

令和 7 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制御のための検査法の開発

及び汚染実態把握

研究代表者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品中におけるウエルシュ菌の増殖に関する研究

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

食肉添加によるウエルシュ菌増殖促進機構およびウエルシュ菌の耐熱性について検討を行った。食肉以外のタンパク源として、大豆ミートとペプトンを用いて、ウエルシュ菌の培養を行ったが、食肉を添加したものと同程度に増殖した。大豆ミート、ペプトン、牛肉のいずれかを添加すると、酸化還元電位は大きく低下した。また、タンパク源を添加していないカレーの pH は 4.8 で、ウエルシュ菌の増殖には適していなかったが、タンパク源を添加することによって、増殖可能な pH 域まで pH が上昇した。以上の結果から、タンパク源を添加することによって、食品中の栄養、酸化還元電位、pH が変化し、ウエルシュ菌の増殖を促進することが明らかになった。

芽胞が発芽後、増殖可能な 45℃ 以下に低下するまでの温度帯は、ウエルシュ菌栄養体にとって脆弱な温度帯である。55℃ における D 値を調べたところ、ウエルシュ菌食中毒由来株と香辛料由来株とで、D 値が高い傾向が認められた。一方で、食中毒由来株であるにも拘らず D 値が非常に低い株も認められた。現在、ウエルシュ菌の増殖予防として、食品の急速冷却が推奨されている。しかし、不適切な冷却は低耐熱性株の生残を促進する結果となってしまう、結果的に食中毒事例数が減少しない要因となっているのではないかと考えられた。

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依然発生が続いており、減少の傾向が認められない。厚生労働科学研究 22KA1002 では、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。食品中での増殖挙動の解析を行ったところ、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。

これまでの研究成果を踏まえ、本研究では、調理過程におけるウエルシュ菌増殖制御を目的とし、食品中でのウエルシュ菌増殖に関わる要因について検討を行う。今年度は、食品への食肉添加によるウエルシュ菌増殖促進効果のメカニズムを検討するとともに、ウエルシュ菌株の耐熱性について検討を行った。

B. 研究方法

[1] タンパク源とウエルシュ菌増

殖との関係

（1）タンパク源の影響

玉ねぎ 100g、じゃがいも 110g、にんじん 50g、さらにタンパク源としてペプトン 24g もしくは大豆ミート 53g 加え、最終的に蒸留水で全量 800 mL に調整し、オートクレーブ処理したものを煮物のモデル食品として作製した。モデル食品はオートクレーブ後、42℃まで冷却した。その後、24 時間培養したウエルシュ菌（10～60 cfu）を接種した。接種菌株は、これまでの研究（厚生労働科学研究 22KA1002）での汚染実態調査でカレーミックス・香辛料から分離された 5 株を使用した。接種後、1 時間ごとにモデル食品をよく攪拌した後、モデル食品を採取し、クロモアガー *C. perfringens*（関東科学）に塗抹し、コロニー数を計数した。

（2）カレーの酸化還元電位および pH の測定

玉ねぎ 100g、じゃがいも 110g、にんじん 50g、さらにタンパク源として牛肉 120g、ペプトン 24g もしくは大豆ミート 53g のいずれかを加えた。さらに粉末タイプのカレーミックス 5g を加え、水で全量を 800 mL に調整した。オートクレーブ後、42℃まで冷却し、酸化還元電位および pH を測定した。

[2] ウエルシュ菌株の耐熱性比較

チオグリコレート培地にウエルシュ菌を接種し、37℃、24 時間培養した。培養後、55℃で 20 分加熱した。加熱

前後の菌液をクロモアガー*C. perfringens* (関東科学)に塗抹し、得られた菌数から、55℃でのD値を求めた。使用した菌株は、厚生労働科学研究 22KA1002 で、環境(河川、土壌)、牛(腸管)、香辛料から分離したものを使用した。ヒト(健常人もしくは他の食中毒由来)およびウエルシュ菌食中毒由来株は、自治体より分与いただいた。牛由来株以外は、全てcpe遺伝子を保有していた。

[3] ウエルシュ菌株の芽胞形成性比較

チオグリコレート培地にウエルシュ菌を接種し、37℃、24時間培養した。培養後、70℃、20分加熱した。加熱後のチオグリコレート培地 1 mL を芽胞形成用のDuncan-Strong培地(DS培地) 9 mLに接種し、37℃、24時間培養した。培養後のDS培地を70℃、20分加熱した。加熱後の菌液をクロモアガー*C. perfringens*に塗抹し、得られた菌数を芽胞数とした。菌株は耐熱性の比較で使用したものをを用いた。

C. 研究結果

[1] タンパク源とウエルシュ菌増殖との関係

これまでの研究結果(厚生労働科学研究 22KA1002)から、ウエルシュ菌は食肉を添加することによって、その増殖が促進されることが明らかになっている。その原因を明らかにするために、タンパク源の影響と

酸化還元電位、pHの影響について検討を行った。

(1) タンパク源の影響

タンパク源の影響を検討するために、モデル食品にウエルシュ菌を接種し、その増殖を調べた。タンパク源として、牛肉 120g に相当するタンパク量のペプトンおよび大豆ミートを添加したところ、大豆ミート、ペプトンのいずれかを添加すると、牛肉を添加した際と同程度の菌の増殖が認められた(図1)。

(2) カレーの酸化還元電位およびpHの測定

タンパク源を加えていない検体を比較すると、粉末カレーミックスを添加するだけで、酸化還元電位は約-10 mV から-50 mV と大きく低下した。さらに、大豆ミート、ペプトン、牛肉のいずれかを添加すると、酸化還元電位は-80 mV 以下とさらに大きく低下した(図2)。

タンパク源非添加のサンプルでは pH は約 4.8 であったが、粉末カレーミックスを加えると pH は 5.1 と若干上昇した。大豆ミート、ペプトン、牛肉を加えると、pH は 5 以上に上昇した(図3)。

[2] ウエルシュ菌株の耐熱性比較

加熱調理後に食品の温度は低下していくが、ウエルシュ菌芽胞は食品の温度が 60℃以下で発芽する。食

品の温度が 45℃まで低下すると、ウエルシュ菌は急速に増殖を開始する。60℃から 45℃の間は、ウエルシュ菌は栄養体の状態で存在するため、この温度帯で長時間滞留するとウエルシュ菌は死滅すると考えられる（図 4）。食品を汚染しているエンテロトキシン遺伝子保有ウエルシュ菌の汚染は 10^1 MPN/100g と非常に少量であるため、この温度帯における栄養体の耐熱性はウエルシュ菌食中毒発生に重要な要因であると考えられる。そこで、本研究ではウエルシュ菌の 55℃における耐熱性を調べた。

55℃の D 値を調べたところ、多くの菌株の D 値は 10 以下であった（図 5）。しかし、D 値が 10 を超える株も存在していた。特にウエルシュ菌食中毒事例由来株や香辛料由来株の D 値が高い傾向を示した。また、55℃では菌数の減少が見られなかった株がウエルシュ菌食中毒事例由来株と香辛料由来株に 1 株ずつ存在した。一方、ウエルシュ菌食中毒事例由来株で、D 値が 4 という耐熱性の低い株も存在した。

[3] ウエルシュ菌株の芽胞形成性比較

ほとんどの菌株の芽胞形成性は $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL で大きな差は認められなかった（図 6）。牛由来株で

芽胞形成性の高い 2 株が認められた。一方、ヒト由来および香辛料由来で芽胞形成性の低い 3 株が認められた。

D. 考察

厚生労働科学研究 22KA1002 の研究成果から、食肉のウエルシュ菌芽胞の汚染源としての重要性はそれほど高くはないが、食肉はウエルシュ菌の増殖を大きく促進するため、ウエルシュ菌食中毒を制御するために重要な因子であることを明らかにした。しかし、食肉の添加がウエルシュ菌の増殖につながる原因は不明であった。そこで、タンパク源の種類、酸化還元電位、pH の変化について検討を行った。

食肉以外のタンパク源として、大豆ミートとペプトンを用いて、ウエルシュ菌の培養を行ったが、食肉を添加したものと同程度に増殖したことから、食肉に拘らずタンパク質が添加されれば、ウエルシュ菌は増殖できることが明らかになった。

次にタンパク源を添加することによって、カレーの酸化還元電位がどのように変化するか検討をしたところ、牛肉、大豆ミート、ペプトンのいずれを添加しても、酸化還元電位が大きく低下することが明らかになった。また、粉末カレーミッ

クスを添加するだけで、酸化還元電位が低下することが今回明らかになった。カレーミックスのこのような効果もカレーでウエルシュ菌食中毒が発生しやすい要因のひとつであると考えられた。

ウエルシュ菌の発育可能 pH は一般的に 5.5~8 程度と言われており、5 以下では増殖できない。タンパク源およびカレーミックスを加えていないサンプル（野菜と水のみ）、カレーミックスは加えているがタンパク源を加えていないサンプル（カレーミックス、野菜、水）の pH はそれぞれ 4.8、5.1 であり、ウエルシュ菌の発育可能範囲以下であった。しかし、タンパク源を加えることによって、pH が大きく上昇した。特に大豆ミートやペプトンを添加すると pH は 5.5 以上となった。

以上の結果から、タンパク源の添加は、食品中の栄養、酸化還元電位、pH の三つの要因をウエルシュ菌増殖に適した方向に変化させる働きを有することが明らかになった。

55℃での耐熱性を調べたところ、多くの株の D 値は 10 以下であったが、ウエルシュ菌食中毒由来や香辛料由来株で耐熱性が高い傾向が認められた。香辛料由来株の耐熱性の高さが、カレーを原因食とする事例が多い要因のひとつである可能性

も考えられた。

ウエルシュ菌食中毒由来株の 55℃での D 値は 10 以下のものが 3 株あり、そのうち 1 株の D 値は 4 であった。食品を汚染している *cpe* 保有ウエルシュ菌芽胞の汚染量は非常に少ないため、調理後の食品を室温で放置しておくなどの緩慢冷却を行った場合、55℃での D 値の低いこれらの株はほとんど死滅してしまい、食中毒の原因にはならないと考えられる。55℃の D 値が低いこれらの株が食中毒の原因となっている要因として、食品の不適切な冷却が挙げられるのではないかと考えられた。現在、ウエルシュ菌の増殖予防として、調理後の食品の急速冷却が推奨されている。しかし、急速に冷却することによって、耐熱性の低い株の生残が促進されると考えられる。もし、その後の温度管理が不適切であった場合、生残した低耐熱性株が増殖し、食中毒の原因となるのではないかと考えられた。例えば、小規模の施設でしばしば行われている調理後の鍋を流水や氷水に浸ける方法では、最初は急速に鍋の中の温度が低下するが、その後、内容物をよく攪拌し、鍋の周りの水を頻繁に交換するなどといったことが適切に行われなかった場合、鍋内の温度低下速度が鈍り、結果として

生残した低耐熱性株が増殖し、食中毒が発生するのではないかと考えられた。

E. 結論

ウエルシュ菌の食品内での増殖を予防するためには、調理後、高温を維持するか、急速に冷却するかのいずれかになる。しかし、冷却する場合、低耐熱性株の生残が促進されることを念頭に、適切に冷却を行わなければならない。急速冷却が推奨されているのにもかかわらず、ウエルシュ菌食中毒が減少しない理由のひとつとして、低耐熱性株の存在と不適切な冷却処理が挙げられるのではないかと考えられた。おそらく、急速冷却が推奨される以前は、高耐熱性株が中心となって、食中毒が発生していたのではないかと考えられる。急速冷却の導入によって、高耐熱性株による食中毒は減少したが、低耐熱性株も食中毒の原因となり得る結果となり、食中毒事例数が減少しない要因となっているのではないかとの可能性も考えられた。今年度検討した食中毒事例株数は十分でないが、すでに 50 株以上の事例由来株を自治体から収集している。来年度は、これらの株の耐熱性の調査を行い、我が国におけるウエルシュ菌食中毒の実態を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi T: Characteristics of Outbreaks Caused by *Clostridium Perfringens* in Japan, Food Safety, 2025:13, 43-45

2. 学会発表

- 1) 淀谷雄亮、渡辺麻衣子、新井沙倉、荒木靖也、小嶋由香、岡部信彦、大島千尋、三澤尚明、大西貴弘：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と集団感染における遺伝的距離の検討、第 46 回日本食品微生物学会学術総会
- 2) 荒木靖也、小嶋由香、淀谷雄亮、池田史朗、本間幸子、大島千尋、渡辺麻衣子、三澤尚明、岡部信彦、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 46 回日本食品微生物学会学術総会
- 3) BUREN QIQIGE、大西貴弘、渡辺麻衣子：分子疫学的手法を用いたウエルシュ菌食中毒由来株と食品・家畜・環境由来株の遺伝的関連性の解析、第 121 回日本食品衛生学会学術講演会
- 4) Ohnishi T, Sasaki S, Watanabe M, Yodotani Y, Nisizato E, Araki S,

Ohshima C, Kojima Y, Okabe N,
Misawa N : Contamination of rivers
and seafood with enterotoxigenic
Clostridium perfringens, Microbial
Solutions for a Changing World
Conference 2025

- 5) Watanabe M, Yonezawa Y, Yodotani
Y, Arai S, Ohshima C, Kojima Y,
Okabe N, Misawa N, Ohnishi T :
Molecular epidemiological
characterization of *Clostridium*
perfringens isolates from food,
environmental, and clinical
origins, Microbial Solutions for a
Changing World Conference 2025

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

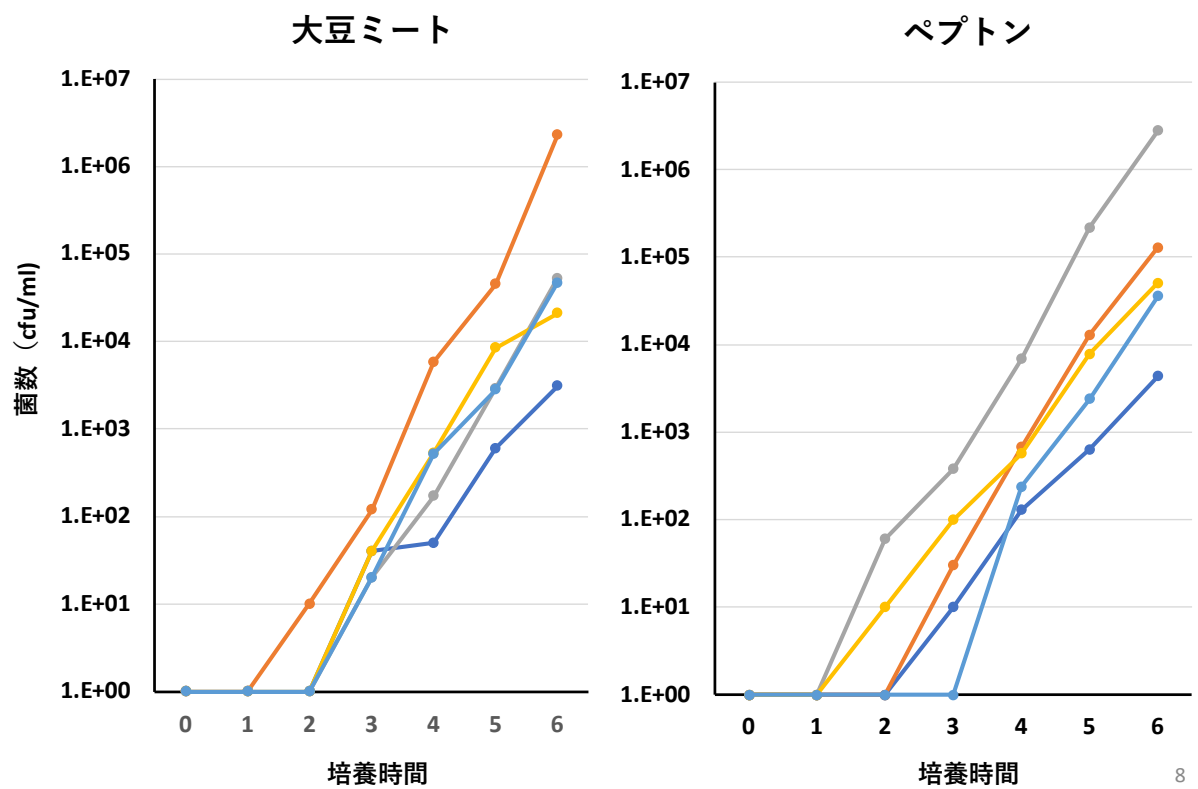


図 1 食肉以外のタンパク源によるウエルシュ菌増殖促進

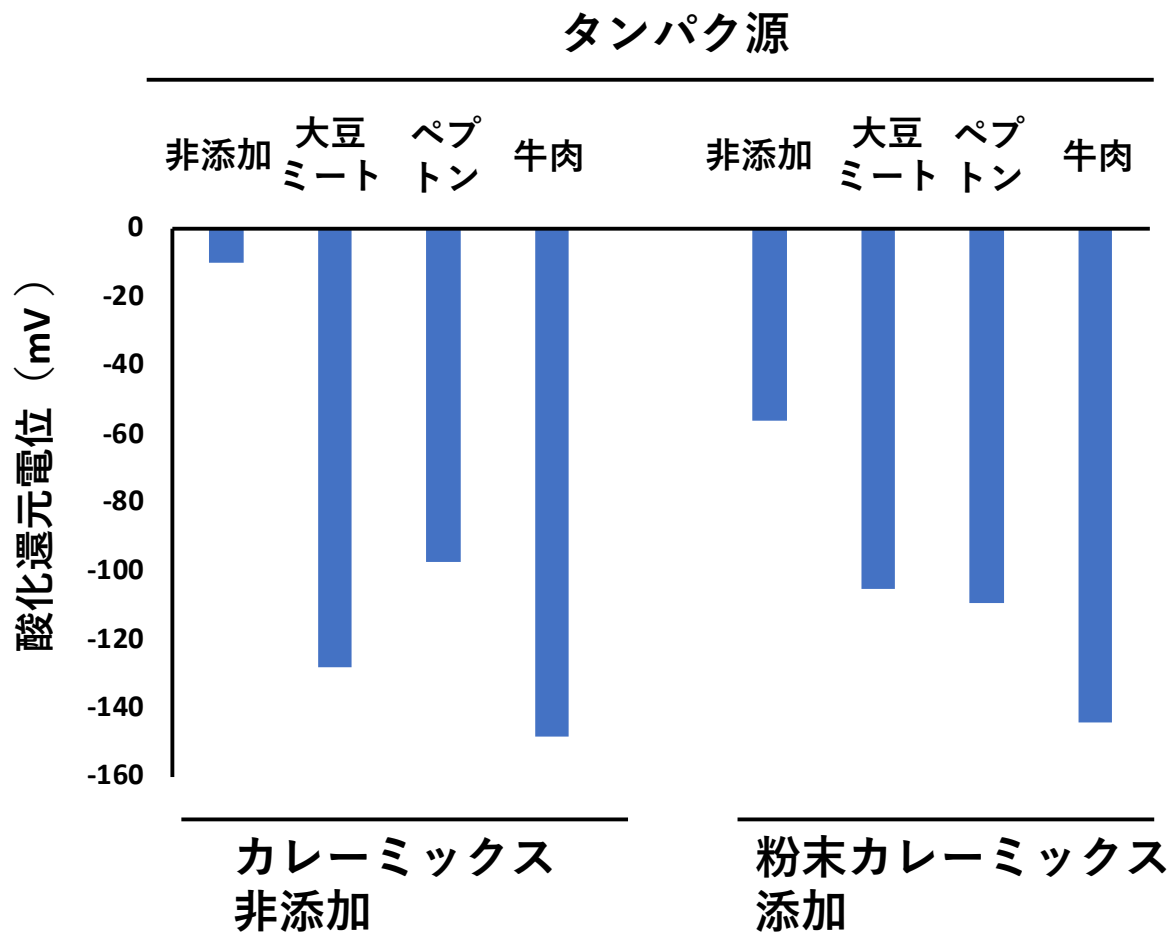


図2 タンパク源添加によるカレーの酸化還元電位の変化

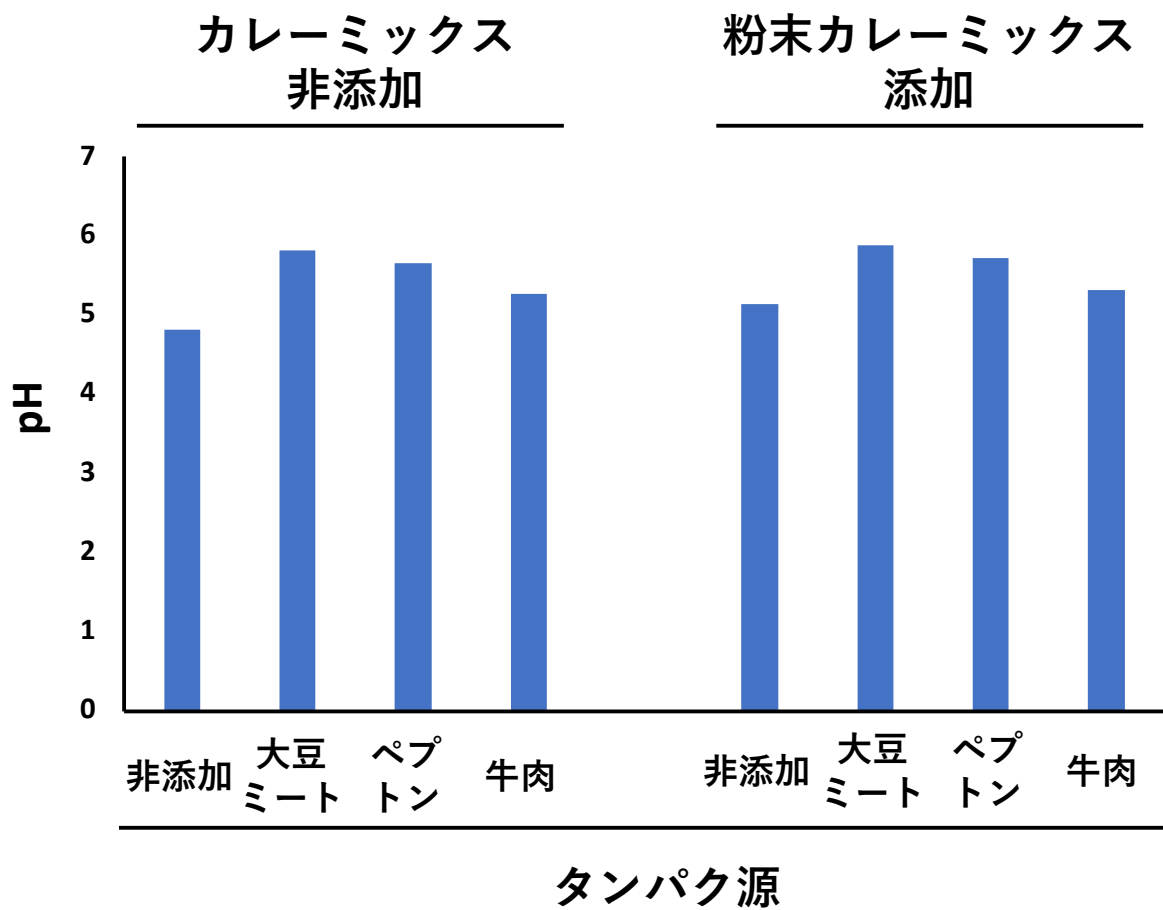


図3 タンパク源添加によるカレーの pH の変化

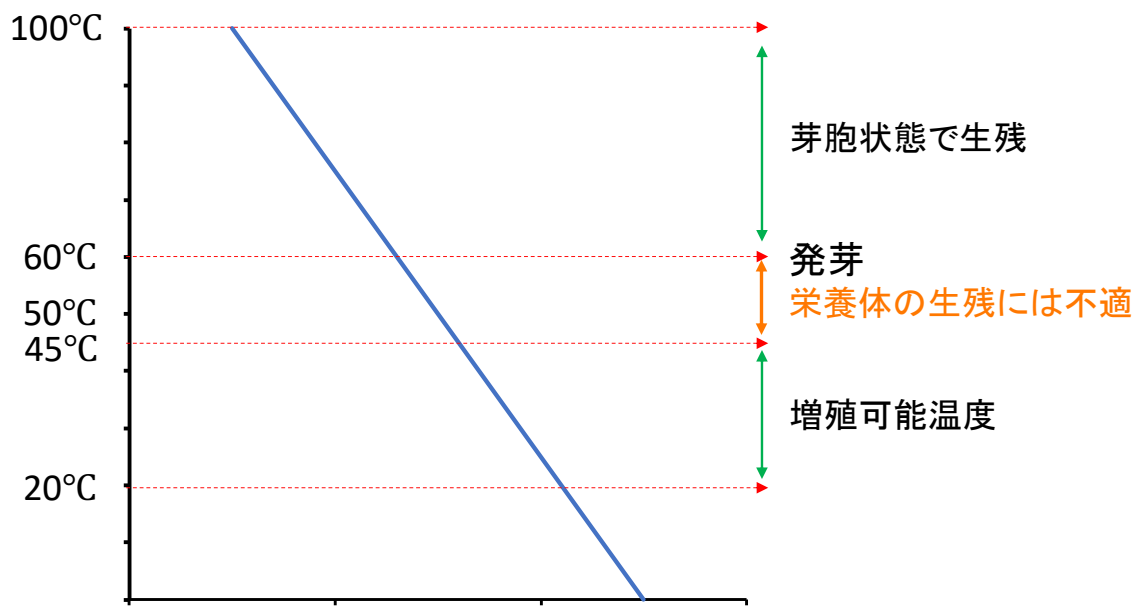


図4 ウエルシュ菌の増殖・生残と温度の関係

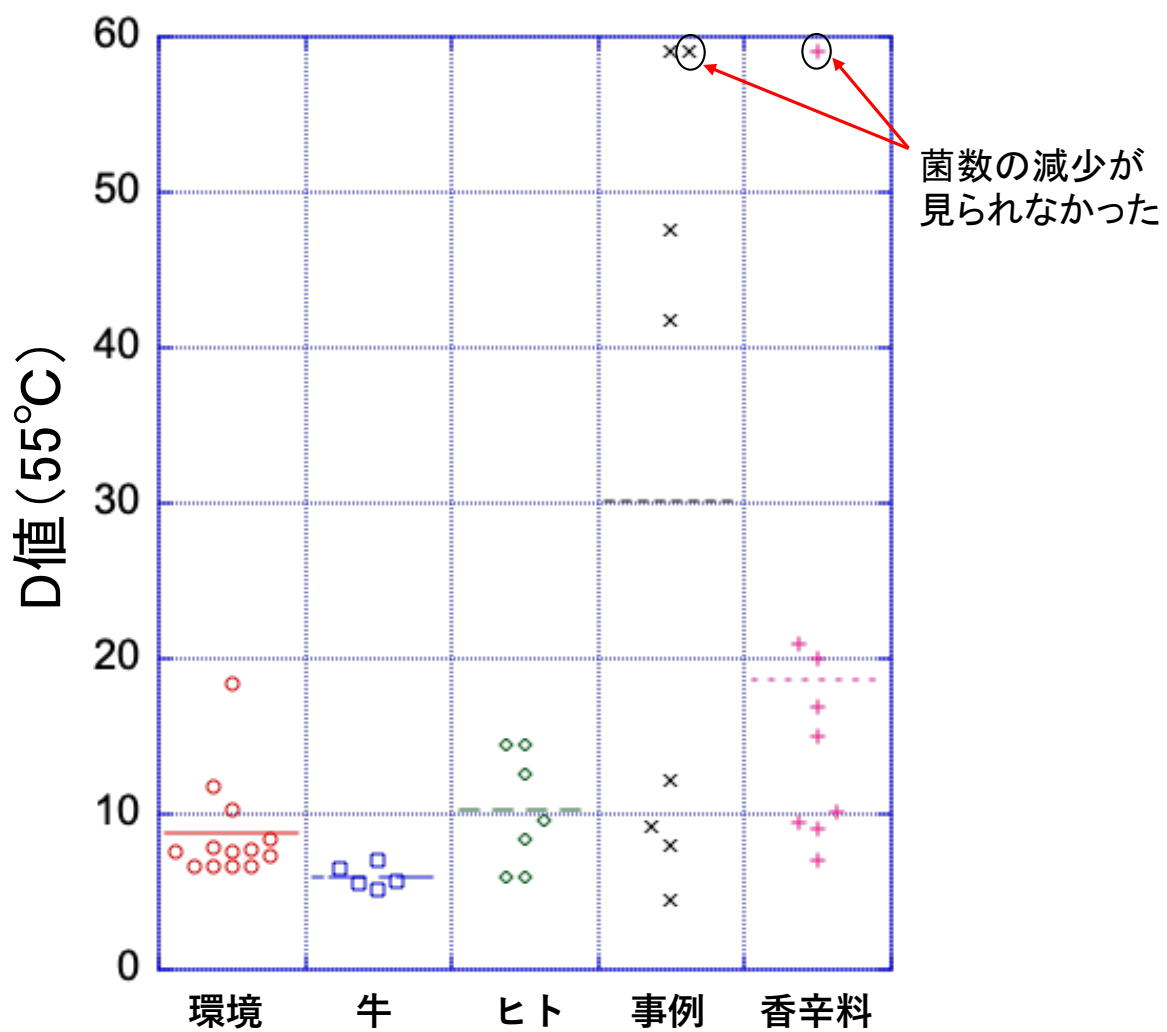


図5 ウエルシュ菌株の55°Cでの耐熱性の比較

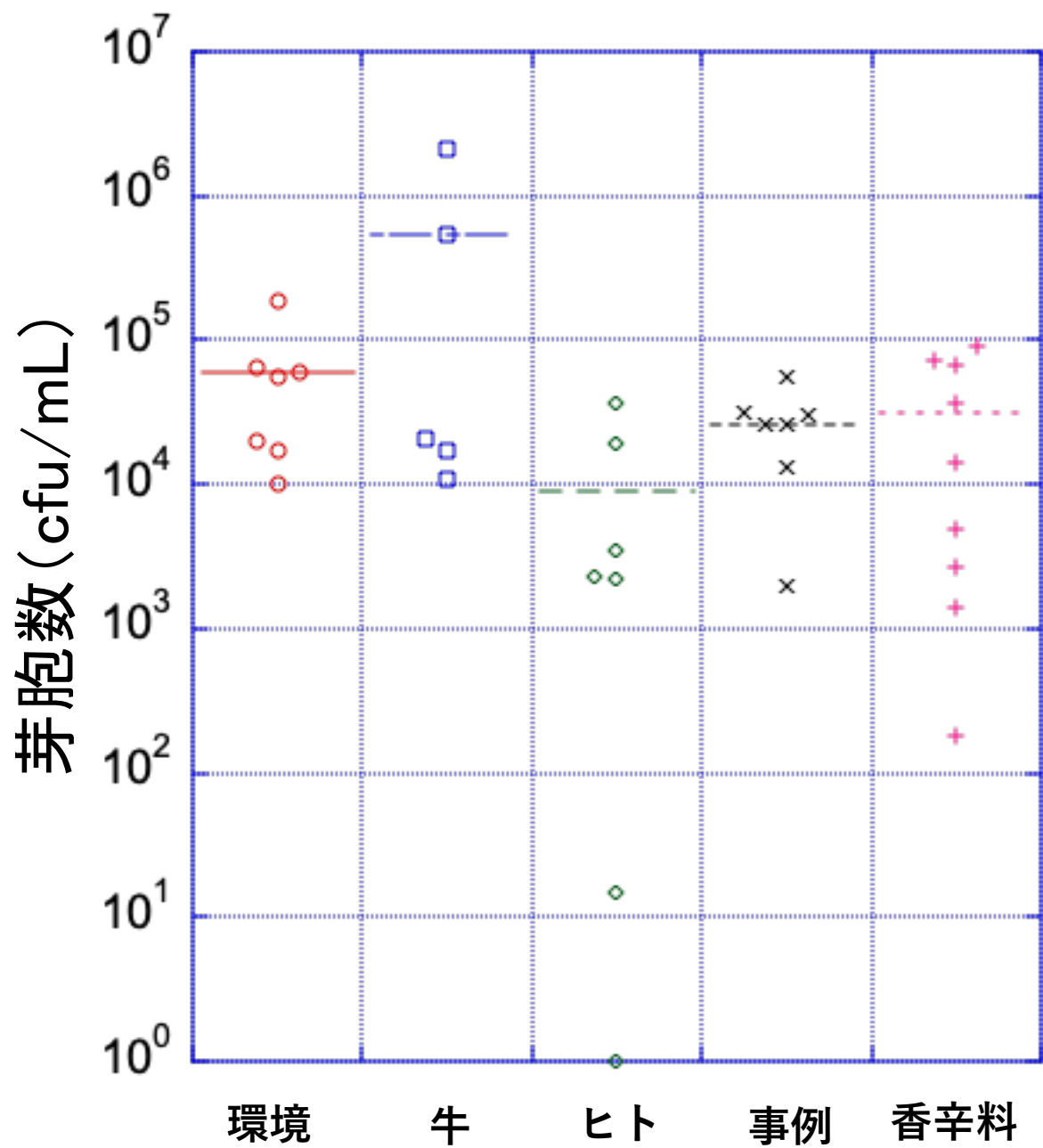


図6 ウエルシュ菌株の芽胞形成性の比較

