

## 2014年に沖縄県で発生したウエルシュ菌集団食中毒事例

高良武俊・岡野祥・新垣絵理・久場由真仁・加藤峰史・喜屋武向子・久高潤・  
稲葉千恵\*・上原えりな\*・仲宗根猛智\*・天久朝信\*

### The outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning in Okinawa prefecture (2014)

Taketoshi TAKARA, Sho OKANO, Eri ARAKAKI, Yumani KUBA, Takashi KATO, Hisako KYAN, Jun KUDAKA,  
Chie INABA, Erina UEHARA, Taketomo NAKASONE, Choshin AMEKU

**要旨：** 2014年12月、北部保健所管内Aホテルにおいてウエルシュ菌による集団食中毒事例が発生した。12月2日にAホテル内レストランにて提供された夕食を喫食した270名中152名が腹痛、下痢等の食中毒様症状を呈していた(平均潜伏時間11.6時間)。当所において有症者便、食品、原材料及び厨房施設の拭き取り検体について食中毒病因物質の検査を行ったところ、有症者便からウエルシュ菌エンテロトキシン(CPE)が検出され(5名中5名)、有症者便(28名中28名)と牛肉オイスター炒め(11検体中1検体)からCPE陽性A型ウエルシュ菌(血清型Hobbs型6)が分離された。パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行ったところ、有症者由来14株及び食品由来1株はすべて同一PFGEパターンを示したことから牛肉オイスター炒めを原因食品とする集団食中毒事例と推察された。保健所の調査により、大量調理後本食品の不適切な温度管理が原因で食品内で本菌が発症に必要な菌量まで増殖したと推測されたため、再現試験を行い食品中における本菌の増殖態度について調査を行った。調理後の保管庫での保管(70°C保温区)、常温保管(約26°C常温放置区)、喫食会場での湯煎(42°C保温区)を想定して再現試験を行ったところ、42°C保温区では、保温開始から菌数の増加が経時的にみられ、保温2時間後以降で急速な増加がみられ、3時間後には発症を起こすのに必要な菌量にまで達していた。本事例で提供された牛肉オイスター炒めは、加熱調理後喫食開始までの時間が3~4時間であったため、本事例においても調理後の保存条件が変化する過程で発育至適温度付近をゆっくり通過し、その時間帯で急速に菌が増殖したと推察された。

**Key words:** ウエルシュ菌, 集団食中毒事例, 牛肉オイスター炒め, 不適切な温度管理, 再現試験

## I はじめに

ウエルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は、芽胞を形成する嫌気性のグラム陽性大桿菌でヒトや動物の腸管や土壌等の自然環境に広く生息する。ヒトに対する病原性の主なものは下痢原性とガス壊疽起病性であり、下痢原性因子であるエンテロトキシンを産生するA型ウエルシュ菌は食中毒を惹起し、主として100°Cで1~6時間の加熱に耐える耐熱性芽胞を形成するため特有の感染機序を示す。本菌は、本菌で汚染された食品の加熱調理後の冷却とともに発芽し、食物中で急激に増殖する。本菌の発症に必要な菌量( $10^6\sim 10^7/g$ )にまで増殖した食品を喫食すると、腸管に達した本菌が芽胞を形成した際に放出するエンテロトキシンにより食中毒を引き起こす<sup>1)</sup>。

2014年12月に北部保健所管内Aホテルにおいてウエルシュ菌による集団食中毒が発生した。事例の概要、当所での検査状況及び推定原因食品である牛肉オイスター炒めを用いた再現試験を報告する。

## II 材料及び方法

### 1. 食中毒病因物質の検査

患者糞便28検体、食品検体11検体、原因食品の原材料3検体及び拭き取り検体10検体を供試した(表1)。ウエルシュ菌の分離法は食品衛生検査指針微生物編2004<sup>2)</sup>及び食品由来感染症と食品微生物<sup>3)</sup>を参照して行った。

(1) 糞便中のウエルシュ菌エンテロトキシン(CPE)の検出

有症者糞便5検体を生理食塩水に懸濁後、その遠心上清を試料液としてPET-RPLA「生研」(デンカ生研株式会社)を用いてエンテロトキシンの検出を行った。

(2) 糞便中のウエルシュ菌の分離・同定

糞便検体は生理食塩水に懸濁後、非加熱、100°C、10分又は、75°C、10分の加熱処理をし、直接培養はカナマイシン(KM)含有卵黄加CW寒天培地(日水製菓

\*沖縄県北部保健所

表1. 被検材料

種類	検体内訳	検体数	
患者糞便	宿泊客	26	
	従業員	2	
食品	パイ	1	
	チキンのトマトソース	1	
	春雨サラダ	1	
	ポタージュスープ	1	
	ご飯	1	
	魚フライ	1	
	グラタン	1	
	グリーンサラダ	1	
	牛肉オイスター炒め	1	
	キーマカレー	1	
	ペペロンチーノ	1	
	原材料	別ロットの牛肉	1
		別ロットのたけのこ缶詰	1
同ロットのオイスターソース		1	
拭き取り検体	野菜用まな板	1	
	魚用まな板	1	
	調理台	1	
	魚用包丁	1	
	仕込用冷蔵庫右内部	1	
	仕込用冷蔵庫左内部	1	
	トマトソース調理鍋	1	
	キーマソース調理鍋	1	
	調理従事者手指	1	
	中央シンクガラ	1	

株式会社)に塗抹し、37°Cで18時間嫌気培養した。増菌培養はTGC培地(日水製薬株式会社)を用いて行い、直接培養と同様に分離を行った。平板培地上でレンチナーゼ反応陽性及び乳糖分解性を呈したコロニーについて、ウエルシュ菌ホスホリパーゼC(*plc*)とウエルシュ菌エンテロトキシン(*cpe*)特異的マルチプレックスPCRを行った<sup>4,5,6</sup>。*plc*遺伝子及び*cpe*遺伝子陽性となったコロニーについて、耐熱性A型ウエルシュ菌免疫血清「生研」(デンカ生研株式会社)を用いて血清型別試験を行った。

(3) 各種細菌及びウイルス検査

患者が受診した医療機関では食中毒病因物質が分離・同定されていなかったため、当所に一番最初に搬入された糞便5検体についてはウエルシュ菌検査の他に各種細菌検査(下痢原性大腸菌, 赤痢菌, サルモネラ属菌, カンピロバクター属菌, 腸炎ビブリオ, コレラ菌, ナグビブリオ, エロモナス属菌, プレジオモナス・シゲロイデス, エルシニア・エンテロコリチカ, 黄色ブドウ球菌, セレウス菌)及びウイルス検査(ノロウイルスイムノクロマト法)を行った。

(4) 食品中のウエルシュ菌の分離・同定

食品検体は1%ペプトン加生理食塩水で10倍乳剤を作製した。ウエルシュ菌の分離は糞便中の分離と同様の方法で行った。

(5) 拭き取り検体のウエルシュ菌の分離・同定

ふきふきチェックII(栄研化学株式会社)で拭き取った拭き取り検体について糞便中の分離と同様の方法で行った。

(6) パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)

食品由来株1検体, 有症者由来株14検体についてPFGEを行った。菌株を変法GAMブイオン(日水製薬株式会社)で37°Cで一晩嫌気培養後, 1mlを12,000rpmで5分間遠心し, 上清除去後, 滅菌PBSで2回洗浄し, 200µlの超純水に懸濁した。等量の1%SeaKemGoldagarose(ロンザジャパン株式会社)を加え, プラグを作成した。10mg/mlLysozyme添加0.5MEDTA溶液で37°C, 4時間処理した。Lysozyme添加0.5MEDTA溶液を除き, 1mg/mlProteinaseK, 1%N-lauroylsarcosine添加0.5MEDTA溶液で50°C, 一晩処理した。4mMPefablocSC溶液でProteinaseKを不活化し, 制限酵素SmaIで25°C, 一晩処理した。PFGEはCHEFDR-IIIを用いて電圧6V/cm, InitialSwitchtime0.5s, FinalSwitchtime40s, IncludedAngle120°, 19.4時間の条件で泳動した。

3. ウエルシュ菌増殖態度試験

本事例にて有症者から分離されたウエルシュ菌を供試菌株とした。変法DS培地に接種し, 37°Cで24時間培養した。培養液を試験開始直前に75°Cで20分間加熱したものを菌芽胞液として供試した。菌添加区では, 調理前の牛肉に菌芽胞液を菌数が約10<sup>4</sup>/gとなるように添加し, 牛肉オイスター炒めを調理した(牛肉600g, 筍200g, オイスターソース)。菌無添加区では, 菌未接種の変法DS培地を同様に添加し, 調理した。保温庫での保管(70°C保温区), 調理場での常温保管(約26°C室温保温区), 喫食会場での湯煎(42°C保温区)を想定し, 経時的な菌数推移を測定した。調理後の食品はスチール製の容器に入れラップをかけ, 菌添加区では70°C, 42°C及び室温(約26°C)で, 菌無添加区では42°Cでそれぞれ5時間保温した。容器の底部にはあらかじめ温度データロガー(KNラボラトリーズ)を入れておき, 保温中の容器内温度を自動計測した。調理直後及び保温1, 2, 3, 4, 5時間後の各試験区の食品を25gずつ採取し, 1%ペプトン加生理食塩水を用いて10倍乳剤を作製し, それを生理食塩水で10<sup>8</sup>倍まで10倍希釈系列を作製した。次に各希釈水を3本のTGC培地に接種し, 37°Cで24時間嫌気培養後, 培地上のウエルシュ菌と推定されるコロニーをPCR法等で同定し, 確定試験陽性試験管数を最確数法(Most Probable Number: MPN)表に当てはめて, 食品中のウエルシュ菌の菌数(最確数法)を算定した。また,

牛肉に添加した菌芽胞数の菌数も同様に算定した。

### Ⅲ 結果及び考察

#### 1. 事例の概要

2014年12月に沖縄県内北部保健所管内のAホテルから「宿泊客約30名が腹痛を訴えている」旨の連絡が北部保健所にあり、同日B病院及びC病院より「腹痛、下痢等食中毒様の症状を訴えている患者を診察した」との届出があった。北部保健所が調査したところ、12月2日にAホテル内レストランにて提供された夕食を喫食した270名中152名が腹痛、下痢等食中毒様症状を呈していた(表2)。有症者の中には同様の夕食を喫食した当該レストランの従業員も含まれていた。2日の夕食後から4日の夕方にかけて発症し、平均潜伏時間は11.6時間であった。当所において有症者便のウエルシュ菌エンテロトキシン検出、糞便中のウエルシュ菌の分離、各種細菌及びウイルス検査、食品中のウエルシュ菌の分離、拭き取り検体中のウエルシュ菌の分離を行ったところ、有症者便からウエルシュ菌エンテロトキシンが検出され、糞便及び食品から同一血清型のCPE陽性A型ウエルシュ菌(血清型Hobbs型6)が分離された(表3)。当該施設は「有症者4名の糞便から同一血清型のウエルシュ菌が検出されたこと」、「有症者の共通食が当該施設で提供

した食品のみであること」、「検食より有症者と同一血清型のウエルシュ菌が検出されたこと」、「医師から食中毒患者届出表の提出があったこと」を理由に4日間の営業停止処分となった。

#### 2. 食中毒病因物質の検査

有症者便5検体中全てからウエルシュ菌エンテロトキシンが検出された。有症者便28検体中27検体、食品(検食)11検体中1検体(牛肉オイスター炒め)からCPE陽性A型ウエルシュ菌(血清型Hobbs型6)が分離された。陰性となった有症者便1検体について再検査を行ったところ、同様にCPE陽性A型ウエルシュ菌(血清型Hobbs型6)が分離され、有症者便28検体中28検体から分離された。原材料(オイスターソースは同一ロット、牛肉及び筍は別ロット)及び拭き取り検体からは分離されなかった(表3)。糞便5検体から各種細菌検査及びウイルス検査を行ったところ、1検体からエンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌が分離された。その他細菌、ノロウイルスは陰性であった。残り23名の糞便について黄色ブドウ球菌の分離を行ったところ、1名からエンテロトキシンB産生黄色ブドウ球菌が分離された。同種の黄色ブドウ球菌が複数の有症者から分離されなかったことから、これらの黄色ブドウ球菌は、本食中毒に関与していないと考えられた。

分離菌株15検体(食品1検体、有症者14検体)に

表2. 症状及び有症者数 (n = 152)

症状	有症者数 (名)	無症者数 (名)	発頭率 (%)
腹痛	142	10	93
下痢	137	15	90
頭痛	25	127	16
吐き気	17	135	11
悪寒	12	140	8
脱力感	12	140	8
あい気	11	141	7
倦怠感	11	141	7
発熱	5	147	3
嘔吐	4	148	3

表3. 検査結果 (-: 検査無し)

検体名	有症者検便中のウエルシュ菌 エンテロトキシン検出	ウエルシュ菌の分離	分離株の血清型
有症者便	ホールスタッフ2名	陽性	Hobbs型6
有症者便	宿泊客3名	陽性	Hobbs型6
有症者便	宿泊客23名	-	Hobbs型6
食品(検食)	2日の夕食10検体	-	-
食品(検食)	牛肉オイスター炒め	陽性	Hobbs型6
その他	原材料3検体	陰性	-
その他	拭き取り検体10検体	陰性	-

ついて PFGE (*Sma*I 処理) を実施したところ全て同一 PFGE パターンを示したことから (図 1), 牛肉オイスター炒めは本食中毒事例の原因食品であることが示唆された。東京都内で 1963~2006 年に発生したウェルシュ菌食中毒 85 事例の原因食品詳細によると, 食肉が関与した原因食品が多いという特徴が認められたとの報告がある<sup>3)</sup>。

### 3. ウェルシュ菌増殖態度試験

ウェルシュ菌による食中毒は, 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ていることが多いという特徴が認められたとの報告がある<sup>3)</sup>。また, 保健所の調査によると大量調理後不適切な温度管理が行われたことが推測されたため再現試験を行った。菌添加区の菌数推移を図 2 に示す。70°C 保温区では 5 時間後まで菌数の増加はみられなかった。室温放置区では, 2 時間後の菌数が調理直後に比べて 10 倍まで増加していたが, その後は横ばいに推移した。42°C 保温区では, 保温開始から菌数の増加が経時的にみられたが, 保温 2, 3, 4 及び 5 時間後の菌数は  $7.5 \times 10^4$  MPN/g,  $2.4 \times 10^7$  MPN/g,  $2.1 \times 10^8$  MPN/g 及び  $\geq 2.4 \times 10^9$  MPN/g と, 特に保温 2 時間以降で急速な増加がみられた。一方, 菌無

添加区では, 調理直後から保温 5 時間後の全検体において TGC 培地での菌発育はみられなかった。本試験において, 70°C 保温区は調理直後から保温 5 時間後まで常時 60°C 以上に維持されていたことから菌が増殖しなかったと思われた。室温放置区では, 保温 2 時間後まで菌数が増加していたものの, その後は横ばいに推移した。一方, 42°C 保温区では, 保温 2 時間後までは室温放置区と同様に緩やかな増加がみられたが, それ以降では急激な増加がみられ, 3 時間後ではすでに発症を起こすのに必要な菌量にまで達していた。北部保健所での調査では, 食中毒事例で提供された牛肉オイスター炒めは加熱調理後喫食開始までの時間が 3~4 時間で, 調理後にトレイに小分けされ, 常温放置→保温庫→湯煎という順で保存されていたが, 保温庫で確実に保温されていたかは不明とのことであった。本試験の結果から, 3~4 時間で本菌が発症に必要な菌量まで増殖するには, 食品の温度が発育至適温度付近で長時間維持されていたと推測される。本事例においても, 調理後の保存条件が変化する過程で発育至適温度付近をゆっくり通過し, その時間帯で急速に菌が増殖したと推測された。ウェルシュ菌による食中毒の原因食品としてはカレーやシチュー等の煮物料理が多い。

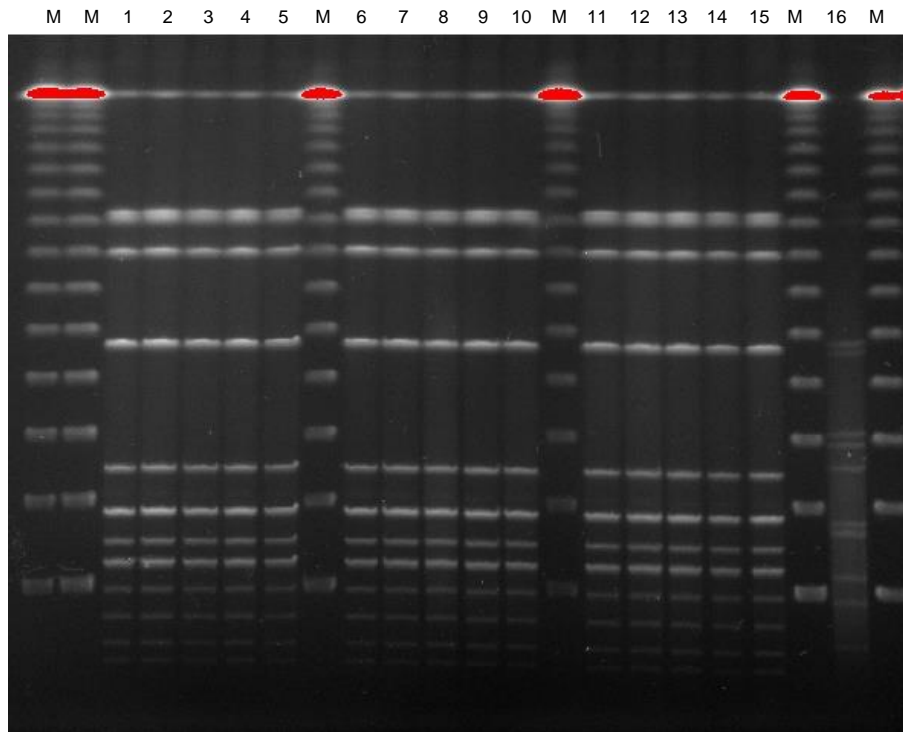


図 1. ウェルシュ菌分離株の PFGE 泳動像 (*Sma*I 処理)

M : DNA ladder marker (Lamda ladder marker)

レーン 1 : 牛肉オイスター炒め由来株

レーン 2, 3 : 従業員由来株

レーン 4~15 : 宿泊客由来株

レーン 16 : 別事例株

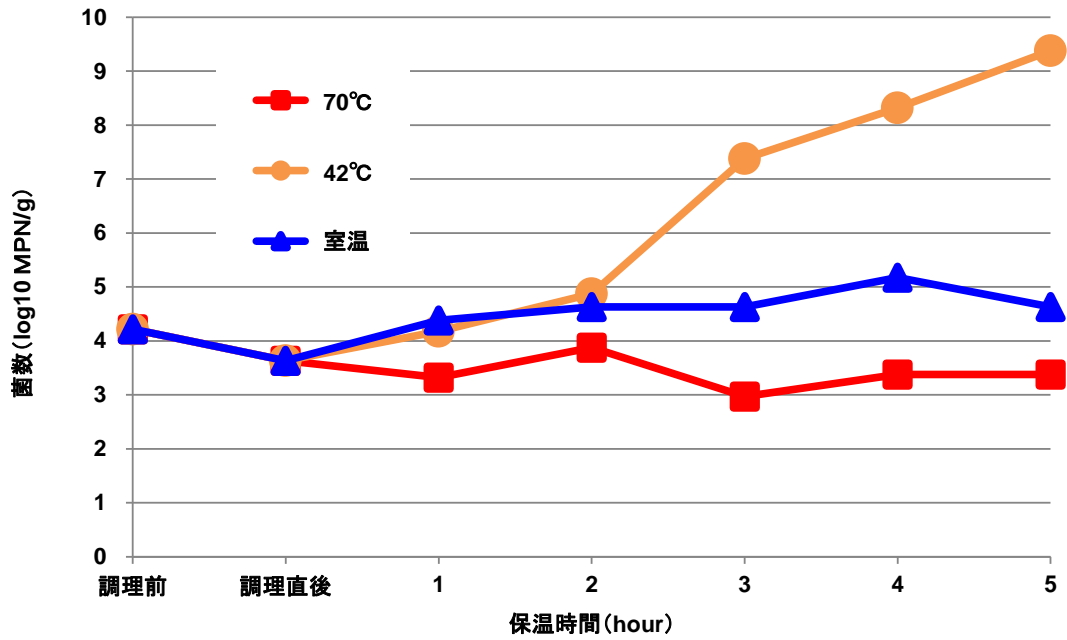


図2. 菌添加区の菌数推移

しかし、ウエルシュ菌は偏性嫌気性菌の中では比較的低い酸素濃度でも増殖できることや 20~50°C という広範囲の温度域で増殖できるため<sup>3)</sup>、今回の様な炒め料理であっても食中毒を起こすことを示している。また、再現試験の結果から大量調理でなくても増殖できることを示している。調理後は速やかに提供するか、40~50°C で保持しないように温蔵する。あるいは速やかに 10°C 以下まで冷却することが本菌の増殖を防ぐことが最も重要である。

<謝辞>

ウエルシュ菌のパルスフィールドゲル電気泳動法をご教授いただいた福岡市保健環境研究所の本田己喜子氏、重村久美子氏に心より感謝いたします。

V 参考文献

1) 小田紘 (2013) 偏性嫌気性菌. 戸田新細菌学, 379-399.

2) 植村興 (2004) 12 ウエルシュ菌. 食品衛生検査指針微生物編 2004, 297-306.

3) 門間千枝・伊藤武 (2009) *Clostridium perfringens*. 食品由来感染症と食品微生物, pp.391-400.

4) TSO JY and Siebel C (1989) Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Infect Immun.*, 57: 468-476.

5) Shahrabadi MS, Bryan LE, Gaffney D, Coderre SE, Gordon R and Pai CH (1984) Latex agglutination test for detection of *Clostridium difficile* toxin in stool samples. *J Clin Microbiol.*, 20: 339-341.

6) Fach P and Popoff MR (1997) Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl Environ Microbiol.*, 63: 4232-4236.