

- ・ リボソーマルタンパク質 30S ribosomal protein S4A
- ・ 伸長因子 Elongation factor P
- ・ 転写伸長因子 Transcription elongation factor greA
- ・ キナーゼ Adenylate kinase

以上のタンパク質は、毒素性が推定される種類ではなく、質量分析機を用いてのタンパク質分析では、毒素タンパク質遺伝子の候補を絞り込むことができなかった。

### 3 ゲノム情報を利用した新型エンテロトキシン産ウエルシュ菌 W5052 株の特異タンパク質の分析

昨年度のゲノム解析の結果、新型エンテロトキシン産 W5052 株特異的なものとして、21 種類の contig (配列が信頼できる塩基配列のかたまり) があり、そのなかに 54 遺伝子が含まれていることは既に明らかになっている。これら 54 遺伝子をタンパク質に翻訳した際、機能性タンパク質 (フェージ関連タンパク質、糖分解酵素、タンパク質分解酵素、糖転移酵素、脂質脱水素酵素、トランスポザーゼ、転写因子、細胞周期関連タンパク質) を取り除くと、9 種類のタンパク質が残った。そのうち 5 種類は、パブリックデータベースでは相同性の低いタンパク質だった。残り 4 種のうち 3 種はクロストリジウム属菌の産生する毒素遺伝子で、残り 1 種はプラスミド伝播後の細菌の生死に関わる toxin-antitoxin システムに関するタンパク質だった。

さらに、3 種の毒素のうち、2 種はウエルシュ菌、1 種はボツリヌス菌が産生する毒素であることまで明らかになった。

### 4 ウエルシュ菌 W5052 株ゲノム情報と部分精製タンパク質画分の質量分析機による解析結果の比較

#### 4-1 Spectrum Mill デフォルト解析

標的の新型エンテロトキシンが、W5052 株のゲノム中にあると仮定し、判明した 21 contig から、タンパク質に翻訳される coding region のすべてを抽出した。それらをアミノ酸配列に翻訳後、独自のデータベースを構築した。以下このデータベースを、「W5052 株タンパク質データベース」と称する。

Spectrum Mill は質量分析機から出力されるシグナルを解析し、各シグナルに惣とするタンパク質をデータベースから検索し抽出してくるソフトウェアであるが、上述のとおり、部分精製画分の分析では毒素を推測させるタンパク質は抽出できなかった。そこで、シグナルを検出する感度を高く、すなわち、デフォルトに設定し、部分精製画分に含まれる全タンパク質情報と、「W5052 株タンパク質データベース」情報を比較し、両者に共通のタンパク質遺伝子を抽出した。その結果、以下の 9 種類を得た。

- ・ 転写伸長因子 1 種
- ・ 伸長因子 1 種
- ・ 電子伝達系タンパク質 2 種
- ・ 酵素 1 種
- ・ リボソーマルタンパク質 1 種

- ・ シャペロンタンパク質 1 種
- ・ リポタンパク質 1 種
- ・ ウエルシュ菌が産生するタンパク質毒素 1 種

以上のうち、ウエルシュ菌が産生するタンパク質毒素 1 種は、「3」に示したゲノム情報解析から得た、ウエルシュ菌の産生する毒素の 1 種と一致した。

#### 4-2 非デフォルト設定による Spectrum Mill による解析

4-1 においては、質量分析時のシグナルの精度が高いものについてのみ分析対象としていた。そこで、分析対象を広げ、非デフォルトの設定で、Spectrum Mill を作動させ、4-1 と同様、「W5052 株タンパク質データベース」内を検索した。その結果、部分精製画分の中に、新たに 1 種の毒素タンパク質遺伝子が抽出された。このタンパク質は、ウエルシュ菌が産生する毒素の 1 種と相同性があった。

#### 5 新型エンテロトキシン遺伝子の絞り込み

上記解析「3」「4-1」および「4-2」に共通なタンパク質に 4 種類が抽出された。そのうち 2 種類は相同性が低く、タンパク質の帰属はできなかったが、残り 2 種はウエルシュ菌が産生するある毒素タンパク質と相同性を有していた。その遺伝子の相同性は低く、当該 W5052 株中で、遺伝子発現があるかどうか、検証する必要がある。遺伝子発現が認められた場合、目的毒素遺伝子である可能性は

高い。クローニング、組換え毒素タンパク質作製、組換えタンパク質の毒性解析、同タンパク質に対する抗体作製と、作製できた抗体による、当該 W5052 株での毒素産生を検証するなど、本毒素の存在を実証するアプローチが構築できる。

#### D. 結論

ウエルシュ菌が新しいエンテロトキシンを産生している可能性がある。事例株である W5052 株を培養し、生化学的手法を用いて新型エンテロトキシンの精製を試みた。活性を保持した部分精製標品を得、同標品についての質量分析機によるタンパク質消化ペプチドと生物情報学的手法を組み合わせ、また、前年度のゲノム解析結果を利用し、新型エンテロトキシン遺伝子の選抜を試みた。

事例株 W5052 は、現在までウエルシュ菌がその遺伝子を持っていると報告されている毒素のなかで 2 種類の毒素と相同性のある毒素遺伝子を持っている可能性が示された。ただし、その相同性は低く、毒素遺伝子のクローニング、組換え体の作製等を通じ、新型エンテロトキシンの存在を確実なものとする必要がある。

#### E. 健康危害情報

なし。

#### F. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京 (2007)
  - 2) Czczulin, J.R., Hanna, P.C. and McClane, B.A. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 61:3429-39 (1993)
  - 3) McClane, B.A. and McDonel, J.L. Characterization of membrane permeability alterations induced in Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. Biochim. Biophys. Acta 600:974-85 (1980)
  - 4) McClane, B.A. and McDonel J.L. The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on morphology, viability, and macromolecular synthesis in Vero cells. J Cell. Physiol 99:191-200 (1979)
  - 5) Katahira, J., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M., Sugimoto, N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. J. Cell. Biol. 136:1239-1247 (1997)
  - 6) 門間千枝、柳川義勢、畠山薫、尾畑浩魅、横山敬子、新垣正夫、甲斐明美、諸角聖、五十嵐英夫、伊藤武。新型エンテロトキシンを産生すると推定されたウエルシュ菌とその下痢原性毒素について。日本細菌学雑誌54:120 (1999)
  - 7) 門間千枝、柴田幹良、下島優香子、小西典子、小畑浩魅、甲斐明美、山田澄夫、諸角 聖。既知エンテロトキシン非産生ウエルシュ菌によると推定された食中毒事例 (第2例)、日本細菌学雑誌 59:283 (2004)
  - 8) 大谷仁己、氏家淳雄。変法 DS 培地におけるウエルシュ菌の芽胞形成とエンテロトキシン産生性、食品衛生学雑誌 28:282-285 (1987)
- G. 知的所有権の取得状況
- 1) 特許取得  
なし。
  - 2) 実用新案取得  
なし。
  - 3) その他  
なし。

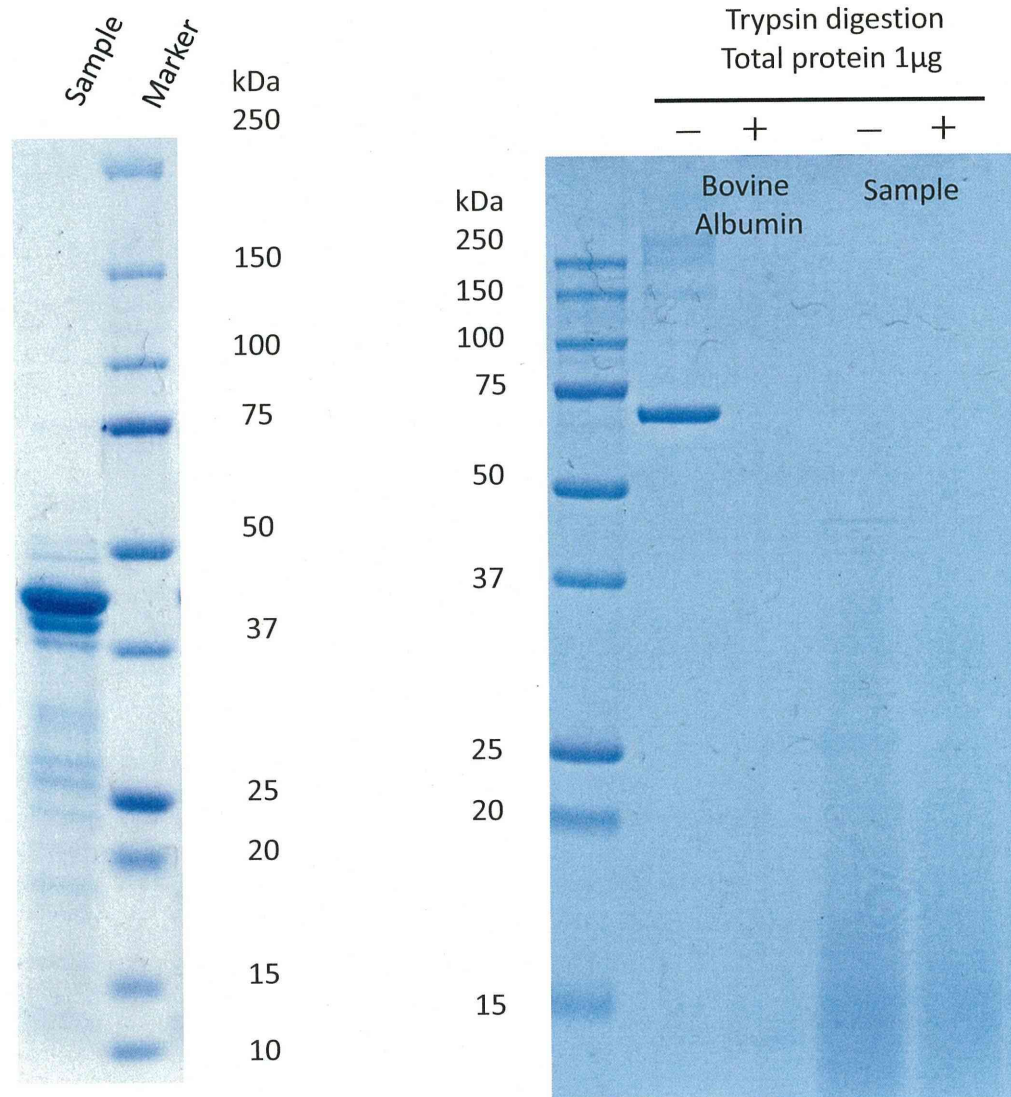


図1 質量分析機で解析するウエルシュ菌新型エンテロトキシン部分精製画分と検体の調製

Sample :新型エンテロトキシン、Bovine Albumin:ウシ血清アルブミン

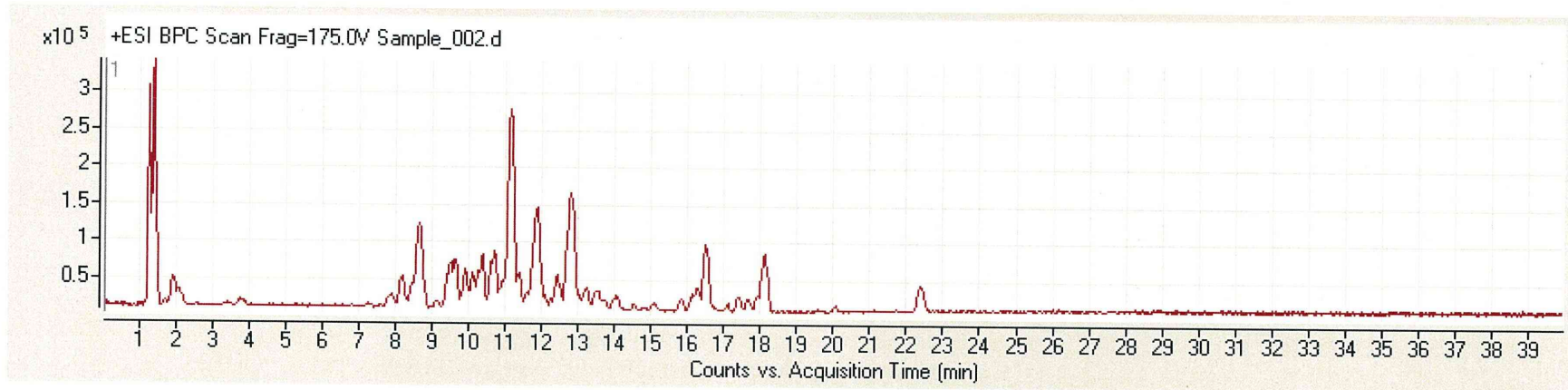


図2 ウェルシュ菌新型エンテロトキシン部分精製画分のLC/MS分析

トリプシン消化した部分精製画分のLCチャート

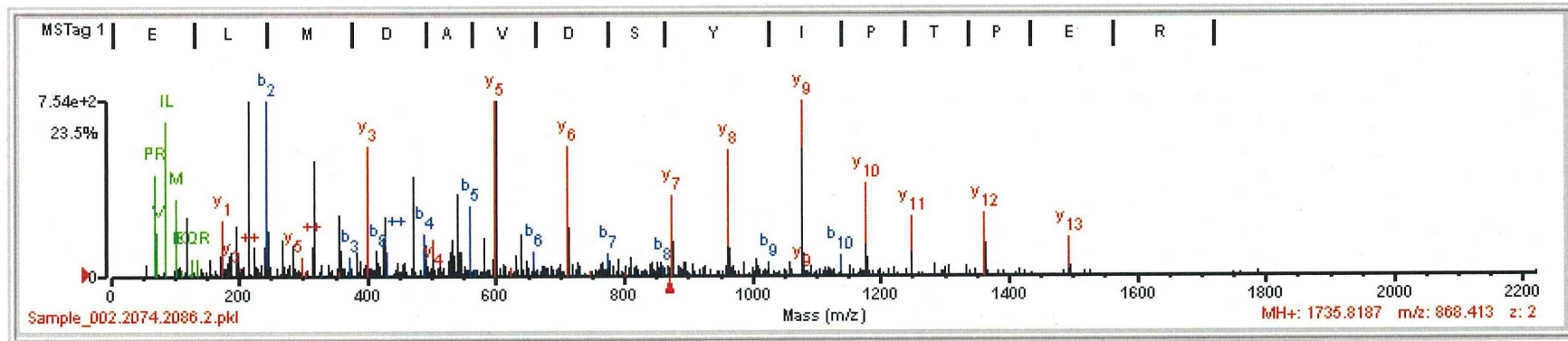


図3 ウェルシュ菌新型エンテロトキシン部分精製画分の質量分析チャート

LCで得られた一つのピーク物質を分解し、アミノ酸の質量を検出、その組み合わせから、アミノ酸配列を推定している。

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Species	Database Accession #	Protein Name
1	10	9	120.15	28	2.90e+005	43557.7	CLOPS	Q0SQCB	Elongation factor Tu OS=Clostridium perfringens (strain SM101 / Type A) GN=tuf1 PE=3 SV=1

#	Filename	z Score	Fwd-Rev Score	SPI (%)	Spectrum Intensity	Sequence	Sequence Map	RT (min)	m/z Measured (Da)	MH <sup>+</sup> Matched (Da)	
1	Sample_002.2074.2086.2	2	21.18	14.91	93.5	1.34e+005	(R)ELMDAYDSYIPTPER(A)	(R)E L M/D A V/D/S/Y/I/P/T/P E R(A)	19.66	868.4130	1735.821
2	Sample_002.2380.2380.2	2	16.67	16.67	86.5	5.90e+005	(R)ELLSEYNFPGDDIPVIK(G)	(R)E L*L S E Y/N/F P G D D/I/P V/I K(G)	22.65	974.9977	1948.990
3	Sample_002.1501.1501.3	3	15.64	8.65	73.3	9.47e+004	(R)GITINTAHVEYETANR(H)	(R)G I T I/N T A/H/Y/E/Y E/T A N R(H)	14.05	596.9668	1788.888
4	Sample_002.2323.2326.2	2	14.82	9.35	83.3	3.96e+005	(R)ELLSEYNFPGDDIPVIK(G)	(R)E L*L*S E/Y/N/F P G D D I/P V I K(G)	22.09	974.9969	1948.990
5	Sample_002.1727.1727.2	2	14.15	8.65	78.6	6.91e+005	(K)FYGQVYVYVK(K)	(K)F V G Q/Y Y/V/L/K(K)	16.26	526.8107	1052.614
6	Sample_002.1318.1318.3	3	12.83	12.83	73.0	7.72e+005	(R)GQYLAQVGTINPHKK(F)	(R)G Q*V L/A Q V/G T I N/P/H K K(F)	12.26	530.6418	1589.912
7	Sample_002.2038.2038.0	3	11.75	11.75	75.2	4.76e+004	(R)GVLHVGDEVEYIGLTEER(R)	(R)G V L H V G D E*V*E*V I/G L/T/E E/R(R)	19.30	651.0132	1951.013
8	Sample_002.2806.2806.0	2	10.72	10.72	63.5	2.20e+004	(K)ADMYDDEELLELVEMEYR(E)	(K)A D M*V/D D E/E*L L/E/L/V/E M/E V R(E)	26.81	1067.9945	2134.988
9	Sample_002.1441.1441.3	3	9.70	9.70	65.4	7.63e+004	(R)GQYLAQVGTINPHK(K)	(R)G Q*V L/A Q/V/G T I N/P/H K(K)	13.46	487.9437	1461.817
10	Sample_002.1519.1519.3	3	7.51	7.51	62.8	7.40e+004	(R)TDIERGQVLAQVGTINPHKK(F)	(R)T D I E R G Q*V*L*A*Q*V/G/T I N/P H K K(F)	14.23	735.4079	2204.215

図4 質量解析から検索された、部分精製ウエルシュ菌新型エンテロトキシン分画中に含まれる予想タンパク質群

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

別添



ウエルシュ菌リスクプロファイル作成  
支援業務

報告書

平成 23 年 9 月

**MRI** 株式会社 三菱総合研究所

# 目 次

---

1 調査の概要.....	2
(1) 調査目的.....	2
(2) 調査範囲.....	2
(3) 調査方法.....	2
2 調査結果.....	3
(1) 調査結果概要.....	3
(2) ウエルシュ菌に関する知見の整理.....	3
1) 病原体の特徴.....	3
2) 引き起こされる疾病の特徴.....	7
3) 用量反応曲線.....	9
4) 食中毒発生状況.....	12
参考資料.....	25

# 1 調査の概要

## (1) 調査目的

ウエルシュ菌に係るリスクプロファイルの作成を支援するため、ウエルシュ菌に関する最新の知見、情報を収集する。

## (2) 調査範囲

最新の知見を得るという観点から、本調査では年々アップデートされていると考えられる以下の項目について重点的に情報収集を行った。

- ・ 国内外の疫学的情報（食中毒発生件数、原因食品、患者数 等）  
※2000年以降の文献に絞って抽出
- ・ 新たに得られた分子生物学的な情報（感染性、発症機序 等）
- ・ 新たな診断法、治療法
- ・ リスク評価（用量反応 等）

## (3) 調査方法

以下の検索サイトを用いて情報を収集した。

- ・ 国際感染症情報（GIDEON<sup>1</sup>）：国内外の疫学情報を収集
- ・ 食中毒統計調査<sup>2</sup>：国内の疫学情報を収集
- ・ 感染症発生動向調査週報 IDWR<sup>3</sup>：ウエルシュ菌の基本情報を収集
- ・ PubMed<sup>4</sup>、FoodRisk<sup>5</sup> 等：その他の情報を収集

その他、「獣医微生物学（第2版）<sup>6</sup>」および食品安全委員会による公表資料<sup>7</sup>等を参考にした。

---

<sup>1</sup> GIDEON <http://www.gideononline.com/>

<sup>2</sup> 厚生労働省 食中毒統計調査 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/112-1.html>

<sup>3</sup> IDWR 感染症の話 ウエルシュ菌感染症 [http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k01\\_g1/k01\\_07/k01\\_7.html](http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k01_g1/k01_07/k01_7.html)

<sup>4</sup> PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

<sup>5</sup> FoodRisk <http://foodrisk.org/>

<sup>6</sup> 獣医微生物学（第2版）見上彪ら（文永堂出版）

<sup>7</sup> 食中毒及び食中毒原因微生物等について「ウエルシュ菌」  
[http://www.fsc.go.jp/sonota/risk\\_profile/risk\\_ushi\\_o157.pdf](http://www.fsc.go.jp/sonota/risk_profile/risk_ushi_o157.pdf)

## 2 調査結果

### (1) 調査結果概要

- GIDEON による検索により、各国のアウトブレイク状況および汚染率等のサーベイランス情報を得た。  
2000 年以降のアウトブレイクに関する文献は 26 件、サーベイランスに関する文献は 11 件、診断に関する文献は 2 件であった。
- FoodRisk による検索では 13 件の文献を抽出した。うち 1 つは 2009 年に公表された、RTE 食品および一部加熱した食肉・家禽製品におけるウエルシュ菌のリスク評価であった。
- その他、PubMed では診断・治療法に関する文献および分子生物学的研究に関する文献を抽出した。

### (2) ウエルシュ菌に関する知見の整理

#### 1) 病原体の特徴

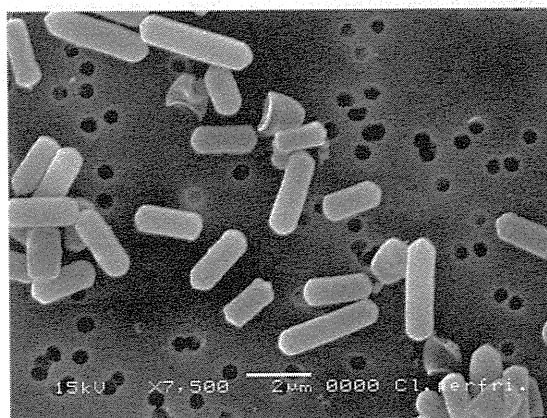
##### ア. 分類

クロストリジウム *Clostridium* 属菌はグラム陽性、芽胞形成能を有する偏性嫌気性の桿菌である。本菌属は土壌や河川、海洋の泥に広く分布している。ある種の菌は動物、人の腸管内に正常細菌叢の一部として生息している。現在までに約 150 菌種が知られている[1]。

ウエルシュ菌 (*C. Perfringens*) はクロストリジウム属菌の一種であり、ヒトの感染症としては食中毒、ガス壊疽、化膿性感染症、敗血症等の原因菌として知られている[2]。

##### イ. 形態

クロストリジウム菌属の増殖能を有する栄養型 (vegetative cell) は桿状 ( $0.5\sim 2\times 2\sim 20\mu\text{m}$ ) をしているが、その長さは菌種、培養条件により変わる。大部分の菌は周毛性鞭毛を有するために運動性を示すが、ウエルシュ菌はない。培養条件が悪くなると菌内に卵円状から球状の芽胞 (endospore) が形成され、芽胞形成部が膨化して孢子嚢 (sporangium) になる[1]。



出典：食品安全委員会事務局資料[3]

### ウ. 増殖・抑制条件

クロストリジウム菌属はカタラーゼやチトクロームオキシダーゼは産生しないが、その性状は多様である (図表 1) [1]。

図表 1 主要なクロストリジウム属菌の性状

菌種	芽胞 の 局在	ゼラ チン 液化	カゼ イン 消化	レシ チナ ーゼ	リパ ーゼ	糖分解						イン ドー ル
						グル コー ス	マル トー ス	ラク トー ス	スク ロー ス	サリ シン	マン ニト ール	
<i>C. perfiringens</i>	S	+	±	+	-	+	+	+	+	±	-	-
<i>C. septicum</i>	S	+	-	-	-	+	+	+	-	±	-	-
<i>C. chauvoei</i>	S	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. botulinum</i> A,B,F	S	+	+	-	+	+	±	-	±	±	-	-
B,E,F	S	+	-	-	+	+	±	-	+	-	-	-
C,D	S	+	-	±	+	+	±	-	-	-	-	-
G	S	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tetani</i>	T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
<i>C. difficile</i>	S	+	-	-	-	+	-	-	-	±	+	-
<i>C. colinum</i>	S	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>C. sordelli</i>	S	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. novyi</i> A	S	+	-	+	+	+	±	-	±	-	-	-
B	S	+	±	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. haemolyticum</i>	S	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

S:偏在、T:端在

出典: 獣医微生物学 (第2版)

一般的には増殖の至適 pH は 6.5~7.0 であるが、酸性域でも増殖可能な菌も存在する。

また、至適増殖温度は一般的には 30~40°Cにあるが、ボツリヌス E 型菌は 3.3°Cで増殖可能である。なお、ウエルシュ菌の発育至適温度は 43~47°Cと高く、分裂時間も 45°Cで約 10 分間と短い特徴がある。

菌種により酸素に対する感受性は異なる。ある種の菌 (*C. novyi* type B 等) は厳密な嫌気条件を要求するが、比較的酸素に対して抵抗性のある菌 (一部のウエルシュ菌など) では 5~10%CO<sub>2</sub>を含む空気中でも増殖可能である[1、2]。

図表 2 にウエルシュ菌の増殖・抑制条件を整理した[5]。

図表 2 ウエルシュ菌の増殖・抑制条件

①増殖条件	
－温度	最低温度：10℃、最高温度：54℃、至適温度：43℃ ※エンテロトキシンは芽胞形成時のみに産生される（35-40℃）
－pH	至適 pH：6-7、範囲：5.1-9.7 ※pH5.1-9.9 の範囲で芽胞形成が行われる
－気圧	至適気圧：嫌気性
－最低水分活性	0.93
②生残条件	
－温度	染色体型 CPE 産生株：D <sub>4℃</sub> =11 日、D <sub>-20℃</sub> =1.5 日 プラスミド型 CPE 産生株：D <sub>4℃</sub> =1.8 日、D <sub>-20℃</sub> =0.6 日 芽胞：冷蔵（4℃）および冷凍（-20℃）条件下で 6 ヶ月間生残（1log 減少程度）
－pH	芽胞：pH4-10 の範囲で 3 ヶ月間生残（1.2 log 減少程度）
－気圧	栄養型は酸素存在下でも生残可能（+200～+300mV）
③不活化条件	
－温度	
－pH	栄養型：pH5 以下で不活化 ※染色体型 CPE 産生株は pH5 以下で徐々に不活化される
－殺菌剤・消毒剤	食品産業におけるほとんどの殺菌剤・消毒剤で食品表面上のウエルシュ菌を不活化可能 グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、塩素、ヨード、酸、アルカリ、過酸化水素、ペルオキシ酸、エチレンオキシド、オゾン は芽胞不活化作用がある（高濃度・長時間）

出典：NZFSA Microbial pathogen data sheet *Clostridium perfringens* を基に、三菱総合研究所作成

## エ. 病原性

ウエルシュ菌は産生する主要な4つの毒素の種類( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ )によりA~E型に分類される(図表3)。このうちA型菌およびC型菌がヒトの疾病を引き起こす。

主要毒素のうち、 $\alpha$ 毒素は全ての型が産生し、その他の毒素はA型以外の菌が産生する。 $\alpha$ 毒素はガス壊疽の主要病原因子であり、その他は腸管感染症の原因となっている。また、4つの主要毒素以外に $\theta$ 毒素および $\kappa$ 毒素が組織障害因子として重要であると考えられている[1]。

食中毒やガス壊疽の原因になるウエルシュ菌はほとんどがA型菌である。A型菌は環境にも広く分布しているが、他の型の菌と比べて家畜の腸管内からよく分離される。A型菌の全てが食中毒を引き起こすわけではなく、そのうちエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌(下痢原性ウエルシュ菌)が付着した食品を喫食することにより発症する。ウエルシュ菌エンテロトキシン(CPE)産生株はA型ウエルシュ菌のうち5%未満と言われている[1、2、4]。

図表 3 ウエルシュ菌の毒素型

毒素型	産生毒素
A	$\alpha$
B	$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$
C	$\alpha$ 、 $\beta$
D	$\alpha$ 、 $\epsilon$
E	$\alpha$ 、 $\iota$

## オ. 感染源

CPE産生型による食中毒のアウトブレイクは、肉製品や鶏肉の不適等な加熱によって引き起こされる[4]。日本においては、多種多様の煮込み料理(カレー、煮魚、麺のつけ汁、野菜煮付け)などが原因となるケースが多い[3]。これらの多くはウエルシュ菌汚染率が高い食肉あるいは魚介類等を使った調理品である。さらに、食肉等にはグルタチオン等の還元物質が豊富に含まれているので、調理品は嫌気状態になりやすくウエルシュ菌の発育に適する。また、原因食品は大量に加熱調理された後、そのまま数時間~一夜室温に放置されていることが多い。加熱調理された食品中では、共存細菌の多くが死滅するが、熱抵抗性が強い下痢原性ウエルシュ菌芽胞は生存する。そして、加熱により芽胞の発芽が促進され、同時に、食品内に含まれる酸素が追い出されてウエルシュ菌の発育に好条件が与えられる。食品中のウエルシュ菌は、加熱調理食品が徐々に冷却していく間に急速に増殖する[2]。

なお、食肉や鶏肉が関連した食中毒が多いため、これまではウエルシュ菌のレゼルボアは食肉動物の消化管であると考えられていた。しかし、PCRによってこれらの動物からcpe遺伝子が検出されたのはごくわずかであった。一方、健康なヒトからcpeポジティブのウエルシュ菌が分離された。これらの結果から、ヒトがウエルシュ菌のレゼルボアである可能性も示唆されている[4]。

## 2) 引き起こされる疾病の特徴

### ア. 潜伏期間および症状

菌に汚染された食品摂取後約 8~12 時間後腹痛や下痢を催し、24 時間以内に回復することが多い。嘔吐や発熱はまれである。致死率は低いが幼児や高齢者ではリスクが上がる[3、4]。なお、推定入院率および致死率はそれぞれ 0.3%および 0.05%である[6]。

約  $10^8$  個の菌を摂取することで発症する。1 食 100g とした場合、発症に至るには少なくとも  $10^6$  個/g を摂取する必要がある[5]。

### イ. 毒性およびその作用機序

ウエルシュ菌エンテロトキシン (CPE) 産生株は A 型菌の 5%未満である。CPE をコードする *cpe* 遺伝子は細菌の染色体あるいはプラスミド上に位置する。これまでに同定された主要な株では、染色体型 *cpe* 遺伝子は Tn5565 および IS1470 遺伝子と関連し、プラスミド型 *cpe* 遺伝子は IS1151 または IS1470 様遺伝子が関与することが知られていた。しかし、近年未知の *cpe* 遺伝子型をもつ株が同定され、そのうちいくつかの株では生物学的活性をもった CPE を産生することが示されている[4]。

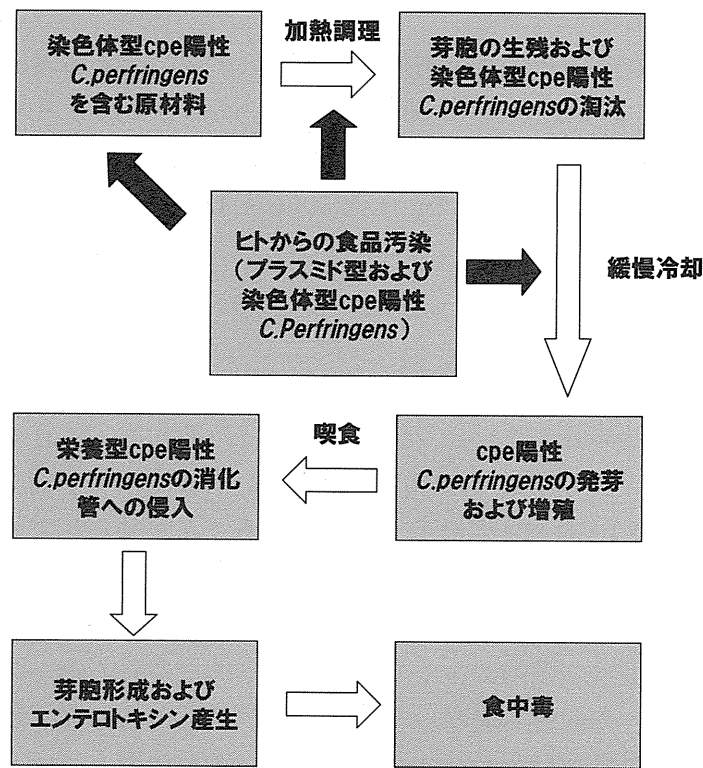
染色体型とプラスミド型は疫学的に全く異なる。遺伝的な背景の違いだけでなく、引き起こす疾病の範囲や環境因への耐性も異なっている。プラスミド型は腸管環境に関連して存在しているが、染色体型は腸管では少数派である。また、染色体型とプラスミド型ではエネルギー、脂肪酸、リン脂質の代謝能が全く異なり、また DNA マイクロアレイでは異なる 2 つのクラスターを形成したことから、それぞれの型は腸管あるいは他の臓器でニッチを形成していると考えられる。なお、近年まで *cpe* 染色体型だけが食中毒の原因菌と考えられていたが、プラスミド型も病因になりうることがアウトブレイク事例から示されている[4]。

また、芽胞形成と CPE 産生は密接に関連する。両者を制御する遺伝子 *spoOA* が見つかっており、2009 年には SigE および SigK 遺伝子も関与していることが報告されている[4]。

CPE は腸管上皮細胞のタイトジャンクションにある claudin-3,4 レセプターと結合して複合体を形成し、原形質膜の膜透過性を変性させて細胞内にカルシウムが流入することで病態が生じる。CPE の量に応じて細胞内のカルシウム濃度も高くなり、アポトーシスあるいは膨張により細胞死が引き起こされる。claudin-4 の N 末端の N149 は claudin-4 と CPE が結合するのに重要な役割を果たすが、このタンパクは哺乳類とそれ以外の動物にも保存されているので、哺乳類以外にも感染する可能性が示されている[4、6]。



図表 4 ウエルシュ菌による食中毒発生機序



出典：Miia Lindström ら(2011)を基に、三菱総合研究所作成

## ウ. 診断方法

食中毒の最も確実な診断は、患者糞便や推定原因食品等からエンテロトキシン産生性のウエルシュ菌を分離することである。食中毒の検査にあたっては、非病原性の常在ウエルシュ菌との区別が重要である。ウエルシュ菌の同定には $\alpha$ 毒素であるレシチナーゼ産生性が重要であり、 $\alpha$ 抗毒素濾紙を使ったレシチナーゼ抑制反応が応用されている。また、エンテロトキシンの検出は、RPLA法を利用した市販試薬を用いて行うのが一般的であるが、最近PCR法も用いられている[2]。

一方、従来行われてきた標準的な菌分離は感度が低いため、菌株に選択バイアスがかかっている可能性も指摘されている。従来の標準的な診断方法として培地による菌分離が用いられてきたが、この方法ではA型菌とその他の毒素型とを区別できず、またcpe+とcpe-の区別もできない。また、Colony hybridization-based isolationはcpe遺伝子を同定することができるが、培養する中でcpeプラスミドが欠落してしまったケースなど、常にcpe遺伝子陽性のサンプルを同定できるわけではない。今後はCPE産生株に特化した、より感度のよい試験法を開発していく必要があると考えられている[4]。

## エ. 予防・治療法

治療は主に対症療法が中心となる。

予防策としては食品中での菌の増殖を防ぐことが重要である[2]。食品中での菌の増殖を阻止するため、加熱調理食品の冷却は速やかに行う。食品を保存する場合は、10℃以下か 55℃以上を保つ。また、食品を再加熱する場合は、十分に加熱して増殖している菌（栄養細胞）を殺菌し早めに摂食する[3]。

また、家畜に対する感染予防策としては、ブロイラーにおける *C. perfringens* のトキシイドワクチンの有効性及び安全性の評価に関する研究において、ウエルシュ菌の A 型/C 型混合型ワクチンが壊疽性腸炎の発症リスクを減少させることが証明された。ワクチンの効果を高めるためには、生後 7 日齢におけるワクチンの一次接種と、21 日齢における二次接種が効果的であることが示されている[7]。

### 3) 用量反応曲線

USDA (2005) が構築した食肉、家禽肉の RTE 食品および一部加熱した製品におけるウエルシュ菌のリスク評価モデルでは、Dische and Elek (1957)、Strong ら(1971)、Hauschild および Thatcher (1967)、Dack ら(1954)のデータを用いた用量反応曲線が採用されている。ここで用いられているデータの概要を図表 5 に示した。これらのデータを対数正規分布に適用し、用量反応曲線を得た (図表 6) [8]。

$$p_i = 1 - \exp(-e^z d_i)$$

※ $p_i$  : 用量  $d_i$  時の発症確率

なお、これらの用量反応曲線を用いたリスク評価の結果、以下の結論が示された[8]。

- アメリカにおける食肉、家禽肉の RTE 食品および一部加熱した製品の喫食によるウエルシュ菌食中毒患者は、年間約 79,000 名と推定される。
- ウエルシュ菌増殖を 1-log10 (10 倍) から 2-log10 (100 倍) または 3-log10 (1,000 倍) に変化させた場合、それぞれ年間食中毒発症者数は中央値で 1.23、1.59 倍上昇した。
- 小売店または家庭での食肉、家禽肉の RTE 食品および一部加熱した製品の不適切な冷蔵保存は、ウエルシュ菌による食中毒要因の約 90%を占めた。また、不適切な高温保存はウエルシュ菌による食中毒要因の約 8%を占めた (ただし、過少評価されている可能性がある)。
- 加工工場における 1-log10 (10 倍) および 2-log10 (100 倍) の菌の増殖による食中毒は、それぞれ 0.05%、0.4%を占めた。
- 実験室での試験結果、ボツリヌス菌の方がウエルシュ菌よりも低温での増殖率が高かった。

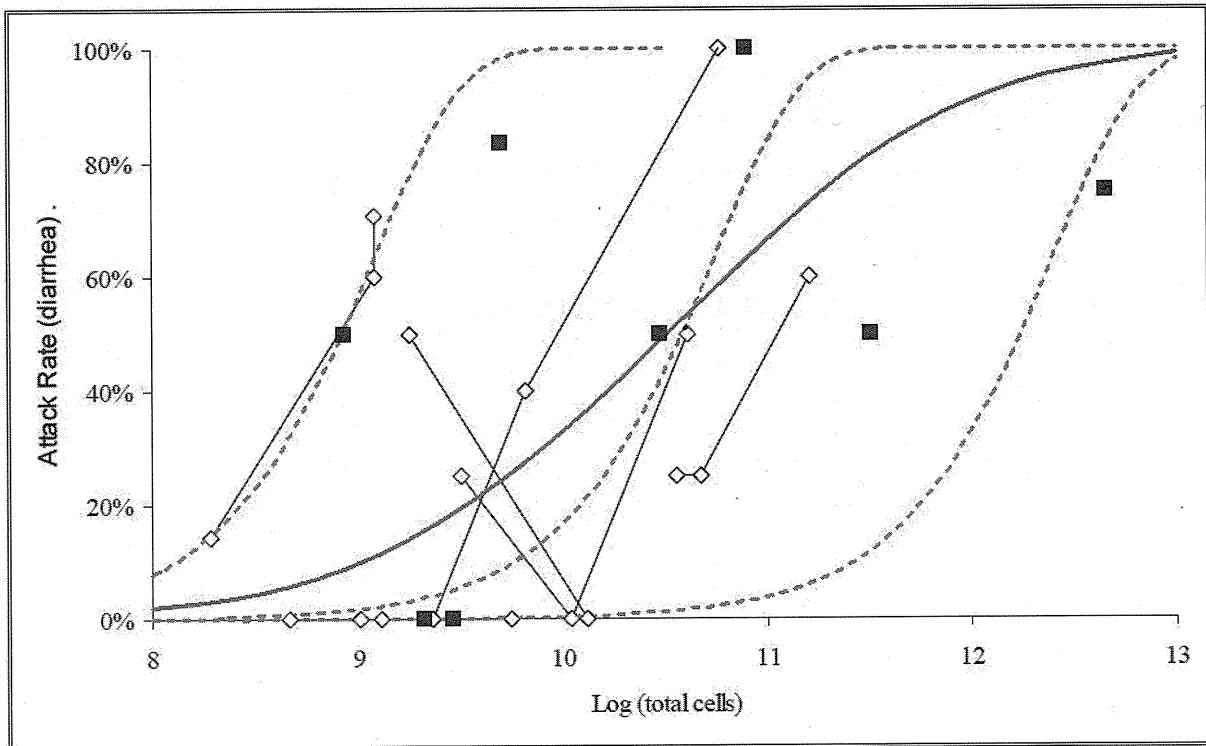
図表 5 用量反応曲線に用いたデータの概要

Strain	No. of cells fed		Human subjects no. diarrhea / no. tested	Reference
	Total count	Spores		
027	3.20E+11	3.20E+08	2 / 4	4
683	2.90E+09	NM	0 / 5	1
689	2.12E+09	NM	0 / 5	1
690	4.62E+08	NM	0 / 6	1
690	1.29E+09	NM	0 / 5	1
690	1.03E+09	NM	0 / 6	1
692	5.56E+09	NM	0 / 5	1
68900	3.00E+10	3.20E+07	2 / 4	4
79394	7.90E+10	5.20E+05	4 / 4	4
E13	4.50E+12	1.60E+08	3 / 4	4
NCTC 10239	3.60E+10	6.40E+08	1 / 4	4
NCTC 10239	4.70E+10	5.40E+06	1 / 4	4
NCTC 10239	1.60E+11	4.20E+07	3 / 5	4
NCTC 10240	1.80E+09	2.70E+06	2 / 4	4
NCTC 10240	1.30E+10	3.40E+07	0 / 4	4
NCTC 8238	8.50E+08	NM	1 / 2	2
NCTC 8239	2.30E+09	NM	0 / 6	2
NCTC 8239	6.60E+09	7.80E+08	2 / 5	4
NCTC 8239	5.80E+10	1.60E+10	3 / 3	4
NCTC 8797	1.90E+08	NM	1 / 7	2
NCTC 8797	1.20E+09	NM	3 / 5	2
NCTC 8797	1.20E+09	NM	17 / 24	2
NCTC 8798	3.20E+09	1.50E+08	1 / 4	4
NCTC 8798	1.10E+10	1.50E+10	0 / 5	4
NCTC 8798	4.10E+10	2.10E+08	2 / 4	4
S-79	5.00E+09	NM	5 / 6	3

NM: not measured (*i.e.*, No attempts were made to measure from these studies)  
 1. Dack *et al.*, 1954.  
 2. Dische and Elek, 1957.  
 3. Hauschild and Thatcher, 1967.  
 4. Strong *et al.*, 1971.

出典 : Crouch, E.ら(2005)

図表 6 用量反応曲線



※点線：各菌株の用量反応曲線、実線：各菌株を平均した用量反応曲線

出典：Crouch, E.ら(2005)