

## 短報

### 集団下痢症におけるウェルシュ菌の効率的な検索法に関する検討

鈴木理恵子, 石原ともえ, 三宅芳枝  
黒木俊郎, 高橋孝則, 新川隆康

#### Examination about an Effective Search Method of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in an Outbreak of Diarrheal Disease

Rieko SUZUKI, Tomoe ISHIHARA

Yoshie MIYAKE, Toshiro KUROKI

Takanori TAKAHASHI and Takayasu NIKKAWA

#### はじめに

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は偏性嫌気性の有芽胞非運動性のグラム陽性大桿菌で、ヒトや動物の腸管内の常在菌であるとともに、下水、河川水等の水中や土壌に広く分布する。ヒトの感染症としては、ガス壊疽、化膿性感染症、敗血症の原因菌として知られているが、最も多発するのは本菌による食中毒である。本菌による食中毒は、エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌(下痢原性ウェルシュ菌)が増殖した食品を喫食することにより、腸管内で本菌が増殖・芽胞を形成する際に産生するエンテロトキシンにより発症する感染型食中毒である。平成8年から平成16年までの本菌による食中毒の全国発生数は年平均29件程度で事件数としては少ないが、1事件あたりの患者数は平均78名と多く、原因施設が給食施設等の大規模調理施設であることがその要因のひとつである。県内では平成16年4月(患者数30名)および平成17年3月(患者数66名)にいずれも施設内給食による食中毒事例の発生があった。本菌による食中毒の最も確実な診断は、患者ふん便や推定原因食品等からエンテロトキシンを産生する本菌が分離されることであるが、2~6%と低率ながらも健康人がエンテロトキシン産生菌を保菌する<sup>1)</sup>ことから、非病原性およびエンテロトキシン産生性の常在ウェルシュ菌と食中毒の原因菌である本

菌の鑑別が重要となる。また、血清型別による診断は、市販血清Hobbs(1~17型)型およびこれに加えて東京都健康安全研究センター独自で行われているTW(1~66型)型が用いられることが多く、市販血清のみでの血清型別は不十分である。また、血清型と病原性は必ずしも一致しないことなど、本菌を原因とする食中毒の診断には時間を要することが多く、改善が求められている。

今回、下痢症患者由来ふん便を用いてエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の検索を行い、本菌が疑われる場合の効率的な検索手順について検討を行ったので報告する。

#### 材料と方法

##### 1. 検査材料

平成17年3月、食中毒が疑われた事例より採取した下痢症患者由来ふん便26検体および調理従事者ふん便1検体の計27検体を用いた。

##### 2. 食中毒起因菌の分離および同定

ふん便は滅菌生理食塩液で10%乳剤とし、定法<sup>2)</sup>に準じて食中毒起因菌の検索を実施した。ウェルシュ菌検索の詳細は、チオグリコール酸培地(以下TGC培地)(栄研化学)15mlの管底にふん便の10%乳剤をスポイトで接種し、100℃、10分加熱し、急冷後37℃、18~48時間培養した。このTGC培養菌をカナマイシン不含CW卵黄寒天培地(ニッスイ)(以下CW培地)に塗抹し、アネロパックケンキ(スギヤマゲン)を用いて37℃、18~48時間、嫌気培養を行った。

CW平板上で周囲にレシチナーゼ反応および乳糖分解による黄色の白濁環を有する黄白色集落を釣菌し、 $\alpha$ 抗毒素含有濾紙(ニッスイ)を用いてレシチナーゼ抑制試験を行った。また、糖分解用GAM半流動高層培地(ニッスイ)を用いて運動性、インドールおよび糖分解試験(グルコース、ラクトース、ラフィノース)を、牛乳培地を用いて凝固およびガス産生試験を行った。

1検体あたり平均4集落を釣菌して確認培養を行ったが、その後必要に応じて追加し、もっとも多い検体では18集落(平均9集落)について確認培養を行った。

以上の試験によりウェルシュ菌と同定された菌株について、耐熱性A型ウェルシュ菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いてHobbs型による血清型別を実施した。

##### 3. エンテロトキシンの検出

エンテロトキシン遺伝子の検索:TGC培地培養液1mlを1.5mlマイクロチューブに採取し、遠心分離(15,000rpm, 10分)後、リン酸緩衝液(以下PBS)を用いて3回洗浄を行った。沈渣にPCR用精製水100 $\mu$ lを加え95℃、10分加熱後、急冷してPCR用の鋳型(以

下, TGC 鋳型) とした. ウェルシュ菌毒素産生遺伝子用 Primer Set CPE-1, -2(TaKaRa)を用いてエンテロトキシン遺伝子の有無を PCR 法で確認した. 一方, 平板に発育した集落密集地菌塊 (以下, CW 鋳型) および分離株については PCR 用精製水100  $\mu$ l に菌体を懸濁後, TGC 培地培養液からの方法に準じ実施した.

エンテロトキシン産生性試験: ふん便を10%乳剤とした遠心上清について, ウェルシュ菌エンテロトキシン検出用キット PET-RPLA 「生研」(デンカ生研) (以下, PET-RPLA) を用いエンテロトキシン産生の有無を確認した.

一方, 分離株については変法 Duncan-Strong 培地で 37°C 18~24時間培養後, その上清を検体とし同様に PET-RPLA でエンテロトキシン産生の有無を確認した.

4. パルスフィールドゲル電気泳動

分離株を GAM ブイヨンで37°C, 18時間培養後, 培養液200  $\mu$ lを15,000rpm, 10分遠心分離した. 沈渣を PBS で3回遠心洗浄後, 精製水200  $\mu$ l に懸濁し, 等量の1% Seakem Gold Agarose (Cambrex) を加え菌体包埋プラグを作製した. 作製したプラグは1mg/ml Lysozyme, 80  $\mu$ g/ml Lysostaphin 添加0.5M EDTA(pH8.0)溶液で溶菌後, 1mg/ml proteinaseK, 1%N -lauroylsarcosine 添加0.5M EDTA (pH8.0) 溶液で処理し, 制限酵素 *Sma* I を用い DNA を切断後, パルスフィールドゲル電気泳動 (以下, PFGE) を行った.

結 果

ふん便27検体について食中毒菌の検索を行ったところ, TGC 培地にウェルシュ菌に特有の発育が20検体 (74.1%) に認められた. CW 培地による分離培養の結果, TGC 培地に発育の認められた20検体すべてから, レシチナーゼ陽性菌の発育が認められた.

TGC 鋳型および CW 鋳型を用いたエンテロトキシン遺伝子検索では各々18検体 (66.7%) が遺伝子を保有していたが, 両鋳型で遺伝子保有が確認されたのは17検体であった.

ふん便より10%乳剤が作製できた24検体について, PET-RPLA によるエンテロトキシン産生試験を実施したところ, 15検体 (62.5%) でエンテロトキシン産生が確認された.

CW 培地上に発育したレシチナーゼ陽性集落を釣菌し,  $\alpha$  抗毒素含有濾紙でレシチナーゼ抑制反応が認められた株をウェルシュ菌と推定し, 生化学性状試験, 血清型別およびエンテロトキシン産生性および遺伝子の検出を行った. 生化学性状はいずれも, 運動性(-), インドール(-), グルコース(+), ラクトース(+), ラフィノース(+),

牛乳培地で凝固, ガス産生(+)であり, 血清型は Hobbs13型および型別不能株, エンテロトキシンは産生および非産生株が分離されており, エンテロトキシン産生株はすべてエンテロトキシン遺伝子を保有していた. 血清型およびエンテロトキシン産生性により Hobbs13型エンテロトキシン非産生株 (13検体), 血清型別不能エンテロトキシン産生株 (17検体), 血清型別不能エンテロトキシン非産生株 (12検体) の3種に型別され, 同一検体から複数型のウェルシュ菌が分離された(表1).

表1 供試検体およびウェルシュ菌検出状況

検体番号	採田	TGC培地の発育	TGC培地からのエンテロトキシン遺伝子検出	CW平板密集地からのエンテロトキシン遺伝子検出	耐熱性ウェルシュ菌検出	血清型 (エンテロトキシン産生性)	ふん便からの直接エンテロトキシン産生性試験
1	調理従事者	+	-	-	+	UT(-)	-
2	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	+
3	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(+)	+
4	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	+
5	発症者	+	+	-	+	Hobbs13(-)	+
6	発症者	+	+	+	+	UT(-) UT(+)	+
7	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	+
8	発症者	-	-	-	-		-
9	発症者	-	-	-	-		-
10	発症者	-	-	-	-		-
11	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	+
12	発症者	-	-	-	-		NT
13	発症者	+	-	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	+
14	発症者	-	-	-	-		-
15	発症者	-	-	-	-		-
16	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-)	NT
17	発症者	+	+	+	+	UT(-) UT(+)	-
18	発症者	+	+	+	+	UT(+)	+
19	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	+
20	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(+)	-
21	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	+
22	発症者	+	+	+	+	UT(+)	+
23	発症者	+	+	+	+	UT(-) UT(+)	+
24	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(+)	+
25	発症者	+	+	+	+	Hobbs13(-) UT(-) UT(+)	NT
26	発症者	-	-	-	-		-
27	発症者	+	+	+	+	UT(+)	+
計		20	18	18	20		15
(%)		(74.1)	(66.7)	(66.7)	(74.1)		(62.5)*

NT:検査せず UT:血清型別不能 \* :検査数24検体

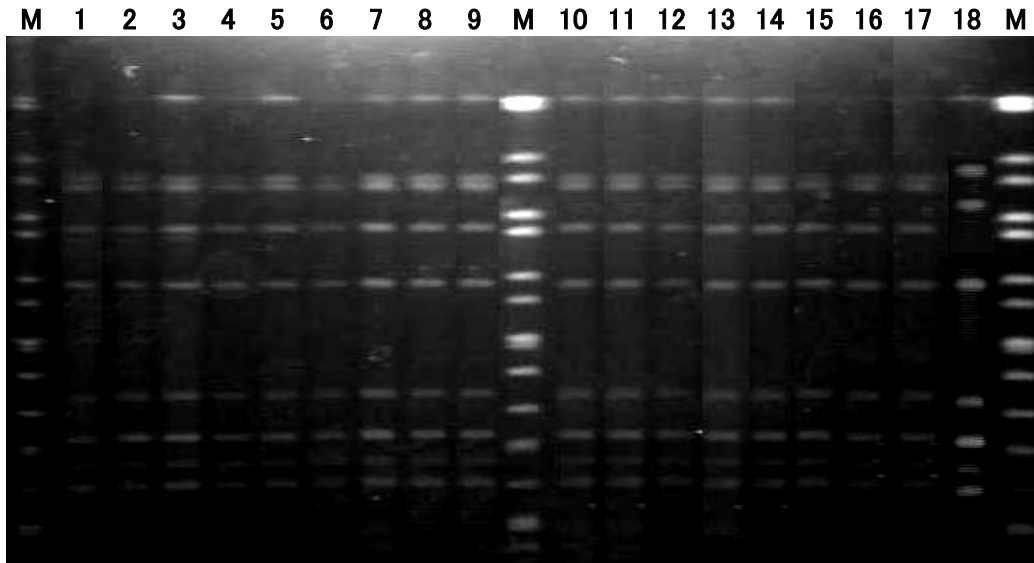


図1 ウェルシュ菌の PFGE パターン (制限酵素 *Sma* I)

M : 分子量マーカー *Salmonella* Braenderup H9812  
 レーン 1~17: 下痢症患者由来株 (型別不能・エンテロトキシン産生株)  
 レーン 18 : 参考株 (型別不能・エンテロトキシン産生株)

実際の検査過程において CW 平板上からレシチナーゼ陽性菌を無作為 (平均4集落) に釣菌したところ、エンテロトキシン産生株が分離できたのは20検体中7検体で、釣菌数に対するエンテロトキシン産生株の占める割合は24.3%であった。しかし、TGC 培地による PCR スクリーニング成績 (66.7%) を加味して平均9集落を追加釣菌したところ、釣菌数に対するエンテロトキシン産生株の占める割合は46.2%と上昇し、20検体中17検体からエンテロトキシン産生株を分離することができた。

TGC 鋳型または CW 鋳型でエンテロトキシン遺伝子の検出、ふん便乳剤中のエンテロトキシン産生性およびエンテロトキシン産生株の分離の4手法において不一致を示したのは24例中4例であった。

分離された型別不能・エンテロトキシン産生株 (17株) および参考株として他事例より分離された型別不能・エンテロトキシン産生株 (1株) について、制限酵素 *Sma* I を用いた PFGE を行ったところ、参考株を除く17株の DNA パターンは一致していた (図1)。

考 察

健康人における耐熱性ウェルシュ菌の保菌率は15~25%、エンテロトキシン産生株の保菌率はさらに低く2~6%<sup>1)</sup>とされている。本菌が食中毒の原因菌か否かは同一血清型のエンテロトキシン産生菌が優位に検出されることが望ましいが、市販血清のみで対応することは難し

く、初期段階ではエンテロトキシン産生性の有無が食中毒か否かの指標となる。ウェルシュ菌は、ふん便から PET-RPLA を用いて直接エンテロトキシンの検索が可能であるが、煩雑な食中毒検査を実施している中、未だ原因菌の特定ができていない場合に並行して特定の細菌の毒素等の検索を行うことは難しく、検査材料も不足する場合がある。そこで加熱により選択的に増菌された培養液 (TGC培地等) 中の発育を観察した上で、培養液から食中毒原因菌の毒素遺伝子等をPCR法で検索することを取り入れることにより、原因菌の推定を迅速に行うことが可能になると考える (図2)。

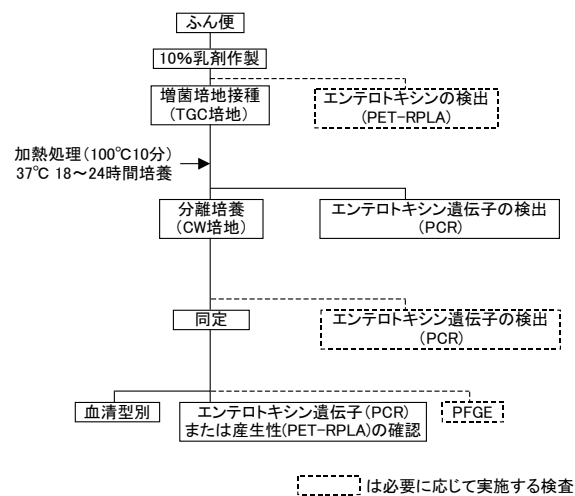


図2 耐熱性ウェルシュ菌の検査法

エンテロトキシン産生の有無は集落のみで判断することは難しく、培養液または平板集落密集地からのスクリーニング検査が有効と考えられる。しかし今回の結果では、すべてのスクリーニング法の結果が一致したわけではなく、24例中4例（検体番号5, 13, 17, 20）の不一致が確認されたことから、この原因を次のように考察した。CW 鋳型での遺伝子検出およびエンテロトキシン産生株の分離が陰性であった検体番号5では、目的菌の遺伝子およびエンテロトキシンは検体中に存在していたものの、エンテロトキシン産生ウェルシュ菌が生残していなかったことが原因として考えられた。TGC 鋳型における遺伝子検出のみが陰性であった検体番号13では、TGC 培養液中のエンテロトキシン産生菌量が PCR 法での検出限界以下であったことが原因として考えられた。ふん便中のエンテロトキシン産生性のみが陰性であった検体番号17および20では、輸送用培地中の検体量の不足、またはエンテロトキシン産生量が検出限界以下であった等が考えられた。スクリーニング法をどの段階で取り入れれば最も効率的で有用であるかを判断するには、今回の結果のみでは例数は不十分であることから、今後も実際の事例数を増やしデータの蓄積を行うことが重要である。

また、本菌を食中毒と決定する上での一指標とされている血清型別は、市販血清で型別不能であった場合に他施設に依頼を行うことになり迅速性にかける。このような場合 PFGE による DNA パターンの一致を疫学解析の一指標と考えることで、他施設に依頼することなく迅速な結果を得ることが可能である。

今回、下痢症患者の74.1%から耐熱性ウェルシュ菌が検出され、その中でも起因菌と考えられるエンテロトキシン産生株は全体の63.0%から検出されており、明らかに健常者より保菌率が高いこと、市販血清では型別不能であったが PFGE のパターンが一致したことにより、共通の汚染源による集団下痢症（食中毒）であることが推察された。

（本調査を実施するにあたり、ご協力いただいた茅ヶ崎保健福祉事務所生活衛生課および関係者の皆様に御礼申し上げます。）

（平成17年7月22日受理）

#### 文 献

- 1) 坂崎利一：新訂食水系感染症と細菌性食中毒，pp396-412，中央法規出版，東京(2000).
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005