

漬物およびカット野菜製造施設の腸管出血性大腸菌汚染状況と
施設内分離株のバイオフィーム形成性

中村寛海、安福 潔*、小笠原 準、平山照雄、平井有紀、長谷 篤

Contamination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* among pickled or pre-cut vegetables
processing plants and biofilm formation of the isolates detected from these plantsHiromi NAKAMURA, Kiyoshi YASUFUKU*, Jun OGASAWARA,
Teruo HIRAYAMA, Yuki HIRAI and Atsushi HASE

Abstract

A large-scale foodborne outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 infection caused by pickled Chinese cabbage, 'hakusai', occurred in Japan. In response to this outbreak, the hygienic practices have been strengthened in pickled products, pre-cut vegetables and pre-cut fruits, which are not heated. We investigated EHEC contamination among 6 pickled or pre-cut vegetables processing plants in Osaka City. Consequently, no EHEC was detected in 40 swabs collected from the 6 plants. Fourteen isolates of 'Enterobacteriaceae' were detected from the 3 plants. Since we have identified these isolates, *Escherichia coli* was not detected. We have tried to measure biofilm forming ability of these isolates. The eight isolates from the 3 plants (*Raoultella terrigena*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp.) were capable of forming biofilm. All of these isolates were detected from a washing sink. It seems likely that the bacteria in washing sink is easy to form biofilms because of its wet environment.

Key words: enterohemorrhagic *Escherichia coli*, contamination, pickled vegetables processing plant, pre-cut vegetables processing plant, biofilm

I 緒言

国内の腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症の患者数は、1996年の集団事例以降減少することなく毎年約4000名で推移している[1]。検出される血清型としては依然としてO157が国内の主流であり、1999~2010年のEHEC感染症届出数約3,000~4,600例のうち約70%がO157であった[1]。EHECの原因食品としては牛肉とその加工品が最も多く、ウシはEHECの最も重要なリザーバーと考えられている[2]。ウシがEHECを保菌していることから、ウシの糞便に汚染された土壌や水を介して

野菜や果物が二次汚染されるため、野菜を原因とする事例も比較的多い[2]。野菜の中でも漬物を原因とするEHEC O157食中毒は、2000年6月に埼玉県で「かぶの浅漬け」、2002年6月に福岡で「きゅうりの浅漬け」、2005年10月に香川県で浅漬けによる事例が発生している[2]。最近では2012年8月に札幌市で「白菜浅漬け」によるEHEC O157食中毒が発生し、患者数169名、死者数8名の大規模事件となった。本事件を受け、同年10月に浅漬の衛生管理強化を目的として、昭和56年に定められた「漬物の衛生規範」改正の通知が出された[3]。本通知の留意事項として、加熱せずに喫食する

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

*大阪市保健所 食品衛生監視課

〒545-0051 大阪市阿倍野区旭町1-2-7-1000

Osaka City Public Health Office

1-2-7-1000, Asahi-cho, Abeno-ku, Osaka 545-0051, Japan

カット野菜及びカット果物製造施設の衛生管理も徹底することとしている。

一方、微生物の存在形態としてバイオフィームが注目されている。バイオフィームとは、微生物が様々な物質表面に付着・増殖して菌体外多糖類を分泌し、それらに取り囲まれて存在する微生物の集合体を指す。バイオフィームを形成した細菌は、通常の遊離状態に比べて乾燥環境や抗菌剤への抵抗性を示す[4]。大腸菌や大腸菌群の中にはこのようなバイオフィーム形成細菌も含まれていることから[5]、漬物やカット野菜等のように非加熱で喫食する食品を製造する施設におけるこれらの細菌のバイオフィーム形成は食品衛生上望ましくない。

本研究では、大阪市内の漬物およびカット野菜製造施設におけるEHEC汚染状況を調べるとともに、施設内から腸内細菌科菌群として分離された菌株を同定し、これらの菌株のバイオフィーム形成性について調べることを目的とした。

II 材料と方法

1) 調査期間

平成24年11月～平成25年1月の間に保健所食品衛生監視課が大阪市内の漬物およびカット野菜製造施設6施設、すなわち、J社、M社、A社、S社、L社、R社から採取し、当研究所に搬入したふきとり水を検査対象とした。これらから分離された菌株について、菌種の同定およびバイオフィーム形成試験を実施した。

2) ふきとり水の細菌検査法

(1) 細菌数(生菌数)、腸内細菌科菌群の測定

施設内をふきとった綿棒を7mLの緩衝ペプトン水(BPW)(ニッスイ)が入ったプラスチックチューブにとり、ふきとり水(原液)とした。原液1mLを9mLのBPWに加えて混和し、10倍希釈液を調製した。以下、同様の手順で適宜10倍段階希釈液を調製した。原液、10倍希釈液を各2枚の滅菌シャーレに分注し、あらかじめ溶解して約50℃に保温しておいたViolet red bile glucose agar (VRBG)培地(BD Difco)と標準寒天培地(ニッスイ)をシャーレに注いで混和し、固化させた。固化後、VRBG培地は重層した。VRBG培地は37±1℃で24±2時間、標準寒天培地は35±1℃で48±3時間培養した。標準寒天培地上に出現した全ての集落をカウントして生菌数とした。VRBG培地上の腸内細菌科菌群の典型集落を計測後、任意に5コロニーを釣菌して普通寒天平板培地(ニッスイ)に画線塗抹し、37±1℃で24±2時間培養した。培養後、普通寒天平板培地上の独立したコロニーを普通斜面培地およびブドウ糖寒天培地(関東化学)に移植した。普通斜面培地上の菌についてオキシダーゼ試験を実施し、オキシダーゼ陰性、ブドウ糖分解性陽性(培地黄変)と判定されたものを腸内細菌科菌群とした。

(2) 腸管出血性大腸菌の検出[6]

施設内をふきとった綿棒を7mLのmEC培地(栄研化学)が入ったプラスチックチューブにとり、そのまま42±1℃で22±2時間培養した。培養後、Loopamp腸管出血性大腸菌検出キット(栄研化学)による*stx*遺伝子の検出を行った。すなわち、増菌培養液50μLをキット添付のExtraction Solution for Foods 50μLと混和し、95℃で5分間加熱して遠心分離した上清をテンプレートDNAとした。キット添付のReaction Mix. VTと*Bst* DNA polymeraseを混和してテンプレートDNAを5μL添加し、Loopampリアルタイム濁度計(LA-320C)(栄研化学)を用いて*stx*遺伝子の検出を行い、判定した。

3) 分離菌株の同定

(1) 生化学性状およびキットによる同定

腸内細菌科菌群陽性となった菌株を普通寒天斜面培地に広げ、TSI培地(ニッスイ)、LIM培地(ニッスイ)、SC培地(ニッスイ)に移植して、これらの培地上の性状を確認するとともに、API20E(シスメックス・ビオメリュー)を用いて添付の説明書に従って菌種の同定を実施した。

(2) 菌株の塩基配列解析と相同性検索による菌種同定

腸内細菌科菌群陽性となった14株について、16S rRNA遺伝子(16S rDNA)の塩基配列(シーケンス)を解読し、そのシーケンスとデータベース上のシーケンスとの相同性検索により菌種同定を試みた。すなわち、BHI培地で37℃、18時間培養後の菌液からDNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。16S rDNAはBacterial 16S rDNA PCR Kit(タカラバイオ)を用いて増幅し、得られた約1.5kbの増幅産物をQIA quick PCR purification kit(QIAGEN)で精製した。キット添付の4種プライマー(F1、F2、R1、R2)とBigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer(Life Technologies, USA)で当該領域のシーケンスを解読した。相同性検索はEMBL-EBIが提供するFASTA-Nucleotide similarity search(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>)を用いて行った。

4) 分離菌株のバイオフィーム形成試験[7]

3)で腸内細菌科菌群として同定された菌株について、バイオフィーム形成試験を行った。すなわち、分離菌株を5mLのミュラーヒントン(MH)培地(BD Difco)に移植し、37℃で20時間回転培養(100回/min)を行った。培養後メニスカス付近のガラス面へのバイオフィーム(菌膜)形成を肉眼で観察した。陽性コントロールとして腸管凝集付着性大腸菌V343株を使用し、形成された菌膜を比較し、判定した。

Ⅲ 結果

1) 漬物およびカット野菜製造施設の細菌汚染状況

表1に今回調査を行った6施設の漬物およびカット野菜製造施設における腸管出血性大腸菌汚染状況と細菌数および腸内細菌科菌群の検査結果を示した。1施設から6あるいは7検体をふきとった。腸管出血性大腸菌は全ての検体で陰性であった。腸内細菌科菌群は1施設(A社)の1検体(脱水機内部)で 3.3×10^3 cfu/mL検出されたのみで他は全て30未満であった。30未満であったが腸内細菌科菌群が検出された検体が4検体あり、これらは表中に推定値として菌数を示した。A社の3検体(脱水機内部、予備洗浄用の2槽シンク、

スライサーガイド部)のふきとり水から $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL、S社の1検体(コンベアガイド)から 3.3×10^6 cfu/mLの細菌数が検出された。

2) ふきとり水から分離された腸内細菌科菌群の同定結果

3施設由来5検体から14株の腸内細菌科菌群を分離した。これらを市販のキットで同定するとともに、16S rDNAのシーケンスによる相同性検索を実施した(表2)。その結果、いずれの方法においても14株の中に大腸菌は含まれなかった。同定の結果、*Enterobacter*属で菌種の違いが見られたものの、属レベルでは全て結果が一致した。腸内細菌科菌群として検出された菌株は、

表1 漬物およびカット野菜製造施設における腸管出血性大腸菌汚染状況と細菌数および腸内細菌科菌群数

搬入日	施設名	検体の分類	検体名	検体番号	検査結果 ^{*1}		
					細菌数 (生菌数)	腸内細菌 科菌群数 ^{*2}	腸管出血 性大腸菌 ^{*3}
20121107	J社	ふきとり	合成樹脂製カゴ(黄色)	J-1	<30	<30	—
		ふきとり	合成樹脂製カゴ(青色)	J-2	<30	<30	—
		ふきとり	脱水機内部	J-3	<30	<30	—
		ふきとり	脱水機フタ	J-4	<30	<30	—
		ふきとり	洗浄室⇒カット室 移動窓内部	J-5	<30 (10)	<30	—
		ふきとり	洗浄シンク内部	J-6	3.1×10^2	<30 (15)	—
		ふきとり	まな板	J-7	<30	<30	—
20121107	M社	ふきとり	野菜洗浄消毒シンク1	M-1	44	<30	—
		ふきとり	野菜洗浄消毒シンク2	M-2	62	<30	—
		ふきとり	野菜洗浄消毒シンク3	M-3	<30 (4)	<30	—
		ふきとり	野菜洗浄消毒シンク4	M-4	<30 (4.5)	<30	—
		ふきとり	野菜洗浄消毒シンク5	M-5	3.0×10^2	<30	—
		ふきとり	野菜洗浄消毒シンク6	M-6	<30 (5.5)	<30	—
		ふきとり	脱水機内部	M-7	<30	<30	—
20121120	A社	ふきとり	予備洗浄用の2槽シンク(内部)	A-1	6.7×10^7	<30 (16)	—
		ふきとり	消毒用2槽シンクのカラン	A-2	25	<30	—
		ふきとり	すすぎシンクオーバーフロー管	A-3	1.8×10^2	<30	—
		ふきとり	スライサーセンターピラー	A-4	8.3×10^2	<30 (5.5)	—
		ふきとり	スライサーベルト	A-5	<30 (6)	<30	—
		ふきとり	脱水機内部	A-6	3.0×10^8	3.3×10^3	—
		ふきとり	スライサーガイド部	A-7	5.3×10^7	<30	—
20121120	S社	ふきとり	ばっ気洗浄機内部	S-1	<30	<30	—
		ふきとり	コンベアガイド	S-2	3.3×10^6	<30	—
		ふきとり	コンベアプーリー	S-3	<30	<30	—
		ふきとり	ばっ気洗浄機循環ろ過槽内部	S-4	41	<30	—
		ふきとり	シャワー式洗浄機内壁	S-5	<30	<30	—
		ふきとり	きゅうり用洗浄機内部	S-6	17	<30	—
		ふきとり	きゅうり用洗浄機/パドル	S-7	23	<30	—
20130130	L社	ふきとり	高速脱水機内部	L-1	<30 (0.5)	<30	—
		ふきとり	洗浄用ポリバケツ内部	L-2	<30	<30	—
		ふきとり	パブリック洗浄機内部	L-3	<30	<30	—
		ふきとり	野菜カット機のベルトコンベア	L-4	3.7×10^2	<30 (1.5)	—
		ふきとり	洗剤槽内部	L-5	<30 (0.5)	<30	—
		ふきとり	玉キャベツの保管パッカ内部	L-6	57	<30	—
20130130	R社	ふきとり	スライサーベルトコンベア	R-1	<30 (6.5)	<30	—
		ふきとり	野菜カゴ内部	R-2	68	<30	—
		ふきとり	土おとし用パブリック槽内部	R-3	3.3×10^3	<30	—
		ふきとり	パブリック機内部	R-4	1.0×10^2	<30	—
		ふきとり	パブリック後野菜パッカのせ台(ステンレス)	R-5	<30	<30	—
		ふきとり	脱水機	R-6	19	<30	—

*1 菌数はふきとり水 1mlあたりの菌数を示す。()内は推定値。

*2 VRBG 寒天培地を用いた混釈法による。

*3 LAMP 法により志賀毒素遺伝子を調べた結果を示す。

表2 施設のふきとり水から分離された腸内細菌科菌群のキットによる同定および16S rDNAの相同性検索結果

菌株番号	キットによる同定結果*1	16S rDNAの相同性検索結果
J-6-1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> (94.2)*2
J-6-2	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Raoultella terrigena</i> (96.9)
J-6-3	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Raoultella terrigena</i> (98.1)
J-6-6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> (98.7)
J-6-8	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Raoultella terrigena</i> (98.6)
A-1-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> (98.4)
A-1-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter soli</i> (99.2)
A-1-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter soli</i> (98.6)
A-4-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> (98.7)
A-4-2	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> (98.2)
A-6-1	<i>Rahnella aquatillis</i>	<i>Rahnella aquatillis</i> (98.3)
L-4-1	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i> (98.9)
L-4-2	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i> (98.2)
L-4-4	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Raoultella terrigena</i> (98.3)

*1 API20Eによる

*2 identity (%)

表3 漬物およびカット野菜製造施設から分離された腸内細菌科菌群のバイオフィルム形成性

菌株番号	J-6-1	J-6-2	J-6-3	J-6-6	J-6-8	A-1-1	A-1-2	A-1-5	A-4-1	A-4-2	A-6-1	L-4-1	L-4-2	L-4-4
菌膜形成	±	+	+	±	+	±	-	-	±	±	-	-	-	-

+: 菌膜形成あり、±: 菌膜形成多少あり、-: 菌膜形成なし

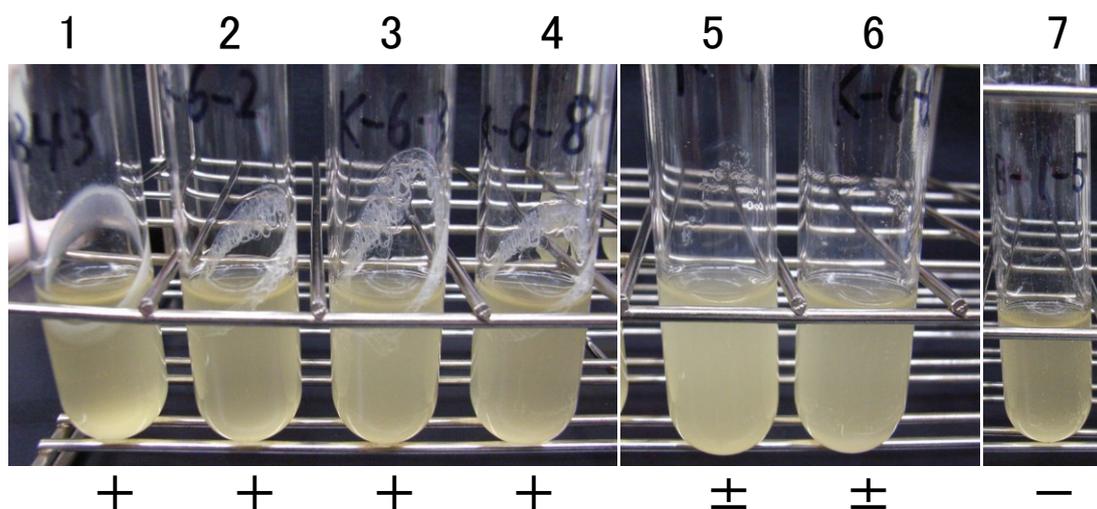


図1 施設内分離株のバイオフィルム形成性

1: 腸管凝集接着性大腸菌(陽性コントロール)、2~4: 菌膜形成あり、5, 6: 菌膜形成多少あり、7: 菌膜形成なし

Klebsiella oxytoca, *Raoultella terrigena*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter soli*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter amnigenus*, *Rahnella aquatillis*, *Citrobacter freundii*と同定された。

3) 分離された腸内細菌科菌群のバイオフィルム形成性

2)で同定された腸内細菌科菌群14株のバイオフィルム形成性を調べた結果、3株(J-6-2, J-6-3, J-6-8)で

明瞭な菌膜が観察された(表3, 図1)。これらは全て同一検体(洗浄シンク内部)から分離された菌株であり、*Raoultella terrigena*であった。また5株で多少の菌膜形成が見られたが、これらのうち2株(J-6-1, J-6-6)は菌膜形成が見られた株と同じく洗浄シンク内部のふきとり水から分離されたものであり、いずれも *Klebsiella oxytoca*であった。残りの3株はいずれも *Enterobacter*属であり、1株(A-1-1)は予備洗浄槽の2槽シンク内部から、2株(A-4-1, A-4-2)はスライサーセンターピラーから分離された(表3, 図1)。

IV 考察

今回の調査対象となった施設は漬物製造施設が1施設(S社)とカット野菜取扱い施設が5施設であった。これら6施設から採取した40検体のふきとり検体から腸管出血性大腸菌は検出されなかった。腸内細菌科菌群を衛生指標菌として用い、大腸菌の検出を目的としてVRBG培地に発育した集落の分離・同定を試みた。腸内細菌科菌群は3施設5検体から14株が分離されたが、14株を同定した結果、大腸菌に該当するものはなかった。1施設(A社)の1検体(脱水機内部)のみで腸内細菌科菌群の菌数が高く、 3.3×10^3 cfu/mLであった。脱水機は今回調査対象となった6施設のうち5施設で設置されており、漬物やカット野菜製造施設に欠かせない機器と考えられる。また、脱水機は原材料の殺菌後に使用される機器であり、細菌が機器の表面にバイオフィームを形成した場合、汚染の供給源となる可能性がある。今回は1施設のみで菌数が高い結果であったが、「漬物の衛生規範」でも定められているように大量調理施設衛生管理マニュアル[8]に従い、調理機械は分解して洗浄・殺菌を行う必要がある。脱水機から分離された菌株(A-6-1)は*Rahnella aquatillis*と同定された。本株のバイオフィーム形成性を調べた結果、菌膜形成は見られなかった(表3)。3施設由来8株(*Raoultella terrigena*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* 属)で菌膜形成が見られたが、これらは全て洗浄シンク内から分離された。洗浄シンク内は常に水に濡れた状態であることから、細菌がバイオフィームを形成しやすい環境であると考えられる。今回検出されたバイオフィーム形成細菌は施設内で実施される日常の殺菌消毒から逃れて生残したと考えられるが、洗浄シンク表面のステンレスなどの非生物表面に対する微生物の挙動や機構を把握し、そこから導かれる適切な洗浄や除去方法を取り入れることが重要である。

市販キットと16SrDNAのシーケンスによる分離菌株の同定結果は属レベルでは全て一致したが、5株で*Enterobacter*属の菌種が異なっていた。これは、*Enterobacter*属が多様な生物性状を有しているために菌種同定が難しいこと[9]に加えて、市販のキットは臨床の現場で用いられることが多く、ヒトに病気を起こす可能性のある細菌種以外は同定されにくいと考えられる。実際に16SrDNAのシーケンスの相同性検索により同定された*Enterobacter soli*や*Enterobacter ludwigii*は特殊な植物や河川から分離されるもので、ヒトへの病原性は不明であり、今回用いた市販キットの同定菌種の中には含まれていなかった。

V 結論

大阪市内の漬物およびカット野菜製造施設6施設から採取した40検体のふきとり検体から腸管出血性大腸

菌は検出されなかった。腸内細菌科菌群は3施設5検体から14株が分離されたが、14株を同定した結果、大腸菌に該当するものはなかった。分離された菌株のバイオフィーム形成性を調べた結果、3施設由来8株(*Raoultella terrigena*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* 属)で菌膜形成が見られたが、これらは全て洗浄シンク内由来株であった。洗浄シンク内は常に水に濡れた状態であることから、細菌がバイオフィームを形成しやすい環境であると考えられた。

謝辞 本研究の遂行にあたり、当研究所調査研究課企画グループの松岡秀明氏、北口智一氏に大変お世話になりました。ここに深謝致します。

(本研究は、平成24年度健康局生活衛生課特別調査研究「既製食品の汚染源追究調査」として実施されたものである。)

参考文献

- 1) 寺嶋 淳, 伊豫田 淳, 泉谷秀昌, 齊藤剛仁, 三戸部治郎, 石原朋子, 大西 真. 腸管出血性大腸菌感染症. 分子疫学的現状. 化学療法の領域 2012; 28: 36-44.
- 2) 寺嶋 淳. 腸管出血性大腸菌による食中毒. 化学療法の領域 2008; 24: 49-56.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. 漬物の衛生規範の改正等について. 食安監発1012第1号, 平成24年10月12日.
- 4) 岩淵範之, 砂入道夫, 中嶋睦安. 菌体外多糖類: EPSの重要性 p84-94. 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編集: バイオフィーム—その生成メカニズムと防止のサイエンス—, サイエンスフォーラム(1998).
- 5) 山本茂貴. バイオフィームの検査法. p223-226. 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編集: バイオフィーム—その生成メカニズムと防止のサイエンス—, サイエンスフォーラム(1998).
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. 腸管出血性大腸菌O26、O111およびO157の検査法について. 食安監発1217第1号, 平成24年12月17日.
- 7) 伊藤健一郎. 付着性大腸菌の検査法と判定について. 病原微生物検出情報 2008; 29: 224-226.
- 8) 厚生省生活衛生局長. 大量調理施設衛生管理マニュアル. 衛食第85号別添, 平成9年3月24日.
- 9) 泉谷秀昌, 渡邊治雄. *Enterobacter sakazakii*の再分類について. 病原微生物検出情報 2009; 30: 135-136.