

令和 6 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

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

研究分担者 三澤 尚明 国立大学法人宮崎大学

研究要旨

ウエルシュ菌食中毒の原因菌であるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌 (*cpe* 陽性菌) の食品における汚染調査では、貝類における *cpe* 陽性菌の検出率が高かった。それらの汚染源が、河川水または下水処理場から河川に放出される下水処理水の可能性があることから、M 県 O 水系および K 水系の河川水および下水処理水、河口に生息するカキおよび川砂から *cpe* 陽性菌の分離を試みた。2 つの水系 14 か所から採水した延べ 33 検体を検査したところ、32 検体 (97.0%) から *cpa* 陽性菌が、18 検体 (54.5%) から *cpe* 陽性菌が分離された。一方、4 か所の下水処理水場から採取した延べ 6 検体すべてから *cpe* 陽性菌が分離された。河川水 100ml 当たりの  $\alpha$  毒素産生性ウエルシュ菌 (*cpa* 陽性菌) の菌数は、非加熱検体が 0~610 cfu (平均 95.6 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.3%)、加熱処理検体が 0~420 cfu (平均 56.8 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.1%) だったのに対し、下水処理水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌の菌数は、非加熱検体が 180~5400 cfu (平均 1386.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 12.2%)、加熱処理検体が 100~4450 cfu (平均 1131.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 15.8%) だった。河川水から分離される *cpe* 陽性菌の検出率は、上流で低く、下流に行くほど高くなる傾向が認められた。さらに、河口の川砂 (3 検体) とカキ (4 検体) から *cpe* 陽性菌の分離を試みたところ、各 2 検体から *cpe* 陽性菌が分離・検出された。また、*cpe* 陽性菌の栄養型および芽胞の河川水中での生存性を試験管内で調べたところ、20℃、好気条件下では、栄養型および芽胞の菌数は時間の経過とともに減少し、栄養型は芽胞を形成しなかった。以上の結果から、調査した河川の表層水から *cpe* 陽性菌が年間を通して分離され、特に下水処理場の排水からの菌数および分離率が高く、下水処理水が河川水の汚染源の一つであることが強く示唆された。さらに、河口の川砂およびカキから *cpe* 陽性菌が検出されたことから、河川水中から貝類に取り込まれる汚染経路が考えられた。

A. 研究目的

ン産生性ウエルシュ菌 (以下、*cpe* 陽性菌)

令和 4 年度に実施したエンテロトキシ の大規模な食品汚染実態調査を実施した

ところ、本菌が分離・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。これらの食品が本菌に汚染される原因が、河川水および下水処理場から河川に放出される処理水である可能性があるため、令和6年度は、河川水、下水処理水、川砂および河口に生息するカキにおける *cpe* 陽性菌の分布状況を明らかにすることを目的として調査を実施した。

## B. 研究方法

### 〔1〕検体

令和6年4月から令和7年2月にかけて、M県0水系（12か所、延べ27検体）（図1）およびK水系（2か所、延べ6検体）（図2）の河川表層水および4つの下水処理場（図3）からの下水処理水（延べ6検体）を採水し、試験に供試した。採水地点はGPSにて確認し、地図上に記録した。約500mlの滅菌採水瓶に採取した検体は、水温とpHを記録した後に冷蔵保存で輸送し、48時間以内に検査を実施した。また、M市内の0水系下流に定点観測地点を置き（採水ポイント10）（図1）、令和6年5月から令和7年2月まで、毎月1回定期的に検査を行った。さらに、川砂（3検体）および岩ガキ（4検体）は、K水系の河口において干潮時に採取した。

### 〔2〕検査手順

河川水または下水処理水は必要に応じ

て10倍段階希釈を行い、非加熱と加熱処理（70℃、20分間加熱後急冷）した各100mlの原液および希釈液を0.2μmのポアサイズのフィルターで吸引ろ過した。吸引後のフィルターをウエルシュ菌の選択培地であるCHROMagar perfringens 平板培地上に置き、さらに同培地を重層して培地が固化した後、37℃、24時間嫌気培養を行った。フィルター上の赤色集落を計測するとともに、無作為に赤色集落を最大30個釣菌した（30個以下の場合は全て釣菌）。純培養した集落からアルカリ熱抽出法でDNAを抽出し、マルチプレックスPCR法により *cpa* および *cpe* 遺伝子を検出した。検体中のウエルシュ菌の菌数は、フィルター上の赤色集落数から求めた菌数に、PCR検査による *cpa* 陽性率を乗じたものを100ml当たりのα毒素産生性ウエルシュ菌（以下、*cpa* 陽性菌）数とした。さらに、*cpe* 陽性菌の検出頻度を示す指標として、分離した *cpa* 陽性菌から *cpe* を保有する菌をPCRで確認し、*cpa* 陽性菌数に対する *cpe* 陽性菌数の比率（*cpe/cpa*）として表した。カキからの菌の分離は、加熱、非加熱の検体25gを225mlのチオグリコレート培地でストマッカー処理後に増菌培養し、常法に従って菌の分離およびPCRによる遺伝子（*cpa*、*cpe*）検査を実施した。川砂は5gを秤量し、滅菌蒸留水で1:1～1:10に希釈した後、ボルテックミキサーで30秒間攪拌した。70℃、20分間加熱・急冷し、懸濁液0.1または1mlをシャーレ内

で加温溶解した CHROMagar perfringens 培地 20 mL と混釈し、37℃、24 時間、嫌気培養した。赤色コロニーを最大 30 個釣菌し、*cpa* および *cpe* 遺伝子を PCR により検出した。培養に供試した川砂の懸濁液 1 ml を分取し、60℃、48 時間加熱して水分を蒸発させ、砂の乾燥重量を測定し、乾燥させた砂 1g 当たりの菌数として表記した。

### [ 3 ] 河川水中でのウエルシュ菌の生存性

河川水中でウエルシュ菌の栄養型と芽胞がどのくらいの期間生残するか、実験室内で調べた。採水ポイント 10 の河川水(図 1) を採取し、ろ過滅菌 (0.2  $\mu$  m) した。これに本試験で分離された *cpe* 陽性菌の栄養型または芽胞を用いて懸濁液 (1~3 cfu/ml) を調整した。

芽胞液の調整は、Uemura の方法 (Uemura, T., J. Appl. Microbiol., 44, 411, 1978) を改変して作製した。GAM 寒天平板培地で 37℃、24 時間嫌気培養した栄養型菌を、TGC 培地 1ml に懸濁 (OD<sub>600</sub>=0.15) し、37℃、24 時間、嫌気培養した。この工程をもう一度実施し、培養液 100  $\mu$  l を DS 培地 1ml に添加し、37℃、24 時間嫌気培養した。培養液を 10,000 $\times$ g、10 分間遠心し、沈査を滅菌蒸留水で 3 回遠心洗浄した。沈査を滅菌蒸留水 1ml に浮遊させ、75℃、30 分間加熱した後、氷中で冷却した。芽胞を顕微鏡下で確認した後、芽胞数を計測し、実験に使用するまで 4℃で保存した。

各懸濁液を 50ml の遠心管に 50ml 分注

し、20℃のインキュベーター内に好気条件下で静置した。経時的に各チューブ内の生菌数を、上述した河川水からのウエルシュ菌の菌数測定法に従って測定した。栄養型の菌液は、非加熱に加え、芽胞への移行を確認するため、70℃、20 分間加熱処理を行った後に菌数測定も実施した。生残菌については、集落から DNA を抽出し、*cpe* 遺伝子を PCR により検出した。1 回の測定に 3 本の保存菌液を供試した。

## C. 研究結果

### [ 1 ] 河川水からの分離成績

調査した 2 つの水系から採取した 33 検体の河川水および下水処理水の水温は、14℃~28℃で、pH は河口付近が pH8、それ以外は pH7 であった。これらからウエルシュ菌の分離を試みたところ、32 検体 (97.0%) から *cpa* 陽性菌が、18 検体 (54.5%) から *cpe* 陽性菌が分離された。また、加熱処理、非加熱の両方の検体から *cpe* 遺伝子陽性菌が検出されたのは 9 検体で、非加熱のみが 6 検体、加熱のみが 3 検体あった。河川水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌の菌数は、非加熱検体が 0~610 cfu (平均 95.6 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.3%)、加熱処理検体が 0~420 cfu (平均 56.8 cfu、平均 *cpe/cpa* 6.1%) で、*cpa* 陽性菌数に占める *cpe* 陽性菌の割合も、下流に行くに従って高くなる傾向を示した (図 4、表 1)。

### [ 2 ] 定点観測

0 水系の下流に定点観測地で、令和 6 年 5 月から令和 7 年 2 月まで、毎月 1 回（計 10 回）*cpa* 陽性菌の定量培養と *cpe* の検出率（*cpe/cpa*）を調査した。*cpe* 陽性菌は 7 回検出され、河川水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌数は、非加熱検体で 42~150 cfu（平均 81.5 cfu、平均 *cpe/cpa* 3.1%）、加熱処理検体で 14~140 cfu（平均 51.1 cfu、平均 *cpe/cpa* 2.2%）であり、季節的な違いは認められなかった（図 5）。

#### [ 3 ] 下水処理水の分離成績

下水処理水では 6 検体すべてから *cpa* および *cpe* 陽性菌が分離された。下水処理水 100ml 当たりの *cpa* 陽性菌の菌数は、非加熱検体が 180~5400 cfu（平均 1386.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 12.2%）、加熱処理検体が 100~4450 cfu（平均 1131.7 cfu、平均 *cpe/cpa* 15.8%）だった（図 6）。

#### [ 4 ] 河川水中での生残性

*cpe* 陽性菌の栄養型および芽胞の 20℃、好気条件下における河川水中での生存性を試験管内で調べたところ、栄養型の生菌数は速やかに減少し、7 日後には増殖集落は認められなかった。また、観察期間中に栄養型が芽胞を形成したかを確認するため、菌液を加熱処理した後に嫌気培養を行ったが、菌は増殖せず、芽胞形成は認められなかった（図 7）。芽胞浮遊液についても栄養型と同様に河川水中での生存性を調べた結果、保存時間の経過とともに培養可能菌は減少し、16 日後には初期菌数の 10

分の 1 まで減少した（図 8）。

#### [ 5 ] カキからの分離成績

K 水系の河口に生息している岩ガキ 4 検体を干潮時に採取し、ウエルシュ菌の分離を試みたところ、非加熱検体と加熱処理検体のいずれからでも *cpa* 陽性菌が分離された。増菌培養液を用いた PCR では 2 検体から *cpe* が検出され、さらにその 1 検体（加熱処理）から *cpe* 陽性菌が分離された（表 2）。

#### [ 6 ] k 川砂からの分離成績

K 水系のカキを採取した周辺の川砂を干潮時に採取し、ウエルシュ菌の分離を試みた。供試した 3 検体から *cpa* 陽性菌が分離され、その 2 検体から *cpe* 陽性菌が分離された（表 3）。

### D. 考察

今回の調査で、2 つの水系のいずれからでも *cpa* 陽性菌が河川水に広く分布していることが分かった。また、河川水から分離された *cpe* 陽性菌は、下流域で分離された。今回の調査結果で特筆すべき点は、調査したすべての下水処理場から排出される下水処理水から *cpa* および *cpe* 陽性菌が高い菌数で分離されたことである。河川水と下水処理水から分離された *cpa* 陽性菌の平均菌数を非加熱検体と加熱処理検体で比較すると、下水処理水のほうが 10~20 倍高い値を示しており、*cpe/cpa* が

3.3~30.0%であったことから、大量の *cpe* 陽性菌が河川に排出されていることが示された。従って、下水処理水は *cpe* 陽性菌の汚染源の一つであることが強く示唆された。さらに、*cpe* 陽性菌が下水処理場の上流でも高頻度に検出されるのは、下水処理場のある河口付近の河川水が満潮時に上流に逆行することとも関係していると思われる。

今回の試験の採水地点 1 (図 1) は、山間部にある清流で、河川の上流には人が生活していないことから、*cpe* 陽性菌の汚染源がないか、ごく少ない可能性が高い。河川水は常時上流から下流に大量の水が流れていることから、連続して大量のウエルシュ菌が河川に流入していなければ、河川水で希釈され、菌の分離頻度は低くなると考えられる。定点観測地点では、*cpa* および *cpe* 陽性菌は高頻度に分離される一方、季節的な変動傾向等は認められなかった。定点観測地点は潮流の影響を受ける位置にあり、上述した潮流による *cpe* 陽性菌の分離成績に影響を与えた可能性も考えられた。

下水処理水以外の汚染源として、家畜や野生動物の腸管内に生息するウエルシュ菌が考えられるが、令和 5 年度に、家畜 (牛、豚、鶏) の腸内容物から *cpe* 陽性菌の分離を試みたが、全く分離されなかった。また、採水ポイント 7 (図 1) は、大規模養豚場の下流であったが、分離されたのは *cpa* 陽性菌のみだった。従って、少なくとも

も家畜由来の汚染はごく限られていると考えられた。

M 市は下水道のインフラ整備が進んでいるが、町村レベルでは簡易浄化槽による処理を行っている場合も依然として認められる。K 水系には下水処理場からの排水は放流されていないことから、簡易浄化槽を含めた他の汚染源が存在することを示唆している。今回は簡易浄化槽からの排水を検査しておらず、*cpe* 陽性菌の汚染の程度は明らかでないが、*cpe* 陽性菌の調査は今後の課題である。

*cpe* 陽性菌の栄養型と芽胞がどの程度の期間生存できるかを調べたところ、栄養型では速やかに死滅し、栄養型から芽胞形成への移行も認められなかった。さらに、芽胞であっても河川水中では長期間生残しないことから、河川から分離されるウエルシュ菌は、常時汚染源から河川水に排出されていると考えられた。

さらに、河口のカキおよびカキを採取した周辺の川砂から *cpe* 陽性菌が分離・検出されたことから、河川水や川砂のウエルシュ菌が貝類に取り込まれ、保菌される可能性が示唆された。これらの結果は、食品の汚染実態調査で貝類から *cpe* 陽性菌が分離された汚染経路を裏付けるものとなった。

今後は、河川水および下水処理水から分離された *cpe* 陽性菌株の分子生物学的手法を用いた系統解析を行い、ヒト、食品、環境由来株との関連性を調べる必要があ

るが、下水処理水から分離された *cpe* 陽性菌がヒトの腸管に由来する可能性がある場合には、ウエルシュ菌食中毒の対策としては、下水処理場での *cpe* 陽性菌の殺菌処理や調理従事者の検便も含めた衛生対策が必要となる。

#### E. 結論

*cpe* 陽性菌は、河川の下流域に広く分布していた。下水処理水は本菌の汚染源の一つであることが強く示唆され、貝類などの食品への汚染源となる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

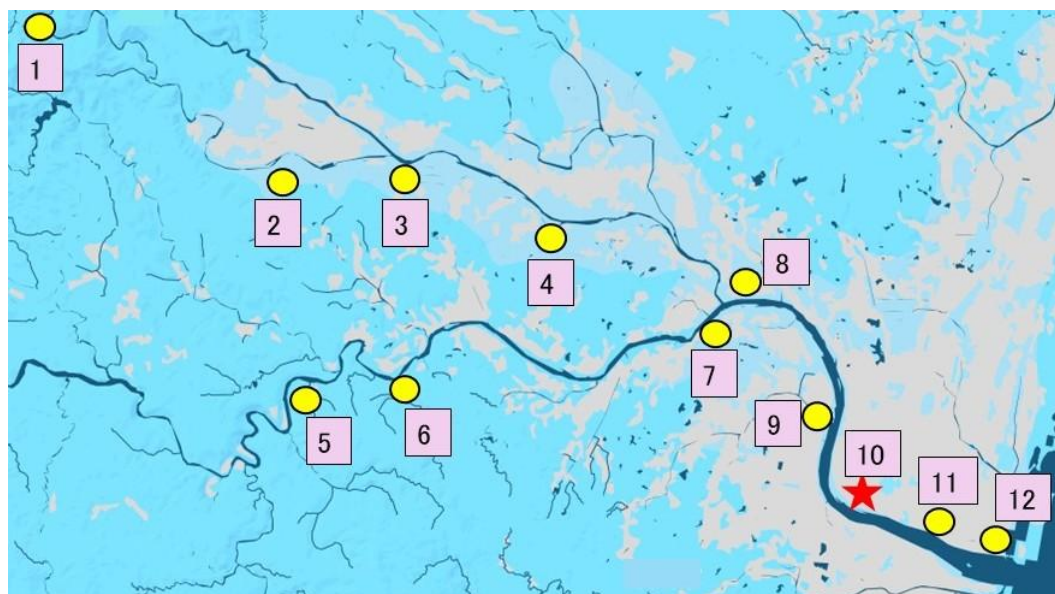
#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状

なし

図1 0 水系の採水ポイント



★ 定点観測地点

図2 K水系の採水ポイント





図3 調査した下水処理場の位置



図4 O水系の各採水ポイントにおけるウェルシュ菌の分離菌数と *cpe* 陽性菌の分離頻度

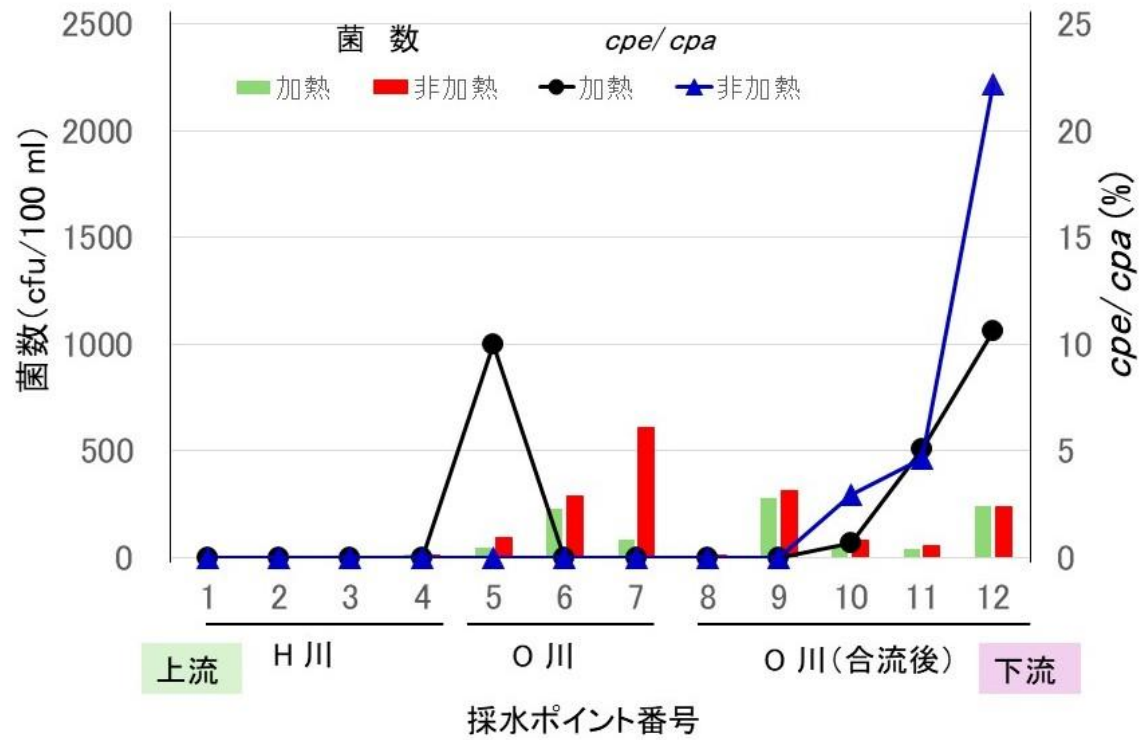


表 1 K 水系の河川水からのウェルシュ菌の分離と *cpe* 陽性菌の分離頻度

採水 ポイント	採水日	水温(°C)	pH	加熱			非加熱		
				菌数 (cfu/100ml)	<i>cpe</i>	<i>cpe/cpa</i> (%)	菌数 (cfu/100ml)	<i>cpe</i>	<i>cpe/cpa</i> (%)
1	2024/5/20	19.0	7	1	1	100	4	2	50.0
1	2024/10/13	19.6	7	4	0	0	1	0	0
2	2024/5/20	22.8	8	9	0	0	13	0	0
2	2024/10/13	23.2	7	8	0	0	17	3	17.6
2	2024/11/5	ND	7	6	1	16.7	11	2	18.2
2	2024/12/7	14.6	8	10	0	0	16	1	6.3

図5 定点観測地（水ポイント10）におけるウェルシュ菌の分離と *cpe* 陽性菌の分離頻度

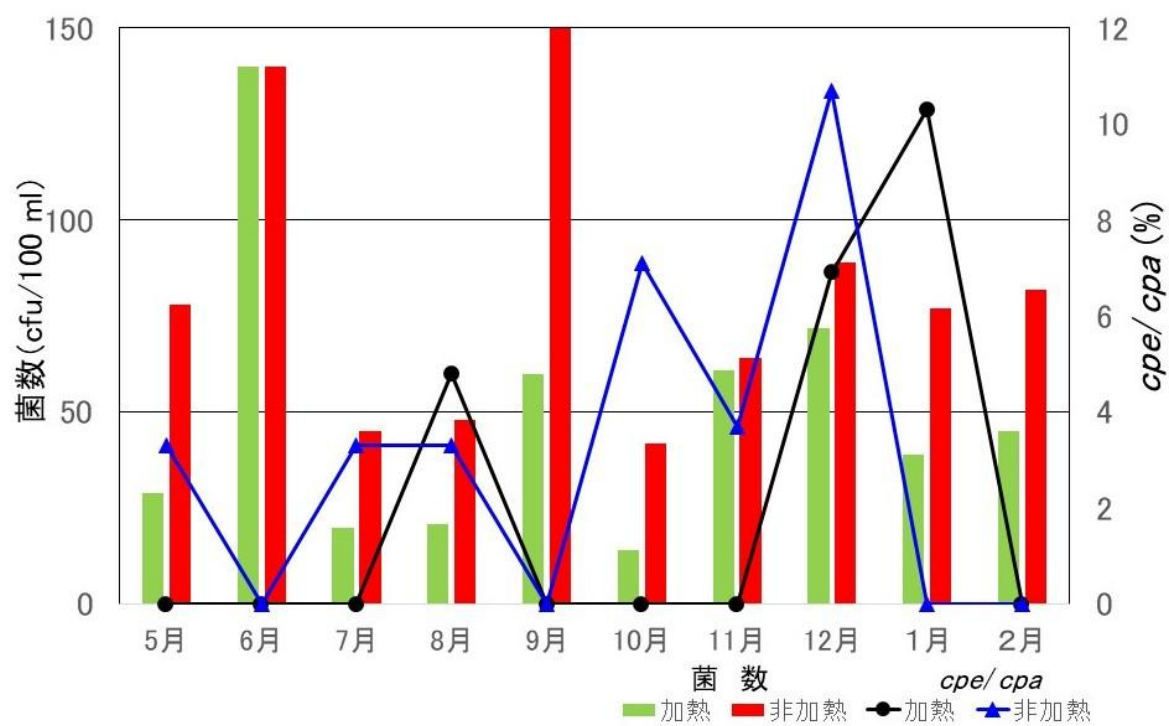


図6 下水処理場からの排水中のウェルシュ菌の分離菌しいと *cpe* 陽性菌の分離頻度

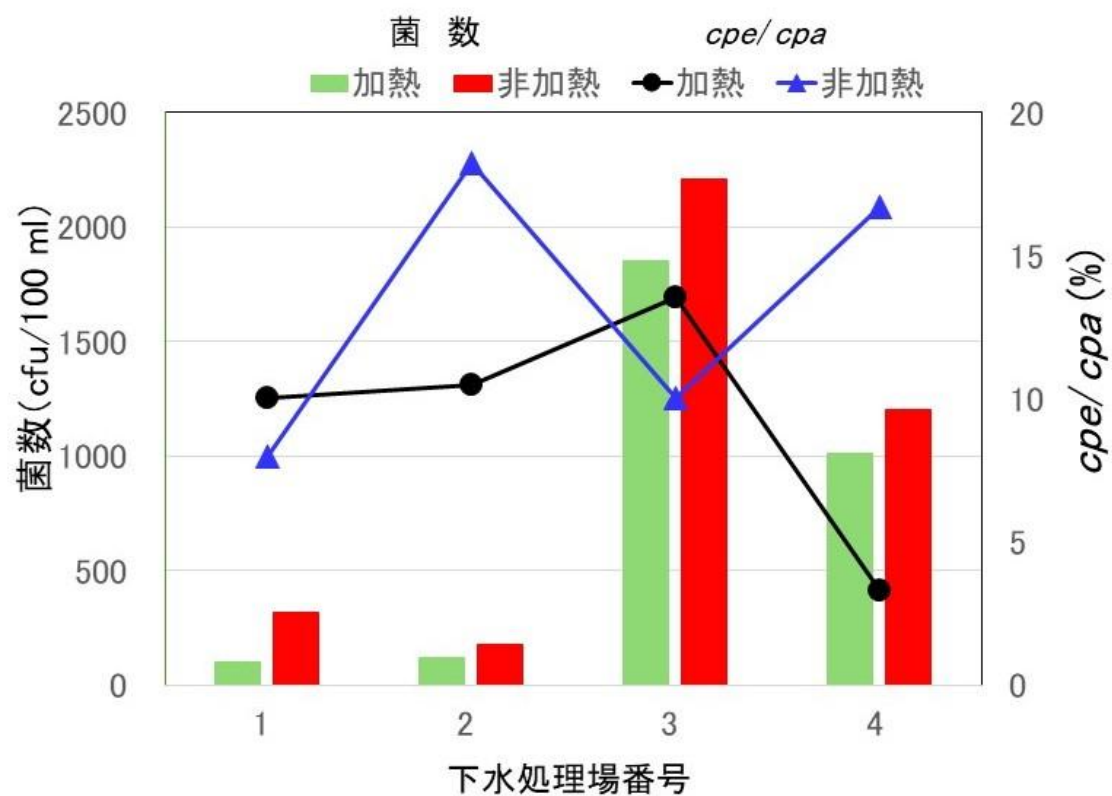
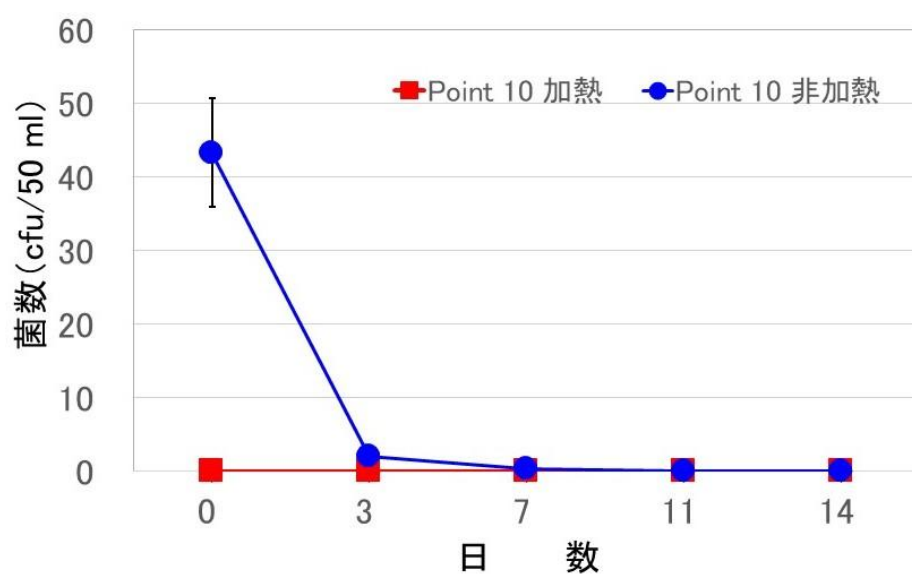
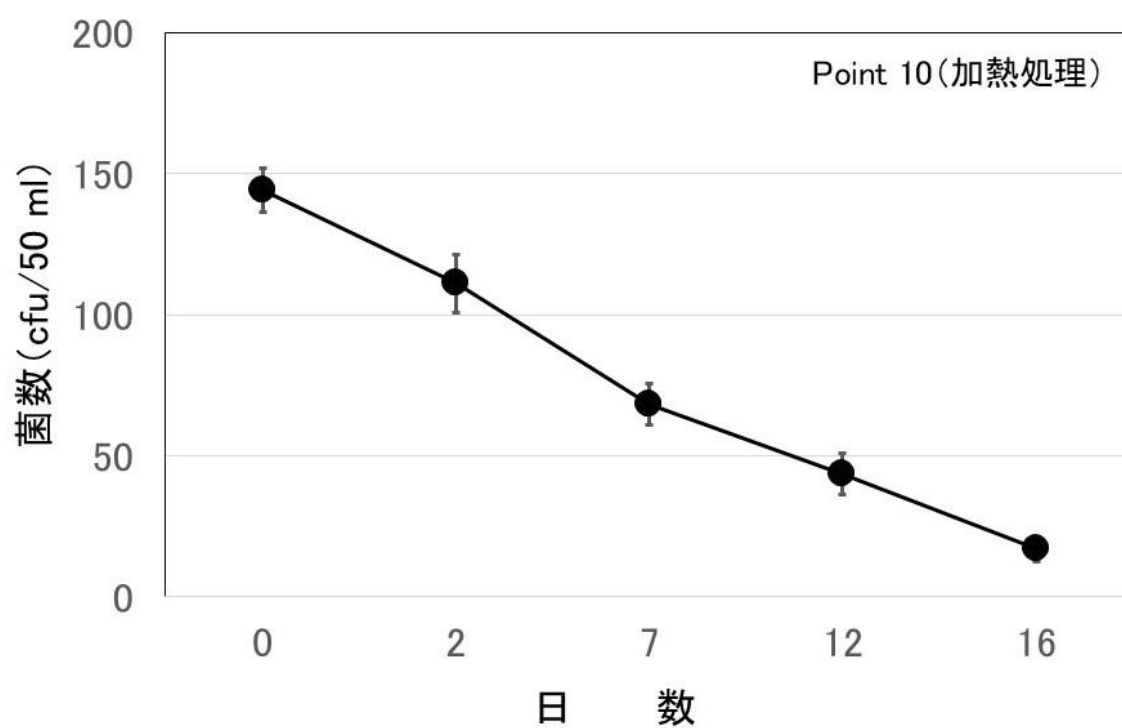


図7 *cpe* 陽性菌（栄養型）の河川水中で生存性



採水ポイント 10 の河川水をろ過滅菌して *cpe* 陽性菌（栄養型）を懸濁。  
20℃、好気条件下で静置した菌液 50ml 中の生菌数をフィルター法で測定。

図8 *cpe* 陽性菌（芽胞）の河川水中での生存性



採水ポイント 10 の河川水をろ過滅菌して *cpe* 陽性菌（芽胞）を懸濁。  
20℃、好気条件下で静置した菌液 50ml 中の生菌数をフィルター法で測定。

表 2 K 水系河口のカキからの *cpe* 陽性菌の分離

採材 ポイント	採材日	加熱				非加熱			
		増菌液 PCR		コロニー PCR		増菌液 PCR		コロニー PCR	
		<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>
2	2024/10/13	+	—	15	0	ND	ND	ND	ND
2	2024/10/13	+	—	14	0	ND	ND	ND	ND
2	2024/11/5	+	—	6	0	+	+	40	0
2	2024/12/7	+	+	47	2	+	+	47	0



表 3 K 水系河口の川砂からの *cpe* 陽性菌の分離

採材 ポイント	採材日	加熱		
		菌数 (cfu/g)	<i>cpe</i>	<i>cpe/cpa</i> (%)
2	2024/11/5	46	0	0
2	2024/11/5	37	5/13	38.5
2	2024/12/7	331	2/30	6.7

