

平成 26 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）
食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究
研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

遺伝子検出法と培養法を用いたエンテロトキシン産生性
非産生性ウェルシュ菌の食品汚染実態調査

研究分担者 久米田 裕子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

研究協力者 余野木 伸哉（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

ウェルシュ菌食中毒事例の原因追及の過程で、ウェルシュ菌は乾ししいたけなどの乾燥食品や牛糞便中で芽胞として長期間残存し、原因食品の汚染源となる可能性が示唆された。そこで、今年度は乾ししいたけ 26 検体、市販コショウ 15 検体、牛直腸スワブ 40 検体について、ウェルシュ菌芽胞の汚染実態調査を実施した。その結果、乾ししいたけでは 5 検体（19.2%）からウェルシュ菌が分離され、そのうち、1 検体（3.8%）から CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) 産生菌が分離された。市販コショウでは、4 検体（26.6%）からウェルシュ菌が分離されたが、CPE 産生菌は分離されなかった。コショウの増菌液から *cpe* 遺伝子をターゲットに PCR を行った結果では、1 検体（6.7%）が陽性となったが、CPE 産生菌を分離することはできなかった。今回使用した増菌培養液の PCR 法は、検出感度が高くスクリーニング法として有用であると考えられた。牛直腸スワブでは 23 検体（57.5%）と高率にウェルシュ菌が検出されたが、CPE 産生菌および BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) 産生菌はともに分離されなかった。従来、汚染率の高さから食肉が汚染源として疑われることが多かったが、今回の調査の結果、和食や中華料理の食材として広く使用される乾物もウェルシュ菌芽胞の汚染源として十分注意しなければならないことが明らかとなった。

- A. 研究目的
- ウェルシュ菌は食中毒の原因菌の一つであり、ヒトや動物の腸管内に常在し、生魚や食肉、特に鶏肉での汚染率が高いことが報告されている。これまでウェルシュ菌食中毒の病原因子として CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin)

が不可欠とされていたが、平成23年に栃木県のホテルで発生したウェルシュ菌食中毒事例では、患者糞便および原因食品のローストビーフから、新型エンテロトキシンBEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*)¹⁾ を産生するウェルシュ菌が分離された。また、平成25年に大阪府の高齢者デイサービス施設で発生したウェルシュ菌食中毒事例では、ざるそばが原因食品と疑われ、調理済み残品の乾ししいたけから、従来のエンテロトキシンCPEを産生するウェルシュ菌が分離された。このことから、ウェルシュ菌は、乾ししいたけなどの乾燥食品や牛糞便中で芽胞として長期間残存し、食中毒原因食品の汚染源となる可能性が示唆された。そこで、今年度は、食中毒の原因となるBECあるいはCPEを産生するウェルシュ菌といずれのエンテロトキシンも産生しないウェルシュ菌の食品汚染実態を調査する。また、PCRを用いて増菌培養液から直接、ターゲット遺伝子を高感度に検出する方法を検討する。さらに、サンプルから分離した菌株は、研究代表者らが実施する「ウェルシュ菌の疫学解析マーカーの検索・タイピング手法に関する研究」に使用し、従来のPFGEの代替法となる新しいタイピング法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 材料

平成25年12月から平成26年8月にかけて、

大阪府内7ヶ所の量販店で乾ししいたけ26検体（原木栽培22検体、菌床栽培4検体）、輸入コショウ15検体（白コショウ4検体、黒コショウ9検体、白黒混合コショウ2検体）を購入し、供試材料とした。

また、平成25年6月に大阪府内のと畜場において、解体後の牛直腸40検体から、スワブを無菌的に採取し、供試材料とした。牛直腸スワブは5都道府県、9農家で飼育された牛から採取した。

2. 方法

1) 食品からのウェルシュ菌分離法

乾ししいたけ等の食品については、食品10gをストマッカー袋に無菌的に採取し、液体チオグリコレート培地（栄研）90mlを加え、80℃、10分加熱処理後、42℃で18±2時間、嫌気培養した。培養後、その増菌液一白金耳をカナマイシン不含卵黄加CW寒天培地（栄研）に塗抹し、42℃で18±2時間、嫌気培養した。判定は、CW寒天培地で卵黄反応陽性のコロニーが検出された検体を推定ウェルシュ菌陽性とした。推定ウェルシュ菌は、3)の記載どおり、α毒素遺伝子(*plc*)をターゲットとしたPCRでウェルシュ菌であることを確認した。PCRで*cpe*遺伝子と*becA*および*becB*遺伝子の保有を確認し、*cpe*遺伝子陽性の株についてCPE産生性をPET-RPLA(デシカ)を用いて確認した。

さらに、増菌培養液から直接、*plc*, *cpe*,
または *becAB* 遺伝子の検出を試みるため、
増菌培養液 1 ml を 1.5 ml 遠心チューブに
移し、15,000 rpm, 5 分間遠心し、上清を
除去した。次に、既報のアルカリ熱抽出
法で芽胞あるいは栄養体の DNA 抽出を行
った²⁾。

2) 牛直腸スワブからのウェルシュ菌分離法

採取したスワブを液体チオグリコレ
ート培地（栄研）10 ml に接種し、80°C、10
分加熱処理後、42°C で 18±2 時間、嫌気培
養した。その後は 1) と同様の方法を行っ
た。

3) PCR 法

DNA 抽出：分離平板上のコロニーを白金線
で極少量採取し、0.1 ml の TE に懸濁後、
100°C、10 分間加熱し、DNA を抽出した。
増菌培養液からの DNA 抽出はアルカリ熱
抽出法で実施した²⁾。

PCR：PCR 反応液は、Ex Taq DNA
polymerase (TaKaRa) と各 0.8 μM のプライマ
ー（表 1）を用いて、24 μl 容量で調整し、
DNA 抽出液を 1 μl 加え、最終容量を 25 μl
とした。反応条件は、94°C, 1 分 → (98°C, 10
秒 → 55°C, 30 秒 → 72°C, 1 分) × 30 cycle →
72°C, 10 分とした。

C. 研究結果

1. 乾燥食品のウェルシュ菌汚染結果

汚染調査の結果を表 2 に示した。乾しい
たけ 26 検体を調べたところ、5 検体 (19.2%)
からウェルシュ菌が検出され、そのうち、1
検体 (3.8%) から CPE 産生菌が検出された。
増菌液 1 ml から直接 DNA を抽出し、PCR を実
施した結果も、26 検体中 5 検体が *plc* 遺伝子
陽性、1 検体が *cpe* 遺伝子陽性で、分離培養
の結果と一致した。*becAB* 遺伝子は増菌液の
PCR、分離培養とも、すべて検出されなかった。
市販コショウ 15 検体については、4 検体
(26.6%) からウェルシュ菌が検出されたが、
CPE 産生菌は検出されなかった。増菌液から
PCR を実施した結果、4 検体 (26.6%) が *plc*
遺伝子陽性で、1 検体 (6.7%) が *cpe* 遺伝子
陽性であった。*cpe* 遺伝子陽性であった検体
について、CW 寒天培地から 100 コロニーを釣
菌したが、CPE 産生菌を分離することはでき
なかった。また、*becAB* 遺伝子は増菌液の PCR、
分離菌とも、すべて陰性であった。

2. 牛直腸スワブのウェルシュ菌汚染結果

牛直腸スワブ 40 検体を調べたところ、23
検体 (57.5%) からウェルシュ菌が検出され
た。分離されたウェルシュ菌はすべて *cpe*,
becAB 遺伝子とも陰性であった。

D. 考察

平成 20 年から 26 年までに全国で発生した
ウェルシュ菌食中毒の原因食品としては、野
菜の煮物、カレー、シチュー、八宝菜、ロー

ストビーフなどが報告されている。これらの食中毒発生事例では、通常、原材料が保存されていることは稀で、実際どの原材料が汚染源であったかを調査することは非常に困難である。今回、我々が経験した食中毒事例では、疫学調査から「ざるそば」が原因食品である可能性が高く、また調理人の聞き取り調査から、「そばつゆ」を提供前夜に調理し、鍋に蓋をして常温で保存していたことが判明した。しかし、ざるそばおよびそばつゆの残品はなく、そばつゆに浸されていた「調理済みの乾ししいたけ」と「調理済みの昆布」が佃煮に調理するため冷凍保存されていた。そばつゆの材料は乾ししいたけ・昆布・花かつお・醤油・みりん・酒であった。調理済みの乾ししいたけと昆布、保管されていた乾物の乾ししいたけ・昆布・花かつおを調べたところ、「調理済みの乾ししいたけ」からCPE産生性のウェルシュ菌が、原材料の「乾ししいたけ」からCPE非産生性のウェルシュ菌が検出された。その他の食品からはウェルシュ菌は検出されなかった。これらのことから、乾ししいたけが汚染源であることが強く疑われたため、我々は、乾燥食品、特に乾ししいたけの汚染実態調査を開始することとした。

乾ししいたけには、原木栽培と菌床栽培があるが、今回の調査でウェルシュ菌芽胞が検出された検体はすべて原木栽培であった。菌床栽培は殺菌処理したおがくずが使用されて

おり、土壌に直接接触する原木栽培より、ウェルシュ菌に汚染される機会は少ないと考えられた。

同じく乾燥食品である香辛料も、芽胞菌の汚染率が高いことが報告されている^{3,4)}。今回、黒コショウ、白コショウをターゲットにした汚染調査でも予想どおり、ウェルシュ菌の汚染率は高かった。また、1999年の福岡市で発生した食中毒事例でも、市販かつおだしが汚染源であったことが報告されている⁵⁾。

このように、今までは汚染率の高さから食肉が汚染源として疑われることが多かったが、今回の調査から乾燥食品も汚染源として十分注意しなければならないことが明らかとなった。乾燥食品の製造時に行う乾燥行程で、多くの細菌の栄養体は死滅するが、芽胞は残存すると考えられる。乾ししいたけなどの乾物は古くから和食や中華料理の食材として広く使用されている。食中毒予防のために、これらの食材がウェルシュ菌芽胞によって汚染されている可能性を調理従事者に説明し、急速冷蔵や再加熱の徹底を心がけることが大切である。

一方、牛直腸スワブでは、57.5%という高率でウェルシュ菌が検出されたが、CPE産生菌もBEC産生菌も分離されなかった。乾燥食品からはCPE産生菌が低率で検出され、食中毒の原因となるこれらエンテロトキシン産生菌について自然界での分布をさらに調査する

必要がある。

今回、食品の汚染調査で使用した増菌培養液の PCR 法は、分離培養法と同等以上の検出感度と考えられた。実際、コショウの 1 検体から *cpe* 遺伝子陽性が確認されたが、菌を分離することはできなかった。食品中の腸管出血性大腸菌 0157 の検査においても同様のことが報告されている⁶⁾。今後、増菌培養液中のエンテロトキシン産生菌の有無を調べる場合には、スクリーニングとして PCR 法を使用することがたいへん有効であると考えられた。

E. 結論

ウェルシュ菌食中毒の原因食品の汚染源として、乾ししいたけ、市販コショウ、牛直腸スワブを調査した結果、乾ししいたけの 19.2%から、市販コショウの 26.6%からウェルシュ菌が検出され、CPE 産生菌も低率で分離された。今回使用した増菌培養液の PCR 法は、検出感度が高くスクリーニング法として有用であると考えられた。牛直腸スワブでは 57.5%と高率にウェルシュ菌が検出されたが、CPE 産生菌も BEC 産生菌も分離されなかった。従来、汚染率の高さから食肉が原因食品の汚染源として疑われることが多かったが、今回の調査の結果、和食や中華料理の食材として広く使用されている乾物もウェルシュ菌芽胞の汚染源として十分注意しなければならないことが明らかとなった。

F. 参考文献

- 1) Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T.; BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect Immun.* 2014. 82:2390-2399.
- 2) Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, Nakaguchi Y, and Nishibuchi M. Development of a loop-mediated Isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol.* 2010. 76: 820-828.
- 3) Hara-Kudo YI, Ohtsuka LK, Onoue Y, Otomo Y, Furukawa I, Yamaji A, Segawa Y, Takatori K. *Salmonella* prevalence and total microbial and spore populations in spices imported to Japan. *J Food Prot.* 2006. 69(10):2519-23.
- 4) Sagoo SKI, Little CL, Greenwood M, Mithani V, Grant KA, McLauchlin J, de Pinna E, Threlfall EJ. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiol.* 2009 Feb;26(1):39-43.
- 5) 楠本 亮, 財津修一, 池田嘉石北隆一. 市

販かつおだし等のウェルシュ菌汚染状況
について．福岡市保環研報．24．95-98
(1999)

- 6) Kanki M., Seto K., Harada T., Yonogi S. and Kumeda Y. Comparison of four enrichment broths for the detection of non-0157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* 091, 0103, 0111, 0119, 0121, 0145 and 0165 from pure culture and food samples. Lett Appl Microbiol. 2011.53:167-173.
- 7) Erol I, Goncuoglu M, Ayaz ND, Bilir Ormanci FS, Hildebrandt G. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. Lett Appl Microbiol. 2008.Jul;47(1):31-4.
- 8) Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. Am J Vet Res. 1997. Jul;58(7):702-5.

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

- 1) 余野木伸哉, 川津健太郎, 神吉政史, 原田哲也, 安田綾, 迎恵美子, 小金井洋輔, 久米田裕子. 高齢者デイサービス施設で発生したウェルシュ菌食中毒事例について. 第 35 回日本食品微生物学会学術

総会. 大阪. 2014

- 2) 余野木伸哉, 松田重輝, 河合高生, 依田知子, 原田哲也, 久米田裕子, 後藤和義, 日吉大貴, 中村昇太, 児玉年夫, 飯田哲也. ウェルシュ菌新規エンテロトキシン BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) の同定. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会. 兵庫. 2014.

表1. 使用したプライマー

プライマー名	配列	PCR産物のサイズ	引用文献
CPA F	gctaatgttactgccgttga	324 bp	7) , 8)
R	cctctgatacatcgtgtaag		
CPE F	ggagatgggttgatattagg	233 bp	7) , 8), 1)
R	ggaccagcagttgtagata		
becA F	caatggggcgaagaaaatta	499 bp	1)
R	aaccatgatcaattaaacctca		
becB F	tgcaaatgacccttacactga	416 bp	1)
R	agattggagcagagccagaa		

表2. 乾燥食品のウェルシュ菌汚染実態調査結果

食品名	検体数	DNA テンプレートの由来	ターゲット遺伝子		
			<i>plc</i>	<i>cpe</i>	<i>becAB</i>
乾ししいたけ	26	増菌液	5	1	0
		分離菌	5	1	0
コショウ	12	増菌液	3	1	0
		分離菌	3	0*	0

*釣菌した100コロニーはすべて *cpe* 遺伝子陰性であった