

分 担 研 究 報 告 書

食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法

大西 貴弘

令和5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)

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法
研究分担者 大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

astA 保有大腸菌を中心とした病原大腸菌の食品への汚染状況および汚染経路等には不明な点が多く残されている。これらを明らかにするために食品における病原大腸菌の汚染実態調査を行ってきた。今年度は、昨年度の調査で特徴的な汚染が認められた鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンにおける汚染菌量を最確数法で推計するとともに、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖挙動について検討した。その結果、食品の種類によって汚染率は様々であったが、汚染菌量は食品の種類に関わらず、概ね約 10^5 MPN/100g 以下であった。オクラに *astA* 保有大腸菌を接種したところ、25℃培養では菌数の一時的な増加が見られた。10℃培養ではオクラ上の菌数の増加は認められなかったが、培養開始時の菌数を長期間維持した。4℃培養では培養3日後には菌は検出されなくなった。以上の結果から、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖を抑制するためには10℃以下の環境に保管する必要があることが明らかになった。

A. 研究目的

下痢原性大腸菌はその発症メカニズムや保有する病原因子によって、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管毒素原生大

腸菌 (ETEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) などに大きく分けられる。しかし、これらの分類に属さない下痢原性大腸菌による食中毒事例が多発している。特に *astA* (EAST1: 腸管凝集付着性大腸菌耐

熱性エンテロトキシン 1) 大腸菌による事例の増加が著しく、対策が求められている。しかしながら、*astA* 保有大腸菌をはじめ多くの下痢原性大腸菌の汚染食品が明らかになっていない。このため、効果的な食中毒予防対策の確立が困難になっている。効果的な予防法を確立するためには、汚染食品、汚染経路を明らかにする必要がある。昨年度までの研究で、鶏肉、豚内蔵肉、外国産オクラ、ベビーコーンで *astA* 保有大腸菌が高率に検出されることを明らかにした。今年度は、これらの食品における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の測定を行った。また、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖挙動を解析し、*astA* 保有大腸菌の増殖を阻害できるオクラの保管温度について考察した。

B. 研究方法

[1] 検体

調査に使用した検体は、神奈川県内のスーパーマーケットおよび小売店で購入した。検体は購入後、4℃で保管し、24時間以内に試験に供した(表1~5)。

[2] 最確数法による汚染菌量の推定

最確数法による *astA* 保有大腸菌の計数を以下の手順で行った(図

1)。検体 25 g を無菌的にストマッカー袋に採取した。これに mEC 培地(栄研化学)を 225 mL 加え、1分間、ストマッカー処理した。これを 10 倍乳剤とした。10 倍乳剤を増菌培地でさらに希釈し、100 倍乳剤を作製した。最確数法は 5 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 10 mL、100 倍乳剤 1 mL および 0.1 mL に増菌培地を加えて最終 10 mL にした。各濃度につき試験管 5 本ずつ用意した。42℃、24 時間、培養を行ない、培養後、培養液からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートとして、スクリーニング PCR を行い、大腸菌の指標としての *uidA* と *astA* の検出を行った(図 2)。 *uidA* と *astA* の両方が検出された試験管を陽性とし、陽性となった試験管の数から、*astA* 保有大腸菌の汚染菌量を推定した。

[3] オクラにおける増殖挙動の解析

TSB 培地 10 mL に 1 エーゼの菌を接種し、37℃、72 時間培養した。菌液をよく攪拌し、1 mL を PBS 100 mL に加え、よく攪拌した (1×10^7 cfu/mL)。滅菌したトレイにオクラを並べ、オクラ 1 本につき菌液 10 μ L (1×10^5 cfu) を接種

し、乾燥した。オクラをストマッカー袋に入れ、ヒートシールした後、ストマッカー袋を4℃、10℃、25℃に保管した。経時的にストマッカー袋を取り出し、10倍量のmEC培地を加えた。2分間、ストマッカー処理し、乳剤1 mLとPBS 9 mLを混合した。以下、同様に段階希釈を行った。各希釈段階0.1 mLをそれぞれ2枚のクロモアガーECCに接種した。35℃、24時間培養後、コロニーを計数した。

C. 研究結果

[1] 食品中の *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定

今回は鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーン、それぞれ35検体、また、その他野菜19検体を対象に（表1～5）、最確数法を用いて *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定を行った（図3～図5）。

鶏肉は35検体中33検体(94%)が陽性となった(表6)。31検体は20～3,477 MPN/100 gであった。1検体は定量限界値以上(1.6×10^4 MPN/100 g)であった(図3)。陽性検体中、62%の検体の汚染菌量は $10^2 \sim 10^3$ MPN/100 gの範囲に分布していた。全検体で

の汚染菌量の平均は1,313 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は1,407 MPN/100 gであった(表6)。

豚内蔵肉およびひき肉は35検体中17検体(49%)が陽性となった(表6)。汚染菌量は20～5,422 MPN/100 gの範囲であった(図3)。陽性検体中、76%の検体の汚染菌量は 10^2 MPN/100 g以下であった(図3)。全検体での汚染菌量の平均は559 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は724 MPN/100 gであった(表6)。

オクラは35検体中7検体(20%)が陽性となった(表6)。汚染菌量の範囲は20～3,476 MPN/100 gであった(図4)。汚染菌量は均一に分布していた。全検体での汚染菌量の平均は380 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は732 MPN/100 gであった(表6)。

ヤングコーンは35検体中15検体(43%)が陽性となった(表6)。汚染菌量の範囲は20～定量限界値以上であった(図4)。陽性検体の53%は 10^2 MPN/100 g以下の汚染菌量であった。残りの47%の汚染菌量は 10^3 以上であった。全検体での汚染菌量の平均は742 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は3,830 MPN/100 g

であった（表 6）。

鶏肉、豚肉、オクラ、ヤングコーンについては、食品ごとに陽性率に変化が見られたが、汚染菌量は概ね $10^2 \sim 10^4$ MPN/100 g 範囲であった（図 5）。また、冷凍処理の有無と汚染菌量との間に関連性は認められなかった。

オクラ、ヤングコーン以外の野菜として、アスパラガス、アボガド、いんげん、かぼちゃ、ごぼう、スナップエンドウ、トレビス、ニンニクの芽、パプリカ、ホワイトアスパラガス、芽キャベツを計 19 検体調査したが、全検体で定量限界値未満であった。

[2] オクラにおける増殖挙動の解析

オクラにオクラ由来の *astA* 保有大腸菌を接種し、 4°C 、 10°C 、 25°C で培養し、7 日までの菌数を測定した。各温度で 3 回繰り返し実験を行った。オクラ 1 本あたり 10^5 cfu/mL 接種したが、菌液を乾燥させたのち菌数を測定すると約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL に低下した。

25°C で培養した場合、培養 3 日目まで菌は増殖し、約 10^5 cfu/mL に達した。その後、菌数はやや減少したが $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL を培養 7 日目まで維持した（図 6）。

10°C で培養した場合、菌数はほ

とんど変化せず、培養 7 日目でも約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL を維持した（図 7）。

4°C で培養した場合、培養開始直後から菌数が減少し、培養 3 日目には、菌は検出されなくなった（図 8）。

D. 考察

食品における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量を明らかにするために、昨年度の汚染実態調査で汚染率の高かった鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーンを対象に調査を行った。調査食品全体でみると汚染菌量はほとんどの検体で $10^2 \sim 10^4$ MPN/100 g 範囲であった。鶏肉 1 検体とヤングコーン 2 検体だけが定量限界値以上 (1.6×10^4 MPN/100 g) であった。鶏肉は昨年度までの調査結果と同様に汚染率が高く、また今回の調査で汚染菌量も高いことが明らかになった。この結果から、鶏肉は一般的に *astA* 保有大腸菌に汚染されているものと考えられた。*astA* 保有大腸菌対策を考える場合、鶏肉は最も優先して対応しなければならない食品であると考えられた。豚肉も汚染率は高かったが、汚染検体の 76% は 10^2 MPN/100 g 以下であり、鶏肉と比べると汚染菌

量は低かった。しかし、一部の検体では 10^3 MPN/100 g を超えているため、注意が必要である。オクラは検体ごとに汚染菌量が分散しており、汚染菌量に特定の傾向は認められなかった。ヤングコーンは汚染検体の 53% が 10^2 MPN/100 g 以下の汚染菌量であったが、残りの汚染検体は 10^3 MPN/100 g を超えており、2 検体は定量限界値を超えていた。この結果から、ヤングコーンは検体によって汚染菌量が大きく異なることが示唆された。しかし、陽性検体だけの平均汚染菌量をみると、鶏肉と同様、非常に高い結果となった。陽性率は鶏肉と比べると低いですが、検体によって汚染菌量が多い場合があるので、ヤングコーンを調理する場合は、十分に加熱を行う必要があると考えられた。また、ヤングコーンに見られる汚染菌量のばらつきの原因がどのようなものであるか、明らかにすることができれば、ヤングコーンをはじめその他の野菜における下痢原性大腸菌の自然汚染の予防等に有用であると考えられた。

オクラとヤングコーンのうち、オクラは生や浅漬けで喫食するため、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖性について検討を行った。今回の結果から、オクラを 10°C 以

下の環境で保管すれば、*astA* 保有大腸菌の増殖を抑制できることが明らかになった。オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推計結果から、市販されているオクラには最高 3×10^3 MPN/100 g の *astA* 保有大腸菌が汚染していると考えられた。オクラ 1 本に換算すると、約 3×10^2 MPN の汚染があると推計された。一方、増殖挙動の解析から、保管温度が高いと、オクラ 1 本あたり約 10^5 cfu/mL まで増殖できることが示唆された。このことから、市販のオクラも保管温度が高ければ、オクラ表面で菌が増殖する可能性があると考えられた。また、今回の研究では、オクラ 1 本につき 1×10^5 cfu の *astA* 保有大腸菌を接種したが、乾燥後、すぐに菌数を測定した結果、 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL に菌数が低下していた。乾燥に伴い、死滅した可能性が示唆された。

E. 結論

今回の結果から、鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、オクラ、ベビーコーンの汚染菌量が明らかになった。この結果から、これらの食品は *astA* 保有大腸菌の汚染率だけでなく、汚染菌量も高いことが明らかになった。*astA* 保有大腸菌対策を

行う場合には、これらの食品が最重要食品になると考えられた。

オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖挙動の解析から、保管温度が適切でなかった場合、オクラの表面でも十分に増殖、生残できることが明らかになった。オクラは海外から輸入されているものが多く、輸入過程の温度管理が適切でないと、食中毒の原因になる可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会等発表)

Ohnishi, T. and Hara-Kudo, Y.
Contamination of *Arcobacter*
and *Campylobacter* species in
retail foods available in
Japan. 55th UNITED STATES-
JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON
DEVELOPMENT & UTILIZATION OF
NATURAL RESOURCES 令和5年8月
6-11日. カリフォルニア

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 食肉における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大

腸菌の汚染状況. 第44回日本食品微生物学会学術総会. 令和5年9月21-22日. 大阪

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 野菜における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大腸菌の汚染状況. 日本食品衛生学会第119回学術講演会. 令和5年10月12日. 東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

最確数法による *astA* 保有大腸菌数の推定

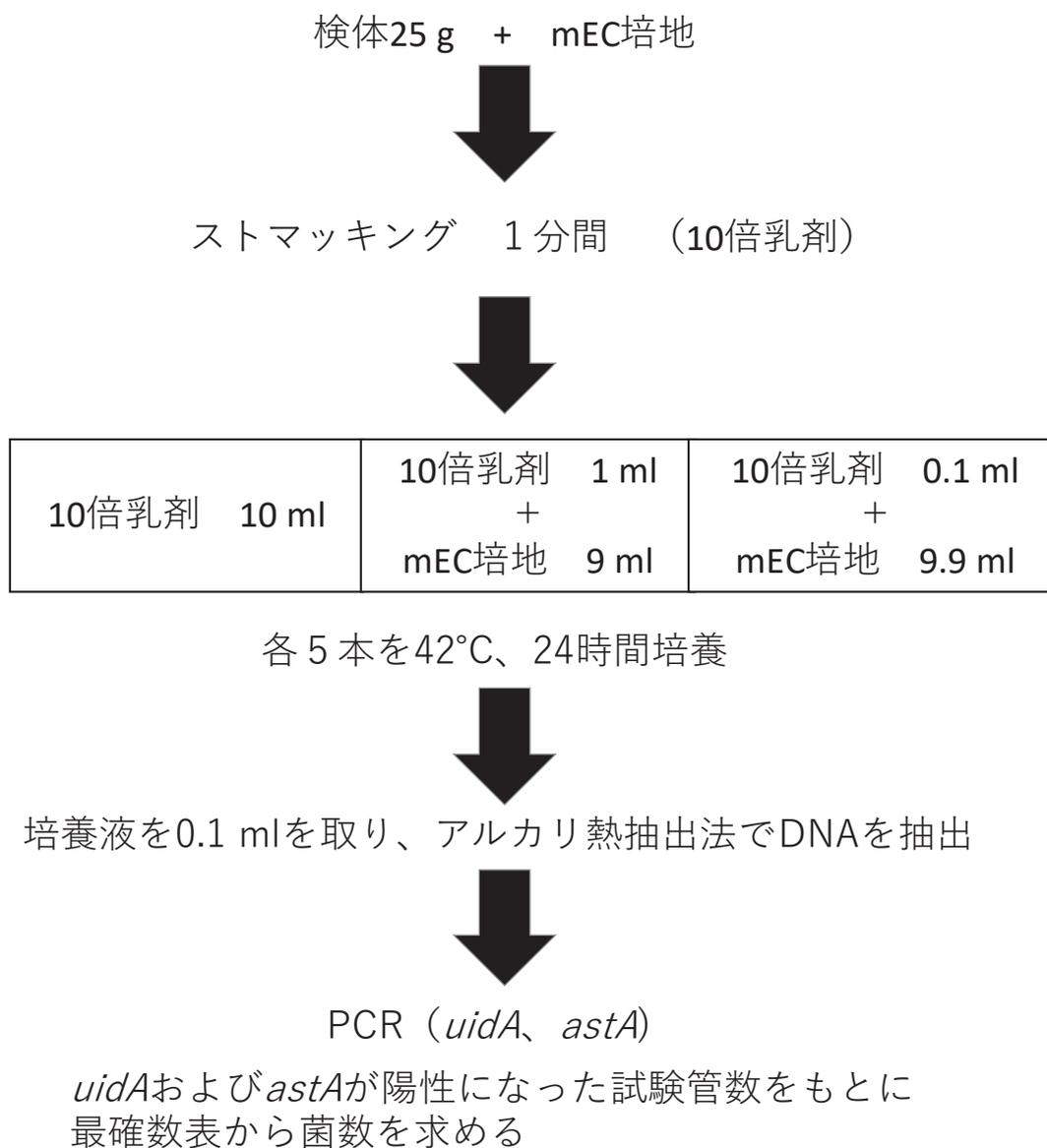


図1 最確数による汚染菌数の推定

プライマー

標的遺伝子	配列 (5'→3')	増幅産物 サイズ (bp)	濃度 (μ M)
astA	TGCCATCAACACAGTATATCCG	102	0.2
	ACGGCTTTGTAGTCCTCCAT		
uidA	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	1487	0.2
	AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG		

PCR反応液組成

Quick Taq	12.5 μ l
astA -F (50 μ M)	0.1 μ l
astA -R (50 μ M)	0.1 μ l
Uid-F (50 μ M)	0.1 μ l
Uid-R (50 μ M)	0.1 μ l
DNA抽出液	1.0 μ l
PCR用水	11.1 μ l
合計	25.0 μ l

PCR反応条件

<u>94°C</u>	<u>2 min</u>
94°C	30 sec
63°C	30 sec
<u>68°C</u>	<u>1.5 m</u> × 35
68°C	5 min

図2 *astA* および *uidA* 検出のための PCR 法

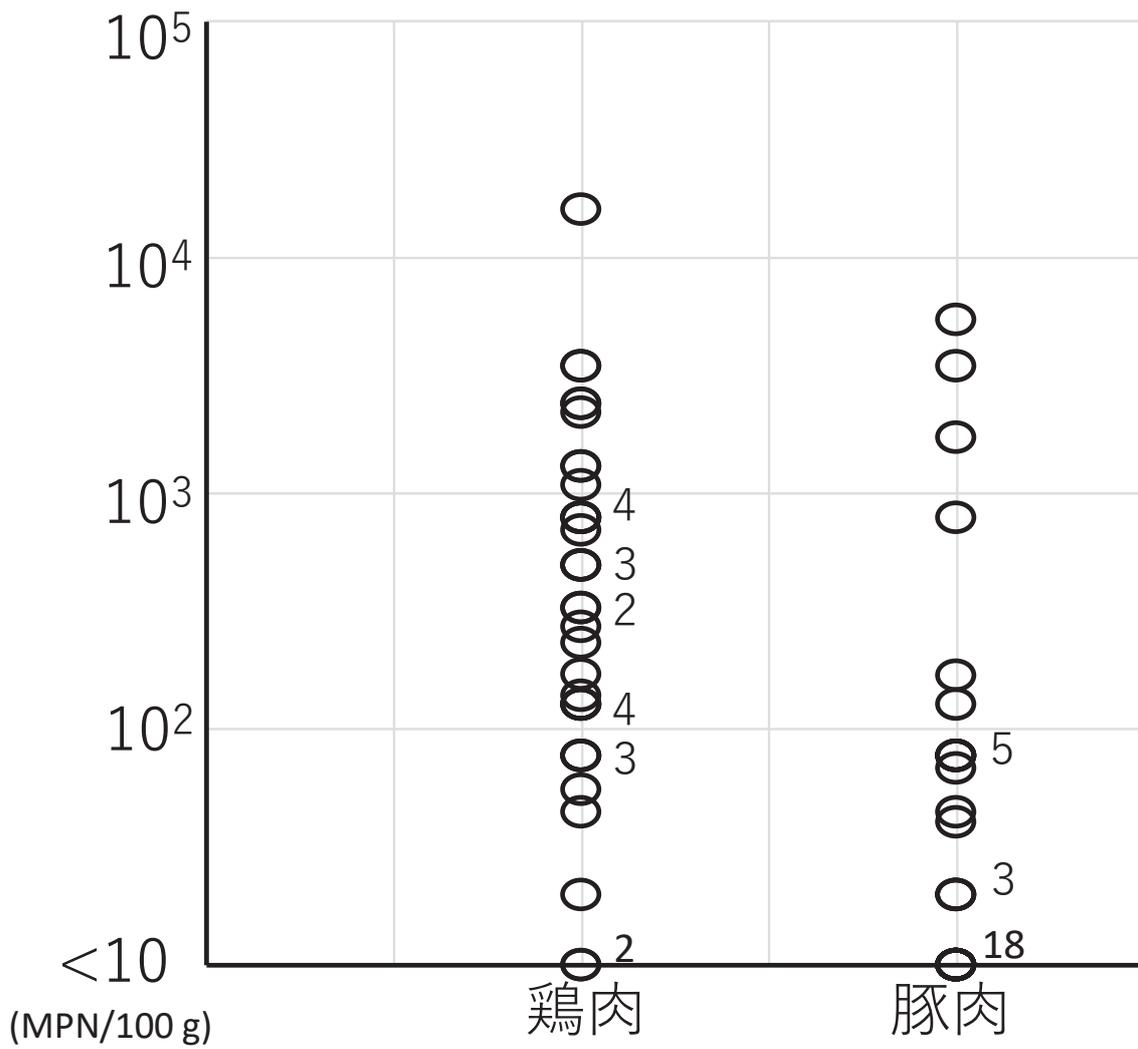


図3 鶏肉および豚肉における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量

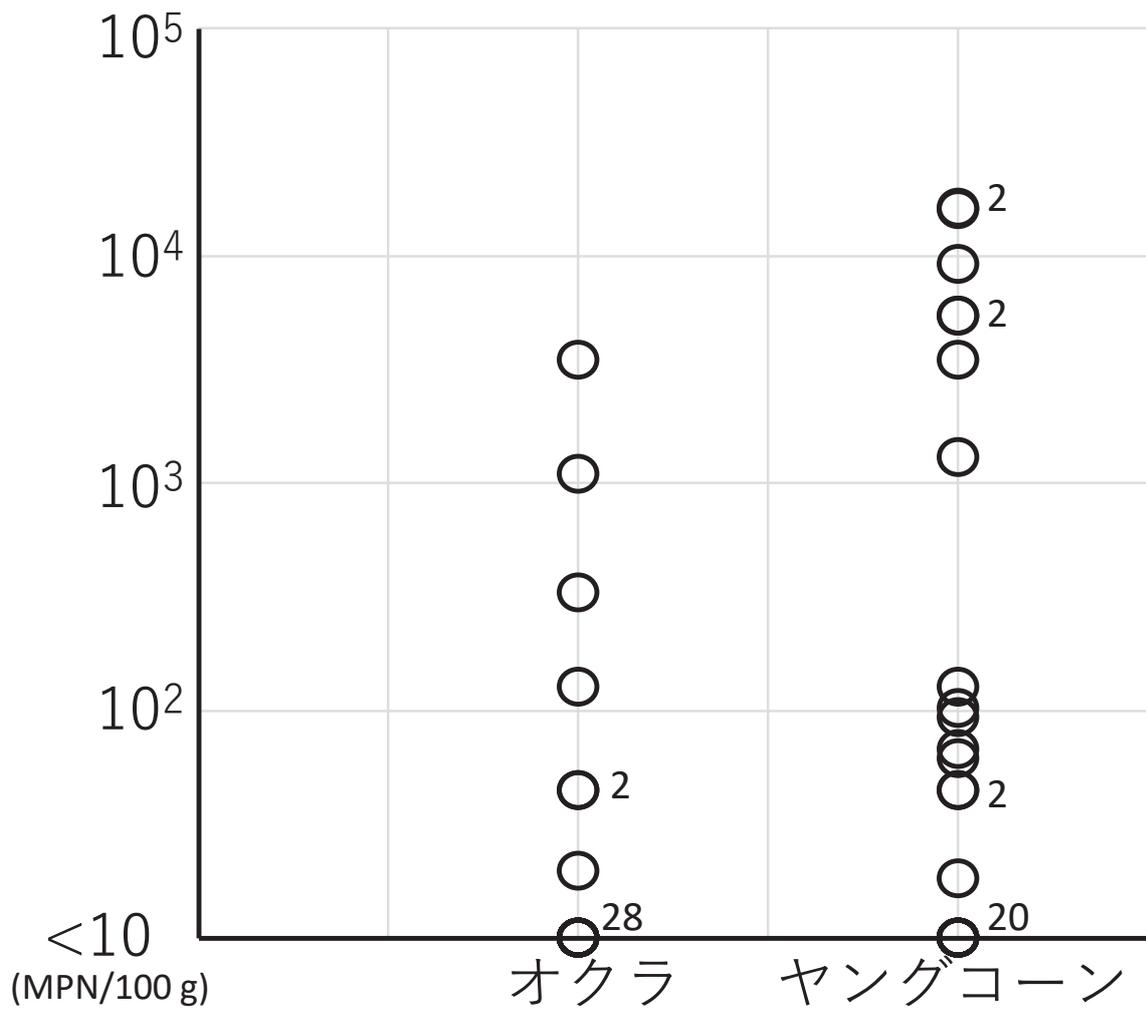


図4 オクラおよびヤングコーンにおける *astA* 保有大腸菌の汚染菌量

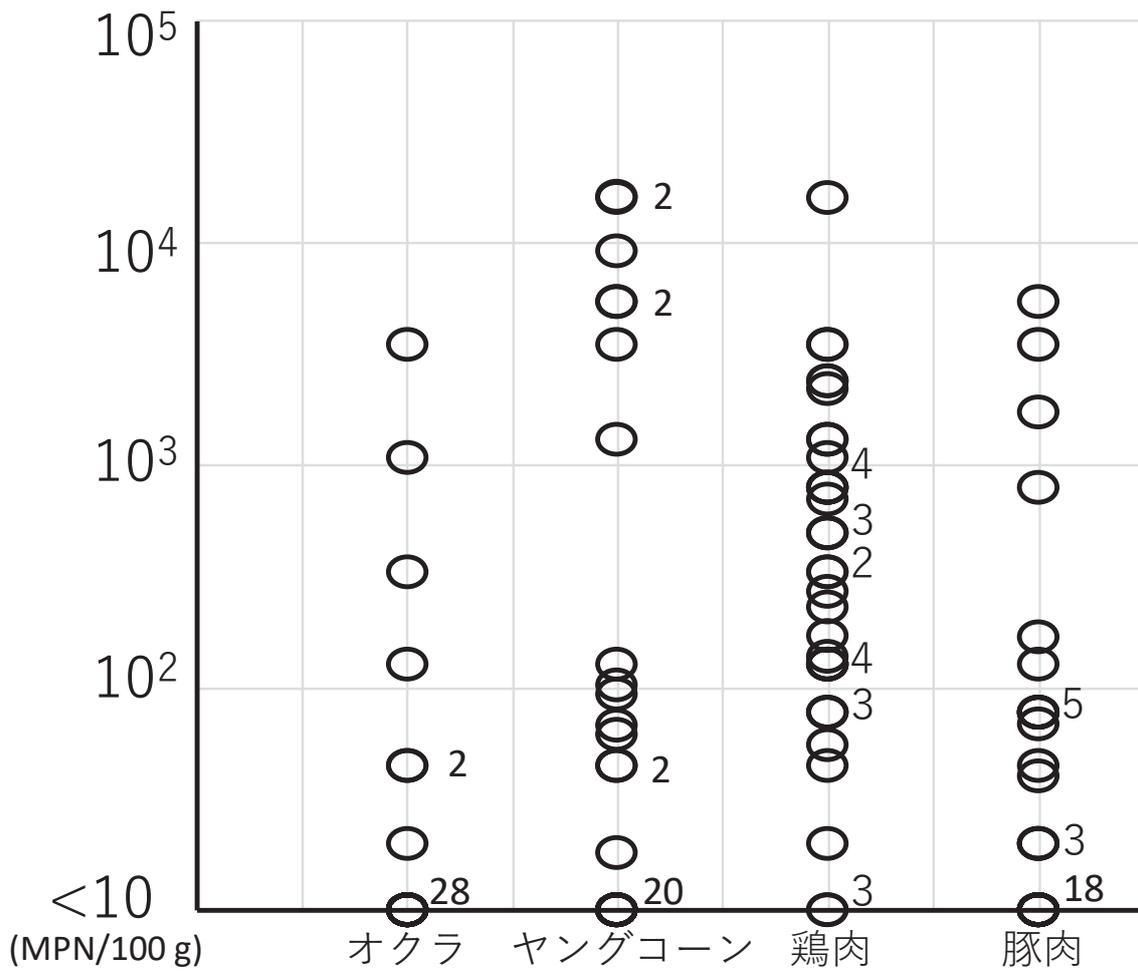


図5 *astA* 保有大腸菌の汚染菌量 (まとめ)

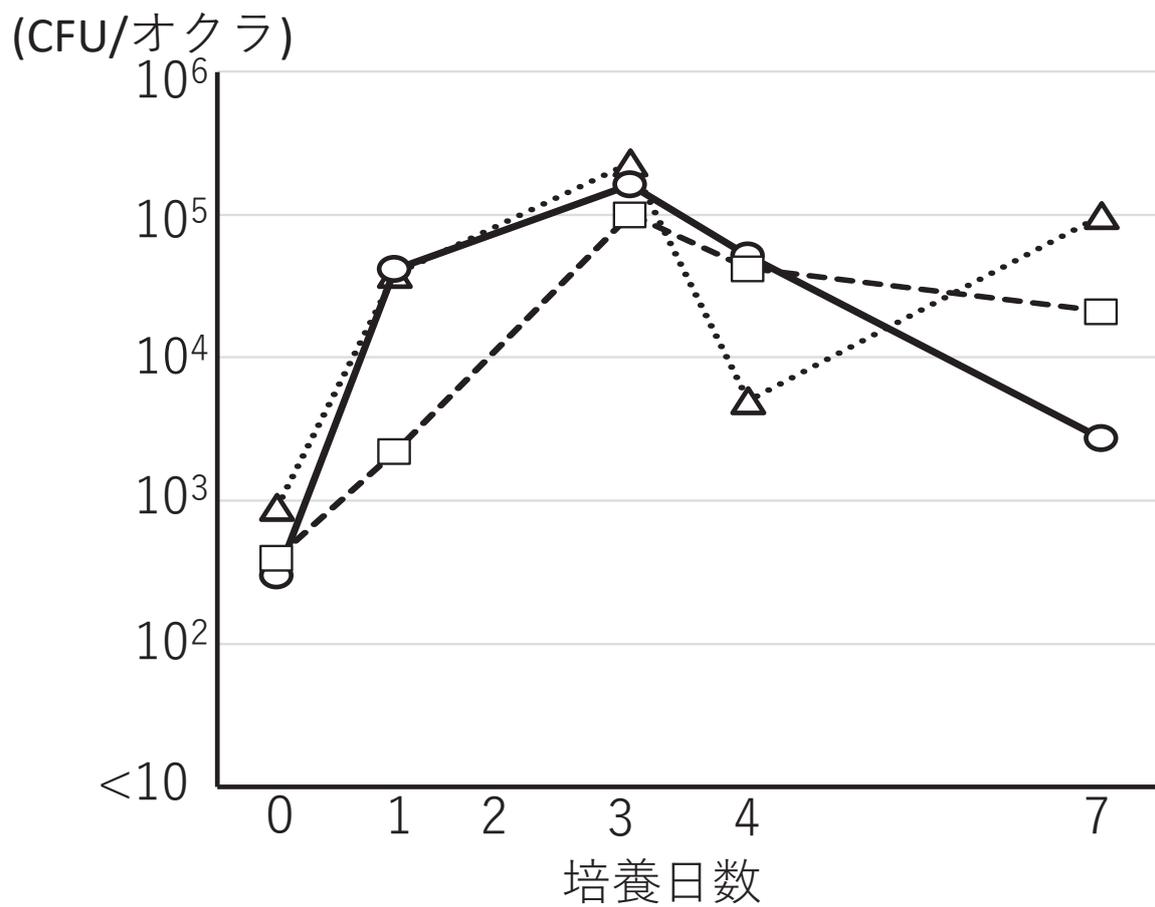


図6 オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖 (25°C)

(○ : 1回目、□ : 2回目、△ : 3回目)

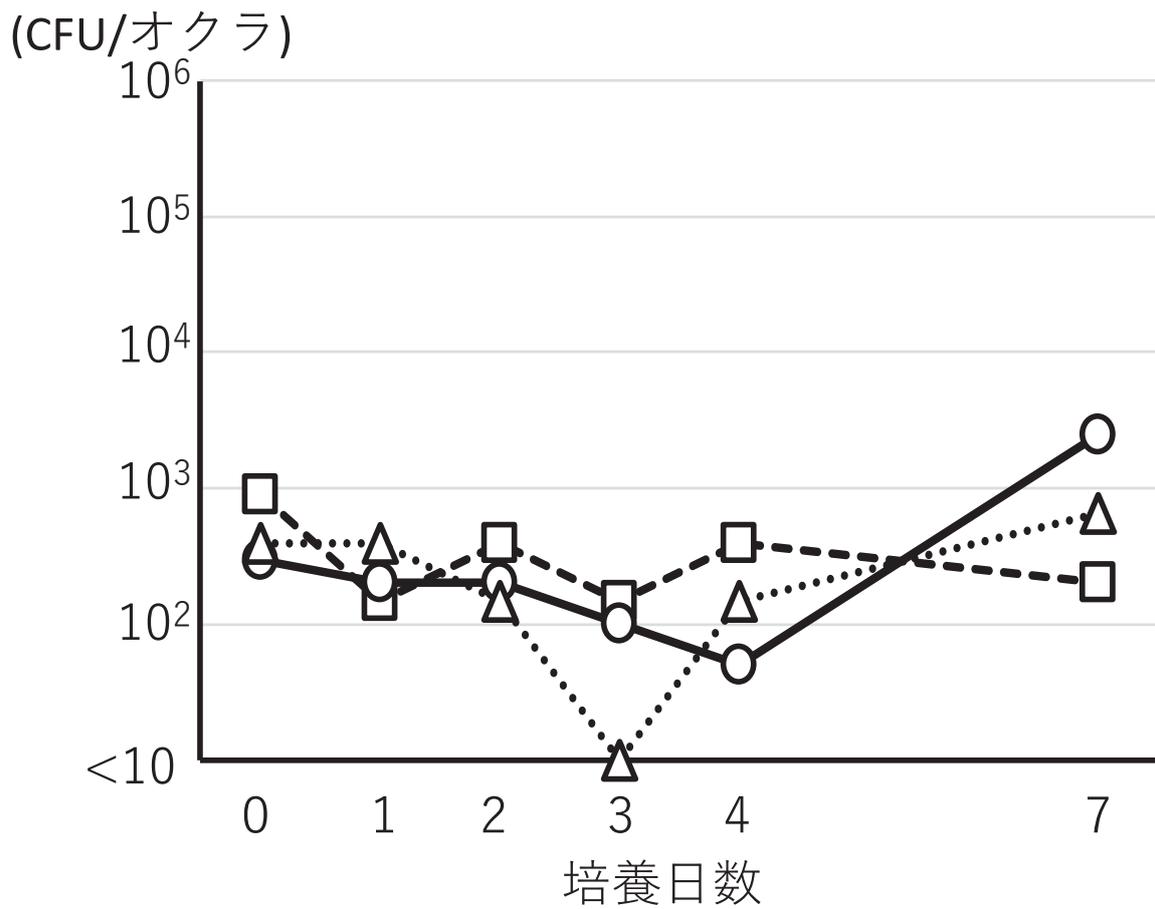


図7 オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖 (10°C)

(○ : 1回目、□ : 2回目、△ : 3回目)

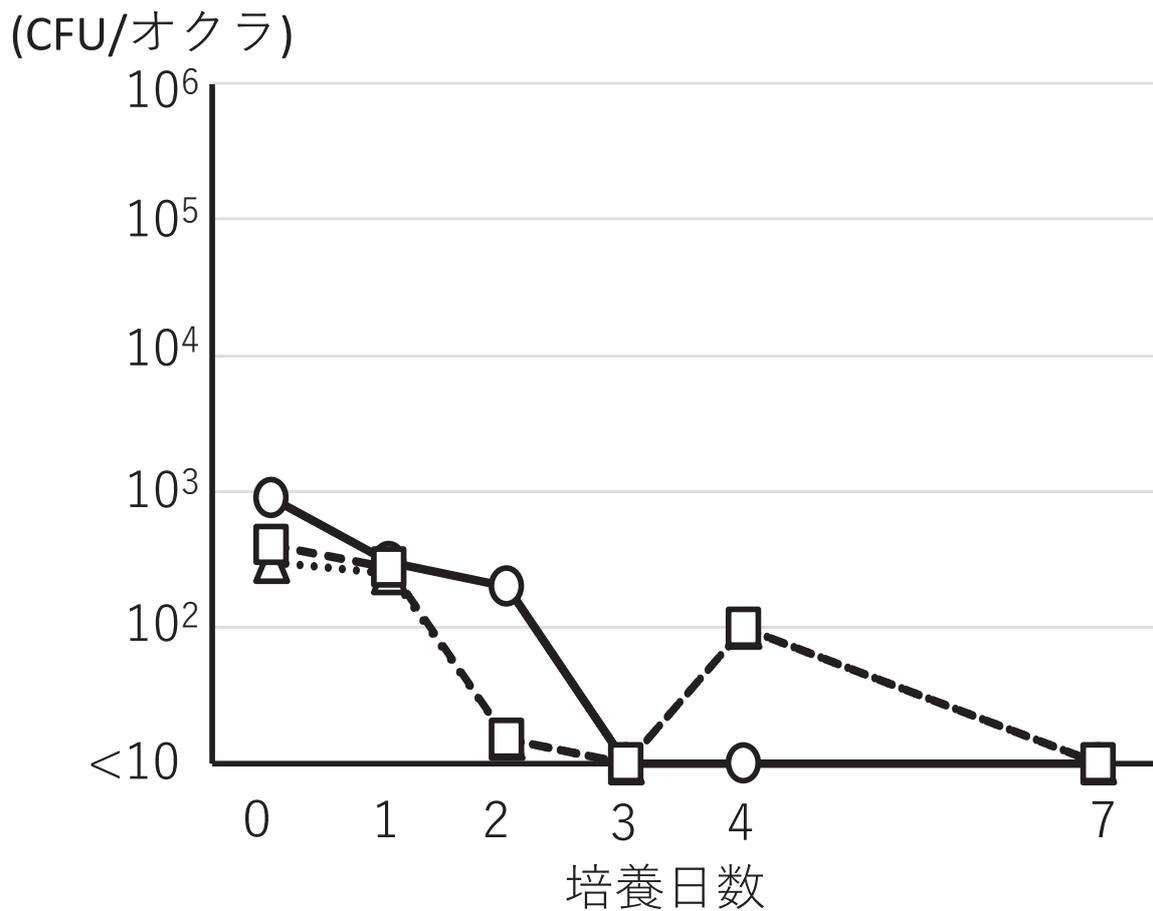


図8 オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖 (4°C)
 (○ : 1回目、□ : 2回目、△ : 3回目)

表1 astA保有大腸菌汚染菌量推定に用いた鶏肉検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
若鶏もも肉	国産	不明	2023/1/19
若鶏ムネこま切	国産	不明	2023/1/30
鶏モモ親子并用	国産	不明	2023/2/2
若鶏手羽小間肉(ムネ)	国産	不明	2023/2/6
鶏むね小間切れ	国産	不明	2023/2/9
鶏むねひき肉	国産	不明	2023/3/16
若鶏肝	タイ	冷凍	2023/4/17
鶏バックリブ	国産	不明	2023/4/17
若鶏小間切れ	国産	不明	2023/4/20
鶏レバー	国産	不明	2023/4/27
鶏ムネ小間切れ	国産	不明	2023/4/27
若鶏レバー	国産	不明	2023/5/15
若鶏もも角切り	ブラジル	冷凍	2023/5/15
鶏レバー	国産	冷凍	2023/5/18
若鶏手羽先	国産	不明	2023/5/18
親鶏ムネモモ角切り	国産	不明	2023/5/18
若鶏砂肝	国産	不明	2023/5/22
若鶏ささみ	国産	冷凍	2023/5/22
若鶏はらみ	国産	不明	2023/5/22
若鶏やげん軟骨	国産	不明	2023/5/25
鶏むねカレー用	国産	不明	2023/5/25
鶏もも角切り	国産	冷凍	2023/5/25
鶏砂肝	国産	不明	2023/5/30
鶏ささみ	国産	不明	2023/5/30
鶏むねひき肉	国産	冷凍	2023/5/30
若鶏手羽中	国産	不明	2023/5/31
若鶏もも	国産	不明	2023/5/31
鶏ヤゲン軟骨	ブラジル	冷凍	2023/5/31
鶏モモ	国産	不明	2023/6/5
鶏むね	国産	不明	2023/6/5
鶏肝(肝臓、心臓)	国産	不明	2023/6/5
若鶏手羽中ハーフ	国産	不明	2023/6/8
若鶏ヒザ軟骨	国産	冷凍	2023/6/8
鶏モモ	タイ	冷凍	2023/6/8
若鶏ムネミンチ	国産	不明	2023/6/8

表2 astA保有大腸菌汚染菌量推定に用いた豚肉検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
豚レバー	国産	不明	2023/1/26
豚赤身ひき肉	国産	不明	2023/1/30
豚ハツスライス	国産	不明	2023/2/2
豚ひき肉	国産	冷凍	2023/2/6
豚レバー	国産	不明	2023/2/6
豚小間切れ	国産	不明	2023/2/13
豚レバー	国産	不明	2023/2/16
豚タン	国産	不明	2023/2/20
豚こま切れ	国産	不明	2023/3/1
豚ひき肉	国産、メキシコ	冷凍	2023/3/9
豚肩うす切り	国産	不明	2023/3/16
豚レバー	国産	不明	2023/4/10
豚切り落とし	国産	不明	2023/4/10
豚ハツスライス	国産	不明	2023/5/15
豚ミンチ	国産、メキシコ	冷凍	2023/5/15
豚小間切れ	国産	不明	2023/5/18
豚赤身ひき肉	国産	冷凍	2023/5/18
豚レバー	国産	不明	2023/5/18
豚モモ一口カツ用	国産	不明	2023/5/22
豚肩切り落とし	カナダ	不明	2023/5/22
豚レバー	国産	不明	2023/5/22
豚レバー	国産	不明	2023/5/25
豚あらびき肉	国産	不明	2023/5/25
豚モモ極うす切り	青森	不明	2023/5/25
豚ロースうす切り	国産	不明	2023/5/30
豚タン	国産	不明	2023/5/30
豚ハラミ	国産	不明	2023/5/30
豚こま切れ	国産	不明	2023/5/31
豚レバー	国産	不明	2023/5/31
豚ひき肉	国産	冷凍	2023/5/31
豚ロース切り身	アメリカ	不明	2023/6/5
豚ハツ	国産	不明	2023/6/5
豚バラ焼肉用	デンマーク	冷凍	2023/6/5
豚小間切れ	カナダ	不明	2023/6/8
豚粗挽きミンチ	国産	不明	2023/6/8

表3 *astA* 保有大腸菌汚染菌量推定に用いたオクラ検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/1/19
オクラ	タイ	非冷凍	2023/1/26
オクラ	タイ	非冷凍	2023/1/30
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/2
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/6
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/9
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/13
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/16
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/20
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/21
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/28
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/1
オクラ	タイ	非冷凍	2023/3/1
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/6
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/9
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/13
オクラ	タイ	非冷凍	2023/3/13
オクラ	タイ	非冷凍	2023/3/16
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/16
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/10
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/20
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/20
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/20
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/27
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/27
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/27
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/27
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/5/9
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/5/9
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/5/9

表5 *astA* 保有大腸菌汚染菌量推定に用いたその他野菜検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/2/9
ホワイトアスパラガス	ペルー	非冷凍	2023/2/16
にんにくの芽	中国	非冷凍	2023/2/16
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/2/20
スナップエンドウ	グアテマラ	非冷凍	2023/2/21
にんにくの芽	中国	非冷凍	2023/2/21
パプリカ	ニュージーランド*	非冷凍	2023/2/28
アボカド	メキシコ	非冷凍	2023/2/28
いんげん	オマーン	非冷凍	2023/3/1
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/3/1
いんげん	オマーン	非冷凍	2023/3/6
芽キャベツ	メキシコ	非冷凍	2023/3/6
アボカド	メキシコ	非冷凍	2023/3/9
いんげん	オマーン	非冷凍	2023/3/9
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/3/9
ゴボウ	中国	非冷凍	2023/3/9
トレビス	アメリカ	非冷凍	2023/3/13
にんにくの芽	中国	非冷凍	2023/3/16
かぼちゃスライス	ニュージーランド*	非冷凍	2023/3/16

表 6 *astA* 保有大腸菌の汚染状況

	陽性率 (%)	平均* ¹ (MPN/100g)	陽性検体平均* ¹ (MPN/100g)
鶏肉	94	1,313	1,407
豚肉	49	559	724
オクラ	20	380	732
ヤングコーン	43	742	3,830

*1 定量下限値未満の検体の汚染菌量を 0 cfu/100 g、定量上限値以上の検体の汚染菌量を 16,000 cfu/100 g として計算した