

201522013B

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25～27年度 総合研究報告書

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

総合研究報告書

- 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)

総合研究(分担)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 15
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に関する研究 39
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:

- 鶏肉やヒト糞便等から分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子型別法の検討 53
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 69
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 77
小西 良子 (麻布大学 生命・環境科学部)

I. 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

—欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法について情報収集—

II. エンテロトキシン産生性/非産生性ウエルシュ菌の遺伝子検出法の開発と

- 汚染実態調査 101
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 126

総 合 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 25～27 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

総合研究報告書

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。本研究ではこれまで 3 年間にわたって日常業務で使用しても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研究を行ってきた。一方、輸入食品等の安全性を確保するためには検体の採取方法が重要である。本研究では諸外国における状況を調査しながら、わが国の実情に則したサンプリング手法を検討した。

平成 25 年から平成 27 年度の間に行った研究項目は以下のとおりである。

- ウェルシュ菌に関しては病原遺伝子やハウスキーピング遺伝子など計 26 の遺伝子を対象にした PCR ベースのタイピング法の検討、ウェルシュ菌の毒素遺伝子を対象としたマルチプレックス PCR の作成、分離培地の検討、食品や動物におけるウェルシュ菌の汚染状況などに関して研究を行った。
- サルモネラに関してはサルモネラ単相菌を対象とした PCR をベースにしたスクリーニング法、遺伝的背景から血清型との相関性を示唆する MLST 解析などについて検討した。
- カンピロバクターに関しては、PFGE 法に代わるタイピング法として comparative genomic fingerprinting 40 の導入を目指し研究を行った。
- ブドウ球菌に関してはタイピング法として POT 法や MLVA 法の有効性を検討した。
- サンプリング法に関しては、諸外国における情報を収集したのち、汚染モデルを作成し、わが国で行われているサンプリング手法の有効性を検討した。また、諸外国における傾向に合わせ n 数を増やして検査をこなう場合を想定して、効率よく検査を行うために、プレエンリッチメント法とプール法の有効性を検討した。

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
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

石崎 直人 麻布大学
黒田 誠 国立感染症研究所
関塚 剛史 国立感染症研究所
村上 光一 福岡県保健環境研究所
大石 明 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
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
岡本 冬樹 福岡県保健環境研究所
川津健太郎 大阪府立公衆衛生研究所
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
白石 理奈 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
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
樫尾 裕子 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
岩淵 香織 岩手県環境保健研究センター
小黒 祐子 福島県衛生研究所

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法は結果が得られるまでに多くの時間を必要とし、安定した検査結果を出せるようになるまでにはかなりの習熟を必要とする検査法が多い。よってこれらの方法を日常的に行うことは検査機関の負担の増大につながる。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。3年間で以下の項目について検討を行った。

- ウェルシュ菌の簡便、迅速なタイピン

グ法を構築するために、分離およびタイプング手法に関して情報収集した。その中から、ウェルシュ菌の病原遺伝子、ハウスキーピング遺伝子などを対象とした PCR 法について検討した。同時に食品、ニワトリやウシにおけるウェルシュ菌の汚染状況も調査した。また、ウェルシュ菌食中毒の病原因子としてはエンテロトキシンが不可欠とされていたが、2014年に新型エンテロトキシンが同定された。そこで、これらの毒素遺伝子を一括して検出する検査法も検討した。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た分離培地の有用性も検討した。

- サルモネラ食中毒は多様な血清型が問題となることが予想される。近年報告が相次いでいる *Salmonella* I 4:i:- もその一つであり、血清型別の実施が困難と思われるサルモネラの単相菌への対応も含めた血清型の遺伝的特性の理解は重要な課題である。そこで本研究では特に、こうした単相菌に対応するために PCR をベースにしたスクリーニング法、遺伝的背景から血清型との相関性を示唆する MLST 解析などについて、その有用性を検討した。
- 食中毒菌のうち黄色ブドウ球菌を対象とし、各自治体において実施可能なタイプング方法について検討することを目的に、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) の遺伝子保有状況について、従来型 A~E 型の *sea*~*see* 遺伝子に加えて新型の G, H, I 型の *seg*, *seh*, *sei* 遺伝子の保有状況を PCR 法により検討した。また、広域なサーベイランス等に活用するにあたり、機関による結果判定の差異が生じないか検討するため、同じ黄色ブドウ球菌株について複数の機関で POT 法による遺伝子型別を実施し比較検討した。

- *Campylobacter jejuni* による食中毒の発生時における原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握等の疫学解析には、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) が広く普及しており、食中毒の発生時には原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握等の疫学解析に用いられている。しかし、PFGE 法は操作が煩雑、結果を得るまでに 3~4 日を要する、複数の機関間での結果の比較が必ずしも容易ではないといった問題がある。そこで、PCR 法を用いた新たな型別法である comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) が海外で開発されたことから、この手法の導入を目指し、評価を行った。

また、本研究においては微生物検査におけるサンプリングプランについても研究を行った。食品の衛生管理を目的として行う微生物検査において、母集団の汚染を正しく反映するサンプリングプランが必要であ

る。日本の厚生労働省が行っている微生物のサンプリングプランは、1ロットからランダムにバッチ (1kg) を採取し、そこから 25g を $n=1$ で検査する方法が取られているが、諸外国では $n=5$ 以上で行うのが一般的であり整合性がとれていない。本研究では、国際的なサンプリングプランとのハーモナイゼーションを図るため、日本のサンプリングプランの有効性を検討するとともに、 n 数を増やした場合に効率的に試験が行えるようにするためにサンプル・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を検討した。

B. 研究方法

1. ウェルシュ菌に関する研究

ウェルシュ菌のタイピング手法を構築するために情報収集を行った。その中から、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 をおこない、その結果をまとめることによってウェルシュ菌のタイピングを行う方法を検討した。検討にはヒト、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 を抽出し使用した。

また、CPE (*C. perfringens* enterotoxin) 遺伝子に加え、BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) a、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するマルチプレックス PCR を検討した。

さらに、乾ししいたけ 26 検体、輸入コショウ 15 検体、ウシ糞便 40 検体、ニワトリ 83 検体からウェルシュ菌の分離を行い、汚染状況を調査した。

また、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) の性能を評価した。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⁺ 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

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 について検討した。また、J. Clin. Microbiol. 47, 3546 (2009) に記載された *hin* 遺伝子の PCR 法について検討した。MLST 解析については 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 の番付を行った。MLVA 解析に関しては 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。得られた結果をレポート数に換算し、Bionumerics をもちいてクラスター解析を

行った。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

CGF40 を導入を図るために標準株および分離株を用いて、条件の検討を行った。検討した項目は PCR の条件および使用した taq ポリメラーゼの種類である。また、操作を簡便にするためにマルチプレックス PCR 化も試みた。さらに、CGF40 のパターンと PFGE のパターンおよび薬剤感受性パターンとの比較を行った。

4. ブドウ球菌の遺伝子型別

鶏由来株、食中毒事例等由来株を用いて 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) A~E, G, H, I 型の遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した。また、POT 法の信頼性を確認するために 5 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

国外におけるサンプリングプランの情報収集をまず行った。また、日本のサンプリングプランの有効性を検討するために蛍光ラテックスビーズを牛挽肉に塗布した汚染モデルを作成し、蛍光ラテックスビーズの分布の不均一性を検討した。また、n 数を増やした場合に効率的に試験を行うために、プレエンリッチメント法とプール法の有効性をネギトロとカット野菜を用いたサルモネラの汚染モデルで検討した。

C. 結果

1. ウェルシュ菌に関する研究

ウェルシュ菌の分離法、タイピング法に関する情報を収集した。その中で 26 のウェルシュ菌遺伝子を対象とした PCR を行い、その結果からウェルシュ菌のタイピングを行う方法があったため、この方法を検討したところ、この方法はウェルシュ菌株をその特徴に沿ってうまくグルーピングできることが明らかになった。対象遺伝子を 26 から 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。

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。

ウェルシュ菌の汚染調査行ったところ、乾しいたけでは 19.2% (5 検体/26 検体) からウェルシュ菌が分離され、3.8% (1 検体) が CPE 産生菌であった。市販コショウでは 26.6% (4 検体/15 検体) 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。ヒト糞便中からは 29.5% (129 検体/437 検体) がウェルシュ菌を保菌しており、その中で 2.2% (10 検体) のヒトが CPE 産生菌を、0.2% (1 検体) のヒトが BEC

産生菌を保菌していた。ウシ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) が保菌していたが、CPE 産生菌も BEC 産生菌も分離できなかつた。ニワトリからは 87 検体中 47 検体からウェルシュ菌が分離されたが CPE 産生株は検出できなかった。

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⁺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

Salmonella I 4:i:-株および *Salmonella* I 4:b:-に関して *fliB*-*fliA* 遺伝子間領域および *fljB* 遺伝子、さらに相変換のための組換えを起こすインベルターゼをコードする *hin* 遺伝子の有無を調べる PCR を検討した。その結果、*fliAB*、*fljB*、*hin* 遺伝子などの PCR によるスクリーニング、MLST 解析による血清型のクラスター解析などの手法が、サルモネラの遺伝特性を明らかにするとともに、迅速な血清型の推定に有用であることが示唆された。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

CGF40 の実施に最も適した taq ポリメラーゼを選ぶために、市販の taq ポリメラー

ゼを比較検討したところ、taq ポリメラーゼの選択が非常に重要であることが明らかになった。また、鶏肉分離株と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

POT 法と MLVA 法は PFGE 法による型別と同程度の解析力を有していることが確認され、簡便性・迅速性からも有用な型別法であると考えられた。また、SE 遺伝子保有状況については、A~E 型の遺伝子保有率が食中毒事例 (88.9%) において、鶏肉 (25.6%) より高率であった。また、POT 型別をサーベイランス等に活用するにあたり、異なる機関における結果判定について検討するため、同じ黄色ブドウ球菌株を用いて 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、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

国外におけるサンプリングプランに関する情報収集を行ったところ、EU もアメリカも規格基準には二階級法のサンプリングプランと試験法が設定されており、さらに n

数が多い検査にはサンプル・プーリングの採用が検討されていた。そこで、蛍光ラテックスビーズと挽肉を用いた汚染モデルで日本のサンプリングプランの有効性を確認したところ、現在行われているバッチ 1kg から調製した測定用検体 (25g) 1 検体のサンプリングプランでは、検体から汚染菌を検出する確率は低く、その検出確率は汚染量が少ないほど減少することが明らかになった。このことは、現在日本で主流となっているサンプリングプランは、実際の対象微生物の汚染分布推定結果から考察しても、母集団を代表する可能性は低いものと示唆された。また、諸外国の傾向に合わせ、サンプリング数が増加した場合を想定して、プレエンリッチメント法とプール法の有効性をネギトロとカット野菜において検討した。その結果、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、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、選択分離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。

D. 考察

1. ウェ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 の内、少なくとも 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。検査時間も短時間で済み、特別な手技も必要としないことから、日常業務におけるサーベイランス法として非常に有用であると思われた。

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。汚染調査の結果から、動物以外に乾物がウェルシュ菌の汚染源として注意しなければいけないことが明らかになった。

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。*fliAB*、*fljB*、*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

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PFGEと同等の解析能力を有し、*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

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今回の結果から明らかになった。一方で、n数を多くすると費用や労力がかかる。そこで効率的に試験を行うために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。

E. 結論

本研究では平成25年から27にわたって

ウェルシュ菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、カンピロバクターに関してタイピング法の構築を進めてきた。これまでに構築した手法はいずれも特別な機器や手技を必要とせず、短時間で結果が得られるなど、食中毒検査の現場での使用が容易なものばかりである。また、今回検討したすべての検査で結果をデジタルデータとして表せられるため、他機関との結果の比較や過去に行った試験結果との比較が非常に容易になっている。さらに、これらの手法は既存の検査方法と比べても遜色のない解像度を持っている。以上のことから、本研究で構築したタイピング手法は日常のサーベイランス業務において非常に有用であると思われる。

食中毒微生物検査のサンプリングプランに関しては、現在わが国で行われているサンプリングプランでは母集団を代表する可能性は低いものと示唆された。そこでn数を増加させて効率的に検査をこなすために検討を行ったところ、ネギトロ、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. 石崎直人、小西良子：第31回日本防菌防黴学会学術総会、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、2014
2. 余野木伸哉、川津健太郎、神吉政史、原田哲也、安田綾、迎恵美子、小金井洋輔、久米田裕子：高齢者デイサービス施設で発生したウェルシュ菌食中毒事例について。第35回日本食品微生物学会学術総会。大阪。2014
3. 余野木伸哉、松田重輝、河合高生、依田知子、原田哲也、久米田裕子、後藤和義、日吉大貴、中村昇太、児玉年夫、飯田哲也：ウェルシュ菌新規エンテロトキシン BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) の同定。第67回日本細菌学会関西支部総会。兵庫。2014.
4. 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、2015
5. 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

総 合 研 究 (分 担) 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 25～27 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）

総合研究（分担）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 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 堀川 和美（福岡県保健環境研究所 病理細菌課）

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）

日常のスクリーニング業務に使用する簡便なウエルシュ菌のタイピン法の構築を目的に研究を行った。まず、ウエルシュ菌の分離法、タイピング手法を既存の論文から情報を収集し、また研究に使用する菌株の収集を行った。情報収集の結果、26 のウエルシュ菌遺伝子をターゲットとした PCR を行い、その結果をまとめることによって、ウエルシュ菌のタイピングを行える可能性が見いだされた。このことをヒト、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、本検査法がウエルシュ菌の由来、特徴をうまく表してタイピングできることが明らかになった。また、検査を簡便にするために 25 の対象遺伝子を 15 に減らしても十分な解像度を持つ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、他機関同士での結果の比較も容易である。このことから、本方法は日常のスクリーニング業務に使用するウエルシュ菌のタイピング手法として非常に有用であると思われた。

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

エルシュ菌食中毒の原因食材は肉、魚介類、野菜など広範な食材によって引き起こされると考えられている。これはウエルシュ菌が芽胞として土壌など自然環境中に存在す

るため多くの食材がウェルシュ菌に汚染されていることを示唆している。食品の中では食肉、特に鶏肉の汚染率が高いことが報告されている。しかし、食肉からのウェルシュ菌の分離頻度は高いがエンテロトキシン産生株が分離されることはまれであり、エンテロトキシン産生株がどのような食品および動物に汚染しているのか明らかになっていない。そのため、エンテロトキシン産生株の由来を明らかにしておくことが食中毒予防に非常に重要であると思われる。また、エンテロトキシン産生株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かれる。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。その一方で、従来のウェルシュ菌エンテロトキシンとは異なる新型のエンテロトキシンが発見され、食中毒との関連が示唆されている。

このようにウェルシュ菌食中毒は毒素産生性、病原性において異なる性質を持つ複数の菌株によって引き起こされているものと考えられる。しかし、これらの菌株がどのような食品、動物に由来するのかは明らか

になっていない。ウェルシュ菌食中毒を防止するためにはどのような食品、動物もしくは環境にどのような特徴を持ったウェルシュ菌株が存在しているのかを明らかにすることが重要である。そのためには、食中毒事例だけに注目するのではなく、日ごろからサーベイランスを行い、市場に流通している食品にどのような菌株が存在しているのかを把握しておく必要がある。本研究では、このようなウェルシュ菌のサーベイランスに必要な迅速かつ簡便なタイピング法の構築を目的として行った。

B. 研究方法

1. ウェルシュ菌分離法およびタイピング法に関する文献調査

一般に公開されている論文および通知法からウェルシュ菌の分離方法に関する情報を収集した。

2. PCR をベースとしたウェルシュ菌タイピング手法の開発

既に報告されている毒素遺伝子、病原遺伝子、ハウスキーピング遺伝子の計 26 のウェルシュ菌遺伝子を標的とした PCR を行い、その結果を総合し、タイピング法として使用できるか評価した¹⁾。今回使用したウェルシュ菌株を表 1 に、標的にした 26 の遺伝子を表 2 に示す。

C. 結果と考察

1. ウェルシュ菌分離法およびタイピング法に関する文献調査

ウエルシュ菌の分離方法を通知法および論文より検索し、分類した。分離法は大きく従来の培養法、密度勾配遠心分離法、コロニーハイブリダイゼーション法に分けられた。培養法では ISO 法と科学的根拠のある妥当性確認を行った NIHSJ (標準試験) 法の整備が進められており、現在、原案が示された段階にある。今後、コラボラティブスタディ等の結果を踏まえ、最終案がまとめられる予定となっている。密度勾配遠心分離法は食品中に含まれる菌を培養を経ずにそのまま濃縮する方法であるため、培養前の菌株間の存在比率や、菌株間の増殖速度の違いなどに影響されることなく分離することができる。コロニーハイブリダイゼーション法は大量の菌株の集落から、特定の菌株の集落を選択し分離することができる。これらの方法は従来の培養法の欠点を補う試験法として使用することができ、より正確なタイピングを行うことを可能にすると考えられる。

また、収集した論文の中に病原遺伝子、毒素遺伝子、ハウスキーピング遺伝子の計 26 のウエルシュ菌遺伝子をターゲットとした PCR に関するものがあつた¹。検討の結果、この PCR を行いその結果をまとめることによって、ウエルシュ菌のタイピングを行える可能性が見いだされた。

2. PCR をベースとしたウエルシュ菌タイピング手法の開発

ウエルシュ菌の分離法、タイピング手法に関する情報収集の結果をもとに 26 のウ

エルシュ菌遺伝子を標的とした PCR を行い、その結果をまとめて、ウエルシュ菌のタイピングに利用できるか検討を行った。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、この方法はウエルシュ菌のタイピングに有用であることが明らかになった。さらに検討を行い、26 の対象遺伝子を 15 まで減らすことが出来た。今回の結果を図 1 に示す。今回使用した 44 株は大きく 6 つのグループにわけられた。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。ニワトリからは多くのウエ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は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た。以上のように本検査法が菌株の由来、

毒素産生性などの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。本試験法にはPCRに必要なサーマルサイクラーだけで特別な機器を必要としない。また、実験も一般的なPCR反応だけであり、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勞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。菌株の由来、毒素産生性など菌株の特徴をよく現してタイピングを行うことが出来る。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、日常業務におけるサーベイランス分離菌株の特徴を分類することが出来、食中毒と食品との関係について考察できるようになると思われる。

E. 参考文献

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

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

<i>cpe</i>	enterotoxin gene
<i>becB</i>	novel enterotoxin gene
<i>cpb2</i>	□2toxin 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2 対象ウェルシュ菌遺伝子