

2012年に山梨県内で発生したウエルシュ菌食中毒4事例

柳本恵太 植松香星

Molecular epidemiological analysis of 4 foodborne outbreaks
caused by *Clostridium perfringens*, yamanashi prefecture, 2012.

Keita YANAGIMOTO, Kousei UEMATSU

キーワード：ウエルシュ菌、PFGE、*Smal*、*NruI*

ウエルシュ菌は耐熱性芽胞を有する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、河川や土壌など広く自然界に分布している食中毒原因菌である。本菌を原因とする年間の食中毒件数は20~40件程度とそれほど多くはないものの、1件あたりの患者数は50~100人程度と大規模な事件になりやすい傾向にある¹⁾²⁾。ヒト及び動物の常在菌であり、市販されている食肉の70%がウエルシュ菌に汚染されている³⁾という報告があり、また、本菌が食中毒を発生させるのに1gあたり 10^6 以上の菌量に汚染された食品を喫食する必要があることが知られている⁴⁾。さらに至適発育温度が43~47℃と高く、増殖速度も速い⁴⁾ことから、加熱後の嫌気状態にある食肉を含む大量調理製品などを長時間不適切な温度に放置すると本菌が急速に大量に増殖するため、食中毒の原因となりやすいことが知られている。

山梨県内ではウエルシュ菌を原因とする食中毒は2000年以降3回発生しているが、1年間に2件以上の発生はない¹⁾²⁾。このような状況の中で、2012年7月から9月にかけて本菌による食中毒が4件発生し、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による分子疫学的調査を行ったのでその概要について報告する。

方法

1 ウエルシュ菌の分離

検体をTGC培地(栄研化学)で80℃、10分間加熱し、35℃で一夜培養後、カナマイシン不含卵黄加CW寒天培地(ニッスイ)に塗抹し、35℃で嫌気培養した。ウエルシュ菌様コロニー(乳糖分解、レシチナーゼ反応陽性)のうちウエルシュ菌検出用Primer Set CPE-1&2(TaKaRa)を用いたPCRでエンテロトキシン遺伝子(*cpe*)が陽性となったものをウエルシュ菌とした。

2 血清型別

分離された菌株について耐熱性A型ウエルシュ菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別(Hobbs型)を行った。

3 PFGE解析

分離された菌株をBHI broth(Oxoid)で35℃、嫌気条件下で一夜培養後、1mlを10,000rpmで5分間遠心し、上清除去後、150µlの精製水で懸濁した。等量の1% Sea Kem Gold agaroseを加え、プラグを作成し、1mg/ml Lysozyme, 80µg/ml Lysostaphin 添加0.5M EDTA (pH8.0)溶液で37℃で1時間溶菌した。次に1mg/ml proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine 添加0.5M EDTA (pH8.0)溶液で50℃で2時間処理し、4mM Pefabloc SC溶液で処理後、制限酵素*Smal*を用いて切断し、PFGEを行った。

結果

事例1:2012年7月20日に企業の夏祭りに参加した約1200人中253名が食中毒症状を呈し、患者便68検体中34検体から血清型別不能(UT)のウエルシュ菌が分離された。食品については既に廃棄されており検査することはできなかったが、疫学調査の結果、屋外で数時間放置していたキーマカレーが疑われた。PFGEの結果、26株は同一のPFGEパターンaを示したが、他に6種類(b~g)のパターンが確認された(図1)。

事例2:2012年7月25日から30日にかけてホテルに宿泊した378名中126名が食中毒症状を呈し、患者便12検体中12検体、同じ食事を喫食していた調理従事者の便7検体中4検体からHobbs2型のウエルシュ菌が分離された。施設の拭き取り10件、食品32件からはウエルシュ菌は検出されなかったが、疫学調査の結果、コーンスープが疑われた。PFGEの結果、16株のウエルシュ菌は全て

同一の PFGE パターンを示した (図 2)。

事例 3 : 2012 年 8 月 16 日から 17 日に合宿所を利用した 31 名中 9 名が食中毒症状を呈し、患者便 8 検体中 8 検体、調理補助者・施設職員便 5 検体中 5 検体から Hobbs2 型のウエルシュ菌が分離された。食品については残品が無く、施設の拭き取り 10 検体からもウエルシュ菌は分離されなかった。当該施設では利用者が自炊したカレーを喫食しており、調理補助者・施設職員も当該品を喫食していたことからカレーが疑われた。PFGE の結果、施設職員由来 1 株を除く 11 株の PFGE パターンが一致した (図 3)。

事例 4 : 2012 年 9 月 5 日に特別養護老人ホームの入所者 38 名が軽症の下痢症状を呈し、患者便 22 検体中 22 検体、調理従事者便 14 検体中 3 検体からウエルシュ菌 Hobbs5 型が 15 株、13 型が 1 株、UT が 9 株分離された。さらに、*cpe* 陰性の Hobbs17 型が患者及び調理従事者から 19 株分離された。施設の拭き取り 10 検体及び食品 58 検体からはウエルシュ菌は分離されなかった。発症時刻は 9 月 5 日の夜から 9 月 6 日の昼に集中しており、ウエルシュ菌が検出された調理従事者は 9 月 5 日の朝食のみ発症者と共通食があったことから当該食事が疑われた。PFGE の結果、Hobbs5 型は全て PFGE パターン h であり、UT は 9 株中 7 株がパターン i であり、17 型は 4 種類のパターン (m~p) が確認された (図 4)。

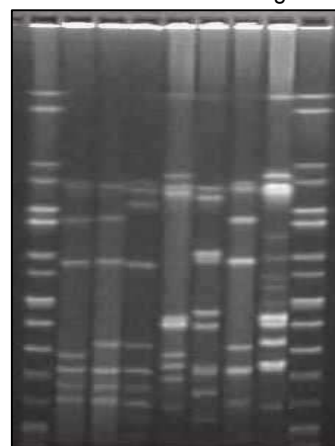
比較的短期間にウエルシュ菌を原因とする複数の食中毒事例が発生したことから事例間の関連性を考え、上記 4 事例での主要なウエルシュ菌 PFGE パターンを比較したところ、事例 1 の PFGE パターン c と事例 4 のパターン i が同一であった (図 5)。同一食品由来であることも考えられるが、一方で今回分離された菌株は異なる血清型であっても類似した PFGE パターンを示す株が多く、確認された 11 パターンが 70%以上の近似度を示したため、制限酵素 *Nru*I により確認した。その結果、それぞれの PFGE パターンの近似度が低下したため菌株間の関連性はないと考えられたが、パターン c とパターン i の菌株は再度同一パターンを示した (図 6)。

考 察

山梨県内においてウエルシュ菌を原因とする集団食中毒事件は 2000 年以降の 11 年間で 3 事例のみの発生であったが、2012 年には 3 ヶ月間で 4 事例発生した。

事例 1 においてはウエルシュ菌が 34 株分離され、全て血清型別は不能であったが、PFGE 解析の結果、7 種類のパターンが確認された。このことから原因と考えられる食品は複数種類のウエルシュ菌に汚染されていたことが考えられた。分離菌株が全て UT である場合であっても、同一の菌株とせずその他の方法による解析を行うことが重要であることが確認された。

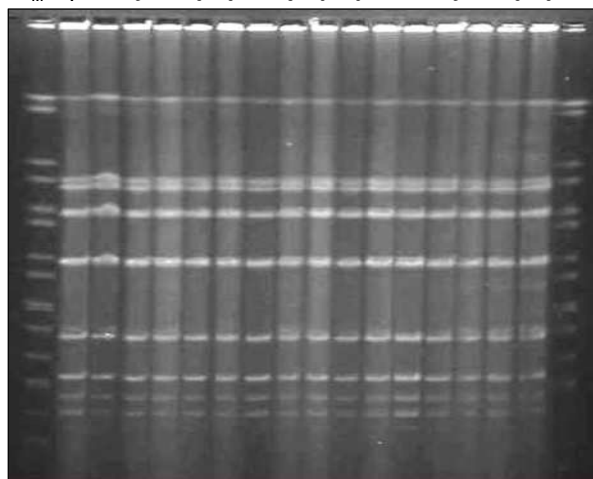
M a b c d e f g M



M : <i>S. Braenderup</i>								
PFGEパターン	a	b	c	d	e	f	g	計
菌株数	26	1	1	2	1	2	1	34

図 1 事例 1 で分離された患者由来ウエルシュ菌の PFGE パターン

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M

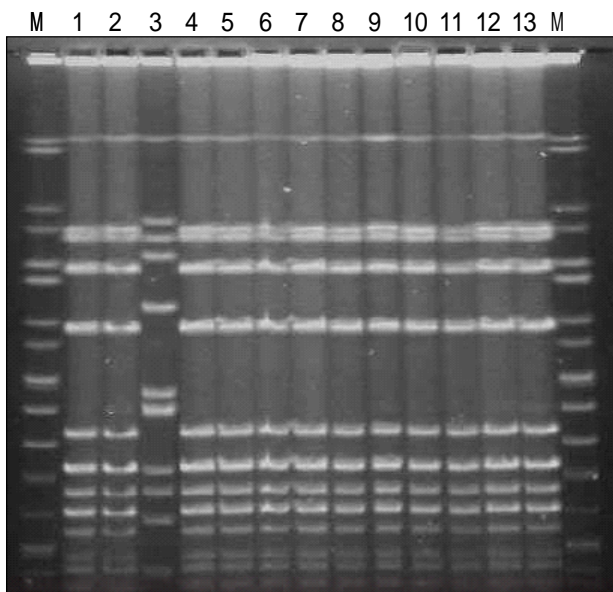


M : *S. Braenderup* 1~12 : 患者由来株 13~16 : 調理従事者由来株

図 2 事例 2 で分離されたウエルシュ菌の PFGE パターン

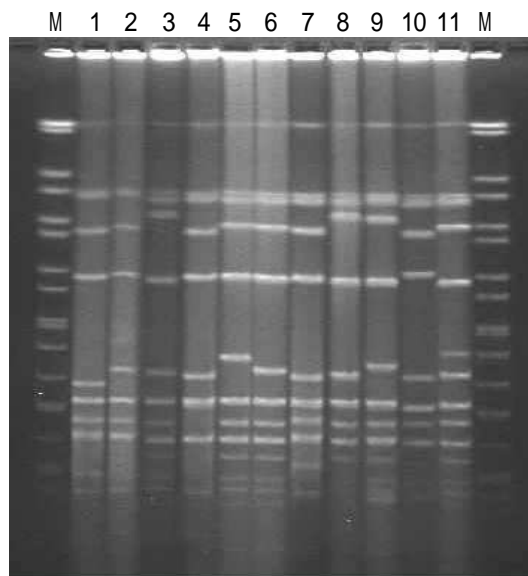
事例 3 においては分離された 12 株は全て Hobbs2 型であったが、同じ食事を喫食していた従業員由来の 1 株が異なる PFGE パターンを示した。この株は検体からの分離に非常に労力が必要であったことから、他よりも検体中の菌量が少ないことが考えられ、原因食品以外の別の原因により排菌されていた可能性が考えられた。

事例 4 においては Hobbs5 型が 15 株、13 型が 1 株、UT が 9 株分離された。その過程において検体から Hobbs17 型が 19 株分離された。PCR の結果 *cpe* は陰性であることを確認し、原因菌ではないことが明らかであったが、複数患者間の分子疫学的な解析が可能であることを考え、PFGE 解析を行った。その結果、5 型が分離された調理従事者と UT が分離された患者から同一パターンの 17 型



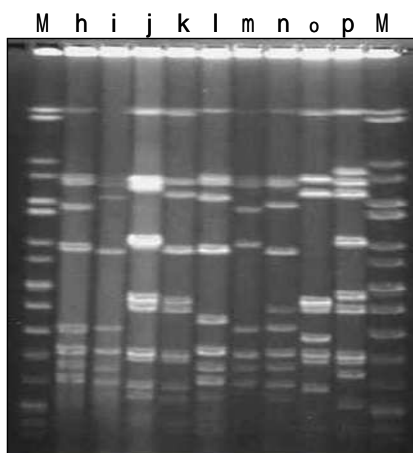
M: *S. Braenderup* 1~5: 調理補助者、従業員由来株
6~13: 患者由来株

図3 事例3で分離されたウエルシュ菌のPFGEパターン



M: *S. Braenderup* 1: パターンa 2: パターンb
3: パターンc 4: パターンf 5: 事例2
6: 事例3 7: パターンh 8: パターンi
9: パターンl 10: パターンm 11: パターンn

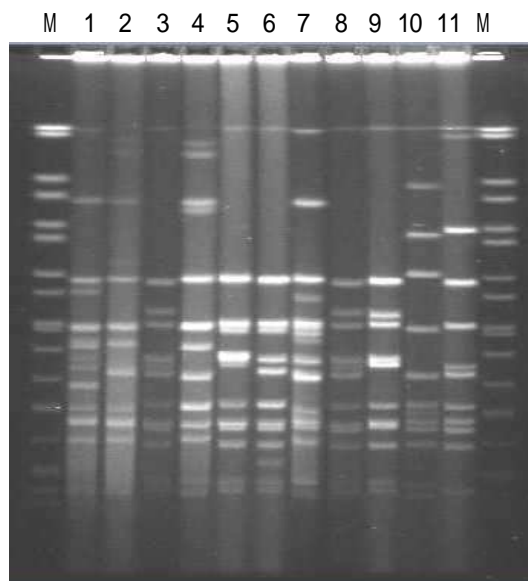
図5 *SmaI* を用いた PFGE パターン



M: *S. Braenderup*

Hobbs型	5					UT			13			17			計
PFGEパターン	h	i	j	k	l	m	n	o	p						
患者由来菌株数	12	7	1	1	1	11	3	1	1						38
調理従事者由来菌株数	3						3								6

図4 事例4で分離されたウエルシュ菌のPFGEパターン



M: *S. Braenderup* 1: パターンa 2: パターンb
3: パターンc 4: パターンf 5: 事例2
6: 事例3 7: パターンh 8: パターンi
9: パターンl 10: パターンm 11: パターンn

図6 *NruI* を用いた PFGE パターン

が分離され、ウエルシュ菌汚染食品が1つであるならば、当該食品は5型、UT、17型に汚染されていたことが考えられた。また、13型が分離された患者については、発症状況が他の患者とは異なるとの指摘が担当医師よりあったため、別の要因による発症であると考えられた。

事例間の PFGE 解析の結果、それぞれの近似度は高かったものの、この4事例は同一菌株が原因ではないことが確認された。各々の近似度を下げる目的で文献⁵⁾で紹介されている *Nrul* による解析を試みた。また、パターンcとパターンiが *Smal*、*Nrul* 処理で共に一致した。このことから、これら2菌株については何らかの関連性が考えられたが、詳細は不明であった。また、今回の4事例11菌株で *Smal* と *Nrul* の識別能力を比較すると、近似度80%における遺伝子型は *Smal* は4種、*Nrul* は8種に型別され、*Nrul* の方が識別能力が高い結果となった。また、*Smal* よりも *Nrul* の方が同一の血清型を持つ菌株の近似度が高くなる傾向にあり、有利な解析ができる可能性が考えられた。しかし、*Nrul* を用いた場合でも Hobbs13型(パターン1)とUT(パターンi)で非常に近いPFGEパターンとなるなど十分ではないと考えられるため、ウエルシュ菌については複数の制限酵素を用いた解析が重要であると考えられる。

今回の4事例では食品からのウエルシュ菌は全て陰性となり原因食品の確定を行うことはできなかった。しかしながら、同一の菌株による事例ではなかったことから、原因は同一食品の流通によるものではなく、個々の事例が集中して発生したと考えられた。4事例が3ヶ月間に集中した原因として、2012年は7月~9月にかけて山梨県内で真夏日が連続して58日間続く⁶⁾など、気温が低い日が少なく、ウエルシュ菌が食品中で増殖するのに適した環境であることが多かったことが考えられる。また、本菌による食中毒は県内では4年に1度程度しか起こらないことから営業者の認知度が低いことも原因の1つと考えられる。さらに、本菌は加熱しても殺菌できないことから、近年発生頻度の高いノロウイルス、カンピロバクターとは異なり、食中毒予防の3原則のうち「付けない」「やっつける」ではなく「増やさない」を念頭に置く必要があり、その部分の対策が不十分であることも原因となった可能性も考えられる。

ウエルシュ菌の病原性は *cpe* であり存在する場所から染色体性、プラスミド性の2つに分類されている⁷⁾。食品が原因となるウエルシュ菌食中毒の場合、本菌は染色体性の *cpe* を持っていることが多いという報告がある⁸⁾。一方で、健康者が *cpe* 陽性のウエルシュ菌を保菌している確率は1~数%程度⁵⁾ と高くはないものの、ヒトはプラスミド性の *cpe* を持つウエルシュ菌を保菌している割合が高い⁹⁾ ことが示されている。今回の食中毒事例では調理従事者からも患者と同一の PFGE パターンを示す菌株が検出されていることから、このような事例においては食品由来かヒト由来かの推定を行うことができれば有

意義であると考えられる。このことから、今後は *cpe* の解析を行うことなどによりウエルシュ菌の由来を推定できるか検証していきたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料 年次別食中毒発生状況 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/xls/nenj-i.xls>
- 2) 厚生労働省：食中毒統計資料 過去の食中毒発生状況 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 3) Yasuhiro Miki et al.: Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan, APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 74, 5366-5372 (2008)
- 4) 病原微生物検出情報: 2006年第33号
- 5) 仲西寿男、丸山務監修: 食品由来感染症と食品微生物, 380-397, 中央法規出版(2009)
- 6) 気象庁: 気象統計情報 <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
- 7) Cornillot et al.: The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne, Mol. Microbiol. 15, 639-647 (1995)
- 8) Collie, R. E. et al.: Evidence That the Enterotoxin Gene Can Be Episomal in *Clostridium perfringens* Isolates Associated with Non-Food-Borne Human Gastrointestinal Diseases, J. Clin. Microbiol. 36, 30-36 (1998)
- 9) Heikinheimo, A. et al.: Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A, Emerg. Infect. Dis. 12, 1724-1729 (2006)