

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

総括研究報告書

研究分担者	大西 貴弘	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	渡辺麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	三澤 直明	国立大学法人宮崎大学
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	川崎市健康安全研究所
研究協力者	淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所
研究協力者	西里英美莉	川崎市健康安全研究所
研究協力者	荒木 靖也	川崎市健康安全研究所

研究要旨

昨年度は、ウエルシュ菌食中毒の原因食材を明らかにするために、食品におけるウエルシュ菌の汚染実態調査をおこなった。今年度は、食品におけるエンテロトキシン遺伝子（*cpe*）保有ウエルシュ菌の汚染実態調査を継続するとともに、家畜・家禽腸内容物からのウエルシュ菌の検出、都市部河川水からのウエルシュ菌の検出、分離株の分子疫学的解析、食品中におけるウエルシュ菌の増殖挙動の解析を行った。その結果、家畜・家禽腸内容物から *cpe* 保有ウエルシュ菌は検出されず、食肉が本食中毒の原因食品となるリスクは低いことが示唆された。また、食品を汚染している *cpe* 保有ウエルシュ菌は最高で 78 MPN/100g と非常に低菌量であることが明らかになった。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* 保有菌が検出され、これらがウエルシュ菌汚染に関与している可能性が示唆された。カレー中のウエルシュ菌の増殖を解析したところ、牛肉非添加のカレーでは、ウエルシュ菌の増殖が著しく抑制され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、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 (cpe) 産生性ウエルシュ菌の汚染源が明らかになっていないことがあげられる。原因食品を明らかにするために、食品におけるウエルシュ菌の汚染実態調査がこれまで多く行われてきた。しかし、これまでの調査にはいくつかの問題点が存在するため、原因食品を明らかにできるまでに至っていない。

昨年度は cpe 保有ウエルシュ菌の汚染源を明らかにするために、大規模な汚染実態調査を行った。その結果、従来、ウエルシュ菌の汚染源として重要視されてきた食肉からは、cpe 保有株はほとんど検出されず、カレー粉、香辛料、貝、海産乾物、根菜から cpe 保有株が多く検出された。この結果から、ウエルシュ菌食中毒の汚染源として、食肉の重要性は従来考えられていたほど高くはないことが示唆された。しかし、ウエルシュ菌食中毒と食肉を使用した料理との関連性が高いのは事実である。そこで今年度は、家畜、家禽の腸内容物から cpe 保有菌の検出を試みるとともに、ウエルシュ菌食中毒が発生しやすい煮物におけるウエルシュ菌の増殖に食肉の添加がどのような影響を及ぼすか、カレーを煮物のモデル食品として使用し、検討を行った。

さらに、今年度は食品における cpe 保有株の汚染実態調査を継続して行うとともに、汚

染菌量の推定も行なった。また、昨年度の調査で、貝や海産乾物における cpe 保有株の汚染が認められたため、河川水における cpe 保有株の汚染状況を調査した。これらに加えて、汚染実態調査で分離された株の遺伝的特徴を明らかにするために、患者分離株とともにゲノム DNA を抽出し、分子系統解析を行った。

B. 研究方法

[1] 食品における汚染実態調査

食品の汚染実態調査は、基本的に昨年度の方法で行った。昨年度の方法では、食品によっては、PCR 反応が阻害されたため、今年度は阻害物質の影響を受けにくい PCR 試薬を用いて、試験した。食品を汚染しているウエルシュ菌数の推定は、最確数法で行った。

[2] 家畜・家禽腸内容物からの cpe 保有株の検出

宮崎県内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およびブロイラーの盲腸内容物、587 検体を供試した。検体は、チオグリコール酸培地 II 中で、70℃、20 分間加熱後、42℃、24 時間増菌培養した。培養後、CHROMagar *C. perfringens* に塗抹し、37℃、24 時間、嫌気培養した。発育したコロニーがウエルシュ菌であることを確認した後、コロニー PCR で *cpa*、*cpe* の保有状況を確認した。

[3] 煮物におけるウエルシュ菌増殖挙動の解析

煮物のモデル食品としてカレーを使用した。カレーのレシピはカレールーに記載の方法に従った。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。接種菌量は、本年度行った、香辛料を汚染している *cpe* 保有株の汚染菌量の推計結果をもとに決定した。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、CHROMagar *C. perfringens* に塗抹し、コロニー数を計数した。

[4] 河川水および土壌における *cpe* 保有株の汚染調査

河川からの採水試料をストマック一袋に分取し、75℃で20分間加熱後、試料をフィルターに吸引ろ過した。フィルターは CHROMagar *C. perfringens* 上で37℃で24±2時間嫌気培養した。形成されたコロニーの *cpa*、*cpe* 保有状況をコロニーPCRによって確認した。

[5] 分離株の分子系統解析

本研究班において昨年度および今年度に分離した *cpe* 保有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。これらの株の全ゲノムシーケンスを行い、*colA*、*groEL*、*sodA*、*plc*、*gyrB*、*sigK*、*pgk* および *nadA* を対象とした MLST 解析を行った。

C. 研究結果

[1] 食品における汚染実態調査

煮干し、蕎麦粉から *cpe* 保有株が検出された。土付き野菜では、ごぼう、長ネギ、じゃがいもから *cpe* 保有株が検出された。牛挽肉からは、昨年度同様、*cpe* 保有株は検出されなかった。

昨年度の調査で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。

[2] 家畜・家禽腸内容物からの *cpe* 保有株の検出

牛、豚、鶏の腸内容物からは、年間を通じて *cpe* 非保有株が検出された。しかし、*cpe* 保有株は検出されなかった。

[3] 煮物におけるウエルシュ菌増殖挙動の解析

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、培養6時間で食中毒を引き起こせるだけの菌濃度に到達す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。

[4] 河川水および土壌における *cpe* 保有株の汚染調査

下水処理場放流水の河川流入域水で *cpe* 保有株が検出された。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* 保有株数が高い可能性があると考えられた。

[5] 分離株の分子系統解析

今年度解析した菌株は6つのハプロタイプに分かれ、分離された国によって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

ウエルシュ菌食中毒はカレーやシチュー、煮物などで多く発生している。特に肉類を使用した料理で発生しやすいと考えられてきた。昨年度の調査では、鶏肉 1 検体から *cpe* 保有株が検出されたのを除き、牛肉、豚肉から *cpe* 保有株は検出されなかった。その一方で、香辛料、カレー粉、貝、海産乾物などから *cpe* 保有株が多数検出された。この結果から、ウエルシュ菌食中毒における食肉の重要性は高くないことが示唆された。今年度は、牛、豚、鶏の腸内容物 587 検体およびひき肉について調査を行ったが、*cpe* 非保有株は検出されるが、*cpe* 保有株は検出されなかった。昨年度および今年度の結果から、食肉、特に牛肉および豚肉がウエルシュ菌食中毒の原因となる可能性は低いと考えられた。しかし、ウエルシュ菌食中毒は食肉を使用した料理で多発している。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、カレー中における、ウエルシュ菌の増殖挙動を検討した。その結果、牛肉の添加は、ウエルシュ菌の増殖を強力に促進することが明らかになった。この結果から、*cpe* 保有株の汚染源としての牛肉の重要性は高くないが、ウエルシュ菌の増殖を著しく促進するため、食肉（牛肉）の添加は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。今後、豚肉や鶏肉を使用した場合についても検討を行いたい。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増殖をサポートしている可能性が考えられた。

昨年度の調査では、貝や海産乾物から *cpe* 保有株が多く検出された。今回の結果から、下水の河川流入域で *cpe* 保有株が検出された。この結果から、河川中の *cpe* 保有株が貝や海産乾物を汚染している可能性が示唆された。海外の研究では、*cpe* 保有株はヒトが保菌しており、下水に汚染された河川が、*cpe* 保有株の汚染源であるとの報告がある。今回の結果は、我が国でも同様の汚染が生じている可能性を示唆するものである。今後、河川におけるウエルシュ菌の汚染状況を詳細に調査し、我が国におけるウエルシュ菌の汚染源を明らかにしていきたい。

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が存在した一方で、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、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

今回の調査結果は、香辛料・カレー粉や海産乾物がウエルシュ菌食中毒の汚染源として重要であることを示唆した昨年度の結果を裏付けるものである。一方、今回の結果から、ウエルシュ菌の増殖を促進するという食肉の新たな重要性が明らかになった。今後、食肉とウエルシュ菌の増殖についてさらに検討を行い、ウエルシュ菌が増殖しにくい調理法の開発に繋がていきたいと考える。

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

