

## 食水系感染症病原体の検査法 - 16

## ウエルシュ菌

う え だ し げ こ  
上 田 成 子  
Shigeko UEDA

## I. 病原体

## 1. 病原体

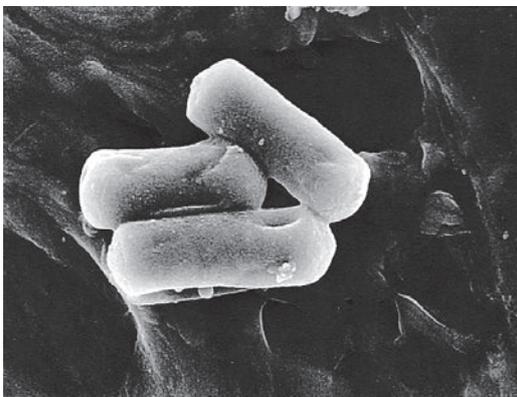
1-1 病原菌の存在<sup>1)</sup>

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトおよび動物の腸内や土壌および下水などに広く分布している。本菌はセレウス菌 (*Bacillus cereus*) やボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) と同様に本来土壌細菌である。また、医学的には *C. novyi* や *C. septicum* とともにガス壊疽菌として知られている。この菌は1940年代以降に食中毒を起こすことが知られるようになった。特に、1953年にイギリスのHobbsらがロンドンで発生した本菌による集団事例を調査・報告し、世界的に注目されるようになった。本菌は多種の毒素や酵素を菌体外に産生し、これらの毒素の協調作用により、その特徴ある病害作用を示すとされている。ウエルシュ菌は腸管内の常在細菌の一

つでもあり、本菌の糞便中の菌数は、日本人の場合、発展途上国の人に比し低く、欧米人に比し高いことが報告されている。このことは食生活の相違や公衆衛生に関わる要因が関与しているかも知れない。欧米では本菌食中毒はカンピロバクター／ジェジュニー／コリー食中毒やノロウイルス食中毒と並んで患者数が多く発生している。わが国では欧米に比較して発生件数は少ないが、“集団食中毒菌”ともいわれ、集団給食を原因とする大規模発生例がみられている。本菌は環境細菌の一つであるとともに、ヒト・動物の腸管常在菌であり、偏性嫌気性の芽胞形成菌であることを認識しておく必要がある。

1-2. 細菌学的特徴<sup>2~4)</sup>

本菌は Genus *Clostridium* に分類され、大型のグラム陽性の偏性嫌気性桿菌であり(写真1)、鞭毛をもたず、芽胞を菌体の中央部からやや偏在して形成し、ボツリヌス菌の様に絶対嫌気性でない(表1)。その酸化還元電位は培養条件等によって多少異なるが、-200mVである。従って大量調理中のスープ類



電子顕微鏡写真



CW 培地上コロニー

写真1 *Cl. perfringens* の電子顕微鏡写真、CW 培地上のコロニー(上田成子作製)

表1 *C.perfringens* の確認のための  
生化学性状試験

| 生化学性状   | 結果     |
|---------|--------|
| 嫌気培養    | +      |
| 運動性     | -      |
| 芽胞形成    | +      |
| 糖発酵     |        |
| 乳糖      | +      |
| ブドウ糖    | +(ガス+) |
| ラフィノース  | +      |
| インドール産生 | -      |
| 牛乳培地    |        |
| 凝固      | +      |
| ガス産生    | +      |
| ゼラチン    | +(液化)  |

やカレー類は加熱・調理により食品中心部は微嫌気状態になり、調理後の取扱い・保管が衛生的でない  
と汚染を受けていた場合、本菌の増殖を助長する結果となる。

本菌は産生毒素がA～E型の5種に分類され、ヒトの食中毒を起こすのはA型である(表2)。A型菌はヒト、動物の腸管内、土壌、下水および塵埃など広く自然環境中に分布している。さらに、エンテロトキシン非産生株が食中毒をおこすことが明らかとなり、その遺伝子も同定されBEC (binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*)と命名された。Hobbsらはウエルシュ菌食中毒の疫学的調査から耐熱性芽胞形成菌が食中毒発生に関与するとし、1型～17型

(Hobbs型菌)に分類している。また、易熱性の芽胞形成菌やHobbs型に該当しない菌も食中毒の原因になることが報告されている。しかしながら、Hobbsらの報告から、耐熱性芽胞形成菌は食品の加熱調理によってもそれらの生残性が高く、食中毒発生原因菌としての確率も高いとされていることから、Hobbsらの分類法は食中毒事例の疫学的追跡調査に利用されている。

本菌はセレウス菌やボツリヌス菌と同様に栄養細胞と芽胞細胞とに形態変化する。栄養細胞はD<sub>59</sub>℃値が7.2分であるが、芽胞細胞は82℃で加熱ショックを受け54℃以下の保存条件で発芽し、増殖する。通常のウエルシュ菌芽胞は100℃、5分あるいは80℃、30分で死滅し耐熱性は比較的弱い。しかしながら、食中毒の原因となるウエルシュ菌芽胞は100℃で1～4時間の加熱に耐える。このことから、一般の調理温度では芽胞は死滅しないので、食品の加熱・調理後の保存は急速冷却するとともに5℃以下の保存により本菌の増殖を極力制御することが重要である。そのためにはFDAでは6時間以内に5℃以下に冷却することを推奨している。即ち、60℃から21℃までの冷却時間を2時間以内に、21℃から5℃までの冷却時間を4時間以内にするとしている。また、本菌の発育温度は15～50℃と広範囲であ

表2 *C.perfringens* の型別毒素・生物活性・感染症および  
エンテロトキシンの性状

|      | 菌型               |                            |                     |                     |                     | 生物活性  |
|------|------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---|
|      | A                | B                          | C                   | D                   | E                   |   |
| 主要毒素 |                  |                            |                     |                     |                     |   |
| α    | ++ <sup>1)</sup> | ++                         | ++                  | ++                  | ++                  | 致死、壊死、溶血  |
| β    | - <sup>2)</sup>  | ++                         | ++                  | -                   | -                   | 致死、壊死   |
| ε    | -                | ++                         | -                   | ++                  | -                   | 致死、壊死   |
| i    | -                | -                          | -                   | -                   | ++                  | 致死、壊死   |
| 従属毒素 |                  |                            |                     |                     |                     |   |
| θ    | + <sup>3)</sup>  | +                          | +                   | +                   | +                   | 溶血  |
| κ    | +                | +                          | +                   | +                   | +                   | コラーゲン分解   |
| λ    | -                | +                          | -                   | +                   | +                   | 蛋白分解  |
| Ent  | ++               |                            | +                   |                     |                     | 下痢性エンテロトキシン*  |
| 感染症  | 食中毒・ガス壊疽         | 子ヒツジ赤痢・腸性中毒症 <sup>4)</sup> | 壊疽性腸炎 <sup>5)</sup> | 腸性中毒症 <sup>6)</sup> | 腸性中毒症 <sup>7)</sup> | *エンテロトキシンの性状<br>・分子量：35,317<br>・等電点：4.3<br>・熱安定性：易熱性(55℃、1時間)<br>・タンパク質分解酵素感受性<br>トリプシン、キモトリプシン、パパイン→安定<br>プロナーゼ、サブチリシン→失活<br>・生物活性：下痢原性、細胞毒性、血管透過性亢進 |

1): 大半の菌株が産性 2): 大半の菌株が非産性 3): 一部の菌株が産性 4): ヒツジ、ヤギ  
5): Pig-bel.Darmbrand 6): ヒツジ、ヤギ 7): ウシ、ウサギ

り、至適増殖温度は 43 ~ 45℃である。この温度は一般の食中毒菌および腐敗細菌に比し高温であり、また分裂速度は 10 ~ 12 分とかなり速い。発育可能 pH は 5.5 ~ 9.0 であり、至適増殖 pH は 7.2 である。一般の食中毒菌と同様、胃などの酸性環境下では強くない。水分活性値の至適増殖域は 0.93 ~ 0.96 である。最高食塩濃度の発育濃度は 5% であり、ブドウ球菌のように耐塩性ではない。

## 2. 疫学<sup>5~6)</sup>

ウエルシュ菌食中毒は北欧・米諸国では比較的高頻度に発生している。わが国においては、これらの国と比較して本菌食中毒発生事例は必ずしも多くはなく、1978 ~ 2016 年の 39 年間の発生事例は 848 件みられ、患者数は 83,037 人であった。また、1 事件当たりの平均患者数は 108 人であり、他の食中毒細菌と比し 1 件当たりの患者数が多いのが特徴で、概して大規模事件をもたらしている。また、月別発生状況を見ると、他の細菌性食中毒と同様に本菌食中毒は夏季に多発する傾向があるが、ウエルシュ菌の発育性状や原因食品から冬季でもかなり発生がみられ、季節的な偏りは小さい。原因施設は全発生事例のうち飲食店がほぼ 45% と最も多く、次いで仕出し屋、旅館、学校、病院の順になっている。原因食品をみると、複合調理食品(弁当類、セット食および複合その他)がほぼ 44% と半数近くを占め、次いで肉類・卵類・乳類およびその加工品、穀類およびその加工品の順になっており特に、複合調理食品に使用される豚肉や鶏肉の調理食品(煮物、肉ダンゴ、シューマイ、コロッケなど)、魚介類の調理食品(煮物、フライ、練製品など)が重要である。本菌は動物や魚介類の腸管に広く存在していることから、これらの食品素材に注意することにより本菌食中毒発生を減少させようと思われる。

上述したように原因食品は自家給食や仕出し弁当によるものが多く、大部分が獣肉、鶏肉、魚介類等のタンパク食品であり、獣肉や魚介類は本菌の汚染率が高い。これは動物性食品にはグルタチオンなどの還元物質も多く含まれており嫌気性菌が発育しやすく、また加熱調理後に同一容器内に大量に詰め込んで数時間以上放置されていたことが食中毒発生に関与している。

また、ウエルシュ菌食中毒の発生要因は、食品の

取扱いの欠陥、厨房内の衛生管理の欠陥、調理従業員の衛生・教育管理の欠陥があげられる。そのなかでも、調理食品の長時間室温放置や加熱不十分の使用等によるものが、発生要因数のうちほぼ 70% と圧倒的に多く、厨房内の衛生管理の欠陥によるものが 7% とされ、主に調理場の汚染・二次汚染が原因とされている。調理従業員については保菌者の存在が問題である。

ヒトに食中毒を起こす A 型ウエルシュ菌はヒト、動物の腸管内、土壌、下水および塵埃など広く自然環境中に分布し、動物ではウシ、ブタ、ヒツジ、ニワトリ、イヌおよびネコなどの腸管や糞便から検出されている。その他、魚介類の腸管や糞便からも検出されている。市販食品では冷凍食品、さつまあげ等は本菌の汚染が高いとされている。また、煮豆や弁当類のおかずからも本菌が検出されている。

## 3. 臨床症状<sup>4)</sup>

本菌食中毒の潜伏期は通常 6 ~ 18 時間、平均 12 時間であり、爆発的な発生を起こすことが多い。主な症状は腹痛と下痢であるが、他の食中毒に比して症状は軽い。下痢の発現は、本菌が 1g 当たり  $10^6$  個以上に増殖した食品を喫食すると、小腸内でさらに増殖し、芽胞を形成する際にエンテロトキシンが遊出される。本毒素の標的は腸管粘膜の上皮細胞微絨毛とされ、腸粘膜上皮に作用し、腸管内への水分の分泌を亢進させることによって下痢をもたらす。この種のエンテロトキシンは生体内毒素と呼ばれている。

この毒素は pH4 以下では短時間で破壊されて胃を通過できないので、腸管内で形成される必要がある。エンテロトキシンは分子量 35,000 の単純タンパク質であり、その生物活性は下痢作用(サルへの経口投与等)、液体貯留活性(ウサギ、ヤギの腸管ループレスト)、細胞毒性(Vero 細胞、腸管粘膜細胞)、血管透過性亢進(皮下、皮内)、流涙および呼吸困難(静脈内投与)、Mitogen 作用(末梢リンパ球)、神経・筋接合部の伝達阻害、大量投与による致死作用や脳幹部の呼吸中枢の障害等が知られている。エンテロトキシンに対する感受性は回腸が最も高く、次に空腸、十二指腸であり、小腸後部ほど感受性が高くなる。なお、FDA によるとヒトの本菌感染菌量は  $10^8$ /ヒト以上とされている。

## Ⅱ. 検査法

### 1. 検査法の流れ

食品のウエルシュ菌の検査方法は、①食品衛生検査指針・微生物編(2015)、②ISO7937、③U.S.FDA BAM、④USDA PSIS MLGに記載されている。ここでは食品衛生検査指針・微生物編(2015)の手法を中心に述べる。

本菌の検査方法は図1に示したように、検査試料は熱処理後チオグリコール培地に接種し、増菌培養し、選択分離培地に塗抹し、嫌気培養を行う。単離したコロニーは再度単一のコロニーとする。

単離コロニーは増菌後、ウエルシュ菌抗血清含有紙を埋め込んだ卵黄寒天培地に、そのろ紙と直角になるように菌を画線塗抹し嫌気培養を行う。形成された集落の周辺に真珠色の不透明帯が観察され、ウエルシュ菌抗血清含有紙の周辺で阻止されれば、ほとんどの場合ウエルシュ菌と同定できる。これらの菌をヒツジ血液寒天培地に塗抹し、嫌気培養を行うと溶血環が認められる。この溶血環は本菌の確認に役立つ。本菌の完全な同定のためには表2の性状を調べる必要がある。A型ウエルシュ菌のさらに厳密な試験は型別抗毒素血清(Wellcome社製)の中和能を利用して、マウス致死試験かモルモット皮内試験で毒素型別を行う必要がある。また、Hobbs型別には、1～17の17型の型別血清が市販されている耐熱性A型ウエルシュ菌型別キットである『耐熱性A型ウエルシュ菌免疫血清「生研」』を利用できる。ウエルシュ菌のエンテロトキシンを検出には細菌毒素検出キットである『PET-RPLA「生研」』を使用して逆受身ラテック凝集反応により検査できる。このほかに酵素抗体法でも実施できる。

### 2. 分離用培地

選択分離培地は、①の食品衛生検査指針ではハンドフォード改良培地(46℃)、パウチ法(図2)、卵黄加CW寒天培地:37℃、塗抹培養、TSC寒天培地(Oxoid Merck):35℃、塗抹/混釈、なおカナマイシン低耐性ウエルシュ菌による食中毒菌が出現していることから、カナマイシンに変わってシクロセリンを使用した培地も検討する必要がある。②のISO

ではSC寒天(混釈培養、(要重層)):37±1℃、20±2時間、嫌気培養、③BAMではTSC基礎寒天(混釈培養)または卵黄加TSC寒天(塗抹培養、要重層):35±1℃、20±2時間、嫌気培養、④のFSISでは卵黄加TSC寒天(塗抹培養(要重層)):35℃、24時間の嫌気培養が記載されている。

### 3. 嫌気培養方法

ウエルシュ菌は偏性嫌気性桿菌である。このことから嫌気培養が必要となる。

- 嫌気培養法はグローブボックスを用いる方法(平沢製作所など):混合ガス(炭酸ガス10%+水素10%+窒素ガス80%または炭酸ガス10%+窒素ガス90%)純窒素ガスがある。
- ガス発生袋を用いる方法:嫌気ジャーまたはガス発生袋用パウチ袋  
ガス発生袋(OXOID、三菱ガス化学)、嫌気性インジケーター。使用方法はガス発生袋を嫌気ジャーに入れ、ふ卵器の中に入れて培養する(嫌気ジャーの大きさとガス発生袋は嫌気ジャーの大きさにあわせる。)
- 混合ガスと嫌気ジャーを用いる方法

### 4. 遺伝子診断法<sup>7)</sup>

PCR法とReal time PCR法:PCR法はウエルシュ菌毒素遺伝子の検出のキットが市販されている(タカラバイオ株式会社)。また、エンテロトキシン非産生の菌株が食中毒をおこすことが明らかとなり、その遺伝子も同定されBEC(binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*)と命名されたが、この遺伝子<sup>8)</sup>は*becAB*、*becA*、および*becB*遺伝子でありこれらについてもPCR法による遺伝子の存在を試験することは重要である。さらにReal time PCR法はいくつかの研究論文が存在しているので調査研究後、利用すると良い。

### 5. 簡易・迅速診断法としてのイムノクロマト法

イムノクロマト法は、検体中の抗原が金コロイド標識特異抗体と結合してシート上を移動し、シート上部に固相化された抗体に捕捉されて、金コロイド由来の赤色の線が現れることにより抗原の検出ができる。また、青色のラテックスで標識した抗体を利用したイムノクロマト法のキットもある。これらの

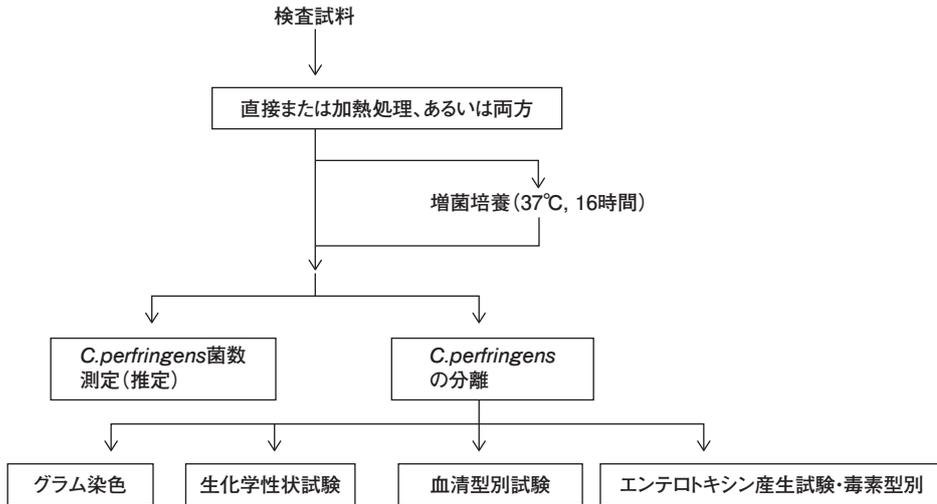


図1 *C.perfringens* の一般的分離・同定手順

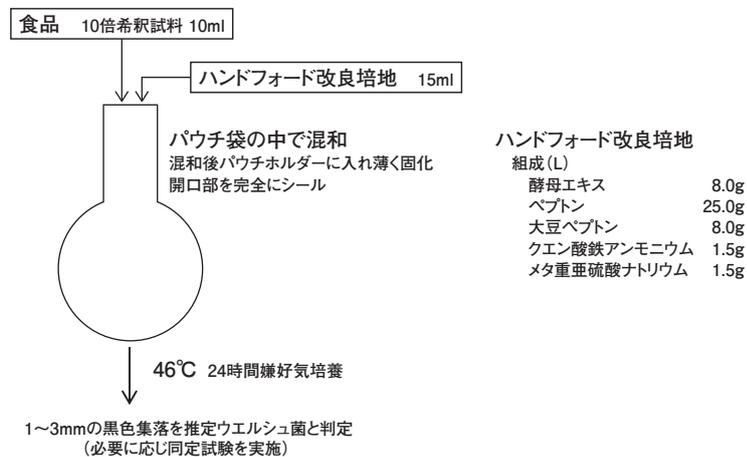


図2 パウチ法による *C.perfringens* 定量試験

方法は操作が簡便で、個人により結果・判定が異なることが少なく、特別な機器も必要としないので、熟練した技術者のいない規模の小さい検査室にも適している。通常、選択増菌培養を行ってから使用する。そのキットに最適な選択増菌培養培地を使用して適切な培養条件で培養し、検出に必要な菌数レベルまで増菌させることが重要である。そのためには、イムノクロマトのキットと最適化された選択増菌培地がセットで開発、販売されているものを使用することが勧められる。

ウエルシュ菌については、核酸クロマトのスィフトジーン CPE 産生ウエルシュ菌「カインス」(株式会社カインス) が市販されている。本クロマトはエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の生菌を検出する。培養は不要で食品試料から直接標的となる核酸を抽出する。核酸抽出、増幅、検出までに要する時

間は1時間以内であり、インターナルコントロール(IC)を共増幅することにより増幅阻害による偽陰性を防止している。

## 文 献

- 1) Hobbs, B.C.: Food Poisoning and food Hygiene, 7th, Edward Arnold Ltd (2007)
- 2) Petit, L., M. Gilbert, and M. R. Popoff. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 1999; 7: 104-110.
- 3) Labbe, R.J., and V.K. Juneja. *Clostridium perfringens*: gastroenteritis. In H. Riemann and D.O. Cliver (ed), foodborne Infections and Intoxications. Academic Press, Inc., San Diego, CA. (2006).
- 4) Juneja, V.K., and Sofos, J. N.,: Pathogens and Toxins in foods: *Clostridium perfringens*: 53-70 ASM Press, Inc., Washington, DC (2010).
- 5) 厚生省環境衛生局食品衛生課編(1978-2005), 全国食中毒

- 事件録(昭和53-平成10年度版).日本食品衛生協会(東京). 全国食中毒事件録(平成11-24年度版). 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課.
- 6) 財団法人厚生統計協会：国民衛生の動向(2010-2018年)(東京).
- 7) Kokai-kun, J.F., Songer, J.G., Czeczulin, J.R., Chen.F., and McClane, B.A: Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. J.Clin. Microbiol. 1994 ; **32** : 2533-2539.
- 8) Shinya Yonogi, and et, al.: BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks : infect. Immun. 2014 ; **82**(6): 2390-2399.