

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

総合分担研究報告書

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

ウエルシュ菌は、ヒトや動物の腸管内、土壌、下水、塵埃など広く分布しているが、国内の食中毒起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）に関する十分な疫学調査がなされていない。本分担研究では、*cpe* 陽性菌の食品および環境における汚染実態を把握する目的で調査を実施した。供試した市販の牛肉、豚肉、鶏肉、根泥付き野菜、魚・エビ、貝類、海藻、カレー粉・香辛料、だし・乾物（計 196 検体）から *cpe* 陽性菌が分離・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。一方、ウエルシュ菌食中毒の主要な原因食品として重要視されている市販の牛肉、豚肉および鶏肉からは α 毒素産生性ウエルシュ菌（*cpa* 陽性菌）しか検出されなかった。そこで、M 県の食肉および食鳥処理場に搬入された牛（213 検体）、豚（210 検体）、鶏（164 検体）の腸内容物 587 検体を調査したところ、*cpa* 遺伝子は 38.5～83.0% の陽性率を示したが、全ての分離株および増菌培養液からは *cpe* 遺伝子は検出されなかった。次に、*cpe* 陽性菌が高頻度に分離・検出された食品が貝類であったことから、M 県内の 2 水系の河川水および下水処理水における *cpe* 陽性菌の分布状況を調査した。さらに、河口に生息するカキおよび川砂から *cpe* 陽性菌の分離・検出を試みた。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 検体の処理水すべてから *cpa* および *cpe* 陽性菌が分離された。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%）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。河川水中の *epe* 陽性菌の検出率は、上流が低く、下流に行くほど高くなる傾向が認められた。河口の川砂（3 検体）とカキ（4 検体）から

cpe 陽性菌の分離・検出を試みたところ、各 2 検体が陽性となった。さらに、*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、観察期間中栄養型は芽胞を形成することはなかった。以上の結果から、食品から分離される *cpe* 陽性菌の汚染源は、家畜や家禽である可能性は低く、河川水、特に下水処理場から排出される下水処理水が汚染源の一つであることが強く示唆された。

研究協力者

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	宮崎大学農学部獣医学科

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。このため、調理後、食品を急速に冷却することがウエルシュ菌の増殖を抑制し、食中毒を予防するのに重要である。こういったウエルシュ菌の特性から、調理後の加熱が緩慢になりがちな大規模調理施設でウエルシュ菌食中毒が発生する傾向が認められる。我が国では HACCP による管理が義務付けられてから、3 年以上が経過しようとしている。しかしながら本菌による食中毒は依然発生が続いており、減少の傾向が認められない。この原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌(以下、*cpe* 陽性菌)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。これまでに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。また、多くのウエルシュ菌食中毒事例では、食中毒が発生しても原因食材を同定できない事例が多く、さらに、飲食店でウエルシュ菌の増殖を抑えるための適切な調理が行われているかどうかの実態も明らかになっていない。このため飲食店等へ効果的な指導を行うための基礎的なデータが不足するという結果になっており、結果的にウエルシュ菌食中毒の発生を防止できないことの一因になっていると考えられる。本研究ではこれらの問題に対応するために、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、*cpe* 陽性菌の汚染源を明らかにすることを目的としている。

本研究では、以下の項目について態査を実施した。

1) 食品における *cpe* 陽性菌の汚染

実態調査

2) 家畜(牛、豚、鶏)および家禽(鶏)の消化管内容物における *cpe* 陽性菌の保菌実態調査

3) 河川水、下水処理水、川砂、および河口に生息するカキかにおける *cpe* 陽性菌の汚染実態調査

B. 研究方法

[1] 食品における *cpe* 陽性菌の汚染実態調査

1) 検体

調査に使用した検体は、M 県内のスーパーマーケットおよび小売店で購入した他、インターネットで購入した食品で、牛肉(20 検体)、豚肉(20 検体)、鶏肉(20 検体)、根菜・ホウレン草などの泥付き野菜(20 検体)、魚・エビ(20 検体)、貝類(20 検体)、海藻(20 検体)、カレー粉・香辛料(26 検体)、だし・乾物(30 検体)の計 196 検体を供試した。検体のうち、生鮮食品は購入後、4℃で保管し、24 時間以内に試験に供した。

供試する検体の条件を以下のように統一した。即ち、肉類は、ミンチおよび内臓肉は使用せず、また、国産、外国産を問わないが、産地(国)が分かるものを購入し、冷凍品(解凍品)はなるべく避けた。泥付き野菜は、なるべく外皮を含む外側を採取した。また、ホウレン草の根は切り落として使用した。野菜に付着した泥については、根菜から故意に落とすことや、水洗いをせ

ず、泥付きの場合はそのことを記録した。魚の切り身は皮を含めて使用した。エビについては、ボイルしたものは使用せず、殻付きエビは殻ごと使用し、有頭エビは頭を付けた状態で使用した。貝類は、むき身、殻付きいずれも使用し、ボイルしたものは使用しなかった。また、生食用か加熱用かは記録した。海藻は、昆布、ヒジキ、海藻サラダのような乾燥品も供試したが、戻し率を 10 倍と考え、2.5 g を使用した。カレー粉は、ルータイプではなく、スパイスの粉末が混合されたものとし、同一製品を、または同一店舗で複数回購入する場合は、なるべく購入時期を変え、ロットが違うものを購入した。だし・乾物は、市販のだしパック、干し椎茸、鰹節、魚の乾燥品などとし、顆粒状の和風調味料は除いた。また、だしパックのパック(不織布)は取り除き、中身だけをストマッカー処理した。さらに、同一製品を、または同一店舗で複数回購入する場合は、なるべく購入時期を変え、ロットが違うものを購入した。

供試した食品は、購入日、購入店、品名、食品区分、産地、冷凍・冷蔵の有無を記録した。

2) 検査方法

検体 25 g を無菌的にストマッカー一袋に採取した。チオグリコール酸培地Ⅱ(ニッスイ)を 225 mL 加え、1 分間、ストマッカー処理し、70℃、20 分間加熱後、急冷したものを試料原液とした。試料原液 10mL と滅菌後 55℃に

保温しておいたハンドフォード改良培地（関東化学）15mLを2枚の嫌気パウチにそれぞれ加え、軽く混ぜた後に空気を追い出し、ヒートシールした後、46℃、18時間培養した。培養後、2枚の嫌気パウチ内の黒色コロニー数の平均を推定ウエルシュ菌数として記録した。残りの試料原液は、ストマッカーバックから空気を追い出し、ヒートシールをし、42℃、24時間、増菌培養した。培養した増菌培養液を2枚の CHROMagar™ *C. perfringens* base（以下、CHROMagar）（関東化学）に塗抹し、37℃、24時間、嫌気培養した。

増菌培養液からアルカリ熱抽出法でDNAを抽出し、Quick Taq HS DyeMix（#DTM-101、TOYOBO）を用いたマルチプレックスPCR法により、増菌培養液中のα毒素遺伝子（*cpa*、324 bp）およびエンテロトキシン遺伝子（*cpe*、233 bp）をそれぞれ特異的に検出するプライマーセット（α毒素遺伝子検出プライマーセット；multi-*cpa*-F：5′-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3′、multi-*cpa*-R：5′-CCTCTGATACATCGTGTAAG-3′、エンテロトキシン遺伝子検出プライマーセット；multi-*cpe*-F：5′-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3′、multi-*cpe*-R：5′-GGACCAGCAGTTGTAGATA-3′）を用いて確認した。増菌培養液を用いたPCR反応が阻害されることを考慮し、このPCRが陰性となった場合でも、増菌培養液のCHROMagarへの塗抹、培養は行った。

CHROM agar上の赤色のウエルシュ菌が

疑われるコロニーを5～20個釣菌し、純培養後にアルカリ熱抽出法でDNAを抽出し、*cpa*および*cpe*保有状況を上述したマルチプレックスPCR法で確認するとともに、生化学性状試験（グラム染色、好気培養）を用い、ウエルシュ菌であるかどうか判定した。*cpe*陽性菌と同定された場合、7.5%DMSOを含むチオグリコレート培地に分離株を浮遊させ、-80℃で保存した。

検査記録簿には、CHROMagar上での菌の発育状況、増菌培養液中の*cpa*および*cpe*の検出結果、分離株の*cpa*および*cpe*保有状況、および生化学性状試験の結果を記録した。

〔2〕家畜（牛、豚、鶏）および家禽（鶏）の消化管内容物における*cpe*陽性菌の保菌実態調査

1) 検体

令和5年5月から令和6年3月にかけて、M県内の5か所の食肉処理場から健康畜として搬入された牛と豚の大腸内容物と3か所の食鳥処理場からブロイラーの盲腸内容物を毎月採取した。供試した検体数は587で、その内訳と月別の検体数は表1および表2に示す。

2) 検査方法

腸内容物中のウエルシュ菌の定性検査に加え、一部の検体について、定量検査を実施した。チオグリコール酸培地Ⅱ（ニッサイ）1mlを2本の1.5mlマイクロチューブに入れ、こ

れに検体 0.1 g を加え、ボルテックスミキサーで均一の懸濁液とした。1 本の懸濁液は、芽胞のみを選択するため、70℃、20 分間加熱後急冷した。非加熱および加熱処理した腸内容物懸濁液を 42℃、24 時間増菌培養し、各増菌培養液を CHROMagar に白金耳 (10 μ l/loop) で画線塗抹し、37℃、24 時間、嫌気培養した。CHROM agar 上の赤色のウエルシュ菌が疑われるコロニーを 5 個釣菌し、純培養後に生化学性状試験 (グラム染色、好気培養) を用い、ウエルシュ菌であるかどうか判定した。さらに、後述するアルカリ熱抽出法で分離株から DNA を抽出し、*cpa* および *cpe* をマルチプレックス PCR 法で検出した。また、各増菌液からの *cpa* および *cpe* を検出するため、増菌培養液 100 μ l を遠心し、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出して、マルチプレックス PCR 法を行った。検体量が少ない場合には、非加熱、加熱処理のうち、加熱処理を優先して実施した。

腸内容物中のウエルシュ菌数を測定するため、一部の検体については、定量培養を行った。チオグリコール酸培地 II (ニッスイ) 0.9ml を 2 本の 1.5ml マイクロチューブに入れ、これに検体 0.1 g を加え、ボルテックスミキサーで 10 倍希釈懸濁液を作製した。1 本の懸濁液は、芽胞のみを選択するため、70℃、20 分間加熱後急冷した。非加熱および加熱処理した腸内

容物懸濁液の 10 倍段階希釈列を作製し、各希釈液の 100 μ l を CHROMagar に塗抹し、37℃、24 時間、嫌気培養した。最も希釈率の高い懸濁液を接種した培地に認められたウエルシュ菌が疑われる赤色コロニーを 5 個釣菌し、マルチプレックス PCR 法で *cpa* および *cpe* を検出し、腸内容物 1g 当たりのウエルシュ菌数を算出した。

cpa および *cpe* を検出する PCR 法は、増菌培養液またはコロニーからアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、Quick Taq HS DyeMix (#DTM-101、TOYOBO) を用いたマルチプレックス PCR 法により、増菌培養液中の *cpa* (324 bp) および *cpe* (233 bp) をそれぞれ特異的に検出するプライマーセット (*cpa* 検出プライマーセット; multi-*cpa*-F: 5' -GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3'、multi-*cpa*-R : 5' -CCTCTGATACATCGTGTAAG-3、*cpe* 検出プライマーセット ; multi-*cpe*-F : 5' -GGAGATGGTTGGATATTAGG-3、multi-*cpe*-R : 5' -GGACCAGCAGTTGTAGATA-3) を用いて確認した。

ウエルシュ菌と同定された菌株は、7.5%DMSO を含むチオグリコレート培地に分離株を浮遊させ、-80℃で保存した。

検査成績は、非加熱、加熱処理した懸濁液を用いて、培養法または PCR 法のいずれかで陽性を示した検体を陽性として記録した。

[3] 河川水、下水処理水、川砂、および

河口に生息するカキかにおける *cpe* 陽性菌の汚染実態調査

1) 検体

令和6年4月から令和7年2月にかけて、M県O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O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) 検査方法

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* 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、常法にしたが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20ml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1ml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 ($0.2\mu\text{m}$) 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 ($1\sim 3\text{cfu/ml}$) を作製した。

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°C 、24 時間嫌気培養した栄養型菌を、TGC 培地 1ml に懸濁 ($\text{OD}_{600}=0.15$) し、 37°C 、24 時間、嫌気培養した。この工程をもう一度実施し、培養液 $100\mu\text{l}$ を DS 培地 1ml に添加し、 37°C 、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°C 、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°C で保存した。

各懸濁液を 50ml の遠心管に 50ml 分注し、 20°C 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したがって測定した。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°C 、20 分間加熱処理を行った後に菌数測定も実施した。生存菌については、集落から DNA を抽出し、*cpe* 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] 食品における *cpe* 陽性菌の汚染実態調査

1) 推定ウエルシュ菌数

加熱処理した試料原液とハンドフールド改良培地を混合・培養し、黒色集落数から検体中の推定ウエルシュ菌数を測定した結果、芽胞が検出されたのは鶏肉 (15%)、泥付き野菜 (20%)、貝類 (30%)、カレー粉 (15.4%)、だし・乾物 (30%) で、推定菌数は $10\sim 10^3\text{cfu/g}$ であった。一方、黒色集落の検出と *cpe* 陽性菌の分離結果とはほとんどの検体で一致していなかった。

2) 増菌培養液から検出されたウエルシュ菌と *cpe* 遺伝子保有状況

増菌培養液から抽出した DNA を鋳型としてウエルシュ菌の *cpa* と *cpe* をマルチプレックス PCR 法で検出した結果、*cpa* が検出されたのは 196 検体中 59 検体 (30.1%) で、*cpe* が検出されたのは 14 検体 (7.1%) だった (表 3)。*cpe* が検出された検体の内訳は、カレー粉・香辛料 (3 検体)、だし・乾物 (1 検体)、貝類 (7 検体)、海藻 (1 検体)、鶏肉 (2 検体) で、泥付き野菜は *cpa* のみが検出された。*cpe* が検出された検体の産地は、カレー粉・香辛料がいずれもインド、貝類の 2 検体が中国と韓国で、それ以外の陽性検体は全て国産だった。

3) 分離培養されたウエルシュ菌のエントロキシン遺伝子保有状況

CHROMagar 上で赤色を示すウエルシュ菌が疑われるコロニーを 5~20 個釣菌し、

純培養後にアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、*cpa* と *cpe* をマルチプレックス PCR 法で検出した結果、*cpa* が検出されたのは 196 検体中 63 検体 (32.1%) で、*cpe* が検出されたのは 9 検体 (4.6%) だった (表 4)。*cpe* が検出された検体の内訳は、カレー粉・香辛料 (2 検体)、貝類 (6 検体)、海藻 (1 検体) だった。*cpe* の検出率が最も高かったのは貝類 (6 検体、30%) で、しじみ 3、あさり 2、生カキ 1 検体だった。増菌培養からの *cpe* の検出された検体数が 14 検体 (7.1%) だったのに対し、分離培養した集落から検出された検体数は 9 検体 (4.6%) で、低い検出率であった。

[2] 家畜 (牛、豚、鶏) および家禽 (鶏) の消化管内容物における *cpe* 陽性菌の保菌実態調査

1) ウエルシュ菌の分離・検出

増菌培養液に接種した腸内容物の懸濁液を加熱処理後に遺伝子抽出または増菌培養後に選択培地から釣菌したコロニーの DNA を用いて *cpa* および *cpe* を PCR で検出したところ、牛、豚、鶏のそれぞれ 38.5%、72.4%、78.7% の検体で *cpa* が検出されたが、*cpe* は供試した全ての検体で陰性を示した (表 5)。また、非加熱の腸内容物懸濁液では、牛、豚、鶏の 48.1%、53.1%、83.0% の検体で *cpa* が検出されたが、*cpe* は全ての検体で陰性を示した (表 5)。

2) 腸内容物中のウエルシュ菌数

腸内容物中のウエルシュ菌の菌数を動物種ごとに測定し、菌数の分布を比較した。牛では、大腸内容物 1 g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 51.1%、加熱処理で 78.7% であり、最も高い検体で 10^6 cfu/g まで保有しており、豚や鶏に比較して、保菌菌数は低かった (図 4-1)。豚では、大腸内容物 1 g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 40.8%、加熱処理で 38.8% であり、最も高い検体では 10^8 cfu/g まで保有していた (図 4-2)。さらに、鶏では、大腸内容物 1 g 当たり 100 cfu 未満の検体が非加熱で 11.4%、加熱処理で 25.7% であり、最も高い検体で 10^6 cfu/g まで保有しており、豚よりも保菌菌数は高い傾向を示した (図 4-3)。

3) *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌の月別推移

検査を実施した 2023 年 5 月から 2024 年 3 月まで、月ごとの *cpa* 遺伝子保有ウエルシュ菌の分離・検出率の推移を比較したところ、ウエルシュ菌はいずれの動物種においても通年腸管内に保菌されていたが、夏季に減少する傾向が求められた (図 5-1、図 5-2、図 5-3)。

[3] 河川水、下水処理水、川砂、および河口に生息するカキかにおける *cpe* 陽性菌の汚染実態調査

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放流水の水温は、 14°C ～

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* 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、*cpe/cpa* は、下流に行くにしたがって高くなる傾向を示した(図6、表6)。

2) 定点観測

O水系の下流に定点観測地を設定し、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、季節的な変動は認められなかった(図7)。

3) 下水処理放流水の分離成績

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8)。

4) 河川水中での生存性

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9)。芽胞浮遊液についても栄養型と同様に河川水中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10)。

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において *cpa* 陽性菌が分離された。増菌培養液を用いた PCR で2検体から *cpe* が検出され、その1検体から *cpe* 陽性菌が分離された(表7)。

6) 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

8)。

D. 考察

[1] 食品における *cpe* 陽性菌の汚染実態調査

ウエルシュ菌食中毒の発症機序として、ウエルシュ菌の食品中での異常増殖がある。食品の加熱は、食材中に含まれる酸素が放出され嫌気状態となる。ウエルシュ菌の耐熱性芽胞は加熱しても食品中で生残する。ウエルシュ菌の至適発育温度は 43～47℃と他の細菌よりも高く、増殖速度も速いため、食品の温度が発育に適した温度まで下がると発芽し、急速に増殖を始める。食品の中で大量に増殖したウエルシュ菌が食品とともに胃を通過し、小腸内で増殖して、菌が芽胞を形成する際に産生・放出されるエンテロトキシンにより発症する。代表的な原因食品として、大量調理されたのち、長時間室温で放置された食品、特にカレーやシチュー等の食肉調理食品があげられる。魚介類調理食品や野菜の煮物が原因となる事例も多い。

今回の調査で、*cpe* を保有したウエルシュ菌が食肉ではなくカレー粉・香辛料から検出されたことから、カレーを原因食品とする食中毒は、*cpe* 陽性菌が食肉に汚染されていた場合に加え、カレー粉や香辛料に汚染された *cpe* 陽性菌に起因する食中毒のリスクも考慮する必要があると考えられた。同様に、だし・乾物、海藻（コンブ）からも *cpe* が検出されており、煮物や煮込

み料理を原因食品とするウエルシュ菌食中毒も、料理に使用した「だし」に *cpe* 陽性菌が混入したことによるケースもあると思われた。

今回の調査で最も *cpe* 陽性菌の検出率が高かったのは貝類であり、しじみ、あさり、生カキから検出された。貝類の汚染経路として考えられるのは、ヒトまたは動物由来 *cpe* 陽性菌の芽胞が下水等に流入し、終末処理場から河川、さらには海洋に流出し、貝類に蓄積されたことが考えられた。よってこれらの食材を煮込み料理等に使用する際には注意が必要と思われる。

一方、今回の調査において、*cpe* 陽性菌は鶏肉の増菌培養液からのみ検出されたが、牛肉と豚肉からは増菌培養および分離培養ともに全く検出されなかった。考えられる原因としては、宿主側の要因、食肉処理場に HACCP の制度が導入され、牛や豚ではより高度な衛生管理が行われている事等があげられる。今後は検体数を増やすとともに、家畜の腸内容物中にどの程度の *cpe* 陽性菌が保菌されているのか、季節的変動も含め調べる必要がある。

今回のウエルシュ菌汚染実態調査では、推定ウエルシュ菌数の測定と検体から *cpe* 陽性菌を分離培養するために、増菌培養とそれに続く選択培地を用いた分離培養を行った。

推定菌数は $10 \sim 10^3$ cfu/g であったが、黒色集落の検出と *cpe* 陽性菌の分離結果とはほとんどの検体で一致していなかつ

た。このことから、加熱処理した試料原液とハンドフォード改良培地を混合・培養し、黒色集落数から検体中の推定ウエルシュ菌数を推定することは可能であるが、*cpe* 陽性菌の汚染状況を推定することは難しいと思われた。

今回行った検査手順において、*cpe* 陽性菌の検出率は分離培養よりも増菌培養のほうが高かった。この検出率の違いは、分離培養で釣菌する集落数が少なかったことが一因と考えられ、釣菌する集落数を増やすなどの検査手順の再検討が必要と思われた。

〔２〕 家畜（牛、豚、鶏）および家禽（鶏）の消化管内容物における *cpe* 陽性菌の保菌実態調査

過去のウエルシュ菌食中毒事例をみると、原因食品として肉類、魚介類、野菜を使用した煮込み料理が多い。発生頻度の高い原因施設は、飲食店、仕出し屋、旅館、学校などの集団給食施設で、カレー、シチュー、スープ、めんつゆなどの、食べる前日に大量に加熱調理され、大きな容器のまま室温で放冷されていた事例が多い。

昨年度に実施した市販食肉の汚染調査において、*cpe* 陽性菌は鶏肉の増菌培養液からのみ検出されたが、牛肉と豚肉からは *cpe* 陽性菌は増菌培養および分離培養ともに全く分離・検出されなかった。一方、カレー粉・香辛料から *cpe* 陽性菌が検出されたことから、カレーを原因食品とする本食中毒は、カレーに使用されるスパイス類

が汚染源で、食肉が汚染源である可能性は低いことが示唆された。

そこで、本年度の調査では、食肉処理場および食鳥処理場に健康畜として搬入された牛、豚、鶏の腸内容物中の *cpe* 陽性菌の検出を試みた。587 検体の腸内容物を調べたところ、*cpa* 陽性菌は 1 年を通じて分離・検出されたが、*cpe* 陽性菌は増菌培養を行っても全く分離・検出されなかった。腸内容物懸濁液を未加熱および加熱処理して検査を実施したところ、いずれの処理検体からも *cpa* 陽性菌が分離・検出されたことから、腸管内では栄養型と芽胞の状態でウエルシュ菌が保菌されていると考えられた。

cpa 陽性菌は、鶏で最も高い保菌率と保菌菌数が認められ、次いで豚で高く、牛では鶏、豚と比較して低い保菌率と保菌菌数であった。今回の結果は、前年度の市販食肉からの分離・検出成績とも一致しており、畜肉における *cpe* 陽性菌の汚染頻度は低いことが示唆された。

本研究課題の大西代表者らは、カレーに牛肉を加えたものと加えないものに添加したウエルシュ菌の増殖動態を調べ、牛肉を添加したカレーでのみウエルシュ菌が急激に増殖することを観察した。食肉にはグルタチオン等の還元物質が豊富に含まれており、食品内が嫌気状態になりやすいことも知られている。今後は、ウエルシュ菌の増殖促進因子としての畜肉の役割についても精査する必要がある。

〔 3 〕 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* 陽性菌の汚染実態調査

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に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 *epe* 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

ウエルシュ菌食中毒の感染源となる食品および食品への汚染源を明らかにするため、市販食品、家畜および家禽の腸内容物、河川水、下水処理水、川砂および河口に生息するカキから *cpe* 陽性菌の分離を試みた。*cpe* 陽性菌が分離・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)

だったが、家畜や家禽の肉、腸管内容物からは *cpe* 陽性菌が分離されなかった。一方、河川水および下水処理水には *cpe* 陽性菌が広く分布し、特に下水処理水から大量の *cpe* 陽性菌が河川に排出されていることが分かった。したがって、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、貝類の汚染源になりうると考えられた。河川水および下水処理水から分離された *cpe* 陽性菌が食中毒の起因菌となりうるか、分離株を用いた分子系統解析や病原性等の詳細な解析を行ったうえで、適切な防除対策を講じる必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

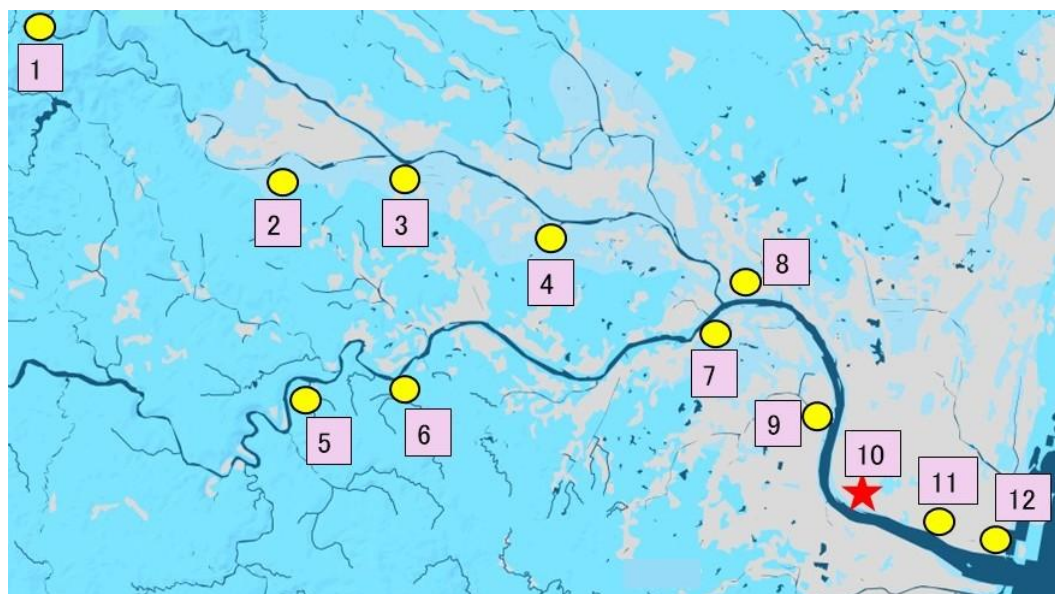
表 1 供試検体の内訳

動物種	処理場	検体数 (定量培養検体)
牛	A	44 (10)
	B	40 (10)
	C	40 (10)
	D	49 (7)
	E	40 (10)
小計		213 (47)
豚	A	44 (10)
	B	40 (10)
	C	40 (10)
	D	48 (11)
	E	40 (8)
小計		212 (49)
鶏	F	55 (11)
	G	55 (11)
	H	55 (13)
小計		165 (35)
合計		587 (131)

表 2 供試検体数の月別内訳

月	牛	豚	鶏	計
5 月	13	11	15	39
6 月	20	20	15	55
7 月	22	24	14	60
8 月	18	16	15	49
9 月	20	20	15	55
10 月	21	20	15	56
11 月	20	21	15	56
12 月	20	21	15	56
1 月	21	21	15	57
2 月	22	20	15	57
3 月	16	16	15	47
計	213	210	164	587

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



表3 食品の増菌培養液から検出されたウエルシュ菌 *cpa* および *cpe* 遺伝子

検 体	検体数	<i>cpa</i> 陽性検体数 (%)	<i>cpe</i> 陽性検体数 (%)	<i>cpe</i> 陽性/ <i>cpa</i> 陽性(%)	備 考
カレー粉・香辛料	26	8 (30.8)	3 (11.5)	37.5	カレーパウダー 2、 チキンマサラ 1
だし・乾物	30	8 (30.8)	1 (3.3)	12.5	いりこ 1
魚・エビ	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
貝	20	16 (80.0)	7 (35.0)	43.8	しじみ 3、あさり 3、 生カキ 1
海藻	20	2 (10.0)	1 (5.0)	50	昆布 1
牛肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
豚肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
鶏肉	20	15 (75.0)	2 (10.0)	13.3	モモ肉 1、ムネ肉 1
泥付き野菜	20	10 (50.0)	0 (0.0)	0	
合計	196	59 (30.1)	14 (7.1)	23.7	

産地：カレーパウダー 2、チキンマサラ 1（インド 3）、いりこ（国産）、しじみ 3（国産）、あさり 3（国産、中国、韓国）、生カキ 1（国産）、昆布 1（国産）、鶏肉 2（国産）

表 4 食品から分離培養されたウエルシュ菌における *cpa* および *cpe* 遺伝子の検出

検 体	検体数	<i>cpa</i> 陽性検体数 (%)	<i>cpe</i> 陽性検体数 (%)	<i>cpe</i> 陽性/ <i>cpa</i> 陽性(%)	備 考
カレー粉・香辛料	26	12 (46.2)	2 (7.7)	16.7	カレーパウダー 2
だし・乾物	30	9 (30.0)	0 (0.0)	0	
魚・エビ	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
貝	20	16 (80.0)	6 (30.0)	37.5	しじみ 3、あさり 2、 生カキ 1
海藻	20	2 (10.0)	1 (5.0)	50	昆布 1
牛肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
豚肉	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0	
鶏肉	20	15 (75.0)	0 (0.0)	0	
泥付き野菜	20	9 (45.0)	0 (0.0)	0	
合計	196	63 (32.1)	9 (4.6)	14.3	

注¹ クロモアーガーから 5～20 個の集落を釣菌。

注² 産地：カレーパウダー 2 (インド)、しじみ 3 国産)、あさり 2 (国産、中国)、生カキ 1 (国産)、昆布 1 (国産)

表 5 腸内容物から分離されたウェルシュ菌における *cpa* および *cpe* 遺伝子の検出

動物	<i>cpa</i> 遺伝子				<i>cpe</i> 遺伝子			
	非加熱 (%)		加熱 (%)		非加熱 (%)		加熱 (%)	
牛	102/212*	(48.1)	82/213	(38.5)	0/212*	(0)	0/213	(0)
豚	110/207*	(53.1)	152/210	(72.4)	0/207*	(0)	0/210	(0)
鶏	132/159*	(83.0)	129/164	(78.7)	0/159*	(0)	0/164	(0)

*検体量が少なく実施不可の検体あり

図 4 - 1 牛大腸内容物中の *cpa* 陽性菌数の分布

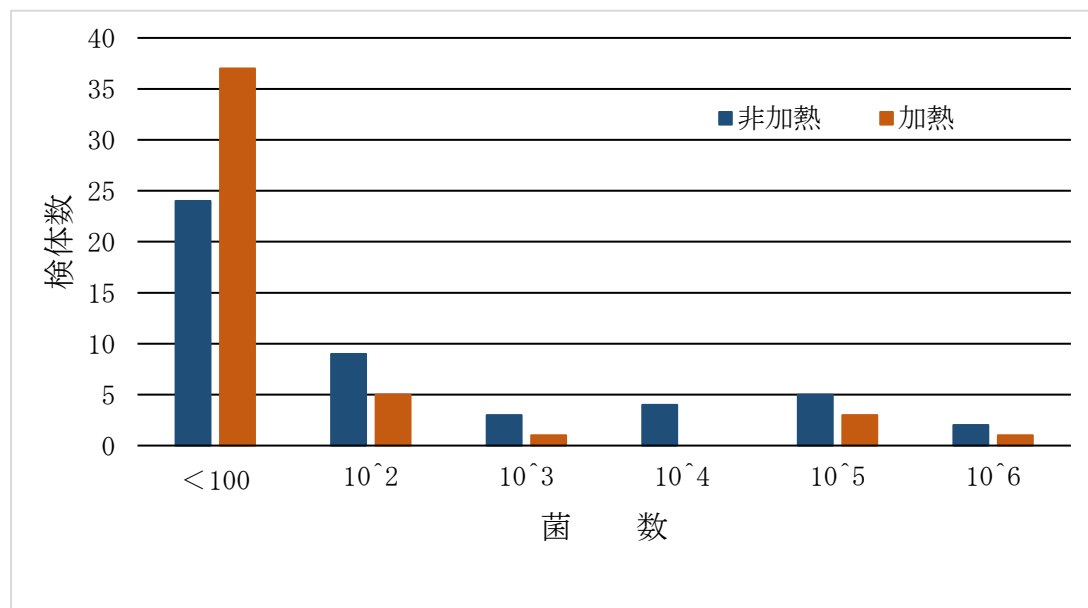


図 4－2 豚大腸内容物中の *cpa* 陽性菌数の分布

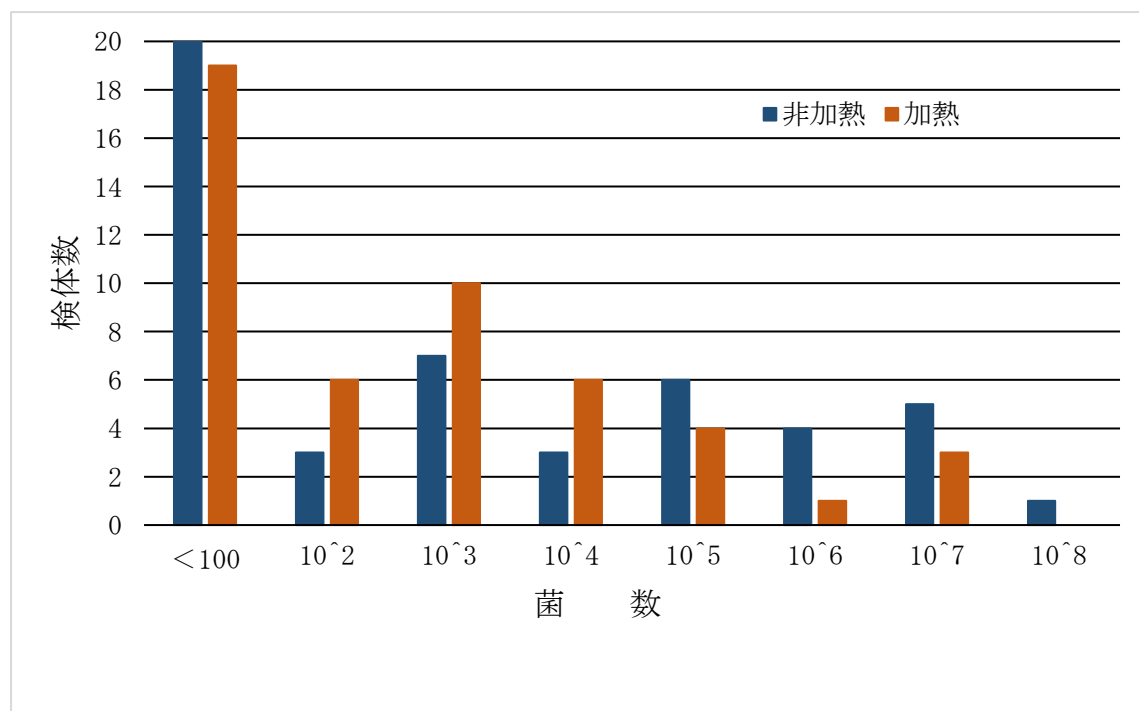


図 4－3 鶏盲腸内容物中の *cpa* 陽性菌数の分布

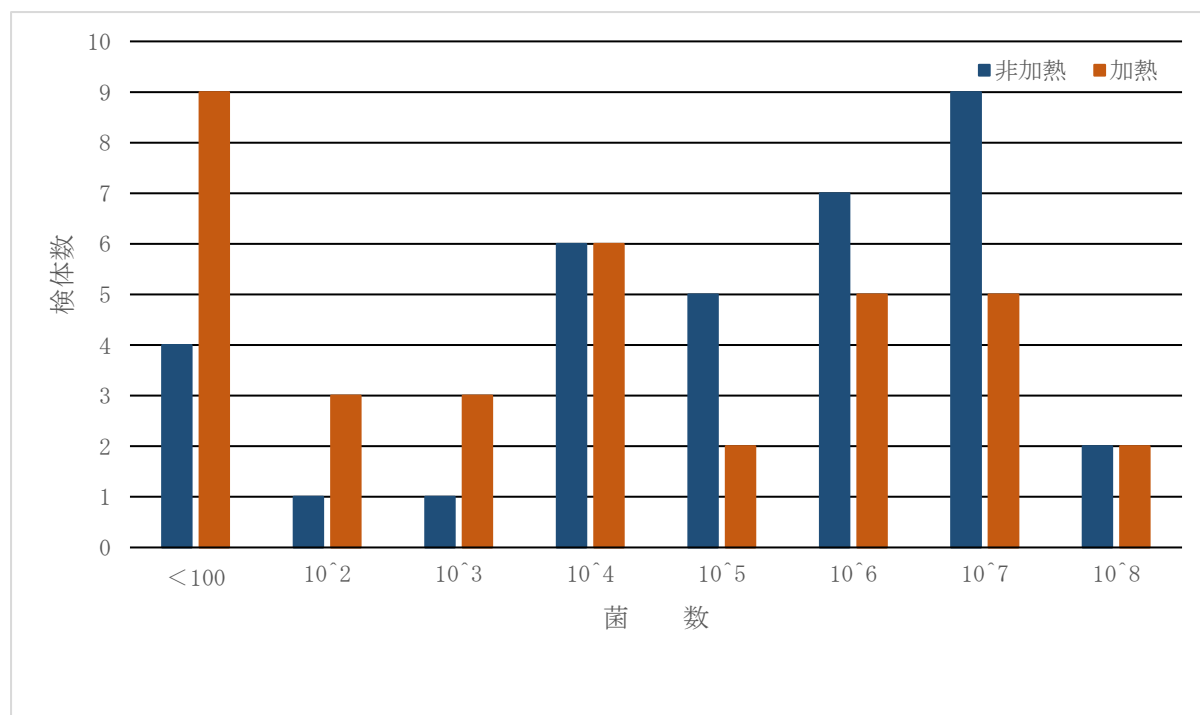


図 5 - 1 牛大腸内容物中の *cpa* 陽性菌検出率の月別推移

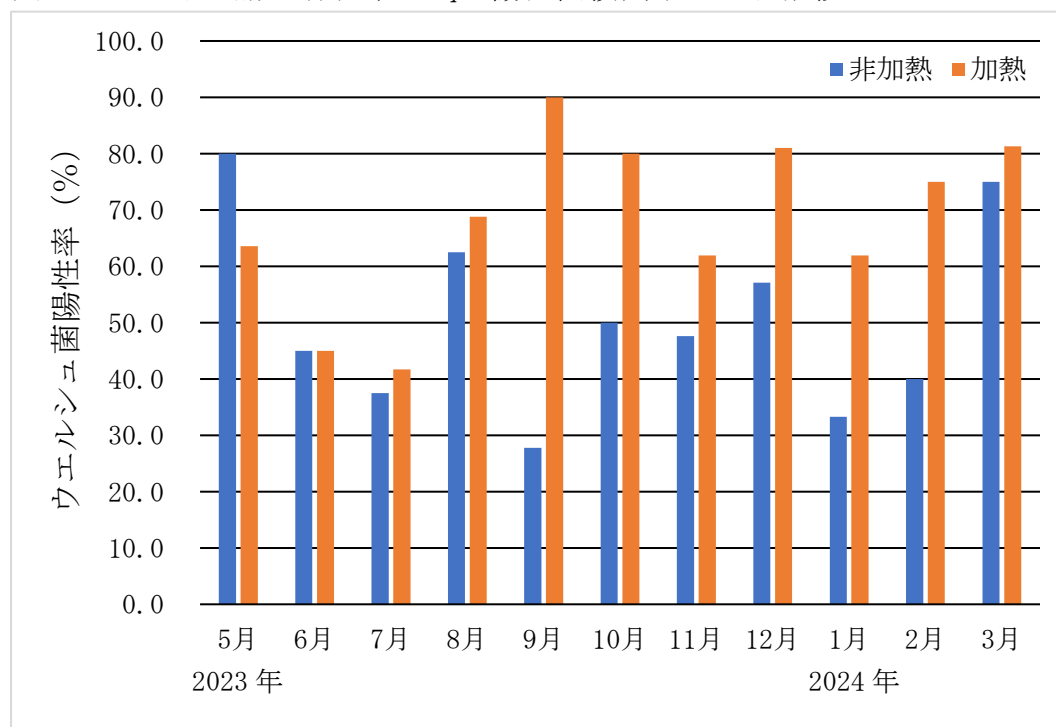


図5－2 豚大腸内容物中の *cpa* 陽性菌検出率の月別推移

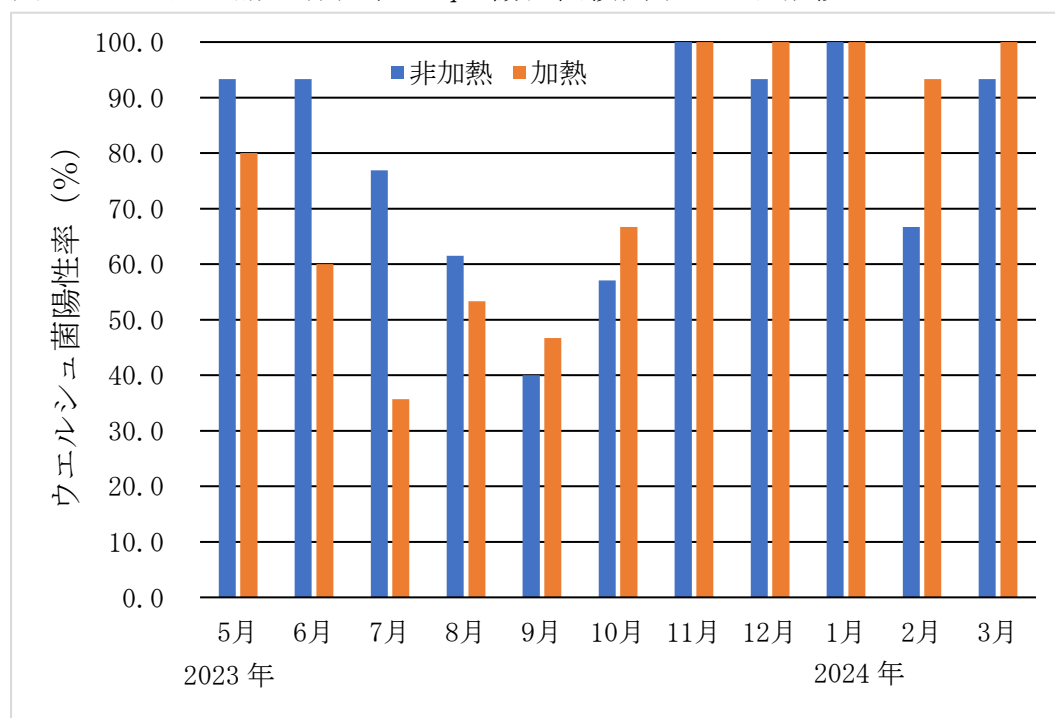


図 5 - 3 鶏盲腸内容物中の *cpa* 陽性菌検出率の月別推移

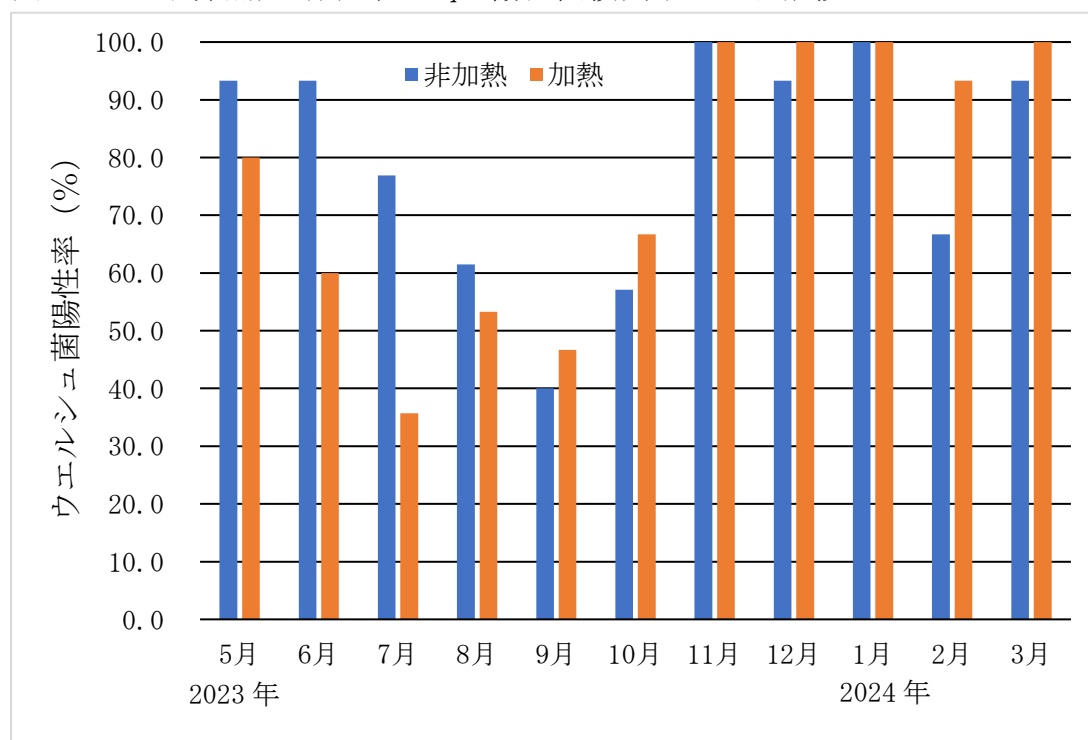


図6 O水系の各採水ポイントにおけるウエルシュ菌の分離菌数と *cpe* 陽性菌の分離頻度

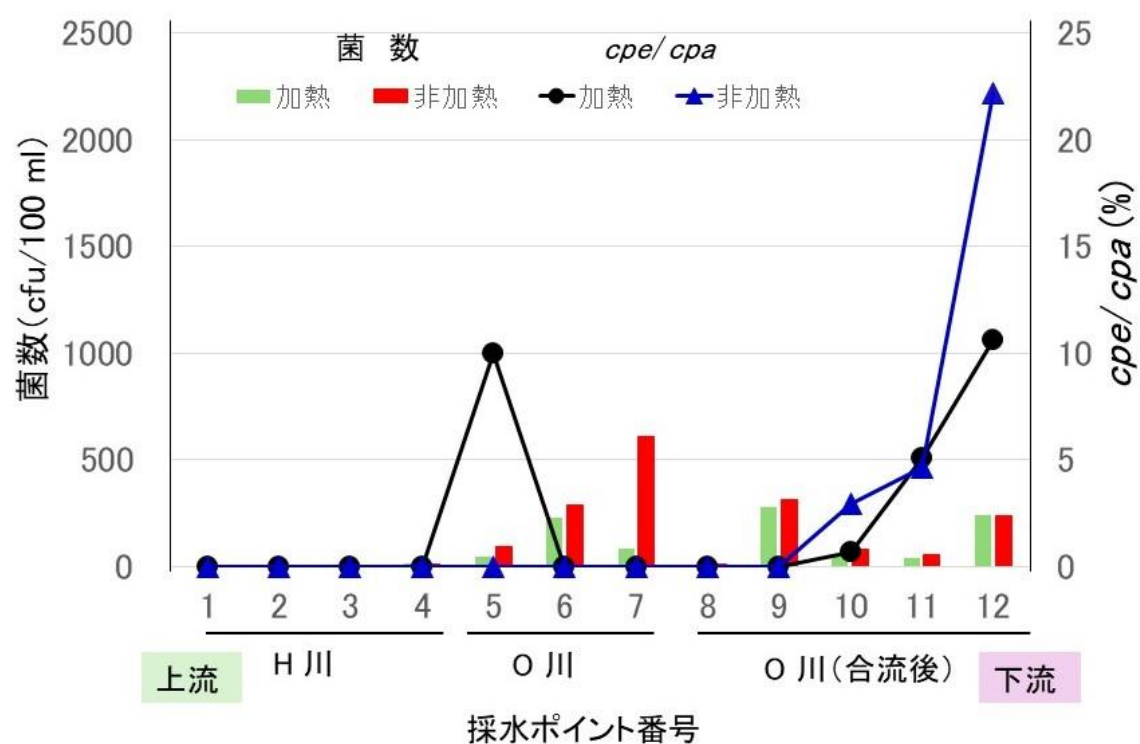


表 6 K 水系の河川水からのウェルシュ菌の分離と *cpe* 陽性菌の分離頻度

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7 定点観測地におけるウェルシュ菌の分離と *cpe* 陽性菌の分離頻度

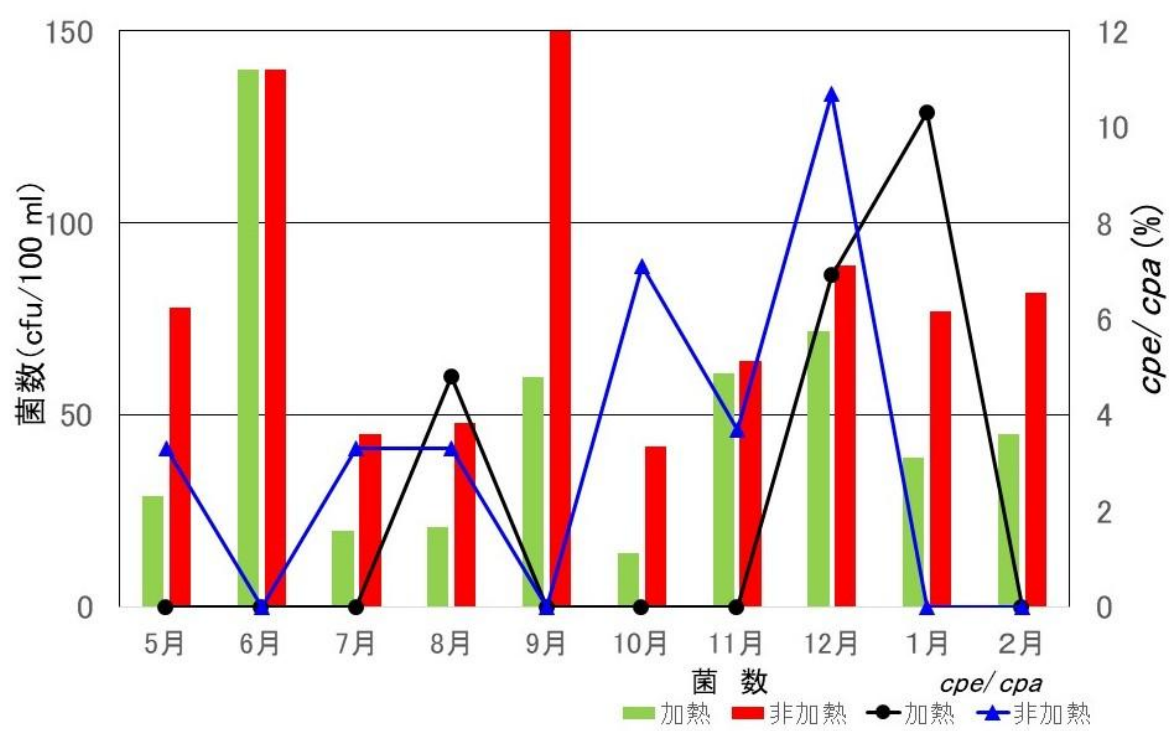


図8 下水処理場からの排水中のウェルシュ菌の分離と *cpe* 陽性菌の分離頻度

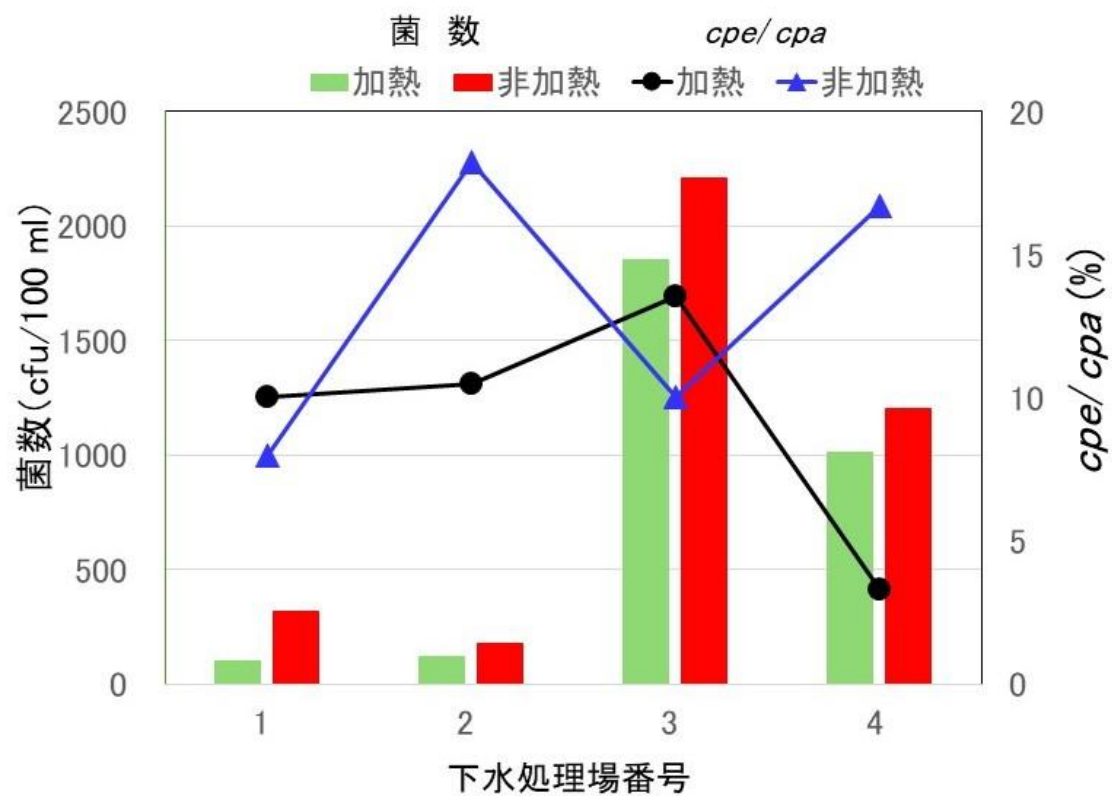
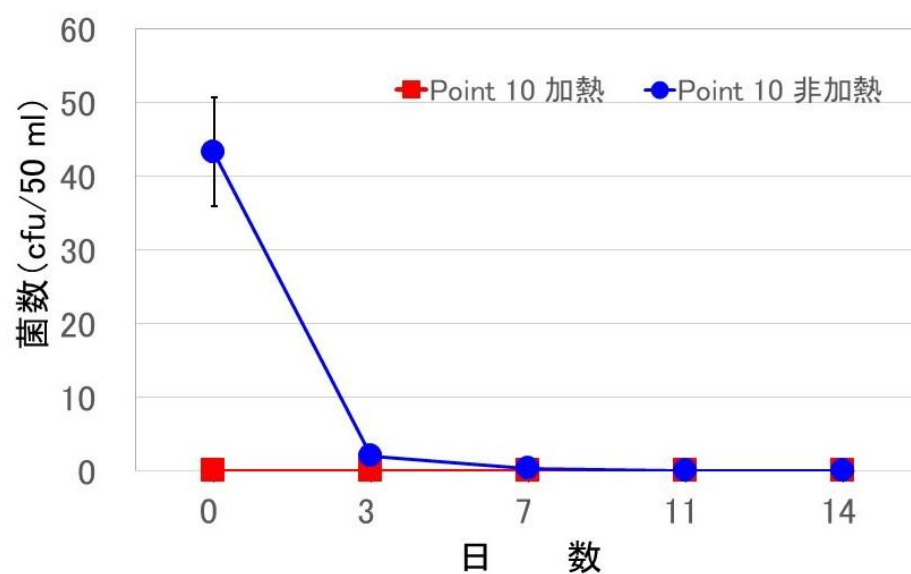
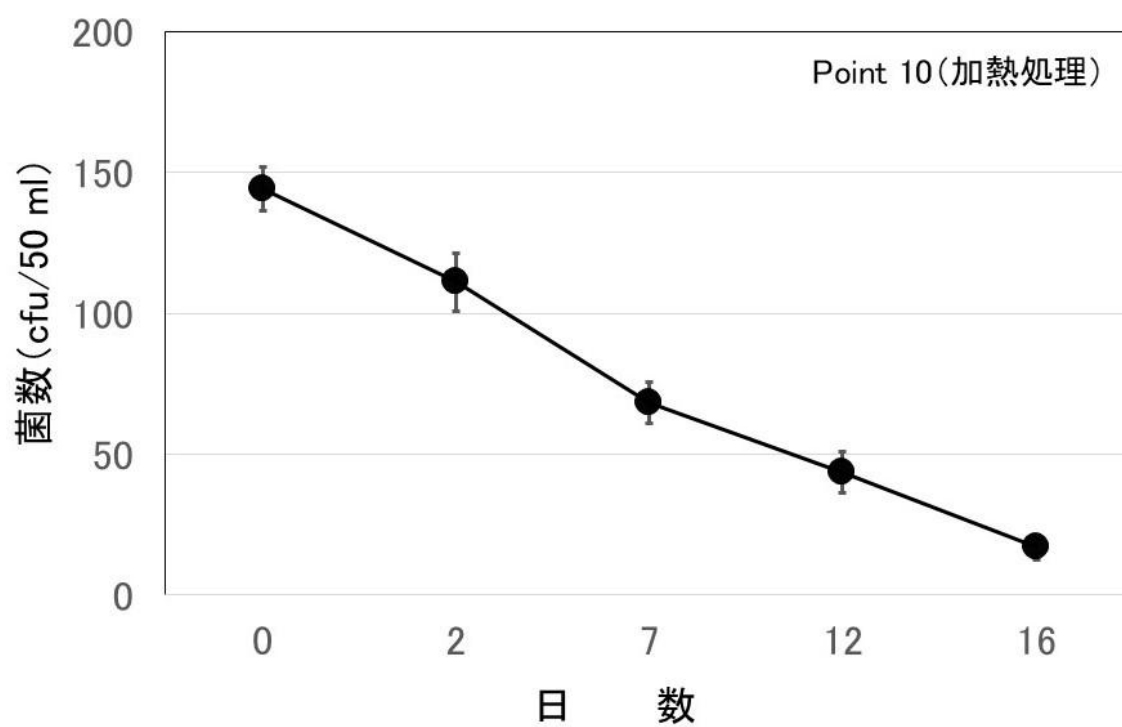


図9 *cpe* 陽性菌（栄養型）の河川水中で生存性



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 10 *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7 K水系河口で採取したカキからの *cpe* 陽性菌の分離・検出

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 8 K 水系河口で採取した川砂からの *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

