

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 26 年度 総括・分担研究報告書

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 27（2015）年 3 月

目次

総括研究報告書

- 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 （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

- 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 （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・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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としての酵素基質培地の有用性・・・・・・・・・・・・・・・・・・
堀川 和美 （福岡県保健環境研究所 保健科学部）

- 食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について・・・・・・・・・・
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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・・・・・・・・・・
小西 良子 （麻布大学 生命・環境科学部）

- 遺伝子検出法と培養法を用いたエンテロトキシン産生性
非産生性ウエルシュ菌の食品汚染実態調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
久米田裕子 （大阪府立公衆衛生研究所 感染症部）

平成 26 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

総括研究報告書

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。本研究では日常業務で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いる。また、また輸入食品等の安全性を確保するために、わが国の実情に則したサンプリング手法を検討する。今年度は以下の項目を検討した。

- 26 のウェルシュ菌遺伝子を対象とした PCR を行い、ウェルシュ菌のタイピングに有効であることを確認した。
- 乾物を対象としたウェルシュ菌芽胞の汚染実態調査を行ったところ、乾物はウェルシュ菌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。
- ウェルシュ菌の分離を容易にするために酵素基質培地である CHROMagar™ C. perfringens 試作品の培地性能について検討したところ、本培地の選択性、発育支持能、鑑別能は、ECW+培地と比べて遜色ないものであった。
- *Salmonella* I 4:i:-に対して *fliAB*、*fljB*、*hin* 遺伝子を対象としたスクリーニングが有効であることを明らかにした。
- *Campylobacter jejuni* の PFGE 法に代わるタイピング法として comparative genomic fingerprinting 40 を検討し、最適条件を決定した。
- 食中毒由来黄色ブドウ球菌を用いて POT 法や MLVA 法の有効性を確認したところ PFGE に匹敵する解析力を有し、有用な型別法と考えられた。
- 食品の輸出入時において安全な食品を確保するためのサンプリング時において、サンプリング数が少ない場合、プレエンリッチメント法とプール法が有効であることを示した。

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
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

西田 雅博	福岡県保健環境研究所
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
村上 光一	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
岡元 冬樹	福岡県保健環境研究所
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
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
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 拓子	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
岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
小黑 祐子	福島県衛生研究所
石崎 直人	麻布大学

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手法の多くは検査に多くの時間を要し、日常的なサーベイランスに用いるには検査機関の負担が大きくなる。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指し、研究を進めている。本年度は以下の課題について研究を行った。

- ウェルシュ菌のタイピングを容易にするために26のウェルシュ菌遺伝子を対象としたPCR法について検討した。また近年、従来のエンテロトキシンとは異なる新規のエンテロトキシンを産生するウェルシュ菌株が見いだされている。そこで、ウェルシュ菌の汚染源として注目されている乾物や牛糞便からウェルシュ菌の分離を行い、毒素産生性について調査した。さらにウェルシュ菌の分離には、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、卵黄反応が不明瞭であることに起因して鑑別に苦慮することがある。そこで、新しい鑑別培地の性能を検討した。

- 近年欧米で報告の相次いでいる *Salmonella* I 4:i:- について、昨年度改良を施したスクリーニング用 PCR に加えて MLST による検討を行った。
- 昨年度行った鶏肉汚染実態調査で分離された黄色ブドウ球菌について POT 法、MLVA 法が有用であることが明らかになったため、今年度は実際の食中毒事例における応用の可能性を検討するため、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黄色ブドウ球菌について同様に検討した。
- *Campylobacter jejuni* のタイピングには PFGE 法に代わる手法として、PCR 法を用いる型別法：comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) の国内への導入を目的として、CGF40 の操作法の検討ならびに評価を昨年引き続き行った。

また本研究においては、我が国の実情に即した輸入品等の病原微生物検査に適したサンプリングプランを提唱し、その妥当性を検討する。昨年度は諸外国におけるサンプリングプランの情報収集および蛍光ラテックスビーズを用いたモデルを作成し、現在、我が国で行われている $n=1$ のサンプリングプランでは、低濃度汚染の病原微生物

の検出は困難であることを示した。しかし、 n 数が多い場合には多大な時間、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リング法として、サンプル・プーリング法が使われる場合があり、現在、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。そこで今年度は、2 種類のサンプル・プーリング法（プール法、プレエンリッチメント法）を応用し、食中毒菌であるサルモネラを対象として食品から検出することが可能か検討をした。

B. 研究方法

1. ウェルシュ菌に関する研究

昨年度、鶏から分離したウェルシュ菌株および食中毒事例から分離された 25 株から DNA を抽出し、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 を行った。その結果から、ウェルシュ菌のタイピングに応用できるか検討を行った。

また、乾物および牛直腸におけるウェルシュ菌の汚染実態を調査するために、液体チオグリコレート培地およびナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地を用いてウェルシュ菌株を分離し、PCR によって *cpe* 遺伝子と *becA* および *becB* 遺伝子の保有を確認した。

ウェルシュ菌の分離を容易にするために、分離培地の選択性、発育支持能、鑑別能等の培地性能を、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) と従来の卵黄反応を釣菌指標とす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) とで比較、検討した。

2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

S. Typhimurium 様の単相菌スクリーニング PCR について昨年改良を施した PCR 法を使い、*fliAB* intergenic region および *fljB* 遺伝子について試験した。PCR による *hin* 遺伝子の試験を行い、必要に応じて塩基配列の決定を行った。また、PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012) に記載の multilocus sequence typing (MLST) を用いた MLST 解析および J. Microbiol. Methods 59(2): 163-172 (2004) に記載された multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) も合わせて検討した。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

CGF40 に用いる PCR 法の条件を設定するために CGF40 の解析結果が既知の標準株 NCTC11168 (ATCC 700819) および RM 1221 (ATCC BAA-1062) を用いて検討を行うとともに、PFGE を合わせて行い比較した。新しく設定した PCR 条件を用いて市販鶏肉からの分離した株 *C. jejuni* 74 菌株および *C. coli* 8 菌株の解析を行った。

4. ブドウ球菌の遺伝子型別

平成 25 年度に供試した 2 事例由来 5 株を

含めて、食中毒 14 事例由来 49 株、有症苦情等 11 事例由来 26 株、計 75 株の黄色ブドウ球菌についてブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の保有状況を PCR 法により調査するとともに、POT 法、MLVA 法による遺伝子型別を実施した。また、これらの株から選択した 53 株を PFGE 法による遺伝子型別に供試した。さらに平成 25 年度に実施した市販鶏肉由来黄色ブドウ球菌の遺伝子型別結果と比較検討した。

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

モデル食品としてネギトロ、食中毒菌として *Salmonella* Infantis1383-1 (鶏肉由来)、夾雑菌として *Escherichia coli* および *Citrobacter braakii* を使用し プール法およびプレエンリッチメント法を用いることによって低濃度の食中毒菌を検出できるかどうかを検討した。

C. 結果

1. ウエルシュ菌に関する研究

26 のウエ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エルシュ菌をタイピングできるか検討を行ったところ、26 の遺伝子を対象とした PCR を行うことによって、日常のサーベイランスに必要な解像度をもつタイピングを行える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、

結果の比較が容易であることが明らかになった。

乾ししいたけ 26 検体、市販コショウ 15 検体、牛直腸スワブ 40 検体について、ウェルシュ菌芽胞の汚染実態調査を実施した。乾ししいたけでは 5 検体 (19.2%) からウェルシュ菌が分離され、そのうち、1 検体 (3.8 %) から CPE(*Clostridium perfringens* Enterotoxin)産生菌が分離された。市販コショウでは、4 検体 (26.6%) 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。牛直腸スワブでは 23 検体 (57.5%) と高率にウェルシュ菌が検出されたが、CPE 産生菌および BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*)産生菌はともに分離されなかった。

CCP 培地の性能を検討したところ、ウェルシュ菌標準菌株 2 株及び野生株 40 株を用いた発育菌数の比較では、いずれの株も CCP 培地の発育菌数が ECW+培地より多かった。また、発育集落の色調による鑑別能については、今回用いたクロストリジウム属標準菌株 5 種 6 株では、ウェルシュ菌のみが青緑色を呈し、ウェルシュ菌の釣菌において鑑別が容易であった。また、カナマイシン感受性株の分離にも適していることが明らかになった。

2. サルモネラの疫学解析マーカーの検出

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) を供試し、

試験を行った。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。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

昨年度の検討結果から、PCR 法に用いる taq polymerase により PCR の結果が異なることが明らかとなっていた。そこで、今年度は CGF40 による型別結果が既知の標準株 NCTC11168 および RM 1221 を用い、CGF40 に適した PCR 条件の検討を行い、良好な結果を得ることのできる条件を決定することが出来た。鶏肉由来株 (*C. jejuni* 74 菌株 および *C. coli* 8 菌株) を用いた CGF40 と PFGE 法による型別の比較では、CGF40 では *C. jejuni* 74 株は 49 パターン、*C. coli* 8 株は 5 パターンに分けられたが、PFGE 法では *C. jejuni* は 59 パターン、*C. coli* は 6 パターンに分けられた。さらに、CGF40 のパターンが一致する菌株間で異なる PFGE パターンである場合や、PFGE のパター

ンが一致する菌株間で異なる CGF40 のパターンを示す場合も認められ、互いの手法で異なる結果が得られるなど、CGF40 は PFGE 法とほぼ同等の識別能を有していることが示された。

4. 食中毒由来等黄色ブドウ球菌の遺伝子型別

食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌について 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）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、食中毒事例等 25 事例由来 75 株は POT 法で 31 種類、SE 型と POT 型の組み合わせで 35 種類、MLVA 法で 36 種類に型別された。さらに、POT 法と MLVA 法の型別の評価のため、POT 型 24 種（SE:POT 型 27 種）、MLVA 法 27 種に型別された 53 株について PFGE 型別を実施したところ、26 種類に型別された。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、逆に異なる POT 型、MLVA 型が同一の PFGE パターンとなる例もみられたが、POT 法と MLVA 法による型別は PFGE 法による型別とほぼ同程度の解析力を有していることが確認された。

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

サンプル・プーリング法（プール法、プレエンリッチメント法）を応用し、食中毒

菌であるサルモネラを対象として食品から検出することが可能か検討をした。その結果、プール法とプレエンリッチメント法、何れのサンプリング法を用いても、調理済み食品(ready-to-eat、RTE)であるネギトロでは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ることが確認された。

D. 考察

1. ウェルシュ菌に関する研究

ウェルシュ菌の 26 の遺伝子を対象とした PCR の結果によってタイピングを行う今回の手法は、十分な解像度を有するにもかかわらず、一般的な手技として普及している PCR を行うだけ済む。そのため新しい技術を新たに習得する必要もほとんどなく、また必要な機器もサーマルサイクラーだけなので、非常に安価に実験を行うことが出来る。さらに結果を得るのに 1 日もあれば十分でかつ結果をデジタルデータとして表すことが出来るため、結果を得るのに時間がかかり、また他機関同士あるいは過去のデータとの比較が難しいという PFGE 法の欠点を克服することが出来る。よって、今回の方法が日常のスクリーニング業務に非常に有用な方法であることが明らかになった。今後さらに検体数を増やし検討を行うとともに、さらに省力化を図られるように改良を行っていく予定である。

乾物、牛腸スワブにおけるウェルシュ菌の汚染実態調査を行ったが、従来、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、今回の調査の結果、和食や中華料理の食材として広く使用され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。

酵素基質培地である CCP 培地の性能について、従来より使用されている ECW+培地と比較、検討したところ、本培地の選択性、発育支持能、鑑別能は、ECW+培地と比べて遜色ないものであることが明らかになった。

2. サルモネラの疫学解析マーカーの検索

fliAB による *S. I 4:i:-* の PCR の結果から、供試菌株は Typhimurium 由来であることが示唆され、本結果は MLST の結果によっても支持された。*fljB*, *hin* 遺伝子による PCR タイピングは MLST の結果と相関し、また、PFGE および MLVA の結果ともある程度の相関性が観察された。

3. *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法の評価

C. jejuni の型別法として導入することを目的に、CGF40 の操作法の検討と評価を行った。使用する Taq ポリメラーゼの種類、PCR 反応の温度および時間の設定条件を既報の条件から変更することで良好な結果が得られた。しかし依然、マルチプレックス PCR では得られにくいバンドがあるため、さらに PCR 条件を検討する必要がある。CGF40 による型別を PFGE 法による型別と比

較したところ、ほぼ同等の識別能が得られた。

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示唆されている。n 数が多くなると費用や労力がかかる。そこで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。今後さらにプー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。

E. 結論

昨年度は自治体で行うことのできる食品中の食中毒菌サーベイランスに活用できるタイピング手法確立のための情報収集、基本的実験条件の検討を行った。今年度は、昨年度行った基礎研究をさらに発展させ、これらタイピング手法の信頼性を向上させ

るための検討を行った。来年度はさらに検体数を増やし、また他機関との共同研究を行い、最終的な試験方法の確立を目指す。

食中毒微生物検査のサンプリングプランに関しては、本年度の結果から、n数が少ない場合におけるプレエンリッチメント法とプール法の有用性を確認することが出来た。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予定である。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

平成 26 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

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 堀川 和美（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）

ウエルシュ菌のタイピング手法には PFGE 法が広く用いられているが、結果を得られるまでの時間がかかり、機関同士で結果の比較が困難であるなどの欠点がある。また、それ以外の方法も手法が複雑で日常のスクリーニング業務での使用は実用的でない。そのため簡便でかつ信頼性の高いタイピング法が求められてきた。そこで、既に報告されているウエルシュ菌の 26 のウエルシュ菌遺伝子を標的とした PCR 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。25 株を用いて試験を行った結果、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、結果の比較が容易であることが明らかになった。これらのことから今回の方法は効果的なウエルシュ菌のタイピング法として使用できることが明らかになった。

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はエンテロトキシンによって引き起こされと考えられている。このウエルシュ菌に対するタイピング手法としては Puls field gel electrophoresis (PFGE)、amplified

fragment length polymorphism、Repetitive-Element PCR などが考案されている。しかし、この中で最も汎用されている PFGE 法は結果を得るのに 2, 3 日必要とし、また検査技術を習得するのに非常に時間を使用する。他の方法も手法が非常に複雑であり、簡便性に劣る。またこれらの方法はいずれも結果が DNA バンドの電気泳動像として得られ、DNA バンドのパターンに

よって株のグループ分けを行う。そのため、泳動条件の少しの違いによって、DNA バンドの泳動距離に変化が生じ、結果の判定が難しくなったり、同じ株でも別の株と判定されてしまう可能性もある。このようなことから同じ研究室で行った試験でも過去のデータと比較したり、他機関同士で結果を比較するのが非常に困難である。これまでの試験法はこのようにタイピングで最も重要な他株との比較という点において大きな問題を抱えていた。そこで本研究では、簡便でかつ結果の判定・比較が容易なウェルシュ菌のタイピング手法の構築を目指す。

近年、エンテロトキシン遺伝子を保有しないウェルシュ菌による食中毒事例が報告されており、新型のエンテロトキシンの関与が示唆されている¹。そのため、エンテロトキシン非産生株の食中毒への関与についても検討し直す必要があると思われる。また、エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌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けられる²。プラスミド上にエンテロトキシン遺伝子を持つものはエンテロトキシン遺伝子の下流に IS1470-like 配列を持つ株と IS1151 配列を持つ 2 株がある²。これら 3 つの株は代謝など多くの性状で違いが見られ、適応している環境が異なるのではないかとの指摘もある。これまでの報告では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。そこで本研究では、3 種類のエンテロトキシン遺伝子（染色体性 1 種類、プラスミド性 2 種類）、新型エンテロトキシン遺伝子、病原遺伝子およびハウスキーピング遺伝子を標的にした PCR を行い、それらの結果を総合し、ウェルシュ菌のタイピングに使用できるか検討する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

研究に使用した菌株は福岡県保健環境研究所、秋田県健康環境センター、さいたま市健康科学研究センターで鶏肉より分離した 18 株、食中毒由来 7 株を用いた(表 1)。食中毒由来株はすべてエンテロトキシン遺伝子を保有していた。

2. DNA 試料調整

各株のグリセロールストックを液体チオグリコレート培地に接種し、37℃、一晚培養した。菌液 200 μ l を 1 ml の滅菌蒸留水に加え、攪拌後、12,000 rpm、1 分間の遠心処理を行った。上精を取り除いた後、InstaGeneDNA 精製マトリクス (Bio-rad) を 200 μ l 加え、56℃で 20 分間、加熱した。10 秒間の攪拌処理を行い、100℃で 8 分間加熱した。さらに 10 秒間の攪拌処理を行い、

10,000 rpm、3 分間の遠心処理を行った。
上精を回収し、これを DNA 溶液とした。

3. ウェルシュ菌遺伝子を標的にした PCR

今回PCRの標的にした遺伝子を表2に示す。

3 種類のエンテロトキシン遺伝子（染色体性 1 種類、プラスミド性 2 種類）、新型エンテロトキシン遺伝子（*becB*）、21 種の病原遺伝子およびハウスキーピング遺伝子、計 25 の遺伝子に関して試験を行った。エンテロトキシン遺伝子に対する PCR は、染色体上にある *cpe*、プラスミド上に存在し下流に IS1470-like 配列を持つ *cpe* および下流に IS1151 配列を持つ *cpe* の 3 種類の *cpe* を標的とし、Miyamoto らの方法によって行った²。新型エンテロトキシンを標的とした PCR は Yonogi らの方法で行った¹。ウェルシュ菌の 21 種類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 は Deguchi らの方法に従って行った³。PCR 反応後、PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、SYBR-Safe (Life Technologies) で染色し、増幅バンドの有無を確認した。株間で共通して PCR 陽性であった遺伝子を整理し、2 株間の遺伝的距離は以下の式から求めた非類似度によって表した^{4,5}。N は株 1 と株 2 で共通して PCR 陽性であった遺伝子数である。

$$\text{非類似度} = 1 - 2N / 48$$

このようにして各株間の遺伝的距離を算出し、距離行列を作成した。この距離行列から Neighbor-joining 法を用いてクラスター解析を行った。クラスター解析および

系統樹作成は MEGA6（フリーソフト）によって行った。

C. 結果と考察

今回の結果を表 3 に示す。今回検討した遺伝子の内、*becB*, *sigK*, *sodA*, *groEL*, *pgk*, *nadA*, *colA*, *lonB*, *virS* は株間で変化が見られなかった。そこで今回、株間で変化が見られなかったこれらの遺伝子を取り除いた結果を表 4 に示す。今回試験した株の中で *cpe* を保有していたのは食中毒由来株のみで、鶏肉由来株は保有していなかった。また、すべての *cpe* 遺伝子保有株は染色体上に遺伝子を保有していた。今回試験した菌株の中で食中毒と関連付けられたのは *cpe* だけであった。*pfoA* は PCR 産物の長さが約 2 000bp のものと 200 bp のものとに分かれた。これらの結果から株間の遺伝的距離を求め、系統樹を作成したところ（図 1）、*tcpH*, *tcpF*, *rep* に対する PCR の結果によって大きく二つのグループに分けられた。Saitama20-10 が二つのグループの中間に位置していた。KanagawaCL0-011 と KanagawaCL0-012、Akita55 と Akita57 はそれぞれ同一の食中毒事例から分離された株であり、PCR の結果は同じパターンを示した（表 4）。一方、Akita60、Akita62、Akita64 の 3 株も同一の食中毒事例からの分離株であるが、Akita60 だけが *bcn* 陽性、*eno* 陰性で他の 2 株と異なるパターンを示した（表 4）。このことからこの事例では複数の株によって食中毒が引き起こされたことが示唆

された。また、Akita55、Akita57 と Akita60、Akita62、Akita64 は異なる事例からの株であるが遺伝的に非常に近いグループに属していた（図1）。また鶏肉由来株であるが、Fukuoka3 と Fukuoka6 も近いグループに属していた（図1）。これらのことからこれらの株間で地理的な関連性が示唆された。一方で、Kanagawa10-1 と Akita6、Kanagawa2-4 と Saitama14-10 などのように地理的に離れた株間で遺伝的な関連性が見いだされた（図1）。

今回の方法に必要な機器は PCR に必要なサーマルサイクラーだけである。サーマルサイクラーは多くの検査所で普及しており、新規に購入しても 20 万円程度で入手することが出来る。実験の手順も、菌株からの DNA 抽出、PCR 反応、ゲル電気泳動の 3 ステップだけであり、これらの手法は多くの検査所でルーチンワークとして汎用されている手法であるため、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。簡便、迅速な検査法であるにもかかわらず、前述のように株間の由来に関して多くの考察を行えるだけのデータを得ることが出来る。もちろん今回の方法はそれぞれの遺伝子に対するプライマーを作成し、それを用いた PCR 反応が陽性であるか、陰性であるかを判定しただけのものである。よって株間同士が本当に同一の株であるかどうかを確認する

ためにはさらに多くの試験を行う必要があるが、日常のスクリーニング業務で使用するタイピング法としては十分な解像度を持つと思われる。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。

今回検討した遺伝子の内、7 つの遺伝子は株間で変化が見られなかった。さらに菌株を増やして検討を行い、これらの遺伝子に変化が見られなかった場合、試験項目から外し省力化を行う予定である。また今後、マルチプレックス化を行い検査機関の負担をさらに軽減できるように改良を行う予定である。

D. 結論

ウェルシュ菌の遺伝子を標的とした PCR ベースの検査法の検討を行った。その結果、今回の方法によって簡便・迅速にウェルシュ菌のタイピングを行うことが出来、日常のスクリーニング業務に非常に有用であることが明らかになった。今後さらに簡便性を追求するために改良を行う予定である。

E. 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 82:2390-2399,2014

2. Miyamoto K, Wen Q, McClane BA: Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (cpe) locus, a plasmid cpe locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid cpe locus with an IS1151 sequence.. J Clin Microbiol 42:1552-1558,2004
3. 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
4. Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Biol Evol 1990;7:478-484
5. Koichiro Kawai, Yuji Ina, Hiromichi Imabayashi. Genetic Relationships between 'Gogi', a Subspecies of Japanese Common Charr, *Salvelinus leucomaenis imbrius*, Distributed around the Watershed Borders in the

Western Chugoku Mountains, Japan, on the Basis of RAPD Analysis. Bulletin of the Hiroshima University Museum 2010;2:35-41

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

<i>cpe</i>	enterotoxin gene
<i>becB</i>	novel enterotoxin gene
<i>cph2</i>	β 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1 対象ウェルシュ菌遺伝子

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2 供試菌株

Kanagawa2-2	cpe	becB	cbp2	gyrB	sigK	sodA	groEL	pdk	nadA	pilC	colA	lonB	eno	virS	pfoA	tcpH	tcpF	rep	can	soj	parB	topA	hcn	
Kanagawa2-4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	
Kanagawa9-4	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	
Kanagawa10-1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	
Kanagawa12-6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	1	
Kanagawa17-6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	
KanagawaCIO-011	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	1
KanagawaCIO-012	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Aktia1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Aktia2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
Aktia6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
Aktia9	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	
Aktia35	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	
Aktia37	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Aktia60	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	
Aktia62	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
Aktia64	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	
Fukuoka1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	
Fukuoka2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	
Fukuoka6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	
Fukuoka3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	
Saitama1-10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
Saitama2-10	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	
Saitama14-10	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	
Saitama20-10	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	

cpe : 0, negative; 1, chromosomal; 2, plasmid IS1470-like; 3, plasmid IS1151

pfoA: 0, negative; 1, MW. 2000bp; 2, MW. 200bp

other genes: 0, negative; 1, positive

表3 ウェルシュ菌遺伝子を対象とした PCR の結果

表4 ウェルシュ菌遺伝子を対象としたPCRの結果②

	cpe	cpb2	gyrB	plc	eno	pfoA	tcpH	tcpF	rep	can	soj	parB	topA	bcn	
Kanagawa2-2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	同一事例
Kanagawa2-4	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	
Kanagawa9-4	0	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	1	
Kanagawa10-1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
Kanagawa12-6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
Kanagawa17-6	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	同一事例
KanagawaCLO-011	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0	
KanagawaCLO-012	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	0	0	
Akita1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	同一事例
Akita2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
Akita6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
Akita9	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	
Akita55	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	0	1	1	
Akita57	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	同一事例
Akita60	1	1	1	1	1	0	2	0	0	0	1	1	1	1	
Akita62	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Akita64	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Fukuoka1	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	1	1	1	1	
Fukuoka2	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	同一事例
Fukuoka6	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
Fukuoka3	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	
Saitama1-10	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
Saitama2-10	0	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	
Saitama4-10	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	同一事例
Saitama20-10	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	

cpe : 0, negative; 1, chromosomal; 2, plasmid IS1470-like; 3, plasmid IS1151
pfoA : 0, negative; 1, MW. 2000bp; 2, MW. 200bp
other genes : 0, negative; 1, positive

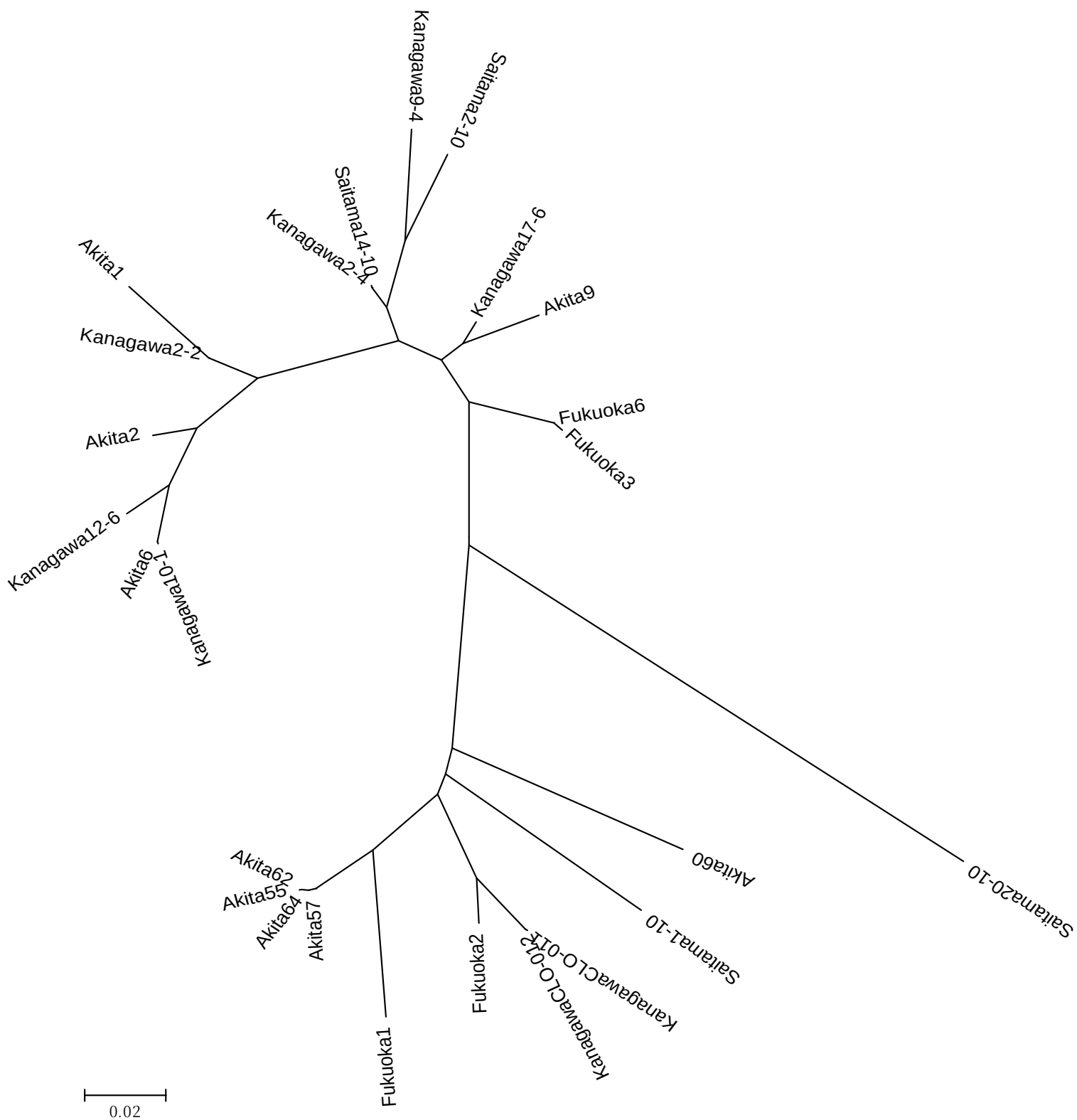


図1 今回の結果から得られた株間の遺伝的関係

平成 26 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

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、そのサーベイランス体制を充実させるための遺伝特性の開発およびタイピング法の検討などを行う。本年度は近年欧米で報告の相次いでいる *Salmonella* I 4:i:- について、昨年度改良を施したスクリーニング用 PCR に加えて MLST による検討を行った。

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なりタイピング法なりを開発・検討することが本研究の目的である。

B. 研究方法

PCR タイピング

Salmonella I 4:i:-は近年欧米で報告の相次いでいる血清型であり、血清型 Typhimurium (I 4:i:1,2) の単相バリエーションであると考えられている。*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 について昨年改良を施した PCR 法を使い、*fliAB* intergenic region および *fljB* 遺伝子について試験した。また、J. Clin. Microbiol. 47, 3546 (2009)に記載された PCR による *hin* 遺伝子の試験を行い、必要に応じて塩基配列の決定を行った。

MLST

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 の型番付けなどを行った。

PFGE

Pulsenet プロトコール (Foodbourne 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

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) を供試し、試験を行った。

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 1 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 1 および図 2 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。上記のこと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。

本研究では今回ヒト由来株と非ヒト由来

株とで遺伝的特性が分かれる結果となった。今後供試菌株数を増やすことで、由来と菌型との間の傾向、関連性などが明らかになってくることが期待される。

D. 結論

fliAB による S. I 4:i:- の PCR の結果から、供試菌株は Typhimurium 由来であることが示唆され、本結果は MLST の結果によっても支持された。

fljB, *hin* 遺伝子による PCR タイピングは MLST の結果と相関し、また、PFGE および MLVA の結果ともある程度の相関性が観察された。

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。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

表 1. PCR タイピングおよび MLST の結果。

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

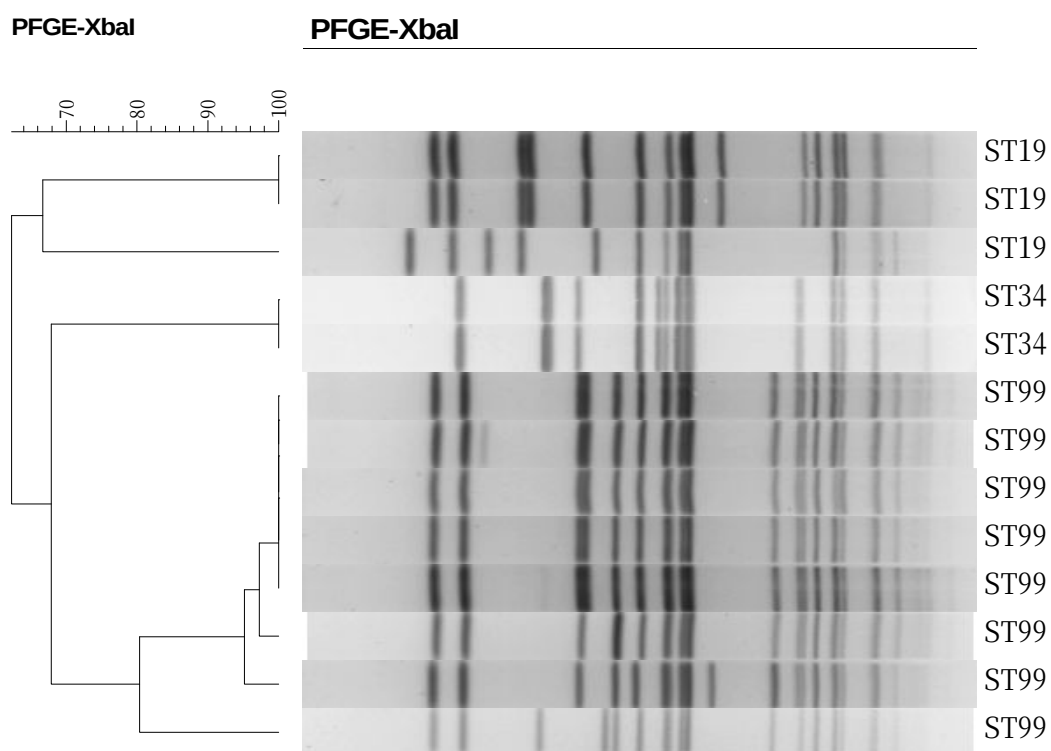


図 1. *S. I 4:i:-* 株 XbaI 消化 PFGE パターンのクラスター解析

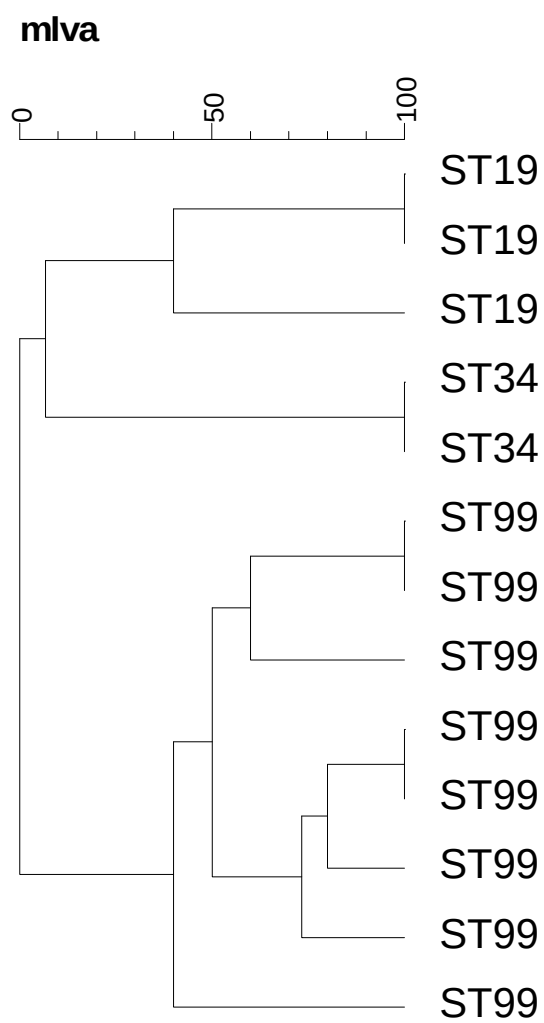


図 2. *S. I 4:i:-*株 MLVA クラスター解析

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）
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

ウェルシュ菌選択分離培地としての酵素基質培地の有用性

研究分担者	堀川和美	（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	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	世良暢之	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	村上光一	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	江藤良樹	（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	岡元冬樹	（福岡県保健環境研究所）
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	黒木俊郎	（神奈川県衛生研究所）

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（CCP 培地）について、発育支持能、鑑別能、選択性等の培地性能を本邦で広く用いられているカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地（ECW⁺培地）と比較、検討した。その結果、ウェルシュ菌標準菌株 2 株及び野生株 40 株を用いた発育菌数の比較では、いずれの株も CCP 培地の発育菌数が ECW⁺培地より多かった。また、発育集落の色調による鑑別能については、今回用いたクロストリジウム属標準菌株 6 株では、ウェルシュ菌のみが青緑色を呈し、ウェルシュ菌の釣菌において鑑別が容易であった。CCP 培地は、糞便より分離されることの多い大腸菌及び黄色ブドウ球菌の標準菌株に対して発育抑制が認められた。一方、ECW⁺培地では CCP 培地に比較して発育菌数が $1/10^4$ 以下であった株が 4 株に認められた。これらの株のカナマイシンに対する MIC 値は $128 \mu\text{g/ml}$ であり、対照株として用いた標準菌株の $256 \mu\text{g/ml}$ 以上に比べて低かった。また、培地作製後 6 日の ECW⁺培地による発育菌数は、これらの株では検出限界未満となり発育しなかった。このことから、カナマイシンに感受性の高いウェルシュ菌の分離において、CCP 培地はカナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地と同様に有用であると考えられた。

A. 研究目的

ウェルシュ菌による食中毒は、主に食品の加熱調理により生じる食品の酸化還元電位の低下と加熱後食品の不適切な温度管理による本菌の発育可能温度域保持時間の延長等に起因して、食品中で増殖したウェルシュ菌が腸管内で産生した毒素により発生すると考えられている。特に給食施設等で大量調理される食品が原因となった場合には、大規模な患者発生につながる危険性を有している。

食中毒細菌であるウェルシュ菌の分離には、本邦ではカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天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。しかしながら、卵黄反応を指標とした分離培地では、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。

そこで、本研究では、分離培地の発育支持能、鑑別能、選択性等の培地性能を、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) と卵黄反応を釣菌指標とす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) とで比較、検討した。あわせて、培地作製後の経過日数がウェルシュ菌の発育菌数に及ぼす影響について、標準菌株を用いて、培地作製後の経過日数毎の発育菌数を比較、検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

使用菌株の由来及び検討した試験内容は表 1 に示した。

使用菌株は、クロストリジウム属の標準菌株 *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)、*C. bifermentans* DSM14991、*C. sporogenes* JCM1416、*C. difficile* DSM1296 及び *C. sordellii* JCM3814 の 6 株を用いた。*Escherichia coli* IF03301 及び *Staphylococcus aureus* IF012732 の 2 株は、糞便より分離される細菌の代表として用いた。食品又は食中毒患者由来のウェルシュ菌野生株は、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)、福岡県保健環境研究所分離 5 株 (検体番号 F) の計 40 株を用いた。

培地作製後の経過日数毎の発育菌数の比較には、ウェルシュ菌標準菌株 ATCC3624 及び ATCC12915 の 2 株を用いた。

2. 方法

2-1 培地性能試験

使用培地は、CCP 培地及び ECW⁺培地を用い、卵黄液は卵黄乳液 EX (関東化学) を使用した。発育菌数の対照培地として、GAM 寒天培地 (以下 GAM 培地、日水製薬) を使用した。培地性能試験は、Miles&Misra ら¹⁾ の方法 (以下ミスラ法) に準拠し、発育菌数の測定及び CCP 培地発育集落の色調を観察した。

2-2 培地作製後の経過日数毎の発育菌数の比較

培地作製後の経過日数が発育菌数に及ぼす影響をみるため、培地作製後、脱酸素剤（アネロキープ、三菱ガス化学）とともに密封し、5–8℃に保存した CCP 培地及び ECW⁺培地と対照培地として用時調製した GAM 培地を用いて、作製後 1 日、7 日、18 日、22 日及び 30 日の計 5 回、ミスラ法により発育菌数を測定し、比較した。

なお、培地性能試験及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数の測定で実施したミスラ法の詳細は以下のとおりである。

培養液及び培養方法：供試菌株のうち、クロストリジウム属標準菌株及びウェルシュ菌野生株については、保存菌株を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±2℃で 22±2 時間嫌気培養した培養菌液を用いて発育菌数を算出した。*E. coli* IF03301 株及び *S. aureus* IF012732 株については、保存菌株を Brain heart infusion broth（栄研化学）に接種し、35±2℃で 22±2 時間、好気培養した培養菌液を用いて発育菌数を算出した。

発育菌数の算出：クロストリジウム属標準菌株及びウェルシュ菌野生株については、培養菌液を Yamamoto-Osaki ら²⁾の嫌気性希釈液を用いて 10 倍から 10⁷ 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。その希釈菌液を各培地 2 枚に 10 µl または 20 µl 滴下し、アネロパックケンキ（三菱ガス化学）を用いて、35±2℃で 22±2 時

間嫌気培養した。発育した集落数を計数し、1ml あたりの菌数を算出した。

C. 研究結果

1. 培地性能試験

1-1 標準菌株による比較

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 2 及び図 1 に示した。

ウェルシュ菌 ATCC3624 株及び ATCC12915 株を用いた発育菌数の比較では、CCP 培地の発育菌数は、GAM 培地と同程度で ECW⁺培地の約 10 倍であった。その他のクロストリジウム属標準菌株 4 株の CCP 培地での発育菌数は、*C. sporogenes* JCM1416 株及び *C. difficile* DSM1296 株では、GAM 培地に比べてやや少なかったが、他の 2 株は GAM 培地とほぼ同じであり、4 株いずれも ECW⁺培地より多い発育菌数であった。

一方、ECW⁺培地では、*C. bifermentans* DSM14991 株及び *C. sporogenes* JCM1416 株の 2 株は発育しなかった。ECW⁺培地に発育した *C. difficile* DSM1296 株及び *C. sordellii* JCM3814 株の発育菌数は、CCP 培地の約 1/2 ないし 1/80 であり、ECW⁺培地の方がウェルシュ菌以外のクロストリジウム属標準菌株 4 株に対する抑制が強かった。

CCP 培地における発育集落の色調は、ウェルシュ菌 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、表 2 に示すようにウェルシュ菌の青緑色とは異なる色調を示した。

E. coli IF03301 株及び *S. aureus* IF012732 株は、CCP 培地及び ECW⁺培地いずれにも発育しなかった。

1-2 ウェルシュ菌野生株による発育菌数の比較

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 3 に示した。

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～ 2.5×10^2 倍の菌数であった。

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。

2. 培地作製後の経過日数毎の発育菌数の比較

ウェルシュ菌標準菌株 2 株を用いて測定した発育菌数を図 2 に示した。

両株の培地作製後の経過日数毎の発育菌数は、CCP 培地では約 10^8 CFU/ml のレベルで推移し、明らかな減少は認められなかった。一方、ECW⁺培地では、培地作製後の日数経過とともに図 2 に示すように発育菌数の減少がみられた。特に、易熱性芽胞形成・*cpe* 陰性株である ATCC3624 株では、作製後 7 日以上経過した培地で測定した発

育菌数が、作製後 1 日の培地で測定した発育菌数に比べて、約 $1/10^3 \sim 1/10^4$ に減少した。

3. ECW⁺培地発育不良株に対する追加試験

C. 1-2 ウェルシュ菌野生株 40 株による発育菌数の比較において、ECW⁺培地の発育菌数が CCP 培地に比べて $1/10^4$ 以下となった株（以下、ECW⁺培地発育不良株）が 4 株みられたことから、ECW⁺培地に添加されているカナマイシンがこれら ECW⁺培地発育不良株の発育に及ぼす影響をみるため、センシディスク及び Etest を用いて薬剤感受性試験を行った。あわせて、カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地（基礎培地：日水製薬、以下 ECW⁻培地）を使用培地に加えて、カナマイシンの有無による卵黄加 CW 寒天培地での発育菌数の比較及び培地作製後の経過日数が発育菌数に及ぼす影響について、培地作製後の経過日数毎の発育菌数を比較、検討した。実施した試験の方法及び結果は以下のとおりである。

3-1 ECW⁺培地発育不良株のカナマイシンに対する薬剤感受性試験

ECW⁺培地発育不良株 4 株について、センシディスク（カナマイシン 30 μ g /disk、日本 BD）及び Etest（カナマイシン濃度勾配ストリップ、シスメックス・ビオメリュー）を用いて、カナマイシンに対する薬剤感受性試験を行った。ウェルシュ菌標準菌株 ATCC3624 株及び ATCC12915 株は対照株として用いた。なお、センシディスクについては、CLSI M11-A8 においてデ

ディスク拡散法による解釈基準等がないため、Etest と同一条件で参考として実施した。Etest は、添付文書に従って、ブルセラブロス（日本 BD）にマクファーランド 1.0 の濁度に調整した被検菌懸濁液をブルセラ血液寒天培地（シスメックス・ビオメリュー）に塗抹し、試験薬剤のストリップを配置後、 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ で 45 ± 3 時間、アネロパックケンキ薬剤感受性用（ CO_2 濃度 10% 相当、三菱化学）を用いて嫌気培養した。培養後、被検菌の発育を目視で確認し、最小発育阻止濃度（以下、MIC）値を判定した。

ECW⁺培地発育不良株のカナマイシンに対する薬剤感受性試験の結果を表 4 に示した。

供試した ECW⁺培地発育不良株 4 株は、いずれもセンシディスクの周囲に阻止円の形成を認めなかった。また、Etest による MIC 値は、4 株いずれも $128 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、対照株として用いた標準菌株の $256 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上に比べて感受性が高かった。

3-2 ECW⁺培地発育不良株のカナマイシンの有無による発育菌数及び培地作製の経過日数毎の発育菌数の比較

CCP 培地、ECW⁺培地、ECW⁻培地及び対照として用事調製した GAM 培地を用いて、培地作製後 1 日及び 6 日の 2 回、前述の B. 2-2 と同様に行った。

ECW⁺培地発育不良株 4 株と対照株 2 株の結果を表 5 及び図 3 に示した。

培地作製後 1 日の ECW⁺培地と ECW⁻培地による ECW⁺培地発育不良株 4 株の発育菌数の比較では、いずれも ECW⁺培地の発育菌数

が ECW⁻培地の発育菌数より少なく、その発育菌数は、ECW⁻培地の約 $1/10^4 \sim$ 約 $1/10^5$ であった。また、培地作製後 6 日の培地で測定した発育菌数と培地作製後 1 日の培地で測定した発育菌数を比較したところ、ECW⁻培地では、同数もしくは約 $1/2$ 程度の減少であったが、ECW⁺培地ではいずれの株も発育菌数が検出限界未満となった。なお、対照株として実施した ATCC3624 株については、C. 2. と同様の結果であった。

D. 考察

ウェルシュ菌標準菌株及び野生株における CCP 培地と GAM 培地の発育菌数の比較では、CCP 培地の発育菌数は GAM 培地の $1/8 \sim$ 約 3 倍で、同程度の発育菌数であった。また、ウェルシュ菌の発育菌数は、用いた全ての株において、CCP 培地の方が ECW⁺培地より多かった。ウェルシュ菌以外のクロストリジウム属標準菌株については、CCP 培地では全ての菌株が発育したが、ECW⁺培地では 2 株が発育しなかった。このことから、ウェルシュ菌の選択分離培地としての発育支持能は CCP 培地が優れていた。また、選択性では ECW⁺培地の方が抑制が強かった。

CCP 培地での発育集落の色調は、本培地で発育可能であったウェルシュ菌以外のクロストリジウム属標準菌株 4 株が白色、淡紅色、淡褐色、黒色等を呈したのに対して、ウェルシュ菌では、標準菌株及び全ての野生株が青緑色を呈し、鑑別は容易であった。

このことから、ウェルシュ菌の選択分離培地として、本培地の鑑別能に特に支障となる点はみられず、発育集落の色調による

他のクロストリジウム属との鑑別において、酵素基質により発色したウェルシュ菌の発育集落は釣菌指標として有用であると考えられた。

本研究において認められた ECW⁺培地での発育菌数が CCP 培地に比べて $1/10^4$ 以下であったウェルシュ菌野生株 4 株について、その発育にカナマイシンが与える影響をみたところ、カナマイシンに対する MIC は、いずれも $128 \mu\text{g/ml}$ であり、標準菌株の $256 \mu\text{g/ml}$ 以上に比べて感受性が高かった。分離培地へのカナマイシン ($200 \mu\text{g/ml}$) の添加の有無による発育菌数の比較では、ECW⁺培地の発育菌数は、ECW⁻培地の約 $1/10^4 \sim$ 約 $1/10^5$ と少なく、また、培地作製後 6 日を経過した時点で検出限界未満となった。赤真ら³⁾ は 90°C で 15 分又は 100°C で 60 分の加熱条件において、カナマイシン含有培地とカナマイシン不含培地での発育菌数を比較したところ、カナマイシン不含培地での発育菌数が優位であったと報告しており、このような株の一部では、分離培養時の加熱処理その他の要因等によりカナマイシンへの感受性が高まっている可能性も考えられた。なお、今回 $200 \mu\text{g/ml}$ のカナマイシンに感受性が認められた 4 株の分離方法は、3 株 (K12 株、K13 株及び K14 株) が検体加熱処理後に ECW⁻培地により分離されたもので、1 株 (A56 株) は加熱処理を行わず ECW⁺培地により分離されたものであった。さらに、近年ではカナマイシンに感受性を示すウェルシュ菌の食中毒事例の報告⁴⁾ もあることから、食中毒事案等におけるウェルシュ菌の分離にあたっては、状況に応じた分離培地を選択し、

適切に使用することが重要であると考えられた。

E. 結論

酵素基質培地である CHROMagar™ C. perfringens 試作品の培地性能について、従来より使用されている ECW⁺培地と比較、検討した。ウェルシュ菌の選択分離培地としての本培地の発育支持能、鑑別能は、ECW⁺培地と比べて遜色ないものであった。選択性については、CCP 培地に比べて、ECW⁺培地の方が、より多くのウェルシュ菌以外の標準菌株の発育を抑制した。

本研究において認められたカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地での発育菌数が CCP 培地に比べて顕著に少ないウェルシュ菌の分離には、カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地と同様に CCP 培地が有用であることがわかった。

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に深謝いたします。

G. 参考文献

- 1) 坂崎利一, 新 細菌培地学講座・上, 200—211, 近代出版, (1978).
- 2) 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.

Microbioli., 40, 179–187, (1994).

- 3) 赤真清人, 大谷 昌, 亀山昭一, 伊藤明治, 村田良介: ウェルシュ菌の分離同定用培地の検討. 日本細菌学雑誌, 21, 564–573, (1966).

- 4) 門間千枝, 下島優香子, 小西典子, 尾畑浩魅, 石崎直人, 仲真晶子, 甲斐明美, 柳川義勢, 山田澄夫: カナマイシンに感受性を示すウェルシュ菌食中毒事例と分離菌株の性状. 日本食品微生物学会雑誌, 25, 76–82, (2008).

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

なし

J. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表 1 供試菌の由来及び実施した試験内容

菌種	由来	菌株	試 験 内 容		追 加 試 験 の 内 容	
			培地性能試験	培地作製後の 経過日数毎の 発育菌数測定	カナマイシン に対する 薬剤感受性試験	カナマイシンの有無 による発育菌数及び 培地作製後の経過日数 毎の発育菌数測定
<i>C. perfringens</i>	ATCC	ATCC3624 ^a	○	○	○	○
<i>C. perfringens</i>	ATCC	ATCC12915 ^b	○	○	○	○
<i>C. bifermentans</i>	DSM	DSM14991	○			
<i>C. sporogenes</i>	JCM	JCM1416	○			
<i>C. difficile</i>	DSM	DSM1296	○			
<i>C. sordellii</i>	JCM	JCM3814	○			
<i>E. coli</i>	IFO	IFO3301	○			
<i>S. aureus</i>	IFO	IFO12732	○			
<i>C. perfringens</i>	鶏肉、有症者便	野生株40株	○		○ ^c	○ ^c

^a 易熱性芽胞形成・*cpe*陰性株

^b 耐熱性芽胞形成・*cpe*陽性株

^c カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地に発育不良であった4株

表2 標準菌株の各培地における発育菌数及び CHROMagar™ *C. perfringens* 試作品での発育集落の色調

菌 種	菌 株	発育菌数 (log CFU/ml) ^a			CCP - ECW ⁺ 発育菌数対数差 (b - c · log)	CCP 発育集落 の色調
		CCP ^b	ECW ⁺ ^c	GAM ^d		
<i>C. perfringens</i>	ATCC3624	8.54	7.40	8.00	1.15	青緑色
<i>C. perfringens</i>	ATCC12915	8.81	7.90	8.60	0.91	青緑色
<i>C. bifermentans</i>	DSM14991	8.81	発育せず ^e	8.78	> 7.41	淡褐色～淡紅色
<i>C. sporogenes</i>	JCM1416	7.30	発育せず ^e	8.60	> 5.90	白色
<i>C. difficile</i>	DSM1296	7.30	5.40	8.00	1.90	淡褐色～黒色
<i>C. sordellii</i>	JCM3814	8.18	8.00	8.40	0.18	白色～淡紅色
<i>E. coli</i>	IFO3301	発育せず ^e	発育せず ^e	8.81	—	集落の形成なし
<i>S. aureus</i>	IFO12732	発育せず ^e	発育せず ^e	7.80	—	集落の形成なし

^a 検出限界: 1.4 logCFU/ml

^b CCP: CHROMagar™ *C. perfringens* 試作品

^c ECW⁺: カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地

^d GAM: GAM寒天培地

^e 出発希釈である10⁻¹希釈菌液による試験において発育せず

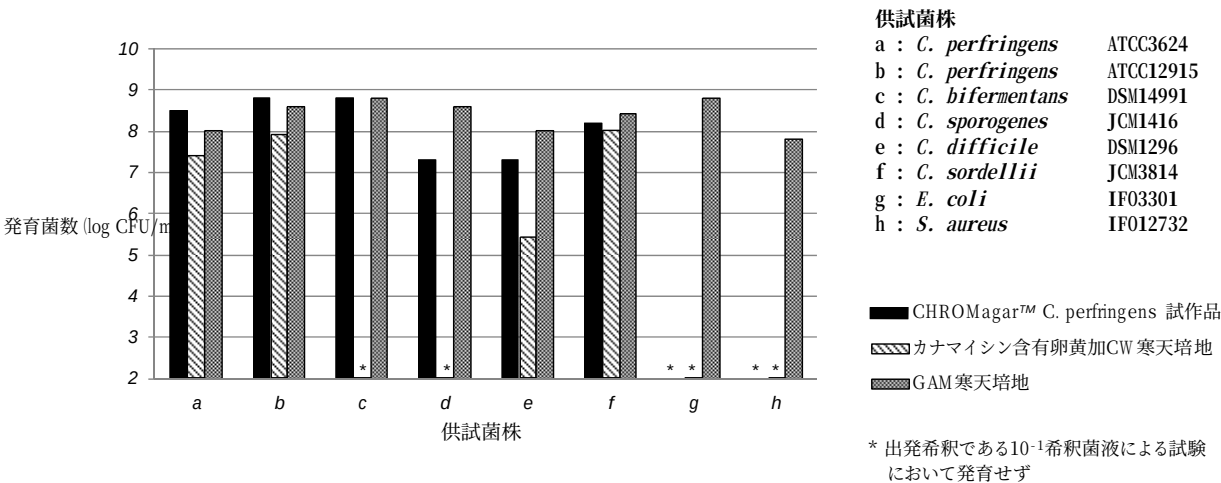


図1 標準菌株の各培地における発育菌数

表3 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) ^a			CCP - ECW ⁺ 発育菌数対数差 (b-c · log)
		CCP ^b	ECW ⁺ ^c	GAM ^d	
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

^a 検出限界: 1.7 logCFU/ml

^b CCP: CHROMagar™ C. perfringens 試作品

^c ECW⁺: カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地

^d GAM: GAM寒天培地

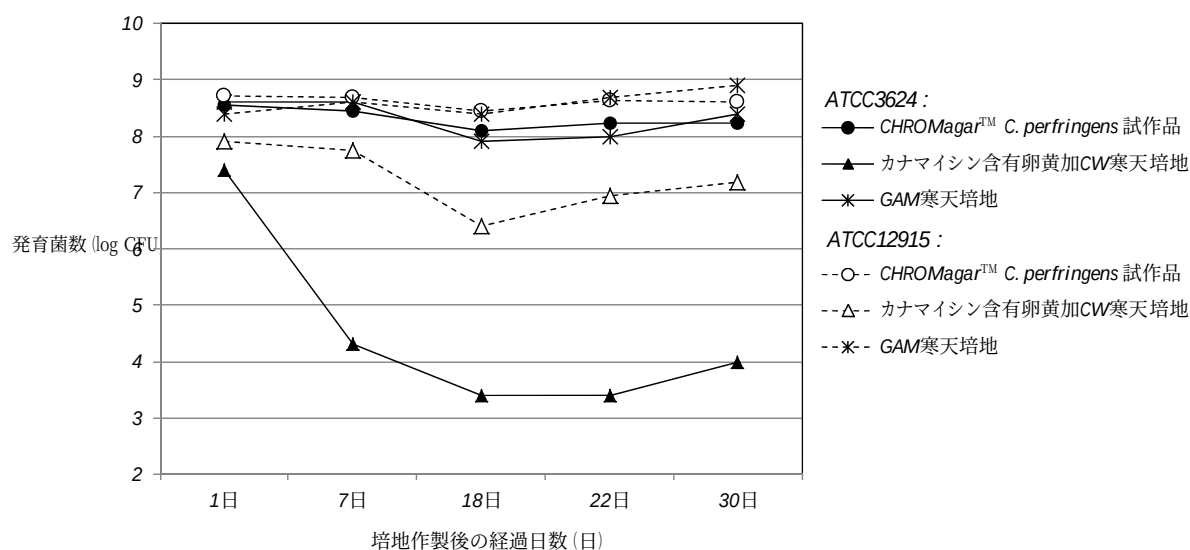


図2 培地作製後の経過日数毎のウェルシュ菌標準菌株の発育菌数

表4 カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地で発育不良を呈するウェルシュ菌の
カナマイシンに対する薬剤感受性試験

菌 株	センシディスク [*] 30 µg/disk (阻止円直径・mm)	Etest [*] (MIC値・µg/ml)
K12 (野生株)	≤ 7mm	128
K13 (野生株)	≤ 7mm	128
K14 (野生株)	≤ 7mm	128
A56 (野生株)	≤ 7mm	128
ATCC3624	≤ 7mm	≥ 256
ATCC12915	≤ 7mm	≥ 256

[試験条件]培地:ブルセラ血液寒天、接種菌液濁度:McFarland 1.0、培養条件:35±2℃、45±3時間、嫌気培養
(アネロパックケンキ薬剤感受性用、CO₂濃度10%相当、三菱ガス化学)

^{*} センシディスク、Etestともに、CLSIの嫌気性菌薬剤感受性試験の承認標準には、ディスク拡散法の指定及び
ウェルシュ菌の解釈基準がないため、S、I、Rの判定は行っていない。

表5 カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地で発育不良を呈するウェルシュ菌の
カナマイシンの有無による発育菌数及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数

菌 株	発育菌数 (log CFU/ml) ^a								ECW ⁺ - ECW ⁻ 発育菌数対数差 (g - i · log)	ECW ⁺ (6日-1日) 発育菌数対数差 (h - g · log)
	C C P ^b		ECW ⁺ ^c		ECW ⁻ ^d		GAM ^e			
	培地作製後経過日数									
	1日	6日	1日 ^g	6日 ^h	1日 ⁱ	6日	1日	6日		
K12 (野生株)	8.60	8.54	3.30	発育せず ^f	8.70	8.48	8.65	8.48	-5.40	< -1.90
K13 (野生株)	8.48	8.60	3.93	発育せず ^f	8.48	8.18	8.30	8.48	-4.55	< -2.53
K14 (野生株)	8.81	8.40	4.30	発育せず ^f	8.48	8.18	8.70	8.40	-4.18	< -2.90
A56 (野生株)	8.00	8.18	3.40	発育せず ^f	7.54	7.54	8.00	8.00	-4.15	< -2.00
ATCC3624	8.48	8.40	7.08	5.04	8.48	8.30	8.00	8.30	-1.40	-2.04
ATCC12915	8.81	8.60	7.90	7.18	8.40	8.40	8.60	8.65	-0.49	-0.73

^a 検出限界:1.4 log CFU/ml

^b CCP: CHROMagarTM C. perfringens 試作品

^c ECW⁺: カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地

^d ECW⁻: カナマイシン不含卵黄加CW寒天培地

^e GAM: GAM寒天培地

^f 出発希釈である10⁻¹希釈菌液による試験において発育せず

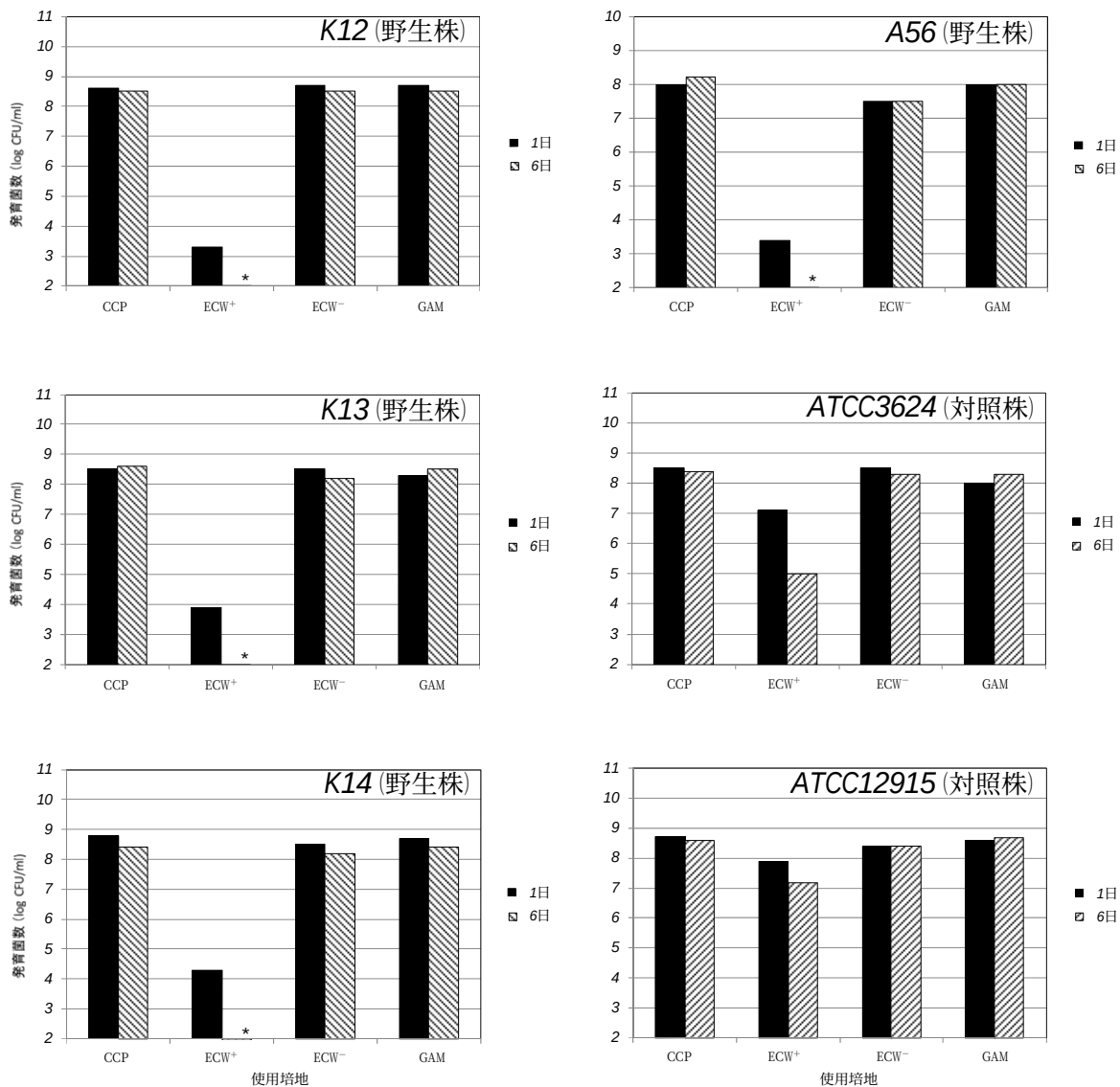


図3 カナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地で発育不良を呈するウェルシュ菌の
カナマイシンの有無による発育菌数及び培地作製後の経過日数毎の発育菌数

CCP : CHROMagar™ *C. perfringens* 試作品
 ECW⁺ : カナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地
 ECW⁻ : カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地
 GAM : GAM 寒天培地
 * 出発希釈である 10⁻¹ 希釈菌液による試験において発育せず

平成 26 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

食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌の遺伝子型別について

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	小林昭彦	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	堀川和美	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	武沼浩子	（青森県環境保健センター）
研究協力者	岩渕香織	（岩手県環境保健研究センター）
研究協力者	小黒祐子	（福島県衛生研究所）
研究協力者	八柳 潤	（秋田県健康環境センター）
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	今野貴之	（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	和田恵理子	（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、食中毒事例等で分離された黄色ブドウ球菌について 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）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、食中毒事例等 25 事例由来 75 株は POT 法で 31 種類、SE 型と POT 型の組み合わせで 35 種類、MLVA 法で 36 種類に型別された。さらに、POT 法と MLVA 法の型別の評価のため、POT 型 24 種（SE:POT 型 27 種）、MLVA 法 27 種に型別された 53 株について PFGE 型別を実施したところ、26 種類に型別された。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、逆に異なる POT 型、MLVA 型が同一の PFGE パターンとなる例もみられたが、POT 法と MLVA 法による型別は PFGE 法による型別とほぼ同程度の解析力を有していることが確認された。また、簡便性・迅速性からも POT 型別及び MLVA 型別は有用な型別法であると考えられた。

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る。食中毒菌のデータベース構築を目指し、食品検査あるいは食中毒事例において分離された黄色ブドウ球菌を対象に、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ため、昨年度は平成 24 年度に実施した鶏肉汚染実態調査で分離された黄色ブドウ球菌について 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の保有状況について、現在各施設においてルーチンで実施されている A～E 型の *sea*～*see* 遺伝子検索に加えて新型エンテロトキシンの G, H, I 型の *seg*, *seh*, *sei* 遺伝子の保有状況について PCR 法により検討した⁴⁾。今年度は、さらに、実際の食中毒事例における応用の可能性を検討するため、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黄色ブドウ球菌について同様に検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試した菌株が分離された事例一覧を表 1 に示す。以下特に記載がない場合、‘食中毒事例’は黄色ブドウ球菌食中毒を示し、‘有症苦情等事例’は有症苦情事例及び黄色ブドウ球菌以外の病因による食中毒事例

を表す。

平成 25 年度に供試した 2 事例由来 5 株を含めて、食中毒 14 事例由来 49 株、有症苦情等 11 事例由来 26 株、計 75 株の黄色ブドウ球菌についてブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の保有状況を PCR 法により調査するとともに、POT 法、MLVA 法による遺伝子型別を実施した。また、これらの株から選択した 53 株を PFGE 法による遺伝子型別に供試した。さらに平成 25 年度に実施した市販鶏肉由来黄色ブドウ球菌の遺伝子型別結果と比較検討した。

2. ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 遺伝子の検出

ブドウ球菌エンテロトキシン A～E 型の遺伝子である *sea*, *seh*, *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¹⁾に従った。

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℃ 20 分, 94℃ 3 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アス分子疫学解析 POT キット (関東化学株式会社) を用いて PCR を行った。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。

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²⁾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。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³⁾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。各パターンは任意に定めて MLVA 型(ML26-数字)として示した。

5. PFGE 法

POT 法及び MLVA 法の型別結果を評価するため遺伝子型別の基準として PFGE を実施した。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 S K 処理を 50°C 一夜行った。制限酵素には *Sma*I を用い、泳動条件は 6V/cm²、5.3 ~ 34.9 S 20 時間とした。解析は Fingerprinting II を用いて、類似係数

Jacaard、デンドログラムタイプ UPGMA により実施した。各パターンは任意に定めて PFGE 型 (PF26-数字) として示した。

*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

C. 研究結果

食中毒事例及び有症苦情事例等由来黄色ブドウ球菌株の各種型別結果一覧を表 2 に示した。

1. ブドウ球菌エンテロトキシン(SE) 遺伝子の保有状況

分離株における SE の A 型~E 型及び G 型~I 型の遺伝子 *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sei* 保有状況について事例別集計を表 3 に示した。表中の分離株の SE 型の “/” は同一株から複数の型の SE 遺伝子が検出されたことを示し、例えば B/H は B 型 (*seb*) と H 型 (*seh*) の二つを同時に保有する株であったことを示す。また A、G/I 等の “,” は同じ事例から複数の異なる SE 型の株が分離されたことを示す。

A 型遺伝子 *sea* を単独・混合を含め食中毒事例由来株の 93.9% (46/49 株) が保有しており、14 事例中 13 事例に認められた。有症苦情等事例由来株では *sea* 保有率は 34.6% (9/26 株) であり、約半数の事例に認められた。

平成 25 年度に実施した鶏肉由来株の SE 型との比較について、SE 型別毎にその遺伝子を保有する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 4 に示した。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。なお黄色ブドウ球菌分離陽性鶏肉検体は 32 検体であり、異なる種類の SE 遺伝子を保有する株が同時に検出された検体はそのうち 7 検体であった。食中毒事例では従来のエンテロトキシン型の A～E 型の遺伝子を含む株が分離された事例が 88.9%、有症苦情等事例でも 66.7%であったが、鶏肉検体では 25.6%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、有症苦情等事例はそれぞれ 11.1%、27.8%であった。鶏肉検体と食中毒事例や有症苦情等事例では分離株が保有する SE 遺伝子の傾向が異なった。

2. POT 法による型別

食中毒事例 14 事例由来 49 株は POT 法で 15 種類に型別された。有症苦情等 11 事例由来 26 株は POT 法で 18 種類に型別された。食中毒事例と有症苦情等事例の両方に 0-1-0 と 2-1-0 に型別された株があったことから、合わせて 25 事例由来 75 株は最終的に 31 種類の POT 型に型別された(図 1, 表 5)。同一事例由来株においては SE 型が同じであった株はほとんど POT 型も一致した(表 2)。同一事例中の同じ

SE 型株で POT 型の不一致は事例 A8、事例 B6 で認められ、事例 A8 では、SE A 型患者由来株の POT 型は 0-51-9 であったが、SE A 型従業員由来株は 2-59-47 と異なっていた。事例 B6 では SE B 型株が 0-8-80 と 0-16-48 の 2 種類に型別された。異なる事例由来株で POT 型が一致した例は 0-1-0：事例 A8 (A/B 型), A9 (A/B 型), B1 (A 型)、0-51-9：事例 A5(A 型), A8 (A 型), A9 (A 型)、2-1-0：事例 A12 (A 型), A14 (A/H 型), B2 (A/C 型)、93-201-117：事例 B3 (G/I 型), B4 (G/I 型) で認められた。事例 A8 と A9 及び B3 と B4 はそれぞれ事例発生地域・時期が近い事例であり、POT 型と SE 型の組み合わせが同じ株が認められた。

3. MLVA 法による型別

食中毒事例及び有症苦情等事例由来株 75 株は MLVA 法で 36 種類に型別された。SE 型と POT 型別の組み合わせと比較してみると、表 6-1 に示すように 4 種類の SE 型：POT 型 (B:0-8-80, A:0-51-9, G/I:6-50-1, A/G/I:6-170-112) がそれぞれ 2～3 種類の MLVA パターンに細分化され。一方、表 6-2 に示すように A:0-19-65 と A:0-51-73 が ML26-2 に、A:0-1-1 と A:0-115-25 が ML26-3 に、G/I:4-0-0 と A/G/I:4-137-80 が ML26-6 に、B:0-8-80 の一部と B:0-16-48 が ML25-30 に型別された。

4. PFGE による型別

食中毒事例及び有症苦情等事例由来株

53株はPFGE法で26種類に型別された(図2,表7)。A:0-51-9:ML26-9型はPFGEでPF26-3,10に細分化された。また、ML26-2はPF26-2,3に、ML26-3はPF26-4,11に、ML26-6はPF6,12に、ML26-30はPF26-21,22に細分化された(表6-2)。一方表6-3に示すようにML26-2,4,9がPF26-3に、ML26-7,8がPF26-7に、ML26-3,17がPF26-11に、ML26-20,21がPF26-19に、ML26-29,30がPF26-21に型別された。

5. 鶏肉由来株と食中毒事例由来株の遺伝子型別の比較

表8に食中毒等由来株と25年度に調査した鶏肉由来株のSE型とPOT型の組み合わせの一覧を示した。事例等由来株と鶏肉由来株でPOT型の一致が認められた型は0-1-0, 0-1-1, 0-9-16, 2-1-0, 4-0-0の5種であり、その内SE型とPOT型の組み合わせが一致したものはA:0-1-1, G/I:0-9-16, G/I:4-0-0の3種であった。この3種類に該当する株についてMLVAパターンを確認したところ、食中毒等由来株と鶏肉由来株では一致は認められなかった(図3)。同様にPFGEパターンを比較したところ食中毒等由来株と鶏肉由来株で一致がみられたのはA:0-1-1のみであった(図4)。

D. 考察

黄色ブドウ球菌のSE型について、鶏肉由来株がG/I型の遺伝子*seg, sei*を高率

に保有していることを平成25年度に報告した。今回実施した食中毒事例由来株、有症苦情等事例由来株においても新型SE遺伝子保有株が確認されたが、鶏肉由来株に比較して*seg, sei*遺伝子の保有率は低く、食中毒事例で顕著に低かった。食中毒事例ではむしろ、A型SE遺伝子保有株が関与する事例が多数を占め、従来型特にA型エンテロトキシン保有株の重要性が示された。このように食中毒事例と鶏肉由来株ではSE遺伝子保有状況はかなり異なっていた。

事例等由来株の遺伝子型別については、昨年度に引き続きMRSAの疫学解析用として用いられているPOT法とMLVA法を試行した。今回供試した株は全てMSSAであり、POT法では、対象とする22領域中の*mec*遺伝子関連のバンドが(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、MRSAの場合は通常7本のバンドが検出されるが、ほとんどの供試株では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。

事例由来75株はPOT法で31種、SE型とPOT型の組み合わせで35種、MLVA法で36種に型別された。同じSE:POT型がMLVA法で細分化された例、逆に異なるSE:POT型が同じMLVAに型別された例が一部みられたが、SE:POT型とMLVA型ほぼ同等に型

別され、SE と POT 型の組み合わせの型別は有効と考えられた。

POT 法と MLVA 法の型別の評価のため POT 型 24 種 (SE:POT 型 27 種)、MLVA 法 27 種に型別された 53 株について PFGE 型別を実施したところ、26 種類に型別された。同じ POT 型、MLVA 型が PFGE 法で細分化される例、逆に異なる POT 型、MLVA 型が同一の PFGE パターンとなる例もみられたが、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ている。また、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。MLVA 法については、今回実施した方法は PFGE 法と同様に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 Fingerprinting II 等を用いた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に活用可能と考えられる。

POT 法と MLVA 法は鶏肉由来株と同様に食中毒事例由来株の解析にも応用可能であった。鶏肉由来株と事例由来株で一致した SE:POT 型は 3 種あり、MLVA 型別ではいずれも不一致であったが、PFGE 型別で

は鶏肉及び事例由来の A:0-1-0 株が一致し、これらの株は近縁と考えられた。鶏肉の黄色ブドウ球菌汚染は非常に高率であり、そのなかに数は少ないが食中毒事例由来株と近縁な株も認められ、鶏肉の黄色ブドウ球菌食中毒感染源としての可能性はさらに検討が必要と考えられた。

今後、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 型あるいは MLVA 型との組み合わせ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。

E. 結論

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。

F. 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. 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

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

表2 平成26年度 食中毒事例・有症苦情事例等由来黄色ブドウ球菌株の検査結果一覧

	No	事例	由来	株No	SE型	POT型	MLVA	PFGE	H25年検査分
食中毒事例	1	A1	患者便	1	A	2; 193; 33	ML26-1	PF26-1	ML14, PF13
			従業員手指	2	A	2; 193; 33	ML26-1	PF26-1	ML14, PF13
			残食品(よもぎ)	3	A	2; 193; 33	ML26-1	PF26-1	ML14, PF13
	2	A2	食品(バラ寿司)	6	A	0; 19; 65	ML26-2	PF26-2	
			患者手指拭き取り	7	A	0; 19; 65	ML26-2	PF26-2	
	3	A3	食品(マグロ)	8	A	0; 51; 73	ML26-2	PF26-3	
			患者便	9	A	0; 51; 73	ML26-2	PF26-3	
	4	A4	食品(イカ天ぷら)	10	A	0; 115; 25	ML26-3	PF26-4	
			患者便	11	A	0; 115; 25	ML26-3	PF26-4	
	5	A5	拭き取り(チルド庫)	12	A	0; 51; 9	ML26-4	PF26-3	
			患者便	13	A	0; 51; 9	ML26-4	PF26-3	
	6	A6	患者便	14	A	2; 17; 1	ML26-5	PF26-5	
			患者便	15	G.I	4; 0; 0	ML26-6	PF26-6	
	7	A7	患者便	16	A.G.I	6; 170; 112	ML26-7	.	
			患者便	17	A.G.I	6; 170; 112	ML26-7	PF26-7	
			患者便	18	A.G.I	6; 170; 112	ML26-7	PF26-7	
			患者便	19	A.G.I	6; 170; 112	ML26-8	PF26-7	
			食品(おっき貝おにぎり)	20	A.G.I	6; 170; 112	ML26-7	PF26-7	
			食品(おっき貝おにぎり)	21	A.G.I	6; 170; 112	ML26-7	.	
	8	A8	患者便	22	A	0; 51; 9	ML26-9	PF26-3	
			患者便	23	A	0; 51; 9	ML26-9	PF26-3	
			食品(おにぎり)	24	A.B	0; 1; 0	ML26-10	PF26-8	
	9	A9	従事者便	25	A	2; 59; 47	ML26-11	PF26-9	
			患者便	26	A.B	0; 1; 0	ML26-10	PF26-8	
			患者便	27	A	0; 51; 9	ML26-9	PF26-3	
			患者便	28	A	0; 51; 9	ML26-9	PF26-10	
			患者便	29	A	0; 51; 9	ML26-9	.	
			食品	30	A	0; 51; 9	ML26-9	PF26-3	
	10	A10	患者便	31	A	0; 1; 1	ML26-3	PF26-11	
			患者便	32	A	0; 1; 1	ML26-3	PF26-11	
			患者便	33	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	34	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	35	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	36	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	37	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	38	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	39	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	40	A	0; 1; 1	ML26-3	.	
			患者便	41	A.G.I	4; 137; 80	ML26-6	PF26-12	
	11	A11	患者便	42	A	2; 65; 33	ML26-12	PF26-13	
			食品	43	A	2; 65; 33	ML26-12	PF26-13	
	12	A12	拭き取り	44	A	2; 1; 0	ML26-13	PF26-14	
			患者便	45	A	2; 1; 0	ML26-13	PF26-14	
			患者便	46	A	2; 1; 0	ML26-13	PF26-14	
			患者便	47	A	2; 1; 0	ML26-13	.	
			従事者便	48	A	2; 1; 0	ML26-13	PF26-14	
	13	A13	患者便	49	G.I	6; 50; 1	ML26-14	PF26-15	
			患者便	50	G.I	6; 50; 1	ML26-15	PF26-16	
	14	A14	患者便	51	A.H	2; 1; 0	ML26-16	PF26-17	
有症苦情・他の病因による食中毒事例	15	B1	患者便	4	A	0; 1; 0	ML26-17	PF26-11	ML03, PF03
			患者吐物	5	G.I	6; 18; 81	ML26-18	PF26-18	ML22, PF25
	16	B2	糞便	52	-	4; 26; 0	ML26-19	.	
			糞便	53	-	0; 9; 16	ML26-20	PF26-19	
			糞便	55	G.I	0; 9; 16	ML26-21	PF26-19	
			糞便	54	A.C	2; 1; 0	ML26-22	.	
			糞便	56	A	6; 152; 34	ML26-23	.	
	17	B3	糞便	57	D.G.I	4; 11; 32	ML26-24	.	
			糞便	58	A.G.I	6; 186; 42	ML26-25	.	
			糞便	59	G.I	93; 201; 117	ML26-26	PF26-20	
			糞便	60	G.I	93; 201; 117	ML26-26	PF26-20	
	18	B4	糞便	61	G.I	93; 201; 117	ML26-26	PF26-20	
	19	B5	糞便	62	H	106; 55; 37	ML26-27	.	
			糞便	63	B	0; 8; 80	ML26-28	.	
	20	B6	糞便	64	B	0; 8; 80	ML26-29	PF26-21	
			糞便	66	B	0; 8; 80	ML26-30	PF26-21	
			糞便	65	B	0; 16; 48	ML26-30	PF26-22	
	21	B7	糞便	67	A.H	2; 1; 65	ML26-31	.	
	22	B8	糞便	68	C.G.I	4; 10; 0	ML26-32	.	
			糞便	69	D	2; 129; 0	ML26-33	PF26-23	
			糞便	73	D	2; 129; 0	ML26-33'	PF26-23	
			糞便	70	A.D	2; 145; 65	ML26-34	PF26-24	
			糞便	71	A.D	2; 145; 65	ML26-34	PF26-24	
	23	B9	糞便	72	A.D	2; 145; 65	ML26-34	.	
			糞便	74	B.G.I	0; 25; 82	ML26-35	PF26-25	
			糞便	75	A	2; 9; 18	ML26-36	PF26-26	

表3 事例別分離株のSE遺伝子保有状況 (A～E型: *sea*～*see*, G～I型: *seg*～*sei*)

	No	事例No	分離株のSE型	<i>sea</i> 保有株	供試株数	
黄色ブドウ球菌食中毒事例	1	A1	A	3	3	A型SE株が分離された事例: 13事例
	2	A2	A	2	2	
	3	A3	A	2	2	
	4	A4	A	2	2	
	5	A5	A	2	2	
	6	A6	A, G/I	1	2	
	7	A7	A/G/I	6	6	
	8	A8	A, A/B	4	4	
	9	A9	A, A/B	5	5	
	10	A10	A, A/G/I	11	11	
	11	A11	A	2	2	
	12	A12	A	5	5	
	13	A13	G/I	0	2	
	14	A14	A/H	1	1	
				46	49 (93.9%)	A型SE株が分離されなかった事例: 1事例
有症苦情・他の病因による事例	15	B1	A, G/I	1	2	
	16	B2	A, A/C, G/I	2	5	
	17	B3	A/G/I, D/G/I, G/I	1	4	
	18	B4	GI	0	1	
	19	B5	H	0	1	
	20	B6	B	0	4	
	21	B7	A/H	1	1	
	22	B8	C/G/I	0	1	
	23	B9	A/D, D	3	5	
	24	B10	B/G/I	0	1	
	25	B11	A	1	1	
				9	26 (34.6%)	

表4 SE遺伝子保有株が分離された検体数及び事例数

	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/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5 事例由来株のSE型、POT型、MLVA型一覧

	事例No	SE型	POT型			MLVA型別
黄色ブドウ球菌食中毒事例	A01	A	2	193	33	ML26-01
	A02	A	0	19	65	ML26-02
	A03	A	0	51	73	ML26-02
	A04	A	0	115	25	ML26-03
	A05	A	0	51	9	ML26-04
	A06	A	2	17	1	ML26-05
	A06	G,I	4	0	0	ML26-06
	A07	A,G,I	6	170	112	ML26-07
	A07	A,G,I	6	170	112	ML26-08
	A08,9	A,B	0	1	0	ML26-10
	A08,9	A	2	59	47	ML26-11
	A08,9	A	0	51	9	ML26-09
	A10	A	0	1	1	ML26-03
	A10	A,G,I	4	137	80	ML26-06
	A11	A	2	65	33	ML26-12
	A12	A	2	1	0	ML26-13
有症苦情・他の病因による事例	A13	G,I	6	50	1	ML26-14
	A13	G,I	6	50	1	ML26-15
	A14	A,H	2	1	0	ML26-16
	計	POT型15種類 POT+SE型16種				16種
	B01	A	0	1	0	ML26-17
	B06	B	0	8	80	ML26-18
	B06	B	0	8	80	ML26-19
	B06	B	0	8	80	ML26-20
	B02	-	0	9	16	ML26-21
	B02	G,I	0	9	16	ML26-22
	B06	B	0	16	48	ML26-23
	B10	B,G,I	0	25	82	ML26-24
	B02	A,C	2	1	0	ML26-25
	B07	A,H	2	1	65	ML26-26
	B11	A	2	9	18	ML26-27
	B09	D	2	129	0	ML26-28
	B09	A,D	2	145	65	ML26-29
	B08	C,G,I	4	10	0	ML26-30
	B03	D,G,I	4	11	32	ML26-30
	B02	-	4	26	0	ML26-31
	B01	G,I	6	18	81	ML26-32
	B02	A	6	152	34	ML26-33
	B03	A,G,I	6	186	42	ML26-34
	B03,4	G,I	93	201	117	ML26-35
	B05	H	106	55	37	ML26-36
	計	POT型18種類 POT+SE型19種				20種
	合計	POT型31種類 POT+SE型35種				36種

表6-1 同一SE+POT型がMLVAとPFGEで細分化された株

事例No	SE	POT			MLVA	PFGE
B6	B	0	8	80	ML26-28	・
B6	B	0	8	80	ML26-29	PF26-21
B6	B	0	8	80	ML26-30	PF26-21
A5	A	0	51	9	ML26-04	PF26-03
A8,9	A	0	51	9	ML26-09	PF26-03
A9	A	0	51	9	ML26-09	PF26-10
A13	G,I	6	50	1	ML26-14	PF26-15
A13	G,I	6	50	1	ML26-15	PF26-16
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-07	PF26-07
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-08	PF26-07

表6-2 同一MLVA型がPOT型とPFGEで細分化された株

事例No	MLVA	SE	POT			PFGE
A2	ML26-02	A	0	19	65	PF26-02
A3	ML26-02	A	0	51	73	PF26-03
A10	ML26-03	A	0	1	1	PF26-11
A4	ML26-03	A	0	115	25	PF26-04
A6	ML26-06	G,I	4	0	0	PF26-06
A10	ML26-06	A,G,I	4	137	80	PF26-12
B6	ML26-30	B	0	8	80	PF26-21
B6	ML26-30	B	0	16	48	PF26-22
A8,9	ML26-09	A	0	51	9	PF26-03
A9	ML26-09	A	0	51	9	PF26-10

表6-3 同一PFGE型がSE+POT型とMLVAで細分化された

事例No	PFGE	SE	POT			MLVA
A3	PF26-03	A	0	51	73	ML26-02
A5	PF26-03	A	0	51	9	ML26-04
A8,9	PF26-03	A	0	51	9	ML26-09
A7	PF26-07	A,G,I	6	170	112	ML26-07
A7	PF26-07	A,G,I	6	170	112	ML26-08
A10	PF26-11	A	0	1	1	ML26-03
B1	PF26-11	A	0	1	0	ML26-17
B2	PF26-19	-	0	9	16	ML26-20
B2	PF26-19	G,I	0	9	16	ML26-21
B6	PF26-21	B	0	8	80	ML26-29
B6	PF26-21	B	0	8	80	ML26-30

表7 事例由来株のPFGE型別結果

事例 No	SE型	POT型			MLVA型別	PFGE型別
B1	A	0	1	0	ML26-17	PF26-11
A8,9	A,B	0	1	0	ML26-10	PF26-8
A10	A	0	1	1	ML26-3	PF26-11
B6	B	0	8	80	ML26-29	PF26-21
B6	B	0	8	80	ML26-30	PF26-21
B2	-	0	9	16	ML26-20	PF26-19
B2	G,I	0	9	16	ML26-21	PF26-19
B6	B	0	16	48	ML26-30	PF26-22
A2	A	0	19	65	ML26-2	PF26-2
B10	B,G,I	0	25	82	ML26-35	PF26-25
A5	A	0	51	9	ML26-4	PF26-3
A9	A	0	51	9	ML26-9	PF26-10
A8,9	A	0	51	9	ML26-9	PF26-3
A3	A	0	51	73	ML26-2	PF26-3
A4	A	0	115	25	ML26-3	PF26-4
A12	A	2	1	0	ML26-13	PF26-14
A14	A,H	2	1	0	ML26-16	PF26-17
B11	A	2	9	18	ML26-36	PF26-26
A6	A	2	17	1	ML26-5	PF26-5
A8,9	A	2	59	47	ML26-11	PF26-9
A11	A	2	65	33	ML26-12	PF26-13
B9	D	2	129	0	ML26-33	PF26-23
B9	A,D	2	145	65	ML26-34	PF26-24
A1	A	2	193	33	ML26-1	PF26-1
A6	G,I	4	0	0	ML26-6	PF26-6
A10	A,G,I	4	137	80	ML26-6	PF26-12
B1	G,I	6	18	81	ML26-18	PF26-18
A13	G,I	6	50	1	ML26-14	PF26-15
A13	G,I	6	50	1	ML26-15	PF26-16
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-7	PF26-7
A7	A,G,I	6	170	112	ML26-8	PF26-7
B3,4	G,I	93	201	117	ML26-26	PF26-20
小計	POT型24種類、POT+SE型27種				27種	26種
B6	B	0	8	80	ML26-28	・
B2	A,C	2	1	0	ML26-22	・
B7	A,H	2	1	65	ML26-31	・
B8	C,G,I	4	10	0	ML26-32	・
B3	D,G,I	4	11	32	ML26-24	・
B2	-	4	26	0	ML26-19	・
B2	A	6	152	34	ML26-23	・
B3	A,G,I	6	186	42	ML26-25	・
B5	H	106	55	37	ML26-27	・
合計	POT型31種類、POT+SE型35種				36種	

* ”・” PFGE型別未実施

表8 鶏肉及び食中毒事例等から分離された株のSE型とPOT型組み合わせ及び分離された検体数・事例数

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

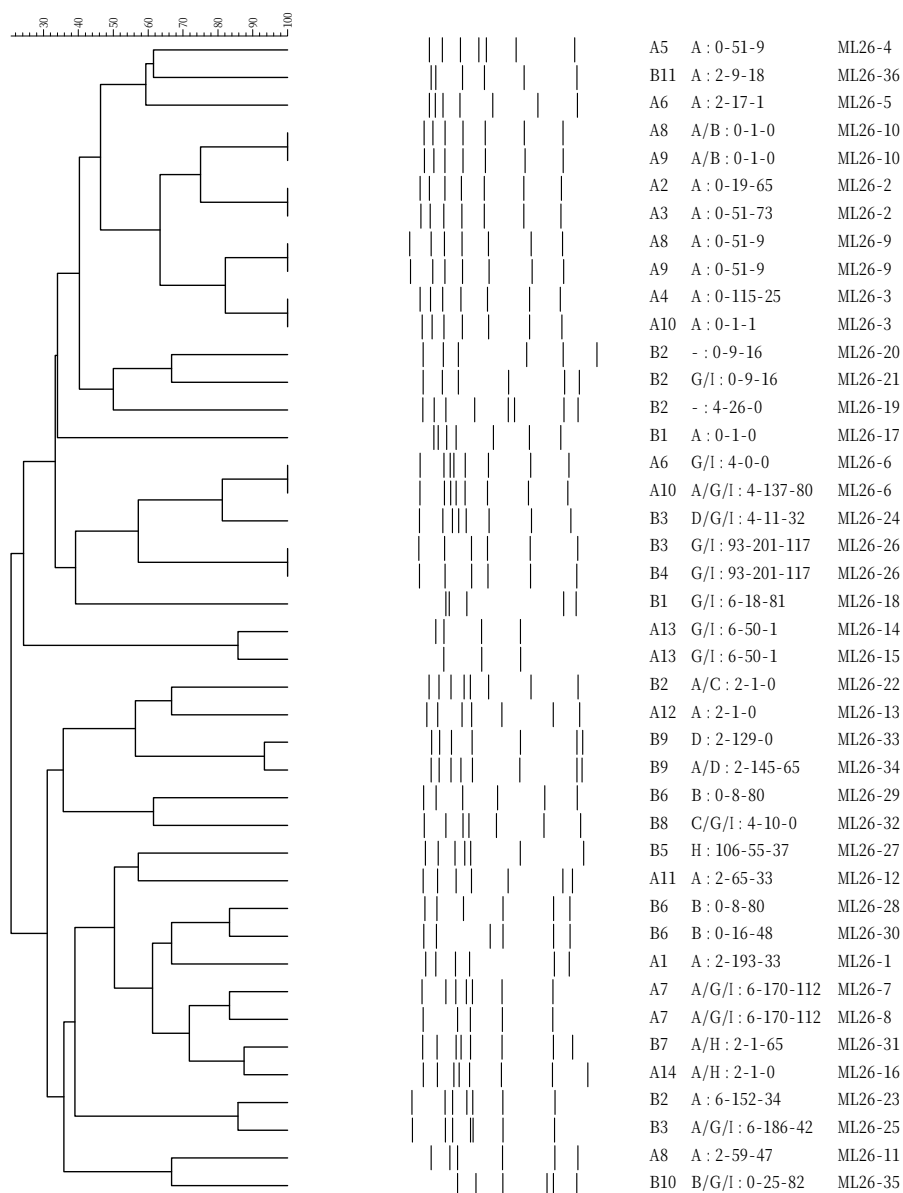


図1 事例等由来株の MLVA パターン系統樹

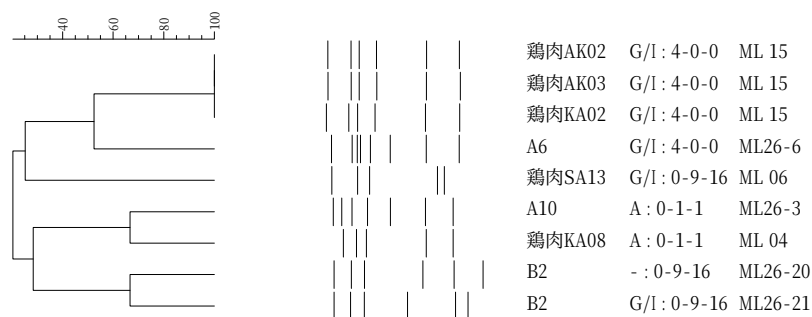


図3 鶏肉由来株（H25）と事例由来株の SE 型：POT 型一致株における MLVA パターンの比較

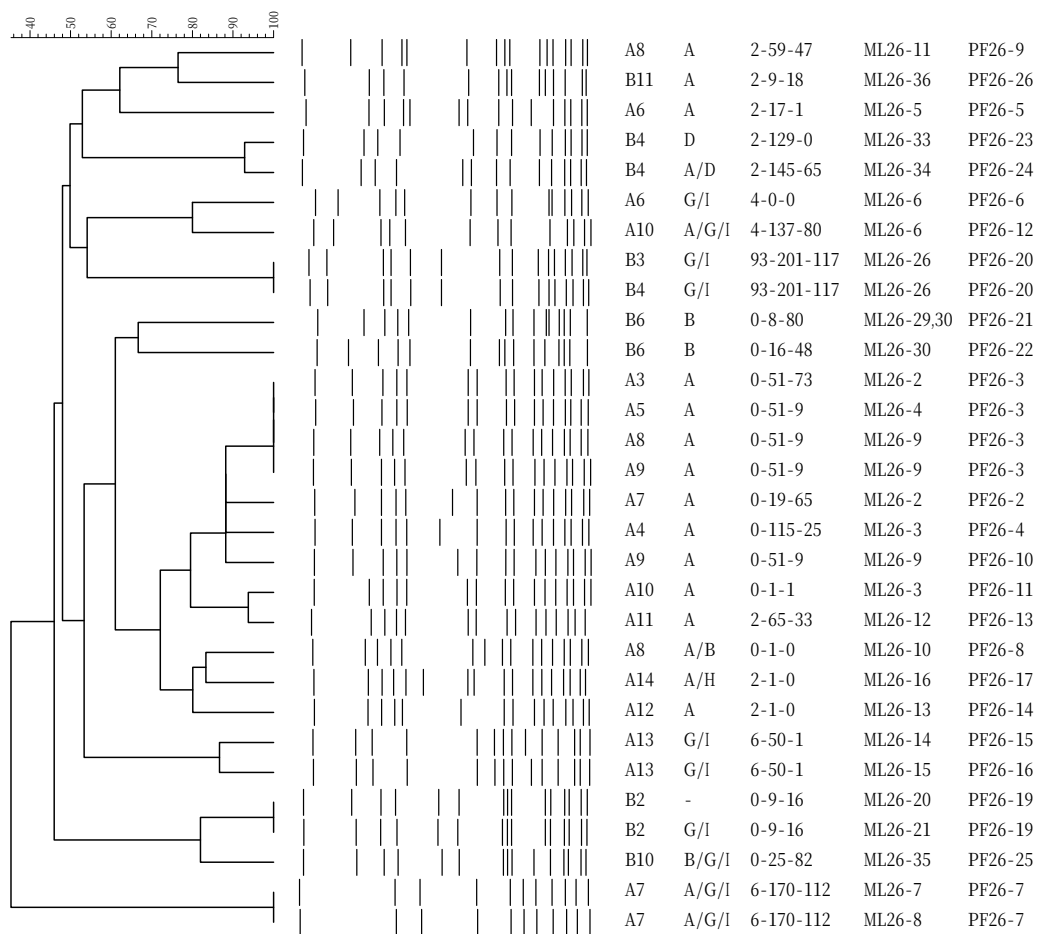


図2 事例由来株の PFGE パターン系統樹

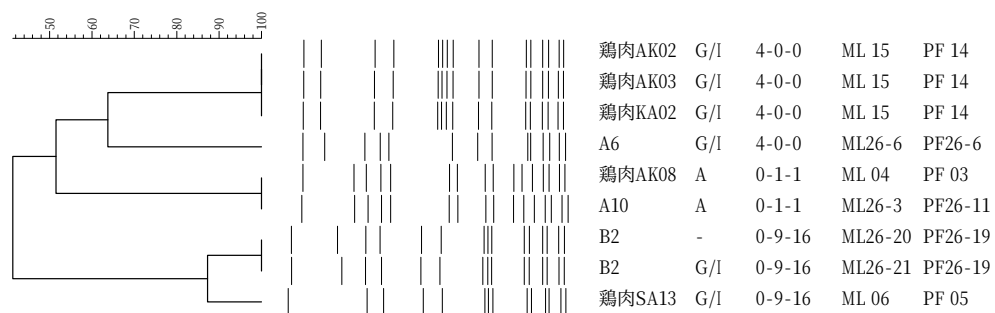


図4 鶏肉由来株（H25）と事例由来株の SE 型：POT 型一致株における PFGE パターンの比較

平成 26 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

Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

研究分担者 黒木俊郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）
研究協力者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）
研究協力者 相川勝弘（神奈川県衛生研究所 微生物部）
研究協力者 古川一郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）

Campylobacter jejuni の型別法として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）は広く普及しており、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。カナダの研究者は、PCR 法を用いた新たな型別法である comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40)を開発した。この CGF40 の国内での導入を目指し、評価を行った。今年度は、*C. jejuni*の標準株を用いて PCR 条件の設定の検討を行った。さらに、*C. jejuni*の分離株を CGF40 により型別を行い、PFGE 法との比較を行った。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni による細菌性食中毒の発生時には、原因物質の特定や食中毒の規模の把握等の疫学調査が実施される。疫学マーカーとして、血清型別、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)法等が利用されている。このうち、識別能の高さなどの理由から PFGE 法が最も普及している。しかし、PFGE 法には結果を得るまでに 3～4 日を要するため、迅速に結果を得ることができない、フラグメント解析

法であるために複数の機関が実施した解析結果を比較することが必ずしも容易ではないといった課題がある。

本研究では、カナダの研究者が開発した、PCR 法を用いる型別法：comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40)（文献 1,2）の国内への導入を目的として、CGF40 の操作法の検討ならびに評価を行った。

B. 研究方法

1) 菌株

CGF40 に用いる PCR 法の条件設定

の検討には、CGF40 の解析結果が既知の標準株 NCTC11168 (ATCC 700819) および RM 1221 (ATCC BAA-1062)を用いた(文献 1)。*C. jejuni* および *C. coli* 分離株の CGF40 による解析には、平成 24 年度に「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」(主任研究者 小西良子)において、市販鶏肉からの分離した株 *C. jejuni* 74 菌株および *C. coli* 8 菌株を用いた。

2) CGF40 の PCR 法の条件の検討

CGF40 の条件は、既報を参照した(文献 1,2)。CGF40 の原法では、対象とする 40 の遺伝子を 5 つずつの 8 セットに分け、各 5 つの対象遺伝子は multiplex PCR により同時に検出する。今回の検討では、taq polymerase の選択、マルチプレックスあるいはシングルでの PCR 反応の実施、および PCR での伸長反応とアニーリングの温度および時間の設定を行った。PCR 法の条件を表 1 に示した。Taq polymerase は Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ)、EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) および Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ)を用いた。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いた。PCR 反応後に 3.0 % NuSieve™ 3:1 アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色後、紫外線下で観察した。

3) PFGE は CDC の方法に従い、制限酵素として *Sma*I を用い、鶏肉分離菌株について解析した。

4) 結果の解析

CGF40 および PFGE で得られた結果は、BioNumerics (Applied Maths)を用いて Pearson の相関係数で類似度を算出し、UPGMA によりクラスター解析を行った。

C. 研究結果

CGF40 による型別結果が公表されている標準株 2 株を用いて、表 1 に示した PCR 条件を設定し、それぞれの条件での結果の検討を行った。NCTC11168 を対象にして Ex Taq Hot Start Version を用いた条件 1~4 では、条件 1 では 10 本のバンドが得られなかったが、シングル PCR で実施した条件 2 では得られなかったバンドが 3 本に減少した。さらに、アニーリングと伸長の時間を 60 秒にした条件 3 でも 3 本のバンドが得られなかった。シングル PCR で実施した条件 4 でも 2 本のバンドが得られなかった。NCTC11168 を対象にして Multiplex PCR Assay Kit を用い、マルチプレックス PCR で実施した条件 5 では、7 本のバンドが得られなかった。NCTC11168 を対象にして EmeraldAmp PCR Master Mix を用いてマルチプレックス PCR で実施した条件 6 では、2 本のバンドが得られなかったが、シングル PCR ではバンドを得ることができた(表 2)。

RM1221 を対象にした場合は、条件

1 では 2 本のバンドが得られなかったが、条件 2 では 1 本のバンドが得られなかった。条件 3 および 4 では、RM1221 の公表された結果と一致した。条件 5 では 2 本のバンドが得られなかったが、条件 6 および 7 では RM1221 の公表された結果と一致した（表 2）。

以上の結果から、CGF40 の PCR 条件の設定の検討において、PCR 反応液として EmeraldAmp PCR Master Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定を 94℃, 5 分→（94℃, 30 秒→55℃, 60 秒→72℃, 60 秒）x35 サイクル→72℃, 5 分に設定した場合に最も良い結果が得られた。PCR 反応条件について、原法の温度と時間の設定では基準株である NCTC11168 および RM1221 の結果において、検出できないバンドがみられたが、アニーリングと伸長反応を原法の 30 秒に対してそれぞれ 60 秒とした条件により結果に改善がみられた。

市販鶏肉から分離された *Campylobacter* について CGF40 を実施した結果、*C. jejuni* 74 菌株は 49 パターン、*C. coli* 8 菌株は 5 パターンに分けられた。これに対し PFGE では、*C. jejuni* は 59 パターン、*C. coli* は 6 パターンに分けられた。CGF40 において同一パターンとなった *C. jejuni* および *C. coli* の菌株のグループは 13 グループ認められ、このうち 7 つのグループでは PFGE パターンが異なる菌株が含まれていた（図 1）。さらに、PFGE による解析から同一パターンとなった菌株のグ

ループも 13 グループ認められ、このうち異なる CGF40 パターンが含まれる菌株のグループは 3 グループであった（図 2）。

CGF40 は *C. jejuni* の識別に開発された方法であるが、*C. coli* 8 菌株を識別することができる結果が得られたことから、本法は食中毒菌に指定される *C. jejuni* および *C. coli* の 2 菌種について解析が可能と思われた。今後、株数を増やして検討する必要がある。

D. 考察

昨年度の報告書で述べたように、*Campylobacter* の型別法には、血清型別や薬剤耐性パターンによる型別があり、さらに遺伝学的手法を用いた型別法として PFGE 法、RFLP 法、リボタイピング、AFLP 法、RAPD 法、MLST 法、*fla* typing 法、SNP 解析法が開発され、利用されている。保健所や地方衛生研究所等で実施される食中毒の疫学調査では、操作性や簡易性等の理由から PFGE 法が最も多用されている。PFGE 法には多くの利点があるが、結果を得るのに 3~4 日を要することや、フラグメント解析法であるために複数の機関での結果の比較に限界があるといった課題もある。そこで、より短時間で結果が得られ、複数の機関間での結果の比較を容易に行うことが可能な解析法として、CGF40 の評価を行った。

昨年度の検討結果から、PCR 法に用いる taq polymerase により PCR の結果が異なることが明らかとなっ

ていた。そこで、今年度は CGF40 による型別結果が既知の標準株 NCTC11168 および RM 1221 を用い、CGF40 に適した PCR 条件の検討を行った。その結果、EmeraldAmp PCR Master Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定条件として 94℃, 5 分→(94℃, 30 秒→55℃, 60 秒→72℃, 60 秒) x35 サイクル→72℃, 5 分とした場合に、もっとも良い結果が得られた。しかし、未だにマルチプレックス PCR ではバンドが得られにくいところが 2 か所あり、今後の検討が必要である。

鶏肉由来株 (*C. jejuni* 74 菌株および *C. coli* 8 菌株) を用いた CGF40 と PFGE 法による型別の比較では、CGF40 では *C. jejuni* 74 株は 49 パターン、*C. coli* 8 株は 5 パターンに分けられたが、PFGE 法では *C. jejuni* は 59 パターン、*C. coli* は 6 パターンに分けられた。さらに、CGF40 のパターンが一致する菌株間で異なる PFGE パターンである場合や、PFGE のパターンが一致する菌株間で異なる CGF40 のパターンを示す場合も認められ、互いの手法で異なる結果が得られるなど、CGF40 は PFGE 法とほぼ同等の識別能を有していることが示され、この結果は既報(文献 1,2)とほぼ同様であった。

E. 結論

C. jejuni の型別法として導入することを目的に、CGF40 の操作法の検討と評価を行った。CGF40 の操作法として、EmeraldAmp PCR Master

Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定条件を既報の条件から変更することで良好な結果が得られた。マルチプレックス PCR では得られにくいバンドがあるため、さらに PCR 条件を検討する必要がある。CGF40 による型別を PFGE 法による型別と比較したところ、ほぼ同等の識別能が得られた。

F. 参考文献

1. Taboada EN, Ross SL, Mutschall SK, Mackinnon JM, Roberts MJ, Buchanan CJ, Kruczkiewicz P, Jokinen CC, Thomas JE, Nash JH, Gannon VP, Marshall B, Pollari F, Clark CG. Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):788-97.
2. Clark CG, Taboada E, Grant CC, Blakeston C, Pollari F, Marshall B, Rahn K, Mackinnon J, Daignault D, Pillai D, Ng LK. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):798-809.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

I. 健康危険情報
なし

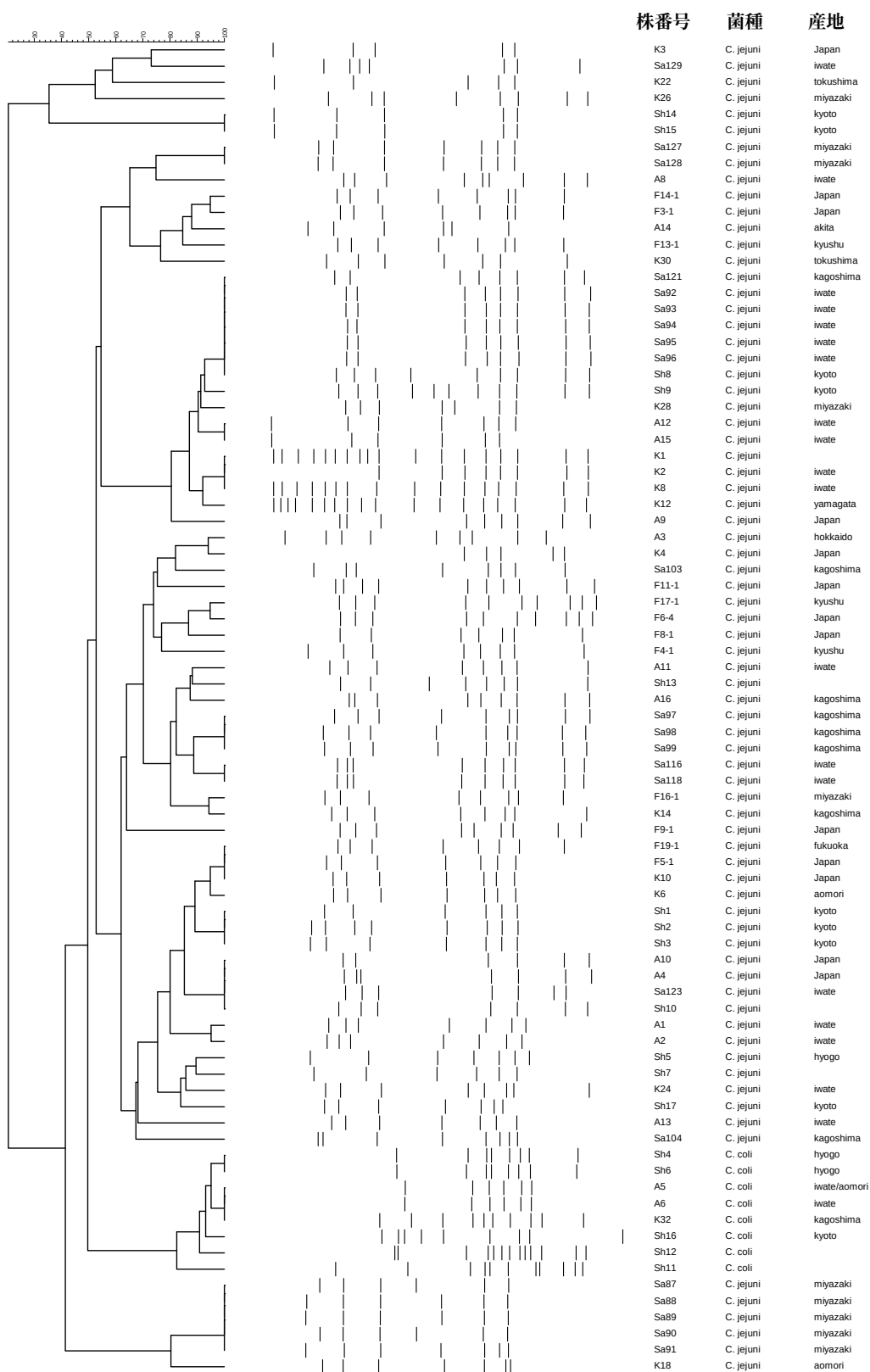


図1 CGF40の結果から作成したデンドログラムおよびPFGEパターン

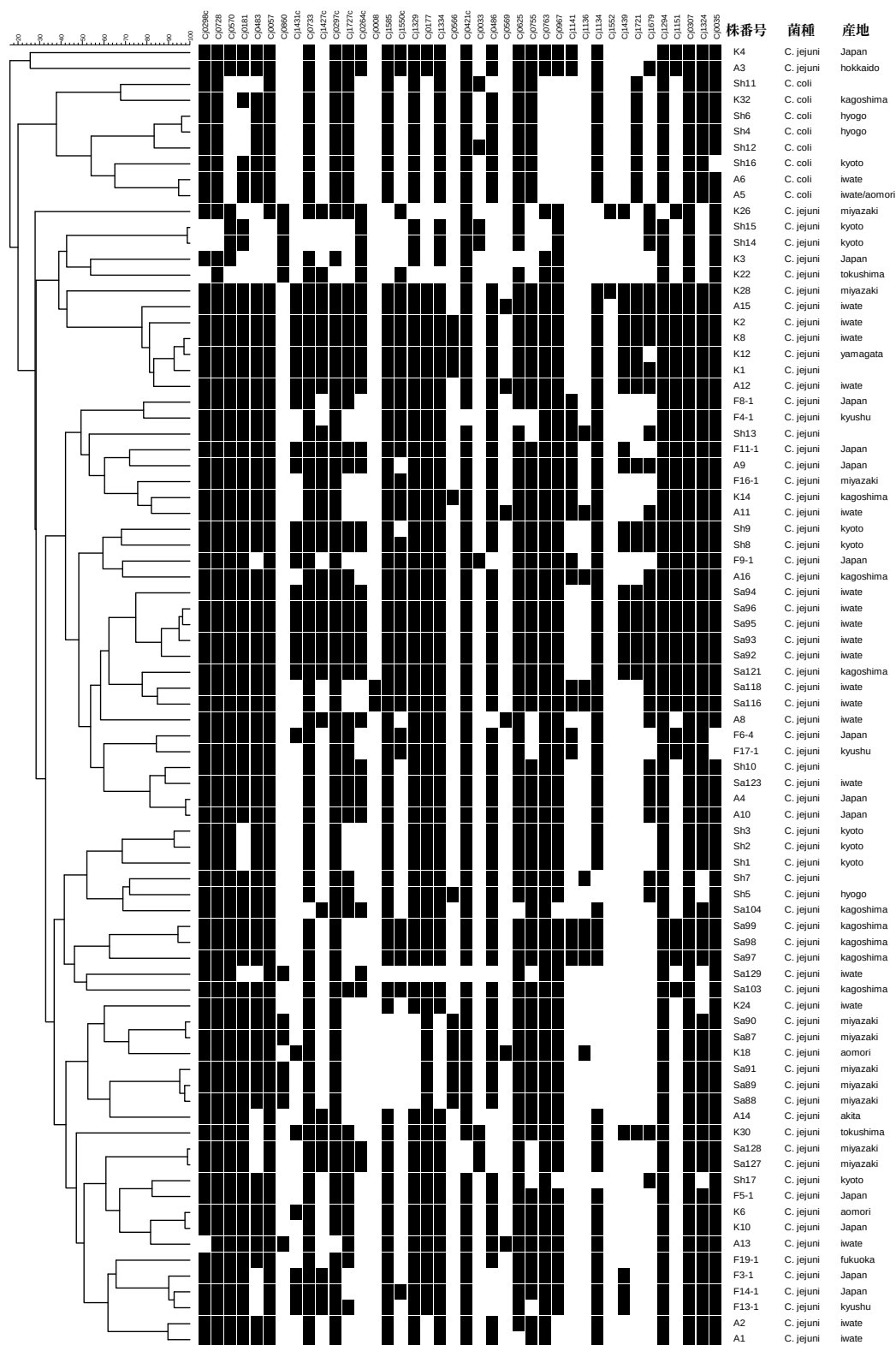


図2 PFGEの結果から作成したデンドログラムおよびCGF40のパターン

表1 PCR 条件の設定において検討した条件

条件	単／複 ^a	温度・時間 ^b	PCR 試薬 (polymerase)
1	M	A	EX Taq Hot Start version
2	S	A	EX Taq Hot Start version
3	M	B	EX Taq Hot Start version
4	S	B	EX Taq Hot Start version
5	M	B	Multiplex PCR Assay Kit
6	M	B	EmeraldAmp PCR Master Mix
7	S	B	EmeraldAmp PCR Master Mix

a: M= マルチプレックス PCR、S= シングル PCR

b: A= 94℃, 5 分→ (94℃, 30 秒→55℃, 30 秒→72℃, 30 秒) x35 サイクル→72℃, 5 分、

B= 94℃, 5 分→ (94℃, 30 秒→55℃, 60 秒→72℃, 60 秒) x35 サイクル→72℃, 5 分

表2 PCR 条件の設定の検討

		CGF_MP1					CGF_MP2					CGF_MP3					CGF_MP4					CGF_MP5					CGF_MP6					CGF_MP7					CGF_MP8						
		Cj 0298c	Cj 0728	Cj 0570	Cj 0181	Cj 0483	Cj 0057	Cj 0860	Cj 1431c	Cj 0733	Cj 1427c	Cj 0297c	Cj 1727c	Cj 0264c	Cj 0008	Cj 1585	Cj 1550c	Cj 1329	Cj 0177	Cj 1334	Cj 0566	Cj 0421c	Cj 0033	Cj 0486	Cj 0569	Cj 0625	Cj 0755	Cj 0763	Cj 0967	Cj 1141	Cj 1136	Cj 1306c	Cj 1552	Cj 1439	Cj 1721	Cj 1679	Cj 1294	Cj 1151	Cj 0307	Cj 1324	Cj 0035		
標準株	NCITC11168																																										
	ATCC 700819																																										
	想定結果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	PCR条件 ^a																																										
	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		
	4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+	NT	NT	NT	NT	-	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
7	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
標準株	RM 1221																																										
	ATCC BAA-2151																																										
	想定結果	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+		
	PCR条件 ^a																																										
	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-		
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-		
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+		
	4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+
5	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+			
6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+			
7	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	

a：表1を参照。 NT：実施せず。

平成 26 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）

食品の流通のグローバル化に伴い、食中毒微生物を原因とする健康被害を受ける可能性も高くなってきている。これらの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、最も検体の採取方法が重要となる。これらサンプリング方法は母集団の汚染を出来るだけ正確に反映するために科学的根拠に基づき確立されなければならない。現在 The International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF) が提唱している二階級法や三階級法を基に、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法が、コーデックス、EU 諸国や米国において実施されている。

本研究では、国際的なサンプリングプランと比べて、日本で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する。前年度は代替病原微生物として蛍光ラテックスビーズ（10 μm ）を用いた実験から、1 バッチ（1kg）から 1 検体 25g を $n=6$ 以上は採取しなければ検出が出来ないことが示され、現在、我が国で行われている $n=1$ のサンプリングプランでは、低濃度汚染の病原微生物の検出は困難であることを示唆した。しかし、サンプリングプランの n 数を多く設定した場合では、多大な時間、費用および労力が課されることになる。そこで我々は Price らが提唱したサンプル・プーリング法（プール法、プレエンリッチメント法）を応用し、食中毒菌であるサルモネラを対象として食品から検出することが可能か検討をした。その結果、プール法とプレエンリッチメント法、何れのサンプリング法を用いても、調理済食品(ready-to-eat、RTE)であるネギトロではサルモネラの汚染菌量が 10^1CFU/g 以上であれば検出できることが確認された。

A. 研究目的

世界各国において食に起因する健康被害を減少させるために、日常的に衛生検査が実施されている。食中毒微生物の食品における分布は不均一であるため、科学的根拠に基づく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となる。衛生管理における微生物のサンプリングプランでは、The International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF) が提唱した2階級法と3階級法が一般的に使われている。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法が設定されていることである¹⁾。

コーデックス規格、EU 諸国におけるサンプリングプランは、原則 ICMSF の考え方を基に作られており、種々の食品又は食中毒起因微生物の違いによって、サンプリングプランが設定されている。

EU におけるサルモネラの規格基準は、乳製品や RTE 食品では $n=5$ であり、免疫力などの弱い乳幼児が食べる調製粉乳やベビーフードでは $n=30$ となっており ISO に試験法が記載されている。リステリア モノサイトゲネス (LM) については乳幼児および特別医療目的の RTE 食品においては $n=10$ が設定されている^{2,3)}。

アメリカの FDA (Food and Drug

Administration) と FSIS (Food Safety and Inspection Service) 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いる。サルモネラのカテゴリー I (サンプリングと消費の間に殺菌工程がなく、乳幼児などリスクが高い対象食品) では $n=60$ 、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) では $n=30$ 、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) では $n=15$ が設定され、試験法は Bacteriological Analytical Manual (BAM) に掲載されている。LM については食品の pH や A_w などの特性や喫食者のリスクによって分類され、 $n=5\sim60$ であり、FSIS の Laboratory Guidebook に試験法が掲載されている^{4,6)}。

一方、我が国の食品衛生法の成分規格に記載されている食肉製品や液卵などのサルモネラ検査のサンプリング法は 25g の $n=1$ である。生ハムやナチュラルチーズなどの RTE 食品で LM が検出された場合は食品衛生法 6 条違反に該当するが、同様に試料量 25g とし $n=1$ で検査が行われている⁷⁾。しかし、この方法で母集団の汚染が正確に反映できているかについては科学的根拠がない。

国際社会との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。しかし、 n 数が多い場合には多大な時間、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

ンプリング法として、サンプル・プーリング法が使われる場合があり、現在、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。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。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。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ため、妥当性の評価が必要となる。

そこで本研究では、代表的な食中毒菌であるサルモネラを RTE 食品のネギトロに接種し、プレエンリッチメント法とプール法の妥当性の評価を目的とした。

B. 研究方法

1. 供試材料

市販ネギトロ：神奈川県の小売店で H26 年 9 月 9 日～12 月 7 日に韓国、フィジー、台湾産ネギトロを購入した。何れの消費期限も 2 日間であった。

2. 供試菌株

・食中毒菌

Salmonella Infantis1383-1 (鶏肉由来)

・ネギトロ由来夾雑菌

Escherichia coli

Citrobacter braakii

3. サルモネラおよび夾雑損傷菌の作製方法 (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および夾雑菌を用いた。

Salmonella Infantis 1383-1 を Brain Heart Infusion (BHI) で 35°C、24h 培養後、ブロックヒーターを用いて、スパイクプロトコール (annex D in draft ISO 16140-2) に基づいて 50°C、15 分加熱処理を行った⁸⁾。

損傷菌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 log CFU 以上であれば損傷菌と判定した。夾雑菌については2菌種を等量混合した後に加熱処理を行い、サルモネラへの処理と同様に実施した。

4. 夾雑菌の分離、同定方法

夾雑菌はネギトロ 10g を用いたサンプリング法の検討時に、DHL 培地と CHS 培地上に高頻度に分離された集落について、アピ 20 (日本バイオメリュー) を用いて同定試験を行った後に、本実験に用いた。

5. 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の検討 (10g、n=4)

実験はdサルモネラ摂取量が 10^1 、 10^0 、 10^{-1} CFU/gとした3群でおこなった。それぞれの群でネギトロ 10g を6検体採取し、それぞれストマッカー袋に入れた。6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 $10^1 \sim 10^{-1}$ 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培地、1ml をTT培地に加えて 42°C 、 22 ± 2 時間培養した。その後、各増菌培養液 10 μ l 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O血清を用いて血清学的試験を行った。ネギトロの細菌数は試料原液を用いて標準寒天培地で 37°C 、48 時間培養後、発育した集落数から算出した(図1)。

6. プール法を用いたdサルモネラの検出方法の検討 (10g, n=4)

プレエンリッチメント法と同様にサンプリングをした後に、1つの三角コルベンに60gを集めサルモネラを接種し、BPW 540ml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(図2)。

7. 夾雑菌のサルモネラ検出率への影響についての検討 (10g, n=1)

各サンプリング法と同様にネギトロを採取し、1つのストマッカー袋に、1g 当たりサルモネラの菌数をそれぞれ $10^0 \sim 10^3$ CFU に調整した後に、夾雑菌も合わせて $10^3 \sim 10^5$ CFU になるようにそれぞれ接種し、プレエンリッチメント法とプール法でサルモネラの検出を行った。

8. ネギトロ 25g を用いた各プーリング法によるdサルモネラの検出方法の検討

(25g, n=4)

サンプリング量を25gとして10gの場合と同様にdサルモネラを接種し各サンプリング法による検出方法の検討を行った。

C. 研究結果

1. dサルモネラおよび夾雑菌の評価

ネギトロに接種するサルモネラ、夾雑菌(*E.coli*、*C.braakii*)の培養液を加熱処理し、それぞれDHL選択培地とSPC非選択培地を用いて菌数の相違を算出し、各表中に損傷度を示した(表1-6)。

2. 各サンプリング法を用いたdサルモネラの検出 (10g, n=4)

10g を採取した場合のプレエンリッチメント法ではネギトロ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。プール法では1回のみ TT 選択増菌培地を用いた場合、 10^0 と 10^{-1} CFU/g でサルモネラを検出することが出来なかった。この検体の細菌数は 9.6×10^3 CFU/g と、他の3回行った検体と比較し約25倍高かったため（表1,2）、ネギトロ中の夾雑菌の汚染量が d サルモネラの検出率に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

3. 夾雑菌のサルモネラ検出率への影響

サルモネラ低濃度汚染ネギトロに夾雑菌を種々の濃度接種し、各サンプリング法でサルモネラの検出率を比較したところ、夾雑菌を 10^3 と 10^5 CFU/g 接種した検体では何れの d サルモネラ接種濃度においても検出をすることが出来たが、 10^4 CFU/g においては、RV 選択増菌培地を用いたプレエンリッチメント法でのみ検出することが出来なかった（表3,4）。プレエンリッチメント法での不検出が夾雑菌濃度に比例していなかったこと、一度だけの実験であることから、再実験は必要であるが、TT 選択増菌培地では、高濃度の夾雑菌においても d サルモネラの検出に影響がなかったことから、ネギトロに含まれる夾雑菌は、d サルモネラの検出に重大な支障を与えないことが明らかになった。

4. ネギトロ 25g を用いた各サンプリング法

による d サルモネラの検出

(25g, n=4)

ネギトロにおいては夾雑菌の影響がほとんど無いことが明らかになったことから、サンプリング量を 25g に増やし、4 回実験を実施した。各回においてサルモネラ汚染菌量が 10^{-1} CFU/g であれば両サンプリング法において検出できることが確認できた。このことから、ネギトロを食品対象とする場合には、両サンプリングプランには差が無いことが明らかになった。（表5,6）。

D. 考察

食中毒微生物の食品への汚染菌量は極少量であり不均一であるため、科学的根拠に基づくサンプリングプランが必要となる。昨年度我々は、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 ($10\mu\text{m}$) 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、低度汚染の検体であってもロット全体の汚染を反映できると考察した。

この結果を踏まえて今年度は、RTE 食品のネギトロに食中毒菌のサルモネラを低濃度接

種し、 $n=6$ の場合のサンプリングプランとして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。

サンプル量を 10g としたプレ実験においては、プール法の 1 回でのみサルモネラが検出されなかった。この検体の細菌数は $9.6 \times 10^8 \text{CFU/g}$ であり、サルモネラが全ての接種濃度において検出された他の 3 回分の平均細菌数より 25 倍高いことから、夾雑菌の影響があったのではないかと考えた。

Price らは *Pseudomonas* sp、*Proteus* sp、*Citrobacter freundii* などの夾雑菌を脱脂粉乳、乾燥卵白に加え、プール法の検出率が低かったことを報告している⁹⁾。我々はネギトロから高頻度に検出された *E. coli*、*C. braakii* の両夾雑菌をネギトロに高濃度接種し、サルモネラ検出への影響を検討したところ、サルモネラを 10^{-1}CFU/g 、夾雑菌を 10^4CFU/g 接種した検体でのみ、プレエンリッチメント法で検出が出来なかったが、夾雑菌の存在下における両サンプリング法の差異は認められなかった。

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

我が国では H26 年に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。）の成分規格にリステリアの基準値が設定された。基準適合性は、対象となる食品検体 1g 当たり、LM 生菌数が 100 を超えないことを定量試験法により $n=5$ で評価し、予備試験を行う場合は、3 箇所以上から検体を採取し、計 25g とし定性試験法により生菌の検出の有無を確認し、本試験を行う事となった¹⁰⁾。今後、食品の食中毒菌の衛生検査においては、複数の検体を採取することがより多く採用されることが考えられる。

本研究においてサンプル・プーリング法の有用性が確認されたが、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示唆されている。諸外国との整合性を計るには n 数が増えると考えられるが、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、何れのサンプリング法を用いても、ネギトロ 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。

2014 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ような傾向が続くと予想されるため、プー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
- 2) Corrigendum to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of November 2005 on microbiological criteria for foodstuff.
- 3) 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.
- 4) BAM: Food Sampling/preparation of Sample Homogenate. April 2003.
- 5) September 2012. FSIS *Salmonella* Compliance

Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products.

6) FSIS Compliance Guidelines: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. January 2014.

7) 食品衛生検査指針 微生物編 厚生労働省 監修 2004 (社) 日本食品衛生協会

8) Kirsten Mooijman, ISO and CEN activities for Salmonella, Technical issues workshop 2011 110519

9) 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

10) 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)

G. 研究発表

論文発表

第31回日本棒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、石崎直人、小西良子 2014

H. 健康危険情報

なし

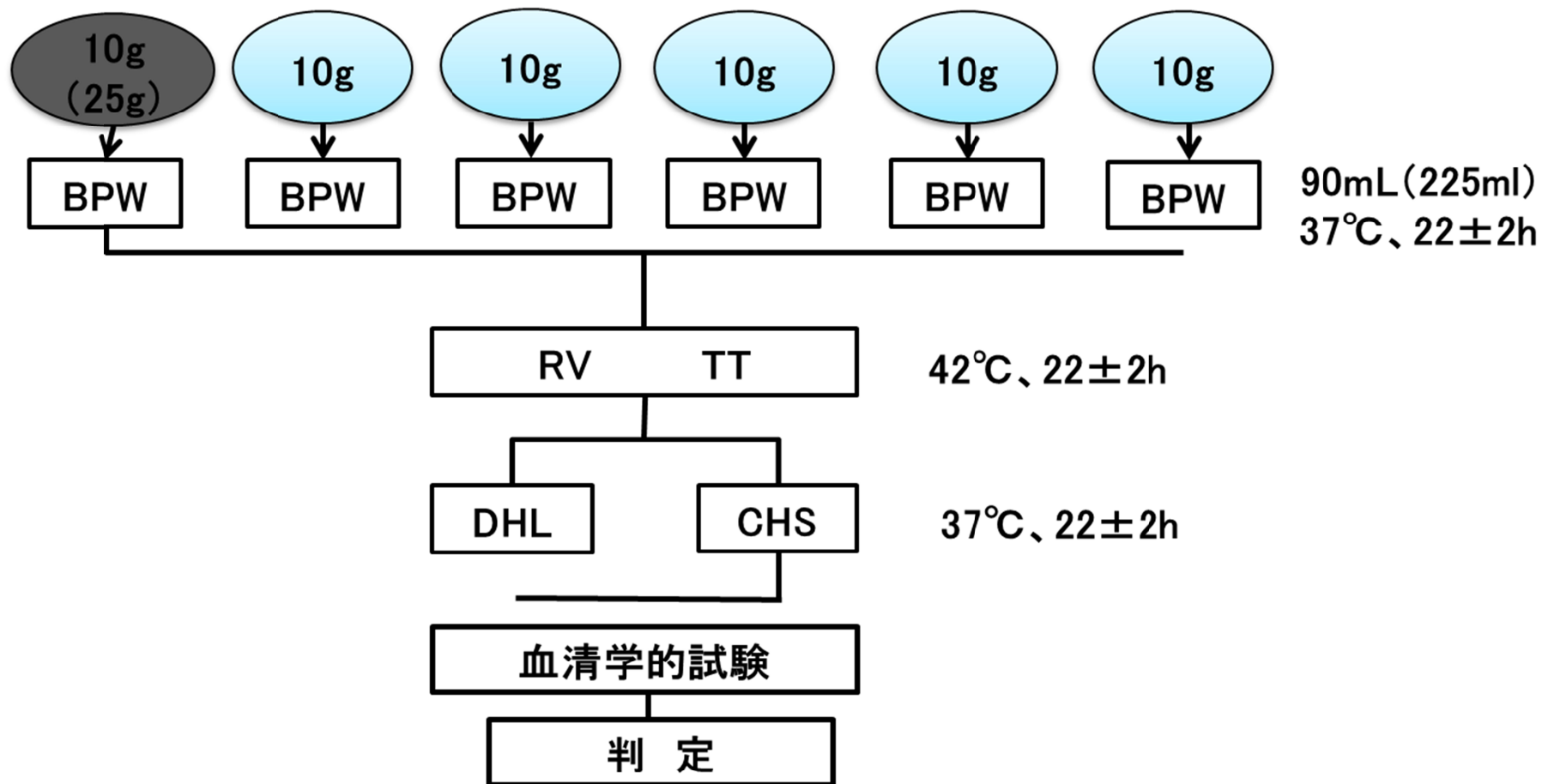


図1. プレエンリッチメント法を用いたサルモネラの検出方法

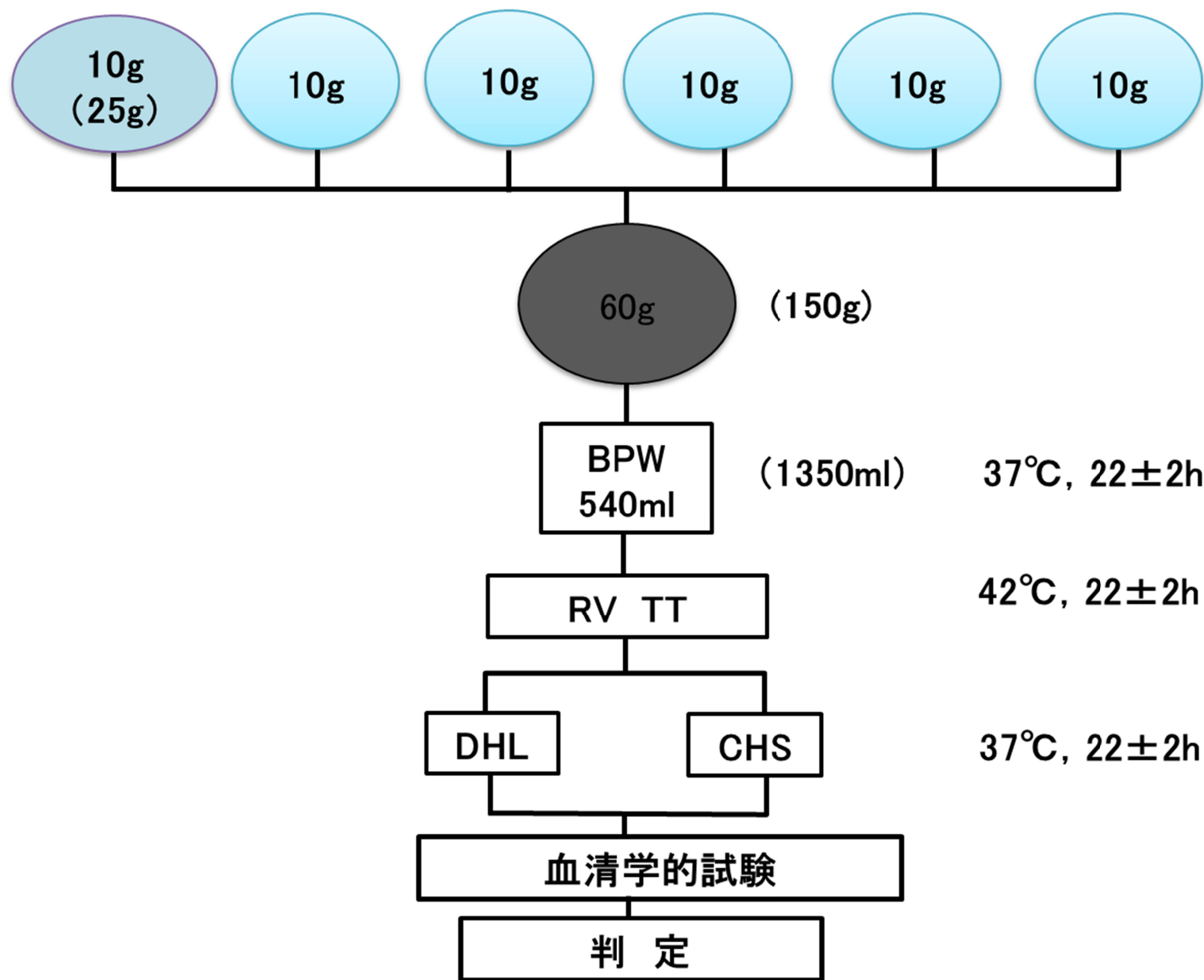


図2. プール法を用いたサルモネラの検出方法

表1. 各サンプリング法の検出結果(10g、n=4)

接種 レベル (/g)	1回目 (SPC: 9.6×10^3 /g)								2回目 (SPC: 3.0×10^2 /g)							
	プレ				プール				プレ				プール			
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		RV		TT	
	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^0	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+

サルモネラの損傷度: 1.5 log CFU

サルモネラの損傷度: 1.4 log CFU

表2. 各サンプリング法の検出結果(10g、n=4)

接種 レベル (/g)	3回目 (SPC: 2.0×10^2 /g)								4回目 (SPC: 6.5×10^2 /g)							
	プレ				プール				プレ				プール			
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		RV		TT	
	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

サルモネラの損傷度: 1.4 log CFU

サルモネラの損傷度: 1.3 log CFU

表3. 夾雑菌のサルモネラ検出率への影響について(10g、n=1)

接種 レベル(/g)		夾雑菌															
		10 ³ CFU/g								10 ⁴ CFU/g							
		プレ				プール				プレ				プール			
		RV		TT		RV		TT		RV		TT		RV		TT	
		DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	10 ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

サルモネラの損傷度: 1.5 log CFU

夾雑菌の損傷度: 1.4 log CFU

表4. 夾雑菌のサルモネラ検出率への影響について(10g、n=1)

接種 レベル(/g)		夾雑菌							
		10^5 CFU/g							
		プレ				プール			
		RV		TT		RV		TT	
		DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	10^0	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-2}	—	—	—	—	—	—	—	—
	10^{-3}	—	—	—	—	—	—	—	—

サルモネラの損傷度: 1.5 log CFU

夾雑菌の損傷度: 1.4 log CFU

表5. 各サンプリング法の検出結果(25g、n=4)

接種 レベル (/g)	1回目 (SPC: 7.5×10^2 /g)								2回目 (SPC: 6.7×10^3 /g)							
	プレ				プール				プレ				プール			
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		RV		TT	
	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

サルモネラの損傷度: 1.2 log CFU

サルモネラの損傷度: 1.3 log CFU

表6. 各サンプリング法の検出結果(25g、n=4)

接種 レベル (/g)	3回目 (SPC: 4.5×10^2 /g)								4回目 (SPC: 6.2×10^3 /g)							
	プレ				プール				プレ				プール			
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		RV		TT	
	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

サルモネラの損傷度: 1.1 log CFU

サルモネラの損傷度: 1.6 log CFU

平成 26 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

遺伝子検出法と培養法を用いたエンテロトキシン産生性
非産生性ウェルシュ菌の食品汚染実態調査

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事例の原因追及の過程で、ウェルシュ菌は乾ししいたけなどの乾燥食品や牛糞便中で芽胞として長期間残存し、原因食品の汚染源となる可能性が示唆された。そこで、今年度は乾ししいたけ 26 検体、市販コショウ 15 検体、牛直腸スワブ 40 検体について、ウェルシュ菌芽胞の汚染実態調査を実施した。その結果、乾ししいたけでは 5 検体（19.2%）からウェルシュ菌が分離され、そのうち、1 検体（3.8%）から CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) 産生菌が分離された。市販コショウでは、4 検体（26.6%）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。コショウの増菌液から *cpe* 遺伝子をターゲットに PCR を行った結果では、1 検体（6.7%）が陽性となったが、CPE 産生菌を分離することはできなかった。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。牛直腸スワブでは 23 検体（57.5%）と高率にウェルシュ菌が検出されたが、CPE 産生菌および BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) 産生菌はともに分離されなかった。従来、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、今回の調査の結果、和食や中華料理の食材として広く使用され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。

- 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、生魚や食肉、特に鶏肉での汚染率が高いことが報告されている。これまでウェルシュ菌食中毒の病原因子として CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin)

が不可欠とされていたが、平成23年に栃木県のホテルで発生したウェルシュ菌食中毒事例では、患者糞便および原因食品のローストビーフから、新型エンテロトキシンBEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*)¹⁾ を産生するウェルシュ菌が分離された。また、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、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。このことから、ウェルシュ菌は、乾ししいたけなどの乾燥食品や牛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。そこで、今年度は、食中毒の原因となるBECあるいはCPEを産生するウェルシュ菌といずれのエンテロトキシンも産生しないウェルシュ菌の食品汚染実態を調査する。また、PCRを用いて増菌培養液から直接、ターゲット遺伝子を高感度に検出する方法を検討する。さらに、サンプルから分離した菌株は、研究代表者らが実施する「ウェ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」に使用し、従来のPFGEの代替法となる新しいタイピング法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 材料

平成25年12月から平成26年8月にかけて、

大阪府内7ヶ所の量販店で乾ししいたけ26検体（原木栽培22検体、菌床栽培4検体）、輸入コショウ15検体（白コショウ4検体、黒コショウ9検体、白黒混合コショウ2検体）を購入し、供試材料とした。

また、平成25年6月に大阪府内のと畜場において、解体後の牛直腸40検体から、スワブを無菌的に採取し、供試材料とした。牛直腸スワブは5都道府県、9農家で飼育された牛から採取した。

2. 方法

1) 食品からのウェルシュ菌分離法

乾ししいたけ等の食品については、食品10gをストマッカー袋に無菌的に採取し、液体チオグリコレート培地（栄研）90mlを加え、80℃、10分加熱処理後、42℃で18±2時間、嫌気培養した。培養後、その増菌液一白金耳をカナマイシン不含卵黄加CW寒天培地（栄研）に塗抹し、42℃で18±2時間、嫌気培養した。判定は、CW寒天培地で卵黄反応陽性のコロニーが検出された検体を推定ウェルシュ菌陽性とした。推定ウェルシュ菌は、3)の記載どおり、α毒素遺伝子(*plc*)をターゲットとしたPCRでウェルシュ菌であることを確認した。PCRで*cpe*遺伝子と*becA*および*becB*遺伝子の保有を確認し、*cpe*遺伝子陽性の株についてCPE産生性をPET-RPLA(デシカ)を用いて確認した。

さらに、増菌培養液から直接、*plc*, *cpe*,
または *becAB* 遺伝子の検出を試みるため、
増菌培養液 1 ml を 1.5 ml 遠心チューブに
移し、15,000 rpm, 5 分間遠心し、上清を
除去した。次に、既報のアルカリ熱抽出
法で芽胞あるいは栄養体の DNA 抽出を行
った²⁾。

2) 牛直腸スワブからのウェルシュ菌分離法

採取したスワブを液体チオグリコレー
ト培地（栄研）10 ml に接種し、80°C、10
分加熱処理後、42°C で 18±2 時間、嫌気培
養した。その後は 1) と同様の方法を行っ
た。

3) PCR 法

DNA 抽出：分離平板上のコロニーを白金線
で極少量採取し、0.1 ml の TE に懸濁後、
100°C、10 分間加熱し、DNA を抽出した。
増菌培養液からの DNA 抽出はアルカリ熱
抽出法で実施した²⁾。

PCR：PCR 反応液は、Ex Taq DNA
polymerase (TaKaRa) と各 0.8 μM のプライマ
ー（表 1）を用いて、24 μl 容量で調整し、
DNA 抽出液を 1 μl 加え、最終容量を 25 μl
とした。反応条件は、94°C, 1 分 → (98°C, 10
秒 → 55°C, 30 秒 → 72°C, 1 分) × 30 cycle →
72°C, 10 分とした。

C. 研究結果

1. 乾燥食品のウェルシュ菌汚染結果

汚染調査の結果を表 2 に示した。乾しい
たけ 26 検体を調べたところ、5 検体 (19.2%)
からウェルシュ菌が検出され、そのうち、1
検体 (3.8%) から CPE 産生菌が検出された。
増菌液 1 ml から直接 DNA を抽出し、PCR を実
施した結果も、26 検体中 5 検体が *plc* 遺伝子
陽性、1 検体が *cpe* 遺伝子陽性で、分離培養
の結果と一致した。*becAB* 遺伝子は増菌液の
PCR、分離培養とも、すべて検出されなかった。
市販コショウ 15 検体については、4 検体
(26.6%) からウェルシュ菌が検出されたが、
CPE 産生菌は検出されなかった。増菌液から
PCR を実施した結果、4 検体 (26.6%) が *plc*
遺伝子陽性で、1 検体 (6.7%) が *cpe* 遺伝子
陽性であった。*cpe* 遺伝子陽性であった検体
について、CW 寒天培地から 100 コロニーを釣
菌したが、CPE 産生菌を分離することはでき
なかった。また、*becAB* 遺伝子は増菌液の PCR、
分離菌とも、すべて陰性であった。

2. 牛直腸スワブのウェルシュ菌汚染結果

牛直腸スワブ 40 検体を調べたところ、23
検体 (57.5%) からウェルシュ菌が検出され
た。分離されたウェルシュ菌はすべて *cpe*,
becAB 遺伝子とも陰性であった。

D. 考察

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。今回、我々が経験した食中毒事例では、疫学調査から「ざるそば」が原因食品である可能性が高く、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。これらのことから、乾ししいたけが汚染源であることが強く疑われたため、我々は、乾燥食品、特に乾ししいたけの汚染実態調査を開始することとした。

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^{3,4)}。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⁵⁾。

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。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。

一方、牛直腸スワブでは、57.5%という高率でウェルシュ菌が検出されたが、CPE産生菌もBEC産生菌も分離されなかった。乾燥食品からはCPE産生菌が低率で検出され、食中毒の原因となるこれらエンテロトキシン産生菌について自然界での分布をさらに調査する

必要がある。

今回、食品の汚染調査で使用した増菌培養液の PCR 法は、分離培養法と同等以上の検出感度と考えられた。実際、コショウの 1 検体から *cpe* 遺伝子陽性が確認されたが、菌を分離することはできなかった。食品中の腸管出血性大腸菌 0157 の検査においても同様のことが報告されている⁶⁾。今後、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は、スクリーニングとして PCR 法を使用することがたいへん有効であると考えられた。

E. 結論

ウェルシュ菌食中毒の原因食品の汚染源として、乾ししいたけ、市販コショウ、牛直腸スワブを調査した結果、乾ししいたけの 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。牛直腸スワブでは 57.5%と高率にウェルシュ菌が検出されたが、CPE 産生菌も BEC 産生菌も分離されなかった。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. 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) Hara-Kudo YI, 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.
- 4) Sagoo SKI, 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.
- 5) 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)

- 6) Kanki M., Seto K., Harada T., Yonogi S. and Kumeda Y. Comparison of four enrichment broths for the detection of non-0157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* 091, 0103, 0111, 0119, 0121, 0145 and 0165 from pure culture and food samples. Lett Appl Microbiol. 2011.53:167-173.
- 7) Erol I, Goncuoglu M, Ayaz ND, Bilir Ormanci FS, Hildebrandt G. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. Lett Appl Microbiol. 2008.Jul;47(1):31-4.
- 8) Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. Am J Vet Res. 1997. Jul;58(7):702-5.

G. 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

- 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.

表1. 使用したプライマー

プライマー名	配列	PCR産物のサイズ	引用文献
CPA F	gctaatgttactgccgttga	324 bp	7) , 8)
R	cctctgatacatcgtgtaag		
CPE F	ggagatgggttgatattagg	233 bp	7) , 8), 1)
R	ggaccagcagttgtagata		
becA F	caatggggcgaagaaaatta	499 bp	1)
R	aaccatgatcaattaaacctca		
becB F	tgcaaatgacccttacactga	416 bp	1)
R	agattggagcagagccagaa		

表2. 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

研究成果に関する一覧表

論文発表

なし

学会発表

なし