

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。今年度はこれらの内、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も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 × 35
68°C	3 min

- 判定 (2%アガロースゲルで電気泳動)

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

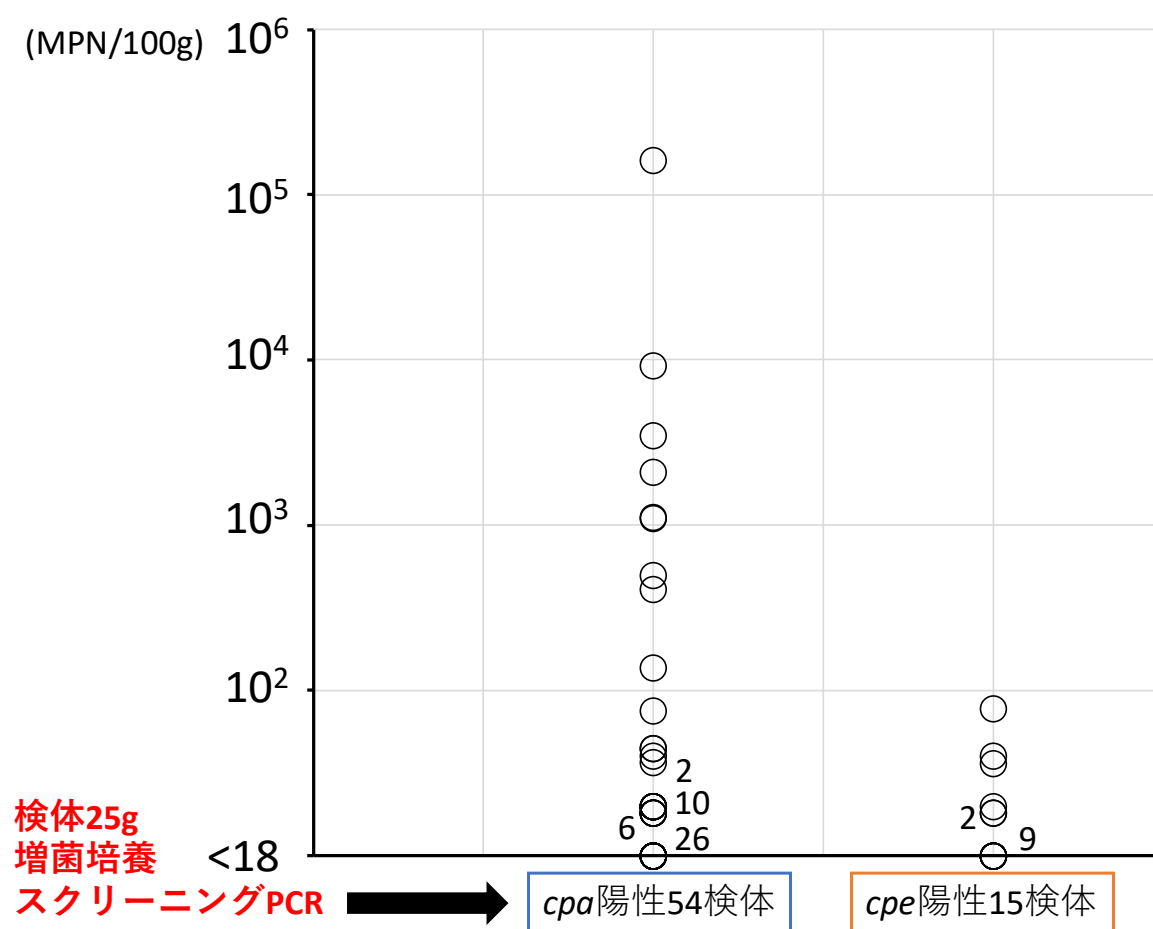


図3 カレー粉・香辛料・海産乾物を汚染しているウエルシュ菌数

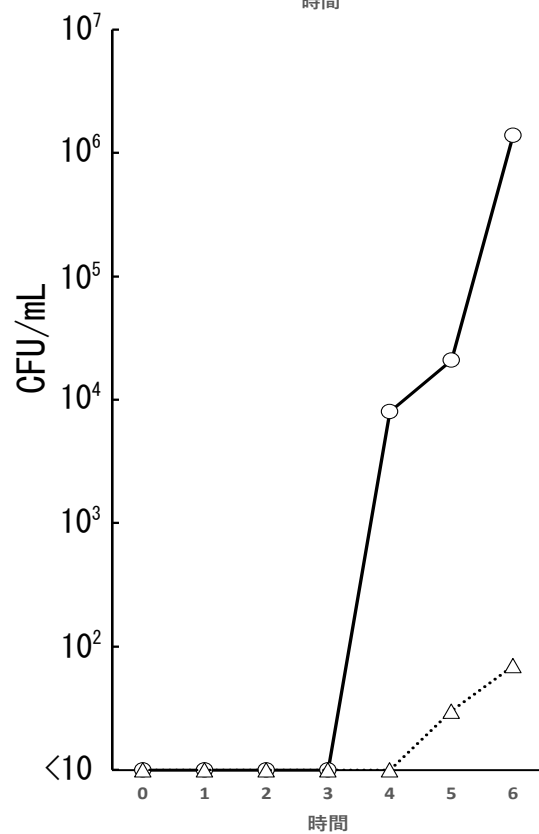
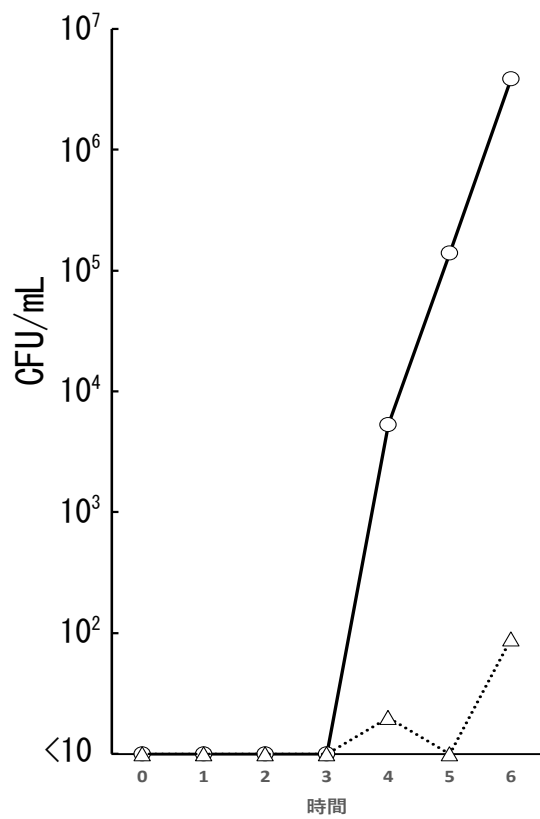
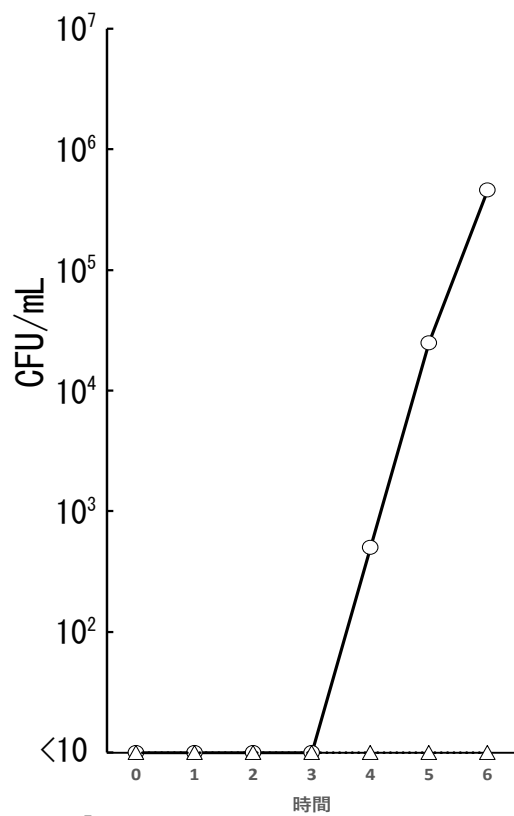
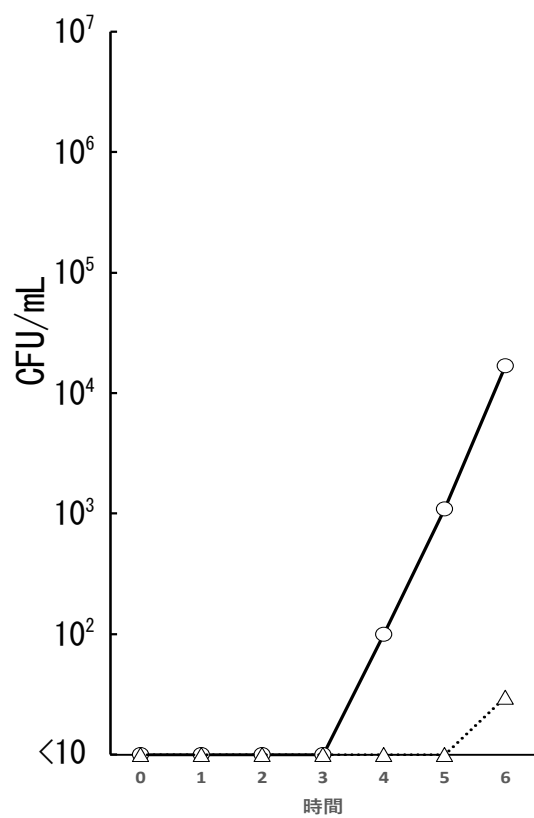


図4 カレー粉由来4株のカレー中での増殖

○：牛肉添加カレー △：牛肉非添加カレー

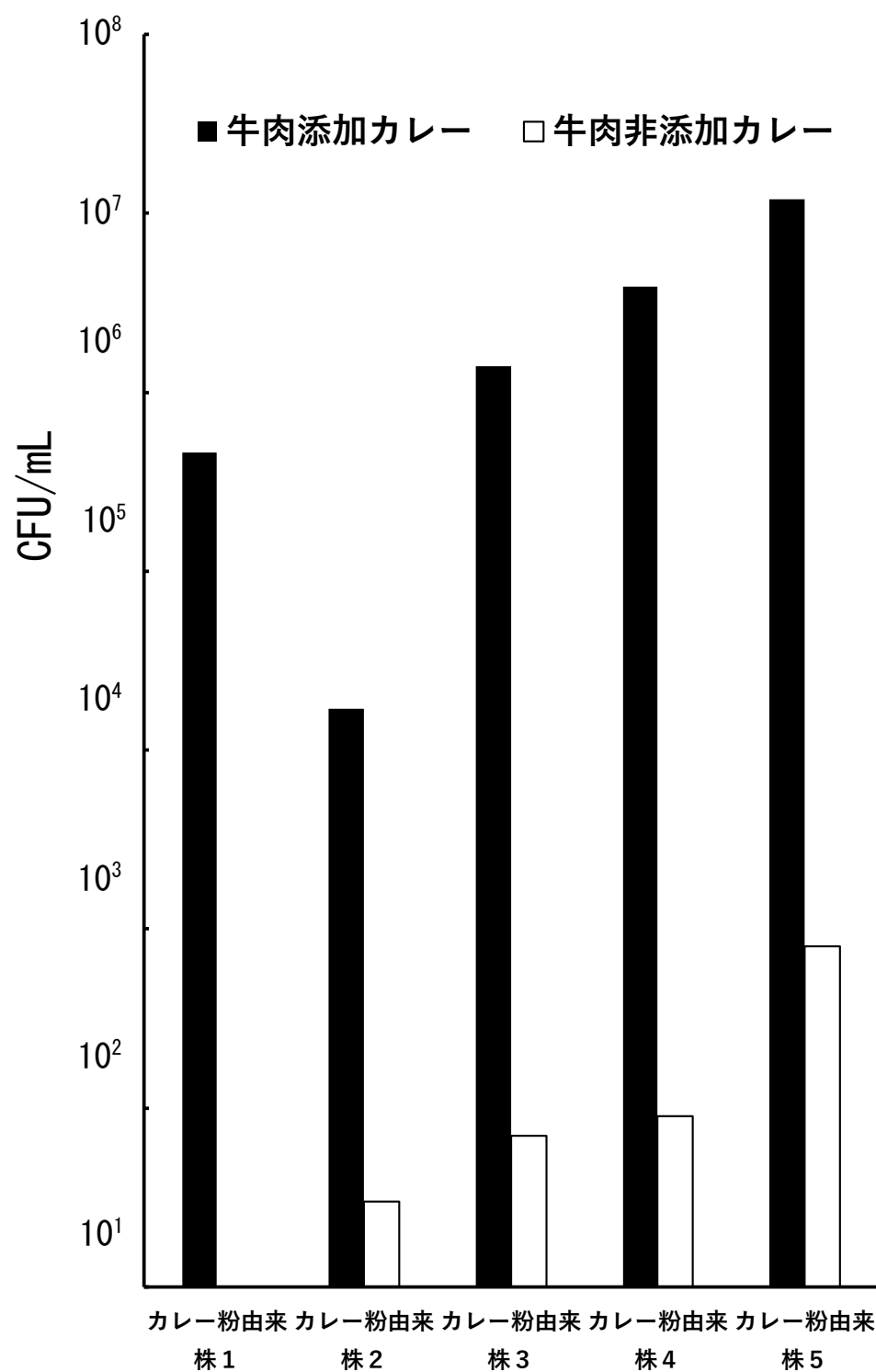


図5 培養6時間後のカレー中での菌数

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

