

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発
及び汚染実態把握のための研究

研究代表者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品におけるウエルシュ菌の汚染調査及び迅速検査法の開発

研究分担者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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

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

A. 研究目的

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

ウエルシュ菌食中毒の原因食品が明らかになっていないことがあげられる。そこで、食品におけるウエルシュ菌の汚染状況を調査した。今回は、食中毒の直接の原因となるエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）保有ウエルシュ菌芽胞に特に着目して調査した。検体としては、これまでウエルシュ菌食中毒の発生原因として考えられてきた食肉や根菜をはじめ、カレー粉・香辛料や水産食品、乾物などを対象とした。わが国

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

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

B. 研究方法

[1] 汚染実態調査

(1) 検体

今回の調査では、牛肉、豚肉、鶏肉、根菜、魚、エビ、貝類、海藻、カレー粉、香辛料、乾物を検査対象とした。食肉は、国産、外国産を問わないが、産地(国)がわかるものを購入した。また、冷凍品(解凍品)はなるべく避けるようにした。根菜は泥を落としたり、洗浄したりせず、そのまま使用した。魚、エビはボイルしたものは検査対象外とし、魚の切り身は皮ごと、エ

ビは頭や殻をつけたまま使用した。貝類は、むき身、殻付き、生食用、加熱用のいずれも使用したが、ボイルしたものは検査対象外とした。乾燥品は戻し率を10倍と考え、2.5g使用した。

(2) 検査手順

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

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

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

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

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

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

（3）マルチプレックス PCR

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

[2] 迅速検査法

免疫磁気ビーズの作製にあたっては、入手し易い試薬を用いること優先した。磁気ビーズとしては DynabeadsTM Protein A

for Immunoprecipitation (Thermo Fisher Scientific, #DB10001)、ウエルシュ菌に対する抗体として *C. perfringens* Rabbit IgG polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific, #PA1-85310) を使用した。検査手順を図 3 に示す。菌液 1 mL にウエルシュ菌抗体 $10\ \mu\text{g}$ を加え、チューブを 1 時間回転させた。その後、あらかじめ PBS で洗浄しておいた磁気ビーズを $10\ \mu\text{L}$ 加え、1 時間回転させた。その後、チューブをマグネチックスタンドに置き、PBS で磁気ビーズを洗浄した。最終的に磁気ビーズは CHROMagar に塗抹、もしくは磁気ビーズからアルカリ熱抽出法を用いて DNA を抽出し、汚染実態調査で用いたマルチプレックス PCR 法を用いて、*cpa*、*cpe* の検出を行った。

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

C. 研究結果

[1] 汚染実態調査

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

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

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

cpe 陽性 (15.0%) となった。*cpa* 陽性となったのは、主にカキとアサリで、カキ 3 検体が *cpe* 陽性となった。

海藻は 1 検体調査したが、*cpa*、*cpe* ともに陰性であつた。

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

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

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

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

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

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

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

[2] 迅速検査法

チオグリコレート培地に既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたものを検体として使用し、今回作製した磁気ビーズの感度を検討した。その結果、磁気ビーズを塗沫した場合、磁気ビーズから DNA を抽出し PCR で検出した場合のいずれでも、

検体中に 10^2 cfu/mL 以上のウエルシュ菌が存在していれば、検出することができた。次に、カレーの 10 倍乳剤を作製し、同様の実験を行ったが感度は変わらず、菌濃度が 10^2 cfu/mL 以上の場合、検出することができた。

D. 考察

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

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

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

今回作製した免疫磁気ビーズ法は 10^2 cfu/mL 以上の菌濃度でウエルシュ菌を検出することが出来た。多くのウエルシュ菌食中毒事例では、食品中の菌濃度が 10^4 cfu/mL 以上になると考えられているため、食中毒の原因究明に使用する場合、十分な検出感度を有していると考えられた。ビーズから DNA を抽出し

PCR を行なった場合は当日中に、ビーズを選択培地に塗抹した場合は翌日にウエルシュ菌の存在を確認することができる。いずれにせよ、増菌培養を行わなくても済むため、増菌培養にかかる 1 日を短縮することができる。今後は、検出感度をさらに向上させ、食中毒の原因究明だけでなく、汚染調査にも使用できるようにしたい。カレー以外の他の食品中でも使用できるか検討する必要があると思われる。また、今回使用した菌株以外でも同様の結果が得られるかどうか検討する必要があると思われる。

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

cpe保有ウエルシュ菌検査手順

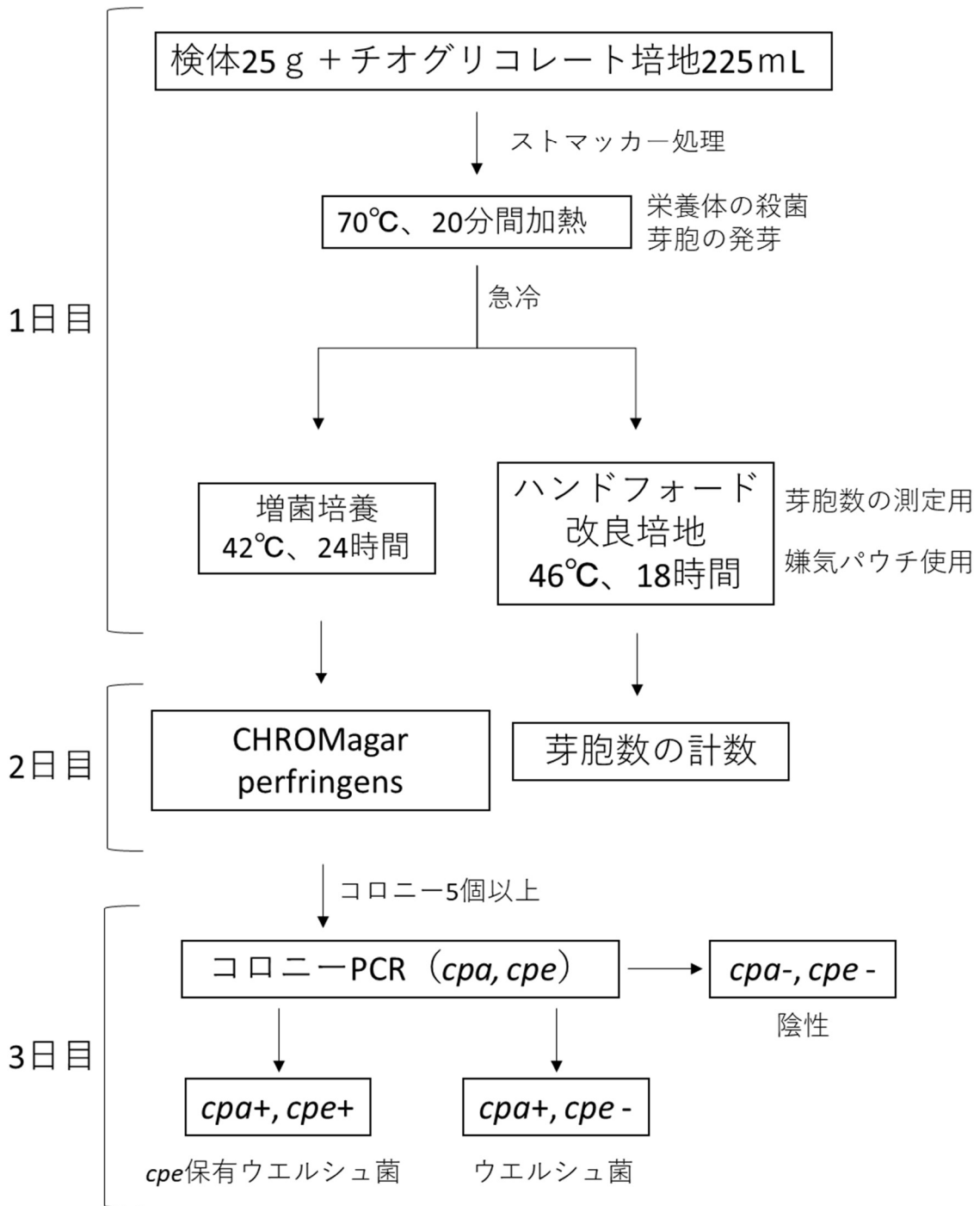


図1 汚染実態調査検査手順

- プライマー

multi-cpa-F: GCTAATGTTACTGCCGTTGA

multi-cpa-R: CCTCTGATACATCGTGTAAG

multi-cpe-F: GGAGATGGTTGGATATTAGG

multi-cpe-R: GGACCAGCAGTTGTAGATA

- 反応液

*Quick Taq HS DyeMix	12.5 μ L
multi-cpa-F (50 μ M)	0.1 μ L
multi-cpa-R (50 μ M)	0.1 μ L
multi-cpe-F (50 μ M)	0.1 μ L
multi-cpe-R (50 μ M)	0.1 μ L
Template	2.0 μ L
H ₂ O	10.0 μ L

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

- プログラム

94°C	2 min
94°C	30 sec
55°C	1 min
68°C	1 min × 30
68°C	5 min

- 判定

324 bp → *cpa* (アルファ毒素遺伝子) 陽性

233 bp → *cpe* (エンテロトキシン遺伝子) 陽性

図2 マルチプレックス PCR の条件

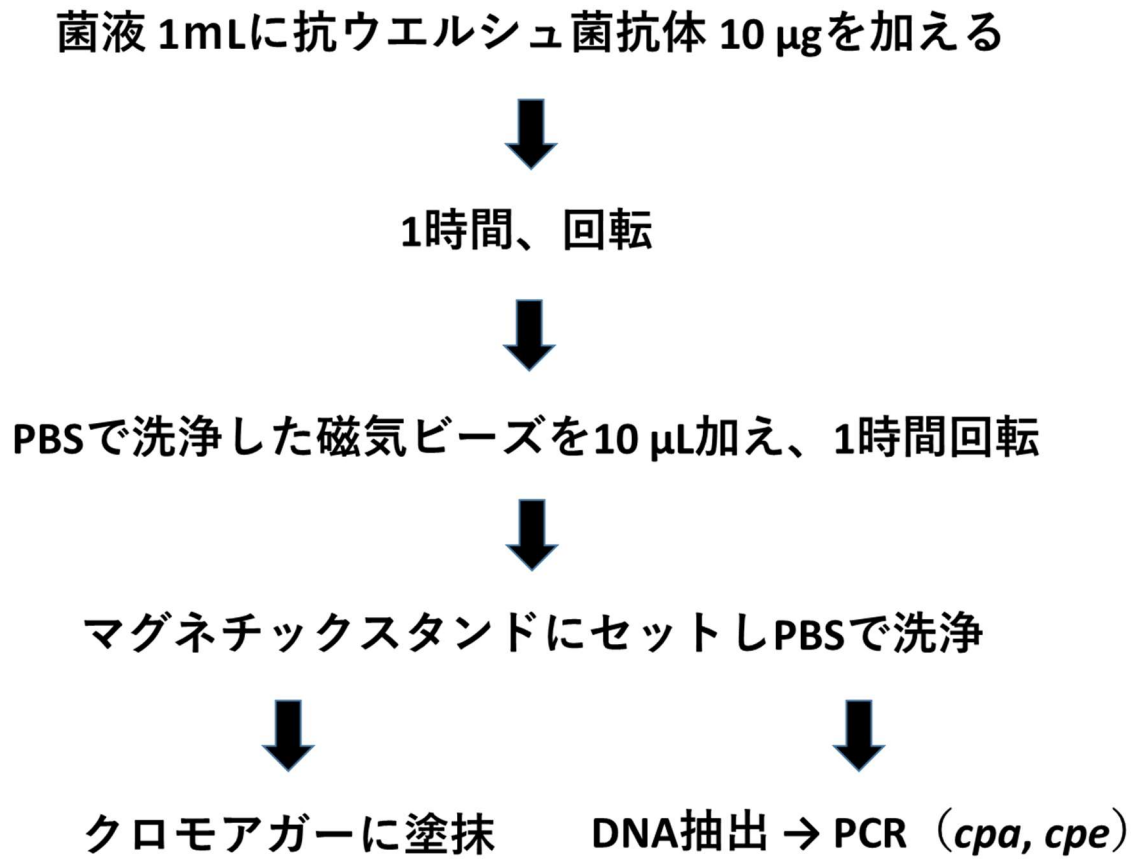


図3 迅速検査法手順

表 1 増菌培養後の PCR の結果

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

表2 コロニーPCRの結果

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

表3 汚染実態調査の最終結果

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