

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発

及び汚染実態把握のための研究

研究代表者 大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究

研究分担者 三澤 尚明 国立大学法人宮崎大学

研究要旨

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

A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒はグラム陽性偏性嫌気性桿菌 *Clostridium perfringens* によって引き起こされる食中毒である。ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、本菌の芽胞に汚染された食品は、調理時の加熱によ

って発芽し、加熱によって嫌気状態になった食品中で急速に増殖する。このため、調理後、食品を急速に冷却することがウエルシュ菌の増殖を抑制し、食中毒を予防するのに重要である。こういったウエルシュ菌の特性から、調理後の加熱が緩慢になりが

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

また、ウエルシュ菌の高感度迅速検査法を開発し、食中毒発生時の原因食材の同定を容易にする。以上の研究結果を総合し、生産から調理段階までを考慮したウエルシュ菌食中毒予防法を提案する。

B. 研究方法

[1] 検体

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

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

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

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

[2] 検査手順

検体 25g を無菌的にストマッカー一袋に採取した。チオグリコール酸培地Ⅱ(ニッスイ)を225mL加え、1分間、ストマッカー処理し、70℃、20分間加熱後、急冷したものを試料原液とした。試料原液10mLと滅菌後55℃に保温しておいたハンドフォード改良培地(関東化学)15mLを2枚の嫌気パウチにそれぞれ加え、軽く混ぜた後に空気を追い出し、ヒートシールした後、46℃、18時間培養した。培養後、2枚の嫌気パウチ内

の黒色コロニー数の平均を推定ウエルシユ菌数として記録した。残りの試料原液は、ストマッカーバックから空気を追い出し、ヒートシールをし、42℃、24時間、増菌培養した。培養した増菌培養液を2枚のCHROMagar™ *C. perfringens* base(以下、CHROMagar)(関東化学)に塗抹し、37℃、24時間、嫌気培養した。

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

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

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

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

C. 研究結果

[1] 推定ウエルシュ菌数

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

[2] 増菌培養液から検出されたウエルシュ菌とエンテロトキシン遺伝子保有状況

増菌培養液から抽出した DNA を鋳型としてウエルシュ菌の α 毒素遺伝子 (*cpa*) とエンテロトキシン遺伝子 (*cpe*) をマルチプレックス PCR 法で検出した結果、*cpa*

が検出されたのは 196 検体中 59 検体 (30.1%) で、*cpe* が検出されたのは 14 検体 (7.1%) だった (表 1)。*cpe* が検出された検体の内訳は、カレー粉・香辛料 (3 検体)、だし・乾物 (1 検体)、貝類 (7 検体)、海藻 (1 検体)、鶏肉 (2 検体) で、泥付き野菜は *cpa* のみが検出された。*cpe* が検出された検体の産地は、カレー粉・香辛料がいずれもインド、貝類の 2 検体が中国と韓国で、それ以外の陽性検体は全て国産だった。

[3] 分離培養されたウエルシュ菌のエンテロトキシン遺伝子保有状況

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

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

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

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

注¹ クロモアーガーから 5~20 個の集落を釣菌。

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

厚生労働大臣 殿

機関名 宮崎大学
 所属研究機関長 職名 学長
 氏名 鮫島 浩

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

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 ウエルシュ菌食中毒の制御のための検査法の開発及び汚染実態把握のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンター
 (氏名・フリガナ) 三澤 尚明・ミサワ ナオアキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<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:)