

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 岡部 信彦 川崎市健康安全研究所

研究要旨

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、嫌気状態になった食品中で急速に増殖する。このようなウエルシュ菌の特性から、調理後の冷却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ている。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ていない。この原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染食品が明らかになっていないことが挙げられる。そこで、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染実態を明らかにすることを目的に汚染実態調査を実施した。

令和 4 年度から 6 年度の間に 312 検体について検査を実施し、ウエルシュ菌が 93 検体（29.8%）分離され、そのうち 5 検体からエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を分離した。エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌 5 検体の内訳は、煮干し 2 検体、カレー粉 1 検体、素干しエビ 1 検体であった。ウエルシュ菌食中毒の原因食品として例示されることの多いカレー以外にも、煮干しを原材料としたりだしを使用して大量調理を行い、加熱後の冷却工程が不十分な状態で保管した場合には、エンテロトキシン産生性菌が増殖することが考えられた。分担研究 3 年目には、これまでのウエルシュ菌汚染実態調査の結果をもとに、川崎市保健所職員を対象に「ウエルシュ菌食中毒に対する予防対策について」の研修会を開催した。

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

荒木 靖也 川崎市健康安全研究所

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、調理後の冷却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ている。我が国では HACCP に沿った管理が義務付けられてから、3 年近く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。令和 6 年の発生件数は例年に比べ増加傾向が認められる（図 1）。この原因として、エンテロトキシン産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。また、多くのウエルシュ菌食中毒事例においても原因食材を同定できない事例が多く、さらに、各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。また、ウエルシュ菌食中毒では、原因食品が特定できない事例が多く、これらのことから、ウエルシュ菌食中毒の発生を防止できないことの要因として、保健所による飲食店等への指導に役立つ基礎的なデータの不足が、考えられた。このため、本研究では、大規模な調査を実施し、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染実態を明らかにすることを目的とした。

令和 4 年度は、カレー・香辛料、乾物、野菜等 115 検体を検査した。令和 5 年度は研究班全体での調査の結果、ウエルシュ菌の分離率の高かった乾物を中心に 100 検体について検査を行い、令和 6 年度は引き続き乾物 97 検体について検査を行った。3 年間で合計 312 検体について検査を行った。

B. 研究方法

[1] 検体

調査に使用した検体は、神奈川県内のスーパーマーケットおよび小売店で購入した。検体は購入後、適切な温度で保管し、24 時間以内に試験に供した。

[2] 検査手順

検査手順を図 1 に示す。検体 25 g を無菌的にストマッカー袋に採取しチオグリコール酸塩培地（日水製薬）を 225 mL 加え、2 分間、ストマッカー処理し、70℃で 20 分間加熱後急冷した（試料原液）。試料原液

は、42℃で24時間、増菌培養を行った。培養後、培養液からアルカリ熱抽出法でDNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートとして、ウエルシュ菌遺伝子(*cpa*)及びエンテロトキシン産生性遺伝子(*cpe*)同時検出PCRを行なった。増菌培養液を2枚のCHROM agar *C. perfringens*に塗抹し、37℃、24時間培養した。CHROM agar に発育した赤色コロニーを前述のPCRを行い、ウエルシュ菌およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌の同定を行った。エンテロトキシン産生ウエルシュ菌株はDSMO1 m l に懸濁し-80℃で保管した。

[3]スクリーニングPCR

ウエルシュ菌遺伝子およびエンテロトキシン産生ウエルシュ菌遺伝子の検出は、H. S. Guranらの方法(Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 77-82)

により、マルチプレックスPCR法で行った。増幅試薬は、令和4年度はQuick Taq HS Dye Mix (TOYOBO)を用い、令和5年度、6年度はKOD One PCR Master Mix (TOYOBO)を用い高速PCRを実施した(添付資料)。KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) 反応液 25.0 μ L に、それぞれのプライマーを 1.5 μ L (0.1 μ M) ずつ、DNA テンプレート 5 μ L、PCR グレード

の精製水 14 μ L 加え、総量 50 μ L に調整した。PCR 反応は、98℃、1 分の反応後、98℃、10 秒、55℃、5 秒、68℃、1 秒のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 68℃、1 分の反応を行った。反応終了後、PCR 産物 2 μ L を MultiNA (SHIMADZU) を用いた電気泳動で特異的なバンドの有無を調べた。

C. 研究結果

[1]スクリーニング検査

汚染実態調査に使用した 312 検体はカレー粉・香辛料 37 検体、乾物 210 検体、貝類 4 検体、牛肉 3 検体、豚肉 10 検体、鶏肉 12 検体、野菜 30 検体であった(表 5)。

増菌液から行ったスクリーニングPCRは、令和4年年度に用いたQuick Taq HS Dye Mix (TOYOBO)では、ウエルシュ菌が陽性であった33検体中増菌液PCR(*cpa* 遺伝子)が陽性になった検体は23検体(69.7%)であった。令和5年、6年度に用いたKOD One PCR Master Mix (TOYOBO)では、ウエルシュ菌が陽性であった48検体中増菌液PCR(*cpa* 遺伝子)が陽性になった検体は45検体(93.8%)であった(表 6)。また、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離されたカレー粉 1 検体、煮干し 2 検体、煮干し 1 検

体、素干しエビ 1 検体、そば粉 1 検体、計 5 検体のスクリーニング PCR ではエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌遺伝子(*cpe* 遺伝子)が検出された。

[2]菌分離

増菌液を CHROMagar *perfringens* 2 枚に塗抹し、赤色コロニー10個を分離し、遺伝子保有状況をマルチプレックス PCR で確認した。

令和4年度は115検体について調査し(表1)、カレー37検体中15検体(40.5%)からウエルシュ菌が分離され、そのうち1検体からエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離された。また、乾物、鶏肉、野菜からウエルシュ菌が分離された。令和5年度、令和6年度は研究班全体の調査で分離率の高かった乾物を中心に検査を行った。令和5年度は乾物100検体について検査し(表2)、煮干し37検体中15検体(40.5%)よりウエルシュ菌を分離し、1検体よりエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を分離した。また、粉類20検体中4検体(20.0%)ウエルシュ菌を分離し、1検体よりエンテロトキシン産生性得ウエルシュ菌を分離した。令和6年度は乾物97検体について検査し(表3)、煮干し28検体中5検体

(17.9%)ウエルシュ菌を分離し、1検体よりエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を分離した。また、素干しエビ16検体中7検体(43.8%)よりウエルシュ菌を分離し、そのうち1検体より、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を分離した。そのほか、だしパック21検体中1検体(4.8%)そば粉3検体中3検体(100%)きくらげ24検体中24検体(100%)干ししいたけ2検体中1検体(50.0%)からウエルシュ菌を分離した。

エンテロトキシン産生ウエルシュ菌が産生された煮干し、そば粉は国内産、素干しエビはベトナム産によるものであった。

D. 考察

令和4年度から令和6年度までの3年間のウエルシュ菌汚染実態調査結果を表4に示す。312検体中93検体(29.8%)からウエルシュ菌が分離され、5検体からエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌が分離された。5検体の内訳は、煮干し2検体、カレー粉1検体、素干しエビ1検体そば粉1検体であった。煮干しを味噌汁、煮物等のだしとして使用し、大量調理を行い、その後の不適切な温度管理によっては、食中毒発生の原因と

なりうることが考えられた。

今回のような汚染実態調査を実施することで、原因不明食中毒の原因食材を推察することが可能となり、飲食店等へ効果的な指導を行うための基礎的なデータとなることが示唆された。

また、令和4年度に実施した増菌液からのスクリーニングPCRは、検出率が70.0%とやや感度の落ちるものであったがであったが、令和5年度から使用したマルチプレックスPCR試薬(KOD One PCR Master Mix)では、令和5年度、令和6年度においては、ウエルシュ菌が陽性となった48検体中45検体(93.8%)でスクリーニングPCRが陽性となった。各サイクルの反応時間が短く、感度がよく、PCR反応時間が30分程度と短時間で終了するため、本試薬を使用することで作業効率の向上に非常に役立った。

E. 行政関係者向けの研修会開催

令和7年3月4日(火)川崎市保健所職員を対象に「食中度予防策(ウエルシュ菌を中心に)」について研修会をオンライン形式にて開催した。公衆衛生に携わる職員が多数参加した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

第45回日本食品微生物学会学術総会
「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解析」(淀谷雄亮)

第36回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静細菌部会

「市販食品におけるウエルシュ菌の汚染状況について」(小嶋由香)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 ウエルシュ菌検出状況（令和4年度）

食品区別	検体数	ウエルシュ菌陽性数（％）	エンテロトキシン産生性 ウエルシュ菌陽性数（％）
カレー粉・香辛料	37	15（40.5）	1（2.7）
乾物	13	5（38.5）	0
魚・エビ	6	0	0
貝類	4	0	0
牛肉	3	0	0
豚肉	10	0	0
鶏肉	12	8（66.7）	0
野菜	30	5（16.7）	0
計	115	33（28.7）	1（0.9）

表 2 ウエルシュ菌検出状況（令和 5 年度）

食品区別	検体数	ウエルシュ菌陽性数（％）	エンテロトキシン産生性 ウエルシュ菌陽性数（％）
海藻	27	0	0
煮干し	37	15（40.5）	1（2.7）
野菜乾燥品	7	0	0
豆類	5	0	0
魚介乾燥品	3	0	0
粉類	20	4（20.0）	1（5.0）
計	100	19（19.0）	2（2.0）

表 3 ウエルシュ菌検出状況（令和 6 年度）

食品区別	検体数	ウエルシュ菌陽性数（％）	エンテロトキシン産生性 ウエルシュ菌陽性数（％）
煮干し	28	5（17.9）	1（3.6）
素干しエビ	16	7（43.8）	1（6.3）
だしパック	21	1（4.8）	0
そば粉	3	3（100）	0
きくらげ	24	24（100）	0
きざみのり	1	0	0
干ししいたけ	2	1（50.0）	0
こんぶ	2	0	0
計	97	41（42.3）	2（2.1）

表 4 ウエルシュ菌検出状況（令和 4 年度～令和 6 年度）

食品区別	検体数	ウエルシュ菌陽性数（％）	エンテロトキシン産生性 ウエルシュ菌陽性数（％）
カレー粉・香辛料	37	15（40.5）	1（2.7）
乾物	210	65（31.0）	4（2.0）
魚・エビ	6	0	0
貝類	4	0	0
牛肉	3	0	0
豚肉	10	0	0
鶏肉	12	8（66.7）	0
野菜	30	5（16.7）	0
計	312	93（29.8）	5（1.6）

表 5 スクリーニング PCR における陽性率

使用した増幅試薬	ウエルシュ菌陽性検体数	増菌液からのスクリーニング PCR 陽性検体数 (%)
Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO)2022 年度使用	33	23 (69.7)
KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) 2023 年度、2024 年度使用	48	45 (93.8)

