

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

二枚貝におけるウエルシュ菌の汚染調査

研究分担者 大島 千尋 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

研究要旨

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、芽胞を形成しエンテロトキシンを產生する偏性嫌気性菌であり、食中毒の原因菌として知られている。特に、原因食品が特定できない食中毒事例が多く、食中毒発生防除のための基礎データが不足していることが課題となっている。本研究では、過去の研究において高いウエルシュ菌汚染が明らかとなった二枚貝について、より詳細に汚染実態を把握するため、異なる種類および産地の二枚貝 62 検体を対象に、ウエルシュ菌およびその毒素産生株（エンテロトキシン産生ウエルシュ菌）の調査を行った。調査の結果、62 検体中 36 検体 (58.1%) からウエルシュ菌が、うち 4 検体 (6.5%) からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。特にムラサキイガイの検出率が高く、また、季節や貝種、産地によって汚染率に差がみられた。そのほか、PCR によるスクリーニング検査において、ヒオウギガイの一部検体で偽陰性が生じる可能性が示唆され、検査手法の見直しも課題として浮上した。本研究は、ウエルシュ菌のリスク評価および食中毒防止対策の基礎資料として有用な知見を提供するものである。

A. 研究目的

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、芽胞形成能を持つ偏性嫌気性の桿菌である。芽胞形成時にエンテロトキシンを產生し、ヒトがそのエンテロトキシンを含む食品を喫食すると、腹痛や下痢などの食中毒症状が現れる。ウエルシュ菌を原因とした食中毒は、毎年 1000 人ほ

どの患者が報告されており、減少傾向にない。多くのウエルシュ菌食中毒事例では原因となる食事を明らかにできた場合でも、原因食材を同定できない事例が多く、また食中毒の原因となるエンテロトキシン産生株の主たる汚染食品が明らかになっていないことから、飲食店等へウエルシュ菌食中毒の発生防止に向けた効果的な指導

を行うための基礎的なデータが不足している。これが、ウエルシュ菌食中毒の発生を防止できない一因になっていると考えられる。そのため、効果的な食中毒発生防止措置のためには、エンテロトキシン產生ウエルシュ菌による汚染食品の種類や汚染経路を明らかにする必要があった。昨年度までの研究において、畜産物、水産物、野菜、香辛料におけるウエルシュ菌の大規模な汚染実態調査が実施された。その結果、水産物のウエルシュ菌やエンテロトキシン產生ウエルシュ菌汚染率は畜産物や野菜よりも高いことが明らかとなった。特に、貝類のエンテロトキシン產生ウエルシュ菌による汚染率が高かった。そこで本課題では、二枚貝のウエルシュ菌およびエンテロトキシン產生ウエルシュ菌汚染率を調査した。異なる産地の二枚貝を一定期間経時的に調査することで、生産方法や貝種、産地の違いによる汚染率の違いを明らかにすることを目標とした。

B. 研究方法

[1] 検体

調査は、アサリ（3検体）、ハマグリ（4検体）、ヒオウギガイ（7検体）、ホタテガイ（28検体）、ホンビノスガイ（2検体）、マガキ（2検体）、ムラサキイガイ（16検体）を対象とした。ヒオウギガイ、ホタテガイ、ムラサキイガイについては、特定の生産地から継時的（5—8月、隔週）にサンプルを購入し調査に用いた（表1）。これ

らの検体の多くは、生産海域から直接入手したが一部の検体については神奈川県内の市場にて購入した。検体は貝がへい死しないよう、氷冷もしくは冷蔵下で輸送し試験に供した。

[2] 検査手順

検査手順を図1に示す。貝を開殻し、検体の軟体部25gを無菌的に細断してストマッカー袋に採取した。ストマッカー袋にチオグリコレート培地（島津ダイアグノスティクス）を225mL加え、1分間、ストマッカー処理した。その後、70°Cで20分間加熱して急冷したものについて42°Cで22～24時間、増菌培養を行なった。培養後、培養液1mlを集菌して上清を取り除き培養液のペレットを得た。得られたペレットからは、Nucleo spin tissue kit（タカラバイオ）を用いてDNA抽出し、以降のPCR検査に使用した。また、培養液をCHROMagar perfringens培地（CHROMagar）に画線し、37°Cで24時間培養した。培養後、ウエルシュ菌であることを示すオレンジ色のコロニーを各検体から8個釣菌し、単離した。単離したコロニーは、チオグリコレート培地で培養し、培養液からペレットを調整した。ペレットからは、Nucleo spin tissue kitを用いてDNAを抽出し、以降のPCR検査に供した。

[3]エンテロトキシン産生ウエルシュ菌のPCR検査

培養液および分離したコロニーから抽出したDNAを対象に、ウエルシュ菌の α 毒素をコードするCPA遺伝子(*cpa*)およびエンテロトキシンをコードするCPE遺伝子(*cpe*)の有無を確認した。

*cpa*および*cpe*を検出するPCRはGuranらの方法を参考にして行った。(H. S. Guran et. al., Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 77-82)。このPCRで対象とした遺伝子とそのプライマーを表2に示す。PCRは、200 μ Lの反応チューブで行った。反応液は、Takara Ex Taq Buffer 12.5 μ L、それぞれのプライマー(表2)を0.2 μ Mずつ、DNAテンプレート5 μ Lから成り、PCRグレードの精製水で最終容量を25 μ Lに調整した。反応は、95°C、2分の後、95°C、30秒、55°C、30秒、72°C、30秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72°C、5分の反応を行った。反応終了後、2%のアガロースゲルを用いた電気泳動に*cpa*および*cpe*の増幅産物と一緒にPCR産物5 μ Lを供し、324 bpのバンドが検出された場合*cpa*陽性、233 bpのバンドが検出された場合*cpe*陽性と判定した。

C. 研究結果

[1]貝種別および产地別のウエルシュ菌検出結果

本研究では、*cpa*が検出された場合にその分離株をウエルシュ菌、*cpe*が検出された場合にその分離株をエンテロトキシン産生ウエルシュ菌と判断した。同様に、増菌培養液のペレットから*cpa*が検出された場合にその検体をウエルシュ菌陽性、*cpe*が検出された場合にその検体をエンテロトキシン産生ウエルシュ菌陽性と判断した。分離株もしくは増菌培養液からそれぞれの遺伝子が検出された場合、その検体をウエルシュ菌もしくはエンテロトキシン産生ウエルシュ菌陽性と判定した。

調査に使用した検体のうち、アサリ2検体(66.7%)、ハマグリ1検体(25.0%)、ホンビノスガイ1検体(50.0%)、マガキ1検体(50.0%)、ヒオウギガイ5検体(71.4%)、ムラサキイガイ14検体(87.5%)、ホタテガイ12検体(42.9%)からウエルシュ菌が検出された。また、ヒオウギガイ1検体(14.3%)、ムラサキイガイ2検体(12.5%)、ホタテガイ1検体(3.6%)からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された(表3)。

[2]ホタテガイおよびムラサキ

イガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

複数の産地から一定数以上の検体を採取したホタテガイおよびムラサキイガイについて、産地別にウエルシュ菌およびエンテロトキシン产生ウエルシュ菌の検出結果を比較した（表4）。各地のホタテガイのウエルシュ菌陽性率は産地Bが12.5%（1/8）、産地Dが62.5%（5/8）、産地Iが20.0%（1/5）、産地Kが71.4%（5/7）であった。エンテロトキシン产生ウエルシュ菌は産地B、D、Iでは検出されなかつたが、産地Kでは7検体中1検体から検出され、陽性率は14.3%であった。同様にムラサキイガイのウエルシュ菌およびエンテロトキシン产生ウエルシュ菌の検出結果を産地別に比較すると、産地Dおよび産地Kの陽性率は87.5%（7/8）であった。エンテロトキシン产生ウエルシュ菌は産地Dのムラサキイガイからは検出されなかつたが産地Kのムラサキイガイからは25.0%（2/8）の陽性率で検出された。

[3] 時期別および産地別のウエルシュ菌検出結果

一定の期間継続して調査を実施したホタテガイ、ムラサキイガイ、ヒオウギガイについて月別のウエルシュ菌およびエンテロトキシン

产生ウエルシュ菌の検出結果を比較した（表5）。ホタテガイについては出荷前に畜養されている産地Iのデータを除いてまとめた。ホタテガイのウエルシュ菌検出結果は、5月が80.0%（4/5）、6月が66.7%（4/6）、7月が42.9%（3/7）、8月が0%（0/5）であった。ホタテガイのエンテロトキシン产生ウエルシュ菌は、5月に5検体中1検体（20.0%）から検出され、他の月には検出されなかつた。ムラサキイガイのウエルシュ菌検出結果は、5月が66.7%（2/3）、6月が80.0%（4/5）、7月が100%（5/5）、8月が100%（3/3）であった。ムラサキイガイのエンテロトキシン产生ウエルシュ菌は、6、7月に5検体中1検体（20.0%）から検出され、他の月には検出されなかつた。ヒオウギガイは5月下旬から8月上旬まで2週毎に実施した。その結果、ウエルシュ菌は、5月下旬から7月下旬まで検出され、エンテロトキシン产生ウエルシュ菌は6月上旬の検体から検出された。

[4] 同じ海域で生産されたホタテガイとムラサキイガイのウエルシュ菌検出結果

本課題では、産地Dおよび産地Kのサンプルにおいて、同一の海域で生産されたホタテガイとムラサ

キイガイを調査したため、それらのウエルシュ菌およびエンテロトキシン产生ウエルシュ菌の検出結果を比較した（表 6）。産地 D の検体は 5 月上旬から 8 月下旬にかけて 8 回調査を実施し、4 回は両貝から、1 回はホタテガイのみから、3 回はムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出された。ムラサキイガイのみからの検出は 7 月下旬から 8 月下旬に集中していた。産地 D の検体からはエンテロトキシン产生ウエルシュ菌は検出されなかった。産地 K の検体は 5 月上旬から 8 月下旬にかけて 7 回調査を実施し、5 回は両貝から、2 回はムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出された。ホタテガイからのみ検出されることはなかった。エンテロトキシン产生ウエルシュ菌は、ホタテガイのみから検出されたことが 1 回、ムラサキイガイのみから検出されたことが 2 回あった。

[5] 増菌培養液の PCR 結果とウエルシュ菌分離結果の比較

チオグリコレート培地を増菌培養した後の集菌ペレットについてウエルシュ菌およびエンテロトキシン产生ウエルシュ菌の検出 PCR を行い、分離株の調査結果と比較した（表 7）。ウエルシュ菌の検出

結果について、増菌培養液と分離株の PCR 結果が異なったケースは全部で 10 件あり、そのうち 1 件は増菌培養液が陽性であるのにウエルシュ菌が分離されなかった。これはムラサキイガイの調査であった。残りの 9 件はウエルシュ菌が分離されているものの増菌培養液の PCR 結果はウエルシュ菌陰性を示した。9 件の検体の内訳は、ヒオウギガイ 5 件、ホタテガイ 3 件、ムラサキイガイ 1 件であった。エンテロトキシン产生ウエルシュ菌の検出結果について、増菌培養液と分離株の PCR 結果が異なったケースは全部で 2 件あり、それらは増菌培養液の PCR 結果はエンテロトキシン产生ウエルシュ菌陽性を示したもの、エンテロトキシン产生ウエルシュ菌を分離できなかった。2 件は、ホタテガイおよびムラサキイガイが 1 件ずつであった。

D. 考察

今年度調査を行った 62 検体の二枚貝のうち、36 検体からウエルシュ菌が検出され、多くの二枚貝がウエルシュ菌に汚染されていることが明らかになった。また、ヒオウギガイ、ムラサキイガイ、ホタテガイからエンテロトキシン产生ウエルシュ菌が検出されており、これらの貝

種がエンテロトキシン産生ウエルシュ菌に汚染されることがあると明らかになった。よって、調理方法によってはこれらの貝種がウエルシュ菌食中毒の原因となる可能性が示された。

ホタテガイのウエルシュ菌検出結果を産地別に比較すると、産地 B、I の検出率が低く、産地 D および K の検出率が高かった。貝類が生息する海水中にウエルシュ菌が存在すると、貝が海水を取り込む際にともに体内に取り込まれると考えられるが、本研究の結果、産地により汚染率が異なっていることから、貝の生産海域によりウエルシュ菌汚染度合いに差があり、それが貝のウエルシュ菌検出率の違いにつながった可能性が考えられた。また、産地 I のホタテガイは出荷前に蓄養されていることから、その間にウエルシュ菌が貝内から排出されている可能性も考えられた。ムラサキイガイについては、ホタテガイでもウエルシュ菌汚染率の高かった産地 D および産地 K の検体を調査対象としたことから、ウエルシュ菌汚染率が高くなったと考えられた。

5月から8月の調査期間中、一定数以上の検体を集められた貝種については、月別にウエルシュ菌の検出率を比較した。その結果、ホタテ

ガイにおいては5月の検出率をピークに徐々に減少し、8月になるとウエルシュ菌が検出されなくなつた。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌についても5月の検体からのみ検出されていた。このことから、ホタテガイにおいては一度ウエルシュ菌を取り込んだ場合でも成長もしくは季節変化によりウエルシュ菌が排出される可能性が考えられた。ムラサキイガイにおいては、5月のウエルシュ菌検出率が最も低く、徐々に増加して7、8月はすべての検体からウエルシュ菌が検出された。このことから、ムラサキイガイはホタテガイとは異なり、一度貝内に取り込まれたウエルシュ菌が排出されにくく、蓄積されていった可能性が考えられた。ヒオウギガイについては、5月下旬から7月下旬にかけて検出されていたものの7月末および8月下旬には検出されなかつたことから、ホタテガイのように季節変化や成長過程により汚染されたウエルシュ菌が排出された可能性が考えられた。

本課題では産地 D および産地 K のホタテガイ、ムラサキイガイについて同一の海域で生産されたものを検体とした。そのため、同一日に同一海域から採取した2種についてウエルシュ菌検出結果を比較した。

産地 Dにおいては、7月上旬までは両貝からウエルシュ菌が検出されることが多く、7月下旬以降はムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出されることが多かった。産地 Kにおいても、調査期間の後半にムラサキイガイのみからウエルシュ菌が検出されるケースが散見されたことから、同一の海域で生産された貝であっても貝種によってウエルシュ菌汚染度には差があることが明らかとなった。また、夏に向けてホタテガイからはウエルシュ菌が排出され、ムラサキイガイのウエルシュ菌はそのまま保持される傾向にあることが示唆された。

チオグリコレート培地の増菌液を *cpa* および *cpe* の PCR に供しウエルシュ菌およびエンテロトキシン产生ウエルシュ菌のスクリーニングを行った結果と、各分離株の検出状況を比較した。その結果、特にヒオウギガイを対象とした試験において、増菌培養液のスクリーニング PCR 検査が陰性を示すのにウエルシュ菌が分離されるケースが多くなった。この結果から、ヒオウギガイにおいては PCR スクリーニングの結果が偽陰性になることが多く、ヒオウギガイの成分が PCR を阻害している可能性が示唆された。そのため、本課題で用いた方法でスクリ

ーニング検査を行う場合には、DNA 抽出や PCR に使用する試薬、PCR 条件について検討する必要があると言えた。

E. 結論

本年度から、二枚貝のみを対象としたウエルシュ菌およびエンテロトキシン产生ウエルシュ菌の汚染調査を実施した。調査に用いたすべての貝種からウエルシュ菌が、一部の貝種からエンテロトキシン产生ウエルシュ菌が検出されていることから、二枚貝はこれらに汚染される可能性があると明らかになった。月別、産地別の調査結果から、時期や貝種、産地によってウエルシュ菌汚染率が異なることも明らかとなり、本研究の成果が今後の二枚貝のウエルシュ菌汚染防除を検討する際に重要な知見になりうると考えられた。

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

なし

表1 調査した検体の詳細

サンプル	検体数	生産地域
アサリ	3	A, F
ハマグリ	4	C, G
ヒオウギガイ	7*	E
ホタテガイ	28*	B, D, I, K
ホンビノスガイ	2	G
マガキ	2	D, J
ムラサキイガイ	16*	D, K

*特定の产地から継続して購入

表2 *cpa/cpe* 検出プライマー

標的遺伝子	配列 (5' →3')	増幅産物サイズ (bp)
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324
	CCTCTGATACATCGTGTAAAG	
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG	233
	GGACCAGCAGTTGTAGATA	

表3 貝種別ウエルシュ菌検出結果

サンプル	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率 (%)	陽性率(検体数)	陽性率 (%)	陽性率(検体数)
アサリ	66.7	2/3	0	0/3
ハマグリ	25.0	1/4	0	0/4
ホンビノスガイ	50.0	1/2	0	0/2
マガキ	50.0	1/2	0	0/2
ヒオウギガイ	71.4	5/7	14.3	1/7
ムラサキイガイ	87.5	14/16	12.5	2/16
ホタテガイ	42.9	12/28	3.6	1/28

表4 ホタテガイおよびムラサキイガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

a. ホタテガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

産地	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン產生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率 (%)	陽性率(検体数)	陽性率 (%)	陽性率(検体数)
B	12.5	1/8	0	0/8
D	62.5	5/8	0	0/8
I	20.0	1/5	0	0/5
K	71.4	5/7	14.3	1/7

b. ムラサキイガイの産地別ウエルシュ菌検出結果

産地	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン產生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率 (%)	陽性率(検体数)	陽性率 (%)	陽性率(検体数)
D	87.5	7/8	0	0/8
K	87.5	7/8	25.0	2/8

表5 ホタテガイ、ムラサキイガイおよびヒオウギガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

a. ホタテガイの時期別ウエルシュ菌検出結果(産地B, D, Kのまとめ)

採取月	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率(検体数)	陽性率(%)	陽性率(検体数)	陽性率(%)
5月	4/5	80.0	1/5	20.0
6月	4/6	66.7	0/6	0
7月	3/7	42.9	0/7	0
8月	0/5	0	0/5	0

b. ムラサキイガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

採取月	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)		エンテロトキシン産生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	
	陽性率(検体数)	陽性率(%)	陽性率(検体数)	陽性率(%)
5月	2/3	66.7	0/3	0
6月	4/5	80.0	1/5	20.0
7月	5/5	100	1/5	20.0
8月	3/3	100	0/3	0

c. ヒオウギガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

時期	ウエルシュ菌陽性		エンテロトキシン産生	
	(<i>cpa</i> 陽性)	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)	ウエルシュ菌陽性	(<i>cpe</i> 陽性)
5月下旬	+			ND
6月上旬	+		+	
6月下旬	+			ND
7月上旬	+			ND
7月下旬	+			ND
7月末	ND			ND
8月下旬	ND			ND

表6 同じ海域で生産されたホタテガイ、ムラサキイガイの時期別ウエルシュ菌検出結果

産地	採取月	ウエルシュ菌陽性 (<i>cpa</i> 陽性)	エンテロトキシン產生 ウエルシュ菌陽性 (<i>cpe</i> 陽性)
D	5月上旬	○	-
D	5月下旬	ホタテガイのみ	-
D	6月上旬	○	-
D	6月下旬	○	-
D	7月上旬	○	-
D	7月下旬	ムラサキイガイのみ	-
D	8月上旬	ムラサキイガイのみ	-
D	8月下旬	ムラサキイガイのみ	-
K	5月下旬	○	ホタテガイのみ
K	6月上旬	○	ムラサキイガイのみ
K	6月下旬	○	-
K	7月上旬	ムラサキイガイのみ	ムラサキイガイのみ
K	7月上旬	○	-
K	7月下旬	○	-
K	8月下旬	ムラサキイガイのみ	-

○：両貝から検出

-：両貝とも非検出

表7 増菌培養液のPCR結果と分離菌PCR結果の比較

a. ウエルシュ菌 (*cpa*陽性) 結果

	増菌培養液陽性	増菌培養液陰性
分離株陽性	27 検体	9 検体
分離株陰性	1 検体	26 検体

b. エンテロトキシンウエルシュ菌 (*cpe*陽性) 結果

	増菌培養液陽性	増菌培養陰性
分離株陽性	2 検体	0 検体
分離株陰性	2 検体	59 検体

図1 ウエルシュ菌検査手順

