

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のインナ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²⁹⁾やMikiら³⁰⁾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。

平成 20 年から 26 年までに全国で発生したウェルシュ菌食中毒の原因食品としては、野菜の煮物、カレー、シチュー、八宝菜、ローストビーフなどが報告されている。これらの食中毒発生事例では、通常、原材料が保存されていることは稀で、実際どの原材料が汚染源であったかを調査することは非常に困難である。ところが、平成 25 年に大阪府の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では、疫学調査から「ざるそば」が原因食品と疑われ、調理済み残品の乾ししいたけから、従来のエンテロトキシン CPE を産生するウェルシュ菌が分離された。また調理人の聞き取り調査から、「そばつゆ」を提供前夜に調理し、鍋に蓋をして常温で保存していたことが判明した。しかし、ざるそばおよびそばつゆの残品はなく、そばつゆに浸されていた「調理済みの乾ししいたけ」と「調理済みの昆布」が佃煮に調理するため冷凍保存されていた。そばつゆの材料は乾ししいたけ・昆布・花かつお・醤油・みりん・酒であった。調理済みの乾ししいたけと昆布、保管されていた乾物の乾ししいたけ・昆布・花かつおを調べたところ、

「調理済みの乾ししいたけ」から CPE 産生性のウェルシュ菌が、原材料の「乾ししいたけ」から CPE 非産生性のウェルシュ菌が検出された。その他の食品からはウェルシュ菌は検出されなかった。これらことから、乾ししいたけが汚染源であることが強く疑われた。

乾ししいたけには、原木栽培と菌床栽培があるが、今回の調査でウェルシュ菌芽胞が検出された検体はすべて原木栽培であった。菌床栽培は殺菌処理したおがくずが使用されており、土壌に直接接触する原木栽培より、ウェルシュ菌に汚染される機会は少ないと考えられた。

同じく乾燥食品である香辛料も、芽胞菌の汚染率が高いことが報告されている^{31, 32)}。今回、黒コショウ、白コショウをターゲットにした汚染調査でも予想どおり、ウェルシュ菌の汚染率は高かった。また、1999 年の福岡市で発生した食中毒事例でも、市販かつおだしが汚染源であったことが報告されている³³⁾。

このように、今までは汚染率の高さから食肉が汚染源として疑われることが多かったが、今回の調査から乾燥食品も汚染源として十分注意しなければならないことが明らかとなった。乾燥食品の製造時に行う乾燥行程で、多くの細菌の栄養体は死滅するが、芽胞は残存すると考えられる。乾ししいたけなどの乾物は古くから和食や中華料理の食材として広く使

用されている。

以上より、ウェルシュ菌は、乾しいたけなどの乾燥食品や牛・ヒト糞便中で芽胞として長期間残存し、食中毒原因食品の汚染源となる可能性が示唆された。食中毒予防のために、これらの食材がウェルシュ菌芽胞によって汚染されている可能性を調理従事者に説明し、急速冷蔵や再加熱の徹底を心がけることが大切である。

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 株については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、BECab 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）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。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。

ウェルシュ菌食中毒の原因食品の汚染源として、乾しいたけ、市販コショウを調査した結果、乾しいたけの 19.2% から、市販コショウの 26.6% からウェルシュ菌が検出され、CPE 産生菌も低率で分離された。今回使用した増菌培養液の PCR 法は、検出感度が高くスクリーニング法として有用であると考えられた。従来、汚染率の高さから食肉が原因食品の汚染源として疑われることが多かったが、今回の調査の結果、和食や中華料理の食材として広く使用されている乾物もウェルシュ菌芽胞の汚染源として十分注意しなければならないことが明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 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)

G. 参考文献

- 1) http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/zikyu_ritu/011.html
- 2) 温泉川肇彦. 輸入食品の安全確保と食品安全の国際的な流れ. 保健医療科学 2013. Vol.62. No.5. 502-513.
- 3) www.keiran-niku.co.jp/k25.pdf. 98年3月解説. 食品の微生物規格の設定及び適用の原則. 厚生省生活衛生局乳肉衛生課. 豊福 肇.
- 4) www.nyusankin.or.jp/scientific/pdf/Nyusankin_475_a.pdf. 微生物規格基準設定の国際動向. 国立保健医療科学員 豊福 肇.
- 5) A simplified guide to understanding and using food safety objectives and performance objectives. ICMSF. 2006.
- 6) Susanne Dahms et.al., Microbiological sampling plans -Statistical aspects. Mitt. Lebensm. Hyg. 95 (2004)
- 7) COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.
- 8) SCIENTIFIC REPORT OF EFSA. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 2009; 7(11):1366.
- 9) SCIENTIFIC OPINION. Scientific Opinion on the risk posed by Shiga

- toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). EFSA Journal 2011;9(11):2424. P52.
- 10) SCIENTIFIC REPORT OF EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011
Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. EFSA Journal 2013;11(6):3241.
- 11) Corrigendum to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union 10.10.2006.
- 12) COMMISSION REGULATION (EU) No 209/2013 of 11 March 2013 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for sprouts and the sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat. Official Journal of the European Union. 12.3.2013.
- 13) Bacteriological Analytical Manual Online January 2001.
- 14) BAM Food Sampling/Preparation of Sample Homogenate. April 2003.
- 15) www.fda.gov/ICECI/Inspections/IOM/ucm127457.htm. Sample Schedule 1: *SALMONELLA* SAMPLING PLAN.
- 16) September 2012. FSIS *Salmonella* Compliance Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products.
- 17) FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. January 2014.
- 18) Compliance Guideline for Establishments Sampling, Beef Trimmings for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Organisms or Virulence Markers, May 2012
- 19) Detection and Isolation of non-0157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. 10/01/2013.
- 20) FSIS DIRECTIVE 10,010.1 Rev. 3 Verification Activities for

- Escherichia coli* O157:H7 in Raw Beef Products.
- 21) 微生物・ウイルス評価書 食品中のリステリア・モノサイトゲネス(案) 平成25年1月17日 第38回微生物・ウイルス専門調査会. 食品安全委員会.
- 22) The 17th EURL-Salmonella workshop. 14, 15, May 2102. Chalkida, Greece. Technical issues workshop 2011 110519. p.17-18. Pooling of samples.
- 23) Newsletter. European Union Reference Laboratory For *Salmonella* Vol. 18 No. 1 April, 2012
- 24) EURL-Salmonella work-programme 2013.08-10-2012.
- 25) W. R Price, R. A. Olsen, and J. E. Hunter, Salmonella Testing of Pooled Pre-Enrichment Broth Cultures for Screening Multiple Food Samples, Applied Microbiology, 23, 679-682 (1972)
- 26) Kirsten Mooijman, ISO and CEN activities for Salmonella, Technical issues workshop 2011 110519
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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>.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) Meer, R.R., Songer, J.G., 1997.
Multiplex polymerase chain
reaction assay for genotyping
Clostridium perfringens. Am J Vet
Res. 58 (7), 702-5.
- 33) Hara-Kudo Y1, Ohtsuka LK, Onoue
Y, Otomo Y, Furukawa I, Yamaji A,
Segawa Y, Takatori K. *Salmonella*
prevalence and total microbial
and spore populations in spices
imported to Japan. J Food Prot.
2006. 69(10):2519-23.
- 34) Sagoo SK1, Little CL, Greenwood
M, Mithani V, Grant KA,
McLauchlin J, de Pinna E,
Threlfall EJ. Assessment of the
microbiological safety of dried
spices and herbs from production
and retail premises in the United
Kingdom. Food Microbiol. 2009
Feb;26(1):39-43.
- 35) 楠本 亮, 財津修一, 池田嘉石北隆
一. 市販かつおだし等のウェルシュ
菌汚染状況について. 福岡市保環研
報. 24. 95-98 (1999)

表1 日本の微生物規格基準の例

標的病原菌	食品分類	サンプリングプラン		指標値		試験法	
		n	c	m	M		
サルモネラ	食肉製品						平成5年3月17日 衛乳第54号
	・非加熱	1	0	0/25 g			
	・特定加熱	1	0	0/25 g			
	・加熱殺菌後包装	1	0	0/25 g			
	食鳥卵						
	・殺菌液卵	1	0	0/25 g		平成10年11月25日 日生衛発第1674号	
リステリア・モノサイ トゲネス	規格基準はない→以下の食品でのみ検出 されれば6条違反となる						平成5年8月2日衛 乳第169号
	(・ソフト及びセミソフトタイプのナチュラルチ ーズ)	1	0	0/25 g			
	(・生ハム等 RTE 食肉製品)	1	0	0/25 g			
STEC	規格基準はない→RTE 食品で検出されれ ば6条違反となる						平成23年9月26日 食安発0926第1号
(Enterobacteriaceae)	(・生食用食肉の加工基準)	25	0	0/25 g			
	(・生食用食肉の成分規格)	1	0	0/25 g			

表2 EUの微生物規格基準の例

標的病原菌	食品分類	サンプリングプラン		指標値		適用段階	試験法
		n	c	m	M		
サルモネラ	RTE * 食鳥肉	5	0	0/25 g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 6579
	加熱用食鳥肉	5	0	0/25 g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 6579
	乳製品	5	0	0/25 g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 6579
	RTE 果物・野菜	5	0	0/25 g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 6579
	乳児用調整粉乳及び特別医療目的のベビーフード	30	0	0/25 g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 6579
リステリア・モノサイトゲネス	乳幼児及び特別医療目的の RTE 食品	10	0	0/25 g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 11290-1
	乳幼児及び特別医療目的以外の RTE 食品						
	・リステリアが増殖不可能な RTE 食品	5	0	100 cfu/g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 11290-2
	・リステリアが増殖可能な RTE 食品	5	0	100 cfu/g		店頭販売時(消費期限内)	EN/ISO 11290-2
		5	0	0/25 g		製造業者の管理から離れる時	EN/ISO 11290-1
STEC	スプラウト(RTE)	5	0	0/25 g		店頭販売時(消費期限内)	CEN/ISO TS 13136
	* ready-to-eat (RTE, 調理済み食品)						

表3 アメリカの微生物規格基準・ガイドラインの例

	食品分類	サンプリングプラン		指標値		試験法
		n	c	m	M	
サルモネラ(FDA 規格)	カテゴリーⅠ					BAM
	・サンプリングと消費の間に殺菌工程がなく、乳幼児や老人等リスクが高い人対象食品	60	0	0/25 g		
	カテゴリーⅡ					
	・サンプリングと消費の間に殺菌工程がない食品	30	0	0/25 g		
	カテゴリーⅢ					
	・サンプリングと消費の間に殺菌工程がある食品	15	0	0/25 g		
リステリア・モノサイトゲネス(FSIS*ガイドライン)	リスクがシリアスな人対象食品					Laboratory Guidebook for FSIS
	・pH や Aw により菌数が減少する食品	5	0	0/25 g		
	・pH や Aw により菌数が<1 log 以下しか増加しない食品	10	0	0/25 g		
	・冷蔵中も菌数が増加する食品	20	0	0/25 g		
	リスクがシビアな人対象食品(病院や介護施設、学校などの給食)					
	・pH や Aw により菌数が減少する食品	15	0	0/25 g		
	・pH や Aw により菌数が<1 log 以下しか増加しない食品	30	0	0/25 g		
・冷蔵中も菌数が増加する食品	60	0	0/25 g			
STEC(FSIS ガイドライン)	ビーフ・トリム	60	0	0/6.25 g		

*United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science

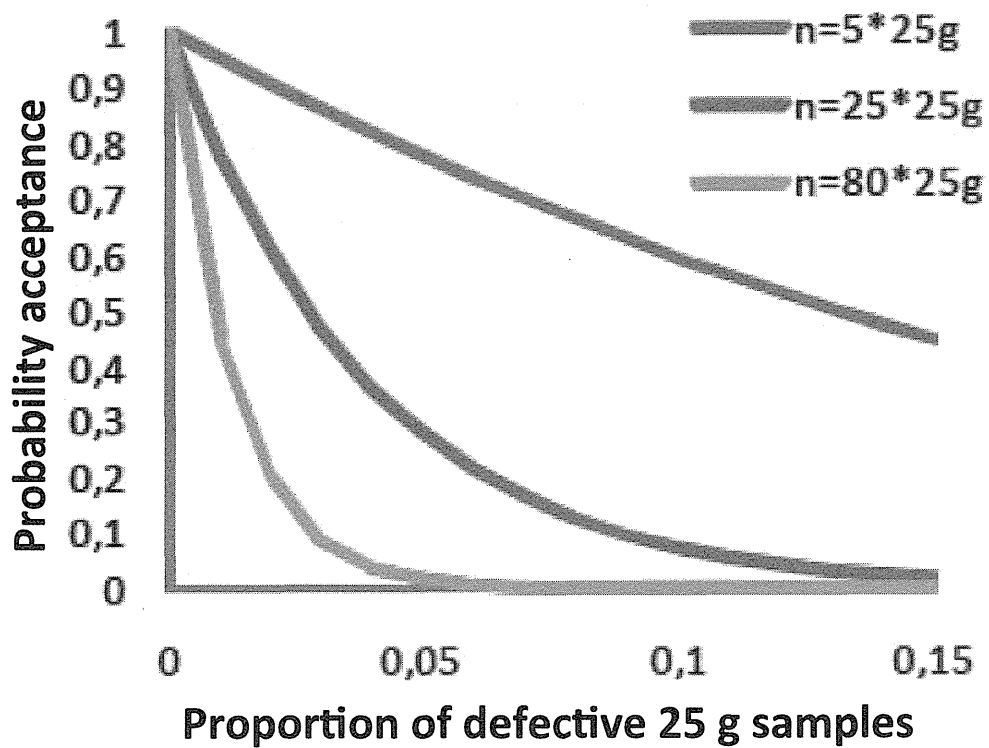
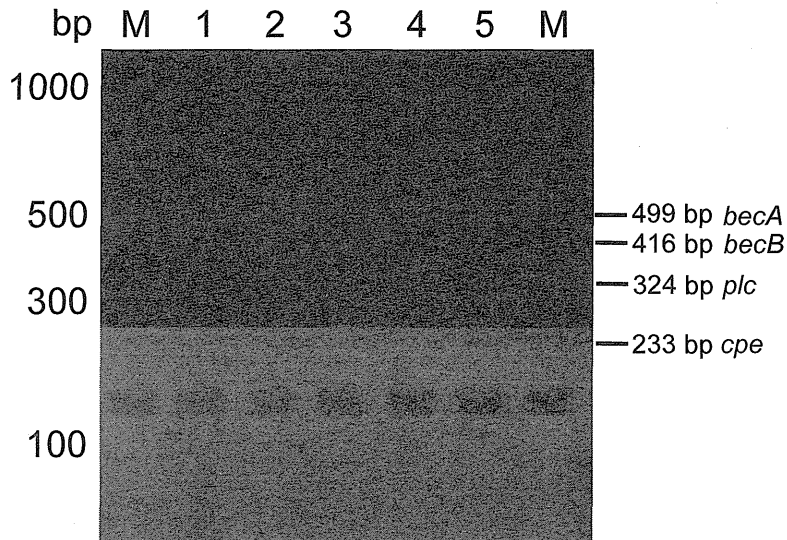


図1 病原菌汚染レベル (25g 中の比率で表示) と欠陥 (陽性) ロットの合格率の関係性 (サンプル数が 5, 25, 80 の時)

表4 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	gctaatgttactgccgttga	324	Erol et al., 2008 ⁵⁾
	CPA R	cctctgatacatcgtgtaag		

図2 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 3 (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

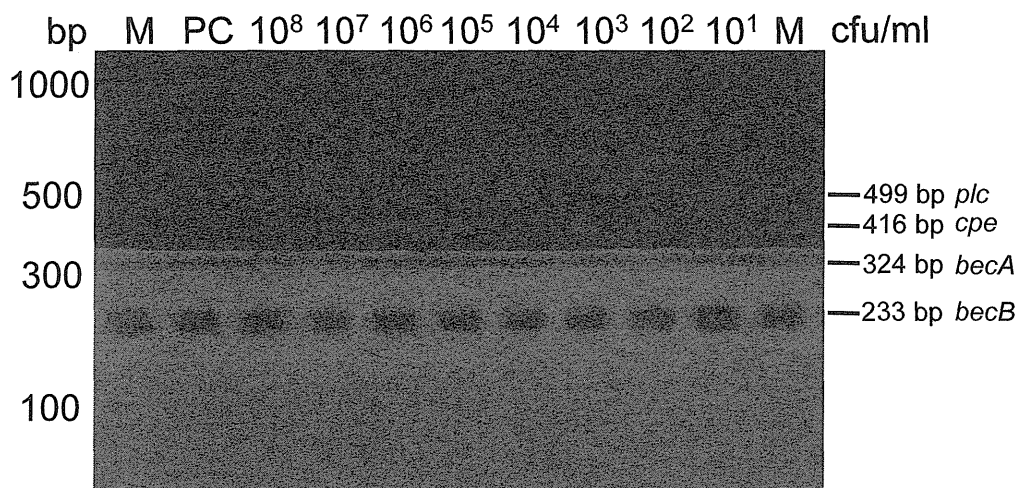
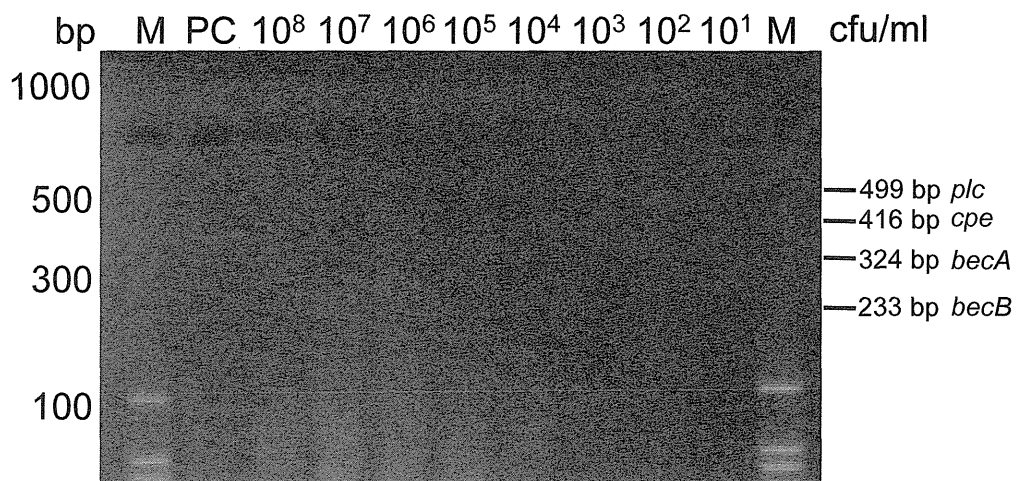
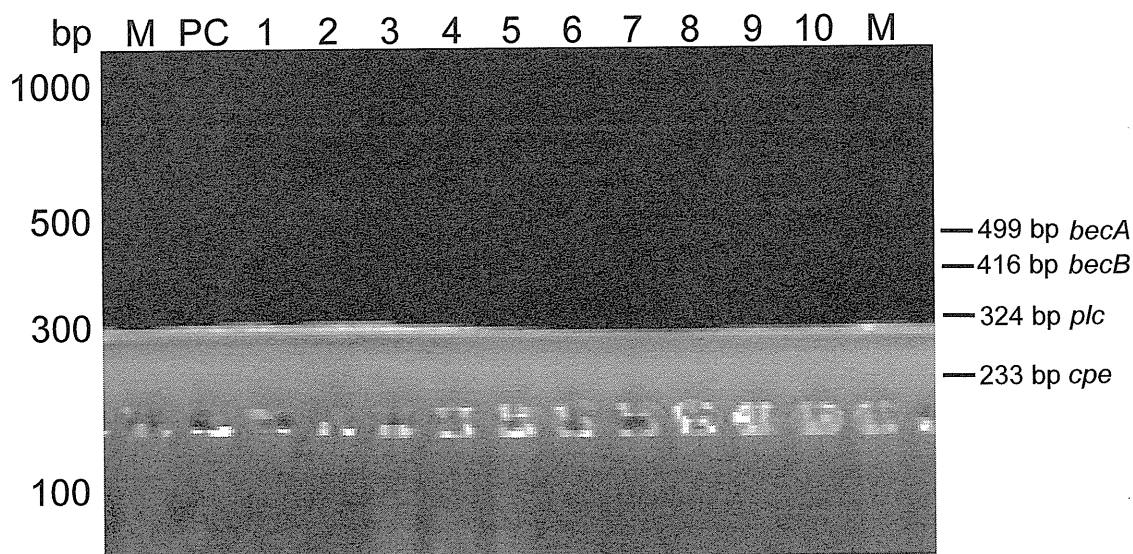


図 3 (B) *C. perfringens* OS1 (*BECab* 遺伝子陽性) を用いた場合のマルチプレックス PCR 法の感度



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.

図4 マルチプレックスPCR法の特異性の検討結果



M, molecular weight marker; Lane 1, multiplex PCR; Lane 2, *C. perfringens* OS1; *C. perfringens* NCTC8239; Lane 4, *P. aeruginosa* ATCC9027; Lane 5, *P. aeruginosa* ATCC10145; Lane 6, *P. aeruginosa* ATCC27853; Lane 7, *P. aeruginosa* IAM1514; Lane 8, *C. difficile* JCM1296; Lane 9, *C. septicum* JCM8146; Lane 10, *C. spiroforme* JCM1432; Lane 11, *C. sporogenes* JCM1416.

表5. 乾燥食品のウェルシュ菌汚染実態調査結果

食品名	検体数	DNA テンプレートの由来	ターゲット遺伝子		
			<i>plc</i>	<i>cpe</i>	<i>becAB</i>
乾しいたけ	26	増菌液	5	1	0
		分離菌	5	1	0
コショウ	12	増菌液	3	1	0
		分離菌	3	0*	0

*釣菌した100コロニーはすべて *cpe* 遺伝子陰性であった

表6. ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌保菌調査

検体	分離菌株数/検体数	陽性菌株数 (Multiplex PCRの結果)		
		<i>plc</i>	<i>cpe</i>	<i>becAB</i>
ヒト糞便	129 / 437	129	10	1
ウシ直腸スワブ	40 / 90	40	0	0*

*増菌培養液のスクリーニング PCR を行った 50 検体のうち 1 検体で *BECab* 遺伝子を確認した。この検体から 100 株分離したが、毒素産生株は検出できなかった。

研究成果の刊行に関する一覧表

特になし

