

30. ウェルシュ菌新型エンテロトキシン遺伝子の分布調査

○余野木伸哉 大阪府立公衆衛生研究所

【研究目的】

ウェルシュ菌は食中毒の原因菌の一つであり、その病原因子として CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxin) が下痢症の発症に不可欠と考えられていた。ところが、我々は 2009 年と 2010 年に発症状況や分子疫学的情報からウェルシュ菌が原因と強く疑われるが、分離したウェルシュ菌が CPE 非産生性である食中毒事例を経験した。我々はこれらの食中毒事例で分離された CPE 非産生性ウェルシュ菌が CPE と異なるエンテロトキシンを産生すると考え、毒素の精製・同定を進め、新規エンテロトキシンとして BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) を同定した (Infect Immun. 2014, 82(6):2390-9.)。BEC は a 成分 (BECa) と b 成分 (BECb) で構成される ADP リボシル化 2 成分毒素の一つに分類されることを明らかにし、これまでにそれぞれのコード遺伝子 *becA* と *becB* (以下、両方の遺伝子をさす場合 *becAB* 遺伝子とする) および従来のエンテロトキシン (*cpe*) 遺伝子とすべてのウェルシュ菌が保有しているホスホリパーゼ C (*plc*) 遺伝子をインターナルコントロールとする同時遺伝子検出系を構築した。

これまでに人の糞便由来のウェルシュ菌株について *becAB* 遺伝子の保有を調査した。下痢症患者から分離された CPE 産生性ウェルシュ菌 10 株、CPE 非産生性ウェルシュ菌 9 株および健康人から分離された CPE 産生性ウェルシュ菌 1 株、CPE 非産生性ウェルシュ菌 16 株について検査し、健康人から分離された CPE 非産生性ウェルシュ菌 1 株から *becAB* 遺伝子を検出した (表 1)。

本研究では構築した遺伝子検出系を用いて牛の直腸スワブや各種食品からウェルシュ菌を分離し、分離菌について *becAB* および *cpe* 遺伝子の保有状況を調査することを目的とした。

【研究方法】

本研究では牛の直腸スワブおよび各種食品からウェルシュ菌を分離し、分離菌について *becAB* 遺伝子、*cpe* 遺伝子および *plc* 遺伝子の保有を調査した。

<牛の直腸スワブの検査>

40頭の牛から直腸スワブを採取しウェルシュ菌の分離を行った。採取したスワブは液体チオグリコレート培地に接種し、80℃で10分間加熱を行い42℃で20時間嫌気培養した。増菌培養液をカナマイシン不含の卵黄加 CW 寒天培地に接種し、42℃で20時間嫌気培養した。卵黄反応を示したコロニーについてボイル法でPCR用のテンプレートを作製し、*becAB*、*cpe* および *plc* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR 法を実施し、菌株の各遺伝子の保有を確認した。

<野菜、果物や魚介類の検査>

検体それぞれ 4g を 20ml のチオグリコレート培地に接種し、80℃で10分間加熱を行ったのち42℃で20時間嫌気培養を行った。増菌培養液をカナマイシン不含の卵黄加 CW 寒天培地に接種し、42℃で20時間嫌気培養した。卵黄反応を示したコロニーについてボイル法でPCR用のテンプレートを作製し、*becAB*、*cpe* および *plc* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR 法を実施した。

検査は野菜7検体（トマト3検体、キュウリ2検体、スプラウト1検体、サラダ菜1検体）、果物6検体（ブドウ3検体、スイカ2検体、メロン1検体）、魚介類6検体（イワシ、アジ、サバ、イカ、湯引きハモ、釜揚げちりめん各1検体）の計19検体について行った。

<コショウと乾ししいたけの検査>

コショウと乾ししいたけ10gを90mlの液体チオグリコレート培地に接種し、80℃で10分間加熱を行い、42℃で20時間嫌気培養した。増菌培養液からアルカリ熱・抽出法によりDNAを抽出し、これをPCR用のテンプレートとして *becAB*、*cpe* および *plc* 遺伝子に対するマルチプレックスPCR法を実施した。また、増菌培養液をカナマイシン不含の卵黄加CW寒天培地に接種し、42℃で20時間嫌気培養した。卵黄反応を示したコロニーについてPCR用のテンプレートをボイル法で作製し、*becAB*、*cpe* および *plc* 遺伝子に対するマルチプレックスPCR法を実施し、菌株の保有する遺伝子を確認した。

また、乾ししいたけ20検体については海外で一般的に使用されている卵黄加 Trypton Sulphite Cycloserine (TSC) 寒天培地で分離培養を行い、卵黄加CW寒天培地と比較した。

【研究結果】

<牛の直腸スワブの検査>

40検体のうち23検体からウェルシュ菌 (*plc* 遺伝子陽性) が分離された。分離菌はすべて *cpe* 遺伝子、*becAB* 遺伝子ともに陰性であった (表2)。

<野菜、果物や魚介類の検査>

19検体すべてウェルシュ菌は検出されなかった (表2)。

<コショウと乾ししいたけの検査>

コショウ12検体のうち3検体からウェルシュ菌が分離された。増菌培養液を使用したスクリーニング検査ではウェルシュ菌が分離された3検体のうち1検体から *cpe* 遺伝子が検出された。この1検体について *cpe* 遺伝子保有菌株の分離を試みたが、分離した100株はすべて *cpe* 遺伝子を保有していなかった (表2)。

乾ししいたけ26検体のうち5検体からウェルシュ菌が分離された。5検体から分離されたウェルシュ菌のうち1検体の分離菌は *cpe* 遺伝子を保有していた (*becAB* 遺伝子は陰性)。その他の4検体は *becAB*、*cpe* 遺伝子ともに陰性であり、分離菌のPCR法と増菌液で行ったスクリーニングPCR法の結果とは一致していた (表2)。乾ししいたけ20検体についてTSC寒天培地とCW寒天培地とで分離培養の比較を行った。20検体のうちCW寒天培地は5検体、TSC寒天培地は4検体で卵黄反応を示すコロニーを確認した。増菌液を用いたスクリーニング法で3検体から *plc* 遺伝子を検出し、それぞれの分離培地で卵黄反応を示した分離菌で *plc* 遺伝子が陽性となった3検体と一致していた (表3)。

		菌株数	分離菌PCR		
			<i>plc</i>	<i>cpe</i>	<i>becAB</i>
ヒト糞便		36	36	11	1
下痢症患者	CPE産生性ウエルシュ菌	10	10	10	0
	CPE非産生性ウエルシュ菌	9	9	0	0
健康人	CPE産生性ウエルシュ菌	1	1	1	0
	CPE非産生性ウエルシュ菌	16	16	0	1

表1. 人の糞便における *becAB* 遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染状況

	検体総数	ウエルシュ菌 陽性検体数	増菌液PCR			分離菌PCR		
			<i>plc</i>	<i>cpe</i>	<i>becAB</i>	<i>plc</i>	<i>cpe</i>	<i>becAB</i>
牛直腸スワブ	40	23	NT	NT	NT	23	0	0
食品								
野菜	7	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT
果物	6	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT
魚介類	6	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT
コショウ	12	3	3	1	0	3	0	0
乾ししいたけ	26	5	5	1	0	5	1	0

表2. 今回の調査結果

NT: 実施せず

	卵黄反応 陽性検体数	分離菌PCR			
		<i>plc</i>	<i>cpe</i>	<i>becAB</i>	
CW寒天培地	5	3	0	0	乾ししいたけ20検体 について検査
TSC寒天培地	4	3	0	0	

表3. 分離平板 (TSC 寒天培地と CW 寒天培地) の比較

【考察と今後の課題】

2009年と2010年に発生したBEC産生性ウエルシュ菌による食中毒事例の原因食品はローストビーフと考えられ、その汚染源として牛肉や牛の腸管内容物が疑われた。今回の調査で牛の直腸スワブ40検体から*becAB*遺伝子を保有するウエルシュ菌は検出されなかった。また、野菜・果物・魚介類あわせて19検体、コショウ12検体や乾ししいたけ26検体から*becAB*遺伝子を保有するウエルシュ菌は検出されず、BEC産生性ウエルシュ菌の分布はCPE産生性ウエルシュ菌に比べて少ないことが分かった。これまでに健康人1人から*becAB*遺伝子を保有するウエルシュ菌が分離されているが(表1)、人の糞便における汚染の詳細は不明である。今後、調査を続け*becAB*遺伝子を保有するウエルシュ菌の汚染状況をさらに明らかにする予定である。

本研究で*becAB*遺伝子を保有するウエルシュ菌は検出されなかったが、コショウ1検体で増菌

培養液に対するスクリーニング検査で *cpe* 遺伝子を確認し、乾ししたけ 1 検体から CPE 産生性ウェルシュ菌を分離した。コショウはカレー、シチューなどの煮込み料理に、乾ししたけは煮物や中華丼などウェルシュ菌食中毒の原因食品としてたびたびみられる料理に使用される。今回の結果からコショウや乾ししたけが CPE 産生性ウェルシュ菌による食中毒の原因となる可能性が示唆された。ウェルシュ菌は人や動物の腸管のほか土壌などの環境中にも存在し、土壌が付着するさまざまな食品に存在していることが考えられる。BEC 産生性ウェルシュ菌に加えて CPE 産生性ウェルシュ菌の分布状況についてもさらに調査を進めたい。

コショウと乾ししたけの検査では増菌培養液から抽出した DNA を用いてスクリーニングのための PCR 法を実施した。コショウ 1 検体がスクリーニング法で *cpe* 遺伝子陽性となり CPE 産生性ウェルシュ菌の存在が示唆されたが、分離されたウェルシュ菌 100 株はすべて *cpe* 遺伝子陰性であった。そのほかの検体ではスクリーニング法と分離菌に対する PCR 法の結果は一致していた。これらのことから液体チオグリコレート培地から DNA を抽出する本スクリーニング法は食品のウェルシュ菌汚染を調査する上で有用と考えられた。

TSC 寒天培地と CW 寒天培地との分離を比較し乾ししたけ 20 検体のうちスクリーニング PCR 法によって 3 検体が *plc* 遺伝子陽性となった。それぞれの分離平板で卵黄反応を示した分離菌のうち、同じ 3 検体から分離された菌が *plc* 遺伝子陽性となりスクリーニング PCR 法の結果と一致していた。今後、卵黄反応を示し *plc* 遺伝子が陰性となった株について菌種の同定作業を行い、二つの培地の特性を詳細に比較する必要がある。

【経費使途明細】

交通費（助成金贈呈式への参加）		350 円
食品検体代金	コショウ 5 検体、乾ししたけ 6 検体	5,969 円
チオグリコール酸培地 II 栄研（栄研化学 E-MI12）	3 個	19,828 円
CW 寒天培地 栄研（栄研化学 E-MG05）	1 個	9,396 円
ウェルシュ菌基礎寒天（TSC and SFP）（OXOID CM0587）	1 個	24,300 円
パーフリンジェンス選択サプリメント（OXOID SR088）	1 個	32,140 円
QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit（100）（キアゲン Cat.no. 206152）	6 個	163,791 円
ワトソン 0.2ml PCR 8 連チューブドームキャップつき（ワトソン 137-232C）	3 個	25,909 円
Agarose-I（同仁化学研究所 A00）	1 個	20,347 円
Ethidium Bromide Dropper Bottle（ジェネシーサイエンテフィック 20-276）	1 個	2,970 円
	合計	305,000 円

*本研究は「平成 25 年度 大同生命厚生事業団 地域保健福祉研究助成」の他に「平成 26 年度 厚生労働科学研究費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」の支援を受けて実施している。