

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）

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

食中毒菌として最も重要な1つであるウエルシュ菌について、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品や、個々の食中毒事例のエンテロトキシン産生株の由来について、明らかにすることが多い。そこで本研究では、国産食品でのウエルシュ菌汚染実態調査および分離菌株の分子疫学解析を実施し、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食中毒原因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、これまでの2年間の調査結果から、エンテロトキシン産生株の分布傾向が強いと考えられた畑土壌として25市販品の国産野菜に付着する土を回収し、菌株分離実験に供試した。また下水処理場放流水の河川流入域の表層水およびその下流の河川河口部の底泥を含む水をそれぞれ1カ所から採取し、菌株分離実験に供試した。さらに、本研究班でのこれまでの分離株および過去に分離された食中毒患者由来等のcpe陽性ウエルシュ菌75株の全ゲノムシーケンスを行い、cgMLSTに基づく分子疫学解析を行った。その結果、野菜付着土壌、下水処理場放流水の河川流入域表層水および河川河口部の底部の水いずれからもcpe陽性の生菌が検出された。またcgMLSTの結果、いくつかの食品や環境由来菌株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であり、分子疫学的に関連がある可能性が考えられた。従来、主なウエルシュ菌食中毒の原因と目されてきた肉類でなく、農作物や海産物を中心とした食品や、畑土壌や水系の環境食品や環境がウエルシュ菌食中毒原因菌の汚染源や由来となる可能性があり、大規模な菌の収集と分子疫学解析を今後も継続して検討する必要性が示された。

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、世界各国でウエルシュ菌食中毒を引き起こしている。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ことから、最も重要な食中毒菌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、現状ではエンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPE) 産生株のみが食中毒の原因となると考えられている。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・毒素 (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPA = ホスホリパーゼ C 遺伝子) があるが、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て、ウエルシュ菌株の分離・収集、および菌株を用いた分子疫学解析を実施している。昨年度までの検討では、エンテロトキシン産生遺伝子 (*cpe*) 陽性株は、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。一方で、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。今年度は、これらの結果を受け、エンテロトキシン産生株の分布傾向が強いと考えられた畑土壌として市販国産野菜に付着する土、下水処理場放流水の河川流入域の表層水、およびその下流の河川河口部の底泥からの *cpe* 陽性菌株分離を試みた。さらに、本研究班で今年度までに分離した菌株、および過去に分離された食中毒患者由来株等を収集して、全ゲノムシーケンスを行い、cgMLST に基づく分子疫学解析を行った。これらの成果を報告する。

B. 研究方法

[1] 菌株分離実験の供試検体

土付きジャガイモ 14、土付きニンジン 10、土付きエダマメ 1 (いずれも国産) の計 25 検体を小売店から購入し、付着する土を回収した。また、川崎市内の多摩川の下水処理場放流水の河川流入域の表層水

およびその下流の河口部の底泥をそれぞれ 1 カ所から採取し、菌株分離に供試した。

〔2〕 土壌からの菌分離

野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（日本製薬株式会社）を加え、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。

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* および *cpa* の保有状況を確認した。増菌培養液 100 μ L 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 μ L 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 μ L 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'-GCTAATGTTAC TGCCGTTGA-3')、multi-*cpa*-R (5'-CCTCTGATACATCGTGTAAAG-3')、multi-*cpe*-F (5'-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3')、multi-*cpe*-R (5'-GGACCAGCAGTT GTAGATA-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 5~30 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。

〔3〕水からの菌分離

神奈川県川崎市内下水処理場放流部の多摩川の表層水、およびこれより下流の神奈川県川崎市内多摩川河口部の底泥を含む底付近水の各 1 カ所から、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」（平成 19 年 3 月 30 日）（健水発第 0330006 号）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 B-〔2〕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。

〔4〕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 75 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、ゲノムライブラリを作製し、i-Seq または MiSeq（illumina 株式会社）を用いて全ゲノムシーケンスを行った。塩基配列解析ソフトウェア CLC Genomics Workbench（Qiagen 株式会社）を用いて出力されたリードのアセンブリを行い、ゲノム DNA 塩基配列のテキストデータを得た。この配列データを微生物の遺伝子解析プラットフォーム PubMLST を使用してデータベースと照合し、各菌株の 1431 遺伝子座それぞれにおいて

allele のタイプを番号化して割り当てた Multilocus sequence typing (MLST) を判定して、allele プロファイルを得た。これに基づき、CLC Genomics Workbench を用いて、Minimum Spanning Tree を作製し、菌株間の系統関係を推定した。

C. 研究結果

[1] 野菜付着土壌からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

野菜付着土壌からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌検出結果を表 2 に示した。平板で塗抹培養しない増菌培養液から直接抽出した DNA をテンプレートにした PCR では、ジャガイモ土では 14 検体中 2 検体 (14.3%)、ニンジン土では 10 検体中 2 検体 (20.0%) から *cpe* が検出された。エダマメ土 1 検体からは非検出であった。増菌培養液を平板に塗抹培養して分離されたコロニーでは、ニンジン土では 10 検体中 1 検体 (10.0%) から *cpe* が検出された一方で、増菌培養液からの直接抽出物では *cpe* が陽性となった検体を含むジャガイモ土およびエダマメ土では全検体由来の全コロニーで *cpe* は陰性であった。ニンジン土の *cpe* 陽性検体において、CCP 平板に生育したコロニー 10 個中 3 (30.0%) で *cpe* が検出された。昨年度調査結果における野菜付着土

壌での CCP 平板上の *cpe* 陽性コロニーの出現頻度と比較すると、ゴボウ土で 20 個中 15 (75.0%)、ジャガイモ土で 20 個中 1 (5.0%)、長ネギ土 *cpe* 陽性検体では 32 個中 1 (3.1%) であり、検体間での頻度の変動幅は大きく、野菜畑土壌中の *cpe* 陽性株の出現頻度は様々な要因に影響を受ける可能性が示された。

[2] 河川で採取した水での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

下水処理場放流部表層水および河川底泥を含む水での *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表層水では 1,042.5 cfu/L、河川底泥を含む水では 656.7 cfu/L であった。昨年度の調査に引き続き、下水処理場放流水の河川流入部付近の水では *cpe* 陽性菌数が下流よりも高い傾向があった。また多摩川河川水では、昨年度調査では表層水から *cpe* 陽性菌は検出限界以下であったが、今年度調査では検出され、川底に近い部位では *cpe* 陽性菌が分布する可能性が示唆された。

[3] 分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析

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・今年度に分離した環境お

および食品由来、および過去に分離された患者由来の *cpe* 陽性ウエルシュ菌 75 菌株（表 1）の、cgMLST プロファイルを指標として作製した Minimum Spanning Tree を図 1 に示した。その結果、患者由来株のみで構成されたクラスターは存在したが、今回解析した食中毒事例とは関連の無い市販食品由来菌株の中で、食中毒患者由来株と ST が 1431 遺伝子中 15 個以下（過去の研究より確認した、同一の集団食中毒事例内で分離された菌株間での最大の異なる ST 数）のみ異なる菌株（図 1：市販煮干し由来株 CP-2024-42、市販生カキ由来株 CP2023-0H-7）、または、食中毒患者由来株と ST が 1431 遺伝子中 17 個のみ異なる菌株（図 1：市販そば粉由来株 CP-2024-56-2）が存在し、同一の集団食中毒事例内での菌株間と同程度に、食中毒患者由来株と類似した allele のタイプを持つ海産物または乾物食品由来株が複数存在した。

D. 考察

今年度の検討結果から、昨年度に引き続き、野菜付着土壌および下水処理水放流部付近や河川において、*cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布が示された。これまで 2 年間の検討結果から、日本国内においては、肉類以外

の食品に、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であること、また河川や海洋の沿岸部、農作物畑土壌などで菌の汚染が起こっている可能性が考えられた。

分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析の結果、患者由来株のみで構成されたクラスターは存在したが、一方で、いくつかの海産物または乾物食品由来株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であると言え、分子疫学的に関連がある可能性が考えられた。一方で、これらの株の由来の偏りや傾向は、現状のデータセットと解析法では確認されなかった。これらのことから、食品の種類などによって、ウエルシュ菌食中毒のリスクの偏りや傾向を把握することはできなかったが、一方で、従来、主なウエルシュ菌食中毒の原因と目されてきた肉類でなく、農作物や海産物を中心とした食品や、畑土壌や水系の環境食品や環境が、ウエルシュ菌食中毒原因菌の汚染源や由来となる可能性が十分に残されていると言え、大規模な菌の収集と分子疫学解析を今後も継続して検討する必要性が高いことが示された。すなわち、収集した分離株のジェノタイピングや分子系統解析による疫学解析を

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できると考えられた。

E. 結論

今年度は、昨年度に引き続き、野菜付着土壌および下水処理場放流水の河川流入域付近表層水やその下流の河口部底泥を含む水から *cpe* 陽性ウエルシュ菌株を分離した。このことから、土壌や河川は、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。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分子疫学解析を行った。その結果、いくつかの食品や環境由来菌株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であることが示された。従来、主なウエルシュ菌食中毒の原因と目されてきた肉類でなく、農作物や海産物を中心とした食品や、畑土壌や水系の環境が、ウエルシュ菌食中毒原因菌の汚染源や由来となる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Sasaki S., Hara-Kudo Y., Kojima Y., Misawa N., Okabe N.: Contamination of Japanese retail foods with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* spores. J. Food Protect. 2025. 88:100429.

2. 学会発表

国内の市販食品および動物の腸内容物におけるエンテロトキシンの遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染状況. 大西貴弘、渡辺麻衣子、淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、佐々木賢美、工藤由起子、小嶋由香、三澤尚明、岡部信彦. 第45回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 09. 06) ヒト・食品・環境から分離された *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分子疫学的解析. 淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、小嶋由香、渡辺麻衣子、大西貴弘、工藤由起子、三澤尚明、岡部信彦. 第45回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 09. 06)

H. 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一覧

No.	シーケンスデータサンプル	サンプルの由来
1	CP2023-WA-1-2	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
2	CP2023-WA-2-1	下水処理場排水口付近採取の矢上川の表層水
3	CP2023-WA-3-1	多摩川の川底泥を含む水
4	CP2023-WA-3-2	多摩川の川底泥を含む水
5	CP2023-SO-13-1	市販野菜付着土（ゴボウ）
6	CP2023-SO-19-1	市販野菜付着土（ジャガイモ）
7	miyazaki2022-6-4-1	市販しじみ
8	miyazaki2022-6-7-4	市販しじみ
9	miyazaki2022-6-12-1	市販生カキ
10	miyazaki2022-6-13-10	市販あさり
11	miyazaki2022-8-14-2	市販カレーパウダー
12	miyazaki2022-26-1-1	市販しじみ
13	CP2023-OH-1	市販生カキ
14	CP2023-OH-2	市販カレーパウダー
15	CP2023-OH-3	市販チリパウダー
16	CP2023-OH-4	市販カレーパウダー
17	CP2023-OH-5	市販カレーパウダー
18	CP2023-OH-6	市販カレーパウダー
19	CP2023-OH-7	市販生カキ
20	CP2023-OH-8	市販桜エビ
21	CP2023-OH-9	市販たたみいわし
22	K-9-4	鶏分離株
23	K-12-6	鶏分離株
24	K-CLO-011	食中毒分離株
25	A-60	食中毒分離株
26	A-61	食中毒分離株
27	O-1	食中毒患者便
28	O-2	食中毒患者便
29	O-5	牛直腸スワブ
30	O-6	牛直腸スワブ
31	O-8	ヒト糞便
32	O-9	ヒト糞便
33	O-10	ヒト糞便
34	O-12	ヒト糞便
35	O-13	食中毒事例食品（干しシイタケ）
36	O-15	食中毒由来株（詳細不明）
37	O-16	ヒト糞便
38	O-17	ヒト糞便
39	O-18	ヒト糞便
40	O-20	ヒト糞便

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一覧・続

No.	シーケンスデータサンプル	サンプルの由来
41	W24008	患者便
42	W24010	患者便
43	W24016	患者便
44	W24018	患者便
45	CP2024-WA-4-1	多摩川の川底泥を含む水
46	CP2024-WA-4-5	多摩川の川底泥を含む水
47	CP2024-WA-4-8	多摩川の川底泥を含む水
48	CP2024-SO-35-1	市販野菜付着土（ニンジン）
49	CP2024-WA-5-1	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
50	CP2024-WA-5-2	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
51	CP2022-DR49-6	市販乾燥小えび
52	miyazaki2022-6-2-10	市販あさり
53	miyazaki2022-8-19-5	市販カレーパウダー
54	miyazaki2022-27-11-8	市販昆布
55	CP2023-WA-1-1	下水処理場排水口付近採取の多摩川の表層水
56	CP-2019-07	発症者
57	CP-2019-09	発症者
58	CP-2019-10	発症者
59	CP-2019-11	発症者
60	hoka35-2023	発症者
61	hoka36-2023	発症者
62	hoka37-2023	発症者
63	hoka38-2023	発症者
64	hoka39-2023	発症者
65	hoka5-2023	発症者
66	hoka7-2023	発症者
67	hoka9-2023	発症者
68	CP-2023-02	発症者
69	CP-2023-56	発症者
70	CP-2016-12	発症者
71	CP-2023-01-20	市販カレーパウダー
72	CP-2022-09	発症者
73	CP-2023-80	市販煮干し
74	CP-2024-42	市販煮干し
75	CP-2024-56-2	市販そば粉
76	CP-2024-94	市販干しえび
77	CP-2022-08	発症者

表2 野菜付着土壌での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査結果

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)		
ジャガイモ土	14	2	(14.3%)	0	(0.0%)	0/30 (0.0%)
ニンジン土	10	2	(20.0%)	1	(10.0%)	3/10 (30.0%)
エダマメ土	1	0	(0.0%)	0	(0.0%)	0/30 (0.0%)
合計	25	4	(12.0%)	3	(12.0%)	—

表3 河川水における *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)
多摩川	等々力水処理センター放流部 表層水	1,042.5
多摩川	川崎市川崎区殿町付近 川底泥を含む水	656.7

