

令和4～6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

総合分担研究報告書

ウエルシュ菌の汚染調査及び食品中の増殖挙動の解析

研究分担者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

ウエルシュ菌食中毒制御のため、食品におけるウエルシュ菌の汚染実態調査、食品中での増殖挙動の解析、迅速検査法の作成を行った。汚染実態調査に関しては、カレーミックス・香辛料、海産食品、食肉、根菜から食中毒の直接の原因である芽胞の検出を行ったところ、カレーミックス・香辛料、貝、乾燥海産食品、根菜、鶏肉で汚染が認められた。特にカレーミックス・香辛料、貝、乾燥海産食品はウエルシュ菌陽性検体数に閉めるエンテロトキシン遺伝子(*cpe*)陽性検体の割合が高く、*cpe* 保有芽胞がこれらの食品に特に汚染している可能性が示唆された。一方、以前からウエルシュ菌食中毒発生の原因と考えられていた牛肉、豚肉からは *cpe* は検出されなかった。食品中での増殖挙動の解析では、食肉が添加されていない食品中では、ウエルシュ菌の増殖は著しくよくせされることが明らかになった。迅速検査法に関しては、免疫磁気ビーズを用いたウエルシュ菌の迅速検査法を作製した。その結果、増菌培養を行うことなく、 $10^2$  cfu/ml 以上のウエルシュ菌を検出することができた。

#### 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、食中毒の中では古典的なものであるが、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、ウエルシュ菌食中毒の原因

食品が明らかになっていないことがあげられる。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産生株であり、食中毒の原因となるエンテロトキシン産生株はほとんど検出されない。これまでもウエルシュ菌の汚染調査が行われてきたが、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品は明らかになっていない。そこで、食品におけるウエルシュ菌の汚染状況を調査した。今回は、食中毒の直接の原因となるエンテロトキシ

ン遺伝子 (*cpe*) 保有ウエルシュ菌芽胞に特に着目して調査した。検体としては、これまでウエルシュ菌食中毒の発生原因として考えられてきた食肉や根菜をはじめ、カレーミックス・香辛料や水産食品、乾物などを対象とした。わが国では、カレーを原因とするウエルシュ菌食中毒が多発しているため、食肉、根菜に加え、カレーミックス・香辛料の調査を行った。また、エンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌は、ヒト由来であり、排泄物を介して、河川や海を汚染しているという報告がある。そのため、水産食品の調査を行った。さらに、ウエルシュ菌は芽胞を形成するため、乾燥状態に非常に強い。そこで、乾物にウエルシュ菌汚染がみられるのではないかと考え、乾物の調査を行った。

ウエルシュ菌食中毒を制御するためには、食品中のウエルシュ菌の増殖挙動を明らかにする必要がある。そこで、ウエルシュ菌食中毒が多発している煮物料理のモデル食品としてカレーを用い、カレー中のウエルシュ菌の増殖を解析した。

我が国のウエルシュ菌食中毒事例では、原因食品を特定できないものが多い。その理由の一つとして、感度の良い迅速検査法が確立していないことが挙げられる。今回はウエルシュ菌に対する免疫磁気ビーズの作製を試みた。特に、多くの検査機関で利用できるようにするために、一般に入手できる試薬だけを用いビーズ法を作製した。

## B. 研究方法

### [1] 食品の汚染実態調査

検体 25 g をストマッカーバックに無菌的に採取し、チオグリコレート培地 225 mL を加えた。1 分間、ストマッカー処理を行った。ストマッカーバックは 70℃、20 分間加熱後、急冷した。この加熱によって、検体中の栄養体は死滅し、芽胞の発芽が促進される。ストマッカーバックは、空気を追い出し、ヒートシールをし、42℃、24 時間培養した (増菌培養液)。増菌培養液からは、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、マルチプレックス PCR で増菌培養液中の  $\alpha$  毒素 (*cpa*) およびエンテロトキシン (*cpe*) 遺伝子を確認した。さらに、増菌培養液を 2 枚の CHROMagar C. *perfringens* (CHROMagar) に塗抹し、ウエルシュ菌が疑われるコロニーの *cpa*、*cpe* 保有状況をコロニーPCR で確認した。

増菌培養後の PCR もしくは分離培養後のコロニーPCRのいずれかで *cpa* もしくは *cpe* が陽性になった場合、その検体はそれぞれの遺伝子について陽性であると判定した。

### [2] 食品中のウエルシュ菌増殖挙動の解析

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に、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種類のカレーを作成した。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℃、6時間培養し、1時間ごとの菌数を測定した。

### [3] ウエルシュ菌迅速検査法の作成

磁気ビーズとしては Dynabeads™ Protein A for Immunoprecipitation (Thermo Fisher Scientific, #DB10001)、ウエルシュ菌に対する抗体として *C. perfringens* Rabbit IgG polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific, #PA1-85310)を使用した。菌液1mLにウエルシュ菌抗体10 µgを加え、チューブを1時間回転させた。その後、あらかじめPBSで洗浄しておいた磁気ビーズを10 µL 加え、1時間回転させた。その後、チューブをマグネチックスタンドに置き、PBSで磁気ビーズを洗浄した。最終的に磁気ビーズはCHROMagarに塗抹、もしくは磁気ビーズからアルカリ熱抽出法を用いてDNAを抽出し、汚染実態調査で用いたマルチプレックスPCR法を用いて、*cpa*、*cpe*の検出を行った。

## C. 研究結果

### [1] 食品の汚染実態調査

食中毒の直接の原因となる芽胞についてカレーミックス・香辛料、魚・エビ、貝、

海藻、乾燥海産物、牛肉、豚肉、鶏肉、根菜の調査を行った。調査は3年間、継続して行ったが、その最終結果を表1に示す。カレーミックス・香辛料の陽性率は非常に高く38.7%だった。粉末のカレーミックスだけでなく、ブロックタイプのいわゆる固形カレーでも、ウエルシュ菌の汚染が認められた。7.4%の検体で *cpe* が検出された。また、*cpa* 陽性検体のうち、19.0%が *cpe* 陽性だった。

貝をはじめとする水産食品でもウエルシュ菌汚染が強く認められた。貝は67.7%の検体から *cpa* が検出されており、*cpe* 検出率は12.3%であった。*cpa* が検出された検体のうち18.1%から *cpe* が検出された。乾燥海産食品は50.6%で *cpa* が検出され、*cpe* 検出率は8.4%であった。また、*cpa* が検出された検体のうち16.7%から *cpe* が検出された。

一方、従来からウエルシュ菌食中毒の原因食品として重要視されてきた食肉であるが、鶏肉は *cpa* 陽性率が高く、*cpe* も検出されているため、ウエルシュ菌汚染が発生していることが示唆された。しかし、牛肉では *cpa* は全く検出されず、豚肉でも陽性率は2.7%であった。

### [2] 食品中のウエルシュ菌増殖挙動の解析

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（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。

### 〔3〕ウエルシュ菌迅速検査法の作成

チオグリコレート培地に既知の菌数のウエルシュ菌を浮遊させたものを検体として使用し、今回作製した磁気ビーズの感度を検討した。その結果、磁気ビーズを塗沫した場合、磁気ビーズから DNA を抽出し PCR で検出した場合のいずれでも、検体中に  $10^2$  cfu/mL 以上のウエルシュ菌が存在していれば、検出することができた。次に、カレーの 10 倍乳剤を作製し、同様の実験を行ったが感度は変わらず、菌濃度が  $10^2$  cfu/mL 以上の場合、検出することができた。

### D. 考察

汚染実態調査の結果から、カレーミックス・香辛料、貝、乾燥海産食品などが *cpe* 保有芽胞に汚染されている状態が明らかになった。カレーミックス・香辛料は、ウエルシュ菌食中毒が頻発しているカレーの原料である。貝はウエルシュ菌食中毒の原因食品という観点からは重要度は低いかもしれないが、わが国の沿岸部で *cpe* 陽性のウエルシュ菌汚染が広がっていることを示唆する結果であると思われる。また、

干しエビ、イリコ、海藻なども *cpe* 保有芽胞に汚染されていた。干しエビやイリコ、昆布などの水産乾燥食品は、和食をはじめとした多くの料理で使用されている。煮物やめんつゆなどでウエルシュ菌食中毒が多発しているが、乾燥海産食品を“だし”として使用し、そこから汚染が発生している可能性が示唆された。米国では、河川や沿岸部がエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の感染源であるという報告がなされているが、今回の調査では海産物における汚染が強く認められたことから、わが国でも同様に、河川や沿岸部がウエルシュ菌の重要な感染源であり、水産食品への汚染が発生しているという可能性が示唆された。また、香辛料の栽培に河川や溜池の水が使用されている場合がある。また、香辛料の種類によっては、収穫した果実の洗浄や発酵させて果肉を除去する際にも水を使用するため、原産国の河川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た。一方、これまでウエルシュ菌汚染で重要視されてきた食肉であるが、*cpe* 保有の有無にかかわらず、ウエルシュ菌の汚染はほとんど認められなかった。この結果から、牛肉や豚肉でのウエルシュ菌汚染は非常に限られたものである可能性が示唆された。鶏肉でウエルシュ菌の汚染が認められていることから、牛肉、豚肉の食肉処理工程の衛生管理が進み、ウエルシュ菌汚染が低減されたのではないかと考

えられた。

カレーにおけるウエルシュ菌の増殖挙動を解析したところ、カレーミックスに汚染している少量のウエルシュ菌でも、牛肉、豚肉、鶏肉のいずれかが添加されている場合、6時間で食中毒を引き起こせるだけの菌濃度に到達できることが明らかになった。しかしながら、食肉を添加しないカレーでは、ウエルシュ菌は増殖することができなかった。15Lの寸胴鍋でカレーを調理後、室温放置した場合、ウエルシュ菌の増殖可能温度帯に約9時間滞留したとの報告があることから、調理後の冷却が適切に行われなかった場合、カレーミックスに汚染している少量のウエルシュ菌でも食中毒を惹起できる可能性が示唆された。

食肉を添加しないカレー中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。このことから、ウエルシュ菌食中毒の予防法として、次の方法が有効ではないかと考えられた。1) カレーを作る際にはまず食肉を炒める。2) 一旦、鍋から食肉を取り出す。3) 残りの材料でカレーを作る。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。この方法で、カレーの中でのウエルシュ菌の増殖を大きく阻害できると考えられる。

食肉添加によるウエルシュ菌の増殖は、カレーミックスの種類に依存しないことが明らかになった。ただし、固形ルーを用いた場合は、粉末カレーミックスもしくはカレーミックス非添加の場合と比べて、ウ

エルシュ菌の増殖が良好であった。これは、固形ルーには香辛料以外に、肉エキス、野菜エキス、酵母エキス、粉乳、澱粉等の栄養となりうる成分が含まれているためと考えられた。

カレーミックス非添加でも、食肉添加に伴うウエルシュ菌の増殖が認められた。このことから、カレー以外の食品においても食肉の添加がウエルシュ菌の増殖に影響を及ぼすことが示唆された。カレー以外でウエルシュ菌食中毒が多く発生している食品として、シチュー、肉じゃが、芋のそぼろ煮などがあるが、これらの食品においても、前述のように食肉を後から添加する方法によってウエルシュ菌の増殖を制御できる可能性が示唆された。

今回作製した免疫磁気ビーズ法は  $10^2$  cfu/mL 以上の菌濃度でウエルシュ菌を検出することが出来た。多くのウエルシュ菌食中毒事例では、食品中の菌濃度が  $10^4$  cfu/mL 以上になると考えられているため、食中毒の原因究明に使用する場合、十分な検出感度を有していると考えられた。ビーズから DNA を抽出し PCR を行なった場合は当日中に、ビーズを選択培地に塗抹した場合は翌日にウエルシュ菌の存在を確認することができる。いずれにせよ、増菌培養を行わなくても済むため、増菌培養にかかる1日を短縮することができる。今後は、検出感度をさらに向上させ、食中毒の原因究明だけでなく、汚染調査にも使用できるようにしたい。

## E. 結論

今回の結果から、カレーで頻発しているウエルシュ菌食中毒は主にカレーミックスや香辛料からの汚染によるものであることが示唆された。今後、ウエルシュ菌食中毒の予防を考えていくうえで、カレーミックス・香辛料にさらに着目していく必要があると思われる。同様に今回の結果から、干しエビやイリコなどを汚染食品とする食中毒発生の可能性も示唆された。今後、食中毒が発生した際には、これらの食品にも注意を払う必要があると考えられる。

食肉は cpe 保有ウエルシュ菌の汚染源としての重要性は高くはないが、ウエルシュ菌の増殖を促進するため、食品中のウエルシュ菌を制御するためには、重要な因子であることが明らかになった。

## 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. 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」日本食品微生物学会学術総会（令和6年9月6日）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1 日本の市販食品におけるウエルシュ菌芽胞の汚染状況

| サンプル        | サンプル数 | <i>cpa</i> 陽性サンプル<br>(%) | <i>cpe</i> 陽性サンプル<br>(%) | <i>cpa</i> 陽性/ <i>cpe</i> 陽性サンプル 数<br>(%) |
|-------------|-------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|
| 牛肉          | 95    | 0 (0.0)                  | 0 (0.0)                  | 0.0                                       |
| 豚肉          | 110   | 3 (2.7)                  | 0 (0.0)                  | 0.0                                       |
| 鶏肉          | 105   | 79 (75.2)                | 2 (1.9)                  | 2.5                                       |
| 魚・エビ        | 79    | 5 (6.3)                  | 2 (2.5)                  | 40.0                                      |
| 貝           | 65    | 44 (67.7)                | 8 (12.3)                 | 18.1                                      |
| 乾燥海産物       | 83    | 42 (50.6)                | 7 (8.4)                  | 16.7                                      |
| 乾燥海藻        | 39    | 6 (15.3)                 | 1 (2.6)                  | 16.7                                      |
| カレーミックス・香辛料 | 204   | 79 (38.7)                | 15 (7.4)                 | 19.0                                      |
| 根菜          | 121   | 37 (30.6)                | 1 (0.8)                  | 2.7                                       |

