

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

食品や環境からのウエルシュ菌の検出および分子疫学的解析

研究分担者 渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒として最も重要であ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ず、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。そこで本研究では、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、ウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品の明確化および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討を行った。今年度は、牛ひき肉、土付きごぼう、土付きジャガイモ、土付き長ネギ（いずれも国産）から計 45 検体を小売店から購入し供試した。また河川水および下水処理場放流水の河川流入域水の計 3 検体を採取し供試した。これらの検体の増菌培養液から DNA を抽出し、 α 毒素産生遺伝子（*cpa*）およびエンテロトキシン産生遺伝子（*cpe*）を PCR で検出した。また増菌培養液から菌株分離を行った。さらに、*cpe* 陽性ウエルシュ菌分離株の全ゲノムシーケンスを行い MLST に基づく分子系統解析を行った。その結果、牛ひき肉からは *cpe* および *cpe* 陽性菌は確認されず、昨年度に引き続き牛肉が食中毒原因菌の汚染源となるリスクは低いことが示唆された。一方、根菜付着土および下水処理場放流水の河川流入域水からは *cpe* 保有生菌が検出された。したがって、土壌や環境水は、農作物や水産物を栽培・養殖・漁獲する場において、食品のエンテロトキシン産生ウエルシュ菌汚染に関連する可能性があると考えられた。

研究協力者

小嶋由香 川崎市健康安全研究所
淀谷雄亮 川崎市健康安全研究所
西里恵美莉 川崎市健康安全研究所
三澤尚明 宮崎大学

A. 研究目的

Clostridium perfringens（ウエルシュ菌）は、ヒトや動物の大腸内常在菌であり、土壌や下水、河川、海等にも広く分布し、食肉、魚介類あるいは野菜など

多くの食品を汚染している。ウエルシュ菌食中毒は世界各国で発生しており、重要な下痢症起因菌である。日本では大規模な集団発生事例が多く、1件当たりの患者数が他の細菌性食中毒よりも圧倒的に多い。そのため年間患者数が最も多い食中毒の一つとして認識されている。

本菌では食中毒原因菌となりうる株は、芽胞形成時にエンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPE) を産生するウエルシュ菌に限られる。ウエルシュ菌は産生する毒素の種類と産生量によって A 型から E 型までの 5 毒素型に分けられるが、A 型ウエルシュ菌のみが食中毒の原因となることが知られている。エンテロトキシン以外にも、A 型から E 型株で共通して産生する主要な毒素としてアルファ毒素 (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPA) がある。本毒素は溶血性等の毒性を持つが食中毒発症には直接関与しないとされている。食中毒由来株におけるエンテロトキシン産生率は 80 ～90% 程度である一方で、健康な人、動物および自然界から分離される菌株では 1 ～2% 以下であり、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品や、その汚染源は明らかになっていない。エンテロトキシン産生株の食品での分布状況、およびそれらの汚染源を環境中から検索し明らかにする必要がある。

そこで本研究では、大規模な食品の汚

染実態調査を実施し、ウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品の明確化および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討を行っている。昨年度の検討では、エンテロトキシン産生株は海産物およびその乾物や根菜類、カレー粉等スパイスから検出されたが、従来、ウエルシュ菌食中毒の原因食品と考えられてきた肉類からはほとんど検出されなかった。今年度は、昨年度の結果を受け、牛ひき肉および土付き根菜類での *cpe* 陽性ウエルシュ菌分布実態調査を行った。また、来年度に実施する河川水等におけるウエルシュ菌分布実態調査の試験法予備検討として、環境水中のウエルシュ菌分布実態調査を行った。さらに、昨年度および今年度分離株の全ゲノムシーケンスを実施し、*cpe* 陽性株の由来を検索するため、分子疫学的調査を行った。これらの成果を報告する。

B. 研究方法

(1) 検体

牛ひき肉 20、土付きごぼう 10、土付きジャガイモ 10、土付き長ネギ 5 (いずれも国産) の計 45 検体を小売店から購入し、供試した。根菜からは薬さじで付着した土壌をこそげ取って回収し供試した。また環境水として、河川水 1 および下水処理場放流水の河川流入域水 2 の計 3 検体を採取し供試した。

(2) 検査手順

①食品からの菌分離

ストマッカー袋に液体チオグリコレート培地(日本製薬株式会社)225 mlを取り、検体 25 gを加えて1分間ホモジナイズした。これを試料原液とした。試料原液をストマッカー袋に入れたまま、ウォーターバス中で内部温度 70℃に保持しつつ 20 分間加温した。その後、流水急冷しヒートシーラーで密閉し、アネロパック・ケンキ(株式会社スギヤマゲン)を用いて 42℃・24 時間嫌気培養し、これを増菌培養液とした。

検体中の芽胞形成菌の定量法として、1 検体につき 2 枚の嫌気性パウチ(株式会社スギヤマゲン)に試料原液 10 ml とハンドフォード改良培地(関東化学株式会社)15 ml を加え混合し、パウチ内部の空気を追い出した後にヒートシーラーで密閉した。アネロパック・ケンキ(株式会社スギヤマゲン)を用いて 46℃・24 時間で嫌気培養後、形成した黒色コロニーを目視で確認し数を計測した。

増菌培養液からアルカリ熱抽出法にて直接DNAを抽出し、増菌培養液中のCPE産生遺伝子 *cpe* およびCPA産生遺伝子 *cpa* (=全てのウェルシュ菌が保有するホスホリパーゼC遺伝子)の保有状況を確認した。増菌培養液 100 µL を 8 連チューブに分取し、

14800 rpm・10 分間遠心分離を行い、上清を除去した。沈査に 50 mM NaOH を 85 µL 加え、100℃・10 分間サーマルサイクラーで加熱した。加熱後 1M Tris-HCl(pH7.0)を 15 µL 加え、再び 14800 rpm・10 分間遠心分離を行い、その上清を DNA 抽出液とした。DNA 抽出液をテンプレートとして、Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) を用いたマルチプレックスPCRを行い、*cpe* および *cpa* を増幅した。プライマー塩基配列は以下の通りである；
multi-*cpa*-F(5' - GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3') 、
multi-*cpa*-R(5' - CCTCTGATACATCGTGTAAG-3') 、
multi-*cpe*-F(5' - GGAGATGGTTGGATATTAGG-3') 、
multi-*cpe*-R(5' - GGACCAGCAGTTGTAGATA-3')。PCR サイクルは以下の通りである；サイクル前熱変性 94℃・2 分→(熱変性 94℃・30 秒、アニーリング 55℃・1 分、伸長反応 68℃・1 分)×30 サイクル→サイクル後伸長反応 68℃・5 分。アガロースゲル電気泳動で *cpe* および *cpa* の増幅の有無を判定した。

さらに CHROMagar *C.perfringens* (CCP；関東化学株式会社)平板培地上に増菌培養液を平板 1 枚あたり 1 エーゼ量画線塗抹し、37℃・24 時間嫌気培養を行った。CCP 平板上に形成

したオレンジ色のコロニーを推定ウエルシュ菌とした。推定ウエルシュ菌の単コロニーを1シャーレにつき10個ずつ釣菌し、分離培養用のチオグリコレート寒天培地に接種し保存用に培養すると同時に、Quick Taq HS DyeMix にプライマーを加えたPCRミックスバッファーに菌体を直接懸濁して、上述の増菌培養液からの *cpe* および *cpa* 検出プロトコルと同様にマルチプレックスPCRを行い（コロニーPCR法）、各コロニーの *cpe* および *cpa* 保有状況を判定した。

②根菜付着土壌からの菌分離

根菜付着土壌の回収重量を計測した。ストマッカー袋に回収土壌と、土壌の9倍重量の液体チオグリコレート培地を加え、1分間ホモジナイズした。これを試料原液とした。その後の培養から菌株分離、前培養液中および分離菌株での *cpe*・*cpa* 遺伝子の検出方法については、(1)-①と同様に実施した。

③河川水および下水処理場放流水河川流入域水からの菌分離

河川水として神奈川県川崎市川崎区付近の多摩川河川水、神奈川県川崎市下水処理場A放流水河川流入域水および神奈川県川崎市矢上川下水処理場B放流水河川流入域水の計3検体を採取した。水中に含まれるウエル

シュ菌の *cpe* 陽性株の定量法として、「水道施設の技術的規準を定める省令」における「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」の別添2「嫌気性芽胞菌の検査方法」¹⁾を参照、一部改変し実施した。河川からの採水試料を500 ml 程度、滅菌プラスチックボトルに採取した。採水試料100 ml 程度をストマッカー袋に分取し、75℃で20分間加熱後、メンブランフィルター法により試料をフィルター1枚につき20～300 mL 吸引ろ過した。メンブランフィルターをろ過装置から外し、気泡が入らないように、CCP 培地寒天面に密着させた。そこに、CCP 培地を10 mL 程度重層し固化させ、さらに同培地を10 mL 程度重層した。37℃で24±2時間嫌気培養した。形成されたコロニーを計測、および(1)-①で上述した *cpa*・*cpe* 特異的マルチプレックスPCRを行い、増幅産物の確認によって菌株の *cpa*・*cpe* 保有状況を判定した。

(3)分離株の全ゲノムシーケンスおよび型別

本研究班において昨年度・今年度に分離した *cpe* 陽性ウエルシュ菌として、食品由来株および川崎市健康安全研究センターで過去に分離した患者由来株の計12株を供試した（表1）。

−80℃凍結保存菌株をチオグリコレート寒天平板に塗抹し 37℃で培養後、平板上で増殖した菌体を 1 mL の PBS を入れた 2 mL マイクロチューブ中に懸濁し、遠心分離して集菌した。PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific 株式会社) を用いて、得られた菌体から DNA 抽出を行った。これをテンプレートとして、QIAseq FX DNA Library Kit (Qiagen 株式会社) を用いて、16S-rDNA をターゲットとした DNA ライブラリを作製し、i-Seq(illumina 株式会社) を用いて全ゲノムシーケンスを行った。Center for Genomic Epidemiology, DTU National Food Institute (デンマーク工科大学) のウェブサービス MLST2.0²⁾ を利用し、得られたリードを用いて解析を行って、各分離株の Multilocus sequence typing (MLST) を判定した。この際、*C. perfringens* では *colA*、*groEL*、*sodA*、*plc*、*gyrB*、*sigK*、*pgk* および *nadA* の 8 遺伝子の MLST を判定した。この際得られた allele のタイプを指標として用い、本研究における分離株 12 株および PubMLST 登録株 16 株のデータに基づき系統解析を行った。系統解析ソフトウェア MEGA 11X) を用いて近隣結合法にて系統樹 (NJ 系統樹) を構築した。この際モデルは p-distance を選択した。

C. 研究結果

(1) 牛ひき肉および根菜付着土壌での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

牛ひき肉および根菜付着土壌からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌検出結果を表 2 に示した。牛ひき肉からは昨年度の調査に引き続き非検出となった。なお *cpa* 検出状況も、増菌培地から検出されたのは 2 検体、CCP 培地でのコロニーから検出されたのは 1 検体のみにとどまった。根菜付着土壌からは、じゃがいも土では 10 検体 1 検体 (10.0%)、ゴボウ土では 10 検体 1 検体 (10.0%)、長ネギ土では 5 検体 1 検体 (20.0%) から、増菌培養液中およびこれを平板に塗抹培養して分離された菌株の両方から *cpe* が検出された。特にゴボウ土の *cpe* 陽性検体において、CCP 平板に生育したコロニー 20 個中 15 個 (5.0%) で *cpe* が検出された。同様の *cpe* 陽性コロニーの頻度は、ジャガイモ土 *cpe* 陽性検体では 20 個中 1 個 (5.0%)、長ネギ土 *cpe* 陽性検体では 32 個中 1 個 (3.1%) であり、これらと比較して、今回供試したゴボウ畑土壌中の *cpe* 陽性株の濃度は高かったことが示唆された。

(2) 河川水および下水処理場放流水河川流入域水での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

河川水および下水処理場放流水河川流入域水からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌検出結果を表 3 に示した。下水処理場放流水の河川流入域水では、処理場 A の放流水では 41.0 cfu/L、処理場 A の放流水では 21.9 cfu/L、多摩川河川水では検出限界以下であった。下水処理場放流水の河川流入部付近の水では *cpe* 陽性菌数が高い可能性があると考えられた。

(3) 分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子系統解析

ウエルシュ菌の患者由来株の由来を検索するため、本研究班において昨年度・今年度に分離した *cpe* 陽性ウエルシュ菌の全ゲノムシーケンス、MLST 型別および分子系統解析を行った。8 遺伝子の allele 型別結果を表 1 に示した。今回型別した対象遺伝子では、*colA* で 6 allele、*groEL* で 4 allele、*sodA* で 4 allele、*plc* で 5 allele、*gyrB* で 4 allele、*sigK* で 5 allele、*pgk* で 4 allele、*nadA* で 5 allele のバリエーションが確認された。この 8 遺伝子の allele タイプを指標として、本研究における分離株 12 株および PubMLST に登録された世界各地で分離された 16 株のデータに基づき系統解析を行い、構築した NJ 系統樹を図 1 に示した。その結果、今回解析した菌株は 6 つのハプ

ロタイプに分かれ、分離された国ではハプロタイプの偏りは無いこと、患者由来株のみで構成されたハプロタイプが確認されたこと、今回分離および配列決定した食品由来株 4 株および下水処理場の河川流入域水由来株 1 株はいずれも複数の国で分離された患者由来株と比較的類似した allele のタイプを持つことが示された。

D. 考察

今年度の検討結果から、昨年度に引き続き肉類からは *cpe* 陽性ウエルシュ菌は一切検出されず、根菜付着土壌からは 12% の陽性率で検出された。これまで 2 年間の検討結果から、肉類、特に牛肉の *cpe* 陽性株の汚染リスクは低く、日本国内においては、土付き根菜や海産物およびその加工品、スパイス等が、食中毒を起こすウエルシュ菌の汚染原因食品として着目すべき食品であることが明らかとなった。また下水処理場放流水の河川流入部付近の水では約 20～40 cfu/L と比較的高濃度で *cpe* 陽性株が検出されたことから、下水処理水は河川および水産物のウエルシュ菌の汚染源となる可能性が考えられた。今回の河川水調査では *cpe* 陽性株は検出されなかったが、調査した試料水は 1 か所の 1 検体であり、また今回

は水 1 L あたりの定量的データを取得するため CCP 寒天培地塗抹前の増菌培養は行わなかった。今後、採水箇所を増やし、採水量や試験法の感度を変更し、詳細な検討を継続する必要がある。

分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子系統解析の結果、患者由来株のみで構成されたハプロタイプは存在したが、一方で、患者由来株と近縁な allele を持つ食品由来株および環境由来株が存在することも示された。これらが食中毒の発生と関連した菌株である可能性が考えられた。

今後は、今回明らかとなった *cpe* 陽性株の汚染頻度が高い食品と関連した環境、すなわち河川・海洋・農地土壌といった環境材料における *cpe* 陽性ウエルシュ菌分布調査を進める。またそれらの分離株とウエルシュ菌食中毒患者由来株の遺伝子解析およびジェノタイピングを、より解像度の高い解析方法によって実施し、菌の動態を疫学的に考察することによって、ヒトに食中毒を起こすリスクが高い食品や、食中毒原因株の汚染源を特定していく予定である。

E. 結論

今年度は、食品関連サンプルとしては牛ひき肉、ごぼう・ジャガイモ・長ネギ付着土壌、河川水および下水処理場放流

水の河川流入域水を供試し、ウエルシュ菌の検出実験を行い、*cpe* 遺伝子の分布調査を行った。さらに本研究班で分離した *cpe* 陽性ウエルシュ菌分離株、および食中毒患者由来株の全ゲノムシーケンスを行い MLST に基づく分子系統解析を行った。その結果、牛ひき肉からは *cpe* および *cpe* 陽性菌は確認されず、昨年度に引き続き牛肉が食中毒原因菌の汚染源となるリスクは低いことが示唆された。一方、根菜付着土および下水処理場放流水の河川流入域水からは *cpe* 保有生菌が検出された。したがって、土壌や環境水は、農作物や水産物を栽培・養殖・漁獲する場において、食品のエンテロトキシン産生ウエルシュ菌汚染に関連する可能性があると考えられた。今後は、養鶏環境、海洋河川、土壌でのウエルシュ菌分布を調査し、菌株のジェノタイピングを行い、菌の動態を考察することによって、食中毒原因株の汚染源を特定していく予定である。

F. 参考文献

- 1) 水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について（平成 19 年 3 月 30 日）（健水発第 0330006 号）
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb3805&dataType=1&pageNo=1
- 2) <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>

3) K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Mol Biol Evol. 38(7):3022-3027 (2021)

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1．本研究班で全ゲノムシーケンスを行った *cpe* 陽性ウエルシュ菌分離株の MLST

菌株 No.	由来詳細	colA	groEL	sodA	plc	gyrB	sigK	pgk	nadA
CP-2016-12	患者、日本	23	26	29	20	16	17	40	20
CP-2019-07	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2019-08	患者、日本	19	5	1	5	5	2	3	1
CP-2019-09	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2019-10	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2019-11	患者、日本	55	51	10	11	5	5	3	11
CP-2023-02	患者、日本	1	5	1	5	5	2	3	1
CP2022-DR49-6	干しエビ、中国産	23	26	29	20	16	17	14	20
6-2-10	アサリ、愛知県産	35	32	37	37	27	26	18	35
8-19-5	カレー粉、 インド産	4	5	1	3	5	4	3	3
27-11-8	干昆布、北海道産	19	5	1	5	1	2	3	1
CP2023-WA1-1	下水処理場放流 域、 多摩川	19	5	1	5	5	2	3	1

表 2. 市販食品での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

食品検体	cpe 遺伝子陽性株					
	検出法	増菌培養液の PCR		コロニーPCR		1 検体における コロニーPCR での <i>cpe</i> 陽性株数 (陽性率)
	試験 検体数	陽性検体数 (陽性率)		陽性検体数 (陽性率)		
牛ひき肉	20	0	(0.0%)	0	(0.0%)	NA
じゃがいも土	10	1	(10.0%)	1	(10.0%)	1/20 (5.0%)
ゴボウ土	10	1	(10.0%)	1	(10.0%)	15/20 (75.0%)
長ネギ土	5	1	(20.0%)	1	(20.0%)	1/32 (3.1%)
根菜合計	25	3	(12.0%)	3	(12.0%)	—

表 3. 河川水およびにおける *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

採取場所	<i>cpe</i> 陽性株数 (cfu/L)
神奈川県川崎市 多摩川下水処理場 A 放流水河川流入域水	41.0
神奈川県川崎市 矢上川下水処理場 B 放流水河川流入域水	21.9
神奈川県川崎市川崎区付近の多摩川河川水	非検出

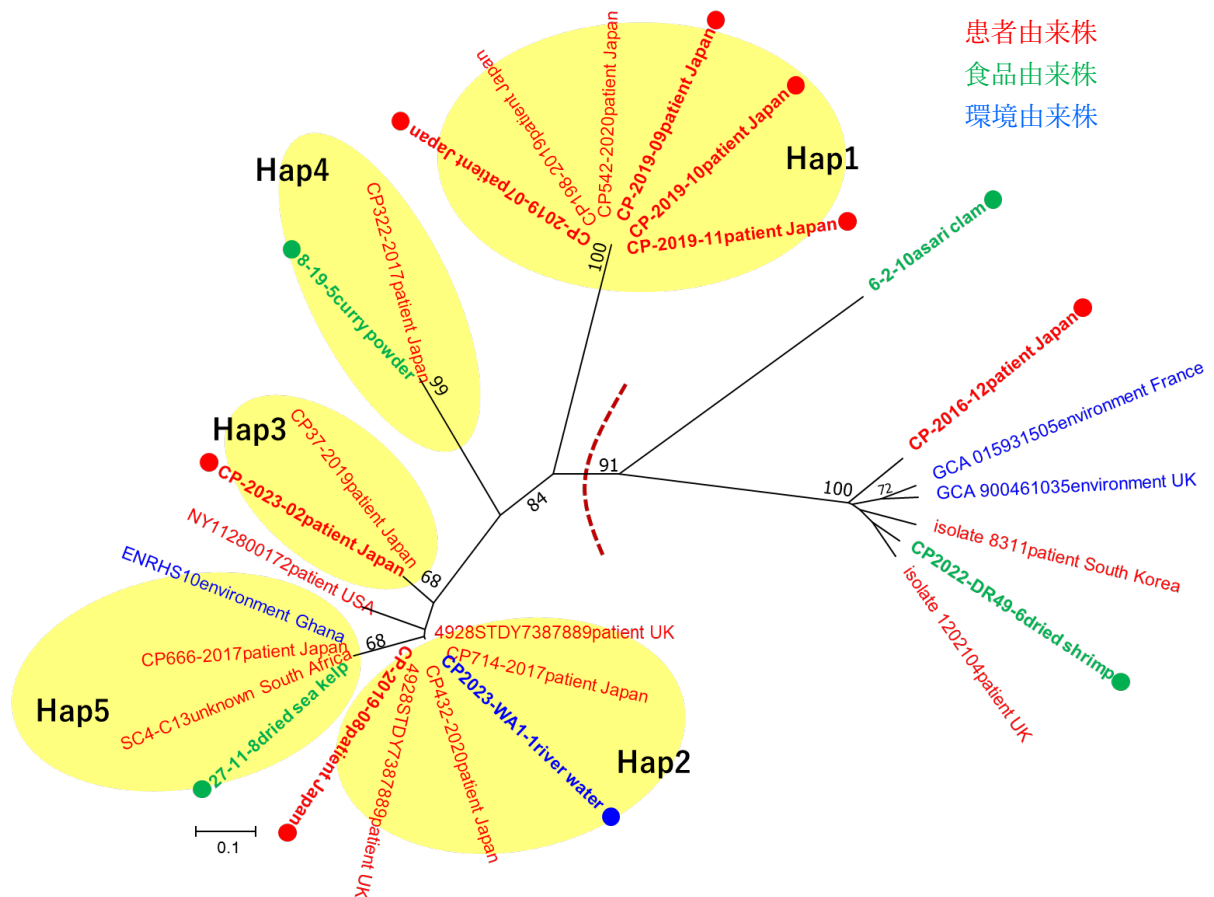


図1. 本研究で全ゲノムシーケンスを実施したウエルシュ菌 *cpe* 陽性株
および PubMLST からダウンロードした菌株の MLST によって型別
した 8 遺伝子の allele に基づく NJ 系統樹

本研究で全ゲノムシーケンスを実施した菌株名に●を付した。各クレードの分枝上の数字は 1,000 回繰り返し試行のブートストラップ確率を示す。Hap1～Hap5 は MLST 型別を指標とした遺伝的に近縁なグループを示す。