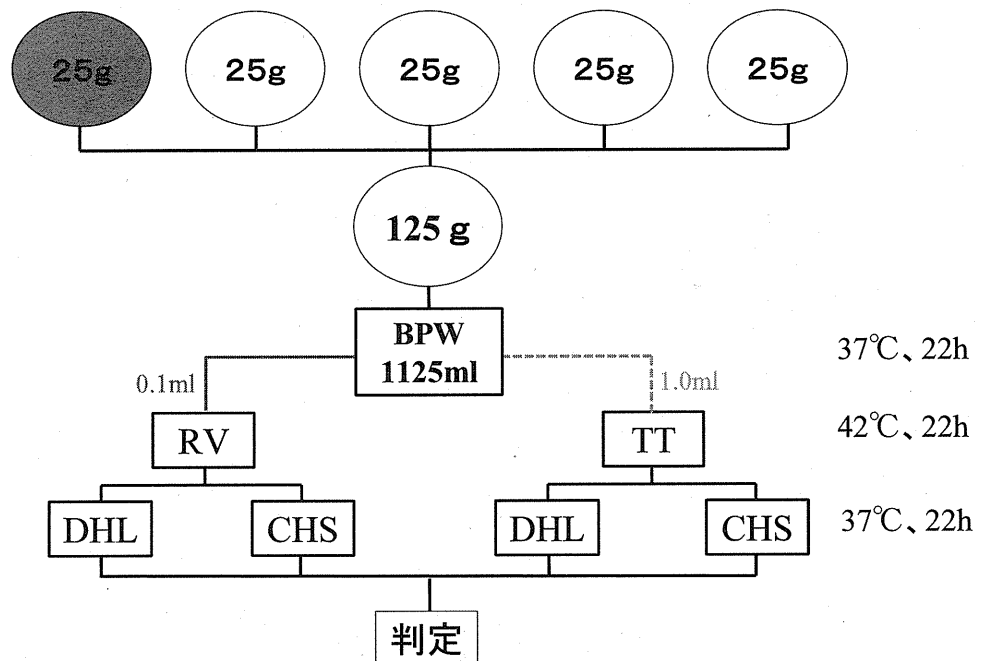


図2 プール法を用いたdサルモネラの検出方法

表1 カット野菜10gを用いた各サンプル・プーリング法の検出結果 (n=5)

1

接種レベル CFU/g	細菌数 4.8×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

2

接種レベル CFU/g	細菌数 7.6×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

3

接種レベル CFU/g	細菌数 3.2×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

4

接種レベル CFU/g	細菌数 7.9×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

5

接種レベル CFU/g	細菌数 2.0×10^3 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

表2 カット野菜25gを用いた各サンプル・プーリング法の検出結果(n=5)

1

接種レベル CFU/g	細菌数 1.9×10^3 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

2

接種レベル CFU/g	細菌数 7.1×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

3

接種レベル CFU/g	細菌数 5.8×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

4

接種レベル CFU/g	細菌数 4.8×10^3 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

5

接種レベル CFU/g	細菌数 1.5×10^3 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

分 担 研 究 報 告 書

マルチプレックス PCR 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 BEC 遺伝子の同時検出法

久米田 裕子

平成 27 年度 厚生労働科学研究費補助金（食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

マルチプレックス PCR 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 BEC 遺伝子の同時検出法

研究分担者 久米田 裕子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

研究協力者 余野木 伸哉（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

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、日常の食中毒検査に使用するため、従来の病原因子である CPE (*C. perfringens* enterotoxin) 遺伝子に加え、BECa、BECb、そしてウェルシュ菌 α 毒素の PLC (phospholipase C) 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。その結果、*becA* が 499 bp, *becB* が 416 bp, *plc* が 324 bp, *cpe* が 233 bp の PCR 産物が確認できた。さらに、構築した PCR 法を使用し、ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌（エンテロトキシン産生性および非産生性）の保菌調査を実施した。直接培養法でヒト糞便中のウェルシュ菌保菌率を調べた結果、29.5% (129 検体/437 検体) のヒトがウェルシュ菌を保菌していたが、本マルチプレックス PCR 法を使用して CPE 産生性を調べたところ、その中で 2.2% (10 検体/437 検体) のヒトが CPE 産生菌を、0.2% (1 検体/437 検体) のヒトが BEC 産生菌を保菌していた。CPE 産生菌は分離したウェルシュ菌株中では 7.8% (10 株/129 株) であった。また、増菌培養法でウシの糞便中のウェルシュ菌保菌率を調べたところ、44.4% (40 検体/90 検体) であった。マルチプレックス PCR 法を使用した増菌培養液からのスクリーニング試験では BECa および BECb と PLC 遺伝子が 1 検体陽性となったが、BEC 産生菌株を分離することはできなかった。CPE 産生菌も検出されなかった。

A. 研究目的

ウェルシュ菌は食中毒の原因菌の一つであり、ヒトや動物の腸管内に常在し、食肉や魚介類、野菜などの多くの食品を汚染する。これまでウェルシュ菌食中毒の発生に、病原因子として CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) が不可欠とされていた。ところが、平成22年に大阪市のホテル、23年に栃木県のホテルで発生した事例で、CPEを産生しないウェルシュ菌による集団食中毒事例が発生し、病原因子として新型エンテロトキシンBEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) が同定された¹⁾。

そこで今年度は、日常の食中毒検査に使用するため、従来の病原因子である CPE (*C. perfringens* enterotoxin) 遺伝子に加え、BECa、BECb、そしてウェルシュ菌 α 毒素の PLC (phospholipase C) 遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法を構築したので報告する。

さらに、構築した PCR 法を使用し、ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌 (エンテロトキシン産生性および非産生性) の保菌調査を実施したので報告する。

B. 研究方法

1. マルチプレックス PCR 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 BECa および BECb 遺伝子の同時検出法の開発

1-1. 使用菌株

- ・ ウェルシュ菌 : CPE 遺伝子陽性株 10 株

(NCTC8239, NCTC8798, 食中毒患者便分離株 8 株)、BECa および BECb 遺伝子陽性株 3 株 (OS1, TS1, ヒト糞便分離株 1 株)、エンテロトキシン陰性株 33 株 (JCM1290, JCM3816, JCM3816, JCM3817, JCM3818, JCM3819, GTC15081, ヒト糞便分離株 27 株) を使用した。

- ・ ウェルシュ菌以外のクロストリジウム属菌 : *C. aceticum*, *C. difficile*, *C. sporogenes* などレファレンス株 15 菌種 21 株を使用した (詳細示さず)。
- ・ クロストリジウム属以外の菌種 : 80 菌種 145 株を使用した (詳細示さず)。

1-2. DNA 抽出法

Yamazaki らの方法により、アルカリ熱抽出法を使用した²⁾。すなわち、1 μ l ループの菌体を 50 μ l の 25 mM NaOH に懸濁し、95°C 5 分間加熱後、4 μ l の 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で中和した。そして、15,000 rpm で 5 分間遠心後、その上清を PCR のテンプレートとした。

1-3. マルチプレックス PCR 法

PCR 反応液は、QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN) に、表 1 のとおりのプライマーを加えて、24 μ l 容量で調整し、DNA 抽出液を 1 μ l 加えて最終容量を 25 μ l とした。プライマーの濃度は、*becA* と *becB* は 0.2 μ M、*plc* と *cpe* は 0.4 μ M とした。反応条件は、95°C, 5 分 → (95°C, 30 秒 → 60°C, 90 秒 → 72°C, 30 秒) × 30 サイクル → 68°C, 10 分とした。PCR 産物は 2.5~3.0% のアガロースゲル電気泳動でそれぞれの大きさを確認した (表 1, 図 1)。

1-4. マルチプレックス PCR 法の感度

CPE 遺伝子陽性株として *C. perfringens* NCTC8239、BECa および BECb 遺伝子陽性株として *C. perfringens* OS1 を使用し、本 PCR 法の感度を測定した。すなわち、両菌をチオグリコレート (TGC) 培地 (ニッスイ) を用いて、37°C で一夜、嫌気培養し、その菌液を TGY (3% Trypticase soy, 2% D-glucose, 1% yeast extract (BD), 0.1% L-cystein) 培地に接種した。37°C で一夜、嫌気培養後、培養液を TGY 培地で 10 倍段階希釈し、それぞれの希釈段階で菌数を測定した。また、PCR のテンプレートとしては、各 10 倍段階希釈液 1 ml を遠心後集菌し、1-2 の方法に従い DNA を抽出し、本 PCR 法を実施した (図 2, 図 3)。

1-5. マルチプレックス PCR 法の特異性

1-1 に記載した合計 102 菌種 187 株を使用し、本 PCR 法を実施し、特異性を確認した。

2. ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌保菌調査

2-1. 材料

2-1-1. ヒト糞便

平成 26 年から 27 年にかけて、当所に搬入されたヒト糞便 437 検体 (健康人とウェルシュ菌食中毒以外の有症苦情ヒト糞便) を使用した。

2-1-2. ウシ糞便

平成 26 年に大阪府内の食肉処理施設に生体で搬入された肉用牛の直腸スワブ 90 検体を使用した。

2-2. ウェルシュ菌の分離方法

2-2-1. ヒト糞便

カナマイシン添加卵黄加 CW 寒天培地 (CW 寒天培地, ニッスイ) に糞便を直接塗抹し、42°C で

一夜嫌気培養した。培養後、CW 寒天培地で卵黄反応陽性のコロニーを釣菌し、マルチプレックス PCR を実施した。CPE 遺伝子を検出した菌株については PET-RPLA (デンカ生研) を用いて CPE 毒素の産生を確認した。

2-2-2. ウシ糞便

直腸スワブを液体チオグリコレート培地 (栄研化学) 10 ml に接種し、80°C、10 分間加熱処理後、42°C で一夜嫌気培養した。次に、液体チオグリコレート培地の増菌液を一白金耳、卵黄加 CW 寒天培地に塗抹し、42°C で一夜嫌気培養した。培養後、CW 寒天培地で卵黄反応陽性のコロニーを釣菌し、マルチプレックス PCR を実施した。CPE 遺伝子を検出した菌株については PET-RPLA (デンカ生研) を用いて CPE 毒素の産生を確認した。

C. 研究結果

1. マルチプレックス PCR 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 BECa および BECb 遺伝子の同時検出法の開発

1-1. マルチプレックス PCR 法の特異性と感度
標準菌株を使用してシングル PCR を行った結果、*becA* が 499 bp, *becB* が 416 bp, *plc* が 324 bp, *cpe* が 233 bp の PCR 産物が確認できた (図 1)。

特異性を調べるために使用したウェルシュ菌以外のクロストリジウム属菌 21 株およびクロストリジウム属以外の 80 菌種 145 株について、マルチプレックス PCR 法を実施したところ、増幅産物は全く確認できなかつた。使用したウェルシュ菌 46 株はすべて *plc* の増幅産物が確認で

きた。CPE産生ウェルシュ菌10株とBEC産生ウェルシュ菌3株は、*plc*に加え、それぞれ*cpe*と*becAB*の増幅産物が確認できた(図4)。

CPE遺伝子陽性株として*C. perfringens* NCTC8239、BECaおよびBECb遺伝子陽性株として*C. perfringens* OS1を使用し、本マルチプレックスPCR法の感度を測定した結果、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、分離菌の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(図2のAとB)。

2. ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌保菌調査

2-1. ヒト糞便

ヒトの糞便中の保菌状況を調べたところ、437検体中129検体からウェルシュ菌が分離された(表2)。その中で、分離菌株129株のうちCPE遺伝子を保有している菌株は10株であった。BECaおよびBECb遺伝子を保有している菌株は1株であった。

2-2. ウシ糞便

ウシの糞便中の保菌状況を調べたところ、直腸スワブ90検体中40検体からウェルシュ菌40株が分離された(表2)。その中で、CPE遺伝子とBECaおよびBECb遺伝子を保有している菌株はなかった(表2)。

また、直腸スワブ50検体については、液体チオグリコレート培地で増菌後、増菌培養液1 mlを採取し、12,000rpm、5分間遠心後、沈渣からDNA抽出を行った(最終容量100 μ l)。その結果、50検体中1検体がBECaおよびBECbとPLC遺伝子陽

性となった。感度を調べた結果からは約 10^3 cfu/mlと同等のバンドの濃度であり、分離したウェルシュ菌株100株を調べたが、BECaおよびBECb産生菌株は分離できなかった。

D. 考察

本マルチプレックスPCR法は分離したウェルシュ菌株が毒素遺伝子を保有しているか否かを調べる方法としては、十分な感度と特異性があることが明らかになった。ウェルシュ菌の α 毒素の遺伝子である*plc*を同時に検出することにより、分離菌株がウェルシュ菌であることが確認できるとともに、PCRのインターコントロールとしても使用できるメリットがあった。

本マルチプレックスPCR法を使用して、ヒト糞便中の毒素産生性ウェルシュ菌保菌調査を実施した結果、CPE産生性ウェルシュ菌は2.2% (10検体/437検体)であり、分離したウェルシュ菌株中では7.8% (10株/129株)であった。Liら³⁾やMikiら⁴⁾によると、様々な環境中から分離されたウェルシュ菌の中でCPE産生性ウェルシュ菌の占める割合はだいたい1~5%と報告されている。以上より、ヒトから分離されたウェルシュ菌の方が環境中より分離されたウェルシュ菌より、CPE産生性ウェルシュ菌の割合が高いと考えられた。このことはウェルシュ菌食中毒の予防のためには、食材だけではなくヒトからの汚染も考慮に入れる必要があることを示している。また、今回の調査では、ヒトのBEC産生性ウェルシュ菌保菌率は0.2%であり、CPE産生性ウェルシュ菌に比較して保菌率が低

かった。BECaおよびBECb産生性ウェルシュ菌は2014年に特定されたため、まだ調査データが少ない。本マルチプレックスPCR法を使用し日常的に検査することにより、今後その分布も明らかになると考えられる。

ウシ糞便は増菌培養したにもかかわらず、CPE産生性ウェルシュ菌は検出されなかった。BECa および BECb 産生性ウェルシュ菌はマルチプレックス PCR で1検体陽性となったが、多数の非 BEC 産生性ウェルシュ菌に隠されてしまい、分離することができなかった。BEC 産生性ウェルシュ菌の食中毒として報告された栃木県のホテルの事例では、原因食品がローストビーフであったため、ウシ糞便中の保菌率を調査したが、予想よりも保菌率は低いと推測された。

今回、ウシ糞便の汚染調査で使用した増菌培養液のマルチプレックス PCR 法は、分離培養法と同等以上の検出感度と考えられた。今後、食品と同様に、糞便からの増菌培養液中のエンテロトキシン産生菌の有無を調べる場合にも、スクリーニング法として本マルチプレックス PCR 法が有効であると考えられた。

E. 結論

今年度は、日常の食中毒検査に使用するため、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 α 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 法を構築した。本法は特異性に優れ、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。また、感度において

も、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。

さらに、構築した PCR 法を使用し、ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌（エンテロトキシン産生性および非産生性）の保菌調査を実施した。直接培養法でヒト糞便中のウェルシュ菌保菌率を調べた結果、29.5%（129 検体/437 検体）のヒトがウェルシュ菌を保菌していたが、本マルチプレックス PCR 法を使用して、CPE 産生性を調べたところ、その中で 2.2%（10 検体/437 検体）のヒトが CPE 産生性ウェルシュ菌を保菌していた。CPE 産生性ウェルシュ菌は分離したウェルシュ菌株中では 7.8%（10 株/129 株）であった。

また、増菌培養法でウシの糞便中のウェルシュ菌保率を調べたところ、44.4%（40 検体/90 検体）であった。マルチプレックス PCR 法を使用した増菌培養液からのスクリーニングでは BECa および BECb と PLC 遺伝子が 1 検体陽性となったが、BECa および BECb 産生性ウェルシュ菌の菌株を分離することはできなかった。CPE 産生性ウェルシュ菌も分離されなかった。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

- 1) 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

トキシシン CPE 遺伝子と新規エンテロトキシシン 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)

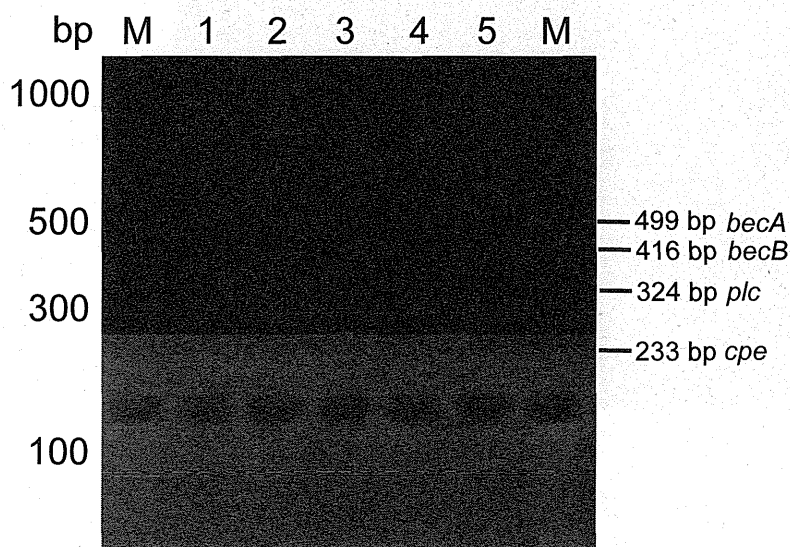
G. 参考文献

- 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.* 2014. 82:2390-2399.
- 2) Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, Nakaguchi Y, and Nishibuchi M. Development of a loop-mediated Isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the tdh and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol.* 2010. 76: 820-828.
- 3) Li, J., Sayeed, S., McClane, B.A., 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7218-7224.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01075-07>.
- 4) Miki, Y., Miyamoto, K., Kaneko-Hirano, I., Fujiuchi, K., Akimoto, S., 2008. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 74 (17), 5366-72. doi: 10.1128/AEM.00783-08.
- 5) Erol, I., Goncuoglu, M., Ayaz, N.D., Bilir-Ormanci, F.S., Hildebrandt, G., 2008. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Lett Appl Microbiol.* 47 (1), 31-4. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02379.x.
- 6) Meer, R.R., Songer, J.G., 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res.* 58 (7), 702-5.

表1 使用したマルチプレックスPCRプライマー

Gene	Primer Name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
<i>cpe</i>	CPE F	ggagatggttgatattagg	233	Erol et al., 2008 ⁵⁾ ; Meer et al., 1997 ⁶⁾
	CPE R	ggaccagcagttgtagata		
<i>becA</i>	becA F	caatggggcgaagaaaatta	499	Yonogi et al., 2014 ¹⁾
	becA R	aaccatgatcaattaaacctca		
<i>becB</i>	becB F	tgcaaatgacccttactga	416	Yonogi et al., 2014 ¹⁾
	becB R	agattggagcagagccagaa		
<i>plc</i>	CPA F	gctaattgtactgccgttga	324	Erol et al., 2008 ⁵⁾
	CPA R	cctctgatacatcgtgtaag		

図1 マルチプレックスPCRとシングルPCRの増幅産物の電気泳動像



1: Multiplex PCR, NCTC8239(*cpe*)とOS1(*becAB*)のDNAを混合
 2~4: Single PCR, OS1(*becAB*)のDNA
 5: Single PCR, NCTC8239(*cpe*)のDNA

図 2 (A) *C. perfringens* NCTC8239 (CPE 遺伝子陽性) を用いた場合のマルチプレックス PCR 法の感度

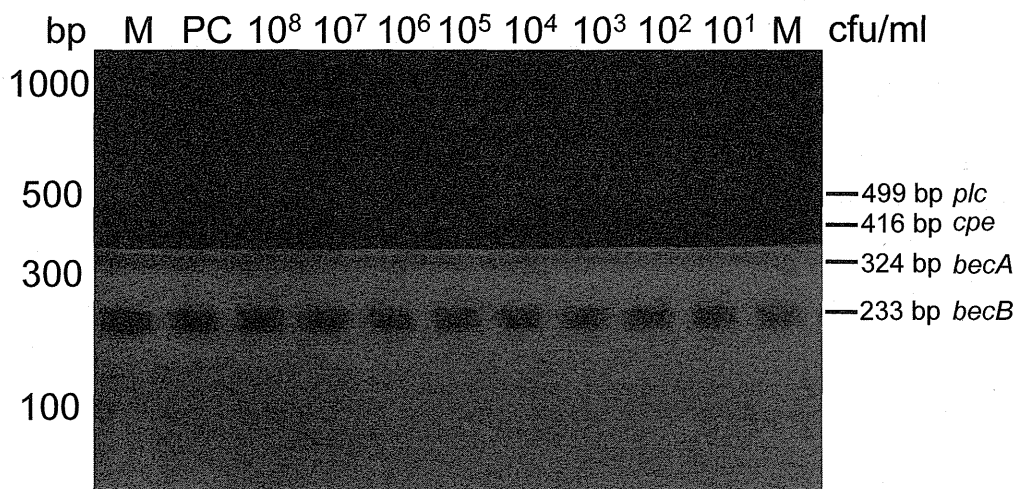
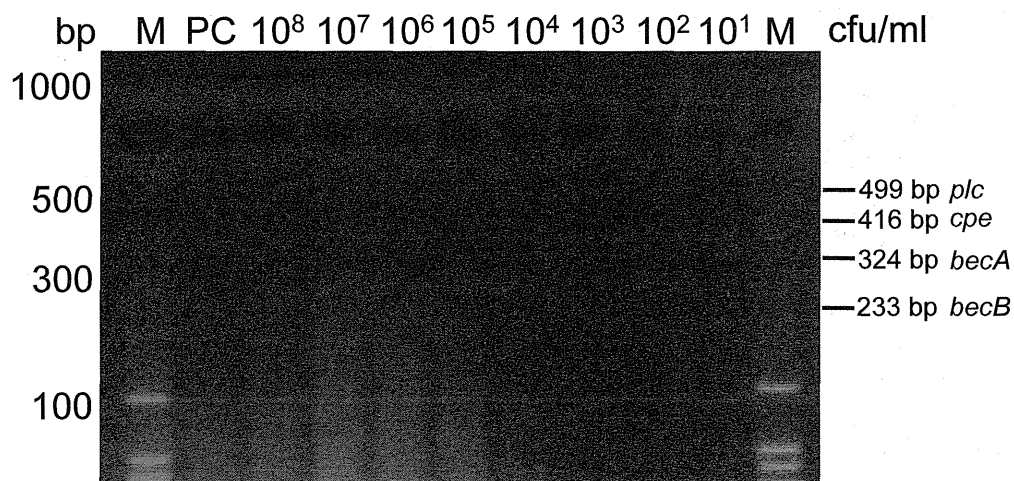


図 2 (B) *C. perfringens* OS1 (*BECab* 遺伝子陽性) を用いた場合のマルチプレックス PCR 法の感度



NCTC8239 を *cpe* (A)、*C. perfringens* OS1 を *becAB* (B) の感度測定に使用した。M, molecular weight marker; Lane 1, multiplex PCR; Lane 2, 10^8 CFU/mL; Lane 3, 10^7 CFU/mL; Lane 4, 10^6 CFU/mL; Lane 5, 10^5 CFU/mL; Lane 6, 10^4 CFU/mL; Lane 7, 10^3 CFU/mL; Lane 8, 10^2 CFU/mL; Lane 9, 10^1 CFU/mL.