

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）

分担研究報告書

食品におけるウエルシュ菌汚染実態調査

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 淀谷雄亮 西里英美莉 荒木靖也

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。このため、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、昨年度はエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の汚染実態調査を実施し、カレー粉・香辛料 等計 115 検体について調査を行い、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（0.9%）検出された。今年度は引き続き、昨年度ウエルシュ菌が多く検出された乾物を中心に 101 検体について調査を行った。煮干し 37 検体中 15 検体（40.5%）からウエルシュ菌が、1 検体（2.7%）からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。また、そば粉 1 検体からもエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。煮干しを出汁とし、大量に調理し、放置した場合にはエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の増殖が考えられる。

また、今年度発生したキッチンカーを原因施設とする食中毒事例の原因食品とされた弁当に使用された食材に着目し、一般流通品を用いた同菌の汚染実態を調査した。

用いた原材料は鶏肉、牛ハラミ、野菜等でこれまでに本研究班全体で行った汚染実態調査においてエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された食材が含まれていた。菌検索の結果、今回の食材からは、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出することはできなかったが、種々の多様な食品の汚染実態調査で得られた結果は、原因食品が不明又は個別の品目にまで特定できない食中毒事例等において、原材料汚染の可能性を考慮した飲食店等への効果的な指導にも活用できる基礎データとなりえると考えられた。

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、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においてウエルシュ菌食中毒事例が国内で発生している。我が国では HACCP に沿った衛生管理が義務付けられてから3年目が経過したが、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ウエルシュ菌の主たる汚染食品が明らかになっていないことが一因として挙げられる。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も原因食材を同定できない事例が多く、さらに、飲食店等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、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問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ことを目的とする。

昨年(R4年)度は肉類、乾物、野菜等115検体を調査し、カレー粉1検体よりエンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出した。今年(R5年)度は昨年度ウエルシュ菌が多く検出された乾物を中心に101検体について検査を行った。また、今年度発生した、キッチンカーを原因施設とする食中毒について、原因食材を推定する目的で、提供食品と同じ食材を購入し検査を行った。

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、適切な温度で保管し、24時間以内に試験に供した。

[2] 検査手順

検査手順を図1に示す。検体25gを無菌的にストマッカー袋に採取し、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

一処理し、70℃で 20 分間加熱後急冷し、42℃で 24 時間、増菌培養を行った。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、ウエルシュ菌遺伝子(*cpa*)及びエンテロトキシン産生遺伝子(*cpe*)同時検出 P C R を行なった。その後、増菌培養液を 2 枚の CHROM agar *C. perfringens* に塗抹し、37℃、24 時間嫌気培養した。CHROM agar に発育した赤色コロニーについて、前述の P C R 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。

[3]スクリーニング PCR

ウエルシュ菌遺伝子およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌遺伝子の検出は、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。今年度は KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) を用い高速 PCR を実施した(添付資料)。反応液は、KOD One PCR Master Mix 25.0 μ L、それぞれのプライマーを 1.5 μ L (0.1 μ M) ずつ、DNA テンプレート 5 μ L、PCR グレードの精製水 14 μ L とし、総量 50 μ L に調整した。P C R 反応は、98℃、1 分の反応後、98℃、10 秒、55℃、5 秒、68℃、1 秒のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 68℃、1 分

の反応を行った。反応終了後、PCR 産物 2 μ L を MultiNA (SHIMADZU) を用いた電気泳動で特異的なバンドの有無を調べた。

C. 結果

[1]スクリーニング P C R 検査

汚染実態調査に使用した検体は、海藻 27 検体、煮干し 37 検体、野菜乾燥品 7 検体、豆腐 6 検体、魚介乾燥品 4 検体、粉類 20 検体の計 101 検体であった(表 1)。

増菌液から行ったスクリーニング P C R は、煮干し 37 検体中 15 検体(40.5%)、粉類 20 検体中 3 検体(15.0%)からウエルシュ菌遺伝子が検出された。また、煮干し 1 検体(2.7%)、そば粉(粉類) 1 検体(5.0%)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(表 2)。

[2]菌分離

増菌液を CHROMagar *C. perfringens* 2 枚に塗抹し、赤色コロニー 10 個を分離し、遺伝子保有状況をマルチプレックス PCR で確認した。

煮干し 37 検体中 15 検体(40.5%)、粉類 20 検体中 4 検体(そば粉 1、天ぷら粉 1、小麦粉 2)からウエルシュ菌が検出された。また、煮干し 1 検体(2.7% 2コロニー/10コロニー)、そば

粉 1 検体 (5.0% 2 コロニー/10 コロニー) からエンテロトキシン産ウエルシュ菌が検出された (表 2)。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌が産生された煮干し、そば粉は国内産によるものであった。

また、キッチンカーを原因施設とする食中毒事例の原因食品とされた弁当に使用された食材に着目し、一般流通品を用いた同菌の汚染実態を調査した。提供メニューに用いられた食材は、鶏肉、牛ハラミ、レタス等、モヤシ、にんじん、紫キャベツ、ごはんであった。対象となる食材を購入し (表 1) 検査を行った。鶏肉 3 検体中 1 検体 (33.%) からウエルシュ菌が検出されたが、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出することはできなかった (表 2)。

D. 考察

今年 (R5 年) 度は、煮干し 37 検体中 15 検体 (40.5%) 検体、粉類 20 検体中 4 検体 (20.0%) からウエルシュ菌が検出され、そのうち、煮干し 1 検体 (2.7%)、そば粉 1 検体 (5.0%) からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。

煮干しから 40.5% と高率にウエルシュ菌が検出され、そのうち 1 検体からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出されたことから、これらの煮

干しを味噌汁、煮物等の出汁として使用し大量調理を行い、その後の不適切な温度管理などがあった場合には、食中毒発生の原因となりうるということが考えられた。

今後も、煮干し等の海産物、粉類等、これまで食中毒発生の原材料としてはあまり考えられていなかった食材において、汚染実態調査を継続して行う必要があると考えられた。

また、川崎市内で発生したキッチンカーを原因施設とする食中毒事例の原因食品とされた弁当に使用された食材に着目し、一般流通品を用いた同菌の汚染実態を調査した。使用された原材料は鶏肉、牛ハラミ、野菜等であり、これまでに本研究班全体で行った汚染実態調査結果においてエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された原材料が含まれていたが、今回の食材からは、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は検出されなかった。種々の多様な食品の汚染実態調査で得られた結果は、原因食品が不明又は個別の品目にまで特定できない食中毒事例等において、原材料汚染の可能性を考慮した飲食店等への効果的な指導にも活用できる基礎データとなりえると考えられた。菌液からのスクリーニング PCR は、分離したウエルシュ菌に対するウエルシュ菌遺伝子の検出率が 70.0 % と

やや感度の落ちるものであったが、今回使用したマルチプレックス P C R 試薬 (KOD One PCR Master Mix) では、ウエルシュ菌が陽性となった 19 検体中 18 検体 (94.7%) でスクリーニング P C R が陽性となった。各サイクルの反応時間が短く、感度がよく、P C R 反応時間が 30 分程度と短時間で終了するため、本試薬を使用することで作業効率の向上に非常に役立った。

E . 結論

昨年 (R4 年) 度より、ウエルシュ菌食中毒の制御のための汚染実態調査を行っている。

今年 (R5 年) 度は煮干し、粉類を中心に 101 検体について汚染実態調査を行った。煮干し 37 検体中 15 検体 (40.5%)、粉類 20 検体中 4 検体 (15.0%) からウエルシュ菌が検出され、エンテロトキシン産生ウエルシュ菌は煮干し 1 検体 (2.7%) そば粉 1 検体 (5.0%) から検出された。煮干しを出汁として使用した味噌汁、汁物、煮物等の大量調理後の温度管理が不十分であった場合には、本菌による食中毒が発生する可能性があることが示唆された。

今後も調査を継続し、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

H. 知的財産権の出願・登録状況

ウェルシュ菌検査手順

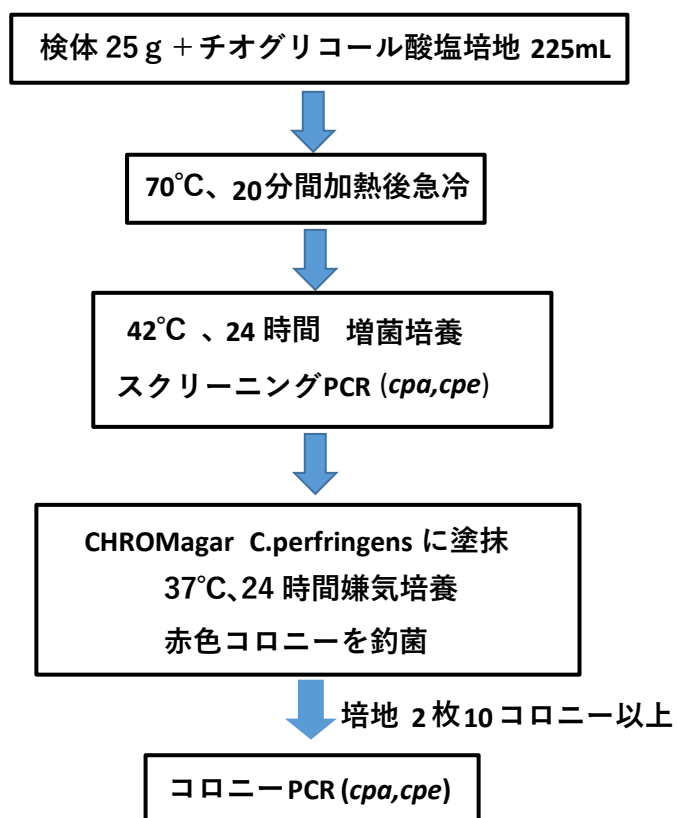


図 1

Multiplex PCR for *cpe* and *cpa*

●PCR プライマー

<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	324 bp
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	233 bp

cpa (アルファ毒素遺伝子)

cpe (エンテロトキシン遺伝子)

H. S. Guran らの方法 (Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 77-82)

●反応液

KOD One PCR Master Mix*	25.0 μ L
<i>cpa</i> -F (10 μ M)	1.5 μ L
<i>cpa</i> -R (10 μ M)	1.5 μ L
<i>cpe</i> -F (10 μ M)	1.5 μ L
<i>cpe</i> -R (10 μ M)	1.5 μ L
H ₂ O	14.0 μ L
Template	5.0 μ L
Total	50.0 μ L

* KOD One PCR Master Mix TOYOBO (#KMM-101)

●プログラム

98°C	1 min	
98°C	10 sec	} × 30
55°C	5 sec	
68°C	1 sec	
68°C	1min	

表 1 検査材料

乾物

海藻	27
煮干し	37
野菜乾燥品	7
豆類	6
魚介乾燥品	4
粉類	20
計	101

キッチンカー食中毒

鶏肉	3
牛ハラミ	1
レタス等	3
もやし	3
にんじん	6
紫キャベツ	5
計	21

表2 結果

乾物

食品区別	検体数	スクリーニング PCR陽性数	ウエルシュ 菌陽性数	エンテロトキシン 産生ウエルシュ 菌陽性数
海藻	27	0	0	0
煮干し	37	15(40.5%)	15(40.5%)	1(2.7%)
野菜乾燥品	7	0	0	0
豆類	5	0	0	0
魚介乾燥品	4	0	0	0
粉類	20	3(15.0%)	4(20.0%)	1(5.0%)
計	101	18(17.8%)	19(18.8%)	2(2.0%)

キッチンカー食中毒食材

食材	検体数	ウエルシュ菌 陽性数	エンテロトキシン産 生ウエルシュ菌陽性 数
鶏肉	3	1(33.3%)	0
牛ハラミ	1	0	0
レタス等	3	0	0
もやし	3	0	0
にんじん	6	0	0
紫キャベツ	5	0	0
計	21	1(4.8)	0

