

食品及び食品製造施設から検出された大腸菌群の解析

柳本恵太 高村知成 矢澤 彩 野田妙子

Microbiological Surveillance of Coliform Bacteria Isolated
from Foods and Swabs from Food-related Facilities

Keita YANAGIMOTO, Chisei TAKAMURA, Aya YAZAWA and Taeko NODA

キーワード：収去検査、病原遺伝子、指導基準

大腸菌群は、グラム陰性の無芽胞桿菌で 48 時間以内に乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性の菌群と定義されている。古くから食品等における微生物学的状況を図る衛生指標菌として利用されており、現在でも食品指導基準で用いられている。検査法による分類であるため、大腸菌群には *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* など多くの腸内細菌科の細菌が含まれるが、糞便とは関係のない *Aeromonas* などもこれに含まれる。また、大腸菌群のなかで、44.5 で発育して乳糖を分解してガスを産生する菌群を糞便系大腸菌群、さらにそのうち IMViC 試験が「++--」のものが *E. coli* と分類されている。食品衛生検査指針(2015)¹⁾によると糞便系大腸菌群は、大腸菌の多くが 44.5 で発育して乳糖を分解することから、煩雑な IMViC 試験を行わずに大腸菌の存在を推定しようとする意図で考えられた菌群である。

山梨県食品の指導基準では加熱を必要としない和生菓子等にも大腸菌群が衛生指標菌として用いられている。この基準による収去検査では様々な食品が大腸菌群または *E. coli* 陽性となり、不良と判定されているが、これらの病原性及び菌種についての報告は少ない。

そこで本研究では収去検査およびふきとり検査から検出された大腸菌群および *E. coli* の下痢原性(病原遺伝子)の有無と菌種を明らかにし、衛生指標菌としての妥当性について検討した。

調査方法

1 材料

平成 27 年 4 月から平成 29 年 3 月の収去検査を対象として、大腸菌群または *E. coli* が陽性と判定された食品 42 検体 180 菌株(表 1)と、食品製造施設のふきとり検査において大腸菌群陽性と判定された 599 検体、および平成 28 年 4 月から 9 月のふきとり検査において大腸菌群が陽性と判定されたふきとり原液 254 検体を対象とした。

2 病原遺伝子の検索

病原遺伝子の検索には multiplex PCR 法²⁾を用いた。対象遺伝子は *stx1*, *stx2*, *eae*, *aggR*, *ipaH*, *invA* 及び LT, ST1a, ST1b をコードする遺伝子とした。食品及びふきとり検体については大腸菌群判定に用いた LB 培地 100 μ L を 10000 rpm で 5 分間遠心し、上清除去後、滅菌超純水に懸濁した。ふきとり原液については検体 1.5 mL を 10000 rpm で 5 分間遠心し、100 倍濃縮した。その後、100、10 分間の熱処理により溶菌し、遠心分離後、上清を DNA テンプレートとした。multiplex PCR による増幅産物は 3% アガロースゲルを用いた電気泳動を行うことにより対象遺伝子の有無を確認した。

表 1 大腸菌群または *E. coli* が陽性と判定された食品および菌株数

食品分類	食品 (陽性数)	株数	基準
アイスクリーム類	ソフトクリーム (5)	34	大腸菌群 乳等省令
洋生菓子	シュークリーム (3) ショートケーキ (3)	58	大腸菌群 衛生規範
	モンブラン (2) ロールケーキ (2)		
	フルーツ杏仁		
めん類	ゆでうどん (2) 生そば ゆでそば	7	大腸菌群 衛生規範
豆腐	豆腐 (3)	20	大腸菌群 県指導基準
和生菓子	大福 (4) さくらもち (3)	32	大腸菌群 県指導基準
	くさもち (2) かしわ餅 だんご		
そうざい	サラダ (5) ナムル ごま和え	25	<i>E. coli</i> 衛生規範
生食用食肉	馬刺し (2)	4	<i>E. coli</i> 衛生基準

3 菌種の同定

材料のうち平成 28 年 3 月から平成 29 年 3 月までに大腸菌群または *E. coli* が陽性と判定された食品 29 検体、108 株を対象とした。菌種の同定には API20 E(シスメックス・ビオメリュー)を使用した。なお、同一食品から同一菌種が同定された場合については 1 株のみを結果として採用した。

結 果

1 病原遺伝子の検索

大腸菌群または *E. coli* が陽性となった食品から病原遺伝子は検出されなかった。また、ふきとり検体で大腸菌群が陽性と判定された検体についても、病原遺伝子の検出はなかった。さらに、ふきとり原液についても病原遺伝子の検出はなかった。

2 菌種の同定

同定の結果、食品 29 検体、45 株が対象となった(表 2)。菌種は *Klebsiella pneumoniae* (31%) の検出が多く、次いで *Enterobacter cloacae* (16%) という結果となり、*Escherichia coli* (大腸菌) の検出は 13% だった(図 1)。

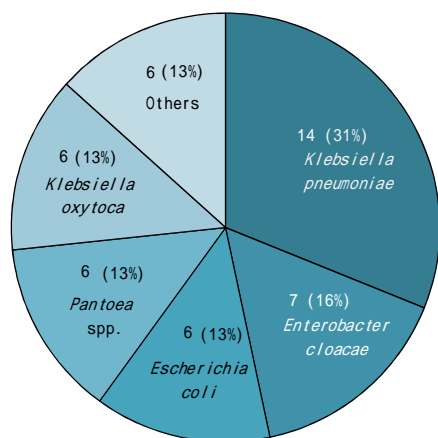


図 1 同定された菌株の内訳(株)

表 2 同定された大腸菌群の菌種と由来食品(株)

食品分類	菌種						計
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pantoea spp.</i>	others	
アイスクリーム類		3	1	3			7
洋生菓子	1	1	3	3	3		11
めん類	1	1		1	1		4
豆腐	2		1		1	2	6
和生菓子	1	2	1	4	1	2	11
そうざい	1			1			2
生食用食肉				2		2	4
計	6	7	6	14	6	6	45

考 察

本研究では様々な食品や食品製造施設のふきとり検体のうち大腸菌群または *E. coli* が陽性となった検体を対象に食中毒を引き起こす病原遺伝子の検出を行ったが、食品 42 検体、ふきとり 599 検体の全てにおいて病原遺伝子が検出されず、同定した大腸菌群のうち大腸菌はわずかに 13% であった。また、大腸菌群の増菌培養によりその他の細菌が検出されなくなっている可能性や、大腸菌群以外の広範な細菌の検出を考慮して増菌前のふきとり原液 254 検体の multiplex PCR 検査を行ったが、これらについても病原遺伝子は検出されなかった。大腸菌群のうち食中毒原因菌は主に下痢原性大腸菌であると思われるが、成松ら³⁾は生野菜サラダ類の基礎的細菌実態調査の結果、大腸菌はほとんど検出されず、病原性大腸菌は検出されなかったこと、大腸菌群数と大腸菌の有無の関連性はなかったことを報告している。また、大腸菌の存在を推定しようとする意図で考えられた糞便系大腸菌は、大腸菌群と同様に必ずしも腸管系病原菌の存在と関連するわけではないことが指摘されている¹⁾。Martinら⁴⁾は、乳製品での大腸菌群と食中毒菌との関連性が確認されないことから、大腸菌群は食中毒菌の指標としては不適切であると報告しており、金子⁵⁾は大腸菌群を生食用野菜の安全性の指標とすることは適切でないと指摘している。これらの報告は本研究結果と一致しており、これらのことから大腸菌群陽性の食品や、通常の商品製造施設の環境では病原遺伝子を有するような細菌が存在する可能性は非常に低いことが考えられ、大腸菌群が陽性であることと食中毒の危険性との相関性は非常に低いことが示唆された。

これまで収去検査で大腸菌群や *E. coli* が陽性となった検体は、調理工程等で汚染があった可能性が示唆され、衛生管理に不備のある危険な食品と判断されてきたと考えられる。しかし、大腸菌群の性状を示す菌はヒトや動物の糞便とは直接関係ない自然界にも広く分布しており、カット野菜由来の大腸菌群についてはほとんどが非大腸菌の土壌由来菌であ

ることが報告されている³⁾。刑部ら⁶⁾は *Enterobacter cloacae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca* は食肉、野菜に広く分布している菌種であると報告している。また、加藤ら⁷⁾は洋生菓子から検出された大腸菌群 16 株の菌種を同定したところ *Enterobacter cloacae*、*Klebsiella pneumoniae* が検出菌株の半分以上を占めており、大腸菌は検出されなかったと報告している。本研究においてもこれらの菌種が多く割合を占めていたことから、食品によっては大腸菌群や *E. coli* が陽性であったとしても原材料由来の細菌であるか調理環境由来の細菌であるかが判断できないことが考えられ、特に自然由来の原材料をそのまま用いており、加熱を必要としない和生菓子等では衛生指標菌として妥当でない可能性が高い。一方で加熱を必要とする食品については大腸菌群の有無により、適切な加熱を確認することができることも考えられる。

大腸菌群を指標とした食品指導基準では、大分県が従来の大腸菌群の検査法から、特定酵素基質法を利用した大腸菌の検出法に改正している³⁾。また、新潟県でも加熱食品群については適切な加熱の指標として大腸菌群を残しつつも、糞便汚染の指標菌については大腸菌群から特定酵素基質法による大腸菌に改正している⁸⁾。現在の山梨県食品の指導基準ではいくつかの食品について大腸菌群が指標として設定されているが、本研究の結果や既報^{1, 3-7)}によると適切に食品のリスクが評価されない可能性が考えられる。そのため、現行の検査法とのさらなる比較、検討を行い、特定酵素基質法を取り入れた大腸菌を検出する検査法を採用することで、本来危険性がなく、衛生管理とは関連のない不良検体を 8 割程度減少させることができると考えられる。今後はこれらの結果を考慮し指導基準および検査法を改正していく必要があると考えられる。

まとめ

食品から検出された大腸菌群および *E. coli* の大半は大腸菌ではなく食品原材料由来と考えられる非食中毒原因菌であり、調理環境中から検出された大腸菌群についても病原遺伝子を持たない非食中毒原因菌であることが確認された。これらのことから、山梨県食品の指導基準で採用されている大腸菌群についても、下痢原性大腸菌と同様の挙動を示すと考えられる大腸菌を指標とした検査法に改正することを検討する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 公益財団法人日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針微生物編, p, 172-173 (2015)
- 2) 日本特許, 山梨県, マルチプレックスシャトル PCR による食中毒原因菌の一括検出法, 特許第 5884108 号, 2016.2.19
- 3) 成松浩志ら: 大分県食品衛生指導基準の見直しに係る生サラダ類の基礎的細菌実態調査, 大分県衛生環境研究センター年報, 41, 27-32 (2013)
- 4) Martin NH et al.: The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods, *Front. Microbiol.*, 7, 1549. doi:10.3389/fmicb.2016.01549 (2016)
- 5) 金子賢一: 生食用野菜及び果物が媒介食品となる感染症, *食品衛生学雑誌*, 6, 417-425 (1999)
- 6) 刑部陽宅ら: 食肉、野菜および環境に分布する大腸菌群の分離と同定, *日本食品微生物学雑誌*, 20, 197-202 (2003)
- 7) 加藤玲ら: 各種食品の衛生規範および東京都措置基準に基づいた細菌学的検査成績 (平成 24~25 年度), *東京都健康安全研究センター年報*, 65, 113-119 (2014)
- 8) 新潟県福祉保健部生活衛生課: 「新潟県食品の指導基準」を改正しました, H18.5.2, [http://www.fureaikan.net/syokuinfo/02terakoya/tera03/pdf/tera03_02_00a.pdf] (最終検索日: 平成 29 年 4 月 24 日)