

河川に広く分布する下痢症起因ウエルシュ菌の 拡散機構の解明と水質保全への提言

地方独立行政法人
大阪健康安全基盤研究所
微生物部細菌課
余野木伸哉

1. はじめに

下水道及び下水道システムは現代の都市にとって必要不可欠な機能であり、日本下水道協会によるとその役割として、(1)街を清潔にする、(2)街を浸水から守る、(3)身近な環境を守る、(4)エネルギー・資源を創るという4つの役割が挙げられている(図1.)¹⁾。このうち(1)街を清潔にする役割は、これまでそして現在も感染症の制御に重

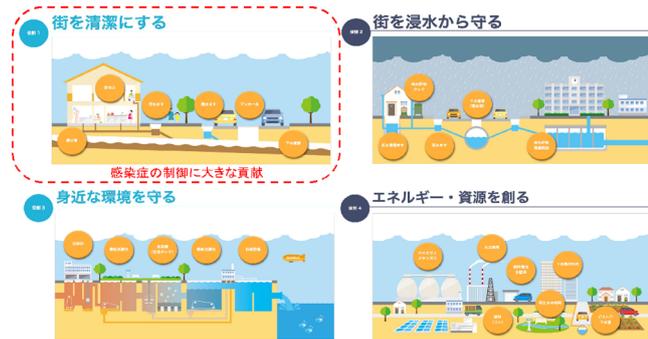


図1. 下水道システムの役割¹⁾

要な貢献を果たしており、さらに近年には、下水はコロナウイルスなどの感染症のモニタリングに利用され、感染症の制御において活用や役割が広がっている。

一方で、下水は処理の最終工程で主に塩素消毒されたのちに放流されるが、この放流水には大腸菌、芽胞菌やウイルスが一部残存していることが知られている^{2, 3)}。近年には、このような下水処理場由来の芽胞菌や耐性菌が地域での感染症の発生に関与することが示されている⁴⁾。しかしながら、国内の下水を介した芽胞菌などによる健康被害に関する情報は乏しく、その詳細は不明である。

ウエルシュ菌はグラム陽性の芽胞形成菌であり、ヒトや動物の常在腸内細菌であるほかに、下水、河川水、海水や土壌、食品など広く環境中にも存在している。ウエルシュ菌はこれまでに20種類以上の外毒素を産生することが報告されており、このうちCPEとBECがヒトの下痢症に関与して食中毒などの原因毒素となることが知られている⁵⁾。CPE遺伝子は染色体上に存在するもの(染色体型)とプラスミド上に存在するもの(プラスミド型)があり、プラスミド型の多くはCPE遺伝子の近傍に存在する挿入配列の種類によってIS1151型とIS1470-like型の2種類の遺伝子型に分類される^{6, 7)}。欧米からの報告では食中毒事件のうちおよそ7割が染色体型の菌が、およそ3割がプラスミド型の菌が原因と報告されており、国内も同様の比率で発生していると考えられている⁸⁾。プラスミド型の菌は食中毒の原因菌となるほかに抗生物質関連性の下痢症、散發性の下痢症や高齢者施設などで集団下痢症を起こすことが知られているが、その発生と周辺環境との関連性は不明なことが多い⁵⁾。

本研究では大阪府の環境水における嫌気性芽胞菌の汚染実態を調査した。さらに、これら嫌気性芽胞菌のうちウエルシュ菌について健康被害との関連について調査した。

2. 方法

2.1 環境水の採水

大阪府の20ヶ所(A~t)の河川や湖沼(淀川を含む7流域の河川)から51サンプルの表

流水をそれぞれ 200mL 以上を採水した（図 2. :地理院地図 Vector で作製）。採水は 2019 年 6 月から 2021 年 3 月の間に行った。

2.2 嫌気性芽胞菌数の測定

採取した環境水はそれぞれ 200mL を減圧濾過によって膜濃縮した。検体を濃縮した膜は上水試験方法のハンドフォード改良寒天培地法に供試して、嫌気性芽胞菌数を計測した。

2.3 菌種の同定

分離した嫌気性芽胞菌は 1 サンプルあたり 30 株を上限として菌種を同定した。菌種の同定は MALDI-TOF/MS のバイオタイパー（スメア法およびギ酸抽出法）を用いて実施した。バイオタイパーでスコアが 2 未満の場合は、およそ 1,500bp の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読して、この配列とデータベースに登録された配列の相同性を確認して決定した。

2.4 ウェルシュ菌数の計測

各サンプル 200mL あたりのウェルシュ菌数は以下の計算式を用いて算出した。（ウェルシュ菌数）＝（検出された芽胞菌数）×（ウェルシュ菌と同定された菌数）／（同定作業を実施した菌数）

2.5 CPE 遺伝子の検出と CPE 遺伝子型の決定

CPE 遺伝子の検出と CPE 遺伝子型の決定はそれぞれ Yonogi S らの方法と Miyamoto K らの方法を用いて実施した^{9, 10)}。

2.6 データと上流域での大規模下水処理施設の有無による採水場所の分類

本調査の採水場所それぞれについて、採水場所から半径 1km 内の人口を政府統計の総合窓口(e-Stat) 地図で見る統計(統計 GIS)を用いて集計した¹¹⁾。また、それぞれの採水場所について、上流域での大規模下水処理施設(1sWWTPs:本研究では処理人口 1 万人以上とした)の放流口の有無を確認した。

2.7 CPE 遺伝子を保有する食中毒原因菌の CPE 遺伝子型

2008 年から 2022 年の 15 年間に大阪健康安全基盤研究所旧森ノ宮センターで検査を実施したウェルシュによる食中毒事件に由来する菌株について、CPE 遺伝子の存在を確認し、その遺伝子型を決定した。方法は 2.5 と同じ方法を用いた。

2.8 Multi locus sequencing typing (MLST)による分子疫学的解析

本研究において環境水から分離した CPE 遺伝子陽性菌と大阪府の食中毒事例由来菌は Deguchi A らの方法に従って MLST 解析に必要な配列を取得した^{12, 13)}。これらの配列は公共のデータベースから収集した主に国内分離株の MLST 配列データと比較した。5,274bp の結合配列を MAFFT でアライメントして、RAxML による最尤推定法を使用して系統樹を作成した。系統のクラスタリングは RhierBAPS ソフトウェアを使用した hierarchical Bayesian analysis of populations structure (hierBAPS)に基づいて実施し、RStudio 環境内で ggtree を用いて視覚化した¹⁵⁾。

2.9 全ゲノムによる分子疫学的解析とプラスミド配列の決定

環境水から分離した CPE 遺伝子陽性菌と大阪府の食中毒事例由来菌のいくつかの株を選抜してゲノム DNA を抽出した。DNA は MiSeq platform (Illumina)または MinION (Oxford Nanopore Technologies)を用いて塩基配列を解読した。得られた配列情報をアセンブルして菌株の全ゲノム配列及び完全プラスミド配列を決定した。

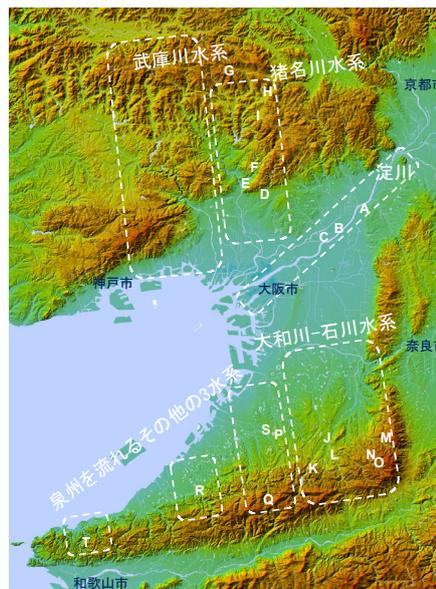


図 2. 採水場所

3. 結果と考察

3.1 採水場所の平均嫌気性芽胞菌数と菌種の同定

各採水場所の平均嫌気性芽胞菌数は表 1. のように 0-178.7 CFU/200mL であった。淀川を除く 17 の採水場所(D-t)では平均検出数の最大値は 21.0 CFU/200mL であった。淀川 3 箇所(A-C)の検出数はいずれも 100 CFU/200mL を超えており、その他の採水場所に比べて検出数が著しく多かった。

嫌気性芽胞菌は 51 サンプルから合計 1597 の集落が計測された。このうち 520 株について菌種を同定し、これらのほとんど (498 株、95.8%) はウエルシュ菌であることが分かった。

3.2 CPE 遺伝子保有株数とその遺伝子型

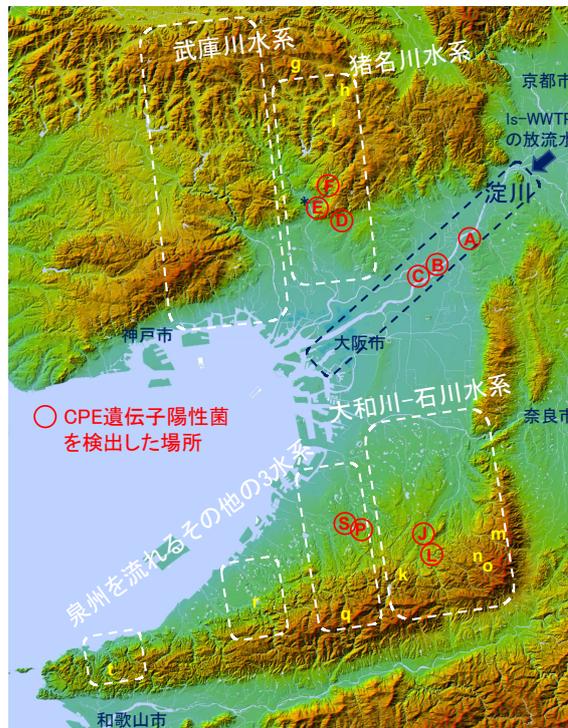
各採水場所についてウエルシュ菌と同定された菌数とその CPE 遺伝子の保有数を集計した (表 1.)。ウエルシュ菌と同定された 498 株のうち 68 株 (13.7%) が CPE 遺伝子を保有しており、河川水には高い割合で CPE 遺伝子保有ウエルシュ菌が存在することが分かった。これら CPE 遺伝子保有ウエルシュ菌の CPE 遺伝子型は 94.1% (64 株) が IS1151 型であり、染色体型の菌は全く検出されなかった。IS1470-like 型の菌や 3 つの遺伝子型では分類できない菌がそれぞれ 2 株 (各 3.1%) 分離されたが、その割合は小さかった。IS1151 型の菌が環境水における CPE 遺伝子陽性菌のなかで優勢な菌であることが明らかになった。

3.3 採水場所の分類

採水場所の半径 1km 内の人口と上流域での大規模下水処理施設の有無によって、採水地を表 2. のように 3 つの地域に分類した。地域ごとに大阪府の環境水に関する調査の結果を集計・整理すると、CPE 遺伝子陽性菌は全て都市・郊外地域から分離されていることが明らかになった (図 3.)。また、CPE 遺伝子陽性菌のうち大阪府の環境水に最も優勢に分布していた IS1151 型の菌は農村・山間地域に比べて都市・郊外地域で有意に多く分離され、ウエルシュ菌に占める割合も有意に多いことが確認された。今回の調査に

採水地	平均芽胞数 /200mL	ウエルシュ菌数	CPE陽性菌数	IS1151型の菌数 (それ以外)
A	140.3	88	10	10
B	178.7	90	12	11 (IS1470-like)
C	128.7	90	13	11 (3つ以外の型)
D	9.2	43	5	4 (3つ以外の型)
E	18.0	17	1	1
F	12.0	8	2	2
G	2.0	1	0	-
H	11.0	9	0	-
I	1.0	0	0	-
J	21.0	39	14	13 (IS1470-like)
K	0.0	0	0	-
L	3.5	7	2	2
M	2.0	2	0	-
N	9.0	15	0	-
O	1.5	1	0	-
P	3.7	10	3	3
Q	0.0	0	0	-
R	2.3	5	0	-
S	7.3	72	6	6
T	0.5	1	0	-

表 1. 大阪府の環境水に関する調査の結果



地域分類	周辺人口 (半径1km内)	IsWWTPsの有無	地図での表示	サンプル合計数	
都市・郊外地域	IsWWTPsあり	9,000人以上	+	3ヶ所 (淀川)	9
	IsWWTPsなし	9,000人以上	-*	7ヶ所 (地図赤色)	24
農村・山間地域	IsWWTPsなし	2,000人以下	-	10ヶ所 (地図黄色)	18

*採水地 E は上流に小規模な下水処理施設あり (計画処理人口 3160 人)

染色体型の菌は分離されなかった

において上流域に 1sWWTPs が存在する採水場所は淀川の 3 地点のみであったが、ウエルシュ菌に占める IS1151 型の菌の割合は上流域での 1sWWTPs の有無によって有意な差は確認されなかった。一方で、上流域での 1sWWTPs の存在によって平均芽胞菌数、ウエルシュ菌数は著しく増加し、IS1151 型の総菌数も増加することが考えられた。

以上のことから、IS1151 型の菌は都市・郊外地域に偏在していることが明らかになった。1sWWTPs は IS1151 型の菌の環境水における分布に関わる重要な要因であるが、都市・郊外地域に 1sWWTPs 以外の要因が存在することが示された。

3.4 食中毒原因菌の CPE 遺伝子型

当所で検査した過去 15 年間の食中毒事例について原因エンテロトキシンと CPE 遺伝子型を整理した

No.	発生年月	ET	ET遺伝子の所在
1	2008年6月	CPE	プラスミド (IS1151型-cpe)
2	2008年6月	CPE	プラスミド (IS1151型-cpe)
3	2008年10月	CPE	プラスミド (IS1151型-cpe)
4	2009年8月	BEC	pCP13-like プラスミド
5	2010年1月	BEC	pCP13-like プラスミド
6	2010年6月	CPE	染色体
7	2010年12月	CPE	染色体
8	2012年12月	CPE	染色体
9	2013年7月	CPE	プラスミド (IS1151型-cpe)
10	2014年5月	CPE	染色体
11	2014年5月	CPE	染色体
12	2016年6月	CPE	染色体
13	2016年10月	CPE	プラスミド (IS1151型-cpe)
14	2017年5月	CPE	プラスミド (IS1151型-cpe)
15	2017年5月	CPE	染色体
16	2018年5月	CPE	染色体
17	2019年8月	CPE	染色体
18	2020年1月	CPE	染色体
19	2021年5月	CPE	染色体
20	2021年5月	CPE	染色体
21	2021年10月	CPE	プラスミド (IS1151型-cpe)
22	2022年4月	CPE	染色体

表 3. 過去 15 年間の食中毒事例の概要

(表 3.)。22 事例のうち 7 事例 (31.8%) では IS1151 型の菌が原因であり、染色体型の菌との比率は欧米の報告とほぼ一致していた。IS1470-like 型の菌が原因となった事例はなかった。

3.5 MLST 解析による国内分離株の分子疫学的解析

66 株の環境水由来株と 37 株の食中毒事例由来の MLST 配列は公共のデータベースに登録されている 188 株の CPE 遺伝子陽性菌の MLST 配列と比較した。188 株のデータベースの配列のうち 177 株は国内分離株の配列であり、主に国内分離株と比較した^{12, 15-17)}。

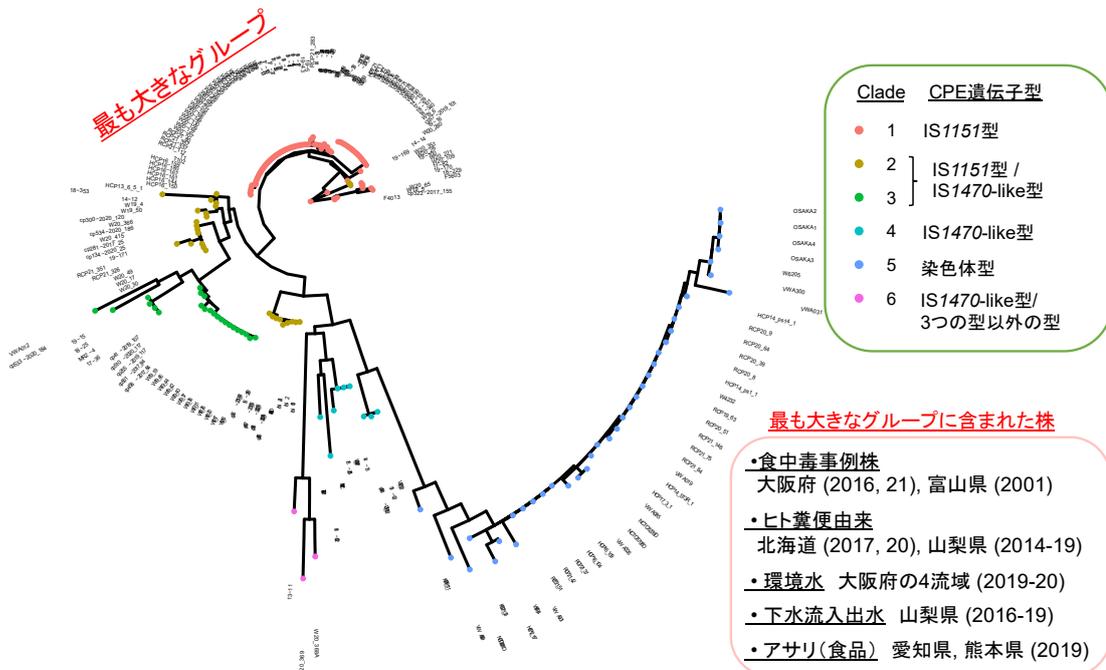


図 4. MLST による国内分離株の系統解析

BAPSに基づいた系統分けによって、これらの菌株は主に6つのクレイドに分類された(図4.)。IS1151型、IS1470-like型、染色体型の菌はそれぞれクレイド[1, 2, 3]、[2, 3, 4, 6]、[5]に分類された。クレイド2と3にはIS1151型とIS1470-like型の菌が共に分類されたが、これらの菌はクレイド内で異なるグループを形成していた。クレイド1に形成された最も大きなグループには大阪府と富山県で発生した食中毒由来株、北海道と山梨県のヒト糞便由来株、本研究において分離した大阪府の4流域の河川に由来する株、山梨県の下水流入水と下水流出水に由来する株、愛知県と熊本県で採取されたアサリから分離された株が分類された。このことから同系統のIS1151型の菌は日本国内に広く分布して、食中毒の原因になることが示された。

3.6 全ゲノム解析によるプラスミドの特定

15株を超えるIS1151型の菌について保有しているプラスミドの全長配列を全ゲノム解析によって決定した。pCPF5603は挿入配列IS1151を近傍に持つCPE遺伝子をコードする代表的なプラスミドとして知られており、全長配列を決定した多くのプラスミドはpCPF5603とほとんど同様なプラスミドであることが分かった。以上の結果からpCPF5603がIS1151型の菌の国内での拡散に関与していることが示された。

4. まとめと今後の展望

本研究によって大阪府の環境水にIS1151型の菌が広く分布しており、この菌は大阪府だけでなく日本国内に広く分布していることが明らかになった。これら国内に広く分布するIS1151型の菌は、本研究の結果から一定の人口密度を有する都市・郊外地域に広く分布することが示された。都市・郊外地域を汚染する環境要因として下水処理施設の放流水は重要であるが、都市・郊外地域に下水処理施設の他の要因が存在することが示された。菌が持つ要因としてはpCPF5603の影響が考えられた。

今後はこれらの結果に影響する環境要因や菌の要因をより具体的に特定するとともに、ウエルシュ菌以外の嫌気性芽胞菌や薬剤耐性菌について国内の状況を調査する予定である。

5. 謝辞

本研究は、令和4年度 公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構「水質保全研究助成」を受けて実施いたしました。ここに記して御礼を申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 日本下水道協会ホームページ; <https://www.jswa.jp/sewage/role/>
- 2) 横浜市ホームページ、令和2年度環境創造局業務研究・改善事例発表会; https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/machizukuri-kankyo/kasen-gesuido/gesuido/shori/sokutei/chosa/report.files/0104_20210427.pdf
- 3) 国土技術政策総合研究所ホームページ; <http://www.nilim.go.jp/lab/bcg/siryou/tnn/tnn1056pdf/ks105609.pdf>
- 4) Danesh Moradigaravand, Theodore Gouliouris, Catherine Ludden, Sandra Reuter, Dorota Jamrozy, Beth Blane, Plamena Naydenova, Kim Judge, Sani H. Aliyu, Nazreen F. Hadjirin, Mark A. Holmes, Estée Török, Nicholas M. Brown, Julian Parkhill, and Sharon Peacock: Genomic survey of *Clostridium difficile* reservoirs in the East of England implicates environmental contamination of wastewater treatment plants by clinical lineages: *Microb Genom.* 2018 Mar; 4(3): e000162.
- 5) 余野木伸哉: 感染制御と予防衛生: ウエルシュ菌による食中毒とその予防: 2019年9月号
- 6) Jihong Li, Kazuaki Miyamoto, Sameera Sayeed, Bruce A. McClane: Organization of the *cpe* Locus in CPE-Positive *Clostridium perfringens* Type C and D

- Isolates: PLoS One. 2010 Jun 3;5(6):e10932.
- 7) Raymond Kiu, Joseph Brown, Harley Bedwell, Charlotte Leclaire, Shabhonam Caim, Derek Pickard, Gordon Dougan, Ronald A. Dixon & Lindsay J. Hall: Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis: Anim Microbiome. 2019 Oct 18;1:12.
 - 8) Abakabir Mahamat Abdelrahim, Nicolas Radomski, Sabine Delannoy, Sofia Djellal, Marylène Le Négrate, Katia Hadjab, Patrick Fach, Jacques-Antoine Hennekinne, Michel-Yves Mistou, Olivier Firmesse: Large-Scale Genomic Analyses and Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Implicated in Foodborne Outbreaks in France: Front Microbiol. 2019 Apr 17;10:777.
 - 9) Shinya Yonogi, Masashi Kanki, Takahiro Ohnishi, Masami Shiono, Tetsuya Iida, Yuko Kumeda: Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes *cpe* and *becAB*: Microbiol Methods. 2016 Aug;127:172-175.
 - 10) Kazuaki Miyamoto, Qiyi Wen, Bruce A McClane: 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. 2004 Apr;42(4):1552-8.
 - 11) 総務省統計局と独立行政法人統計センターのホームページ、政府統計の総合窓口(e-Stat) 地図で見る統計(統計GIS): <https://www.e-stat.go.jp>
 - 12) Agi Deguchi, Kazuaki Miyamoto, Tomomi Kuwahara, Yasuhiro Miki, Ikuko Kaneko, Jihong Li, Bruce A. McClane, Shigeru Akimoto: Genetic Characterization of Type A Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Strains: PLoS One. 2009 May 19;4(5):e5598.
 - 13) Yinghua Xiao, Arjen Wagendorp, Roy Moezelaar, Tjakko Abee, Marjon H J Wells-Bennik: A wide variety of *Clostridium perfringens* type A food-borne isolates that carry a chromosomal *cpe* gene belong to one multilocus sequence typing cluster: Appl Environ Microbiol. 2012 Oct;78(19)
 - 14) Gerry Tonkin-Hill, John A. Lees, Stephen D. Bentley, Simon D.W. Frost and Jukka Corander: RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS: Wellcome Open Res. 2018; 3: 93.
 - 15) Asami Matsuda, Meiji Soe Aung, Noriko Urushibara, Mitsuyo Kawaguchiya, Ayako Sumi, Mayumi Nakamura, Yuka Horino, Masahiko Ito, Satoshi Habadera, Nobumichi Kobayashi: Prevalence and Genetic Diversity of Toxin Genes in Clinical Isolates of *Clostridium perfringens*: Coexistence of Alpha-Toxin Variant and Binary Enterotoxin Genes (*bec/cpile*): Toxins (Basel). 2019 Jun 6;11(6):326.
 - 16) Keita Yanagimoto, Kosei Uematsu, Takaya Yamagami, Eiji Haramoto: The Circulation of Type F *Clostridium perfringens* among Humans, Sewage, and Ruditapes philippinarum (Asari Clams): Pathogens. 2020 Aug 18;9(8):669.
 - 17) Meiji Soe Aung, Asami Matsuda, Noriko Urushibara, Mitsuyo Kawaguchiya, Nobuhide Ohashi, Norifumi Matsuda, Mayumi Nakamura, Masahiko Ito, Satoshi Habadera, Akinori Matsumoto, Mina Hirose, Nobumichi Kobayashi: Clonal diversity of *Clostridium perfringens* human clinical isolates with various toxin gene profiles based on multilocus sequence typing and alpha-toxin (PLC) typing: Anaerobe. 2021 Dec;72:102473.