

令和 5-7 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

食肉の *Providencia* 属菌による汚染を検証した。市販食肉 149 検体（鶏肉 60 検体、豚肉 61 検体、牛肉 28 検体）中、81 検体（54%；鶏肉 53 検体[88%]、豚肉 22 検体[36%]、牛肉 6 検体 21%）より *Providencia* 属菌に特異的な PCR にて *Providencia* 属菌を検出した。PCR で陽性となった 81 検体中、72 検体から 81 株の *Providencia* 属菌を分離した。最も多かったのが *P. alcarifaciens* の 37 株、次いで *P. rusutigianii* の 34 株であった。分離された *Providencia* 属菌全てにおいて細胞膨化致死毒素（*cdt*）遺伝子は検出されなかったが、*P. alcarifaciens* と *P. rusutigianii* のそれぞれ 1 株で 3 型分泌装置（T3SS）の *pSpaL* 遺伝子が検出された。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。増菌前の鶏肉 1 検体で *Providencia* 属菌が 2.3×10^4 CFU/g となった検体があったが、それ以外は検出下限以下（ $<1.0 \times 10^3$ CUF/g）であった。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について検証した。鶏肉においては大腸菌群と *Providencia* 属菌汚染と相関性を示す傾向にあり、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な差を示さなかった。病原因子保有の *Providencia* 属菌（*cdt*, *invA* [T3SS] 遺伝子）と非保有 *Providencia* 属菌を検出できる *Providencia*-multiplex PCR（*P*-multiplex PCR）を構築した。食肉の *Providencia* 属菌汚染実態を把握する手法として、緩衝ペプトン水で増菌後、*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、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。本菌は現在までに少なくとも 11 菌種報告されている。その中でも *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の患者から分離されている。遡り調査

により、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も明らかとなっている。以後、2002 年に東京都で、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。我々の研究グループは岡山県の小児下痢症患者便から *P. alcalifaciens*、*P. rettgeri* や *P. rustigianii* を分離し、新たな病原因子として細胞膨化致死毒素

(CDT) や 3 型分泌装置 (T3SS) を見出し報告している。*Providencia* 属菌の他の病原因子として、細胞接着性・侵入性やウレアーゼ等も知られている。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十分に明らかにされていない。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、*Providencia* 属菌の感染源の一つとなりえる食肉(鶏肉、豚肉、牛肉)に着目し、我が国における *Providencia* 属菌の食肉汚染を検証した。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* 属菌の分離を試みた。分離菌の細菌学的性状を解析し、菌種同定を行った。また、*Providencia* 属菌の汚染と衛生指標菌である大腸菌群細菌数と相関性があるか、さらに病原性の *Providencia* 属菌と非病原性の *Providencia* 属菌を鑑別するための *P*-multiplex PCR 法の構築も試みた。

B. 研究方法

市販食肉からの *Providencia* 属菌の検出、分離と菌種同定

近隣のスーパーマーケットで購入した国産の食肉 149 検体(鶏肉 60 検体、豚肉 61 検体、牛肉 28 検体)を本研究に供した。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処理を行った。その後、37°C で 20 ± 2 時間静置培養し、本増菌培養液よりアルカリ熱抽出法にて DNA を抽出した。*Providencia* 属菌特異的 (*P*-16S rRNA) 遺伝子及び *Providencia* 属菌の *cdt* (*Pcdt*) 遺伝子を検出できる *P*-duplex PCR で *Providencia* 属菌及び *Pcdt* 遺伝子を検出した。さらに、T3SS の構成遺伝子である *pSpaL* 遺伝子についても PCR で調べた。

PCR にて *P*-16S rRNA 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、その後、分離菌の生化学性状試験を行い菌種を同定した。

Providencia 属菌の鶏肉及び豚肉の汚染菌数定量

市販の鶏肉と豚肉をそれぞれ 15 検体購入し、それぞれ 25 g を無菌的に切り出し 9 倍量の緩衝ペプトン水に加えて揉み出し液を作製した。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。揉み出し液を 10 倍濃縮し、*Providencia* 属菌に特異的なジャイレーズ遺伝子を標的とした real-time PCR で菌数を定量した。また揉み出し液を 37°C、18 時間培養後、*P*-duplex PCR で *Providencia* 属菌を検出した。

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 検体と豚肉 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。揉みだし液より、マッコンキー寒天培地を用い平板塗抹法にて大腸菌群数を求めた。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、*P*-duplex PCR にて、*Providencia* 属菌の検出を行った。さらに、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、現在知りうる全ての *P*-*cdt* 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、陽性菌株として 4 株の *P. alcalifaciens* [(*cdt* (-) /*invA* (-) 1 株, *cdt* (-) /*invA* (+) 1 株, *cdt* (+) /*invA* (+) 2 株]、2 株の *P. rustigianii* [(*cdt* (+) /*invA* (+)]、2 株の *P. rettgeri* [(*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 株で、計 17 株を用いて 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

市販食肉からの *Providencia* 属菌の検出、分離と菌種同定

供試した食肉 149 検体中、81 検体 (54%) で *Providencia* 属菌特異的 PCR が陽性となった。各食肉における検出率は鶏肉 88% (53/60)、豚肉 36% (22/61)、牛肉 21% (6/28) 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 81 検体から *Providencia* 属菌の分離を試みた。鶏肉 50 (94%) 検体、豚肉 16 (73%) 検体、牛肉 6 (100%) 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結果、鶏肉では 26 検体から *P. alcalifaciens* が、30 検体から *P. rustigianii* が分離された。うち 6 検体では *P. alcalifaciens* と *P. rustigianii* の 2 菌種が同時に分離された。豚肉では 10 検体から *P. alcalifaciens* が、3 検体から *P. rustigianii* が、3 検体から *P. vermicola* が分離された。牛肉では 1 検体から *P. alcalifaciens* が、1 検体から *P. rustigianii* が、3 検体から *P. rettgeri* が、2 検体から *P. vermicola* が、2 検体から *P. huaxiensis* 分離された (表)。

Providencia 属菌の鶏肉及び豚肉の汚染菌数定量

緩衝ペプトン水での増菌前後の鶏肉、豚肉における *Providencia* 属菌数を定量した。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 検体全てで検出下限以下 ($<1.0 \times 10^3$ CFU/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。

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ところ、平均値はそれぞれ $1,146.9 \pm 1,217.7$ CFU/g または 362.1 ± 452.2 CFU/g であった。一方で *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 (図 1) または $878.9 \pm 2,751.7$ CFU/g であった (図 2)。鶏肉では *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。一方、豚肉では *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、陽性 8 株は全て予想された増幅産物を、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* 属菌をスパイク後、増菌した際の検出下限は、RAC2016A [*cdt* (-) /*invA* (-)], RAC2016B 株 [*cdt* (-) /*invA* (-)] は 1 CFU をスパイクしたものの、RAC2212A 株 [*cdt* (+) /*invA* (+)] は 10 CFU をスパイクしたもので検出

された。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 *cdt* 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

タイでは鶏肉 58% (15/26)、豚肉 64% (16/25)、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。我が国では鶏肉が特に高率 (88%) で *Providencia* 属菌に汚染されていた。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分離される *P. alcalifaciens* や *P. rustigianii* 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。

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。さらに、食肉の *Providencia* 属菌汚染と衛生指標菌（ここでは大腸菌群）との間に相関性があるかどうかを調べた。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 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細菌数と相関性がある傾向が認められたが、本研究では、豚肉、鶏肉においても衛生指標菌である大腸菌群が *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。鶏肉、豚肉においても今後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* 属菌汚染を迅速にモニタリングできる可能性が示めされた。

E. 結論

HACCP が導入された後においても、我が国の食肉の多くは *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。

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ことが必要である。一方、より簡便で迅速な方法として本研究で構築した *P*-multiplex PCR を用いることで病原性と非病原性の *Providencia* 属菌を鑑別する事ができ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

1. 論文

- 1) Hassan J., Awasthi S. P., Hatanaka N., Hoang P. H., Nagita A., Hinenoya A., Faruque S. M., Yamasaki S. Presence of functionally active cytolethal distending toxin genes on a conjugative plasmid in a clinical isolate of *Providencia rustigianii*. Infection and Immunity, 91(6), e00121-22, 2023.
- 2) Obi O. J., Hinenoya A., Awasthi S. P., Hatanaka N., Faruque S. M., Yamasaki S. Wild raccoons (*Procyon lotor*) as a potential reservoir of cytolethal distending toxin-producing *Providencia* strains in Japan. Microbiology Spectrum, 13(4), e02616-24, 2025.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) Obi John 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シア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

表 我が国の市販食肉における *Providencia* 属菌の汚染状況及び汚染菌種

肉種	<i>Providencia</i> -16S PCR 陽性数 (%)	<i>cdt</i>	分離数 (%)	菌種ごとの分離数					複数菌種 分離検体
				<i>P. al</i>	<i>P. ru</i>	<i>P. re</i>	<i>P. ve</i>	<i>P. hu</i>	
鶏肉 (n=60)	53 (88)	0	50 (94)	26	30*	0	0	0	6
豚肉 (n=61)	22 (36)	0	16 (73)	10*	3	0	3	0	0
牛肉 (n=28)	6 (21)	0	6 (100)	1	1	3	2	2	3
計 (n=149)	81 (54)	0	72 (89)	37	34	3	5	2	10

*T3SS 遺伝子クラスターに存在する *pSpaL* 遺伝子が PCR それぞれ 1 検体で検出

P. al: *P. alcalifaciens*

..

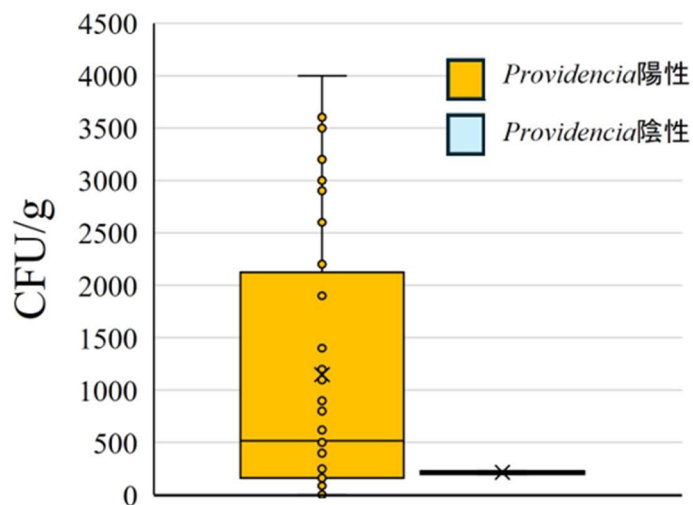


図1、*Providencia*属菌陽性、陰性鶏肉検体における大腸菌群数

*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

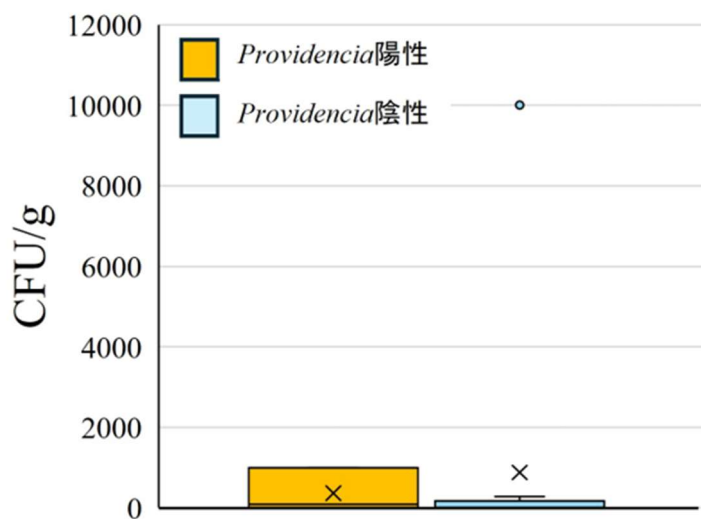


図2、*Providencia*属菌陽性、陰性豚肉検体における大腸菌群数

*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