

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

総合研究報告書

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

ウエルシュ菌食中毒制御に資する知見を得るため、食品や河川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、分離株の分子疫学的解析、迅速検査法の作製を行った。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、貝から食中毒の直接の原因であるエンテトロキシン遺伝子（*cpe*）陽性芽胞の検出を行ったところ、カレーミックス・香辛料、貝、乾燥水産食品、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、乾燥水産食品はウエルシュ菌陽性検体数に占めるエンテトロキシン遺伝子（*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の汚染源と考えられていた牛肉、豚肉からは *cpe* 保有芽胞は検出されなかった。

河川および海産物における *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* 陽性ウエルシュ菌の汚染源である可能性、また *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。

本研究で得られた食品・環境由来の *cpe* 陽性ウエルシュ菌と過去の食中毒事例由来株の分子疫学的解析を行ったところ、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。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ことが示唆された。

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抑制されることが明らかになった。これらの結果から、牛肉、豚肉は汚染源としての重要性は低い、ウエルシュ菌の増殖に大きな影響をおよぼすため、食肉はウエルシュ菌食中毒を制御する上で重要な因子であることが示唆された。

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。

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
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。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いるが、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、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、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の主たる汚染源を明らかにした。また、食中毒予防のための基礎的なデータを収集するために、ウエルシュ菌食中毒が多発する煮物中の増殖挙動を検討した。食肉への汚染を考察するために家畜の腸内容物からのウエルシュ菌の検出を行うとともに、汚染実態調査の結果から、河川を介したエンテロトキシン陽性ウエルシュ菌の食品への汚染が示唆されたため、河川や貝における汚染調査を行った。さらに、本研究で得られた食品や環境からの分離株の分子疫学的解析を行い、これらの株の由来の推定を行った。さらに、ウエルシュ菌の迅速検査法の検討

を行った。

B. 研究方法

[1]食品の汚染実態調査

国内で市販されているカレーミックス・香辛料、根菜、食肉（牛肉、豚肉、鶏肉）、魚・エビ、貝、乾燥水産食品、乾燥海藻など、計 901 検体の調査を行った。食中毒の直接の原因となるウエルシュ菌芽胞を対象に調査を行った。一部の検体では、最確数法によって汚染菌量の推定を行った。

[2]煮物中での増殖挙動の解析

煮物のモデル食品としてカレーを採用した。カレーには、野菜と食肉（牛肉、豚肉、鶏肉、もしくは食肉非添加のいずれか）を加え、カレーミックスとしては、ブロックタイプの固形のもの、もしくは香辛料を破碎しただけのものを使用し、合わせてカレーミックス非使用の検体も作成した。これらのカレーに、香辛料由来のウエルシュ菌を接種し（約 10^4 cfu/800 mL カレー）、42°C で培養し、1 時間毎に菌数を測定した。

[3]家畜内容物からのウエルシュ菌の検出

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 であった。腸内用物から芽胞および栄養体の検出を行った。

[4]河川における汚染調査

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、非加熱と加熱処理した各 100ml の原液および希釈液を 0.2 μ m 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°C、24 時間嫌気培養を行った。コロニー PCR によって、ウエルシュ菌およびエンテロトキシン遺伝子の検出を行った。

[5]貝における汚染調査

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。

[6]分離株の分子疫学的解析

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。

[7]迅速検査法の検討

ウエルシュ菌に対する免疫磁気ビーズの作製を試みた。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 1 mL にウエルシュ菌抗体 10 μ g 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 μ L 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。

[8] ウエルシュ菌の検出方法

本研究では、食中毒の直接の原因となるウエルシュ菌芽胞を対象に調査を行った。本研究をとおして使用した検出方法は以下のとおりである。

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。芽胞を検出する場合は、次にストマッカーバックを 70℃、20 分間加熱した。その後、42℃、24 時間の増菌培養を行った。増菌培養液からアルカリ熱抽出法で抽出した DNA をテンプレートとして利用し、マルチプレックス PCR を行った。マルチプレックス PCR では、ウエルシュ菌のマーカー

ーとしてアルファ毒素遺伝子 (*cpa*) を検出するとともに *cpe* を検出した。さらに、増菌培養液を 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。

C. 研究結果

[1] 食品の汚染実態調査

汚染実態調査では、カレーミックス・香辛料、貝、根菜、鶏肉から *cpe* が検出された。特にカレーミックス・香辛料は、*cpa*、*cpe* ともに陽性率が高かった。また、*cap* 陽性検体中に占める *cpe* 陽性検体の割合も高く、カレーミックス・香辛料には *cpe* 陽性ウエルシュ菌芽胞が特に汚染していることが示唆された。一方、これまでウエルシュ菌食中毒の原因食品として重要視されていた牛肉、豚肉からは、*cpe* は検出されなかった。特に牛肉ではすべての検体で *cpa* が検出されず、豚肉は 1 検体だけから *cpa* が検出された。

貝や乾燥水産食品（煮干し、素干しエビなど）において *cpa*、*cpe* が高率に検出された。また、*cap* 陽性検体中に占める *cpe* 陽性検体の割合も高く、*cpe* 陽性ウエルシュ菌が高率に汚染している可能性が示唆

された。

[2] 煮物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（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] 家畜内容物からのウエルシュ菌の検出

牛、豚、鶏の腸内容物からは、年間を通じてウエルシュ菌の栄養体および芽胞が検出された。しかし、*cpe* 保有株は検出されなかった。

[4] 河川における汚染調査

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。河口の川砂とカキから *cpe* 陽性菌が分離された。

[5] 貝における汚染調査

貝は 62 検体を調査した。調査の結果、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 %) から *cpe* 陽性株が検出された。

[6] 分離株の分子疫学的解析

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。

[7] 迅速検査法の検討

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

ス・香辛料、貝、乾燥水産食品などが *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、わが国の沿岸部の一部が *cpe* 陽性のウエルシュ菌によって汚染され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、昆布などの乾燥水産食品は、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発生しているが、乾燥水産食品を“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、ヒトがエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を保菌しており、下水をとおして河川や沿岸部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という報告がなされている。今回の調査では、河川、特に下水処理施設の放流水で強く汚染が認められ、また、海産物においても汚染が強く認められたことから、わが国でも同様に、河川や沿岸部がエンテロトキシン産生性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。また、家畜の腸内容物から、*cpe* 保有株を検出することができなかった。これらの結果から、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。鶏肉では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。

これらの結果は、分子疫学的解析によっても確認された。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確認できなかった。これらの結果は、従来、食中毒の主な原因であると考えられてきた食肉以外の広い範囲の食品でも、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。

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-Kudoa 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）
- 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・登録状況
なし

