

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04756

研究課題名(和文)水循環システムを介した食中毒起因ウェルシュ菌の挙動とその消毒に関する研究

研究課題名(英文) Fate of food poisoning causing *Clostridium perfringens* in water environment, and its disinfection.

研究代表者

橋本 温 (Hashimoto, Atsushi)

県立広島大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：30332068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌の環境や食品の汚染源として、cpe保有ウェルシュ菌が多数存在する下水放流水の関与およびその下水放流水での塩素に代替する消毒法について検討することを目的として、下水および根菜類から分離されるウェルシュ菌の遺伝子組成の評価および下水放流水の過酢酸による代替消毒法の効果について検討を行った。じゃがいも付着土壌からcpe保有ウェルシュ菌が分離され、遺伝子型の調査を行ったところ、下水放流水から分離されるcpb2を有するタイプは分離されず、下水放流水との関連性は認められなかった。また、過酢酸は下水放流水中のウェルシュ菌を2,000 mg・min/Lでは約-2 log不活化させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根菜類(じゃがいも)表面付着土壌からcpe遺伝子保有ウェルシュ菌を分離し、ウェルシュ菌の環境での動態を明らかにする上で学術上意義の高い情報を得ることができた。加えて、本菌の根菜類の汚染状況は食品衛生上も極めて重要な情報である。さらに、過酢酸による塩素耐性のウェルシュ菌に対する不活化効果を示したことも、水質衛生学上ならびに健全な水循環システムの構築の上でも意義の高い情報であると考えられる。これらの成果は、微生物学、衛生学、衛生工学などの学術的側面および水処理や水循環、食品衛生などの社会的側面の両面から意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the involvement of *Clostridium perfringens* in sewage effluent, in which a large number of cpe-positive *Clostridium perfringens* exist, as a source of environmental and food contamination. *Clostridium perfringens* with cpe was isolated from surface attached soil of potato, and genotypes were investigated. The type with cpb2 isolated from sewage effluent was not isolated from surface attached soil, and no relationship with sewage effluent was observed.

In addition, for the purpose of examining a disinfection method that alternative chlorine in sewage effluent, the disinfection of *Clostridium perfringens* using peracetic acid was investigated. Peracetic acid inactivated *Clostridium perfringens* in sewage effluent by approximately -2 log at 2,000 mg・min/L.

研究分野：水質衛生学

キーワード：ウェルシュ菌 エンテロトキシン 過酢酸 根菜類 下水放流水

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は温血動物の腸管に常在し、芽胞形成により塩素消毒耐性を有することから、生残性の高い糞便汚染指標およびクリプトスポリジウムなどの原虫の汚染の恐れを判断指標として用いられている。研究代表者らは、ウェルシュ菌の水域の糞便汚染源の探索指標としての利用に関する先行研究の中で、ウェルシュ菌のうちエンテロトキシン(*cpe*)遺伝子保有株が「下水放流水からの分離株中30%と極めて高率に存在する」こと、「食中毒の汚染源と考えられていた食肉用の家畜(牛、豚、鶏)の糞便やその排水には存在しないこと(*cpe*陰性ウェルシュ菌は常在)」を示した(Hashimoto *et al.*, 2016, Suzuki *et al.*, 2021)。

このウェルシュ菌 *cpe* 遺伝子保有株は、食中毒の起因菌であり、その汚染源は古くから食肉の関与が言われてきた。一方で、上述のように家畜糞便(Hashimoto *et al.*, 2016)や食肉から検出されることは極めてまれである(Miwa *et al.*, 1996 など多数)。また、食中毒事例での原因食品は様々な食材から成るカレーなどの煮込み料理のような複合食品と推定されることが多いこと(食中毒統計)に加えて、研究代表者らの予備調査で、市販の“根菜類”の表面洗浄液からも高率にウェルシュ菌 *cpe* 遺伝子保有株が分離されることも明らかになっている。

### 2. 研究の目的

これらの先行研究を背景に、ウェルシュ菌の環境や食品の汚染源として、*cpe* 保有ウェルシュ菌が多数存在する下水放流水の食材等の汚染への関与およびその下水放流水での塩素に代替する消毒法について検討することを目的として、下水および根菜類から分離されるウェルシュ菌の遺伝子組成の評価および下水放流水の過酢酸による代替消毒法の効果について検討を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)供試試料

根菜類(じゃがいも)の表面付着土壌

16産地の市販のじゃがいも30試料を購入し、重量を測定したのち滅菌リン酸緩衝生理食塩水100 ml とともに食品サンプル用滅菌ポリバッグに入れた。ポリバッグ内のじゃがいもをもみ洗いしながら表面付着土壌を洗い出し、洗浄溶液を試料とした。洗浄後直ちに培養等の操作を行い、ウェルシュ菌の分離定量を行った。それぞれのじゃがいも試料の収穫から市販までの期間、保存・貯蔵条件等はコンディション不明である。

下水放流水試料

広島県内の下水処理場(オキシデーションディッチ処理)の最終沈殿池流出水(塩素注入前)を試料とした。採水後、直ちに培養操作を行い、ウェルシュ菌の培養等の操作を行い、ウェルシュ菌の分離定量を行った。

#### (2)根菜類および下水放流水からのウェルシュ菌の分離

下水放流水およびじゃがいも等の根菜類の表面洗浄水(滅菌リン酸緩衝生理食塩水)を試料とした。試料を50 ml ポリ遠心管に50ml ずつ分注し、75°Cの恒温槽中で15分間湯浴させたのち、直ちに冷却した。冷却後、一定量(1~500 ml)をハンドフォード改良寒天培地三重層法あるいはメンブランフィルター法で培地に植種し、嫌気培養(45、24h)で培養した。培養後、ウェルシュ菌と推定される黒色のコロニー数を計数した。

ハンドフォード改良寒天培地上に形成された黒色コロニーを全数あるいはランダムに選択して単離し、コロンビア5%羊血液寒天培地に塗抹して嫌気条件で増菌培養(36、24h)し、培養後コロニーを集めTE緩衝液中に浮遊させ、遺伝子検査用試料として凍結保存した。

#### (3)遺伝子検査

保存した試料をPCR法にて毒素遺伝子(*cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iap* および *cpe*)の保有状況および *cpe* 遺伝子保有株については、*cpe* 上流の遺伝子座位特定のPCR(*cpe* plasmid loci with downstream IS1151 sequence / IS1470-like sequence : プラスミドあるいは染色体性の識別)を行った。PCRののち、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を確認した。

また、一部の *cpe* 保有ウェルシュ菌については、16S rRNA V3-V4 領域についてもPCRを行い、増幅産物のシーケンスとシーケンス結果を基に系統解析を行った。本研究で使用したプライマーの一覧を表1に示した。

#### (4)過酢酸によるウェルシュ菌の代替消毒の検討

塩素に耐性を有するウェルシュ菌の代替消毒法として、下水放流水中に存在するウェルシュ菌を対象として、過酢酸との消毒評価実験を行った。300~2,000 mlの三角フラスコを反応槽とし、過酢酸製剤を10~100 mg/Lの濃度となるように添加し、接触時間を測定した。反応槽中の

下水放流水の過酢酸濃度は過酢酸計(平沼産業)で計測し、接触時間と過酢酸濃度から濃度時間積(CT: Concentration/Time 値)を求めた。各 CT 値ごとの試料中のウェルシュ菌濃度をハンドフールド改良寒天培地法で計数し、不活化曲線を作成した。

#### 4. 研究成果

(1)市販じゃがいもおよび下水から分離されたウェルシュ菌の遺伝子型比較

じゃがいも表面付着から分離されたウェルシュ菌の遺伝子型分布

6地方14道県を産地とする市販のじゃがいも30試料を試験した。30試料中25試料(83%)のじゃがいも表面付着土壌からウェルシュ菌が分離され、その個数は表面付着土壌1gあたり平均10.3cfuであった。ウェルシュ菌のうちcpe遺伝子保有株は9試料

(3%)から分離され、分離されたじゃがいもの付着土壌1gあたり平均2.3cfuであった。

30試料のじゃがいもから613株のウェルシュ菌と推定される黒色コロニーを単離、増菌培養し、PCR法で遺伝子の検査を行った。288株(47%)がcpa遺伝子を保有したことでウェルシュ菌であることが同定され、この288株のうち64株(22%)からcpe遺伝子が分離された。

じゃがいも表面付着土壌から分離されたウェルシュ菌の毒素遺伝子保有状況と下水放流水分離株との比較

市販じゃがいも表面付着土壌から分離された288株のウェルシュ菌のcpa、cpeを含む毒素遺伝子の保有状況を図1に示した。市販のじゃがいも表面付着土壌から分離されたウェルシュ菌の73%は毒素型分類でのA型に分類され、その内訳はcpa遺伝子を単独で有するものがほとんどであった。

また、cpe遺伝子を保有するもの(全体の22%)はほとんどがF型に分類されるウェルシュ菌であり、cpaとcpeを保有していた。

下水放流水から分離されるウェルシュ菌は、そのほとんどがcpaとcpeに加えてcpb2遺伝子を保有するタイプであることが先行研究で明らかになっている(Hashimoto et al., 2016, Suzuki et al., 2021)。このことから、今回調査したじゃがいもの表面付着土壌から分離されたウェルシュ菌と下水放流水の直接的な関連性は観られず、下水放流水等のヒト由来の排水等のウェルシュ菌が灌漑用水などを通じて根菜類を汚染している可能性は見いだすことができなかった。一方で、ウェルシュ菌の耕作土壌の汚染からじゃがいもに付着までには、じゃがいも収穫-貯蔵-出荷までの間を見積もると少なくとも数ヶ月単位のタイムラグが発生する可能性がある。また、ウェルシュ菌には毒素遺伝子やそのプラスミドの保有状況による熱耐性の差などの環境ストレスへの抵抗性に差があることも明らかに

表1 使用したプライマー

Target	Primer	Sequence (5'-3')
<i>C. perfringens</i> cpa gene	CPAlphaF	GCTAATGTTACTGCCGTTGA
	CPAlphaR	CCTCTGATACATCGTGAAG
<i>C. perfringens</i> cpb gene	CPBetaF3	GCGAATATGCTGAATCATCTA
	CPBetaR3	GCAGGAACATTAGTATATCTTC
<i>C. perfringens</i> cpb2 gene	CPBeta2totalF2	AAATATGATCCTAACCAAMaAA
	CPBeta2totalR	CCAAATACTYbTAATYGATGC
<i>C. perfringens</i> etx gene	CPEpsilonF	TGGGAACCTCGATACAAGCA
	CPEpsilonR2	AACTGCACTATAATTTCTTTTCC
<i>C. perfringens</i> iap gene	CPiotaF2	AATGGTCCTTTAAATAATCC
	CPiotaR	TTAGCAAATGCACTCATATT
<i>C. perfringens</i> cpe gene	CPEnteroF	TTCAGTTGGATTACTTCTG
	CPEnteroR	TGTCCAGTAGCTGTAATTGT
16S rRNA gene (V3-V4 region)	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG
	806R	GGACTACHVGGGTWCTAAT
Chromosomal cpe locus	cpe4F	TTAGAACAGTCCTTAGGTGATGGAG
	IS1470R1.3	CTTCTTGATTACAAGACTCCAGAAGAG
Plasmid cpe locus with an IS1470-like sequence	cpe4F	TTAGAACAGTCCTTAGGTGATGGAG
	IS1470-likeR1.6	CTTTGTGTACACAGCTTCGCCAATGTC
Plasmid cpe locus with an IS1151 sequence	cpe4F	TTAGAACAGTCCTTAGGTGATGGAG
	IS1151R0.8	ATCAAATATGTTCTTAAAGTACGTTTC
<i>C. perfringens</i> cpe gene	3F	GATAAAGGAGATGGTTGGATATTAGG
	4R	GAGTCCAAGGGTATGAGTTAGAAG

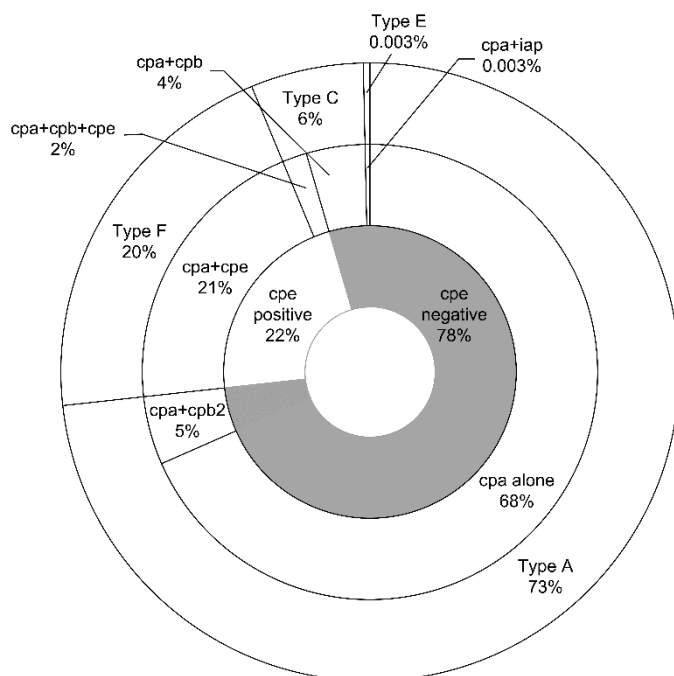


図1 分離ウェルシュ菌の毒素遺伝子保有状況

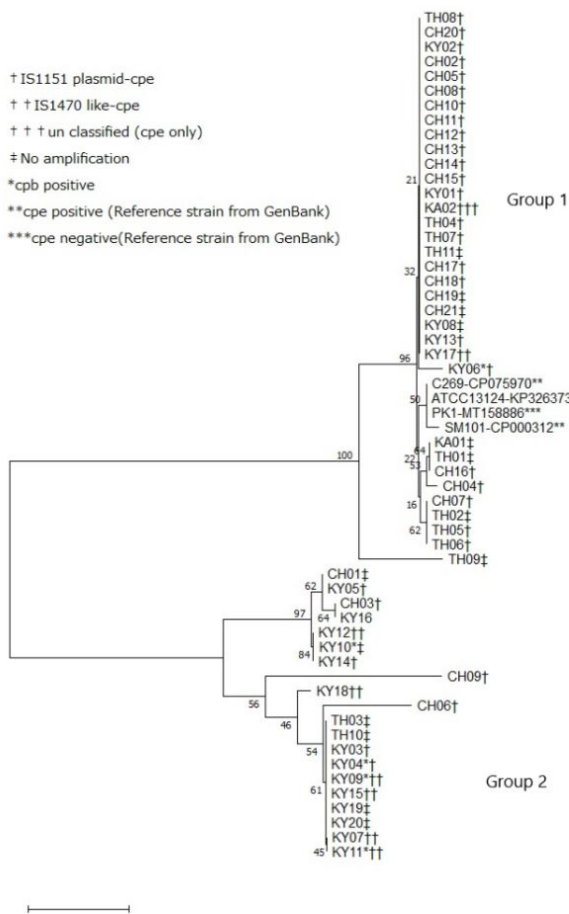


図2 ウェルシュ菌の 16S rRNA 系統解析

動物の食中毒等から分離された株の遺伝子情報は Group 1 と高い相同性が示された。本研究で得られたじゃがいも付着土壌分離ウェルシュ菌の 16S rRNA 遺伝子系統解析や *cpe* 遺伝子座位の解析の結果は、下水放流水から分離される *cpe* 保有ウェルシュ菌の遺伝子と比較することで両者の関係や汚染への関与などの情報を得ることができると考えられる。現在、下水放流水から分離された *cpe* 保有ウェルシュ菌については、項で示したとおり、*cpb2* 遺伝子が検出されないことから、その関与を強く示すような情報は得られていない。一方で、今後これらの情報が追加され、根菜類等から分離されるウェルシュ菌と比較することで、ウェルシュ菌の水循環システムを通じた挙動が明らかになると考えられる。

(2) 下水放流水中のウェルシュ菌の過酢酸製剤による不活化

下水放流水に過酢酸製剤を添加し、培養によるウェルシュ菌の定量値から CT 値ごとの log 不活化を計測した。結果を図 3 に示した。

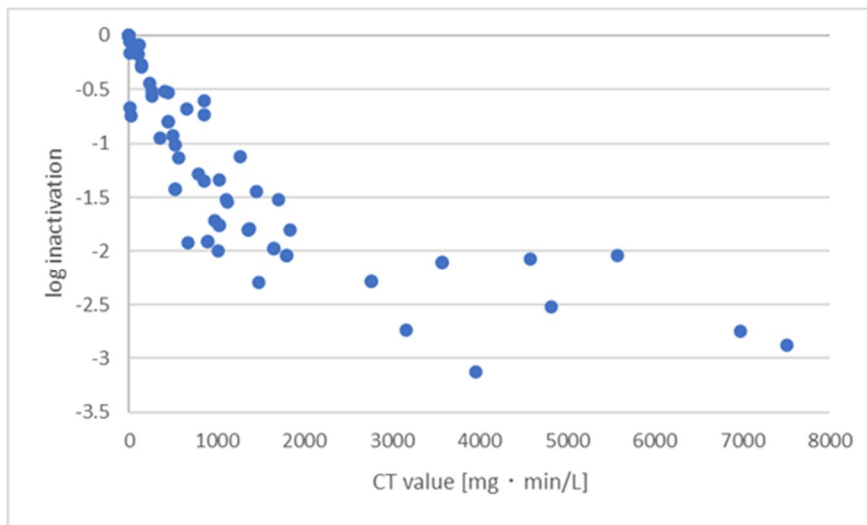


図3 過酢酸製剤による下水放流水中ウェルシュ菌の不活化効果

なっており、下水放流水分離株で頻出する *cpb2* 遺伝子を保有する *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌と *cpa* と *cpe* を保有するウェルシュ菌の抵抗性の差などが影響していることも推測される。従って、下水放流水から食品へのウェルシュ菌の汚染の可能性については、より詳細な調査が必要であると考えられる。

じゃがいも表面付着土壌から分離された *cpe* 保有ウェルシュ菌の特性について本研究でじゃがいも表面付着土壌から分離された 288 株のうち、54 株の *cpe* 保有ウェルシュ菌については、*cpe* 遺伝子の位置(プラスミド性または染色体性)および 16S rRNA 遺伝子のシーケンスと系統解析を行った。

54 株の調査で、ヒトの大規模な集団食中毒と強い関連性を示す染色体性の *cpe* 遺伝子を有する株は検出されず、ヒト等で散発性下痢症の起因菌となるプラスミド型(IS1151 または IS1470-like)が 38 株、本 PCR 法では染色体/プラスミド型の識別不能であった物が 1 株、試料の保存の影響で PCR 増幅産物が得られず不明のもの(*cpe* は確認)が 15 株であった。

また、16S rRNA 遺伝子のシーケンスによる系統解析の結果を図 2 に示した。

じゃがいも表面付着土壌から分離した *cpe* 保有ウェルシュ菌は大きく Group 1 と Group 2 の二系統に分類された。このうち、GeneBank のデータベースから得たヒト、

下水放流水中のウェルシュ菌の過酢酸による不活化は、CT 値 1,500 ~ 2,000 mg・min/L まではほぼ直線に進行し、CT 値 500 mg・min/L で約-1 log、2,000 mg・min/L では約-2 log まで不活化された。コントロールとして実施した塩素による不活化(CT 値 400 mg・min/L で約-2 log)と比較すると不活化の進行は緩やかであったものの、過酢酸では不活化が進行しても過酢酸濃度が初期注入量の 90%程度(ex. 10mg/L の注入量で 100 分、CT 値 1,000 mg・min/L、塩素では 0.01mg/L まで減衰)が残留するなど、共存する有機物の影響を受けにくいことが示された。

一方で、CT 値 2,000 mg・min/L を超えると不活化の進行が止まり、8,000 mg・min/L でも-3 log 程度の不活化効果しか認められなかった。この原因として、今回の実験ではウェルシュ菌の不活化効果をハンドフォード改良寒天培地上に発育した黒色コロニー(ウェルシュ菌を含む亜硫酸還元性クロストリジウム属芽胞)で評価した。一部の試料についてのみ暫定的な結果ではあるが、高 CT 値で不活化した黒色コロニーからは遺伝子検査でウェルシュ菌が検出されず、未同定ではあるがウェルシュ菌以外の過酢酸耐性-亜硫酸還元性クロストリジウム属芽胞のみが検出されている。より定量的な評価が必要であるが、これらの非ウェルシュ菌の過酢酸耐性芽胞がこの不活化率低下の原因になっている可能性がある。過酢酸のウェルシュ菌不活化効果についてはさらなる検討が必要であるものの、有機物共存下でも耐塩素性の芽胞の不活化が可能である過酢酸は、下水放流水による水域のウェルシュ菌芽胞の制御の手法の一つとして有効である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Hiroyuki, Oonaka Kenji, Hashimoto Atsushi	4. 巻 19
2. 論文標題 Evaluation of <i>C. perfringens cpe</i>-positive Strain as a Source Tracking Indicator of Human Contamination in Freshwater Environments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Water and Environment Technology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2965/jwet.20-089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Atsushi, Suzuki Hiroyuki, Oonaka Kenji	4. 巻 79
2. 論文標題 Prevalence of cpe-positive Clostridium perfringens in surface-attached soil of commercially available potatoes and its significance as a potential source of food poisoning	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102687~102687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anaerobe.2022.102687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------