

牛の腸内容物および枝肉から分離されたウェルシュ菌の性状について

四日市市保健所食品衛生検査所 ○小谷 康一郎

はじめに

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、偏性嫌気性の芽胞形成菌であり、ヒトや動物の腸管内、土壌等の自然環境に広く分布している。一部のウェルシュ菌はエンテロトキシンを産生し、ヒトに腸炎を引き起こす。ウェルシュ菌による食中毒は、加熱調理によって食品内部の酸素分圧が低くなりやすい大量調理食品が原因となることが多く、一件当たりの患者数が多い特徴を持つため、公衆衛生上重要である。食品の中では食肉の汚染率が数%~50数%と高く、 $10^0 \sim 10^4$ cfu/g 検出されており、その汚染経路として食肉を解体する時に筋肉部分が汚染される可能性がある¹⁾とされている。

日本におけるウェルシュ菌の食中毒検査においては、卵黄加カナマイシン (KM: 200mg/L) 含有 CW 寒天 (KM-CW 寒天) 培地が汎用されている。一方、近年の食中毒事例では KM-CW 寒天培地では検出されない KM 感受性の非定型ウェルシュ菌が分離されている^{2, 3)}。このような非定型ウェルシュ菌は従来の検査では検出されないことがあり、公衆衛生上重要である。

そこで今回、管内と畜場に搬入された牛の枝肉および同一個体の腸内容物のウェルシュ菌汚染状況を調査し、併せて検出されたウェルシュ菌の性状を調べた。

材料及び方法

2025 年 2 月から 5 月までに管内と畜場に搬入された牛 50 頭を対象とし、牛生体の直腸から腸内容物を採取し、検体とした。また、腸内容物を採取した牛の枝肉の頸部表面を無菌的に切除し、検体とした。検体はそれぞれ増菌培養として TGC 培地に接種し、腸内容物は培養前に 80℃、10 分加熱処理を実施した。検体を接種した TGC 培地を 37℃で 18~22 時間培養後、KM-CW 寒天培地と CG-GS-CW 寒天培地 (CW 寒天にサイクロセリン 200mg/L, ピルビン酸ナトリウム、硫酸第一鉄、ピロ亜硫酸ナトリウム各 500mg/L を添加した培地) に画線塗抹して 37℃で 18~24 時間嫌気培養後、Dneasy Blood&Tissue Kit (キアゲン社製) により DNA を抽出、ウェルシュ菌エンテロトキシン (*cpe*) 遺伝子およびウェルシュ菌 16s rDNA をターゲットとしてリアルタイム PCR を実施した。

また、16s rDNA をターゲットとしたリアルタイム PCR で陽性と判定された 5 菌株を対象とし、E-test (バイオメリュー社製) を使用してカナマイシンの最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。操作方法は使用説明書に従い、純培養したウェルシュ菌株をミューラーヒントンプイヨンに調製し、ブルセラ血液寒天培地に塗布した。72 時間培養後の阻止円から MIC 値を判定した。

成績

ウェルシュ菌 16s rDNA をターゲットとしたリアルタイム PCR で陽性と判定された菌をウェルシュ菌とした。ウェルシュ菌検出率は腸内容物 32% (16/50)、枝肉 4% (2/50) であり、50 頭中 17 頭からウェルシュ菌が検出された。腸内容物と枝肉の両方からウェルシュ菌が検出されたのは 50 頭中 1 頭であった。検出されたウェルシュ菌のうち、KM-CW 寒天培地では発育せず CG-GS-CW 寒天培地で発育する KM 感受性を示すウェルシュ菌は 0% (0/18) であった。また、レシチナーゼ反応が認められない非定型ウェルシュ菌は腸内容物 18.75% (3/16)、枝肉 0% (0/2) であった。一方、*cpe* 検出率は腸内容物、枝肉ともに 0% (0/100) であった。

MIC 値の測定結果は表 1 に示すとおり、すべて 256 µg/mL 以上であった。

表 1 .MIC 測定結果

菌株	MIC 値	<i>cpe</i>	レシチナーゼ反応	月 齢	品 種
菌株①	≥ 256 µg/mL	—	+	27	交雑種
菌株②	≥ 256 µg/mL	—	+	63	ホルスタイン
菌株③	≥ 256 µg/mL	—	+	84	ホルスタイン
菌株④	≥ 256 µg/mL	—	—	50	ホルスタイン
菌株⑤	≥ 256 µg/mL	—	+	84	ホルスタイン

考察

牛の腸内容物におけるウェルシュ菌の保菌状況は 38.4% と報告があり⁴⁾、今回の検出率 32% と大きな差は認められなかった。食中毒の原因となる *cpe* 産生ウェルシュ菌は腸内容物、枝肉ともに検出されなかった。牛肉は従来ウェルシュ菌食中毒の原因食品の 1 つとして考えられてきたが、今回の結果からそのリスクは低いことが示唆された。

牛の腸内容物からレシチナーゼ反応陰性を示す非定型ウェルシュ菌が検出された。KM-CW 寒天培地上でレシチナーゼ反応を呈するコロニーをウェルシュ菌として扱う従来法では検出しきれないウェルシュ菌が存在していることが示唆された。

カナマイシンに対する MIC 値を測定した 5 菌株は 256µg/mL 以上を示し、すべてカナマイシンに耐性を持つ定型ウェルシュ菌であることが確認できた。今回 PCR でウェルシュ菌と判定された 17 菌株はすべて KM-CW 寒天培地と CG-GS-CW 寒天培地の両方で発育していたため、牛の腸内に生存するウェルシュ菌はカナマイシン耐性を維持している可能性が高いと考えられる。

まとめ

今回の調査で検出されたウェルシュ菌には *cpe* 産生遺伝子を保有しているものはなかった。大西らの報告では牛の腸内容物を検体とした PCR ではすべての検体で *cpe* 陰性となっ

た⁵⁾。このことから、牛の腸内に生存するウェルシュ菌は *cpe* 産生遺伝子を保有しない可能性が高く、ウェルシュ菌食中毒の原因食品として牛肉の重要性は低いことが示唆された。

一方、近年の食中毒事例ではエンテロトキシンを産生しない新型下痢病原性食中毒事例が複数報告され、その原因物質が新規エンテロトキシン BEC (binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*) と同定されている。2017 年には北海道の胃腸炎患者においても BEC を保有するウェルシュ菌が分離されている。今後はこのような非定型ウェルシュ菌の汚染状況を調査し、リスク分析につなげたい。

引用文献

- 1) 平成 21 年度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書」(社団法人 畜産技術協会作成)
- 2) カナマイシン含有培地使用では検出不可能なウェルシュ菌による集団下痢症事例—東京都(IASR Vol. 38 p.130-131: 2017 年 6 月号)
- 3) カナマイシン感受性ウェルシュ菌による集団食中毒発生事例:平成 30 年度北九州市保健福祉研究発表会
- 4) 牛・豚・肉用鶏における *Clostridium perfringens* 保菌状況調査:平成 27 年度全国食肉衛生検査所協議会東海北陸ブロック研修会(岐阜県食肉衛生検査所)
- 5) 国内の市販食品及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ェルシュ菌の汚染状況:第 45 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 p61