

資 料

## Hobbs型別不能ウエルシュ菌食中毒における分離菌株の 遺伝子学的方法による同一性の確認

福田 伸治 竹田 義弘 門田 達尚

### Application of Genetic Typing Methods to the Identification of Hobbs' Untypable Strains Implicated in a *Clostridium perfringens* Food Poisoning Outbreak

SHINJI FUKUDA, YOSHIHIRO TAKEDA and TATSUHISA MONDEN

(Received Sept. 29, 1995)

#### はじめに

ウエルシュ菌による食中毒には、市販のHobbs型別用血清（1～17型）に凝集しないHobbs型別不能食中毒も多くみられる [1]。1995年5月、島根県に観光旅行に行ったグループ50名中41名が腹痛、下痢および嘔吐（軽症）の症状を呈していることが判明した（本事件は島根県の観光施設を原因とする食中毒）。患者21名の便を検査したところ、21名（100%）からウエルシュ菌を分離し、7名の便から2～8,192ng/gのウエルシュ菌エンテロトキシンを検出した。しかし、全員から分離したウエルシュ菌21株はすべてエンテロトキシン産生株であったが、市販のHobbs型別用血清に凝集せず、Hobbs型別不能であった（2名から同時にHobbs 13型を分離したが、エンテロトキシン非産生）。そこで、21株の菌株間の同一性の確認のため、遺伝子学的検査および薬剤感受性試験を実施したので、その結果を報告する。

#### 材 料

本事例から分離したHobbs型別不能ウエルシュ菌21株、同時に本事例から分離したHobbs 13型および保存株（1事例から分離したHobbs型別不能株）7株を用いた。

#### 方 法

##### 1. プラスミドプロファイル

Plasmid Mini Prep Kit（ニッポンジーン）を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドはTris-

Borate bufferで調整した0.7%アガロースで100V、2時間電気泳動した。泳動後エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネータで観察した。

##### 2. RAPDプロファイル

Williamsら [2] の報告したRAPD（Random Amplified polymorphic DNA）法により染色体DNA増幅パターンを検討した。染色体DNAはセバジーン（三光純薬）を用いて抽出した。プライマーは腸管出血性大腸菌VT遺伝子検出用EVC-1（宝酒造）および腸炎ピブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用VPD-1（宝酒造）を用いた。反応液組成は滅菌蒸留水19 $\mu$ l、プライマー1 $\mu$ l、10 $\times$ Buffer 3 $\mu$ l、dNTPmix 2.5 $\mu$ l、耐熱性Taq DNAポリメラーゼ（0.5u/ $\mu$ l）1.5 $\mu$ l、テンプレートDNA 3 $\mu$ lとし、遺伝子増幅条件はLawrenceら [3] の条件に従って行った。増幅後、DNAはTris-Borate bufferで調整した1%アガロースで100V、1.5時間電気泳動した。そして、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネータで観察した。なお、サーマルサイクラーはPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700（アステック）を用いた。

##### 3. 薬剤感受性パターン

センシディスク（BBL）を用いて行った。使用した薬剤はテトラサイクリン（Te30）、ペニシリン（P10）、アミカシン（AN30）、ノボピオシン（NB30）、ナリジキシン酸（NA30）、クロラムフェニコール（C30）、ストレプトマイシン（S10）、ホスホマイシン（FF50）、エリスロマイシン（E15）、セファロチン（CF 30）、ゲンタマイシン（GM10）およびコリスチン（CL10）である。

結果および考察

本事例の原因菌であると考えられるウエルシュ菌 Hobbs型別不能株の同一性の確認を遺伝子学的方法を用いて行った。図1にプラスミドプロファイルを示した。本事例分離のHobbs型別不能株およびHobbs13型株ともプラスミドを保有しておらず、株間の違いあるいは同一性の確認はできなかった。

RAPDプロファイルでは、図2および3に示したように、本事例分離Hobbs型別不能株は同一のRAPDプロファイルを示し、同一株であることが確認された。腸管出血性大腸菌VT遺伝子検出用EVC-1プライマーを用いた場合は、保存株との違いは確認できたが、本事例から同時に分離したHobbs13型株との違いは確認できなかった。腸炎ピブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用

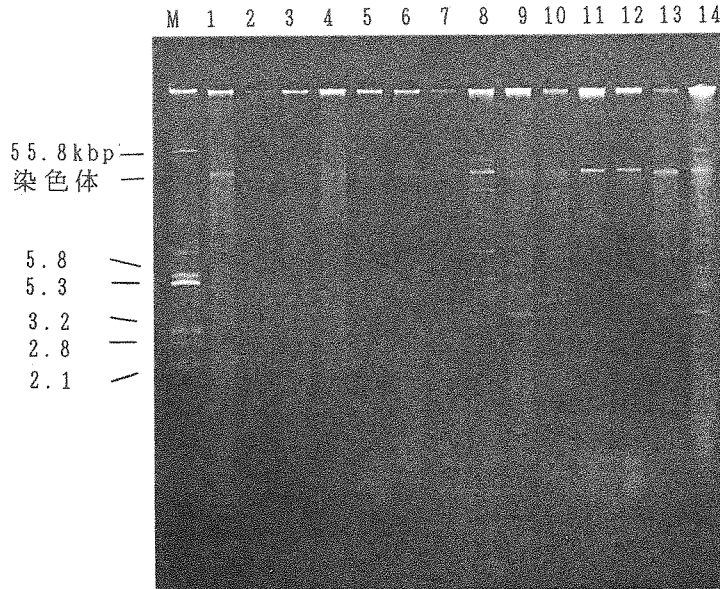


図1 プラスミドプロファイル

M:マーカー (*Escherichia coli* V517); 1~5:本事例分離株 (Hobbs型別不能);  
6, 7: 本事例分離株 (Hobbs 13型); 8~14:保存株 (Hobbs 型別不能)

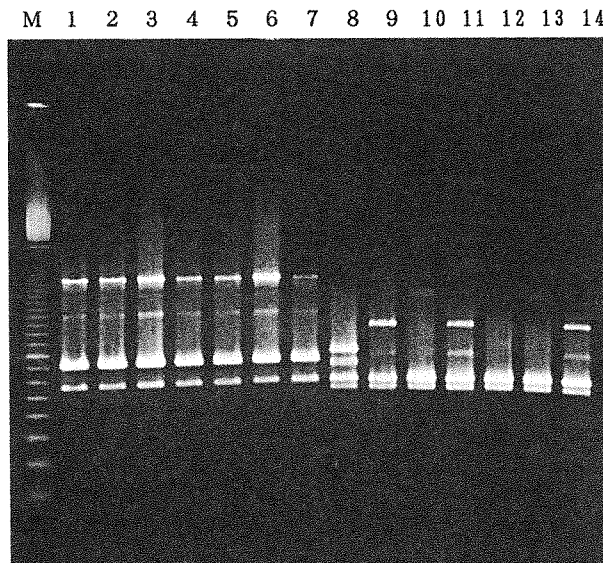


図2 腸管出血性大腸菌VT遺伝子検出用EVC-1プライマーを用いたRAPDプロファイル

M:マーカー (100 Base-Pair Ladder); 1~5:本事例分離株 (Hobbs型別不能);  
6, 7: 本事例分離株 (Hobbs 13型); 8~14:保存株 (Hobbs 型別不能)

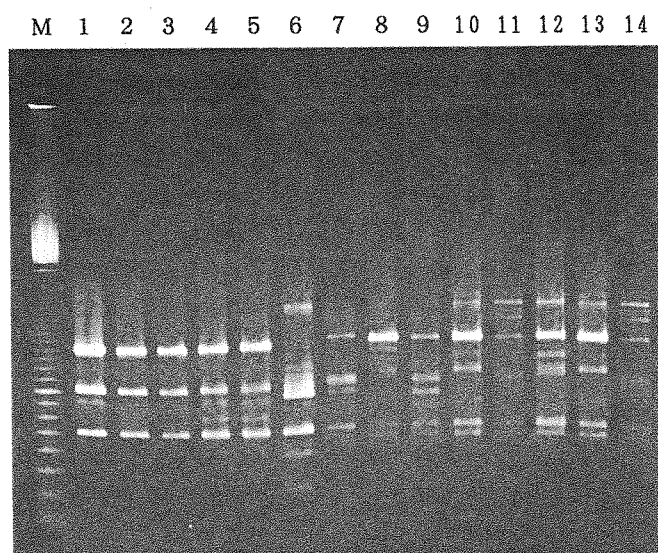


図3 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用VPD-1プライマーを用いたRAPDプロファイル  
 M:マーカー (100 Base-Pair Ladder) ;1~5:本事例分離株 (Hobbs型別不能) ;  
 6, 7: 本事例分離株 (Hobbs 13型) ;8~14:保存株 (Hobbs 型別不能)

表1 薬剤感受性パターン

薬 剤 名	ウエルシュ菌株													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
テトラサイクリン	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	I	I
ペニシリン	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
アミカシン	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ノボビオシン	I	I	S	I	S	I	S	I	I	I	S	S	I	S
ナリジキシン酸	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
クロラムフェニコール	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ストレプトマイシン	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ホスホマイシン	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
エリスロマイシン	I	I	S	S	I	I	S	I	I	I	S	S	S	S
セファロチン	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ゲンタマイシン	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
コリスチン	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

1~5:本食中毒分離株 (Hobbs型別不能) ; 6, 7:本食中毒分離株 (Hobbs 13型) ;

8~14:保存株 (Hobbs型別不能)

R:耐性; I:中間型; S:感受性

VPD-1プライマーを用いた場合には、保存株および同時に分離したHobbs13型株との違いが確認され、分離したHobbs型別不能株は21株とも同一のRAPDプロファイルを示した。

ウエルシュ菌の株間の同一性の確認には、通常、血清型別が用いられ、血清型別の有用性が報告されている [4]。ウエルシュ菌のエンテロトキシン産生率は10%以下と低く [5,6]、エンテロトキシン産生性陽性の同一血清型を示すウエルシュ菌が分離されれば、その菌が原因菌であると考えて問題はないが、市販の

Hobbs型別用血清は1型から17型の17種しかなく、Hobbs型別不能株も数多く存在する [5-8]。東京都立衛生研究所の伊藤 [9] は独自にTW型の血清を追加し応用しているが、血清型別を依頼するにしても地理的問題があり迅速性に欠ける。今回用いたプラスミドプロファイルおよびRAPDプロファイルは迅速にしかも特別な機器を必要とせず、PCRを行っている施設であれば簡易に実施できる利点がある。ウエルシュ菌食中毒においても、RAPD法は株間の違いあるいは同一性の確認が迅速にしかも確実にできる方法であることが

認められた。しかし、使用するプライマーによっては、異なった株であるにもかかわらず、同一と判定する可能性があり、プライマーの選択には注意を要すると考えられる。プラスミドプロファイルは、本事例分離株がプラスミドを保有していなかったこともあり、株間の同一性の確認には使えなかったが、ウエルシュ菌の60~90%はプラスミドを保有しており、ウエルシュ菌の迅速な株間の違いあるいは同一性の確認のための一方法であることが報告されている [10-12]。ウエルシュ菌のすべてがプラスミドを保有しておらず、脱落することもあるので、プラスミドプロファイルのみでは株間の同一性の確認ができない場合もあるが、RAPDプロファイルを用いることにより、迅速に、詳細に、株間の違いおよび同一性を確認できると考えられる。

表1に薬剤感受性パターンを示したが、本事例分離Hobbs型別不能株、Hobbs13型株および保存株ともほぼ同様のパターンを示し、株間の違いあるいは同一性を確認することができなかった。薬剤感受性パターンは、簡易に実施できる利点があるが、少なくとも今回用いた薬剤では明確なパターン分類が不可能であった。さらに他の事例 [13] と比較しても明確なパターン分類は不可能であることから、薬剤感受性パターンは、ウエルシュ菌の株間の同一性の確認に対して有効な方法ではないと考えられる。

#### まとめ

1. ウエルシュ菌Hobbs型別不能株の同一性確認にRAPD法が迅速で確実な方法であることが認められた。
2. ウエルシュ菌の場合は、薬剤感受性パターンによる菌株の同一性の確認は有用でなかった。

#### 文献

[1] 坂崎利一編 (1983) : 食中毒Ⅱ - 新たに認定された食中毒菌一, P.281-337, 東京, 中央法規出版。  
 [2] Williams, J. G., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.  
 [3] Lawrence, L. M., Harvey, J. and Gilmore, A. (1993) : Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3117-3119.  
 [4] Stringer, M. F., Turnbull, P. C.B. and Gilbert, R. J.

(1980) : Application of serological typing to the investigation of outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning, 1970-1978. *J. Hyg., Camb.*, 84, 443-456.  
 [5] 刑部陽宅 (1978) : 環境における *Clostridium perfringens* の分布と分離菌の Enterotoxin 産生性. *食衛誌*, 19, 236-241.  
 [6] Saito, M. (1990) : Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, food, and the natural environment in Japan. *J. Food Prot.*, 53, 115-118.  
 [7] 中津川修二 (1975) : 食中毒起病性 *Clostridium perfringens* に関する研究 第1報 正常人ふん便における分布と分離菌株の耐熱性. *感染症誌*, 49, 232-240.  
 [8] 中津川修二 (1975) : 食中毒起病性 *Clostridium perfringens* に関する研究 第2報 市販食品における汚染状況. *感染症誌*, 49, 241-250.  
 [9] 伊藤 武 (1972) : 耐熱性ウエルシュ菌の健康人における分布および血清学的型別とそれに起因する食中毒に関する研究. *東京都立衛生研究所年報*, 24, 7-39.  
 [10] Mahony, D. E., Clark, G. A., Stringer, M. F., MacDonald, M. C. and Duchesne, D. R. (1986) : Rapid extraction of plasmids from *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 521-523.  
 [11] Mahony, D. E., Stringer, M. F., Borriella, S. P. and Mader, J. A. (1987) : Plasmid analysis as a means of strain differentiation in *Clostridium perfringens*. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1333-1335.  
 [12] Jones, M. K. P., Iwanejko, L. A. and Longden, M. S. (1989) : Analysis of plasmid profiling as a method for rapid differentiation of food-associated *Clostridium perfringens* strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 243-245.  
 [13] 小川博美, 福田伸治, 佐々木実己子, 門田達尚, 荒川 勇 (1992) : ウエルシュ菌食中毒患者糞便中の菌量及びエンテロトキシンの推移. *広島県獣医学雑誌*, 7, 53-60.