

総 合 研 究 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 3 ～ 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に関する研究  
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

本研究の目的は *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を調査することによって、汚染食品を明らかにし、効果的な食中毒予防法を確立することである。汚染調査の結果、鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンにおける *astA* 保有大腸菌の汚染が深刻であることが明らかになった。汚染菌量は食品の種類に関わらず、約  $10^5$  MPN/100g 以下であった。オクラを用いた *astA* 保有大腸菌の接種実験を行ったところ、オクラの表面で長期間生残できることが明らかになった。オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖を抑制するためには  $10^{\circ}\text{C}$  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

近年、既存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) 保有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。効果的な予防対策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が、多くの *astA* 保有大腸菌による事例で、原因食品が不明となっている。また、*astA* 保有大腸菌による事例だけでなく、腸管凝集付着性大腸菌、腸管病原性大腸菌による事例でも同様に、原因食品が明らかになっていないものが多い。これまでに、食品における *astA* 保有大腸菌の汚染調査が行われているが、調査食品のカテゴリーが偏っていたり、

検体数が不足していたりするものが多く、結果として *astA* 保有大腸菌の汚染食品、汚染経路について不明な点が多く残されたままとなっている。本研究では、*astA* 保有大腸菌を中心とした下痢原性大腸菌の汚染食品や汚染経路を明らかにするために、食品における汚染大腸菌の汚染率および汚染菌量の調査を行った。調査を行うにあたっては、調査食品のカテゴリーに偏りが出ないように注意を払った。また、汚染が重度に見られた食品に対しては、接種実験を行い、菌の増殖挙動を観察し、菌が増殖しない条件を検討した。

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。

## 〔2〕食品における下痢原生大腸菌の汚染実態調査

検体 25 g に mEC 培地（栄研化学）を 225 mL 加え、42℃、22～24 時間、増菌培養を行なった。培養後、培養液からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、Müller らの方法（Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73, 3380-3390）を改良したマルチプレックス PCR 法でスクリーニングを行い、大腸菌の病原因子の検出を行なった。何らかの病原因子が検出された場合、クロモアガーECC を用いてコロニーの分離を試みた。分離コロニーは、コロニー-PCR によって病原因子を再確認した上で、生化学性状試験を行い、大腸菌であることを確認した。

## 〔3〕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。検体 25 g に mEC 培地を 225 mL 加え、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 本法で行った。42℃、22 時間、培養後、培養液からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、PCR で *uidA* と *astA* の検出し、*uidA* と *astA* の両方が検出された試験管を陽性とした。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。

## 〔4〕O 遺伝子型別

LB 培地で培養した菌体から、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、井口らの方法（J. Clin. Microbiol., 2015, 53, 2427-32）に従い、PCR によって O 遺伝子型別を行った。

## 〔5〕オクラにおける増殖挙動の解

析

TSB 培地 10mL に 1 エーゼの菌を接種し、37℃、72 時間培養した。培養菌液 1 mL を PBS 100mL に加え、よく攪拌した（ $1 \times 10^7$  cfu/mL）。オクラ 1 本につき菌液 10  $\mu$ L（ $1 \times 10^5$  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、4℃、10℃、25℃に保管した。経時的にストマッカー袋を取り出し、オクラに静山している菌数を測定した。

## C. 研究結果

### 〔1〕食品における下痢原性大腸菌の汚染実態調査

スクリーニングの結果、鶏肉は陽性率が高く、31 検体全てで *astA* が陽性となった。*astA* 単独陽性が 8 検体、*astA* と *eae* が陽性になった検体が 21 検体、*astA* と *elt* が陽性となった検体が 2 検体であった。これらの検体から 36 株が分離された。*astA* 単独保有株が 30 株、*astA*、*eae* 保有株が 2 株、*eae* 単独保有株が 2 株、*astA*、*estIa* 保有株が 1 株、*estIa* 単独保有株が 1 株分離された。鶏肉分離株における *astA* 保有率が非常に高いことが明らかになった。

豚肉はスクリーニングで 22 検体中 6 検体が *astA* 陽性であったが、菌株を分離できなかった。しかし、スクリーニングでひき肉と内臓肉の陽性率が高かった。そこで、ひき肉と内臓肉をさらに調査したところ、40 検体中 29 検体がスクリーニング陽性となり、21 検体から *astA* 保有大腸菌が分離された。

牛肉では 24 検体中 6 検体がスクリーニングで *astA* 陽性となった。2 検体が *astA* 単独陽性、2 検体が *astA* と *eae* 陽性、1 検体が *astA*、*stx2*、*estIa* 陽性、1 検体が *astA*、*eae*、*stx2* が陽

性であった。牛肉からは *astA*、*eae* 保有株を 1 株分離した。

魚介類では 70 検体中 6 検体がスクリーニングで *astA* 陽性であった。エビは 10 検体中 4 検体、サバは 2 検体中 1 検体、スズキは 1 検体中 1 検体が陽性であった。*astA* 単独保有株を 3 株分離した。

野菜では 99 検体中 6 検体が *astA* 陽性であった。*astA* 単独保有株を 3 株分離した。海外産オクラと海外産ヤングコーンの陽性率が高かったため、さらに調査を行ったところ、オクラ 36 検体中 11 検体がスクリーニング陽性となり、5 検体から *astA* 保有株を分離した。ヤングコーンは、29 検体中 19 検体がスクリーニングで陽性となり、*astA* 単独保有株 3 株、*bfpB* 単独保有株 1 株が分離された。

#### [ 2 ] 分離菌株の 0 遺伝子型別

2021 年度および 2022 年度の汚染実態調査から、牛由来 11 株、鶏肉由来 51 株、豚肉由来 36 株、野菜由来 16 株、魚由来 6 株、計 120 株が分離された。分離された型別は合計 65 種類あった。最も多かったのが、型別不能で 17 株 (14.3%)、次いで、0g8 が 8 株 (6.7%)、0g88 が 7 株 (5.8%)、0gGp9 が 4 株 (3.3%) と多く分離された。しかし、食品ごとに特定の傾向は認められなかった。[ 3 ] 食品中の *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定

汚染が強く認められた鶏肉、豚内臓肉、海外産オクラ、海外産ヤングコーン、それぞれ 35 検体を対象に、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。

鶏肉は 35 検体中 32 検体 (91%) が陽性となり、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 ( $1.6 \times 10^4$  MPN/100 g) であった。豚内臓肉は 35 検体中 17 検体

(49%) が陽性となり、汚染菌量は 20~5,422 MPN/100 g の範囲であった。オクラは 35 検体中 7 検体 (20%) が陽性となり、汚染菌量の範囲は 20~3,476 MPN/100 g であった。ヤングコーンは 35 検体中 15 検体 (43%) が陽性となった。汚染菌量の範囲は 20~定量限界値以上であった。陽性検体の 53% は 102 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。

#### [ 4 ] オクラにおける増殖挙動の解析

オクラ由来の *astA* 保有大腸菌をオクラに接種し、4℃、10℃、25℃で培養し、7 日までの菌数を測定した。

25℃で培養した場合、培養 3 日目まで菌は増殖したが、約  $10^5$  cfu/mL で平衡状態に達し、培養 7 日目まで菌数を維持した。

10℃で培養した場合、菌数はほとんど変化せず、培養 7 日目でも接種菌数を維持した。

4℃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。

#### D. 考察

汚染実態調査の結果から、鶏肉、豚内臓肉、海外産オクラ、海外産ヤングコーンが *astA* 保有大腸菌に重度に汚染されていることが明らかになった。鶏肉やオクラは生食する可能性があるため、特に注意が必要であると考えられる。また、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖性を検討したところ、オクラの表面でも、25℃で保管した場合、菌が増殖し、オクラ 1 本当たり最大  $10^5$  cfu まで増殖することが確認できた。また、10℃では、菌の増殖は認められなかったが、7 日後でも接種菌数を維持したまま生残し

ていた。菌を増殖させないためには、少なくとも 10℃以下での保管が必要であることが、今回の結果から明らかになった。現在、我が国では海外からの輸入オクラが非常に多く流通している。輸送時の温度管理が適切に行われなかった場合、*astA* 保有大腸菌が増殖し、食中毒の原因になる可能性が示唆された。

一方で、*astA* 保有大腸菌の病原性については不明な点が非常に多い。また、今回の調査では、鶏肉から *astA* 保有大腸菌が高率に分離された。しかし、*astA* 保有大腸菌が原因と考えられる食中毒事例は非常に少ない。このため *astA* 自体は病原性に関与していない、あるいは病原性を発現するためには *astA* に加えて他の因子が必要である可能性が示唆された。以上の結果から、*astA* は食中毒原因菌のマーカーとしては適切ではないと考えられた。

#### E. 結論

本研究では、食品における *astA* 保有大腸菌の汚染状況について調査した。結論として、*astA* を食中毒原因菌のマーカーとして使用するのには適切でないと考えられた。しかし、食中毒事例が発生していることから、未知の病原因子を保有している可能性がある。室温で放置すると、食品中で増殖するため、野菜をはじめとする食品の衛生管理には注意を払う必要性が認められた。

#### 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. 知的財産権の出願・登録状況

なし