

ウェルシュ菌食中毒に関する最新の知見

The latest findings on foodborne diseases caused by *Clostridium perfringens*

門間 千枝 Chie Monma

東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員
Department of Microbiology Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

キーワード … ウェルシュ菌、食中毒、エンテロトキシン

01 はじめに

2017年、東京都内にある保育園のイベントで、園児らが前日に調理した「一晩寝かせた」カレーを原因としたウェルシュ菌食中毒が発生して話題になった。カレーは一晩寝かせるとさらに美味しくなるといわれており、調理した翌日以降に食べる人も多い。同じように前日に調理され一晩寝かせがちな食品に「味がしみた煮物」等があげられる。ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は、このような前日に調理した食品を原因として発生する食中毒の原因菌であり、本菌食中毒は発生時に大規模化することも珍しくない。

ウェルシュ菌は、植物の種子の様に熱や乾燥に強い「芽胞」を形成し、酸素の存在しない状態で発育する「嫌気性菌」である。また、毒素の宝庫と言われるように多くの毒素や酵素を産生する菌であり、興味深い菌でもある。

本稿では、2020年のコロナ禍におけるウェルシュ菌を中心とした食中毒発生状況を初めに、ウェルシュ菌食中毒の特徴およびその原因菌であるウェルシュ菌について最新の知見を交えて紹介したい。

02 コロナ禍のウェルシュ菌食中毒発生状況

1. 2020年の食中毒発生状況の概要

2020年の全国の食中毒は801事例(2021年1月4日速報値)、2019年の食中毒事例は1,061事例であり、東京都では2019年119事例、2020年は112事例であった(2021年1月末現在)^{1,2)}。図1に東京都における2020年の月別発生事例数を平成(2010年~2019年の平均)と比較した²⁾。過去10年間の平均である平成の月別食中毒発生事例数は、1年を通じてほぼ同じで

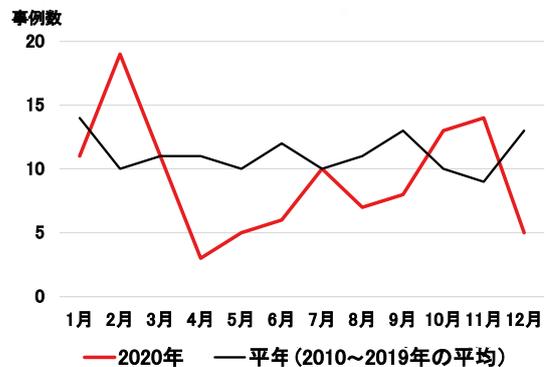


図1 月別食中毒発生事例数(東京都) 参考文献²⁾より作成

あったが、2020年は4月に激減している。直前の2019年と比較しても4月の食中毒事例の発生は、全国では2019年に107事例であったのに対し、2020年は30事例(2021年1月4日速報値)であり、東京都では2019年10事例に対し、2020年3事例であった。このように2020年の食中毒事例の発生は、4月(緊急事態宣言中)に急激に減少したが、5月以降は徐々に平成並みの発生数に戻っていった(東京都)。

一般に、食中毒の原因施設は飲食店であることが多い(全国:

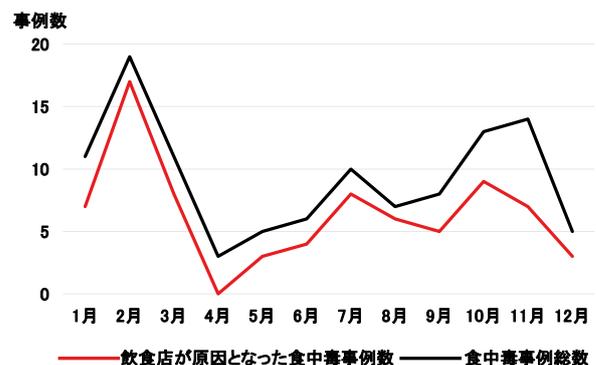


図2 2020年飲食店が原因施設となった食中毒事例数(東京都) 参考文献²⁾より作成

65.2%、東京都:83.9%、2019年)ことから、食中毒の発生数は飲食店での発生件数と平行である(図2、東京都)。

例えば、4月の都内の飲食店での発生は、2019年4月では10事例中7事例に対し、2020年4月は報告例がなく¹⁻³⁾、緊急事態宣言下の4月、飲食店の利用が少なくなり食中毒が減少したことが推定される。

近年、食中毒事件の原因物質のほぼ8割は、アニサキス、カンピロバクター、ノロウイルスで占めている。この傾向は2020年も変わらないが、事例数ではカンピロバクターの割合が減少し(4、5月に減少)、アニサキスの割合が増加している(図3、東京都)。2020年東京都で発生した食中毒事例の患者数第1位は毒素原性大腸菌による食中毒であるが、本菌食中毒の発生は5年ぶりで稀である。また、ノロウイルスによる食中毒は過去10年間(2010~2019年)いずれの年も患者数が第1位であるが、2020年では131名(2021年1月15日速報値)と266名(2019年)から減少している(東京都)^{2,3)}。

2. 2020年のウェルシュ菌食中毒発生状況

全国におけるウェルシュ菌食中毒事例数(2010年~2019年)は、平均25.1事例で年19~32事例と年によりやや変動が認められ、1事例あたりの平均患者数は61.5名であった。2020年のウェルシュ菌食中毒事例は19事例(2021年1月4日速報値)であった¹⁾。

東京都におけるウェルシュ菌食中毒事例数は年間1~5事例で、2020年では4事例発生した。その内訳は、給食によるもの2事例(患者数46名、35名)、テイクアウト弁当によるもの1事例(患者数71名)、ケータリングによるもの1事例(2月末発生、患者数184名)であった²⁾。

ウェルシュ菌食中毒の原因物質別では4番目の発生数であったのに対し、患者数は合計336名で毒素原性大腸菌(患者数

2,548名)について2番目であった(図3、東京都)。

3. 2020年に東京都で発生したウェルシュ菌事例

2020年に発生したウェルシュ菌食中毒2事例を紹介する。両事例ともCOVID-19対策の影響を多少なりとも受けて発生したことが示唆される事例である。

1) 事例1:大量のテイクアウト弁当の調理で発生した事例

5月、子供食堂が提供したテイクアウト弁当で下痢、腹痛を呈した事例である。患者は71名で、子供食堂はボランティア団体で運営され、この飲食店に調理を依頼したのは初めてであった。患者ふん便及び冷凍庫に保存してあった鶏肉の煮物残品からエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が検出され、原因菌と断定された。飲食店では、鶏肉の煮物等を提供前々日に調理し、調理後に常温下に長時間放置していた。大量の調理が前々日調理、常温放置を招き、ウェルシュ菌が増殖する機会を与え、ウェルシュ菌食中毒が発生したと考えられる。

2) 事例2:提供方法を変えて業務量が増え、食中毒が発生した可能性がある事例

11月、全寮制の施設で寮生167名中46名が腹痛、下痢等を呈した事例である。患者ふん便からエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が検出され、ウェルシュ菌による食中毒と判明した。疫学調査から発症前日の夕食が原因食品とされた

当該施設では、8月に新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染者5名が確認され、食事のサイドメニュー(数種類のメニューから複数選択)の提供方法をその場で取り分けて提供するピュッフエスタイルから、あらかじめ小鉢でひとつずつ分けて提供する方法に変更し、それにより、従業員の業務量が増加したと聞いている。また、ピュッフエスタイルだとメニューごとに調理容器が一つで

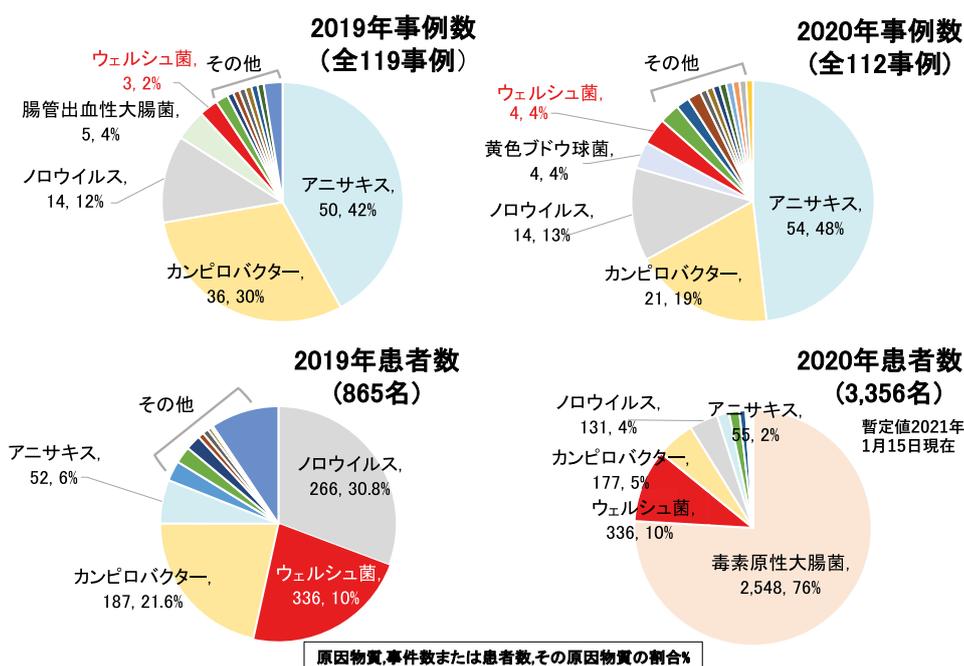


図3 原因物質別食中毒事例数および患者数(東京都) 参考文献²⁾より作成

残った場合の廃棄が容易であったのが、小鉢で提供するスタイルの場合、昼食に残った小鉢をひとつずつ廃棄し洗浄するのに手間がかかるため、そのまま冷蔵庫で保管して提供していた場合もあったと推定されることも原因の一つと示唆されている。

03 ウェルシュ菌食中毒の特徴

1. 発生状況

ウェルシュ菌食中毒は大規模な集団発生事例が多く、1事例あたりの患者数は、平均48.2名(東京都、2011年～2020年)である。その原因施設の内訳は、飲食店19事例(70.4%)、給食施設7事例(25.9%)である。患者100名以上の事例は13事例(東京都、1990年～2020年)認められている^{2,3)}。

2. 臨床症状

ウェルシュ菌食中毒の潜伏時間は通常6～18時間、平均10時間で、潜伏時間の幅が狭く発症のピークは鋭い。本菌食中毒の患者786人(東京都、2009年～2013年)の症状を調べると、主要症状は下痢(98.3%)と腹痛(70.9%)で、下痢の便性状は水様便(41.9%)、粘液便(9.2%)、軟便(5.3%)であり、その回数は1～5回が全体の75.3%を占めていた³⁾。これらの発症状況から、ウェルシュ菌食中毒の患者は比較的軽度の下痢を発症し、1～2日で回復するので、実際は統計上の数字よりも多くの食中毒が発生していると考えられる。

3. 原因食品

ウェルシュ菌食中毒の原因食品には、食肉の加熱調理食品と煮込み料理が多いのが特徴である(図4)^{3,4)}。

この理由として、第一にウェルシュ菌芽胞で汚染されている確率が高い食肉類には、酸化還元電位が下げる性質を持つグルタ



図4 ウェルシュ菌食中毒の原因食品
ウェルシュ菌食中毒124件(東京都、1963年～2018年、推定を含む)
参考文献³⁾より作成

チオン等が多いことから大量調理食品中では嫌気状態になり易く、食品中でのウェルシュ菌増殖に適した条件となることがあげられる。

第二に大量に加熱調理された後、そのまま数時間ないし一夜室温に放置された食品が多いことから、その食品中には熱抵抗性が強い下痢原性ウェルシュ菌の芽胞が生残してしまうことである。食品の再加熱処理により生存した芽胞の発芽が促進させると同時に食品内に含まれる酸素が追い出され、ウェルシュ菌の発育・増殖に適した嫌気状態になる。ウェルシュ菌の分裂時間は約10分で2倍に増殖し、他の食中毒原因菌より早く急激に増殖する。

04 ウェルシュ菌食中毒の対策

1. 発生要因

ウェルシュ菌食中毒の発生要因を調べた結果、加熱調理食品の長時間の常温放置等温度管理が不十分であったものが31事例(56.4%)、前日以前に調理された食品によるものが24事例(43.6%)、不十分な再加熱によるものが11事例(20.0%)であった^{3,4)}。これらの結果から、「前日調理」「大量調理」の結果生じる「緩慢冷却」が、生残した芽胞が通常のウェルシュ菌(栄養細胞型)となり増殖する原因となり、本菌食中毒の主要な発生要因になっている。

2. 予防

食中毒予防三原則は「つけない」、「増やさない」、「やっつける」である。しかしながら、ウェルシュ菌の芽胞が多くの食品、環境に生残しているため、「つけない」ことは実現困難である。また、芽胞を形成したウェルシュ菌を「やっつける」ことも困難が伴う。ウェルシュ菌食中毒は、 10^6 個以上の本菌(栄養細胞型)を食品と共に喫食することにより発生するので、対策は「増やさない」が最も重要な予防法となる。具体的には、食品をウェルシュ菌が旺盛な発育をする30～47℃に置く時間を短くすることが必要である。さらに、「小分け」することは「急速に冷却」し、再加熱時に攪拌不足から起こりやすい「加熱温度ムラ(加熱不十分)を防ぐ」ために有効である。

実験結果より、以下の点が確認されている^{5,6)}。

1. ウェルシュ菌の発育は、4、15、25、37、42、47℃で測定した結果、42℃及び47℃で増殖速度が早い。
2. ウェルシュ菌の芽胞を接種した鶏肉を2時間で75℃から25℃に直線的に降下させた場合、ウェルシュ菌の増殖は認められない。しかしながら、75℃から50℃に30分で降下させ、その後6時間で25℃に降下させた場合、4～6時間でウェルシュ菌の急速な増殖が認められる。
3. カレー(ウェルシュ菌 10^3 個/g添加)を冷蔵保管後再加熱した場合の菌数は、鍋のままの場合は 10^3 個/gであったが、一方、小分けした場合は10個/g以下であった。

05

ウェルシュ菌の特徴

1. ウェルシュ菌

ウェルシュ菌食中毒の原因菌であるウェルシュ菌は、ヒトをはじめ、ウシ、ブタ、トリ等多くの動物の腸管内の正常細菌叢の一つである⁷⁾。土壌や河川、海等にも広く芽胞の形で分布し、食肉、魚介類あるいは野菜等多くの食品が本菌に汚染されている。芽胞を形成する偏性嫌気性菌であるクロストリジウム属の一菌種である(図5、図6)。他の嫌気性菌に比べ、発育や生存のために嫌気度は要求されないため、数時間大気中に暴露されても生残している。ウェルシュ菌の一般的な発育温度(発育可能温度ではない)は12~50℃、旺盛な発育温度帯は30~47℃、発育至適温度は43~45℃である。分裂時間は約10分間(45℃)と短く、発育が早い。

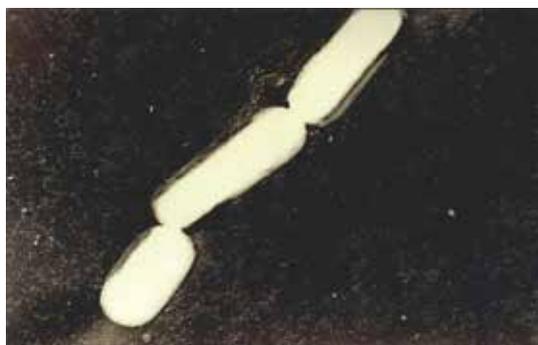
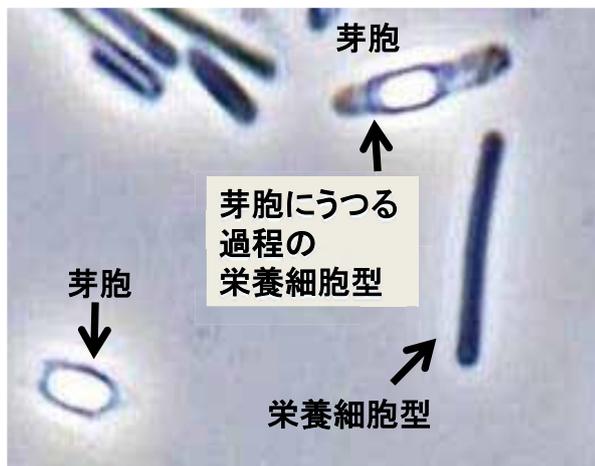


図5 ウェルシュ菌(電子顕微鏡)

図6 ウェルシュ菌の栄養細胞型と芽胞(位相差顕微鏡)
栄養細胞型:通常の(芽胞でない)菌

ウェルシュ菌は食中毒のほかガス壊疽の原因菌でもあり、少なくとも16種類という多種類の毒素を産生する。これまでウェルシュ菌の毒素型は4種類の主要毒素(α 、 β 、 ϵ 、 l)の産生性からA、B、C、D、Eの5つに分類されていたが、近年新たな毒素がいくつか発見されA~Gの7つに分類することが提唱されている⁸⁾。A型ウェルシュ菌は主要毒素の中では α 毒素のみ産生し、最も一般的

に分布している菌である。下痢原性毒素であるエンテロトキシン産生菌は今まではA型に分類されていたが、F型に分類された。また、7つ以上の毒素型を提唱している研究者もいる。

2. 下痢原性ウェルシュ菌の病原因子

ウェルシュ菌の中で、ヒトに下痢原性毒素を産生する菌が食中毒の起因菌となる。食中毒を起こす下痢原性ウェルシュ菌は、健康な人の腸内に常在しているウェルシュ菌と異なり、下痢原性因子である下痢原性毒素(エンテロトキシンまたは新型エンテロトキシン)を産生する。

1) エンテロトキシン

下痢原性毒素としては1960年代にウェルシュ菌エンテロトキシン(エンテロトキシンと略す)が明らかにされた。ウェルシュ菌食中毒はこのエンテロトキシンを産生する菌が原因となる⁷⁾。

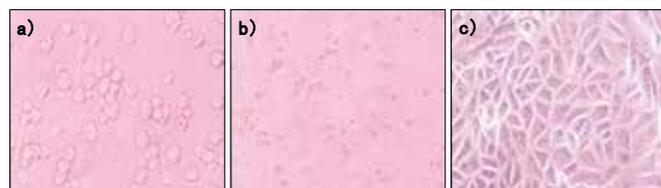
エンテロトキシンは319アミノ酸からなる分子量35,317ダルトン、等電点4.3の易熱性タンパクである。細胞膜に小孔を形成し、それによる膜透過性の変化と細胞の形態変化、細胞死をもたらす。また、ウサギ等の腸管結紮ループ内に投与することにより、小腸粘膜上皮の破壊と管腔内への液体貯留(下痢の再現)を誘発する。

食中毒由来株のエンテロトキシンをコードする遺伝子(*cpe* 遺伝子)の多くは染色体上にあるが、一方、散発下痢症患者や環境から分離された株の*cpe* 遺伝子はプラスミド上にある。

一般に、健康なヒトのふん便から検出されるウェルシュ菌の中で、エンテロトキシン産生菌は数パーセント⁹⁾である。また、他の菌と異なりエンテロトキシンは芽胞を形成する過程で産生される。

2) 新型エンテロトキシン:CPILE (*Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin)

1997年、東京都で発生した食中毒事例が新しい下痢原性毒素による食中毒であると報告され¹⁰⁾、この新型下痢原性毒素は後にCPILE (*Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin)と同定された¹¹⁾。この新型毒素による集団食中毒は現在までに4事例報告され、すべて日本国内で発生している。患者の症状は下痢、腹痛でエンテロトキシンによる食中毒と同じである。本毒素は腸管結紮ループ試験で陽性であり、vero細胞等において、エンテロトキシンと異なった細胞変性を示す(図7)。また、環境や健康なヒトのふん便からも検出されるが、CPILE産生菌は1パーセント未満である。

図7 新型エンテロトキシン及びエンテロトキシンのvero細胞への作用
a) 新型エンテロトキシン(CPILE), b) エンテロトキシン, c) コントロール
参考文献¹⁰⁾より引用

CPILEは2つのコンポーネント(CPILE-a、CPILE-b)から構成され、ウェルシュ菌のイオタ毒素等クロストリジウム属の4菌種が産生する二成分毒素のそれぞれの2つのコンポーネントに高い相同性を示す。CPILE-aはNicotinamide adenine dinucleotide(NAD)を基質とするADPリボース転移酵素である。CPILE-bは細胞膜受容体への結合に関与している。CPILEを含む5つのコンポーネント毒素において、アミノ酸相同性は70～80数%であった¹¹⁾。しかし、著者らはCPILEの下痢原性は他の二成分毒素と異なっている可能性を示唆している。

06 ウェルシュ菌検査法

1. 食中毒発生時の検査法

ウェルシュ菌食中毒はCPILE産生菌によるものが稀にあるが、ほとんどの場合エンテロトキシン産生性のウェルシュ菌が原因となる。また、腸管には常在している下痢原性を持たないウェルシュ菌が混在するため、エンテロトキシン産生性をターゲットに検査を行う。食中毒の最も確実な診断法は、患者ふん便や原因食品等から、同一血清型エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌を分離・検出することである。ウェルシュ菌はふん便中では芽胞で存在するので、ウェルシュ菌の分離は加熱処理を行って他の菌を死滅させてから実施する。食中毒原因菌の検出は、①嫌気性芽胞菌であることから嫌気培養を行い、嫌気性菌以外の菌の発育を抑制すること、②カナマイシン等アミノグリコシド系抗生物質が無効であることから、カナマイシンを選択剤として培地に添加して他の菌の発育を抑制すること、③卵黄を加えた培地においてレシチナーゼ反応を呈するのでこれを指標として行うこと等の「ウェルシュ菌の特徴を利用する」ことと、④*cpe* 遺伝子を保有しエンテロトキシンを産生すること、⑤エンテロトキシン産生菌の芽胞は常在菌の芽胞と比較して熱に強い耐熱性芽胞形成菌であること等の「下痢原性ウェルシュ菌の特徴を利用する」ことをキーポイントにして行っている(図8-1)。検査の詳細は、既報を参考されたい⁷⁾。

疫学調査のための型別用血清としては、Hobbs1～17型(市販)の他、TW1～94型(当センターの自家調製)の各血清がある。

2. 通常の検査法では検出できないウェルシュ菌

発生状況、患者症状等からウェルシュ菌食中毒が強く疑われるにもかかわらず、通常の検査法ではエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が検出されない場合は、通常の検査法では検出できない非定型的な性状をもつウェルシュ菌も念頭において検査を行う必要がある。

これらの非定型的な性状のウェルシュ菌は、「ウェルシュ菌の特徴を利用する」「下痢原性ウェルシュ菌の特徴を利用する」ことを見直し、分離・検出されたものである。

前述の新型エンテロトキシン(CPILE)産生菌もこの過程で検

出され、下痢原性の確認後、次世代シークエンサー等を用い下痢原性物質CPILEが同定された^{10,11)}。その他、著者らは、100℃10分の加熱で死滅する易熱性芽胞形成菌、乳糖遅分解(図8-2、写真下段左)¹²⁾、レシチナーゼ反応陰性(図8-2、写真下段右)、カナマイシン含有培地で発育できないウェルシュ菌¹³⁾(カナマイシン低度耐性菌)等の非定型的な性状のウェルシュ菌を分離し、各々食中毒の原因菌となった事例を確認している。

3. ウェルシュ菌検査法の改良

東京都健康安全研究センターでは、非定型的な性状の菌についても検出できるように検査法を改良している(図8-2)。改良点としては、易熱性芽胞形成ウェルシュ菌が検出されるように、ふん便の加熱処理温度を100℃から80℃に変更した。また、近年、カナマイシン低度耐性菌による事例が発生している。東京都では19事例中12事例(63.2%、2014～2018年)のカナマイシン低度耐性菌によるウェルシュ菌食中毒を確認している。本菌は汎用されているカナマイシン含有の培地では発育できないことから、著者らは選択分離培地(カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地)に添加されている抗生物質をカナマイシンからサイクロセリンに変更し、発育促進剤を加えた培地を作成してルーチン検査に用いている。

4. 衛生管理のためのウェルシュ菌検査法

衛生管理を目的とした一般流通食品のウェルシュ菌検査は原因菌究明のための食中毒検査とは全く異なる。ウェルシュ菌の発育には酸素のない状態が必要で、嫌気培養装置が必須であるが、一般流通食品等の検査には好気条件下でも培養可能なパウチを用いる方法が汎用されている。ローストビーフ等の特定加熱食肉製品および包装後加熱食肉製品は、成分規格でウェルシュ菌を含むクロストリジウム属菌の菌数が定められており、クロストリジア測定用培地を用いるパウチ法で検査を行う。詳細は既報を参考されたい¹⁴⁾。なお、食品からの微生物標準試験法検討委員会でISO法にそったウェルシュ菌の検査法が検討されている。

07 おわりに

ウェルシュ菌食中毒は軽症な患者が多く、ウェルシュ菌が食品の成分規格にも定められていないこともあり、本菌を対象とした培地、検査試薬の開発が他の腸内細菌検査に比べ進んでいない。しかし、ウェルシュ菌食中毒は毎年コンスタントに発生し1事件あたりの患者数が多い。さらに、食中毒をはじめとした臨床検体や環境から、新規毒素や非定型的な性状を示す菌が分離されてきている。このため、扱い易い検査培地や検査試薬、検査方法の開発が求められる。

本菌食中毒はコロナ禍でも発生し、給食や弁当、テイクアウト食品等を原因として大規模化することが多いが、予防対策のポ

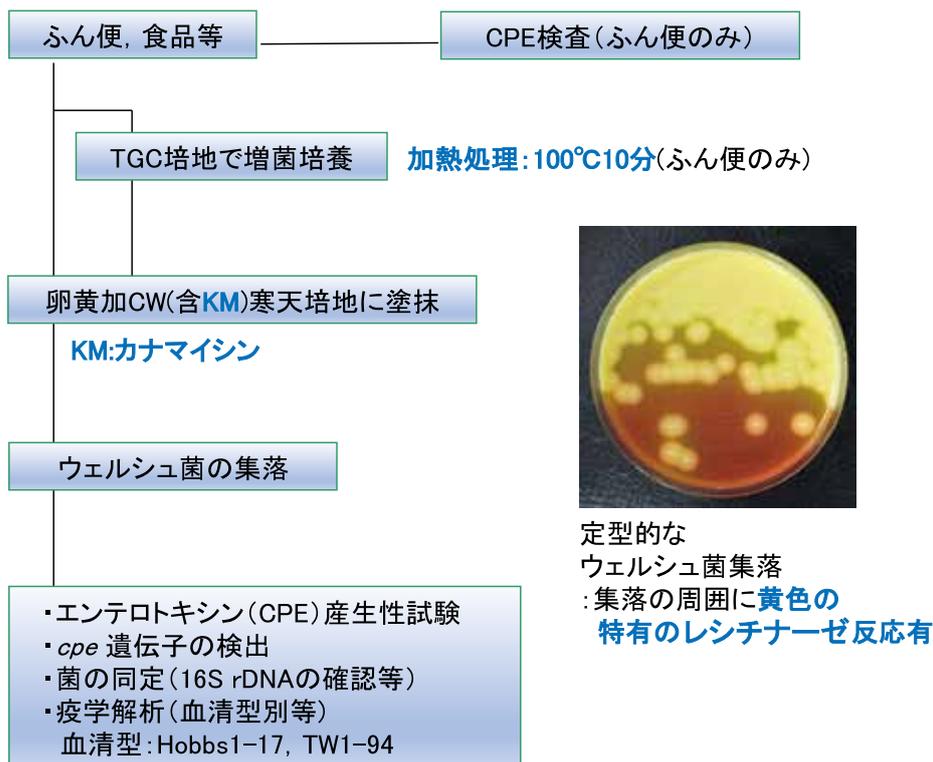


図8-1 食中毒発生時のウェルシュ菌検査法(従来法)

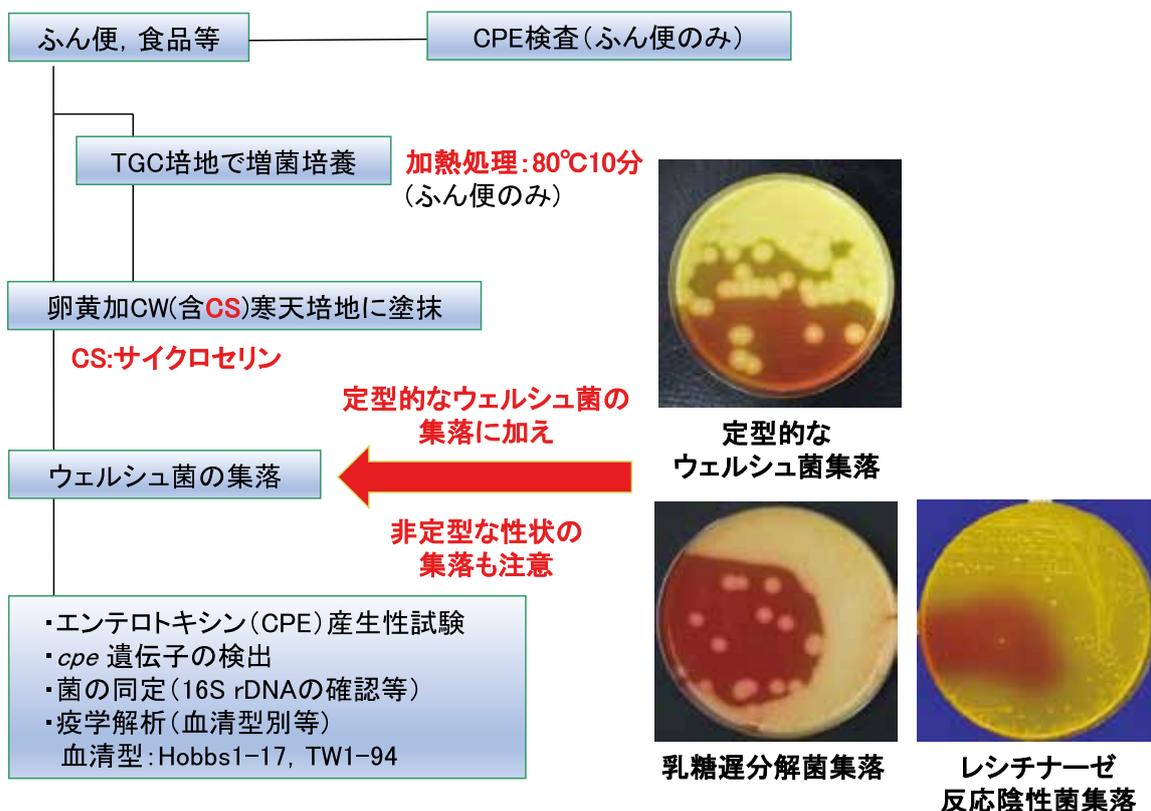


図8-2 食中毒発生時のウェルシュ菌検査法(当研究センター改良法)

イントを抑えることによって防ぐことができる。調理から喫食まで、「ウェルシュ菌を増やさない」こと、そのためには「調理や食品を保存する現場での温度管理」に注意することが大切である。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 4. 食中毒統計資料,
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html(参照 2021-1-31).
- 2) 東京都福祉保健局, 食中毒の発生状況,
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/tyudoku/index.html>(参照 2021-1-31).
- 3) 東京都福祉保健局: 東京都の食中毒概要, 1990 ~ 2021 年, 各年.
- 4) 門間千枝, 食品衛生研究, **69**(5), 21-36(2019).
- 5) 稲葉美佐子, 伊藤武, 坂井千三, 東京衛研年報, **33**: 143-149(1982).
- 6) 東京都福祉保健局, 「二日目のカレー」のウェルシュ菌増殖・殺菌実験,
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/jikken/2curry.pdf>(参照 2021-1-31).
- 7) 門間千枝, 伊藤武, *Clostridium perfringens*: 食品由来感染症と食品微生物, 仲西寿男, 丸山務監修 (中央法規出版, 東京, 2009).
- 8) Shrestha A, Uzal FA, McClane BA, *Microbiol. Spec.*, **6**(1), 1-17(2018).
- 9) 門間千枝, 柳川義勢, 楠淳, 甲斐明美, 新垣正夫, 尾畑浩魅, 伊藤武, 太田建爾, 工藤泰雄, 東京衛研年報 **45**, 11-15(1994).
- 10) C. Monma, K.Hatakeyama, H. Obata, K. Yokoyama, N. Konishi, T. Itoh, A. Kai, *J. Clin. Microbiol.*, **53**(3), 859-867(2015).
- 11) D. Irikura, C. Monma, Y. Suzuki, A. Nakama, A. Kai, A. Fukui-Miyazaki, Y. Horiguchi, T. Yoshinari, Y. Sugita-Konishi, Y. Kamata, *PLoS One*, **10**: e0138183(2015).
- 12) 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, 東京衛研年報, **58**, 53-56(2007).
- 13) 門間千枝, 下島優香子, 小西典子, 尾畑浩魅, 石崎直人, 仲真晶子, 甲斐明美, 柳川義勢, 山田澄夫, 日食微誌, **25**(2), 76-82(2008).
- 14) 門間千枝, 伊藤武, ウエルシュ菌: 食品衛生検査指針微生物編改定第2版 (公益社団法人日本食品衛生協会, 東京, 2018)