

# THE CHEMICAL TIMES

2021 No.2 (通巻260号)  
ISSN 0285-2446

特集

食中毒と衛生管理の重要性

## 02 ウェルシュ菌食中毒に関する最新の知見

東京都健康安全研究センター 微生物部 門間 千枝

## 09 Core genome MLSTによる食中毒菌の汚染ルートの推定 ～食品を汚染した菌はどのように追跡するのか?～

東京海洋大学 食品生産科学部門 高橋 肇 中村 綾花

### トピックス

## 15 食肉処理における衛生対策～洗浄作業の重要性～

JA全農ミートフーズ株式会社 法務・コンプライアンス本部 菊池 孝治



KANTO CHEMICAL CO., INC.

# ウェルシュ菌食中毒に関する最新の知見

The latest findings on foodborne diseases caused by *Clostridium perfringens*

門間 千枝 Chie Monma

東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員  
Department of Microbiology Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

キーワード ... ウェルシュ菌、食中毒、エンテロトキシン

## 01 はじめに

2017年、東京都内にある保育園のイベントで、園児らが前日に調理した「一晩寝かせた」カレーを原因としたウェルシュ菌食中毒が発生して話題になった。カレーは一晩寝かせるとさらに美味しくなるといわれており、調理した翌日以降に食べる人も多い。同じように前日に調理され一晩寝かせがちな食品に「味がしみた煮物」等があげられる。ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は、このような前日に調理した食品を原因として発生する食中毒の原因菌であり、本菌食中毒は発生時に大規模化することも珍しくない。

ウェルシュ菌は、植物の種子の様に熱や乾燥に強い「芽胞」を形成し、酸素の存在しない状態で発育する「嫌気性菌」である。また、毒素の宝庫と言われるように多くの毒素や酵素を産生する菌であり、興味深い菌でもある。

本稿では、2020年のコロナ禍におけるウェルシュ菌を中心とした食中毒発生状況を初めに、ウェルシュ菌食中毒の特徴およびその原因菌であるウェルシュ菌について最新の知見を交えて紹介したい。

## 02 コロナ禍のウェルシュ菌食中毒発生状況

### 1. 2020年の食中毒発生状況の概要

2020年の全国の食中毒は801事例(2021年1月4日速報値)、2019年の食中毒事例は1,061事例であり、東京都では2019年119事例、2020年は112事例であった(2021年1月末現在)<sup>1,2)</sup>。図1に東京都における2020年の月別発生事例数を平成(2010年~2019年の平均)と比較した<sup>2)</sup>。過去10年間の平均である平成の月別食中毒発生事例数は、1年を通じてほぼ同じで

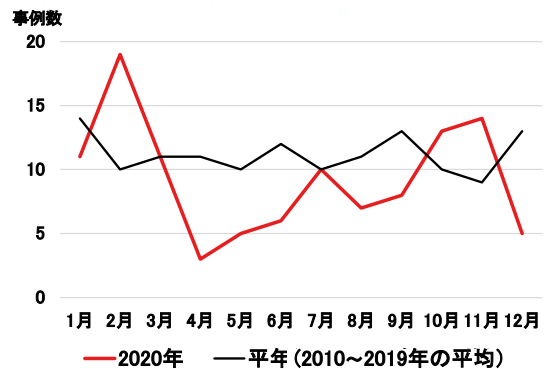


図1 月別食中毒発生事例数(東京都) 参考文献<sup>2)</sup>より作成

あったが、2020年は4月に激減している。直前の2019年と比較しても4月の食中毒事例の発生は、全国では2019年に107事例であったのに対し、2020年は30事例(2021年1月4日速報値)であり、東京都では2019年10事例に対し、2020年3事例であった。このように2020年の食中毒事例の発生は、4月(緊急事態宣言中)に急激に減少したが、5月以降は徐々に平成並みの発生数に戻っていった(東京都)。

一般に、食中毒の原因施設は飲食店であることが多い(全国:

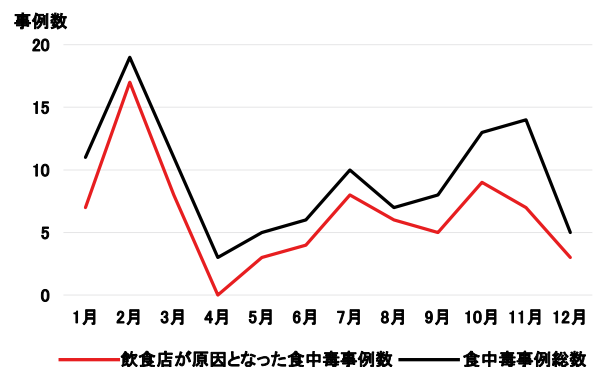


図2 2020年飲食店が原因施設となった食中毒事例数(東京都) 参考文献<sup>2)</sup>より作成

65.2%、東京都:83.9%、2019年)ことから、食中毒の発生数は飲食店での発生件数と平行である(図2、東京都)。

例えば、4月の都内の飲食店での発生は、2019年4月では10事例中7事例に対し、2020年4月は報告例がなく<sup>1-3)</sup>、緊急事態宣言下の4月、飲食店の利用が少なくなり食中毒が減少したことが推定される。

近年、食中毒事件の原因物質のほぼ8割は、アニサキス、カンピロバクター、ノロウイルスで占めている。この傾向は2020年も変わらないが、事例数ではカンピロバクターの割合が減少し(4、5月に減少)、アニサキスの割合が増加している(図3、東京都)。2020年東京都で発生した食中毒事例の患者数第1位は毒素原性大腸菌による食中毒であるが、本菌食中毒の発生は5年ぶりで稀である。また、ノロウイルスによる食中毒は過去10年間(2010~2019年)いずれの年も患者数が第1位であるが、2020年では131名(2021年1月15日速報値)と266名(2019年)から減少している(東京都)<sup>2,3)</sup>。

## 2. 2020年のウェルシュ菌食中毒発生状況

全国におけるウェルシュ菌食中毒事例数(2010年~2019年)は、平均25.1事例で年19~32事例と年によりやや変動が認められ、1事例あたりの平均患者数は61.5名であった。2020年のウェルシュ菌食中毒事例は19事例(2021年1月4日速報値)であった<sup>1)</sup>。

東京都におけるウェルシュ菌食中毒事例数は年間1~5事例で、2020年では4事例発生した。その内訳は、給食によるもの2事例(患者数46名、35名)、テイクアウト弁当によるもの1事例(患者数71名)、ケータリングによるもの1事例(2月末発生、患者数184名)であった<sup>2)</sup>。

ウェルシュ菌食中毒の原因物質別では4番目の発生数であったのに対し、患者数は合計336名で毒素原性大腸菌(患者数

2,548名)について2番目であった(図3、東京都)。

## 3. 2020年に東京都で発生したウェルシュ菌事例

2020年に発生したウェルシュ菌食中毒2事例を紹介する。両事例ともCOVID-19対策の影響を多少なりとも受けて発生したことが示唆される事例である。

### 1) 事例1:大量のテイクアウト弁当の調理で発生した事例

5月、子供食堂が提供したテイクアウト弁当で下痢、腹痛を呈した事例である。患者は71名で、子供食堂はボランティア団体で運営され、この飲食店に調理を依頼したのは初めてであった。患者ふん便及び冷凍庫に保存してあった鶏肉の煮物残品からエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が検出され、原因菌と断定された。飲食店では、鶏肉の煮物等を提供前々日に調理し、調理後に常温下に長時間放置していた。大量の調理が前々日調理、常温放置を招き、ウェルシュ菌が増殖する機会を与え、ウェルシュ菌食中毒が発生したと考えられる。

### 2) 事例2:提供方法を変えて業務量が増え、食中毒が発生した可能性がある事例

11月、全寮制の施設で寮生167名中46名が腹痛、下痢等を呈した事例である。患者ふん便からエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が検出され、ウェルシュ菌による食中毒と判明した。疫学調査から発症前日の夕食が原因食品とされた

当該施設では、8月に新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染者5名が確認され、食事のサイドメニュー(数種類のメニューから複数選択)の提供方法をその場で取り分けて提供するピュッフスタイルから、あらかじめ小鉢でひとつずつ分けて提供する方法に変更し、それにより、従業員の業務量が増加したと聞いている。また、ピュッフスタイルだとメニューごとに調理容器が一つで

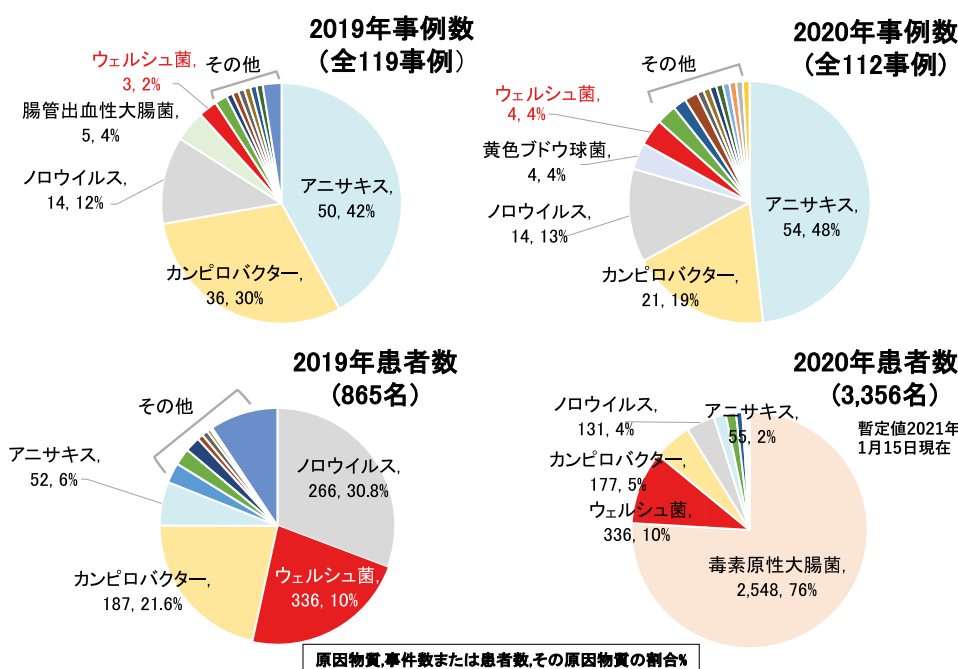


図3 原因物質別食中毒事例数および患者数(東京都) 参考文献<sup>2)</sup>より作成

残った場合の廃棄が容易であったのが、小鉢で提供するスタイルの場合、昼食に残った小鉢をひとつずつ廃棄し洗浄するのに手間がかかるため、そのまま冷蔵庫で保管して提供していた場合もあったと推定されることも原因の一つと示唆されている。

## 03 ウェルシュ菌食中毒の特徴

### 1. 発生状況

ウェルシュ菌食中毒は大規模な集団発生事例が多く、1事例あたりの患者数は、平均48.2名(東京都、2011年～2020年)である。その原因施設の内訳は、飲食店19事例(70.4%)、給食施設7事例(25.9%)である。患者100名以上の事例は13事例(東京都、1990年～2020年)認められている<sup>2,3)</sup>。

### 2. 臨床症状

ウェルシュ菌食中毒の潜伏時間は通常6～18時間、平均10時間で、潜伏時間の幅が狭く発症のピークは鋭い。本菌食中毒の患者786人(東京都、2009年～2013年)の症状を調べると、主要症状は下痢(98.3%)と腹痛(70.9%)で、下痢の便性状は水様便(41.9%)、粘液便(9.2%)、軟便(5.3%)であり、その回数は1～5回が全体の75.3%を占めていた<sup>3)</sup>。これらの発症状況から、ウェルシュ菌食中毒の患者は比較的軽度の下痢を発症し、1～2日で回復するので、実際は統計上の数字よりも多くの食中毒が発生していると考えられる。

### 3. 原因食品

ウェルシュ菌食中毒の原因食品には、食肉の加熱調理食品と煮込み料理が多いのが特徴である(図4)<sup>3,4)</sup>。

この理由として、第一にウェルシュ菌芽胞で汚染されている確率が高い食肉類には、酸化還元電位が下げる性質を持つグルタ



図4 ウェルシュ菌食中毒の原因食品  
ウェルシュ菌食中毒124件(東京都、1963年～2018年、推定を含む)  
参考文献<sup>3)</sup>より作成

チオン等が多いことから大量調理食品中では嫌気状態になり易く、食品中でのウェルシュ菌増殖に適した条件となることがあげられる。

第二に大量に加熱調理された後、そのまま数時間ないし一夜室温に放置された食品が多いことから、その食品中には熱抵抗性が強い下痢原性ウェルシュ菌の芽胞が生残してしまうことである。食品の再加熱処理により生存した芽胞の発芽が促進させると同時に食品内に含まれる酸素が追い出され、ウェルシュ菌の発育・増殖に適した嫌気状態になる。ウェルシュ菌の分裂時間は約10分で2倍に増殖し、他の食中毒原因菌より早く急激に増殖する。

## 04 ウェルシュ菌食中毒の対策

### 1. 発生要因

ウェルシュ菌食中毒の発生要因を調べた結果、加熱調理食品の長時間の常温放置等温度管理が不十分であったものが31事例(56.4%)、前日以前に調理された食品によるものが24事例(43.6%)、不十分な再加熱によるものが11事例(20.0%)であった<sup>3,4)</sup>。これらの結果から、「前日調理」「大量調理」の結果生じる「緩慢冷却」が、生残した芽胞が通常のウェルシュ菌(栄養細胞型)となり増殖する原因となり、本菌食中毒の主要な発生要因になっている。

### 2. 予防

食中毒予防三原則は「つけない」、「増やさない」、「やっつける」である。しかしながら、ウェルシュ菌の芽胞が多くの食品、環境に生残しているため、「つけない」ことは実現困難である。また、芽胞を形成したウェルシュ菌を「やっつける」ことも困難が伴う。ウェルシュ菌食中毒は、 $10^6$ 個以上の本菌(栄養細胞型)を食品と共に喫食することにより発生するので、対策は「増やさない」が最も重要な予防法となる。具体的には、食品をウェルシュ菌が旺盛な発育をする30～47℃に置く時間を短くすることが必要である。さらに、「小分け」することは「急速に冷却」し、再加熱時に攪拌不足から起こりやすい「加熱温度ムラ(加熱不十分)を防ぐ」ために有効である。

実験結果より、以下の点が確認されている<sup>5,6)</sup>。

1. ウェルシュ菌の発育は、4、15、25、37、42、47℃で測定した結果、42℃及び47℃で増殖速度が早い。
2. ウェルシュ菌の芽胞を接種した鶏肉を2時間で75℃から25℃に直線的に降下させた場合、ウェルシュ菌の増殖は認められない。しかしながら、75℃から50℃に30分で降下させ、その後6時間で25℃に降下させた場合、4～6時間でウェルシュ菌の急速な増殖が認められる。
3. カレー(ウェルシュ菌 $10^3$ 個/g添加)を冷蔵保管後再加熱した場合の菌数は、鍋のままの場合は $10^3$ 個/gであったが、一方、小分けした場合は10個/g以下であった。



## 05

## ウェルシュ菌の特徴

## 1. ウェルシュ菌

ウェルシュ菌食中毒の原因菌であるウェルシュ菌は、ヒトをはじめ、ウシ、ブタ、トリ等多くの動物の腸管内の正常細菌叢の一つである<sup>7)</sup>。土壌や河川、海等にも広く芽胞の形で分布し、食肉、魚介類あるいは野菜等多くの食品が本菌に汚染されている。芽胞を形成する偏性嫌気性菌であるクロストリジウム属の一菌種である(図5、図6)。他の嫌気性菌に比べ、発育や生存のために嫌気度は要求されないため、数時間大気中に暴露されても生残している。ウェルシュ菌の一般的な発育温度(発育可能温度ではない)は12~50℃、旺盛な発育温度帯は30~47℃、発育至適温度は43~45℃である。分裂時間は約10分間(45℃)と短く、発育が早い。

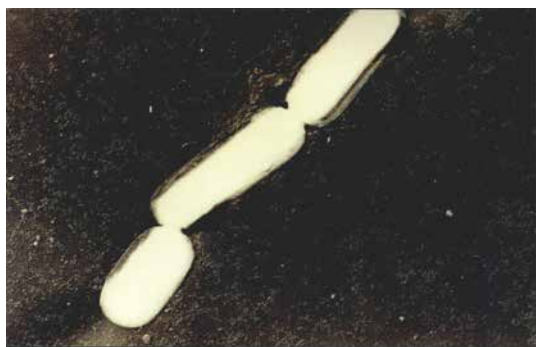
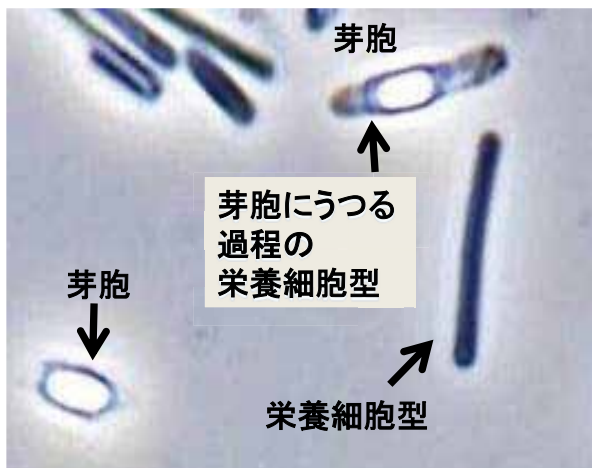


図5 ウェルシュ菌(電子顕微鏡)

図6 ウェルシュ菌の栄養細胞型と芽胞(位相差顕微鏡)  
栄養細胞型:通常の(芽胞でない)菌

ウェルシュ菌は食中毒のほかガス壊疽の原因菌でもあり、少なくとも16種類という多種類の毒素を産生する。これまでウェルシュ菌の毒素型は4種類の主要毒素( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $l$ )の産生性からA、B、C、D、Eの5つに分類されていたが、近年新たな毒素がいくつか発見されA~Gの7つに分類することが提唱されている<sup>8)</sup>。A型ウェルシュ菌は主要毒素の中では $\alpha$ 毒素のみ産生し、最も一般的

に分布している菌である。下痢原性毒素であるエンテロトキシン産生菌は今まではA型に分類されていたが、F型に分類された。また、7つ以上の毒素型を提唱している研究者もいる。

## 2. 下痢原性ウェルシュ菌の病原因子

ウェルシュ菌の中で、ヒトに下痢原性毒素を産生する菌が食中毒の起因菌となる。食中毒を起こす下痢原性ウェルシュ菌は、健康な人の腸内に常在しているウェルシュ菌と異なり、下痢原性因子である下痢原性毒素(エンテロトキシンまたは新型エンテロトキシン)を産生する。

## 1) エンテロトキシン

下痢原性毒素としては1960年代にウェルシュ菌エンテロトキシン(エンテロトキシンと略す)が明らかにされた。ウェルシュ菌食中毒はこのエンテロトキシンを産生する菌が原因となる<sup>7)</sup>。

エンテロトキシンは319アミノ酸からなる分子量35,317ダルトン、等電点4.3の易熱性タンパクである。細胞膜に小孔を形成し、それによる膜透過性の変化と細胞の形態変化、細胞死をもたらす。また、ウサギ等の腸管結紮ループ内に投与することにより、小腸粘膜上皮の破壊と管腔内への液体貯留(下痢の再現)を誘発する。

食中毒由来株のエンテロトキシンをコードする遺伝子(*cpe* 遺伝子)の多くは染色体上にあるが、一方、散発下痢症患者や環境から分離された株の*cpe* 遺伝子はプラスミド上にある。

一般に、健康なヒトのふん便から検出されるウェルシュ菌の中で、エンテロトキシン産生菌は数パーセント<sup>9)</sup>である。また、他の菌と異なりエンテロトキシンは芽胞を形成する過程で産生される。

2) 新型エンテロトキシン:CPILE (*Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin)

1997年、東京都で発生した食中毒事例が新しい下痢原性毒素による食中毒であると報告され<sup>10)</sup>、この新型下痢原性毒素は後にCPILE (*Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin)と同定された<sup>11)</sup>。この新型毒素による集団食中毒は現在までに4事例報告され、すべて日本国内で発生している。患者の症状は下痢、腹痛でエンテロトキシンによる食中毒と同じである。本毒素は腸管結紮ループ試験で陽性であり、vero細胞等において、エンテロトキシンと異なった細胞変性を示す(図7)。また、環境や健康なヒトのふん便からも検出されるが、CPILE産生菌は1パーセント未満である。

図7 新型エンテロトキシン及びエンテロトキシンのvero細胞への作用  
a) 新型エンテロトキシン(CPILE), b) エンテロトキシン, c) コントロール  
参考文献<sup>10)</sup>より引用

CPILEは2つのコンポーネント(CPILE-a、CPILE-b)から構成され、ウェルシュ菌のイオタ毒素等クロストリジウム属の4菌種が産生する二成分毒素のそれぞれの2つのコンポーネントに高い相同性を示す。CPILE-aはNicotinamide adenine dinucleotide(NAD)を基質とするADPリボース転移酵素である。CPILE-bは細胞膜受容体への結合に関与している。CPILEを含む5つのコンポーネント毒素において、アミノ酸相同性は70～80数%であった<sup>11)</sup>。しかし、著者らはCPILEの下痢原性は他の二成分毒素と異なっている可能性を示唆している。

## 06 ウェルシュ菌検査法

### 1. 食中毒発生時の検査法

ウェルシュ菌食中毒はCPILE産生菌によるものが稀にあるが、ほとんどの場合エンテロトキシン産生性のウェルシュ菌が原因となる。また、腸管には常在している下痢原性を持たないウェルシュ菌が混在するため、エンテロトキシン産生性をターゲットに検査を行う。食中毒の最も確実な診断法は、患者ふん便や原因食品等から、同一血清型エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌を分離・検出することである。ウェルシュ菌はふん便中では芽胞で存在するので、ウェルシュ菌の分離は加熱処理を行って他の菌を死滅させてから実施する。食中毒原因菌の検出は、①嫌気性芽胞菌であることから嫌気培養を行い、嫌気性菌以外の菌の発育を抑制すること、②カナマイシン等アミノグリコシド系抗生物質が無効であることから、カナマイシンを選択剤として培地に添加して他の菌の発育を抑制すること、③卵黄を加えた培地においてレシチナーゼ反応を呈するのでこれを指標として行うこと等の「ウェルシュ菌の特徴を利用する」ことと、④*cpe* 遺伝子を保有しエンテロトキシンを産生すること、⑤エンテロトキシン産生菌の芽胞は常在菌の芽胞と比較して熱に強い耐熱性芽胞形成菌であること等の「下痢原性ウェルシュ菌の特徴を利用する」ことをキーポイントにして行っている(図8-1)。検査の詳細は、既報を参考されたい<sup>7)</sup>。

疫学調査のための型別用血清としては、Hobbs1～17型(市販)の他、TW1～94型(当センターの自家調製)の各血清がある。

### 2. 通常の検査法では検出できないウェルシュ菌

発生状況、患者症状等からウェルシュ菌食中毒が強く疑われるにもかかわらず、通常の検査法ではエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が検出されない場合は、通常の検査法では検出できない非定型的な性状をもつウェルシュ菌も念頭において検査を行う必要がある。

これらの非定型的な性状のウェルシュ菌は、「ウェルシュ菌の特徴を利用する」「下痢原性ウェルシュ菌の特徴を利用する」ことを見直し、分離・検出されたものである。

前述の新型エンテロトキシン(CPILE)産生菌もこの過程で検

出され、下痢原性の確認後、次世代シークエンサー等を用い下痢原性物質CPILEが同定された<sup>10,11)</sup>。その他、著者らは、100℃10分の加熱で死滅する易熱性芽胞形成菌、乳糖遅分解(図8-2、写真下段左)<sup>12)</sup>、レシチナーゼ反応陰性(図8-2、写真下段右)、カナマイシン含有培地で発育できないウェルシュ菌<sup>13)</sup>(カナマイシン低度耐性菌)等の非定型的な性状のウェルシュ菌を分離し、各々食中毒の原因菌となった事例を確認している。

### 3. ウェルシュ菌検査法の改良

東京都健康安全研究センターでは、非定型的な性状の菌についても検出できるように検査法を改良している(図8-2)。改良点としては、易熱性芽胞形成ウェルシュ菌が検出されるように、ふん便の加熱処理温度を100℃から80℃に変更した。また、近年、カナマイシン低度耐性菌による事例が発生している。東京都では19事例中12事例(63.2%、2014～2018年)のカナマイシン低度耐性菌によるウェルシュ菌食中毒を確認している。本菌は汎用されているカナマイシン含有の培地では発育できないことから、著者らは選択分離培地(カナマイシン含有卵黄加CW寒天培地)に添加されている抗生剤をカナマイシンからサイクロセリンに変更し、発育促進剤を加えた培地を作成してルーチン検査に用いている。

### 4. 衛生管理のためのウェルシュ菌検査法

衛生管理を目的とした一般流通食品のウェルシュ菌検査は原因菌究明のための食中毒検査とは全く異なる。ウェルシュ菌の発育には酸素のない状態が必要で、嫌気培養装置が必須であるが、一般流通食品等の検査には好気条件下でも培養可能なパウチを用いる方法が汎用されている。ローストビーフ等の特定加熱食肉製品および包装後加熱食肉製品は、成分規格でウェルシュ菌を含むクロストリジウム属菌の菌数が定められており、クロストリジア測定用培地を用いるパウチ法で検査を行う。詳細は既報を参考されたい<sup>14)</sup>。なお、食品からの微生物標準試験法検討委員会でISO法にそったウェルシュ菌の検査法が検討されている。

## 07 おわりに

ウェルシュ菌食中毒は軽症な患者が多く、ウェルシュ菌が食品の成分規格にも定められていないこともあり、本菌を対象とした培地、検査試薬の開発が他の腸内細菌検査に比べ進んでいない。しかし、ウェルシュ菌食中毒は毎年コンスタントに発生し1事件あたりの患者数が多い。さらに、食中毒をはじめとした臨床検体や環境から、新規毒素や非定型的な性状を示す菌が分離されてきている。このため、扱い易い検査培地や検査試薬、検査方法の開発が求められる。

本菌食中毒はコロナ禍でも発生し、給食や弁当、テイクアウト食品等を原因として大規模化することが多いが、予防対策のポ



図8-1 食中毒発生時のウェルシュ菌検査法(従来法)

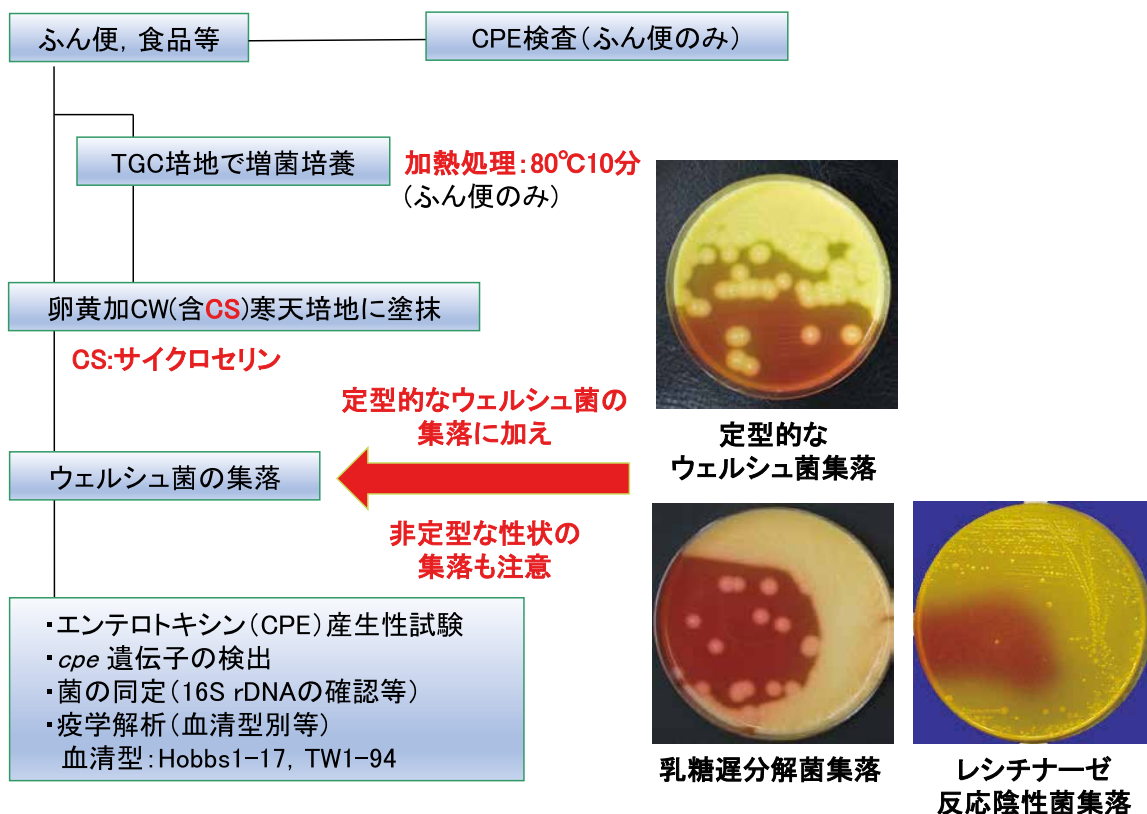


図8-2 食中毒発生時のウェルシュ菌検査法(当研究センター改良法)

イントを抑えることによって防ぐことができる。調理から喫食まで、「ウェルシュ菌を増やさない」こと、そのためには「調理や食品を保存する現場での温度管理」に注意することが大切である。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省, 4. 食中毒統計資料,  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html)(参照 2021-1-31).
- 2) 東京都福祉保健局, 食中毒の発生状況,  
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/tyudoku/index.html>(参照 2021-1-31).
- 3) 東京都福祉保健局: 東京都の食中毒概要, 1990 ~ 2021 年, 各年.
- 4) 門間千枝, 食品衛生研究, **69**(5), 21-36(2019).
- 5) 稲葉美佐子, 伊藤武, 坂井千三, 東京衛研年報, **33**: 143-149(1982).
- 6) 東京都福祉保健局, 「二日目のカレー」のウェルシュ菌増殖・殺菌実験,  
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/jikken/2curry.pdf>(参照 2021-1-31).
- 7) 門間千枝, 伊藤武, *Clostridium perfringens*: 食品由来感染症と食品微生物, 仲西寿男, 丸山務監修 (中央法規出版, 東京, 2009).
- 8) Shrestha A, Uzal FA, McClane BA, *Microbiol. Spec.*, **6**(1), 1-17(2018).
- 9) 門間千枝, 柳川義勢, 楠淳, 甲斐明美, 新垣正夫, 尾畑浩魅, 伊藤武, 太田建爾, 工藤泰雄, 東京衛研年報 **45**, 11-15(1994).
- 10) C. Monma, K.Hatakeyama, H. Obata, K. Yokoyama, N. Konishi, T. Itoh, A. Kai, *J. Clin. Microbiol.*, **53**(3), 859-867(2015).
- 11) D. Irikura, C. Monma, Y. Suzuki, A. Nakama, A. Kai, A. Fukui-Miyazaki, Y. Horiguchi, T. Yoshinari, Y. Sugita-Konishi, Y. Kamata, *PLoS One*, **10**: e0138183(2015).
- 12) 門間千枝, 尾畑浩魅, 小西典子, 畠山薫, 池内容子, 甲斐明美, 柳川義勢, 矢野一好, 東京衛研年報, **58**, 53-56(2007).
- 13) 門間千枝, 下島優香子, 小西典子, 尾畑浩魅, 石崎直人, 仲真晶子, 甲斐明美, 柳川義勢, 山田澄夫, 日食微誌, **25**(2), 76-82(2008).
- 14) 門間千枝, 伊藤武, ウエルシュ菌: 食品衛生検査指針微生物編改定第2版 (公益社団法人日本食品衛生協会, 東京, 2018)



# Core genome MLSTによる 食中毒菌の汚染ルートの推定 ～食品を汚染した菌はどのように追跡するのか?～

Molecular source tracking of food poisoning bacteria by using core genome MLST  
-How to track the contaminated bacteria?-

**高橋 肇** Hajime Takahashi (Associate Professor)

東京海洋大学 学術研究院 食品生産科学部門 食品微生物学研究室 准教授  
Tokyo University of Marine Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Food Microbiology

**中村 綾花** Ayaka Nakamura (Doctoral Course Student)

東京海洋大学大学院 応用生命科学専攻 食品微生物学研究室 博士後期課程2年  
Tokyo University of Marine Science and Technology, Course of Applied Marine Biosciences, Laboratory of Food Microbiology

キーワード ■■ 食中毒菌、core genome MLST、DNAタイピング

## 01 食品製造現場における微生物検査の現状

近年、食の多様化と食品の安全性に対する社会的関心の高まりを受け、食品の製造現場では高度な衛生管理手法が要求されている。特に、あらかじめ調理され、購入後手を加えることなく食べられるReady-to-Eat食品、少々の手間を加えれば食べられる半調理済み食品の割合は年々増加し、多種多様な食品形態が見られるようになってきている。このような食品は家庭料理として調理される食品とは根本的に異なり、異物の混入や長期にわたる流通、消費者の取り扱いによる温度不備等、想定すべきリスクが多く、その品質、安全性の確保にはHACCPの考え方を導入した高度な衛生管理が要求される。しかし、日本においては、中規模、小規模な食品会社も多く、高度な衛生管理手法を取り入れるのが困難であるという状況も多い。このような中で、食品の安全性を確保すべく、各種食中毒菌の検査法や汚染実態、鮮度のモニタリング法の確立は急務であり、また、これら手法は中規模、小規模な食品会社においても実施可能な簡易でコスト的にも十分実施可能な方法であることが望まれている。

これまでの食品工場などにおける微生物検査は、そのほとんどが培養法に基づくものであり、製品や製造ライン上の衛生管理を行う上で迅速性という点において大きな障害となっていた。また、専門的な知識を有する従業員の育成や、微生物検査に伴う安全性の確保(培養菌体の製品への混入防止)に多大な労力を要しており、より導入しやすい管理手法が求められている。

最近では、遺伝子増幅技術であるPCR法が病原菌の検出に広く用いられるようになり、また、PCR反応終了と同時に遺伝子の増幅が確認でき、電気泳動操作が不要なリアルタイムPCR法も広く普及し、食中毒菌のモニタリングを行うことのできる自主

衛生管理手法の一つとして選択肢に入ってきている。PCR法は、操作自体に専門的知識を要求することは少なく、キット化も容易で、迅速、簡便であるという特徴を有していることに加え、食品製造の現場で病原菌を培養する必要がなく、検査室に近い生産ラインの安全性確保も容易である。また、導入を後押しするように各種食中毒菌の検出キットも発売されており、一昔前よりはPCR検査導入のハードルは下がっているのではないかと考えている。本稿では、遺伝子手法を用いた食中毒菌のモニタリング法、特に、食品製造現場における食中毒菌等の汚染源を解析するための最新手法について解説する。

## 02 遺伝子手法を用いた食中毒菌の検査法

本稿では食中毒菌のモニタリング、汚染源の解析法に焦点を当て解説を行っていくが、その前に、簡単に食中毒菌の検出法、同定法の現状について述べたいと思う。

微生物の検出・同定法はこれまで、ほとんどが培養法に基づき行われてきた。食品の中に存在する菌の大半は食中毒菌以外のいわゆる雑菌であり、そのような中で食中毒菌は優勢菌に埋もれ、ごく微量に存在していることがほとんどである。そのため、雑多な菌群中から特定の食中毒菌を検出するには、増菌培養により全体の菌数を増やし、選択培養により標的菌もしくはその近縁の微生物を増殖させ、鑑別試験により対象とする微生物を確認する手法がとられる。このため、各培養のステップを経る必要があり、少なくとも数日、長いものでは1週間程度の検査時間が必要である。近年になってこれら培養法を用いた検査法に加え、PCR法などの遺伝子手法を用いる試みが急速に広がり、一部の

食中毒菌においては一般的な検出手法となっている。

PCR法を用いた食中毒菌の検出は、検査対象となる食中毒菌だけが持つ特定の遺伝子をPCRで増幅することで行っている。これまでにほとんどの食中毒菌で毒素遺伝子などを標的としたプライマーが開発され、検出方法が確立している。また、PCRで増幅される増幅産物をリアルタイムで定量することが可能なリアルタイムPCRも広く普及しており、目的菌の有無を判別するだけでなく、菌数を定量することも可能となっている。PCR法は分子マーカー（その菌だけが持つ特定の遺伝子配列）となる遺伝子が決まっている場合、すなわち、毒素遺伝子の保有が確認されている、病原因子の遺伝子が決定されているといった場合は、検出系の確立が可能であるが、これといった分子マーカーが無い菌群については、検出系の確立が難しい。食品製造現場においては食中毒菌のみならず、腐敗菌や変敗原因菌の迅速検出といったニーズがかなりあると思われるが、これらの菌群については分子マーカーの抽出が難しく、検出法の確立が困難なケースもある。本稿で取り上げる、次世代シーケンシングによる解析は、分子マーカーの決定にも一役買うと考えられ、今後、検査系の確立が容易になる可能性もある。この点に関しては後で述べたいと思う。

同定法に関しては、分子マーカーとしていくつかの遺伝子が用いられており、この配列情報の相同性にに基づき同定を行うことが多い。この場合、特定の菌を検出する場合とは異なり、全ての生物種に共通している遺伝子、例えば、リボゾームRNA遺伝子、ジャイレース遺伝子等が用いられる。リボゾームRNAはタンパク質合成に関与する細胞内小器官リボゾームを構成しており、構造上も機能上も生物種による相違が少ない核酸物質である。細菌は16S rRNA、23S rRNA、5S rRNAの3つのリボゾームRNAを持っており、このうち16S rRNAは古くからその塩基配列情報が解析されていたため、ほぼすべての培養可能な菌の配列情報がデータベースに登録されており、細菌の系統学的解析や相同性の比較に広く用いられている。また、細菌の主要タンパク質をMALDI-TOF MSにより分析、主要タンパク質の分子量パターンより同定を行う手法も一般的になっている。

16S rRNA遺伝子の配列に基づく菌種判別が一般的となり、そのデータベースが充実するにつれ、遺伝子配列の細かな違い(多型)による分類が細菌の種を問わず行われるようになった。これら手法の多くは、細菌の16S rDNAを対象にし、その配列中に存在する多型を検出することで解析を行っている。16S rDNAは約1500bpからなる遺伝子であるが、その中にはほとんどの細菌に共通な配列部分(保存領域)と菌種毎に異なる配列(多型領域)が交互に繰り返されるように分布している。菌種によってはこの多型領域の配列が菌株間においても異なっていることがあり、そのため同じ属にある菌を種ごとに、あるいはそれ以上の精度で分類することも可能である。この領域を用いたタイピング方法は汚染菌の混入ルートを株レベルで追跡するほどの解像度は持たないものの、工場や製品から分離された菌株が何群に分かれ、どのような内訳なのか、汚染菌のなかで優勢なものはどれのかなど、汚染の実態をおおまかに把握するような場合には簡便で使いやすいものと思われる。

03

これまでの汚染源追跡法  
(DNAフラグメントのパターンによるタイピング)

工場内外で分離した菌をすべて同定したとしても、それらの伝播動態を把握することは困難である。例えば、同じ食中毒菌が出荷した製品と複数の原料と工場内の複数箇所から検出された場合は、同じ菌種だからすべて疑わしいとするには無理があり、菌株レベルでの解析を行い、真の原因を突き止める必要がある。このような場合には、種レベルの群別・同定よりさらに精度の高い、株レベルでのDNAタイピング法が必須である。株レベルの判別を行うには、細菌の持つ全てのDNA(ゲノム)を対象として解析を行い、同じ遺伝型なのかどうかというタイピングを行う。このタイピングは菌株個々の指紋を解析するに等しいことからフィンガープリンティングと呼ぶこともある。

全ゲノムを対象としたDNAタイピングは、大規模な食中毒や感染症が発生した際の疫学調査のためのツールとして発展してきた。DNAタイピング法として古くから行われ、国際的にも標準的なものとして広く使われていた方法はPFGE(Pulse-field Gel electrophoresis)である。本法は、全ゲノムを制限酵素で切断し、得られた高分子量のDNA断片を電場の向きを連続的に変えられる特殊な泳動層で分離し、そのバンドパターンを比較する手法で、各国の衛生研究所などで疫学解析のツールとして広く使われており、信頼性の高さ、解像度の高さから国際ネットワークとしてパルスネットが作られ、稼働している<sup>1)</sup>(図1)。パルスネットには、PFGEによる菌株の解析情報と食中毒等の発生事例に関する種々の疫学情報が登録され、その情報を各国の研究機関などが共有することで、感染症発生時に迅速な対応と原因の究明ができるよう運営が行われている。しかしながら、PFGEは解像度が高いという特徴がある反面、操作が非常に煩雑であり手法の習熟にも時間を要するため、食品会社において導入しているところはほとんどないのが現状である。

PulseNet International



図1 PulsNet Internationalのネットワーク

一方、操作が簡便で食品製造の現場においても特殊な機械を必要としないため、広く用いられてきたものに、RAPD(Random Amplification of Polymorphic DNA)がある。これはPCRを用いた全ゲノムを対象としたタイピング法で、通常のPCRのように特異性を持ったプライマーを用いるのではなく、特段の特異性を持たせていないプライマーをゲノムの非特異な領域にランダムにアニーリングさせ、増幅されてきたDNA断片をバンドパターンとして解析するものである。PCR法を利用しているため、操作自体は簡便であるが、プライマーをランダムにアニーリングさせ、ゲノム上の領域をランダムに増幅するという特性上、PCR反応液の組成やPCR機器により得られる結果が異なり、再現性や研究機関毎における互換性について問題点が指摘されている。しかしながら、国際的な微生物学のジャーナルにおいて、特に食品工場内の汚染源追跡に本法を使用している研究報告はいまだ多く、簡易に工場汚染菌のタイピングを行う方法として、一定の定着を見ることができている。なお、本法に関してはRAPDという名称ではなく、他の名称で報告している研究論文も多いが、原理は同じと考えてよい。

## 04

### これからの汚染源追跡法 (配列情報比較によるタイピング)

これまでに述べた全ゲノムを対象としたタイピング法は、基本的に染色体DNAを制限酵素などで切断、もしくは、PCRで増幅したDNAのフラグメントを電気泳動により分離することで、可視化したバンドパターンにより判別する方法である。これらの方法の最大の欠点は、バンドパターンとして表れている物の再現性を得るのが難しく、試験研究機関の間における共有、データ化が難しいという点である。つまり、同じ電気泳動のゲル内においては、隣のレーンに泳動したバンドパターンの比較は容易に行えるが、他の研究機関、あるいは過去の解析において示されたバンドパターンとの比較は、別な写真として撮影された写真を並べ比較し

ているため、詳細な比較は困難である。一般的には電気泳動は分子量マーカーを同時に流しているため、大まかにバンドパターン比較することも可能であるし、マーカーとの比較によりある程度の数値化も可能ではある。しかしながら微妙なバンドのずれ、泳動の乱れなどがある場合にはゲル間での比較は困難であることも多い。

これらの方法に変わり、MLVA(Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis)、MLST(Multilocus Sequence Typing)と呼ばれる塩基配列情報に基づくタイピング法が開発され、10年ほど前から菌株識別、タイピングの手法として広く用いられるようになってきた。

MLVA法はゲノム上に複数箇所存在する特定の繰り返し配列のうち、菌株間で繰り返し回数が異なることが分かっている領域の配列を解析することで菌株間の差異を判断するものである。この繰り返し回数は、菌株間でかなり差がある領域も多く、そのため、菌株をPFGEと同様かそれ以上の精度で識別することが可能である。しかしながら、繰り返し配列や採用する領域について複数の論文や方法が発表されており、後述のMLSTほどはデータベースとして拡充されてはならず、特定の菌種、あるいは特定のフィールドにおける解析に利用されている<sup>2-4)</sup>。

MLSTはゲノム上の5~8箇所程度の遺伝子領域(数百bpを数か所)の塩基配列を決定し、その配列情報の差異に基づき菌株を判別する手法である。同一菌種内で、高解像度に菌株を識別できる遺伝子領域が選ばれており、各食中毒菌について、それぞれ方法が提供されている<sup>5)</sup>(図2)。本法では、シークエンサーにて読み取った各遺伝子領域の塩基配列に対し、配列が同じものには同じ番号、違うものには違う番号を振る。この振り付けたアレル番号の組み合わせにより、Sequence Type(ST)が決定する。本手法は、各遺伝子領域の配列さえ取得できれば、STを決定することができるため、ATGCの羅列である塩基配列情報(生データ)をいつまでも保持することなく、菌株の遺伝型を番号で管理できるため、誰にでも取り扱いやすい方法として急速に広まった。

これまでの研究報告では、MLVA法、MLST法に基づくタイピ

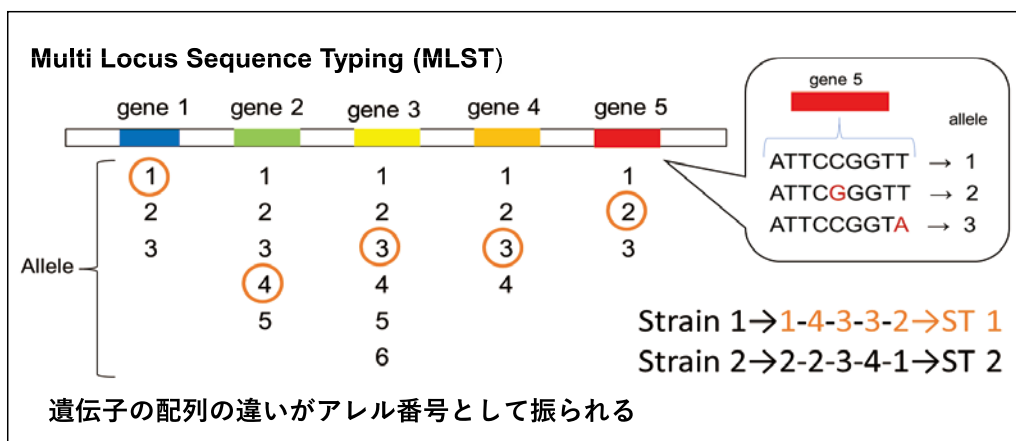


図2 MLST解析の原理



ング法は従来から行われてきたバンドパターンとして解析を行う判別方法と株の識別能力的には大差はなく、これまでのバンドパターンを用いた方法にかわるタイピング法として引き続き使われていくものと考えられる。

## 05 より高い識別能をもつcgMLST法の登場

ここ数年、注目を集めているのがcore genome MLST(cgMLST)法である。従来のMLST法では、株識別に用いる解析対象領域が5~8遺伝子であったのに対し、cgMLST法はその菌種が共通に持つ全ての遺伝子領域、すなわちcore geneを対象としている(図3)。core geneを定義するためには、始めに複数株の全ゲノムデータを取得し、そこから共通に持つ配列部分を抽出する必要がある。ここで、抽出した共通領域は必ずしも遺伝子の一部ではなく、遺伝子以外の配列部分も抽出されるため、厳密にはcore geneの数はloci(遺伝子座)で表記する。例えば*Salmonella*では3,002 loci<sup>6)</sup>、*E. coli*では2,513 loci<sup>7)</sup>がcore geneとして定義されている。疫学的に重要かつ主要な食中毒菌などは、すでに

複数の研究者によりcore geneが定義されており、我々は彼らの開発したschemeに準拠しcgMLST解析を行えばよい。MLST解析のような配列の差異に基づく株識別法は、他の研究者が決定したSequence Type(ST)と比較することが容易である。そのため、世界中の研究者が自らの分離株のSTを、分離源(国、臨床株、食品由来株など)、分離年、病原性の有無、血清型などの情報とともに、データベースに登録している(図4)。例えば、サルモネラのデータベースには、286,159株もの分離株データが登録されている(2021年2月4日現在)。現在、MLST解析のためのデータベースは大きく3つあり(図5)、Enterobase(Organized by Warwick University, UK)、PubMLST(Organized by University of Oxford, UK)、Pasteur MLST(Organized by Institut Pasteur, FR)である。Enterobaseは、腸内細菌科菌群に属する菌種の情報が豊富であり、*E. coli* や*Salmonella*等を分析したい場合に最適である。PubMLSTは*Campylobacter*や*S. aureus*など、Pasteur MLSTは*L. monocytogenes*等を分析したい場合に用いると良い。このように、これらのデータベースでは、core geneの定義及びschemeが異なっているため、自身の分離株を解析する上で最も都合の良いデータベースを選択するのが望ましい。

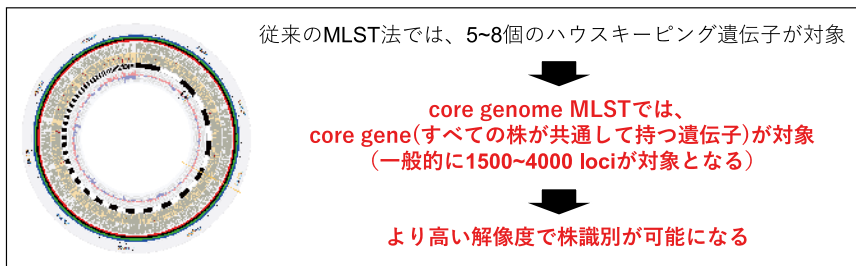


図3 cgMLST解析の特徴

Species Home	Data	View	Workspace	Experiment	Space:None	Rows: 82585	Filtered: 82585	Experimental Data	LogML	Alert: C.V.1	Fit Mode: □
Uberstrain	Name	Data Source	Source	Collection	Location	Lab Contact	Species	Serologi	ST	HCO (Indi)	
■ESC_AA...	AZ-TG71511	SRR213339	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17560	17560	
■ESC_AA...	AZ-TG71511	SRR213339	Poultry	11/2014	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17559	17559	
■ESC_AA...	AZ-TG71555	SRR213334	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17558	17558	
■ESC_AA...	AZ-TG71519	SRR213332	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17557	17557	
■ESC_AA...	AZ-TG71539	SRR213321	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		16681	16681	
■ESC_AA...	AZ-TG71515	SRR213321	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17556	17556	
■ESC_AA...	AZ-TG71543	SRR213320	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17555	17555	
■ESC_AA...	AZ-TG71535	SRR213318	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17554	17554	
■ESC_AA...	AZ-TG71531	SRR213318	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17553	17553	
■ESC_AA...	AZ-TG71507	SRR213318	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		1	1	
■ESC_AA...	AZ-TG71551	SRR213316	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		16221	16221	
■ESC_AA...	AZ-TG71547	SRR213316	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17552	17552	
■ESC_AA...	AZ-TG71527	SRR213316	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17551	17551	
■ESC_AA...	AZ-TG71523	SRR213316	Poultry	10/2009	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17550	17550	
■ESC_AA...	AZ-TG73335	SRR213315	Poultry	7/2013	United States	FOOD AND DRUG AD...	Escherichia coli		17549	17549	
■ESC_AA...	FSIS1503189	SRR213220	Livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli		17546	17546	
■ESC_AA...	FSIS1503190	SRR213220	Livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli		17546	17546	
■ESC_AA...	FSIS1503260	SRR213207	Livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli		17543	17543	
■ESC_AA...	FSIS1503255	SRR213207	Livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli		17538	17538	
■ESC_AA...	FSIS1503266	SRR213206	Livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli		601	601	
■ESC_AA...	FSIS1503263	SRR213206	Livestock	2014	United States	USDA-FSIS	Escherichia coli		17536	17536	

図4 Enterobase内の*E. coli*のデータベース  
出典:Enterobase, <https://enterobase.warwick.ac.uk/> (参照2021-02-05)



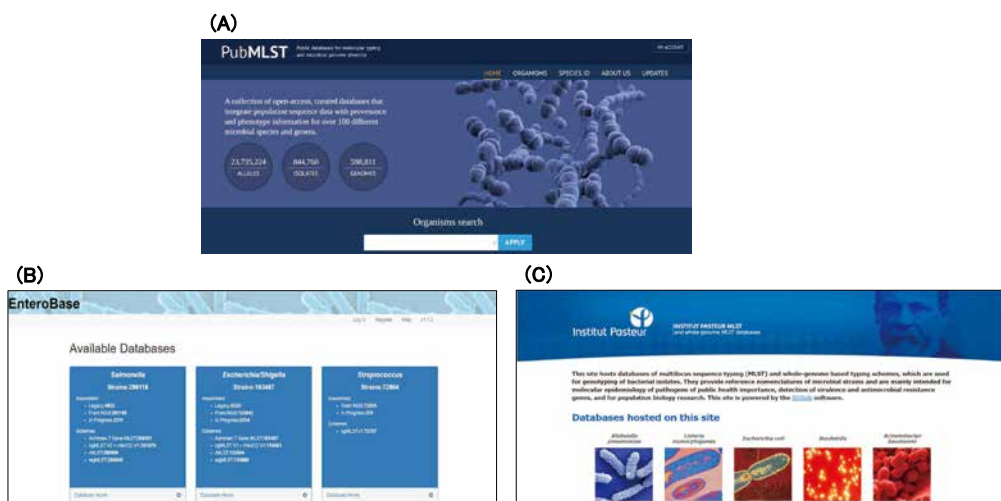


図5 MLST解析のための代表的なデータベース  
 (A)PubMLST, <https://pubmlst.org/>(参照2021-02-05)  
 (B)Enterobase, <https://enterobase.warwick.ac.uk/>(参照2021-02-05)  
 (C)PasteurMLST, <https://bigsd.b.pasteur.fr/>(参照2021-02-05)

## 06 cgMLST解析の方法

実際にどのような手順で自身の分離株をcgMLST解析するのか解説する。まず始めに、分離した株よりDNAを抽出し、次世代シーケンサー(NGS)を用いてドラフトゲノムデータを取得する。用いるNGSのプラットフォームとしては、IlluminaやIon Torrentなどが挙げられる。しかし、NGSは依然として高価な機器であり、加えて試薬の手配や実験操作など、導入には障壁も大きい。近年では、NGSの受託サービスを行う会社も増えてきており、機器を持っていなくても簡単にドラフトゲノムデータを取得できるようになった。得られたドラフトゲノムデータについて、クオリティコントロール及びアセンブルなどのデータ処理を行い、その後は各菌の定義されたschemeに準拠しcore gene

にアレル番号を振っていく(図6)。この際、アレル番号を振るのに、MentaLiSTなどのLinuxベースのソフトウェア、あるいはBioNumericsやRidom SeqSphereなどのソフトウェアを用いると良い。各lociのアレル番号の差異を基に、樹形図を作成すると、遺伝的に近い株(全lociのうち、同じ塩基配列のlociが多いと遺伝的に近いと言える)が明らかとなる。

## 07 cgMLST解析の食品工場における応用例

食品製造現場では製品が規格に適合しているか調べるため、出荷前に抜き取り検査を行っている。その検査において危害菌が検出された場合は、再度同じ汚染が起らないよう、汚染源を



図6 Enterobaseを用いたアレル番号の振り方  
 出典:Enterobase, <https://enterobase.warwick.ac.uk/>(参照2021-02-05)

特定し、衛生管理手法を見直すことが重要である。先日、我々は食品会社との共同研究の中で、最終製品の抜き取り検査において検出された危害菌(製品分離株)について、その汚染源を探るべくcgMLST解析を応用した。本解析では、工場内の製造ラインを中心とした複数箇所より製品へと混入した危害菌と同じ菌種を数百株分離し、その中からある程度絞り込んだ菌株について、全ゲノムの配列情報を取得、上述の方法に従って、これら菌株と製品分離株のcore geneのアレルパターンを比較した(図7)。この解析によって、製品分離株は工場の特定の箇所より分離された株と全く同じアレルパターンを有する。すなわち、クローンである可能性が高いことが明らかとなり、製品が汚染されたと考えられる場所の特定につながる有力な情報を得ることができた。このように、工場の各所より分離された菌株と製品分離株をクローンレベルで解析することで、どこでどのように汚染が起きたのか、その汚染実態を把握することができる。

cgMLST解析を行う際に得られたドラフトゲノムデータは、汚染源の特定だけでなく、その後の衛生管理手法の確立にも大いに貢献できることについても言及したい。食品製造現場において、製品への汚染を繰り返すような危害菌は、一般的に他の菌株よりも環境ストレスに対して強いという傾向を有していることも多い。このような個々の菌株の性状はドラフトゲノムデータを取得し、菌株間で比較することで、その性状を持つ理由をゲノム情報の中に見出すことができる。また、特有の耐性遺伝子や遺伝子変異など極めて重要な因子を特定できる可能性もある。さらに、先に述べた通り、食中毒菌のように病原因子など特異的な分子マーカーを持たないものの、製品への腐敗を引き起こすような食品産業においては重要な菌群についても、ドラフトゲノムデータと近縁種のゲノムデータ比較により、その菌をモニタリングするための分子マーカーを開発することも可能である。このように、NGSを食品製造現場の衛生管理に導入することで、①cgMLST解析を用いた汚染源追跡、及び、②その後の衛生管理手法の確立といった今までの技術では難しかったようなことまでごく短時間に実施、解決が可能になると考えられる。

08 おわりに

本稿では、遺伝子解析手法を用いた細菌のモニタリング法、また、DNA タイピングによる汚染源追跡法の変遷と最新の解析法cgMLST法を紹介した。DNAタイピング法はここ10年ほどの間に劇的に進化し、従来の電気泳動により可視化したフラグメント解析から次世代シーケンサーにより取得した全ゲノムの配列を利用した高い識別能をもつ解析へと大きく変わった。次世代シーケンサーから出力される膨大なデータは、バイオインフォマティクスなどを専門としている研究者でないと取り扱いが難しかったが、それもタイピング程度であれば、深い知識を有していなくても特段支障なく行えるようになってきている。今後の技術の進歩により、また新たな解析法、アプローチが生まれてくるのが大変楽しみであるが、食品製造の現場では、問題を引き起こす菌種も多様であり、解決したい問題も違ってくるため、それぞれの現場に最も適した解析手法を選択、実施していく必要があるだろう。

製品が消費者の手に渡る前に微生物による危害を察知できれば、食中毒を引き起こすことにもなりかねない。製品の微生物的危害を防止するためには、高感度で迅速な検査法を整備し、危害菌の動態を把握し、万一危害菌が混入した際には迅速に原因究明できるツールを用意しておくことが望まれる。

参考文献

- 1) PulseNet International, <https://pulsenetinternational.org/protocols/pfge/> (参照 2021-02-05)
- 2) Techaruvichit P, Takahashi H, Vesaratchavest M, Keeratipibul S, Kuda T, Kimura B. *Applied and Environmental Microbiology* 81:5318-5325(2015)
- 3) Takahashi H, Ohshima C, Nakagawa M, Thanatsang K, Phraephaisarn C, Chaturongkasumrit Y, et al. *PLoS ONE* 9(9): e105803. (2014)
- 4) Miya S, Kimura B, Sato M, Takahashi H, Ishikawa T, Suda T, Wiedmann M. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (3), 239-249(2008)
- 5) PubMLST, <https://pubmlst.org/organisms> (参照 2021-02-05)
- 6) Alikhan NF, Zhou Z, Sergeant MJ, Achtman M. *PLoS Genetics* 14(4): e1007261. (2018)
- 7) Zhou Z, Alikhan NF, Mohamed K, Fan Y; Agama Study Group, Achtman M. *Genome Research*. 30(1):138-152. (2020)

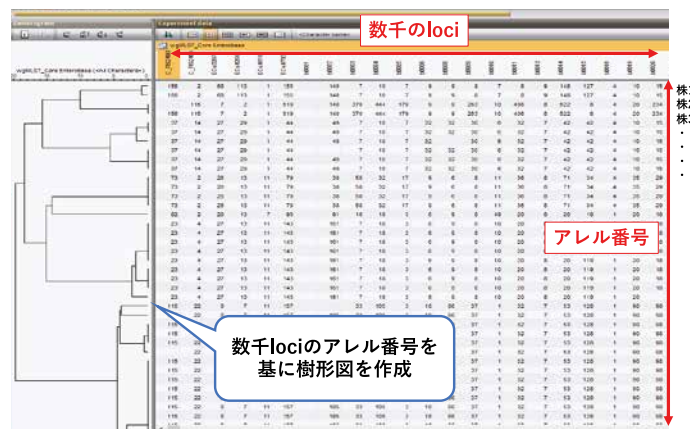


図7 Bionumericsを用いたcgMLSTデータの解析例

# 食肉処理における衛生対策 ～洗浄作業の重要性～

Hygiene measures in slaughter -Importance of cleaning work-

菊池 孝治 Koji Kikuchi

JA全農ミートフーズ株式会社 常務取締役 法務・コンプライアンス本部長  
Managing Director General Manager, Legal Matter & Compliance Division, JA ZEN-NOH MEAT FOODS CO.,LTD

キーワード ● ● ● 食肉処理、衛生対策、洗浄

## 01 はじめに

食肉は、豚や牛の生体をと畜解体し、枝肉、業務用の部分肉、一般消費者向けの包装肉などの形態や、ハムやウインナーなどの食肉製品として流通・消費される。

図1に一般的な牛と豚のと畜・解体工程を示した。

以下に、豚の処理工程について概説する<sup>1)</sup>。

生産者から出荷された豚の生体は、と畜場で生体受付され、農家ごとに係留される(図2)。



図2 搬入された豚生体

この時に、食肉衛生検査所の検査員による、生体検査が行われ、健康な豚のみがと畜処理される。歩行不能や何らかの疾病症状がある場合は、病畜棟で処理される。

生体は、追い込みレーンから搬入され、電気による失神、喉刺しによる放血により、失血死する。この状態を「と体」という。と体は吊り上げられ、と体洗浄機で体表の血液などの汚れを除去する。



図1 と畜・解体工程



足の先は切断され、「豚足」として処理する。

モモ周辺、腹部から胸部の正中線を中心に、外皮をナイフやデハイダーで部分的に剥皮する。

内臓は、消化管系の白物と、心臓やレバー、タンなどの赤物に分けて摘出し、内臓処理室に搬送される。

頭部は切断されカシラ処理室に搬送される。内臓や頭部についても検査が行われる。この時点で疾病が確認された場合、内臓の廃棄等の指示が行われる。

横型スキナーや縦型スキナーという剥皮装置で外皮を剥ぎ取り、枝肉となって清浄区へ搬送される。

枝肉は自動背割り装置で背骨の中心を切断し、半丸の枝肉となる。

枝肉は、枝肉洗浄機や作業者による流水で鋸くずや汚れ、血合いなどを除去する。

枝肉冷蔵庫で10℃以下に冷却された枝肉は、食肉加工施設に搬送され、大割、脱骨、整形され、簡易包装または真空包装し、金属探知機を通過後、箱詰めされ、部分肉として冷蔵保管する。

部分肉は、各仕向け先に出荷し、包装肉やハムなどの食肉製品、味付け肉などの加工品に加工され、一般消費者に販売される。

これらの各工程において、とくに微生物の影響による変色や異臭、腐敗などの発生しやすい場所、およびその対策について以下に述べる。

牛部分肉は真空包装されるため、これらの好気性菌を抑制することができるが、ピンホールなどにより、急激な腐敗が発生することがある。

## 2. 乳酸菌

食肉の処理環境に通性嫌気性菌である乳酸菌が残存すると、流通過程で乳酸臭の発生や、真空包装部分肉の膨張が発生する。

## 3. 食中毒菌

現在、食肉は加熱喫食が基本であるため、食中毒菌の残存による食中毒の発生リスクは低い。ただし、調理施設内で調理するサラダなどへの交差汚染によるリスクがある。

また、ユッケなどの生食用食肉は、製造基準法および腸内細菌科菌群陰性の微生物基準を遵守する必要がある。なお、牛レバー刺しの提供は禁止されている。

## 4. クロストリジウム属

とくに和牛などの厚みのある牛において、枝肉の冷却が遅延した場合、腸管内のクロストリジウムがリンパ線に入り、とくにモモの骨の付け根部分で増殖することがある。これをボーンテイントといい、緑変と異臭が発生する(図4)。軽度の場合はムレといわれる<sup>2),3)</sup>。



図4 ボーンテイントによる緑変色

## 02 食肉処理において対策が必要な微生物

### 1. 低温細菌

低温で処理され、低温流通される食肉は、シュードモナスなどの低温細菌の付着が多い場合、流通過程において変色、異臭、腐敗などが発生する(図3)。その結果、賞味期限が短くなり、販売上の不利益やクレームの原因となる。



図3 脂肪部分に発生した青色変色

豚部分肉は薄いビニールシートで包む簡易包装が主流であるため、空気が透過するため低温細菌の影響を受けやすい。

## 03 と体の消毒

豚や牛などの体表には農場由来の微生物(芽胞菌やシュードモナスなど)が数多く付着しており、一般的に $10^5 \sim 10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>程度の菌数が検出される。

この状態でと畜解体室内に搬入されると、解体処理における枝肉表面や、その後の部分肉や包装肉まで影響を与える。そのため、効果的なと畜表面の消毒が望まれる。

現在、使用可能で効果的な対策は、有機物の存在下でも殺菌効果を維持できる過酢酸製剤である。と畜洗浄機を通過したと畜表面に対し、300ppm~500ppmで強めのシャワーリングを行うこ



とにより、3D～5D程度の殺菌効果を得ることができる(図5)。国内では、秋田県鹿角市にある株式会社ミートランドが運用している。



図5 過酢酸製剤による体表面殺菌

## 04 内臓摘出

牛は反芻動物であるため胃袋の中には、多くの微生物が生息しているルーメンが詰まっている。そのため、食道及び肛門を結紮し、消化管内容物が漏れないようにしてから内臓を摘出する。しかし、摘出時に内臓を破損する場合がある。その時は汚染部分をトリミングするが、確実に除去することは難しい。このような場合は、1,000ppmの過酢酸製剤スプレーを常備し、汚染箇所を噴霧し殺菌することが効果的である。

## 05 剥皮

と体の外皮を剥いだ箇所は基本的に微生物等による汚染は無い。ただし、外皮を触れた作業者の手が剥皮部分に触れることで、汚染を受ける。また、ナイフによる切皮を行う際、外皮側から一気に切ると、獣毛とともに外皮の汚れを切開部分に押し込んでしまう。そのため、最初の切皮は小さく、切り裂くときはナイフの刃を外側に向けて行う。また、外皮を切ったナイフは都度83℃以上の熱水で消毒する。

## 06 背割り

牛の背割りは、背挽きノコを使い熟練した作業者が背骨の中心をきれいに切断する。背挽きノコは、一頭処理ごとに専用の熱水槽で洗浄消毒を行う。

豚は、自動背割り装置で切断する。切断時に回転刃に温水を掛

けるが、これが周囲や上部の搬送レールに飛び散るため、汚れが残しやすい。

自動背割り装置の洗浄が不十分な場合、微生物汚染のリスクが非常に高くなる。

作業終了後には、本体内部だけでなく、レールや本体カバーなどを丁寧に洗浄することが大切である。

## 07 枝肉洗浄

枝肉をきれいにするために行われる工程であるが、水を使用するため、枝肉洗浄装置内や上部のレールに食肉のカスなどが飛びちる。これを放置すると致命的な汚染源になる。そのため、と畜で使用する機器類の中では特に効果的な洗浄を行う必要がある。ただし、装置自体に高さがあるため、日々の洗浄作業では発泡洗浄機による泡洗浄を行い、定期的に足場を組み、上部のレール部分などを丁寧に洗浄することが大切である。

また、作業者が高圧洗浄機を使用して枝肉洗浄を行う事例があり、床面からの跳ね返りによる枝肉、とくにネック部分の汚染が発生する。この場合は、跳ね返り防止用の樋などを設置するなどの対策を行う。

## 08 冷蔵保管

と畜解体直後の枝肉は「ヌク」と呼ばれ、37℃前後の温度がある。これを、枝肉冷蔵庫で冷却する(図6)。冷却効率が悪いと、ムシやボーンテントが発生する。これを防止するためには、枝肉の間隔を開け、効果的に風(4m/sec)を当て、20時間以内にモモの中心温度を15℃以下にする必要がある。その後、2℃前後の枝肉冷蔵庫で、豚は24時間、牛は48時間、冷却される。



図6 枝肉冷蔵庫内の豚枝肉

## 09 食肉加工

冷却された枝肉は、食肉加工施設で、大分割、脱骨、整形され、包装されて部分肉となる(図7)。



図7 冷蔵保管中の部分肉

加工施設内は8~14℃に冷却されているため、食肉の温度が加工中に上昇することはない。ただし、人の手に付いた肉汁は、体温により温められ、付着している微生物が増殖する。

この増殖を制御するため、30分に一回、ゴム手袋、前掛けなどの表面を消毒用アルコールや過酢酸製剤(200ppm)で消毒する。

加工施設、とくにコンベアとまな板は使用後の洗浄が重要である。低温下で使われるため、低温細菌が主体となり、洗浄不要があると、保存期限の短縮や変色の原因となる。

まな板は、ナイフによる傷が入りやすいため、カバー付きの高圧洗浄機や、アルカリ洗剤への漬け込み洗浄を行うことが効果的である。

コンベア類は、分解洗浄を行う。ただし、古いスチールコンベアなどはベルトを支持しているローラーやガイド類が外れにくいものがあり、容易に外せるように改造が必要がある。最近のコンベアは、工具を使わずにガイドや支持ローラーが簡単に外すことができるものが増えた(図8)。



図8 分解性の良いコンベア

包装肉を加工する場合に使用するスライサーやミンチ機も、分解洗浄を確実にを行う必要がある。

## 10 洗浄作業の基本

加熱工程の無い食肉の処理において、加工施設や装置などを効果的に洗浄することが微生物汚染の低減、変色や異臭発生の防止のために重要である。基本的な洗浄工程は以下の通りである。

### 1. 付着物の除去

機器類や器具類に付着した肉片などは丁寧に取り除き、廃棄物容器に収納する。

付着したままの洗浄は何度洗っても再汚染の原因となる。

### 2. 機器類の分解

使用する機器類をどのように分解できるのか、理解する必要がある。基本は、部品単体まで分解することである。導入する機器類は、いかに分解が容易であるかも重要な選定条件である(図9)。

スライサーやミンチ機、ポンプなどの回転軸のあるものは、軸と軸受けの隙間に汚れが入り、微生物が増殖するため、分解洗浄の重要なポイントである。



図9 機器類は徹底して分解

### 3. 予備洗浄

温水を掛け、表面の汚れを浮かせ洗浄しやすくする。この時にホースの流水を使用すると、周辺に汚れを拡散するだけでなく、水の使用量が増大する。移動式のコンテナ(図10)に温水を貯めて使用すると、これらのリスクは低くなる。

### 4. 洗剤による洗浄

洗剤は対象物に適合したものを選択する。アルカリ洗剤は洗浄効果が高いが、アルミや真鍮などを腐食することがある。

洗剤を掛けた後はブラッシングなどの物理的な力を加える。

高圧洗浄機を使用する場合は、飛散防止対策を確実にを行う。



図10 移動式コンテナの利用

ナイフ傷のあるまな板は、アルカリ洗浄剤に一晚漬けこみ洗浄を行う。

### 5. すすぎ

洗剤成分を洗い流す。

汚れがひどい場合は、再度洗剤による洗浄を行うと効果的である。

### 6. 水切り・乾燥

水切りや不織布によるふき取りを行い、極力早く乾燥させる。濡れたままの放置は、運動性のある微生物を拡散させる危険性がある。

## 11 食肉表面の微生物検査方法(参考)

参考として、食肉の表面を微生物検査するためのふき取り方法を紹介する。この方法は、枝肉やと体など表面を切り取って採材できない場合に、弊社で採用している方法である。

### 1. 3回ふき取り法<sup>4)</sup>

- ①ふき取り綿棒(生理食塩水9ml入り)で、10cm四方を丁寧にふき取る。
  - ②綿棒を容器に戻し、洗い出す。
  - ①②を合計3回繰り返し、試料原液とする。
- ※3回を超えると綿棒が破損する。

### 2. カウンタークロス法

- ①手ぬぐいサイズのカウンタークロスを8等分する。  
(※Swabbing Sheet(関東化学)も使用可能)
- ②アルミ箔で包み、オートクレーブ殺菌する。
- ③アルミ箔を開き、生理食塩水を数ミリたらし、ゴム手袋を着用した手で持ち、と体表面30cm四方を強くふき取る。
- ④ストマッカー袋にふき取ったカウンタークロスと生理食塩水を一定量となるように添加し、ストマッカーに掛ける。
- ⑤ストマッカーをしたものを試料原液とする。

## 12 おわりに

食肉は、生産者が丹精込めて育てた牛や豚をと畜・解体という工程を経ることで供給される。まさに、貴重な命をいただく食べ物である。

そして、安全で高品質な食肉を消費者に届ける責務として、食肉処理場や食肉加工施設は、品質管理や食品安全に関する取り組み、HACCPの制度化に対する対応、さらには第三者認証への取り組みなどを進めている。

弊社も、その一端を担う企業として、今後も安全でおいしい国産食肉の供給に努めていきたい。

### 参考文献

- 1) と畜場法施行規則
- 2) Meat Safety Quality and Veterinary Public Health in Australia(1998)
- 3) 畜産試験場研究報告 第47号(1988) P67-71 小沢、小石川、千国、吉武
- 4) 豚と畜処理方法が豚内蔵の品質へ与える影響の調査(2000肉処理衛生管理工場推進事業)全国農業協同組合連合会 佐藤、成田、出雲、赤崎、平井、新沼、小野、菊池



# キーワード解説

## 細菌性食中毒

食中毒とは、食品(飲食)に起因する下痢・腹痛・発熱・嘔吐などの症状の総称である。食中毒には、細菌性食中毒・ウイルス性食中毒・寄生虫・自然毒・化学物質による食中毒があり、食中毒の原因のうち大多数は、微生物によるものである。細菌性食中毒には、①食品とともに摂食された生菌が腸管内で増殖し、腸管や組織内に侵入あるいは毒素を出すなどにより急性胃腸炎を起こす感染型(例:サルモネラ・カンピロバクター等)、②食品中で菌が増殖し、それに伴って産生された毒素を摂食することにより発症する食品内毒素型(例:黄色ブドウ球菌・セレウス菌(嘔吐型)等)、③食品中で増殖した生菌が食品とともに摂食されて腸管内でタンパク毒素を産生し、腸管内で働き急性胃腸炎を起こす生体内毒素型(例:ウェルシュ菌・腸管出血性大腸菌等)がある。

## 芽胞形成菌

芽胞は限られた種類の細菌にみられ、食品衛生管理において重要な細菌である。芽胞形成菌としては、好気性菌の*Bacillus*属・嫌気性菌の*Clostridium*属がある。芽胞は、高温・乾燥・凍結・殺菌剤等に対して強い抵抗性を示し、環境中で長期間にわたり生き延びることができ、適当な環境条件になると発芽して再び増殖を開始する。特に加熱に対して強い抵抗性を持ち、食品衛生管理上において、加熱調理後は短時間で低温管理することが重要である。

## シークエンシング

DNAの塩基配列を決定することである。DNAシークエンシングは遺伝情報を解析するための基本手段であり、自動解析機(DNAシークエンサー)で行われ、サンガー法を基礎とした手法が広く用いられている。現在では、高速かつ高度な処理を可能とした新しい原理に基づく高性能のシークエンサー(次世代シークエンサー)があり、生物学のみならず、医学分野における感染症や遺伝疾患など臨床診断にも応用されている。

# シカジーニアス® 核酸精製キットシリーズ

## サンプルに応じたカラムで効率的に精製



- 簡単操作で迅速に高純度な核酸を精製
- 酵素反応、シークエンシング、形質転換など、様々なアプリケーションのサンプル調製に

当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

関東化学株式会社ホームページ THE CHEMICAL TIMES  
<https://www.kanto.co.jp/times.html>

QRコードはこちらです▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。

 関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号  
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

HP <http://www.kanto.co.jp/times/>

E-mail : [chemiti-info@gms.kanto.co.jp](mailto:chemiti-info@gms.kanto.co.jp) 編集責任者：木原 温子

2021年4月発行