

図1 今回の結果から得られた株間の遺伝的関係

総 合 研 究 (分 担) 報 告 書

サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法

泉谷 秀昌

総合研究（分担）報告書

サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法

研究分担者 泉谷 秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）

研究協力者 古川 一郎（神奈川県衛生研究所）

研究協力者 齊藤志保子（秋田県健康環境センター）

研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）

本研究班では、食中毒の予防・迅速な原因食品究明に役立つ、食品中の食中毒菌の情報、とくにその遺伝的特性に関する研究を行う。本研究ではサルモネラ属菌に着目し、とりわけ血清型別の実施において困難が予想される（もしくは困難がある）単相菌を中心に、遺伝特性に関する試験法の検討、すなわち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。その結果、fliAB、fliJ、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。

A. 研究目的

サルモネラは国内外を問わず主要な食中毒菌の一つであり、公衆衛生上非常に重要な位置を占めている。わが国では 1990 年代から 2000 年代にかけて *Salmonella* Enteritidis による食中毒事例が多発し大きな問題となった。2000 年代以後はサルモネラによる食中毒事例および患者数は減少したものの、主要な食中毒菌であることに変わりはない。

サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれ、近年では SE 以外の血清型でも食中毒が発生しており、今後は SE 以外のサルモネラへの対応が必要となってくる。

SE 以外にヒトからの分離頻度が高い血

清型としては Typhimurium、Infantis などがあり、とくに Infantis は鶏肉から高頻度に分離される。また SE は鶏卵あるいは鶏肉などの食品（加工品）が主たる感染源となっている。

このように、サルモネラに関しては本菌感染と食品の結びつきが大変強い。したがって、本菌に関して、ヒトおよび食品でサーベイランスを実施することは重要な課題であり、その遺伝特性を解析し、そこから有用なマーカーおよびタイピング法を開発・検討することが本研究の目的である。

上述のようにサルモネラによる食中毒は減少してきており、以前のような Enteritidis 一色というよりは多様な血清

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、I 4:i:-をはじめとした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の検査系等の検討を重点的に行った。

B. 研究方法

PCR タイピング

S. I 4:i:- 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

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。

PFGE

Pulsenet プロトコール (Foodborne Pathog Dis. 3(1): 20-31 (2006), <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/>) に従い、パルスフィールドゲル電気泳動法を実施した。XbaI 消化して得られた泳動パターンを Bionumerics に取り込み、クラスター解析を行った。

MLVA

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。得られた結果をリピート数に換算し、Bionumerics をもちいてクラスター解析を行った。

C. 研究結果および考察

1. スクリーニング用 PCR タイピングの検討

S. I 4:i:- は、近年欧米各国で報告が相次いでおり、その多くは Typhimurium の単相菌と考えられている。サルモネラの血清型別において、H 型別を決めるために相誘導が必要であるが、上記単相菌を PCR によって推測することができれば、時間短縮につながる。欧州食品安全庁 EFSA では上記 Typhimurium 様の単相菌を検索するためのマルチプレックス PCR を紹介している。本 PCR においては *fliB-fliA* 遺伝子間領域 (プライマー FFLIB, RFLIA) および *fljB* 遺伝子 (プライマー Sense-59, Antisense-83 ; 図 1s-as) を標的としている。前者は Typhimurium においては IS200 の挿入によって 1kb となるが、それ以外の血清型では 250bp となる。後者は、2 相目の H 抗原をコードしている。本研究では、上記マルチプレックス PCR について検討した。また、これ以外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 も検討した。

上記 PCR を検討した結果、*hin* 遺伝子の PCR はマルチプレックス PCR に組み込めなかったため単独で実施することとなった。

fliB-fliA + fljB マルチプレックス PCR は、前者が単相菌以外の菌株において増幅効率が悪いことが判明したため、プライマーの改変を行い、良好に試験ができるようになった (表 1 および図 1)。

2. S. I 4:i:-株の解析

上記単相菌スクリーニング用 PCR および MLST 解析等を用いて、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）を実際に試験した。

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。このうち、10 株は予想される大きさ（約 0.6kb）の増幅産物が得られた。1 株は約 1.3kb の増幅産物を生じたので、部分的に塩基配列を決定したところ、IS26 の挿入が推定された。

fliAB、*fljB* および *hin* 各 PCR の結果をまとめたものを表 2 に示す。非ヒト由来株 11 株の中で *fljB* 陽性の 8 株は *hin* も陽性であった。そこで *hin* 遺伝子増幅産物の塩基配列を決定したところ、140 番目のアミノ酸においてアルギニンからロイシンへの置換 (R140L) が見出された。本変異によって 2 相目への相変換が阻害されることが示唆されており、したがって 1 相目の H 抗原しか検出されないものと推測された。

MLST 解析の結果、今回供試した 13 株は 3 つの ST から成ることが明らかとなった。すなわち、ST34、ST19 および ST99 であった。

ヒト由来株は 2 株とも ST34 であった。非ヒト由来株は 3 株が ST19、8 株が ST99 であ

った。ST34 株はいずれも *fljB* 陰性、*hin* 陰性であった。ST19 および ST99 はいずれも *hin* 陽性（IS26 挿入株も含む）であり、前者は *fljB* 陽性、後者は *fljB* 陰性であった。上記 PCR タイピングの結果と MLST の結果には相関がみられることが示唆された。

PFGE および MLVA によるクラスター解析の結果を図 2 および図 3 に示す。いずれの方法でも 3-4 つほどのクラスターが形成され、これらは、ほとんど各 ST に対応した。

既報 (PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012)) では、ST19 は血清型 Typhimurium の主要な ST を占めており、ST34 は Typhimurium 単相菌の主要な ST となっている。ST99 は Typhimurium のマイナーな ST の一つである。本結果から PCR タイピングだけでなく、MLST の結果からも本研究で供試した菌株が Typhimurium から派生する単相菌であることが示唆され、かつ、*fliAB* によるスクリーニングが妥当であることを示している。

3. S. I 4:b:-株の解析

Salmonella I 4:b:-は、あまり報告例のない血清型であり、単純に抗原構造からは血清型 Schleissheim となる。しかしながら、上記 S. I 4:i:-の例のように、S. I 4:b:-も何らかの血清型に由来する単相菌である可能性も考えられた。そこで、上記単相菌スクリーニング用 PCR (*fljB*, *hin* 遺伝子) および MLST 解析等を活用し、同菌の解析を行った。

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 (表 3)。

S. I 4:b:- は 10 株すべて酒石酸陽性であり、10 株とも *hin* 遺伝子陰性であった。

試験菌株を MLST 解析した結果、Paratyphi B は 3 株とも ST86 であった。Paratyphi B var Java は ST43 が 16 株、ST88 および ST127 がそれぞれ 3 株、ST307 が 1 株であった。*S. I 4:b:-* は、ST127 が 4 株、ST423 が 3 株、ST42、ST1838、ST2923 が 1 株ずつであった。(表 3)

MLST 解析の結果、本研究で供試した試験菌株の *S. I 4:b:-* は、ST Complex (STC) 19 (ST88, 127 を含む)、STC32 (ST42, 423 を含む)、STC155 (ST1838, 2923 を含むと推定) に該当した。本研究ならびに既報データベース (PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012)) から、これらはいずれも Paratyphi B var Java からなる STC であった。供試菌株 44 株について、MLST の結果を minimum spanning tree にまとめた (図 4)。*S. I 4:b:-* 株は Paratyphi B var Java 株と STC を共有していることがわかる。

供試菌株 44 株について PFGE 解析を行ったところ、ほぼ STC に関連したクラスターの形成が観察された (図 5)。STC5 は大きく 3 つのクラスターに分かれ、Paratyphi B は図 5 の左のクラスターに含まれた。それ以外の Paratyphi B var Java もしくは *S. I 4:b:-* 株は、Paratyphi B のクラスターには含まれなかった一方で、STC19 株などは同一のクラスターに包括された。

以上ことから、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. I 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。

D. 結論

hin 遺伝子 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、サルモネラの血清型の推定に有用であることが示された。

E. 研究発表等

1. Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*_{TEM-52}-carrying plasmids of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Dec;58(12):7545-7.
2. 泉谷秀昌：食品を介した抗生物質耐性菌の世界的感染拡大について。日本食品微生物学会、第 31 巻第 2 号、57-62、2014 年 6 月。
3. 泉谷秀昌：サルモネラ症。公衆衛生情報、第 44 巻第 5 号、20-21、2014 年 8 月。
4. Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen

TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* 01 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol Infect.* 2015 Nov 11:1-7. [Epub ahead of print]

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プライマー	配列	産物(bp)
hin-F	TGGCTACTATTGGGTATATTCGGG	570
hin-R	AATTCATTCGTTTTTTTATGCGGC	
Sense-59	CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG	1.4k
Antisense-83	GCCATATTTTCAGCCTCTCGCCCG	
FFLIB_v1	GTA CTGGCGACGATCTGTGCGATG	1kb (Typhimurium)
RFLIA_v1	TCAGCGGTATACAGTGAATTCAC	250 (上記以外)

表 1. PCR タイピング用プライマー

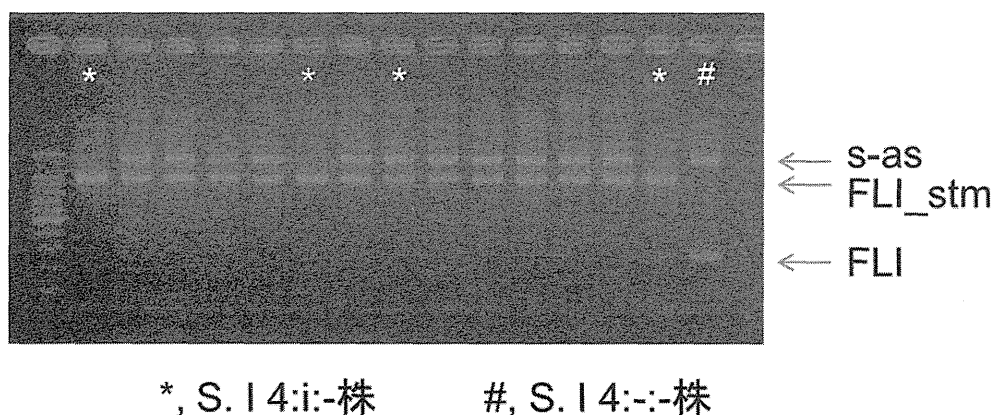


図 1. PCR タイピング実施例

			ヒト	非ヒト
<i>fliAB</i> (1kb)			2	11
<i>fliB</i> 陰性	<i>hin</i> 陰性	ST34	2	0
	<i>hin</i> 陽性	ST19	0	3*
<i>fliB</i> 陰性	<i>hin</i> 陰性		0	0
	<i>hin</i> 陽性	ST99	0	8**

表 2. *S. I 4:i:-*株の PCR タイピングおよび MLST 解析の結果。

*、IS26 挿入型を 1 株含む。**、いずれも R140L 変異を持つ。

PFGE-XbaI

PFGE-XbaI

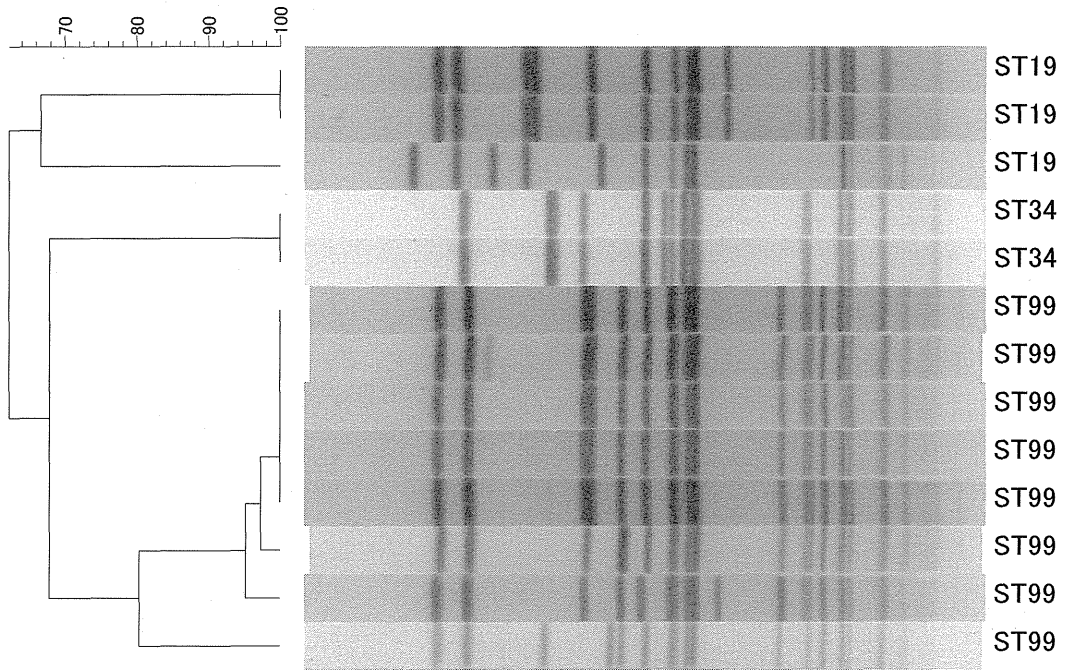


図 2. *S. I 4:i:-*株 XbaI 消化 PFGE パターンのクラスター解析

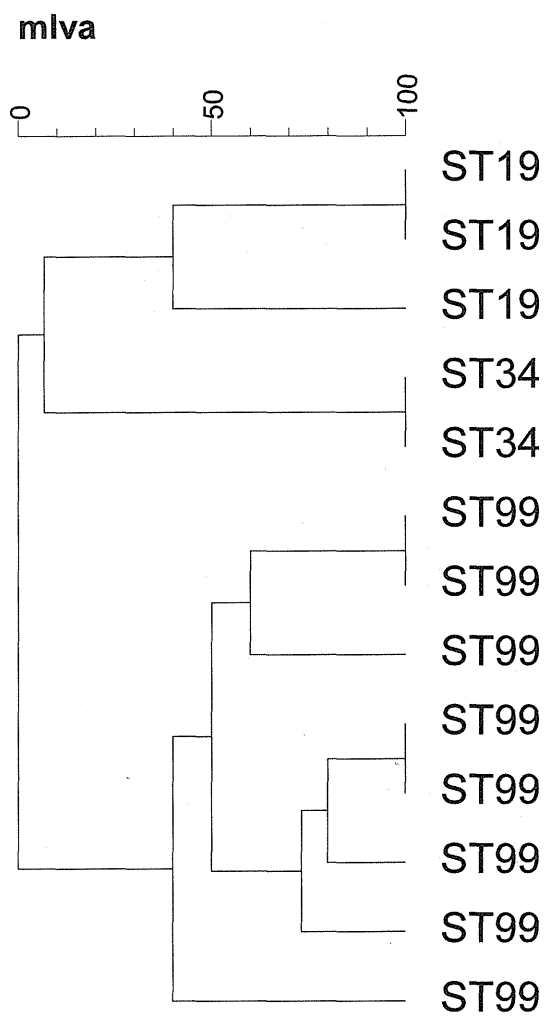


図3. *S. I 4:i:-*株 MLVA クラスタ解析

	STC	5				19			32			155	76	214	計		
	ST	43	86	149	307	88	127		42	423	1838	2923	1833	276			
	Origin	h	h	ref	ref	h	nh	h	nh	h	ref	h	nh	nh	ref	ref	
I 4:b:- (小計)							4		1	3		1	1			10	
fljB-									1	3		1	1			6	
fljB+							4									4	
Paratyphi B			3	4												7	
Paratyphi B Java		16			1	1	3	1	2		1					25	
Schleissheim													1			1	
II 4:b:-															1	1	
総計		16	3	4	1	1	3	5	2	1	1	3	1	1	1	1	44

表 3. PCR タイピングおよび MLST の結果
h, ヒト由来株、nh, 非ヒト由来株、ref, 参照株

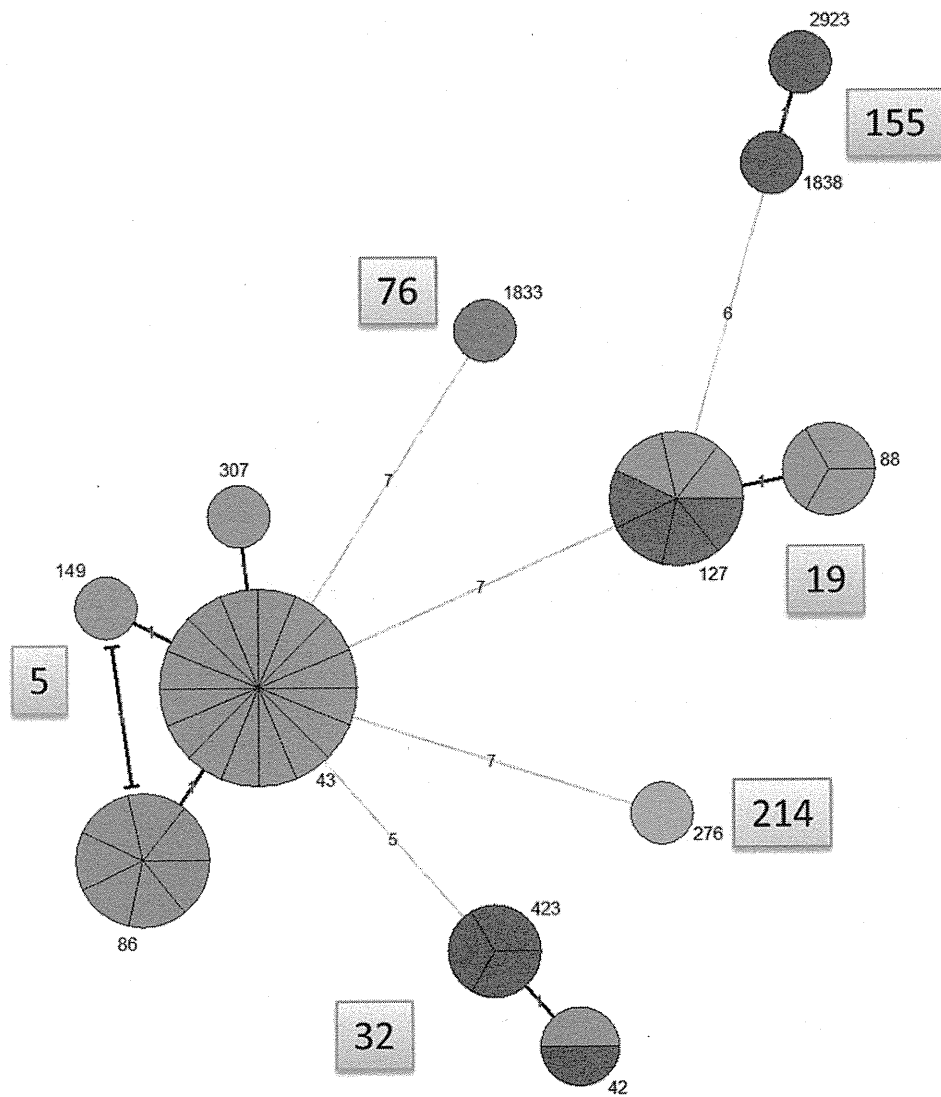


図4. MLSTの結果に基づくMST。頂点の脇にある数字はSTを、□でくくった数字はSTCを表す。線上の数字は異なる遺伝子座の数を表す。紫, Paratyphi B、緑, Paratyphi B var Java、赤, I 4:b:-、濃い緑, Schleissheim、水色, II 4:b:-。

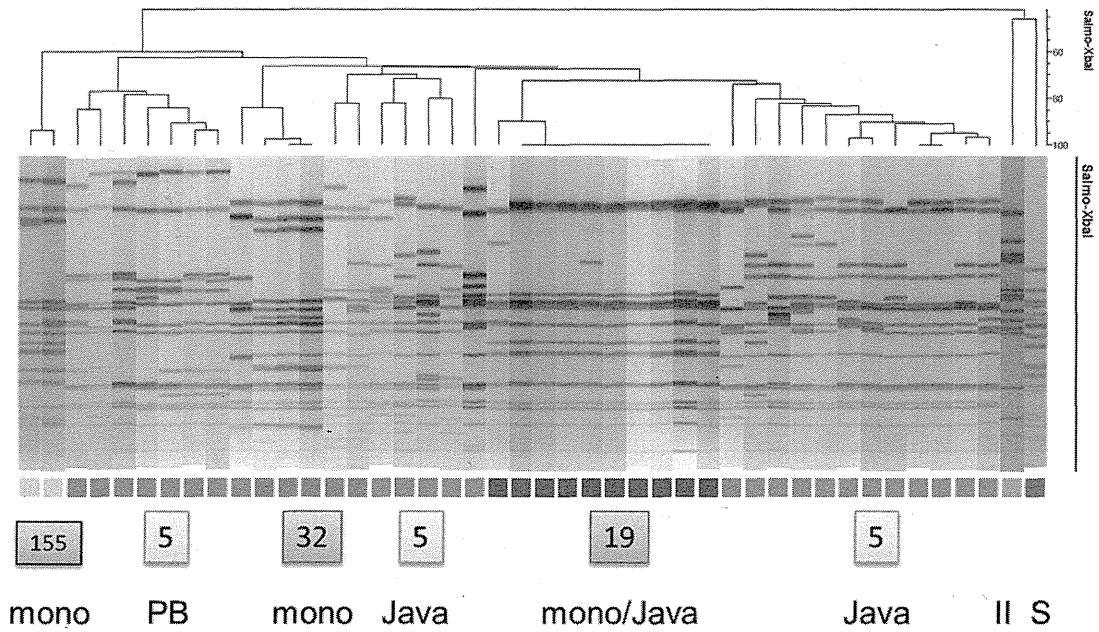


図5. *S. I 4:b:-*関連株 XbaI 消化 PFGE パターンのクラスター解析

上段は STC、下段はクラスターの大半を占める血清型（略称）を表す。mono, I 4:b:-、PB, Paratyphi B、Java, Paratyphi B var Java、II, II 4;b:-、S, Schleissheim

総合研究(分担)報告書

ウエルシュ菌選択分離培地の比較検討に関する研究

世良 暢之

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

ウェルシュ菌選択分離培地の比較検討に関する研究

研究分担者	世良 暢之	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	西田 雅博	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	前田詠里子	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	重村 洋明	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	丸田 直子	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	村上 光一	（国立感染症研究所）
研究協力者	江藤 良樹	（福岡県保健医療介護総務課）
研究協力者	大石 明	（福岡県健康増進課）
研究協力者	小林 昭彦	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	曾根 美紀	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	加藤 直樹	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	齊藤志保子	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	黒木 俊郎	（神奈川県衛生研究所）

国内で生産、冷蔵で流通されている市販鶏肉についてウェルシュ菌の汚染実態調査を実施した結果、鶏肉の推定ウェルシュ菌数は 83 検体中 47 検体（56.6%）から 1-49 CFU/g 検出され、残り 36 検体は 1 CFU 未満/g であった。そのうちウェルシュ菌は 29 検体から検出され、鶏肉の部位別ではモモ 35.3%、ムネ 51.6%及びササミ 0%であった。検出されたウェルシュ菌はいずれも血清型別不能、エンテロトキシン産生遺伝子陰性であった。ウェルシュ菌の選択分離培地として作製された酵素基質培地である CHROMagar™ C. perfringens 試作品（CHROMagar 社、以下 CCP 培地）は、従来から用いられてい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）と比較し、発育支持能及び鑑別能で優れていた。特に発育集落の色調による鑑別能では、ウェルシュ菌のみが青緑色を呈し、他の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った。この CCP 培地は、ウェルシュ菌を単独で食品に添加した際には回収率が優れていたが、夾雑菌が含まれている食品等の場合には Trypton sulphite cycloserine 寒天培地（Oxoid 社、以下 TSC 培地）のほうがより優れていた。一方、便への添加では回収率は極端に下がり、食中毒事例発生時等において有症者

便等からエンテロトキシン遺伝子陽性のウェルシュ菌を分離することは困難を極めると思われた。しかし、従来から用いられている 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。

A. 研究目的

ウェルシュ菌による食中毒は、年間数十件程度で、それほど多いものではないが、1事例あたりの平均患者数が多く、大規模事例の多いことで知られている。本菌による食中毒は、大量の食事を取り扱う給食施設や仕出し屋、飲食店等で発生しており、主な原因食品の多くは食肉、野菜或いは魚介類等を使った調理品であるが、鶏肉の汚染率等について全国的な規模での実態調査が実施されていない。また、食中毒細菌であるウェルシュ菌の分離には、本邦では ECW⁺培地など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、ウェルシュ菌の一部に卵黄反応が弱い、または不明瞭であることに起因して鑑別・同定試験の要否判断に苦慮することがあると言われている。

そこで本研究では、まず全国の4地方衛生研究所の協力のもと、国内で生産、冷蔵で流通されている鶏肉について、ウェルシュ菌の汚染実態調査を実施した。次に、検出されたウェルシュ菌の野生株に加え、ウェルシュ菌標準菌株及び夾雑菌であるクロストリジウム属標準菌株等を用いて、ECW⁺培地及び CCP 培地について、発育支持能、鑑別能及び選択性等について比較検討した。

最後に、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するため、上記2種類の培地に、卵黄反応と黒色集落を釣菌指標とする TSC 培地を加え、比較検討した。

B. 検査材料及び方法

1. 検査材料

(1) 平成25年度

国内で生産、冷蔵で流通されている鶏肉について、平成25年11月から平成26年1月までの間に、全国の4地方衛生研究所において、鶏肉のモモ34検体、ムネ31検体、ササミ14検体及びテバ4検体の合計83検体を購入し、実験に用いた。

(2) 平成26年度

使用菌株は、ウェルシュ菌標準菌株2株（*Clostridium perfringens* ATCC3624（易熱性芽胞形成・*cpe*陰性株）、*C. perfringens* ATCC12915（耐熱性芽胞形成・*cpe*陽性株）、夾雑菌であるクロストリジウム属標準菌株4株（*C. bifermentans* DSM14991、*C. sporogenes* JCM1416、*C. difficile* DSM1296及び*C. sordellii* JCM3814）及び糞便より分離される細菌の代表として *Escherichia coli* IF03301 及び *Staphylococcus aureus*

IF012732 の 2 株の合計 8 株を用いた。食品または食中毒有症者由来のウェルシュ菌の野生株は、秋田県健康環境センター分離 13 株（検体番号 A）、神奈川県衛生研究所分離 11 株（検体番号 K）、さいたま市健康科学研究センター分離 11 株（検体番号 S）及び福岡県保健環境研究所分離 5 株（検体番号 F）の合計 40 株を用いた。

培地は ECW 培地及び CCP 培地を用い、卵黄液は卵黄乳液 EX（関東化学）を用いた。対照培地には GAM 寒天培地（日水製薬、以下 GAM 培地）を用いた。

(3) 平成 27 年度

使用菌株は平成 26 年度で使用した菌株を用いた。培地は平成 26 年度の 2 種類の培地に加え、TSC 培地を追加して用いた。添加回収のための食品には、ウェルシュ菌食中毒事例における推定原因食品の上位である肉類を含むカレー等、野菜類を含む煮物等及び魚介類を含む煮物等を選定し、糞便には、ウェルシュ菌が含まれていないことを確認した糞便を選定し、実験に用いた。

2. 検査方法

(1) 平成 25 年度

購入した鶏肉は滅菌リン酸緩衝生理食塩水で 10 倍希釈して試料原液とし、パウチ法により推定ウェルシュ菌数を計測、検出された黒色コロニーについて生化学的性状試験を行った。ウェルシュ菌と同定された菌

株については、耐熱性 A 型ウェルシュ菌免疫血清（デンカ生研）を用いた血清型別、ウェルシュ菌毒素産生遺伝子検出用プライマー（タカラバイオ）を用いた PCR によりエンテロトキシン産生遺伝子の有無を確認した。

(2) 平成 26 年度

供試菌株のうち、ウェルシュ菌標準菌株、夾雑菌であるクロストリジウム属標準菌株及びウェルシュ菌の野生株は、変法チオグリコレート培地（日水製薬）に接種し、アネロパックケンキ（三菱ガス化学）を用いて、 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間、嫌気培養した培養菌液を試験菌原液とした。*E. coli* IF03301 株及び *S. aureus* IF012732 株は、Brain heart infusion broth（栄研化学）に接種し、 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間、好気培養した培養菌液を試験菌原液とした。

ウェルシュ菌標準菌株、夾雑菌であるクロストリジウム属標準菌株及びウェルシュ菌の野生株の発育菌数は、培養菌液を Yamamoto-Osaki ら¹⁾の嫌気性希釈液を用いて 10 倍から 10^7 倍まで 10 倍階段希釈した。また、*E. coli* IF03301 株及び *S. aureus* IF012732 株については、滅菌生理食塩水を用いて同様に希釈した。その希釈菌液を Miles&Misra ら²⁾の方法（以下ミスラ法）に準拠して各培地 2 枚に $10\mu\text{l}$ または $20\mu\text{l}$ 滴下し、アネロパックケンキ（三菱ガス化学）を用いて、 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間嫌気培

養、発育菌数の測定及び CCP 培地発育集落の色調を観察した。

(3) 平成 27 年度

試験菌原液は、平成 26 年度と同様の方法で調整し、10 倍から 10^7 倍まで 100 倍或いは 10 倍階段希釈して用いた。培養も、平成 26 年度と同様の方法で、嫌気培養した。

食品への添加回収試験は、添加回収試験 1 (生食 212.5ml にウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか、試験菌原液) 2.5ml 及び食品 25 g を添加、10 倍階段希釈した後、ミスラ法で、計測)、添加回収試験 2 (生食 212.5ml にウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか、試験菌原液、100 倍階段希釈) 2.5ml、クロストリジウム属標準菌株 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*) 各 2.5ml 及び食品 25 g を添加、画線培養) 及び添加回収試験 3 (生食 210ml にウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* S7 及び S9 の両方、試験菌原液、10 倍階段希釈) 各 2.5ml、クロストリジウム属標準菌株 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*) 各 2.5ml 及び食品 25 g を添加、画線培養後、4 集落を釣菌し、エンテロトキシン遺伝子を確認) の 3 段階に分けて実施した。

便への添加回収試験も食品と同様に、添加回収試験 1 (生食 8.9ml にウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* S7 或いは S9 の

いずれか、試験菌原液) 0.1ml、便 1 g を添加、10 倍階段希釈した後、ミスラ法で計測)、添加回収試験 2 (生食 8.5ml にウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか、試験菌原液、100 倍階段希釈) 0.1ml、クロストリジウム属標準菌株 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*) 各 0.1ml、便 1 g を添加、画線培養) 及び添加回収試験 3 (生食 8.4ml にウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* S7 及び S9 の両方、試験菌原液、10 倍階段希釈) 各 0.1ml、クロストリジウム属標準菌株 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*) 各 0.1ml 及び便 1 g を添加、画線培養後、4 集落を釣菌し、エンテロトキシン遺伝子を確認) の 3 段階に分けて実施した。

C. 研究結果

1. 平成 25 年度

推定ウェルシュ菌数は 83 検体中 11 検体が 11-49 CFU/g、9 検体が 6-10 CFU/g、27 検体が 1-5 CFU/g 及び 36 検体 (3.4%) が 1 CFU/g 未満であった。推定ウェルシュ菌数の最大値は東北産ムネの 49 CFU/g であったが、同検体からウェルシュ菌は検出されなかった。部位別の推定ウェルシュ菌検出率はモモ 58.8%、ムネ 74.2% 及びササミ 0% であった (表 1)。

ウェルシュ菌は推定ウェルシュ菌数が 1

CFU/g 以上の 47 検体中 29 検体から検出され、各部位毎で見るとモモ 35.3%、ムネ 51.6%及びササミ 0%であった(表 2)。検出されたウェルシュ菌 237 株は全て血清型別不能、エンテロトキシン産生遺伝子陰性であった。

2. 平成 26 年度

(1) 標準菌株による発育菌数及び集落の色調

標準菌株による発育菌数及び CCP 培地に発育した集落の色調を表 3 に示した。ウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* ATCC3624 株及び ATCC12915 株) は、CCP 培地では GAM 培地と同程度に発育し、ECW⁺培地の約 10 倍であった。その他の夾雑菌であるクロストリジウム属標準菌株は CCP 培地ではあまり抑制され無かったのに対し、ECW⁺培地においては、*C. bifermentans* DSM14991 株及び *C. sporogenes* JCM1416 株の 2 株は発育が完全に抑制され、*C. difficile* DSM1296 株及び *C. sordellii* JCM3814 株においても CCP 培地の約 1/2 ないし 1/80 に抑制された。

CCP 培地における発育集落の色調は、ウェルシュ菌標準菌株 (*C. perfringens* ATCC3624 株及び ATCC12915 株) が青緑色を呈し、その他のクロストリジウム属標準菌株 4 株はウェルシュ菌標準菌株の青緑色とは異なる色調を示し、鑑別が容易であった。

(2) 野生株による発育菌数及び集落の色調

ウェルシュ菌野生株 40 株の各培地における発育菌数を表 4 に示した。

C. perfringens K12 株、K13 株、K14 株及び A56 株を除いた 36 株の CCP 培地での発育菌数は、ECW⁺培地の発育菌数に比べて、ほぼ同数 $\sim 2.5 \times 10^2$ 倍の菌数であった。*C. perfringens* K12 株、K13 株、K14 株及び A56 株の CCP 培地での発育菌数は、 $2.0 \times 10^8 \sim 6.5 \times 10^8$ CFU/ml で他の野生株 36 株と同程度であったが、ECW⁺培地での発育菌数は $1.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^4$ CFU/ml と少なかった。なお、ウェルシュ菌の野生株 40 株の CCP 培地における発育集落の色調は全て青緑色であり、今回使用したその他の夾雑菌であるクロストリジウム属標準菌株 4 株との鑑別は容易であった。

3. 平成 27 年度

食品からの添加回収試験 1 の結果、ECW⁺培地では回収率が数% ~ 20 数%、CCP 培地では全てにおいて 80%以上、さらに TSC 培地では 30%から 90%程度であった(表 5)。添加回収試験 2 の結果、試験菌原液を添加した際には ECW⁺培地及び CCP 培地の両方から回収が可能であったが、100 倍階段希釈においては CCP 培地のみから回収できた。一方、TSC 培地においては試験菌原液、100 倍及び 10,000 倍階段希釈のいずれにおいても十分回収が可能であった(表 6)。添加回収試験 3 の結果、試験菌原液を添加した際にはいずれの培地からも回収が可能であ

ったが、100 倍階段希釈においては ECW⁺培地及び CCP 培地のみから回収できた(表 7)。

便からの添加回収試験 1 の結果、抗生物質投与済みの便からは全く回収されなかった。それ以外の便からの回収率も低く、数%~20 数%程度であった(表 8)。添加回収試験 2 の結果、試験菌原液を添加した際にのみ ECW⁺培地及び CCP 培地からは回収が可能であったが、TSC 培地からは回収されなかった(表 9)。添加回収試験 3 の結果、試験菌原液を添加した際に、CCP 培地のみから回収できた。追加試験として、各濃度から 10 集落釣菌して回収できるかどうかについて検討した結果、試験菌原液を添加した際に、ECW⁺培地及び CCP 培地において、回収が可能であった(表 10)。

D. 考察

平成 25 年度の検討において、鶏肉の推定ウェルシュ菌数は 83 検体中 47 検体(56.6%)から 1-49 CFU/g と高率に検出され、ウェルシュ菌そのものも 29 検体から検出された。特に、鶏肉のモモ及びムネから 35.3%及び 51.6%と高率に汚染された。分離された全てのウェルシュ菌は、血清型別不明、エンテロトキシン産生遺伝子であったが、鶏肉等の肉類がウェルシュ菌による食中毒の主な原因食品の 1 つであることから、今後も実態調査を継続実施していくことが必要であると考えられた。

平成 26 年度の検討において、ウェルシュ菌標準菌株及び野生株における CCP 培地と ECW⁺培地の比較では、発育支持能及び鑑別能では CCP 培地が優れていたが、選択性が ECW⁺培地よりやや劣っていた。これらのことから CCP 培地は夾雑菌を含む材料からのウェルシュ菌の分離に適用可能かどうかについて詳細な検討が必要だと思われた。

平成 27 年度の検討において、実際の食品のように他の夾雑菌が含まれている可能性がある食品等からウェルシュ菌を検出する場合には TSC 培地が優れており、従来から用いられている ECW⁺培地、ハンドフオード改良寒天培地等に加え、TSC 培地を併用することが有用であると思われた。一方、夾雑菌が非常に多いと推定される食中毒事例発生等における有症者便等からエンテロトキシン遺伝子陽性のウェルシュ菌を分離することは困難を極めるが、従来から用いられている ECW⁺培地に加え、CCP 培地を併用することが有用であると思われた。

E. 結論

平成 25~27 年度にかけての検討で、国産鶏肉はウェルシュ菌に高率に汚染されているが、エンテロトキシン産生遺伝子を保有したウェルシュ菌は検出されなかった。ウェルシュ菌を分離する際の培地として、食品からの検出においては TSC 培地が、糞便からの検出においては CCP 培地が有用であ