

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

総括報告書

研究代表者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

昨年度の研究で、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。今年度は牛肉以外の食肉でも、牛肉同様のウエルシュ菌増殖促進作用を持つのか、また、カレーミックスの種類を変更しても同じ現象が認められるのかについても検討した。その結果、牛肉だけでなく、豚肉、鶏肉にもウエルシュ菌の増殖促進効果があること、またこの現象は、カレーミックスの種類に依存しておらず、カレーミックス非添加でも認められることが明らかになった。

河川、二枚貝、素干しエビ、煮干しにおける *cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染調査から、下水処理場の放流水が *cpe* 陽性ウエルシュ菌汚染源である可能性、*cpe* 陽性ウエルシュ菌は河川水を介して沿岸部を広く汚染している実態が明らかになった。

分離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、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。この結果から、従来、ウエルシュ菌食中毒の主な原因と考えられてきた食肉だけでなく、海産物や農産物を含む広範な食品が、ウエルシュ菌食中毒の原因になりうると考えられた。

研究分担者

渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
岡部 信彦 川崎市健康安全研究所
三澤 尚明 国立大学法人 宮崎大学
大島 千尋 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所

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
荒木 靖也 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
佐々木賢美 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター
白石 優衣 宮崎大学

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。我が国におけるウエルシュ菌食中毒は、発生件数、患者数ともに減少傾向が認められない。この原因として、エンテロトキシン (cpe) 產生性ウエルシュ菌の主たる汚染食品が明らかになっていないことがまず挙げられる。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产生株であり、食中毒の原因となるエンテロトキシン产生株はほとんど検出されない。これまでにもウエルシュ菌の汚染調査が行われてきたが、エンテロトキシン产生株の主たる汚染食品は明らかになっていない。本研究班では、大規模な汚染実態調査を行い、cpe 遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染源として、カレーミックス・香辛料、さらに海藻、干しエビ、煮干し等の乾燥水産食品が重要であることを示した。一方で、牛肉、豚肉、および家畜、家禽の腸内容物から cpe 遺伝子保有ウエルシュ菌はほとんど検出されないことも併せて明らかにした。また、ウエルシュ菌食中毒が多発する煮物中のウエルシュ菌の増殖挙動を、カレーを用いて調べたところ、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。これらの結果から、汚染源としての食肉の重要性は、他の食品と比較すると高くないと

考えられた。しかし、食肉はウエルシュ菌の増殖を促進することから、ウエルシュ菌食中毒を考える上で重要な要素であると本研究班では結論している。

今年度は、牛肉以外の食肉でも、牛肉同様のウエルシュ菌増殖促進作用を持つのか、また、カレーミックスの種類を変更しても同じ現象が認められるのかについても検討した。併せて、食品を汚染しているウエルシュ菌の由来を推定するために、河川におけるウエルシュ菌の汚染調査、食品における汚染調査、分離ウエルシュ菌株の分子疫学調査を行った。

B. 研究方法

[1] カレー中での増殖挙動の解析

ウエルシュ菌食中毒が頻発する煮物におけるウエルシュ菌の増殖挙動を解析するため、カレーをモデル食品として採用した。カレーは、牛肉、豚肉、鶏肉、食肉非添加の 4 種類、さらにそれぞれにつきカレーミックスとして固形カレールー使用、粉末カレーミックス(破碎された香辛料の混合物) 使用、カレーミックス非使用の 3 種類を用意し、計 12 種類のカレーを作製した。使用したウエルシュ菌株は香辛料由来の 5 株を使用した。カレー 3 人分 (800 mL) に対して、10~60 cfu 接種し、42°C、6 時間培養し、1 時間ごとの菌数を測定した。

[2] 河川でのウエルシュ菌汚染調査

令和 6 年 4 月から 11 月にかけて、河川

表層水および終末処理場（下水処理場）からの放流水、河口の川砂およびカキを検査対象として採材した。河川水または放流水は必要に応じて 10 倍段階希釀を行い、非加熱と加熱処理（70℃、20 分間加熱後急冷）した各 100ml の原液および希釀液を 0.2 μm 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 CHROMagar perfringens 平板培地上に置き、37℃、24 時間嫌気培養を行った。

[3] 食品におけるウエルシュ菌汚染

乾物、二枚貝および土付き野菜（ジャガイモ、ニンジン、枝豆）の土の調査を行った。乾物 97 検体、二枚貝 62 検体、野菜付着土 25 検体の調査を行なった。二枚貝は生産地もしくは市場より購入した。アサリ、ハマグリ、ヒオウギガイ、ホタテガイ、ホンビノスガイ、マガキ、ムラサキイガイを対象とした。活貝を開殻し、軟体部全体を細断して検体とした。乾物、二枚貝とも検体 25 g に 225 ml のチオグリコレート培地を加え、野菜付着土は 9 倍重量のチオグリコレート培地を加えた。その後、ホモジナイズした後、70℃で 20 分間加熱して急冷した。その後、42℃で 24 時間培養し、培養液を CHROMagar perfringens に画線した。集落から DNA を抽出し、前述のマルチプレックス PCR 法で cpa および cpe 遺伝子の保有状況を確認した。

[4] 分子疫学的解析

本研究班において分離した cpe 陽性ウエルシュ菌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。ゲノム DNA 塩基配列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] カレー中での増殖挙動の解析

食肉非添加のカレー中では、ウエルシュ菌の増殖は認められなかった。しかし、食肉を添加すると、6 時間後には $10^3 \sim 10^7$ cfu/mL まで増殖した。添加した食肉の種類によって増殖性に違いは認められなかった。カレーミックスの種類では、固形ルーを用いたカレー中での増殖が最も良かった。カレーミックスを添加していないものの（野菜と水だけ）でも、食肉を添加すると増殖が認められたが、食肉非添加では増殖は認められなかった。以上の結果から、昨年度調査した牛肉だけでなく、豚肉、鶏肉にもウエルシュ菌の増殖促進効果があること、またこの現象は、カレーミックスの種類に依存しておらず、カレーミックス非添加でも認められることが明らかになった。

[2] 河川でのウエルシュ菌汚染調査

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からウエルシュ菌の分離を試みたところ、ウエルシュ菌の検出率は、上流が低く、下流で高くなる傾向が認められた。*cpe*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。*cpe*陽性ウエルシュ菌の検出が最も高かったのは放流水で、下水処理場の放流水すべてから*cpe*陽性菌が分離された。また、河口の川砂とカキから*cpe*陽性菌が分離された。

[3] 食品におけるウエルシュ菌汚染

乾物に関しては、97検体について調査を行った。その結果、煮干し28検体中5検体(17.9%)からウエルシュ菌が、そのうち1検体から*cpe*陽性菌が分離された。また、素干しエビ16検体中7検体(43.8%)からウエルシュ菌が、そのうち1検体から、*cpe*陽性菌が分離された。二枚貝は62検体を調査した。調査の結果、二枚貝前62検体のうち36検体(58.1%)からウエルシュ菌が検出され、4検体(6.5%)から*cpe*陽性菌が検出された。野菜付着土からは、25検体中4検体(16%)で*cpe*が検出された。

[4] 分子疫学的解析

本研究班でこれまでに分離した環境、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菌株のcgMLSTプロファイルを指標として Minimum Spanning Treeを作製した。その結果、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由来株が複数存在した。しかし、特定の食品が患者由来株と特に近縁であるというような傾向は認められなかった。

D. 考察

昨年度の調査では、牛肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌はほとんど増殖できないが、牛肉を添加するとウエルシュ菌は増殖できることを明らかにした。本年度行なった研究成果から、牛肉だけでなく、豚肉、鶏肉にもウエルシュ菌の増殖促進効果があること、またこの現象は、カレーミックスの種類に依存しておらず、カレーミックス非添加でも認められることが明らかになった。食肉非添加のカレー中ではウエルシュ菌が増殖できない現象を利用して、食肉を別調理しておき、配膳直前に食肉をカレールーに混ぜて提供するというウエルシュ菌食中毒予防法を昨年度、提唱した。今年度の結果から、カレーミックスを使用していない煮物、例えば肉じゃがなどでも、同様の方法で食中毒発生を予防できるのではないかと考えられた。今後、大規模調理の際でも、この方法で予防できるかどうか検討を行なって行きたい。

今回の河川の調査結果から、河川に広くウエルシュ菌が存在しており、特に下水処理場周辺で*cpe*陽性ウエルシュ菌が高率に分離された事から、下水処理場の放流水が汚染源である可能性が強く示唆された。また、素干しエビや煮干し、二枚貝の調査

結果から、河川の *cpe* 陽性ウエルシュ菌によって沿岸部が広く汚染されている実態が明らかになった。今回の結果から、ウエルシュ菌はノロウイルス同様の汚染経路を持つと考えられる。今回明らかになったウエルシュ菌の食品汚染経路は、ウエルシュ菌対策を今後考える際に、非常に基礎的かつ重要なデーターであると考えられる。分子疫学的解析の結果からも同様の傾向が示唆された。分子疫学的解析では、患者由来株と非常に近縁な関係にある株が、海産物や乾物から分離されているという結果が得られた。その一方で、患者由来株と近縁の *cpe* 陽性ウエルシュ菌が特定の食品から特に分離されたというような結果は、分子疫学的解析からは得られなかった。これらの結果は、広い範囲の食品が、ウエルシュ菌食中毒の原因となりうる可能性を示唆しているものと考えられた。

E. 結論

昨年度、行なった研究で食肉を添加しないカレー中ではウエルシュ菌の増殖が抑制されることを明らかにした。このことから、ウエルシュ菌食中毒の予防法として、次の方法を提唱した。

- 1) 煮物を作る際にはまず食肉を炒める。
- 2) 一旦、鍋から食肉を取りだす。
- 3) 残りの材料で煮物を作る。
- 4) 配膳直前の再加熱の際に、先に調理した食肉を合わせ、提供する。

今年度の研究成果から、この予防法は牛肉

以外の食肉を使用した食品、カレーミックスを使用していない食品でも応用できる可能性が示唆された。今後、食肉がウエルシュ菌の増殖に及ぼす影響を検討し、食品におけるウエルシュ菌増殖の制御法を確立したい。

今年度の研究から、ウエルシュ菌汚染が水を介して広がっている可能性が示唆された。本研究班のこれまでの成果から、香辛料がエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌に汚染されていることを明らかにしているが、香辛料の栽培、加工には多量の水を必要とされる。よって、原産国の衛生状況によっては、土壌だけでなく、水を介したウエルシュ菌汚染が発生している可能性も考えられる。今後、食品におけるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染を考察する際には、水を中心に考えていく必要があるのではないかと考えられる。

cpe 陽性ウエルシュ菌の分子疫学的解析結果から、従来、ウエルシュ菌食中毒の主たる原因食品であると考えられてきた食肉だけでなく、農作物や海産物、およびその環境が、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示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, *Journal of Food Protection*, 2025; 88: 100429.
- 2) Ohnishi T: Characteristics of outbreaks caused by *Clostridium perfringens* in Japan, *Food Safety* (Submitted)
2. 学会発表
- 1) Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Kojima Y., Sasaki C., Hara-Kudo Y., Misawa N, Okabe N., Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in retailed foods and intestinal contents of animals in Japan. United States and Japan Conference on the Development and Utilization of Natural Resources-Joint Panel on Toxic Microorganisms (2024. 9. 18)
 - 2) Ohnishi T., Watanabe M., Yodotani Y., Nishizato E., Araki S., Kojima Y., Misawa N, Okabe N., Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in retailed foods in Japan. International Microbiological Societies Congress (2024. 10. 25)
 - 3) 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「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遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染状況」第45回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 9. 6)
 - 4) 淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、小嶋由香、大西貴弘、渡辺麻衣子、工藤由起子、三澤尚明、岡部信彦: 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 第45回日本食品微生物学会学術総会 (2024. 9. 6)
 - 5) 小嶋由香、淀谷雄亮、荒木靖也、池田史朗、本間幸子、岡部信彦、渡辺麻衣子、三澤尚明、大西貴弘: 市販食品におけるウエルシュ菌の汚染状況について 第36回地方衛生研究所協議会 細菌研究会 (2025. 1. 16)
3. 行政関係者向けの説明会等
- 1) 大西貴弘 : ウエルシュ菌食中毒 食品衛生危機管理研修 (2024. 9. 27)
 - 2) 大西貴弘: ウエルシュ菌の基礎と食中毒の原因食材に関する最新知見 特別区職員研修所 令和6年度専門研修「食品衛生」 (2025. 2. 19)
 - 3) 大西貴弘 : 食中毒予防対策 (ウエルシュ菌を中心として) 令和6年度川崎市職員研修会 (2025. 3. 4)
- H. 知的財産権の出願・登録状
なし

