

ほうれん草とアサリの煮物が原因と考えられた ウエルシュ菌による食中毒事例

柳本恵太 山上隆也 植松香星 土屋邦男

A Food Poisoning Case Caused by Stewed Spinach and Asari Clams
Contaminated with *Clostridium perfringens*

Keita YANAGIMOTO, Takaya YAMAGAMI, Kousei UEMATSU and Kunio TSUCHIYA

キーワード：MLST、*cpe* genotyping

ウエルシュ菌は芽胞を形成するグラム陽性桿菌である。同菌は芽胞を形成すると加熱による殺菌効果が低くなることから、加熱後の食品を不適切な温度で保管することにより増殖し、食中毒を引き起こすことがある。同菌による食中毒事件数は国内で年間 20~30 件程度であるが、患者数は 1,000~2,000 名程度¹⁾と 1 件あたりの患者数が多いことが特徴である。下痢を引き起こす毒素である CPE 産生株が食中毒の原因となることがほとんどで、*cpe* 陽性株は食肉²⁾、海産物³⁾などの食品や、水環境中^{4,5)}からも検出されている。

2024 年 7 月に山梨県内の介護老人保健施設（入所者、職員併せて 120 名）において *cpe* 陽性ウエルシュ菌を原因とした食中毒事例が発生したため、詳細を報告する。

材料および方法

1 材料および方法

(1) 供試検体

発症者 10 名（入所者 9 名、職員 1 名）および調理従事者 6 名の糞便、発症者の共通食である夕食の検食・食材 16 検体、施設ふきとり検体 2 検体について、食中毒菌の検査を行った。

(2) 検査方法

ウエルシュ菌については、検体を TGC 培地中で 80°C、10 分間加熱後、カナマイシンを含有しない CW 寒天培地を用いて 36°C で嫌気培養を行い、ウエルシュ菌様コロニーを釣菌した。分離菌株について PCR により *cpe* 陽性株を分離した。PCR に用いたプライマーは既報⁵⁾で示した *cpe*-F (5'-GATAAAGGAGATGGTTGGATATTAGGGGAAC-3') および *cpe*-R (5'-CCTAAGCTATCTGCAGATGTTTACTAAGCC-3') であり、94°C 5 秒、64°C 45 秒、35 サイクルで増幅された 383 bp の PCR 産物により *cpe* 陽性株と判断した。

大腸菌については、糞便は直接マッコンキー寒天培地で、ふきとり検体および検食・食材については EC 培地で

42°C 一晚培養した菌液をマッコンキー寒天培地で 36°C 一晚培養した。大腸菌様コロニーを釣菌し、PCR⁶⁾により VT1, 2, LT, ST1a, ST1b 遺伝子および *eae*, *aggR* の保有を確認した。Yamamoto ら⁷⁾のプライマーを修正した EAST11a (5'-GCCATCAACACAGTATATCCGAAGA-3') および EAST11b (5'-CGCGAGTGACGGCTTTGT-3') を用いて前述同様の条件により *astA* について PCR を行った。

黄色ブドウ球菌については、糞便は直接マンニット食塩寒天培地で 36°C 48 時間培養を行い、ふきとり検体および検食・食材についてはハートインフュージョン培地で 36°C 一晚培養した菌液をマンニット食塩寒天培地で 36°C 48 時間培養を行った。分離された菌株について、狩野ら⁸⁾の方法を用いてエンテロトキシン遺伝子を確認した。

セレウス菌については、糞便は直接 NGKG 寒天培地で 36°C 一晚培養を行い、ふきとり検体および検食・食材についてはハートインフュージョン培地で 36°C 一晚培養した菌液を NGKG 寒天培地で 36°C 一晚培養を行った。分離菌株について、*Bacillus cereus* (CRS gene) PCR Detection Kit (タカラバイオ) を用いてセレウリド遺伝子の確認を行った。

(3) 分離菌株の解析

全てのウエルシュ菌分離菌株について *cpe* genotyping assay⁹⁾により *cpe* の存在箇所の確認を行った。代表株（入所者、職員、食品由来株）について 8 遺伝子 (*colA*, *groEL*, *sodA*, *plc*, *gyrB*, *sigK*, *pgk*, *nadA*) の multilocus sequence typing (MLST)¹⁰⁾を実施した。MLST で得られたアレル番号から ST 型を決定するため、PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/clostridium-perfringens>) により解析を行った。

結果と考察

細菌およびウイルス検査の結果、*cpe* 陽性ウエルシュ

菌が発症者 9 名（入所者 8 名、職員 1 名）の糞便から 9 株、ほうれん草とアサリの煮物から 2 株分離された。一方、ほうれん草とアサリの煮物の食材であるアサリから *cpe* 陰性株が分離されたものの、*cpe* 陽性株は分離されず、ほうれん草はウエルシュ菌陰性であった。この他に *astA* 陽性大腸菌とエンテロトキシン A 遺伝子陽性黄色ブドウ球菌が別の入所者各 1 名の糞便から、セレウリド遺伝子陽性セレウス菌がほうれん草とアサリの煮物、ほうれん草とやわらかかまぼこの煮物から分離された。その他の食中毒原因菌およびノロウイルスは全て陰性であった。これらの結果と疫学調査の結果から、本事例は *cpe* 陽性ウエルシュ菌による集団食中毒と判断された。

分離された 11 株の *cpe* は *cpe* genotyping assay により全てが染色体に存在していると判定された。*cpe* が染

色体に存在している株はプラスミドに存在している株と比較し、熱に強い芽胞を形成することから、食中毒の原因となりやすいことが報告されている¹¹⁾。ほうれん草とアサリの煮物は、調理後に温度不明の保温庫で保管されていたことや、室温に放置された時間があったことから、加熱に耐えた芽胞から栄養型となり、増殖が起こる状況にあったことが推察された。

発症者（職員 1 名、入所者 3 名）由来 4 株、およびほうれん草とアサリの煮物由来 2 株について MLST を実施した結果、発症者（入所者）由来 2 株、およびほうれん草とアサリの煮物由来 1 株が ST147 で一致した。他の発症者由来 2 株は ST246 と判定され、ほうれん草とアサリの煮物由来の別の 1 株は ST 不明であった（表 1）。

表 1 分離株のアレル番号と ST

由来	<i>colA</i>	<i>groEL</i>	<i>sodA</i>	<i>plc</i>	<i>gyrB</i>	<i>sigK</i>	<i>pgk</i>	<i>nadA</i>	ST
発症者	23	12	24	91	16	17	14	20	246
	23	12	24	91	16	17	14	20	246
	23	12	29	20	18	17	27	20	147
	23	12	29	20	18	17	27	20	147
ほうれん草とアサリの煮物	23	12	29	20	18	17	27	20	147
	23	26	29	20	16	17	14	20	—

ST147 と異なるアレル番号は灰色で表示

—：データベースに登録なし

まとめ

本事例の解析結果から、発症者由来株に多様性があったものの、ほうれん草とアサリの煮物が原因食品であることが示唆された。食材のアサリからは *cpe* 陽性株は分離できなかったが、過去の我々の調査では、購入した市販のアサリ（10 粒単位）の 9%程度から *cpe* 陽性株が検出されている⁵⁾。喫食者が 120 名程度であることを考慮すると、多くのアサリが調理に供されていたことが考えられ、今回分離された ST とは異なる *cpe* 陽性株による汚染もあった可能性が考えられた。今回は、ほうれん草とアサリの煮物および発症者由来株に共通していたのは ST147 のみであり、ST246 は同食品からは分離できなかった。汚染率が比較的高い食材を大量に使用していると考

えられる食品からの病原体の検出には、可能な限り多くの菌株を分離することが重要であると考えられた。

参考文献

- 厚生労働省、食中毒統計資料
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html]（最終検索日 2025 年 6 月 19 日）
- Y. 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)
- 3) M. Saito: Production of Enterotoxin by *Clostridium perfringens* Derived from Humans, Animals, Foods, and the Natural Environment in Japan. J Food Prot., **53**, 115-118 (1990)
- 4) A. Hashimoto et al.: Distribution of enterotoxin gene-positive *Clostridium perfringens* spores among human and livestock samples and its potential as a human fecal source tracking indicator. J. Water. Environ. Technol., **14**, 447-454 (2016)
- 5) K. Yanagimoto et al.: The Circulation of Type F *Clostridium perfringens* among Humans, Sewage, and *Ruditapes philippinarum* (Asari Clams). Pathogens., **9**, (2020)
- 6) 柳本恵太: 特開 2015-146786
- 7) T. Yamamoto, P. Echeverria: Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. Infect Immun., **64** 1441-1445 (1996)
- 8) 狩野真由子, 重茂克彦, 品川邦汎: ブドウ球菌エンテロトキシンを網羅的に検出する multiplex PCR, 岩獣会報, **35**, 43-48 (2009)
- 9) K. Miyamoto, Q. Wen, B.A. Mc Clane: Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (CPE) locus, a plasmid CPE locus with an *IS1470*-like sequence, or a plasmid cpe locus with an *IS1151* sequence. J. Clin. Microbiol. **42**, 1552-1558 (2004)
- 10) A. Deguchi et al.: Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. PLoS ONE, **4**, e5598, (2009)
- 11) Li J, McClane BA: Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. Appl Environ Microbiol. **72**, 4561-4568 (2006)