

ることが分かった。

J. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

#### F. 謝辞

本研究を進めるにあたり、CHROMagar™ C. perfringens 試作品を提供いただきました  
関東化学株式会社の関係各位、福岡県保健  
環境研究所病理細菌課の堀川和美氏、岡元  
冬樹氏、佐伯かおり氏、平野桂子氏、さい  
たま市健康科学研究センターの宮崎元伸所  
長に深謝いたします。

#### G. 参考文献

- 1) Takako Yamamoto-Osaki, Shigeru Kamiya, Sadaaki Sawamura, Masanori Kai and Atsushi Ozawa: Growth inhibition of *Clostridium difficile* by intestinal flora of infant faces in continuous flow culture., J. Med. Microbiol., 40, 179-187, (1994).
- 2) 坂崎利一, 新 細菌培地学講座・上, 200-211, 近代出版, (1978).

#### H. 健康危険情報

なし

#### I. 研究発表

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、

表1 鶏肉の部位毎の推定ウェルシュ菌数

部位	検査数	検体数					
		推定ウェルシュ菌数、CFU/g					
		1未満	1-5	6-10	11-20	21-100	101以上
モモ	34	14	11	5	4	0	0
ムネ	31	8	14	4	2	3	0
ササミ	14	14	0	0	0	0	0
テバ	4	0	2	0	2	0	0
計	83	36	27	9	8	3	0

表2 鶏肉の部位毎のウェルシュ菌数

部位	検体数	陽性検体数 (%)	
		推定ウェルシュ菌	ウェルシュ菌
		モモ	34
ムネ	31	23 ( 74.2% )	16 ( 51.6% )
ササミ	14	0 ( 0.0% )	0 ( 0.0% )
テバ	4	4 ( 100.0% )	1 ( 25.0% )
計	83	47 ( 56.6% )	29 ( 34.9% )

表3 標準菌株の各培地における発育菌数及びCHROMagar C. perfringens寒天培地における発育集落の色調

Strain No.	菌種	菌株	発育菌数 (log CFU/ml) <sup>a</sup>			CCP - ECW <sup>+</sup> 発育菌数対数差 (b - c · log)	CCP 発育集落の色調
			CCP <sup>b</sup>	ECW <sup>+</sup> <sup>c</sup>	GAM <sup>d</sup>		
1	<i>C. perfringens</i>	ATCC3624	8.54	7.40	8.00	1.15	青緑色
2	<i>C. perfringens</i>	ATCC12915	8.81	7.90	8.60	0.91	青緑色
3	<i>C. bifermentans</i>	DSM14991	8.81	発育せず <sup>e</sup>	8.78	> 7.41	淡褐色～淡紅色
4	<i>C. sporogenes</i>	JCM1416	7.30	発育せず <sup>e</sup>	8.60	> 5.90	白色
5	<i>C. difficile</i>	DSM1296	7.30	5.40	8.00	1.90	淡褐色～黒色
6	<i>C. sordellii</i>	JCM3814	8.18	8.00	8.40	0.18	白色～淡紅色
7	<i>E. coli</i>	IFO3301	発育せず <sup>e</sup>	発育せず <sup>e</sup>	8.81	—	集落の形成なし
8	<i>S. aureus</i>	IFO12732	発育せず <sup>e</sup>	発育せず <sup>e</sup>	7.80	—	集落の形成なし

<sup>a</sup> 検出限界: 1.4 logCFU/ml

<sup>b</sup> CCP: CHROMagar<sup>TM</sup> C. perfringens 試作品

<sup>c</sup> ECW<sup>+</sup>: カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地

<sup>d</sup> GAM: GAM寒天培地

<sup>e</sup> 出発希釈である10<sup>-1</sup>希釈菌液による試験において発育せず

表4 ウェルシュ菌野生株40株の各培地における発育菌数

No.	検体番号	発育菌数 (log CFU/ml) <sup>a</sup>			CCP - ECW <sup>+</sup> 発育菌数対数差 (b-c · log)
		CCP <sup>b</sup>	ECW <sup>+</sup> <sup>c</sup>	GAM <sup>d</sup>	
1	K1	8.30	7.78	8.30	0.52
2	K2	8.15	6.30	8.11	1.85
3	K4	7.70	5.98	8.04	1.72
4	K5	8.00	6.40	8.90	1.60
5	K8	8.54	6.48	9.08	2.07
6	K9	8.40	7.54	8.48	0.85
7	K10	8.85	7.81	8.78	1.03
8	K11	8.40	7.65	9.00	0.74
9	K12	8.81	3.98	9.04	4.84
10	K13	8.30	3.00	8.48	5.30
11	K14	8.60	4.48	8.95	4.12
12	A1	9.11	8.48	8.85	0.64
13	A4	8.81	7.93	8.78	0.88
14	A6	8.74	6.48	8.30	2.26
15	A9	8.78	7.81	8.48	0.97
16	A20	8.54	7.70	8.70	0.85
17	A30	8.90	7.30	8.70	1.60
18	A41	8.40	8.08	8.30	0.32
19	A43	8.70	8.20	8.90	0.49
20	A50	8.81	7.81	8.85	1.00
21	A56	8.54	3.24	8.24	5.30
22	A60	9.40	8.98	9.60	0.42
23	A61	9.18	8.98	9.85	0.20
24	A62	9.20	8.88	9.15	0.33
25	F1	8.88	7.78	8.70	1.10
26	F2	9.18	9.00	9.30	0.18
27	F3	8.70	8.08	9.18	0.62
28	F5	8.98	8.18	9.08	0.80
29	F6	9.30	6.95	9.30	2.35
30	S1	9.11	7.18	9.11	1.94
31	S2	8.60	6.81	9.04	1.79
32	S3	8.70	7.48	8.85	1.22
33	S4	8.70	7.85	8.70	0.85
34	S5	8.70	7.93	9.08	0.77
35	S6	9.00	6.60	9.08	2.40
36	S7	9.11	7.95	9.11	1.16
37	S8	7.88	6.74	8.60	1.13
38	S9	8.70	8.65	8.90	0.05
39	S10	8.74	7.11	8.48	1.63
40	S11	8.60	7.95	8.48	0.65

<sup>a</sup> 検出限界: 1.7 logCFU/ml

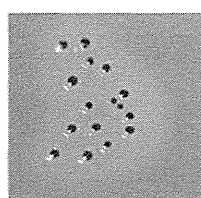
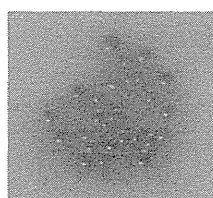
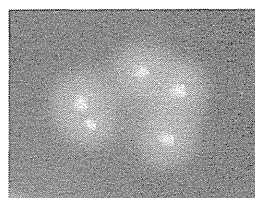
<sup>b</sup> CCP: CHROMagar<sup>TM</sup> C. perfringens 試作品

<sup>c</sup> ECW<sup>+</sup>: カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地

<sup>d</sup> GAM: GAM寒天培地

表5 ウェルシュ菌のみを食品に添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

添加	対照 (GAM)		比較した培地					
			ECW		CCP		TSC	
	S7	S9	S7	S9	S7	S9	S7	S9
食品1	26,500 (100%)	21,500 (100%)	7,000 (26.4%)	5,000 (23.3%)	34,750 (131%)	26,000 (121%)	12,000 (45.3%)	7,000 (32.6%)
食品2	26,500 (100%)	21,500 (100%)	2,100 (7.93%)	3,850 (17.9%)	29,925 (113%)	18,500 (86.0%)	24,750 (93.4%)	13,500 (62.8%)
食品3	26,500 (100%)	21,500 (100%)	2,050 (7.74%)	5,250 (24.4%)	40,000 (151%)	25,000 (116%)	10,750 (40.6%)	16,750 (77.9%)



(単位、cfu/g、食品)

ECW、CCP及びTSC上のウェルシュ菌の写真  
(さいたま市健康科学研究センター撮影)

表6 ウェルシュ菌とその共雑菌(クロストリジア属)を食品に添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	C.perfringensの発育状況					
				ECW		CCP		TSC	
	S7	S9		S7	S9	S7	S9	S7	S9
食品1	26500	21500	C. bifermentans, 4.1×10 <sup>3</sup>	+	+	+	++	+	++
	265	215	C. sporogenes, 9.0×10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	++	++
	3	2	C. difficile, 1.8×10 <sup>2</sup> C. sordellii, 2.9×10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	++	++
食品2	26500	21500	C. bifermentans, 4.1×10 <sup>3</sup>	+	+	+	+	++	++
	265	215	C. sporogenes, 9.0×10 <sup>3</sup>	-	-	-	+	++	++
	3	2	C. difficile, 1.8×10 <sup>2</sup> C. sordellii, 2.9×10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	++	++
食品3	26500	21500	C. bifermentans, 4.1×10 <sup>3</sup>	+	+	+	++	++	++
	265	215	C. sporogenes, 9.0×10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	++	++
	3	2	C. difficile, 1.8×10 <sup>2</sup> C. sordellii, 2.9×10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	++	++

(+, 10~99集落)  
(++, 1~9集落)

表7 ウェルシュ菌(CPE-とCPE+)とその共雑菌(クロストリジア属)を食品に添加した際のウェルシュ菌(CPE+)の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	比較した培地		
	S7	+ S9		ECW	GCP	TSC
				S7+S9	S7+S9	S7+S9
食品1	26500	21500		3	4	1
	2650	2150	C. bifermentans, 4.1x10 <sup>3</sup>	0	-	0
	265	215	C. sporogenes, 9.0x10 <sup>3</sup>	-	-	0
	27	22	C. difficile, 1.8x10 <sup>2</sup>	-	-	0
	3	2	C. sordellii, 2.9x10 <sup>4</sup>	-	-	0
食品2	26500	21500		0	0	2
	2650	2150	C. bifermentans, 4.1x10 <sup>3</sup>	0	2	0
	265	215	C. sporogenes, 9.0x10 <sup>3</sup>	-	1	0
	27	22	C. difficile, 1.8x10 <sup>2</sup>	-	-	0
	3	2	C. sordellii, 2.9x10 <sup>4</sup>	-	-	0
食品3	26500	21500		1	1	3
	2650	2150	C. bifermentans, 4.1x10 <sup>3</sup>	2	1	0
	265	215	C. sporogenes, 9.0x10 <sup>3</sup>	-	-	0
	27	22	C. difficile, 1.8x10 <sup>2</sup>	-	-	0
	3	2	C. sordellii, 2.9x10 <sup>4</sup>	-	-	0

(1濃度から4集落約菌してPCRでCPE(+))を確認  
(-、発育を認めず)

表8 ウェルシュ菌のみを便に添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

培地名 菌株名	対照(GAM)		比較した培地					
	S7	S9	ECW		GCP		TSC	
			S7	S9	S7	S9	S7	S9
便1	875,000	125,000	0 (0%)	0 (0%)	1 (0%)	1 (0%)	2 (0%)	0 (0%)
便2	875,000	125,000	39,167 (4.48%)	7,000 (5.60%)	64,500 (7.37%)	30,500 (24.4%)	132,500 (15.1%)	6,000 (4.80%)
便3	875,000	125,000	433 (0.05%)	8 (0.01%)	8,000 (0.91%)	1,850 (1.48%)	67,500 (7.71%)	1,625 (1.30%)

(単位、cfu/g、便)

表9 ウェルシュ菌とその共雑菌(クロストリジア属)を便に添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	C.perfringensの発育状況					
	S7	S9		ECW		CCP		TSC	
				S7	S9	S7	S9	S7	S9
便1	875,000	125,000	C. bifermentans, 8.1x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
	8750	1250	C. sporogenes, 4.3x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
	88	13	C. difficile, 9.9x10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
便2	875,000	125,000	C. bifermentans, 8.1x10 <sup>5</sup>	+	-	+	+	-	-
	8750	1250	C. sporogenes, 4.3x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
	88	13	C. difficile, 9.9x10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
便3	875,000	125,000	C. bifermentans, 8.1x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
	8750	1250	C. sporogenes, 4.3x10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
	88	13	C. difficile, 9.9x10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-

(++, 10~99集落)  
(+, 1~9集落)

表10 ウェルシュ菌(CPE-とCPE+)とその共雑菌(クロストリジア属)を便に添加した際のウェルシュ菌(CPE+)の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	比較した培地		
	S7+	S9		ECW	CCP	TSC
				S7+S9	S7+S9	S7+S9
便1	26500	21500	C. bifermentans, 8.1x10 <sup>5</sup>	0	0	0
	2650	2150	C. sporogenes, 4.3x10 <sup>5</sup>	0	0	0
	265	215	C. difficile, 9.9x10 <sup>1</sup>	0	0	0
	27	22	C. sordellii, 1.3x10 <sup>5</sup>	0	0	0
	3	2		0	0	0
便2	26500	21500	C. bifermentans, 8.1x10 <sup>5</sup>	0 (1)	0 (2)	0
	2650	2150	C. sporogenes, 4.3x10 <sup>5</sup>	0	0	0
	265	215	C. difficile, 9.9x10 <sup>1</sup>	0	0	0
	27	22	C. sordellii, 1.3x10 <sup>5</sup>	0	0	0
	3	2		0	0	0
便3	26500	21500	C. bifermentans, 8.1x10 <sup>5</sup>	0	1 (2)	0
	2650	2150	C. sporogenes, 4.3x10 <sup>5</sup>	0	0	0
	265	215	C. difficile, 9.9x10 <sup>1</sup>	0	0	0
	27	22	C. sordellii, 1.3x10 <sup>5</sup>	0	0	0
	3	2		0	0	0

(1濃度から4集落釣菌してPCRでCPE(+))を確認  
(括弧内は1濃度から10集落釣菌してPCRでCPE(+))を確認  
(-, 発育を認めず)

# 総合研究(分担)報告書

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

齊藤 志保子

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

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

研究分担者	齊藤志保子	（秋田県健康環境センター）
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	黒木 俊郎	（神奈川県衛生研究所）
研究協力者	久米田裕子	（大阪府立公衆衛生研究所）
研究協力者	余野木伸哉	（大阪府立公衆衛生研究所）
研究協力者	世良 暢之	（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	熊谷 優子	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	高橋 志保	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	今野 貴之	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	檜尾 拓子	（秋田県健康環境センター）

各自治体が行う食中毒事例や食品等の食中毒菌のサーベイランスに活用できるタイピング方法を検討するため、平成 25 年度は鶏肉から、平成 26 年度は食中毒事例等から分離された黄色ブドウ球菌について POT 法、MLVA 法、PFGE 法を用いて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）遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した。その結果、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。

さらに、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。



## A. 研究目的

一般に流通している食品における各種食中毒菌の汚染状況及び菌株の型別等の疫学情報は食中毒発生時の原因究明あるいは食品衛生指導等に非常に有用と考えられ、食中毒菌のデータベース構築が望まれる。そこで、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ピ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。平成25年度は鶏肉から分離された菌株、平成26年度は黄色ブドウ球菌食中毒事例由来株、有症苦情事例や他の原因物質事例で検出された菌株についての試験を実施した<sup>4)5)</sup>。

さらに、平成27年度はこれまでの検討で有用な型別法と考えられたPOT型別について、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。

## B. 研究方法

### 1. 黄色ブドウ球菌のSE遺伝子検索及び遺

## 伝子型別

### 1-1 供試菌株

鶏肉由来株：平成24年度に実施した鶏肉の汚染実態調査において地方衛生研究所3機関で分離した鶏肉32検体由来107株。SE遺伝子検索は107株すべてについて、そのうち94株をPOT法、77株をMLVA法、52株をPFGE法による型別に供した。

食中毒事例等由来株：平成15年～26年に発生した黄色ブドウ球菌食中毒14事例由来49株、有症苦情等の黄色ブドウ球菌以外の事例11事例由来26株、計75株をSE遺伝子検索、POT法、MLVA法に供した。選抜した53株をPFGE法に供試した。

### 1-2 ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)遺伝子の検索

ブドウ球菌エンテロトキシンA～E型の遺伝子である *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* に加えG型、H型、I型の遺伝子である *seg*, *seh*, *sei* の保有についてPCR法により検索した。プライマー、各種条件等についてはKatsuhiko Omoeらの報告<sup>1)</sup>に従った。

### 1-3 POT法(Phage ORF typing法)

POT法は菌株ごとに異なるORFの保有パターンをMultiplex PCRによって検出する方法である。シカジーニアスDNA抽出試

薬を用いて新鮮培養菌を 70°C20 分, 94°C3 分処理によりテンプレートを作成し、黄色ブドウ球菌用シカジーニクス分子疫学解析 POT キット（関東化学株式会社）を用いて PCR を行った。POT 型への変換方法例（表 1）に示すようにターゲットとする 22 領域の増幅バンドの有無から POT 型の数値に変換し、POT1-POT2-POT3 の 3 つの数値により型を標記した。

#### 1-4 MLVA 法 (Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis)

MLVA 法は MRSA を型別対象とした Artur Sabat らの方法<sup>2)</sup>を一部改変し実施した。*clfA*, *clfB*, *sdr* (*sdrC*, *sdrD*, *sdrE*), *spa*, *ssp* の 7 カ所の遺伝子を対象として 5 種類のプライマーセットにより Multiplex PCR を行った。テンプレートはシカジーニクス DNA 抽出試薬により抽出した DNA を用いた。本法は株における VNTR の多様性をデジタル表示化するのではなく異なるバンドパターンを比較解析して型別するものであり、解析は Fingerprinting II を用いて N. Malachowa らの方法<sup>3)</sup>に従い類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA により実施した。

#### 1-5 PFGE 法

菌株を BHI で 30°C 一夜培養後、遠心し、その沈さに CSB\*1（リゾチーム 5mg/ml、リゾ

スタフィン 0.2 μg/ml 加）100 μl を加え、1% Seakem Gold Agarose/TE を等量混合し、プラグを作成した。プラグを CLB\*2（リゾチーム 5mg/ml、リゾスタフィン 0.2 μg/ml 加）1ml 中 37°C 2 時間処理後、プロテナーズ K 処理を 50°C 一夜行った。制限酵素には *SmaI* を用い、泳動条件は 6V/cm<sup>2</sup>、5.3 ~ 34.9 S 20 時間とした。解析は Fingerprinting II を用いて、類似係数 Jaccard、デンドログラムタイプ UPGMA により実施した。

\*1 CSB: Cell suspension buffer

100mM Tris、100mM EDTA (pH 8.0)

\*2 CLB: Cell Lysis buffer

50mM Tris、50mM EDTA (pH 8.0)

+ 1% Sarcosyl

#### 2. 複数機関における POT 型別結果の比較

2-1 参加機関: さいたま市健康科学研究センター、福岡県保健環境研究所、大阪府立公衆衛生研究所、神奈川県衛生研究所、秋田県健康環境センターの 5 機関

#### 2-2 供試株

鶏肉由来株 5 株、ヒト糞便由来株 5 株計 10 株（表 2）を供試した。新鮮培養菌を蒸留水にマックファーランド 3 程度に浮遊させ、沸騰水中で 2 分加熱したものを冷蔵で各機関宛て平成 27 年 9 月 28 日に送付した。POT 型別試験は各機関で 10 月 8 日までに実

施した。

### 2-3 方法

5 機関とも同一ロットの関東化学株式会社のシカジーニース DNA 抽出試薬、シカジーニース分子疫学解析 POT キット（黄色ブドウ球菌用）を使用した。キットの取り扱い説明書に従い 1-3 のとおり実施した。

## C. 研究結果

### 1. 黄色ブドウ球菌の SE 遺伝子検索及び遺伝子型別

#### 1-1 ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の保有状況

保有する SE 遺伝子の種類・組み合わせ毎にその該当株が分離された鶏肉検体数、食中毒事例数、有症苦情等事例数を表 3 に示した。

従来のエンテロトキシン型の A～E 型の遺伝子を含む株や事例の割合は食中毒事例が 88.9%と高率であったが、それに比較して鶏肉検体は 25.6%と低率であった。新型 (G, H, I) 遺伝子のみ保有は鶏肉の 43.6%に比べて食中毒事例では 11.1%と低率であった。鶏肉由来株と食中毒事例の SE 遺伝子保有状況とは傾向が異なっていた。

#### 1-2 遺伝子型別結果

POT 法、MLVA 法、PFGE 法における由来別

の供試株数と何種類に型別されたかという結果を表 4 に示す。鶏肉由来株は POT 法では 19 種、MLVA 法では 20 種、PFGE 法では 24 種に型別された。食中毒事例は POT 法で 15 種、MLVA 法で 16 種、PFGE 法で 17 種に型別された。また、保有する SE 遺伝子の種類と POT 型の組み合わせで鶏肉由来株、食中毒事例等で型別可能数が 1 増加した。

表 5 に平成 25 年度～26 年度の調査で型別された SE 型と POT 型の組み合わせの一覧を示した。食中毒事例由来株と鶏肉由来株で一致した SE 型:POT 型は A:0-1-1、G, I:4-0-0 の 2 種類の型であった。G, I:0-9-16 は鶏肉と他の事例で一致がみられた。

### 2. 複数機関における POT 型別結果の比較

No. 1～10 の供試株 (表 2) についての各機関の POT 型別 PCR の泳動結果を図 1～5、POT 型数値については表 6 に示す。POT 型別は 10 株中 9 株について 5 機関すべてで一致した。供試株 No. 3 については 3 機関で 6-0-84 と判定したが、機関 C では POT2-1 (係数 128) をバンド有りとし、6-128-84 と判定、機関 D では POT1-7 (係数 1) をバンド有りとし 7-0-84 と判定した。POT2-1 のバンドを有りとした機関 C の泳動写真 (図 3) を見ると全体的にバンドが非常に明るく、POT2-1 付近に薄いバンドが確認できる。陽性コントロールに比較し非常に薄く、他の機関の泳動

像では確認できなかった。POT1-7 は機関 D(図 4)の泳動像では陽性コントロールに比べて薄くまたやや幅が狭いバンドが認められる。機関 B、E の泳動像でも非常に薄い像が認められるがバンドとして判定しなかった。

#### D. 考察

黄色ブドウ球菌の SE 型について、食中毒事例由来株では従来型の A~E 型、特に A 型の SE 遺伝子保有株が関与する事例が多数を占め、鶏肉由来株では G, I 型の遺伝子 *seg, sei* を高率に保有していることが確認された。食品中での発育性・毒素産生力あるいは病原性等で選択がかかっていると思われる食中毒事例原因菌と鶏肉由来株では SE 遺伝子保有状況はかなり異なるものになったと考えられた。

遺伝子型別法の検討には MRSA の疫学解析用として開発された POT 法と MLVA 法を試行した。本研究に供試した株は全て MSSA であり、POT 法では対象とする 22 領域中 *mec* 遺伝関係のバンドが (一) となることから、解析に用いられるバンド数が MRSA と比較して少なかったが、検出されたバンドを数値化することにより POT 型別は可能であった。MLVA 法についても 4~6 本のバンドの位置による解析で型別が可能であった。

鶏肉由来株や食中毒事例等では SE : POT 型と MLVA 型はほぼ同等に型別され、SE:POT

型の組み合わせの型別は有効と考えられた。

さらに、POT 法と MLVA 法の型別の評価のため PFGE 法を実施した。POT 法、MLVA 法と PFGE 法の型別結果の比較の詳細は平成 25 年度報告書、平成 26 年度報告書を参照していただきたい。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、また逆に異なる POT 型と MLVA 型が同一の PFGE パターンになる例も認められたが、POT 法と MLVA 法による型別は PFGE 法による型別とほぼ同等の解析力を有すると考えられた。

POT 法はキット化された 2 セットの Multiplex PCR 法であり、操作の簡便性、結果判定の迅速性に優れ、型別結果が数値により標記されることから、分離機関、地域、時期等が異なる分離株においても比較解析が容易であると考えられた。MLVA 法については、本調査研究で実施した方法はバンドの位置による画像解析のため、他のデータとの比較は系統樹解析が必要となるが、プライマー 5 組 1 セットを使用する Multiplex PCR に基づいた方法であることから、迅速性に優れ、同一事例等の同時解析における菌株の比較においては有効活用可能と考えられる。

食中毒事例由来株や各種食品由来株の遺伝子型別データを蓄積・比較解析することにより、健康被害に関与する株の SE 型と POT 型との組み合わせ等を推定できる可能

性が考えられる。このような情報を関係機関が共有することは食中毒予防・迅速な原因食品究明に役立つと考えられる。

今回実施した POT 法のコラボ試験においては、供試した 10 株中 9 株がすべての機関で一致した。使用した試薬はキット化され、操作も簡便であり、結果も迅速に得られた。ただし、陽性コントロールにおいて非常に薄いバンドがあり、そのバンドは検体でも薄めの傾向があった。また、薄いエキストラバンドが認められる場合があったことから、試験実施時はそれらの特徴を把握しておく必要があると考えられた。実際、薄いバンドの判定において、今回のコラボ試験でも 1 株の 2 つのバンドについて判定が機関により異なった。このことから広域事例等で複数の機関での型別結果を比較する場合、できれば映像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。

#### E. 結論

SE 遺伝子保有状況は鶏肉由来株と食中毒事例由来株では傾向が異なっていた。

黄色ブドウ球菌の遺伝子型別のための POT 法や MLVA 法は解析力、操作の簡便性、結果判明の迅速性等から有用な型別法と考えられた。

POT 法について同じ菌株を用いた複数の機関における検討の結果、一致率は良好であったが、場合によっては写真情報の相互

確認も必要と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 参考文献

- 1) K. omoe et al., Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates., FEMS Microbiology Letters 246, p191-198 (2005)
- 2) A. Sabat et al., New Method Typing *Staphylococcus aureus* Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates., JCM, Vol. 41, No. 4, p1801-1804 (2003)
- 3) N. Malachowa et al., Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed Field Gel Electrophoresis, *spa* Typing and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates., JCM, Vol. 43, No. 7, p3095-3100 (2005)
- 4) 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 年度 総括・

分担研究報告書

- 5) 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26年度 総括・  
分担研究報告書

表1 POT型への変換方法例

	POT ナンバー	bp	POT 係数	結果	POT ポイント	小計
Reaction Mixture 1	femA	601		1		
	POT1-1	530	64	×	0 = 0	0 a
	POT1-2	449	32	×	0 = 0	
	POT1-3	355	16	×	0 = 0	
	POT2-1	304	128	×	1 = 128	144 b
	POT2-2	271	64	×	0 = 0	
	POT2-3	228	32	×	0 = 0	
	POT2-4	197	16	×	1 = 16	
	POT2-5	161	8	×	0 = 0	
	POT2-6	131	4	×	0 = 0	
	POT2-7	104	2	×	0 = 0	
	POT2-8	81	1	×	0 = 0	
	Reaction Mixture 2	femA	601		1	
POT1-4		477	8	×	0 = 0	6 c
POT1-5		388	4	×	1 = 4	
POT1-6		320	2	×	1 = 2	
POT1-7		273	1	×	0 = 0	
POT3-1		243	64	×	1 = 64	81 d
POT3-2		197	32	×	0 = 0	
POT3-3		171	16	×	1 = 16	
POT3-4		140	8	×	0 = 0	
POT3-5		115	4	×	0 = 0	
POT3-6		95	2	×	0 = 0	
POT3-7		78	1	×	1 = 1	

結果:バンド陽性(+)は1、バンド陰  
性(-)は0として入力

POT-1 : a+c=6  
POT-2 : b=144  
POT-3 : d=81

表2 POT法コラボ試験 供試株一覧

No	保存株No	由来	分離年
1	2012ST04	鶏肉	平成24年
2	2012ST18	鶏肉	平成24年
3	2012ST46	鶏肉	平成24年
4	2012ST50	鶏肉	平成24年
5	2012ST57	鶏肉	平成24年
6	MR538	ヒト糞便	平成25年
7	MR548	ヒト糞便	平成25年
8	MR552	ヒト糞便	平成25年
9	MR554	ヒト糞便	平成25年
10	MR556	ヒト糞便	平成25年

表3 SE遺伝子保有パターン別 分離検体数、事例数

	SE型	鶏肉検体数	食中毒事例数	有症苦情等事例数
従来型 A～E型を含む パターン	A	2	11	3
	B	0	0	1
	D	0	0	1
	A,B	0	2	0
	A,C	0	0	1
	A,D	0	0	1
	A,H	0	1	1
	B,H	1	0	0
	A,B,H	6	0	0
	A,G,I	0	2	1
	B,G,I	0	0	1
	C,G,I	0	0	1
	D,G,I	0	0	1
	A,C,G,I	1	0	0
小計	10 (25.6%)	16 (88.9%)	12 (66.7%)	
新型 G,H,I型 のみ	G,I	17	2	4
	H	0	0	1
	小計	17 (43.6%)	2 (11.1%)	5 (27.8%)
未保有		12 (30.8%)	0	1 (5.6%)
合計		39	18	18

\* 同一検体・事例から異なる種類・組み合わせのSE遺伝子保有株が分離された場合はそれぞれのSE型の欄に1と重複記載した。

表4 由来別 POT法、MLVA法、PFGE法による型別数

由来	POT法		SE:POT*	MLVA法		PFGE法	
	供試株数	型別数	型別数	供試株数	型別数	供試株数	型別数
鶏肉	94 (32検体)	19	20	77 (32検体)	20	52 (32検体)	24
黄色ブドウ球菌食中毒事例	49 (14事例)	15	16	49 (14事例)	16	37 (14事例)	17
有症苦情事例等	26 (11事例)	18	17	26 (11事例)	20	16(MLVA型11種に該当) (8事例)	10(食中毒事例と同型1つ含む)

\* SE遺伝子保有結果とPOT型別の組み合わせ(POT型が同じでもSE型が異なれば違う型と判定)



表5 SE型:POT型別 該当株が分離された鶏肉検体数、食中毒等事例数

No	SE型	POT			鶏肉	事例数		No	SE型	POT			鶏肉	事例数	
						食中毒	他							食中毒	他
1	G,I	0	0	0	1			28	A	2	59	47		1	
2	A	0	1	0			1	29	A	2	65	33		1	
3	A,B	0	1	0		2		30	D	2	129	0			1
4	G,I	0	1	0	2			31	A,D	2	145	65			1
5	A	0	1	1	1	1		32	A	2	193	33		1	
6	-	0	3	1	1			33	G,I	4	0	0	3	1	
7	B	0	8	80			1	34	G,I	4	8	80	1		
8	G,I	0	9	16	1		1	35	C,G,I	4	10	0			1
9	-	0	9	16			1	36	D,G,I	4	11	32			1
10	B	0	16	48			1	37	G,I	4	16	0	6		
11	A	0	19	65		1		38	G,I	4	18	16	3		
12	G,I	0	25	80	1			39	-	4	24	0	1		
13	B,G,I	0	25	82			1	40	-	4	26	0			1
14	-	0	27	80	2			41	-	4	82	97	1		
15	A	0	51	9		2	1	42	A,G,I	4	137	80		1	
16	A	0	51	73		1		43	-	6	0	64	1		
17	A	0	113	17	1			44	-	6	0	84	1		
18	A	0	115	25		1		45	G,I	6	18	81			1
19	A,B,H	2	1	0	5			46		6	50	1		1	
20	A,H	2	1	0		1		47	A,C	6	132	32	1		
21	A,C	2	1	0			1	48	A	6	152	34			1
22	A	2	1	0		1		49	A	6	170	112		1	
23	B,H	2	1	0	1			50	A	6	186	42			1
24	A,H	2	1	65			1	51	-	93	201	117			2
25	A	2	9	18			1	52	-	106	55	37			1
26	A	2	17	1		1		計					40	18	21
27	-	2	53	32	6										

表6 H27年度 5機関におけるPOT型別試験結果一覧

機関		検体No										コメント
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	関東化学社製のDNA抽出試薬の工程が簡便であった。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	
B	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	すでにキットとして販売されていることもあり、試験の実施には特に問題はないと思う。 非特異的な増幅産物が見られること或いはバンドの濃さ等を考慮した詳細な判定基準があると精度がさらに高まると思われる。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	40	1	80	
C	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	Reaction mixture 1でPCのバンドがPOT1-3とPOT2-5で極めて薄かった。
	POT2	18	25	128*	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	
D	POT1	4	0	7**	0	4	4	2	6	0	106	・陽性コントロールのバンドで非常に薄いバンドがあった。(POT2-5) ・サンプルのバンドで、非常に薄くて、バンドの有無の判断に困るようなものがあった(ノンスペなのか目的バンドなのかはっきりしないバンド)。このようなバンドについて、今回はサイズが比較的小さいバンド以外は極力0と判定した。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	
E	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	・コントロールのPOT2-2、POT2-5のバンドが薄かった。 ・検体No.2 のPOT2-4のバンドが薄かったが1と判定した。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	

\*: POT2-1(係数128) バンド有と判定

\*\* : POT1-7(係数1) バンド有と判定

Reaction1

Reaction2

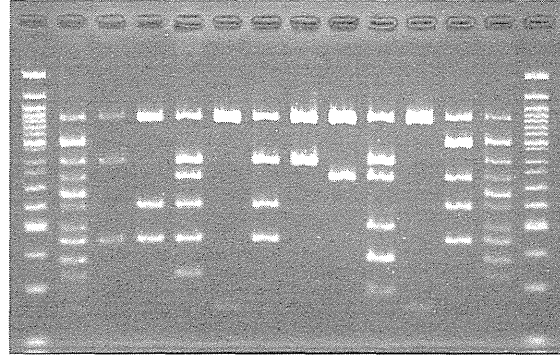
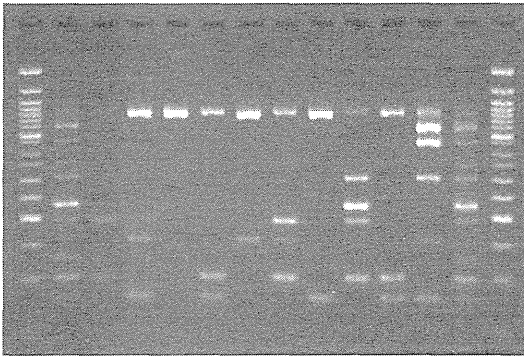


図1 機関 A マーカー, R1, 検体 1~10, R1, マーカー マーカー, R2, 検体 1~10, R2, マーカー

Reaction1

Reaction2

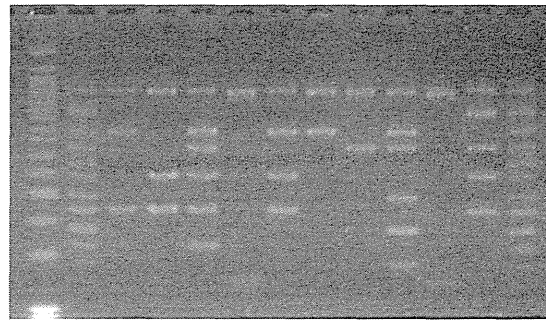
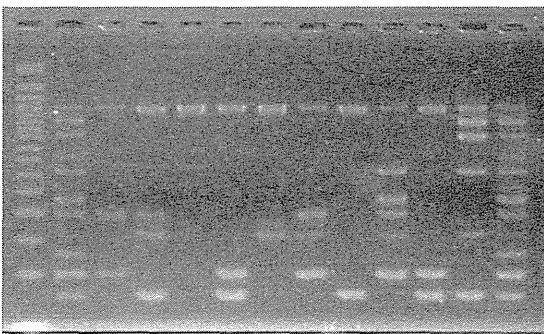


図2 機関 B マーカー, R1, 検体 1~10, R1 マーカー, R2, 検体 1~10, R2

Reaction1

Reaction2

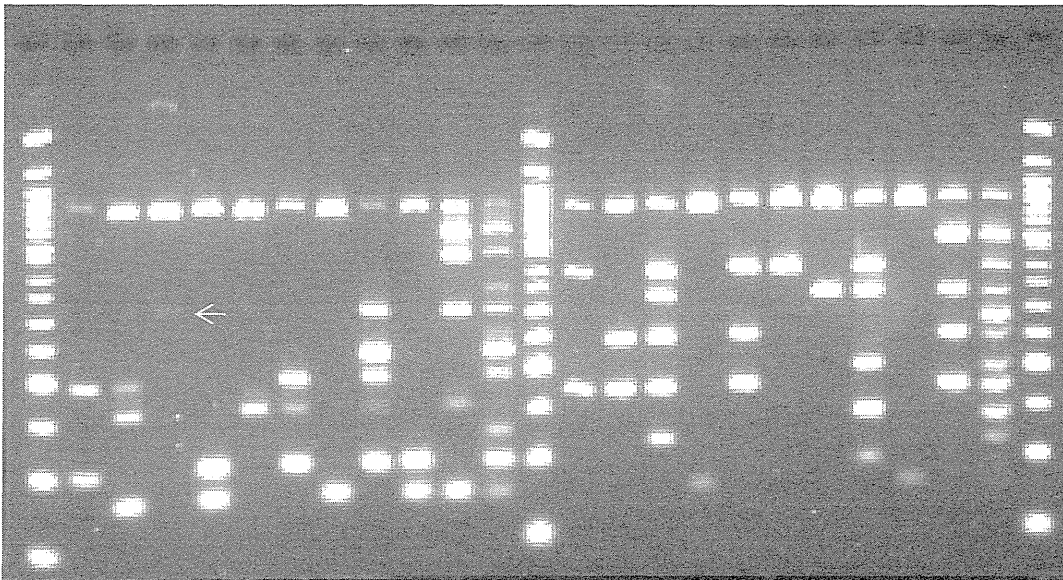


図3 機関 C マーカー, 検体 1~10, R1, マーカー, 検体 1~10, R2, マーカー

Reaction1

Reaction2

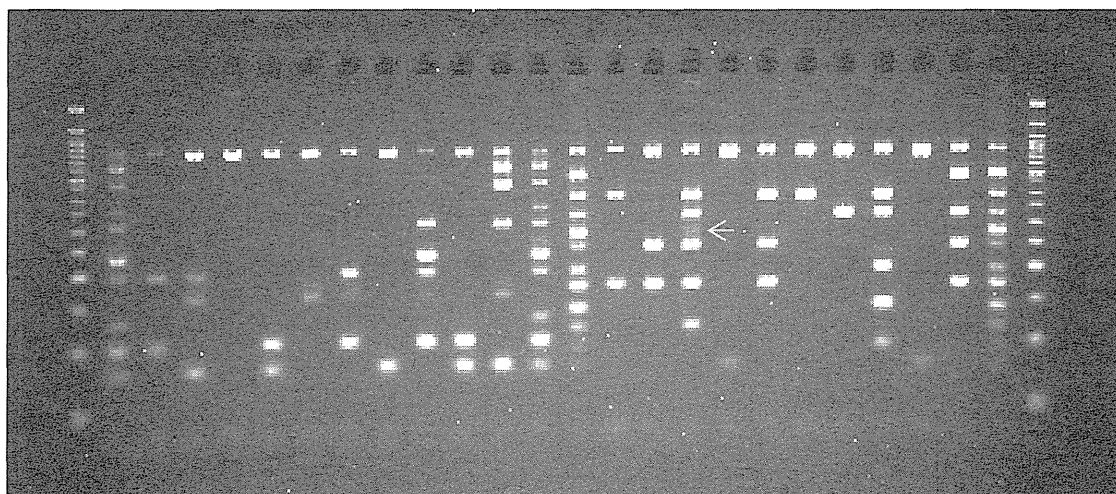


図4 機関D マーカー, R1, 検体 1~10, R1, R2, 検体 1~10, R2, マーカー

Reaction1

Reaction2

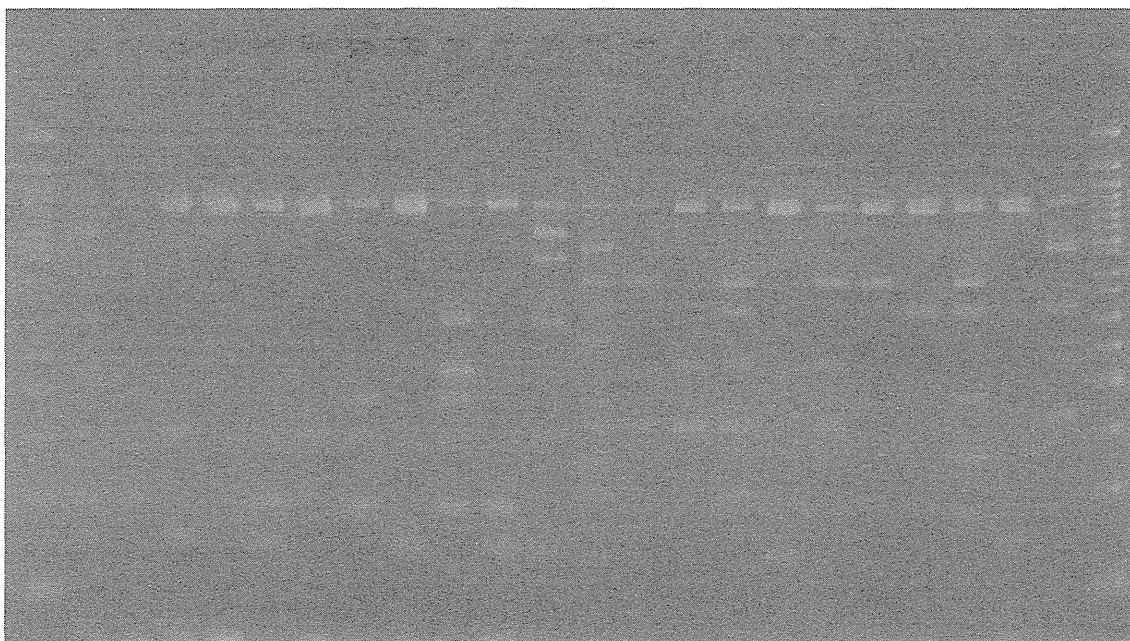


図5 機関E マーカー, R1, 検体 1~10, R2, 検体 1~10, マーカー

マーカー : 50bp DNA Ladder

R1 : Reaction Mixture1 の陽性コントロール

R2 : Reaction Mixture2 の陽性コントロール