科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号: 8 4 4 0 7 研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2013~2015

課題番号: 25750069

研究課題名(和文)国内で流通する非加熱摂取食品に潜在する細菌学的健康リスクの解明

研究課題名(英文) Enterobacteriaceae and foodborne bacterial pathogen contamination of ready-to-eat

foods retailed in Japan

研究代表者

原田 哲也 (Harada, Tetsuya)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・研究員

研究者番号:70516723

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):2013年4月から2015年5月に入手した非加熱摂取食品282検体(浅漬96検体、洋生菓子88検体、魚介類加工品98検体)について、腸内細菌科菌群および食中毒起因菌の汚染実態調査を行った。腸内細菌科菌群は、浅漬92検体、洋生菓子39検体、魚介類加工品74検体より分離された。また、エンテロトキシン産生性黄色ブドウ球菌が浅漬2検体、洋生菓子2検体、魚介類加工品1検体より分離された。また、腸内細菌科菌群の菌種同定により、院内・日和見感染の原因となる細菌の汚染が明らかとなった。さらに、第三世代セファロスポリン系、ニューキノロン系抗生剤あるいはホスホマイシンに耐性を示す株の汚染が明らかとなった。

研究成果の概要(英文): To investigate the bacterial contamination of ready-to-eat (RTE) foods retailed in Japan, the prevalence of Enterobacteriaceae and foodborne bacterial pathogens in 96 Japanese light pickles, 88 western-style sweets, and 98 Japanese seafood products was detected in this study. Enterobacteriaceae was isolated from 92 (95.8%) Japanese light pickes, 39 (44.3%) western-style sweets, and 74 (75.5%) Japanese seafood products. Additionally, enterotoxin-producing Staphylococcus aureus strains were isolated from 2 Japanese light pickes, 2 western-style sweets, and 1 Japanese seafood product. On the other hand, the prevalence of C. braakii/freundii, E. cloacae complex, E. coli, K. oxytoca, K. pneumonia, P. mirabilis, and S. marcescens in these RTE foods was determined by bacterial species identifications of Enterobacteriaceae. Moreover, the third-generation cephalosporin-, FOM-, or quinolone-resistant strains were detected by antimicrobial disk susceptibility tests.

研究分野: 食品微生物

キーワード: 非加熱摂取食品 ready-to-eat foods bacterial contamination

1.研究開始当初の背景

国内には冷蔵保存および冷蔵輸送技術の 進歩により、日本独自の食文化を反映した食 品も含め、多種多様な非加熱摂取食品が流通 している。これらの大部分で十分な衛生管理 が実施されておらず、また、食中毒菌を含む 汚染指標菌の汚染実態が不明で、その危険性 が把握されていない。

2.研究の目的

本研究では国内に流通する浅漬、洋生菓子、 魚介類加工品について、腸内細菌科菌群なら びに食中毒菌(黄色プドウ球菌、サルモネラ 属菌、毒素原性大腸菌あるいは腸管出血性 大腸菌)の汚染実態調査を実施する。また、 分離株の菌種同定および薬剤感受性試験を 実施し、非加熱摂取食品に由来する細菌のヒ トへの健康危害を検討することを目的とす

さらに、海外渡航者が摂食する国外産の非加熱摂取食品の一つとして、ベトナムで流通するコショウについても、腸内細菌科菌群およびサルモネラ属菌の汚染実態調査を行い、分離株の薬剤感受性を検討する。

3.研究の方法

(1)供試検体

2013 年 4 月から 2015 年 5 月までに大阪府内 で入手した非加熱摂取食品 282 検体(浅漬 96 検体、洋生菓子 88 検体、魚介類加工品 98 検 体)を供試した。

また、2014 年 2 月から 2015 年 3 月にベトナム国内で小売りされたコショウ 84 検体を供試した。なお、コショウについては腸内細菌科菌群定性および定量試験、サルモネラ属菌定性試験および分離株の薬剤感受性試験と耐性機構の検討のみを実施した。

(2) 腸内細菌科菌群の定性および定量試験 腸内細菌科菌群の定性および定量試験は、国際標準化機構の定める方法(ISO21528)に準 じて行った。また、ベトナムで入手したコショウについては、さらに定量試験も実施した。 なお、定量下限値は1.5×10² CFU/g とした。

(3)食中毒菌の分離

(3-a)黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌の分離は米国食品医薬品局の定める方法に若干の変更を加え、実施した。定型集落をTrypticase Soy 寒天(TSA)斜面培地で純培養し、femA遺伝子陽性およびPSラテックス(栄研)陽性を示した株を黄色ブドウ球菌とした。

(3-b)サルモネラ属菌

検体 10g または 25g を無菌的に秤量し、9 倍量の BPW(栄研)を加えた。ホモジナイズ後に 35±1 で 22±2 時間培養後、0.1ml の BPW 培養液を 10ml の Rappaport-Vassiliadis Broth (RV) (日水)に加え、42±1 で 22±2 時間培養した。培養後、1 白金耳を XLD 寒天培地(栄

研) および BGS 寒天培地 (OXOID) にそれぞれ塗抹し、35±1 で一晩培養した。

なお、コショウについては ISO6579 に準じて 分離を行い、分離株については市販血清を用 いて血清型別を行った。

(3-c) 毒素原性大腸菌あるいは腸管出血性 大腸菌

検体 10g または 25g を無菌的に秤量し、9 倍量の Universal preenrichiment broth (UPB; BD)を加えた。ホモジナイズ後に 42 ± 1 で 22 ± 2 時間培養後、1 白金耳をマッコンキー寒天培地(BD)に塗抹し、 35 ± 1 で一晩培養した。培養後、濃厚発育部位についてスイープ PCR 法(1)によるエンテロトキシンおよび志賀毒素遺伝子のスクリーニングを行った。また、腸内細菌科菌群の菌種同定により Escherichia coli と同定された株については、リアルタイム PCR 法(2)により、志賀毒素遺伝子の保有を確認した。

(4) セフォタキシム(CTX) 耐性大腸菌群のスクリーニング

ベトナムで入手したコショウについては、 1mg/mICTX添加クロモアガーECC寒天培地(和 光)を用いて、第三世代セファロスポリン耐 性大腸菌群のスクリーニングを実施した。

(5)腸内細菌科菌群の菌種同定

(5-a)生化学的性状

腸内細菌科菌群分離株について API20E(ビオメリュー)を用いて、生化学的性状を確認した。

(5-b)質量分析

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)を用いて、質量分析による菌種同定を実施した。

(5-c)種特異的遺伝子検出法

生化学的性状あるいは質量分析のデータに 基づき、種特異的遺伝子検出法による菌種同 定を行った。

E. coli、K. oxytoca、K. pneumoniae、P. mirabilis、S. marcescens、C. sakazakiiについては既報プライマーを用いて PCR 法を実施した。また、C. freundii/braakii については既報のプライマーおよびプローブを用いてリアルタイム PCR 法を実施した(3-8)。

また、*E. cloacae* complex については *hsp60* 遺伝子配列解析により菌種同定を行った(9)。

(6)薬剤感受性試験

(6-a)腸内細菌科菌群

浅漬、洋生菓子、魚介類加工品由来株については、Clinical Laboratory Standard Institute のディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク(BD)を用いて実施した。供試薬剤はABPC、SM、TC、KM、CP、GM、ST、CPDX、CTX、CPFX、NA、FOM、IPM、MEPM、AMK、CFX の 16 剤を使用した。一方、コショウ類については、ABPC、SM、TC、KM、CP、GM、

ST、CPFX、NA、FOM、CTX、CFX の 12 剤を使用した。また、CTX に中間以上を示した株については、CAZ、CPDX、MEPM を追加検討した。CTX、CAZ あるいは CPDX に中間以上を示した株については、クラブラン酸を加えたディスクを用いて、基質拡張型 - ラクタマーゼ(ESBL)産生性を確認した。また、ボロン酸を加えたディスクを用いて、AmpC 型 - ラクタマーゼ産生性を確認した。

さらに CPFX に中間以上を示した株については CPFX および NA の E-test(ビオメリュー)を行い、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。なお、FOM ディスクについては、E. cloacae complex および K. pneumoniae は阻止円 8mm以下(10)、それ以外の腸内細菌科菌群では取扱い説明書に従い 10mm 以下をそれぞれ耐性と判定した。

(6-b)黄色ブドウ球菌

ディスク法の供試薬剤は ABPC、GM、KM、AMK、TC、CP、ST、CTX、CPDX、IPM、MEPM、CPFX、PC、EM、DC、MINO、CAZ、CFX、LVX、NOR、RIF、VAN、TEIC、LZD の 24 剤を使用した。

(7)薬剤耐性遺伝子の検出

ESBL の表現型を示した株については、既報に 従い ESBL 遺伝子検出を行った(11)。また、 AmpC 産生性を示した株については、 Pérez-Pérez らのプライマーを用い(12)、プ ラスミド性 AmpC 遺伝子の同定を行った。 FOM についてディスク法で耐性と判定された に つ L١ fosA-151F(CTTTCGGCGGCTATCTGAAA) および fosA-718R(AGCCTCGTCTGAGGTAAACA) fosA-230F(CACGGCGTGGTTTATGTTCA) および fosAR2(GGAGTACCTGTGCAATCA)(13)にて fosA 遺伝子を、fosA3/4、fosC2遺伝子は既報のプ ライマー(14、15)を用いて検出を行った。 CPFX にディスク法で中間以上を示した株に ついてはプラスミド性のキノロン耐性遺伝 子の検出を行った。遺伝子陽性株については、 シークエンス解析を行った。

(8) gyrA および parC におけるキノロン耐性決 定領域の解析

CPFX にディスク法で中間以上を示した株については、既報のプライマー (16)とparC-28F(CTGCATGAATTCACGGAAAA) およびparC-442R(CGAAGTTTGGCACCCAGTC)を用いてダイレクトシークエンス解析を行った。得られた塩基配列データは、GenBank に登録される参照配列と比較した。

(9)黄色ブドウ球菌病原因子の検出

分離された黄色ブドウ球菌について、マルチプレックス PCR 法 (17)を用いて病原因子の検出を行った。さらに、エンテロトキシン遺伝子陽性株については、エンテロトックス-F(栄研)によるエンテロトキシン産生性試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌科菌群定性試験および定量試験 腸内細菌科菌群は、浅漬 96 検体中 92 検体 (95.8%)、洋生菓子 88 検体中 39 検体(44.3%)、魚介類加工品 98 検体中 74 検体(75.5%)より分離された(表)。一方、ベトナムで入手したコショウについては、84 検体中 78 検体 (92.9%)から腸内細菌科菌群が検出された。また、定量試験では 62 検体が定量下限値以上で、1.5×10²-1.0×10³ CFU/g が 4 検体、1.0×10³-1.0×10⁵ CFU/g が 6 検体であった(図)。

(2)食中毒起因菌の分離

(2-a)浅漬、洋生菓子、魚介類加工品 黄色ブドウ球菌が浅漬 6 検体、洋生菓子 7 検 体、魚介類加工品 3 検体より分離され、この うち A 型エンテロトキシン産生株が浅漬 1 検 体、C 型エンテロトキシン産生株が洋生菓子 1 検体よび魚介類加工品 1 検体、A 型まンテロトキシン産生株が洋生菓子 1 検体より分離された。また、洋生菓子 1 検体より分離された C 型エンテロトキシン耐性 は mecA 遺伝子陽性で、メチシリン耐性ら ブドウ球菌(MRSA) と考えられた。さらの株は TSST-1 遺伝子も保有していた。一方、 黄色ブドウ球菌以外の食中毒起因菌は分離 されなかった。

(2-b) コショウ

サルモネラ属菌が黒コショウ 5 検体より分離された。このうち2 株は *Salmonella* Weltevreden で、さらに、*S.* Gaminara、*S.* Virchow、*S.* Hvittingfoss が各1 株ずつ分離された。薬剤感受性試験の結果、これらの株はすべての供試薬剤に感受性であった。

(3)腸内細菌科菌群の菌種同定および薬剤感 受性

(3-a)浅漬(n=96 検体)

C. freundii/braakii、E. cloacae complex、E. coli、K. oxytoca、K. pneumoniae、S. marcescens の検出率はそれぞれ 45.8%(44 検体)、26.0%(25 検体)、6.3%(6 検体)、4.2%(4 検体)、14.6%(14 検体)、20.8%(20 検体)であった(表)。薬剤感受性試験において、CTX あるいは CPDX に中間以上を示した株は、C. freundii/braakii で 17 株、E. cloacae complex で 2 株であり、CPFX には C. freundii/braakii の 4 株および E. cloacae complex の 2 株が中間以上を示した。また、FOM 耐性株は E. cloacae complex で 8 株、K. oxytoca で 1 株、K. pneumoniae で 1 株であった。

(3-b)洋生菓子(n=88 検体)

E. cloacae complex、 K. oxytoca、 K. pneumoniae、S. marcescens の検出率はそれぞれ22.7%(20 検体)、3.4%(3 検体)、10.2%(9 検体)、2.3%(2 検体)であった(表)。薬剤感

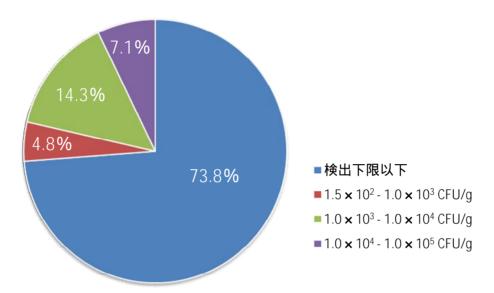


図. コショウにおける腸内細菌科菌群定量試験結果

表. 各検体からの菌種別検出率									
供試検体	腸内細菌科菌群定性	C. freundii/braakii	E. cloacae complex	E. coli	K. oxytoca	K. pneumoniae	S. marcescens	P. mirabilis	C. sakazakii
浅漬(n=96検体)	95.8% (92検体)	45.8% (44検体)	26.0% (25検体)	6.3% (6検体)	4.2% (4検体)	14.6% (14検体)	20.8% (20検体)	ND	ND
洋生菓子(n=88検体)	44.3% (39検体)	ND	22.7% (20検体)	ND	3.4% (3検体)	10.2% (9検体)	2.3% (2検体)	ND	ND
魚介類加工品(n=98検体)	75.5% (74検体)	13.3% (13検体)	13.3% (13検体)	6.1% (6検体)	1.0% (1検体)	2.0% (2検体)	7.1% (7検体)	1.0% (1検体)	ND
ベトナム・コショウ(n=84検体)									
ISO21528	92.9% (78検体)	ND	35.7% (30検体)	14.3% (12検体)	ND	42.9% (36検体)	ND	ND	22.9% (19検体)
CTX耐性大腸菌群スクリーニング	ND	ND	23.8% (20検体)	ND	ND	9.5% (8検体)	ND	ND	1.2% (1検体)

受性試験において、FOM 耐性株は E. cloacae complex で 9 株、K. oxytoca で 1 株、K. pneumoniae で 2 株であった。

(3-c)魚介類加工品(n=98 検体)

C. freundii/braakii、E. cloacae complex、E. coli、K. oxytoca、K. pneumoniae、S. marcescens、P. mirabilisの検出率はそれぞれ13.3%(13 検体)、13.3%(13 検体)、6.1%(6 検体)、1.0%(1 検体)、2.0%(2 検体)、7.1%(7 検体)、1.0%(1 検体)であった(表)。薬剤感受性試験において、CPDX に中間以上を示した株は、C. freundii/braakii で2株、S. marcescensで1株であった。また、FOM 耐性株はE. cloacae complexで2株、K. oxytocaで1株、K. pneumoniaeで2株であった。(3-d)コショウ(n=84)

ISO21528 に準じた方法では、*E. cloacae* complex、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*C. sakazakii* の検出率はそれぞれ 35.7%(30 検体)、14.3%(12 検体)、42.9%(36 検体)、22.6%(19 検体)であった(表)。薬剤感受性試験において、CTX に中間以上を示した株は、*E. cloacae* complex で 1 株のみであった。また、FOM 耐性株は *E. cloacae* complex で 11 株、*K. pneumoniae* で 18 株、*C. sakazakii* で 11 株であった。

一方、CTX 耐性大腸菌群のスクリーニングでは、*E. cloacae* complex、*K. pneumoniae*、*C. sakazakii* の検出率はそれぞれ 23.8%(20 検体)、9.5%(8 検体)、1.2%(1 検体)であった(表)。薬剤感受性試験において、CTX、CAZ あるいは CPDX に中間以上を示した株は、*E. cloacae* complex で 7 株、*K. pneumoniae* で 7 株であった。また、CPFX には *E. cloacae* complex の 1 株および *K. pneumoniae* の 2 株が中間以上を示した。FOM 耐性株は *E. cloacae* complex で 6 株、*K. pneumoniae* で 2 株であった。

(4) 第三世代セファロスポリン、ニューキノロン、FOM 耐性機構

(4-a)浅漬由来株

CTX あるいはCPDX に中間以上の耐性を示した *C. freundii/braakii* 17 株および *E. cloacae* complex 2 株について、CTX、CAZ、CPDX のそれぞれにボロン酸を加えたディスクを用いて、AmpC 型 -ラクタマーゼ産生性を確認したところ、すべての株で AmpC 産生性の表現型が確認された。また、AmpC 遺伝子の検出により、*C. freundii/braakii* 16 株は、CIT グループに含まれる AmpC 遺伝子を保有することが明らかとなった。一方、残りの 3 株については、増幅産物は得られなかった。

CPFX に中間以上を示した C. freundii/braakiiの4株および E. cloacae complexの2株について、gyrAおよび parC におけるキノロン耐性決定領域のアミノ酸置換を検討したところ、すべての株で GyrAの83番目のアミノ酸に置換が確認され、さらに、C. freundii/braakiiの2株およびE.

cloacae complex の 1 株では、ParC の 80 番目のアミノ酸でも置換がみられた。

FOM に耐性を示した *E. cloacae* complex 5 株では *fosA* 遺伝子陽性であったが、それ以外の株では、耐性遺伝子は検出されなかった。 (4-b)洋生菓子由来株

FOM に耐性を示した E. cloacae complex 3 株では fosA 遺伝子陽性であったが、それ以外の株では耐性遺伝子は検出されなかった。

(4-c)魚介類加工品由来株

CPDX に 中 間 以 上 を 示 し た *C. freundii/braakii* 2 株および *S. marcescens* 1 株について、すべての株で AmpC 産生性の表現型が確認された。しかしながら、今回の検討で用いた PCR では、耐性遺伝子は確認されなかった。

FOM に耐性を示した E. cloacae complex 1 株では fosA 遺伝子陽性であったが、それ以外の株では耐性遺伝子は検出されなかった。

(4-d)コショウ由来株

ISO21528 に準じた方法で分離された腸内細菌科菌群において、CTX に中間を示した E. cloacae complex で 1 株は、AmpC 産生性の表現型が確認された。しかしながら、今回の検討で用いた PCR では、耐性遺伝子は確認されなかった。また、FOM に耐性を示した E. cloacae complex 6 株では fosA 遺伝子陽性であったが、それ以外の株では耐性遺伝子は検出されなかった。それゆえ、K. pneumoniae および C. sakazakii の FOM 耐性株では、今回の検討とは別の耐性機構が関与していると考えられた。

CTX 耐性大腸菌群のスクリーニングで分離された CTX、CAZ あるいは CPDX に中間以上を示した K. pneumoniae 7 株のうち、4 株はクラブラン酸添加ディスクによる検討で、ESBL 産生性の表現型が確認された。これらについて ESBL 遺伝子を検討したところ、3 株が $bIa_{CTX-M-15}$ 保有株で、1 株が bIa_{TEM-1} および bIa_{SHV-12} 保有株であった。残りの3 株のうち、2 株は AmpC 産生性の表現型が確認され、 bIa_{DHA-1} が検出された。残りの1 株は、 $bIa_{CTX-M-14}$ および bIa_{DHA-1} 保有株であった。CTX、CAZ あ

および bIa_{DHA-1} 保有株であった。CTX、CAZ あるいは CPDX に中間以上を示した E.~cIoacae complex で 7 株はすべて AmpC 産生性の表現型が確認された。このうち 1 株は bIa_{MIR-7} 保有株であったが、残りの 6 株では、耐性遺伝子は確認されなかった。

また、CPFX に中間以上を示した *E. cloacae* complex 1 株では *qnrS1* が検出され、*K. pneumoniae*の2株は、*qnrB1と aac(6')-Ib-cr* が検出された。

FOM に耐性を示した *E. cloacae* complex 4株では *fosA* 遺伝子陽性であったが、それ以外の株では耐性遺伝子は検出されなかった。

今回の検討により、市販される浅漬、洋生菓子、魚介加工品の高率な腸内細菌科菌群汚染が明らかとなった。また、エンテロトキシン産生性黄色ブドウ球菌や、ヒトの臨床上重要

な第三世代セファロスポリン系あるいはニューキノロン系抗生剤に耐性を示す株の汚染は、これら非加熱摂取食品の喫食に伴うヒトの健康リスクになりうると考えられた。また、ベトナムで入手可能であったコショウについては、サルモネラ属菌の汚染や ESBL産生菌、あるいはプラスミド性のニューキノロン耐性遺伝子や FOM 耐性遺伝子保有株の汚染が明らかとなった。よって、これらを原料とする非加熱摂取食品についても、衛生的な取り扱いが食品衛生上、重要であると考えられる。

引用文献

(1) Harada, et al. (2013) Jpn J Infect Dis, 66, 530-533. (2) Harada, et al. (2015) J Food Prot. 78, 1800-1811, (3) Padmavathy. et al. (2012) Curr Microbiol, 65, 44-53. (4) Kovtunovych, et al. (2003), Research in Microbiology, 154, 587-592. (5) Zhang, et al. (2013) Ann Microbiol, 63, 683-689. (6) Saikaly et al. (2007) AEM, 73, (2013) 6557-6565. **(7)**Huang et al. Molecular and Cellular Probes, 27, 15-18. (8) Kaclíková et al. (2005) Current Microbiology, 51, 229-232. (9)Hoffmann et (2003)AEM. 69. 5306-5318. (10) Perdigão-Neto, et al. (2014) AAC, 58, 1763-1767. (11) Nguyen et al. (2016) BioMed Research International, Article ID 8182096 (12) Pérez-Pérez et al. (2002) JCM, 40, 2153-2162. **(13)**Xu et al. (2011) Letters in Applied Microbiology, 52, 427-429. (14) Nakamura et al. (2014) JCM, 52, 3175-3179. (15) Hou, et al. (2012) AAC, 56, 2135-2138. **(16)**Weigel et al. (1998) AAC, 42, 2661-2667. (17) Mehrotra et al. (2000) JCM, 38, 1032-1035.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

[雑誌論文](計1件)

Harada T., Iguchi A., Iyoda S., Seto K., Taguchi M., Kumeda Y. Multiplex Real-Time PCR Assays for Screening of Shiga Toxin 1 and 2 Genes, Including All Known Subtypes, and Escherichia coli 026-, 0111-, and 0157-Specific Genes in Beef and Sprout Enrichment Cultures. J Food Prot 78, 1800-1811 (2015), 查 読 有 , doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-050

[学会発表](計3件)

・原田哲也, 勢戸和子, 田口真澄: すべての VT サブタイプを検出するためのリアルタイム PCR 法の確立と食品検査への応用, 第35回日本食品微生物学会学術総会,大阪(2014)

·<u>原田哲也</u>, 神吉政史, 田口真澄, 久米田

裕子:浅漬における腸内細菌科菌群汚染実態と分離株の薬剤感受性, 第36回日本食品微生物学会学術総会, 神奈川(2015)

・山根諒子, <u>原田哲也</u>, 井澤恭子, 河原隆二, 久米田裕子, 伊勢川裕二, 山本容正: ベトナムで流通する香辛料の腸内細菌科菌群汚染実態と分離株の薬剤耐性, 第36回日本食品微生物学会学術総会, 神奈川(2015)

[図書](計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計件)

名称: 発明者: 権類: 種号:

出願年月日: 国内外の別:

取得状況(計件)

名称: 発明者: 権利者: 種類: 番号: 取得年月日: 国内外の別:

〔その他〕 ホームページ等

- 6.研究組織
- (1)研究代表者

原田 哲也 (HARADA, Tetsuya) 大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌 課・主任研究員

研究者番号:70516723

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: