

令和7年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発

及び汚染実態把握

研究代表者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食中毒原因究明のための新規遺伝子検査法確立に関する研究

研究分担者 新井 沙倉 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

既存のウエルシュ菌の型別法にはそれぞれ課題があり、集団食中毒へ迅速に対応するためには改良法の開発が求められる。そこで本研究では、新たな遺伝子型別法を開発する前段階として、日本国内にて分離された多様なウエルシュ菌がどのような遺伝子やアミノ酸配列を有するのか、全ゲノムデータを基に解析した。その結果、食中毒を起こすために必須の *cpe* 遺伝子が染色体上に局在するウエルシュ菌は大きく分けて2種類の系統に属した。うち片方 (*c-cpe group1*) はウエルシュ菌の芽胞の耐熱性に重要な Ssp4 のアミノ酸配列が耐熱性の構成を示すことが明らかとなった。また、この *c-cpe group1* に特徴的なその他の遺伝子構成も明らかとなった。集団食中毒事例分離株に着目して解析すると、ある程度事例ごとに特徴的な病原遺伝子/環境耐性因子パターンを示した。今後は集団食中毒事例由来株をより増やして解析し、遺伝子型別法の標的遺伝子を選定する。

研究協力者

Burenqiqige

国立医薬品食品衛生研究所

大野祐太、落合崇浩

北海道立衛生研究所

菊池 俊

千葉県衛生研究所

小西典子、尾畑浩魅、門間千枝*

東京都健康安全研究センター

柳本恵太

山梨県衛生環境研究所

八木美弥

静岡県環境衛生科学研究所

大西 真、柿田徹也、久手堅剛、平良遥乃

沖縄県衛生環境研究所

石黒真琴

札幌市衛生研究所

土屋彰彦、曾根美紀

さいたま市健康科学研究センター

松本裕子

横浜市衛生研究所

淀谷雄亮

川崎市健康安全研究所

* 現所属：十文字学園大学

A. 研究目的

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は保有する毒素の種類によって7種類 (A型、B型、C型、D型、E型、F型およびG型) の毒素型に大別される (表1)。その中でもヒトに食中毒を引き起こす菌株は α 毒素およびCPEを保有するF型菌である。ウエルシュ菌の検査の際に注意すべきがヒト腸管内に健康保菌されるウエルシュ菌の存在である。このウエルシュ菌は α 毒素のみ保有するA型菌であることが多いが、特に高齢者ではF型菌も保菌していることがあり、集団食中毒の検査の際には食中毒の原因菌株と常在菌株とを区別することが重要である。この区別する方法として、現在までに様々な型別法が開発、利用されてきた (表2)。まず、血清型別法として唯一市販されている商品がHobbs型別法の血清である。しかし、Hobbs型の市販血清は型が限られており、日本の集団食中毒事例分離株の多くがいずれの血清型とも凝集反応を示さない型別不能に分類されることが大きな問題である。また、東京都が実施している血清型別のTW型は多様性に富む点で優れているが、日本国内でのみ実施されるため国際的な比較が難しいことが難点である。次に、遺伝子を使用した方法として、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は解像度が高く広く利用されているが、機器が終売のため、将来的には利用を継続することが難しい。PFGE法よりも簡便な方法として遺

伝子の塩基配列データを比較するMultilocus Sequence Typing (MLST) 法も型別に有用だが、8つの遺伝子を個別にシーケンサーにて塩基配列を取得する必要があるため煩雑であり、対象とする遺伝子数が8つに限られているため解像度もPFGEより劣る。また、近年主流になってきた全ゲノムで共通性があるコアゲノムを使用した方法や配列の多様性 (SNP) を活用したゲノム解析は、解像度に優れているが、機器とライブラリー調整試薬が高価である。機器がない機関では外注での運用も可能だが、納期まで日にちを要するため、迅速な検査が求められる集団食中毒事例直後の利用には適さない。このようにウエルシュ菌の現行の型別法はいずれも課題があり、改良法の開発が必要である。

そこで本研究では、自治体が集団食中毒事例に対応する際に利用可能な簡便、迅速、かつ安価なウエルシュ菌型別法の開発を目指す。初年度は、型別法に利用する遺伝子候補を検討した。

B. 研究方法

[1] 食中毒関連遺伝子の解析

(1) 文献調査

過去の文献の中でも、ウエルシュ菌の多様性と食中毒に関連する遺伝子について詳細に解析した論文を検索した。系統ごとに保有する遺伝子の特徴に着目し、解析対象とする遺伝子およびアミノ酸を選定した。

(2) 国内分離株 74 株の解析

1) 菌株

集団食中毒由来 27 株、詳細不明のヒト由来 7 株、動物由来 4 株、スパイス由来 8 株、海産物由来 14 株、乾物由来 2 株および環境由来 12 株の合計 74 株を供試した。

2) ゲノム配列の取得

過去 3 年間の研究にて渡辺班にて取得された生データを活用した。

3) 保有遺伝子の解析

cpe 遺伝子の局在解析には以下のバイオインフォマティクスツールを用いた。リードデータのトリミングは fastp (v0.24.3) を用い、-g および --detect_adapter_for_pe オプションを指定して行った。ゲノムアセンブルは skesa (v2.5.1) を用い、デフォルト設定により各菌株のドラフトゲノムを作成した。病原遺伝子の検出には abricate (v1.0.1) を使用し、Virulence Factor Database (VFDB) を参照データベースとして、デフォルト設定 (最小一致率 80%、最小カバレッジ 80%) で検索を行った。abricate により検出された *cpe* 遺伝子については、MOB-suite (v3.1.9) を用いて解析し、染色体またはプラスミド上の局在を判定した。さらに、染色体性 *cpe* およびプラスミド性 *cpe* のいずれもその遺伝子の前後配列を比較すると、挿入配列 (insertion sequence: IS) の多様性などによって染

色体性とプラスミド性のいずれも 7 パターン (合計 14 パターン) の局在パターンがあることが報告されているため (Shrestha et al., 2024. Microbiol. Mol. Biol. Rev.)、挿入配列の検出には ISEScan (v1.7.3) を用い、デフォルト設定で解析した。さらに、既知の *cpe* 保有プラスミド配列との BLAST による相同性解析を実施し、その結果に基づいてプラスミドタイプを判定した。

その他の遺伝子またはアミノ酸の解析では、CLC ゲノミックワークベンチ (v25.0.3) のソフトウェアを利用して、生データの Quality Check、Trimming の後にドラフトゲノムを作成した。得られたドラフトゲノムをオンラインの D-FAST に Upload することで、Annotation を行った。解析対象とする遺伝子が Annotation された場合には、その遺伝子の有無を記録した。アミノ酸配列を解析する場合には、アミノ酸配列を D-FAST からダウンロードし、再び CLC ゲノミックワークベンチに配列を取り込み、配列多様性を比較した。一方、D-FAST にて Annotation されなかった解析対象遺伝子については、National Center for Biotechnology Information (NCBI) などのデータベースから遺伝子配列情報を取得し、配列対象遺伝子の有無をドラフトゲノム中から検索する Local BLAST を実施した。なお、解析対象とする遺伝子およびア

ミノ酸の結果を渡辺班にて取得した Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST) の maximum-likelihood phylogenetic tree と並記することで、系統ごとの特徴を解析した。

[2] 集団食中毒事例由来株の追加収集

上記の 74 株では集団食中毒由来株が全体に占める比率が低く、一部のヒト由来株は詳細不明で食中毒と関連しているか判定が困難であったため、国内の集団食中毒事例由来株を追加収集した。過去にウエルシュ菌食中毒事例が発生した自治体を調査し、原因食品が判明している集団食中毒事例を中心に菌株を収集した。

C. 研究結果

[1] 食中毒関連遺伝子の解析

(1) 文献調査

Jaakkola らの報告 (Jaakkola et al., 2021. Frontier) がウエルシュ菌の系統ごとに保有する遺伝子について詳細に解析していた。食中毒に必須の遺伝子 *cpe* については、プラスミド上に *cpe* が局在する菌株 (p-*cpe*)、と染色体上に *cpe* が局在する菌株の 2 種類に大別されており、染色体上の株はさらに系統樹上で別系統の 2 グループ (c-*cpe* group1 および c-*cpe* group2) に大別された。また、ウエルシュ菌の主要な病原遺伝子に加え、環境中や食品中での生存や生体内での生存に重要な環境耐性因子等を併せて解析していた。

(2) 国内分離株 74 株の解析

1) *cpe* の局在解析

cgMLST の系統樹に株の *cpe* の局在情報を併せると、p-*cpe*、c-*cpe* group1 および c-*cpe* group2 がおおそ系統ごとに分かれており、*cpe* 非保有株は p-*cpe* および c-*cpe* group2 と同じ系統に属していた (図 1)。特に c-*cpe* group1 は他の 2 種類と明らかに別の系統に属していた。この c-*cpe* group1 に属する菌株は集団食中毒由来 11 株、海産物 (アサリ、シジミ、乾燥小エビおよび干しエビ) 由来 4 株およびスパイス由来 1 株であり、本研究に使用した集団食中毒由来株 26 株中 42% が c-*cpe* group1 に属していた。

cpe 遺伝子の前後配列を比較解析した結果、p-*cpe* の 33 株のうち、25 株が *cpe* 遺伝子の上流に IS1469 (IS200S)、下流に IS1151 が配置される F5603 に型別された (図 2)。また、6 株が *cpe* 遺伝子の上流に IS1469 (IS200S)、下流に IS1470 が配置される F4969、1 株は *cpe* 遺伝子の上流に *ibp* および *iap* が配置される pCPPB-1 に型別され、1 株は再解析が必要な株であった。一方、染色体上に *cpe* がコードされる 21 株は、いずれも *cpe* 遺伝子を含む contig の長さが不足したため、型別されなかった。

2) 各種遺伝子解析

渡辺班にて作成した cgMLST の系統樹 (図 1) と日本国内のウエルシュ菌分離株の主要な病原遺伝子および環境耐

性因子を併せて解析した（図3）。その結果、毒素に着目して解析すると、 ι 毒素をコードする *iap/ibp* 遺伝子がスパイス（チリパウダー）由来1株から検出され、この株はE型菌（表1）であることが示唆された。また、 β 毒素をコードする *cpb2* 遺伝子が環境（河川水）、スパイス（カレーパウダー）、海産物（サクラエビ）由来の合計3株から検出され、この株はC型菌（表1）であることが示唆された。

次に系統関係に着目して解析すると、c-cpe group1 の株でのみ共通して、Ssp4 (Small Acid Soluble Protein-4) というウエルシュ菌の芽胞の耐熱性に関与する因子のアミノ酸配列が、耐熱性の配列を示していた。その他、c-cpe group1 以外の菌株は概ね共通して保有している NanI、NanJ、NagI、NagJ、NagK、NagL が c-cpe group1 では欠損していた（図3）。本研究にて解析した日本由来株の各種遺伝子解析の結果を Jaakkola らの報告と比較すると、ほとんどの遺伝子の有無は両者で共通であった。一方、いくつかの遺伝子は両者で異なっており、日本由来株の特徴が見られた。まず、PfoA は、c-cpe において日本由来株では陽性だが、Jaakkola では陰性であった。NagH は、c-cpe group2 において日本由来株で概ね陽性で（Jaakkola は概ね陰性）、c-cpe group1 において日本由来株において半

数程度が陽性であった（Jaakkola は全て陰性）。NanI、NagI および NagK は、日本由来株の c-cpe group2 で全てが陽性であったが、Jaakkola では陰性であった。Arc および FaoAB は Jaakkola では c-cpe group2 を中心に陰性だったが、日本由来株は c-cpe group2 で陽性で group1 の一部が陰性な点が異なった。また、SplB および SigV は Jaakkola では c-cpe group2 および c-cpe group1 の一部が陰性だったが、日本由来株は SplB はほぼ全株で陽性、SigV は c-cpe group2 で陽性出会った。

さらに、本研究にて使用した遺伝子を用いて集団食中毒事例由来株の型別が可能か検討するために、食中毒事例由来株27株のみを抜き出し、病原遺伝子および環境耐性因子の保有状況を比較した（図4）。その結果、合計12の多様性パターンに分けられた。同一の集団食中毒事例由来株から複数株試験した場合（事例5、7、10および11）、事例5および7では株間でパターンが一致していたが、事例10はパターン7と10の2種類、事例11はパターン8と12の2種類が検出された。事例ごとのパターンを比較すると、事例3と事例4の2株、事例5と事例6の6株および事例10と事例13の2株がそれぞれ同一パターンを示していた。

[2] 集団食中毒事例由来株の追加収集

10自治体から合計30事例由来の118株

を分与いただいた。分与株については、渡辺班と共同で、外注によって全ゲノム配列を取得した。

D. 考察

本研究で国内分離ウエルシュ菌株の系統ごとの病原遺伝子および環境耐性因子の分布が明らかとなった。特に Ssp4 は食中毒に密接に関連しており、*cpe* 陽性の食中毒由来株と *cpe* 陽性の食中毒以外由来株では、どちらも同量の芽胞と CPE を産生するが、食中毒由来株の芽胞の方がより低温や高温に耐性があることが示されている (Collie et al., 1998. Anaerobe; Smedley et al., 2004. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol)。この環境耐性の由来として考えられる要因が Ssp4 である。Ssp4 は、芽胞形成細菌が広く保有する芽胞の主要な構成要因であり、DNA 結合能を持ち、外的ストレスから DNA を保護する。特定のアミノ酸がアスパラギン酸の株は環境耐性が高いが、同アミノ酸がグリシンの株は環境耐性が低いという報告があり、本研究では、供試した 74 株のうち、c-cpe group1 に属する 16 株のみが特定のアミノ酸がアスパラギン酸であり、その他の全ての菌株はグリシンであった。そのため、c-cpe group1 に属する菌株は、特に芽胞の耐熱性が高いことが想定された。そのため、ウエルシュ菌食中毒の発生機序として従来から言及されるようなカレーライスなどの煮込み料理を調理後に生き残る芽胞

というのは、この c-cpe group1 に属する菌株の可能性が示唆された。本研究にて原因食品が判明したカレーによる食中毒事例株 4 株もこの c-cpe group1 に属していた。しかし、2 株ずつ系統が分かれていたため (W24016_s と W24008_s、W24010_s と W24018_s)、2 種類の異なるウエルシュ菌が原因の食中毒である可能性が示唆された。さらに、海産物由来株とスパイス由来株の一部もこの c-cpe group1 に属していたため、カレーに限らず、これら食材を使用した調理時にも、従来通り、煮込み料理などで加熱した後の温度管理によって菌数の増加を防ぐことが重要であることが示唆された。

一方、集団食中毒事例由来株 27 株中 16 株は c-cpe group1 以外に属しており、4 株は *cpe* 非保有、12 株は p-cpe であった。そのため、*cpe* 陰性株については、食中毒の原因菌株ではなく常在ウエルシュ菌であった可能性や、プラスミド性の *cpe* が脱落した可能性が考えられた。一方、p-cpe は、常在ウエルシュ菌の可能性も考えられるが、複数人から同じ p-cpe が分離されている場合には食中毒の原因である可能性が高い。その場合は、上述のカレーなどの高温に長時間さらされる煮込み料理が原因ではない可能性もある。本研究にて供試した 27 株の集団食中毒事例由来株では、原因食品を含む食中毒事例の詳細が多く株で不明であった。そこで、今年度新たに原因食品が確定または推定された集団

食中毒事例を中心に菌株を収集し、全ゲノムデータを取得した。次年度はこれらの追加菌株データを引き続き解析することで、Ssp4 のアミノ酸配列と原因食品とを関連して解析する。また、いくつかの事例間で保有遺伝子パターンが同一であったため、解析する遺伝子をさらに追加し、事例ごとに異なるパターンを示す遺伝子候補の選定を進める。さらに、染色体性 *cpe* およびプラスミド性 *cpe* がどのような遺伝子構成パターンでコードされているか解析したところ、食中毒の原因となる F 型菌は従来の報告通り F4969 または F5603 の 2 種類から構成されていた。一方、染色体性の *cpe* は今回 Illumina のショートリードシーケンスにて配列を取得したため、contig 長が本解析には不足し、判定されなかった。そこで、次年度以降ロングリードシーケンスにて配列を追加取得した後に解析すれば、染色体性 *cpe* が c-cpe group1 および c-cpe group 2 の 2 種類よりもさらに細かに分類される可能性が示唆された。

E. 結論

日本で分離された多様な由来のウェルシュ菌株のゲノム解析を実施した。病原遺伝子および環境耐性因子を解析した結果、cgMLST 解析の系統樹の各種系統に対応するように複数の特徴的な遺伝子が見られた。また、集団食中毒事例由来株の一部(c-cpe group1) が耐熱性芽胞形成に重要な Ssp4 のアミノ酸配列を有していた。今後、

原因食品が判明した集団食中毒事例由来株を中心に解析することで、有用な遺伝子候補を確定し、ウェルシュ菌の遺伝子型別法開発へと繋げたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

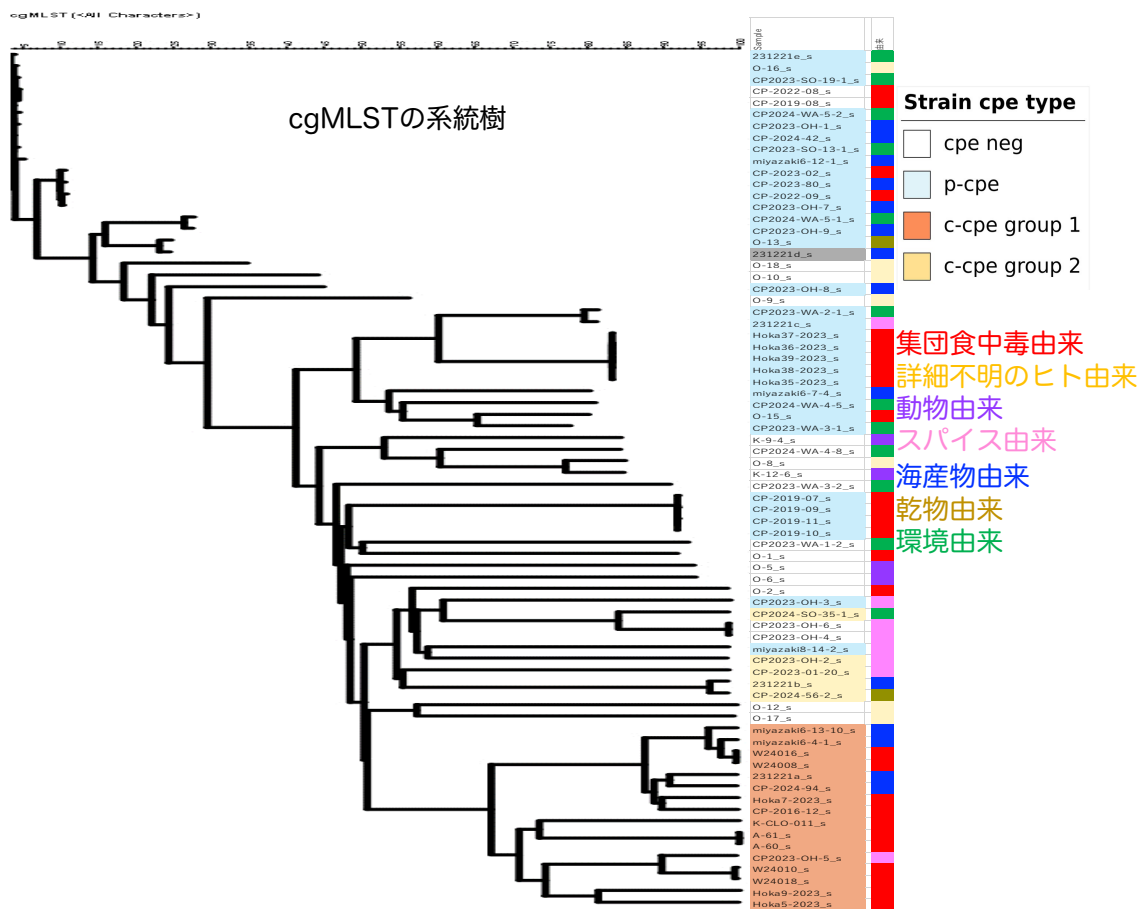


図1. ウエルシュ菌の cgMLST による系統樹 (maximum-likelihood phylogenetic tree) と *cpe* 遺伝子局在の解析

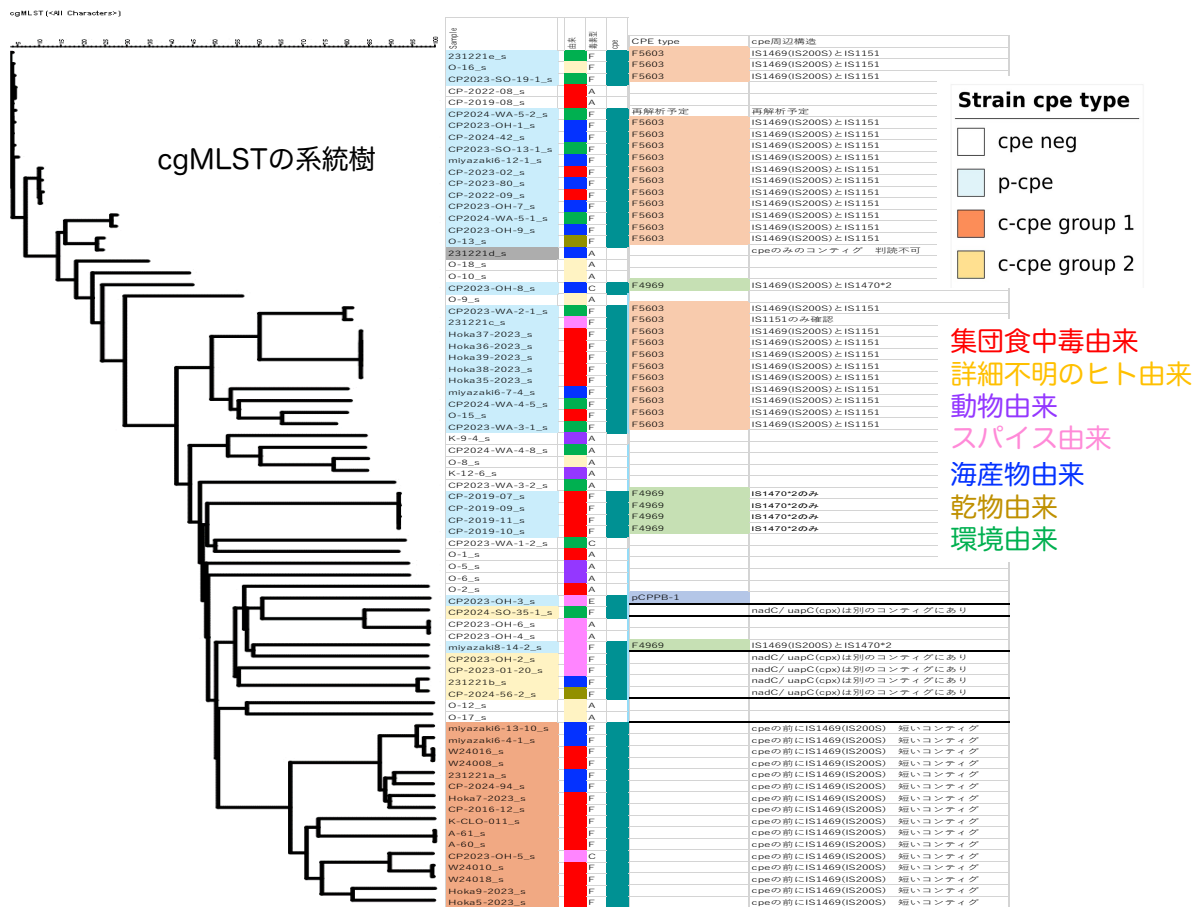


図2. ウエルシュ菌の cgMLST による系統樹と *cpe* 遺伝子局在の詳細な型別

事例	自治体	年	Sample	由来	菌株型	cpe	PfoA	Plc	NanH	NanI	NanJ	ColA	NagH	NagI	NagJ	NagK	NagL	CloSI	cpb	cpb2	iota a	iota b	Arc	FeoAB	SpIB	SigV	NaoX	Ssp4 (36)	Ssp4 (72)	原因食品	パターン
1	a	2022	CP-2022-08_s		A																										1
2	a	2019	CP-2019-08_s		A																			解析中							
3	a	2023	CP-2023-02_s		F																										2
4	a	2022	CP-2022-09_s		F																										2
5	a	2023	Hoka37-2023_s		F																										3
5	a	2023	Hoka36-2023_s		F																										3
5	a	2023	Hoka39-2023_s		F																										3
5	a	2023	Hoka38-2023_s		F																										3
5	a	2023	Hoka35-2023_s		F																										3
6	b	?	O-15_s		F																										3
7	a	2019	CP-2019-07_s		F																										4
7	a	2019	CP-2019-09_s		F																										4
7	a	2019	CP-2019-11_s		F																										4
7	a	2019	CP-2019-10_s		F																										4
8	b	2009	O-1_s		A																										5
9	b	2010	O-2_s		A																										6
10	c	?	W24016_s		F																									カレー	7
10	c	?	W24008_s		F																									カレー	7
11	a	2023	Hoka7-2023_s		F																										8
12	a	2016	CP-2016-12_s		F																										9
13	d	?	K-CLO-011_s		F																										10
14	e	2011	A-61_s		F																										11
15	e	2011	A-60_s		F																										11
10	c	?	W24010_s		F																									カレー	10
10	c	?	W24018_s		F																									カレー	10
11	a	2023	Hoka9-2023_s		F																										12
11	a	2023	Hoka5-2023_s		F																										12

図 4. 集団食中毒事例由来ウエルシュ菌 26 株の病原遺伝子および環境耐性因子

表 1. ウエルシュ菌の毒素型

毒素型	α 毒素	β 毒素	ϵ 毒素	ι 毒素	CPE	NetB	疾病
A	+						悪性水腫（ウシ），壊死性腸炎
B	+	+	+				壊死性腸炎（ヒツジ，ヤギ）
C	+	+			+/-		壊死性腸炎（ウシ）
D	+		+		+/-		壊死性腸炎（ヒツジ，ヤギ）
E	+			+	+/-		壊死性腸炎（子牛）
F	+				+		食中毒（ヒト）
G	+				+/-	+	壊死性腸炎（ニワトリ）

表 2. ウエルシュ菌の現行の型別法

型別法	概要	課題
血清型別	TW型 Hobbs型	TW型：東京都でのみ実施（持ち込み） Hobbs型：半数程度は型別不能
PFGE	パルスフィールドゲル電気泳動	煩雑、機器が終売
MLST	8種の遺伝子の 塩基配列データを使用	煩雑、解像度がPFGEに劣る
ゲノム 解析	全ゲノムで共通性があるコアゲノム を使用した方法や配列の多様性 （SNP）を活用した方法	装置も試薬も高価 外注では時間がかかる

