

資料

## CHROMagar™ *C. perfringens* (トリアル品) を用いたエンテロトキシン

### 遺伝子陽性ウェルシュ菌の糞便検体からの添加回収

世良暢之・前田詠里子・丸田直子・重村洋明・西田雅博・  
曾根美紀\*・加藤直樹\*・小林昭彦\*・大西貴弘\*\*

食中毒の病因物質となり得るエンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌が、エンテロトキシン遺伝子陰性ウェルシュ菌やその他のクロストリジウム属菌等の夾雑菌を添加した糞便から効率的に回収できるかどうかについて、3種類の培地 (ECW+培地、CCP培地及びTSC培地) を用いて検討した。その結果、夾雑菌を添加した糞便からのウェルシュ菌の回収率は非常に低く、食中毒事例発生時において有症者便からエンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌を分離することは困難を極めると思われた。しかしながら、従来から用いられているECW+培地に加え、CCP培地を併用することで、分離できる可能性がわずかながら上昇した。これらの結果から、糞便検査において、エンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌を試験検査する際には、従来から用いられているECW+培地に加え、CCP培地を併用することが有用であると思われた。

[キーワード: ウェルシュ菌、CHROMagar™ *C. perfringens* (トリアル品)、添加回収]

#### 1 はじめに

ウェルシュ菌による食中毒事例発生時において、病因物質であるエンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌を効率良く分離することは迅速な原因究明をする上で非常に重要である。ここでは、新しく開発された酵素基質を添加して発育集落の色調により識別を容易にしたCHROMagar™ *C. perfringens* (CHROMagar社、トリアル品、以下 CCP 培地) が糞便からのエンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌の分離に有用であるかどうかを検証するため、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) 及び卵黄反応と黒色集落を釣菌指標とする Trypton sulphite cycloserine 寒天培地 (Oxoid 社、以下 TSC 培地) と比較検討した。

#### 2 研究材料及び方法

##### 1. 材料

##### (1) 供試菌株

供試菌株は、さいたま市健康科学研究センターで分離

福岡県保健環境研究所 (〒818-0135 太宰府市大字向佐野 39)

\*さいたま市健康科学研究センター

(〒338-0013 さいたま市中央区鈴谷 7-5-12)

\*\*国立医薬品食品衛生研究所

(〒158-0098 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

されたウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* S7 (エンテロトキシン遺伝子陰性株) 及び *C. perfringens* S9 (エンテロトキシン遺伝子陽性株)、理化学研究所より購入したクロストリジウム属菌 (*C. bifementans* DSM14991、*C. sporogenes* JCM1416、*C. difficile* DSM1296 及び *C. sordellii* JCM3814) の6株を用いた。

##### (2) 培地

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

##### (3) 糞便

添加回収のための糞便には、ウェルシュ菌が含まれていないことを確認した糞便を選定した (表1)。

#### 2. 方法

##### (1) 試験菌液の調整

試験菌原液は、保存しておいたウェルシュ菌及びクロストリジウム属菌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±1℃で22±2時間嫌気培養した培養菌液とした。試験菌液の希釈は、試験菌原液をYamamoto-Osakiら<sup>1)</sup>の嫌気性希釈液を用いて10倍から10<sup>7</sup>倍まで100倍或いは10倍段階希釈して用いた。

##### (2) 培養

培養は、発育菌数の測定ではMiles&Misraら<sup>2)</sup>の方法 (以下ミスラ法) を用い、その他の試験においては画線

培養法を用い、アネロパックケンキを用いて、35±1℃で22±2時間、嫌気培養した。

### (3) 便への添加回収試験

#### 1) 添加回収試験1 (回収率の検討)

生食8.9mlにウェルシュ菌 (*C.perfringens* S7或いはS9のいずれか、試験菌原液) 0.1mlを添加し、1分間、混釈した。上記に便1gを添加して、さらに1分間、混釈した。混釈液を、嫌気性希釈液で、10倍段階希釈した後、3種類の培地各2枚に、ミスラ法で滴下し、嫌気培養した。

#### 2) 添加回収試験2 (ウェルシュ菌の検出)

生食8.5mlにウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7或いはS9のいずれか、試験菌原液、100倍段階希釈) 0.1ml、クロストリジウム属菌 (*C.bifermentans*、*C.sporogenes*、*C.difficile*及び*C.sordellii*) 各0.1mlを添加し、1分間、混釈した。上記に便1gを添加して、さらに1分間、混釈した。3種類の培地各2枚に、画線し、嫌気培養した。

#### 3) 添加回収試験3 (エンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌の検出)

生食8.4mlにウェルシュ菌 (*C.perfringens* S7及びS9の両方、試験菌原液、10倍段階希釈) 各0.1ml、クロストリジウム属菌 (*C.bifermentans*、*C.sporogenes*、*C.difficile*及び*C.sordellii*) 各0.1mlを添加し、1分間、混釈した。上記に便1gを添加して、さらに1分間、混釈した。3種類の培地各2枚に、画線し、嫌気培養した。3種類の培地2枚から、培地の種類毎に10集落を釣菌し、PCRで、エンテロトキシン遺伝子を確認した。

#### (4) エンテロトキシン遺伝子の確認

ウェルシュ菌のDNAは、分離した単一コロニーの中心部から滅菌チップなどで菌体を釣菌、100µlの滅菌蒸留水に懸濁し、95℃で5分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用した。PCRはタカラバイオのCPE-1&2 (S020) に従い、20µl系で実施した。

## 3 結果

### (1) 添加回収試験1

ウェルシュ菌のみ (*C.perfringens* S7或いはS9のいずれか) を3種類の糞便へ添加し、3種類の培地を用いて回収試験を実施した結果、抗生物質投与済みの便からは全く回収されなかった。それ以外の便からの回収率も低く、数%～20数%程度で、培地による差は認められなかった (表2)。

### (2) 添加回収試験2

ウェルシュ菌 (*C.perfringens* S7或いはS9のいずれか) に夾雑菌であるクロストリジウム属菌4種類を同時に共存させた際の添加回収について検討した結果、試験菌原液のウェルシュ菌を添加した際には、夾雑菌が存在して

も、ECW+培地及びCCP培地からは回収が可能であったが、TSC培地からは回収されなかった (表3)。

### (3) 添加回収試験3

ウェルシュ菌 (*C.perfringens* S7及びS9の両方) と夾雑菌であるクロストリジウム属菌4種類を同時に共存させ、*C.perfringens* S9 (エンテロトキシン遺伝子陽性株) が回収できるかどうかについて検討した結果、試験菌原液のエンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌を添加した際には、ECW+培地及びCCP培地においてのみ、回収が可能であった (表4)。

## 4 考察

ウェルシュ菌分離用に新しく開発されたCCP培地が、エンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌を糞便から効率的に分離できるどうか検証するため、従来から用いられている2種類の培地 (ECW+培地及びTSC培地) と比較検討した。その結果、エンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌を、エンテロトキシン遺伝子陰性株及びその夾雑菌であるクロストリジウム属菌を同時に添加した糞便から回収することは非常に難しいことが分かった。特に抗生物質を投与されている有症者便からの回収は非常に困難であり、抗生物質投与前の糞便を確保することが食中毒発生時の原因究明には非常に重要であると思われた。今回の試験で、食中毒事例発生時等において有症者便等からエンテロトキシン遺伝子陽性のウェルシュ菌を分離する際には困難が予想されるものの、従来から用いられているECW+培地に加え、新しく開発されたCCP培地を併用することが有用であると思われた。

## 文献

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

## 謝辞

本研究は、平成27年度厚生労働科学研究費補助金「食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究 (H25-食品-一般-014)」により行った。本研究を進めるにあたり、CHROMagar™ *C.perfringens* (トリアル品) を提供いただきました関東化学株式会社の関係各位、当所の香月進所長、岡元冬樹氏、さいたま市健康科学研究センターの宮崎元伸所長に深謝いたします。

表 1 添加回収に使用した糞便検体の情報

検体番号	有症者	喫食場所	潜伏時間	症状	抗生物質	検査結果		
						細菌・寄生虫	ウイルス	備考
便 1	24歳、男	飲食店	約30時間	水様性下痢 5回/日 嘔吐 2回/日 嘔気	クラリスッド錠200mg	陰性	ノロウイルスGII.17	—
便 2	31歳、男	飲食店	約6時間	水様性下痢 5~6回/日 嘔吐 10回/日 嘔気 発熱 37.9℃ 頭痛 悪寒 倦怠感	無し	ブドウ球菌検出	実施せず	ヒラメからクドア検出
便 3	30歳、女性	飲食店	約9時間	水様性下痢 2~3回/日 嘔吐 5回/日 嘔気 発熱 37.5℃ 頭痛 悪寒 倦怠感	無し	陰性	実施せず	ヒラメからクドア検出

表 2 ウェルシュ菌のみを糞便に添加した際の 3 種類の培地からの回収試験結果

供試菌株	添加菌量 (cfu/g)	添加材料	比較検討した培地 (cfu/g)		
			ECW	CCP	TSC
<i>C. perfringens</i> S7	875,000	便 1	0 (0%)	1 (0%)	2 (0%)
	875,000	便 2	39,167 (4.48%)	64,500 (7.37%)	132,500 (15.1%)
	875,000	便 3	433 (0.05%)	8,000 (0.91%)	67,500 (7.71%)
<i>C. perfringens</i> S9	125,000	便 1	0 (0%)	1 (0%)	0 (0%)
	125,000	便 2	7,000 (5.60%)	30,500 (24.4%)	6,000 (4.80%)
	125,000	便 3	8 (0.01%)	1,850 (1.48%)	1,625 (1.30%)

表3 ウェルシュ菌に夾雑菌としてその他のクロストリジウム属菌を同時に添加した際の回収試験結果

供試菌株		添加材料	添加した夾雑菌 (cfu/g)		ウェルシュ菌の回収		
ウェルシュ菌	添加菌量 (cfu/g)		クロストリジウム属菌		ECW	CCP	TSC
<i>C. perfringens</i> S7	875,000	便1	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	-	-	-	
	8750			-	-	-	
	88			-	-	-	
	875,000	便2	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	+	+	-	
	8750			-	-	-	
	88			-	-	-	
	875,000	便3	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	-	+	-	
	8750			-	-	-	
	88			-	-	-	
<i>C. perfringens</i> S9	125,000	便1	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	-	-	-	
	1250			-	-	-	
	13			-	-	-	
	125,000	便2	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	-	+	-	
	1250			-	-	-	
	13			-	-	-	
	125,000	便3	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	-	+	-	
	1250			-	-	-	
	13			-	-	-	

(+, 回収可能、-, 回収不可)

表4 エンテロトキシン遺伝子陽性ウェルシュ菌に、エンテロトキシン遺伝子陰性ウェルシュ菌及びその他のクロストリジウム属菌を同時に添加した際の回収試験結果

供試菌株		添加材料	添加したウェルシュ菌及び夾雑菌 (cfu/g)		エンテロトキシン遺伝子陽性 ウェルシュ菌の集落数		
ウェルシュ菌	添加菌量 (cfu/g)		ウェルシュ菌 S7	クロストリジウム属菌	ECW	CCP	TSC
<i>C. perfringens</i> S9	125,000	便1	875,000	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	0	0	0
	12,500		87,500		0	0	0
	1,250		8,750		0	0	0
	125		875		0	0	0
	13		88		0	0	0
<i>C. perfringens</i> S9	125,000	便2	875,000	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	1	2	0
	12,500		87,500		0	0	0
	1,250		8,750		0	0	0
	125		875		0	0	0
	13		88		0	0	0
<i>C. perfringens</i> S9	125,000	便3	875,000	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. bifermentans</i>, 8.1x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. sporogenes</i>, 4.3x10<sup>5</sup></li> <li><i>C. difficile</i>, 9.9x10<sup>1</sup></li> <li><i>C. sordellii</i>, 1.3x10<sup>5</sup></li> </ul>	0	2	0
	12,500		87,500		0	0	0
	1,250		8,750		0	0	0
	125		875		0	0	0
	13		88		0	0	0