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

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発
及び汚染実態把握のための研究

令和４年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　大西　貴弘

令和５年４月２５日

目次

I. 総括研究報告
ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究 ------------------------------ 2
大西　貴弘

II. 分担研究報告
食品におけるウエルシュ菌の汚染調査及び迅速検査法の開発 ------------------------------ 19
大西　貴弘

食品中のウエルシュ菌の汚染実態調査 ------------------------------ 32
渡辺　麻衣子

ウエルシュ菌食中毒の汚染実態把握のための研究 ------------------------------ 47
岡部　信彦

ウエルシュ菌食中毒の汚染実態把握のための研究 ------------------------------ 55
三澤　尚明

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ------------------------------ 64

令和４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）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究代表者　大西　貴弘　国立医薬品食品衛生研究所

総括研究報告書

研究分担者	大西　貴弘	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	渡辺麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	三澤　直明	国立大学法人宮崎大学
研究分担者	岡部　信彦	川崎市健康安全研究所
研究協力者	小嶋　由香	川崎市健康安全研究所
研究協力者	川上　浩	共立女子大学
研究協力者	橋元　優香	共立女子大学

研究要旨

ウエルシュ菌食中毒の原因食材を明らかにするために、食品におけるウエルシュ菌の汚染実態調査をおこなった。今回の調査は食中毒の直接の原因となる芽胞を対象に行った。合計 935 検体を調査したところ、カレー粉・香辛料およびイリコ、エビ、海藻などの海産乾燥食品で、エンテロトキシン遺伝子陽性のウエルシュ菌の強い汚染が認められた。一方、従来よりウエルシュ菌食中毒の原因食材と考えられてきた牛肉、豚肉、鶏肉、根菜からはエンテロトキシン陽性ウエルシュ菌はほとんど検出されなかった。特に牛肉、豚肉では、エンテロトキシン陰性を含めウエルシュ菌はほとんど検出出来なかった。以上の結果から、ウエルシュ菌食中毒予防のためにはカレー粉・香辛料および海産乾燥食品に重点を置く必要性が認められた。さらに、本研究では免疫磁気ビーズを用いたウエルシュ菌の迅速検査法を作製した。その結果、増菌培養を行うことなく、10^2 cfu/ml 以上のウエルシュ菌を検出することができた。

Ａ．研究目的

ウエルシュ菌食中毒はグラム陽性桿菌 *Clostridium perfringens* によって引き起こされる食中毒である。ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、調理時の加熱によって発芽し、加熱によって嫌気状態になった食品中で急速に増殖するという特徴を持つ。ウエルシュ菌食中毒は依然発生が続いており、減少の傾向が認められない。その大きな原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌食中毒の原因食品が明らかになっていないことがあげられる。そのた

め原因食品を明らかにするために、これまでに多く食品におけるウエルシュ菌の汚染実態調査が行われてきた。しかし、これまでの調査にはいくつかの問題点が存在するため、原因食品を明らかにできるまでには至っていない。

これまでに行われてきた調査の最も大きな問題点は、芽胞と栄養体を明確に区別せずに行っている調査が多いことである。典型的なウエルシュ菌食中毒は、食品中に存在する芽胞が調理の過程で加熱によって発芽することによって発生する。栄養体は加熱によって死滅するため、食中毒の原因とはならない。よって、食中毒の原因食材を明らかにするためには、芽胞の調査を行わなければならない。また、多くの調査では検体数が数十程度と少なく、検体の種類に非常に偏りがみられる。特定の検体に偏った調査では、その食品中での汚染は理解できるが、他の検体との比較ができないため、食中毒全体の中での重要性を相対的に明らかにすることができない。さらに、動物レベルの調査が多く行われており、動物からウエルシュ菌が分離されるから、その動物が食中毒で重要であると結論を出しているものがある。しかし近年、食肉処理工程の衛生状況が改善されており、また、食肉は店頭に並ぶまでにトリミングなどのリスク低減措置が取られている。このため、動物レベルでの汚染をそのまま消費者が喫食する直前の最終製品の汚染に結び付けることはできない。

そこで本研究では、芽胞を対象とした食品におけるウエルシュ菌の汚染実態調査を行った。食品間で食中毒の原因食品としての重要性を比較できるように、検体として用いる食品の種類を偏りなく選び、統計処理が行える十分な検体数の調査を行った。

我が国のウエルシュ菌食中毒事例では、原因食品を特定できないものが多い。その理由の一つとして、感度の良い迅速検査法が確立していないことが挙げられる。今回はウエルシュ菌に対する免疫磁気ビーズの作製を試みた。特に、多くの検査機関で利用できるようにするために、一般に入手できる試薬だけを用いビーズ法を作製した。

B．研究方法

[１]汚染実態調査

（１）検体

今回の調査では、牛肉、豚肉、鶏肉、根菜、魚、エビ、貝類、海藻、カレー粉、香辛料、だし、乾物を検査対象とした。食肉は、国産、外国産を問わないが、産地（国）がわかるものを購入した。また、冷凍品（解凍品）はなるべく避けるようにした。根菜は泥を落としたり、洗浄したりせず、そのまま使用した。魚、エビはボイルしたものは検査対象外とし、魚の切り身は皮ごと、エビは頭や殻をつけたまま使用した。貝類は、むき身、殻付き、生食用、加熱用のいずれも使用したが、ボイルしたものは検査対象外とした。乾燥品は戻し率を 10 倍と

考え、2.5 g 使用した。

（２） 検査手順

検査手順を図１に示す。検体 25ｇをストマッカーバックに無菌的に採取し、チオグリコレート培地 225mL を加えた。１分間、ストマッカー処理を行った。ストマッカーバックは 70℃、20 分間加熱後、急冷した（試料原液）。この加熱によって、検体中の栄養体は死滅し、芽胞の発芽が促進される。

芽胞数測定のため、試料原液 10mL とハンドフォード改良培地 15mL を 2 枚の嫌気パウチにそれぞれ加え、軽く混ぜた後に空気を追い出し、ヒートシールした。嫌気パウチは、46℃、18 時間培養し、2 枚の嫌気パウチ内の黒色コロニー数の平均を推定ウエルシュ菌芽胞数とした。

ストマッカーバックは、空気を追い出し、ヒートシールをし、42℃、24 時間培養した（増菌培養液）。増菌培養液からは、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、マルチプレックス PCR で増菌培養液中のα毒素（cpa）およびエンテロトキシン（cpe）遺伝子を確認した。

増菌培養液を 2 枚の CHROMagar C. perfringens（CHROMagar）に塗抹し、37℃、24 時間、嫌気培養した。検体によっては、増菌培養液中に PCR 阻害物質が含まれているため、増菌培養後の PCR 反応が阻害される場合がある。そのため、増菌培養後の PCR が陰性になった場合でも、CHROMagar への塗抹は必ず行った。CHROMagar 上のオレンジ色のウエルシュ菌が疑われるコロニーを 5 個取り、*cpa*、*cpe* 保有状況をコロニーPCR で確認するとともに、生化学性状試験（グラム染色、好気培養等）、API、質量分析装置などを用い、ウエルシュ菌であるかどうか判定した。エンテロトキシン陽性ウエルシュ菌と同定された場合、7.5％DMSO を含むチオグリコレート培地に浮遊させ、−30℃以下で保存した。

増菌培養後の PCR もしくはコロニーPCR のいずれかで *cpa* もしくは *cpe* が陽性になった場合、その検体はそれぞれの遺伝子が陽性であると判定した。

（３） マルチプレックス PCR

cpa および *cpe* を検出するマルチプレックス PCR は Guran らの方法を参考にして行った(H. S. Guran et. al., Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 77-82)。PCR の条件を図 2 に示す。PCR 後、1.5％のアガロースゲル電気泳動を行い、324 bp のバンドが検出された場合 *cpa* 陽性、233 bp のバンドが検出された場合 *cpe* 陽性と判定した。

［２］迅速検査法

免疫磁気ビーズの作製にあたっては、入手し易い試薬を用いること優先した。磁気ビーズとしては Dynabeads™ Protein A for Immunoprecipitation（Thermo Fisher Scientific, #DB10001）、ウエルシュ菌に対する抗体として *C. perfringens* Rabbit IgG polyclonal antibody（Thermo Fisher Scientific, #PA1-85310）を使用した。検

査手順を図3に示す。菌液1mLにウエルシュ菌抗体10μgを加え、チューブを1時間回転させた。その後、あらかじめPBSで洗浄しておいた磁気ビーズを10μL加え、1時間回転させた。その後、チューブをマグネチックスタンドに置き、PBSで磁気ビーズを洗浄した。最終的に磁気ビーズはCHROMagarに塗抹、もしくは磁気ビーズからアルカリ熱抽出法を用いてDNAを抽出し、汚染実態調査で用いたマルチプレックスPCR法を用いて、*cpa*、*cpe*の検出を行った。

検体としては、既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたチオグリコレート培地、もしくはレトルトカレーをチオグリコレート培地で10倍希釈したものに既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたものを使用した。

C. 研究結果

［1］汚染実態調査

増菌培養後のPCRの結果を表1に、分離培養後のコロニーPCRの結果を表2に示した。また、増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめた最終結果を表3に示した。

カレー粉・香辛料は204検体調査した。増菌培養後のPCRでは36検体（17.6%）が*cpa*陽性、11検体（5.4%）が*cpe*陽性となった。分離培養後のコロニーPCRでは78検体（38.2%）が*cpa*陽性、8検体（3.9%）が*cpe*陽性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に204検体中、79検体（38.7%）が*cpa*陽性、15検体（7.4%）が*cpe*陽性となった。また、*cpa*陽性79検体中、15検体が*cpe*陽性（19.0%）となった。ハンドフォード改良培地上に、多くのコロニーが発育した。また、*CPA*が陰性の検体からも、多くのコロニーがハンドフォード改良培地上で発育した。

貝は65検体調査した。増菌培養後のPCRでは31検体（47.7%）が*cpa*陽性、6検体（9.2%）が*cpe*陽性となった。分離培養後のコロニーPCRでは41検体（63.1%）が*cpa*陽性、6検体（9.2%）が*cpe*陽性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に65検体中、44検体（67.7%）が*cpa*陽性、8検体（12.3%）が*cpe*陽性となった。また、*cpa*陽性44検体中、8検体が*cpe*陽性（18.1%）となった。主にカキ、シジミ、アサリで*cpa*と*cpe*が陽性になった。

素干しエビ・イリコは21検体調査した。増菌培養後のPCRでは11検体（52.3%）が*cpa*陽性、2検体（9.5%）が*cpe*陽性となった。分離培養後のコロニーPCRでは13検

体（61.9%）が *cpa* 陽性、1 検体（4.8%）が *cpe* 陽性となった。増菌培養後の PCR と分離培養後のコロニーPCR の結果をまとめると、最終的に 21 検体中、13 検体(61.9%)が *cpa* 陽性、2 検体（9.5%）が *cpe* 陽性となった。また、*cpa* 陽性 13 検体中、2 検体が *cpe* 陽性（15.3%）となった。

海藻は 39 検体調査した。増菌培養後の PCR では 4 検体（10.3%）が *cpa* 陽性、1 検体（2.6%）が *cpe* 陽性となった。分離培養後のコロニーPCR では 4 検体（10.3%）が *cpa* 陽性、1 検体（2.6%）が *cpe* 陽性となった。増菌培養後の PCR と分離培養後のコロニーPCR の結果をまとめると、最終的に 39 検体中、6 検体（15.3%）が *cpa* 陽性、1 検体(2.6%)が *cpe* 陽性となった。また、*cpa* 陽性 6 検体中、1 検体が *cpe* 陽性（16.7%）となった。*cpa* 陽性となったのは、昆布と海苔であった。

魚・エビは 79 検体調査した。増菌培養後の PCR では 3 検体(3.8%)が *cpa* 陽性、2 検体（2.5%）が *cpe* 陽性となった。分離培養後のコロニーPCR では 2 検体（2.5%）が *cpa* 陽性となった。増菌培養後の PCR と分離培養後のコロニーPCR の結果をまとめると、最終的に 79 検体中、5 検体(6.3%)が *cpa* 陽性、2 検体(2.5%)が *cpe* 陽性となった。また、*cpa* 陽性 5 検体中、2 検体が *cpe* 陽性（40.0%）となった。エビ、シラス、アジが *CPA* 陽性となり、エビから *CPE* が検出された。すべての検体で、ハンドフォード改良培地上にコロニーの発育は認められなかった。

乾物は 96 検体調査した。増菌培養後の PCR では 40 検体（41.7%）が *cpa* 陽性、2 検体（2.1%）が *cpe* 陽性となった。分離培養後のコロニーPCR では 40 検体（41.7%）が *cpa* 陽性、1 検体（1.0%）が *cpe* 陽性となった。増菌培養後の PCR と分離培養後のコロニーPCR の結果をまとめると、最終的に 96 検体中、46 検体（47.9%）が *cpa* 陽性、2 検体(2.1%)が *cpe* 陽性となった。また、*cpa* 陽性 46 検体中、2 検体が *cpe* 陽性（4.3%）となった。切り干し大根やそば粉からも *CPA* が検出された。また、*CPA* が陰性の検体からも、多くのコロニーがハンドフォード改良培地上で発育した。

牛肉は国産 55 検体、海外産 40 検体、計 95 検体調査した。しかし、国産、海外産にかかわらず、*cpa*、*cpe* は全検体陰性となった。

豚肉は国産 80 検体、海外産 30 検体、計 110 検体調査した。その結果、3 検体で *cpa* が陽性（2.7%）になったが、*cpe* は全検体陰性であった。

鶏肉は105検体調査した。増菌培養後のPCRでは79検体（75.2%）が*cpa*陽性、2検体（1.9%）が*cpe*陽性となった。分離培養後のコロニーPCRでは79検体（75.2%）が*cpa*陽性、*cpe*は陰性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に105検体中、79検体（75.2%）が*cpa*陽性、2検体（1.9%）が*cpe*陽性となった。また、*cpa*陽性79検体中、2検体が*cpe*陽性（2.5%）となった。部位による検出率の差は認められなかった。

根菜は121検体調査した。増菌培養後のPCRでは34検体（28.1%）が*cpa*陽性、1検体（0.8%）が*cpe*陽性となった。分離培養後のコロニーPCRでは34検体（28.1%）が*cpa*陽性、*cpe*陰性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に121検体中、37検体（30.6%）が*cpa*陽性、1検体（0.8%）が*cpe*陽性となった。また、*cpa*陽性37検体中、1検体が*cpe*陽性（2.7%）となった。

［2］迅速検査法

チオグリコレート培地に既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたものを検体として使用し、今回作製した磁気ビーズの感度を検討した。その結果、磁気ビーズを塗沫した場合、磁気ビーズからDNAを抽出しPCRで検出した場合のいずれでも、検体中に10^2 cfu/mL以上のウエルシュ菌が存在していれば、検出することができた。次に、カレーの10倍乳剤を作製し、同様の実験を行ったが感度は変わらず、菌濃度が10^2 cfu/mL以上の場合、検出することができた。

D．考察

ウエルシュ菌食中毒はカレーやシチュー、煮物などで多く発生している。特に肉類を使用した料理で発生しやすいと考えられてきた。また、ウエルシュ菌は根菜などの野菜を使用した料理でも発生しやすいと考えられてきた。実際、動物の腸内容物や土壌からウエルシュ菌の分離が報告されている。しかし、その多くがエンテロトキシン陰性株であり、エンテロトキシン陽性株の汚染源は不明のままであった。また、これらの調査は序論の項で述べたような多くの問題点を抱えていた。本研究では、従来の調査の問題点を克服するために、*cpe*保有の芽胞に焦点を絞り、検体とする食品のカテゴリーに偏りがないようにして、調査を行った。今回の調査から、*cpe*陽性芽胞の汚染が強く認められたのは、カレー粉・香辛料、貝、イリ

コ・エビ、海藻などであった。一方、*cpe* 陽性芽胞の汚染があまり認められなかったのが、従来、ウエルシュ菌食中毒の原因食材として重要であると考えられてきた牛肉、豚肉、鶏肉、根菜であった。今回の結果から、ウエルシュ菌食中毒の予防を考える上で、カレー粉・香辛料、貝、イリコ・エビ、海藻が重要であると考えられた。

カレーは我が国におけるウエルシュ菌食中毒の代表的な原因食品である。従来はカレーに使用される肉類や根菜がウエルシュ菌の汚染源であると考えられてきた。しかし今回の調査結果から、肉類や根菜よりも、カレー粉や香辛料が汚染源である可能性が示唆された。今回の調査では、粉末タイプのカレー粉からだけでなく、一般家庭で用いられる固形のカレールーからもウエルシュ菌が検出されており、ウエルシュ菌食中毒におけるカレー粉・香辛料の重要性が示唆された。

ウエルシュ菌食中毒が肉料理と結びつきが強い印象を受けるのは、ローストビーフなどで発生している海外の事例の影響が強いのではないかと思われる。しかし、ローストビーフをはじめとする海外の肉料理では、ふんだんに香辛料が使用されているものが多く、肉が汚染源なのか、香辛料が汚染源なのか、特定が難しいのではないかと考えられる。実際、FDA や USDA も香辛料とウエルシュ菌食中毒の関係性にはすでに着目しており警告を発している。現在、我が国ではカレーが香辛料を使用した代表的な料理であるが、外食を中心に香辛料を使用した料理が急速に普及している。今後、香辛料を汚染源とするカレー以外のウエルシュ菌食中毒が発生する可能性が危惧される。

今回の調査で、香辛料と並んで *cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染が強く見られたのが貝、イリコ・エビ、海藻などの海産物であった。*cpe* 陽性ウエルシュ菌の由来については、以前より議論されてきており、動物由来、土壌由来などが代表的である。しかし、動物や土壌からの分離ウエルシュ菌は *cpe* 保有率が低いため、他にも汚染源があるのではないかと考えられてきた。最近の研究では、*cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染源はヒトであり、その排泄物に含まれる *cpe* 陽性ウエルシュ菌が下水処理場で濃縮され、河川に排出され、最終的に汽水域や沿岸を汚染していることが報告されている。今回の調査では、貝で *cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染が強く認められた。ウエルシュ菌食中毒における貝の原因食材と

しての重要性は不明であるが、貝で強い汚染が認められたことは、我が国でも水を介したウエルシュ菌汚染が発生しており、沿岸部が *cpe* 陽性ウエルシュ菌に汚染されていることを示唆する物である。また同様に、イリコ、エビ、海藻などの海産乾燥食品からも今回の調査で *cpe* 陽性ウエルシュ菌が検出された。我が国では、煮物などの和食をはじめ様々な料理で海産乾燥食品が出汁をとるのに使用され、また、具材としても使用されている。このため、海産乾燥食品もウエルシュ菌食中毒の原因食材となりうることが考えられた。

香辛料は栽培に灌漑用水や河川の水が使用されており、また、収穫された後、洗浄される。さらに香辛料の種類によっては、収穫後、水に長期間浸漬し、発酵させ、外部の果肉が除去される。このように、香辛料の生産には多量の水が使用される。このため、生産国の水の衛生状況によっては、水を介した香辛料のウエルシュ菌汚染が発生しているのではないかと考えられた。

香辛料や海産乾燥食品に対して、今回の調査で *cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染があまり認められなかったのは食肉である。特に牛肉からはウエルシュ菌は一切検出されず、豚肉からは *cpe* 陰性ウエルシュ菌がわずかに検出されただけである。鶏肉では、*cpe* 陰性ウエルシュ菌の陽性率は非常に高かったが、*cpe* 陽性ウエルシュ菌の陽性率は低かった。近年、ウシやブタの食肉処理における衛生管理が進んでいるため、食肉における汚染が少なくなってきているのではないかと考えられた。また、最終製品として店頭で販売される前に、ブロック肉の外側をトリミングしてからスライスし販売している業者もある。このような衛生管理措置が、牛肉や豚肉における低いウエルシュ菌汚染率の要因のひとつになっているのではないかと考えられた。また、今回の調査では芽胞だけを調査対象としたため、陽性率はさらに下がったのではないかと考えられた。一方、食肉処理における衛生管理の改善があまり進んでいないことが、鶏肉におけるウエルシュ菌の汚染率の高さとして現れているのではないかと考えられた。しかし、従来の報告同様、今回の調査でも鶏肉からウエルシュ菌は検出されるが、*cpe* 陽性ウエルシュ菌はほとんど検出されなかった。これらの結果は、ニワトリが *cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染源として重要でない可能性を示唆している。今後、動物個体レベルの汚染と

最終製品としての食肉における汚染の関連性について調査を進める必要があると考えられた。

根菜も、鶏肉同様に多くの検体でウエルシュ菌が検出されたが、エンテロトキシン保有ウエルシュ菌の検出率は低かった。このことから、根菜を汚染源としたウエルシュ菌食中毒の発生リスクは、香辛料や海産乾燥食品に比べて低いのではないかと考えられた。

今回、推定ウエルシュ菌芽胞数の測定のために、ハンドフォード改良培地でのコロニーの発育を調査した。しかし、ハンドフォード改良培地の選択性はそれほど強くないためか、ウエルシュ菌以外のものと思われる黒色コロニーが培地一面に広がったりしたため、計数には利用できなかった。特にカレー粉・香辛料では、*cpa* が陰性の検体でもハンドフォード改良培地上で多くのコロニーが発育したため、ウエルシュ菌以外のおそらくクロストリジウム属菌の汚染を強く受けていることが示唆された。また、魚・エビでは、*cpa* が陽性となった検体でも、ハンドフォード改良培地上にコロニーが認められなかった。このことから、魚・エビにおけるウエルシュ菌の汚染は、非常に低いものであることが示唆された。

今回作製した免疫磁気ビーズ法は 10^2 cfu/mL 以上の菌濃度でウエルシュ菌を検出することが出来た。多くのウエルシュ菌食中毒事例では、食品中の菌濃度が 10^4 cfu/mL 以上になると考えられているため、食中毒の原因究明に使用する場合、十分な検出感度を有していると考えられた。ビーズから DNA を抽出し PCR を行なった場合は当日中に、ビーズを選択培地に塗抹した場合は翌日にウエルシュ菌の存在を確認することができる。いずれにせよ、増菌培養を行わなくても済むため、増菌培養にかかる 1 日を短縮することができる。今後は、検出感度をさらに向上させ、食中毒の原因究明だけでなく、汚染調査にも使用できるようにしたい。カレー以外の他の食品中でも使用できるか検討する必要があると思われる。また、今回使用した菌株以外でも同様の結果が得られるかどうか検討する必要があると思われる。

E．結論

今回の調査結果から、香辛料・カレー粉やイリコ、エビ、海藻などの海産乾燥食品がウエルシュ菌食中毒予防のために重要であると考えられた。一方、これまでウエルシュ菌食中毒の原因食材であると考えられてきた牛肉、豚肉、鶏肉、根菜

による食中毒発生リスクは低いと考えられた。

今回作製した迅速検査法は 10^2 cfu/mL 以上のウエルシュ菌を検出することができた。今後、特異性を確認するとともに、検出感度をさらに向上させ、食中毒の原因究明だけでなく、汚染調査にも使用できるようにしたい。

Ｆ．健康危険情報

なし

Ｇ．研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

なし

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況

なし

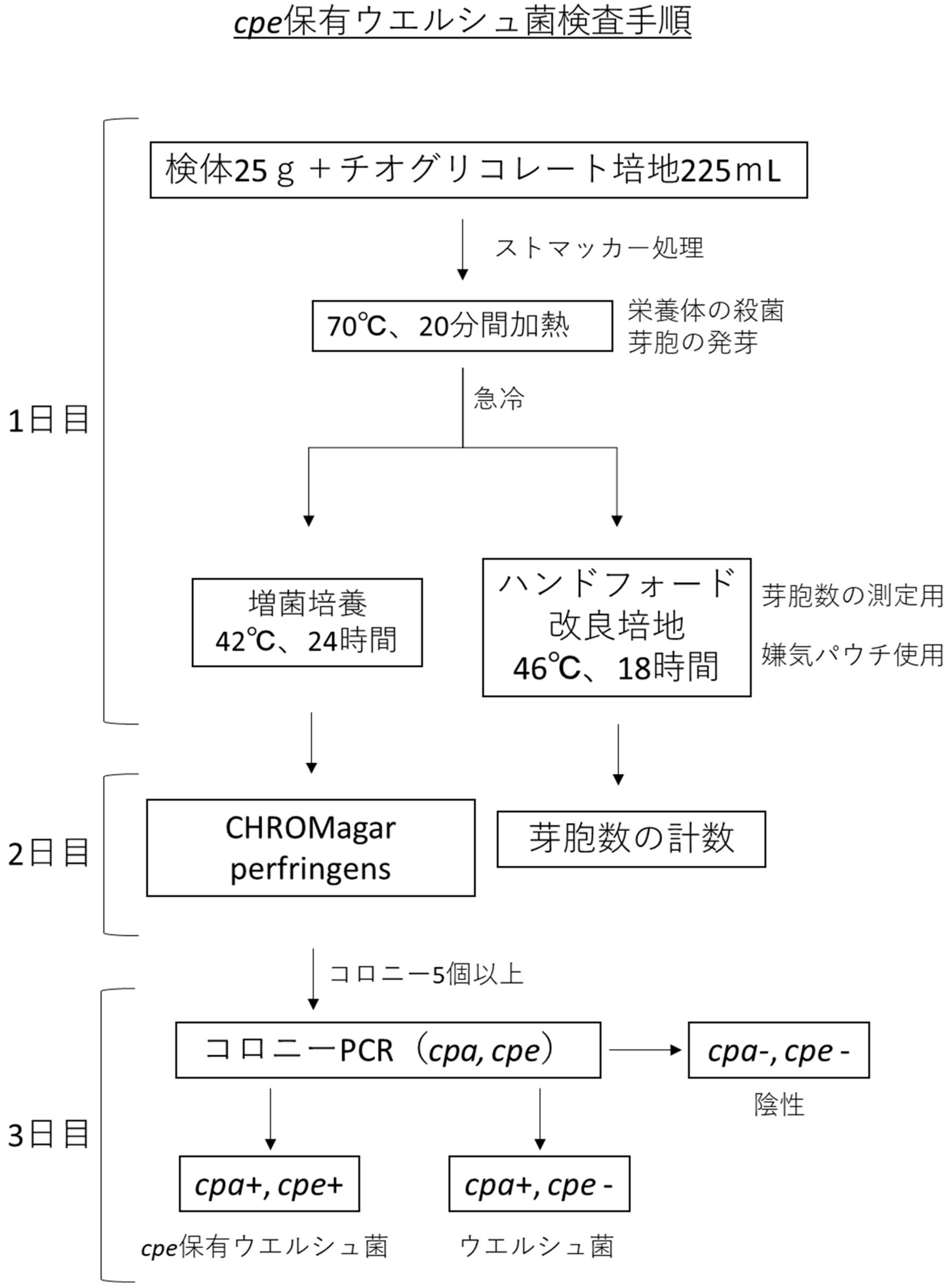

図１　汚染実態調査検査手順

- プライマー

multi-cpa-F：GCTAATGTTACTGCCGTTGA

multi-cpa-R：CCTCTGATACATCGTGTAAG

multi-cpe-F：GGAGATGGTTGGATATTAGG

multi-cpe-R：GGACCAGCAGTTGTAGATA

- 反応液

*Quick Taq HS DyeMix	12.5 μL
multi-cpa-F（50μM）	0.1 μL
multi-cpa-R（50μM）	0.1 μL
multi-cpe-F（50μM）	0.1 μL
multi-cpe-R（50μM）	0.1 μL
Template	2.0 μL
H_2O	10.0 μL

*Quick Taq HS DyeMix (TYOBO, #DTM-101)

- プログラム

94℃	2 min	
94℃	30 sec	
55℃	1 min	
68℃	1 min	×30
68℃	5 min	

- 判定

324 bp → *cpa*（アルファ毒素遺伝子）陽性

233 bp → *cpe*（エンテロトキシン遺伝子）陽性

図 2　マルチプレックス PCR の条件

菌液 1mLに抗ウエルシュ菌抗体 10 µgを加える

↓

1時間、回転

↓

PBSで洗浄した磁気ビーズを10 µL加え、1時間回転

↓

マグネチックスタンドにセットしPBSで洗浄

↓ ↓

クロモアガーに塗抹 **DNA抽出 → PCR（*cpa, cpe*）**

図 3　迅速検査法手順

表１　増菌培養後の PCR の結果

品目	検体数	CPA陽性（%）	CPE陽性（%）	CPE/CPA（%）
カレー粉 香辛料	204	36 (17.6)	11 (5.4)	30.5
貝	65	31 (47.7)	6 (9.2)	19.4
素干しエビ イリコ	21	11 (52.3)	2 (9.5)	18.2
海藻	39	4 (10.3)	1 (2.6)	25.0
魚・エビ	79	3 (3.8)	2 (2.5)	66.7
乾物	96	40 (41.7)	2 (2.1)	5.0
牛肉	95	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
豚肉	110	3 (2.7)	0 (0.0)	0.0
鶏肉	105	79 (75.2)	2 (1.9)	2.5
根菜	121	34 (28.1)	1 (0.8)	2.9

表２　コロニーPCR の結果

品目	検体数	CPA陽性（%）	CPE陽性（%）	CPE/CPA（%）
カレー粉 香辛料	204	78 (38.2)	8 (3.9)	10.3
貝	65	41 (63.1)	6 (9.2)	14.6
素干しエビ イリコ	21	13 (61.9)	1 (4.8)	7.7
海藻	39	4 (10.3)	1 (2.6)	25.0
魚・エビ	79	2 (2.5)	0 (0.0)	0.0
乾物	96	40 (41.7)	1 (1.0)	2.5
牛肉	95	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
豚肉	110	3 (2.7)	0 (0.0)	0.0
鶏肉	105	79 (75.2)	0 (0.0)	0.0
根菜	121	34 (28.1)	0 (0.0)	0.0

表３　汚染実態調査の結果

品目	検体数	CPA陽性（%）	CPE陽性（%）	CPE/CPA（%）
カレー粉 香辛料	204	79 (38.7)	15 (7.4)	19.0
貝	65	44 (67.7)	8 (12.3)	18.1
素干しエビ イリコ	21	13 (61.9)	2 (9.5)	15.3
海藻	39	6 (15.3)	1 (2.6)	16.7
魚・エビ	79	5 (6.3)	2 (2.5)	40
乾物	96	46 (47.9)	2 (2.1)	4.3
牛肉	95	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
豚肉	110	3 (2.7)	0 (0.0)	0.0
鶏肉	105	79 (75.2)	2 (1.9)	2.5
根菜	121	37 (30.6)	1 (0.8)	2.7

令和 5 年　3　月　30日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　合田　幸広

次の職員の令和４年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　衛生微生物部　第二室長

（氏名・フリガナ）　大西　貴弘（オオニシ　タカヒロ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	☑	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	☑	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	☑	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□	☑	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑　無 □(無の場合はその理由：　)
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑　無 □(無の場合は委託先機関：　)
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑　無 □(無の場合はその理由：　)
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　)

令和４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）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究代表者　大西　貴弘　国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品におけるウエルシュ菌の汚染調査及び迅速検査法の開発

研究分担者　大西　貴弘　国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品におけるエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌芽胞の汚染実態調査を行った。カレー粉・香辛料、海産食品、食肉、根菜など合計413検体の調査を行った。増菌培養液および分離コロニーからDNAを抽出し、アルファ毒素遺伝子（*cpa*）をA型ウエルシュ菌のマーカーとして、さらにエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）の検出を行った。強い汚染が認められたのが、カレー粉・香辛料、貝、根菜であった。特にカレー粉・香辛料と貝は*cpa*陽性検体に占める*cpe*陽性検体の割合が高く、*cpe*陽性芽胞がこれらの食品に特に汚染している可能性が示唆された。一方、以前からウエルシュ菌食中毒発生の原因と考えられていた牛肉、豚肉、鶏肉からは*cpe*は検出されなかった。特に、牛肉からは*cpe*だけでなく、*cpa*もすべての検体で陰性であった。鶏肉の*cpa*陽性率は高かったが、*cpe*は検出されなかった。今回の結果から、カレーで頻発しているウエルシュ菌食中毒は主にカレー粉や香辛料からの汚染によるものであることが示唆された。

免疫磁気ビーズを用いたウエルシュ菌の迅速検査法を作製した。その結果、増菌培養を行うことなく、10^2 cfu/ml以上のウエルシュ菌を検出することができた。

Ａ．研究目的

ウエルシュ菌食中毒はグラム陽性桿菌*Clostridium perfringens*によって引き起こされる食中毒である。ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、調理時の加熱によって発芽し、加熱によって嫌気状態になった食品中で急速に増殖するという特徴を持つ。ウエルシュ菌食中毒は依然発生が続いており、減少の傾向が認められない。その大きな原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌食中毒の原因食品が明らかになっていないことがあげられる。そこで、食品におけるウエルシュ菌の汚染状況を調査した。今回は、食中毒の直接の原因となるエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）保有ウエルシュ菌芽胞に特に着目して調査した。検体としては、これまでウエルシュ菌食中毒の発生原因として考えられてきた食肉や根菜をはじめ、カレー粉・香辛料や水産食品、乾物などを対象とした。わが国

では、カレーを原因とするウエルシュ菌食中毒が多発しているため、食肉、根菜に加え、カレー粉・香辛料の調査を行った。また、エンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌は、ヒト由来であり、排泄物を介して、河川や海を汚染しているという報告がある。そのため、水産食品の調査を行った。さらに、ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、乾燥状態に非常に強い。そこで、乾物にウエルシュ菌汚染がみられるのではないかと考え、乾物の調査を行った。

我が国のウエルシュ菌食中毒事例では、原因食品を特定できないものが多い。その理由の一つとして、感度の良い迅速検査法が確立していないことが挙げられる。今回はウエルシュ菌に対する免疫磁気ビーズの作製を試みた。特に、多くの検査機関で利用できるようにするために、一般に入手できる試薬だけを用いビーズ法を作製した。

Ｂ． 研 究 方 法

［１］汚染実態調査

（１）検体

今回の調査では、牛肉、豚肉、鶏肉、根菜、魚、エビ、貝類、海藻、カレー粉、香辛料、乾物を検査対象とした。食肉は、国産、外国産を問わないが、産地（国）がわかるものを購入した。また、冷凍品（解凍品）はなるべく避けるようにした。根菜は泥を落としたり、洗浄したりせず、そのまま使用した。魚、エビはボイルしたものは検査対象外とし、魚の切り身は皮ごと、エビは頭や殻をつけたまま使用した。貝類は、むき身、殻付き、生食用、加熱用のいずれも使用したが、ボイルしたものは検査対象外とした。乾燥品は戻し率を 10 倍と考え、2.5 ｇ使用した。

（２） 検査手順

検査手順を図 1 に示す。検体 25ｇをストマッカーバックに無菌的に採取し、チオグリコレート培地 225mL を加えた。１分間、ストマッカー処理を行った。ストマッカーバックは 70℃、20 分間加熱後、急冷した（試料原液）。この加熱によって、検体中の栄養体は死滅し、芽胞の発芽が促進される。

芽胞数測定のため、試料原液 10mL とハンドフォード改良培地 15mL を 2 枚の嫌気パウチにそれぞれ加え、軽く混ぜた後に空気を追い出し、ヒートシールした。嫌気パウチは、46℃、18 時間培養し、2 枚の嫌気パウチ内の黒色コロニー数の平均を推定ウエルシュ菌芽胞数とした。

ストマッカーバックは、空気を追い出し、ヒートシールをし、42℃、24 時間培養した（増菌培養液）。増菌培養液からは、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、マルチプレックス PCR で増菌培養液中のα毒素（cpa）およびエンテロトキシン（cpe）遺伝子を確認した。

増菌培養液を 2 枚の CHROMagar C. perfringens(CHROMagar)に塗抹し、37℃、24 時間、嫌気培養した。検体によっては、増菌培養液中に PCR 阻害物質が含まれて

いるため、増菌培養後のPCR反応が阻害される場合がある。そのため、増菌培養後のPCRが陰性になった場合でも、CHROMagarへの塗抹は必ず行った。CHROMagar上のオレンジ色のウエルシュ菌が疑われるコロニーを5個取り、*cpa*、*cpe*保有状況をコロニーPCRで確認するとともに、生化学性状試験（グラム染色、好気培養等)、API、質量分析装置などを用い、ウエルシュ菌であるかどうか判定した。エンテロトキシン陽性ウエルシュ菌と同定された場合、7.5%DMSOを含むチオグリコレート培地に浮遊させ、-30℃以下で保存した。

増菌培養後のPCRもしくは分離培養後のコロニーPCRのいずれかで*cpa*もしくは*cpe*が陽性になった場合、その検体はそれぞれの遺伝子について陽性であると判定した。

（３） マルチプレックスPCR

*cpa*および*cpe*を検出するマルチプレックスPCRはGuran らの方法を参考にして行った(H. S. Guran et. al., Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 77-82)。PCRの条件を図2に示す。PCR後、1.5%のアガロースゲル電気泳動を行い、324 bpのバンドが検出された場合*cpa*陽性、 233 bpのバンドが検出された場合*cpe*陽性と判定した。

［2］迅速検査法

免疫磁気ビーズの作製にあたっては、入手し易い試薬を用いること優先した。磁気ビーズとしてはDynabeads™ Protein A for Immunoprecipitation (Thermo Fisher Scientific, #DB10001)、ウエルシュ菌に対する抗体として*C. perfringens* Rabbit IgG polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific, #PA1-85310)を使用した。検査手順を図3に示す。菌液1mLにウエルシュ菌抗体10μgを加え、チューブを1時間回転させた。その後、あらかじめPBSで洗浄しておいた磁気ビーズを10μL加え、1時間回転させた。その後、チューブをマグネチックスタンドに置き、PBSで磁気ビーズを洗浄した。最終的に磁気ビーズはCHROMagarに塗抹、もしくは磁気ビーズからアルカリ熱抽出法を用いてDNAを抽出し、汚染実態調査で用いたマルチプレックスPCR法を用いて、*cpa*、*cpe*の検出を行った。

検体としては、既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたチオグリコレート培地、もしくはレトルトカレーをチオグリコレート培地で10倍希釈したものに既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたものを使用した。

Ｃ．研究結果

［１］汚染実態調査

今回は、413検体の調査を行った。増菌培養後のPCRの結果を表1に、分離培養後のコロニーPCRの結果を表2に示した。また、増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめた最終結果を表3に示した。

カレー粉・香辛料は121検体調査した。増菌培養後のPCRでは16検体（13.2％）が *cpa* 陽性、5検体（4.1％）が *cpe* 陽性となった。分離培養後のコロニーPCRでは42検体（34.7％）が *cpa* 陽性、5検体（4.1％）が *cpe* 陽性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に121検体中、42検体(34.7％)が *cpa* 陽性、9検体（7.1％）が *cpe* 陽性となった。また、*cpa* 陽性42検体中、9検体が *cpe* 陽性（21.4％）となった。増菌培養後のPCRより分離培養後のPCRの方が *cpa* 陽性検体数が多かった。ハンドフォード改良培地上で、多くの黒色コロニーが発育した。また、*cpa* 陰性でもハンドフォード改良培地上でコロニーが発育するものがあった。

貝は29検体調査した。増菌培養後のPCRでは11検体（37.9％）が *cpa* 陽性、1検体（3.4％）が *cpe* 陽性となった。分離培養後のコロニーPCRでは17検体（58.6％）が *cpa* 陽性、2検体（6.9％）が *cpe* 陽性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に29検体中、20検体（69.0％）が *cpa* 陽性、3検体（10.3％）が *cpe* 陽性となった。また、*cpa* 陽性20検体中、3検体が *cpe* 陽性（15.0％）となった。*cpa* 陽性となったのは、主にカキとアサリで、カキ3検体が *cpe* 陽性となった。

海藻は1検体調査したが、*cpa*、*cpe* ともに陰性であった。

魚・エビは30検体調査した。増菌培養後のPCRでは1検体(3.3％)が、分離培養後のコロニーPCRでは2検体が *cpa* 陽性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に30検体中、3検体（10.0％）が *cpa* 陽性となった。*cpe* は検出されなかった。シラス、バナメイエビ、アジで *cpa* が陽性となった。

乾物は16検体調査した。増菌培養後のPCRでは8検体(50.0％)が、コロニーPCRでは4検体が *cpa* 陽性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に16検体中、8検体（50.0％）が *cpa* 陽性となった。*cpe* は検出されなかった。主にだしから *cpa* が検出された。

牛肉は56検体調査したが、*cpa*、*cpe* ともに全検体陰性となった。

豚肉は60検体調査したが、増菌培養後のPCRで1検体（1.7％）、で分離培養後のPCRで1検体（1.7％）がcpa陽性になった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの

結果をまとめると、最終的に1検体が *cpa* 陽性（1.7%）となった。*cpe* は全検体陰性であった。

鶏肉は45検体調査した。増菌培養後および分離培養後のPCRで37検体(82.2%)が *cpa* 陽性となった。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に45検体中、37検体(82.2%)が *cpa* 陽性となった。*cpe* は検出されなかった。部位による検出率の差は認められなかった。

根菜は55検体調査した。増菌培養後のPCRでは12検体（21.8%）が、分離培養後のPCRで10検体（18.1%）が *cpa* 陽性となった増菌培養後のPCRで1検体が *cpe* 陽性となった(1.8%)。増菌培養後のPCRと分離培養後のコロニーPCRの結果をまとめると、最終的に55検体中、12検体（21.8%）が *cpa* 陽性となった。*cpe* は1検体（1.8%）が陽性となった。*cpe* が検出されたのは、里芋だった。

[２]迅速検査法

チオグリコレート培地に既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたものを検体として使用し、今回作製した磁気ビーズの感度を検討した。その結果、磁気ビーズを塗沫した場合、磁気ビーズからDNAを抽出しPCRで検出した場合のいずれでも、検体中に 10^2 cfu/mL以上のウエルシュ菌が存在していれば、検出することができた。次に、カレーの10倍乳剤を作製し、同様の実験を行ったが感度は変わらず、菌濃度が 10^2 cfu/mL以上の場合、検出することができた。

D．考察

今回実施したエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌芽胞を対象とした汚染実態調査では、カレー粉・香辛料、貝、根菜から *cpe* が検出された。特にカレー粉・香辛料は、*cpa*、*cpe* ともに陽性率が高かった。また、*cap* 陽性検体中に占める *cpe* 陽性検体の割合も高く、カレー粉・香辛料には *cpe* 陽性ウエルシュ菌芽胞が特に汚染していることが示唆された。一方、これまでウエルシュ菌食中毒の原因食品として重要視されていた食肉からは、*cpe* は検出されなかった。特に牛肉ではすべての検体から *cpa* が検出されず、豚肉は1検体だけから *cpa* が検出された。以上の結果から、食肉を原因とするウエルシュ菌食中毒の発生リスクは低いと考えられる。特に我が国では、カレーを原因とする食中毒が多発しているが、従来、カレーのウエルシュ菌食中毒の汚染食品として、牛肉や豚肉などの食肉や根菜が疑われてきた。今回の調査結果

から、カレーを原因とするウエルシュ菌食中毒では、食肉よりもカレー粉・香辛料が主な原因となっている可能性が示唆された。

今回の調査では、カレー粉・香辛料に加えて、貝において *cpa*、*cpe* が高率に検出された。また、*cap* 陽性検体中に占める *cpe* 陽性検体の割合も高く、*cpe* 陽性ウエルシュ菌が高率に汚染している可能性が示唆された。貝自体がウエルシュ菌食中毒発生にどれだけ関与しているかは、現時点では不明である。しかし、これまでエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の由来はヒトであり、排泄物中のウエルシュ菌が下水処理場を介して、河川や海を汚染している可能性が報告されている。今回の調査で、貝において *cpe* 陽性検体の割合が高かったことから、実際に海でエンテロトキシン陽性ウエルシュ菌の汚染が発生していることが確認された。

今回作製した免疫磁気ビーズ法は 10^2 cfu/mL 以上の菌濃度でウエルシュ菌を検出することが出来た。多くのウエルシュ菌食中毒事例では、食品中の菌濃度が 10^4 cfu/mL 以上になると考えられているため、食中毒の原因究明に使用する場合、十分な検出感度を有していると考えられた。ビーズから DNA を抽出し PCR を行なった場合は当日中に、ビーズを選択培地に塗抹した場合は翌日にウエルシュ菌の存在を確認することができる。いずれにせよ、増菌培養を行わなくても済むため、増菌培養にかかる 1 日を短縮することができる。今後は、検出感度をさらに向上させ、食中毒の原因究明だけでなく、汚染調査にも使用できるようにしたい。カレー以外の他の食品中でも使用できるか検討する必要があると思われる。また、今回使用した菌株以外でも同様の結果が得られるかどうか検討する必要があると思われる。

E. 結論

今回の結果から、カレーで頻発しているウエルシュ菌食中毒は主にカレー粉や香辛料からの汚染によるものであることが示唆された。今後、ウエルシュ菌食中毒の予防を考えていくうえで、カレー粉・香辛料にさらに着目していく必要があると思われる。

本研究では、汚染実態調査に加えて、免疫磁気ビーズを用いたウエルシュ菌の迅速検査法を作製した。その結果、増菌培養を行うことなく、10^2 cfu/ml 以上のウエルシュ菌を検出することができた。増菌培養に要する 1 日を短縮できるため、迅速な対応を要求される現場で有用ではないかと考えられた。

Ｆ．健康危険情報

なし

Ｇ．研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

なし

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況

なし

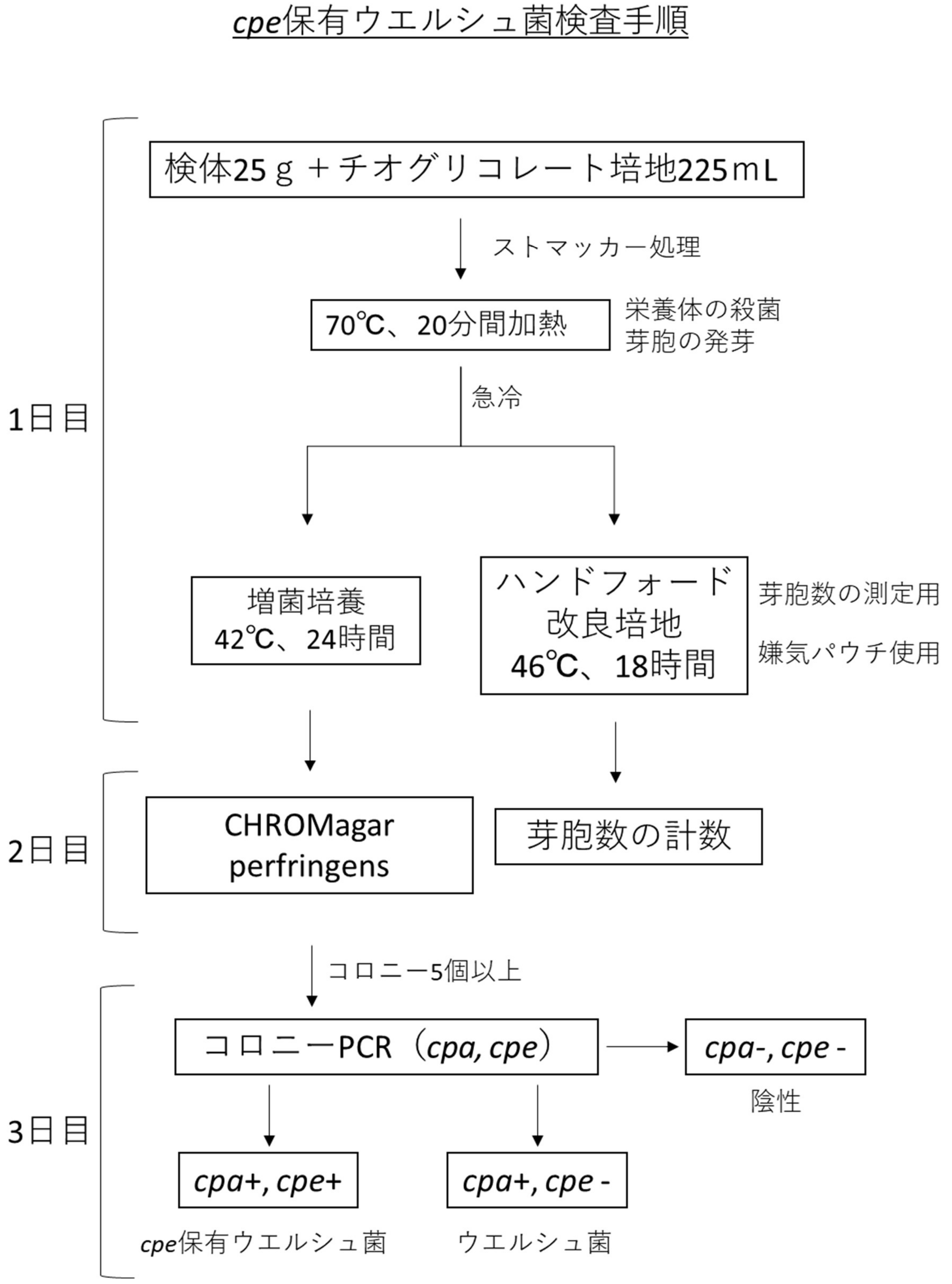

図１　汚染実態調査検査手順

- プライマー

multi-cpa-F：GCTAATGTTACTGCCGTTGA

multi-cpa-R：CCTCTGATACATCGTGTAAG

multi-cpe-F：GGAGATGGTTGGATATTAGG

multi-cpe-R：GGACCAGCAGTTGTAGATA

- 反応液

*Quick Taq HS DyeMix	12.5 μL
multi-cpa-F（50μM）	0.1 μL
multi-cpa-R（50μM）	0.1 μL
multi-cpe-F（50μM）	0.1 μL
multi-cpe-R（50μM）	0.1 μL
Template	2.0 μL
H_2O	10.0 μL

*Quick Taq HS DyeMix (TYOBO, #DTM-101)

- プログラム

94℃	2 min	
94℃	30 sec	
55℃	1 min	
68℃	1 min	×30
68℃	5 min	

- 判定

324 bp → *cpa*（アルファ毒素遺伝子）陽性

233 bp → *cpe*（エンテロトキシン遺伝子）陽性

図 2　マルチプレックス PCR の条件

菌液 1mLに抗ウエルシュ菌抗体 10 μgを加える

↓

1時間、回転

↓

PBSで洗浄した磁気ビーズを10 μL加え、1時間回転

↓

マグネチックスタンドにセットしPBSで洗浄

↓ クロモアガーに塗抹

↓ DNA抽出 → PCR（*cpa, cpe*）

図３　迅速検査法手順

表１　増菌培養後の PCR の結果

品目	検体数	CPA陽性（%）	CPE陽性（%）	CPE/CPA（%）
カレー粉 香辛料	121	16 (13.2)	5 (4.1)	31.3
貝	29	11 (37.9)	1 (3.4)	9.1
海藻	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
魚・エビ	30	1 (3.3)	0 (0.0)	0.0
乾物	16	8 (50.0)	0 (0.0)	0.0
牛肉	56	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
豚肉	60	1 (1.7)	0 (0.0)	0.0
鶏肉	45	37 (82.2)	0 (0.0)	0.0
根菜	55	12 (21.8)	1 (1.8)	8.3

表２　コロニーPCR の結果

品目	検体数	CPA陽性（%）	CPE陽性（%）	CPE/CPA（%）
カレー粉 香辛料	121	42 (34.7)	5 (4.1)	11.9
貝	29	17 (58.6)	2 (6.9)	11.8
海藻	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
魚・エビ	30	2 (6.7)	0 (0.0)	0.0
乾物	16	4 (25.0)	0 (0.0)	0.0
牛肉	56	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
豚肉	60	1 (1.7)	0 (0.0)	0.0
鶏肉	45	37 (82.2)	0 (0.0)	0.0
根菜	55	10 (18.1)	0 (0.0)	0.0

表３　汚染実態調査の最終結果

品目	検体数	CPA陽性（%）	CPE陽性（%）	CPE/CPA（%）
カレー粉 香辛料	121	42 (34.7)	9 (7.1)	21.4
貝	29	20 (69.0)	3 (10.3)	15.0
海藻	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
魚・エビ	30	3 (10.0)	0 (0.0)	0.0
乾物	16	8 (50)	0 (0.0)	0.0
牛肉	56	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0
豚肉	60	1 (1.7)	0 (0.0)	0.0
鶏肉	45	37 (82.2)	0 (0.0)	0.0
根菜	55	12 (21.8)	1 (1.8)	8.3

令和４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）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究代表者　大西貴弘　国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書
食品中のウエルシュ菌の汚染実態調査

研究分担者　渡辺麻衣子　　国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ウエルシュ菌食中毒は、大量調理時に発生する事例が多い。また、肉類の総菜が原因食品とされる事例が多く、肉類がウエルシュ菌の汚染源となっていると考えられてきた。しかしながら、これまで網羅的なウエルシュ菌汚染実態調査がほとんど行われておらず、食品中のウエルシュ菌の分布実態は明らかとなっていない。そこで本研究では、統一された検査手法を用いて、流通量がある程度多い網羅的な食品を検体としたウエルシュ菌汚染実態調査を行い、ウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品を明確化することを目的とした検討を行った。鶏肉、牛肉、豚肉、海藻、貝類、魚・エビ類、根菜等、カレー粉および出汁・乾物から計 255 検体の食品を小売店から購入し供試した。食品検体をチオグリコレート液体培地中でホモジナイズし、24 時間 42℃で嫌気培養して増菌培養液を調製した。増菌培養液から DNA を抽出し、α毒素産生遺伝子（cpa）およびエンテロトキシン産生遺伝子（cpe）を PCR で検出した。また増菌培養液を塗抹して嫌気培養を行い、形成されたコロニーにおいてもこれら２種の毒素産生遺伝子を PCR で検出した。その結果、肉類および根菜等からは、cpe およびこれを保有する生菌は確認されず、これら食品が食中毒原因菌の汚染源となるリスクは低いことが示唆された。一方、乾物や海洋沿岸部で捕獲あるいは養殖された貝、エビ、海藻では、cpe またはこれを保有する生菌が複数検出された。このことは、海洋沿岸部におけるウエルシュ菌の汚染や、食品加工の乾燥工程におけるウエルシュ菌の選択的な生残と関連があると考えられた。

研究協力者
川上　浩　　　共立女子大学
橋元　優香　　共立女子大学

Ａ．研究目的

ウエルシュ菌（*Clostridium perfringens*）は、ヒトや動物の大腸内常在菌であり、土壌や下水、河川、海等にも広く分布し、食肉、魚介類あるいは野菜など多くの食品を汚染している。本菌は食中

毒の原因菌となるが、食中毒原因菌となりうる株は、全ての *Clostridium perfringens* ではなく、芽胞形成時にエンテロトキシン(Clostridium perfringens enterotoxin：CPE)を産生するウエルシュ菌に限られる。ウエルシュ菌は産生する毒素の種類と産生量によって A 型から E 型までの５毒素型に分けられるが、A 型ウエルシュ菌のみが食中毒の原因となることが知られており、食中毒由来株におけるエンテロトキシン産生率 は 80～90％程度ある一方で、健康な人、動物および自然界から分離される菌株では１～２％以下といわれている。エンテロトキシン以外にも、A 型から E 型株で共通して産生する主要な毒素としてα毒素 (Clostridium perfringens enterotoxin：CPA) がある。本毒素は溶血性等の毒性を持つが食中毒発症には直接関与しないとされている。ウエルシュ菌のエンテロトキシン産生は菌の増殖とは関係なく、芽胞形成時にのみに起こる。芽胞細胞は、70℃～80℃でショックを受け 54℃以下の保存条件で発芽し、増殖するとされている。そのため、食品の加熱調理後、室温放置した際などに、芽胞細胞が急激に増殖し、食品中のエンテロトキシン濃度が増加する。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌が体内に取り込まれると、腸管内でウエルシュ菌が芽胞を形成する際に産生・放出されたエンテロトキシンが腸管粘膜に作用して腹痛や下痢などの食中毒症状を起こす。

ウエルシュ菌食中毒は世界各国で発生しており、欧米においてウエルシュ菌による集団下痢症は発生数および患者数ともに全集団下痢症の 10％を占め、重要な下痢症起因菌であるとされている。日本では大規模な集団発生事例が多く、１件当たりの患者数が他の細菌性食中毒よりも圧倒的に多い食中毒として認識されている。原因食品は、実際の食中毒事例から、食肉および魚介類の加熱調理品が多いとされている。しかしながら、その他にサンドウィッチやいなり寿司など肉類や魚介類が直接含まれない食品からの事例も散発しており、明確な原因食品は明らかにされていない。また、食品中のウエルシュ菌検査に関して公定法や妥当性を確認した標準試験法は示されていないため、統一した検査法で網羅的な食品の調査は行われていない。

そこで本研究では、鶏肉、牛肉、豚肉、海藻、貝類、魚・エビ類、根菜等、カレー粉および出汁・乾物の計９分類の食品に着目し、ウエルシュ菌汚染実態調査を行った。

Ｂ．研究方法

[１]検体

鶏肉 31 検体、牛肉 28 検体、豚肉 32 検体、海藻 19 検体、貝類 20 検体、魚・エビ類 21 検体、根菜等 32 検体、カレー粉 20 検体および出汁・乾物 52 検体の計 255 検体を供試した。これらの食品種別を供試検体の大分類と定義した（表１）。さらに各

大分類における詳細な食品種類を中分類および小分類と定義した（表１）。

［２］検査手順

最初に、ストマッカー袋に液体チオグリコレート培地(日本製薬株式会社)225 ml を取り、検体 25 g を加えて１分間ホモジナイズした。これを試料原液とした。試料原液をストマッカー袋に入れたまま、ウォーターバス中で内部温度 70℃に保持しつつ 20 分間加温した。その後、流水急冷しヒートシーラーで密閉し、アネロパック・ケンキ（株式会社スギヤマゲン）を用いて 42℃・24 時間嫌気培養し、これを増菌培養液とした。

検体中の芽胞形成菌の定量法として、１検体につき２枚の嫌気性パウチ(株式会社スギヤマゲン)に試料原液 10 ml とハンドフォード改良培地(関東化学株式会社)15 ml を加え混合し、パウチ内部の空気を追い出した後にヒートシーラーで密閉した。アネロパック・ケンキを用いて 46℃・18 時間で嫌気培養後、形成した黒色コロニーを目視で確認し数を計測した。

増菌培養液からアルカリ熱抽出法にて直接 DNA を抽出し、増菌培養液中の CPE 産生遺伝子 *cpe* および CPA 産生遺伝子 *cpa*（＝全てのウエルシュ菌が保有するホスホリパーゼ C 遺伝子）の検出状況を確認した。増菌培養液 100 µL を８連チューブに分取し、14800 rpm・10 分間遠心分離を行い、上清を除去した。沈査に 50 mM NaOH を 85 µL 加え、100℃・10 分間サーマルサイクラーで加熱した。加熱後 1M Tris-HCl(pH7.0)を 15 µL 加え、再び 14800 rpm・10 分間遠心分離を行い、その上清を DNA 抽出液とした。DNA 抽出液をテンプレートとして、Quick Taq HS DyeMix（TOYOBO）を用いたマルチプレックス PCR を行い、*cpe* および *cpa* を増幅した。プライマー塩基配列は以下の通りである；multi-cpa-F(5’-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3’)、multi-cpa-R(5’-CCTCTGATACATCGTGTAAG-3’)、multi-cpe-F(5’-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3’)、multi-cpe-R(5’-GGACCAGCAGTTGTAGATA-3’)。PCR サイクルは以下の通りである；サイクル前熱変性 94℃・2 分→（熱変性 94℃・30 秒、アニーリング 55℃・1 分、伸長反応 68℃・1 分）×30 サイクル→サイクル後伸長反応 68℃・5 分。アガロースゲル電気泳動で *cpe* および *cpa* の増幅の有無を判定した。

CHROMagar C.perfringens（CCP；関東化学株式会社）平板培地上に増菌培養液を平板１枚あたり１エー

ゼ量画線塗抹し、アネロパック・ケンキを用いて37℃・24時間嫌気培養を行った。CCP平板上に形成したオレンジ色のコロニーを推定ウエルシュ菌とした。推定ウエルシュ菌の単コロニーを1シャーレにつき10個ずつ釣菌し、分離培養用のチオグリコレート寒天培地に接種し保存用に培養すると同時に、Quick Taq HS DyeMix にプライマーを加えた PCR ミックスバッファーに菌体を直接懸濁して、上述の増菌培養液からの *cpe* および *cpa* 検出プロトコルと同様にマルチプレックス PCR を行い（コロニーPCR 法）、各コロニーの *cpe* および *cpa* 保有状況を判定した。

C．研究結果

［1］供試検体の大分類別にみた芽胞形成菌検出状況

検体区分（大分類）別にみたハンドフォード培地での嫌気培養による芽胞形成菌数の検出状況を以下に示す。本培養法で黒色のコロニー数が1個以上確認された、または培養物全体が黒色となりコロニー数の計測が不可能となった検体は、今回供試した255検体中32検体であった。そのうち、コロニー数が計測できた場合の2枚の平板平均値の最高菌数は18.5個であった。しかし、これら黒色コロニーが形成された検体32検体中で、増菌培養液からの直接 PCR 法またはコロニーPCR 法から *cpe* が検出されたのは1検体のみであった。さらに、増菌培養液からの直接 PCR 法またはコロニーPCR 法から *cpe* が検出された4検体中、黒色コロニーが形成されなかったものも3検体あった。以上のことから、本培養法の芽胞菌の検出状況と、PCR による *cpe* 検出状況との間には関連性はほとんど無く、本培養法によって検体中の芽胞を量的に評価することは困難であることが示された。

［2］供試検体の大分類別にみたウエルシュ菌毒素遺伝子検出状況

各供試検体の大分類別に見た *cpa* および *cpe* 保有ウエルシュ菌検出状況を表2に示した。増菌培養液からの直接 PCR 法、またはコロニーPCR 法から *cpa* が検出された検体の割合は、鶏肉で67.7％（31検体中21検体）、豚肉で6.3％（32検体中2検）、貝類で5.3％（19検体中1検体）、海藻で65.6％（20検体中13検体）、生魚・エビで9.5％（21検体中2検体）、根菜等で34.4％（32検体中11検体）、カレー粉で45.0％（20検体中9検体）、出汁・乾物で49.0％（52検体中25検体）であった。同時に、*cpe* 陽性の検体も、海藻で5.3％

(19 検体中１検体)、生魚・エビで 9.5%(21 検体中２検体)、出汁・乾物で 1.9%(52 検体中１検体)の割合で確認された。生魚・エビでは、*cpa* が検出された２検体ともに *cpe* も保有していた。以上のことから、*cpa* 保有ウエルシュ菌陽性率が最も高かったのは鶏肉、次いで海藻であり、*cpe* 保有ウエルシュ菌陽性率が最も高かったのは生魚・エビ、次いで海藻であったことが確認された。これまでウエルシュ菌食中毒の主な原因食品として認識されてきた肉類では、合計で 91 検体の検査を行ったが、豚肉の 6.3%および鶏肉の 67.7%から *cpa* のみが検出されたにすぎず、*cpe* は１検体も検出されなかった。

また、カレー粉では、コロニーPCR 法では 45.0%の検体で *cpa* が検出されたにもかかわらず、増菌培養液からの直接 PCR 法では１検体からも検出されなかった。その他の検体では、両遺伝子検出率は、増菌培養液からの直接 PCR 法およびコロニーPCR では同等または前者のほうが高い傾向であった。したがって、カレー粉の増菌培養液からの直接 PCR 法では、食品成分が抽出 DNA に混入して PCR 酵素を阻害し、PCR 増幅が見られなかった可能性が考えられた。

［３］供試検体の中分類別にみたウエルシュ菌毒素遺伝子検出状況

増菌培養液からの直接 PCR 法またはコロニーPCR 法から、*cpa* または *cpe* 遺伝子が１検体以上検出された中分類の検体のみを結果から抽出し、毒素遺伝子検出状況を表３に示した。本表に掲載されない検体区分では、*cpa* および *cpe* 遺伝子はいずれも１検体からも検出されなかった。増菌培養液からの直接 PCR 法、またはコロニーPCR 法から *cpa* が検出された検体の割合は、生鶏肉で 67.7%(31 検体中 21 検体)、生豚肉で 6.3%(32 検体中２検)、生エビで 50.0%(４検体中２検体)、巻貝で 100%(２検体中２検体)、二枚貝で 61.1%(18 検体中 11 検体)、生海藻（湯通し不明）で 50.0%(２検体中１検体)、乾燥海藻で 25.0%(12 検体中３検体)、乾燥魚介類で 58.3%(24 検体中 14 検体)、海産物を含む出汁類で 41.7%(12 検体中５検体)、根菜で 28.0%(25 検体中７検体)、葉野菜で 57.1%(７検体中４検体)、乾燥野菜・豆で 35.7%(14 検体中５検体)、カレー粉(スパイス粉末)で 45.0%(20 検体中９検体)であった。同時に、*cpe* 陽性の検体は、生エビで 50.0%(４検体中２検体)、乾燥海藻で 8.3%(12 検体中１検体)、乾燥

魚介類で 4.2%(24 検体中1検体)の割合で確認された。以上のことから、海産物やそれを含む乾物でのみ *cpe* が検出され、これらでは *cpa* 陽性率も比較的高いことが示された。また、*cpa* は生鶏肉および根菜や葉野菜からも比較的高い陽性率で検出された。したがって、海洋河川・土壌、鶏体内または飼育・食鳥処理環境でのウエルシュ菌分布や、乾燥工程での芽胞の選択的な生存が関与する可能性が考えられた。

［4］供試検体の小分類別にみたウエルシュ菌および *cpe* 保有ウエルシュ菌検出状況

海産物について、ウエルシュ菌、特に *cpe* 保有株の分布を詳細に把握するため、検体区分をさらに細分し、増菌培養液からの直接 PCR 法またはコロニーPCR 法による *cpa* または *cpe* 検出状況を集計し比較した。*cpa* が検出された検体の割合は、エビ類では（表４）、生エビ４種で 50.0%(４検体中２検体)、および乾燥サクラエビで 63.2%(19 検体中 12 検体)であった。貝類では(表５)、あさりで 66.7%(９検体中６検体)、およびしじみで 66.7%(６検体中４検体)、その他、検査検体数は各１であったがつぶ貝、ホッキガイおよびはまぐりで 100%検出された。ムール貝は２検体中での検出は無かった。海藻では(表６)、乾燥昆布で 18.2%(11 検体中２検体)、その他、検査検体数は各１であったが乾燥または生ヒトエグサ・アオサで 100%検出された。湯通し塩蔵生昆布および生ワカメ、および生もずくでの検出は無かった。*cpe* 陽性の検体は、生エビで 50.0%(４検体中２検体)、乾燥サクラエビで 8.3%(12 検体中１検体)、乾燥昆布で 9.1%(11 検体中１検体)であった。以上のことから、エビ類、貝類、ヒトエグサ・アオサ、乾燥昆布では *cpa* の陽性率が、さらにエビ類および乾燥昆布では *cpe* の陽性率も同時に高かった傾向にあることが示された。

乾燥サクラエビについては、国産および海外産の間で陽性率を比較した。今回供試した 19 検体中 16 検体が海外産（台湾、中国、フィリピン、ベトナム）であったが、*cpa* および *cpe* 陽性となったのは全て海外産であった。貝類および海藻類については、今回供試した全検体が国産品であったため産地ごとの傾向の違いについての情報は得られなかった。エビ類の結果を参照すると、今後、産地等による陽性率の比較検討を進める必要があると考えられた。

D．考察

本研究の結果から、従来、ウエルシュ菌食中毒の原因食品と考えられてきた肉類は、その重要性は低いことが示唆された。しかし今回供試した肉類検体は、豚肉１検体を除きすべて国産であったため、今回の結果は国産肉の汚染状況の反映であり、今後は、海外産肉類での検討も行う必要があると考えられた。

生・乾燥のエビ類、および海藻の中でも乾燥昆布から *cpe* またはこれの保有ウエルシュ菌が検出され、食中毒を起こすウエルシュ菌の汚染原因食品として着目するべき食品であることが明らかとなった。乾燥サクラエビについては、海外における加工および流通過程の衛生管理や、海洋でのウエルシュ菌分布状況について、今後調査していく必要がある。

鶏肉、貝類、出汁類、根菜、葉野菜、乾燥野菜・豆およびカレー粉については、今回 *cpe* の検出は無かったが、*cpa* の検出率は比較的高かった。ここに上述のエビ類および海藻を加えて、鶏肉、カレー粉の原料となるスパイス類を含めた乾物、土壌が付着する野菜類、貝類およびエビ類で、ウエルシュ菌分布濃度が高いと考えられることから、養鶏環境・海洋・土壌でのウエルシュ菌分布や、乾燥工程での菌の付着や選択的な生存が関与する可能性が示唆された。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は、海泥中のウエルシュ菌陽性株は高いエンテロトキシン産生能を示すという報告がある。今後、これらの環境におけるウエルシュ菌分布、および加工食品の乾燥や加熱等の工程に着目し、食品のウエルシュ菌汚染メカニズムを解明していく必要がある。

ウエルシュ菌が保有する *cpa* および *cpe* 検査法に関して述べる。カレー粉では、増菌培養液からの直接 DNA 抽出法では *cpa* 陽性検体を検出できなかったが、コロニーPCR 法では 40％が陽性となった。この原因の一つとして、カレー粉を含む増菌培養液からの直接 DNA 抽出法では、抽出物中に、一般的に PCR 阻害として働くタンパク質、ポリフェノール類、多糖類等に加えて、香辛料の香気や辛味、色素、抗酸化成分として多様なフェノール系化合物等を含有しており、これらの成分がより強く PCR 阻害作用をもたらしたと考えられた。また生エビにおいては、増菌培養液からの直接 DNA 抽出法のみで *cpa* および *cpe* が検出され、これらの遺伝子を保有するコロニーは分離されなかった。このことから、増菌培養液中にはこれらの遺伝子

を保持したプラスミドの状態で混入する、またはそのプラスミドがCCP培地に生育できない細菌種に乗った形で検体中に存在していた等の可能性が考えられた。このことについては今後検討し、手法の改良が必要と考えられた。

今後は、今回明らかとなった着目するべき食品や、養鶏環境、海洋、農地土壌といった環境材料におけるウエルシュ菌分布調査を進める。それらの由来株とウエルシュ菌食中毒患者由来株の遺伝子解析およびジェノタイピングを行い、菌の動態を考察することによって、食中毒原因株の汚染源を特定していく予定である。

E．結論

本年度からウエルシュ菌および *cpe* 保有汚染実態調査を開始した。従来、ウエルシュ菌食中毒の原因食品と考えられてきた肉類の汚染原因菌としての重要性は低く、海産物や乾物の重要性が新たに確認された。今後は、養鶏環境、海洋河川、土壌でのウエルシュ菌分布を調査し、菌株のジェノタイピングを行い、菌の動態を考察することによって、食中毒原因株の汚染源を特定していく予定である。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

無し

2．学会発表

無し

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　供試検体一覧

大分類	中分類	小分類	試験数	小計
鶏肉	生鶏肉	ムネ肉、モモ肉、ササミ	31	31
牛肉	生牛肉	ロース肉、モモ肉、バラ肉、小間切れ、カレー用	28	28
豚肉	生豚肉	ロース肉、モモ肉、バラ肉、小間切れ、カレー用	32	32
海藻	生海藻湯通し不明	生もずく、生ヒトエグサ・アオサ	2	19
	湯通し塩蔵海藻	生昆布、生ワカメ	5	
	乾燥海藻	乾燥昆布、乾燥ヒトエグサ・アオサ	12	
貝類	巻貝	ツブ貝、ホッキガイ	2	20
	二枚貝	はまぐり、あさり、しじみ、ムール貝	18	
生魚・エビ	淡水魚	鮎	1	21
	生エビ	アカエビ、シバエビ、クルマエビ、ガスエビ	4	
	海水魚	タイ、ブリ、サケ、マダラ、カレイ、イワシ、サンマ	16	
根菜等	葉野菜	チンゲンサイ、ホウレンソウ、小松菜	7	32
	根菜	タマネギ、ジャガイモ、ゴボウ、ニンジン、大根、長いも、ショウガ、サトイモ	25	
カレー粉	スパイス粉末	ターメリック・コリアンダー・クミン・チリ・パプリカ・シナモン・カルダモン等のミックス	20	20
出汁・乾物	乾燥キノコ	シイタケ、キクラゲ	4	52
	海産物を含む出汁類	鰹節・昆布・いりこ出汁・あご出汁・シイタケ等のミックス	12	
	乾燥野菜・豆	切干大根、切干人参、乾燥小豆	12	
	乾燥魚介類	乾燥サクラエビ、干しイカ、干しイワシ	24	
合計				254

表２　検体区分（大分類）別にみたウエルシュ菌毒素遺伝子検出結果の比較

		cpe遺伝子						cpa遺伝子					
	遺伝子検出法	増菌培養液のPCR		コロニーPCR		増菌培養液またはコロニーPCR		増菌培養液のPCR		コロニーPCR		増菌培養液またはコロニーPCR	
	試験検体数	陽性検体数（陽性率）		陽性検体数（陽性率）		陽性検体数（陽性率）		陽性検体数（陽性率）		陽性検体数（陽性率）		陽性検体数（陽性率）	
鶏肉	31	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	21	(67.7%)	21	(67.7%)	21	(67.7%)
牛肉	28	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)
豚肉	32	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	2	(6.3%)	2	(6.3%)	2	(6.3%)
海藻	19	1	(5.3%)	0	(0.0%)	1	(5.3%)	3	(15.8%)	2	(10.5%)	4	(21.1%)
貝類	20	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	9	(45.0%)	11	(55.0%)	13	(65.0%)
生魚・エビ	21	2	(9.5%)	0	(0.0%)	2	(9.5%)	2	(9.5%)	0	(0.0%)	2	(9.5%)
根菜等	32	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	10	(31.3%)	11	(34.4%)	11	(34.4%)
カレー粉	20	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0	(0.0%)	9	(45.0%)	9	(45.0%)
出汁・乾物	52	1	(1.9%)	1	(1.9%)	1	(1.9%)	19	(37.3%)	23	(45.1%)	25	(49.0%)
合計	255	4	(1.6%)	1	(0.4%)	1	(1.6%)	66	(26.0%)	79	(31.1%)	87	(34.1%)

表３　検体区分（中分類）別にみたウエルシュ菌毒素遺伝子検出結果の比較

検体区分（中分類）	遺伝子検出法	cpe遺伝子			cpa遺伝子		
		増菌培養液のPCR	コロニーPCR	増菌培養液またはコロニーPCR	増菌培養液のPCR	コロニーPCR	増菌培養液またはコロニーPCR
	試験検体数	陽性検体数（陽性率）	陽性検体数（陽性率）	陽性検体数（陽性率）	陽性検体数（陽性率）	陽性検体数（陽性率）	陽性検体数（陽性率）
生鶏肉	31	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	21 (67.7%)	21 (67.7%)	21 (67.7%)
生豚肉	32	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (6.3%)	2 (6.3%)	2 (6.3%)
生エビ	4	2 (50.0%)	0 (0.0%)	2 (50.0%)	2 (50.0%)	0 (0.0%)	2 (50.0%)
巻貝	2	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
二枚貝	18	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	7 (38.9%)	11 (61.1%)	11 (61.1%)
生海藻 湯通し不明	2	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)
乾燥海藻	12	1 (8.3%)	0 (0.0%)	1 (8.3%)	3 (25.0%)	1 (8.3%)	3 (25.0%)
乾燥魚介類	24	1 (4.2%)	1 (4.2%)	1 (4.2%)	11 (45.8%)	13 (54.2%)	14 (58.3%)
海産物を含む出汁類	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (25.0%)	5 (41.7%)	5 (41.7%)
根菜	25	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	6 (24.0%)	7 (28.0%)	7 (28.0%)
葉野菜	7	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (57.1%)	4 (57.1%)	4 (57.1%)
乾燥野菜・豆	14	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (35.7%)	5 (35.7%)	5 (35.7%)
カレー粉（スパイス粉末）	20	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	9 (45.0%)	9 (45.0%)

表４　エビ類におけるウエルシュ菌毒素遺伝子検出結果の比較（増菌培養液のPCR またはコロニーPCR での検出）

検体区分（大分類または中分類）	検体区分（小分類）	試験検体数	陽性検体数（陽性率）	
			cpe 遺伝子	cpa 遺伝子
生エビ	アカエビ、シバエビ、クルマエビ、ガスエビの各１	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)
乾燥魚介類	乾燥サクラエビ	19	1 (5.3%)	12 (63.2%)

表５　貝類におけるウエルシュ菌毒素遺伝子検出結果の比較（増菌培養液の PCR またはコロニーPCR での検出）

検体区分（大分類または中分類）	検体区分（小分類）	試験検体数	陽性検体数（陽性率）	
			cpe 遺伝子	cpa 遺伝子
巻貝	つぶ貝	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
	ホッキガイ	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
二枚貝	あさり	9	0 (0.0%)	6 (66.7%)
	しじみ	6	0 (0.0%)	4 (66.7%)
	はまぐり	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
	ムール貝	2	0 (0.0%)	0 (0.0%)

表６　海藻におけるウエルシュ菌毒素遺伝子検出結果の比較（増菌培養液の PCR またはコロニーPCR での検出）

検体区分（大分類または中分類）	検体区分（小分類）	試験検体数	陽性検体数（陽性率） cpe 遺伝子	陽性検体数（陽性率） cpa 遺伝子
海藻	乾燥 ヒトエグサ・アオサ	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
	生 ヒトエグサ・アオサ	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
	乾燥昆布	11	1 (9.1%)	2 (18.2%)
	湯通し塩蔵生昆布	3	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	生もずく	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	湯通し塩蔵生ワカメ	2	0 (0.0%)	0 (0.0%)

令和 5 年　3　月 30日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　合田　幸広

次の職員の令和４年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　衛生微生物部　第三室長

（氏名・フリガナ）　渡辺　麻衣子（ワタナベ　マイコ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	☑	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	☑	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	☑	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□	☑	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑　無 □(無の場合はその理由:　　)
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑　無 □(無の場合は委託先機関:　　)
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑　無 □(無の場合はその理由:　　)
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　　）

令和４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）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発
及び汚染実態把握のための研究

研究代表者　大西貴弘　国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究分担者　岡部信彦　　川崎市健康安全研究所
研究協力者　小嶋由香　　川崎市健康安全研究所

研究要旨

ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、調理時の加熱によって発芽し、嫌気状態になった食品中で急速に増殖する。このようなウエルシュ菌の特性から、調理後の冷却が緩慢になりがちな大規模調理施設でウエルシュ菌食中毒が発生する傾向が認められている。本菌による食中毒は依然発生が続いており、減少の傾向が認められていない。この原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染食品が明らかになっていないことが挙げられる。そこで、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染実態を明らかにすることを目的に汚染実態調査を実施した。

調査に使用した検体は、カレー粉・香辛料 37 検体、乾物 13 検体、魚・エビ 6 検体、貝 4 検体、牛肉 3 検体、豚肉 12 検体、鶏肉 12 検体、野菜 30 検体の計 115 検体であった。115 全検体中、ウエルシュ菌は 33 検体(28.7%)から検出され、そのうちエンテロトキシン産生ウエルシュ菌は 1 検体（0.9%）検出された。食品分類別では、カレー粉・香辛料から 37 検体中 15 検体(40.5%)、乾物 13 検体中 5 検体(46.1%)、鶏肉 12 検体中 8 検体（66.7%)、野菜 30 検体中 5 検体(16.7%)からウエルシュ菌が検出された。今回の結果からは食中毒発生頻度の高いカレーの原材料であるカレー粉からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が 1 検体(8.1%)検出された。今後さらに調査を継続し、食品におけるウエルシュ菌およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の汚染実態を明らかにしていきたい。

Ａ．研究目的

ウエルシュ菌食中毒はグラム陽性桿菌 *Clostridium perfringens* によって引き起こされる食中毒である。ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、調理時の加熱によって発芽し、嫌気状態になった食品中で急速に増殖する。このため、調理後、食品を急速に冷却することがウエルシ

ュ菌の増殖を抑制し、食中毒を予防するのに重要であるが、調理後の冷却が緩慢になりがちな大規模調理施設においてウエルシュ菌食中毒がしばしば発生している。我が国では HACCP に沿った管理が義務付けられてから、1年以上が経過しようとしているが、本菌による食中毒は依然として発生が続いている。この原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染食品が明らかになっていないことが挙げられる。ウエルシュ菌は多くの食品から検出されるが、そのほとんどがエンテロトキシン非産生株であり、食中毒の原因となるエンテロトキシン産生株はほとんど検出されない。これまでにもウエルシュ菌の汚染調査が行われてきたが、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品は明らかになっていない。また、多くのウエルシュ菌食中毒事例において原因食材が同定されていないことから、原因不明のままとなっている事例は多い。さらに、飲食店でウエルシュ菌の増殖を抑えるための適切な調理が行われているかどうかの実態も明らかになっていない。このため飲食店等へ食中毒対策として適切な指導を行うための基礎的なデータが不足するという結果になっており、ウエルシュ菌食中毒の発生を防止できないことの一因になっていると考えられる。本研究ではこれらの課題に対応するために、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染実態を明らかにする。

B．研究方法

［1］検体

調査に使用した検体は神奈川県内のスーパーマーケットおよび小売店で購入した。検体は購入後、保管に適した温度で保管し、24時間以内に試験に供した。

［2］検査手順

検体 25ｇを無菌的にストマッカー袋に採取し、チオグリコール酸塩培地（日水製薬）を 225 mL 加え、２分間、ストマッカー処理し、70℃で 20 分間加熱後急冷した（試料原液）。試料原液 10ml とハンドフォード改良培地 15m l を２枚の嫌気パウチにそれぞれ加え軽く混ぜた後ヒートシールし 46℃で 18 時間培養し、嫌気性菌の定量を行った。

試料原液は、42℃で 24 時間増菌培養を行ない、培養後、培養液からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートとして、ウエルシュ菌およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌遺伝子同時検出スクリーニングＰＣＲを

行なった。また、増菌培養液を２枚の CHROM agar C.perfringens に塗抹し、37℃、24 時間培養した。CHROM agar C.perfrungens に発育した赤色コロニーを前述と同様の方法でＰＣＲを行い、ウエルシュ菌およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の同定を行った。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌はＤＳＭＯ　１ｍｌに懸濁し-80℃で保管した。

［３］マルチプレックスＰＣＲ

ウエルシュ菌遺伝子およびウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子の検出は、H.S.Guran らの方法 (Letters in Applied Microbiology,2013,57,77-82) によりマルチプレックスＰＣＲ法で行った。ＰＣＲは、200μＬの反応チューブで行った。反応液は、Quick Taq HS Dye Mix(TOYOBO) 12.5μＬ、それぞれのプライマーを 0.1μＭずつ、DNA テンプレート 2μＬを混和し、ＰＣＲグレードの精製水で最終容量を 25μＬに調整した。反応は、94℃、2 分加熱後、94℃、30 秒、55℃、1 分、68℃、1 分のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 68℃、5 分の反応を行った。反応終了後、ＰＣＲ産物 2μＬを MultiNA（SHIMADZU）を用いたキャピラリ電気泳動を行い特異的なバンドの有無を調べた。

Ｃ．研究結果

［１］調査食品

汚染実態調査に使用した検体は、カレー粉・香辛料 37 検体、乾物 13 検体、魚・エビ 6 検体、貝 4 検体牛肉 3 検体、豚肉 12 検体、鶏肉 12 検体、野菜 30 検体の計 115 検体であった。

［２］嫌気性菌同定

嫌気性菌の定量検査では、多数のコロニーの発育のため培地全体が黒色となり、定量できない検体が多数認められた。

［３］スクリーニングＰＣＲ

増菌液から行ったスクリーニングＰＣＲでは、カレー粉・香辛料が 37 検体中 11 検体(29.7%)、乾物 13 検体中（7.7%)、鶏肉 12 検体中 7 検体（58.3%)、野菜 30 検体中 4 検体（13.3%）からウエルシュ菌遺伝子が検出された。また、カレー粉・香辛料 3 検体（8.1%）からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌遺伝子が検出された。

［４］菌分離

クロモアガー２枚に塗抹し、赤色コロニー10 個を釣菌後、前述のマルチプレックスＰＣＲを用い、遺伝子保有状況を確認した。

ウエルシュ菌検出状況を表 1 に示す。115 全検体中、ウエルシュ菌

は 33 検体(28.7%)検出され、そのうちエンテロトキシン産生ウエルシュ菌は 1 検体（2.7%）検出された。

食品分類別検出状況を表 2 に示す。カレー粉・香辛料 37 検体中 15 検体（40.5%）、乾物 13 検体中 5 検体(46.1%)、鶏肉 12 検体中 8 検体（66.7%)、野菜 30 検体中 5 検体(16.7%)からウエルシュ菌が検出された。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌はカレー香辛料 1 検体(2.7%)から検出された。

鶏肉では、ムネ、ミンチ、軟骨、ささみ、小間切れ等様々な部位から検出されていた。乾物ではそば粉、天ぷら粉、片栗粉、黒ごまきな粉からウエルシュ菌が検出された。野菜については、水菜、モロヘイヤ、ターツアイ、セルリーの葉部分（可食部）から検出された。

D．考察

今年度調査を行った 115 検体中、33 検体(28.7%)からウエルシュ菌が検出され、そのうち 1 検体でエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。カレー粉・香辛料から 37 検体中 15 検体(40.5%)、乾物 13 検体中 5 検体(46.1%)、鶏肉 12 検体中 8（66.7%)、野菜 30 検体中 5 検体(16.7%)からウエルシュ菌が検出された。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌はカレー粉 1 検体(2.7%)から検出された。

食中毒発生時の原因食品の一つとして考えられているカレー粉からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出され、大量調理時における不適切な温度管理による食中毒発生事例の原因となりうると考えられるものであった。鶏肉からは種々の部位よりウエルシュ菌が検出された。しかしながら、原因食品として考えられている豚肉、牛肉からの検出は認められなかった。今回のこれら食肉類の検体はスーパーマーケットで購入したものであり、解体からパック包装に至るまでの食肉処理法によって検出率が変動する可能性が考えられた。また、豚肉、牛肉におけるウエルシュ菌の増殖性、生存性についても検討する必要があると考えられた。

野菜類については主に可食部についてサンプリングを行ったが、16.7%からウエルシュ菌が検出された。土壌由来の可能性も考えられるが、野菜洗浄時の水の汚染なども原因となり得ると考えられた。

乾物については、主に粉類のサンプリングを行った。そば粉、天ぷら粉、片栗粉等から検出された。粉類自体の汚染または製造工程での汚染が考えられる。

また、今回実施した増菌液からのスクリーニングＰＣＲは、ウエルシュ菌が検出された検体 33 検体中スクリーニングで陽性となった検体は 23 検体(70.0%)であった。迅速検出方法として確立するためには抽出などの改良が必要と考えられた。

Ｅ．結論

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究を本年度から開始した。ウエルシュ菌は、カレー粉、鶏肉、乾物、野菜において認められ、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は食中毒原因食品として報告事例の多いカレーの原材料であるカレー粉から検出された。今後さらに調査を継続し、食品におけるウエルシュ菌およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の汚染実態を明らかにしていきたい。

Ｆ．健康危険情報

なし

Ｇ．研究発表

なし

２．学会発表

なし

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　ウエルシュ菌検出状況

食品分類	検体数	CHROMagar コロニー発育検体数（%）	ウエルシュ菌検出数（%）	エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌検出数（%）	増菌液 ウエルシュ菌遺伝子 陽性数（%）	増菌液 エンテロトキシン産生 遺伝子陽性数（%）	ハンドフォード コロニー発育
カレー粉・香辛料	37	15(40.5)	15(40.5)	1(2.7)	11(29.7)	3(8.1)	14(37.8)
乾物	13	5(38.5)	5(38.5)	0	1(7.7)	0	3(23.0)
魚・エビ	6	0	0	0	0	0	0
貝	4	0	0	0	0	0	0
牛肉	3	0	0	0	0	0	0
豚肉	10	0	0	0	0	0	0
鶏肉	12	8(66.7)	8(66.7)	0	7(58.3)	0	3(25.0)
野菜	30	5(16.7)	5(16.7)	0	4(13.3)	0	1(3.3)
計	115	33(28.7)	33(28.7)	1(0.9)	23(20.0)	3(2.6)	21(18.3)

( )内は%

表２　食品分類別検出状況

鶏肉	検体数	ウエルシュ菌検出数
ムネ	4	1
ミンチ	2	2
軟骨	2	2
ササミ	1	1
小間切れ	1	1
手羽元	1	1
鳥皮	1	
計	12	8

乾物	検体数	ウエルシュ菌検出数
そば粉	2	2
黄な粉	2	
白玉粉	2	
上新粉	1	
天ぷら粉	1	1
片栗粉	1	1
小麦粉	1	
白あん	1	
黒ごまきな粉	1	1
米粉	1	
計	13	5

野菜	検体数	ウエルシュ菌検出数
きのこ	10	
納豆	3	
豆腐	3	
水菜	2	2
小松菜	2	
かいわれ大根	1	
もやし	1	
オクラ	1	
モロヘイヤ	1	1
ニラ	1	
ターツアイ	1	1
菜の花	1	
ほうれん草	1	
セリ	1	
セルリー	1	1
計	30	5

令和５年　４月　10日

厚生労働大臣 殿

機関名　川崎市健康安全研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　岡部信彦

次の職員の令和４年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　川崎市健康安全研究所　所長

（氏名・フリガナ）　岡部信彦（オカベノブヒコ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　　）	□	■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　）

令和４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）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究代表者　大西貴弘　国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究分担者　三澤 尚明　　国立大学法人宮崎大学

研究要旨

食中毒菌の一つであるウエルシュ菌は、ヒトや動物の腸管内、土壌、下水、塵埃など広く分布しているほか、海底の泥土や魚からも分離されていることから、食中毒の原因食品の多くは、食肉、あるいは魚介類等を使った調理品である。しかしながら、汚染状況に関する十分な疫学調査がなされていない。本年度の研究では、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染源を明らかにすることを目的とした。検体として、牛肉、豚肉、鶏肉、根泥付き野菜、魚・エビ、貝類、海藻、カレー粉・香辛料、だし・乾物の計196検体を供試した。検体25 gにチオグリコール酸培地を225 mL加えてストマッカー処理し、70℃、20分間加熱後、急冷したものを試料原液とした。試料原液の増菌培養液をCHROMagarに塗抹し、疑わしい集落を釣菌した。増菌培養液および釣菌集落から、α毒素遺伝子（*cpa*）およびエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）をPCRで検出した。196検体から*cpe*が検出されたのは、増菌培養液から14検体（7.1%）、釣菌集落からは9検体（4.6%）だった。*cpe*が検出された食品は、カレー粉・香辛料、だし・乾物、貝類、海藻で、*cpe*のが検出率が最も高かったのは貝類（しじみ、あさり、生カキ）だった。一方、いずれの食肉からは *cpe*は検出されなかった。今回の調査結果から、*cpe*保有ウエルシュ菌の汚染食品の傾向が認められ、本食中毒の汚染源と予防法を考慮する上で重要な疫学データを提供した。

A．研究目的

ウエルシュ菌食中毒はグラム陽性偏性嫌気性桿菌 *Clostridium perfringens* によって引き起こされる食中毒である。ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、本菌の芽胞に汚染された食品は、調理時の加熱によって発芽し、加熱によって嫌気状態になった食品中で急速に増殖する。このため、調理後、食品を急速に冷却することがウエルシュ菌の増殖を抑制し、食中毒を予防するのに重要である。こういったウエルシュ菌の特性から、調理後の加熱が緩慢になりが

ちな大規模調理施設でウエルシュ菌食中毒が発生する傾向が認められる。我が国では HACCP による管理が義務付けられてから、1年以上が経過しようとしている。しかしながら本菌による食中毒は依然発生が続いており、減少の傾向が認められない。この原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ種菌の主たる汚染食品が明らかになっていないことがまず挙げられる。ウエルシュ菌は多くの食品から検出されるが、そのほとんどがエンテロトキシン非産生株であり、食中毒の原因となるエンテロトキシン産生株はほとんど検出されない。これまでにもウエルシュ菌の汚染調査が行われてきたが、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品は明らかになっていない。また、多くのウエルシュ菌食中毒事例では、食中毒が発生しても原因食材を同定できない事例が多く、さらに、飲食店でウエルシュ菌の増殖を抑えるための適切な調理が行われているかどうかの実態も明らかになっていない。このため飲食店等へ効果的な指導を行うための基礎的なデータが不足するという結果になっており、結果的にウエルシュ菌食中毒の発生を防止できないことの一因になっていると考えられる。本年度の研究では、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染源を明らかにすることを目的としている。さらに、研究期間中に汚染食材からのウエルシュ菌除去法や食材中の増殖挙動を検討する。また、ウエルシュ菌の高感度迅速検査法を開発し、食中毒発生時の原因食材の同定を容易にする。以上の研究結果を総合し、生産から調理段階までを考慮したウエルシュ菌食中毒予防法を提案する。

B． 研究方法

[１]検体

調査に使用した検体は、宮崎県内のスーパーマーケットおよび小売店で購入した他、インターネットで購入した食品で、牛肉（20 検体)、豚肉（20 検体)、鶏肉（20 検体)、根菜・ホウレン草などの泥付き野菜（20 検体)、魚・エビ（20 検体)、貝類（20 検体)、海藻（20 検体)、カレー粉・香辛料（26 検体)、だし・乾物（30 検体）の計 196 検体を供試した。検体のうち、生鮮食品は購入後、４℃で保管し、24 時間以内に試験に供した。

供試する検体の条件を以下のように統一した。即ち、肉類は、ミンチおよび内臓肉は使用せず、また、国産、外国産を問わないが、産地(国)がわかるものを購入し、冷凍品（解凍品）はなるべく避けた。泥付き野菜は、なるべく外皮を含む外側を採取した。また、ホウレン草の根は切り落として使用した。野菜に付着した泥については、根菜から故意に落としたり、水洗いをせず、泥付きの場合はそのことを記録した。魚の切り身は皮を含めて使用した。エビについては、ボイルしたものは使用せず、殻付きエビは殻ごと使用し、有頭エビは頭を付けた状態で使用した。貝類は、むき身、殻付

きいずれも使用し、ボイルしたものは使用しなかった。また、生食用か加熱用かは記録した。海藻は、昆布、ヒジキ、海藻サラダのような乾燥品も供試したが、戻し率を10倍と考え、2.5gを使用した。カレー粉は、ルータイプではなく、スパイスの粉末が混合されたものとし、同一製品を、または同一店舗で複数回購入する場合は、なるべく購入時期を変えたり、ロットが違うものを購入した。だし・乾物は、市販のだしパック、干し椎茸、鰹節、魚の乾燥品などとし、顆粒状の和風調味料は除いた。また、だしパックのパック(不織布)は取り除き、中身だけをストマッカー処理した。さらに、同一製品を、または同一店舗で複数回購入する場合は、なるべく購入時期を変えたり、ロットが違うものを購入した。

供試した食品は、購入日、購入店、品名、食品区分、産地、冷凍・冷蔵の有無を記録した。

[２]検査手順

検体 25gを無菌的にストマッカー袋に採取した。チオグリコール酸培地Ⅱ（ニッスイ）を 225 mL 加え、1分間、ストマッカー処理し、70℃、20分間加熱後、急冷したものを試料原液とした。試料原液10mLと滅菌後55℃に保温しておいたハンドフォード改良培地（関東化学）15mLを２枚の嫌気パウチにそれぞれ加え、軽く混ぜた後に空気を追い出し、ヒートシールした後、46℃、18時間培養した。培養後、２枚の嫌気パウチ内の黒色コロニー数の平均を推定ウエルシュ菌数として記録した。残りの試料原液は、ストマッカーバックから空気を追い出し、ヒートシールをし、42℃、24時間、増菌培養した。培養した増菌培養液を２枚の CHROMagar™ *C. perfringens* base（以下、CHROMagar）（関東化学）に塗抹し、37℃、24時間、嫌気培養した。

増菌培養液からアルカリ熱抽出法でDNAを抽出し、Quick Taq HS DyeMix(#DTM-101、TOYOBO)を用いたマルチプレックスPCR法により、増菌培養液中のα毒素遺伝子(324 bp)およびエンテロトキシン遺伝子(233 bp)をそれぞれ特異的に検出するプライマーセット(α毒素遺伝子検出プライマーセット；multi-cpa-F： 5’-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3’、multi-cpa-R: 5’-CCTCTGATACATCGTGTAAG-3、エンテロトキシン遺伝子検出プライマーセット；multi-cpe-F : 5’-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3、multi-cpe-R : 5’-GGACCAGCAGTTGTAGATA-3)を用いて確認した。増菌培養液を用いたPCR反応が阻害されることを考慮し、このPCRが陰性となった場合でも、増菌培養液のCHROMagarへの塗抹、培養は行った。

CHROM agar上のオレンジ色のウエルシュ菌が疑われるコロニーを５～20 個釣菌し、純培養後にアルカリ熱抽出法でDNAを抽出し、α毒素遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子保有状況を上述したマルチプレックス PCR 法で確認するとと

もに、生化学性状試験（グラム染色、好気培養）を用い、ウエルシュ菌であるかどうか判定した。エンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌と同定された場合、7.5% DMSO を含むチオグリコレート培地に分離株を浮遊させ、-80℃で保存した。

検査記録簿には、CHROMagar 上での菌の発育状況、増菌培養液中のα毒素遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子の検出結果、分離株のα毒素遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子保有状況、および生化学性状試験の結果を記録した。

C．研究結果

［１］推定ウエルシュ菌数

加熱処理した試料原液とハンドフォード改良培地を混合・培養し、黒色集落数から検体中の推定ウエルシュ菌数を測定した結果、芽胞が検出されたのは鶏肉(15%)、泥付き野菜(20%)、貝類(30%)、カレー粉（15.4%）、だし・乾物（30%）で、推定菌数は10～10^3 cfu/gであった。一方、黒色集落の検出とエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の分離結果とはほとんどの検体で一致していなかった。

［２］増菌培養液から検出されたウエルシュ菌とエンテロトキシン遺伝子保有状況

増菌培養液から抽出したDNAを鋳型としてウエルシュ菌のα毒素遺伝子（*cpa*）とエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）をマルチプレックスPCR法で検出した結果、*cpa*が検出されたのは 196 検体中 59 検体（30.1%）で、*cpe*が検出されたのは14検体（7.1%）だった（表１）。*cpe*が検出された検体の内訳は、カレー粉・香辛料（３検体）、だし・乾物（１検体）、貝類（７検体）、海藻（１検体）、鶏肉（２検体）で、泥付き野菜は*cpa*のみが検出された。*cpe* が検出された検体の産地は、カレー粉・香辛料がいずれもインド、貝類の２検体が中国と韓国で、それ以外の陽性検体は全て国産だった。

［３］分離培養されたウエルシュ菌のエンテロトキシン遺伝子保有状況

CHROMagar 上のオレンジ色のウエルシュ菌が疑われるコロニーを５～20 個釣菌し、純培養後にアルカリ熱抽出法で DNA を抽出した。α毒素遺伝子(*cpa*)とエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）をマルチプレックスPCR法で検出した結果、*cpa*が検出されたのは 196 検体中 63 検体（32.1%）で、*cpe*が検出されたのは９検体（4.6%）だった（表２）。*cpe*が検出された検体の内訳は、カレー粉・香辛料（２検体）、貝類（６検体）、海藻（１検体だった。*cpe* のが検出率が最も高かったのは貝類(6検体、30%)で、しじみ 3、あさり 2、生カキ 1検体だった。増菌培養からの *cpe* の検出された検体数が 14 検体（7.1%）だったのに対し、分離培養した集落から検出された検体数は９検体（4.6%）で、低い検出率であった。

D．考察

ウエルシュ菌食中毒の発症機序として、ウエルシュ菌の食品中での異常増殖がある。食品の加熱は、食材中に含まれる酸素が放出され嫌気状態となる。ウエルシュ菌の耐熱性芽胞は加熱しても食品中で生残する。ウエルシュ菌の至適発育温度は 43～47℃と他の細菌よりも高く、増殖速度も速いため、食品の温度が発育に適した温度まで下がると発芽して、急速に増殖を始める。食品の中で大量に増殖したウエルシュ菌が食品とともに胃を通過し、小腸内で増殖して、菌が芽胞を形成する際に産生・放出するエンテロトキシンにより発症する。代表的な原因食品として、大量調理されたのち、長時間室温で放置された食品、特にカレーやシチュー等の食肉調理食品があげられる。魚介類調理食品や野菜の煮物が原因となる事例も多い。

今回の調査で、エンテロトキシン遺伝子（*cpe*）を保有したウエルシュ菌が食肉ではなくカレー粉・香辛料から検出されたことから、カレーを原因食品とする食中毒は、*cpe* 保有ウエルシュ菌が食肉に汚染されていた場合に加え、カレー粉や香辛料に汚染された *cpe* 保有ウエルシュ菌に起因する食中毒のリスクも考慮する必要があると考えられた。同様に、だし・乾物、海藻（コンブ）からも *cpe* が検出されており、煮物や煮込み料理を原因食品とするウエルシュ菌食中毒も、料理に使用した「だし」に *cpe* 保有ウエルシュ菌が混入したことによるケースもあると思われた。

今回の調査で最も *cpe* 保有ウエルシュ菌の検出率が高かったのは貝類であり、しじみ、あさり、生カキから検出された。貝類の汚染経路として考えられるのは、ヒトまたは動物由来 *cpe* 保有ウエルシュ菌の芽胞が下水等に流入し、終末処理場から河川、さらには海洋に流出し、貝類に蓄積されたことが考えられた。よってこれらの食材を煮込み料理等に使用する際には注意が必要と思われる。

一方、今回の調査において、*cpe* 保有ウエルシュ菌は鶏肉の増菌培養液からのみ検出されたが、牛肉と豚肉からは *cpa* および *cpe* 保有ウエルシュ菌は増菌培養および分離培養ともに全く検出されなかった。考えられる原因としては、宿主側の要因、食肉処理場に HACCP の制度が導入され、牛や豚ではより高度な衛生管理が行われている事等があげられる。今後は検体数を増やすとともに、家畜の腸内容物中にどの程度の *cpe* 保有ウエルシュ菌が保菌されているのか、季節的変動も含め調べる必要がある。

今回のウエルシュ菌汚染実態調査では、推定ウエルシュ菌数の測定と検体から *cpe* 保有ウエルシュ菌を分離培養するために、増菌培養とそれに続く選択培地を用いた分離培養を行った。

推定菌数は $10～10^3$ cfu/g であったが、黒色集落の検出と *cpe* 保有ウエルシュ菌の分離結果とはほとんどの検体で一致していなかった。このことから、加熱処理し

た試料原液とハンドフォード改良培地を混合・培養し、黒色集落数から検体中の推定ウエルシュ菌数を推定することは可能であるが、*cpe* 保有ウエルシュ菌の汚染状況を推定することは難しいと思われた。

今回行った検査手順において、*cpe*保有ウエルシュ菌の検出率は分離培養よりも増菌培養のほうが高かった。この検出率の違いは、分離培養で釣菌する集落数が少なかったことが一因と考えられ、釣菌する集落数を増やすなどの検査手順の再検討が必要と思われた。

E．結論

本年度から食品の *cpe* 保有ウエルシュ菌の汚染実態調査を開始した。*cpe*保有ウエルシュ菌は、貝類、だし・乾物およびカレー粉・香辛料から分離され、特に貝類が高い検出率を示した。一方、牛肉、豚肉からはウエルシュ菌が全く分離されなかった。今後は、食品における *cpe* 保有ウエルシュ菌汚染実態を明らかにするための疫学調査を継続して実施することが必要である。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

表１　食品の増菌培養液から検出されたウエルシュ菌アルファ毒素遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子

検　体	検体数	*cpa*陽性検体数 (%)	*cpe*陽性検体数 (%)	*cpe*陽性／*cpa*陽性(%)	備　考
カレー粉・香辛料	26	8 (30.8)	3 (11.5)	37.5	カレーパウダー 2、チキンマサラ 1
だし・乾物	30	8 (30.8)	1 (3.3)	12.5	いりこ 1
魚・エビ	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
貝	20	16 (80.0)	7 (35.0)	43.8	しじみ 3、あさり 3、生カキ 1
海藻	20	2 (10.0)	1 (5.0)	50	昆布 1
牛肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
豚肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
鶏肉	20	15 (75.0)	2 (10.0)	13.3	モモ肉 1、ムネ肉 1
泥付き野菜	20	10 (50.0)	0 (0.0)	0	
合計	196	59 (30.1)	14 (7.1)	23.7	

産地：カレーパウダー 2（インド)、チキンマサラ１（インド)、いりこ１（国産)、しじみ 3（国産)、あさり 3（国産、中国、韓国)、生カキ 1（国産)、昆布 1（国産)、鶏肉２（国産）

表 2　クロモアーガーから釣菌された集落から検出されたウエルシュ菌アルファ毒素遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子

検　体	検体数	*cpa*陽性検体数 (%)	*cpe*陽性検体数 (%)	*cpe*陽性/*cpa*陽性(%)	備　考
カレー粉・香辛料	26	12 (46.2)	2 (7.7)	16.7	カレーパウダー 2
だし・乾物	30	9 (30.0)	0 (0.0)	0	
魚・エビ	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
貝	20	16 (80.0)	6 (30.0)	37.5	しじみ 3、あさり 2、生カキ 1
海藻	20	2 (10.0)	1 (5.0)	50	昆布 1
牛肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
豚肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
鶏肉	20	15 (75.0)	0 (0.0)	0	
泥付き野菜	20	9 (45.0)	0 (0.0)	0	
合計	196	63 (32.1)	9 (4.6)	14.3	

注[1] クロモアーガーから 5～20 個の集落を釣菌。

注[2] 産地：カレーパウダー 2（インド）、しじみ 3（国産）、あさり 2（国産、中国）、生カキ 1（国産）、昆布 1（国産）

令和５年４月５日

厚生労働大臣　殿

機関名　　宮崎大学

所属研究機関長　職　名　　学　長

氏　名　　鮫　島　　浩

次の職員の令和 4 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンター

（氏名・フリガナ）　三澤 尚明・ミサワ ナオアキ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□	■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　）

研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし

令和　5　年　3　月　30日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　合田　幸広

次の職員の令和４年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　衛生微生物部　第二室長

（氏名・フリガナ）　大西　貴弘（オオニシ　タカヒロ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学･医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	☑	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	☑	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	☑	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□	☑	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑ 無 □(無の場合はその理由:　)
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑ 無 □(無の場合は委託先機関:　)
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑ 無 □(無の場合はその理由:　)
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □ 無 ☑（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和　5　年　3　月　30日

厚生労働大臣　殿

機関名　国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　合田　幸広

次の職員の令和４年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　衛生微生物部　第三室長

（氏名・フリガナ）　渡辺　麻衣子（ワタナベ　マイコ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学･医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	☑	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	☑	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	☑	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□	☑	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和５年　４月　10日

厚生労働大臣 殿

機関名　川崎市健康安全研究所

所属研究機関長　職　名　所長

氏　名　岡部信彦

次の職員の令和４年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　川崎市健康安全研究所　所長

（氏名・フリガナ）　岡部信彦（オカベノブヒコ）

４．倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学･医学系研究に関する倫理指針（※3）	□	■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□	■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□	■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　）	□	■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☑　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ☑　無 □（無の場合は委託先機関：　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ☑　無 □（無の場合はその理由：　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ☑（有の場合はその内容：　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和５年４月５日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）~~ 殿
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名　　宮崎大学

所属研究機関長　職　名　　学　長

氏　名　　鮫　島　　浩

次の職員の令和４年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

１．研究事業名　　食品の安全確保推進研究事業

２．研究課題名　　ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

３．研究者名　（所属部署・職名）　宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンター

（氏名・フリガナ）　三澤 尚明・ミサワ ナオアキ

４．倫理審査の状況

	該当性の有無 有　無	左記で該当がある場合のみ記入（※1） 審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学･医学系研究に関する倫理指針（※3）	□　■	□		□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□　■	□		□
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	□　■	□		□
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：　　）	□　■	□		□

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

５．厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ■　　未受講 □

６．利益相反の管理

当研究機関におけるＣＯＩの管理に関する規定の策定	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究機関におけるＣＯＩ委員会設置の有無	有 ■　無 □（無の場合は委託先機関：　　）
当研究に係るＣＯＩについての報告・審査の有無	有 ■　無 □（無の場合はその理由：　　）
当研究に係るＣＯＩについての指導・管理の有無	有 □　無 ■（有の場合はその内容：　　）

（留意事項）　・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。