

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

食品や環境からのウエルシュ菌の検出および分子疫学的解析

研究分担者 渡辺 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

最も重要な食中毒菌の1つであると認識されるウエルシュ菌について、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品や、個々の食中毒事例のエンテロトキシン産生株の由来など明らかにになっていないことは多い一方で、これまで網羅的なウエルシュ菌汚染実態調査はほとんど行われていない。そこで本研究では、ウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品の明確化および食中毒原因菌の汚染源を明らかにすることを目的として、流通量がある程度多い網羅的な食品を対象として統一された検査手法を用いたウエルシュ菌汚染実態調査を行った。さらに本研究班でのこれまでの分離株および過去に分離された食中毒患者等由来の *cpe* 陽性ウエルシュ菌株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析を実施した。鶏肉、牛肉、豚肉、海藻、貝類、魚・エビ類、根菜等、カレー粉および出汁・乾物といった国内流通食品のほか、野菜に付着した畑土壌、下水処理場放流水の河川流入域の表層水およびその下流の河口部の川底泥を含む水を採取し、菌株分離実験に供試した。その結果、肉類からは、*cpe* またはこれを保有する生菌は確認されず、一方で、乾物や海産物、根菜では複数検体から検出された。*cpe* 陽性菌株の cgMLST に基づく分子疫学解析を行った結果、いくつかの海産物や乾物といった食品由来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。これらの結果から、日本国内においては、食中毒を起こすウエルシュ菌の汚染原因食品として肉類以上に農作物や海産物およびその乾物に着目すべきであることが示された。また、これらの食品は畑土壌や海洋沿岸部でウエルシュ菌に汚染され、食品加工の乾燥工程において選択的にウエルシュ菌が生残・増殖した可能性が考えられた。

研究協力者

小嶋由香	川崎市健康安全研究所	三澤尚明	宮崎大学
淀谷雄亮	川崎市健康安全研究所	川上 浩	共立女子大学
西里恵美莉	川崎市健康安全研究所	橋元優香	共立女子大学

A. 研究目的

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、ヒトや動物の大腸内常在菌であり、土壌や下水、河川、海等にも広く分布し、食肉、魚介類あるいは野菜など多くの食品を汚染している。日本では大規模な集団発生事例が多く、1件当たりの患者数が他の細菌性食中毒よりも圧倒的に多いことから、最も重要な食中毒菌の一つとして認識されている。本菌は食中毒の原因菌となるが、食中毒原因菌となりうる菌株は全ての *C. perfringens* ではなく、芽胞形成時にエンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin: CPE) を産生する菌株に限られる。

食中毒由来株におけるエンテロトキシン産生率は 80~90% 程度である一方で、健康な人、動物および自然界から分離される菌株では 1~2% 以下であり、エンテロトキシン産生株の主たる汚染食品や、その汚染源は明らかになっていない。エンテロトキシン産生株の食品での分布状況、およびそれらの汚染源を環境中から検索し明らかにする必要

がある。

そこで本研究では、大規模な食品の汚染実態調査を実施し、ウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品の明確化およびエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の汚染源を明らかにすることを目的として、以下の項目について検討した；

- 1) 食品や環境検体からのウエルシュ菌株の分布実態調査
- 2) ウエルシュ菌分離菌株を用いた分子疫学解析

B. 研究方法

[1] 菌株分離実験の供試検体

市販食品として、鶏肉、牛肉（ひき肉を含む）、豚肉、海藻、貝類、魚・エビ、根菜、カレー粉、および出汁・乾物を供試した。さらに、市販の根菜等から付着する土を回収した。加えて、川崎市内河川の下水処理場放流水の河川流入域の表層水およびその下流の河口部の表層水・底泥を含む水を採取し、供試した。

[2] 食品からの菌株分離

ストマッカー袋に液体チオグリコレート培地（日本製薬株式会社）225 ml を取り、検体 25 g を加

えて 1 分間ホモジナイズした。これを試料原液とした。試料原液をストマッカー袋に入れたまま、ウォーターバス中で内部温度 70℃に保持しつつ 20 分間加温した。その後流水急冷し、42℃・24 時間嫌気培養し、これを増菌培養液とした。

増菌培養液からアルカリ熱抽出法にて直接 DNA を抽出し、増菌培養液中の *cpe* および *cpa* の保有状況を PCR で確認した。DNA 抽出液をテンプレートとして、Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) を用いたマルチプレックス PCR を行い、*cpe* および *cpa* を増幅した。プライマー塩基配列は以下の通りである；multi-*cpa*-F(5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3')、multi-*cpa*-R(5'-CCTCTGATACATCGTTAAG-3')、multi-*cpe*-F(5'-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3')、multi-*cpe*-R(5'-GGACCAGCAGTTGTAGATA-3')。さらに CHROMagar *C. perfringens* (CCP；関東化学株式会社) 平板培地上に増菌培養液を画線塗抹し、37℃・24 時間嫌気培養を行った。CCP 平板上に形成したオレンジ色のコロニーを 1 シャーレにつき 5~30 個ずつ釣菌し、Quick Taq HS DyeMix にプライマーを加えた PCR ミックスバッファーに菌体を直接懸濁して、上述の増菌培養液からの *cpe* および *cpa* 検出プロトコルと同様に

マルチプレックス PCR を行い、各コロニーの *cpe* および *cpa* 保有状況を判定した。

〔3〕 土壌からの菌分離

野菜付着土壌の回収重量を計測した。ストマッカー袋に回収土壌と液体チオグリコレート培地(日本製薬株式会社)を加え、1 分間ホモジナイズし、これを試料原液とした。試料原液をストマッカー袋に入れたまま、ウォーターバス中で内部温度 70℃に保持しつつ 20 分間加温した。その後、流水急冷し、アネロパック・ケンキ(株式会社スギヤマゲン)を用いて 42℃・24 時間嫌気培養し、これを増菌培養液とした。増菌培養液中の *cpe* および *cpa* の保有状況およびウエルシュ菌生菌の検出・分離は、B-〔2〕と同様に実施した。

〔4〕 水からの菌分離

神奈川県川崎市内下水処理場放流部の多摩川または矢作川の表層水、およびこれより下流の多摩川河口部の表層水または底泥を含む水を採取した。水中に含まれるウエルシュ菌の *cpe* 陽性株の定量法として、「水道施設の技術的規準を定める省令」における「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」の別添 2「嫌気性芽胞菌の検査方法」(平成 19 年

3月30日) (健水発第0330006号)を参照、一部改変し実施した。河川からの採水試料を500 ml程度採取した。採水試料100 ml程度をストマッカー袋に分取し、75℃で20分間加熱後、メンブランフィルター法により試料をフィルターに吸引ろ過した。メンブランフィルターをCCP培地寒天面に密着させた上にCCP培地を10 mL程度重層し固化させ、さらに同培地を10 mL程度重層して、37℃で24±2時間嫌気培養した。形成されたコロニーを計測、およびB-〔2〕で上述した *cpa*・*cpe* 特異的マルチプレックス PCR を行い、増幅産物の確認によって菌株の *cpa*・*cpe* 保有状況を判定した。

〔5〕 分離株の全ゲノムシーケンスおよび型別

cpe 陽性ウエルシュ菌として、本研究班において分離した食品由来株および過去に分離された患者由来株を供試した。保存菌株を復元し、菌体からDNA抽出を行った。これをテンプレートとして、ゲノムライブラリを作製し、i-Seq またはMiSeq(illumina株式会社)を用いて全ゲノムシーケンスを行った。出力されたリードのアセンブリを行い、得られたゲノムDNA塩基配列のテキストデータ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遺伝子座のMultilocus sequence typing (cgMLST)を判定した。これを指標として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〕 食品における *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

供試した食品の培養検査の結果、*cpe* 保有ウエルシュ菌陽性率が最も高かったのは生魚・エビ、次いで海藻であったことを確認した。これまでウエルシュ菌食中毒の主な原因食品として認識されてきた肉類では、牛肉ではひき肉を含めて合計で111検体の検査を行ったが、豚肉および鶏肉から *cpa* のみが検出されたのみで、*cpe* は1検体からも検出されなかった。また、海産物やそれを含む乾物では *cpe* が検出され、これらでは *cpa* 陽性率も比較的高いことが示された。食品検体をさらに細かく分類し結果を比較したところ、エビ類、貝類、ヒトエグサ・アオサ、乾燥昆布では *cpa* の陽性率が高く、さらにエビ類および乾燥昆布では *cpe* の陽性率も同時に高かった。

〔2〕 野菜付着土壌からの *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

増菌培養液を平板に塗抹培養して分離されたコロニーでは、ニンジン土、ゴボウ土、ジャガイモ土、長ネギ土および検体から *cpe* 陽性菌が分離された。CCP 平板上の *cpe* 陽性コロニーの出現頻度は、ニンジン土でコロニー10 個中 3 (30.0%)、ゴボウ土で 20 個中 15 (75.0%)、ジャガイモ土で 20 個中 1 (5.0%)、長ネギ土では 32 個中 1 (3.1%) であり、検体間での頻度の変動幅は大きく、場合によっては分布するウエルシュ菌の中でも *cpe* 陽性菌の頻度が高く、高濃度分布のケースもあることが確認された。

〔3〕 河川で採取した水での *cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布実態調査

下水処理場放流水の表層水では 3 検体全てから *cpe* 陽性ウエルシュ菌が 21.9~1,042.5 cfu/L の濃度で検出され、2 年間の調査に渡って下水処理場放流水の河川流入部付近の水では *cpe* 陽性菌数が下流よりも高い傾向にあったことが確認された。また多摩川河口付近で採取された水では、表層水から *cpe* 陽性菌は検出限界以下であったが、川底泥を含む水では 656.7 cfu/L の濃度で検出され、川底に近い部位での *cpe* 陽性菌の分布が示唆された。

〔4〕 分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析

ウエルシュ菌食中毒原因菌の直接の由来を推定するため、本研究班において分離した環境および食品由来、および過去に分離された患者由来の *cpe* 陽性ウエルシュ菌株の cgMLST プロファイルを指標とした Minimum Spanning Tree を作製した。この際、過去の研究より確認した、同一の集団食中毒事例内で分離された菌株間での、異なる ST を示した遺伝子数が 1431 個中最大で 15 であった (1416 個以上一致した) ことを基準として、菌株間の遺伝的関連性を評価した。その結果、同一の食中毒事例における患者由来株のみで構成されたクラスターは存在した一方で、今回解析した食中毒事例とは関連の無い市販食品由来菌株の中で、食中毒患者由来株と ST が 1416 個以上一致した菌株は 2 株確認され (市販煮干し由来株、市販生カキ由来株各 1 株)、食中毒患者由来株と ST が 1434 個一致した菌株も 1 株 (市販そば粉由来株) 確認された。これらの菌株は、食中毒原因菌株と近縁であったことが示唆された。

D. 考察

〔1〕 ウエルシュ菌の食品や環境中の分布実態

農作物や水産物およびそれらの

乾物、野菜付着土壌および下水処理水放流部付近や河川において、*cpe* 陽性ウエルシュ菌の分布が示された。日本国内においては、食中毒を起こすウエルシュ菌の汚染原因食品として肉類以上に農作物や海産物およびその乾物に着目すべきであること、また河川や海洋の沿岸部、農作物畑土壌などで *cpe* 陽性ウエルシュ菌の汚染が起こっており、さらに乾燥工程での芽胞の選択的な生存や増殖が発生している可能性が考えられた。

〔2〕ウエルシュ菌分離菌株を用いた分子疫学解析

分離株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析の結果、食中毒患者由来株と、同一の集団食中毒事例内での分離菌株間と同程度に類似した allele のタイプを持つ海産物または乾物食品由来株が複数存在した。これら食品由来株は食中毒患者由来株と遺伝的に比較的近縁であると言え、分子疫学的に関連がある可能性が考えられた。一方で、これらの株の由来の偏りや傾向は、現状のデータセットと解析法では確認されなかった。これらのことから、食品の種類などによって、ウエルシュ菌食中毒のリスクの偏りや傾向を把握することはできなかったが、一方で、従来、主なウエルシュ菌食

中毒の原因と目されてきた肉類でなく、農作物や海産物を中心とした食品や、畑土壌や水系の環境食品や環境が、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もあると言え、大規模な菌の収集と分子疫学解析を今後も継続して検討する必要性が高いことが示された。すなわち、収集した分離株のジェノタイプングや分子系統解析による疫学解析をより解像度の高い解析方法によって実施し、菌の動態を疫学的に考察することによって、今後、ヒトに食中毒を起こすリスクが高い食品や、食中毒原因株の汚染源を特定できると考えられた。

E. 結論

本研究ではウエルシュ菌食中毒のリスクが高い食品の明確化および食中毒原因菌の汚染源を明らかにすることを目的として、網羅的な食品を対象としたウエルシュ菌汚染実態調査を行った。さらに本研究班での分離株および過去に分離された食中毒患者等由来株の全ゲノムシーケンスおよび分子疫学解析を実施した。その結果、農作物や海産物の乾物から最も高頻度で *cpe* 陽性菌が検出され、一部の株では患者由来株との分子疫学的関連性が示され、日本国内においては、食中

毒を起こすウエルシュ菌の汚染原因食品として肉類以上に農作物や海産物およびその乾物に着目するべきであることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. J. Food Protect. 2025. 88:100429.

2. 学会発表

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
テロトキシンの遺伝子保有ウエル
シュ菌の汚染状況. 第45回日本食
品微生物学会学術総会
(2024.09.06)

淀谷雄亮、西里恵美莉、荒木靖也、
小嶋由香、渡辺麻衣子、大西貴弘、

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 (2024.09.06)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

