

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

食品におけるウエルシュ菌汚染実態調査に関する研究

研究分担者 岡部 信彦 川崎市健康安全研究所

研究協力者 池田 史朗 川崎市健康安全研究所

研究要旨

ウエルシュ菌食中毒は、嫌気状態になった食品中で大量に増殖したエンテロトキシン産生ウエルシュ菌を摂取し、腸管内で本菌が芽胞を形成する際に産生されるエンテロトキシンによって腹痛や下痢などの消化器症状が引き起こされる。我が国におけるウエルシュ菌を原因とする食中毒事件数は年間 30～40 事例で推移し、減少傾向がみられていないため、令和 4～6 年度の研究ではエンテロトキシン産生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てカレー粉、乾物、食肉、野菜など計 312 検体について調査を行い、カレー粉 1 検体、乾物 4 検体からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出し、汚染状況を明らかにした。乾物 4 検体の内訳は、煮干し 2 検体、素干しエビ 1 検体、そば粉 1 検体である。これらの結果を踏まえて令和 7～9 年度の研究では、カレー粉に含まれる香辛料に着目し、個々の香辛料の汚染状況を明らかにするとともにウエルシュ菌の汚染除去法を検討することを目的として本研究を実施することとした。令和 7 年度はカレー粉のパッケージを参考にして店舗販売されている各香辛料について調査を行い、コリアンダー及びフェンネルにおいてウエルシュ菌の検出率が高いことが明らかになった。令和 8 年度はウエルシュ菌が検出された香辛料について購入店舗数を増やし、様々なメーカーの物を調査する予定である。

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。その大きな原因として、エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌食中毒の原因食品が明らかになっていないことがあげられる。そこで、食品におけるウエルシュ菌の汚染状況を調査し、令和 4～6 年度の研究ではカレー

粉、乾物、食肉、野菜など計 312 検体について調査を行い、カレー粉 1 検体、乾物 4 検体からエンテロトキシン産生ウエルシュ菌を検出し、汚染状況を明らかにした。乾物 4 検体の内訳は、煮干し 2 検体、素干しエビ 1 検体、そば粉 1 検体である。これらの結果を踏まえて令和 7~9 年度の研究では、カレー粉に含まれる香辛料に着目し、個々の香辛料の汚染状況を明らかにするとともにウエルシュ菌の汚染除去法を検討することにした。

今年度は、カレー粉のパッケージを参考にして店舗販売されている各香辛料について調査を行った。

B. 研究方法

[1] ウエルシュ菌定性検査

川崎市内及びその近隣自治体のスーパーマーケットや小売店等で購入した香辛料 40 検体を供試した。検体 10g 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 90mL を加えた。1 分間、ストマッカー処理を行った。ストマッカーバックは 70℃で 20 分間加熱後急冷し、試料原料とした。試料原料を 42℃で 24 時間の嫌気性条件で増菌培養を行った。増菌培養液 100 μ L を採取し、10,000 $\times$ g、10 分間遠心して上清を除き、沈渣に 50 mM NaOH 85 μ L を添加し、100℃で 10 分間加熱処理後、1M Tris-HCl (pH7.0) 15 μ L を加え、10,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、上清をテンプレート DNA とした。テンプレート DNA を

用いて、H. S. Guran らの方法 (Letters in Applied Microbiology, 2013, 57, 77-82) を参考にして、ウエルシュ菌マーカーのアルファ毒素遺伝子 (*cpa*) 及びウエルシュ菌のエンテロトキシン遺伝子 (*cpe*) のマルチプレックス PCR を行った (図 1)。PCR 法は、KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) 12.5 μ L、各 50 μ M プライマー (ユーロフイン) 0.15 μ L、H₂O 9.9 μ L、テンプレート DNA 2.0 μ L の計 25 μ L に調整した反応液を 98℃10 秒、55℃5 秒、68℃10 秒のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 68℃3 分の条件で行った。反応終了後、滅菌超純水 30 μ L に PCR 産物 2 μ L を加えた溶液をマイクロチップ電気泳動システム (SHIMADZU) で電気泳動を行い、324bp のバンドが検出された場合 *cpa* 陽性、233bp のバンドが検出された場合 *cpe* 陽性と判定した (図 4)。また、増菌培養液を CHROMagar C. perfringens (関東化学) に塗抹し、37℃で 24 時間の嫌気培養後ウエルシュ菌が疑われるコロニーについてアルカリ熱抽出を行い、*cpa* 及び *cpe* 保有状況をコロニー PCR で確認した。増菌培養後の PCR 及び分離培養後のコロニー PCR で *cpa* もしくは *cpe* が陽性になった場合、当該検体はそれぞれの遺伝子陽性であると判定した。

[2] 最確数法

ウエルシュ菌定性検査の後、最確数法を用いて汚染菌量を推計した (図 1)。検体 10g 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 90mL を

加え、1 分間、ストマッカー処理を行った。ストマッカーバックは70℃で20 分間加熱後急冷し、試料原料とした。この加熱によって、検体中の栄養体は死滅し、芽胞の発芽が促進される。試料原液をチオグリコレート培地で10 倍、100 倍希釈した。試料原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液、それぞれを3 本の試験管に10mL ずつ分注した。その後、42℃で24 時間の嫌気性条件で培養した。培養後、各試験管からCHROMagar C. perfringens2 枚に培養液1 白金耳量ずつ塗抹し、37℃で24 時間嫌気培養した。培養後、ウエルシュ菌が疑われるコロニーについてウエルシュ菌定性検査と同じ方法を用いてテンプレートを作製し、マルチプレックスPCR で各試験管の *cpa* 及び *cpe* の検索を行った。*cpa* もしくは *cpe* の陽性件数を最確数表に当てはめ、検体中の *cpa* 及び *cpe* 保有ウエルシュ菌の汚染菌数を推計した（図2）。

[3]細菌数

ウエルシュ菌定性検査及び最確数法と併せて香辛料中の生菌数の測定も実施した。検体10g をストマッカーバックに無菌的に採取し、滅菌リン酸緩衝希釈水90mL を加え、1 分間、ストマッカー処理を行い試料原液とした。試料原液を10 倍段階希釈し、それぞれの希釈試料液1mL をシャーレに分注を行った後、標準寒天培地（栄研化学）15mL を無菌的に加え、試料と培地を混釈し、35℃で48 時間培養した。培養後、コロニーを計測し、

生菌数の算定を行った（図3）。

C. 研究結果

[1]ウエルシュ菌定性検査

今年度は、香辛料40 検体を調査し、増菌培養液及びコロニーPCR で *cpa* 陽性となったのは、9 検体（22.5%）で、そのうち *cpe* 陽性は0 検体であった。香辛料の種類別内訳では、モロッコ産コリアンダー2 検体、インド産コリアンダー2 検体、インド産フェネル2 検体、インド産ホワイトペッパー1 検体、インド産バジル1 検体、インド産クミン1 検体であった。また、購入店別ではスーパーマーケット等の大規模小売店で購入した28 検体中2 検体（7.1%）、香辛料等の専門店で購入した12 検体中7 検体（58.3%）が *cpa* 陽性であった。

[2]最確数法

ウエルシュ菌定性検査で *cpa* 陽性であった9 検体について最確数法で推計したところ、モロッコ産コリアンダー2 検体が 3.6×10^1 、 4.3×10^2 MPN/100g、インド産コリアンダー1 検体が 9.0×10^1 MPN/100g、インド産フェネル2 検体が 6.1×10^1 、 1.1×10^2 MPN/100g であった。*cpa* が陽性であったのにも関わらず、4 検体が定量限界値未満であった。

[3]細菌数

細菌数の検査については、内容量が少なかった 1 検体を除いた 39 検体を検査対象とした。細菌数は検体によって様々であり、ブラックペッパーは 6 検体中 5 検体が 3.0×10^2 cfu/g 未満で、残り 1 検体も 6.0×10^2 cfu/g であった。細菌数が最も多かったインド産ターメリックは 4.3×10^7 cfu/g であったが、*cpa* 陰性であった。購入店別では、大規模小売店で購入した検体が 3.0×10^2 未満～ 6.7×10^4 cfu/g で、専門店で購入した検体が $7.6 \times 10^2 \sim 4.3 \times 10^7$ cfu/g であった。また、*cpa* 陽性の検体については、モロッコ産コリアンダー 2 検体が 3.6×10^4 、 1.2×10^5 cfu/g、インド産コリアンダー 2 検体が 7.6×10^2 、 8.0×10^3 cfu/g、インド産フェンネル 2 検体が 7.0×10^3 、 9.0×10^3 cfu/g、インド産ホワイトペッパー 1 検体が 5.0×10^3 cfu/g、インド産バジル 1 検体が 7.8×10^2 cfu/g、インド産クミン 1 検体が 5.3×10^4 cfu/g であった。

D. 考察

令和 7 年度は 40 検体 19 種類の香辛料について調査を行い、9 検体 5 種類からウエルシュ菌が検出され、陽性であった香辛料はコリアンダー 4 検体、フェンネル 2 検体、ホワイトペッパー 1 検体、バジル 1 検体、

クミン 1 検体であり、特定の香辛料がウエルシュ菌に汚染されている可能性が考えられた（表 1）。次年度以降は、これらの香辛料について検査検体数を増やしてさらに詳細な汚染状況を明らかにする。また、原産地別では、今回購入した香辛料の原産地は 9 か国あり、そのうちインド産の香辛料 16 検体中 7 検体（43.8%）、モロッコ産の香辛料 3 検体中 2 検体（66.7%）からウエルシュ菌が分離され、地域によって汚染状況が異なる可能性が考えられた。さらに、購入店別では、大規模小売店で購入した 28 検体中 2 検体（7.1%）、専門店で購入した 12 検体中 7 検体（58.3%）からウエルシュ菌が分離され、専門店で販売されている香辛料は大規模小売店のものより汚染率が高いことが明らかになった。

最確数法において定量限界値以上であったのはコリアンダー 3 検体及びフェンネル 2 検体であり、これらの香辛料は他の *cpa* 陽性であったホワイトペッパー、バジル、クミンよりもウエルシュ菌に汚染されやすい可能性が考えられた。

香辛料中の細菌数については、ブラックペッパーは 6 検体中 5 検体が 3.0×10^2 cfu/g 未満であり、細菌汚染が低いことが明らかになった。

ターメリックは細菌数が $3.0 \times 10^2 \text{cfu/g}$ 未満～ $4.3 \times 10^7 \text{cfu/g}$ と同一原産国の商品でも細菌数にばらつきがあったことから、製造過程で汚染された可能性が考えられた。また、購入店別においても大規模小売店と専門店の検体で大きな差はみられなかった。*cpa* 陽性の香辛料について、1 検体を除き細菌数が多い検体は最確数も定量限界値以上であったことから、ウエルシュ菌に汚染された香辛料において細菌数とウエルシュ菌芽胞数には一定の相関がある可能性が考えられた。

E. 結論

今年度の調査で市販香辛料において *cpe* 保有ウエルシュ菌は検出されなかったが、2 割程度がウエルシュ菌に汚染されていることが明らかになった。また、ウエルシュ菌が検出された香辛料については、特定の原産地及び専門店で販売されたものから高い割合で検出されることも明らかになった。さらに、ウエルシュ菌に汚染された香辛料については、細菌数とウエルシュ菌芽胞数に一定の相関があることが推察されるため、調理で香辛料を使用する際は十分加熱し、調理後は室温で放置せず冷蔵庫内で保管することが食中毒予防として重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

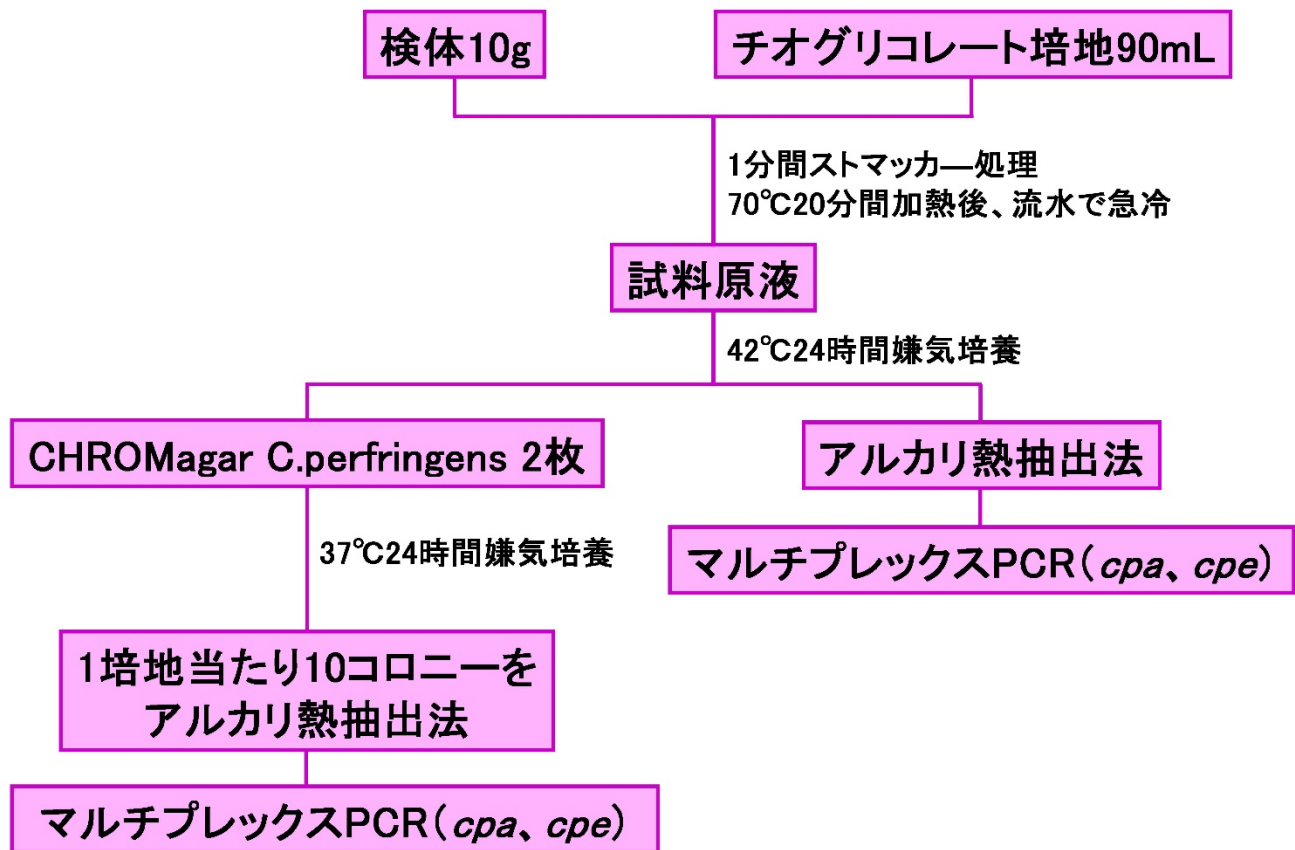


図1 ウエルシュ菌定性検査の検査手順

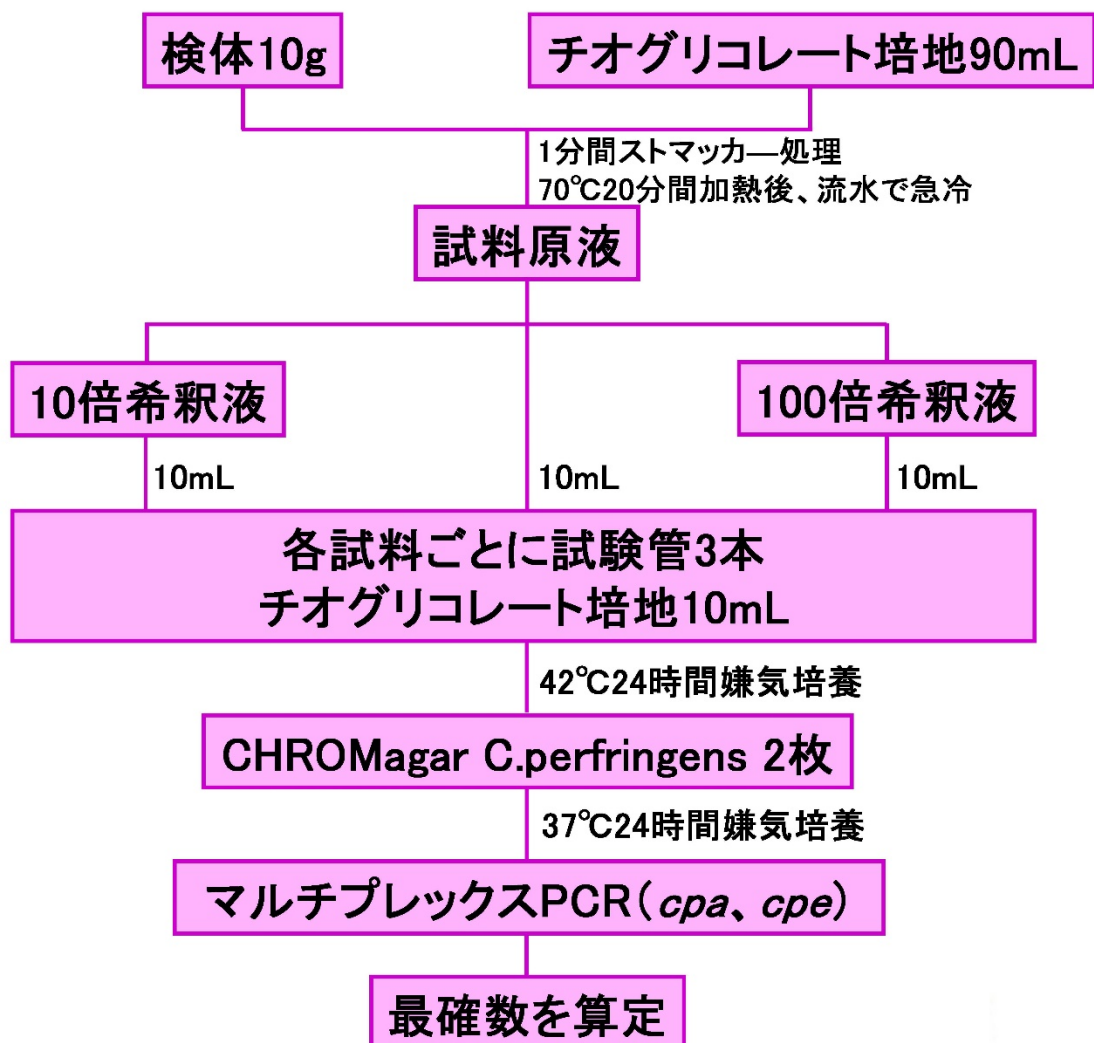


図2 最確数法によるウエルシュ菌数算定の検査手順

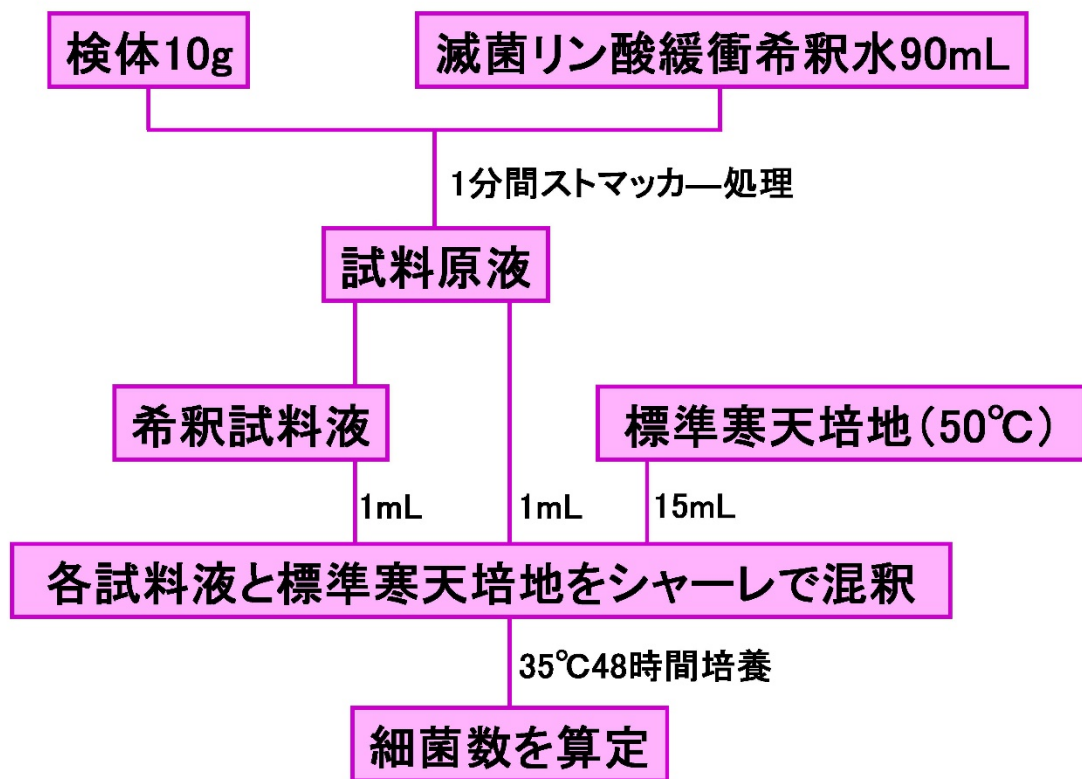


図3 細菌数算定の検査手順

Multiplex PCR for *cpe* and *cpa*

- プライマー

multi-*cpa*-F: GCTAATGTTACTGCCGTTGA

multi-*cpa*-R: CCTCTGATACATCGTGTAAG

multi-*cpe*-F: GGAGATGGTTGGATATTAGG

multi-*cpe*-R: GGACCAGCAGTTGTAGATA

- 反応液

KOD one master mix	12.5 μ L
multi- <i>cpa</i> -F (50 μ M)	0.15 μ L
multi- <i>cpa</i> -R (50 μ M)	0.15 μ L
multi- <i>cpe</i> -F (50 μ M)	0.15 μ L
multi- <i>cpe</i> -R (50 μ M)	0.15 μ L
Template	2.0 μ L
<u>H₂O</u>	<u>9.9 μ L</u>

- プログラム

98°C	10 sec
55°C	5 sec
<u>68°C</u>	<u>10 sec</u> × 35
68°C	3 min

- 判定 (マイクロチップ電気泳動システムで電気泳動)

324 bp → *cpa* (アルファ毒素遺伝子) 陽性

233 bp → *cpe* (エンテロトキシン遺伝子) 陽性

図4 マルチプレックス PCR の条件

No.	検体名	原産地	購入店	<i>cpa</i>	<i>cpe</i>	最確数 (MPN/100g)	細菌数 (CFU/g)
1	八角	中国	大規模小売店	－	－		490
2	ブラックペッパー	中国	大規模小売店	－	－		<300
3	ローズマリー	モロッコ	大規模小売店	－	－		570
4	オレガノ	トルコ	大規模小売店	－	－		6000
5	一味唐辛子	中国	大規模小売店	－	－		<300
6	ターメリック	インド	大規模小売店	－	－		700
7	シナモン	ベトナム	大規模小売店	－	－		460
8	ターメリック	スリランカ	大規模小売店	－	－		11000
9	ターメリック	インド	大規模小売店	－	－		8000
10	クミン	トルコ	大規模小売店	－	－		1000
11	ナツメグ	インドネシア	大規模小売店	－	－		1000
12	コリアンダー	モロッコ	大規模小売店	＋	－	36	36000
13	クミン	トルコ	大規模小売店	－	－		2100
14	コリアンダー	モロッコ	大規模小売店	＋	－	430	120000
15	ターメリック	インド	大規模小売店	－	－		／
16	ターメリック	スリランカ	大規模小売店	－	－		
17	コリアンダー	フランス	大規模小売店	－	－		1000
18	コリアンダー	フランス	大規模小売店	－	－		11000
19	ターメリック	マレーシア	大規模小売店	－	－		2000
20	ブラックペッパー	マレーシア	大規模小売店	－	－		600
21	ブラックペッパー	ベトナム	大規模小売店	－	－		<300
22	シナモン	マレーシア	大規模小売店	－	－		480
23	シナモン	スリランカ	大規模小売店	－	－		67000
24	一味唐辛子	中国	大規模小売店	－	－		33000
25	ブラックペッパー	ベトナム	大規模小売店	－	－		<300
26	シナモン	マレーシア	大規模小売店	－	－		8000
27	ホワイトペッパー	インド	専門店	＋	－	<30	5000
28	スターアニス	インド	専門店	－	－		520
29	バジル	インド	専門店	＋	－	<30	780
30	フェンネル	インド	専門店	＋	－	61	9000
31	グローブ	インド	専門店	－	－		23000
32	ブラックペッパー	ベトナム	大規模小売店	－	－		<300
33	クミン	インド	大規模小売店	－	－		7000
34	マンゴー	インド	専門店	－	－		20000
35	クミン	インド	専門店	＋	－	<30	53000
36	ターメリック	インド	専門店	－	－		43000000
37	コリアンダー	インド	専門店	＋	－	91	8000
38	フェンネル	インド	専門店	＋	－	110	7000
39	コリアンダー	インド	専門店	＋	－	<30	760
40	アジョワン	インド	専門店	－	－		4000

表 1 各検体におけるウエルシュ菌定性検査及び最確数、細菌数結果一覧