HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Polymerase Chain Reaction法による海産食品からのエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の検出
Author(s)	岡, 重美; 西崎, 修代; 高間, 浩蔵
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 50(1), 33-43
Issue Date	1999-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24182
Type	bulletin (article)
File Information	50(1)_P33-43.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
50(1), 33-43. 1999.

Polymerase Chain Reaction 法による海産食品からのエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の検出

岡　重美[1)]・西崎　修代[1)]・高間　浩蔵[1)]

Detection of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Seafood by Polymerase Chain Reaction Procedure

Shigemi OKA[1)], Nobuyo NISHIZAKI[1)] and Kozo TAKAMA[1)]

Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) procedure are simple, rapid and specific method to detect the enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a causative organism in human food poisoning. Synthetic oligonucleotide primer pair used in the PCR procedure amplified 364 base pair (bp) seqence internal to the *C. perfringens* enterotoxin gene.

The principle of this study was to investigate the correlation between the detection by commercial Kit for enterotoxin production and PCR procedure for enterotoxin gene of *C. perfringens* and, also, to detect for enterotoxin gene of the organism in the culture media and seafood extracts by the PCR procedure.

Moreover, sensitivity of the PCR procedure used in this experiment was determined. The results obtained were as followed;

1) The results for enterotoxin production of test strains when using reversed passive agglutination test, and PCR procedure in detection of enterotoxin gene were proved to be consistent.
2) No difference was found in detection of enterotoxin gene of *C. perfringens* cultured in liquid medium and solid medium by the PCR procedure.
3) It was confirmed that the PCR procedure used in this experiment was specific to detect only enterotoxin gene of *C. perfringens* out of six kinds of food poisoning bacteria.
4) *C. perfringens* inoculated in five kinds of seafood extracts grew and the number of bacterial cells were from 10^6 to 10^7 CFU/ml. Also, enterotoxin gene was detected from the organism in each extract by the PCR procedure and the reaction was not inhibited by food components.
5) The sensitivity of the PCR procedure used in this experiment was over 10^5 CFU/ml as bacterial counts.

Key words: *Clostridium perfringens*, Enterotoxin gene, Polymerase chain reaction, Seafood

緒　　言

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は環境中に常在する偏性嫌気性芽胞形成菌である。この菌の中にはヒトの食中毒の原因となるエンテロトキシン (腸管毒素, 以下 Et と略す) を産生す

[1)] 北海道大学水産学部食品機能化学講座
(*Laboratory of Food Wholesomeness, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

るものがあり (安川ら, 1975; 刑部, 1978; Oka ら, 1989; Oka ら, 1989), 食品衛生上しばしば問題となる。

食中毒事件の発生に際しては, まずその原因の究明と診断が急務であり, そのためには, 簡易・迅速かつ特異的で, しかも検出感度の高い試験法が求められる。

ウェルシュ菌をはじめ, Et 産生食中毒原因菌の診断や検索には, 現在免疫学的手法を取り入れた市販の Et 検出用キットの使用が有効であるが, この場合菌の培養から試料の調製, さらには結果の判定までには数日間を要する。

最近幅広い分野で利用されるようになった PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は, Et 遺伝子などの標的 DNA を増幅し, 検出する技術であり, 特に病原菌の同定や診断には有効な手法の一つとして注目されている。

本法にはいくつかの問題点も指摘されてはいるものの (武士ら, 1997), 操作が比較的簡易で, 迅

Table 1. List of strains used.

Strain	Source
Clostridium perfringens NCTC 8238*[1]	Food poisoning
Clostridium perfringens NCTC 8239[1]	Food poisoning
Clostridium perfringens NCTC 8798[1]	Food poisoning
Clostridium perfringens NCTC 10239[1]	Food poisoning
Clostridium perfringens FD-1*[2]	Food poisoning
Clostridium perfringens S-40*[3]	Food poisoning
Clostridium perfringens S-45*[4]	Food poisoning
Clostridium perfringens So-1*[5]	Soil
Clostridium perfringens So-2[5]	Soil
Clostridium perfringens So-3[5]	Soil
Clostridium perfringens Rw-1[5]	River water
Clostridium perfringens Rw-2[5]	River water
Clostridium perfringens Rw-18[5]	River water
Clostridium perfringens Fi-1[5]	Fresh-water fish
Clostridium perfringens Fi-2[5]	Fresh-water fish
Clostridium perfringens Fi-3[5]	Fresh-water fish
Clostridium perfringens Fi-4[5]	Fresh-water fish
Staphylococcus aureus FP-10*[7]	Food poisoning
Bacillus cereus No. 55*[6]	Food poisoning
Clostridium botulinum IWANAI[2]	Food poisoning
Escherichia coli O157: H7 HK[2]	Food poisoning
Salmonella enteritidis 95-6-1[2]	Food poisoning

*[1] Obained from National Institute of Health, Japan.
*[2] Obtained from Hokkaido Institute of Public Health.
*[3] Obtained from Food and Drug Administration, Washington, D.C.
*[4] Obtained from Hiroshima City Institute of Public Health.
*[5] Isolated in Faculty of Fisheries, Hokkaido University.
*[6] Obtained from Faculty of Agriculture, Iwate University.
*[7] Obtained from Sapporo City Institute of Public Health.

速かつ特異性があり，しかも検出感度が高いなどの利点を有することから，すでに食品衛生の分野において食中毒原因菌の同定や，その起病因子である Et 遺伝子の検出などに応用されている (小林，1992；小林・渡部，1994；Candrian, 1995；向井ら，1997)。

本食中毒の原因となる Et 産生ウェルシュ菌やその遺伝子の検出に本法を応用した報告は過去に 2, 3 認められるが (Saito ら，1992；石村ら，1993；Baez and Juneja, 1995)，いずれも食中毒由来株や環境由来株の培地培養菌に直接応用したもの，さらには食中毒発生時の患者便や食肉からの検出への応用例であり，過去にわが国で食中毒の原因食品となった海産食品 (山県，1962) への応用例報告はない。

そこで本研究では，食中毒発生時の疫学的解明手段の一つとして注目されている PCR 法が，海産食品からの Et 産生菌の検出にも応用が可能か否かを，まずこれらのエキスを用いて検討した。

実 験 方 法

供試菌株

本研究には *Clostridium perfringens* の食中毒由来株 7 株と環境由来株 10 株，ならびに *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Escherichia coli* および *Salmonella enteritidis* の各 1 株の総計 22 株を供試した。これらの詳細は Table 1 に示した。

Et の産生と検出

ウェルシュ菌の Et 産生方法と，市販キットによる Et の検出方法は先の報告 (岡ら，1992) のとおりである。ただし，Et の産生には芽胞の形成が条件となることから，供試菌株がいずれも芽胞形成培地 (Duncan and Strong, 1968；大谷・氏家，1987) 内で芽胞を形成していることを確認後，定性的に Et の検出を行った。

生菌数の測定

ウェルシュ菌および他の食中毒原因菌の培養に用いた 2 種類の液体培地 [Thioglycolate Broth と Brain Heart Infusion Broth (Difco)] 中および後述の食品エキス中の生菌数の測定は以下の方法によって行った。

液体培地では，供試菌株を接種し，37°C, 18-20 時間好気的条件下で培養を行った後，*C. perfringens* ではカナマイシン不含 CW 卵黄寒天培地 (日水製薬) 2 枚に 10^{-4} から 10^{-6} までの各希釈液の 0.1 ml ずつを塗抹し，37°C，48 時間，Gas pak (BBL) 嫌気培養を行った。*C. botulinum* においては 5% 血液・1% ブドウ糖添加 Brain Heart Infusion Agar 2 枚を用い，同様各希釈液の 0.1 ml ずつを塗抹後，30°C，48 時間嫌気培養を行った。また，*S. aureus, B. cereus, E. coli* および *S. enteritidis* では Plate Count Agar (Difco) の各 2 枚を用い，これらに培養菌液の 10^{-4} から 10^{-6} までの希釈液の 0.1 ml ずつを塗抹後，37°C，48 時間好気的条件下で培養を行った。培養後，常法に従って各 2 枚の寒天培地平板上の検出集落の平均値から 1 ml あたりの菌数を Colony Forming Unit (CFU/ml) で示した。

なお，*C. perfringens* を接種した食品エキス中の生菌数の測定方法についても液体培地の場合と同様に行った。

PCR 反応の手順

PCR 反応は以下の手順に従って実施した。

1) 鋳型 DNA の調製：液体培地の Thioglycolate Broth と Brain Heart Infusion Broth では，37°C，18 時間好気培養した菌液 1 ml の遠心沈渣 (15,000 rpm，5 分間) に TE 緩衝液 (TaKaRa 製) 500 μl (一部の試験では 1,000 μl 使用) を加え，また固形培地であるカナマイシン不含 CW 卵黄寒天培地にあっては 37°C，18 時間嫌気培養した被検菌の 1 白金耳量を TE 緩衝液 500 μl に加え，よく混和懸濁した後，沸騰水中で 10 分間加熱を行い，冷却後，これらの遠心上清を試験用鋳型 DNA とした。

2) プライマー：プライマーは Saito ら (1992) の方法に従って合成した。

すなわち，プライマーPT 1 はウェルシュ菌の Et の塩基配列の 426-446，PT 2 は 770-789 に相補するもので，それぞれ (5′-TGTAGAATATGGATTTGGAAT) と (5′-AGCTGGGTTT-GAGTTTAATG) であり，予想される増幅 DNA は 364 bp である。

3) 反応条件と電気泳動：鋳型 DNA の 1 μl を，PCR 反応液 49 μl (滅菌蒸留水：38.75 μl，10×PCR 緩衝液：5 μl，dNTP ミックス：4 μl，PT 1 プライマー：0.5 μl，PT 2 プライマー：0.5 μl, Taq ポリメラーゼ：0.25 μl) に加え，94°C，5 分間，ついで 94°C，30 秒間の熱変性，55°C，30 秒間のアニーリング，72°C，1 分間の伸長反応の条件で，35 回の PCR 反応を行った。反応終了後，反応液の 10 μl をとり，2% アガロースゲル電気泳動を行って，目的とする 364 bp 増幅 DNA の有無を確認した。なお試薬類はいずれも和光純薬工業(株) から購入し，また分子量マーカーには 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL) を用いた。

食品エキスの調製と菌の接種

食品エキスの調製には市販のマサバ，サケ，マイカおよびホタテガイの 4 種類の海産魚介類の他に，コンブとトリ肉を用いた。コンブを除いた 5 種類の食品においては肉質部の重量に対して 3 倍量の脱イオン水を加えてホモジナイズし，コンブでは細切後重量に対して 8 倍量の脱イオン水を加えた後，100°C，30 分間加熱した。これらを遠心ろ過し，ろ液を中試験管 (16×160 mm) に 10 ml ずつ分注した後，121°C，15 分間高圧滅菌したものを供試食品エキスとした。これら食品の加熱抽出エキスに，あらかじめカナマイシン不含 CW 卵黄寒天培地で 37°C，18 時間嫌気培養を行った *C. perfringens* の Et 産生株 (NCTC 8239) の培養菌 1 白耳量を接種し，37°C，18 時間嫌気培養を行った。

結　　果

食中毒由来株と環境由来株における Et 産生能

C. perfringens の食中毒由来株 7 株と環境由来株 10 株の計 17 株を供試し，市販の Et 検出用キットを用い，Et 産生能について検討した。その結果は Table 2 に示したように，食中毒由来株 7 株中，市販キットにより Et の産生が確認されたのは 5 株 (NCTC 8238, NCTC 8239, NCTC 8798, NCTC 10239, S-45) と環境由来株 10 株中の 1 株 (Rw-18) のみであった。

食中毒由来株と環境由来株における Et 遺伝子の検出

ついで，同じく食中毒株由来株 7 株と環境由来株 10 株について前述の条件で PCR 反応を行

Table 2. Comparison of the results of commercial Kit test for detection of enterotoxin and PCR procedure for detection of enterotoxin gene of *C. perfringens*.

Strain	Commercial Kit test (PET-RPLA, SEIKEN)	PCR procedure
C. perfringens NCTC 8238	+*1	+
C. perfringens NCTC 8329	+	+
C. perfringens NCTC 8798	+	+
C. perfringens NCTC 10239	+	+
C. perfringens FD-1	−*2	−
C. perfringens S-40	−	−
C. perfringens S-45	+	+
C. perfringens So-1	−	−
C. perfringens So-2	−	−
C. perfringens So-3	−	−
C. perfringens Rw-1	−	−
C. perfringens Rw-2	−	−
C. perfringens Rw-18	+	+
C. perfringens Fi-1	−	−
C. perfringens Fi-2	−	−
C. perfringens Fi-3	−	−
C. perfringens Fi-4	−	−

+*1 Positive. −*2 Negative.

い，Et 遺伝子の検出を行った。その結果，市販キットにおいて Et を産生した食中毒由来株の 5 株と，環境由来の 1 株からは Et 遺伝子も検出され，両試験法による成績は一致した (Table 2)。

培地の種類別培養菌と PCR 産物の検出

つぎに，ウェルシュ菌を異なる培地で培養し，各培養菌体から調製した鋳型 DNA の違いが PCR 産物の検出に影響するか否かについて検討した。はじめに液体培地である Thioglycolate Broth を用いて食中毒由来株 7 株から鋳型 DNA を調製し，前述の条件で PCR 反応を行い，得られた PCR 産物の電気泳動パターンを Fig. 1. A に示した。同様に食中毒由来株 3 株と環境由来株 3 株を培養した固形培地の培養菌から得られた PCR 産物の電気泳動パターンを Fig. 1. B に示した。Fig. 1. A および Fig. 1. B から明らかなように，両培地に共通した供試菌株 (NCTC 8239, S-45, S-40) のうち，NCTC 8239 と S-45 の 2 株では，いずれも 364 bp の位置に 1 本のバンドが検出され，培地間による PCR 産物の検出成績に違いは認められなかった。

なお，液体培地中の増殖菌数はいずれの菌株とも 1 ml あたり 10^8 CFU のオーダーであった。

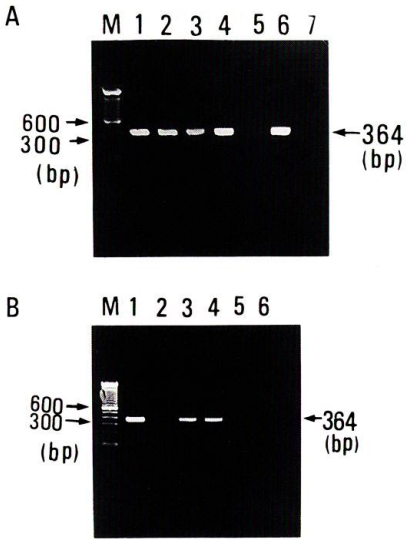

Fig. 1. A. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *C. perfringens* cultured in Thioglycolate Broth.
Lanes: M, 100 bp ladder marker; 1, NCTC 8238; 2, NCTC 8239; 3, NCTC 8798; 4, NCTC 10239; 5, FD-1; 6, S-45; 7, S-40.
B. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *C. perfring*, ens cultured on CW Egg Yolk Agar plate.
Lanes: M, 100 bp ladder marker; 1, NCTC 8239; 2, S-40; 3, S-45; 4, Rw-18; 5, So-2; 6, Fi-3.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products of six kinds of food poisoning bacteria cultured in Brain Heart Infusion Broth.
Lanes: M, 100 bp ladder marker; 1, *B. cereus* No. 55; 2, *S. aureus* FP-10; 3, *S. enteritidis* 95-6-1; 4, *E. coli* O157: H7 HK; 5, *C. perfringens* NCTC 8239; 6, *C. botulinum* IWANAI.

本 PCR 法の特異性の検討

C. perfringens およびその他の食中毒原因菌 (*S. aureus*, *B. cereus*, *C. botulinum*, *E. coli* および *S. enteritidis*) の Brain Heart Infusion Broth 培養菌から，それぞれ鋳型 DNA を調製し，前述の反応を用いて PCR 法を実施した。その PCR 産物の電気泳動パターンを Fig. 2 に示した。またその際の培地中の菌数はいずれも 10^6 から 10^8 CFU/ml のオーダーであった (Table 3)。

Fig. 2 にみられるように 364 bp の位置にバンドが検出された菌種は 6 菌種中 *C. perfringens* のみで，他の 5 種類の食中毒原因菌からは検出されず，本 PCR 法が *C. perfringens* の Et 遺伝子の検出に対して特異的であることが認められた。

Table 3. Viable cell counts of six kinds of food poisoning bacteria in Brain Heart Infusion Broth.

Strain	Viable cell counts (CFU/ml)
Bacillus cereus No. 55	1.5×10^{7}
Staphylococcus aureus FP-10	4.7×10^{8}
Samonella enteritidis 95-6-1	4.3×10^{8}
Escherichia coli O157 : H7 HK	5.2×10^{8}
Clostridium perfringens NCTC 8239	2.3×10^{8}
Clostridium botulinum IWANAI	8.0×10^{6}

ウェルシュ菌の海産食品エキスでの増殖と Et 遺伝子の検出

6 種類の食品エキスを用いて培養した菌体と，液体および固形の両培地培養菌からそれぞれ鋳型 DNA を調製し，前述の条件で PCR 反応を行い，目的とする 364 bp に位置するバンドが検出されるか否かを試験した。

その電気泳動パターンは Fig. 3 に示したように，Et 産生株を接種した 6 種類すべての食品エキ

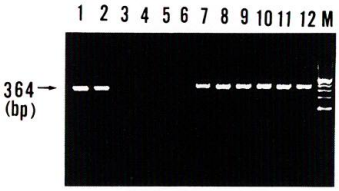

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products of enterotoxigenic *C. perfringens* cultured in various food extracts and culture media.
Lanes : M, 100 bp ladder marker ; 1, CW Egg Yolk Agar plate ; 2, Brain Heart Infusion Broth ; 3, Control (Brain Heart Infusion Broth) ; 4, Control (Thioglycolate Broth) ; 5, Control (Chicken ext.) ; 6, Control (Mackerel ext.) ; 7, Seaweed (kombu) extract ; 8, Scallop extract ; 9, Squid extract ; 10, Salmon extract ; 11, Mackerel extract ; 12, Chicken extract.

Table 4. Viable cell counts of *Clostridium perfringens* cultured in various food extracts.

Extract	Viable cell counts (CFU/ml)
Seaweed (kombu)	1.5×10^{6}
Scallop	5.0×10^{6}
Squid	2.0×10^{6}
Salmon	6.0×10^{7}
Mackerel	4.0×10^{7}
Chicken	3.2×10^{7}

スの培養菌と，再度確認のため試験した Brain Heart Infusion Broth および CW 卵黄寒天培地の培養菌から，いずれも 364 bp に位置する 1 本のバンドが検出された。

また，これらエキス内での増殖菌数は種類によって異なったものの，10^6 から 10^7 CFU/ml のオーダであった (Table 4)。なお，対照として用いた 2 種類の食品エキスと 2 種類の液体培地からは当該バンドは検出されなかった。また食品エキスの pH はいずれも 6.2 から 6.4 の間にあった。

ウェルシュ菌の PCR 産物の検出感度と菌数との関係

つぎに，本実験で用いた PCR 反応での反応産物の検出感度を菌数の点から検討した。まず，ウェルシュ菌の Thioglycolate Broth の 37°C，18 時間培養菌液から同培地を用いて 10 倍段階希釈系列を作成し，それぞれの希釈液から先に述べた方法で鋳型 DNA を作成し，前述の条件で PCR 法を行った。その結果は Fig. 4 に示したとおり，原液から 10^{-3} 希釈液までは 364 bp の位置に PCR 産物である 1 本のバンドが検出されたが，10^{-4} 希釈液では検出されなかった。この場合，鋳型 DNA 調製用の TE 緩衝液量は 500 μl であったが，これを 1,000 μl に増量した場合も同様の検出パターンを示した。

培養菌液の原液 1 ml あたりの菌数は 10^8 CFU 台であったことから，PCR 産物の検出し得るに必要な菌数は 1 ml あたり 10^5 CFU 以上であると計算された。

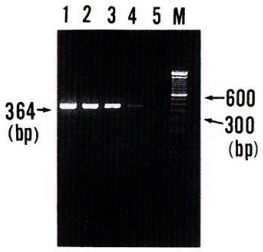

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from diluted solution of Thioglycolate Broth incubated with enterotoxigenic *C. perfringens*.
Lanes : M, 100 bp ladder marker ; 1, 10^0 ; 2, 10^{-1} ; 3, 10^{-2} ; 4, 10^{-3} ; 5, 10^{-4}

考　　察

ウェルシュ菌食中毒は本菌の産生するエンテロトキシン (Et) によって引き起こされる腸管内毒素型食中毒である。

原因となる Et 産生ウェルシュ菌の診断法にはこれまで免疫学的手法を中心として多くの方法が報告されており (Duncan and Sommers, 1972 ; Uemura ら，1973 ; Skjelkvale and Uemura, 1977 ; 伊藤ら，1982 ; Notermans ら，1984 ; Jakson ら，1986 ; Mehta ら，1989 ; Uemura ら，1992)，実用化されたその一つが今日普及している Et 検出用のキットである。このキットは使用方法が簡便で，Et の検出感度も高い点で本来の目的にかなった検査法である。しかし，この検査法ではまず芽胞形成培地によって被検菌の芽胞培養を行い，芽胞形成が確認された培養液からのみ試験液の調製が可能になること，芽胞培養によっても必ずしも芽胞形成は容易でないこと，さらにそのための培養日数がかかり，それに伴い結果の判定までにも時間がかかるという難点がある。

そこで本報では，現在多くの研究分野で活用されている PCR 法がウェルシュ菌を含む食中毒

原因細菌の遺伝子診断にも広く応用されている点に着目し，ウェルシュ菌食中毒の原因食品となる海産魚介類にも本法の応用が可能か否かを知る一つの試みとして，これらの食品から調製したエキス内での接種菌の増殖の有無と，本法による当該細菌の Et 遺伝子検出への応用の可能性について検討した。

まず食中毒由来株と環境由来株を供試し，市販キットによる Et 産生能を調べた。その結果，Et を産生した供試菌から Et 遺伝子も検出され，Et を産生しない菌株では Et 遺伝子も検出されず両方による試験成績は一致した。この結果は，また他の報告者ら (Saito ら，1992；石村ら，1993；Ridell ら，1998) の試験成績とも一致したことから，Et 産生株の検出に本法の有用性が証明された。加えて，試験結果の判定までには PCR 法では市販キット法より約 2 日間短縮されたことから，迅速性の点でも優れていることは明らかである。この実験で供試した FD-1 株と S-40 株は食中毒由来株として分与された菌株で，芽胞の形成も良好であったにもかかわらず，Et 産生は認められず，また Et 遺伝子も検出されなかった。これは分離当初保持していた Et 産生能が菌株の保存中に喪失したものと考えられるが詳細は不明である。ついで，鋳型 DNA を異なる培地から調製することにより Et 遺伝子の検出に影響があるか否かについて検討した。その結果，液体培地と固形培地の双方から調製した鋳型 DNA のいずれからも Et 遺伝子の明瞭なバンドが検出され，特に培地間による Et 遺伝子の検出成績に違いは認められなかった。

ついで，*C. perfringens* を含むわが国の代表的食中毒原因菌 6 種類を供試し，本 PCR 法の特異性について検討した。その結果，*C. perfringens* のみから Et 遺伝子のバンドが検出され，用いた本 PCR 法が本菌の Et 遺伝子検出に特異的であることが確認された。

わが国で発生したウェルシュ菌食中毒の中には海産魚介類とこれらの加工食品に起因した事例が含まれている (山県，1962)。しかし，これまでこれらの食品について PCR 法を応用し，Et 産生菌の検出を試みた報告はない。

そこでこれらの魚介類食品に対して直接本法を応用する前に，まずこれらの食品から調製したエキスを用い，人為的に接種した *C. perfringens* の増殖と，PCR 法によるこれら増殖菌から Et 遺伝子の検出を試みた。その結果，試験した 5 種類の海産魚介類エキスのすべてからウェルシュ菌を検出するとともに，本法の応用により当該細菌から Et 遺伝子も検出することが出来た。また，この際，食品エキス成分による PCR 反応阻害も認められなかった。ただし，後述のように，PCR 法を用いた本試験ではウェルシュ菌の Et 遺伝子の検出には限界があることも明らかになった。

海産食品においては調理方法の一つに“だし”としての利用があり，コンブはその代表的食品として利用頻度も高く，また本エキス中ではウェルシュ菌の芽胞は十分発芽することから (岡，1979)，さらに発芽成長後の菌の増殖により食中毒を起こす可能性がある。今後は，鋳型 DNA の調製法も含め，海産魚介類自体からのウェルシュ菌の検出とその Et 遺伝子の検出に向けた PCR 法の応用性について検討して行く必要がある。

最後に，本法による PCR 産物の検出感度を知るため，まず菌数との関係から検討した。その結果，Et 遺伝子のバンドが検出された培養菌液の最大希釈倍数は 10^{-3} であった。培養菌液の原液菌数は 10^8 CFU/ml であったことから，Et 遺伝子の検出感度は 10^5 CFU/ml 以上と計算された。この成績は，鋳型 DNA 調製の際の TE 緩衝液が 500 μl の場合の成績であるが，同緩衝液を 1,000 μl に増量した場合も Et の検出成績には違いは認められなかった。ここで得られた 10^5 の値は，本食中毒の発症菌数である 10^6 (伊藤，1981) より検出感度は高いことから食中毒発生時における疫学的解明の一助にはなり得るものの，より検出感度を高めるためには，鋳型 DNA の濃縮や精製の他 (武士ら，1997)，Nested PCR 法 (Baez and Juneja, 1995) などの工夫も必要となろう。

謝　　辞

本研究の遂行にあたり，種々ご協力，ご助言を賜わりました北海道立衛生研究所食品微生物科各位ならびに渡島保健所および函館市立保健所衛生課各位に深謝致します。

文　　献

Baez, L.A. and Juneja, V.K. (1995). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in raw beef by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, **58**, 154-159.

Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction in food microbiology. *J. Microbiol. Method.*, **23**, 89-103.

Duncan, C.L. and Strong, D.H. (1968). Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, **16**, 82-89.

Duncan, C.L. and Somers, E.B. (1972). Quantitation of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by electroimmunodiffusion. *Appl. Microbiol.*, **24**, 801-804.

刑部陽宅 (1978). 環境における *Clostridium perfringens* の分布と分離菌のエンテロトキシン産生能. 食品衛生学雑誌, **19**, 236-241.

石村勝之・萱島隆之・蔵田和正・伊藤文明・中野　潔・松石武昭・荻野武雄 (1993). Polymerase chain reaction 法を用いた *Clostridium perfringens* type A エンテロトキシン遺伝子の迅速検出. 食品と微生物, **10**, 35-41.

伊藤　武・稲葉美佐子・斎藤香彦 (1982). (4) ウェルシュ菌エンテロトキシンの検査法およびその応用. メジアサークル, **27**, 22-30.

伊藤　武 (1981). (4. ウェルシュ菌, p. 192-224, 坂崎利一 (編)), 食中毒. 中央法規出版, 東京.

Jackson, S.G., Yip-Chuck, D.A. and Brodsky, M.H. (1986). Evaluation of the diagnostic application of an enzyme immunoassay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 969-970.

小林一寛 (1992). Polymerase chain reaction (PCR) 法による下痢・食中毒菌の同定. 食品と微生物, **9**, 77-88.

小林一寛・渡辺治雄 (1994). 食品衛生検査における PCR 法の応用. 食品衛生研究, **44**, 27-39.

Mehta, R., Narayan, K.G. and Notermans, S. (1989). DOT-enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Int. J. Food Microbiol.*, **9**, 45-50.

向井博之・島田　敦・日野文嗣 (1997). PCR 法による食中毒原因菌の簡便な検出法. ジャパンフードサイエンス, **4**, 39-46.

Notermans,S., Heuvelman,C., Beckers, H. and Uemura, T. (1984). Evaluation of the ELISA as tool in diagnosing *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig*, **179**, 225-234.

Oka, S., Ando, Y. and Oishi, K. (1989). Distribution of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in water and soil in the southern part of Hokkaido. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 71-78.

Oka, S., Ando, Y. and Oishi, K. (1989). Distribution of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in fish and shellfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 79-86.

岡　重美 (1979). 各種食品エキス中における A 型ウェルシュ菌芽胞の発芽について. 食品衛生学雑誌, **20**, 239-246.

岡 重美・伊藤博司・高間浩蔵 (1992). ガス置換貯蔵魚肉中における食中毒細菌の増殖と毒素の産生. 北海道大学水産学部研究彙報, **43**, 105-114.

大谷仁巳・氏家淳雄 (1987). 変法 DS 培地におけるウェルシュ菌の芽胞形成とエンテロトキシン産生性. 食品衛生学雑誌, **28**, 281-285.

Ridell, J., Bjorkroth, J., Eisgruber, H., Schalch, B., Stolle, A. and Korkeala, H. (1998). Prevalence of the enterotoxin gene and clonality of *Clostridium perfringens* strains associated with food-poisoning outbreaks. *J. Food. Prot.*, **61**, 240-243.

Saito, M., Matsumoto, M. and Funabashi, M. (1992). Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin gene by the polymerase chain reaction amplification procedure. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 47-55.

Skjelkvale, R. and Uemura, T. (1977). Detection of enterotoxin in feces and anti-enterotoxin in

serum after *Clostridium perfringens* food poisoning. *J. Appl. Bacteriol.*, **42**, 355-363.
武士甲一・池田徹也・砂川紘之 (1997). 遺伝子診断技術を用いた新しい食品微生物検査法. 日本食品微生物学会雑誌, **14**, 75-81.
Uemura, T., Sakaguchi, G. and Riman, H.P. (1973). In vitro production of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its detection by reversed passive hemagglutination. *Appl. Microbiol.*, **26**, 381-385.
Uemura, T., Yoshitake, S., Hu, D. and Kajikawa, T. (1992). A highly enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**, 23-25.
山県　宏 (1962). ウェルチ菌食中毒についての最近の知見. 食品衛生研究, **12**, 53-66.
安川　章・岡田陽一・北瀬照代・宮本三郎 (1975). ヒト, 食品と土壌におけるエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の分布. 食品衛生学雑誌, **16**, 313-317.