

令和 7 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）

分担研究報告書

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

食肉における病原微生物の汚染実態把握、性状解析並びに
モニタリング手法に関する研究

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
オビ オケチュク 同 特任助教

研究要旨

本年度は、昨年度に引き続き食肉の *Providencia* 属菌汚染と、衛生指標菌である大腸菌群数との間に相関性があるかを調べるために、*Providencia* 属菌の検出と大腸菌群数の関係性について検証した。さらに、病原因子保有の *Providencia* 属菌と非保有の *Providencia* 属菌を検出できる *Providencia*-multiplex PCR (*P*-multiplex PCR) の構築を試みた。鶏肉においては、大腸菌群と *Providencia* 属菌汚染と相関性が見られ、豚肉においても同様の傾向が認められた。しかしながら、両者とも統計学的に優位差を示す事ができなかった。以上より、食肉の *Providencia* 属菌汚染実態を把握する手法として、*P*-multiplex PCR と *Providencia* 属菌選択分離培地である PMXMP 寒天培地を併用したモニタリング法を提案する。

A. 研究目的

Providencia 属菌はグラム陰性通性嫌気性桿菌であり腸内細菌目、モルガネラ科に分類されている。本菌種は現在までに少なくとも 11 菌種が同定されており、*P. alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii*, *P. situartii* は腸管疾患、尿道感染症、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。特に *P. alcalifaciens* による感染症の報告が多い。本菌種の病原因子としては、細胞接着性・侵入性、ウレアーゼや細胞膨化致死毒素 (CDT) 等が知られている。さらに、3 型分泌装置 (T3SS) も *Providencia* 属菌の重要な病原因子である事を明らかにしてきた。近年、*Providencia* 属菌による食中毒事例や小児下痢症事例が散発的に報告されている。感染源の 1 つとして食肉が考えられ、昨年度までに、食肉の中でも特に鶏肉が高率に *Providencia* 属菌に汚染されていることを明らかにしてきた。今年度は、昨年度に引き続き、食肉における *Providencia* 属菌汚染と食肉中の大腸菌群数の関係性について検証した。さらに *Providencia* 属菌を迅速に検出するだけでなく、病

原因子についても検出できる multiplex PCR の構築を試み、食肉の *Providencia* 属菌の汚染実態を把握するモニタリング法を構築・提案する事を目的とした。

B. 研究方法

市販食肉からの *Providencia* 属菌の検出と大腸菌群数

市販の鶏肉 38 検体、豚肉 15 検体の合計 53 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、そこに 9 倍量の緩衝ペプトン水を加えストマッカーにて 30 秒間ストマッキングを行った。ストマッキングを行った揉みだし液より、マッコンキー寒天培地を用いた平板塗抹法にて大腸菌群数を求めた。

ストマッキングした揉みだし液については 37°C で 20 ± 2 時間静置培養した。この増菌培養液よりアルカリ熱抽出法にて DNA を抽出し、*Providencia* 属菌 (*P*-16S rRNA) および *Providencia* 属菌の *Pcdt* 遺伝子を検出する *P*-duplex PCR にて、*Providencia* 属菌の検出を行った。さらに、

Providencia 属菌の選択分離培地である PMXMP 寒天培地を用いて *Providencia* 属菌の分離を試みた。

Providencia 属菌の検出及び病原因子を検出する新規 multiplex PCR の構築

新たに *Providencia* 属菌において細胞膨化致死毒素をコードする *cdt* 遺伝子配列を見出したため、*Providencia* 属菌すべての *Pcdt* 遺伝子を検出するためにプライマーの再設計を行った。さらに、*Providencia* 属菌の主要な病原因子と考えられる *P. alcalifaciens* と *P. rustigianii* で見つかった T3SS の塩基配列から *invA* 遺伝子の特異的に検出できるプライマーを設計し、*Pcdt* 遺伝子と *P-16S rRNA* の 3 種類のプライマーを組み合わせた *P-multiplex PCR* の構築を試みた。

新規 P-multiplex PCR の評価

構築した *P-multiplex PCR* の感度・特異度を検証するために、PCR の陽性菌株として *P. alcalifaciens* 4 株 [*cdt* (-) /*invA* (-) 1 株, *cdt* (-) /*invA* (+) 1 株, *cdt* (+) /*invA* (+) 2 株]、*P. rustigianii* 2 株 [*cdt* (+) /*invA* (+)]、*P. rettgeri* 2 株 [*cdt* (-) /*invA* (+) 1 株, *cdt* (+) /*invA* (+) 1 株] を用いた。また、陰性菌株として *E. coli* 4 株、*E. albertii*、*Shigella dysenteriae*、*S. flexnerii*、*S. sonnei*、*S. boydii*、*Campylobacter jejuni*、*C. coli*、*Proteus mirabilis*、*Salmonella* Typhimurium、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter cloacae*、*Vibrio cholerae*、*V. parahaemolyticus* をそれぞれ 1 株の、計 17 株を用い PCR を行った。

また、検出下限について検証するために、10 g の *Providencia* 属菌陰性が確認された牛肉に対して、*P. alcalifaciens* RAC2212A 株 [*cdt* (+) /*invA* (+)]、RAC2016A 株 [*cdt* (-) /*invA* (+)]、RAC2016B 株 [*cdt* (-) /*invA* (-)] をそれぞれ 1, 10, 100, 1000 CFU をスパイクし、前述同様に緩衝ペプトン水で増菌後、構築した新規 *P-multiplex PCR* で検出を試みた。

C. 研究結果

食肉における Providencia 属菌の検出と食肉中の大腸菌群数との相関性

市販の鶏肉 38 検体中 36 検体、豚肉 15 検体中 3 検体より *Providencia* 属菌が検出、または分離された。次に *Providencia* 属菌が検出された鶏肉 36 検体または豚肉 3 検体の大腸菌群数を計測した結果、それぞれの平均値は $1,146.9 \pm 1,217.7$ CFU/g または 362.1 ± 452.2 CFU/g であった。一方、*Providencia* 属菌が検出されなかった鶏肉 2 検体ま

たは豚肉 12 検体の大腸菌群数は、それぞれ 215.0 ± 15.0 CFU/g または $878.9 \pm 2,751.7$ CFU/g であった (図 1, 図 2)。鶏肉においては、*Providencia* 属菌が検出された検体においては、大腸菌群数が多い傾向にあったが、一方、豚肉においては *Providencia* 属菌が検出されない検体の方が多い傾向にあった。鶏肉及び豚肉において、*Providencia* 属菌陽性または陰性の検体数に差があり、有意差検定はできなかった。

構築した新規 P-multiplex PCR の評価

PCR の結果、*Providencia* 陽性 8 株は全て予想された増幅産物を、*Providencia* 陰性 17 菌株からは特異的な増幅産物は確認されず、感度および特異度は 100% であった。

次に、10 g の牛肉に *Providencia* 属菌をスパイク

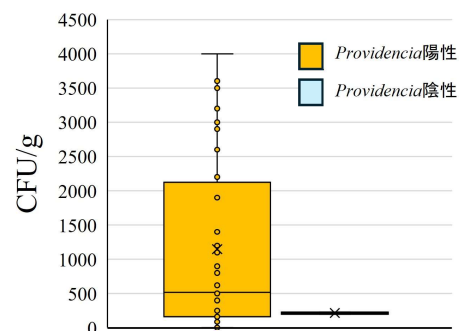


図1、*Providencia*属菌陽性、陰性鶏肉検体における大腸菌群数

*Providencia*属菌が検出された36検体とされなかった2検体におけるそれぞれの大腸菌群数の箱ひげ図

後、増菌した際の検出限界は、RAC2016A [*cdt* (-) /*invA* (-)] と RAC2016B 株 [*cdt* (-) /*invA* (-)] は

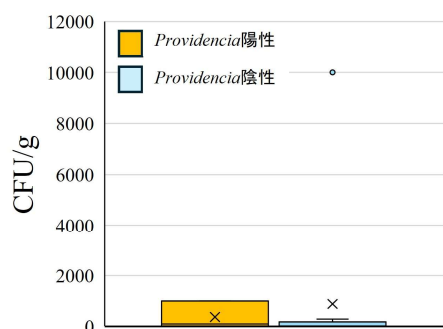


図2、*Providencia*属菌陽性、陰性豚肉検体における大腸菌群数

*Providencia*属菌が検出された3検体とされなかった12検体におけるそれぞれの大腸菌群数の箱ひげ図

1 CFU、RAC2212A 株 [*cdt* (+) /*invA* (+)] は 10 CFU であった。しかも、*P. alcalifaciens* に特異的な 16S rRNA 遺伝子のみならず、病原因子である

invA 遺伝子及び *Pcdt* 遺伝子も 16S rRNA 遺伝子と同程度の感度で検出された。

D. 考察

これまでの研究で、我々は市販の鶏肉、豚肉、牛肉における *Providencia* 属菌による汚染調査を行い、特に鶏肉が *Providencia* 属菌に高率に汚染されていることを見出した。*Providencia* 属菌は腸内細菌目細菌であり、環境水、野生動物や家畜の腸管内に分布していることが知られている。今年度は、食肉の *Providencia* 属菌汚染と衛生指標菌（ここでは大腸菌群数）との間に相関性があるかどうかを調べた。すなわち、もし、相関性があれば *Providencia* 属菌の汚染を衛生指標菌である大腸菌群数を検出することで知ることができる。図 1 に示したように、鶏肉においては *Providencia* 属菌が検出された食肉からは大腸菌群数が多い傾向が確認された。しかしながら、*Providencia* 属菌陰性検体が 2 つしかなかったため、統計学的に有意差があるかについて明らかにすることができなかった。一方、豚肉においては、*Providencia* 属菌陰性 1 検体においても 10,000 CFU/g と極端に大腸菌群数が多い検体が確認された。さらに、豚肉の場合、*Providencia* 属菌の陽性検体が鶏肉と比べ、それほど多くなく、*Providencia* 属菌汚染と大腸菌群の細菌数と相関性がある傾向が認められたが、統計学的に優位な差があることを示すことはできなかった。以上より、本研究では、豚肉においても、鶏肉においても衛生指標菌である大腸菌群数が *Providencia* 属菌汚染の判定に用いることができるかどうか、結論づけることはできなかった。今後、鶏肉、豚肉においてもさらに検体数を増やして検討する必要がある。

一方、PCR 法は今日、簡便で迅速な病原体検査法として幅広く普及し利用されている。本研究では、衛生指標菌に変わる手法として、*Providencia* 属菌に特異的な遺伝子（*P*-16S rRNA）と 2 種の病原遺伝子（*Pcdt* 遺伝子、*invA* 遺伝子[T3SS]) を同時に検出できる *P*-multiplex PCR を構築した。本 *P*-multiplex PCR はスパイク実験において、1~10 CFU/g の *Providencia* 属菌を検出する事ができ、*Providencia* 属菌の選択分離培地である PMXMP 寒天培地と組み合わせることで、食肉の *Providencia* 属菌汚染をモニタリングできる可能性が示めされた。

E. 結論

食肉からの *Providencia* 属菌の検出法として緩衝ペプトン水で増菌培養し、*P*-multiplex PCR で *Providencia* 属菌を検出し、陽性となった場合は *Providencia* 属菌選択分離培地である PMXMP 寒天培地で検体を培養する。*Providencia* 属菌と疑わしいコロニーが得られれば、再度 *P*-multiplex PCR で *Providencia* 属菌を同定する。以上のフローは食肉からの *Providencia* 属菌のモニタリング法として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし

2. 学会発表等

Obi Okechukwu, Awasthi Sharda Prasad、宇山千晴、日根野谷 淳、畑中律敏、山崎伸二. 市販食肉のプロビデンス属菌による汚染状況と分離菌の病原性について. 第 57 回ビブリオシンポジウム、2025 年 10 月 30 日、長崎大学、長崎

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