

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

ウェ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5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 貴弘

令和6年5月24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

ウエルシュ菌の汚染調査及び食品中の増殖挙動の解析	8
大西 貴弘	
家畜・家禽の腸内容物からのウエルシュ菌の検出	22
三澤 尚明	
食品におけるウエルシュ菌汚染実態調査	36
岡部 信彦	
食品や環境からのウエルシュ菌の検出および分子疫学的解析	46
渡辺 麻衣子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

	58
--	----

令和5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	淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所
研究協力者	西里英美莉	川崎市健康安全研究所
研究協力者	荒木 靖也	川崎市健康安全研究所

研究要旨

昨年度は、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。今年度は、食品におけるエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）保有ウエルシュ菌の汚染実態調査を継続するとともに、家畜・家禽腸内容物からのウエルシュ菌の検出、都市部河川水からのウエルシュ菌の検出、分離株の分子疫学的解析、食品中におけるウエルシュ菌の増殖挙動の解析を行った。その結果、家畜・家禽腸内容物から *cpe* 保有ウエルシュ菌は検出されず、食肉が本食中毒の原因食品となるリスクは低いことが示唆された。また、食品を汚染している *cpe* 保有ウエルシュ菌は最高で 78 MPN/100g と非常に低菌量であることが明らかになった。一方、根菜付着土および下水処理場放流水の河川流入域水からは *cpe* 保有菌が検出され、これらがウエルシュ菌汚染に関与している可能性が示唆された。カレー中のウエルシュ菌の増殖を解析したところ、牛肉非添加のカレーでは、ウエルシュ菌の増殖が著しく抑制されることが明らかになった。本研究班のこれまでの成果から、ウエルシュ菌の汚染源としての食肉の重要性は、それほど高くないことが示唆されたが、食肉の添加はウエルシュ菌の増殖を強力に促進するため、ウエルシュ菌食中毒の予防を考える上で、非常に重要な要素であることが明らかになった。

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 (cpe) 産生性ウエルシュ菌の汚染源が明らかになっていないことがあげられる。原因食品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がこれまで多く行われてきた。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至っていない。

昨年度は cpe 保有ウエルシュ菌の汚染源を明らかにするために、大規模な汚染実態調査を行った。その結果、従来、ウエルシュ菌の汚染源として重要視されてきた食肉からは、cpe 保有株はほとんど検出されず、カレー粉、香辛料、貝、海産乾物、根菜から cpe 保有株が多く検出された。この結果から、ウエルシュ菌食中毒の汚染源として、食肉の重要性は従来考えられていたほど高くはないことが示唆された。しかし、ウエルシュ菌食中毒と食肉を使用した料理との関連性が高いのは事実である。そこで今年度は、家畜、家禽の腸内容物から cpe 保有菌の検出を試みるとともに、ウエルシュ菌食中毒が発生しやすい煮物におけるウエルシュ菌の増殖に食肉の添加がどのような影響を及ぼすか、カレーを煮物のモデル食品として使用し、検討を行った。

さらに、今年度は食品における cpe 保有株の汚染実態調査を継続して行うとともに、汚

染菌量の推定も行なった。また、昨年度の調査で、貝や海産乾物における cpe 保有株の汚染が認められたため、河川水における cpe 保有株の汚染状況を調査した。これらに加えて、汚染実態調査で分離された株の遺伝的特徴を明らかにするために、患者分離株とともにゲノム DNA を抽出し、分子系統解析を行った。

B. 研究方法

[1] 食品における汚染実態調査

食品の汚染実態調査は、基本的に昨年度の方法で行った。昨年度の方法では、食品によっては、PCR 反応が阻害されたため、今年度は阻害物質の影響を受けにくい PCR 試薬を用いて、試験した。食品を汚染しているウエルシュ菌数の推定は、最確数法で行った。

[2] 家畜・家禽腸内容物からの cpe 保有株の検出

宮崎県内の食肉処理場から健康畜として搬入された牛と豚の大腸内容物およびブロイラーの盲腸内容物、587 検体を供試した。検体は、チオグリコール酸培地 II 中で、70℃、20 分間加熱後、42℃、24 時間増菌培養した。培養後、CHROMagar *C. perfringens* に塗抹し、37℃、24 時間、嫌気培養した。発育したコロニーがウエルシュ菌であることを確認した後、コロニー PCR で *cpa*、*cpe* の保有状況を確認した。

[3] 煮物におけるウエルシュ菌増殖挙動の解析

煮物のモデル食品としてカレーを使用した。カレーのレシピはカレールーに記載の方法に従った。作製後、カレーは 42℃まで冷却し、24 時間培養したウエルシュ菌を接種した。接種菌株は、昨年度の汚染実態調査でカレー粉・香辛料から分離された 5 株を使用

した。接種菌量は、本年度行った、香辛料を汚染している *cpe* 保有株の汚染菌量の推計結果をもとに決定した。接種後、1 時間ごとにカレーをよく攪拌した後にカレーを採取し、CHROMagar *C. perfringens* に塗抹し、コロニー数を計数した。

[4] 河川水および土壌における *cpe* 保有株の汚染調査

河川からの採水試料をストマック一袋に分取し、75℃で20分間加熱後、試料をフィルターに吸引ろ過した。フィルターは CHROMagar *C. perfringens* 上で37℃で24±2時間嫌気培養した。形成されたコロニーの *cpa*、*cpe* 保有状況をコロニーPCRによって確認した。

[5] 分離株の分子系統解析

本研究班において昨年度および今年度に分離した *cpe* 保有株および川崎市健康安全研究センターで過去に分離した患者由来株の計12株を供試した。これらの株の全ゲノムシーケンスを行い、*colA*、*groEL*、*sodA*、*plc*、*gyrB*、*sigK*、*pgk* および *nadA* を対象とした MLST 解析を行った。

C. 研究結果

[1] 食品における汚染実態調査

煮干し、蕎麦粉から *cpe* 保有株が検出された。土付き野菜では、ごぼう、長ネギ、じゃがいもから *cpe* 保有株が検出された。牛挽肉からは、昨年度同様、*cpe* 保有株は検出されなかった。

昨年度の調査で汚染が強く認められたカレー粉・香辛料および海産乾物における汚染菌量の推計を行った。その結果、18 MPN/100g 未満から 78 MPN/100g という低濃度の汚染が

認められた。

[2] 家畜・家禽腸内容物からの *cpe* 保有株の検出

牛、豚、鶏の腸内容物からは、年間を通じて *cpe* 非保有株が検出された。しかし、*cpe* 保有株は検出されなかった。

[3] 煮物におけるウエルシュ菌増殖挙動の解析

カレーにおける増殖挙動を調査した。その結果、カレー粉・香辛料に汚染している少量のウエルシュ菌でも、牛肉添加カレー中では、培養6時間で食中毒を引き起こせるだけの菌濃度に到達することが明らかになった。しかし、牛肉非添加のカレー中では、ウエルシュ菌の増殖は著しく抑制された。

[4] 河川水および土壌における *cpe* 保有株の汚染調査

下水処理場放流水の河川流入域水で *cpe* 保有株が検出された。河川水では検出限界以下であった。下水処理場放流水の河川流入部付近の水では *cpe* 保有株数が高い可能性があると考えられた。

[5] 分離株の分子系統解析

今年度解析した菌株は6つのハプロタイプに分かれ、分離された国によってはハプロタイプの偏りは無いこと、患者由来株のみで構成されたハプロタイプが確認されたこと、今回分離および配列決定した食品由来株4株および下水処理場の河川流入域水由来株1株はいずれも複数の国で分離された患者由来株と比較的類似した

allele のタイプを持つことが示された。

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。昨年度の調査では、鶏肉 1 検体から *cpe* 保有株が検出されたのを除き、牛肉、豚肉から *cpe* 保有株は検出されなかった。その一方で、香辛料、カレー粉、貝、海産乾物などから *cpe* 保有株が多数検出された。この結果から、ウエルシュ菌食中毒における食肉の重要性は高くないことが示唆された。今年度は、牛、豚、鶏の腸内容物 587 検体およびひき肉について調査を行ったが、*cpe* 非保有株は検出されるが、*cpe* 保有株は検出されなかった。昨年度および今年度の結果から、食肉、特に牛肉および豚肉がウエルシュ菌食中毒の原因となる可能性は低いと考えられた。しかし、ウエルシュ菌食中毒は食肉を使用した料理で多発している。そこで、ウエルシュ菌の増殖における食肉の影響を調べるために、カレー中における、ウエルシュ菌の増殖挙動を検討した。その結果、牛肉の添加は、ウエルシュ菌の増殖を強力に促進することが明らかになった。この結果から、*cpe* 保有株の汚染源としての牛肉の重要性は高くないが、ウエルシュ菌の増殖を著しく促進するため、食肉（牛肉）の添加はウエルシュ菌食中毒の予防を考える上で、非常に重要な要素であること

が明らかになった。今後、豚肉や鶏肉を使用した場合についても検討を行いたい。今回、牛肉の添加によってウエルシュ菌の増殖が促進したが、その原因を明らかにすることはできなかった。ウエルシュ菌はタンパク質を好む細菌であるため、牛肉が栄養源として働いた可能性が考えられた。また、食肉の添加は、酸化還元電位を低下させると考えられているため、嫌気度を上昇させることによって増殖をサポートしている可能性が考えられた。

昨年度の調査では、貝や海産乾物から *cpe* 保有株が多く検出された。今回の結果から、下水の河川流入域で *cpe* 保有株が検出された。この結果から、河川中の *cpe* 保有株が貝や海産乾物を汚染している可能性が示唆された。海外の研究では、*cpe* 保有株はヒトが保菌しており、下水に汚染された河川が、*cpe* 保有株の汚染源であるとの報告がある。今回の結果は、我が国でも同様の汚染が生じている可能性を示唆するものである。今後、河川におけるウエルシュ菌の汚染状況を詳細に調査し、我が国におけるウエルシュ菌の汚染源を明らかにしていきたい。

分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子系統解析の結果、患者由来株のみで構成されたハプロタイプが存在した一方で、患者由来株と近縁な allele を持つ食品由来株および環境由来株が存在することも示された。これらが食中毒の発生に関連した菌株である可能性が考えられた。今後は、分離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プ
ピングを、より解像度の高い解析方法
によって実施し、菌の動態を疫学的に
考察することによって、ヒトに食中毒
を起こすリスクが高い食品や、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

今回の調査結果は、香辛料・カレー
粉や海産乾物がウエルシュ菌食中毒
の汚染源として重要であることを示
唆した昨年度の結果を裏付けるもの
である。一方、今回の結果から、ウエ
ルシュ菌の増殖を促進するという食
肉の新たな重要性が明らかになった。
今後、食肉とウエルシュ菌の増殖につ
いてさらに検討を行い、ウエルシュ菌
が増殖しにくい調理法の開発に繋げ
ていきたいと考える。

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

令和 5 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

ウエルシュ菌の汚染調査及び食品中の増殖挙動の解析

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

昨年度の食品における汚染実態調査の結果から、エンテロトキシン遺伝子（*cpe*）保有ウエルシュ菌芽胞の汚染が強く認められたカレー粉・香辛料および海産乾物における汚染菌量の推計を行った。その結果、18 MPN/100g 未満から 78 MPN/100g という低濃度の汚染が認められた。煮物におけるウエルシュ菌の増殖を検討するために、カレーにおける増殖挙動を調査した。その結果、カレー粉・香辛料に汚染している少量のウエルシュ菌でも、牛肉添加カレー中では、6 時間で食中毒を引き起こせるだけの菌濃度に到達できることが明らかになった。しかし、牛肉非添加のカレー中では、ウエルシュ菌の増殖は著しく抑制された。昨年度の調査では、牛肉からは *cpe* 保有ウエルシュ菌芽胞は検出されなかった。以上の結果から、ウエルシュ菌の汚染源としての食肉の重要性は、それほど高くはないことが示唆されたが、食肉の添加はウエルシュ菌の増殖を強力に促進するため、ウエルシュ菌食中毒の予防を考える上で、非常に重要な要素であることが明らかになった。

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。昨年度は、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。昨年度の調査結果から、カレー粉・香辛料、貝、イリコ・干しエビ、魚介類、根菜、鶏肉な

どさまざまな食品から *cpe* 保有ウエルシュ菌芽胞が検出された。この中で、検出されたウエルシュ菌の *cpe* 保有率が高かったのが、カレー粉・香辛料、貝、イリコ・干しエビであった。一方、牛肉、豚肉からは *cpe* 保有ウエルシュ菌芽胞は検出されなかった。特に牛肉からは、*cpe* 非保有ウエルシュ菌芽胞も検出されなかった。これらの結果から、*cpe* 保有ウエルシュ菌芽胞の汚染源として、牛肉および豚肉の重要性は低いことが示唆された。

今年度は、食品を汚染している *cpe* 保有ウエルシュ菌芽胞の推計を行った。さらに、ウエルシュ菌食中毒が頻発する煮物におけるウエルシュ菌の増殖を検討するために、カレーにおける増殖挙動を調査した。

B. 研究方法

[1] 汚染菌量の推計

(1) 検体

カレー粉 54 検体およびイリコや干しエビなどの海産乾物 62 検体を供試した。

(2) スクリーニング検査

検体 25 g 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 225 mL 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、42℃、24 時間の増菌培養を行った。増菌培養液 100 μ L を採取し、10,000 $\times$ g、10 分間遠心して上清を除き、沈渣に 50 mM NaOH 85 μ L を添加し、100℃で 10 分間加熱処理した。1M Tris-HCl (pH7.0) 15 μ L を加え、10,000 $\times$ g で 10 分

間遠心した。上清をテンプレートとして利用し、マルチプレックス PCR を行った。マルチプレックス PCR では、ウエルシュ菌のマーカースとしてアルファ毒素遺伝子 (*cpa*) を検出するとともに *cpe* を検出した。

(2) 最確数法

スクリーニング検査の後、最確数法を用いて汚染菌量を推計した (図 1)。検体 25 g 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 225 mL 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。試料原液をチオグリコレート培地で 10 倍、100 倍希釈した。試料原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液、それぞれを 5 本の試験管に 10 mL ずつ分注した。その後、42℃、24 時間培養した。培養後、各試験管から培養液 100 μ L を採取した。スクリーニング検査と同じ方法を用いてテンプレートを作製し、マルチプレックス PCR で各試験管ごとに *cpa* および *cpe* 検出した。*cpa* もしくは *cpe* の陽性件数を最確数表に当てはめ、検体中の *cpa* もしくは *cpe* 保有ウエルシュ菌の汚染菌数を推計した。

(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] 増殖挙動の解析

ウエルシュ菌食中毒が頻発する煮物におけるウエルシュ菌の増殖挙動を解析するために、カレーをモデル食品として採用した。カレーは 3 人分 (約 800mL) 作製した。カレーはカレールーの箱に記載の方法に従い、カレールー 57g、牛肉 120g、玉ねぎ 100g、じゃがいも 110g、にんじん 50g、水 350g (3 人分) を使用した。作製後、カレーは 42℃ まで冷却し、24 時間培養したウエルシュ菌を接種した。接種菌株は、昨年度の汚染実態調査でカレー粉・香辛料から分離された 5 株を使用した。接種後、1 時間ごとにカレーをよく攪拌した後にカレーを採取し、クロモアガー *C. perfringens* (関東科学) に塗抹し、コロニー数を計数した。

C. 研究結果

[1] 汚染菌量の推計

今回の調査では、カレー粉・香辛料 54 検体、海産乾物 62 検体を調査した (表 1)。カレー粉・香辛料で、*cpa* がスクリーニング陽性となったのは、25 検体 (46%) で、そのうち 11 検体 (20%) が *cpe* 陽性となった。海産乾物で *cpa* がスクリーニン

グ陽性となったのは、29 検体 (47%) で、そのうち 4 検体 (6%) が *cpe* 陽性となった。*cpe* がスクリーニングで陽性となったのはカレー粉・香辛料 11 検体、海産乾物 4 検体の計 15 検体であった。スクリーニング検査で *cpa* 陽性検体中のウエルシュ菌量を最確数法を用いて推計したところ、 $1.8 \times 10^1 \sim 1.6 \times 10^5$ MPN/100g であった (図 3)。増菌培養後のスクリーニング検査で *cpa* が陽性であったのにも関わらず、最確数法が定量限界値未満の検体が 26 検体あった。スクリーニング検査で *cpe* 陽性だった検体中の *cpe* 保有ウエルシュ菌量は、 $1.8 \times 10^1 \sim 7.8 \times 10^1$ MPN/100g であった (図 3)。増菌培養後のスクリーニング検査で *cpe* が陽性であったのにも関わらず、最確数法が定量限界値未満の検体が 9 検体あった。

同一検体中の *cpa* 陽性ウエルシュ菌数と *cpe* 陽性ウエルシュ菌数を比較したところ、*cpa* 保有ウエルシュ菌数が 10^3 MPN/100g 以上の検体でも、*cpe* 保有ウエルシュ菌数は低値であった (表 3)。

[2] 煮物中のウエルシュ菌の増殖挙動の解析

ウエルシュ菌食中毒が頻発している煮物中のウエルシュ菌食中毒の増殖挙動を解析した。本研究では、

煮物のモデルとしてカレーを用いた。今回は、ウエルシュ菌増殖における食肉添加の影響を調べるために、牛肉添加、牛肉非添加のカレーを作製した。カレー3人分(800 mL)を作製し、カレー粉由来の *cpe* 保有ウエルシュ菌5株を $10\sim 60$ cfu 接種した。

1時間ごとの牛肉添加カレー中の菌数を測定したところ、培養3時間後にウエルシュ菌が検出され始め、6時間後には $10^6\sim 10^8$ cfu/mL になった(図4)。牛肉非添加のカレーでは、6時間後の菌量は $10\sim 10^2$ cfu/mL であり、牛肉入りカレーの結果と比較して、増殖が大きく抑制された(図5)。

D. 考察

昨年度の汚染実態調査では、検出されたウエルシュ菌の内、*cpe* 保有率が高かったのが、カレー粉・香辛料、貝、イリコ・干しエビであった。今年度はこれらの中、カレー粉・香辛料、海産乾物におけるウエルシュ菌量を推計した。その結果、増菌培養後のスクリーニング検査では *cpe* が検出されるが、最確数法では定量限界値未満の検体が多く存在した。最確数法で定量限界値以上の検体でも、 10^2 MPN/100g 以下であった。以上の結果から、これらの食品を汚染している

cpe 保有ウエルシュ菌芽胞は非常に低量であることが明らかになった。

同一検体中の *cpa* 保有ウエルシュ菌数と *cpe* 保有ウエルシュ菌数を比較したところ、*cpa* 保有ウエルシュ菌数と *cpe* 保有ウエルシュ菌数との間に関連性は認められなかった。*cpa* 保有ウエルシュ菌が低量の検体でも、*cpe* 保有ウエルシュ菌量は低量であったため、*cpa* 保有ウエルシュ菌によって、*cpe* 保有ウエルシュ菌の増殖が抑制されているわけではないと考えられた。今回は検体数が少なかったため、今後さらに検討する必要があるが、*cpa* 保有ウエルシュ菌と *cpe* 保有ウエルシュ菌が独立して分布している可能性も考えられた。

カレーにおけるウエルシュ菌の増殖挙動を解析した。今回は、カレー粉・スパイスに汚染している菌量を元に $10\sim 60$ cfu/カレー800 mL という低濃度の接種を行った。結果から、このような少量のウエルシュ菌でも、6時間で食中毒を引き起こせるだけの菌濃度に到達できることが明らかになった。今回は 42°C というウエルシュ菌の増殖に非常に適した温度で培養を行ったため、増殖速度が速くなったと思われる。しかし、15Lの寸胴鍋でカレーを調理後、室温放置した場合、ウエルシュ菌の

増殖可能温度帯に約 9 時間滞留したとの報告があることから、調理後の冷却が適切に行われなかった場合、少量のウエルシュ菌でも食中毒を惹起できる可能性が示唆された。

ウエルシュ菌食中毒には、肉を使用した料理が多いことが知られている。そこで、ウエルシュ菌の増殖における食肉の影響を調べるために、牛肉非添加カレーで同様の実験を行い、比較した。その結果、牛肉が入っていないカレーでは、6 時間後の菌量は $10 \sim 10^2$ cfu/ml であり、牛肉添加カレーの結果と比較して、増殖が大きく抑制された。今回、牛肉の添加によってウエルシュ菌の増殖が促進したが、その原因を明らかにすることはできなかった。ウエルシュ菌はタンパク質を好む細菌であるため、牛肉が栄養源として働いた可能性が考えられた。また、食肉の添加は、酸化還元電位を低下させると考えられているため、嫌気度を上昇させることによって増殖をサポートしている可能性が考えられた。これらの結果から、カレーへの牛肉（食肉）の添加は、ウエルシュ菌の増殖に大きな影響を与える要素であることが明らかになった。

本研究班のこれまでの成果から、ウエルシュ菌の汚染源としての食肉の重要性は、高くないことが示唆されたが、食肉の添加はウエルシュ菌の増殖を強力に促進

するため、ウエルシュ菌食中毒の予防を考える上で、非常に重要な要素であることが明らかになった。

E. 結論

食品に汚染している *cpe* 保有ウエルシュ菌の汚染量は非常に少量であることが明らかになった。また、食肉を添加しないカレー中ではウエルシュ菌の増殖が抑制されることが明らかになった。このことから、ウエルシュ菌食中毒の予防法として、次の方法が有効ではないかと考えられた。

- 1) 煮物を作る際にはまず食肉を炒める。
- 2) 一旦、鍋から食肉を取り出す。
- 3) 残りの材料で煮物を作る。
- 4) 配膳直前の再加熱の際に、先に調理した食肉を合わせ、提供する。

この方法で、カレーの中のウエルシュ菌の増殖を大きく阻害できると考えられる。次年度以降、この方法で食中毒を予防できるか、大鍋用いた大量調理を行い、実際に検討したい。

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

最確数法によるウエルシュ菌数の推定

検体25 g + チオグリコレート培地 225 mL



ストマッキング 1 分間 (10倍乳剤)



10倍乳剤 10 ml	10倍乳剤 1 ml + チオグリコレート培地 9 ml	10倍乳剤 0.1 ml + チオグリコレート培地 9.9 ml
-------------	------------------------------------	--

各 5 本を42°C、24時間培養



培養液を0.1 mlを取り、アルカリ熱抽出法でDNAを抽出



PCR (*cpa*, *cpe*)

陽性になった試験管数をもとに最確数表から菌数をめる

図1 最確数法によるウエルシュ菌数の推定手順

Multiplex PCR for *cpe* and *cpa*

- プライマー

multi-*cpa*-F: GCTAATGTTACTGCCGTTGA

multi-*cpa*-R: CCTCTGATACATCGTGTAAG

multi-*cpe*-F: GGAGATGGTTGGATATTAGG

multi-*cpe*-R: GGACCAGCAGTTGTAGATA

- 反応液

KOD one master mix	12.5 μ L
multi- <i>cpa</i> -F (50 μ M)	0.15 μ L
multi- <i>cpa</i> -R (50 μ M)	0.15 μ L
multi- <i>cpe</i> -F (50 μ M)	0.15 μ L
multi- <i>cpe</i> -R (50 μ M)	0.15 μ L
Template	2.0 μ L
H ₂ O	9.9 μ L

- プログラム

98°C	10 sec
55°C	5 sec
68°C	10 sec $\times$ 35
68°C	3 min

- 判定 (2%アガロースゲルで電気泳動)

324 bp $\rightarrow$ *cpa* (アルファ毒素遺伝子) 陽性

233 bp $\rightarrow$ *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

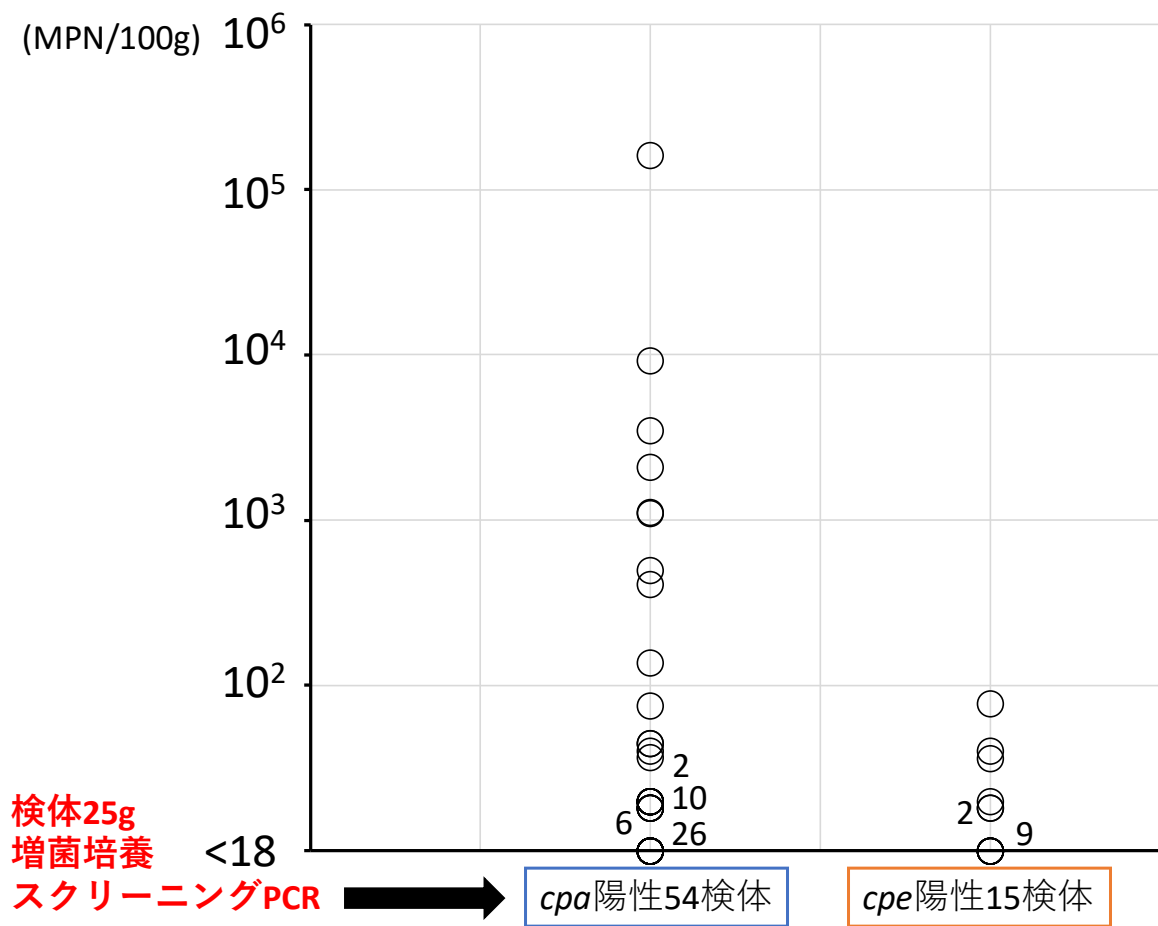


図3 カレー粉・香辛料・海産乾物を汚染しているウエルシュ菌数

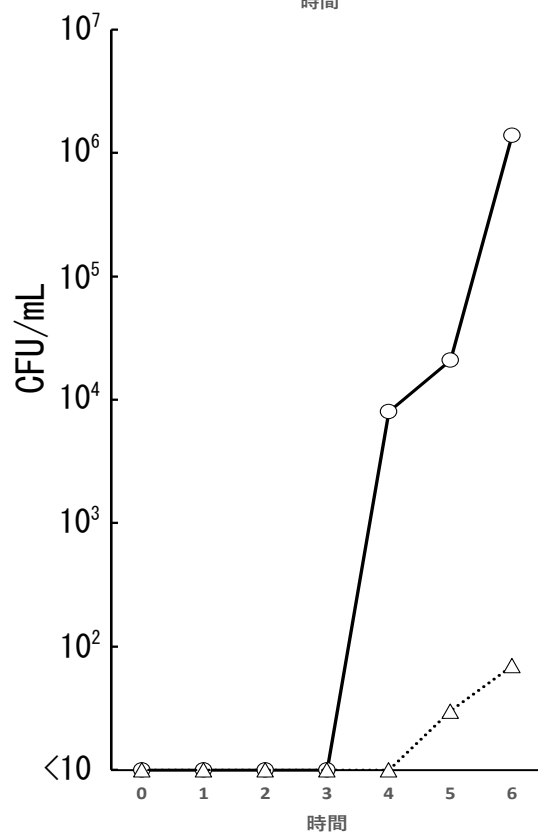
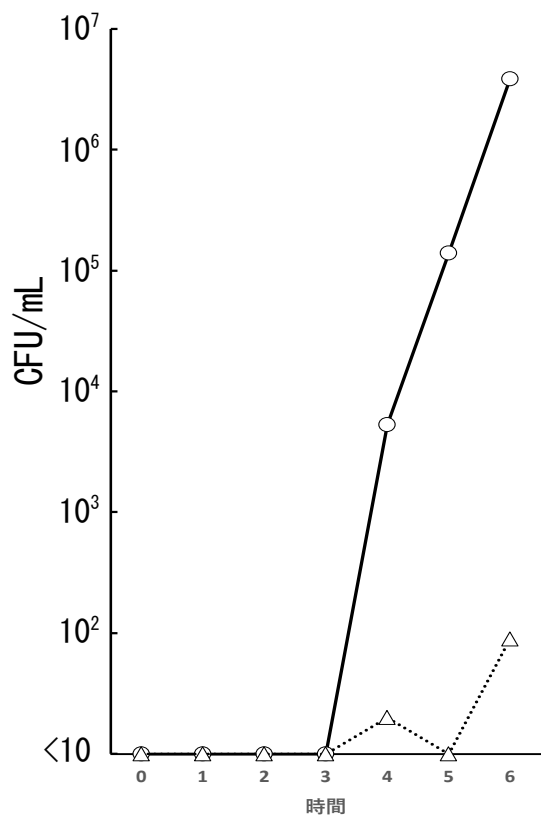
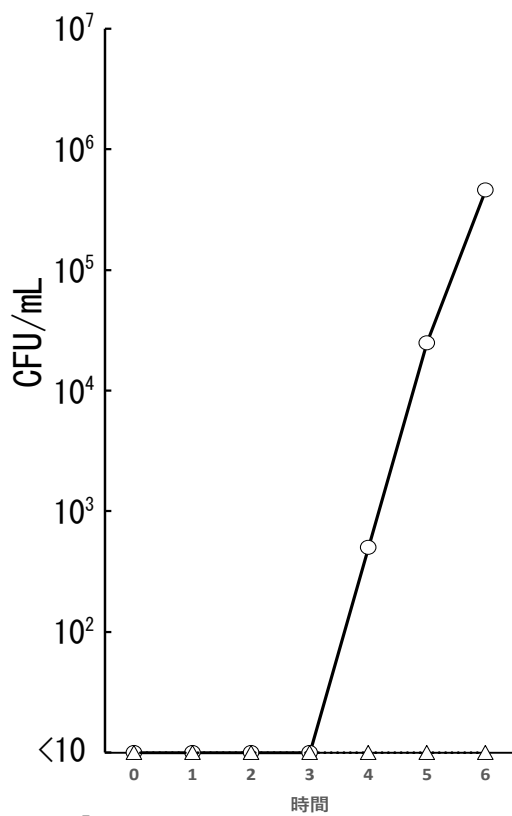
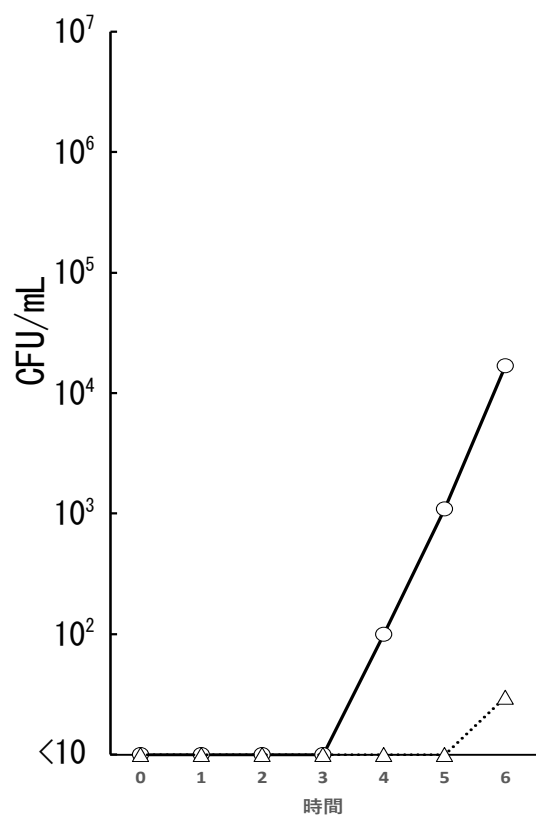


図4 カレー粉由来4株のカレー中での増殖
○：牛肉添加カレー △：牛肉非添加カレー

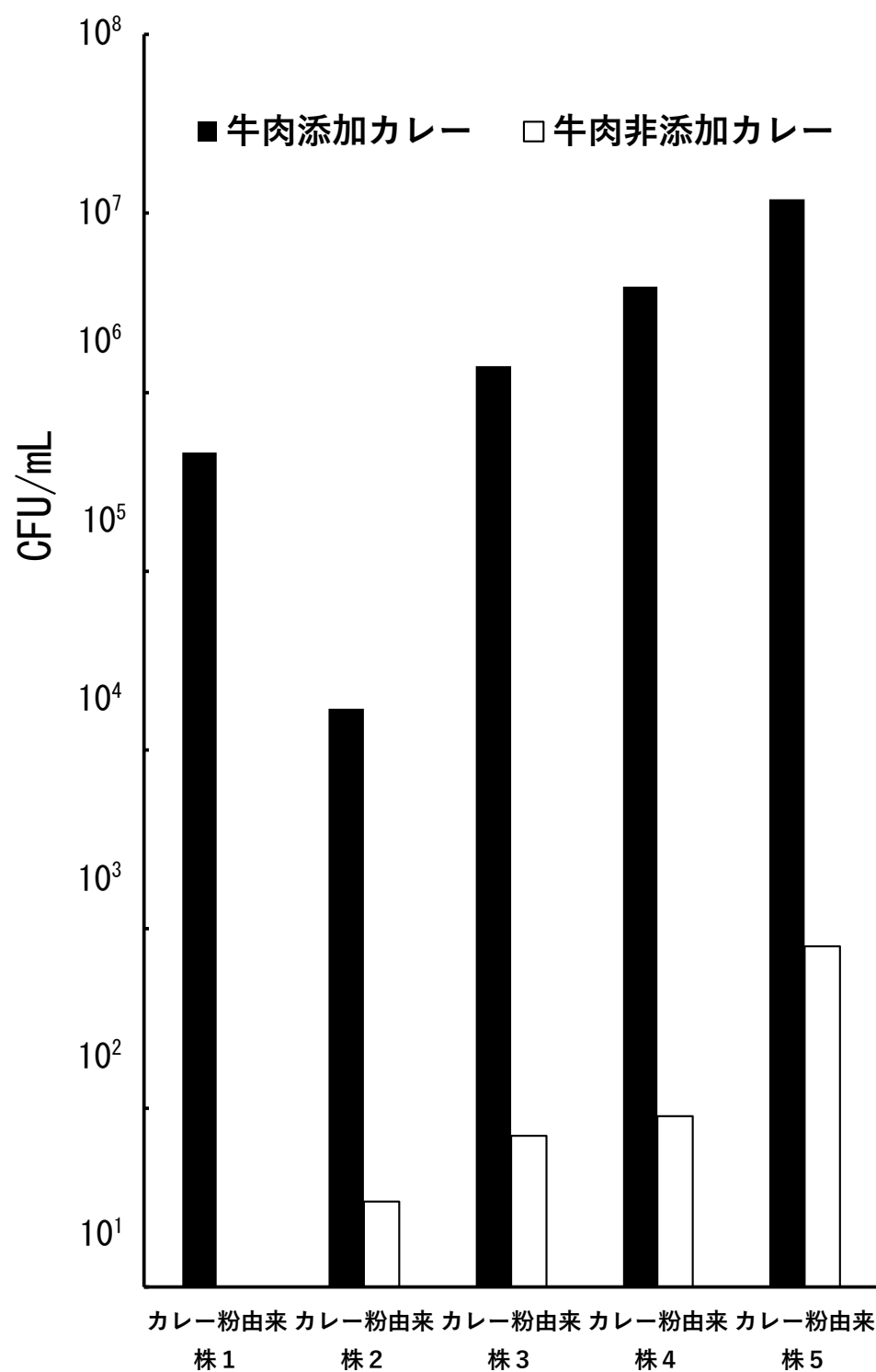


図5 培養6時間後のカレー中での菌数

表 1 増菌培養後のスクリーニング検査の結果

		増菌培養後のスクリーニングPCR	
		<i>cpa</i> (+)	<i>cpe</i> (+)
カレー粉	54 検体	25 (46%)	11 (20%)
乾物	62 検体	29 (47%)	4 (6%)

表 2 検体中の *cpa* 保有ウエルシュ菌数と *cpe* 保有ウエルシュ菌数の比較

検体	<i>cpa</i> (+)	<i>cpe</i> (+)
乾物(エビ)	<18	<18
乾物(魚)	<18	20
カレー粉	<18	<18
カレー粉	18	<18
乾物(魚)	20	<18
カレー粉	20	<18
カレー粉	20	<18
カレー粉	37	40
カレー粉	40	<18
カレー粉	75	<18
乾物(エビ)	104	18
カレー粉	201	78
カレー粉	3477	<18
カレー粉	9178	36
カレー粉	161093	18

令和5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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

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

家畜・家禽の腸内容物からのウエルシュ菌の検出

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、本菌による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。昨年度実施した大規模な食品の汚染実態調査を実施した結果、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離・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* 遺伝子の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、本食中毒の感染源として重要視されていた牛肉、豚肉および鶏肉からはアルファ毒素産生性ウエルシュ菌は検出されたが、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌は全く検出されなかった。これらの結果を踏まえ、本年度は牛、豚および鶏におけるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の保有状況を調査するため、腸内容物からの分離・検出を実施した。

牛（213 検体）、豚（210 検体）、鶏（164 検体）の腸内容物 587 検体を調査したところ、増菌培養前の加熱処理の有無により検出率は異なっていたが、*cpa* 遺伝子は 38.5～83.0%の陽性率を示した。一方、全ての検体の増菌培養液または分離株からエンテロトキシンをコードする *cpe* 遺伝子は検出されなかった。以上の結果から、牛、豚、鶏の腸内容物中にはエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の存在は認められず、従来、ウエルシュ菌の汚染源と想定されていた畜肉の重要性は高くないことが示唆された。

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。このようなウ

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。我が国では本菌による食中毒は依然発生が続いており、発生件数は少ないものの、1 件当たりの患者数が多い傾向が認められる。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要因になっていると考えられる。

昨年度実施した大規模な食品の汚染実態調査の結果、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離・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* 遺伝子の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、本食中毒の感染源として重要視されていた牛肉、豚肉および鶏肉からは α 毒素産生性ウエルシュ菌は検出されたが、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌は全く検出されなかった。これらの結果を踏まえ、本年度は牛、豚および鶏におけるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の保有状況を調査するため、腸内容物からの分離・検出を試みた。

B. 研究方法

[1] 検体

令和5年5月から令和6年3月にかけて、宮崎県内の5か所の食肉処理場から健康畜として搬入された牛と豚の大腸内容物と3か所の食鳥処理場からブロイラーの盲腸内容物を毎月採取した。供試した検体数は587で、その内訳と月別の検体数は表1および表2に示す。

[2] 検査手順

腸内容物中のウエルシュ菌の定性検査に加え、一部の検体について、定量検査を実施した。チオグリコール酸培地Ⅱ（ニッスイ）1mlを2本の1.5mlマイクロチューブに入れ、これに検体0.1gを加え、ボルテックスミキサーで均一の懸濁液とした。1本の懸濁液は、芽胞のみを選択するため、70℃、20分間加熱後急冷した。非加熱および加熱処理した腸内容物懸濁液を42℃、24時間増菌培養し、各増菌培養液をCHROMagar™ *C. perfringens* base（以下、CHROMagar）（関東化学）に白金耳（10 μ l/loop）で画線塗抹し、37℃、24時間、嫌気培養した。CHROM agar上の赤色のウエルシュ菌が疑われるコロニーを5個釣菌し、純培養後に生化学性状試験（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。さらに、後述するアルカリ熱抽出法で分離株からDNAを抽出し、 α 毒素遺伝子(*cpa*)および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。また、各増菌液からの *cpa* および *cpe* を検出するため、増菌培養液 100 μ l を遠心し、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出して、マルチプレックス PCR 法を行った。検体量が少ない場合には、非加熱、加熱処理のうち、加熱処理を優先して実施した。

腸内容物中のウエルシュ菌数を測定するため、一部の検体については、定量培養を行った。チオグリコール酸培地Ⅱ（ニッスイ）0.9ml を 2 本の 1.5ml マイクロチューブに入れ、これに検体 0.1 g を加え、ボルテックスミキサーで 10 倍希釈懸濁液を作製した。1 本の懸濁液は、芽胞のみを選択するため、70℃、20 分間加熱後急冷した。非加熱および加熱処理した腸内容物懸濁液の 10 倍段階希釈列を作製し、各希釈液の 100 μ l を 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。最も希釈率の高い懸濁液を接種した培地に認められたウエルシュ菌が疑われる赤色コロニーを 5 個釣菌し、マルチプレックス PCR 法で *cpa* および *cpe* を検出し、腸内容物 1g 当たりのウエルシュ菌数を算出した。

cpa および *cpe* を検出する PCR 法は、増菌培養液またはコロニー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。

ウエルシュ菌と同定された菌株は、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。

検査成績は、非加熱、加熱処理した懸濁液を用いて、培養法または PCR 法のいずれかで陽性を示した検体を陽性として記録した。

C. 研究結果

〔1〕ウエルシュ菌の分離・検出

増菌培養液に接種した腸内容物の懸濁液を加熱処理後に遺伝子抽出または増菌培養後に選択培地から釣菌したコロニーの DNA を用いて *cpa* および *cpe* を PCR で検出したところ、牛、豚、鶏のそれぞれ 38.5%、72.4%、78.7%の検体で *cpa* が検出されたが、*cpe* は供試した全ての検体で陰性を示した（表 3）。また、非加熱の腸内容物懸濁液では、牛、豚、鶏の 48.1%、53.1%、83.0%の検体で *cpa* が検出されたが、*cpe* は全ての検体で陰性を示した（表 3）。

〔2〕腸内容物中のウエルシュ菌数

腸内容物中のウエルシュ菌の菌数を動物種ごとに測定し、菌数の分布を比較した。牛では、大腸内容物 1g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 51.1%、加熱処理で 78.7%であり、最も高い検体で 10^6 cfu/g まで保有しており、豚や鶏に比較して、保菌菌数は低かった（図 1－1）。豚では、大腸内容物 1g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 40.8%、加熱処理で 38.8%であり、最も高い検体では 10^8 cfu/g まで保有していた（図 1－2）。さらに、鶏では、大腸内容物 1g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 11.4%、加熱処理で 25.7%であり、最も高い検体で 10^6 cfu/g まで保有しており、豚よりも保菌菌数は高い傾向を示した（図 1－3）。

〔2〕*cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌の月別推移

検査を実施した 2023 年 5 月から 2024 年 3 月まで、月ごとの *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌の分離・検出率の推移を比較したところ、ウエルシュ菌はいずれの動物種においても通年腸管内に保菌されていたが、夏季に減少する傾向が求められた（図 2－1、図 2－2、図 2－3）。

D. 考察

過去のウエルシュ菌食中毒事例をみると、原因食品として肉類、魚介類、野菜を使用した煮込み料理が多い。発生頻度の高い原因施設は、飲食店、仕出し屋、旅館、

学校などの集団給食施設で、カレー、シチュー、スープ、めんつゆなどの、食べる前日に大量に加熱調理され、大きな容器のまま室温で放冷されていた事例が多い。

昨年度に実施した市販食肉の汚染調査において、*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分離・検出されなかった。一方、カレー粉・香辛料から *cpe* 保有ウエルシュ菌が検出されたことから、カレーを原因食品とする本食中毒は、カレーに使用されるスパイス類が汚染源で、食肉の汚染源としての可能性は低いことが示唆された。

そこで、本年度の調査では、食肉処理場および食鳥処理場に健康畜として搬入された牛、豚、鶏の腸内容物中の *cpe* 保有ウエルシュ菌の検出を試みた。587 検体の腸内容物を調べたところ、*cpa* 保有ウエルシュ菌は 1 年を通じて分離・検出されたが、*cpe* 保有ウエルシュ菌は増菌培養を行っても全く分離・検出されなかった。腸内容物懸濁液を未加熱および加熱処理して検査を実施したが、いずれの処理検体からも *cpa* 保有ウエルシュ菌が分離・検出されたことから、腸管内では栄養型と芽胞の状態でウエルシュ菌が保菌されていると考えられた。

cpa 保有ウエルシュ菌は、鶏で最も高い保菌率と保菌菌数が認められ、次いで豚で高く、牛では鶏、豚と比較して低い保菌率

と保菌菌数であった。今回の結果は、前年度の市販食肉からの分離・検出成績とも一致しており、畜肉における *cpe* 保有ウエルシュ菌の汚染頻度は低いことが示唆された。

本研究課題の大西代表者らは、カレーに牛肉を加えたものと加えないものに添加したウエルシュ菌の増殖動態を調べた。ウエルシュ菌は、牛肉を添加したカレーでのみ急激に増殖することを観察した。食肉にはグルタチオン等の還元物質が豊富に含まれており、食品内が嫌気状態になりやすいことも知られている。今後は、ウエルシュ菌の増殖促進因子としての畜肉の役割についても精査する必要がある。

E． 結 論

牛、豚、鶏の腸内容物中には、 α 毒素産生ウエルシュ菌は通年腸管内に保菌されたが、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の保菌は認められず、従来、ウエルシュ菌の汚染源と想定されていた畜肉の重要性は高くないことが示唆された。

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 供試検体の内訳

動物種	処理場	検体数（定量培養検体）
牛	A	44 (10)
	B	40 (10)
	C	40 (10)
	D	49 (7)
	E	40 (10)
	小計	213 (47)
豚	A	44 (10)
	B	40 (10)
	C	40 (10)
	D	48 (11)
	E	40 (8)
	小計	212 (49)
鶏	F	55 (11)
	G	55 (11)
	H	55 (13)
	小計	165 (35)
	合計	587 (131)

表 2 供試検体数の月別内訳

月	牛	豚	鶏	計
5 月	13	11	15	39
6 月	20	20	15	55
7 月	22	24	14	60
8 月	18	16	15	49
9 月	20	20	15	55
10 月	21	20	15	56
11 月	20	21	15	56
12 月	20	21	15	56
1 月	21	21	15	57
2 月	22	20	15	57
3 月	16	16	15	47
計	213	210	164	587

表3 ウエルシュ菌分離株からの *cpa* および *cpe* 遺伝子の検出

動物	<i>cpa</i> 遺伝子				<i>cpe</i> 遺伝子			
	非加熱 (%)		加熱 (%)		非加熱 (%)		加熱 (%)	
牛	102/212*	(48.1)	82/213	(38.5)	0/212*	(0)	0/213	(0)
豚	110/207*	(53.1)	152/210	(72.4)	0/207*	(0)	0/210	(0)
鶏	132/159*	(83.0)	129/164	(78.7)	0/159*	(0)	0/164	(0)

*検体量が少なく実施不可の検体あり

図 1 - 1 牛大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウェルシュ菌数の分布

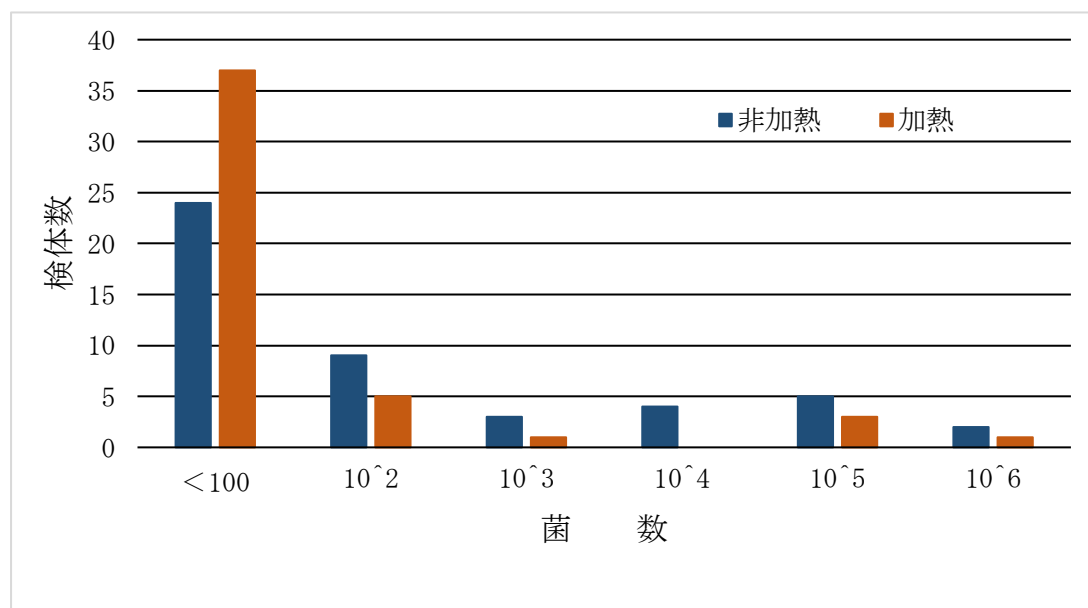


図 1 - 2 豚大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌数の分布

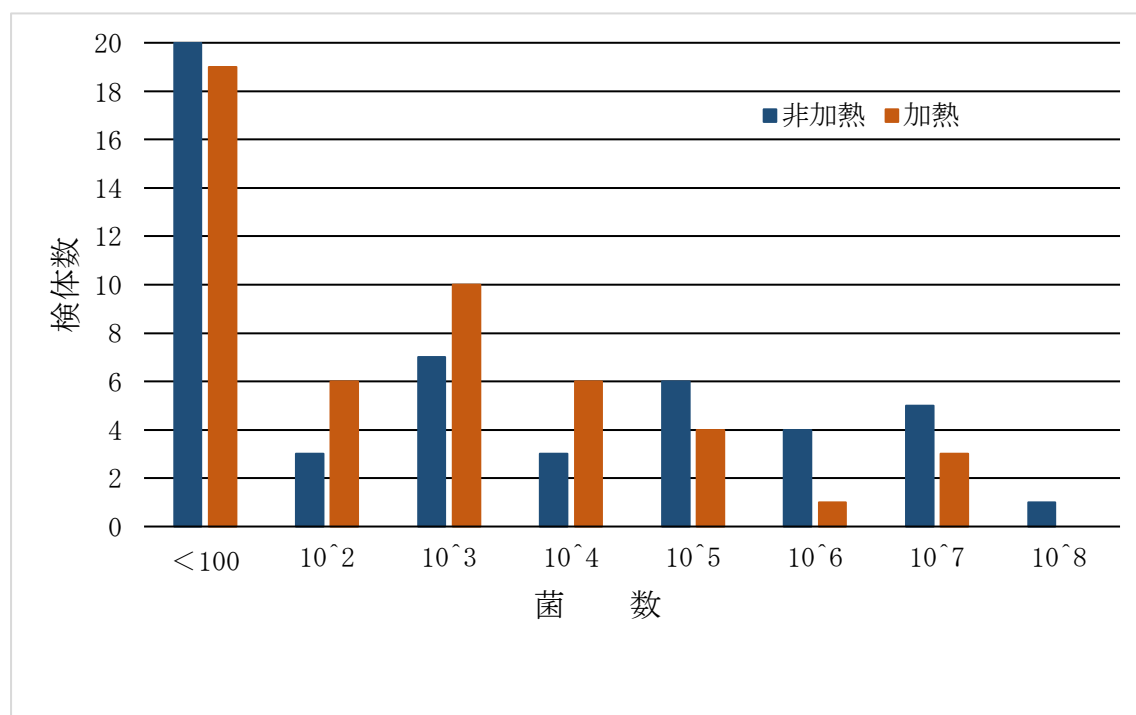


図 1－3 鶏盲腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌数の分布

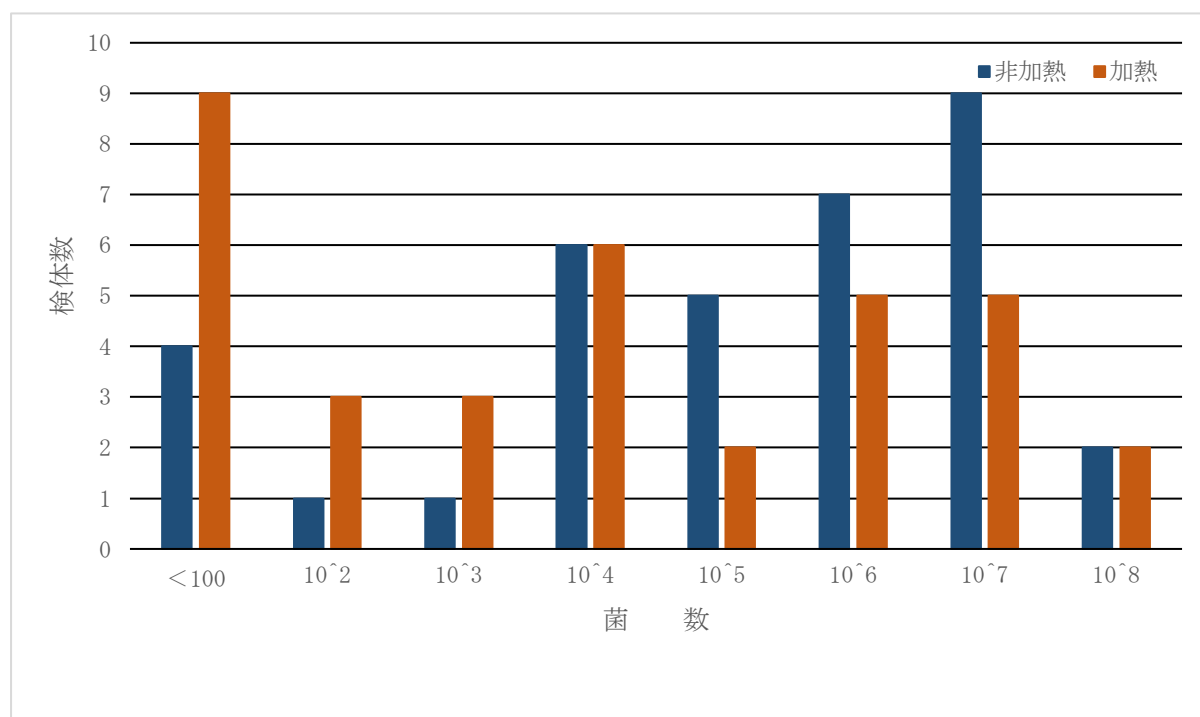


図 2-1 牛大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌検出率の月別推移

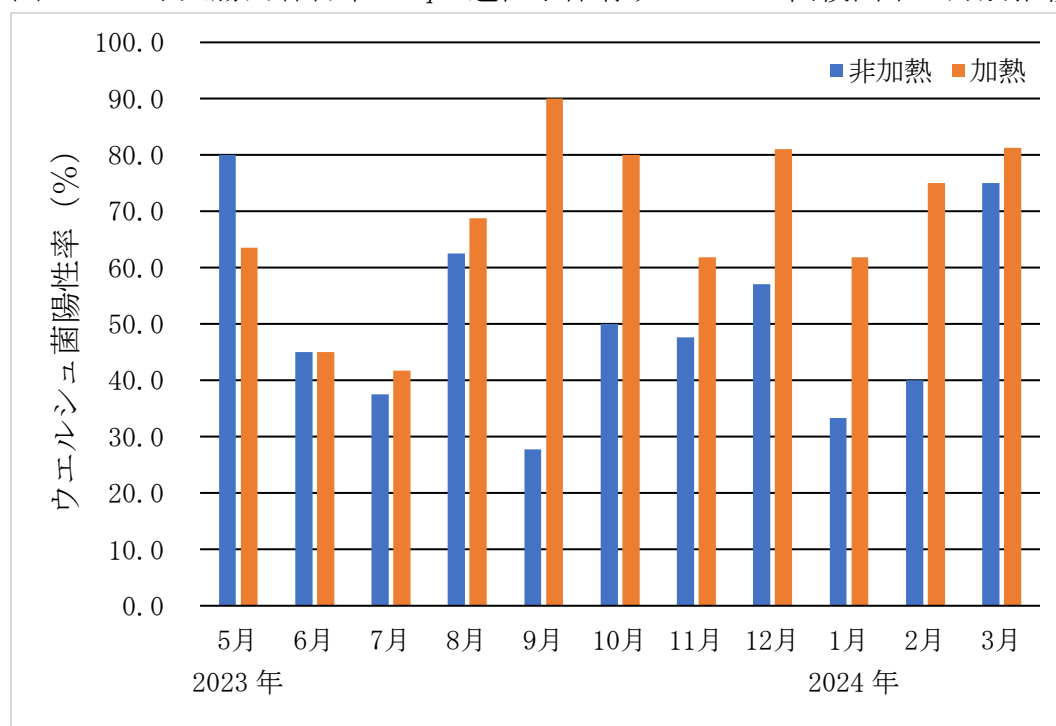


図 2－2 豚大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウェルシュ菌検出率の月別推移

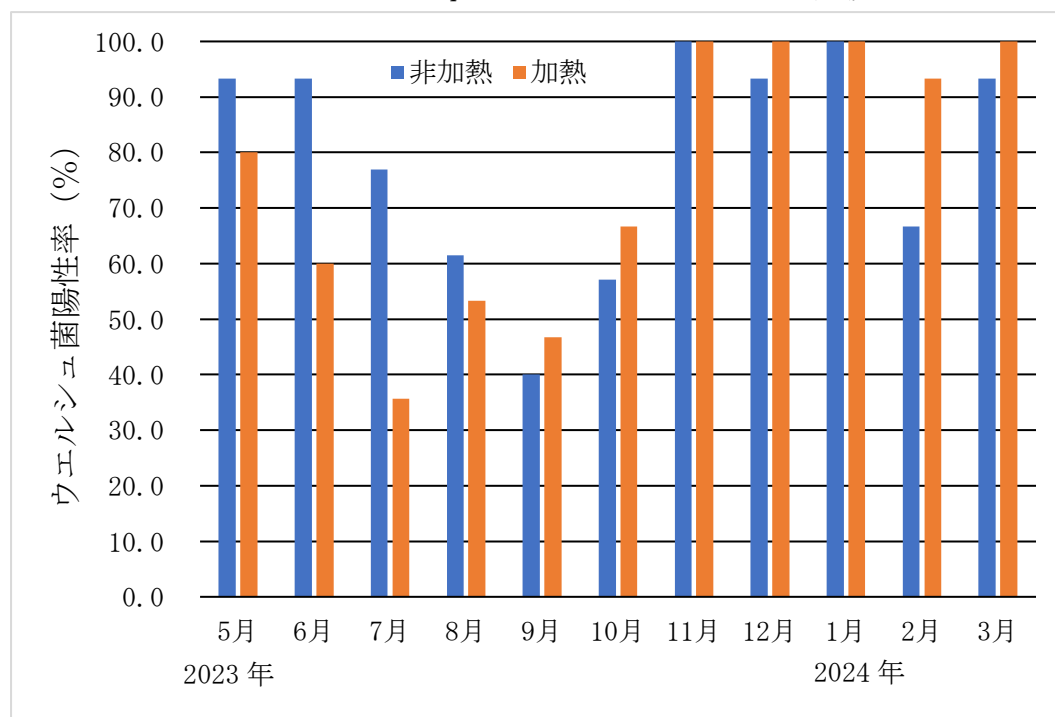
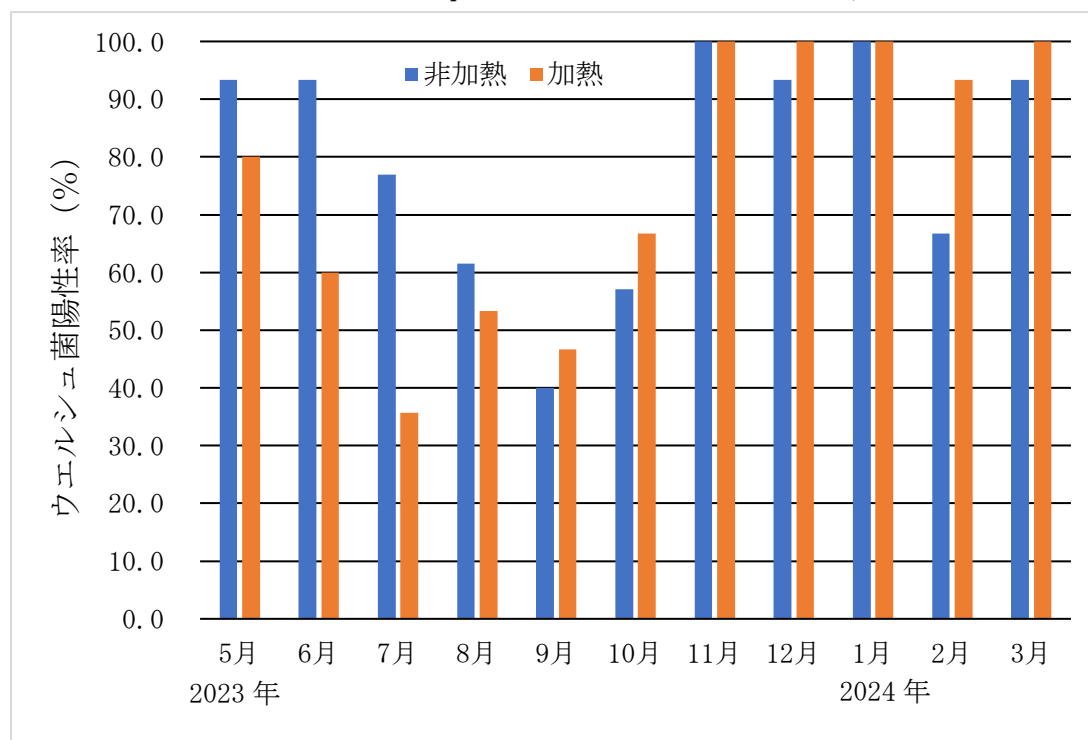


図 2－3 鶏盲腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウェルシュ菌検出率の月別推移



令和5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）

分担研究報告書

食品におけるウエルシュ菌汚染実態調査

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 淀谷雄亮 西里英美莉 荒木靖也

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。このため、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、昨年度はエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の汚染実態調査を実施し、カレー粉・香辛料 等計 115 検体について調査を行い、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（0.9%）検出された。今年度は引き続き、昨年度ウエルシュ菌が多く検出された乾物を中心に 101 検体について調査を行った。煮干し 37 検体中 15 検体（40.5%）からウエルシュ菌が、1 検体（2.7%）からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。また、そば粉 1 検体からもエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。煮干しを出汁とし、大量に調理し、放置した場合にはエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の増殖が考えられる。

また、今年度発生したキッチンカーを原因施設とする食中毒事例の原因食品とされた弁当に使用された食材に着目し、一般流通品を用いた同菌の汚染実態を調査した。

用いた原材料は鶏肉、牛ハラミ、野菜等でこれまでに本研究班全体で行った汚染実態調査においてエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された食材が含まれていた。菌検索の結果、今回の食材からは、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出することはできなかったが、種々の多様な食品の汚染実態調査で得られた結果は、原因食品が不明又は個別の品目にまで特定できない食中毒事例等において、原材料汚染の可能性を考慮した飲食店等への効果的な指導にも活用できる基礎データとなりえると考えられた。

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、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においてウエルシュ菌食中毒事例が国内で発生している。我が国では HACCP に沿った衛生管理が義務付けられてから3年目が経過したが、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ウエルシュ菌の主たる汚染食品が明らかになっていないことが一因として挙げられる。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も原因食材を同定できない事例が多く、さらに、飲食店等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、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問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ことを目的とする。

昨年(R4年)度は肉類、乾物、野菜等115検体を調査し、カレー粉1検体よりエンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出した。今年(R5年)度は昨年度ウエルシュ菌が多く検出された乾物を中心に101検体について検査を行った。また、今年度発生した、キッチンカーを原因施設とする食中毒について、原因食材を推定する目的で、提供食品と同じ食材を購入し検査を行った。

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、適切な温度で保管し、24時間以内に試験に供した。

[2] 検査手順

検査手順を図1に示す。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

一処理し、70℃で 20 分間加熱後急冷し、42℃で 24 時間、増菌培養を行った。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、ウエルシュ菌遺伝子(*cpa*)及びエンテロトキシン産生遺伝子(*cpe*)同時検出 P C R を行なった。その後、増菌培養液を 2 枚の CHROM agar *C. perfringens* に塗抹し、37℃、24 時間嫌気培養した。CHROM agar に発育した赤色コロニーについて、前述の P C R 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。

[3]スクリーニング PCR

ウエルシュ菌遺伝子およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌遺伝子の検出は、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。今年度は KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) を用い高速 PCR を実施した(添付資料)。反応液は、KOD One PCR Master Mix 25.0 μ L、それぞれのプライマーを 1.5 μ L (0.1 μ M) ずつ、DNA テンプレート 5 μ L、PCR グレードの精製水 14 μ L とし、総量 50 μ L に調整した。P C R 反応は、98℃、1 分の反応後、98℃、10 秒、55℃、5 秒、68℃、1 秒のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 68℃、1 分

の反応を行った。反応終了後、PCR 産物 2 μ L を MultiNA (SHIMADZU) を用いた電気泳動で特異的なバンドの有無を調べた。

C. 結果

[1]スクリーニング P C R 検査

汚染実態調査に使用した検体は、海藻 27 検体、煮干し 37 検体、野菜乾燥品 7 検体、豆腐 6 検体、魚介乾燥品 4 検体、粉類 20 検体の計 101 検体であった(表 1)。

増菌液から行ったスクリーニング P C R は、煮干し 37 検体中 15 検体(40.5%)、粉類 20 検体中 3 検体(15.0%)からウエルシュ菌遺伝子が検出された。また、煮干し 1 検体(2.7%)、そば粉(粉類) 1 検体(5.0%)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(表 2)。

[2]菌分離

増菌液を CHROMagar *C. perfringens* 2 枚に塗抹し、赤色コロニー 10 個を分離し、遺伝子保有状況をマルチプレックス PCR で確認した。

煮干し 37 検体中 15 検体(40.5%)、粉類 20 検体中 4 検体(そば粉 1、天ぷら粉 1、小麦粉 2)からウエルシュ菌が検出された。また、煮干し 1 検体(2.7% 2コロニー/10コロニー)、そば

粉 1 検体 (5.0% 2 コロニー/10 コロニー) からエンテロトキシン産ウエルシュ菌が検出された (表 2)。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌が産生された煮干し、そば粉は国内産によるものであった。

また、キッチンカーを原因施設とする食中毒事例の原因食品とされた弁当に使用された食材に着目し、一般流通品を用いた同菌の汚染実態を調査した。提供メニューに用いられた食材は、鶏肉、牛ハラミ、レタス等、モヤシ、にんじん、紫キャベツ、ごはんであった。対象となる食材を購入し (表 1) 検査を行った。鶏肉 3 検体中 1 検体 (33.%) からウエルシュ菌が検出されたが、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出することはできなかった (表 2)。

D. 考察

今年 (R5 年) 度は、煮干し 37 検体中 15 検体 (40.5%) 検体、粉類 20 検体中 4 検体 (20.0%) からウエルシュ菌が検出され、そのうち、煮干し 1 検体 (2.7%)、そば粉 1 検体 (5.0%) からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。

煮干しから 40.5% と高率にウエルシュ菌が検出され、そのうち 1 検体からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出されたことから、これらの煮

干しを味噌汁、煮物等の出汁として使用し大量調理を行い、その後の不適切な温度管理などがあった場合には、食中毒発生の原因となりうるということが考えられた。

今後も、煮干し等の海産物、粉類等、これまで食中毒発生の原材料としてはあまり考えられていなかった食材において、汚染実態調査を継続して行う必要があると考えられた。

また、川崎市内で発生したキッチンカーを原因施設とする食中毒事例の原因食品とされた弁当に使用された食材に着目し、一般流通品を用いた同菌の汚染実態を調査した。使用された原材料は鶏肉、牛ハラミ、野菜等であり、これまでに本研究班全体で行った汚染実態調査結果においてエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された原材料が含まれていたが、今回の食材からは、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は検出されなかった。種々の多様な食品の汚染実態調査で得られた結果は、原因食品が不明又は個別の品目にまで特定できない食中毒事例等において、原材料汚染の可能性を考慮した飲食店等への効果的な指導にも活用できる基礎データとなりえると考えられた。菌液からのスクリーニング PCR は、分離したウエルシュ菌に対するウエルシュ菌遺伝子の検出率が 70.0 % と

やや感度の落ちるものであったが、今回使用したマルチプレックス P C R 試薬 (KOD One PCR Master Mix) では、ウエルシュ菌が陽性となった 19 検体中 18 検体 (94.7%) でスクリーニング P C R が陽性となった。各サイクルの反応時間が短く、感度がよく、P C R 反応時間が 30 分程度と短時間で終了するため、本試薬を使用することで作業効率の向上に非常に役立った。

E . 結論

昨年 (R4 年) 度より、ウエルシュ菌食中毒の制御のための汚染実態調査を行っている。

今年 (R5 年) 度は煮干し、粉類を中心に 101 検体について汚染実態調査を行った。煮干し 37 検体中 15 検体 (40.5%)、粉類 20 検体中 4 検体 (15.0%) からウエルシュ菌が検出され、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は煮干し 1 検体 (2.7%) そば粉 1 検体 (5.0%) から検出された。煮干しを出汁として使用した味噌汁、汁物、煮物等の大量調理後の温度管理が不十分であった場合には、本菌による食中毒が発生する可能性があることが示唆された。

今後も調査を継続し、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

H. 知的財産権の出願・登録状況

ウェルシュ菌検査手順

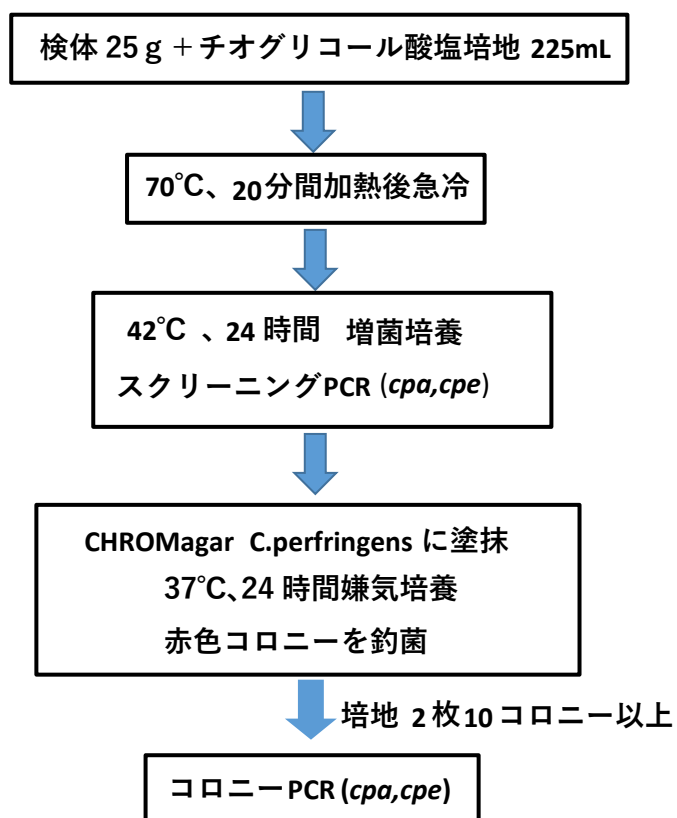


図 1

Multiplex PCR for *cpe* and *cpa*

●PCR プライマー

<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	324 bp
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	233 bp

cpa (アルファ毒素遺伝子)

cpe (エンテロトキシン遺伝子)

H. S. Guran らの方法 (Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 77-82)

●反応液

KOD One PCR Master Mix*	25.0 μ L
<i>cpa</i> -F (10 μ M)	1.5 μ L
<i>cpa</i> -R (10 μ M)	1.5 μ L
<i>cpe</i> -F (10 μ M)	1.5 μ L
<i>cpe</i> -R (10 μ M)	1.5 μ L
H ₂ O	14.0 μ L
Template	5.0 μ L
Total	50.0 μ L

* KOD One PCR Master Mix TOYOBO (#KMM-101)

●プログラム

98°C	1 min	
98°C	10 sec	} × 30
55°C	5 sec	
68°C	1 sec	
68°C	1min	

表 1 検査材料

乾物

海藻	27
煮干し	37
野菜乾燥品	7
豆類	6
魚介乾燥品	4
粉類	20
計	101

キッチンカー食中毒

鶏肉	3
牛ハラミ	1
レタス等	3
もやし	3
にんじん	6
紫キャベツ	5
計	21

表2 結果

乾物

食品区別	検体数	スクリーニング PCR陽性数	ウエルシュ 菌陽性数	エンテロトキシン 産生ウエルシュ 菌陽性数
海藻	27	0	0	0
煮干し	37	15(40.5%)	15(40.5%)	1(2.7%)
野菜乾燥品	7	0	0	0
豆類	5	0	0	0
魚介乾燥品	4	0	0	0
粉類	20	3(15.0%)	4(20.0%)	1(5.0%)
計	101	18(17.8%)	19(18.8%)	2(2.0%)

キッチンカー食中毒食材

食材	検体数	ウエルシュ菌 陽性数	エンテロトキシン産 生ウエルシュ菌陽性 数
鶏肉	3	1(33.3%)	0
牛ハラミ	1	0	0
レタス等	3	0	0
もやし	3	0	0
にんじん	6	0	0
紫キャベツ	5	0	0
計	21	1(4.8)	0

令和 5 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

食品や環境からのウエルシュ菌の検出および分子疫学的解析

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

食中毒として最も重要であ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ず、これまで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。そこで本研究では、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、ウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品の明確化および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討を行った。今年度は、牛ひき肉、土付きごぼう、土付きジャガイモ、土付き長ネギ（いずれも国産）から計 45 検体を小売店から購入し供試した。また河川水および下水処理場放流水の河川流入域水の計 3 検体を採取し供試した。これらの検体の増菌培養液から 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。また増菌培養液から菌株分離を行った。さらに、*cpe* 陽性ウエルシュ菌分離株の全ゲノムシーケンスを行い MLST に基づく分子系統解析を行った。その結果、牛ひき肉からは *cpe* および *cpe* 陽性菌は確認されず、昨年度に引き続き牛肉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、根菜付着土および下水処理場放流水の河川流入域水からは *cpe* 保有生菌が検出された。したがって、土壌や環境水は、農作物や水産物を栽培・養殖・漁獲する場において、食品のエンテロトキシン産生ウエルシュ菌汚染に関連する可能性があると考えられた。

研究協力者

小嶋由香 川崎市健康安全研究所
淀谷雄亮 川崎市健康安全研究所
西里恵美莉 川崎市健康安全研究所
三澤尚明 宮崎大学

A. 研究目的

Clostridium perfringens（ウエルシュ菌）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。ウエルシュ菌食中毒は世界各国で発生しており、重要な下痢症起因菌である。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。そのため年間患者数が最も多い食中毒の一つとして認識されている。

本菌では食中毒原因菌となりうる株は、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アルファ毒素 (*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。食中毒由来株におけるエンテロトキシン産生率は 80 ～90% 程度である一方で、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% 以下であり、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品や、その汚染源は明らかになっていない。エンテロトキシン産生株の食品での分布状況、およびそれらの汚染源を環境中から検索し明らかにする必要がある。

そこで本研究では、大規模な食品の汚

染実態調査を実施し、ウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品の明確化および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討を行っている。昨年度の検討では、エンテロトキシン産生株は海産物およびその乾物や根菜類、カレー粉等スパイスから検出されたが、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からはほとんど検出されなかった。今年度は、昨年度の結果を受け、牛ひき肉および土付き根菜類での *cpe* 陽性ウエルシュ菌分布実態調査を行った。また、来年度に実施する河川水等におけるウエルシュ菌分布実態調査の試験法予備検討として、環境水中のウエルシュ菌分布実態調査を行った。さらに、昨年度および今年度分離株の全ゲノムシーケンスを実施し、*cpe* 陽性株の由来を検索するため、分子疫学的調査を行った。これらの成果を報告する。

B. 研究方法

(1) 検体

牛ひき肉 20、土付きごぼう 10、土付きジャガイモ 10、土付き長ネギ 5 (いずれも国産) の計 45 検体を小売店から購入し、供試した。根菜からは薬さじで付着した土壌をこそげ取って回収し供試した。また環境水として、河川水 1 および下水処理場放流水の河川流入域水 2 の計 3 検体を採取し供試した。

(2) 検査手順

①食品からの菌分離

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(株式会社スギヤマゲン)を用いて 46℃・24 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* (=全てのウェルシュ菌が保有するホスホリパーゼ C 遺伝子)の保有状況を確認した。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。

さらに 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、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。

②根菜付着土壌からの菌分離

根菜付着土壌の回収重量を計測した。ストマッカー袋に回収土壌と、土壌の9倍重量の液体チオグリコレート培地を加え、1分間ホモジナイズした。これを試料原液とした。その後の培養から菌株分離、前培養液中および分離菌株での *cpe*・*cpa* 遺伝子の検出方法については、(1)-①と同様に実施した。

③河川水および下水処理場放流水河川流入域水からの菌分離

河川水として神奈川県川崎市川崎区付近の多摩川河川水、神奈川県川崎市下水処理場A放流水河川流入域水および神奈川県川崎市矢上川下水処理場B放流水河川流入域水の計3検体を採取した。水中に含まれるウエル

シュ菌の *cpe* 陽性株の定量法として、「水道施設の技術的規準を定める省令」における「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」の別添2「嫌気性芽胞菌の検査方法」¹⁾を参照、一部改変し実施した。河川からの採水試料を500 ml 程度、滅菌プラスチックボトルに採取した。採水試料100 ml 程度をストマッカー袋に分取し、75℃で20分間加熱後、メンブランフィルター法により試料をフィルター1枚につき20～300 mL 吸引ろ過した。メンブランフィルターをろ過装置から外し、気泡が入らないように、CCP 培地寒天面に密着させた。そこに、CCP 培地を10 mL 程度重層し固化させ、さらに同培地を10 mL 程度重層した。37℃で24±2時間嫌気培養した。形成されたコロニーを計測、および(1)-①で上述した *cpa*・*cpe* 特異的マルチプレックスPCRを行い、増幅産物の確認によって菌株の *cpa*・*cpe* 保有状況を判定した。

(3)分離株の全ゲノムシーケンスおよび型別

本研究班において昨年度・今年度に分離した *cpe* 陽性ウエルシュ菌として、食品由来株および川崎市健康安全研究センターで過去に分離した患者由来株の計12株を供試した（表1）。

−80℃凍結保存菌株をチオグリコレート寒天平板に塗抹し 37℃で培養後、平板上で増殖した菌体を 1 mL の PBS を入れた 2 mL マイクロチューブ中に懸濁し、遠心分離して集菌した。PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific 株式会社) を用いて、得られた菌体から DNA 抽出を行った。これをテンプレートとして、QIAseq FX DNA Library Kit (Qiagen 株式会社) を用いて、16S-rDNA をターゲットとした DNA ライブラリを作製し、i-Seq (illumina 株式会社) を用いて全ゲノムシーケンスを行った。Center for Genomic Epidemiology, DTU National Food Institute (デンマーク工科大学) のウェブサービス MLST2.0²⁾ を利用し、得られたリードを用いて解析を行って、各分離株の Multilocus sequence typing (MLST) を判定した。この際、*C. perfringens* では *colA*、*groEL*、*sodA*、*plc*、*gyrB*、*sigK*、*pgk* および *nadA* の 8 遺伝子の MLST を判定した。この際得られた allele のタイプを指標として用い、本研究における分離株 12 株および PubMLST 登録株 16 株のデータに基づき系統解析を行った。系統解析ソフトウェア MEGA 11X) を用いて近隣結合法にて系統樹 (NJ 系統樹) を構築した。この際モデルは p-distance を選択した。

C. 研究結果

(1) 牛ひき肉および根菜付着土壌での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

牛ひき肉および根菜付着土壌からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌検出結果を表 2 に示した。牛ひき肉からは昨年度の調査に引き続き非検出となった。なお *cpa* 検出状況も、増菌培地から検出されたのは 2 検体、CCP 培地でのコロニーから検出されたのは 1 検体のみにとどまった。根菜付着土壌からは、じゃがいも土では 10 検体 1 検体 (10.0%)、ゴボウ土では 10 検体 1 検体 (10.0%)、長ネギ土では 5 検体 1 検体 (20.0%) から、増菌培養液中およびこれを平板に塗抹培養して分離された菌株の両方から *cpe* が検出された。特にゴボウ土の *cpe* 陽性検体において、CCP 平板に生育したコロニー 20 個中 15 個 (5.0%) で *cpe* が検出された。同様の *cpe* 陽性コロニーの頻度は、ジャガイモ土 *cpe* 陽性検体では 20 個中 1 個 (5.0%)、長ネギ土 *cpe* 陽性検体では 32 個中 1 個 (3.1%) であり、これらと比較して、今回供試したゴボウ畑土壌中の *cpe* 陽性株の濃度は高かったことが示唆された。

(2) 河川水および下水処理場放流水河川流入域水での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

河川水および下水処理場放流水河川流入域水からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌検出結果を表 3 に示した。下水処理場放流水の河川流入域水では、処理場 A の放流水では 41.0 cfu/L、処理場 A の放流水では 21.9 cfu/L、多摩川河川水では検出限界以下であった。下水処理場放流水の河川流入部付近の水では *cpe* 陽性菌数が高い可能性があると考えられた。

(3) 分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子系統解析

ウエルシュ菌の患者由来株の由来を検索するため、本研究班において昨年度・今年度に分離した *cpe* 陽性ウエルシュ菌の全ゲノムシーケンス、MLST 型別および分子系統解析を行った。8 遺伝子の allele 型別結果を表 1 に示した。今回型別した対象遺伝子では、*colA* で 6 allele、*groEL* で 4 allele、*sodA* で 4 allele、*plc* で 5 allele、*gyrB* で 4 allele、*sigK* で 5 allele、*pgk* で 4 allele、*nadA* で 5 allele のバリエーションが確認された。この 8 遺伝子の allele タイプを指標として、本研究における分離株 12 株および PubMLST に登録された世界各地で分離された 16 株のデータに基づき系統解析を行い、構築した NJ 系統樹を図 1 に示した。その結果、今回解析した菌株は 6 つのハプ

ロタイプに分かれ、分離された国ではハプロタイプの偏りは無いこと、患者由来株のみで構成されたハプロタイプが確認されたこと、今回分離および配列決定した食品由来株 4 株および下水処理場の河川流入域水由来株 1 株はいずれも複数の国で分離された患者由来株と比較的類似した allele のタイプを持つことが示された。

D. 考察

今年度の検討結果から、昨年度に引き続き肉類からは *cpe* 陽性ウエルシュ菌は一切検出されず、根菜付着土壌からは 12% の陽性率で検出された。これまで 2 年間の検討結果から、肉類、特に牛肉の *cpe* 陽性株の汚染リスクは低く、日本国内においては、土付き根菜や海産物およびその加工品、スパイス等が、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べき食品であることが明らかとなった。また下水処理場放流水の河川流入部付近の水では約 20～40 cfu/L と比較的高濃度で *cpe* 陽性株が検出されたことから、下水処理水は河川および水産物のウエルシュ菌の汚染源となる可能性が考えられた。今回の河川水調査では *cpe* 陽性株は検出されなかったが、調査した試料水は 1 か所の 1 検体であり、また今回

は水 1 L あたりの定量的データを取得するため CCP 寒天培地塗抹前の増菌培養は行わなかった。今後、採水箇所を増やし、採水量や試験法の感度を変更し、詳細な検討を継続する必要がある。

分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子系統解析の結果、患者由来株のみで構成されたハプロタイプは存在したが、一方で、患者由来株と近縁な allele を持つ食品由来株および環境由来株が存在することも示された。これらが食中毒の発生と関連した菌株である可能性が考えられた。

今後は、今回明らかとなった *cpe* 陽性株の汚染頻度が高い食品と関連した環境、すなわち河川・海洋・農地土壌といった環境材料における *cpe* 陽性ウエルシュ菌分布調査を進める。またそれらの分離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、より解像度の高い解析方法によって実施し、菌の動態を疫学的に考察することによって、ヒトに食中毒を起こすリスクが高い食品や、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

今年度は、食品関連サンプルとしては牛ひき肉、ごぼう・ジャガイモ・長ネギ付着土壌、河川水および下水処理場放流

水の河川流入域水を供試し、ウエルシュ菌の検出実験を行い、*cpe* 遺伝子の分布調査を行った。さらに本研究班で分離した *cpe* 陽性ウエルシュ菌分離株、および食中毒患者由来株の全ゲノムシーケンスを行い MLST に基づく分子系統解析を行った。その結果、牛ひき肉からは *cpe* および *cpe* 陽性菌は確認されず、昨年度に引き続き牛肉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、根菜付着土および下水処理場放流水の河川流入域水からは *cpe* 保有生菌が検出された。したがって、土壌や環境水は、農作物や水産物を栽培・養殖・漁獲する場において、食品のエンテロトキシン産生ウエルシュ菌汚染に関連する可能性があると考えられた。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. 参考文献

- 1) 水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について（平成 19 年 3 月 30 日）（健水発第 0330006 号）
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb3805&dataType=1&pageNo=1
- 2) <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>

3) K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Mol Biol Evol. 38(7):3022-3027 (2021)

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 本研究班で全ゲノムシーケンスを行った *cpe* 陽性ウエルシュ菌分離株の MLST

菌株 No.	由来詳細	colA	groEL	sodA	plc	gyrB	sigK	pgk	nadA
CP-2016-12	患者、日本	23	26	29	20	16	17	40	20
CP-2019-07	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2019-08	患者、日本	19	5	1	5	5	2	3	1
CP-2019-09	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2019-10	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2019-11	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2023-02	患者、日本	1	5	1	5	5	2	3	1
CP2022-DR49-6	干しエビ、中国産	23	26	29	20	16	17	14	20
6-2-10	アサリ、愛知県産	35	32	37	37	27	26	18	35
8-19-5	カレー粉、 インド産	4	5	1	3	5	4	3	3
27-11-8	干昆布、北海道産	19	5	1	5	1	2	3	1
CP2023-WA1-1	下水処理場放流 域、 多摩川	19	5	1	5	5	2	3	1

表 2. 市販食品での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

食品検体	cpe 遺伝子陽性株					
	検出法	増菌培養液の PCR		コロニーPCR		1 検体における コロニーPCR での <i>cpe</i> 陽性株数 (陽性率)
	試験 検体数	陽性検体数 (陽性率)		陽性検体数 (陽性率)		
牛ひき肉	20	0	(0.0%)	0	(0.0%)	NA
じゃがいも土	10	1	(10.0%)	1	(10.0%)	1/20 (5.0%)
ゴボウ土	10	1	(10.0%)	1	(10.0%)	15/20 (75.0%)
長ネギ土	5	1	(20.0%)	1	(20.0%)	1/32 (3.1%)
根菜合計	25	3	(12.0%)	3	(12.0%)	—

表 3. 河川水およびにおける *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

採取場所	<i>cpe</i> 陽性株数 (cfu/L)
神奈川県川崎市 多摩川下水処理場 A 放流水河川流入域水	41.0
神奈川県川崎市 矢上川下水処理場 B 放流水河川流入域水	21.9
神奈川県川崎市川崎区付近の多摩川河川水	非検出

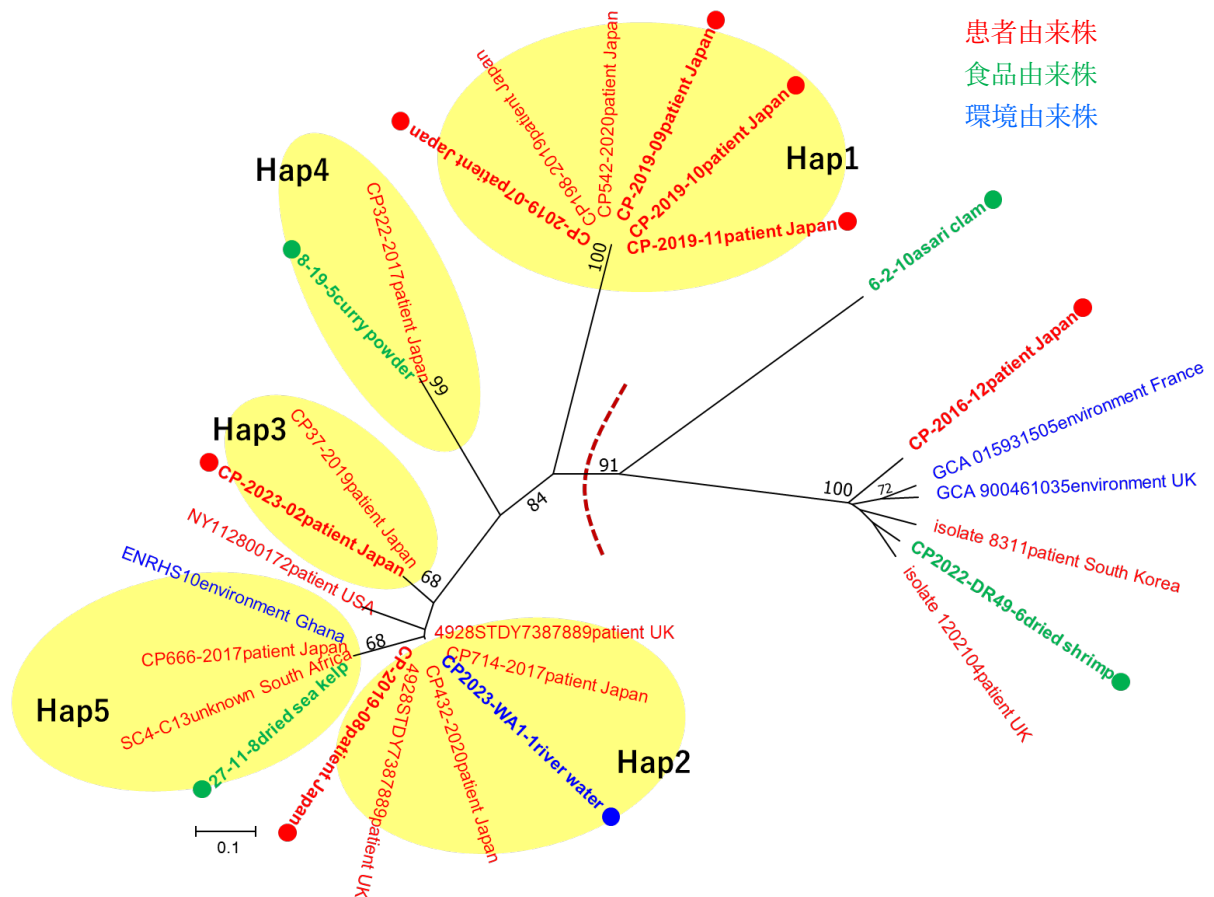


図1. 本研究で全ゲノムシーケンスを実施したウエルシュ菌 *cpe* 陽性株
および PubMLST からダウンロードした菌株の MLST によって型別
した 8 遺伝子の allele に基づく NJ 系統樹

本研究で全ゲノムシーケンスを実施した菌株名に●を付した。各クレードの分枝上の数字は 1,000 回繰り返し試行のブートストラップ確率を示す。Hap1～Hap5 は MLST 型別を指標とした遺伝的に近縁なグループを示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

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 本間 正充

次の職員の令和5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6年5月15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5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制御のための検査法の開発及び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・特別教授
（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： ）

（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。

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 三崎貴子

次の職員の令和5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 参与
(氏名・フリガナ) オカベノブヒコ 岡部 信彦

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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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) 未審査の場合は、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。

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 本間 正充

次の職員の令和5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。