

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

総括報告書

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

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ところ、タンパク源を添加することによって、酸化還元電位、pH がウエルシュ菌の増殖に適した方向に変化し、ウエルシュ菌の増殖を促進することが明らかになった。また、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 10 以下と非常に低い株も認められた。

新たな遺伝子型別法を開発する前段階として、日本国内にて分離された多様なウエルシュ菌がどのような遺伝子を有するのか、全ゲノムデータを基に解析した。その結果、食中毒を起こすために必須の cpe 遺伝子が染色体上に局在するウエルシュ菌は大きく分けて 2 種類の系統に属した。うち片方（c-cpe group1）はウエルシュ菌の芽胞の耐熱性に重要な Ssp4 のアミノ酸配列が耐熱性の構成を示すことが明らかとなった。また、この c-cpe group1 に特徴的なその他の遺伝子構成も明らかとなった。さらに系統解析の結果から、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。

カレーミックスにウエルシュ菌の汚染が認められたことから、カレーミックス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。その結果、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。

研究分担者

渡辺麻衣子 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
岡部 信彦 川崎市健康安全研究所

研究協力者

Burenqiqige 国立医薬品食品衛生研究所
池田 史朗 川崎市健康安全研究所
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
大野 祐太 北海道立衛生研究所
落合 崇浩 北海道立衛生研究所
菊池 俊 千葉県衛生研究所
小西 典子 東京都健康安全研究センター
尾畑 浩魅 東京都健康安全研究センター
門間 千枝 東京都健康安全研究センター
柳本 恵太 山梨県衛生環境研究所
八木 美弥 静岡県環境衛生科学研究所
大西 真 沖縄県衛生環境研究所
柿田 徹也 沖縄県衛生環境研究所
久手 堅剛 沖縄県衛生環境研究所
平良 遥乃 沖縄県衛生環境研究所
石黒 真琴 札幌市衛生研究所
土屋 彰彦 さいたま市健康科学研究センター
曾根 美紀 さいたま市健康科学研究センター
松本 裕子 横浜市衛生研究所

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。我が国におけるウエルシュ菌食中毒は、

発生件数、患者数ともに減少傾向が認められない。この原因として、エンテロトキシン（cpe）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。研究代表者が厚生労働科学研究（22KA1002）で行なった研究では、食中毒の原因となる cpe 遺伝子保有芽胞は主に、カレーミックスや海産物を汚染していることを明らかにした。一方でこれまでにウエルシュ菌の汚染源として重要視されてきた食肉からは、cpe 遺伝子保有芽胞はほとんど検出できなかった。しかし、食中毒統計などで過去の事例を参照すると、ウエルシュ菌食中毒は食肉との関連性が高い。22KA1002 で行なった研究では、食肉の添加は、ウエルシュ菌の増殖を促進するが、食肉を添加していない食品中ではほとんど増殖できないことを明らかにした。そこで、食肉添加によるウエルシュ菌増殖促進機構を解明し、食品中のウエルシュ菌制御法を検討する。

現在、自治体ではウエルシュ菌分離菌株の分子疫学的解析にはパルスフィールドゲル電気泳動法が用いられているが、パルスフィールドゲル電気泳動法は煩雑で、また結果が得られるまでに時間がかかるなどの欠点がある。また、パルスフィールドゲル電気泳動法終売になっているため、今後は

この方法でウエルシュ菌の疫学解析が行えなくなる可能性がある。そこで、自治体で実施可能な従来法と同等の感度を有する遺伝子検査法を確立する。また、食中毒の原因となった cpe 保有ウエルシュ菌の由来を明らかにするため、食中毒事例・食品・環境等由来株を分子疫学的に解析する。

22KA1002 では、カレーミックスに cpe 遺伝子保有ウエルシュ菌芽胞が汚染している実態を明らかにした。しかし、個々の香辛料の汚染状況は明らかになっていないため、これらの汚染状況を調査し、汚染除去法を検討する。

B. 研究方法

[1] タンパク源とウエルシュ菌増殖との関係

煮物にタンパク源としてペプトンもしくは大豆ミートを加えたものを作製し、ウエルシュ菌の増殖性を検討した。また、カレーにタンパク源として牛肉、ペプトンもしくは大豆ミートのいずれかを加えたものを作製し、酸化還元電位や pH を測定した。

[2] ウエルシュ菌栄養体の耐熱性及び芽胞形成性の比較

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、加熱前後の菌数の変化から、55℃における D 値を算出した。また、芽胞形成用の DS 培地 (Duncan-Strong medium) 中での芽胞形成性を比較した。

[3] 新規遺伝子検査法確立

過去の文献の中でも、ウエルシュ菌の多様

性と食中毒に関連する遺伝子について詳細に解析した論文を検索した。系統ごとに保有する遺伝子の特徴に着目し、解析対象とする遺伝子およびアミノ酸を選定した。その後、全ゲノム解析を行い、遺伝子の保有状況を確認した。

[4] 食中毒原因株の由来解明のための分子疫学的解析

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。

[5] ウエルシュ菌汚染実態調査

22KA1002 の方法を用いて、香辛料におけるウエルシュ菌の汚染を調査した。供試した検体は、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。

C. 研究結果

[1] タンパク源とウエルシュ菌増殖との関係

煮物に大豆ミート、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ウエルシュ菌の増殖が認められた。

酸化還元電位に関しては、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。

pH に関しては、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。

[2] ウエルシュ菌栄養体の耐熱性及び芽胞形成性の比較

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。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。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。

芽胞形成性に関しては、菌株間で大きな差は認められなかった。

[3] 新規遺伝子検査法確立

食中毒を起こすために必須の cpe 遺伝子が染色体上に局在するウエルシュ菌は大きく分けて 2 種類の系統に属した。うち片方 (c-cpe group1) はウエルシュ菌の芽胞の耐熱性に重要な Ssp4 のアミノ酸配列が耐熱性の構成を示すことが明らかとなった。また、この c-cpe group1 に特徴的なその他の遺伝子構成も明らかとなった。集団食中毒事例分離株に着目して解析すると、ある程度事例ごとに特徴的な病原遺伝子/環境耐性因子パターンを示した。

[4] 食中毒原因株の由来解明のための分子疫学的解析

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。

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。

[5] ウエルシュ菌汚染実態調査

カレーミックス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。

D. 考察

厚生労働科学研究 22KA1002 の研究成果から、食肉はウエルシュ菌芽胞の汚染源として重要性はそれほど高くないが、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。その結果、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も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。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。

ウエルシュ菌栄養体の 55℃での耐熱性を調べたところ、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。一方で、ウエルシュ菌食中毒由来株の 55℃での D 値が 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。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。原因はよくわからないが、ひとつの可能性として、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。

日本で分離された多様な由来のウエルシュ菌株のゲノム解析を実施した。病原遺伝子および環境耐性因子を解析した結果、cgMLST 解析の系統樹の各種系統に対応するように複数の特徴的な遺伝子が見られた。また、集団食中毒事例由来株の一部（c-cpe group1）が耐熱性芽胞形成に重要な Ssp4 のアミノ酸配列を有していた。今後、原因食品が判明した集団食中毒事例由来株を中心に解析することで、有用な遺伝子候補を確定し、ウエルシュ菌の遺伝子型別法開発へと繋げたい。

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 系統樹の間で樹形を比較し、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た。

香辛料における汚染調査を実施したところ、コリアンダーなど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。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。

E. 結論

今年度の結果から、耐熱性の弱いウエルシュ菌株によっても、食中毒が引き起こされている可能性が出てきた。食品の調理後、冷却することが推奨されているが、急速冷却は耐熱性の弱い株の生残を促進する可能性がある。不適切な冷却処理によって、耐熱性の弱い株が生残し、その後増殖し、食中毒が発生しているのではないかと考えられる。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。

日本で分離された多様な由来のウエルシュ菌株のゲノム解析を実施した。病原遺伝子および環境耐性因子を解析した結果、cgMLST 解析の系統樹の各種系統に対応するように複数の特徴的な遺伝子が見られた。また、集団食中毒事例由来株の一部 (c-cpe group1) が耐熱性芽胞形成に重要な Ssp4 のアミノ酸配列を有していた。今後、原因食品が判明した集団食中毒事例由来株を中心に解析することで、有用な遺伝子候補を確定し、ウエルシュ菌の遺伝子型別法開発へと繋げたい。また、事例株や環境株との関連性を検討したところ、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。さらに、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いることから、今後は 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、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行いたい。

市販香辛料の汚染調査を行ったが、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。今後さらに検体数を増やし、香辛料における汚染実態を明らかにしていきたい。

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) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

- 5) 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

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
令和 6 年度専門研修 (2025. 2. 19)
- 2) 大西 貴 弘 : 芽胞形成菌について
令和 7 年度特別区専門研修 (2025. 9. 25)

H. 知的財産権の出願・登録状

なし

