

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

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

研究代表者 大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究分担者 岡部信彦 川崎市健康安全研究所

研究協力者 小嶋由香 川崎市健康安全研究所

研究要旨

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

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

A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒はグラム陽性桿菌 *Clostridium perfringens* に  
よって引き起こされる食中毒であ

る。ウエルシュ菌は芽胞を形成する  
ため、調理時の加熱によって発芽し、  
嫌気状態になった食品中で急速に  
増殖する。このため、調理後、食品  
を急速に冷却することがウエルシ

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

発生を防止できないことの一因になっていると考えられる。本研究ではこれらの課題に対応するために、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染実態を明らかにする。

## B. 研究方法

### [1] 検体

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

### [2] 検査手順

検体 25 g を無菌的にストマッカー一袋に採取し、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°C で 20 分間加熱後急冷した（試料原液）。試料原液 10 mL とハンドフォード改良培地 15 mL を 2 枚の嫌気パウチにそれぞれ加え軽く混ぜた後ヒートシールし 46°C で 18 時間培養し、嫌気性菌の定量を行った。

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

行なった。また、増菌培養液を2枚の CHROM agar *C. perfringens*

に塗抹し、37℃、24時間培養した。CHROM agar *C. perfringens*

に発育した赤色コロニーを前述と同様の方法でPCRを行い、ウエルシュ菌およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の同定を行った。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌はDSMO 1mlに懸濁し、80℃で保管した。

### [3]マルチプレックスPCR

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

有無を調べた。

## C. 研究結果

### [1]調査食品

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

### [2]嫌気性菌同定

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

### [3]スクリーニングPCR

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

### [4]菌分離

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

ウエルシュ菌検出状況を表1に示す。115全検体中、ウエルシュ菌

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

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

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

#### D. 考察

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

生ウエルシユ菌はカレー粉 1 検体 (2.7%) から検出された。

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

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

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

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

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 ウエルシユ菌検出状況

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

表 2 食品分類別検出状況

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

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 川崎市健康安全研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 岡部信彦

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

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 川崎市健康安全研究所 所長

(氏名・フリガナ) 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		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)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )