

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）

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

家畜・家禽の腸内容物からのウエルシュ菌の検出

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、本菌による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。昨年度実施した大規模な食品の汚染実態調査を実施した結果、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離・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。一方、本食中毒の感染源として重要視されていた牛肉、豚肉および鶏肉からはアルファ毒素産生性ウエルシュ菌は検出されたが、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌は全く検出されなかった。これらの結果を踏まえ、本年度は牛、豚および鶏におけるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の保有状況を調査するため、腸内容物からの分離・検出を実施した。

牛（213 検体）、豚（210 検体）、鶏（164 検体）の腸内容物 587 検体を調査したところ、増菌培養前の加熱処理の有無により検出率は異なっていたが、*cpa* 遺伝子は 38.5～83.0%の陽性率を示した。一方、全ての検体の増菌培養液または分離株からエンテロトキシンをコードする *cpe* 遺伝子は検出されなかった。以上の結果から、牛、豚、鶏の腸内容物中にはエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の存在は認められず、従来、ウエルシュ菌の汚染源と想定されていた畜肉の重要性は高くないことが示唆された。

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。このようなウ

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。我が国では本菌による食中毒は依然発生が続いており、発生件数は少ないものの、1 件当たりの患者数が多い傾向が認められる。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。

昨年度実施した大規模な食品の汚染実態調査の結果、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離・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。一方、本食中毒の感染源として重要視されていた牛肉、豚肉および鶏肉からは α 毒素産生性ウエルシュ菌は検出されたが、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌は全く検出されなかった。これらの結果を踏まえ、本年度は牛、豚および鶏におけるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の保有状況を調査するため、腸内容物からの分離・検出を試みた。

B. 研究方法

[1] 検体

令和5年5月から令和6年3月にかけて、宮崎県内の5か所の食肉処理場から健康畜として搬入された牛と豚の大腸内容物と3か所の食鳥処理場からブロイラーの盲腸内容物を毎月採取した。供試した検体数は587で、その内訳と月別の検体数は表1および表2に示す。

[2] 検査手順

腸内容物中のウエルシュ菌の定性検査に加え、一部の検体について、定量検査を実施した。チオグリコール酸培地Ⅱ(ニッスイ)1mlを2本の1.5mlマイクロチューブに入れ、これに検体0.1gを加え、ボルテックスミキサーで均一の懸濁液とした。1本の懸濁液は、芽胞のみを選択するため、70℃、20分間加熱後急冷した。非加熱および加熱処理した腸内容物懸濁液を42℃、24時間増菌培養し、各増菌培養液をCHROMagar™ *C. perfringens* base(以下、CHROMagar)(関東化学)に白金耳(10 μ l/loop)で画線塗抹し、37℃、24時間、嫌気培養した。CHROM agar上の赤色のウエルシュ菌が疑われるコロニーを5個釣菌し、純培養後に生化学性状試験(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。さらに、後述するアルカリ熱抽出法で分離株からDNAを抽出し、 α 毒素遺伝子(*cpa*)および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。また、各増菌液からの *cpa* および *cpe* を検出するため、増菌培養液 100 μ l を遠心し、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出して、マルチプレックス PCR 法を行った。検体量が少ない場合には、非加熱、加熱処理のうち、加熱処理を優先して実施した。

腸内容物中のウエルシュ菌数を測定するため、一部の検体については、定量培養を行った。チオグリコール酸培地Ⅱ（ニッスイ）0.9ml を 2 本の 1.5ml マイクロチューブに入れ、これに検体 0.1 g を加え、ボルテックスミキサーで 10 倍希釈懸濁液を作製した。1 本の懸濁液は、芽胞のみを選択するため、70°C、20 分間加熱後急冷した。非加熱および加熱処理した腸内容物懸濁液の 10 倍段階希釈列を作製し、各希釈液の 100 μ l を CHROMagar™ *C. perfringens* base（以下、CHROMagar）（関東化学）に塗抹し、37°C、24 時間、嫌気培養した。最も希釈率の高い懸濁液を接種した培地に認められたウエルシュ菌が疑われる赤色コロニーを 5 個釣菌し、マルチプレックス PCR 法で *cpa* および *cpe* を検出し、腸内容物 1g 当たりのウエルシュ菌数を算出した。

cpa および *cpe* を検出する PCR 法は、増菌培養液またはコロニー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（324 bp）およびエンテロトキシン遺伝子（233 bp）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' -CCTCTGATACATCGTGAAG-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。

ウエルシュ菌と同定された菌株は、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。

検査成績は、非加熱、加熱処理した懸濁液を用いて、培養法または PCR 法のいずれかで陽性を示した検体を陽性として記録した。

C. 研究結果

[1] ウエルシュ菌の分離・検出

増菌培養液に接種した腸内容物の懸濁液を加熱処理後に遺伝子抽出または増菌培養後に選択培地から釣菌したコロニーの DNA を用いて *cpa* および *cpe* を PCR で検出したところ、牛、豚、鶏のそれぞれ 38.5%、72.4%、78.7% の検体で *cpa* が検出されたが、*cpe* は供試した全ての検体で陰性を示した（表 3）。また、非加熱の腸内容物懸濁液では、牛、豚、鶏の 48.1%、53.1%、83.0% の検体で *cpa* が検出されたが、*cpe* は全ての検体で陰性を示した（表 3）。

[2] 腸内容物中のウエルシュ菌数

腸内容物中のウエルシュ菌の菌数を動物種ごとに測定し、菌数の分布を比較した。牛では、大腸内容物 1g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 51.1%、加熱処理で 78.7%であり、最も高い検体で 10^6 cfu/g まで保有しており、豚や鶏に比較して、保菌菌数は低かった(図 1-1)。豚では、大腸内容物 1g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 40.8%、加熱処理で 38.8%であり、最も高い検体では 10^8 cfu/g まで保有していた(図 1-2)。さらに、鶏では、大腸内容物 1g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 11.4%、加熱処理で 25.7%であり、最も高い検体で 10^6 cfu/g まで保有しており、豚よりも保菌菌数は高い傾向を示した(図 1-3)。

[2] *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌の月別推移

検査を実施した 2023 年 5 月から 2024 年 3 月まで、月ごとの *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌の分離・検出率の推移を比較したところ、ウエルシュ菌はいずれの動物種においても通年腸管内に保菌されていたが、夏季に減少する傾向が求められた(図 2-1、図 2-2、図 2-3)。

D. 考察

過去のウエルシュ菌食中毒事例をみると、原因食品として肉類、魚介類、野菜を使用した煮込み料理が多い。発生頻度の高い原因施設は、飲食店、仕出し屋、旅館、

学校などの集団給食施設で、カレー、シチュー、スープ、めんつゆなどの、食べる前日に大量に加熱調理され、大きな容器のまま室温で放冷されていた事例が多い。

昨年度に実施した市販食肉の汚染調査において、*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分離・検出されなかった。一方、カレー粉・香辛料から *cpe* 保有ウエルシュ菌が検出されたことから、カレーを原因食品とする本食中毒は、カレーに使用されるスパイス類が汚染源で、食肉の汚染源としての可能性は低いことが示唆された。

そこで、本年度の調査では、食肉処理場および食鳥処理場に健康畜として搬入された牛、豚、鶏の腸内容物中の *cpe* 保有ウエルシュ菌の検出を試みた。587 検体の腸内容物を調べたところ、*cpa* 保有ウエルシュ菌は 1 年を通じて分離・検出されたが、*cpe* 保有ウエルシュ菌は増菌培養を行っても全く分離・検出されなかった。腸内容物懸濁液を未加熱および加熱処理して検査を実施したが、いずれの処理検体からも *cpa* 保有ウエルシュ菌が分離・検出されたことから、腸管内では栄養型と芽胞の状態ウエルシュ菌が保菌されていると考えられた。

cpa 保有ウエルシュ菌は、鶏で最も高い保菌率と保菌菌数が認められ、次いで豚で高く、牛では鶏、豚と比較して低い保菌率

と保菌菌数であった。今回の結果は、前年度の市販食肉からの分離・検出成績とも一致しており、畜肉における *cpe* 保有ウエルシュ菌の汚染頻度は低いことが示唆された。

本研究課題の大西代表者らは、カレーに牛肉を加えたものと加えないものに添加したウエルシュ菌の増殖動態を調べた。ウエルシュ菌は、牛肉を添加したカレーでのみ急激に増殖することを観察した。食肉にはグルタチオン等の還元物質が豊富に含まれており、食品内が嫌気状態になりやすいことも知られている。今後は、ウエルシュ菌の増殖促進因子としての畜肉の役割についても精査する必要がある。

E. 結論

牛、豚、鶏の腸内容物中には、 α 毒素産生ウエルシュ菌は通年腸管内に保菌されたが、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の保菌は認められず、従来、ウエルシュ菌の汚染源と想定されていた畜肉の重要性は高くないことが示唆された。

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 供試検体の内訳

動物種	処理場	検体数 (定量培養検体)
牛	A	44 (10)
	B	40 (10)
	C	40 (10)
	D	49 (7)
	E	40 (10)
	小計	213 (47)
豚	A	44 (10)
	B	40 (10)
	C	40 (10)
	D	48 (11)
	E	40 (8)
	小計	212 (49)
鶏	F	55 (11)
	G	55 (11)
	H	55 (13)
	小計	165 (35)
	合計	587 (131)

表2 供試検体数の月別内訳

月	牛	豚	鶏	計
5月	13	11	15	39
6月	20	20	15	55
7月	22	24	14	60
8月	18	16	15	49
9月	20	20	15	55
10月	21	20	15	56
11月	20	21	15	56
12月	20	21	15	56
1月	21	21	15	57
2月	22	20	15	57
3月	16	16	15	47
計	213	210	164	587

表3 ウエルシュ菌分離株からの *cpa* および *cpe* 遺伝子の検出

動物	<i>cpa</i> 遺伝子				<i>cpe</i> 遺伝子			
	非加熱 (%)		加熱 (%)		非加熱 (%)		加熱 (%)	
牛	102/212*	(48.1)	82/213	(38.5)	0/212*	(0)	0/213	(0)
豚	110/207*	(53.1)	152/210	(72.4)	0/207*	(0)	0/210	(0)
鶏	132/159*	(83.0)	129/164	(78.7)	0/159*	(0)	0/164	(0)

*検体量が少なく実施不可の検体あり

図 1 - 1 牛大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌数の分布

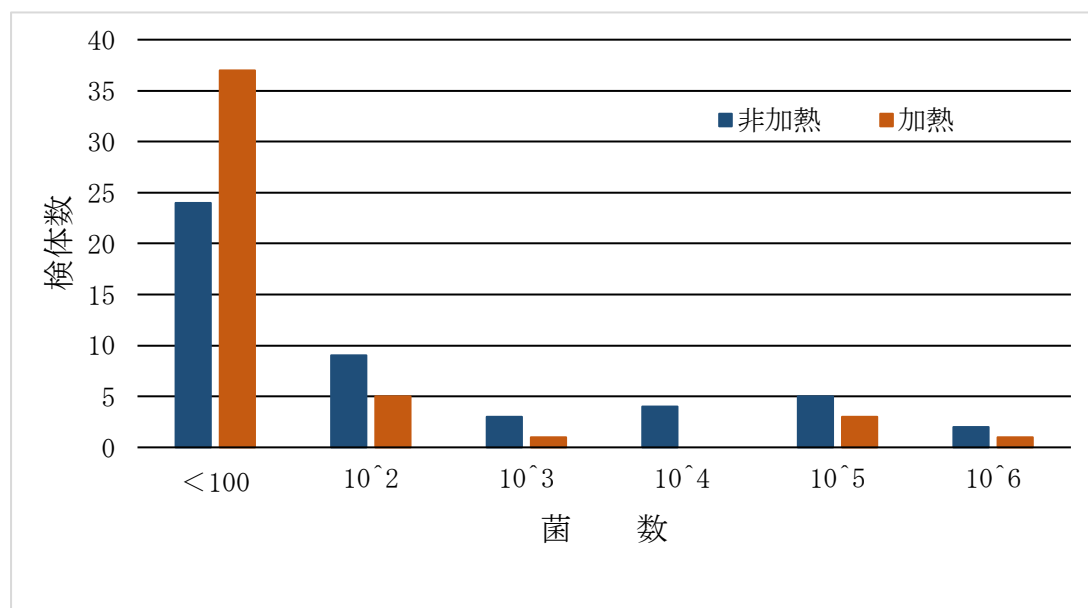


図 1 - 2 豚大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌数の分布

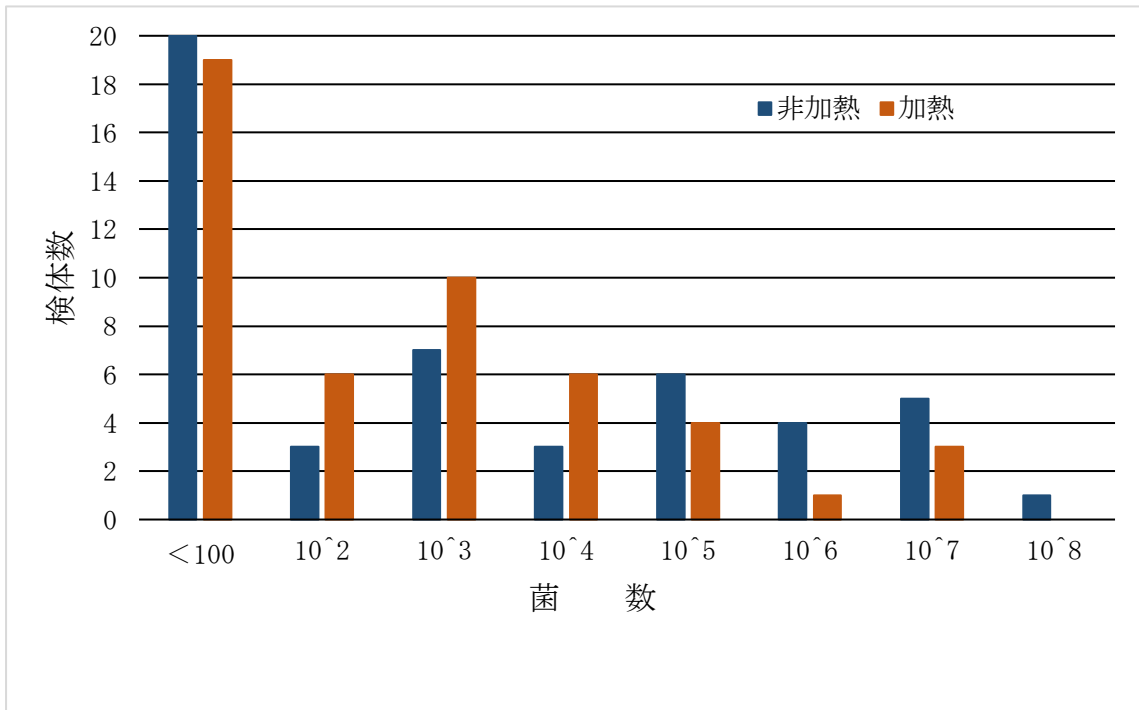


図 1 - 3 鶏盲腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌数の分布

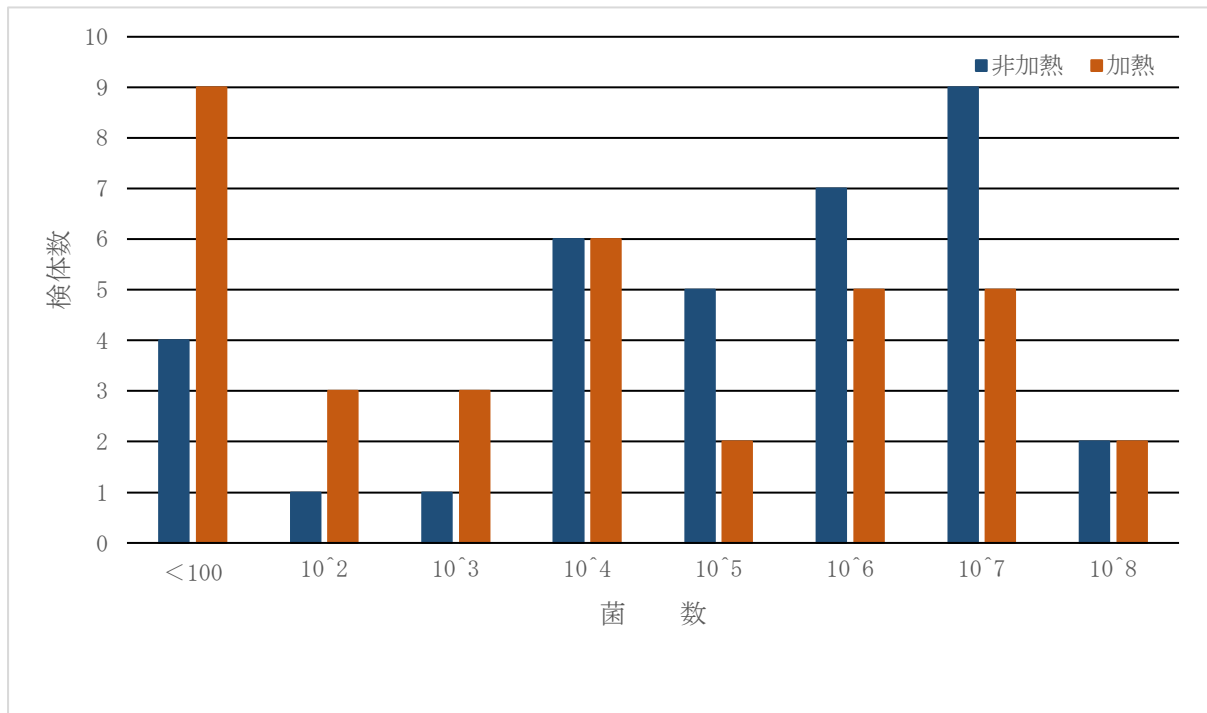


図 2-1 牛大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌検出率の月別推移

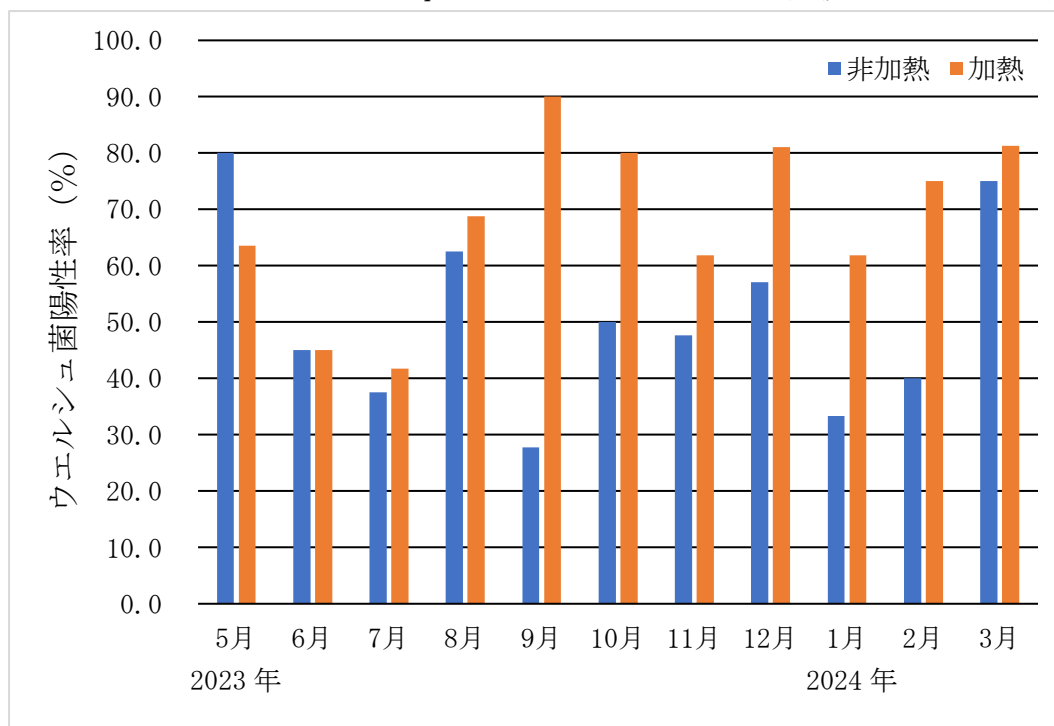


図 2 - 2 豚大腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌検出率の月別推移

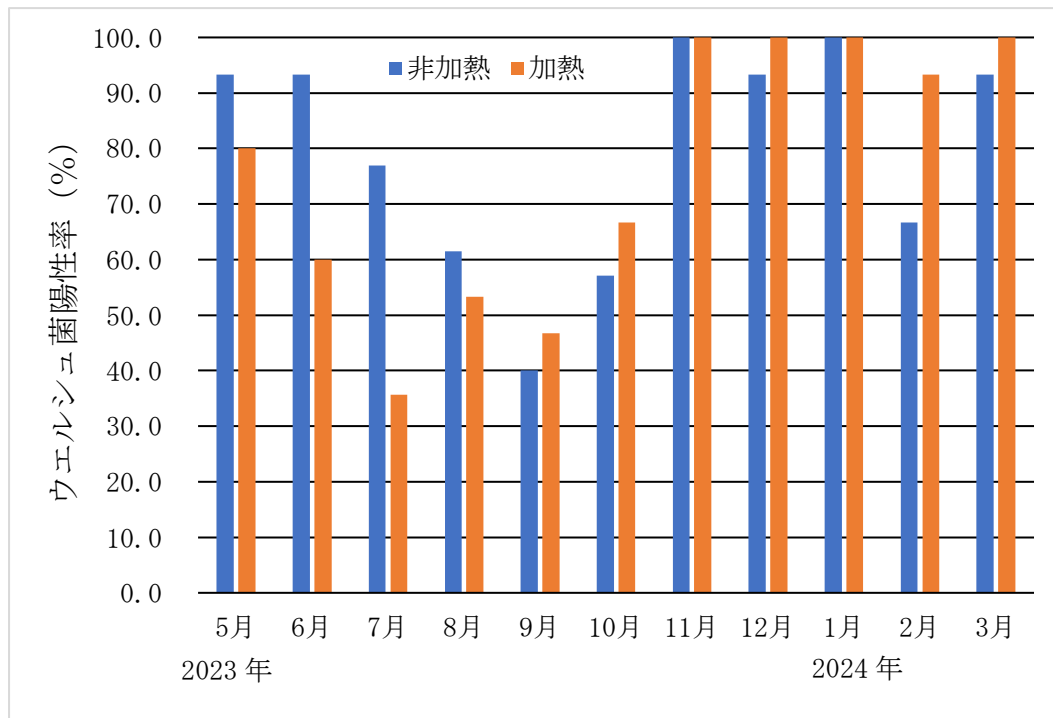


図 2-3 鶏盲腸内容物中の *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌検出率の月別推移

