

分 担 研 究 報 告 書

サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法

泉谷 秀昌

平成 27 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

サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法

研究分担者 泉谷 秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）  
研究協力者 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）  
研究協力者 古川 一郎（神奈川県衛生研究所）  
研究協力者 齊藤志保子（秋田県健康環境センター）  
研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）

本研究班では、食中毒の予防・迅速な原因食品究明に役立つ、食品中の食中毒菌の情報、とくにその遺伝的特性に関する研究を行う。本研究ではサルモネラ属菌に着目し、そのサーベイランス体制を充実させるための遺伝特性に関する試験法の開発および検討などを行う。本年度は *Salmonella* I 4:b:- について、昨年度 *Salmonella* I 4:i:- で使用した解析法をベースに検討を行った。

A. 研究目的

サルモネラは国内外を問わず主要な食中毒菌の一つであり、公衆衛生上非常に重要な位置を占めている。わが国では 1990 年代から 2000 年代にかけて *Salmonella* Enteritidis による食中毒事例が多発し大きな問題となった。2000 年代以後はサルモネラによる食中毒事例および患者数は減少したものの、主要な食中毒菌であることに変わりはない。

サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれ、近年では SE 以外の血清型でも食中毒が発生しており、今後は SE 以外のサルモネラへの対応が必要となってくる。

SE 以外にヒトからの分離頻度が高い血清型としては Typhimurium、Infantis などがあり、とくに Infantis は鶏肉から高頻度

に分離される。また SE は鶏卵あるいは鶏肉などの食品（加工品）が主たる感染源となっている。

このように、サルモネラに関しては本菌感染と食品の結びつきが大変強い。したがって、本菌に関して、ヒトおよび食品でサーベイランスを実施することは重要な課題であり、その遺伝特性を解析し、そこから有用なマーカーなりタイピング法なりを開発・検討することが本研究の目的である。

B. 研究方法

PCR タイピング

*Salmonella* I 4:b:- は、あまり報告例のない血清型であり、単純に抗原構造からは血清型 Schleissheim となる。しかしながら、近年欧米で報告の相次いでいる血清型

であり、血清型 Typhimurium (I 4:i:1,2) の単相バリエーションであると考えられている *S. I 4:i:-* の例のように、*S. I 4:b:-* も何らかの血清型に由来する単相菌である可能性も考えられた。そこで、本研究にてこれまでに検討してきた単相菌スクリーニング PCR (*fljB*, *hin* 遺伝子など) および MLST 解析を活用し、同菌の解析を行った。

#### MLST 解析

PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012) に記載の multilocus sequence typing (MLST) を用いて MLST 解析を行った。MLST データについては <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/> を参照し、ST の型番付などを行った。

#### PFGE 解析

Pulsenet プロトコール (Foodborne Pathog Dis. 3(1): 20-31 (2006), <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/>) に従い、パルスフィールドゲル電気泳動法を実施した。*XbaI* 消化して得られた泳動パターンを Bionumerics に取り込み、クラスター解析を行った。

#### C. 研究結果および考察

サルモネラ 44 株を供試した。8 株は血清型参照株であり、内訳は Paratyphi B 4 株、Paratyphi B var Java 2 株、Schleissheim 1 株、*S. II 4:b:-* 1 株であった。36 株は試験菌株で、うち 29 株はヒト由来株、7 株は非ヒト由来株であった。試験菌株のうち、3 株が Paratyphi B、23 株が Paratyphi B var Java (酒石酸陽性) であった。残り 10 株は *S. I 4:b:-* であった (表)。

*S. I 4:b:-* は 10 株すべて酒石酸陽性であり、10 株とも *hin* 遺伝子陰性であった。

試験菌株を MLST 解析した結果、Paratyphi B は 3 株とも ST86 であった。Paratyphi B var Java は ST43 が 16 株、ST88 および ST127 がそれぞれ 3 株、ST307 が 1 株であった。*S. I 4:b:-* は、ST127 が 4 株、ST423 が 3 株、ST42、ST1838、ST2923 が 1 株ずつであった。(表)

参照株の MLST 解析の結果、Paratyphi B は 4 株とも ST86 であった。var Java は ST42 および ST149 が 1 株ずつ。Schleissheim は ST1833、*S. II 4:b:-* は ST276 であった。

MLST 解析の結果、本研究で供試した試験菌株の *S. I 4:b:-* は、ST Complex (STC) 19 (ST88, 127 を含む)、STC32 (ST42, 423 を含む)、STC155 (ST1838, 2923 を含むと推定) に該当した。本研究ならびに既報データベース (PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012)) から、これらはいずれも Paratyphi B var Java からなる STC であった。供試菌株 44 株について、MLST の結果を minimum spanning tree にまとめた (図 1)。*S. I 4:b:-* 株は Paratyphi B var Java 株と STC を共有していることがわかる。

供試菌株 44 株について PFGE 解析を行ったところ、ほぼ STC に関連したクラスターの形成が観察された (図 2)。STC5 は大きく 3 つのクラスターに分かれ、Paratyphi B は図の左のクラスターに含まれた。それ以外の Paratyphi B var Java もしくは *S. I 4:b:-* 株は、Paratyphi B のクラスターには含まれなかった一方で、STC19 株などは同一のクラスターに包括された。

以上ことから、Paratyphi B var Java が複数のクローンから成ることが MLST および PFGE 解析から明らかになった。また、

本研究で供試した試験菌株の *S.* 4:b:-も、複数のクローンから成り、Paratyphi B var Java に由来し、*hin* 遺伝子（および／もしくは *fljB* 遺伝子）を欠いたために単相菌になったことが示唆された。

#### D. 結論

サルモネラは主要な食中毒起因菌であり、血清型別を含めた迅速なタイピングは疫学調査に欠かせない。*hin* 遺伝子等の PCR タイピング、MLST 解析などの遺伝的特性を利用した解析法は、単相菌をはじめとしたサルモネラの血清型の推定ならびにクローンの同定に有用であることが示された。

#### E. 研究発表等

Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol Infect.* 2015 Nov 11:1-7. [Epub ahead of print]

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

	STC	5				19			32			155		76	214	計	
	ST	43	86		149	307	88	127	42	423		1838	2923	1833	276		
	Origin	h	h	ref	ref	h	nh	h	nh	h	ref	h	nh	nh	ref	ref	
I 4:b:- (小計)							4		1	3		1	1			10	
fljB-									1	3		1	1			6	
fljB+							4									4	
Paratyphi B			3	4												7	
Paratyphi B Java		16			1	1	3	1	2		1					25	
Schleissheim														1		1	
II 4:b:-															1	1	
総計		16	3	4	1	1	3	5	2	1	1	3	1	1	1	1	44

表 1. PCR タイピングおよび MLST の結果

h, ヒト由来株、nh, 非ヒト由来株、ref, 参照株

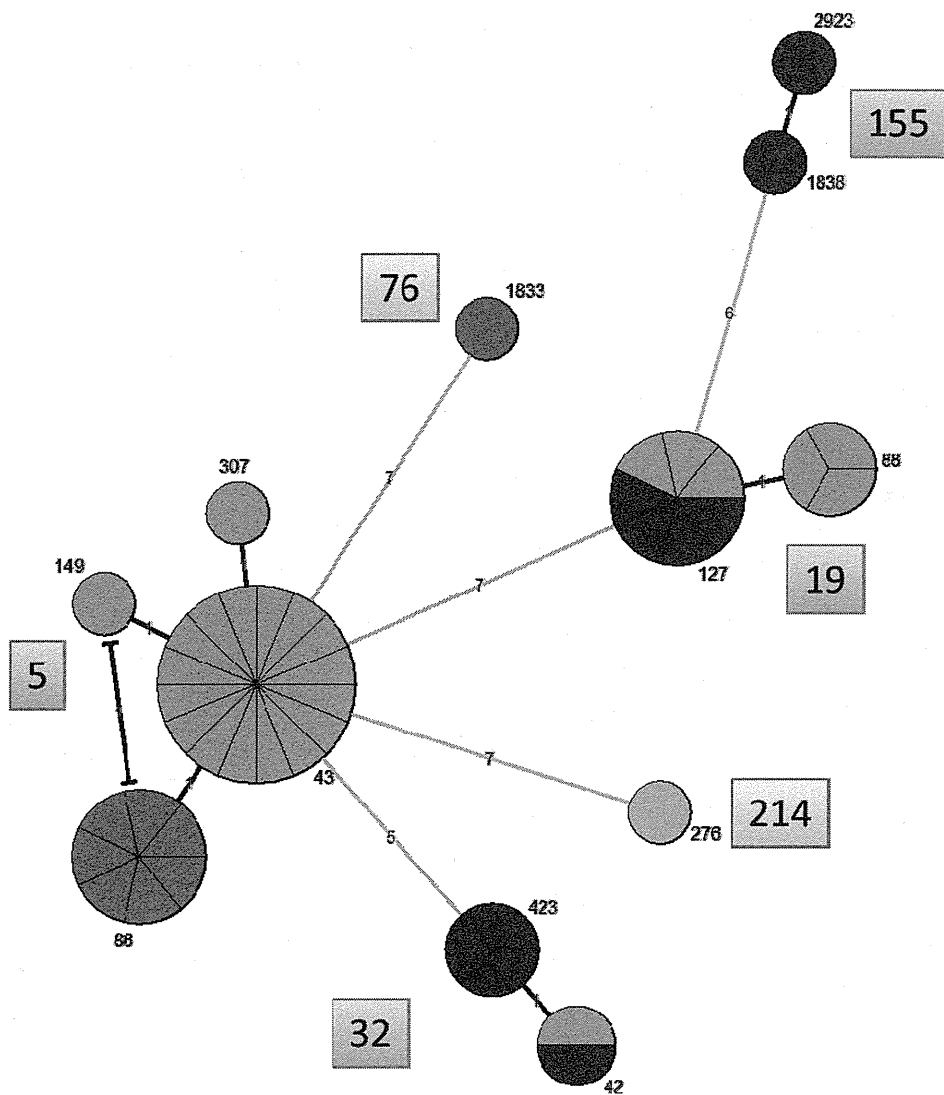


図1. MLSTの結果に基づくMST。頂点の脇にある数字はSTを、□でくくった数字はSTCを表す。線上の数字は異なる遺伝子座の数を表す。紫, Paratyphi B、緑, Paratyphi B var Java、赤, I 4:b:-、濃い緑, Schleissheim、水色, II 4:b:-。

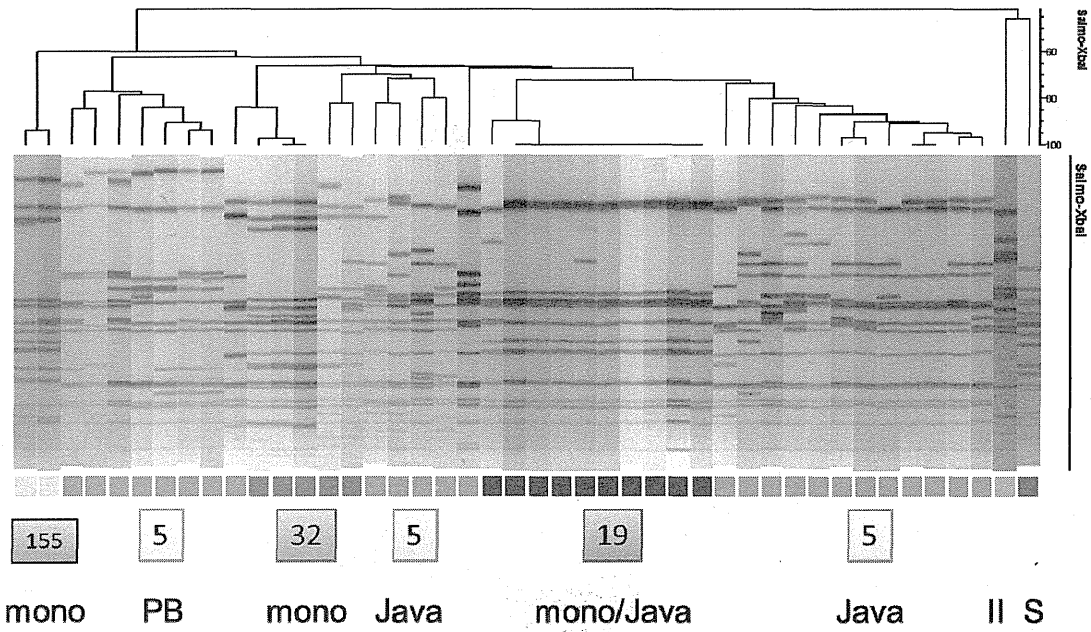


図2. *S. I 4:b:-*関連株 XbaI 消化 PFGE パターンのクラスター解析

上段は STC、下段はクラスターの大半を占める血清型（略称）を表す。mono, I 4:b:-, PB, Paratyphi B, Java, Paratyphi B var Java, II, II 4;b:-, S, Schleissheim

# 分 担 研 究 報 告 書

ウエルシュ菌選択分離培地の比較検討（食品、糞便等への添加回収）

世良 暢之



平成 27 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

ウェルシュ菌選択分離培地の比較検討（食品、糞便等への添加回収）

研究分担者	世良 暢之	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	前田詠里子	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	小林 昭彦	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	曾根 美紀	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	加藤 直樹	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	西田 雅博	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	重村 洋明	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	丸田 直子	（福岡県保健環境研究所）

ウェルシュ菌（エンテロトキシン遺伝子陰性株或いは陽性株）が、クロストリジウム属菌等の夾雑菌が含まれている食品或いは糞便等から効率的に添加回収できるかどうかについて、3種類の培地（ECW\*培地、CCP 培地及び TSC 培地）を用いて検討した。その結果、ウェルシュ菌を単独で食品に添加した際には CCP 培地が最も回収率が優れているが、夾雑菌が含まれている可能性がある食品等の試験検査の場合には TSC 培地のほうがより優れていることが示された。一方、便の添加回収においては食品と比較して回収率は格段に劣り、食中毒事例発生時等において有症者便等からエンテロトキシン遺伝子陽性のウェルシュ菌を分離することは困難を極めると思われた。しかし、従来から用いられている ECW\*培地に加え、CCP 培地を併用することで、その可能性がわずかながらでも上昇すると思われた。これらの結果から、ウェルシュ菌を試験検査する際には、従来から用いられている培地に加え、食品検査においては TSC 培地を、糞便検査においては CCP 培地を併用することが有用であると思われた。

#### A. 研究目的

ウェルシュ菌による食中毒は、年間数十件程度で、それほど多いものではないが、1 事例あたりの平均患者数は多く、大規模

事例の多いことで知られている。本菌による食中毒は、大量の食事を取り扱う給食施設や仕出し屋、飲食店等で発生しており、主な原因食品の多くは食肉、野菜あるいは

魚介類等を使った調理品である。これは、ウェルシュ菌汚染率が高い食肉、野菜或いは魚介類を調理することで夾雑菌の多くが死滅するが、熱抵抗性が強いウェルシュ菌芽胞は生存する。再加熱により芽胞の発芽が促進され、嫌気状態となり、ウェルシュ菌の発育に好条件が与えられ、増殖することによる。

このウェルシュ菌の検査において、平成25及び26年度の調査研究において、酵素基質を添加し発育集落の色調により識別を容易にした CHROMagar™ *C. perfringens* 試作品 (CHROMagar 社、以下 CCP 培地) が、卵黄反応を釣菌指標とするカナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地 (基礎培地: 日水製薬、以下 ECW\*培地) と比較して、発育支持能及び鑑別能において遜色が無いことを示した。平成27年度は、CCP 培地が実際の試験検査 (食品或いは糞便) で使用可能かどうかを検証するため、上記2種類の培地に、卵黄反応と黒色集落を釣菌指標とする Trypton sulphite cycloserine 寒天培地 (Oxoid 社、以下 TSC 培地) を加え、比較検討した。

## B. 研究材料及び方法

### 1 材料

#### (1) 供試菌株

使用菌株は、さいたま市健康科学研究センターで分離されたウェルシュ菌

*Clostridium perfringens* S7 (エンテロトキシン遺伝子 *Clostridium perfringens* enterotoxin 陰性株、以下 *cpe* 陰性株) 及び *C. perfringens* S9 (*cpe* 陽性株)、理化学研究所より購入したクロストリジウム属菌 (*C. bifermentans* DSM14991、*C. sporogenes* JCM1416、*C. difficile* DSM1296 及び *C. sordellii* JCM3814) の6株を用いた。いずれも平成26年度における予備試験で使用した菌株である (表1)。

#### (2) 培地

培地は ECW\*培地、CCP 培地及び TSC 培地を用い、卵黄液は卵黄乳液 EX (関東化学) を用いた。対照培地には GAM 寒天培地 (日水製薬、以下 GAM 培地) を用いた。

#### (3) 食品或いは糞便

添加回収のための食品には、ウェルシュ菌食中毒事例における推定原因食品の上位である肉類を含むカレー等、野菜類を含む煮物等及び魚介類を含む煮物等を考慮し (表2)、選定した (図1)。糞便には、ウェルシュ菌が含まれていないことを確認した糞便を選定した (表3)。

## 2. 方法

### (1) 試験菌液の調整

試験菌原液は、保存しておいたウェルシュ菌及びクロストリジウム属菌を変法チオグリコレート培地 (日水製薬) に接種し、アネロパックケンキ (三菱ガス化学) を用いて、 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  で  $22\pm 2$  時間嫌気培養した

培養菌液とした。試験菌液の希釈は、試験菌原液を Yamamoto-Osaki ら<sup>1)</sup>の嫌気性希釈液を用いて 10 倍から 10<sup>7</sup>倍まで 100 倍或いは 10 倍階段希釈して用いた。

## (2) 培養

培養は、発育菌数の測定では昨年度と同様に Miles&Misra ら<sup>2)</sup>の方法 (以下ミスラ法) を用い、その他の試験においては画線培養法を用い、アネロパックケンキ (三菱ガス化学) を用いて、35±2℃で 22±2 時間、嫌気培養した。

## (3) 添加回収

### 1) 食品への添加回収試験

#### ① 添加回収試験 1

生食 222.5ml に *C. perfringens* (S7 或いは S9 のいずれか、試験菌原液) 2.5ml を添加し、1 分間、混釈 (ストマッカー) する。上記に食品 25 g を添加して、さらに 1 分間、混釈する。混釈液を嫌気性希釈液で 10 倍階段希釈した後、3 種類の培地各 2 枚に、ミスラ法で滴下し、嫌気培養する (図 2)。

#### ② 添加回収試験 2

生食 212.5ml にウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか、試験菌原液、100 倍階段希釈) 2.5ml、クロストリジウム属菌 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*) 各 2.5ml を添加し、1 分間、混釈する。上記に食品 25 g を添加して、さらに 1 分間、

混釈する。3 種類の培地各 2 枚に、画線し、嫌気培養する (図 3)。

### ③ 添加回収試験 3

生食 210ml にウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 及び S9 の両方、試験菌原液、10 倍階段希釈) 各 2.5ml、クロストリジウム属菌 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*) 各 2.5ml を添加し、1 分間、混釈する。上記に食品 25 g を添加して、さらに 1 分間、混釈する。3 種類の培地各 2 枚に、画線し、嫌気培養する。3 種類の培地 2 枚から、培地の種類毎に 4 集落を釣菌し、PCR によりエンテロトキシン遺伝子を確認する (図 4)。

### 2) 便への添加回収試験

#### ① 添加回収試験 1

生食 8.9ml にウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか、試験菌原液) 0.1ml を添加し、1 分間、混釈 (ブレンダー) する。上記に便 1 g を添加して、さらに 1 分間、混釈する。混釈液を、嫌気性希釈液で、10 倍階段希釈した後、3 種類の培地各 2 枚に、ミスラ法で滴下し、嫌気培養する (図 5)。

#### ② 添加回収試験 2

生食 8.5ml にウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか、試験菌原液、100 倍階段希釈) 0.1ml、クロストリジウム属菌 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*)

各 0.1ml を添加し、1 分間、混釈する。上記に便 1g を添加して、さらに 1 分間、混釈する。3 種類の培地各 2 枚に、画線し、嫌気培養する (図 6)。

### ③ 添加回収試験 3

生食 8.4ml にウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 及び S9 の両方、試験菌原液、10 倍階段希釈) 各 0.1ml、クロストリジウム属菌 (*C. bifermentans*、*C. sporogenes*、*C. difficile*、*C. sordellii*) 各 0.1ml を添加し、1 分間、混釈する。上記に便 1g を添加して、さらに 1 分間、混釈する。3 種類の培地各 2 枚に、画線し、嫌気培養する。3 種類の培地 2 枚から、培地の種類毎に 4 集落を釣菌し、PCR で、エンテロトキシン遺伝子を、確認する (図 7)。

#### (4) エンテロトキシン遺伝子の確認

DNA は、分離した単一コロニーの中心部から滅菌チップなどで菌体を釣菌、100  $\mu$ l の滅菌蒸留水に懸濁し、95°C5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用した。

PCR はタカラバイオの CPE-1&2 (S020) に従い、20  $\mu$ l 系で実施した。

## C. 結果

### 1 食品からの添加回収

#### (1) 添加回収試験結果 1

ウェルシュ菌のみ (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか) を 3 種類の食品へ

添加し、3 種類の培地を用いて回収試験を実施した結果、ECW<sup>+</sup>培地では回収率が数% ~20 数%、CCP 培地では全てにおいて 80% 以上、さらに TSC 培地では 30% から 90% 程度であった (表 4)。

#### (2) 添加回収試験結果 2

ウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか) に夾雑菌であるクロストリジウム属菌 4 種類を同時に共存させた際の添加回収について検討した結果、試験菌原液を添加した際には ECW<sup>+</sup>培地及び CCP 培地の両方から回収が可能であったが、100 倍階段希釈においては CCP 培地のみから回収できた。一方、TSC 培地においては試験菌原液、100 倍及び 10,000 倍階段希釈のいずれにおいても十分回収が可能であった (表 5)。

#### (3) 添加回収試験結果 3

ウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 及び S9 の両方) と夾雑菌であるクロストリジウム属菌 4 種類を同時に共存させ、*C. perfringens* S9 (*cpe* 陽性株) が回収できるかどうかについて検討した結果、試験菌原液を添加した際にはいずれの培地からも回収が可能であったが、100 倍階段希釈においては ECW<sup>+</sup>培地及び CCP 培地のみから回収できた (表 6)。

### 2 便からの添加回収

#### (1) 添加回収試験結果 1

ウェルシュ菌のみ (*C. perfringens* S7

或いは S9 のいずれか) を 3 種類の便へ添加し、3 種類の培地を用いて回収試験を実施した結果、抗生物質投与済みの便からは全く回収されなかった。それ以外の便からの回収率も低く、数%~20 数%程度であった (表 7)。

#### (2) 添加回収試験結果 2

ウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 或いは S9 のいずれか) に夾雑菌であるクロストリジウム属菌 4 種類を同時に共存させた際の添加回収について検討した結果、試験菌原液を添加した際にのみ ECW 培地及び CCP 培地からは回収が可能であったが、TSC 培地からは回収されなかった (表 8)。

#### (3) 添加回収試験結果 3

ウェルシュ菌 (*C. perfringens* S7 及び S9 の両方) と夾雑菌であるクロストリジウム属菌 4 種類を同時に共存させ、*C. perfringens* S9 (*cpe* 陽性株) が回収できるかどうかについて検討した結果、試験菌原液を添加した際に、CCP 培地のみから回収できた。追加試験として、各濃度から 10 集落釣菌して回収できるかどうかについて検討した結果、試験菌原液を添加した際に、ECW 培地及び CCP 培地において、回収が可能であった (表 9)。

#### D. 考察

ウェルシュ菌 (エンテロトキシン遺伝子

陰性株或いは陽性株) 及びその夾雑菌であるクロストリジウム属菌 4 菌種を食品或いは糞便等に添加し、効率的に回収できるかどうかについて、3 種類の培地 (ECW 培地、CCP 培地及び TSC 培地) を用いて検討した。

その結果、ウェルシュ菌を単独で食品に添加した際には CCP 培地が最も回収率が優れているが、実際の食品のように他の夾雑菌が含まれている可能性がある食品等の場合には TSC 培地のほうが優れていると思われる。食品からのウェルシュ菌等の嫌気性芽胞菌を検出する際には、今回は検討していないがハンドフォード改良寒天培地等に加え、TSC 培地を併用することが有用であると思われる。

一方、便の添加回収においては食品と比較して回収率は格段に劣るものの、食中毒事例発止時等において有症者便等からエンテロトキシン遺伝子陽性のウェルシュ菌を分離する際には、従来から用いられている ECW 培地に加え、CCP 培地を併用することが有用であると思われる。

#### E. 結論

本研究において、卵黄反応と黒色集落を釣菌指標とする TSC 培地は食品からのウェルシュ菌等の嫌気性芽胞菌を検出する際に有用である。酵素基質培地である CCP 培地は夾雑菌であるクロストリジウム属菌との鑑別が容易であることから、食中毒発生時

のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を分離するのに有用である。

#### F. 謝辞

本研究を進めるにあたり、CHROMagar™

C. perfringens 試作品を提供いただきました関東化学株式会社の関係各位、福岡県保健環境研究所病理細菌課の岡元冬樹氏、佐伯かおり氏、平野桂子氏、さいたま市健康科学研究センターの宮崎元伸所長に深謝いたします。

#### G. 参考文献

- 1) Takako Yamamoto-Osaki, Shigeru Kamiya, Sadaaki Sawamura, Masanori Kai and Atsushi Ozawa: Growth inhibition of *Clostridium difficile* by intestinal flora of infant faces in continuous flow culture., *J. Med. Microbiol.*, 40, 179-187, (1994).
- 2) 坂崎利一, 新 細菌培地学講座・上, 200-211, 近代出版, (1978).

#### H. 健康危険情報

なし

#### I. 研究発表

西田ら、ウェルシュ菌の選択分離を目的とした酵素基質培地の基礎的検討、第41回九州衛生環境技術協議会、平成27年10月8日、熊本市、

#### J. 知的財産権の出願、登録状況

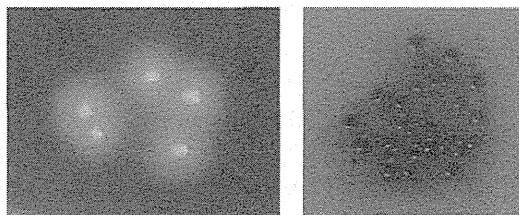
なし

表1 平成26年度の実験結果(一部抜粋)

		CPE 遺伝子	対照(GAM)	比較培地	
				ECW	CCP
Clostridium perfringens	ATCC3624	-	1.0x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>7</sup>	3.5x10 <sup>8</sup>
	ATCC12195	+	4.0x10 <sup>8</sup>	7.9x10 <sup>7</sup>	6.5x10 <sup>8</sup>
	S7	-	1.3x10 <sup>9</sup>	8.9x10 <sup>7</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>
	S9	+	9.1x10 <sup>8</sup>	4.5x10 <sup>8</sup>	5.0x10 <sup>8</sup>
Clostridium bifermentans	DSM14991		6.0x10 <sup>8</sup>	-	6.5x10 <sup>8</sup>
Clostridium sporogenes	JCM1416		4.0x10 <sup>8</sup>	-	2.0x10 <sup>7</sup>
Clostridium .difficile	DSM1296		1.0x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>
Clostridium sordelli	JCM3814		2.5x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>

非選択培地GAMを基本として、

発育能 ECW<CCP  
鑑別能 ECW<CCP  
選択性 ECW>CCP



ECWとCCP上のウェルシュ菌の写真  
(さいたま市健康科学研究センター撮影)

表2 国内におけるウェルシュ菌食中毒事例(2005~2014)における推定原因食品

原因食品(推定含む)	事例数
カレーを含む食品	20
鶏肉等の煮物類	10
ローストビーフ	7
そばろ煮	6
豚肉を含む煮物(肉じゃが、ゴーヤチャンプル、ハッシュドポーク各1含む)	6
牛肉の煮物	6
アサリを含む煮物	5
シチュー	4
蒸し鶏・棒棒鶏	4
あんかけ類	4
かぼちゃを含む煮物	4
さつまあげ煮(かまぼこ1を含む)	3
八宝菜	3
その他の野菜煮物	3
クリーム煮	2
煮浸し	2
その他、のっぺ、昆布豆、つけ麺、ブロッコリーのマヨネーズ和え、卵焼き、海老ボールのスープ煮、スパゲティサラダ、チキンケバブなど	各1
不明	多数

種別毎の原因食品(推定含む)	事例数	
牛・豚・鶏肉等を含むカレー、煮物、シチュー	64	66%
野菜類を含む煮物等	19	20%
魚介類等を含む煮物等	2	2%

図1 ウェルシュ菌を添加した食品検体



食品1

食品2

食品3

表3 添加した便検体の情報

検体番号	有症者	喫食場所	潜伏時間	症状	抗生物質	検査結果		
						細菌・寄生虫	ウイルス	備考
便1	24歳、男	飲食店	約30時間	水様性下痢 5回/日 嘔吐 2回/日 嘔気	クラリスッド錠200mg	陰性	ノロウイルスGIL17	—
便2	31歳、男	寿司屋	約6時間	水様性下痢 5~6回/日 嘔吐 10回/日 嘔気 発熱 37.9°C 頭痛 悪寒 倦怠感	無し	ブドウ球菌検出	実施せず	ヒラメからクドア検出
便3	30歳、女性	寿司屋	約9時間	水様性下痢 2~3回/日 嘔吐 5回/日 嘔気 発熱 37.5°C 頭痛 悪寒 倦怠感	無し	陰性	実施せず	ヒラメからクドア検出



2種類

- CPE(-) 0.1ml
- or
- CPE(+) 0.1ml

*C. perfringens*

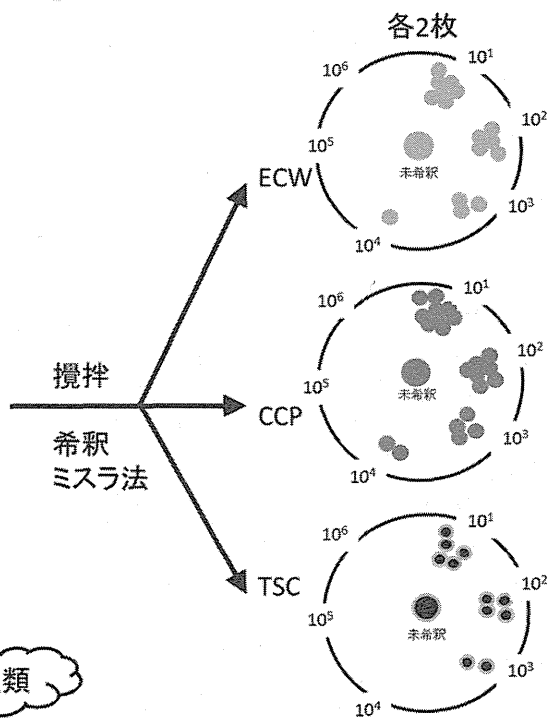
菌液 2.5ml 試験原液

生食 222.5ml

食品 25g

3種類

### 図2 食品からの添加回収試験1



2種類

- CPE(-) 0.1ml
- or
- CPE(+) 0.1ml

*C. perfringens*

菌液 2.5ml 試験原液を100倍希釈

- C. bifermentans* 2.5ml
- C. sprogenes* 2.5ml
- C. difficile* 2.5ml
- C. sordelli* 2.5ml

菌液 10ml 試験原液

生食 212.5ml

食品 25g

3種類

### 図3 食品からの添加回収試験2

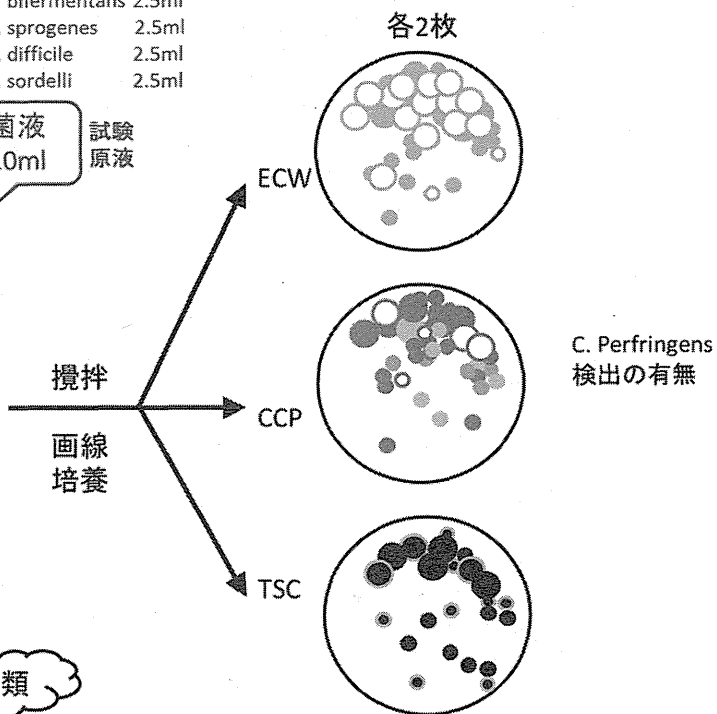


図4 食品からの添加回収試験3

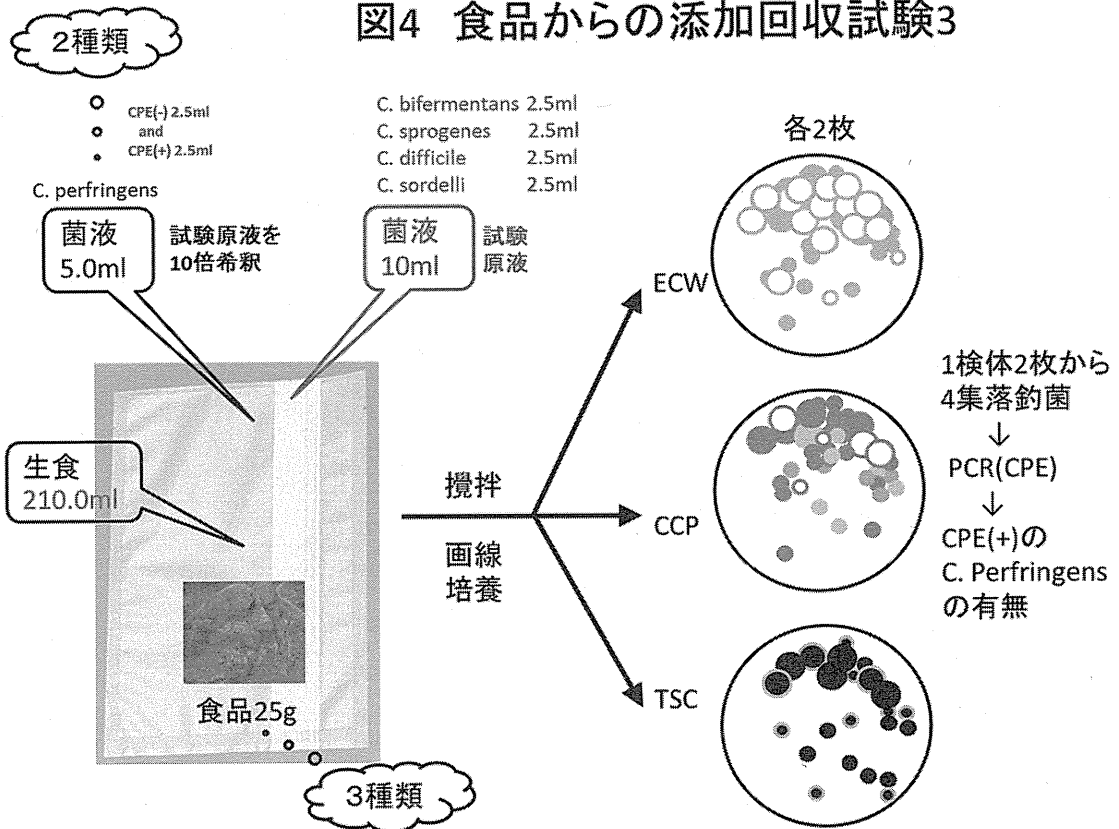
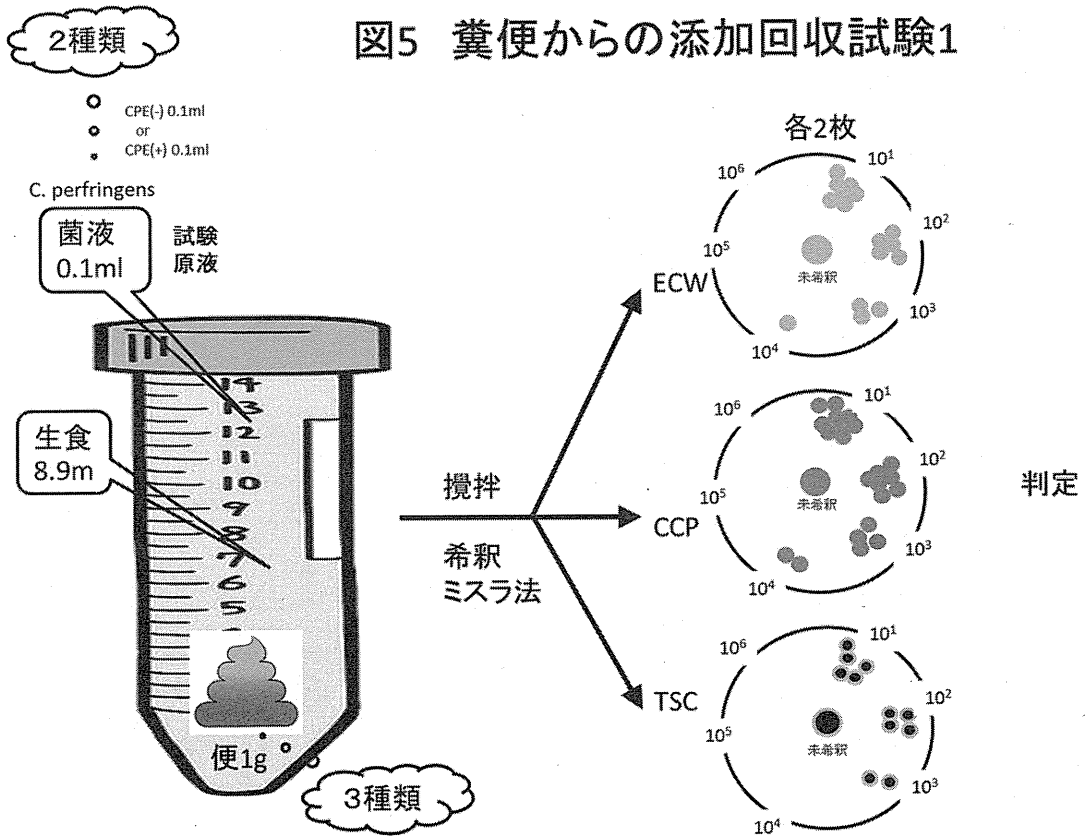


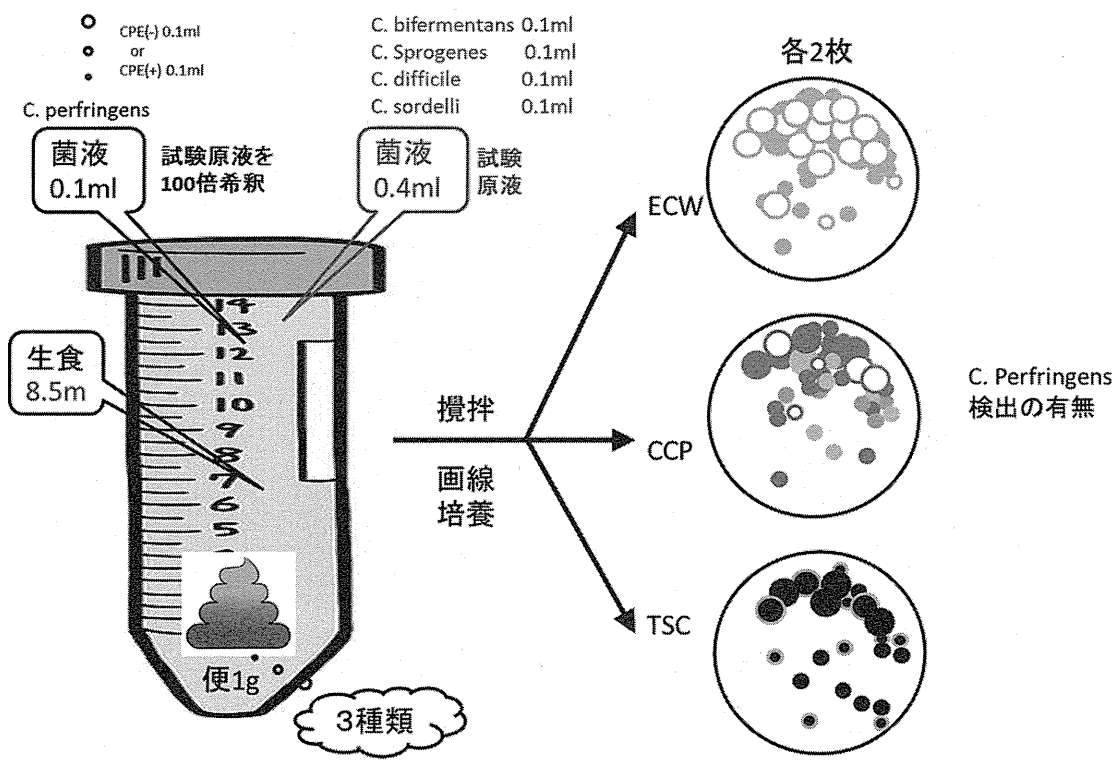
図5 糞便からの添加回収試験1



2種類

- CPE(-) 0.1ml
- or
- CPE(+) 0.1ml

図6 食品からの添加回収試験2



2種類

- CPE(-) 0.1ml
- and
- CPE(+) 0.1ml

図7 糞便からの添加回収試験3

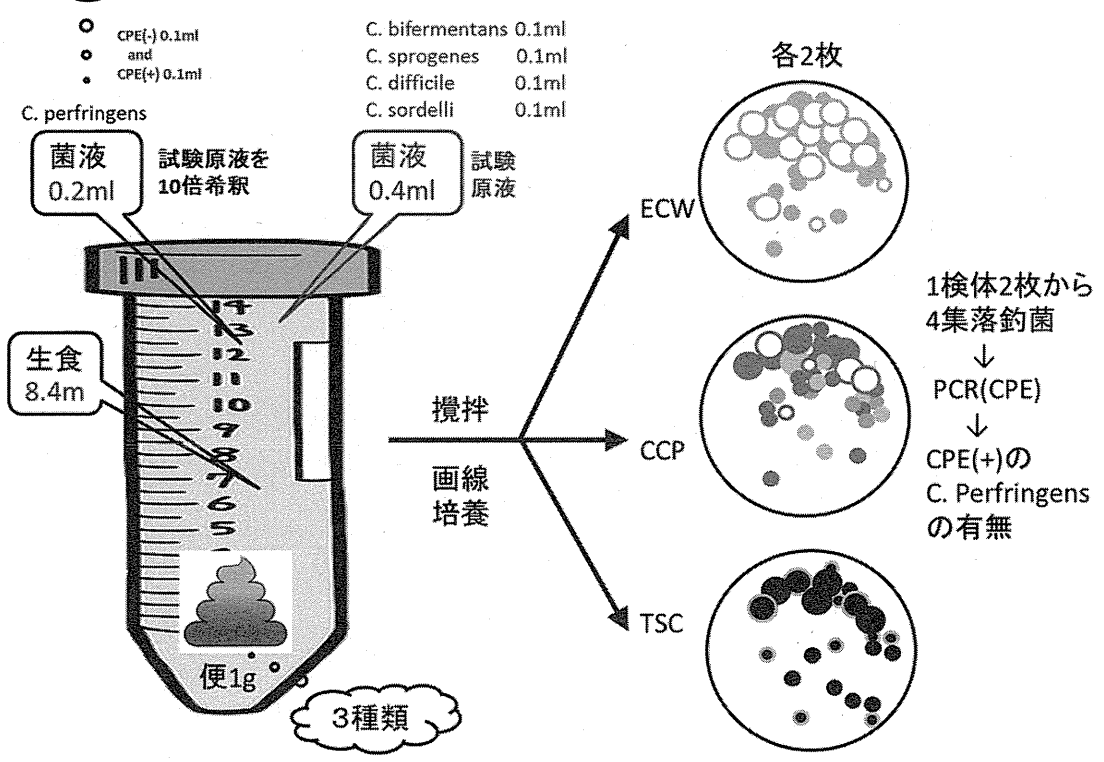
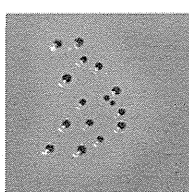
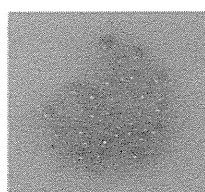
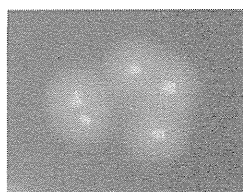


表4 ウェルシュ菌のみを食品に添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

添加	対照 (GAM)		比較した培地					
			ECW		CCP		TSC	
	S7	S9	S7	S9	S7	S9	S7	S9
食品1	26,500 (100%)	21,500 (100%)	7,000 (26.4%)	5,000 (23.3%)	34,750 (131%)	26,000 (121%)	12,000 (45.3%)	7,000 (32.6%)
食品2	26,500 (100%)	21,500 (100%)	2,100 (7.93%)	3,850 (17.9%)	29,925 (113%)	18,500 (86.0%)	24,750 (93.4%)	13,500 (62.8%)
食品3	26,500 (100%)	21,500 (100%)	2,050 (7.74%)	5,250 (24.4%)	40,000 (151%)	25,000 (116%)	10,750 (40.6%)	16,750 (77.9%)



(単位、cfu/g、食品)

ECW、CCP及びTSC上のウェルシュ菌の写真  
(さいたま市健康科学研究センター撮影)

表5 ウェルシュ菌とその共雑菌(クロストリジア属)を食品に添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	C.perfringensの発育状況					
				ECW		CCP		TSC	
	S7	S9		S7	S9	S7	S9	S7	S9
食品1	26500	21500	C. bifermentans, 4.1x10 <sup>3</sup>	+	+	+	++	+	++
	265	215	C. sporogenes, 9.0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	++	++
	3	2	C. difficile, 1.8x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	++	++
食品2	26500	21500	C. bifermentans, 4.1x10 <sup>3</sup>	+	+	+	+	++	++
	265	215	C. sporogenes, 9.0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	+	++	++
	3	2	C. difficile, 1.8x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	++	++
食品3	26500	21500	C. bifermentans, 4.1x10 <sup>3</sup>	+	+	+	++	++	++
	265	215	C. sporogenes, 9.0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	++	++
	3	2	C. difficile, 1.8x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	++	++

(++, 10~99集落)  
(+, 1~9集落)