

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6年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 貴弘

令和7年5月21日

目次

I. 総括研究報告書

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	2
大西 貴弘	

II. 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	9
大西 貴弘	
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	17
三澤 尚明	
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	35
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	45
渡辺 麻衣子	
二枚貝におけるウエルシュ菌の汚染調査	58
大島 千尋	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 倫理審査状況及び利益相反等の管理について

令和6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

総括報告書

研究代表者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

昨年度の研究で、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。今年度は牛肉以外の食肉でも、牛肉同様のウエルシュ菌増殖促進作用を持つのか、また、カレーミックスの種類を変更しても同じ現象が認められるのかについても検討した。その結果、牛肉だけでなく、豚肉、鶏肉にもウエルシュ菌の増殖促進効果があること、またこの現象は、カレーミックスの種類に依存しておらず、カレーミックス非添加でも認められることが明らかになった。

河川、二枚貝、素干しエビ、煮干しにおける *cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染調査から、下水処理場の放流水が *cpe* 陽性ウエルシュ菌汚染源である可能性、*cpe* 陽性ウエルシュ菌は河川水を介して沿岸部を広く汚染している実態が明らかになった。

分離株の全ゲノムシーケンスを行い、cgMLST に基づく分子疫学解析を行った。その結果、いくつかの食品や環境由来菌株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であり、分子疫学的に関連がある可能性が考えられた。この結果から、従来、ウエルシュ菌食中毒の主な原因と考えられてきた食肉だけでなく、海産物や農産物を含む広範な食品が、ウエルシュ菌食中毒の原因になりうると考えられた。

研究分担者

渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
岡部 信彦 川崎市健康安全研究所
三澤 尚明 国立大学法人 宮崎大学
大島 千尋 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所

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
荒木 靖也 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
佐々木賢美 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター
白石 優衣 宮崎大学

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。我が国におけるウエルシュ菌食中毒は、発生件数、患者数ともに減少傾向が認められない。この原因として、エンテロトキシン (cpe) 産生性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。本研究班では、大規模な汚染実態調査を行い、cpe 遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染源として、カレーミックス・香辛料、さらに海藻、干しエビ、煮干し等の乾燥水産食品が重要であることを示した。一方で、牛肉、豚肉、および家畜、家禽の腸内容物から cpe 遺伝子保有ウエルシュ菌はほとんど検出されないことも併せて明らかにした。また、ウエルシュ菌食中毒が多発する煮物中のウエルシュ菌の増殖挙動を、カレーを用いて調べたところ、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。これらの結果から、汚染源としての食肉の重要性は、他の食品と比較すると高くないと

考えられた。しかし、食肉はウエルシュ菌の増殖を促進することから、ウエルシュ菌食中毒を考える上で重要な要素であると本研究班では結論している。

今年度は、牛肉以外の食肉でも、牛肉同様のウエルシュ菌増殖促進作用を持つのか、また、カレーミックスの種類を変更しても同じ現象が認められるのかについても検討した。併せて、食品を汚染しているウエルシュ菌の由来を推定するために、河川におけるウエルシュ菌の汚染調査、食品における汚染調査、分離ウエルシュ菌株の分子疫学調査を行った。

B. 研究方法

[1] カレー中での増殖挙動の解析

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、牛肉、豚肉、鶏肉、食肉非添加の4種類、さらにそれぞれにつきカレーミックスとして固形カレールー使用、粉末カレーミックス(破碎された香辛料の混合物)使用、カレーミックス非使用の3種類を用意し、計12種類のカレーを作製した。使用したウエルシュ菌株は香辛料由来の5株を使用した。カレー3人分(800 mL)に対して、10~60 cfu 接種し、42℃、6時間培養し、1時間ごとの菌数を測定した。

[2] 河川でのウエルシュ菌汚染調査

令和6年4月から11月にかけて、河川

表層水および終末処理場（下水処理場）からの放流水、河口の川砂およびカキを検査対象として採材した。河川水または放流水は必要に応じて 10 倍段階希釈を行い、非加熱と加熱処理（70℃、20 分間加熱後急冷）した各 100ml の原液および希釈液を 0.2 μ m のポアサイズのフィルターで吸引ろ過した。吸引後のフィルターを CHROMagar perfringens 平板培地上に置き、37℃、24 時間嫌気培養を行った。

〔3〕食品におけるウエルシュ菌汚染

乾物、二枚貝および土付き野菜（ジャガイモ、ニンジン、枝豆）の土の調査を行った。乾物 97 検体、二枚貝 62 検体、野菜付着土 25 検体の調査を行なった。二枚貝は生産地もしくは市場より購入した。アサリ、ハマグリ、ヒオウギガイ、ホタテガイ、ホンビノスガイ、マガキ、ムラサキイガイを対象とした。活貝を開殻し、軟体部全体を細断して検体とした。乾物、二枚貝とも検体 25 g に 225 ml のチオグリコレート培地を加え、野菜付着土は 9 倍重量のチオグリコレート培地を加えた。その後、ホモジナイズした後、70℃で 20 分間加熱して急冷した。その後、42℃で 24 時間培養し、培養液を CHROMagar perfringens に画線した。集落から DNA を抽出し、前述のマルチプレックス PCR 法で *cpa* および *cpe* 遺伝子の保有状況を確認した。

〔4〕分子疫学的解析

本研究班において分離した *cpe* 陽性ウエルシュ菌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 75 株を供試した。ゲノム DNA 塩基配列を微生物の遺伝子解析プラットフォーム PubMLST を使用してデータベースと照合し、各菌株の 1431 遺伝子座それぞれにおいて allele のタイプを番号化して割り当てた Multilocus sequence typing (MLST) を判定して、allele プロファイルを得た。これに基づき、CLC Genomics Workbench を用いて、Minimum Spanning Tree を作製し、菌株間の系統関係を推定した。

C. 研究結果

〔1〕カレー中での増殖挙動の解析

食肉非添加のカレー中では、ウエルシュ菌の増殖は認められなかった。しかし、食肉を添加すると、6 時間後には $10^3 \sim 10^7$ cfu/mL まで増殖した。添加した食肉の種類によって増殖性に違いは認められなかった。カレーミックスの種類では、固形ルーを用いたカレー中での増殖が最も良かった。カレーミックスを添加していないもの（野菜と水だけ）でも、食肉を添加すると増殖が認められたが、食肉非添加では増殖は認められなかった。以上の結果から、昨年度調査した牛肉だけでなく、豚肉、鶏肉にもウエルシュ菌の増殖促進効果があること、またこの現象は、カレーミックスの種類に依存しておらず、カレーミックス非添加でも認められることが明らかになった。

〔2〕河川でのウエルシュ菌汚染調査

調査した2つの水系から採取した33検体の河川水および下水処理水からウエルシュ菌の分離を試みたところ、ウエルシュ菌の検出率は、上流が低く、下流で高くなる傾向が認められた。*cpa* 陽性菌数に占める *cpe* 陽性菌の割合も、下流に行くに従って高くなる傾向を示した。*cpe* 陽性ウエルシュ菌の検出が最も高かったのは放流水で、下水処理場の放流水すべてから *cpe* 陽性菌が分離された。また、河口の川砂とカキから *cpe* 陽性菌が分離された。

[3] 食品におけるウエルシュ菌汚染

乾物に関しては、97 検体について調査を行った。その結果、煮干し 28 検体中 5 検体(17.9%)からウエルシュ菌が、そのうち 1 検体から *cpe* 陽性菌が分離された。また、素干しエビ 16 検体中 7 検体(43.8%)からウエルシュ菌が、そのうち 1 検体から、*cpe* 陽性菌が分離された。二枚貝は 62 検体を調査した。調査の結果、二枚貝前 62 検体のうち 36 検体(58.1%)からウエルシュ菌が検出され、4 検体(6.5%)から *cpe* 陽性菌が検出された。野菜付着土からは、25 検体中 4 検体(16%)で *cpe* が検出された。

[4] 分子疫学的解析

本研究班でこれまでに分離した環境、食品由来、および過去に分離された患者由来の *cpe* 陽性ウエルシュ菌 75 菌株の cgMLST プロファイルを指標として Minimum Spanning Tree を作製した。その結果、同一の集団食中毒事例内での菌株間と同程度に、食中毒患者由来株と類似した

allele のタイプを持つ海産物または乾物由来株が複数存在した。しかし、特定の食品が患者由来株と特に近縁であるというような傾向は認められなかった。

D. 考察

昨年度の調査では、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。本年度行なった研究成果から、牛肉だけでなく、豚肉、鶏肉にもウエルシュ菌の増殖促進効果があること、またこの現象は、カレーミックスの種類に依存しておらず、カレーミックス非添加でも認められることが明らかになった。食肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌が増殖できない現象を利用して、食肉を別調理しておき、配膳直前に食肉をカレールーに混ぜて提供するというウエルシュ菌食中毒予防法を昨年度、提唱した。今年度の結果から、カレーミックスを使用していない煮物、例えば肉じゃがなどでも、同様の方法で食中毒発生を予防できるのではないかと考えられた。今後、大規模調理の際でも、この方法で予防できるかどうか検討を行なって行きたい。

今回の河川の調査結果から、河川に広くウエルシュ菌が存在しており、特に下水処理場周辺で *cpe* 陽性ウエルシュ菌が高率に分離されたことから、下水処理場の放流水が汚染源である可能性が強く示唆された。また、素干しエビや煮干し、二枚貝の調査

結果から、河川の *cpe* 陽性ウエルシュ菌によって沿岸部が広く汚染されている実態が明らかになった。今回の結果から、ウエルシュ菌はノロウイルス同様の汚染経路を持つと考えられる。今回明らかになったウエルシュ菌の食品汚染経路は、ウエルシュ菌対策を今後考える際に、非常に基礎的かつ重要なデータであると考えられる。分子疫学的解析の結果からも同様の傾向が示唆された。分子疫学的解析では、患者由来株と非常に近縁な関係にある株が、海産物や乾物から分離されているという結果が得られた。その一方で、患者由来株と近縁の *cpe* 陽性ウエルシュ菌が特定の食品から特に分離されたというような結果は、分子疫学的解析からは得られなかった。これらの結果は、広い範囲の食品が、ウエルシュ菌食中毒の原因となりうる可能性を示唆しているものと考えられた。

E. 結論

昨年度、行なった研究で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を明らかにした。このことから、ウエルシュ菌食中毒の予防法として、次の方法を提唱した。

- 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。

今年度の研究成果から、この予防法は牛肉

以外の食肉を使用した食品、カレーミックスを使用していない食品でも応用できる可能性が示唆された。今後、食肉がウエルシュ菌の増殖に及ぼす影響を検討し、食品におけるウエルシュ菌増殖の制御法を確立したい。

今年度の研究から、ウエルシュ菌汚染が水を介して広がっている可能性が示唆された。本研究班のこれまでの成果から、香辛料がエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌に汚染されていることを明らかにしているが、香辛料の栽培、加工には多量の水を必要とされる。よって、原産国の衛生状況によっては、土壌だけでなく、水を介したウエルシュ菌汚染が発生している可能性も考えられる。今後、食品におけるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染を考察する際には、水を中心に考えていく必要があるのではないかと考えられる。

cpe 陽性ウエルシュ菌の分子疫学的解析結果から、従来、ウエルシュ菌食中毒の主たる原因食品であると考えられてきた食肉だけでなく、農作物や海産物、およびその環境が、ウエルシュ菌食中毒原因菌の汚染源や由来となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi T, Watanabe M, Yodotani Y,

- Nishizato E, Araki S, Sasaki S, Hara-Kudo Y, Kojima Y, Misawa N, Okabe N: Contamination of Japanese retail foods with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* spores, Journal of Food Protection, 2025; 88: 100429.
- 2) Ohnishi T: Characteristics of outbreaks caused by *Clostridium perfringens* in Japan, Food Safety (Submitted)
2. 学会発表
- 1) Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Kojima Y., Sasaki C., Hara-Kudo Y., Misawa N, Okabe N., Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in retailed foods and intestinal contents of animals in Japan. United States and Japan Conference on the Development and Utilization of Natural Resources-Joint Panel on Toxic Microorganisms (2024. 9. 18)
- 2) Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Kojima Y., Misawa N, Okabe N., Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in retailed foods in Japan. International Microbiological Societies Congress (2024. 10. 25)
- 3) 大西貴弘、渡辺麻衣子、淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、佐々木賢美、工藤由起子、小嶋由香、三澤尚明、岡部信彦「国内の市販食品および動物の腸内容物におけるエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染状況」第 45 回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 9. 6)
- 4) 淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、小嶋由香、大西貴弘、渡辺麻衣子、工藤由起子、三澤尚明、岡部信彦: ヒト・食品・環境から分離された *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分子疫学的解析 第 45 回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 9. 6)
- 5) 小嶋由香、淀谷雄亮、荒木靖也、池田史朗、本間幸子、岡部信彦、渡辺麻衣子、三澤尚明、大西貴弘: 市販食品におけるウエルシュ菌の汚染状況について 第 36 回地方衛生研究所協議会 細菌研究会 (2025. 1. 16)
3. 行政関係者向けの説明会等
- 1) 大西貴弘: ウエルシュ菌食中毒 食品衛生危機管理研修 (2024. 9. 27)
- 2) 大西貴弘: ウエルシュ菌の基礎と食中毒の原因食材に関する最新知見 特別区職員研修所 令和 6 年度専門研修「食品衛生」(2025. 2. 19)
- 3) 大西貴弘: 食中毒予防対策 (ウエルシュ菌を中心として) 令和 6 年度川崎市職員研修会 (2025. 3. 4)
- H. 知的財産権の出願・登録状
なし

令和6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、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。今年度は、牛肉以外の食肉でも、牛肉同様のウエルシュ菌増殖促進作用を持つのか、また、カレーミックスの種類を変更しても同じ現象が認められるのかについても検討した。その結果、食肉を添加したカレー中でウエルシュ菌は発育したが、添加した食肉の種類によって増殖性に違いは認められなかった。カレーミックスの種類では、固形ルーを用いたカレー中での増殖が最も良かった。カレーミックスを添加していないもの（野菜と水だけ）でも、食肉を添加すると増殖が認められた。以上の結果から、昨年度調査した牛肉だけでなく、豚肉、鶏肉にもウエルシュ菌の増殖促進効果があること、またこの現象は、カレーミックスの種類に依存しておらず、カレーミックス非添加でも認められ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。この研究班では、これまでに食品におけるウエル

シュ菌の汚染状況の調査を行っている。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ところ、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。しかしながら、ウエルシュ菌食中毒は食肉を使用した食品が原因食であることが多い。昨年度、ウエルシュ菌食中毒が多発する煮物中のウエルシュ菌の増殖挙動を、カレーを用いて調べたところ、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。これらの結果から、汚染源としての牛肉の重要性は、他の食品と比較すると高くないが、牛肉はウエルシュ菌の増殖を促進することから、ウエルシュ菌食中毒を考える上で重要な要素であると結論した。

今年度は、牛肉以外の食肉でも、牛肉同様のウエルシュ菌増殖促進作用を持つのか、また、使用するカレーミックスの種類を変更しても同じ現象が認められるのかについても検討した。

B. 研究方法

[1] カレー中での増殖挙動の解析

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、牛肉、豚肉、鶏肉、食肉非添加の4種類、さらにそれぞれにつきカレーミックスとして固形ルー使用、粉末カレー粉(破碎された香辛料の混合物)使用、カレーミックス非使用の3種類を用意し、

計12種類のカレーを作成した。カレーは、玉ねぎ100g、ジャガイモ110g、ニンジン50gに固形ルー120gもしくは粉末カレー粉??gを加え、水で800mL(カレー3人分)に調整した。カレーは調理後、42℃まで冷却したのち、カレー3人分に対して、チオグリコレート培地で一昼夜培養したウエルシュ菌を10~60 cfu接種した。その後、42℃、6時間培養し、1時間ごとの菌数を測定した。使用したウエルシュ菌株は香辛料由来のエンテロトキシン遺伝子保有5株を使用した。

C. 研究結果

[1] 固形ルーを使用したカレー中でのウエルシュ菌の増殖挙動

カレーミックスとして固形ルーを使用したカレーに牛肉、豚肉、鶏肉のいずれかを添加した場合、ウエルシュ菌の増殖は非常に良好であった(図1)。培養開始後2から3時間程度で菌が検出され始め、多くの場合、 $10^5 \sim 10^7$ cfu/mL程度まで増殖した。一方、食肉を添加していない検体では、最も増殖の良いものでも、約 10^3 cfu/mLであった。多くの検体では、培養6時間後でも菌を検出できなかった。牛肉、豚肉、鶏肉間で増殖性に差は認められなかった。

[2] 粉末カレー粉を使用したカレー中でのウエルシュ菌の増殖挙動

カレーミックスとして粉末カレー粉を使用したカレーに牛肉、豚肉、鶏肉のいずれかを添加した場合、培養開始から2から

3 時間後にウエルシュ菌の増殖が認められた。最もよく増殖した検体では、培養 6 時間で約 10^6 cfu/mL に達した検体もあったが、多くの検体は約 10^5 cfu/mL 以下であった。固形ルーを使用したカレー中に比べると、ウエルシュ菌の増殖は良くなかった。牛肉、豚肉、鶏肉間で増殖性に差は認められなかった。食肉非添加の検体では、ウエルシュ菌の増殖は認められなかった。

〔3〕 カレーミックス非使用のカレー中でのウエルシュ菌の増殖挙動

カレーミックス非使用のカレー(野菜と水だけ)に牛肉、豚肉、鶏肉のいずれかを添加した場合、2 から 4 時間後にウエルシュ菌の増殖が認められた(図 3)。最もよく増殖した 1 検体では、培養 6 時間で約 5×10^5 cfu/mL に達したが、それ以外の検体は約 10^5 cfu/mL 以下であった。固形ルーを使用したカレー中に比べると、ウエルシュ菌の増殖は良くなかったが、粉末カレー粉を使用したカレーとは増殖性に大きな差は認められなかった。牛肉、豚肉、鶏肉間で増殖性に差は認められなかった。食肉非添加の検体では、培養 6 時間後に 1 検体が 20 cfu/mL に増殖したが、それ以外の検体では、ウエルシュ菌の増殖は認められなかった。

D. 考察

昨年度の研究では、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は

増殖できることを明らかにした。今年度は同様の現象が他の食肉を用いた場合でも見られるのか、また、使用するカレーミックスの種類に依存するか検討を行った。今回の結果から、食肉の種類に関わらず、牛肉、豚肉、鶏肉を添加した場合でもウエルシュ菌の増殖が認められた。また、食肉添加によるウエルシュ菌の増殖は、カレーミックスの種類に依存していないことが明らかにになった。ただし、固形ルーを用いた場合は、粉末カレー粉もしくはカレーミックス非添加の場合と比べて、ウエルシュ菌の増殖が良好であった。これは、固形ルーには香辛料以外に、肉エキス、野菜エキス、酵母エキス、粉乳、澱粉等の栄養となりうる成分が含まれているためと考えられた。

今年度の結果から、カレーミックス非添加でも、食肉添加に伴うウエルシュ菌の増殖が認められた。このことから、カレー以外の食品においても食肉の添加がウエルシュ菌の増殖に影響を及ぼすことが示唆された。カレー以外にもウエルシュ菌食中毒が多く発生している食品として、シチュー、肉じゃが、芋のそぼろ煮などがあるが、これらの食品においても食肉を添加するタイミングによってウエルシュ菌の増殖を制御できる可能性が示唆された。

E. 結論

昨年の研修で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を明らかにした。このことから、ウエ

ルシ菌食中毒の予防法として、次の方法を提唱した。

- 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。

今年度の研究成果から、この予防法は牛肉以外の食肉を使用した食品、カレーミックスを使用していない食品でも応用できる可能性が示唆された。今後、食肉がウエルシ菌の増殖に及ぼす影響を検討し、食品におけるウエルシ菌増殖の制御法を確立したい。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi T, Watanabe M, Yodotani Y, Nishizato E, Araki S, Sasaki S, Hara-Kudo Y, Kojima Y, Misawa N, Okabe N: Contamination of Japanese retail foods with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* spores, Journal of Food Protection, 2025; 88: 100429.

2. 学会発表

- 1) Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Kojima Y., Sasaki C., Hara-Kudo Y., Misawa N, Okabe N., Prevalence of enterotoxigenic

Clostridium perfringens in retailed foods and intestinal contents of animals in Japan. United States and Japan Conference on the Development and Utilization of Natural Resources-Joint Panel on Toxic Microorganisms (2024. 9. 18)

- 2) Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Kojima Y., Misawa N, Okabe N., Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in retailed foods in Japan. International Microbiological Societies Congress (2024. 10. 25)

- 3) 大西貴弘、渡辺麻衣子、淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、佐々木賢美、工藤由起子、小嶋由香、三澤尚明、岡部信彦「国内の市販食品および動物の腸内容物におけるエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシ菌の汚染状況」日本食品微生物学会学術総会（令和6年9月6日）

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

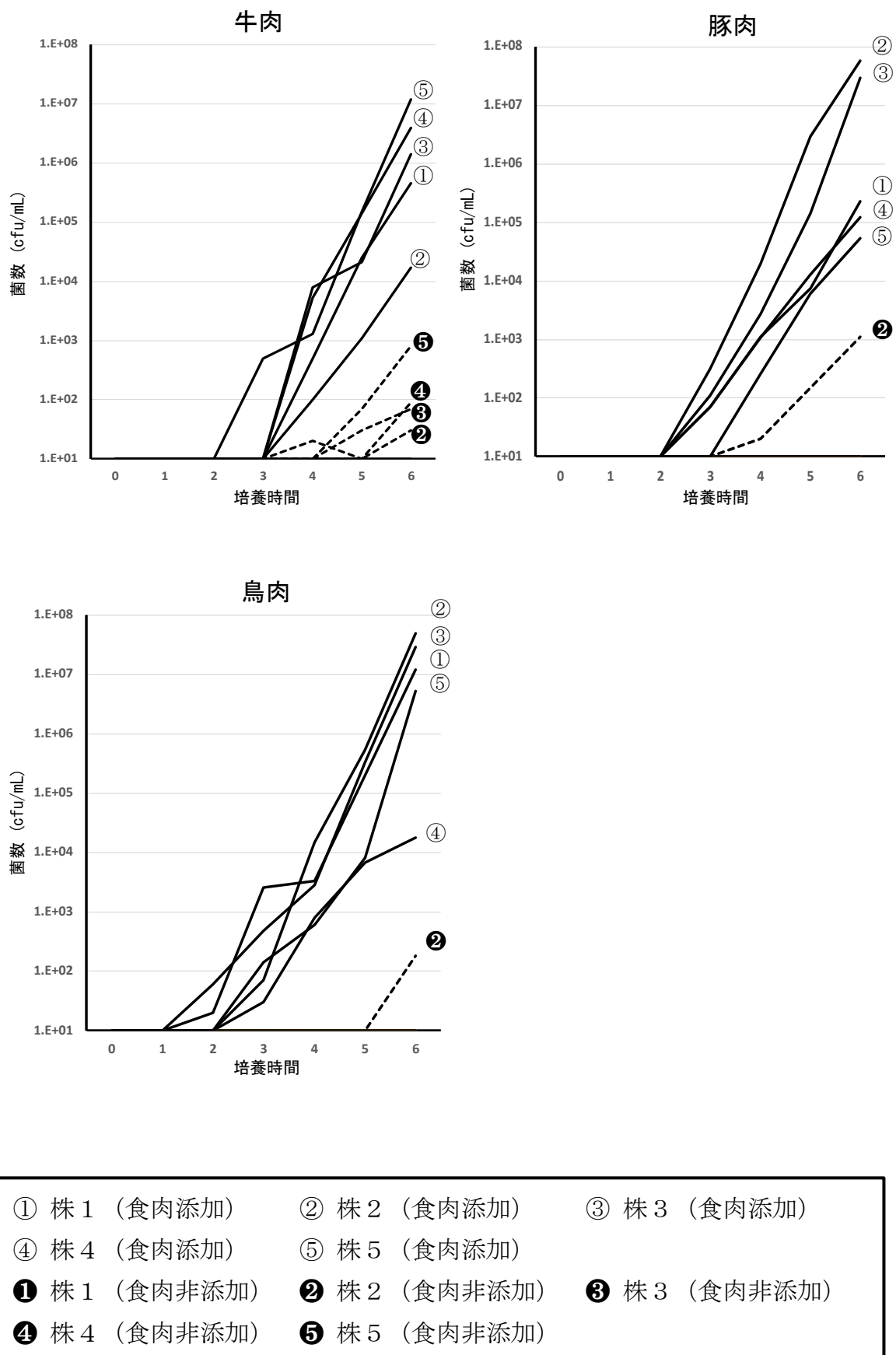
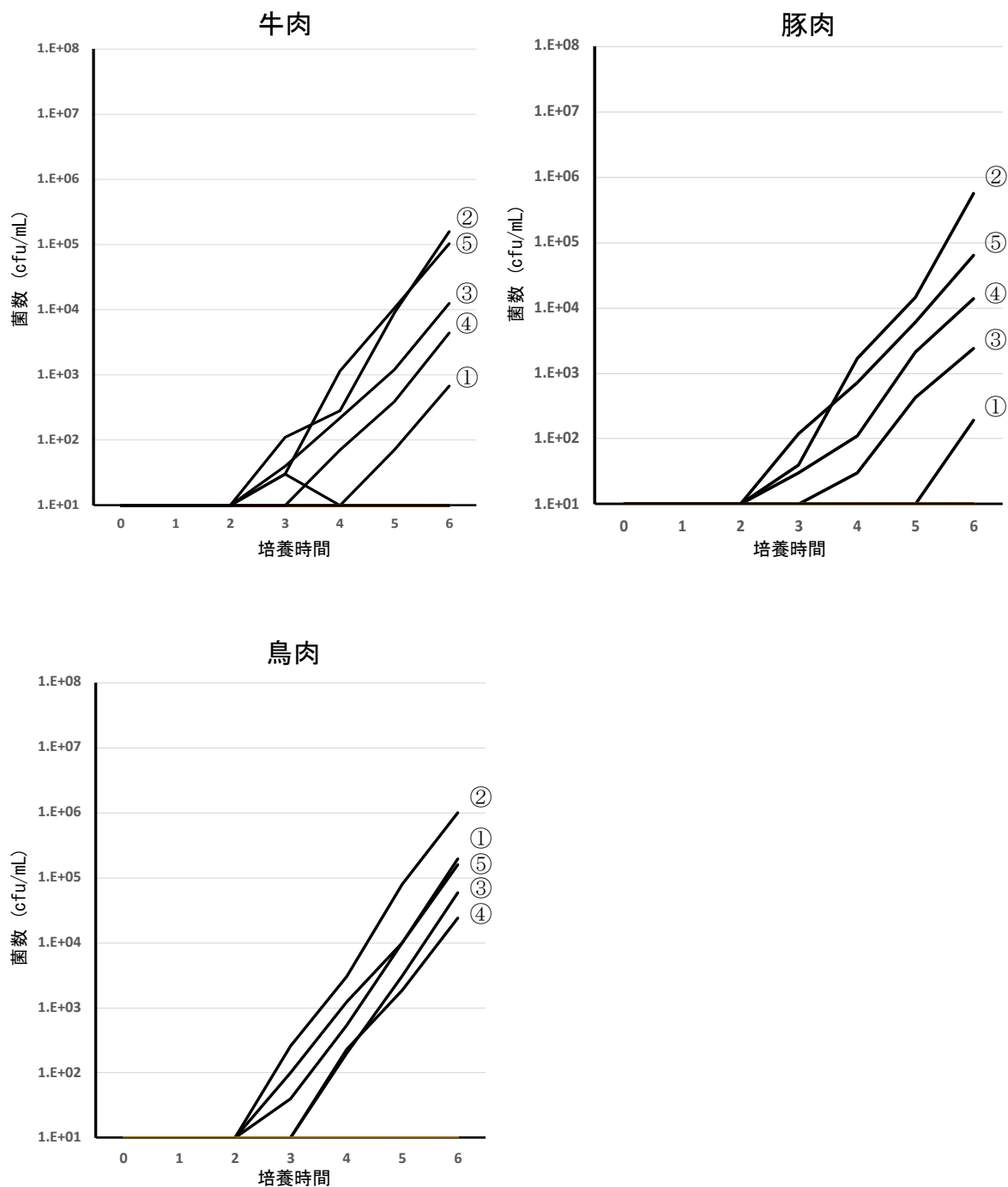
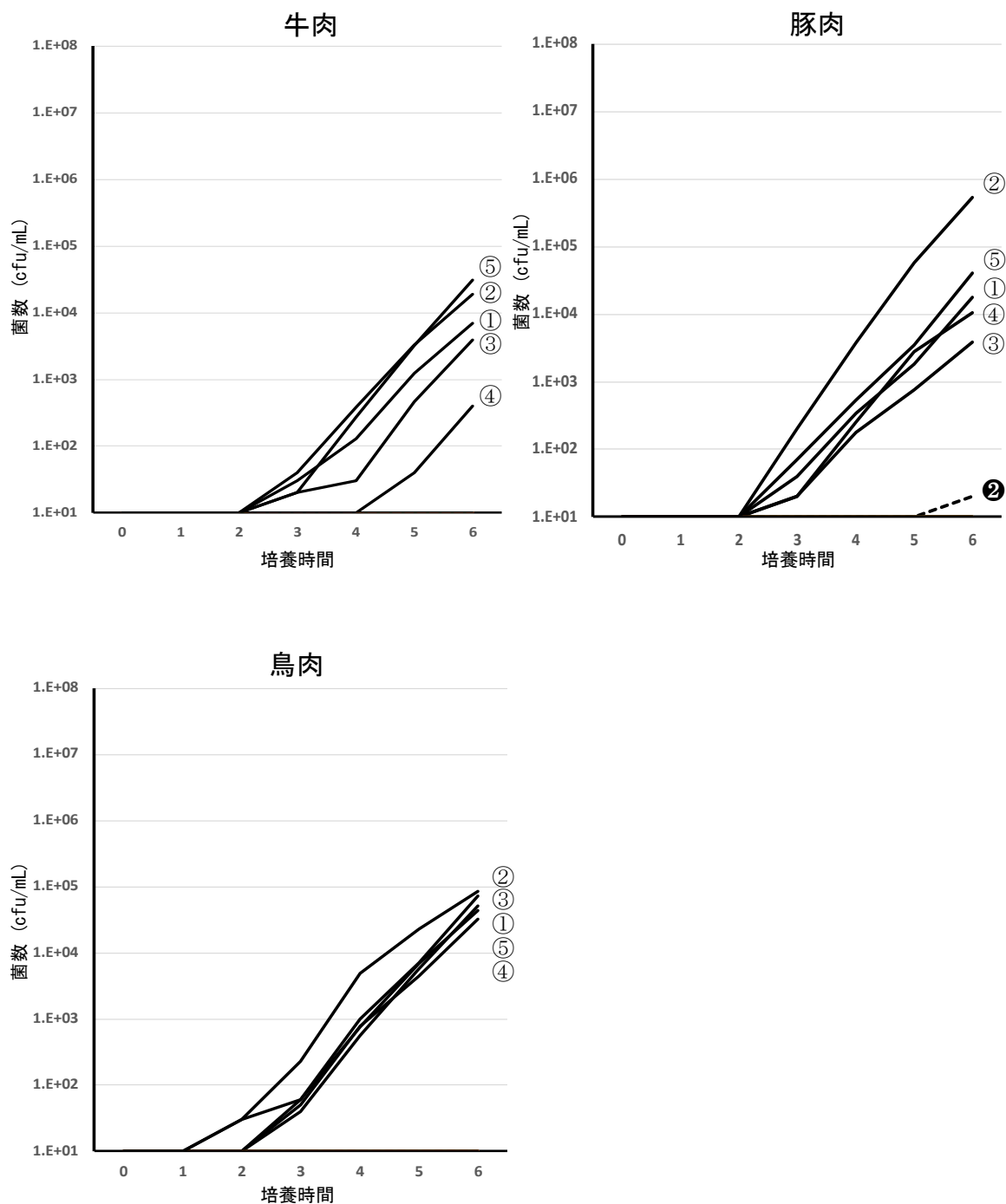


図 1 固形ルーを使用したカレー中でのウエルシュ菌の増殖



- | | | |
|---------------|---------------|---------------|
| ① 株 1 (食肉添加) | ② 株 2 (食肉添加) | ③ 株 3 (食肉添加) |
| ④ 株 4 (食肉添加) | ⑤ 株 5 (食肉添加) | |
| ① 株 1 (食肉非添加) | ② 株 2 (食肉非添加) | ③ 株 3 (食肉非添加) |
| ④ 株 4 (食肉非添加) | ⑤ 株 5 (食肉非添加) | |

図 2 粉末カレー粉を使用したカレー中でのウエルシュ菌の増殖



- | | | |
|---------------|---------------|---------------|
| ① 株 1 (食肉添加) | ② 株 2 (食肉添加) | ③ 株 3 (食肉添加) |
| ④ 株 4 (食肉添加) | ⑤ 株 5 (食肉添加) | |
| ① 株 1 (食肉非添加) | ② 株 2 (食肉非添加) | ③ 株 3 (食肉非添加) |
| ④ 株 4 (食肉非添加) | ⑤ 株 5 (食肉非添加) | |

図 3 カレーミックス非添加でのウエルシュ菌の増殖

令和 6 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

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

ウエルシュ菌食中毒の原因菌であるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌 (*cpe* 陽性菌) の食品における汚染調査では、貝類における *cpe* 陽性菌の検出率が高かった。それらの汚染源が、河川水または下水処理場から河川に放出される下水処理水の可能性があることから、M 県 O 水系および K 水系の河川水および下水処理水、河口に生息するカキおよび川砂から *cpe* 陽性菌の分離を試みた。2 つの水系 14 か所から採水した延べ 33 検体を検査したところ、32 検体 (97.0%) から *cpa* 陽性菌が、18 検体 (54.5%) から *cpe* 陽性菌が分離された。一方、4 か所の下水処理水場から採取した延べ 6 検体すべてから *cpe* 陽性菌が分離された。河川水 100ml 当たりの α 毒素産生性ウエルシュ菌 (*cpa* 陽性菌) の菌数は、非加熱検体が 0~610 cfu (平均 95.6 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.3%)、加熱処理検体が 0~420 cfu (平均 56.8 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.1%) だったのに対し、下水処理水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌の菌数は、非加熱検体が 180~5400 cfu (平均 1386.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 12.2%)、加熱処理検体が 100~4450 cfu (平均 1131.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 15.8%) だった。河川水から分離される *cpe* 陽性菌の検出率は、上流で低く、下流に行くほど高くなる傾向が認められた。さらに、河口の川砂 (3 検体) とカキ (4 検体) から *cpe* 陽性菌の分離を試みたところ、各 2 検体から *cpe* 陽性菌が分離・検出された。また、*cpe* 陽性菌の栄養型および芽胞の河川水中での生存性を試験管内で調べたところ、20℃、好気条件下では、栄養型および芽胞の菌数は時間の経過とともに減少し、栄養型は芽胞を形成しなかった。以上の結果から、調査した河川の表層水から *cpe* 陽性菌が年間を通して分離され、特に下水処理場の排水からの菌数および分離率が高く、下水処理水が河川水の汚染源の一つであることが強く示唆された。さらに、河口の川砂およびカキから *cpe* 陽性菌が検出されたことから、河川水中から貝類に取り込まれる汚染経路が考えられた。

A. 研究目的

ン産生性ウエルシュ菌 (以下、*cpe* 陽性菌)

令和 4 年度に実施したエンテロトキシ の大規模な食品汚染実態調査を実施した

ところ、本菌が分離・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。これらの食品が本菌に汚染される原因が、河川水および下水処理場から河川に放出される処理水である可能性があるため、令和 6 年度は、河川水、下水処理水、川砂および河口に生息するカキにおける *cpe* 陽性菌の分布状況を明らかにすることを目的として調査を実施した。

B. 研究方法

[1] 検体

令和 6 年 4 月から令和 7 年 2 月にかけて、M 県 0 水系（12 か所、延べ 27 検体）（図 1）および K 水系（2 か所、延べ 6 検体）（図 2）の河川表層水および 4 つの下水処理場（図 3）からの下水処理水（延べ 6 検体）を採水し、試験に供試した。採水地点は GPS にて確認し、地図上に記録した。約 500ml の滅菌採水瓶に採取した検体は、水温と pH を記録した後に冷蔵保存で輸送し、48 時間以内に検査を実施した。また、M 市内の 0 水系下流に定点観測地点を置き（採水ポイント 10）（図 1）、令和 6 年 5 月から令和 7 年 2 月まで、毎月 1 回定期的に検査を行った。さらに、川砂（3 検体）および岩ガキ（4 検体）は、K 水系の河口において干潮時に採取した。

[2] 検査手順

河川水または下水処理水は必要に応じ

て 10 倍段階希釈を行い、非加熱と加熱処理（70℃、20 分間加熱後急冷）した各 100ml の原液および希釈液を 0.2 μ m のポアサイズのフィルターで吸引ろ過した。吸引後のフィルターをウエルシュ菌の選択培地である CHROMagar *perfringens* 平板培地上に置き、さらに同培地を重層して培地が固化した後、37℃、24 時間嫌気培養を行った。フィルター上の赤色集落を計測するとともに、無作為に赤色集落を最大 30 個釣菌した（30 個以下の場合は全て釣菌）。純培養した集落からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、マルチプレックス PCR 法により *cpa* および *cpe* 遺伝子を検出した。検体中のウエルシュ菌の菌数は、フィルター上の赤色集落数から求めた菌数に、PCR 検査による *cpa* 陽性率を乗じたものを 100ml 当たりの α 毒素産生性ウエルシュ菌（以下、*cpa* 陽性菌）数とした。さらに、*cpe* 陽性菌の検出頻度を示す指標として、分離した *cpa* 陽性菌から *cpe* を保有する菌を PCR で確認し、*cpa* 陽性菌数に対する *cpe* 陽性菌数の比率（*cpe/cpa*）として表した。カキからの菌の分離は、加熱、非加熱の検体 25g を 225ml のチオグリコレート培地でストマッカー処理後に増菌培養し、常法に従って菌の分離および PCR による遺伝子（*cpa*、*cpe*）検査を実施した。川砂は 5g を秤量し、滅菌蒸留水で 1:1～1:10 に希釈した後、ボルテックミキサーで 30 秒間攪拌した。70℃、20 分間加熱・急冷し、懸濁液 0.1 または 1 ml をシャーレ内

で加温溶解した CHROMagar perfringens 培地 20 mL と混釈し、37℃、24 時間、嫌気培養した。赤色コロニーを最大 30 個釣菌し、*cpa* および *cpe* 遺伝子を PCR により検出した。培養に供試した川砂の懸濁液 1 ml を分取し、60℃、48 時間加熱して水分を蒸発させ、砂の乾燥重量を測定し、乾燥させた砂 1g 当たりの菌数として表記した。

[3] 河川水中でのウエルシュ菌の生存性

河川水中でウエルシュ菌の栄養型と芽胞がどのくらいの期間生残するか、実験室内で調べた。採水ポイント 10 の河川水(図 1) を採取し、ろ過滅菌 (0.2 μ m) した。これに本試験で分離された *cpe* 陽性菌の栄養型または芽胞を用いて懸濁液 (1~3 cfu/ml) を調整した。

芽胞液の調整は、Uemura の方法 (Uemura, T., J. Appl. Microbiol., 44, 411, 1978) を改変して作製した。GAM 寒天平板培地で 37℃、24 時間嫌気培養した栄養型菌を、TGC 培地 1ml に懸濁 (OD₆₀₀=0.15) し、37℃、24 時間、嫌気培養した。この工程をもう一度実施し、培養液 100 μ l を DS 培地 1ml に添加し、37℃、24 時間嫌気培養した。培養液を 10,000 $\times$ g、10 分間遠心し、沈査を滅菌蒸留水で 3 回遠心洗浄した。沈査を滅菌蒸留水 1ml に浮遊させ、75℃、30 分間加熱した後、氷中で冷却した。芽胞を顕微鏡下で確認した後、芽胞数を計測し、実験に使用するまで 4℃で保存した。

各懸濁液を 50ml の遠心管に 50ml 分注

し、20℃のインキュベーター内に好気条件下で静置した。経時的に各チューブ内の生菌数を、上述した河川水からのウエルシュ菌の菌数測定法に従って測定した。栄養型の菌液は、非加熱に加え、芽胞への移行を確認するため、70℃、20 分間加熱処理を行った後に菌数測定も実施した。生残菌については、集落から DNA を抽出し、*cpe* 遺伝子を PCR により検出した。1 回の測定に 3 本の保存菌液を供試した。

C. 研究結果

[1] 河川水からの分離成績

調査した 2 つの水系から採取した 33 検体の河川水および下水処理水の水温は、14℃~28℃で、pH は河口付近が pH8、それ以外は pH7 であった。これらからウエルシュ菌の分離を試みたところ、32 検体 (97.0%) から *cpa* 陽性菌が、18 検体 (54.5%) から *cpe* 陽性菌が分離された。また、加熱処理、非加熱の両方の検体から *cpe* 遺伝子陽性菌が検出されたのは 9 検体で、非加熱のみが 6 検体、加熱のみが 3 検体あった。河川水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌の菌数は、非加熱検体が 0~610 cfu (平均 95.6 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.3%)、加熱処理検体が 0~420 cfu (平均 56.8 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.1%) で、*cpa* 陽性菌数に占める *cpe* 陽性菌の割合も、下流に行くに従って高くなる傾向を示した (図 4、表 1)。

[2] 定点観測

0 水系の下流に定点観測地で、令和 6 年 5 月から令和 7 年 2 月まで、毎月 1 回（計 10 回）*cpa* 陽性菌の定量培養と *cpe* の検出率（*cpe/cpa*）を調査した。*cpe* 陽性菌は 7 回検出され、河川水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌数は、非加熱検体で 42~150 cfu（平均 81.5 cfu、平均 *cpe/cpa* 3.1%）、加熱処理検体で 14~140 cfu（平均 51.1 cfu、平均 *cpe/cpa* 2.2%）であり、季節的な違いは認められなかった（図 5）。

[3] 下水処理水の分離成績

下水処理水では 6 検体すべてから *cpa* および *cpe* 陽性菌が分離された。下水処理水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌の菌数は、非加熱検体が 180~5400 cfu（平均 1386.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 12.2%）、加熱処理検体が 100~4450 cfu（平均 1131.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 15.8%）だった（図 6）。

[4] 河川水中での生残性

cpe 陽性菌の栄養型および芽胞の 20℃、好気条件下における河川水中での生存性を試験管内で調べたところ、栄養型の生菌数は速やかに減少し、7 日後には増殖集落は認められなかった。また、観察期間中に栄養型が芽胞を形成したかを確認するため、菌液を加熱処理した後に嫌気培養を行ったが、菌は増殖せず、芽胞形成は認められなかった（図 7）。芽胞浮遊液についても栄養型と同様に河川水中での生存性を調べた結果、保存時間の経過とともに培養可能菌は減少し、16 日後には初期菌数の 10

分の 1 まで減少した（図 8）。

[5] カキからの分離成績

K 水系の河口に生息している岩ガキ 4 検体を干潮時に採取し、ウエルシュ菌の分離を試みたところ、非加熱検体と加熱処理検体のいずれからでも *cpa* 陽性菌が分離された。増菌培養液を用いた PCR では 2 検体から *cpe* が検出され、さらにその 1 検体（加熱処理）から *cpe* 陽性菌が分離された（表 2）。

[6] k 川砂からの分離成績

K 水系のカキを採取した周辺の川砂を干潮時に採取し、ウエルシュ菌の分離を試みた。供試した 3 検体から *cpa* 陽性菌が分離され、その 2 検体から *cpe* 陽性菌が分離された（表 3）。

D. 考察

今回の調査で、2 つの水系のいずれからでも *cpa* 陽性菌が河川水に広く分布していることが分かった。また、河川水から分離された *cpe* 陽性菌は、下流域で分離された。今回の調査結果で特筆すべき点は、調査したすべての下水処理場から排出される下水処理水から *cpa* および *cpe* 陽性菌が高い菌数で分離されたことである。河川水と下水処理水から分離された *cpa* 陽性菌の平均菌数を非加熱検体と加熱処理検体で比較すると、下水処理水のほうが 10~20 倍高い値を示しており、*cpe/cpa* が

3.3~30.0%であったことから、大量の *cpe* 陽性菌が河川に排出されていることが示された。従って、下水処理水は *cpe* 陽性菌の汚染源の一つであることが強く示唆された。さらに、*cpe* 陽性菌が下水処理場の上流でも高頻度に検出されるのは、下水処理場のある河口付近の河川水が満潮時に上流に逆行することとも関係していると思われる。

今回の試験の採水地点 1 (図 1) は、山間部にある清流で、河川の上流には人が生活していないことから、*cpe* 陽性菌の汚染源がないか、ごく少ない可能性が高い。河川水は常時上流から下流に大量の水が流れていることから、連続して大量のウエルシュ菌が河川に流入していなければ、河川水で希釈され、菌の分離頻度は低くなると考えられる。定点観測地点では、*cpa* および *cpe* 陽性菌は高頻度に分離される一方、季節的な変動傾向等は認められなかった。定点観測地点は潮流の影響を受ける位置にあり、上述した潮流による *cpe* 陽性菌の分離成績に影響を与えた可能性も考えられた。

下水処理水以外の汚染源として、家畜や野生動物の腸管内に生息するウエルシュ菌が考えられるが、令和 5 年度に、家畜 (牛、豚、鶏) の腸内容物から *cpe* 陽性菌の分離を試みたが、全く分離されなかった。また、採水ポイント 7 (図 1) は、大規模養豚場の下流であったが、分離されたのは *cpa* 陽性菌のみだった。従って、少なくとも

も家畜由来の汚染はごく限られていると考えられた。

M 市は下水道のインフラ整備が進んでいるが、町村レベルでは簡易浄化槽による処理を行っている場合も依然として認められる。K 水系には下水処理場からの排水は放流されていないことから、簡易浄化槽を含めた他の汚染源が存在することを示唆している。今回は簡易浄化槽からの排水を検査しておらず、*cpe* 陽性菌の汚染の程度は明らかでないが、*cpe* 陽性菌の調査は今後の課題である。

cpe 陽性菌の栄養型と芽胞がどの程度の期間生存できるかを調べたところ、栄養型では速やかに死滅し、栄養型から芽胞形成への移行も認められなかった。さらに、芽胞であっても河川水中では長期間生残しないことから、河川から分離されるウエルシュ菌は、常時汚染源から河川水に排出されていると考えられた。

さらに、河口のカキおよびカキを採取した周辺の川砂から *cpe* 陽性菌が分離・検出されたことから、河川水や川砂のウエルシュ菌が貝類に取り込まれ、保菌される可能性が示唆された。これらの結果は、食品の汚染実態調査で貝類から *cpe* 陽性菌が分離された汚染経路を裏付けるものとなった。

今後は、河川水および下水処理水から分離された *cpe* 陽性菌株の分子生物学的手法を用いた系統解析を行い、ヒト、食品、環境由来株との関連性を調べる必要があ

るが、下水処理水から分離された *cpe* 陽性菌がヒトの腸管に由来する可能性がある場合には、ウエルシュ菌食中毒の対策としては、下水処理場での *cpe* 陽性菌の殺菌処理や調理従事者の検便も含めた衛生対策が必要となる。

E. 結論

cpe 陽性菌は、河川の下流域に広く分布していた。下水処理水は本菌の汚染源の一つであることが強く示唆され、貝類などの食品への汚染源となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

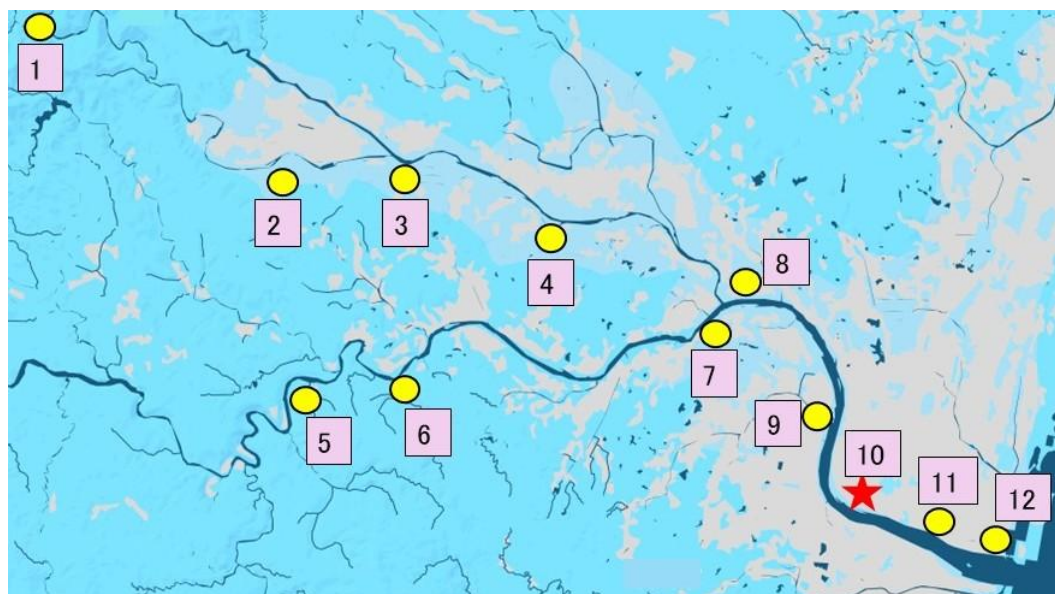
G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状

なし

図1 0 水系の採水ポイント



★ 定点観測地点

図2 K水系の採水ポイント



図3 調査した下水処理場の位置



図4 O水系の各採水ポイントにおけるウェルシュ菌の分離菌数と *cpe* 陽性菌の分離頻度

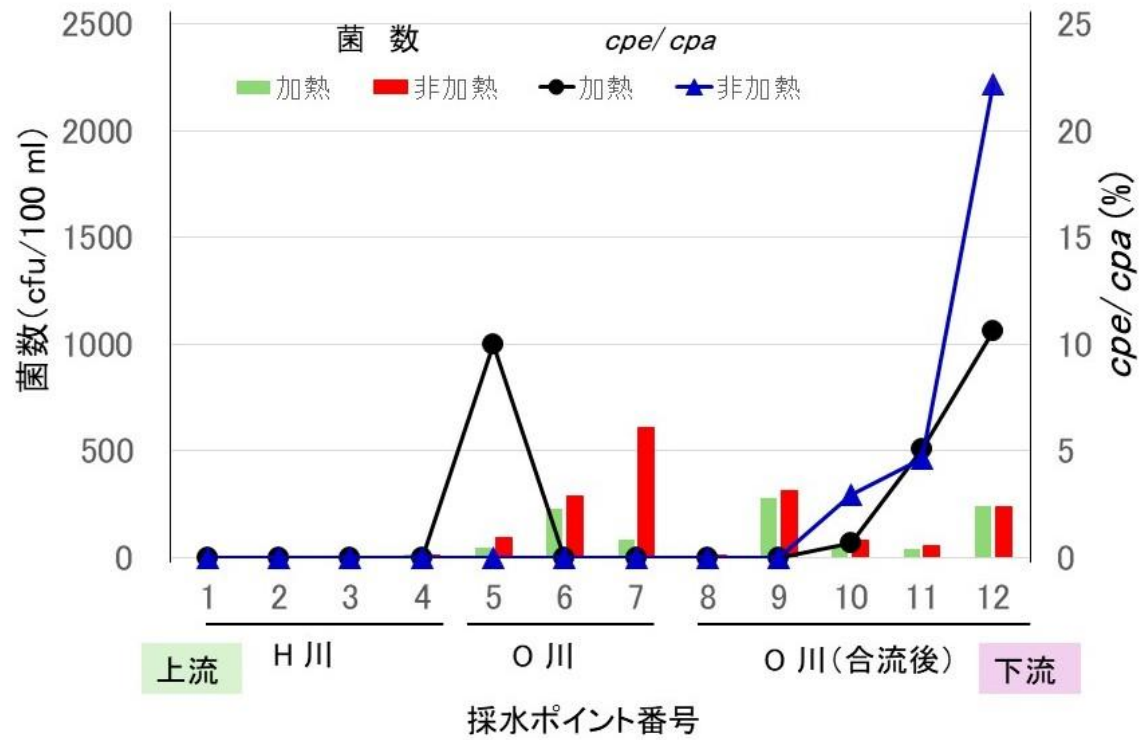


表 1 K 水系の河川水からのウェルシュ菌の分離と *cpe* 陽性菌の分離頻度

採水 ポイント	採水日	水温(°C)	pH	加熱			非加熱		
				菌数 (cfu/100ml)	<i>cpe</i>	<i>cpe/cpa</i> (%)	菌数 (cfu/100ml)	<i>cpe</i>	<i>cpe/cpa</i> (%)
1	2024/5/20	19.0	7	1	1	100	4	2	50.0
1	2024/10/13	19.6	7	4	0	0	1	0	0
2	2024/5/20	22.8	8	9	0	0	13	0	0
2	2024/10/13	23.2	7	8	0	0	17	3	17.6
2	2024/11/5	ND	7	6	1	16.7	11	2	18.2
2	2024/12/7	14.6	8	10	0	0	16	1	6.3

図5 定点観測地（水ポイント10）におけるウェルシュ菌の分離と *cpe* 陽性菌の分離頻度

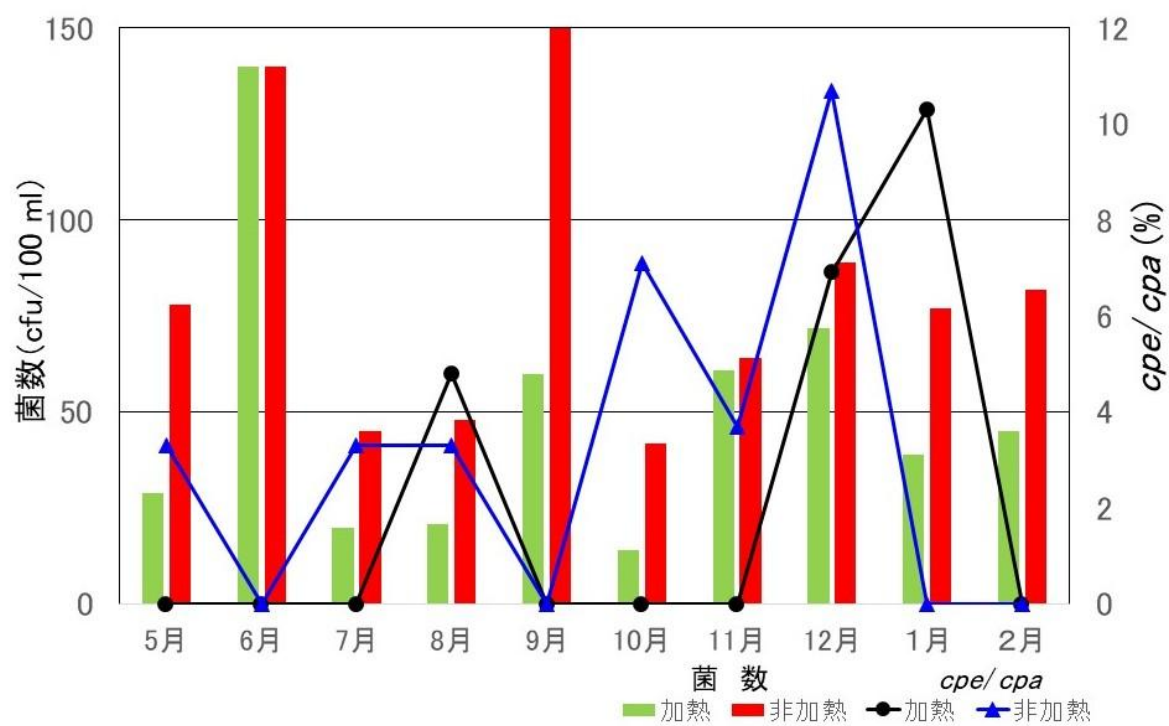


図6 下水処理場からの排水中のウェルシュ菌の分離菌しいと *cpe* 陽性菌の分離頻度

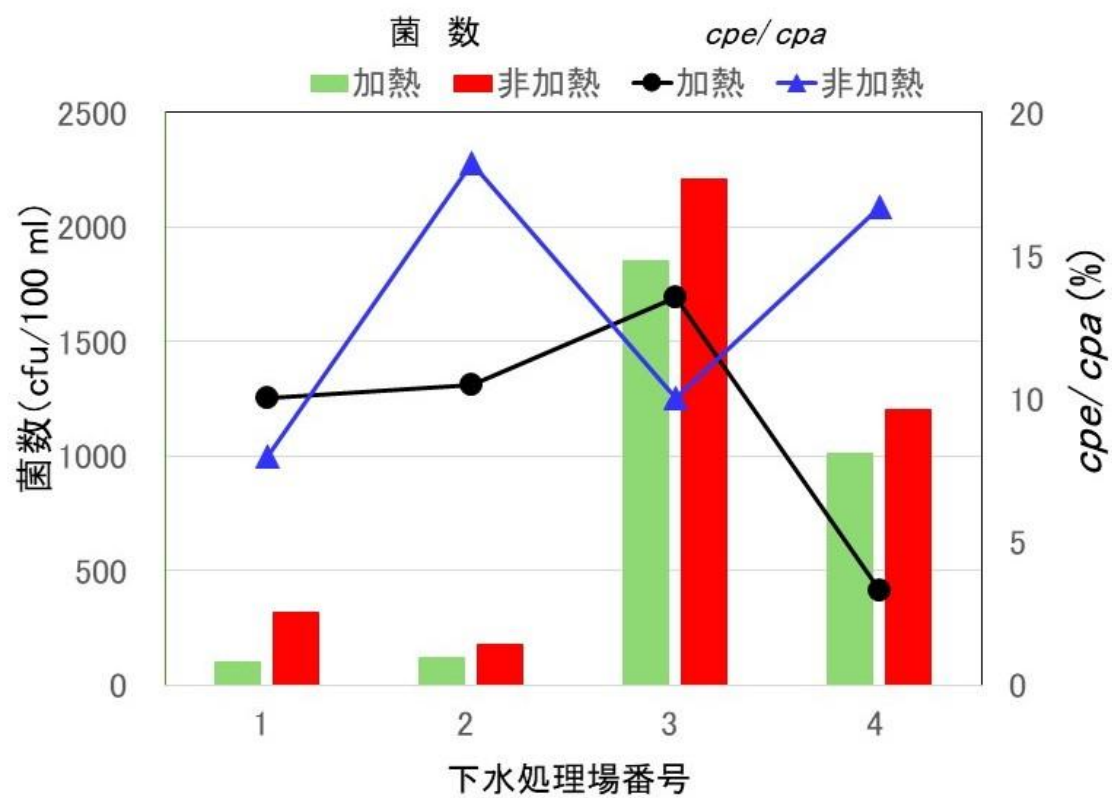
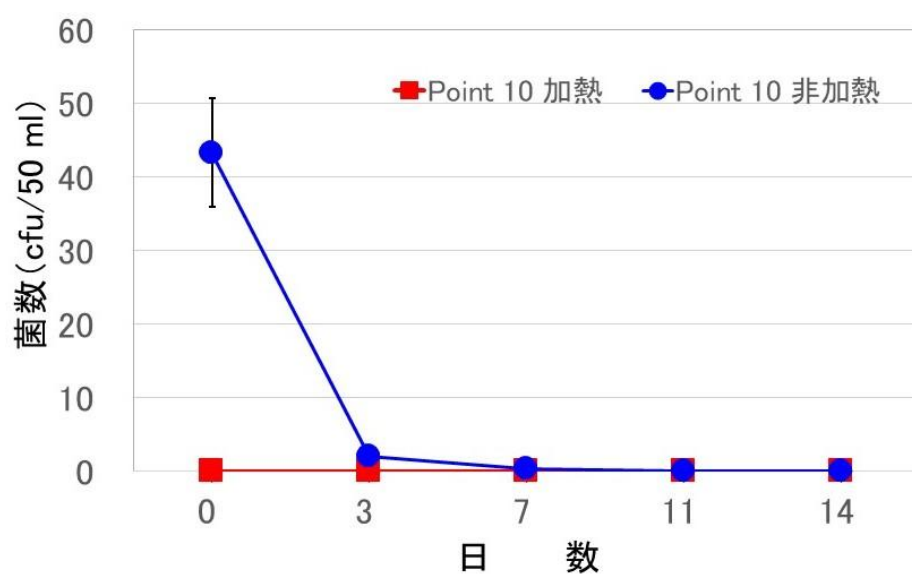
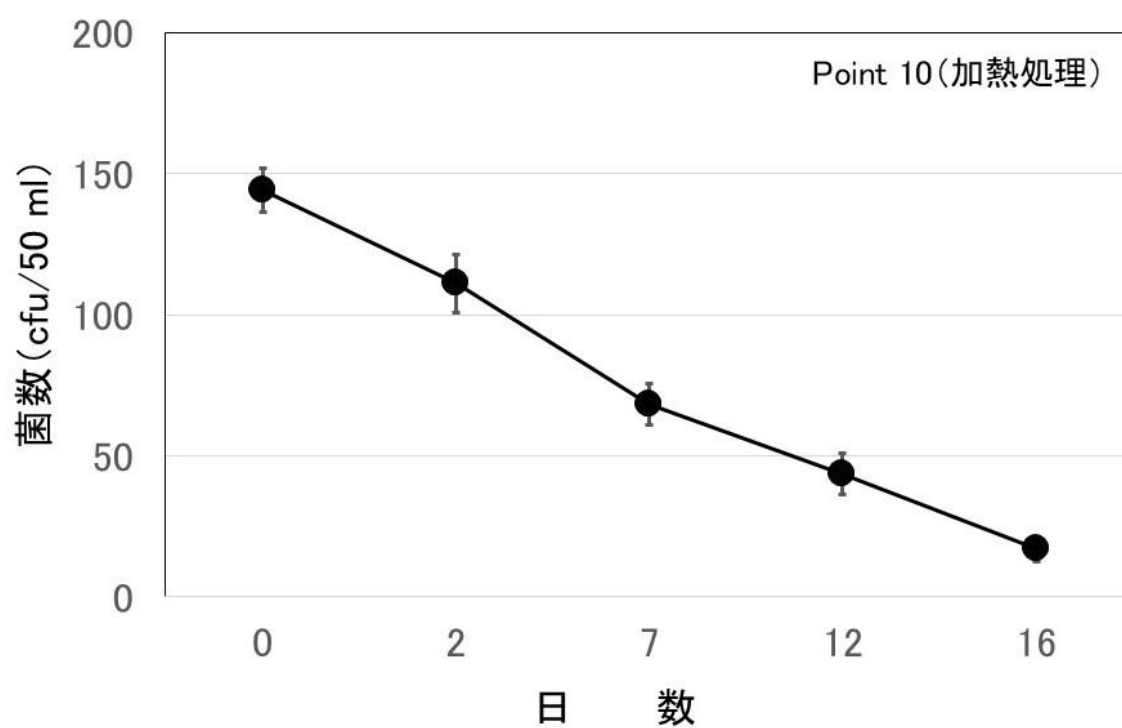


図7 *cpe* 陽性菌（栄養型）の河川水中で生存性



採水ポイント10の河川水をろ過滅菌して *cpe* 陽性菌（栄養型）を懸濁。
20℃、好気条件下で静置した菌液 50ml 中の生菌数をフィルター法で測定。

図8 *cpe* 陽性菌（芽胞）の河川水中での生存性



採水ポイント 10 の河川水をろ過滅菌して *cpe* 陽性菌（芽胞）を懸濁。
20℃、好気条件下で静置した菌液 50ml 中の生菌数をフィルター法で測定。

表 2 K 水系河口のカキからの *cpe* 陽性菌の分離

採材 ポイント	採材日	加熱				非加熱			
		増菌液 PCR		コロニー PCR		増菌液 PCR		コロニー PCR	
		<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>
2	2024/10/13	+	—	15	0	ND	ND	ND	ND
2	2024/10/13	+	—	14	0	ND	ND	ND	ND
2	2024/11/5	+	—	6	0	+	+	40	0
2	2024/12/7	+	+	47	2	+	+	47	0

表 3 K 水系河口の川砂からの *cpe* 陽性菌の分離

採材 ポイント	採材日	加熱		
		菌数 (cfu/g)	<i>cpe</i>	<i>cpe/cpa</i> (%)
2	2024/11/5	46	0	0
2	2024/11/5	37	5/13	38.5
2	2024/12/7	331	2/30	6.7

令和 6 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、令和 6 年の発生件数は増加傾向が認められた。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、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染実態調査を実施し、これまでに、令和 4 年度は、カレー粉・香辛料 37 検体、乾物 13 検体等計 115 検体について調査し、カレー粉・香辛料 1 検体(0.9%)よりエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を分離した。令和 5 年度は、ウエルシュ菌分離率の高かった乾物を中心に 100 検体について調査を行い、煮干し 1 検体、そば粉 1 検体よりエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を分離した。今年度は昨年度に引き続き、ウエルシュ菌の分離率の高かった乾物を中心に 97 検体について調査を行った。その結果、煮干し 28 検体中 5 検体(17.9%)からウエルシュ菌が、そのうち 1 検体からエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離された。また、素干しエビ 16 検体中 7 検体(43.8%)からウエルシュ菌が、そのうち 1 検体から、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離された。今年度も煮干しからエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離されたことから、煮干しを原材料としただしを、大量に調理し、放置した場合にはエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が増殖する可能性が考えられた。

また、今年度は、分担研究 3 年目であり、これまでのウエルシュ菌汚染実態調査の結果をもとに、川崎市保健所職員を対象に「ウエルシュ菌食中毒に対する予防対策について」の研修会を開催した。

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

荒木 靖也 川崎市健康安全研究所

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。こういった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。我が国では HACCP に沿った管理が義務付けられてから、3 年近く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。また、令和 6 年の発生件数は例年に比べ増加傾向が認められる（図 1）。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主たる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、ウエルシュ菌食中毒では、原因食品が特定できない事例が多く、さらに、各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。これらのことから、ウエルシュ菌食中毒の発生を防止できないことの一因として、保健所による飲食店等への指導に役立つ基礎的なデータの不足が、考えられた。このため、本研究では、大規模な調査を実施し、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した。

令和 4 年度は、カレー・香辛料、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性ウエルシュ菌を検出した。令和 5 年度は、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い、煮干し 1 検体、そば粉 1 検体よりエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を分離した。今年度は昨年度に引き続き乾物について調査を行った。

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 25 g 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）。試料原液は、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性遺伝子(*cpe*)同時検出 PCR を行なった。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 に発育した赤色コロニーを前述の PCR を行い、ウエルシュ菌およびエンテロトキシン産生性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株は DSM0 1mL に懸濁し-80℃で保管した。

[3] スクリーニング PCR

ウエルシュ菌性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。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 に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 を加え、総量 50 μ L に調整した。PCR 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. 研究結果

[1] スクリーニング検査

汚染実態調査に使用した検体は煮干し 28 検体、素干しエビ 16 検体、だしパック 21 検体、そば粉 3 検体、きくらげ 24 検体、きざみのり 1 検体、干ししいたけ 2 検体、こんぶ 2 検体の計 97 検体であった（表 1）。

増菌液から行ったスクリーニング PCR は、煮干し 28 検体 5 検体 (17.9%)、素干しエビ 16 検体中 7 検体 (43.8%)、そば粉 3 検体中 2 検体 (66.7%)、きくらげ 24 検体中 24 検体 (100%)、干ししいたけ 2 検体中 1 検体 (50.0%) からウエルシュ菌遺伝子検出された。また、煮干し 1 検体 (3.6%)、素干しエビ 1 検体 (6.3%) からエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌遺伝子が検出された（表 1）。

〔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 28 検体 5 検体 (17.9%)、素干しエビ 16 検体中 7 検体 (43.8%)、だしパック 21 検体中 1 検体 (4.8%)、そば粉 3 検体中 3 検体 (100%)、きくらげ 24 検体中 24 検体 (100%) 干しいしいたけ 2 検体中 1 検体 (50.0%) からウエルシュ菌が分離された。また、煮干し 1 検体、素干しエビ 1 検体からエンテロトキシン産性ウエルシュ菌が分離された (表 1)。エンテロトキシン産性ウエルシュ菌が産生された煮干しは国内産、素干しエビはベトナム産によるものであった。

D. 考察

煮干し 28 検体 5 検体 (17.9%)、素干しエビ 16 検体中 7 検体 (43.8%)、だしパック 21 検体中 1 検体 (4.8%)、そば粉 3 検体中 3 検体 (100%) きくらげ 24 検体中 24 検体 (100%) 干しいたけ 2 検体中 1 検体 (50.0%) からウエルシュ菌が分離された。このうち、煮干し 1 検体、素干しエビ 1 検体からエンテロトキシン産性ウエルシュ菌が分離された。また、令和 5

年度も煮干し 37 検体中 15 検体 (40.5%) 検体からウエルシュ菌が分離され、そのうち、煮干し 1 検体からエンテロトキシン産性ウエルシュ菌が分離されている。

このことから、エンテロトキシン産性ウエルシュ菌に汚染された煮干しを味噌汁や煮物等のだしに使用し、大量調理を行う場合に、不適切な温度管理がされると、同菌の食中毒の原因になりうることが示唆された。

今回のような汚染実態調査を実施することで、原因不明食中毒の原因食材を推察することが可能となり、飲食店等へ効果的な指導を行うための基礎的なデータとなることが示唆された。

また、初年度実施した増菌液からのスクリーニング PCR は、検出率が 70.0 % とやや感度の落ちるものであったがであったが、昨年度から使用したマルチプレックス PCR 試薬 (KOD One PCR Master Mix) では、令和 5 年度においては、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 PCR が陽性となった。今年度においてもウエルシュ菌が陽性となった 41 検体中 39 検体 (95.1%) でスクリーニング PCR 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、PCR 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. 行政関係者向けの研修会開催

令和7年3月4日（火）川崎市保健
所職員を対象に「食中度予防対策
（ウエルシュ菌を中心に）」について
研修会を zoom 形式にて開催した。公
衆衛生に携わる職員が多数参加した。

F. 健康危険情報

なし

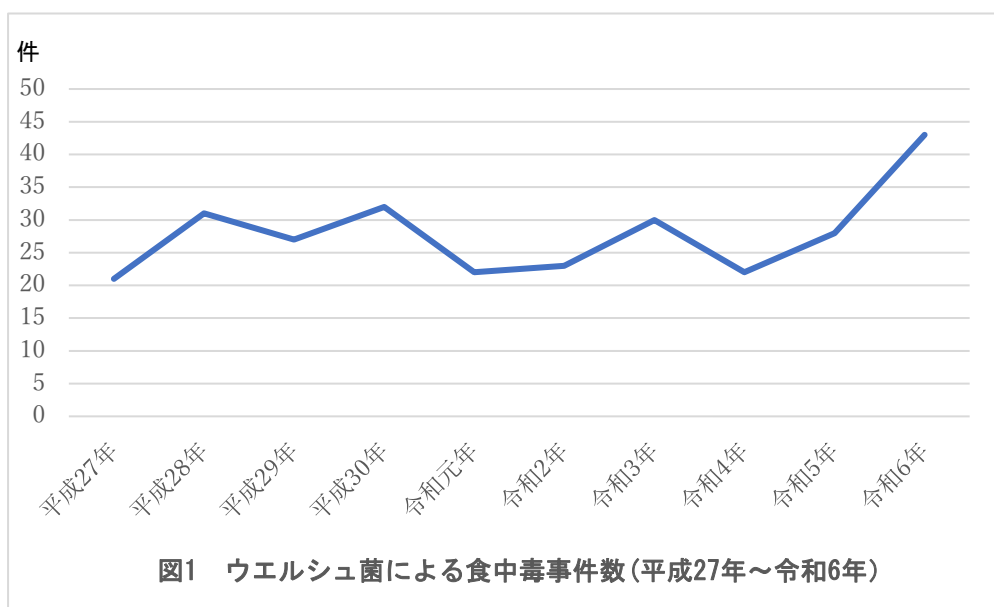
G. 研究発表

第45回日本食品微生物学会学術総会
「ヒト・食品・環境から分離された *cpe*
陽性ウエルシュ菌の分子疫学解析」
（淀谷雄亮）

第36回地方衛生研究所全国協議会関東
甲信静細菌部会
「市販食品におけるウエルシュ菌の汚染
状況について」（小嶋由香）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



ウェルシュ菌検査手順

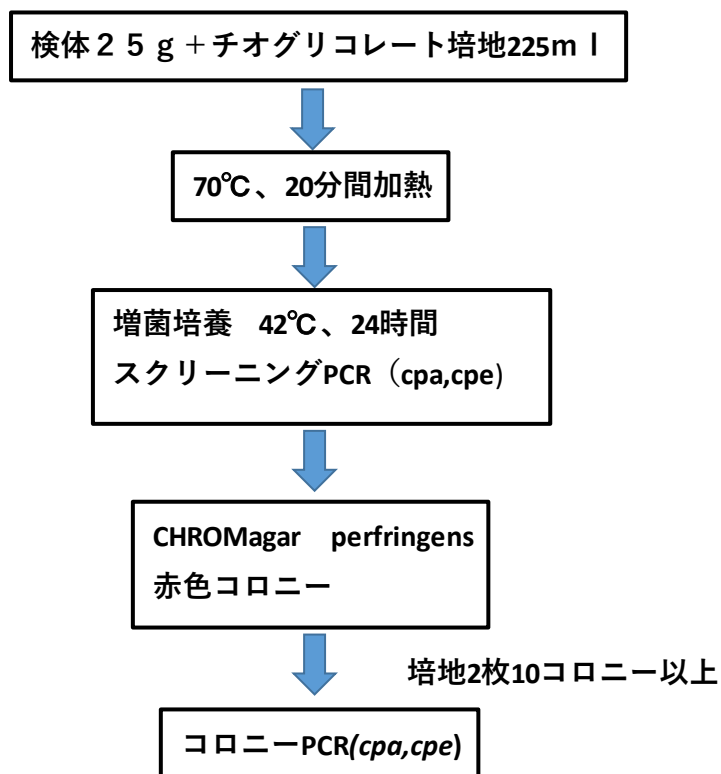


図 2

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

表1		令和6年度ウエルシュ菌汚染実態調査結果		
食品区別	検体数	増菌PCR陽性数(%)	ウエルシュ菌陽性数 (%)	エンテロトキシン産生性 ウエルシュ菌陽性数 (%)
煮干し	28	5(17.9)	5(17.9)	1(3.6)
素干しエビ	16	7(43.8)	7(43.8)	1(6.3)
だしパック	21	0	1(4.8)	0
そば粉	3	2(66.7)	3(100)	0
きくらげ	24	24(100)	24(100)	0
きざみのり	1	0	0	0
干しいたけ	2	1(50.0)	1(50.0)	0
こんぶ	2	0	0	0
	97	39(40.2)	41(42.3)	2(2.1)

令和6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

食中毒菌として最も重要な1つであるウエルシュ菌について、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品や、個々の食中毒事例のエンテロトキシン産生株の由来について、明らかにすることが多い。そこで本研究では、国産食品でのウエルシュ菌汚染実態調査および分離菌株の分子疫学解析を実施し、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食中毒原因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、これまでの2年間の調査結果から、エンテロトキシン産生株の分布傾向が強いと考えられた畑土壌として25市販品の国産野菜に付着する土を回収し、菌株分離実験に供試した。また下水処理場放流水の河川流入域の表層水およびその下流の河川河口部の底泥を含む水をそれぞれ1カ所から採取し、菌株分離実験に供試した。さらに、本研究班でのこれまでの分離株および過去に分離された食中毒患者由来等のcpe陽性ウエルシュ菌75株の全ゲノムシーケンスを行い、cgMLSTに基づく分子疫学解析を行った。その結果、野菜付着土壌、下水処理場放流水の河川流入域表層水および河川河口部の底部の水いずれからもcpe陽性の生菌が検出された。またcgMLSTの結果、いくつかの食品や環境由来菌株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であり、分子疫学的に関連がある可能性が考えられた。従来、主なウエルシュ菌食中毒の原因と目されてきた肉類でなく、農作物や海産物を中心とした食品や、畑土壌や水系の環境食品や環境がウエルシュ菌食中毒原因菌の汚染源や由来となる可能性があり、大規模な菌の収集と分子疫学解析を今後も継続して検討する必要性が示された。

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、世界各国でウエルシュ菌食中毒を引き起こしている。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ことから、最も重要な食中毒菌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、現状ではエンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPE) 産生株のみが食中毒の原因となると考えられている。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・毒素 (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPA = ホスホリパーゼ C 遺伝子) があるが、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て、ウエルシュ菌株の分離・収集、および菌株を用いた分子疫学解析を実施している。昨年度までの検討では、エンテロトキシン産生遺伝子 (*cpe*) 陽性株は、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。一方で、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。今年度は、これらの結果を受け、エンテロトキシン産生株の分布傾向が強いと考えられた畑土壌として市販国産野菜に付着する土、下水処理場放流水の河川流入域の表層水、およびその下流の河川河口部の底泥からの *cpe* 陽性菌株分離を試みた。さらに、本研究班で今年度までに分離した菌株、および過去に分離された食中毒患者由来株等を収集して、全ゲノムシーケンスを行い、cgMLST に基づく分子疫学解析を行った。これらの成果を報告する。

B. 研究方法

[1] 菌株分離実験の供試検体

土付きジャガイモ 14、土付きニンジン 10、土付きエダマメ 1 (いずれも国産) の計 25 検体を小売店から購入し、付着する土を回収した。また、川崎市内の多摩川の下水処理場放流水の河川流入域の表層水

およびその下流の河口部の底泥をそれぞれ 1 カ所から採取し、菌株分離に供試した。

〔2〕 土壌からの菌分離

野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（日本製薬株式会社）を加え、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。

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* および *cpa* の保有状況を確認した。増菌培養液 100 μ L 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 μ L 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 μ L 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'-GCTAATGTTAC TGCCGTTGA-3')、multi-*cpa*-R(5'-CCTCTGATACATCGTGTAAAG-3')、multi-*cpe*-F(5'-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3')、multi-*cpe*-R(5'-GGACCAGCAGTT GTAGATA-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 5~30 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。

〔3〕水からの菌分離

神奈川県川崎市内下水処理場放流部の多摩川の表層水、およびこれより下流の神奈川県川崎市内多摩川河口部の底泥を含む底付近水の各 1 カ所から、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」（平成 19 年 3 月 30 日）（健水発第 0330006 号）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 B-〔2〕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。

〔4〕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 75 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、ゲノムライブラリを作製し、i-Seq または MiSeq（illumina 株式会社）を用いて全ゲノムシーケンスを行った。塩基配列解析ソフトウェア CLC Genomics Workbench（Qiagen 株式会社）を用いて出力されたリードのアセンブリを行い、ゲノム DNA 塩基配列のテキストデータを得た。この配列データを微生物の遺伝子解析プラットフォーム PubMLST を使用してデータベースと照合し、各菌株の 1431 遺伝子座それぞれにおいて

allele のタイプを番号化して割り当てた Multilocus sequence typing (MLST)を判定して、allele プロファイルを得た。これに基づき、CLC Genomics Workbench を用いて、Minimum Spanning Tree を作製し、菌株間の系統関係を推定した。

C. 研究結果

[1] 野菜付着土壌からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

野菜付着土壌からの *cpe*陽性ウエルシュ菌検出結果を表2に示した。平板で塗抹培養しない増菌培養液から直接抽出したDNAをテンプレートにしたPCRでは、ジャガイモ土では14検体中2検体(14.3%)、ニンジン土では10検体中2検体(20.0%)から *cpe* が検出された。エダマメ土1検体からは非検出であった。増菌培養液を平板に塗抹培養して分離されたコロニーでは、ニンジン土では10検体中1検体(10.0%)から *cpe* が検出された一方で、増菌培養液からの直接抽出物では *cpe* が陽性となった検体を含むジャガイモ土およびエダマメ土では全検体由来の全コロニーで *cpe* は陰性であった。ニンジン土の *cpe* 陽性検体において、CCP平板に生育したコロニー10個中3(30.0%)で *cpe* が検出された。昨年度調査結果における野菜付着土

壌での CCP 平板上の *cpe* 陽性コロニーの出現頻度と比較すると、ゴボウ土で20個中15(75.0%)、ジャガイモ土で20個中1(5.0%)、長ネギ土 *cpe* 陽性検体では32個中1(3.1%)であり、検体間での頻度の変動幅は大きく、野菜畑土壌中の *cpe* 陽性株の出現頻度は様々な要因に影響を受ける可能性が示された。

[2] 河川で採取した水での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

下水処理場放流部表層水および河川底泥を含む水での *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表層水では1,042.5 cfu/L、河川底泥を含む水では656.7 cfu/Lであった。昨年度の調査に引き続き、下水処理場放流水の河川流入部付近の水では *cpe* 陽性菌数が下流よりも高い傾向があった。また多摩川河川水では、昨年度調査では表層水から *cpe* 陽性菌は検出限界以下であったが、今年度調査では検出され、川底に近い部位では *cpe* 陽性菌が分布する可能性が示唆された。

[3] 分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析

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・今年度に分離した環境お

および食品由来、および過去に分離された患者由来の *cpe* 陽性ウエルシュ菌 75 菌株（表 1）の、cgMLST プロファイルを指標として作製した Minimum Spanning Tree を図 1 に示した。その結果、患者由来株のみで構成されたクラスターは存在したが、今回解析した食中毒事例とは関連の無い市販食品由来菌株の中で、食中毒患者由来株と ST が 1431 遺伝子中 15 個以下（過去の研究より確認した、同一の集団食中毒事例内で分離された菌株間での最大の異なる ST 数）のみ異なる菌株（図 1：市販煮干し由来株 CP-2024-42、市販生カキ由来株 CP2023-0H-7）、または、食中毒患者由来株と ST が 1431 遺伝子中 17 個のみ異なる菌株（図 1：市販そば粉由来株 CP-2024-56-2）が存在し、同一の集団食中毒事例内での菌株間と同程度に、食中毒患者由来株と類似した allele のタイプを持つ海産物または乾物食品由来株が複数存在した。

D. 考察

今年度の検討結果から、昨年度に引き続き、野菜付着土壌および下水処理水放流部付近や河川において、*cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布が示された。これまで 2 年間の検討結果から、日本国内においては、肉類以外

の食品に、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であること、また河川や海洋の沿岸部、農作物畑土壌などで菌の汚染が起こっている可能性が考えられた。

分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析の結果、患者由来株のみで構成されたクラスターは存在したが、一方で、いくつかの海産物または乾物食品由来株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であると言え、分子疫学的に関連がある可能性が考えられた。一方で、これらの株の由来の偏りや傾向は、現状のデータセットと解析法では確認されなかった。これらのことから、食品の種類などによって、ウエルシュ菌食中毒のリスクの偏りや傾向を把握することはできなかったが、一方で、従来、主なウエルシュ菌食中毒の原因と目されてきた肉類でなく、農作物や海産物を中心とした食品や、畑土壌や水系の環境食品や環境が、ウエルシュ菌食中毒原因菌の汚染源や由来となる可能性が十分に残されていると言え、大規模な菌の収集と分子疫学解析を今後も継続して検討する必要性が高いことが示された。すなわち、収集した分離株のジェノタイピングや分子系統解析による疫学解析を

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できると考えられた。

E. 結論

今年度は、昨年度に引き続き、野菜付着土壌および下水処理場放流水の河川流入域付近表層水やその下流の河口部底泥を含む水から *cpe* 陽性ウエルシュ菌株を分離した。このことから、土壌や河川は、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。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分子疫学解析を行った。その結果、いくつかの食品や環境由来菌株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であることが示された。従来、主なウエルシュ菌食中毒の原因と目されてきた肉類でなく、農作物や海産物を中心とした食品や、畑土壌や水系の環境が、ウエルシュ菌食中毒原因菌の汚染源や由来となる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Sasaki S., Hara-Kudo Y., Kojima Y., Misawa N., Okabe N.: Contamination of Japanese retail foods with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* spores. J. Food Protect. 2025. 88:100429.

2. 学会発表

国内の市販食品および動物の腸内容物におけるエンテロトキシンの遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染状況. 大西貴弘、渡辺麻衣子、淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、佐々木賢美、工藤由起子、小嶋由香、三澤尚明、岡部信彦. 第45回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 09. 06) ヒト・食品・環境から分離された *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分子疫学的解析. 淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、小嶋由香、渡辺麻衣子、大西貴弘、工藤由起子、三澤尚明、岡部信彦. 第45回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 09. 06)

H. 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一覧

No.	シーケンスデータサンプル	サンプルの由来
1	CP2023-WA-1-2	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
2	CP2023-WA-2-1	下水処理場排水口付近採取の矢上川の表層水
3	CP2023-WA-3-1	多摩川の川底泥を含む水
4	CP2023-WA-3-2	多摩川の川底泥を含む水
5	CP2023-SO-13-1	市販野菜付着土（ゴボウ）
6	CP2023-SO-19-1	市販野菜付着土（ジャガイモ）
7	miyazaki2022-6-4-1	市販しじみ
8	miyazaki2022-6-7-4	市販しじみ
9	miyazaki2022-6-12-1	市販生カキ
10	miyazaki2022-6-13-10	市販あさり
11	miyazaki2022-8-14-2	市販カレーパウダー
12	miyazaki2022-26-1-1	市販しじみ
13	CP2023-OH-1	市販生カキ
14	CP2023-OH-2	市販カレーパウダー
15	CP2023-OH-3	市販チリパウダー
16	CP2023-OH-4	市販カレーパウダー
17	CP2023-OH-5	市販カレーパウダー
18	CP2023-OH-6	市販カレーパウダー
19	CP2023-OH-7	市販生カキ
20	CP2023-OH-8	市販桜エビ
21	CP2023-OH-9	市販たたみいわし
22	K-9-4	鶏分離株
23	K-12-6	鶏分離株
24	K-CLO-011	食中毒分離株
25	A-60	食中毒分離株
26	A-61	食中毒分離株
27	O-1	食中毒患者便
28	O-2	食中毒患者便
29	O-5	牛直腸スワブ
30	O-6	牛直腸スワブ
31	O-8	ヒト糞便
32	O-9	ヒト糞便
33	O-10	ヒト糞便
34	O-12	ヒト糞便
35	O-13	食中毒事例食品（干しシイタケ）
36	O-15	食中毒由来株（詳細不明）
37	O-16	ヒト糞便
38	O-17	ヒト糞便
39	O-18	ヒト糞便
40	O-20	ヒト糞便

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一覧・続

No.	シーケンスデータサンプル	サンプルの由来
41	W24008	患者便
42	W24010	患者便
43	W24016	患者便
44	W24018	患者便
45	CP2024-WA-4-1	多摩川の川底泥を含む水
46	CP2024-WA-4-5	多摩川の川底泥を含む水
47	CP2024-WA-4-8	多摩川の川底泥を含む水
48	CP2024-SO-35-1	市販野菜付着土（ニンジン）
49	CP2024-WA-5-1	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
50	CP2024-WA-5-2	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
51	CP2022-DR49-6	市販乾燥小えび
52	miyazaki2022-6-2-10	市販あさり
53	miyazaki2022-8-19-5	市販カレーパウダー
54	miyazaki2022-27-11-8	市販昆布
55	CP2023-WA-1-1	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
56	CP-2019-07	発症者
57	CP-2019-09	発症者
58	CP-2019-10	発症者
59	CP-2019-11	発症者
60	hoka35-2023	発症者
61	hoka36-2023	発症者
62	hoka37-2023	発症者
63	hoka38-2023	発症者
64	hoka39-2023	発症者
65	hoka5-2023	発症者
66	hoka7-2023	発症者
67	hoka9-2023	発症者
68	CP-2023-02	発症者
69	CP-2023-56	発症者
70	CP-2016-12	発症者
71	CP-2023-01-20	市販カレーパウダー
72	CP-2022-09	発症者
73	CP-2023-80	市販煮干し
74	CP-2024-42	市販煮干し
75	CP-2024-56-2	市販そば粉
76	CP-2024-94	市販干しえび
77	CP-2022-08	発症者

表2 野菜付着土壌での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査結果

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)		
ジャガイモ土	14	2	(14.3%)	0	(0.0%)	0/30	(0.0%)
ニンジン土	10	2	(20.0%)	1	(10.0%)	3/10	(30.0%)
エダマメ土	1	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0/30	(0.0%)
合計	25	4	(12.0%)	3	(12.0%)	—	

表3 河川水における *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)
多摩川	等々力水処理センター放流部	表層水	1,042.5
多摩川	川崎市川崎区殿町付近	川底泥を含む水	656.7

令和 6 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

二枚貝におけるウエルシュ菌の汚染調査

研究分担者 大島 千尋 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

研究要旨

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、芽胞を形成しエンテロトキシンを産生する偏性嫌気性菌であり、食中毒の原因菌として知られている。特に、原因食品が特定できない食中毒事例が多く、食中毒発生防除のための基礎データが不足していることが課題となっている。本研究では、過去の研究において高いウエルシュ菌汚染が明らかとなった二枚貝について、より詳細に汚染実態を把握するため、異なる種類および産地の二枚貝 62 検体を対象に、ウエルシュ菌およびその毒素産生株（エンテロトキシン産生ウエルシュ菌）の調査を行った。調査の結果、62 検体中 36 検体（58.1%）からウエルシュ菌が、うち 4 検体（6.5%）からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。特にムラサキイガイの検出率が高く、また、季節や貝種、産地によって汚染率に差がみられた。そのほか、PCR によるスクリーニング検査において、ヒオウギガイの一部検体で偽陰性が生じる可能性が示唆され、検査手法の見直しも課題として浮上した。本研究は、ウエルシュ菌のリスク評価および食中毒防止対策の基礎資料として有用な知見を提供するものである。

A. 研究目的

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、芽胞形成能を持つ偏性嫌気性の桿菌である。芽胞形成時にエンテロトキシンを産生し、ヒトがそのエンテロトキシンを含む食品を喫食すると、腹痛や下痢などの食中毒症状が現れる。ウエルシュ菌を原因とした食中毒は、毎年 1000 人ほ

どの患者が報告されており、減少傾向になり。多くのウエルシュ菌食中毒事例では原因となる食事を明らかにできた場合でも、原因食材を同定できない事例が多く、また食中毒の原因となるエンテロトキシン産生株の主たる汚染食品が明らかになっていないことから、飲食店等へウエルシュ菌食中毒の発生防止に向けた効果的な指導

を行うための基礎的なデータが不足している。これが、ウエルシュ菌食中毒の発生を防止できない一因になっていると考えられる。そのため、効果的な食中毒発生防止措置のためには、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌による汚染食品の種類や汚染経路を明らかにする必要があった。昨年度までの研究において、畜産物、水産物、野菜、香辛料におけるウエルシュ菌の大規模な汚染実態調査が実施された。その結果、水産物のウエルシュ菌やエンテロトキシン産生ウエルシュ菌汚染率は畜産物や野菜よりも高いことが明らかとなった。特に、貝類のエンテロトキシン産生ウエルシュ菌による汚染率が高かった。そこで本課題では、二枚貝の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汚染率を調査した。異なる産地の二枚貝を一定期間経時的に調査することで、生産方法や貝種、産地の違いによる汚染率の違いを明らかにすることを目標とした。

B. 研究方法

[1] 検体

調査は、アサリ (3 検体)、ハマグリ (4 検体)、ヒオウギガイ (7 検体)、ホタテガイ (28 検体)、ホンビノスガイ (2 検体)、マガキ (2 検体)、ムラサキイガイ (16 検体) を対象とした。ヒオウギガイ、ホタテガイ、ムラサキイガイについては、特定の生産地から継時的 (5-8 月、隔週) にサンプルを購入し調査に用いた (表 1)。これ

らの検体の多くは、生産海域から直接入手したが一部の検体については神奈川県内の市場にて購入した。検体は貝がへい死しないよう、氷冷もしくは冷蔵下で輸送し試験に供した。

[2] 検査手順

検査手順を図 1 に示す。貝を開殻し、検体の軟体部 25 g を無菌的に細断してストマッカー袋に採取した。ストマッカー袋にチオグリコレート培地 (島津ダイアグノスティクス) を 225 mL 加え、1 分間、ストマッカー処理した。その後、70℃で 20 分間加熱して急冷したものについて 42℃で 22~24 時間、増菌培養を行った。培養後、培養液 1 mL を集菌して上清を取り除き培養液のペレットを得た。得られたペレットからは、Nucleo spin tissue kit (タカラバイオ) を用いて DNA 抽出し、以降の PCR 検査に使用した。また、培養液を CHROMagar perfringens 培地 (CHROMagar) に画線し、37℃で 24 時間培養した。培養後、ウエルシュ菌であることを示すオレンジ色のコロニーを各検体から 8 個釣菌し、単離した。単離したコロニーは、チオグリコレート培地で培養し、培養液からペレットを調整した。ペレットからは、Nucleo spin tissue kit を用いて DNA を抽出し、以降の PCR 検査に供した。

[3] エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の PCR 検査

培養液および分離したコロニーから抽出した DNA を対象に、ウエルシュ菌の α 毒素をコードする CPA 遺伝子 (*cpa*) およびエンテロトキシンをコードする CPE 遺伝子 (*cpe*) の有無を確認した。

cpa および *cpe* を検出する 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)。この PCR で対象とした遺伝子とそのプライマーを表 2 に示す。PCR は、200 μ L の反応チューブで行った。反応液は、Takara Ex Taq Buffer 12.5 μ L、それぞれのプライマー (表 2) を 0.2 μ M ずつ、DNA テンプレート 5 μ L から成り、PCR グレードの精製水で最終容量を 25 μ L に調整した。反応は、95℃、2 分の後、95℃、30 秒、55℃、30 秒、72℃、30 秒のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 72℃、5 分の反応を行った。反応終了後、2%のアガロースゲルを用いた電気泳動に *cpa* および *cpe* の増幅産物と一緒に PCR 産物 5 μ L を供し、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。

C. 研究結果

[1] 貝種別および産地別のウエルシュ菌検出結果

本研究では、*cpa* が検出された場合にその分離株をウエルシュ菌、*cpe* が検出された場合にその分離株をエンテロトキシン産生ウエルシュ菌と判断した。同様に、増菌培養液のペレットから *cpa* が検出された場合にその検体をウエルシュ菌陽性、*cpe* が検出された場合にその検体をエンテロトキシン産生ウエルシュ菌陽性と判断した。分離株もしくは増菌培養液からそれぞれの遺伝子が検出された場合、その検体をウエルシュ菌もしくはエンテロトキシン産生ウエルシュ菌陽性と判定した。

調査に使用した検体のうち、アサリ 2 検体 (66.7%)、ハマグリ 1 検体 (25.0%)、ホンビノスガイ 1 検体 (50.0%)、マガキ 1 検体 (50.0%)、ヒオウギガイ 5 検体 (71.4%)、ムラサキイガイ 14 検体 (87.5%)、ホタテガイ 12 検体 (42.9%) からウエルシュ菌が検出された。また、ヒオウギガイ 1 検体 (14.3%)、ムラサキイガイ 2 検体 (12.5%)、ホタテガイ 1 検体 (3.6%) からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された (表 3)。

[2] ホタテガイおよびムラサキ

イガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

複数の産地から一定数以上の検体を採取したホタテガイおよびムラサキイガイにについて、産地別に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検出結果を比較した（表 4）。各地のホタテガイのウエルシュ菌陽性率は産地 B が 12.5%(1/8)、産地 D が 62.5%(5/8)、産地 I が 20.0%(1/5)、産地 K が 71.4%(5/7) であった。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は産地 B, D, I では検出されなかったが、産地 K では 7 検体中 1 検体から検出され、陽性率は 14.3% であった。同様にムラサキイガイの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検出結果を産地別に比較すると、産地 D および産地 K の陽性率は 87.5%(7/8) であった。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は産地 D のムラサキイガイからは検出されなかったが産地 K のムラサキイガイからは 25.0%(2/8) の陽性率で検出された。

[3] 時期別および産地別のウエルシュ菌検出結果

一定の期間継続して調査を実施したホタテガイ、ムラサキイガイ、ヒオウギガイについて月別の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検出結果を比較した（表 5）。ホタテガイについては出荷前に畜養されている産地 I のデータを除いてまとめた。ホタテガイのウエルシュ菌検出結果は、5 月が 80.0%(4/5)、6 月が 66.7%(4/6)、7 月が 42.9%(3/7)、8 月が 0%(0/5) であった。ホタテガイのエンテロトキシン産生ウエルシュ菌は、5 月に 5 検体中 1 検体（20.0%）から検出され、他の月には検出されなかった。ムラサキイガイのウエルシュ菌検出結果は、5 月が 66.7%(2/3)、6 月が 80.0%(4/5)、7 月が 100%(5/5)、8 月が 100%(3/3) であった。ムラサキイガイのエンテロトキシン産生ウエルシュ菌は、6, 7 月に 5 検体中 1 検体（20.0%）から検出され、他の月には検出されなかった。ヒオウギガイは 5 月下旬から 8 月上旬まで 2 週毎に実施した。その結果、ウエルシュ菌は、5 月下旬から 7 月下旬まで検出され、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は 6 月上旬の検体から検出された。

[4] 同じ海域で生産されたホタテガイとムラサキイガイのウエルシュ菌検出結果

本課題では、産地 D および産地 K のサンプルにおいて、同一の海域で生産されたホタテガイとムラサ

キイガイを調査したため、それらの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検出結果を比較した（表 6）。産地 D の検体は 5 月上旬から 8 月下旬にかけて 8 回調査を実施し、4 回は両貝から、1 回はホタテガイのみから、3 回はムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出された。ムラサキイガイのみからの検出は 7 月下旬から 8 月下旬に集中していた。産地 D の検体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。産地 K の検体は 5 月上旬から 8 月下旬にかけて 7 回調査を実施し、5 回は両貝から、2 回はムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出された。ホタテガイからのみ検出されることはなかった。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は、ホタテガイのみから検出されたことが 1 回、ムラサキイガイのみから検出されたことが 2 回あった。

〔5〕増菌培養液の PCR 結果とウエルシュ菌分離結果の比較

チオグリコレート培地を増菌培養した後の集菌ペレットについ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の検出 PCR を行い、分離株の調査結果と比較した（表 7）。ウエルシュ菌の検出

結果について、増菌培養液と分離株の PCR 結果が異なったケースは全部で 10 件あり、そのうち 1 件は増菌培養液が陽性であるのにウエルシュ菌が分離されなかった。これはムラサキイガイの調査であった。残りの 9 件はウエルシュ菌が分離されているものの増菌培養液の PCR 結果はウエルシュ菌陰性を示した。9 件の検体の内訳は、ヒオウギガイ 5 件、ホタテガイ 3 件、ムラサキイガイ 1 件であった。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の検出結果について、増菌培養液と分離株の PCR 結果が異なったケースは全部で 2 件あり、それらは増菌培養液の PCR 結果はエンテロトキシン産生ウエルシュ菌陽性を示したものの、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を分離できなかった。2 件は、ホタテガイおよびムラサキイガイが 1 件ずつであった。

D. 考察

今年度調査を行った 62 検体の二枚貝のうち、36 検体からウエルシュ菌が検出され、多くの二枚貝がウエルシュ菌に汚染されていることが明らかになった。また、ヒオウギガイ、ムラサキイガイ、ホタテガイからエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出されており、これらの貝

種がエンテロトキシン産生ウエルシュ菌に汚染されることがあると明らかになった。よって、調理方法によってはこれらの貝種がウエルシュ菌食中毒の原因となる可能性が示された。

ホタテガイのウエルシュ菌検出結果を産地別に比較すると、産地 B、I の検出率が低く、産地 D および K の検出率が高かった。貝類が生息する海水中にウエルシュ菌が存在すると、貝が海水を取り込む際にもともに体内に取り込まれると考えられるが、本研究の結果、産地により汚染率が異なっていることから、貝の生産海域によりウエルシュ菌汚染度合いに差があり、それが貝のウエルシュ菌検出率の違いにつながった可能性が考えられた。また、産地 I のホタテガイは出荷前に畜養されていることから、その間にウエルシュ菌が貝内から排出されている可能性も考えられた。ムラサキイガイについては、ホタテガイでもウエルシュ菌汚染率の高かった産地 D および産地 K の検体を調査対象としたことから、ウエルシュ菌汚染率が高くなったと考えられた。

5 月から 8 月の調査期間中、一定数以上の検体を集められた貝種については、月別にウエルシュ菌の検出率を比較した。その結果、ホタテ

ガイにおいては 5 月の検出率をピークに徐々に減少し、8 月になるとウエルシュ菌が検出されなくなった。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌についても 5 月の検体からのみ検出されていた。このことから、ホタテガイにおいては一度ウエルシュ菌を取り込んだ場合でも成長もしくは季節変化によりウエルシュ菌が排出される可能性が考えられた。ムラサキイガイにおいては、5 月のウエルシュ菌検出率が最も低く、徐々に増加して 7、8 月はすべての検体からウエルシュ菌が検出された。このことから、ムラサキイガイはホタテガイとは異なり、一度貝内に取り込まれたウエルシュ菌が排出されにくく、蓄積されていた可能性が考えられた。ヒオウギガイについては、5 月下旬から 7 月下旬にかけて検出されていたものの 7 月末および 8 月下旬には検出されなかったことから、ホタテガイのように季節変化や成長過程により汚染されたウエルシュ菌が排出された可能性が考えられた。

本課題では産地 D および産地 K のホタテガイ、ムラサキイガイについて同一の海域で生産されたものを検体とした。そのため、同一日に同一海域から採取した 2 種についてウエルシュ菌検出結果を比較した。

産地 D においては、7 月上旬までは両貝からウエルシュ菌が検出されることが多く、7 月下旬以降はムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出されることが多かった。産地 K においても、調査期間の後半にムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出されるケースが散見されたことから、同一の海域で生産された貝であっても貝種によってウエルシュ菌汚染度には差があることが明らかとなった。また、夏に向けてホタテガイからはウエルシュ菌が排出され、ムラサキイガイのウエルシュ菌はそのまま保持される傾向にあることが示唆された。

チオグリコレート培地の増菌液を *cpa* および *cpe* の PCR に供し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スクリーニングを行った結果と、各分離株の検出状況を比較した。その結果、特にヒオウギガイを対象とした試験において、増菌培養液のスクリーニング PCR 検査が陰性を示すのにウエルシュ菌が分離されるケースが多かった。この結果から、ヒオウギガイにおいては PCR スクリーニングの結果が偽陰性になることが多く、ヒオウギガイの成分が PCR を阻害している可能性が示唆された。そのため、本課題で用いた方法でスクリ

ーニング検査を行う場合には、DNA 抽出や PCR に使用する試薬、PCR 条件について検討する必要があると言えた。

E. 結論

本年度から、二枚貝のみを対象とした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調査を実施した。調査に用いたすべての貝種からウエルシュ菌が、一部の貝種からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出されていることから、二枚貝はこれらに汚染される可能性があることが明らかになった。月別、産地別の調査結果から、時期や貝種、産地によってウエルシュ菌汚染率が異なることも明らかとなり、本研究の成果が今後の二枚貝のウエルシュ菌汚染防除を検討する際に重要な知見になりうると考えられた。

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 調査した検体の詳細

サンプル	検体数	生産地域
アサリ	3	A, F
ハマグリ	4	C, G
ヒオウギガイ	7*	E
ホタテガイ	28*	B, D, I, K
ホンビノスガイ	2	G
マガキ	2	D, J
ムラサキイガイ	16*	D, K

*特定の産地から継続して購入

表2 *cpa/cpe* 検出プライマー

標的遺伝子	配列 (5' →3')	増幅産物サイズ (bp)
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324
	CCTCTGATACATCGTGTAAG	
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG	233
	GGACCAGCAGTTGTAGATA	

表3 貝種別ウエルシュ菌検出結果

サンプル	ウエルシュ菌陽性（ <i>cpa</i> 陽性）		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性（ <i>cpe</i> 陽性）	
	陽性率（%）	陽性率（検体数）	陽性率（%）	陽性率（検体数）
アサリ	66.7	2/3	0	0/3
ハマグリ	25.0	1/4	0	0/4
ホンビノスガイ	50.0	1/2	0	0/2
マガキ	50.0	1/2	0	0/2
ヒオウギガイ	71.4	5/7	14.3	1/7
ムラサキイガイ	87.5	14/16	12.5	2/16
ホタテガイ	42.9	12/28	3.6	1/28

表4 ホタテガイおよびムラサキイガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

a. ホタテガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

産地	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率 (%)	陽性率 (検体数)	陽性率 (%)	陽性率 (検体数)
B	12.5	1/8	0	0/8
D	62.5	5/8	0	0/8
I	20.0	1/5	0	0/5
K	71.4	5/7	14.3	1/7

b. ムラサキイガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

産地	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率 (%)	陽性率 (検体数)	陽性率 (%)	陽性率 (検体数)
D	87.5	7/8	0	0/8
K	87.5	7/8	25.0	2/8

表5 ホタテガイ、ムラサキガイおよびヒオウギガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

a. ホタテガイの時期別ウエルシュ菌検出結果(産地 B, D, K のまとめ)

採取月	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率(検体数)	陽性率(%)	陽性率(検体数)	陽性率(%)
5 月	4/5	80.0	1/5	20.0
6 月	4/6	66.7	0/6	0
7 月	3/7	42.9	0/7	0
8 月	0/5	0	0/5	0

b. ムラサキガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

採取月	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率(検体数)	陽性率(%)	陽性率(検体数)	陽性率(%)
5 月	2/3	66.7	0/3	0
6 月	4/5	80.0	1/5	20.0
7 月	5/5	100	1/5	20.0
8 月	3/3	100	0/3	0

c. ヒオウギガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

時期	ウエルシュ菌陽性	エンテロトキシン産生
	(<i>cpa</i> 陽性)	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)
5 月下旬	+	ND
6 月上旬	+	+
6 月下旬	+	ND
7 月上旬	+	ND
7 月下旬	+	ND
7 月末	ND	ND
8 月下旬	ND	ND

表6 同じ海域で生産されたホタテガイ、ムラサキイガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

産地	採取月	ウエルシュ菌陽性（ <i>cpa</i> 陽性）	エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性（ <i>cpe</i> 陽性）
D	5 月上旬	○	－
D	5 月下旬	ホタテガイのみ	－
D	6 月上旬	○	－
D	6 月下旬	○	－
D	7 月上旬	○	－
D	7 月下旬	ムラサキイガイのみ	－
D	8 月上旬	ムラサキイガイのみ	－
D	8 月下旬	ムラサキイガイのみ	－
K	5 月下旬	○	ホタテガイのみ
K	6 月上旬	○	ムラサキイガイのみ
K	6 月下旬	○	－
K	7 月上旬	ムラサキイガイのみ	ムラサキイガイのみ
K	7 月上旬	○	－
K	7 月下旬	○	－
K	8 月下旬	ムラサキイガイのみ	－

○：両貝から検出

－：両貝とも非検出

表7 増菌培養液の PCR 結果と分離菌 PCR 結果の比較

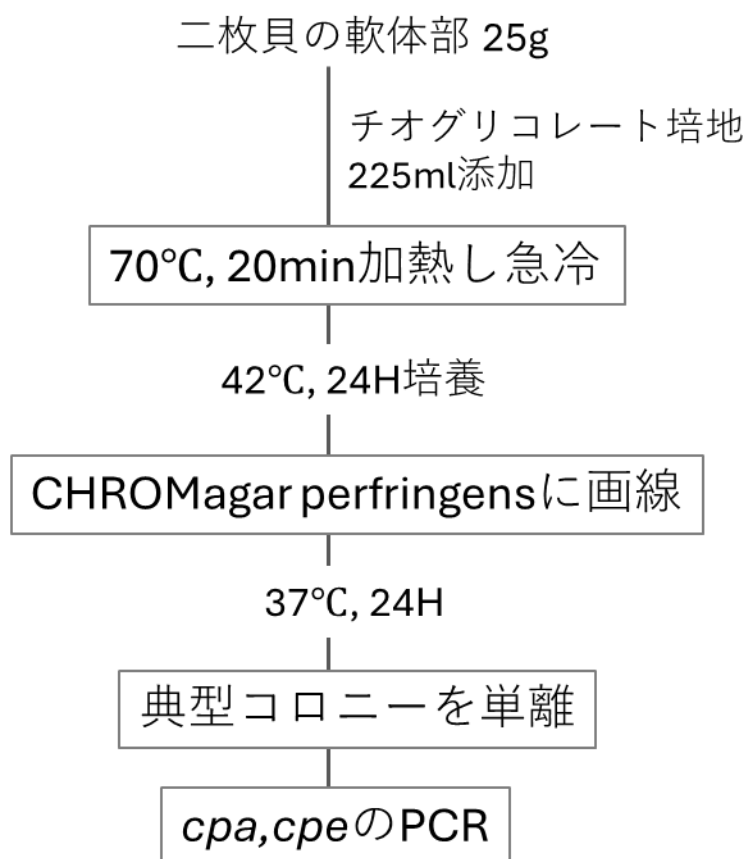
a. ウエルシュ菌（*cpa* 陽性）結果

	増菌培養液陽性	増菌培養液陰性
分離株陽性	27 検体	9 検体
分離株陰性	1 検体	26 検体

b. エンテロトキシンウエルシュ菌（*cpe* 陽性）結果

	増菌培養液陽性	増菌培養液陰性
分離株陽性	2 検体	0 検体
分離株陰性	2 検体	59 検体

図1 ウエルシュ菌検査手順



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
Ohnishi, T. <i>et al.</i>	Contamination of Japanese retail foods with enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> spores.	Journal of Food Protection	88	100429	2025

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6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・部長
(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7年5月7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6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6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6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7年5月9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 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中山 一郎

次の職員の令和6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 令和6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）
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） 水産技術研究所 環境・応用部門
- 水産物応用開発部安全管理グループ・研究員
- （氏名・フリガナ） 太島千尋・オオシマチヒロ

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。