

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）
と畜・食鳥処理場における HACCP の検証及び食肉・食鳥肉の衛生管理の
向上に資するための研究
分担研究報告書

食肉における *Providencia* 属菌の汚染状況

分担研究者 山崎 伸二 大阪公立大学大学院 獣医学研究科 教授
研究協力者 畑中 律敏 同 助教
アワスティ シャルダ プラサダ 同特任講師

研究要旨

食肉の *Providencia* 属菌による汚染を検証するために、*Providencia* 属菌を PCR にて検出するとともに陽性検体から菌の分離を試み、食肉がどのような *Providencia* 属菌に汚染されているのか菌種同定を行った。食肉 79 検体（鶏肉 54、豚肉 15、牛肉 10）中 59 検体（75%；鶏肉 47、豚肉 8、牛肉 4）より *Providencia* 属菌に特異的な PCR にて *Providencia* 属菌を検出した。HACCP が導入された後においても、我が国の食肉、特に鶏肉は *Providencia* 属菌に高率に汚染されていることが明らかとなった。PCR で陽性となった 59 検体中、53 検体から *Providencia* 属菌が分離された。以上の結果より、我が国の食肉はヒトの *Providencia* 感染症の感染源となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Providencia 属菌は、腸内細菌目、モルガネラ科に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌で、鞭毛を有し運動性がある。本菌は環境中に広く分布し、現在までに少なくとも 10 菌種報告されており、中でも *P. alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii*, *P. stuartii* は腸管感染症、尿路感染症や敗血症等のヒトの疾患に関わっていることが報告されている。遡り調査で 1996 年福井県で発生した集団食中毒事例に *P. alcalifaciens* が関わっていたことが明らかとなった。以後、2002 年には東京都で、2006 年には鳥取県で *P. alcalifaciens* が原因となる集団食中毒事例が報告されている。また、我々の研究グループは岡山県の小児下痢症患者から *P. alcalifaciens*, *P. rettgeri* や *P. rustigianii* を下痢症原因菌として分離し、報告している。

Providencia 属菌の病原因子として、細胞接着性・侵入性、ウレアーゼや細胞膨化致死毒素 (CDT: cytolethal distending toxin) の産生性等が知られている。しかしながら、本菌種の環境中における分布や、ヒトへの感染源等については未だに疫学データが不足しており不明な点が多い。我々の研究グループはタイの市販食肉の約 60～70%が *Providencia* 属菌で汚染していることを報告した。

本研究では、我が国においても *Providencia* 属菌の感染源の一つとなりえる食肉に着目し、食肉の *Providencia* 属菌による汚染を検証した。具体的には、食肉の増菌培養液より PCR 法で *Providencia* 属菌を特異的遺伝子を検出し、陽性検体から *Providencia* 属菌の分離を試み、分離菌の菌種同定や細菌学的性状を解析した。

B. 研究方法

鶏肉 54 検体（冷凍保管; 20, 新鮮市販; 14, 食鳥処理場由来新鮮と体; 20）、豚肉 15 検体（新鮮市販）、牛肉 10 検体（新鮮市販）の合計 79 検体を用いた。食肉 25 g（食鳥処理場由来 20 検体は 10 g）をストマッキングバックに採取し、それぞれ 9 倍量の buffered pepton water を加えストマッカーにて 30 秒間ストマッキング処理を行った。その後、37℃で 20±2 時間静置培養し、増菌培養液よりアルカリ熱抽出法にて DNA を抽出した。*Providencia* 属菌および *Providencia* 属菌の *cdt* (*Pcdt*) 遺伝子を特異的に検出できる duplex-PCR にて *Providencia* 属菌及び *Pcdt* 遺伝子を検出した。

PCR にて *Providencia* 属菌が陽性となった増菌培養液は、*Providencia* 属菌の選択分離培地である

PMXMP 寒天培地に塗布し、37°C、18 ± 2 時間培養し *Providencia* 属菌の分離を試みた。培地上の *Providencia* 属菌様のコロニーを PCR 法にて *Providencia* 属菌であることを確認し、分離菌の生化学性状試験を行い菌種を同定した。

C. 研究結果

供試した食肉 79 検体中、59 検体 (75%) が *Providencia* 属菌特異的 PCR で陽性となった。各食肉における検出率は鶏肉 83% (47/54)、豚肉 53% (8/15)、牛肉 40% (4/10) であった。また、*Pcdt* 遺伝子は全て陰性であった。

PCR にて *Providencia* 属菌が検出された計 59 検体から *Providencia* 属菌の分離を試みた。鶏肉 42 検体、豚肉 8 検体、牛肉 3 検体より *Providencia* 属菌の分離に成功した。さらに分離菌を生化学性状試験により菌種を同定した。鶏肉では 31 検体より *P. alcalifaciens*、12 検体より *P. rustigianii*、2 検体より *P. huaxiensis*、1 検体より *P. vermicola* が分離された。豚肉では 5 検体より *P. alcalifaciens*、2 検体より *P. rustigianii*、1 検体より *P. vermicola* が分離された。牛肉では *P. alcalifaciens*、*P. rustigianii*、*P. huaxiensis*、*P. vermicola*、*P. rettgeri* がそれぞれ 1 検体より分離された (表)。

D. 考察

タイでは鶏肉 58% (15/26) で、豚肉 64% (16/25) で、牛肉 68% (17/25) で *Providencia* 属菌が陽性となった (Shima et al, Jpn J Infect Dis, 69: 323-325, 2016)。タイの鶏肉 15 検体全てから *P. alcalifaciens* が、2 検体から *P. stuartii* が、豚肉 16 検体中 14 検体から *P. alcalifaciens* が、2 検体から *P. rustigianii* が、1 検体から *P. rettgeri* が、牛肉 17 検体中、10 検体から *P. alcalifaciens* が、7 検体から *P. stuartii* が、2 検体から *P. rettgeri* が分離されている。

我が国においてもタイ同様市販食肉が高率で *Providencia* 属菌に汚染されていることが明らかとなった。我が国では鶏肉が *Providencia* 属菌に高率 (83%) に汚染されていた。HACCP 義務化以前 (2012~2013 年) に我々が行った研究においても 64% (16/25) の鶏肉から *Providencia* 属菌が分離されており、本属菌の検出率は豚肉や牛肉と比較して高い傾向が見られた。また以前同様、鶏肉から分離された本属菌の多くがヒトの胃腸炎患者からもよく分離される *P. alcalifaciens* であった。さらに豚肉、牛肉からも *P. alcalifaciens* だけでなく患者からも分離される *P. rettgeri* や *P. rustigianii* が

分離され、食肉がヒトへの感染源となる可能性が示唆された。

今後さらに検体数を増やし疫学データを蓄積するとともに、分離菌の病原遺伝子プロファイルや薬剤感受性についても調べる予定である。食肉に分布している *Providencia* 属菌の性状についてさらに検証を進め、ヒト由来株との比較解析を行い、食肉由来の *Providencia* 属菌がヒトへの感染源となっている可能性について調べていく。

E. 結論

HACCP が導入された後においても、我が国の食肉は多くが *Providencia* 属菌に汚染されており、特に鶏肉が高率に汚染されていることが明らかとなった。分離菌の多くが *P. alcalifaciens* であり、今後食肉分離菌株と患者由来菌株を比較することで、食肉が本属菌に汚染されていることのリスクについてもさらに検証することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

J. Hassan[#], S.P. Awasthi[#], N. Hatanaka, P.H. Hoang, A. Nagita, A. Hinenoya, S.M. Faruque and S. Yamasaki^{*}. Presence of functionally active cytolethal distending toxin genes on a conjugative plasmid in a clinical isolate of *Providencia rustigianii*. *Infect. Immun.*, 91(6): 1-13, 2023. ([#]These authors are equally contributed.)

2. 学会発表等

山崎伸二, Jayedul Hassan, 日根野谷淳, 畑中律敏, Awasthi Sharda Prasad, 山手丈至, 中村昇太, 元岡大佑, 名木田章: 小児下痢症患者から分離した *Providencia* 属菌の新規病原因子. 第 20 回日本小児消化管感染症研究会. 2024 年 2 月 18 日, JR 博多シティ, 博多

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表. 我が国の食肉における *Providencia* 属菌の汚染状況および汚染菌種

食肉	詳細	<i>Providencia</i> 属菌		分離された菌種(検体数)				複数菌種 分離された検体数
		PCR陽性検体数	分離検体数	P.al	P.ru	P.hu	P.ve	
鶏肉 (n=54)	レトロスペクティブ (n=20)	14 (70%)	11	9	2	-	-	-
	市販 (n=14)	13 (92%)	13	6	10	-	-	3 (P.al/P.ru)
	食鳥処理場 (n=20)	20 (100%)	18	16	-	2	1	1 (P.al/P.ve)
	小計	47 (83%)	42	31	12	2	1	4
豚肉 (n=15)	市販	8 (53%)	8	5	2	-	1	-
牛肉 (n=10)	市販	4 (40%)	3*	1	1	1	1	1 (P.ve/P.re) 1 (P.ru/P.hu)
合計 (n=79)		59 (75%)	53	37	15	3	3	6

P.al = *P. alcalifaciens*, P.ru = *P. rustiganii*, P.hu = *P. huxleyensis*

P.ve = *P. vermicola*, P.re = *P. rettgeri*,

* = Isolation is ongoing with 1 sample (3/7)