

食中毒事例から分離された乳糖遅分解のウエルシュ菌

門間千枝，尾畑浩魅，小西典子，畠山 薫，池内容子，甲斐明美，柳川義勢，矢野一好

***Clostridium perfringens* with delayed lactose fermentation isolated from a foodborne outbreak**

Chie MONMA, Hiromi OBATA, Noriko KONISHI, Kaoru HATAKEYAMA, Yoko IKEUCHI,
Akemi KAI, Yoshitoki YANAGAWA and Kazuyoshi YANO

食中毒事例から分離された乳糖遅分解のウエルシュ菌

門間千枝*, 尾畑浩魅*, 小西典子*, 畠山 薫**, 池内容子*, 甲斐明美*, 柳川義勢**, 矢野一好***

Clostridium perfringens with delayed lactose fermentation isolated from a foodborne outbreak

Chie MONMA *, Hiromi OBATA *, Noriko KONISHI *, Kaoru HATAKEYAMA **, Yoko IKEUCHI *,
Akemi KAI *, Yoshitoki YANAGAWA ** and Kazuyoshi YANO ***

A foodborne outbreak of gastroenteritis occurred among persons who had eaten Chinese food in Tokyo between 20 and 27 December, 2000. As a result of epidemiological investigation, a total of 101 patients (18 groups) of 685 persons (42 groups) who had eaten causal food was reported. *Clostridium perfringens* serotype TW47, which produces enterotoxin was isolated from 12 of 50 patients, 1 of 12 food handlers and 2 of 8 foods at the restaurant and regarded as the cause of the foodborne outbreak. The isolate was atypical strain that the color of lecithinase reaction on CW agar with egg yolk was orange color, atypical color. We compared pH of broth cultures after inoculated the isolates from the outbreak and that of isolates from the others. After 24 hours incubation, pH of cultures after incubated the isolates from the outbreak showed pH 5.0 ~ 6.1 (pH 5.4 on average), though pH of cultures after incubated the isolates from the other outbreaks showed pH 4.5 ~ 5.1 (pH 4.8 on average). It seemed that the lecithinase reaction of the isolate colored orange because the lactose fermentation of the isolate was delayed than that of the other outbreaks' isolates. The isolate from the outbreak had typical characteristics of *C. perfringens* except lecithinase reaction, and 16S rDNA of *C. perfringens*.

Keywords : ウエルシュ菌 *Clostridium perfringens*, 食中毒事例 foodborne outbreak, レシチナーゼ反応 lecithinase reaction, 乳糖遅分解 delayed lactose fermentation, 非定型的性状 atypical characteristics

はじめに

ウエルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は芽胞を形成する偏性嫌気性菌で、下痢、腹痛を主症状とする食中毒の原因菌の一つである。東京都における本菌食中毒の発生事件数は年間数件程度であるが、発生すれば、比較的大規模の食中毒になることが多く、食中毒対策上、重要な菌の一つである。食中毒原因菌を検査する過程で、特にウエルシュ菌食中毒が疑われる場合には、まず、本菌の分離・検出がキーポイントである。検出された菌に対して病因物質であるエンテロトキシン産生性を調べ、原因菌か否かを決定している。

わが国では、1966 年赤尾ら¹⁾が開発したカナマイシン含有または不含有の卵黄加 CW 寒天平板培地が、選択分離培地として食中毒発生時のウエルシュ菌検査に汎用されている²⁾。ウエルシュ菌は、本培地上では、産生する α 毒素による特有のレシチナーゼ反応を示し、かつ、乳糖を分解するため、そのレシチナーゼ反応部は黄色を呈する。このレシチナーゼ反応部は他の類似菌と異なるため、検査をする上でウエルシュ菌を容易に選択できる指

標になっている。

2000 年 12 月に東京都内で発生した患者数 101 名の大規模集団食中毒事例の原因となったウエルシュ菌は、卵黄加 CW 寒天平板培地上のレシチナーゼ反応部が通常と異なる稀な菌であった。本菌の検査状況および分離菌株の性状について報告する。

材料及び方法

1. 被検材料

2000 年 12 月に東京都内で発生した食中毒事件の被検材料、すなわち、患者ふん便 50 件、従業員ふん便 12 件、参考食品 8 件、拭き取り検体 12 件を供試した。

2. ウエルシュ菌の分離

ウエルシュ菌の分離は常法²⁾に従って直接分離培養と増菌培養を行った。直接分離培養はカナマイシン含有 CW 寒天平板培地(日水製薬)に卵黄を添加した培地(以下、CW 寒天と略す)を用い、増菌培養には TGC 培地(日水製薬)を使用した。増菌培養では、ふん便は 80

* 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

*** 東京都健康安全研究センター微生物部

℃ 10 分加熱処理を行った後、食品とふき取りは加熱処理を行わずに TGC 培地に接種し 37℃ 一夜、培養した。その培養液を CW 寒天に塗抹し嫌気培養を行った。CW 寒天上に発育したレシチナーゼ反応陽性の集落について同定とエンテロトキシン産生性試験等を行った。

3. ウエルシュ菌の同定と血清型別検査

分離菌株の生化学的性状試験は常法³⁾に従って行った。レシチナーゼ抑制試験には α 抗毒素濾紙（日水製薬）を用いた。さらに、ウエルシュ菌の 16S rDNA に基づいた菌種特異的なプライマーを用いた PCR 法を応用して同定した⁴⁾。また、血清型別は、市販の耐熱性 A 型ウエルシュ菌免疫血清（デンカ生研）及び自家調製した TW のシステムによる免疫血清^{5,6)}を用い、スライド凝集法によって行った。

4. 分離菌株のエンテロトキシン産生性試験

エンテロトキシン産生性は、供試菌株を変法 DS 培地⁷⁾で 37℃ 約 20 時間培養し、芽胞形成を確認した後、その遠心上清を用いて、RPLA 法（デンカ生研）で調べた。

エンテロトキシン遺伝子の有無は、市販のプライマー CPE-1/2（タカラ）及び石村ら⁸⁾のプライマーを用いた PCR 法で調べた。PCR 反応用の DNA の抽出は、供試菌株の BHI 培養液からアルカリ熱抽出法で行った。

5. 乳糖分解能の測定

本事例由来 10 株及び他の食中毒 10 事例由来の原因菌で血清型が異なるウエルシュ菌 10 株を対象に、乳糖分解能を測定した。供試菌株を乳糖を 1% 添加したチオグリコレート培地（DIFCO）に接種後 37℃ で嫌気培養し、経時的に培地の pH 変化を測定した。これは、乳糖が分解

されることにより培地の pH が下がることに基づく測定法である。

結 果

1. 疫学調査成績

本事例は、2006 年 12 月 20 日から 27 日にかけて、都内の飲食店で中華料理を喫食した 42 グループ 685 名の内 18 グループ 101 名が、約 12 時間後に下痢（97.0%）、腹痛（74.3%）を呈した食中毒事例である（Table 1）。発症者 18 グループ 101 名については、グループ間の関係は全くなく、唯一の関連が当飲食店での会食であった。

本大規模食中毒では、複数グループの患者ふん便、従業員ふん便、参考食品から後述するエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌血清型 TW47 が検出され、本菌が食中毒原因菌と確定された。原因菌が検出された参考食品の

Table 1. Outline of the Outbreak

Date of occurrence	December 20-27, 2000
Place of occurrence	Restaurant
No. of patients/No. of at risk	101/685 (14.7%)
No. of patients' groups /No. of risk groups	18/42
Incriminated food	Chinese foods
Symptoms	Diarrhea (97.0%), Abdominal pain (74.3%)
Causal bacteria	<i>Clostridium perfringens</i> serotype TW 47
Isolated from patients	12/50
Isolated from food handlers	1/12
Isolated from foods	2*/8

*Steamed chicken and boiled Chinese wheat-gluten bread

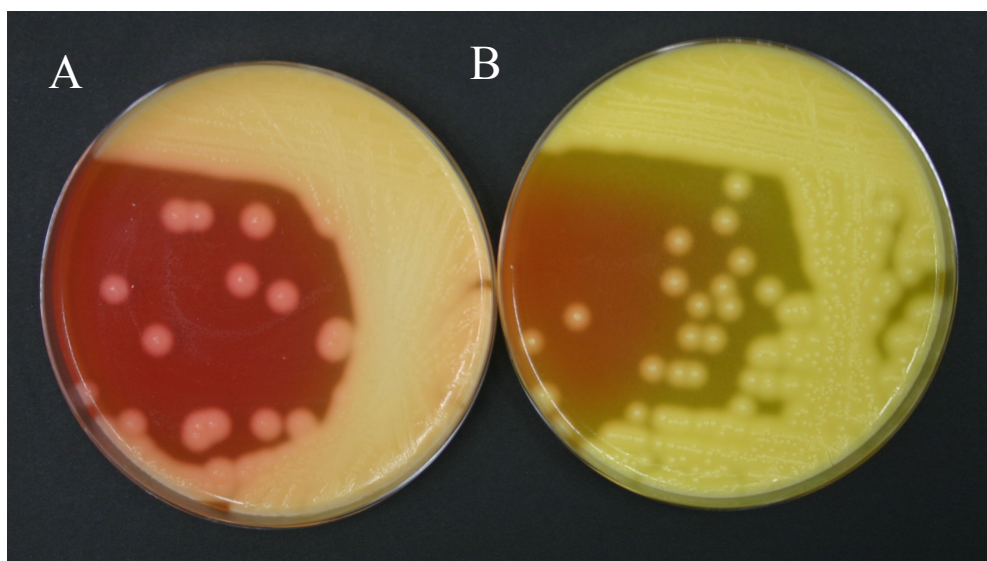


Fig.1. *Clostridium perfringens* on CW Agar with Egg Yolk

A: Colony of *Clostridium perfringens* isolated from patient of the outbreak

B: Typical colony of *Clostridium perfringens*

蒸し鶏と中国麺は前菜として提供されていた。他の前菜（タン、クラゲ、湯葉巻、ピータン）も含めこれらは、客への提供前日に調理し、冷蔵で保存された後に、翌日客に提供する3～5時間前にスライスし、盛りつけられていた。参考食品からも食中毒原因菌が分離されたことから、連続的な汚染を受けていた可能性が高いと推定された。

2. ウエルシュ菌検出成績

患者ふん便について、通常通り、CW 寒天を用いて典型的なウエルシュ菌を分離して調べた結果、分離株は病原因子であるエンテロトキシン非産生性であった。更に、分離寒天平板培地上のウエルシュ菌とは認められない判定し難い非定型的性状の集落について検査を進めた

Table 2. Characteristics of *Clostridium perfringens* Isolates

Characteristics	Isolates from the outbreak	Isolates from the other outbreaks
Growth on aerobic blood agar	-	-
Motility	-	-
Spores(Subterminal)	+	+
Egg yolk agar		
Lecithinase production	+	+
	(orange color)	
Neutralization by α -antitoxin	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Milk digestion (Stormy fermentation)	+	+
Indole production	-	-
Carbohydrate fermentation		
Glucose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
	(delayed)	
Sucrose	+	+
Salicin	-	-
Mannitol	-	-
Raffinose	+	+
Cellobiose	-	-
Inulin	-	-
Inositol	±	-
Trehalose	-	-
<i>C. perfringens</i> 16S rDNA	+	+
Enterotoxin		
RPLA method	+	+
PCR method	+	+

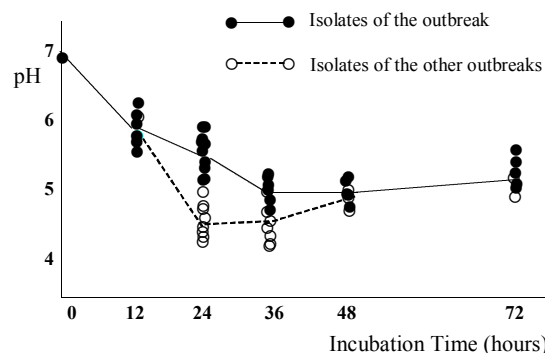


Fig. 2. pH of Culture Media After Incubation of Isolates

結果、患者ふん便 50 件中 12 件、従業員ふん便 12 件中 1 件（配膳従業員）、参考食品 8 件中 2 件（前菜として提供された蒸し鶏及び中国麺）から、ウエルシュ菌血清型 TW47 が検出された。本ウエルシュ菌は RPLA 法と PCR 法でエンテロトキシン産生性が確認された。しかし、本菌のレシチナーゼ反応部は、典型的な黄色ではなく赤橙色であった (Fig. 1)。

このほか、拭き取り検体 16 件中 1 件（前菜用まな板）から黄色ブドウ球菌が検出された。しかし、サルモネラ、下痢原性大腸菌、腸炎ビブリオ、セレウス菌などの既知の食中毒起因菌やノロウイルスは患者ふん便等から検出されなかった。

3. 分離されたウエルシュ菌の性状

分離寒天平板培地上に認められた通常と色調が異なる集落周囲のレシチナーゼ反応は、別に行ったレシチナーゼ抑制試験で、ウエルシュ菌のレシチナーゼ反応であることが確認された。

分離された菌は乳糖遅分解であったほかは、ウエルシュ菌の典型的な性状を示し、PCR 法で 16S rDNA 上のウエルシュ菌の特有塩基配列の保有が確認された (Table 2)。

4. 分離されたウエルシュ菌の乳糖分解能

本事例由来株と他の食中毒事例由来の典型株（各 10 株）で乳糖分解能を比較したところ、培養 24 時間後の pH 値は典型株では pH4.5 ～ 5.1（平均 pH4.8）を示したのに対し、本事例由来株では pH5.0 ～ 6.1（平均 pH5.4）であったことから、乳糖の分解が遅いことが示された。培養後 48 時間ではその差は認められなかった (Fig. 2)。

考 察

ウエルシュ菌の選択分離培地として多種類の培地が開発されているが、その選択分離の方法は共通している。すなわち、菌の選択のために 1 種類あるいは複数の抗生物質を使用すること、また、クロストリジウム属菌とそれ以外の菌を区別するために、平板上で特異的な反応が起こるように工夫されていることである。例えば、亜硫酸塩添加培地上での硫化物生成による黒色化集落⁹⁻¹²⁾

や、卵黄加培地上での卵黄反応^{1,2-14)} 等がある。

我が国では、選択分離培地として、卵黄反応を利用した CW 寒天平板培地が市販され、通常汎用されている。本培地は、卵黄加寒天平板培地^{1,4)} を基礎にして、添加する糖や色素の種類を検討し開発された。糖の種類としては最初ブドウ糖が検討されたが、ウエルシュ菌同定用培地として乳糖含有培地 (lactose-egg-york-milk 培地)¹⁵⁾ が用いられていたことを加味し、乳糖に決定された。乳糖添加培地とブドウ糖添加培地でその発育、卵黄反応の大きさを比較すると、乳糖添加培地では *Clostridium bifermentans*, *Clostridium novyi* 等の *Clostridium* 属菌では若干発育が悪くなるが、ウエルシュ菌では差は無く、ウエルシュ菌用分離培地としては乳糖を使用の方が良いと報告されている¹⁾。また、pH 指示薬としての添加色素は、ニュートラルレッドが用いられることが多かったが^{1,5)}、血液を添加したときの溶血反応が観察しやすいようにフェノールレッドに変更された。その結果、ウエルシュ菌の集落は黄色を呈し、溶血反応が判別しやすくなったと報告されている¹⁾。

本食中毒の原因菌であるウエルシュ菌血清型 TW47 のレシチナーゼ反応部は、黄色ではなく赤橙色で、嫌気培養したセレウス菌の反応に酷似していた。乳糖分解能試験の結果から、本菌株は乳糖遅分解で有ることが判明した。しかし、48 時間培養すると典型的なウエルシュ菌のレシチナーゼ反応を示した。本菌は乳糖遅分解であるため、CW 寒天上で pH 指示薬であるフェノールレッドによる黄変が遅れ、赤橙色を呈したと考えられた。

ウエルシュ菌における乳糖発酵は、非運動性、硝酸塩還元、ゼラチンの液化と併せてウエルシュ菌の同定に必要な特異的性状である。しかし、本事例原因株は乳糖遅分解という非定型的な性状を示すウエルシュ菌であった。

また、著者らは非定型的性状のウエルシュ菌食中毒として、本事例の他に易熱性芽胞形成ウエルシュ菌による事例、レシチナーゼ反応陰性菌による事例、既知のエンテロトキシンとは異なった下痢原性毒素産生菌によると推定される事例なども経験している。本事例のように発症状況からウエルシュ菌が原因と疑われるにもかかわらず、典型的な原因菌が検出されないときには、常法では検出されにくい非定型的な菌である可能性も考慮する必要がある。

ま と め

ウエルシュ菌の分離・同定は卵黄寒天上のレシチナーゼ反応を指標に行われている。しかし、2000 年 12 月に中華料理を原因として発生した食中毒事例 (喫食者 685 名、患者 101 名) は、そのレシチナーゼ反応部の色調が通常と異なり、ウエルシュ菌と推定し難い菌が原因であ

った。

詳細な検査の結果、患者ふん便 50 件中 12 件、従業員ふん便 12 件中 1 件、参考食品 8 件中 2 件から非典型的な赤橙色のレシチナーゼ反応部を示すウエルシュ菌が検出された。本菌はエンテロトキシン産生性で、血清型 TW47 であった。培養時の乳糖分解による pH 値の低下について検討した結果、培養 24 時間後の pH 値は、典型的なウエルシュ菌では pH4.5 ~ 5.1 (平均 pH4.8) であったのに対し、本事例由来株では pH5.0 ~ 6.1 (平均 pH5.4) であった。すなわち、本菌は乳糖遅分解のためレシチナーゼ反応部が赤橙色を呈したと考えられた。その他の性状は典型的なウエルシュ菌の性状を示し、16S rDNA 上のウエルシュ菌の特有塩基配列の保有が PCR 法で確認された。

謝 辞 疫学調査にご協力頂きました東京都福祉保健局健康安全室食品監視課及び東京都立川保健所の関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) 赤尾清人, 大谷 昌, 亀山昭一, 他: 日本細菌学雑誌, **21**, 564-573, 1966.
- 2) 行部陽宅, 伊藤 武: ウエルシュ菌, 厚生省監修, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第 3 版, D-153-165, 1987, 日本公衆衛生協会, 東京.
- 3) 上野一恵, 光岡知足, 渡辺邦友: 細菌学技術叢書 3, 嫌気性菌の分離と同定法, 22-44, 1982, 菜根出版, 東京.
- 4) Kikuchi, E., Miyamoto, Y., Narushima, S., et al.: *Microbiol. Immunol.*, **46**, 353-358, 2002.
- 5) 伊藤武: 東京衛研年報, **24**, 7-39, 1972.
- 6) 門間千枝, 柳川義勢, 楠淳, 他: 東京衛研年報, **46**, 8-11, 1995.
- 7) 大谷仁己, 氏家淳雄: 食衛誌, **28**, 281-285, 1987.
- 8) 石村勝之, 萱島隆之, 蔵田和正, 他: 日食微誌, **10**, 35-41, 1993.
- 9) Shahidi, S.A. and Ferguson, A.R.: *Appl. Microbiol.*, **21**, 500-506, 1971.
- 10) Hauschild, A.H.W. and Hilsheimer, R.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 521-526, 1974.
- 11) Handford, P.M.: *J. Appl. Bacteriol.*, **37**, 559-570, 1974.
- 12) Harmon, S.M., Kautter, D.A. and Peeler, J.T.: *Appl. Microbiol.*, **22**, 688-692, 1971.
- 13) McClung, L.S. and Toabe, R.: *J. Bact.*, **53**, 139-147, 1947.
- 14) Willis, A.T. and Hobbs, G.: *J. Path. Bact.*, **75**, 299-305, 1958.
- 15) Willis, A.T. and Hobbs, G.: *J. Path. Bact.*, **77**, 511-521, 1959.