

認されており²⁾、L929 細胞にはエンテロトキシン受容体が存在しないことで、L929 細胞への致死毒性が発現しないと説明されている。一方、この度の 4 事例からの分離菌株を、変法 DS 培地で培養して得た培養液ろ液を、Vero 細胞および L929 細胞の培地中に添加したところ、両細胞への致死作用が観察された。

5. 事例株のゲノム解析

Shotgun シークエンシング法で、W5052 株のゲノム情報を得た。平均のリード数（一回あたりに読み取れた塩基配列の数）は 472 bp だった。全読み取り塩基数は 68 Mbp を示した。それらの配列を、付属のソフト GS de novo Assembler で処理をしたところ、17 種類の Scaffold を得た。Scaffold は、信頼性のある塩基配列の固まりを示している。17 種のサイズは、2 Kbp から 3.2 Mbp の間に分布した。Scaffold の塩基サイズが大きいものは染色体を、小さいものはプラスミドを示唆する。

同様の解析を Mate-pair 法で実施した。平均リード数は 451 bp、読み取った全塩基数は 90 Mbp を示した。Mate-pair 法と Shotgun 法の双方で得た配列を合わせて、de novo Assemble で解析したところ、scaffold は 3 種にまで減少した。具体的には約 310 万 bp、約 5 万 4 千 bp、および約 1 万 2 千 bp の Scaffold を示した。

これら 3 種の Scaffold に対し、GS Reference Mapper を用いて、ウエルシュ菌 St. 13 株ゲノムとのマッピングを行い、

塩基配列の相同性を比較した。それぞれを図に示す（図 1、2、3）。最も塩基数の多い Scaffold は、SM101 株との比較から、染色体であることが推察された。他の 2 種の scaffold は、塩基サイズから、プラスミドと推察された。

D. 考察

ウエルシュ菌は各種の毒素を産生する。それら毒素のうち、食中毒を誘発する直接の毒素がエンテロトキシンで、腸管粘膜上皮細胞に障害を与え、下痢を誘発することがわかっている。ウエルシュ菌食中毒は、エンテロトキシン産生性のウエルシュ菌生菌が、食品とともに人体に取り込まれ、腸管内で増殖し、エンテロトキシンを産生することによって発症する。一方、ウエルシュ菌は環境中や糞便中にも存在する。それらの、食中毒とは無関係のウエルシュ菌では、エンテロトキシン遺伝子は保持せず、毒素産生を誘発しやすい培地に接種してもエンテロトキシン産生は認められない。したがって、ウエルシュ菌食中毒を起こす菌株は、必ずエンテロトキシン遺伝子を保有し、かつ、毒素産生培地でのエンテロトキシン産生が確認できる。

ウエルシュ菌食中毒は、腸管内での増殖と毒素産生のために、ブドウ球菌やセレウス菌毒素性食中毒より長時間の潜伏期を示すのが通常である。前者は早いと喫食後 30 分程度で症状の発現をみるが、ウエルシュ菌では平均的に 10 時間程度

の潜伏時間を要するとされている。症状は、水様性下痢、渋り腹と呼ばれる腹痛を主とする。予後はよい。

ウエルシュ菌食中毒は、原因食品に特徴を持つ。ウエルシュ菌は耐熱性の芽胞を産生する。食材に同菌芽胞が含まれて、加工調理される際、加熱により共存菌の死滅、芽胞の加熱による活性化と一斉増殖が起こる。そのため、原因食には肉、野菜等の煮込み料理や、ローストビーフなどの加熱加工食品がある。

ウエルシュ菌食中毒は、原因施設にも特徴がある。家庭での発生は通常みられない。上述のように、加工加熱する食品がウエルシュ菌の原因食となるのであるが、嫌気性菌のウエルシュ菌の食品内増殖を許す条件があり、食品内嫌気度を上昇させる大量調理施設が該当する。同施設では、容量の大きな調理器具を使用する。同器具は高さがあり、大気の器具底部への浸透が弱い。加熱によって排出された酸素が、再び食品内に浸透する際に、深さのある調理器具は食品内嫌気度を高く保つ危険性がある。さらに、カレー、シチュー、煮物のように、粘性の高い食品は、大気の浸透を妨げる。飲食店、給食施設、仕出し弁当をつくる調理施設が、ウエルシュ菌食中毒の原因施設になりやすい条件は、ウエルシュ菌固有の性状が原因になっている。飲食店や給食施設で調理された「同一の食品」は多くの人に提供され、大規模な人数の食中毒に発展することもウエルシュ菌食中毒の大きな特徴となっている。

以上のウエルシュ菌とウエルシュ菌食中毒の特徴は、同食中毒を診断する際に有効に作用する。原因施設、原因食、患者数、潜伏期間、症状、から推測し、原因食および患者糞便から、ウエルシュ菌を培養する。同菌が耐熱性の芽胞を産生すること、嫌気性菌であることを利用し、菌分離を行う。また、患者下痢便中にはエンテロトキシンが検出されることも多い。

患者材料や推定原因食からウエルシュ菌が分離された場合、菌体 DNA をテンプレートして PCR を行い、エンテロトキシン遺伝子があること、また、毒素産生培地に接種し、エンテロトキシンタンパク質が産生されていることを確認し、ウエルシュ菌食中毒と診断する。

1997年、ウエルシュ菌食中毒が疑われ、患者材料からウエルシュ菌が分離された事例が発生した。ウエルシュ菌食中毒と診断するため、常法に従い、エンテロトキシン遺伝子と同タンパク質の有無を検査したところ、いずれも陰性だった。同事例から、複数の菌株についても同様だった。以降、2010年に至るまで、4例の同様な事例の発生があった。

4事例から分離された菌株について、その腸管病原性を検証した。ウサギ腸管ループ試験は、対象物が直接に腸組織に接触し、下痢原性を実証する。液体の貯留、すなわち下痢誘発性と、貯留した液体による腸管ループの腫脹が認められた場合、検査対象に下痢誘発性、腸管病原性があり、食中毒を惹起する能力を証明する。

4 事例のそれぞれから分離された菌株の、培養液ろ液は、腸管ループレスト陽性を示した。

ウエルシュ菌エンテロトキシンは、細胞膜上の受容体に結合し、細胞膜に小孔を開け、細胞内容物の流出と、細胞死を誘導することがわかっている。これまでの受容体研究から、ミドリザル腎臓由来 Vero 細胞は同受容体を持ち、したがってエンテロトキシン感受性を示すことが明らかになっている。一方、マウス繊維芽細胞 L929 細胞は、エンテロトキシン受容体を保有せず、したがってエンテロトキシン非感受性細胞になる。両細胞に対し、事例分離株の培養ろ液は、細胞毒性を示した。これらの事実は、4 事例を発生させたウエルシュ菌は、エンテロトキシンではなく、新種の下痢誘発毒素があること、複数の事例が観察され、現状の検査法と、検査者のウエルシュ菌食中毒に対する知識では、同菌食中毒の正確な疫学情報を得ているとは言い難いことを示している。

昨年度までの、本厚生労働科学研究の成果から、上記の新種の腸管毒性物質が、事例菌が産生するタンパク質性の毒素であることが明らかになっている⁴⁾。本年度は、事例由来の菌株の性状を蓄積して、新型毒素産生ウエルシュ菌の存在が、普遍的である可能性を示すとともに、事例分離菌の、ゲノム情報を解析した。

ウエルシュ菌のゲノムは、数株についてはすでに公開されている、それらのうちの SM101 株は、エンテロトキシン産生性の菌株として分析され、事実、

染色体上にエンテロトキシン遺伝子が存在している⁵⁾。事例由来株の一つ、W5052 株について、次世代シーケンシング解析を行った。同法では、Mate-pair 法による解析が有効だった。次世代シーケンシングでは、信頼性ある塩基配列の固まり (scaffold) が大きくなり、その数が少なくなり、一定数の scaffold で収束した場合、ゲノム構成成分が規定される。細菌の場合、数 Mbp のレベルの染色体と、菌が保有するプラスミドがゲノム構成成分となる。W5052 株の Mate-pair 解析では、3 種の scaffold に収束し、そのうちのひとつが 3 Mbp と大きく、染色体であることを示す。一方、50,000 bp 程度および 12000 bp 程度の小さな scaffold も存在し、これらはプラスミドであることを示唆する。

昨年度までの解析では、当該腸管毒性物質は、イオタ毒素に相同性のあるタンパク質であることが示されている。イオタ毒素は、ウエルシュ菌で発見されたものであるが⁶⁾、イオタ毒素に類似の毒素がスピロフォルム菌でも発見され、イオタ毒素様毒素として、ウサギの下痢症に関わることが明らかになっている⁶⁾。新種の腸管毒素は、ウエルシュ菌のイオタ毒素よりも、スピロフォルム菌のイオタ毒素様毒素に相同性が高かった⁴⁾。以上のことは、イオタ毒素が、ウエルシュ菌からスピロフォルム菌に伝播し、変異を受け、さらに、エンテロトキシン遺伝子を持たないウエルシュ菌に伝播して、さらに変異をしたことを想像させる。本年度の新型下痢毒素産生性ウエルシュ菌の

ゲノム解析研究は、ウエルシュ菌食中毒の疫学情報を正確に刷新できるだけでなく、病原性遺伝子の伝播と、同遺伝子を保有する生物種の間を明らかにできる可能性がある。

E. 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) Kimura J, Abe H, Kamitani S, Toshima H, Fukui A, Miyake M, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Horiguchi Y. *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. J. Biol. Chem. 2010, 285, 401-408.
- 3) 鎌田洋一ら、厚生労働科学研究補助金平成24年度食の安全推進研究事業「独資産生微生物及び試験法に関する研究」
- 4) 大谷仁己、氏家淳雄. 1987. 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、食衛誌、28、281-285.
- 5) Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002, 99, 996-1001.
- 6) 桜井淳、本田武史、小熊恵二（編）細菌毒素ハンドブック、Science Forum,

2002, 東京.

E. 健康危害情報

特になし。

F 研究発表

なし。

G. 学会発表

- 1) Kamata Y, Irikura D, Monma C, Namaka A, Kai A, Sugita-Konishi, Y. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (1) detection and identification of a new enterotoxin using genome analysis and *in silico* screening. Clostpath 2013. Palm Cove. Qld, Australia, Sep. 2013.
- 2) Monma C, Suzuki Y, Irikura D, Kamata, Y, Sugita-Konishi Y, Nakama A, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Kai A. (2013) *Clostridium perfringens* new enterotoxin (2) biochemical characterization of an new enterotoxin. Clostpath 2013. Palm Cove. Palm Beach, Qld, Australia, Sep. 2013.
- 3) 門間千枝、赤瀬 悟、石塚理恵、齋木大、小西典子、横山敬子、仲間晶子、鎌田洋一、甲斐明美(2013) 人ふん便における新型エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の保有状況、第34回日本食品

微生物学会.

H. 知的所有権の取得情報
特許申請なし。

表1 ウエルシュ菌が分離されたが、従来と性状の異なる食中毒事例

	事例1	事例2	事例3	事例4
発生年月	1997.1	2003.6	2009.8	2010.1
発生地	東京	東京	大阪	栃木
患者数(人)	39	11	84	79
原因施設	飲食店	飲食店	飲食店	飲食店
原因食品	シラタキと牛肉 の煮物	子羊煮物	ローストビーフ	ローストビーフ
主要症状	下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛
平均潜伏時間 (時間)	15.4	10	12.2	9.7

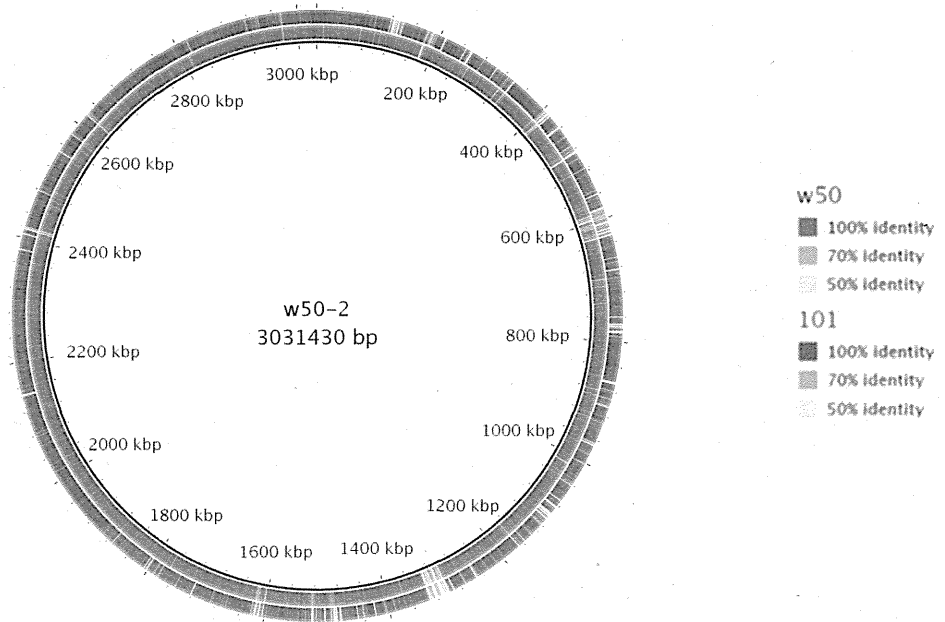


図1 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のゲノムマップ
W5052株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌 SM101と比較した。

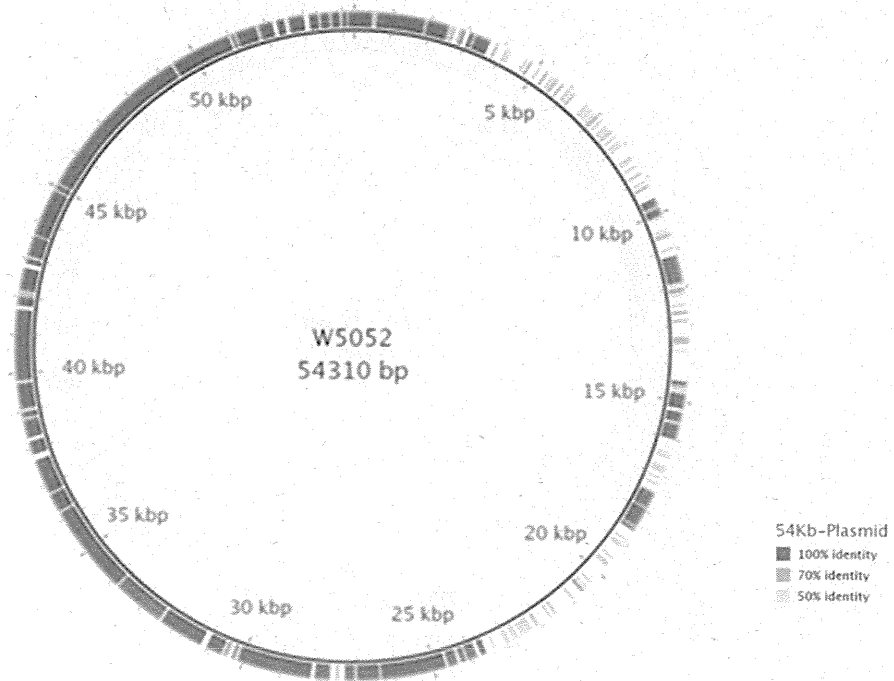


図2 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のゲノムマップ
W5052株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌SM101と比較した。

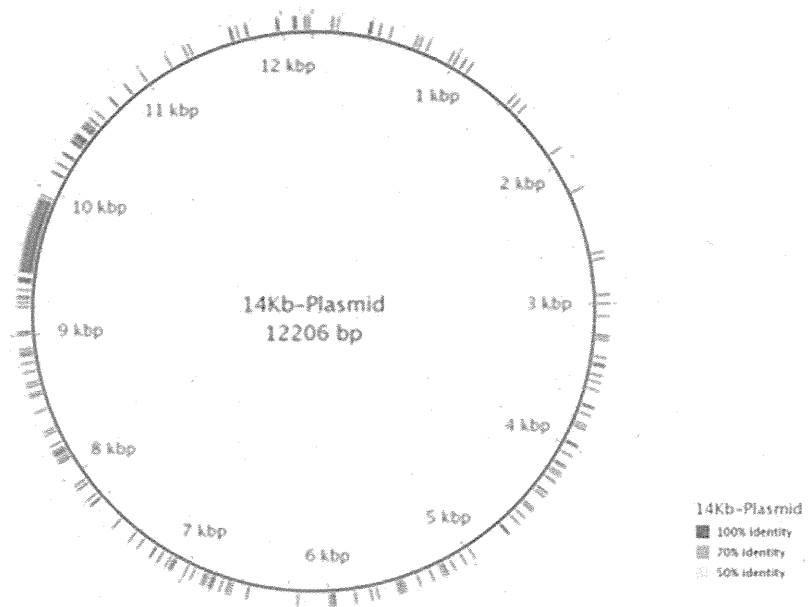


図3 エンテロトキシン非産生性ウエルシュ菌 W5052 株のゲノムマップ
W5052 株のゲノムシーケンスを、公開されているウエルシュ菌 SM101 と比較した。

