Hobbs 型 1~17 に一致しない耐熱性ウェルシュ菌 による食中毒例の細菌学的検索について

(昭和 45 年 5 月 11 日受理)

中 津 川 修 二* 浅 川 豊*

Isolation of New Serotype *Clostridium perfringens* from Two Outbreaks of Food Poisoning

Shūji NAKATSUGAWA and Yutaka ASAKAWA

(Shizuoka Public Health Laboratory : 3-68, Takajō-machi, Shizuoka)

The authors carried out epidemiological and bacteriological investigations on two outbreaks of food poisoning due to heat-resistant *C. perfringens* (not related to Hobbs types 1-17) occurred in Shizuoka prefecture, in October 1968 and October 1969.

Results obtained were as follows:

(1) In both outbreaks the symptoms, appearing 7-19 hr. after the patients had eaten the meal, were abdominal pain and diarrhoea with little vomiting. Pyrexia and headache were not recognized. The illness disappeared in a day or two.

(2) In outbreak 1, in a company in Shimizu city, the food suspected was a meat-dumpling (mixed minced chicken, egg yolk, starch and salt) cooked with soy sauce and sugar on the previous evening. A count of 3 million *C. perfringens* per gram was obtained from its remains. Heat-resistant strains were found in ten of the eleven samples of faeces from patients. The greater part of the strains isolated from food and faeces were not agglutinated by Hobbs types 1-17 antisera, and an antiserum was prepared against the strain (F7-2a) isolated from the meat-dumpling. This antiserum agglutinated 31/62 strains isolated from eight samples of faeces and two samples of food.

(3) In outbreak 2, in an office in Fujieda city, no food was available for examination. Faeces were collected from fifteen patients and heat-resistant *C. perfringens* were isolated from all samples. None of the strains isolated was agglutinated by Hobbs types 1-17 antisera, but 45/50 strains from fourteen samples of faeces were agglutinated by the antiserum prepared against the strain (F7-2a) isolated from the food in outbreak 1.

(Received May 11, 1970)

I. 緒 言

わが国におけるウェルシュ菌食中毒は、Yamagata ら¹⁾の報告以来、現在までにおよそ30余例の発生が数えられており、この数年、この種の菌の検索が進むにつれて増加してきたが、細菌性食中毒全般からみると、その例数はまだ限られている。著者らは、これまでに4例のウェルシュ菌食中毒に遭遇し、その一部についてはすでに報告²⁾した。一方、英国における食中毒³⁾についてみると、ウェルシュ菌による集団発生の占める割合はかなり高く、サルモネラについていることは注目される。

Hobbs ら⁴⁾のウェルシュ菌食中毒の報告以来、耐熱性A型菌の腸炎起病原性が注目されたが、わが国における事例も、そのほとんどが同種の菌によるものである。しかし、A型菌食中毒の発病機序については、まだはっきりしていない点が多く、菌側の性状でもまだ明確でない。Hall ら⁵⁾は、アメリカで食中毒から分離したウェルシュ菌の中には耐熱性のないものが多数含まれていると述べ、Sutton ら⁶⁾は易熱性菌による食中毒事例を報告し、また、Hauschild ら⁷⁾は人体実験で易熱性菌が食中毒症状を起こさせることを証明しているので、易熱性A型菌についてもさらに検討を要する。

* 静岡県衛生研究所：静岡市鷹匠町 3-68

A型ウェルシュ菌の血清学的分類については、Hobbsら^{4),6)}によって食中毒起病の耐熱性菌が17型まで報告されているが、わが国における食中毒事例⁶⁾も大部分はこのHobbs血清型に型別され、1, 5, 4, 6型などによるものが多く報告されている。

今回、著者らはHobbsの血清型1~17に型別不能の耐熱性菌による食中毒事例2件に遭遇し、そのいずれも同一の血清型によるものであったので、それらの細菌学的検索の概要について報告する。

II. 発生状況

1. 事例 1

昭和43年10月8日、静岡県清水市内のT事業所において、下痢、腹痛を主訴とする食中毒事件が発生した。患者は、いずれも前日の昼食に仕出し弁当を喫食しており、これが原因食品と考えられ、喫食者291名のうち、21名が発病した。潜伏時間は、最短8時間、最長19時間(平均12時間)であった。臨床症状は、下痢(95.2%)と腹痛(71.4%)が主症状で、発熱はなく、嘔吐(4.8%)がわずかにみられた。下痢の回数は1~4回(85.0%)が多く、最高8回であった。便の性状は、大部分が水様性で、一部は軟便であった。患者は一般に軽症で、1~2日で回復した。

仕出し弁当の内容は、赤飯、鯛の塩焼き、エビフライ、ようかん、きんとん、かまぼこ、肉だんご、その他で、後に述べる残存食品の検査結果より、肉だんごが原因食品と判明した。肉だんごは、鶏のひき肉1kgに、鶏卵の黄味3個分、少量の片栗粉と食塩を加え、よく煉ってから、だんご(約20g/個)をつくり、沸とうした湯の中に投じ5~6分ゆでてから、しょう油、味りん、砂糖を加え、約30分煮つめて作られた。調理後、約12時間室温に放置され、翌日喫食された。

2. 事例 2

昭和44年10月19日、静岡県藤枝市内のH事業所の職員57名が、山梨、長野県方面の団体旅行から帰宅後、その中の16名が腹痛、下痢を訴えて発病した。本事例では、残存食品が入手できず、原因食品は明確ではないので、潜伏時間は不明であるが、臨床症状は事例1とほぼ同様で、軽度の腹痛と下痢を主症状とし、発熱、悪感、嘔吐などの症状はほとんどみられなかった。下痢の回数は、3~5回がもっとも多く、最高9回であった。患者は比較的軽症に経過し、1~2日のうちに回復した。

III. 細菌学的検査

1. 事例 1

1) 検査材料

残存食品では、仕出し弁当2検体が、かなり完全な形で採取された。患者のふん便は、発病後2日目に6名より、3日目に7名より採取されたが、量の不足から、ウェルシュ菌については11名分を供試した。

2) 病原菌の検索状況

ウェルシュ菌は、食品2検体より直接培養で検出され、患者ふん便からは加熱処理培養で11名中10名より検出された。また、黄色ブドウ球菌が食品(肉だんご1検体より $2 \times 10^8/g$)と患者の一部(2/13)から検出されたが、検出状況および患者の臨床症状などよりみて本事例とは無関係と考えられた。腸炎ビブリオをはじめ、その他の既知病原菌はまったく検出されなかった。

3) ウェルシュ菌の検出状況

食品検査では、食品別に滅菌生理的食塩水で5倍乳剤をつくり、その1白金耳をZeissler培地に塗まつし、37°で嫌気培養する方法と、TGC培地に約1gを接種し、46°で24時間増菌培養した後、その1白金耳をZeissler培地に移植、37°で嫌気培養する方法を行なった。その結果、直接培養では、肉だんご2検体より平板培地上に無数のウェルシュ菌コロニーが検出された。そこでさらに定量培養したところ、g当りの菌数は約 3×10^8 であった。増菌培養では、肉だんごのほか、ようかん、かまぼこ、鯛の塩焼き、エビフライなどからも検出されたが、検出状況よりみて肉だんごとの接触による汚染と考えられた。

ふん便の検査では、約1gをTGC培地にけん濁し、100°で60分間加熱後、37°で24~48時間増菌培養し、その1白金耳をZeissler培地に移植し嫌気培養したところ、11名中10名(90.9%)よりウェルシュ菌が検出された。

4) 分離ウェルシュ菌の血清学的性状

食品と患者より高率に検出された分離株についてHobbs型(1~17型)の型別を行なったが、一部に2型、13型がみられたのみで、大部分の菌株は型別されなかった。そこで、型別不能株について同一菌型であるか否かを確認するため、食品由来株より2株(F7-1a, F7-2a)、患者由来株より2株(K10-1, K13-1)の代表株を選び、ホルマリン死菌によるウサギ免疫血清をつくり、交差凝集反応を行なった。Table 1に示すように、凝集

Table 1. Serological Relationship among 2 Strains from Patients, 2 Strains from Foods, and Hobbs Type Strains

Antigens	Antisera				Source of strain
	F7-1a	F7-2a	K10-1	K13-1	
F7-1a	640*	<40	<40	<40	Food
F7-2a	<40	640	320	320	Food
K10-1	<40	640	320	320	Faeces
K13-1	<40	640	320	320	Faeces
Hobbs types 1-17		<40	<40	<40	NCTC

* Titre of agglutination

Table 2. Serotype of *C. perfringens* Strains Isolated from Outbreak 1

Sample designation and source	No. of strains tested	Hobbs type		Untypable		
		2	13	F7-1a	F7-2a	Others
F7-1(food)	11	1		8	1	1
F7-2(food)	11				6	5
K1 (faeces)	3					3
K3 (faeces)	3				3	
K5 (faeces)	0					
K6 (faeces)	3				3	
K7 (faeces)	3				3	
K8 (faeces)	3				1	2
K9 (faeces)	3	2				1
K10(faeces)	3				3	
K11(faeces)	4		1		3	
K12(faeces)	12	2		4	6	
K13(faeces)	3				2	1

価よりみると食品由来の1株(F7-2a)と、患者由来の2株(K10-1, K13-1)は一致したが、ほかの1株は異なった。また、Hobbs 血清型1~17についても定量凝集反応を行なって検討したが一致しなかった。そこで、食品由来2株(F7-1a, F7-2a)の免疫血清を用いて、食品および患者由来のほかの菌株(1検体につき食品では11株、患者では3株程度を供試した)について、主としてスライド凝集反応によって型別を行なった。その結果はTable 2に示すように、食品由来(肉だんごより直接分離)の22株中7株(2検体中2検体)と、患者由来の40株中24株(10名中8名)がF7-2a株に一致した。また、食品由来の8株(1検体)と、患者由来の4株(1名)は、F7-1a株に一致した。

以上の検出状況よりすると、食品および患者の72.7%(11名中8名)より検出されたF7-2a株に一致した分離菌が、本事例の主因菌と考えられた。最近、坂井ら⁹⁾は正常人由来のHobbs 型別不能の耐熱性ウェルシュ菌について検討し、それらを1~56の血清型(TW)に分類している。そこで、F7-2a株に一致した分離株9株

Table 3. Viable Cell Counts and Serotype of *C. perfringens* in Faeces of Patients Associated with Outbreak 2

Isolation Sample no.	Heated to 100°C for 60 min.			Unheated	
	Enrichment culture	Direct culture		Direct culture	
	F7-2a* ¹ /Strains* ²	V.C.C.* ³ /g	F7-2a /Strains	V.C.C.* ⁴ /Loop	E7-2a /Strains
1 (2 days)* ⁵	5/5	48×10 ⁵	5/5	35	5/5
2 (2 days)	5/5			70	5/5
3 (2 days)	5/5			150	5/5
4 (2 days)	5/5	86×10 ⁵	5/5	卅	4/5
5 (2 days)	0/5			卅	0/10
6 (2 days)	5/5	26×10 ⁵	5/5	150	3/10
7 (2 days)	5/5	27×10 ⁵	5/5	6	5/5
8 (2 days)	5/5			卅	5/5
9 (5 days)	5/5	15×10 ⁸	5/5	10	1/10
10 (5 days)	5/5			—	
11 (5 days)	5/5	7×10 ⁸	5/5	卅	0/10
12 (5 days)	5/5	18×10 ²	5/5	—	
13 (5 days)	5/5	54×10 ⁸	5/5	5	1/5
14 (5 days)	5/5	11×10 ²	5/5	—	
15 (5 days)	5/5	13×10 ²	0/5	300	0/10

*¹ Number of strains agglutinated by the antiserum prepared against the strain (F7-2a) from the food in outbreak 1.

*² Number of strains tested for serotyping.

*³ V.C.C.=Viable cell counts.

*⁴ Symbol: 卅 many colonies observed.

*⁵ Days of specimen collection after the onset of symptoms.

Table 4. Biological and Biochemical Characters of Isolated Strains

Case	Strains		Motility	Milk	Gelatin liquefaction	Indol	Proteolysis	Opalescence inhibition by <i>C. perfringens</i> α -antitoxin	Resistance to 100°C for 60 min.	Glucose	Lactose	Sucrose	Mannitol	Dulcitol
	Sample	No. of strains tested												
Outbreak 1	Foods	7	—	st	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—
Outbreak 1	Faeces	24	—	st	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—
Outbreak 2	Faeces	14	—	st	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—

st: Stormy fermentation

(食品由来1株, 患者由来加熱分離6株, 同非加熱分離2株)について, 坂井博士のところで TW 血清型との関連を検討したところ, すべて TW 6 型であった。

5) 分離ウェルシュ菌の生物学的性状

血清型が F7-2a 株に一致した分離株31株について生物学的性状をしらべたところ, Table 4 に示すごとく, すべて A 型ウェルシュ菌の性状を有し, 分離当初 100° 60分の耐熱性であった。なお, 耐熱性試験は, cooked meat broth および Kim ら¹⁰⁾ の培地を用いて行なった。

2. 事例 2

1) 検査材料

患者ふん便は, 発病後2日目に8名, 5日目に7名より採取された。食品は県外で起きた事件でもあり入手できなかった。

2) 病原菌の検索状況

ウェルシュ菌は加熱処理培養で, 15名中15名(100.0%)より検出された。また, 1名より病原大腸菌(0-126)が検出されたが, 発生状況より本中毒とは直接関係ないものと考えられ, その他の既知病原菌は検出されなかった。

3) ウェルシュ菌の検出状況

患者ふん便の約 1g を TGC 培地にけん濁し, 100° で60分間加熱後, 37° で24~48時間増菌培養し, その1白金耳を Zeissler 培地に移植, 嫌気培養したところ, 15名中15名よりウェルシュ菌が検出された。一部の便については, 加熱処理後直ちにペプトン水で階段希釈し, その 0.1 ml ずつを Zeissler 培地に塗布 37° で培養し, g 当りの耐熱性菌数を測定したところ, 2病日の便より 10⁶台, 5病日の便より 10³~10⁴のウェルシュ菌が検出された。また, 非加熱のふん便の1白金耳を 100 µg/ml KM 加 Zeissler 培地に塗まつし嫌気培養したところ, 15名中12名よりウェルシュ菌が検出された。以上の検出状況は, まとめて Table 3 に示した。

4) 分離ウェルシュ菌の血清学的ならびに生物学的性状

患者より加熱処理増菌培養で高率に検出された分離株(1名につき5株供試した)について, Hobbs の型別を行なったが, 1~17型までに型別されるものはなかった。そこで, 当所において過去に作製した Hobbs 型別不能の耐熱性ウェルシュ菌の免疫血清数種類を用いて型別を試みたところ, Table 3 に示すように, 75株(15名)中70株(14名)が事例1であげた F7-2a 株の血清型に一致した。また, 加熱処理後直接培養して分離した50株(10名)中45株(9名)と, 非加熱直接培養による分離株85株(12名)中34株(9名)も同じ血清型(F7-2a)であった。

以上のごとく, 事例2では患者15名中14名(93.3%)より同じ血清型(事例1の原因菌型と同じ)の耐熱性ウェルシュ菌が検出され, これが主因菌と考えられた。なお, これら分離株の生物学的性状は, Table 4 に示すごとく, A型ウェルシュ菌の性状を有し, 分離当初100° 60分の再耐熱性を示した。

IV. 考察

今回, 著者らは Hobbs の血清型に型別できない新型の耐熱性菌による食中毒2事例に遭遇し, その検索の概要について述べた。A型ウェルシュ菌の食中毒起病原性の本質については, まだ不明な点が多く, 菌側の性状も明確でないが, これまでの食中毒例よりすると, 100° の耐熱性を有し, 毒素原性の非常に弱い菌株に由来する場合が多い。これら菌の芽胞が, 調理時の加熱に抵抗して生残し, その後発芽増殖した食品の喫食が発症につながっている。これらの食中毒菌と正常人が高率に保菌している耐熱性菌との間には, 既知の性状に差異が認められないので, はたして耐熱性菌は, すべて起病原性をもつか, また Hobbs 型菌のみが特異性を有するのか, などの疑問が残るが, これらは未解決の問題である。一方, Hobbs の血清型も, 従来の1~13型に, 最近さらに14~17型⁹⁾が追加されたが, 今後の検索の進展に伴い, 今回の著者らの報告のごとき諸事例を加えて, さらに広い型に拡大されるであろう。坂井ら⁹⁾は, 正常人の腸管内常在耐熱性ウェルシュ菌の中, Hobbs 型別不能株に

ついて血清学的に TW 1~56 型に分類し、その起病原性との関連の検討を進めているが、今回の 2 事例の原因菌型が TW 6 に一致したことは興味深い。

つぎに、食中毒の検査法について考えてみると、起病原性のウェルシュ菌の性状が明確でなく、Hobbs 型別不能菌や易熱性菌^{9)~11)}によっても食中毒の起こる可能性のある現況では、従来の Hobbs 型耐熱性菌一辺倒の検査法から進んで、もっと幅広い検索が行なわれる必要であろう。著者らは、事例 2 において患者ふん便中の原因菌型の分布について若干の検討をしたが、とくにふん便の検査では、発症早期のふん便について検査することが望ましいことはもちろんであるが、培養法でも加熱処理ならびに非加熱の直接培養が実施され定量的な検討がなされることが望ましいと考える。

V. 結 語

昭和43年10月8日(事例1)および昭和44年10月19日(事例2)に、静岡県下で発生した集団下痢症について細菌学的検索を行なった結果、2例とも同一の血清型(Hobbs 型別不能)の耐熱性ウェルシュ菌によるものと判定したが、それについてまとめてみるとつぎのごとくである。

- 1) 事例1の原因食品は仕出し弁当で、そのうち前日に加熱調理された肉だんごが感染源と考えられた。肉だんごからは、約 $10^6/g$ の原因菌が検出された。事例2では残存食品が得られず、原因食品は不明であった。
- 2) 事例1では患者11名中10名、事例2では15名中15名より耐熱菌が検出され、その大部分が原因菌型であった。
- 3) 原因菌の生物学的性状はA型ウェルシュ菌に一致し、 100° の耐熱性を有するが、その血清型は Hobbs 型と異なる新型であった。

4) 患者ふん便中の原因菌の分布について、事例2において若干検討したが、ふん便の培養には加熱処理増菌培養と共に、直接培養の実施が望ましいと考える。

終わりに、本研究の実施に当って Hobbs 型標準株(14~17)を分与され、また TW 血清型の検討をいただいた東京都立衛生研究所坂井千三室長、伊藤武技師に深謝の意を表します。また、御校閲を賜った当所野口所長に深謝します。

本報の要旨は、第27回日本公衆衛生学会総会(1969. 10. 29. 岡山)において発表した。

文 献

- 1) H. Yamagata, Y. Iwafune, et al.: Jap. J. Microbiol. **3**, 365 (1959).
- 2) 浅川 豊, 中津川修二: 食衛誌. **7**, 266 (1966).
- 3) B. C. Hobbs: "Food poisoning and food hygiene" 2nd. Ed. p. 26 (1968), Edward Arnold Ltd. London.
- 4) B. C. Hobbs, M. E. Smith, et al.: J. Hyg. **51**, 75 (1953).
- 5) H. E. Hall, R. Angelotti, et al.: J. Bacteriol. **85**, 1094 (1963).
- 6) R. G. A. Sutton, B. C. Hobbs: J. Hyg. **66**, 135 (1965).
- 7) A. H. W. Hauschild, F. S. Thatcher: J. Fd. Sci. **32**, 467 (1967).
- 8) 小酒井 望, 鈴木祥一郎編: "嫌気性菌と嫌気性菌症" p. 237 (1968) 医学書院.
- 9) 坂井千三: 第42回日本細菌学会総会シンポジウム(1), 徳島(1969).
- 10) C. H. Kim, R. Cheney, et al.: Appl. Microbiol. **15**, 871 (1967).