

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の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

食中毒原因株の由来解明のための分子疫学的解析に関する研究

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

ウエルシュ菌は、ヒト、動物および環境など多様な生態系に広く分布し、国内外で大規模な食中毒事例を引き起こすことが知られているが、原因食品や汚染原因の特定が困難な場合が多い。本分担研究では、菌株の全ゲノムデータの収集および今後実施する大規模分子疫学解析を見据えての解析手法の比較検討を目的として、患者・食品・動物および環境由来のウエルシュ菌分離株の収集、およびそれらの菌株を対象に全ゲノムシーケンスを実施し、cgMLST 解析や cgSNP 解析により分子疫学的解析を行った。その結果、食中毒と直接関係の無い環境や食品由来株を含めて、アリル差 7 遺伝子座以下の組み合わせが計 6 組確認され、これらは同一の食中毒事例から分離された菌株同士と同程度とされる遺伝的距離を示した。一方、従来ウエルシュ菌食中毒の主な原因食品と考えられてきた畜肉との明確な関連性は認められなかった。このことから、従来の共通見解と異なり、畜肉以外の菌株の食中毒への関与の可能性、さらには、環境・食品およびヒトといった異なるニッチにまたがって遺伝的に連続した菌集団が存在し、そこから派生した菌群が食中毒の原因となる可能性が考えられた。また、cpe 遺伝子を保有しない患者由来株と cpe 遺伝子を保有する海産物由来株は、cgMLST を指標とした MST 解析での遺伝的距離が近く、また cgSNP での系統樹においても互いに近縁な単系統群を形成した。このことから、食中毒発症における CPE 以外の病原因子関与の可能性、または菌株が増殖・伝播し変異する過程における cpe 遺伝子の獲得または喪失の可能性が考えられた。また、cgMLST または cgSNP を指標とした系統樹は、cgMLST に基づく MST 解析では得られなかった、詳細な菌株間およびクレード間の系統関係の情報が得られた。今後は、最も普及する全ゲノム解析法である cgMLST に基づく MST 解析にとどまらず、cgSNP を指標とした系統解析を実施し、食中毒事例における患者および残品由来株、環境・水産物・農作物といった食中毒に直接関連のない分離株の解析数をさらに増やして、食中毒原因株の推定精度の向上および汚染経路の解明に向けたさらなる検討が必要である。

研究協力者

大西貴弘	国立医薬品食品衛生研究所
新井沙倉	国立医薬品食品衛生研究所
Burenqiqige	国立医薬品食品衛生研究所
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
米澤隆弘	広島大学
三澤尚明	宮崎大学
大島千尋	水産研究・教育機構 水産技術研究所

A. 研究目的

Clostridium perfringens (ウエルシュ菌)はグラム陽性の嫌気性芽胞形成桿菌であり、ヒトや動物の腸管内に常在するほか、河川水や土壌などの環境中にも広く分布している。本菌は幅広い食品を汚染し、芽胞形成能および耐熱性を有することで、加工・保存段階においても生存することから、世界的に食品由来疾患の重要な原因菌の一つとされている。本菌が産生するエンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin: CPE) は、ウエルシュ菌食中毒の主要な原因とされている。本菌による集団食中毒事例は国内外において多数報告されるが、食中毒事例において、食中毒残品から原因菌が分離されるケースが少なく、原因食品や汚染源を特定することが困難な場合が多い。そのため、患者や食中毒由来株のみならず、食中毒と直接関連のない食品、家畜および環境由来株を含めた広範な視点から菌株間の遺伝的関連性を

解析し、食中毒発生の背景となる菌の分布や生態を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、食中毒原因ウエルシュ菌の分布状況や汚染経路を明らかにすることを目的として、食中毒事例・食品・家畜・環境由来株のウエルシュ菌株の収集、および分離された菌株を用いた分子疫学解析を実施する。今年度は、まず、日本国内で分離された多数のウエルシュ菌株を収集した。次に、全ゲノムレベルでの複数解析手法について、本目的に適した手法の評価を実施した。この際、収集した菌株の一部を用いて全ゲノムシーケンスを決定、また公共データベースに登録された海外分離株の全ゲノムシーケンスデータを収集し、全ゲノム塩基配列の解析を実施して、一部の食中毒と関連の無い食品や環境由来株と食中毒由来株との間に、遺伝的関連性や分離源に関する情報を得たので、報告する。

B. 研究方法

[1] ウエルシュ菌分離株の収集

本研究では、解析対象菌株として合計576株のウエルシュ菌を収集した。内訳は、患者由来株182株、食中毒事例関連食品由来株16株、食中毒事例関連であるが詳細由来不明株16株、ウエルシュ菌食中毒患者ではないヒト由来株17株、家畜由来株123株(鶏41株、牛40株、豚42株)、食品由来株87株(水産物73株、農産物14株)、環境由来株117株(河川水97株、土

壤 20 株)、および由来不明株 18 株であった。

[2] ウエルシュ菌株の全ゲノムシーケンス解析

(1) 供試菌株

[1]に述べた収集菌株のうちの一部を供試した。具体的には、患者由来株 25 株、ウエルシュ菌食中毒患者ではないヒト由来株 7 株、動物由来株 4 株、環境由来株 12 株、食中毒事例関連食品由来株 1 株、食中毒事例関連であるが詳細由来不明株 1 株、海産物由来株 14 株、スパイス由来株 8 株および農産物由来株 2 株の合計 74 株を用いた (表 1)。

(2) 菌株からの DNA 抽出および全ゲノムシーケンスの決定

−80℃凍結保存菌株をチオグリコレート寒天平板に塗抹し 37℃で嫌気培養した。平板上で増殖した菌体を回収し、1 mL の滅菌蒸留水を加えた 2 mL マイクロチューブ中に懸濁した後、菌体懸濁液を 4℃、14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。得られた菌体ペレットを用いて DNA を抽出した。DNA 抽出は FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) を用いて行った。

得られたゲノム DNA を用いて全ゲノムシーケンス解析を実施した。ゲノム DNA の品質評価 (QC) を行い、

100ng/ライブラリの DNA を使用した。ライブラリ調整には Illumina DNA Prep (M) Tagmentation キット (イルミナ社) を用い、トランスポゼースによる tagmentation 反応により DNA を断片化すると同時にアダプターを付加した。その後、PCR により 10 塩基の unique dual index を付加し、ライブラリを増幅し、ビーズを用いた精製とサイズセクションを実施して、平均長約 500bp のライブラリを得た。ライブラリ DNA の品質評価を実施した後、NovaSeq (イルミナ社) による 151 サイクル×2 ペアエンドシーケンスを行った。最後に、BCL convert v3.9 (イルミナ社) を用いてベースコールを行い、アダプター配列をトリミングする設定を適用して、バーコードごとに Fastq ファイルを生成した。

得られたリードデータは、塩基配列解析ソフトウェア CLC Genomics Workbench (Qiagen 株式会社) を用いてアセンブリを行い、複数の super contig を得て、それら contig のコンセンサス配列のテキストデータを得た。

(3) 分子疫学的解析

日本国内のウエルシュ菌分離株と世界各地の菌株との遺伝的関連性を評価するため、公共データベースに登録されている世界各地のウエルシュ菌 7 株の全ゲノムシーケンスデータをダウンロードにより

収集した（表 2）。

続いて、chewBBACA を使用して 1,431 遺伝子座のアリル解析に基づく core genome Multi Locus Sequence Type (cgMLST) 解析を実施した。得られたアリルプロファイルに基づき、GrapeTree により minimum spanning tree (MST) を作成し、さらに R の ape パッケージを用いて Neighbor-Joining (NJ) 系統樹を構築した。さらに、SNP Caster を用いて core genome 中の SNP (cgSNP) を抽出し、IQ-TREE により Maximum likelihood (ML) 系統樹を構築した。これらの解析結果に基づき、菌株間の遺伝的距離および系統関係について、分離源や *cpe* などの病原遺伝子との関連性を考慮して考察した。

C. 研究結果

[1] cgMLST に基づく ウエルシュ菌株の minimum spanning tree

cgMLST に基づく MST (cgMLST-MST) 解析を実施したところ、いくつかの明瞭なクラスターが形成された。それらクラスターを形成する株間のアリルの違いの程度を確認した。同一の集団食中毒事例内の異なる患者由来株の間では、1431 遺伝子座のうち 0-2 座において異なるアリルが認められた。ウエルシュ菌における cgMLST クラスター閾値は未確立であるが、Abdel-Gli1 らは食中毒事例解析において 7 アリル差をもって同一食中毒事例のアリル差の閾値として用いている (Abdel-Gli1 et.

al., Microbiology Spectrum, 2021, 9, e00533-21)。本解析においてもこれを参考とした結果、患者由来株 3 株 (図 1: CP-2022-08、CP2023-56、PubMLST 登録の患者由来株 83921_3_4) と食品または環境由来株の 3 株 (図 1: 煮干し由来株 CP-2024-42、そば粉由来株 CP-2024-56-2、PubMLST 登録の環境由来株 79385-3) の 3 通りの組み合わせ、ウエルシュ菌食中毒患者ではないヒト由来株 1 株 (図 1: 0-16) と食品由来株 1 株 (図 1: 煮干し由来株 CP-2024-42) の 1 通りの組み合わせ、ならびに食品由来株 1 株 (図 1: 煮干し由来株 CP-2024-42) と河川水または土壌由来株の 2 株 (図 1: 231221e、CP2023-S0-13-1) の 2 通りの組み合わせの、計 6 組が 7 遺伝子座以下のアリル違いに該当することが確認された (図 1)。一方、従来ウエルシュ菌食中毒の主な原因食品と考えられてきた畜肉との明確な関連性は本解析では確認されなかった。また、患者由来株 CP-2022-08 は *cpe* 遺伝子を保有していなかったのに対し、当該菌株とアリル差が 7 遺伝子座しかなく遺伝的距離が近かった煮干し由来の CP2024-42 は *cpe* 遺伝子を保有していた (図 1)。

cgMLST-MST 解析は、解析負荷が比較的少なく、遺伝的距離がごく近い菌株の集団であるクラスターの容易な認識が可能であった。一方、菌株間およびクラスター間の系統情報を得ることは難しかった。

[2] cgMLST または cgSNP に基づく

ウエルシュ菌分離株の系統樹

cgMLST を指標とした NJ (cgMLST-NJ) 系統樹または cgSNP を指標とした ML (cgSNP-ML) 系統樹を構築した結果、菌株間および lineage 間の系統関係が明らかとなった。これらの樹形を cgMLST-MST と比較したところ、MST で認識されたクラスターを構成する菌株群は、cgMLST-NJ 系統樹における遺伝的距離の小さい単系統性が示されたクレードまたは cgSNP-ML 系統樹における単系統性が強く支持されたクレードに含まれる菌株群の内容と、概ね一致していた (図 1-3)。また、cgMLST-NJ と cgSNP-ML 系統樹間で樹形を比較したところ、互いに極近縁な菌株間および単系統群の間の系統関係はおおむね一致していたが、それらの間の遺伝的距離には大きな違いが見られ、また各系統樹において早期に分岐した lineage 間の系統関係には矛盾が見られた (図 2-3)。

cgMLST-NJ 系統樹と cgSNP-ML 系統樹の双方では、今回解析したスパイス由来株および家畜由来株では、患者由来株と極近縁な単系統性を示す菌株の存在は確認されなかった (図 2-3)。さらに、同一地域・同一年に分離された一部の菌株は互いに極近縁な単系統群を形成していた。一方で、同一地域・同一年に分離されていてもまた別の株間で

はある程度の遺伝的距離が認められ互いに近縁な単系統群を形成していないケースがあった。

D. 考察

今年度はウエルシュ菌分離株およびそれらの全ゲノムシーケンスデータの収集を精力的に実施した。さらに、cgMLST および cgSNP に基づく全ゲノム解析を 3 手法により並行して実施し、得られた結果を比較した。その結果、cgMLST-MST 解析と、cgMLST-NJ および cgSNP-ML 系統樹の間に樹形を比較し、cgMLST-MST は、比較的低い計算負荷でクラスターを把握することが可能であり、アウトブレイクの迅速な認識に有用な手法であると考えられた。一方で、菌株間および単系統群間の遺伝的距離や詳細な系統関係を評価するには、cgSNP に基づく系統解析が最も高い解像度を有しており、疫学的情報に最も富んでいたことが示された。したがって、cgMLST のみでなく cgSNP による系統解析も採用することにより、*C. perfringens* の分子疫学解析をより高い精度で実施できると考えられる。

今回の 74 菌株の解析によって、分離株間の疫学的情報についてもいくつかの有用な情報が得られた。、単一の事例においても複数の ST に

属する菌株が同時に検出されたことから、場合によっては同時に発症に関与する可能性が考えられた。現時点では、*Clostridium perfringens* に特化した cgMLST アリル差について国際的に統一された判定基準は確立されていない。本研究では既報を参考に、7 アリル差以下を暫定的指標として解析を行った結果、患者由来株と食品・環境由来株との間で遺伝的距離の近い菌株を抽出することができた。このことから、この基準は実務上の初期スクリーニング指標として有用である可能性がある。一方で、菌株の系統多様性や地域差を考慮すると、今後さらに大規模データに基づく妥当性検証が必要である。

食品由来株や環境由来株の一部には、患者由来株との間で遺伝的距離の近い株が認められた。特に、患者由来株が煮干し由来株およびそば粉由来株との間で遺伝的距離が近いことが注目される、ウェルシュ菌食中毒は従来、加熱調理後の大量調理食品や畜肉料理との関連が重視されてきたが、本研究では、患者由来株と家畜由来株との明確な関連性は認められず、むしろ乾燥水産加工品や穀粉製品との関連が示された。これらの結果は、ウェルシュ菌の食品媒介経路が畜肉中心の従

来モデルよりも広範である可能性が考えられる。乾燥食品や粉体原料は保存期間が長く、広域流通や多用途利用が可能であることから、一次汚染のみならず調理現場における二次汚染源としても重要であると考えられる。したがって、今後のリスク評価では非畜肉食品も重要な監視対象とすべきである。

さらに、煮干し由来株 CP-2024-42 は、患者由来株 CP-2022-08、ウェルシュ菌食中毒患者ではないヒト由来株 0-16 および環境由来株（河川水由来株 231221e/ 土壌由来株 CP2023-S0-13-1）との間で遺伝的距離が近く、分子疫学的関連性が示唆された。これらの結果から、環境から水産物、さらにヒトへの伝播の可能性が考えられ、原材料生産、加工、流通、調理までを一連の連鎖として捉える One Health 的視点の重要性を裏付けるものである。

患者由来株 CP-2022-08 は cpe 遺伝子を保有していなかったのに対し、当該菌株とアリル差が 7 遺伝子座しかなく遺伝的距離が近かった煮干し由来の CP2024-42 は cpe 遺伝子を保有していた。cpe 遺伝子は典型的なウェルシュ菌食中毒の主要病原因子として知られているが、本結果は近縁系統内で cpe 遺伝子保有性が必ずしも一致しないこと

を示している。このことから、食中毒発症における CPE 以外の病原因子関与の可能性、または菌株が増殖・伝播し変異する過程における cpe 遺伝子の獲得・喪失の可能性が考えられた。一方、今回解析したスパイス由来株および家畜由来株は、患者由来株と遺伝的関連性が低く、これらが直接的にウエルシュ菌食中毒の原因菌となる可能性は低いことが示された。

同一地域・同一年に分離された菌株の中には、クラスターまたは極近縁な単系統群を形成する複数菌株が認められ、地域環境に定着したクローンの存在が示唆された。一方で、同一地域・同一年に分離された菌株であっても、互いに姉妹群とはならない株も確認された。これらの結果から、ウエルシュ菌の生態的および遺伝的な多様性の複雑化が示された。

今後は、ウエルシュ菌食中毒原因株の汚染源を解明するため、食中毒事例における患者および残品由来株を系統解析に多数追加するとともに、環境、水産物および農作物由来株の解析数をさらに増やすことで、原因株の推定精度の向上および汚染経路の解明に向けたさらなる検討が必要である。cpe 遺伝子は染色体型およびプラスミド型の双方

が報告されており、その保有様式の違いが菌株の生態や宿主適応に影響する可能性が指摘されている。本研究においても今後これらの遺伝学的特徴を含めた検討の進めることも重要である。

E. 結論

本研究により、ウエルシュ菌が環境、食品、動物および臨床由来といった異なるニッチ間で生態学的に連続して存在している可能性が示された。特に、環境中のリザーバーが食中毒発生の背景にある伝播ネットワークの重要な構成要素となっている可能性が考えられた。また、cgMLST-MST 解析は遺伝的距離が小さいクラスターを簡便に認識する目的では最適な解析手法であるが、一方で、cgSNP-ML 系統樹は、菌株間および単系統群間の遺伝的距離や詳細な系統関係に関して最も高い解像度を有しており、疫学的情報に最も富んでいたことが示された。今後は、最も普及する全ゲノム解析法である cgMLST-MST 解析にとどまらず、cgSNP を指標とした系統解析を実施し、分離株の解析数をさらに増やして、食中毒原因株の推定精度の向上および汚染経路の解明に向けたさらなる検討を実施する必要がある。

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

Watanabe, M., Yonezawa, T., Yodotani, Y., Arai, S., Ohshima, C., Kojima, Y., Okabe, N., Misawa, N., Ohnishi, T. Molecular epidemiological characterization of *Clostridium perfringens* isolates from clinical, food, and environmental origins. Microbial Solutions for a Changing World Conference (2025.11.25-27)

Ohnishi, T., Sasaki, S., Watanabe, M., Yodotani, Y., Nishizato, 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 (2025.11.25-27)

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 (2025.09.18-19)

ブリンチチゲ、渡辺麻衣子、新井沙倉、淀谷雄亮、大島千尋、小嶋由香、岡部信彦、三澤尚明、大西貴弘. 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46回日本食品微生物学会学術総会 (2025.09.18-19)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

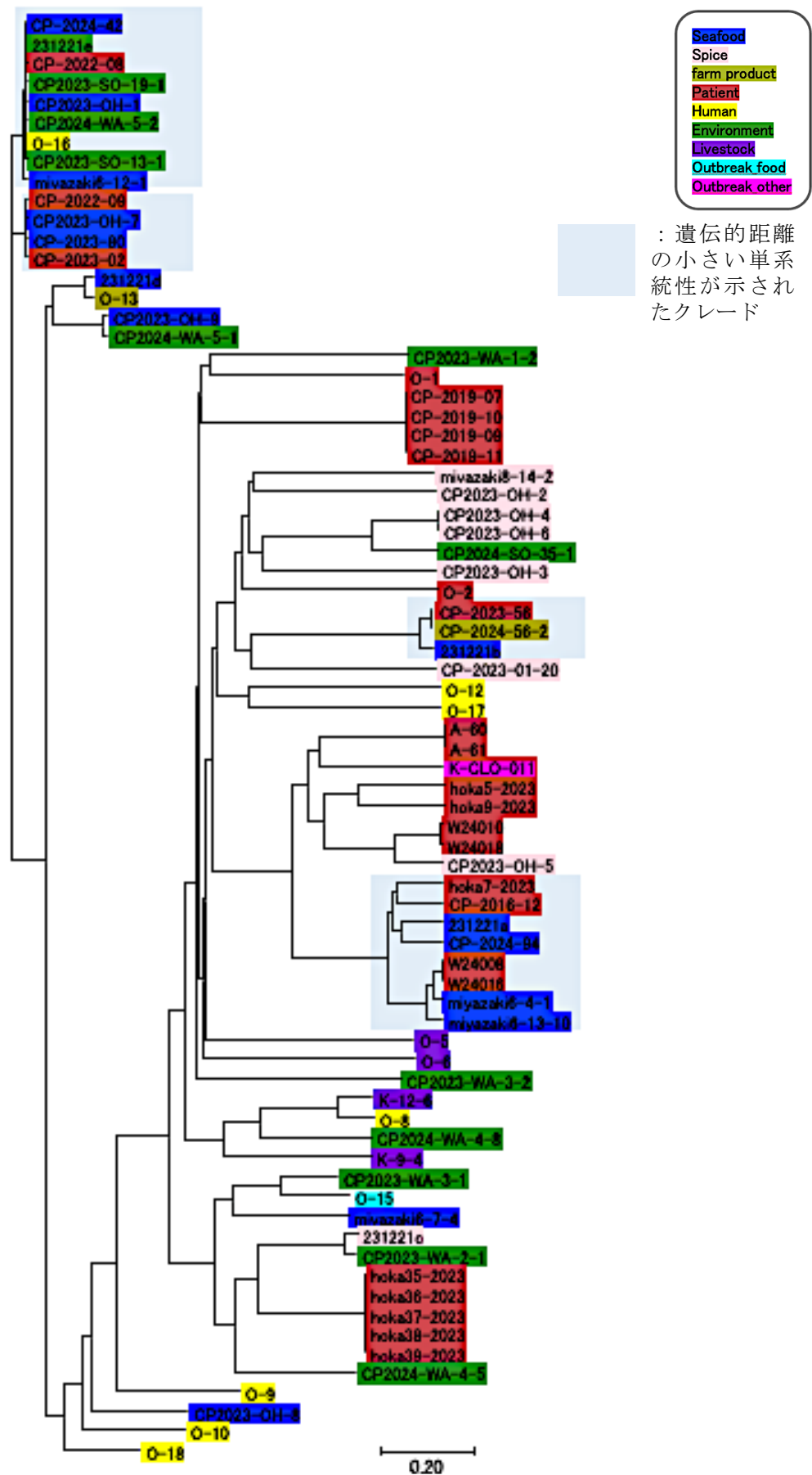


図2 cgMLSTに基づく *Clostridium perfringens* 分離株の近隣結合法による分子系統樹

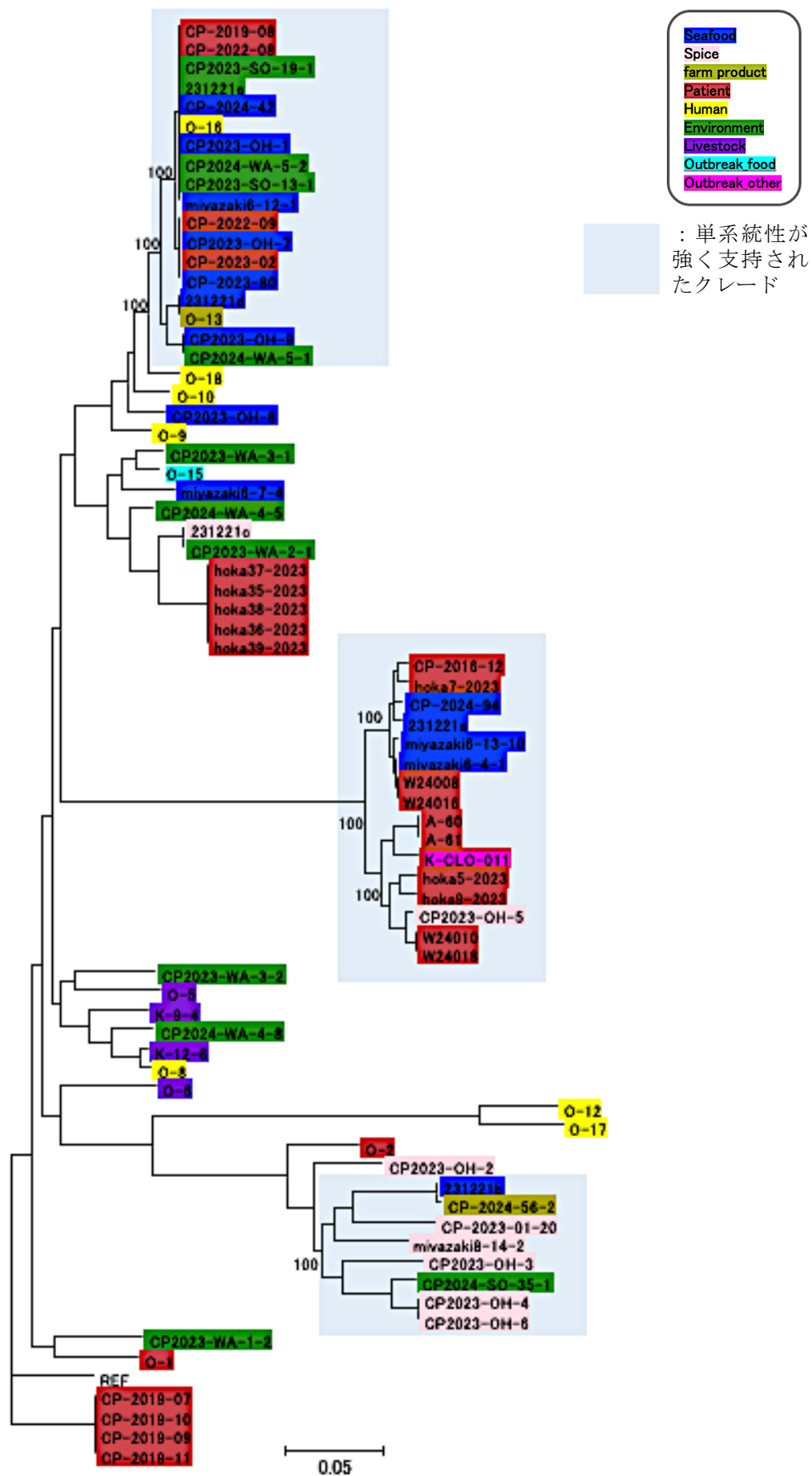


図3 cgSNPに基づく *Clostridium perfringens* 分離株の最尤系統樹

表 1 全ゲノムシーケンス解析を決定した分離株

菌株	由来	菌株	由来
CP-2019-07	患者	CP2023-OH-3	チリパウダー
CP-2019-09	患者	CP2023-OH-4	カレーパウダー
CP-2019-10	患者	CP2023-OH-6	カレーパウダー
CP-2019-11	患者	CP2023-OH-5	カレーパウダー
hoka35-2023	患者	CP2023-OH-7	水産物(生カキ)
hoka36-2023	患者	CP-2023-80	水産物(にぼし)
hoka37-2023	患者	CP-2023-02	患者
hoka38-2023	患者	CP2023-OH-8	水産物(桜エビ)
hoka39-2023	患者	CP2023-OH-9	水産物(たたみいわし)
hoka5-2023	患者	K-9-4	鶏
hoka7-2023	患者	K-12-6	鶏
hoka9-2023	患者	K-CLO-011	食中毒分離株
CP-2023-56	患者	A-60	患者
231221e	環境(多摩川水_等々力)	A-61	患者
231221a	水産物(乾燥小えび)	O-1	患者
231221b	水産物(あさり)	O-2	患者
231221c	カレーパウダー	CP2023-OH-2	カレーパウダー
231221d	水産物(昆布)	O-5	牛直腸スワブ
CP-2016-12	患者	O-6	牛直腸スワブ
CP-2023-01-20	カレーパウダー	O-8	ヒト糞便
CP-2022-09	患者	O-9	ヒト糞便
CP-2024-42	水産物(にぼし)	O-10	ヒト糞便
CP-2024-56-2	そば粉	O-12	ヒト糞便
CP-2024-94	水産物(ほしえび)	O-13	干しシイタケ
CP-2022-08	患者	O-15	干しシイタケ (食中毒事例)
CP2023-WA-1-2	環境(多摩川水_等々力)	O-16	ヒト糞便
CP2023-WA-2-1	環境(矢上川水)	O-17	ヒト糞便
CP2023-WA-3-1	環境(多摩川水_殿町)	O-18	ヒト糞便
CP2023-WA-3-2	環境(多摩川水_殿町)	W24008	患者
CP2023-SO-13-1	環境(ゴボウ付着土)	W24010	患者
CP2023-SO-19-1	環境(ジャガイモ付着土)	W24016	患者
miyazaki6-4-1	水産物(しじみ)	W24018	患者
miyazaki6-7-4	水産物(しじみ)	CP2024-WA-4-5	環境(多摩川水_殿町)
miyazaki6-12-1	水産物(生カキ)	CP2024-WA-4-8	環境(多摩川水_殿町)
miyazaki6-13-10	水産物(あさり)	CP2024-SO-35-1	環境(ニンジン付着土)
miyazaki8-14-2	カレーパウダー	CP2024-WA-5-1	環境(多摩川水_等々力)
CP2023-OH-1	水産物(生カキ)	CP2024-WA-5-2	環境(多摩川水_等々力)

**表 2 PubMLST データベースから収集した世界各地の分離株
全ゲノムシーケンスデータ**

分離株	分離国	由来
83921_3_4	Italy	患者
79385-3	Italy	環境
NY82540322	USA	食品
2018-YCVTN979	China	動物
GCA_015931445.1	France	環境
cp2020YL9	China	食品
CQ101	China	患者

