

令和 6 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 准教授
アワスティ シャルダ プラサダ 同 特任准教授

研究要旨

食肉の *Providencia* 属菌汚染を検証するために *Providencia* 属菌を PCR にて検出し、陽性検体から菌を分離し、分離菌の菌種を同定した。食肉 79 検体（鶏肉 28, 豚肉 41, 牛肉 10）中 36 検体（46%；鶏肉 24, 豚肉 12, 牛肉 0）より *Providencia* 属菌を PCR で検出し、PCR で陽性となった 36 検体中、30 検体から *Providencia* 属菌を分離した。鶏肉、豚肉由来株は共に *P. alcalifaciens*, *P. rustigianii* と同定された。さらに、市販鶏肉と豚肉それぞれ 15 検体の増菌前後の菌数を RT-PCR で定量した結果、増菌前で鶏肉 1 検体のみ、 2.3×10^4 CFU/g となったがそれ以外の 29 検体は検出下限以下（ $<1.0 \times 10^3$ CFU/g）であった。さらに食肉の *Providencia* 属菌汚染と衛生指標菌（大腸菌群）汚染との相関性の判定には至らなかった。

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。また、昨年度は我が国における *Providencia* 属菌の食肉汚染を調べた結果、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）で *Providencia* 属菌が PC 法で陽性となった。

本研究では我が国の食肉における *Providencia* 属菌の汚染調査を継続し、食肉の汚染菌数を調べ、食肉の *Providencia* 属菌汚染と衛生指標菌である大腸菌群汚染との相関性について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

近隣のスーパーマーケットで購入した国産鶏肉 28 検体、豚肉 41 検体、牛肉 10 検体の合計 79 検体を用いた。食肉 25 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 peptone water (BPW) を加えストマッカーにて 30 秒間ストマック処理を行った。その後、37°C 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*) 遺伝子の特異的に検

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、24-48 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。

さらに市販鶏肉と豚肉をそれぞれ 15 検体（上記の 79 検体に含まれる）の増菌前の揉み出し液を MacConley 寒天培地上に塗抹し 37°C、20±2 時間培養後赤色と無色のコロニーをそれぞれ計測した。また、揉み出し液を 10 倍濃縮し、*Providencia* 属菌に特異的なプライマーを用いた RT-PCR で菌数を定量した。揉み出し液を 37°C、18 時間培養後、*Providencia* 属菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法で *Providencia* 属菌を検出した。

C. 研究結果

供試した食肉 79 検体中、36 検体（46%）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 86%（24/28）、豚肉 29%（12/41）、牛肉 0%（0/10）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 36 検体から *Providencia* 属菌の分離を試みた。鶏肉 24 検体、豚肉 12 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 14 検体より *P. alcalifaciens*、12 検体より *P. rustigianii* が分離された。豚肉では 5 検体より *P. alcalifaciens*、1 検体より *P. rustigianii*、1 検体より既存の菌種に属さない *Providencia* 属菌が分離された（表 4-1）。

さらに衛生指標菌との比較実験では、増菌前に *Providencia* 属菌が検出されたのは鶏肉 1 検体のみで、菌数は 2.3×10^4 CFU/g であった。それ以外の 29 検体では全て検出下限以下（ $<1.0 \times 10^3$ CUF/g）であった。増菌培養後に鶏肉は 14 検体で、豚肉は 3 検体で陽性となり、陰性検体は鶏肉で 1 検体、豚肉で 12 検体であった。衛生指標菌と *Providencia* 属菌との相関性を解析しようとしたが、鶏肉に関しては陰性が 1 検体のみで解析不能であった。豚肉においては MacConkey 寒天培地上での赤色コロニーと無色コロニー数と *Providencia* 属菌検出あるいはコロニー数では有意差は認められなかった（図 4-1）。

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ことが報告されている（Shima et al, Jpn J Infect Dis, 69: 323-325, 2016）。タイの鶏肉から *P. alcalifaciens*、*P. stuartii* が、豚肉から *P. alcalifaciens*、*P. rustigianii*、*P. rettgeri* が、牛肉から *P. alcalifaciens*、*P. stuartii*、*P. rettgeri* が分離されている。

我が国においても昨年度の結果に引き続きタイ同様に市販食肉が、特に鶏肉が高率で *Providencia* 属菌に汚染されていることが明らかとなった。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。今年度の結果は、鶏肉や豚肉から分離された本属菌は、ヒトの胃腸炎患者からもよく分離される *P. alcalifaciens* と *P. rustigianii* であった。

食肉の汚染菌数を調べたところ鶏肉 1 検体で 2.3×10^4 CFU/g であったが、それ以外は $<1.0 \times 10^3$ CUF/g と検出下限以下であった。また衛生指標菌として用いられる大腸菌群の細菌数と相関性の判定にはいたらなかった。これは鶏肉では陰性検体が少なかったこと、また、豚肉では陽性検体が 3 検体と少なかったため、現段階で相関性がないと結論づけることはできない。最終年度は、さらに検体数を増やし相関性の有無について調べるとともに、*Providencia* 属菌の簡便で迅速な検出法及び培養法の検討を試みる。

E. 結論

我が国の食肉、特に鶏肉が *Providencia* 属菌に汚染されていること、汚染菌種は鶏肉・豚肉とも人の胃腸炎患者から分離される *P. alcalifaciens* と *P. rustigianii* が多いことがわかった。また、食肉の汚染菌数は少なく、増菌培養をしないと検出できないレベルであった。衛生指標菌が *Providencia* 属菌の汚染指標になるかならないか結論づけるにはさらに検体数を増やして調べる必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. O. J. Obi, A. Hinenoya*, S. P. Awasthi, N. Hatanaka, S. M. Faruque, S. Yamasaki*. Wild raccoons (*Procyon lotor*) as potential reservoir of cytolethal distending toxin producing *Providencia* strains in Japan. **Microbiol. Spectr.**, 13(4), e0261624. 2025.

2. 学会発表等

なし

H. 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4-1 我が国の市販食肉における *Providencia* 属菌の汚染状況および汚染菌種2024.04～2025.03

食肉	<i>Providencia</i> 属菌		分離された菌種(検体数)							
	PCR陽性検体数	分離検体数	分 離 された菌種(検体数)							
鶏肉(n=28)	24(86%)	23(96%)	P. al	P. ru	P. re	P. ve	P. re	P. ve	P. re	不明
豚肉(n=41)	12(29%)	7(58%)	14	12	0	0	0	0	0	0
牛肉(n=10)	0(0%)	0(0%)	5	1	0	0	0	0	0	1
			0	0	0	0	0	0	0	0
合計	36(46%)	30(83%)	19	13	0	0	0	0	0	1

P. al=*P. alcalifaciens*, P. ru=*P. rustigianii*, P. hu=*P. huaxiensis*

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

鶏肉検体は検定不能、豚肉では*Providencia*属菌陽性陰性検体間に有意差は認められなかった

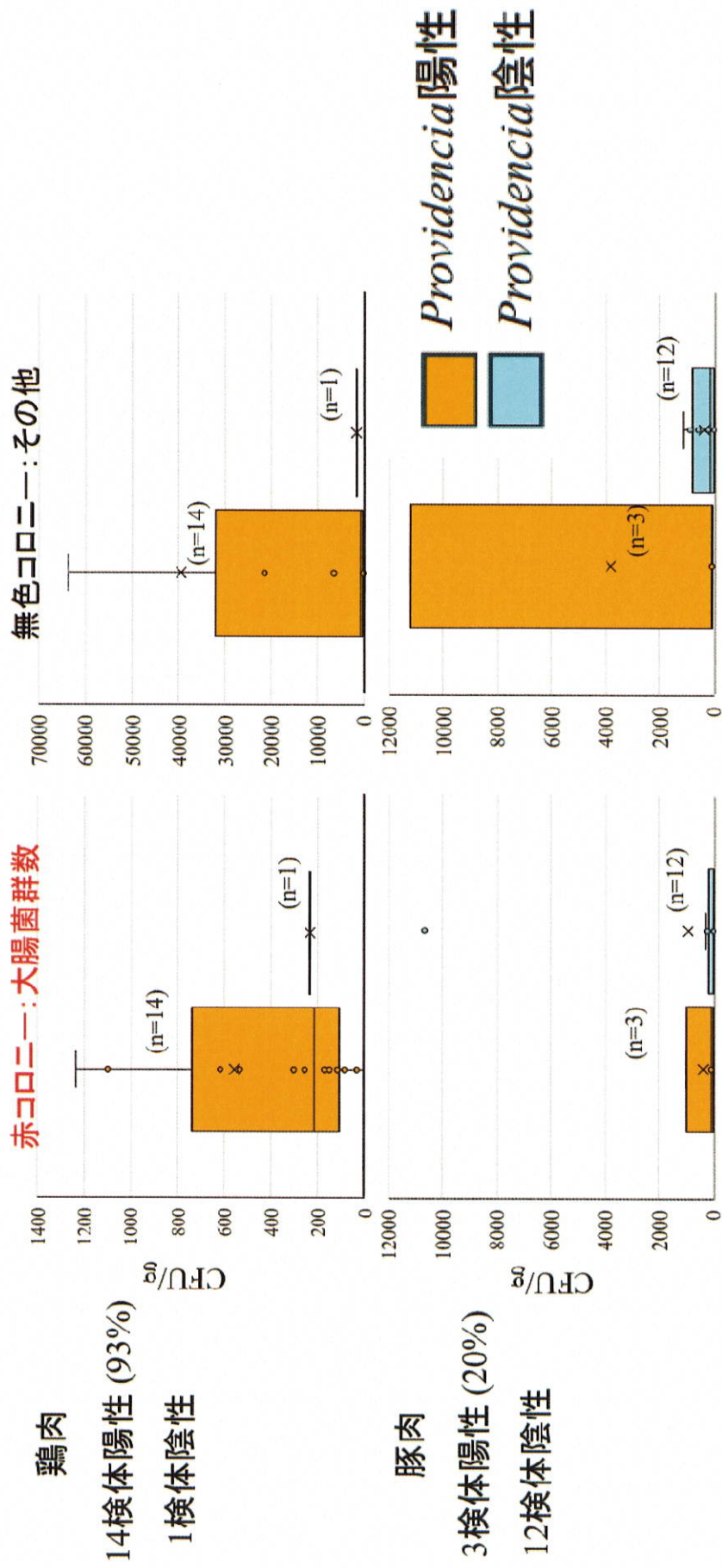


図4-1 食肉から*Providencia*属菌が検出された検体と大腸菌群数との相関性