

## セレウス菌およびウエルシュ菌が同時に分離された 集団食中毒の分子疫学解析

榎本美貴<sup>1\*</sup> 西海弘城<sup>1</sup> 辻 英高<sup>1</sup> 坪谷嘉子<sup>2</sup> 稲田幸司郎<sup>2</sup> 山岡政興<sup>1</sup>

### Molecular epidemiological analysis of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* isolated simultaneously in a food poisoning outbreak

Miki ENOMOTO<sup>1\*</sup>, Hiroki NISHIUMI<sup>1</sup>, Hidetaka TSUJI<sup>1</sup>, Yoshiko TSUBOTANI<sup>2</sup>, Koushirou INADA<sup>2</sup>  
and Masaoki YAMAOKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*  
and <sup>2</sup> *Nishinomiya City Public Health Center*

Food poisoning occurred at the meeting held in Nishinomiya City in July 2005. About 500 of 565 participants ate the same lunch. A total of 108 patients developed symptoms such as diarrhea and abdominal pain. The median incubation period was 11.5 hours. *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* were isolated from patients' stool specimens and *B.cereus* was also isolated from leftover lunch and stool specimens from two cooks. In view of toxin and the PFGE pattern, *B.cereus* could not be proven to be the cause of this case. But it seemed reasonable to regard *C.perfringens* as the causative agent of this outbreak because *C.perfringens* type A strains carrying chromosomal enterotoxin gene were isolated from 6 (55%) of 11 patients and showed all the same PFGE pattern.

#### I はじめに

2005年7月に西宮市で開催された集会で食中毒が発生し、108名が下痢、腹痛等の症状を呈した。弁当材料からセレウス菌 *Bacillus cereus* が検出され、有症者の糞便からは主にセレウス菌とウエルシュ菌 *Clostridium perfringens* が検出された。

セレウス菌はバチルス属に属する好気性の芽胞形成桿菌で、土壌をはじめ河川水等の自然環境、食料、飼料等に広く分布し、人や家畜の消化管内にも存在する。セレウス菌食中毒は、症状により嘔吐型と下痢型の2つのタイプに分けられる。嘔吐型は食品内

で菌が増殖する際に産生された嘔吐毒によって発症する食物内毒素型食中毒であり、潜伏時間は1～5時間で嘔吐を主徴とする。一方、下痢型は食品内で増殖した菌が摂食され、腸管内で増殖する際に産生された下痢毒によって起こる生体内毒素型食中毒である。潜伏時間は8～16時間と長く、水様性下痢、腹痛が主症状である<sup>1)</sup>。

ウエルシュ菌は、クロストリジウム属に属する偏性嫌気性の桿菌で芽胞を形成する。ヒトや動物の腸管内、土壌、下水、塵埃など自然界に広く常在する。ウエルシュ菌は $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 毒素の産生能によって、AからE型菌までの5型に分類される。食中毒原因菌の大部分は $\alpha$ 毒素のみを産生するA型に属する。ウエルシュ菌食中毒の起因为物質は、菌が腸管に達し芽胞を形成する時に産生するエンテロトキシンである。ウエルシュ菌食中毒は、菌の摂取によって発症する生体内毒素型食中毒に分類され、潜伏時間

<sup>1</sup> 感染症部 <sup>2</sup> 西宮市保健所

\* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29  
兵庫県立健康環境科学研究所  
感染症部 榎本美貴

は 8 ~ 24 時間, 主症状は下痢と腹痛であり, 下痢型のセレウス菌食中毒と類似している<sup>2) 3)</sup>.

セレウス菌およびウエルシュ菌は自然環境から頻りに検出されるため, 食中毒事例において原因菌として特定するためには, 症状および疫学事項を考慮し, 原因食品や患者糞便から分離された菌株の毒素産生能やパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 等による遺伝子型の一致を認めることが必要である.

そこで今回検出されたこれらの菌が食中毒に関与したのかを明らかにするため, それぞれの菌株について, 主に毒素産生性と PFGE による遺伝子解析を行ったのでその結果について報告する.

## II 材料と方法

### 1. 事例概要

2005 年 7 月, 西宮市で開催された集会で食中毒が発生した. この集会には近畿 2 府 4 県から 565 名が参加し, 昼食に 500 食の幕の内弁当が用意された. 症状のあった者は 108 名で, 共通して喫食した食品は幕の内弁当のみであった. 患者の主症状は下痢 105 名 (97.2%), 腹痛 70 名 (64.8%) で, 嘔気, 嘔吐 18 名 (16.7%) も認められた (Fig.1). 平均潜伏時間は 11.5 時間であり, 患者の半数以上が喫食後 12 時間以内に発症していた.

### 2. 使用した菌株の由来

西宮市保健所では, 弁当材料, 冷蔵庫内や調理器具等のふき取り, 弁当を提供した飲食店の調理従事者の糞便, 有症者の糞便について, 食品衛生検査指針<sup>3)</sup>に従い食中毒起因菌の検査を行った. 弁当材料については, 一般細菌数と食中毒起因菌を疑う菌の菌数についても検査した. ただし, 酢の物は検体量不足のため一般細菌数の検査はできなかった. また, 他市在住の有症者の糞便検査は患者の住所地を管轄する保健所等が行った. 検査に使用した菌株は, 我々が検出したものと同機関から分与されたものを使用した.

### 3. 黄色ブドウ球菌および大腸菌の病原因子の検出

黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンの検出には, 逆受身ラテックス凝集反応による検査キット SET-RPLA (デンカ生研) を使用した. 大腸菌のペロ毒素の検出は, 逆受身ラテックス凝集反応による検査キット VTEC-RPLA (デンカ生研) と PCR 法で行った.

### 4. ウエルシュ菌の血清型別試験

耐熱性 A 型ウエルシュ菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて Hobbs 型別試験を行った.

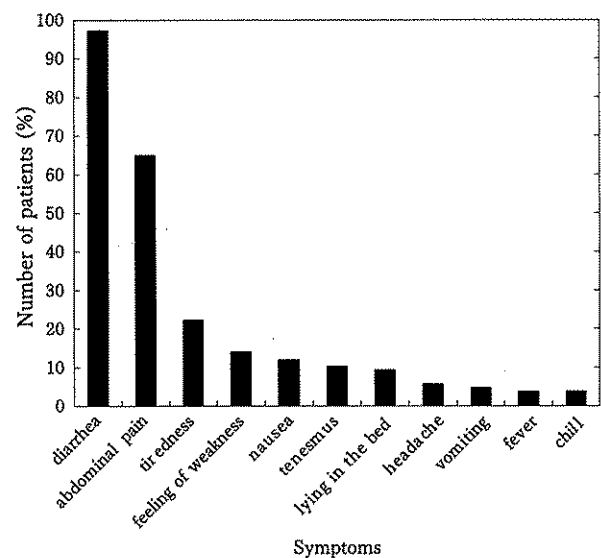


Fig.1 Patients' symptoms

### 5. PCR 法によるセレウス菌およびウエルシュ菌の毒素遺伝子検出およびセレウス菌エンテロトキシンの免疫学的検出

検査材料から分離されたセレウス菌について, 嘔吐毒であるセレウリド合成遺伝子及び, 下痢毒である NHE (non hemolytic enterotoxin) と HBL (hemolysin BL) の産生遺伝子 *nhe* (A, B および C) と *hbl* (A, C および D) の有無を PCR 法で調べた. 遺伝子の検出に使用したプライマーを Table 1 に示した.

ウエルシュ菌の主要毒素 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$  毒素) は Table 2 に示すプライマーを用いて, PCR 法で増幅した. エンテロトキシン産生遺伝子は市販のプライマー (Takara) を用いて, PCR 法で増幅した. エンテロトキシン産生遺伝子が検出された菌株については, Table 2 に示すプライマーを用いて, PCR 法により, 遺伝子が染色体上, あるいはプラスミド上にコードされているかを調べた. 反応液は, (1 ×) Ex-Taq buffer, 200  $\mu$ M dNTP Mixture, 5  $\mu$ M 5' および 3' プライマー, 0.625U Ex-Taq となるように調整し, これに DNA 試料液を 2.5  $\mu$ L 加え, 全量を 25  $\mu$ L とした. 目的遺伝子の増幅はエチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲル電気泳動で確認した.

セレウス菌のエンテロトキシンの検出には, 逆受身ラテックス凝集反応による検査キット CRET-RPLA (デンカ生研) を使用した.

### 6. PFGE による染色体切断パターンの解析

セレウス菌は LB 培地で一晚振盪培養したもの, ウエルシュ菌は TGC 培地で一晚静置培養したものを集菌し, 滅菌蒸留水で洗浄した. その後, 滅菌蒸留水に再懸濁し, 等量の 1% 低融点アガロースと混合して, プラグモールドに注入・固化し, ゲルブロックを作製

Table 1 PCR primers for *B.cereus* used in this work

Target Gene	Name	Primer Sequence(5' →3')	PCR product (bp)	Reference
<i>cereulid</i>	CesF1	GGT GAC ACA TTA TCA TAT AAG GTG	1271	4
	CesR2	GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AAC A		
<i>nheA</i>	nheA 344 S	TAC GCT AAG GAG GGG CA	500	5
	nheA 843 A	GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT		
<i>nheB</i>	nheB 1500 S	CTA TCA GCA CTT ATG GCA G	770	5
	nheB 2269 A	ACT CCT AGC GGT GTT CC		
<i>nheC</i>	nheC 2820 S	CGG TAG TGA TTG CTG GG	582	5
	nheC 3401 A	CAG CAT TCG TAC TTG CCA A		
<i>hbla</i>	HBLA-N	GCT AAT GTA GTT TCA CCT AGC AAC	873	6
	HBLA-C	AAT CAT GCC ACT GCG TGG ACA TAT AA		
<i>hb1C</i>	HBLC-N	AAT AGG TAC AGA TGG AAC AGG	399	6
	HBLC-C	GGC TTT CAT CAG GTC ATA CTC		
<i>hb1D</i>	HBLD-N	AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT	439	6
	HBLD-C	CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT		

Table 2 PCR primers for *C.perfringens* used in this work

Target Gene	Name	Primer Sequence(5' →3')	PCR product(bp)	Reference
$\alpha$ toxin	CPA Forward	GTT GAT AGC GCA GGA CAT GTT AAG	402	7
	CPA Reverse	CAT GTA GTC ATC TGT TCC AGC ATC		
$\beta$ toxin	CPB Forward	ACT ATA CAG ACA GAT CAT TCA ACC	236	7
	CPB Reverse	TTA GGA GCA GTT AGA ACT ACA GAC		
$\epsilon$ toxin	CPE Forward	ACT GCA ACT ACT ACT CAT ACT GTG	541	7
	CPE Reverse	CTG GTG CCT TAA TAG AAA GAC TCC		
$\iota$ toxin	CPI Forward	GCG ATG AAA AGC CTA CAC CAC TAC	317	7
	CPI Reverse	GGT ATA TCC TCC ACG CAT ATA GTC		
plasmid-borne <i>cpe</i>	MET-1.5F	CTC AGA GTT AGG AGC TAG CCC AAC CC	3300	8
	CPE-up	CCT AAT ATC CAA CCA TCT CC		
chromosomal <i>cpe</i>	CPE-4.5F	CAG TCC TTA GGT GAT GGA	2100	8
	IS1470F	AAC TAA ATA GGC CTA TAA ATA CC		

した。ブロックは1mg/mL リゾチームと3U/ $\mu$ L ムタノリシンを含む溶菌液に入れ、37°Cで20時間保温した。次にProteinaseK溶液(1% N-Laurylsarcosine, 1mg/mL ProteinaseK, 0.5M EDTA, pH8.0)に入れ替え、50°Cで一晩保温し、蛋白を分解した。溶菌後、1mg/mLのPefablocSCで同酵素を不活化し、制限酵素 *Sma* IでDNAを切断し<sup>9) 10)</sup>、電気泳動を行った。泳動はGene Path Strain Typing System(日本バイオ・ラッド)を用い、泳動条件は、0.5 × TBE buffer, 電圧6V/cm, パルスタイム5.3 ~ 34.9秒, 泳動時間20時間で行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、切断パターンを比較した。

Table 3 Isolation of *B.cereus* and *C.perfringens* from samples

Source	Number of samples	<i>B.cereus</i> (%)	<i>C.perfringens</i> (%)
food	13	12 (92.3)	0 (0.0)
swab	15	1 (6.7)	0 (0.0)
feces from cooks	10	2 (20.0)	0 (0.0)
feces from patients	52 <sup>1)</sup>	11 <sup>2)</sup> (21.2)	13 <sup>3)</sup> (25.0)

1) inspected in 15 laboratories

2) isolated in 6 laboratories

3) isolated in 6 laboratories

### III 結果

#### 1. 検査材料からの菌の検出

弁当食材の一般細菌数は  $1.5 \times 10^5 \sim 6.6 \times 10^8$  CFU/gであった。セレウス菌は検査した弁当材料の中で酢の物を除くすべての食材から検出され、菌数は  $10^2$  CFU/g 以下から  $1.1 \times 10^7$  CFU/gであった。また、冷蔵庫内部の棚のふき取りからもセレウス菌が検出された。調理従事者は、集会の参加者と同じ弁当を食べており、2人からセレウス菌が分離されたが、2人とも無症状であった。有症者糞便52検体からセレウス菌は11件、ウエルシュ菌は13件分離された。セレウス菌とウエルシュ菌の両方が検出された有症者糞便は5検体あった。ウエルシュ菌は弁当材料、ふき取り、調理従事者の糞便からは分離されなかった (Table 3)。他の食中毒起因菌として有症者糞便から黄色ブドウ球菌が2件、大腸菌が2件検出されたが、これらの菌株はいずれも食中毒の原因となる病原因子を保有していなかった。

#### 2. セレウス菌の毒素産生性

供試したセレウス菌は30菌株であるが、このうち弁当材料からの16株は12食材から分離されたもので、有症者糞便のうちb機関からの5株は1検体から検出されたものである。毒素遺伝子の検出およびエンテロトキシン産生の結果をTable 4に示した。

セレウス菌30株のうち、21株からセレウリド合

成遺伝子が検出された。その内訳は食材由来14株、ふきとり由来1株、調理従事者由来2株および患者由来4株だった。この菌株が検出された有症者の中で、嘔気、嘔吐の症状を呈したものはなかった。

3種類のNHE関連遺伝子すべてが、弁当材料由来15株、冷蔵庫ふき取り由来1株、調理従事者由来2株、患者由来9株から検出された。弁当材料の1株および患者由来株2株からは3種類のNHE関連遺伝子のうちのいずれかしか検出されなかった。

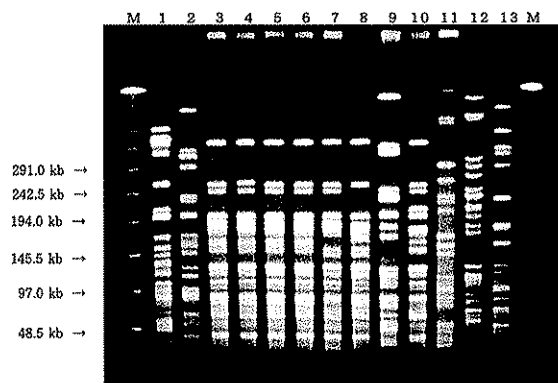


Fig.2 PFGE patterns of *Sma* I - digested genomic DNA of *B. cereus* isolates.

lane 1 : pattern B-1, lane 2 : pattern B-2, lane 3 ~ 6 : pattern B-3, lane 7 : pattern B-4, lane 8 : pattern B-5, lane 9 : pattern B-6, lane 10 : pattern B-7, lane 11 : pattern B-8, lane 12 : pattern B-9, lane 13 : ATCC 14579, lane M :  $\lambda$  ladder size marker (Cambrex Bio Science). The origin of isolates is as following, lane 1 ~ 3 : food, lane 4 : a swab, lane 5 ~ 6 : cooks' feces, lane 7 ~ 12 : patients' feces

Table 4 Characteristics of *B.cereus* strains isolated from samples

Source	Number of isolates	Laboratory	emetic toxin (celeulid)	Toxin <sup>1)</sup>						PFGE pattern	
				enterotoxin			CRET-RPLA <sup>2)</sup> (test kit)				
				NHE complex			HBL complex				
	<i>nhe</i> <sub>A</sub>	<i>nhe</i> <sub>B</sub>	<i>nhe</i> <sub>C</sub>	<i>hbl</i> <sub>A</sub>	<i>hbl</i> <sub>C</sub>	<i>hbl</i> <sub>D</sub>					
food	1 <sup>3)</sup>	a	-	+	+	+	+	+	+	128	B-1
	1 <sup>3)</sup>	a	-	-	+	-	-	+	+	4	B-2
	14 <sup>3)</sup>	a	+	+	+	+	-	-	-	0	B-3
a swab of a refrigerator's shell	1	a	+	+	+	+	-	-	-	0	B-3
feces from cooks	2	a	+	+	+	+	-	-	-	0	B-3
	1	a	-	+	+	+	-	-	-	0	B-4
feces from patients <sup>4)</sup>	3 <sup>5)</sup>	b	+	+	+	+	-	-	-	0	B-5
	2 <sup>5)</sup>	b	-	+	+	+	+	+	+	128	B-6
	1	c	+	-	+	+	-	-	-	0	B-7
	3	d	-	+	+	+	-	-	-	0	B-8
	1	d	-	+	-	+	-	-	-	0	B-9

1) The toxin genes were detected by PCR. +, positive. -, negative.

2) The indices from 0 to 128 corresponded to the last supernatant dilution rate (among 1/2 serial dilutions) for which enterotoxin remained detectable. According to the manufacturer's instructions, strains with an index of 0 were considered negative.

3) Sixteen strains were isolated from 12 food samples.

4) *B.cereus* strains were isolated from patients' feces in 6 laboratories. Eleven strains were obtained from 4 laboratories.

5) Five strains were isolated from a single patient's feces.

Table 5 Characteristics of *C.perfringens* strains isolated from samples

Source	Number of isolates	Laboratory	Hobbs type	Toxin <sup>1)</sup>					PFGE pattern
				$\alpha$ toxin	$\beta$ toxin	$\epsilon$ toxin	$\iota$ toxin	enterotoxin	
feces from patients <sup>2)</sup>	3	e	NT <sup>3)</sup>	+	-	-	-	-	C-1
	6	a,b,e	Type 4	+	-	-	-	+ <sup>4)</sup>	C-2
	1	e	NT	+	-	-	-	-	C-3
	1	c	Type 9	+	-	-	-	-	C-4

1) The toxin genes were detected by PCR. +, positive. -, negative.

2) *C.perfringens* strains were isolated from patients' feces in 6 laboratories. Eleven strains were obtained from 4 laboratories.

3) non-typable

4) All enterotoxin genes were encoded on the chromosome.

HBL 関連遺伝子は、弁当材料 1 株および患者由来 2 株からのみ 3 種類すべてが検出された。他の検体からは、弁当材料由来 1 株から *hblC* と *hblD* が検出されたが、それ以外からはいずれの遺伝子も検出されなかった。

CRET-RPLA は、食材由来 2 株および患者由来 2 株が陽性を示し、HBL 関連遺伝子の結果と一致した。*hblC* と *hblD* が検出された弁当材料由来 1 株では、陽性を示した最高希釈倍数は 4 倍であったが、3 種類の HBL 関連遺伝子がすべて検出された食材由来 1 株および患者由来 2 株では 128 倍であり、高いエンテロトキシン産生量を示した。

弁当材料 12 検体からの 16 菌株および b 検査機関の有症者糞便 1 検体からの 5 菌株を検査した結果、同じ検体から毒素産生能の異なる菌株が分離された。

### 3. 制限酵素によるセレウス菌の染色体切断パターンの解析

セレウス菌 DNA を *Sma* I で切断後、PFGE による解析を行った結果を Fig.2 に示した。PFGE は全部で 9 パターンを示した。このうち、弁当材料 14 菌株、ふき取り 1 菌株、調理従事者の糞便 2 菌株は同一の PFGE パターン、B-3 であった。有症者糞便の中で B-4、B-5 及び B-7 のパターンを示した菌株は B-3 と完全に一致したものではなかったが、類似性は極めて高かった。他の有症者糞便の菌株のパターンは B-3 とは明らかに異なっていた。

### 4. ウエルシュ菌の血清型別および毒素産生性

患者便 11 検体から分離された 11 株を供試して Hobbs の血清型別を行った結果、Hobbs 4 型が 6 菌株、Hobbs 9 型が 1 菌株あり、他の 4 株は型別不能であった。また、11 株はすべて、 $\alpha$  毒素産生遺伝子を持つ A 型ウエルシュ菌であった。エンテロトキシン産生遺伝子 (*cpe*) の有無を調べた結果、Hobbs 4 型の 6 菌株が陽性を示し、これらの菌株の *cpe* はすべて染色体上にコードされていた (Table 5)。

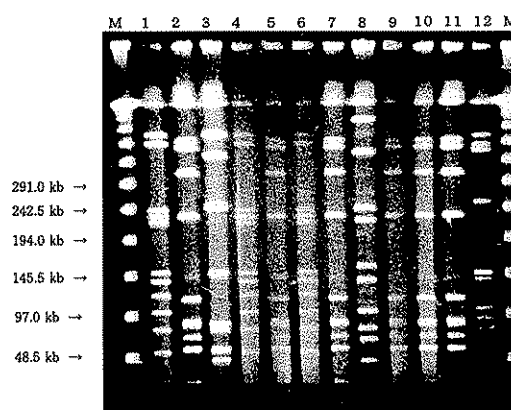


Fig.3 PFGE patterns of *Sma* I - digested genomic DNA of *C.perfringens* isolates from patients' feces.

lane 1,4,6: pattern C-1, lane 2,5,7,9~11: pattern C-2, lane 3: pattern C-3, lane 8: pattern C-4, lane 12: ATCC 13124, lane M:  $\lambda$  ladder size marker (Cambrex Bio Science).

### 5. 制限酵素によるウエルシュ菌の染色体切断パターンの解析

ウエルシュ菌 DNA を *Sma* I で切断した PFGE 解析を Fig.3 に示した。11 株の PFGE は異なる 4 つのパターンに分かれた。エンテロトキシン遺伝子を保有する 6 菌株はすべて同一の PFGE パターン、C-2 であった。エンテロトキシン遺伝子を保有しない菌株は 3 つのパターンに分類された。

## IV 考 察

セレウス菌の病原因子は、耐熱性毒素である嘔吐毒 (セレウリド) と易熱性毒素である下痢毒 (エンテロトキシン) の 2 種類に分けられる。セレウリドは、20°C で産生性が高く、その発現には通気条件が必要であることが知られている<sup>11)</sup>。嘔吐毒の遺伝子を持つセレウス菌が検出された有症者の中に嘔気、嘔吐の症状を呈したものがいなかったのは、これらの菌株が食品中でセレウリドの発現の条件を満たしていなかったためと推測される。

一方、エンテロトキシン活性を示す毒素は複数

あると考えられており、そのうち NHE と HBL はそれぞれ3種類のタンパク質で構成されている。NHEを構成するタンパク質 NheA, NheB, NheC は *nheA, nheB, nheC* 遺伝子に、HBLを構成するタンパク質 B, L<sub>1</sub> および L<sub>2</sub> は *hblA, hblD, hblC* 遺伝子にコードされている<sup>12)</sup>。Beecher と Wong<sup>13)</sup> は、エンテロトキシン検出キットである CRET-RPLA は *hblC* によりコードされているエンテロトキシン HBL の L<sub>2</sub> コンポーネントを検出していると報告している。本事例において、CRET-RPLA により、HBL 関連遺伝子を持つ食材由来と患者糞便由来の4菌株において、エンテロトキシンが検出された。NHE と HBL はそれぞれのコンポーネント単独でも弱い活性が観察されるが、3つのコンポーネントを持ち、さらにそれらの相互作用によって、最大の活性を発揮すると考えられている<sup>14)</sup>。*hblC* と *hblD* のみが検出された弁当材料由来株のエンテロトキシン産生量が、3種類の HBL 関連遺伝子がすべて検出された菌株と比較すると少なかったのは、このことを示唆している。

セレウス菌による消化器症状は、食品中で1gあたり10<sup>6</sup>個から10<sup>8</sup>個に増殖した多数のセレウス菌を摂取することによって引き起こされる<sup>1)</sup>。この事例では、PFGEパターンが同一のセレウス菌が弁当材料13検体から12検体という高率で検出され、菌量も最高で1.1 × 10<sup>7</sup> CFU/g 検出された。また、調理従事者2名のPFGEパターンは食材と完全に一致し、患者糞便から検出された菌株の中で、弁当材料のPFGEパターンと類似するパターンを示すものもあった。しかし、患者糞便から検出された菌株には弁当材料とPFGEパターンが完全に一致するものはなく、多様性を示したため、セレウス菌によるこの事例への関与は証明できなかった。

A型ウエルシュ菌のうち、エンテロトキシン遺伝子の保有あるいはエンテロトキシンの産生能は、6%以下の菌株でしか認められていないことが報告されている<sup>15)16)</sup>。家畜や健康保菌者から分離された株など、ヒトの食中毒事例に由来しない株においては、プラスミド上にエンテロトキシン遺伝子が存在する<sup>17)</sup>。一方、染色体上にエンテロトキシン遺伝子を持つ菌株は、プラスミド上にエンテロトキシン遺伝子を持つ菌株よりも、熱に抵抗性があり<sup>18)</sup>、食中毒事例に由来する株の多くが染色体上にエンテロトキシン遺伝子を持つ<sup>19)</sup>。今回、ウエルシュ菌は、弁当食材、ふき取りからは検出されなかったが、患者から分離された11株はすべてA型ウエルシュ菌であり、そのうちの6菌株(55%)は染色体上にエンテロトキ

シン産生遺伝子を持っており、血清型も全て同一であった。異なる検査機関で異なる患者から分離された6菌株のPFGE型もすべて一致したことより、今回の食中毒にウエルシュ菌が関与していた可能性は高いと考えられる。

今回弁当を提供した施設では、通常弁当の製造をしておらず、調理作業場等の清掃も不十分であった。弁当は午前3時から調理が開始され、すべてのおかずの盛り付けが終了したのは午前11時であった。当日喫食された弁当の中の食品はすべて保存されておらず、保存自体も適切ではなかったことなどから、結果として食材からの原因菌の特定には至らなかったが、食品を長時間室温に放置していたことにより菌が増殖し汚染が広がり、今回の食中毒につながったと推測される。

## V まとめ

2005年7月に西宮市で開催された集会で食中毒が発生し、参加者565名のうち約500名が提供された幕の内弁当を食べ、108名が下痢、腹痛等の症状を呈した。平均潜伏期間は11.5時間であった。ほぼ同数の有症者の糞便からセレウス菌とウエルシュ菌が検出された。弁当材料からセレウス菌が検出されたが、有症者の糞便から検出された菌株とPFGEパターンは一致せず、セレウス菌のこの事例への関与は証明されなかった。しかし、染色体上にエンテロトキシン遺伝子を保有するA型ウエルシュ菌は、有症者11名のうち6名から検出され、すべて同一のPFGEパターンを示したことから、ウエルシュ菌が関与していた可能性は高いと考えられた。

## 謝 辞

菌株の分与および有益な情報をいただいた加古川健康福祉事務所検査室、東大阪市環境衛生検査センター、大阪市立環境科学研究所、奈良市保健所の諸氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 品川那汎: *Bacillus cereus*, 坂崎利一編, 食水系感染症と細菌性食中毒, p.304-335, 中央法規出版, 東京(1991)
- 2) 植村興: *Clostridium perfringens*, 坂崎利一編, 食水系感染症と細菌性食中毒, p.282-303, 中央法規

- 出版, 東京 (1991)
- 3) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針 微生物編, p.297-306, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
  - 4) Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Martlbauer, E. and Scherer, S. : Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 105-113 (2005)
  - 5) Hansen, B. M. and Hendriksen, N. B. : Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 185-189 (2001)
  - 6) Rowan, N. J., Caldow, G., Gemmell, C. G. and Hunter, I. S. : Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2372-2376 (2003)
  - 7) Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y. and Park, Y.H. : Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 228-232 (1997)
  - 8) Wen, Q., Miyamoto, K. and McClane, B.A. : Development of a duplex PCR genotyping assay for distinguishing *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal enterotoxin (*cpe*) genes from those carrying plasmid-borne enterotoxin (*cpe*) genes. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1494-1498 (2003)
  - 9) Liu, P.Y., Ke, S.C. and Chen, S.L. : Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1533-1535 (1997)
  - 10) Johansson, A., Aspan, A., Bagge, E., Baverud, V., Engstrom, B.E. and Johansson, K.E. : Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.*, **6**, 47 (2006)
  - 11) Haggblom, M. M., Apetroaie, C., Andersson, M. A. and Salkinoja-Salonen, M. S. : Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2479-2483 (2002)
  - 12) 品川那汎, 重茂克彦: セレウス菌 (*Bacillus cereus*) エンテロトキシン, 櫻井 純, 本田 武司, 小熊 恵二編, 細菌毒素ハンドブック, p.47-54, サイエンスフォーラム, 東京 (2002)
  - 13) Beecher, D. J. and Wong, A. C. : Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4616-4616 (1994)
  - 14) Lund, T. and Granum, P. E. : Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiol.*, **143**, 3329-3336 (1997)
  - 15) Daube, G., Simon, P., Limbourg, B., Manteca, C., Mainil, J. and Kaeckenbeeck, A. : Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (alpha, beta, epsilon, iota, theta, mu, and enterotoxin) and for sialidase. *Am. J. Vet. Res.*, **57**, 496-501 (1996)
  - 16) Kokai-Kun, J. F., Songer, J. G., Czeczulin, J. R., Chen, F. and McClane, B. A. : Comparison of western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2533-2539 (1994)
  - 17) Collie, R. E. and McClane, B. A. : Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 30-36 (1998)
  - 18) Sarker, M.R., Shivers, R.P., Sparks, S. G., Juneja, V.K. and McClane, B.A. : Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3234-3240 (2000)
  - 19) Miyamoto, K., Wen, Q. and McClane, B. A. : Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1552-1558 (2004)