

博士論文

豚レンサ球菌の食肉汚染に関する研究

新井 沙倉

## 目次

緒言 .....	1
第1章 <i>S. suis</i> の血清型再評価に対応する PCR の開発 .....	3
1. はじめに .....	3
2. 材料と方法 .....	4
1) 供試菌株および培養条件 .....	4
2) ゲノム DNA の抽出 .....	5
3) 塩基配列決定と解析 .....	6
4) <i>recN</i> PCR に供試する Primer の開発 .....	6
5) PCR の条件 .....	7
6) PCR の感度 .....	7
7) 16S PCR の Primer 配列の確認 .....	8
3. 成績 .....	8
1) <i>recN</i> PCR の確立 .....	8
2) <i>recN</i> PCR と <i>gdh</i> PCR の特異性 .....	9
3) <i>recN</i> PCR の感度 .....	9
4. 考察 .....	10
5. 要約 .....	12

第2章 真の <i>S. suis</i> に特異的な LAMP 法の開発と市販豚肉・内臓肉への応用...	13
1. はじめに.....	13
2. 材料と方法 .....	14
1) 供試菌株および培養条件 .....	14
2) 市販豚肉・内臓肉 .....	14
3) 鋳型 DNA の抽出.....	16
4) レプリカプレート法を利用した肉汁からの <i>S. suis</i> の分離 .....	16
5) LAMP <sub>SS</sub> に供試する Primer の開発 .....	18
6) LAMP 法 .....	19
7) LAMP <sub>SS</sub> の特異性と感度 .....	20
8) 統計処理 .....	20
3. 成績 .....	20
1) LAMP <sub>SS</sub> の確立.....	20
2) LAMP <sub>SS</sub> の特異性と感度 .....	22
3) 市販豚肉・内臓肉からの <i>S. suis</i> DNA の検出 .....	23
4) 市販豚肉・内臓肉の総生菌数 .....	24
5) 市販豚肉・内臓肉から分離した <i>S. suis</i> 野外株の性状 .....	24
4. 考察 .....	25
5. 要約 .....	28

第3章 食肉中の <i>S. suis</i> 検出・定量を目的とした新規 real-time PCR の開発 ...	30
1. はじめに.....	30
2. 材料と方法 .....	31
1) 供試菌株および培養条件 .....	31
2) 市販豚肉・内臓肉 .....	31
3) 凍結融解 .....	32
4) qPCR <sub>SS</sub> に供試する Primer の開発 .....	33
5) EMA .....	34
3. 成績 .....	36
1) qPCR <sub>SS</sub> の確立.....	36
2) qPCR <sub>SS</sub> の特異性 .....	36
3) 凍結融解.....	36
4) EMA 反応と鋳型 DNA の抽出 .....	37
5) 市販豚肉・内臓肉を供試した qPCR <sub>SS</sub> と m-cfu.....	37
4. 考察 .....	38
5. 要約 .....	41
総括.....	43
謝辞.....	46
文献.....	47

表 .....56

图 .....75

## 緒言

*Streptococcus suis*は、グラム陽性球菌であり、髄膜炎、敗血症、心内膜炎、関節炎、肺炎等の様々な病気を豚に引き起こし、世界中の養豚業界で経済的負担になっている病原体である (Staats *et al.*, 1997; Fittipaldi *et al.*, 2012)。*S. suis*は荚膜の抗原性から35の血清型 (1-34、1/2型) に型別されていたが (Fittipaldi *et al.*, 2012)、近年、16S rRNA遺伝子とchaperonin-60遺伝子の塩基配列を比較することによって、血清型32型と34型の参考株は*Streptococcus orisratti* に修正された (Hill *et al.*, 2005)。加えて、全塩基配列を比較することによって、血清型20、22および26型は*Streptococcus parasuis*という新しい細菌種に分類され、(Nomoto *et al.*, 2015)、manganesedependent superoxide dismutase (*sodA*) と recombination/repair protein (*recN*) 遺伝子の塩基配列を比較することによって、33型も*S. suis*から除外すべきであると報告された (Tien *et al.*, 2013)。このように、分類再評価後の現在では、29の血清型が真の*S. suis*と考えられているが、真の*S. suis*だけを標的とした簡易同定法は未だ確立されていない。

一方、*S. suis* は、人獣共通感染症の病原体でもあり、ヒトが感染すると髄膜炎や敗血症等を呈し、時として致死率の高い劇症型を引き起こす上、早期治療によって回復したとしても聴覚の著しい低下が残るのが特徴である (Ye *et al.*, 2006; Mai *et al.*, 2008; Takamatsu *et al.*, 2008)。西洋諸国では、養豚業や食肉処理業など、生きた豚と密に接するヒトを中心に本菌感染例が報告されているが、東南アジアの一部の国々では、未加熱の豚肉を喫食する文化があるため、普段豚と接しない一般消費者が料理を介して感染する事例が多く、公衆衛生上の問題として注目されており (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014)、実際、ベトナム、タイ、香港におけるヒトの細菌性髄膜炎の発生に占める *S. suis* の順位がそれぞれ1位、2位、3位であると

報告された (Ip *et al.*, 2007; Mai *et al.*, 2008; Suankratay *et al.*, 2004) 。さらに、*S. suis* が香港の市場で販売されている生の豚肉・内臓肉からも検出、分離された報告もあることから (Cheung *et al.*, 2008; Ip *et al.*, 2007) 、食の安全を考える上でも重要な細菌である。日本では、これまで誌上に報告されていないものも含め、少なくとも 14 名の患者が確認されている (Sekizaki, 2012) 。その多くは、養豚業や食肉加工業に携わっているが、14 名中 2 名は、豚肉の調理中に手を串で刺したことが感染要因となっており、そのうち 1 名は死亡している。しかし、これまでに日本の食肉を対象とした *S. suis* 汚染調査は行われていなかった。そこで、著者は、分類再評価後の真の *S. suis* に特異的な遺伝子増幅法を開発し、正しい疫学調査に有用な方法を確立すると共に、開発した方法の一部を日本の市販豚肉・内臓肉に応用した結果、*S. suis* の食肉汚染に関して新たな知見を得ることができたため、ここに報告する。

本論文は全 3 章から構成されている。第 1 章では、分類再評価後の真の *S. suis* に特異的な PCR を開発し、既存の PCR と比較することで、開発した方法が今後の正しい疫学調査に有用であることを示した。第 2 章では、真の *S. suis* に特異的な LAMP 法を開発し、市販豚肉・内臓肉に供試した。さらに、陽性の市販豚肉から *S. suis* を分離、型別することで生きた状態でヒトに危害を加えうる *S. suis* が食肉に付着していることを実証した。第 3 章では、真の *S. suis* に特異的な定量的 real-time PCR を開発し、これを用いて、市販豚肉・内臓肉中に含まれる *S. suis* の菌量を推定し、第 2 章で *S. suis* が分離できたグループと分離できなかったグループとに分けた場合で比較、評価した。

## 第1章 *S. suis*の血清型再評価に対応するPCRの開発

### 1. はじめに

*Streptococcus suis* は、かつて生化学性状に重きを置いた試験により細菌種を同定した後、莢膜の抗原性から35の血清型(1-34、1/2型)に型別されていた。しかし、染色体上のいくつかの遺伝子の塩基配列を比較することにより、6つの血清型(20、22、26、32、33および34型)が除外されるべきであると報告され(Hill *et al.*, 2005; Tien *et al.*, 2013; Nomoto *et al.*, 2015)、現在では、29の血清型が真の*S. suis*と考えられている。従来から、生化学性状のみを参考に野外から分離した菌を同定すると、*S. suis*とその近縁種を混同してしまうことが知られているため、臨床や研究の現場では、PCRによる簡易同定法が幅広く利用されている。しかし、現行の*S. suis*検出用PCRが開発されたのは、29の血清型に分類再評価される以前であったため、*S. suis*に含めるべきではない血清型や細菌種まで検出してしまう。現行のPCRには、Okwumabua *et al.* (2003)の開発したglutamate dehydrogenase (*gdh*)遺伝子を標的にしたPCR(*gdh* PCR)と、Marois *et al.* (2004)が開発した16S rRNA遺伝子を標的にしたPCR(16S PCR)がある。今後の正しい疫学調査のためにも、分類再評価後の真の*S. suis*に特異的な新しいPCRの開発が急務である。

*recN*遺伝子は、*Streptococcus*属菌の中で、他のハウスキーピング遺伝子よりも種間では相同性が高く、亜種間では多様性に富んだ塩基配列を有している(Glazunova *et al.*, 2010)。この報告を受け、Tien *et al.* (2013)が、*recN*遺伝子の塩基配列を比較した成績とDNA-DNAハイブリダイゼーションの成績が一致していることを示したため、真の*S. suis*に特異的なPCRの標的遺伝子として適している



と考えられた。そこで、本研究では、*recN*遺伝子を標的とした新しい*S. suis*特異的PCR (*recN*PCR)を開発し、その特異性と感度を現行の2つのPCRと比較することで、その有用性を示した。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌株および培養条件

供試した*S. suis*菌株は、表1に示した。全ての*S. suis*野外株は、*gdh* PCRもしくは16S PCRに供試し、特異的な抗血清によって血清型を決め、*S. suis* (*S. suis*からは除外されるべき血清型も含む)であることを決定した。*S. suis*野外株の血清型は、市販の抗血清 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) を用いた共凝集試験と莢膜凝集試験により判定した (Higgins and Gottschalk, 1990)。その他の*Streptococcus*属菌およびその他菌属の豚の病原細菌は表2に示した。

*Streptococcus*属菌には、*recN*遺伝子を基に系統的比較を行った場合の近縁種 (*recN*近縁種: *Streptococcus acidominimus*、*Streptococcus gallinaceus*、*Streptococcus minor*、*Streptococcus ovis*) も含めた (Glazunova *et al.*, 2010)。

全ての*Streptococcus*属菌、*Escherichia coli*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuisは、Todd-Hewitt (TH) 寒天培地 (Becton Dickinson, Sparks, MD) で培養した。*Actinobacillus pleuropneumoniae*、*Bordetella bronchiseptica*、*Staphylococcus hyicus*は5%の羊血液を添加したTrypto soya agar base (Nissui, Tokyo, Japan) で培養した。*Haemophilus parasuis*は5%の牛血液を添加したTrypto soya agar base (Nissui) で培養した。*Mycoplasma hyopneumoniae*、*Mycoplasma hyorhinis*、*Mycoplasma hyosynoviae* は、Kobayashi *et al.* (1996) の報告にあるPPLOブローで培養した。*E. coli* と*S.*

*enterical*は、通常の孵卵器を用いて、37 °C、16時間培養し、その他の菌は5% CO<sub>2</sub> 下で37 °C、16時間培養した。

## 2) ゲノム DNA の抽出

*S. suis* 基準株と血清型参考株のゲノム DNA は、Mogollon *et al.* (1990) の報告の通りに抽出した。すなわち、TH 寒天培地上に培養した菌を、0.1M の Sodium EDTA と 0.15M の NaCl を含む 500 $\mu$ l の Saline-EDTA butter (pH 8.0) に懸濁した。懸濁液へ 10mg/ml の Lysostaphin と 100mg/ml の Lysozyme 混合液を 10 $\mu$ l 加え、37 °C で 60 分間静置した後、25 $\mu$ l の 20% SDS 溶液を加えた。混合液を 60 °C で 10 分間静置した後、4 °C で 8,000rpm、10 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清を、フェノール・クロロホルムで 2 回処理して変性タンパクを除いた後、2.5 倍量の 99.5% エタノールで DNA を沈殿させた。70% エタノールで洗浄後、再度 99.5% エタノールで洗浄、エタノールを捨て、DNA を乾燥させた。この DNA を 100 $\mu$ l の DW で溶解し、それを 100 倍希釈したものを PCR に供試した。

その他の *S. suis* 菌株、*M. hyopneumoniae*、*M. hyorhinis* および *M. hyosynoviae* を除くその他の細菌種はボーリング法で DNA を抽出した。すなわち、寒天培地上に培養した菌を、500 $\mu$ l の DW に懸濁した。懸濁液は 20,000  $\times$  g で 1 分間遠心後、上清を除き、25mM NaOH 50 $\mu$ l にペレットを懸濁した。95 °C 、5 分間加熱し、1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) を 4 $\mu$ l 加えることで中和した。中和後、20,000  $\times$  g で 1 分間遠心し、その上清を鋳型として PCR に供試した。

*M. hyopneumoniae*、*M. hyorhinis*、*M. hyosynoviae* のゲノム DNA は、Bio-Rad InstaGene Matrix (Bio-Rad, Singapore) を用いて推奨プロトコル通りに抽出した。

すなわち、培養後の PPLO ブロース 1ml を回収し、12,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を捨てた。その後、200 $\mu$ l の InstaGene Matrix にペレットを懸濁した。これを 56°C で 30 分間加熱した。10 秒間ボルテックスした後、8 分間 100°C で加熱した。さらに 10 秒間ボルテックスした後、12,000 rpm で 2 分間遠心し、その上清を鋳型として PCR に供試した。

### 3) 塩基配列決定と解析

分類再評価前の *S. suis* 血清型 32、34 型の参考株における *recN* 遺伝子の塩基配列は、Glazunova *et al.* (2010) の報告の方法に従って決定した。塩基配列情報は、Sequencher software, version 4.8 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd., Yokohama, Japan) と GENETYX software, version 11.1 (GENETYX Corp., Tokyo, Japan) を用いてアセンブルし、DDBJ/EMBL/GenBank に登録した。本研究で決定した血清型 32 および 34 型の *recN* 遺伝子の塩基配列は、それぞれアクセッション番号 AB738035、AB738036 で登録した。

### 4) *recN* PCR に供試する Primer の開発

*S. suis* 基準株および血清型参考株の *recN* 遺伝子の塩基配列は、Tien *et al.* (2013) の報告にある配列を用いた。また、*recN* 近縁種の配列は、Glazunova *et al.* (2010) の報告にある配列を用いた。上述の配列に加え、3) で決定した 32 および 34 型の *recN* 遺伝子の塩基配列も加え、Sequencher software と GENETYX software および MEGA 5 を用いてアセンブルし、真の *S. suis* とその他の株の *recN* 遺伝子の塩基配列の違いを目視で判別した。そして、真の *S. suis* には共通しており、その他の株では異なる塩基配列が多い箇所を選定し、その領域に Primer を設計した。設計

した Primer は、その後、2)で抽出したゲノム DNA のうち、*S. suis* の基準株、血清型参考株 (*S. suis* からは除外されるべき血清型も含む) および *recN* 近縁種を供試することで、その特異性を評価した。この時の反応には、Quick Taq® HS DyeMix (TOYOBO, Osaka, Japan) を供試し、Primer は、各 10pmol を 25µl の反応溶液に加えた。また、反応条件は、94 °C 2 分間の後、94 °C 30 秒、60 °C 10 秒、68 °C 30 秒を 30 サイクル繰り返した後に 68 °C 5 分間反応させた。PCR 産物は、Tris-phosphate EDTA buffer を用いたアガロースゲル電気泳動に供試し、結果を判定した。特異性の評価で真の *S. suis* 特異的だった Primer セットを *recN* PCR の Primer とし、上述の反応条件中のアニーリング温度を 50°C、55°C、および 60°C に変え、最適なアニーリング温度を決定した。さらに、表 1 と表 2 に示した様々な血清型の *S. suis* 代表株と野外株および複数の細菌種を供試して、*recN* PCR の特異性を確認した。

#### 5) PCR の条件

今回の試験に供試した Primer は、表 3 に示した。*gdh* PCR と 16S PCR は、それぞれ Okwumabua *et al.* (2003) と Marois *et al.* (2004) の報告を参考に、サイクル数を 30 に統一して行った。PCR 反応は、全て Quick Taq® HS DyeMix (TOYOBO, Osaka, Japan) を供試した。PCR 産物は、Tris-phosphate EDTA buffer を用いたアガロースゲル電気泳動に供試し、結果を判定した。

#### 6) PCR の感度

*recN* PCR と 16S PCR の感度は、*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup> (血清型 2 型) と 4961 (血清型 3 型) を供試することで比較した。上述の 2 菌株を TH ブロースに接種し、5%

CO<sub>2</sub>下で37 °C 培養することで、Optical density 600nm (OD<sub>600</sub>) の値が0.3になる対数増殖期まで培養した。その培養液を、10倍階段希釈し、それぞれの希釈段階の一部をTH寒天培地上に接種した。次に、残りのそれぞれの希釈段階を、20,000 × gで10分間遠心した。上清を除き、菌塊を100μlのInstaGene Matrixに懸濁し、2)で示したプロトコル通りにDNAを抽出した。10μlの抽出DNAを、鋳型としてPCRに供試した。コロニー形成単位 (colony forming unit: cfu) は翌日TH寒天培地上に生えた*S. suis*コロニー数の計測によって求めた。

#### 7) 16S PCR の Primer 配列の確認

*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup>と4961の16S rRNA遺伝子の塩基配列は、Chatellier *et al.* (1998) の報告にある配列を使用した。上述の配列に加え、表3で示す16S PCRのPrimer配列も加え、Sequencher softwareとGENETYX softwareおよびMEGA 5を用いてアセンブルし、*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup>と4961における16S PCRのPrimer配列との塩基配列の違いを確認した。

### 3. 成績

#### 1) *recN* PCR の確立

真の *S. suis* に特異的な PCR のために、Forward Primer (SSrecN-preF) : 5'-TGCCTATCGTAGTCTTCGCAAACG-3'、Reverse Primer (SSrecN-R) : 5'-ACAACAGCCAATTCATGGCGTGATT-3'を設計した。この特異性を表 1 に示した *S. suis* 血清型 2 型の基準株と血清型参考株、および表 2 に示す *recN* 近縁種を供試して検討したところ、真の *S. suis* に属する血清型では全て *recN* 配列の一部を示す 627bp の増幅産物を形成した。しかし、*S. suis* からは除外されるべき血清型参

考株の 33 型や、*recN* 近縁種の *S. acidominimus* も同様に増幅産物を形成したことから、新たに Forward Primer (SSrecN-F) : CTACAAACAGCTCTCTTCT を設計した。SSrecN-F と SSrecN-R の組み合わせでは、*S. suis* 血清型 2 型の基準株と、血清型 20、22、26、32、33 および 34 型を除いた 28 の血清型参考株は、*recN* 配列の一部を示す 336bp の増幅産物を形成した (図 1) 。また、表 2 に示す *recN* 近縁種では、*recN* 遺伝子の増幅は確認されなかったため、SSrecN-F と SSrecN-R の Primer セットを供試した PCR を *recN* PCR とした。次に、適切なアニーリング温度を検討したところ、50°C、55°C、および 60°C 全てで十分な増幅が確認されたため、60°C を *recN* PCR のアニーリング温度とし、その後の試験に用いた。

## 2) *recN* PCR と *gdh* PCR の特異性

真の *S. suis* に属する血清型の *S. suis* 菌株 (2 株の代表株 (血清型 2 型) 、1 株のヒト由来野外株 (血清型 2 型) および 132 の豚由来野外株 (血清型 1、2、3、4、5、7、8、9、11、12、15、16、25 および 31 型) ) は、*recN* PCR 陽性だった。しかし、血清型 20、22 および 33 型の 16 株の豚および牛由来野外株では陰性だった (表 1) 。表 2 に示すその他の細菌種では、*recN* 遺伝子の増幅は確認されなかった。一方、*recN* 近縁種を *gdh* PCR に供試したところ、*S. gallinaceus* と *S. ovis* が陽性コントロールと同様に 688bp の増幅産物を形成した (図 2) 。

## 3) *recN* PCR の感度

*recN* PCR と 16S PCR の感度を比較した成績を図 3 に示した。*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup> を鋳型として供試した場合 (図 3A) 、*recN* PCR の検出限界は 900cfu/反応 (レーン 4) だったのに対して、16S PCR は 90cfu/反応 (レーン 12) だった。

一方、図 3B は、*S. suis* 血清型 3 型の参考株、4961 を供試したときの成績である。*recN* PCR の検出限界は 1,048cfu/反応（レーン 4）だったのに対して、16S PCR は 1,048,000cfu/反応（レーン 7）以上だった。そこで、*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup> と 4961 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列中にある 16S PCR の Primer 領域の配列を比較したところ、図 4 で示すように、16S-195(s)では、NCTC 10234<sup>T</sup> の 3' 端 2bp の変異があったが、4961 では全て Primer と同じ配列だった。一方、16S-489(as2)では、NCTC 10234<sup>T</sup> および 4961 共に全て Primer と同じ配列だった。

#### 4. 考察

本研究で、*S. suis*血清型20、 22、 26、 32、 33および34型を除くすべての真の*S. suis*を検出する新規のPCRを開発した。この10年間で*S. suis*の血清型と分類が再評価され、6つの血清型は*S. suis*から除外されるべきであると報告されたが (Hill *et al.*, 2005; Tien *et al.*, 2013; Nomoto *et al.*, 2015) 、これらの血清型は、ヒトの*S. suis*感染者から分離された報告がないため (Arends and Zanen, 1988; Nghia *et al.*, 2008; Kerdsin *et al.*, 2011; Fittipaldi *et al.*, 2012; Callejo *et al.*, 2014) 、ヒトの*S. suis*感染例を摘発する場合にも、*recN* PCRは有用と考えられる。一方、市販の簡易同定キットを用いた場合に、*S. suis*が誤同定された事例が後を絶たない。Tsai *et al.* (2012) とDonsakul *et al.* (2003)は、*S. suis*が*S. acidominimus*や*viridans*グループレンサ球菌に誤同定された事例を報告した。*S. suis*がヒトに感染するという認識が臨床現場で広まっていないため、このような事例が起こると考えられる。このように、真の*S. suis*のみを検出する本*recN* PCRは、獣医学領域のみならず、ヒトの臨床現場でも求められてきた方法である。

*recN* PCRは、増幅産物が336bpと短いため、短時間のPCR反応で完了することができる（約70分間）。また、*S. suis*基準株と28の血清型参考株、2株の代表株、1株のヒト由来野外株と132株の豚由来野外株はすべて*recN* PCR陽性であり、除外されるべき血清型の*S. suis*菌株、その他の*Streptococcus*属菌とその他菌属の豚の病原細菌では陰性だったことから、*recN* PCRは*S. suis*への特異性が高く、野外株の検出にも適していると考えられる。一方、遺伝子の検出技術の向上と共に、新たな細菌種が次々と発見されている。この中の少なくとも2つの細菌種、*S. gallinaceus* (Collins *et al.*, 2002)と*S. ovis* (Collins *et al.*, 2001)は、*gdh* PCR (Okwumabua *et al.*, 2003)陽性だった。*recN*遺伝子の塩基配列の比較は、*Streptococcus*属の既知の限られた細菌種でしか行われていないため、今後、新規に発見される他の菌属の細菌種で、今回開発したPrimerと相同配列をもつ未知の細菌種が現れても不思議ではない。そこで、野外株を分離した後は、純培養、グラム染色、カタラーゼ試験を行い、少なくとも*Streptococcus*属菌であることを確認した後に*recN* PCRを行うことが勧められる。

本試験で、*recN* PCRと16S PCRの感度を比較し、基準株および1つの血清型参考株で異なる成績が得られた。*S. suis*は一般に4コピーの16S rRNA遺伝子と1コピーの*recN*遺伝子を保有するため、16S PCRの方が*recN* PCRよりも感度が高いと予想していた。しかし、今回供試した血清型3型の参考株では、16S PCRの方が、感度が劣っていた。16S PCRのPrimer領域に点変異が認められたことが原因と考えられる。一方、*recN* PCRは、血清型間でその感度に大きな差はなく（約1,000 cfu/反応）、安定した感度を示した。以上の成績より、本研究で開発した*recN* PCRは、フードチェーンの最も上流である家畜衛生の現場や、その下流に位置する食品処理業



に携わる人が感染した場合に使用すれば、的確かつ迅速に*S. suis*を検出でき、今後の疫学調査にも有用な手法になると期待される。

## 5. 要約

分類再評価後の真の *S. suis* に特異的な新規の *recN* PCR を開発した。分類再評価前の血清型も含む全ての血清型参考株、様々な血清型の *S. suis* 代表株および野外株、*recN* 近縁種、その他の *Streptococcus* 属菌およびその他菌属の豚の病原細菌を供試した結果、真の *S. suis* のみが陽性であり、*S. suis* からは除外されるべき血清型とその他の細菌種は全て陰性だった。現行の *S. suis* 検出用 PCR である *gdh* PCR は、*recN* 近縁種の一部で陽性となり、特異性に問題があることを示した。また、他の現行の *S. suis* 検出用 PCR である 16S PCR と *recN* PCR の感度を比較したところ、*recN* PCR はおおよそ 1,000cfu/反応であったが、16S PCR は、供試した血清型によって感度の違いが顕著だった。以上より、開発した *recN* PCR は、優れた特異性と安定した感度を示すことが証明され、今後の疫学研究等の有用な手法となることを示した。

## 第2章 真の *S. suis* に特異的な LAMP 法の開発と市販豚肉・内臓肉への応用

### 1. はじめに

Notomi *et al.* (2000) によって loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法という核酸増幅法が開発された。LAMP 法は、遺伝子の増幅が恒温状態で進むため、特別な機器を使用せずとも標的遺伝子配列を増幅できる (Mori and Notomi, 2009)。また、6 つの領域に対応した配列から 4 つの Primer を設計し、複雑な遺伝子増幅反応を引き起こす。さらに、LAMP 法は、一般的な PCR よりも遺伝子増幅を阻害する物質の影響を受けにくく (Kaneko *et al.*, 2007)、反応の副産物であるマグネシウムリン酸塩によって反応後の溶液が白濁するため、遺伝子増幅の有無を目視で確認できる (Mori *et al.*, 2001)。このような利点が注目され、LAMP 法は多くの病原細菌の検出に応用されており (Itano *et al.*, 2006; Kurosaki *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 2008)、その中には食品媒介病原体に関連した報告も含まれている (Hayashi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012)。それゆえ、様々な菌種が混在している食肉から *S. suis* を検出する手段として LAMP 法が有用であると考えた。

Huy *et al.* (2012) は、ヒトの細菌性髄膜炎の起因菌として代表的な 4 つの細菌種 (*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*S. suis* および *Streptococcus agalactiae*) に共通の Primer を、16S rRNA 遺伝子配列上に設計し、single-tube LAMP 法を開発した。しかし、この方法は、4 つの細菌種のどれが原因かを特定するため、LAMP 反応後に 90 分間の制限酵素処理とその後の電気泳動が必要であるため、時間を要し、煩雑であるだけでなく、増幅産物による実験室内汚染の危険もある。一方 Zhang *et al.* (2013) は、*S. suis* の *cps2J* 遺伝子を標的にした血清型 2 型または 1/2 型特異的な LAMP 法 (LAMP<sub>2J</sub>) と *salK* 遺伝子を標的にした

LAMP 法を開発した。LAMP<sub>2J</sub> は、ヒトの *S. suis* 感染例の約 9 割を占める血清型 2 型の検出には有効だが、*S. suis* の中でも限定されたグループにしか標的遺伝子が存在しないため、弱毒菌も含めた様々な *S. suis* を食肉から検出する目的には適していない。そこで本研究では、第 1 章に記載した通り、*Streptococcus* 属菌の分類に適している *recN* 遺伝子を標的とした、真の *S. suis* に特異的な LAMP 法(LAMP<sub>SS</sub>)を開発した。また、食肉のリスク分析のための最初のステップとして、日本の市販豚肉・内臓肉を LAMP<sub>SS</sub> に供試し、どの程度の食肉が *S. suis* に汚染されているのか調査した。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌株および培養条件

供試した菌株は、全て表 4 に示した。全ての *S. suis* 野外株は、第 1 章で開発した *recN* PCR または 16S PCR に供試し、特異的な抗血清によって血清型を決め、*S. suis* (*S. suis* からは除外されるべき血清型も含む) であることを決定した。*S. suis* 野外株の血清型は、第 1 章に記載した方法により決めた。また、全ての細菌種は、第 1 章に記載した方法により培養した。

### 2) 市販豚肉・内臓肉

合計 996 検体の市販豚肉（カット肉 404 検体（国産 277 検体および外国産 127 検体）、ひき肉 263 検体（国産 244 検体および外国産 19 検体））・内臓肉 299 検体（レバー 128 検体、タン 101 検体、ハツ 48 検体およびモツ 22 検体）を複数の都県にある 49 の小売店（スーパー 31 店、デパート 14 店および肉専門店 4 店）より 2013 年 11 月から 2014 年 2 月中旬までに購入した（表 6）。外国産の市販豚

肉は、アメリカ、イタリア、カナダ、スペイン、デンマーク、ポーランド、メキシコの7カ国から輸入されたものを供試した。基本的に、1サンプル（例：SP-J1（表7参照））の市販豚肉・内臓肉につき125gを5検体ずつ同時に購入したが、店舗に十分な量がない場合には、後日追加で購入した。しかし、それでも十分な量が得られなかった場合には、最低70gを1検体として使用した。いくつかのサンプルについては、LAMP<sub>SS</sub>陽性の成績が、異なる時期に購入した場合でも一貫して変わらないかどうかを判定するために、同じ店舗から繰り返し購入した。

パック内の市販豚肉・内臓肉が大きい場合、または塊のハツや切られていないモツを購入した場合には、小さく切り、125gを計測した後、滅菌ストマッカー袋（Atect, Osaka, Japan）に入れた。それぞれの市販豚肉・内臓肉に適した量の滅菌生理食塩水（カット肉10ml、ひき肉5ml、タン8ml、レバー1ml、ハツ5mlおよびモツ0ml）を加え、30秒間ストマッカー（IUL, S. A., Barcelona, Spain）にかけることで、混合した。ストマッカー袋から、それぞれ1mlの肉汁を回収し、そのうち100 $\mu$ lを5mlのTHブローに接種し、37 $^{\circ}$ C、16時間培養した。

培養に使用せず余った肉汁は、抗凍結剤は添加せずに、総生菌数の計測と *S. suis* の菌分離が行われるまで-80 $^{\circ}$ Cに保存した。総生菌数測定のために、全ての種類の市販豚肉・内臓肉からそれぞれ5サンプルを無作為に抽出した。それぞれのサンプルの総生菌数は、滅菌生理食塩水を使用して肉汁を階段希釈した後、Standard Plate Count寒天培地（Oxoid, Basingstoke, England）に接種し、30 $^{\circ}$ C、48時間培養した。その後、寒天培地上のコロニー数を計測し、cfu/ml肉汁を計算によって求めた。

市販豚肉・内臓肉に含まれる *S. suis* を検出するために、TH培養液1mlから抽出したDNAをLAMP<sub>SS</sub>に供試した。LAMP<sub>SS</sub>が陽性だった場合には、その検体のDNAをヒトが多く感染する血清型2型の検出のために、LAMP<sub>2J</sub>に供試した。さらに

LAMP<sub>2J</sub>も陽性だった場合には、その検体の肉汁を *S. suis* の菌分離に供試した。LAMP<sub>SS</sub> の成績が全て揃った後、それぞれの市販豚肉・内臓肉を購入した店舗を、国産豚肉と内臓肉を同時に販売する店舗と、国産豚肉のみを販売する店舗の2グループに分けた。それぞれのグループをさらに、LAMP<sub>SS</sub> 陽性豚肉を検出した店舗と、検出しなかった店舗に分け、それぞれの店舗数を比較した。

### 3) 鋳型 DNA の抽出

*S. suis* 基準株と血清型参考株のゲノム DNA は、第 1 章に記載した Mogollon *et al.* (1990) の報告によって抽出し、その他の *S. suis* 菌株と、*Mycoplasma* 属細菌を除いたその他の細菌種は第 1 章に記載したボーリング法によって、*Mycoplasma* 属細菌は第 1 章に記載した InstaGene Matrix を用いた方法で DNA を抽出した。

市販豚肉・内臓肉の肉汁を TH ブロースに入れて培養した後の DNA は、LAMP 法の感度を向上させるため、3 段階遠心法(Yamazaki *et al.*, 2009)を改良した方法によって抽出した。この方法によって、肉汁を供試した場合に生じる大きな残渣と TH ブロース中の遺伝子増幅を阻害する物質を除去し、少ない量の *S. suis* を濃縮した。まず、TH 培養液を 900 × g で 1 分間遠心し、上清を新しい 1.5ml チューブに移した。次に、10,000 × g で 1 分間遠心し、上清を除いた。さらに、ペレットを 25 mM NaOH 50μl に溶解し、第 1 章に記載したボーリング法によって DNA を抽出した。

### 4) レプリカプレート法を利用した肉汁からの *S. suis* の分離

LAMP<sub>2J</sub> 陽性の肉汁を、*S. suis* の分離に供試した。-80 °C に保存していた肉汁を解凍し、滅菌生理食塩水を用いて 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-5</sup> まで 10 倍階段希釈した。各 100μl

の希釈段階を、Streptococcus Selective Supplement (SSS) (Oxoid)を添加したTH寒天培地に接種し、37 °C、16時間培養した。100から1000個のコロニーを形成している希釈段階のTH寒天培地を選択し、レプリカプレート法(Lederberg and Lederberg, 1952)によってコロニーをコピーした。つまり、滅菌したベルベットの布を円柱上に固定し、コロニーが形成されているTH寒天培地のコロニー面を下にして布の上にあてがい、5から10秒間指で押さえつけ、布にコロニーを付着させた。次に、新しいSSS添加TH寒天培地を円柱上の布の上に乗せ、布からSSS添加寒天培地にコロニーを付着させた。このSSS添加TH寒天培地は、5% CO<sub>2</sub>下で37 °C、16時間培養した。レプリカプレートの後、最初にコロニーを形成していたSSS添加TH寒天培地（マスタープレート）上に残っている全てのコロニーを回収し、第1章に記載したボーリング法によってゲノムDNAを抽出し、その5µlの上清をLAMP<sub>SS</sub>に供試した。LAMP<sub>SS</sub>陽性の場合には、さらに、LAMP<sub>2J</sub>にも供試した。LAMP<sub>SS</sub>（検体によってはLAMP<sub>2J</sub>）陽性の場合、1枚目のレプリカプレートに8分画の境界線を引き、同様にベルベットの布にあてがった。次に、2枚目のレプリカプレートを0.2 µg/mlクリスタルバイオレットおよび6%羊血液添加コロンビア血液寒天培地(Oxoid)を用いて作製し、1枚目と同様に位置を合わせて8分画した。1枚目のレプリカプレートの8分画それぞれから上述のボーリング法によってゲノムDNAを抽出し、LAMP<sub>SS</sub>（検体によってはLAMP<sub>2J</sub>）に供試した。*S. suis*の分離は、LAMP<sub>SS</sub>（検体によってはLAMP<sub>2J</sub>）が陽性になった1枚目のレプリカプレート上の分画と同じ分画にある2枚目のレプリカプレートのコロンビア血液寒天培地上で、α溶血性のコロニーを選択し、純培養した。分離した株は、グラム染色とカタラーゼ試験を行い、グラム陽性かつカタラーゼ陰性の球菌は、上述のボーリング法によってゲノムDNAを抽出し、*recN*PCRに供試した。そこで陽性の野外株のうちLAMP<sub>2J</sub>の分画から分

分離された株は、血清型2もしくは1/2型であるかを判定するため *cps2J* 遺伝子を標的にしたPCR (*cps2J* PCR) (Marois *et al.*, 2004)に供試した。PCRは、第1章に記載したQuick Taq HS DyeMix を用いた方法で行った。

LAMP<sub>SS</sub>のみ陽性の分画から分離された株もしくは *cps2J* PCR 陰性の *S. suis* 野外株の血清型は、マルチプレックス PCR(Okura *et al.*, 2014)を行った後、第1章に記載した血清凝集反応によって推定した。*S. suis* 血清型 2 型の野外株は、Multi Locus Sequence Typing (MLST) (King *et al.*, 2002)に供試した。この成績を *S. suis* MLST データベース (<http://ssuis.mlst.net>) 上にある情報と照らし合わせることで sequence type (ST)を決め、eBLAST algorithm (<http://eburst.mlst.net>) を利用してデータベース上にある全ての *S. suis* 菌株と比較した。

#### 5) LAMP<sub>SS</sub> に供試する Primer の開発

第1章と同様に、Tien *et al.* (2013) およびGlazunova *et al.* (2010) から、*S. suis* 基準株、血清型参考株および *recN* 近縁種の *recN* 遺伝子の塩基配列を得た。また、第1章で決定した32および34型の *recN* 遺伝子の塩基配列も加え、Sequencher softwareとGENETYX softwareおよびMEGA 5を用いてアセンブルし、真の *S. suis* とその他の株の *recN* 遺伝子の塩基配列を整列して列挙した。

2本の outer primer (F3 and B3) と inner primer (FIP and BIP) を PrimerExplorer V4 software (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) を利用して *recN* 遺伝子配列上に設計した。しかし、このソフトウェアでは変異箇所を選択したPrimerの設計はできないため、ソフトウェア上で設計された複数のPrimerセットをそれぞれ上述の *recN* 遺伝子の塩基配列に当てはめることで、真の *S. suis* には共通しており、その他の株では異なる塩基配列が多い箇所に該当した

Primerセットを候補にした。設計したPrimerをHPLC精製したものを合成し、2)で抽出したゲノムDNAのうち、*S. suis*の基準株、血清型参考株 (*S. suis*からは除外されるべき血清型も含む) および*recN*近縁種を供試することで、その特異性を評価した。この時の反応には、Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)を供試し、合計25 $\mu$ lの溶液中に40pmolのFIPおよびBIP、5pmolのF3およびB3を加えた。反応条件は、60 °C 60分間の後、80 °C 5分間で行い、目視で反応後の溶液が濁っていた場合に、陽性と判定した(Mori *et al.*, 2001)。特異性の評価で真の*S. suis*特異的だったPrimerセットを候補として、以降の条件検討を行った。次に、反応時間の短縮のためにLB loop primerも設計し、LB loop primerの有無で白濁までに要する時間の違いを観察した。最適な反応温度の検討には、*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup>のゲノムDNAを供試し、60、63および65 °C で120分間反応させた。継時的な濁度の変化を観察するため、Loopamp EXIA real-time turbidimeter (Eiken Chemical Co., Ltd.)を使用した。濁度の上昇が早く、最も高い濁度を記録した温度を最適な温度と判断した。また、DNA濃度が薄い検体の継時的な濁度の変化を観察するときにもLoopamp EXIA real-time turbidimeterを使用した。上述の様々な条件検討で最も優れていたPrimerセットを、LAMP<sub>SS</sub>のPrimerセットとした。全ての反応条件検討後の反応では、T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA)を使った。また、以上のLAMP反応完了後には酵素を失活させるために80 °C で5分間加熱した。

## 6) LAMP 法

今回の試験に供試した Primer は、表 5 に示した。LAMP 法は全て HPLC 精製した Primer を使用した。LAMP<sub>2J</sub> (Zhang *et al.*, 2013) は、論文に記載されてい



る方法に従った。すなわち、63 °C で 48 分間反応させた後、酵素を失活させるため 85 °C 2 分間加熱した。LAMP 法は、Loopamp DNA amplification kit を利用した合計 25 $\mu$ l の方法で行った。40pmol の FIP および BIP、5pmol の F3 および B3、20pmol の LB を 25 $\mu$ l の反応溶液中に入れた。LAMP 法を行うときには必ず、陰性対照として DNA の代わりに DW を用いたチューブを用意した。LAMP 法の成績は、目視で反応後の溶液が濁っていた場合に、陽性と判定した。

### 7) LAMP<sub>SS</sub> の特異性と感度

表4に記載している全ての細菌種をLAMP<sub>SS</sub>の特異性試験に供試した。一方、感度試験には、*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup> を供試した。第1章の材料と方法の6) に記載した方法によって*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup>のDNAを調整し、cfuも同じ方法で求めた。5 $\mu$ lの抽出DNAを、鋳型としてLAMP<sub>SS</sub>に供試した。

### 8) 統計処理

LAMP<sub>SS</sub> 陰性サンプルと、LAMP<sub>SS</sub> 陽性サンプルの総生菌数の違いは、等分散の場合には Student の *t* 検定、不等分散の場合には Welch の *t* 検定を行った。P 値が < 0.05 のときに、有意な差があると判定した。

## 3. 成績

### 1) LAMP<sub>SS</sub> の確立

真の *S. suis* に特異的な LAMP 法のために、LAMP<sub>SS</sub>1-F3:5'-TGAGATGCTAG AATACCAAATT-3'、LAMP<sub>SS</sub>1-B3 : 5'-AGACTTTGCAAGTCACTCAT-3'、LAMP<sub>SS</sub>1-FIP : 5'-GCAGTTTATCGCGTTCCTGATGAAGCAGCGGATTTGAA

G-3'、LAMP<sub>SS</sub>1-BIP : 5'-CACAAACAAATTGCAGATACACTGACTGAGCGTAGGTTGTTCA-3'を設計し、この Primer セットを *recN-1* とした。*recN-1* で増幅が起こるかを表 4 に示した *S. suis* 血清型 2 型の基準株を供試して検討したところ、はっきりとした白濁までに 4 時間を要したため、不適とした。次に、LAMP<sub>SS</sub>2-F3 : 5'-ATCCCAGCACCATATCC-3'、LAMP<sub>SS</sub>2-B3 : 5'-TTCCCCAGACTTCAAA TC-3'、LAMP<sub>SS</sub>2-FIP : 5'-CAACGGTTGTCTGATAACGGTCTTGTCTTTTG GACAGTTTCGG-3'、LAMP<sub>SS</sub>2-BIP : 5'-AAGCAAAAAAATGAGCAAGAAC ATGCTTCGATTTTCAGCAATT-3'と LAMP<sub>SS</sub>3-F3 : 5'-TGTCGATGATGTT TTGGACTA -3'、LAMP<sub>SS</sub>3-B3 : 5'-GCTTTCTCCATATACAAGTCTTG-3'、LAMP<sub>SS</sub>3-FIP : 5'-AAGCTGAACTTCCAAATCATCTCCCAGCGAAGAATAC AATCTATTGAC-3'、LAMP<sub>SS</sub>3-BIP : 5'-TAGAGAAAGAATTGGTTGAACGAG CGCGGATAATATCTTCTAAAACAAC-3'を設計し、それぞれを *recN-2*、*recN-3* とした。*recN-2* および *recN-3* で増幅が起こるかを *S. suis* 血清型 2 型の基準株を供試して検討したところ、60 分間で明らかな白濁がみられたため、表 4 に示した血清型参考株および *recN* 近縁種を供試して確認したところ、血清型 20、22、26、32、33 および 34 型の血清型参考株および *recN* 近縁種は全て白濁しなかったが、上記を除いた 28 の血清型参考株は、60 分間で明らかな白濁を形成した。以上より、*recN-2* と *recN-3* を以後の Primer セットの候補とした。

次に、*recN-2* と *recN-3* の loop primer を設計した。*recN-2* は、LAMP<sub>SS</sub>2-B loop : 5'-CAAGGCGCGGATTGAGATG-3'、*recN-3* は、LAMP<sub>SS</sub>3-B loop : 5'-GGTCAGCTCAGCCAATCACGC -3'を設計した。LB loop primer の有無で、それぞれ *recN-2* と *recN-3* がどれだけ白濁するまでの時間が短縮するのか *S. suis* 血清型 1、4、14 型の参考株を供試したところ、*recN-2* では、白濁するまでの時

間が 35 分間から 25 分間に短縮し、*recN-3* では 50 分間から 30 分間に短縮した。このため、この後の条件検討では全てに LB loop primer も加えた。

また、最適な反応温度の検討時間を検討するため、継時的な濁度の変化を観察した。*S. suis*血清型2型の基準株を用いて60、63および65°Cを試したところ、*recN-2*、*recN-3*共に60°Cで濁度が最も早く上昇し、最も高い濁度を記録したことから、その後は全て60°Cで反応させた。しかし、*recN-2*は120分間の反応で最も高い濁度が0.6だったのに対して、*recN-3*は0.7だった。

さらに、供試するDNA濃度が薄い場合でも濁度が上がるかを確認するため、*S. suis*血清型2型の基準株のDNAを10倍階段希釈し、*recN-2*および*recN-3*に供試して継時的な濁度の変化を観察した。3,500,000 cfu/反応を原液とし、それを $10^{-5}$ 乗まで希釈した。*recN-2*は、 $10^{-4}$  (350 cfu/反応) が60分間で濁度0.4まで達したが、 $10^{-5}$  (35 cfu/反応) が濁度0.4まで達するのに80分間以上要した。一方、*recN-3*は、 $10^{-5}$ が60分間で濁度0.4まで達した。

以上の成績より、*recN-2* と *recN-3* ではどちらも真の *S. suis* に特異的で、最適な反応温度は 60°C だった。最も高い濁度が *recN-3* の方が高く、さらに、供試する DNA 濃度が薄いときには、*recN-3* の方がより薄い DNA 濃度でも濁度の上昇が確認されたため、より優れている *recN-3* を LAMP<sub>SS</sub> の Primer セットとした。また、LAMP<sub>SS</sub> に食肉から抽出した DNA を供試した場合には、抽出 DNA 中の *S. suis* DNA 濃度が薄いことを想定して、LB loop primer も加えた状態で 60°C、60 分間の反応を LAMP<sub>SS</sub> の反応とした。

## 2) LAMP<sub>SS</sub> の特異性と感度

表4に記載している様々な血清型の *S. suis* 代表株と野外株、および *recN* 近縁種以

外の全ての細菌種を供試してLAMP<sub>SS</sub>の特異性を判定した。真の*S. suis*に含まれる血清型の*S. suis*菌株（2株の代表株および14の豚由来野外株）は、LAMP<sub>SS</sub>陽性だった。しかし、血清型20、22および33型の3株の豚および牛由来野外株では陰性だった。また、その他の細菌種では全て陰性だった（表4）。一方、LAMP<sub>SS</sub>の感度は、5.4 cfu/反応（58.3 cfu/ml THブロース培養）だった。

### 3) 市販豚肉・内臓肉からの *S. suis* DNA の検出

LAMP<sub>SS</sub> と LAMP<sub>2J</sub> の成績は、表 6 に示した。全ての種類の市販豚肉・内臓肉から、LAMP<sub>SS</sub> および LAMP<sub>2J</sub> が陽性の検体が見つかった。合計 255 検体の市販豚肉・内臓肉が LAMP<sub>SS</sub> によって *S. suis* の DNA を含有していることがわかった。特に、レバー（70.3%）、モツ（63.6%）、タン（59.4%）、外国産豚ひき肉（57.9%）およびハツ（56.3%）で高い LAMP<sub>SS</sub> 陽性率を示した。また、国産豚カット肉（6.9%）、国産豚ひき肉（7.4%）および外国産豚カット肉（12.6%）では低い LAMP<sub>SS</sub> 陽性率だった。LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体のうち 47 検体は LAMP<sub>2J</sub> によって *S. suis* 血清型 2 もしくは 1/2 型の DNA を含有していることがわかった。外国産豚ひき肉（54.5%）、タン（28.3%）、外国産豚カット肉（18.8%）、国産豚カット肉（15.8%）、レバー（14.4%）、ハツ（11.1%）、モツ（7.1%）および国産豚ひき肉（5.6%）の順で高い LAMP<sub>2J</sub> 陽性率を示した。さらに、販売形態の違いに着目すると、国産豚肉と内臓肉を同時に販売する店舗数（11 店/23 店）の方が、国産豚肉のみを販売する店舗数（6 店/22 店）よりも LAMP<sub>SS</sub> 陽性豚肉を検出した店舗数が多かった。これらの店舗の中で、特に豚肉と内臓肉を同時に販売する小売店は、繰り返し LAMP<sub>SS</sub> 陽性豚肉が検出された。また、残りの 4 店舗は、内臓肉のみの販売、もしくは外国産豚肉のみを販売していた。

#### 4) 市販豚肉・内臓肉の総生菌数

LAMP<sub>SS</sub>陰性サンプルと、LAMP<sub>SS</sub>陽性サンプルの総生菌数（cfu/ml肉汁）を図5に示した。この2グループ間、または国産豚肉と外国産豚肉との間で有意な差はなかった。しかし、店舗ごとにその差が大きく、LAMP<sub>SS</sub>陰性の検体で比較すると、国産カット肉および外国産カット肉で最も総生菌数の多い店舗はそれぞれ153,000,000、136,000,000であり、最も少ない店舗はそれぞれ2,800、440,000だった。国産ひき肉および外国産ひき肉で最も総生菌数の多い店舗はそれぞれ18,800,000、8,400,000であり、最も少ない店舗はそれぞれ12,800、3,530,000だった。レバー、タン、ハツ、モツで最も総生菌数の多い店舗はそれぞれ37,200,000、55,400,000、131,300,000、113,000,000であり、最も少ない店舗は97,200、1,180,000、153,000、33,600,000だった。一方、LAMP<sub>SS</sub>陽性の検体で比較すると、国産カット肉および外国産カット肉で最も総生菌数の多い店舗はそれぞれ600,000、59,600,000であり、最も少ない店舗はそれぞれ2,150、445,000だった。国産ひき肉および外国産ひき肉で最も総生菌数の多い店舗はそれぞれ15,300,000、4,330,000であり、最も少ない店舗はそれぞれ237,000、227,000だった。レバー、タン、ハツ、モツで最も総生菌数の多い店舗はそれぞれ180,000,000、420,000,000、91,300,000、1,020,000,000であり、最も少ない店舗は89,000、16,200,000、760,000、2,030,000だった。

#### 5) 市販豚肉・内臓肉から分離した *S. suis* 野外株の性状

マスタープレート上のコロニーのLAMP法成績と、そこから分離した*S. suis*野外株の性状は、表7に示した。LAMP<sub>2J</sub>陽性の47検体全てに対して、少なくとも3回は*S. suis*の分離を試みた。このうち1回でもLAMP法が陽性になった場合には表で陽性

とした。47検体のマスタープレート上のコロニーから抽出したDNAのうち、29検体がLAMP<sub>SS</sub>陽性だった（表7）。これらの検体から、血清型1型1株、血清型2型2株を含む総計149株の*S. suis*を分離した。血清型2型の2株は、それぞれ異なるタン検体（T1およびT2）から分離されており、どちらもST28だった。外国産ひき肉（MP-F1）、レバー（L1）、タン（T3-T8）およびハツ（H1）からも*S. suis*を分離した。しかし、29検体中10検体からは*S. suis*が分離できなかった。一方、血清型を推定するマルチプレックスPCRで特異的なバンドを形成しない場合や、特異的な抗血清で凝集しない場合があり、それらの*S. suis*野外株は型別不能とした。

#### 4. 考察

本研究で、*S. suis*血清型20、22、26、32、33および34型を除くすべての真の*S. suis*を検出する新規のLAMP法を開発した。市販の食肉は、と畜場、流通、保管、加工場、店舗における陳列等の作業工程の中で、様々な微生物が混入する。さらに、LAMP法の感度は、従来のPCRよりも遺伝子増幅を阻害する物質の影響を受けにくい（Kaneko *et al.*, 2007）、市販豚肉・内臓肉中に他の細菌種が多く存在する中でも確実に*S. suis*を検出する手段として、食肉検査への応用に適していると考えた。

*S. suis*の生息環境は、豚の扁桃や鼻腔と考えられているが、豚の生殖器や消化管からも検出されることがあった（Higgins and Gottschalk, 2005）。それゆえ、レバー、タンおよびモツは*S. suis*に汚染されているだろうと予想していた。しかし、予想に反して、カット肉、ひき肉、ハツでも*S. suis*に汚染された検体があった。と畜前の筋肉に*S. suis*が存在していれば、その豚個体が菌血症や敗血症になっていたことを意味する。しかし、日本の全てのと畜場には獣医師が常駐しており、全ての豚個

体、枝肉および臓器を検査し、異常が見られた際には部分廃棄もしくは全廃棄になるため、菌血症や敗血症の個体を見逃したとは考えにくい。さらに、日本のと畜場は衛生的に管理されており、多くのと畜場で枝肉と臓器は別々のラインで処理される。市販豚内臓肉では50%以上がLAMP<sub>SS</sub>陽性であり、また、いくつかの小売店において時期を変えて繰り返し豚肉を購入したところ、内臓肉も販売している店舗では、繰り返しLAMP<sub>SS</sub>陽性になるところがあった。さらに、豚肉のみ販売する店舗では、その多くがLAMP<sub>SS</sub>陰性だった。これらの成績から、市販豚肉の*S. suis*汚染の原因としては、一緒に販売されている豚内臓肉が疑われた。

一方、ハツの場合は、初期の心内膜炎があった可能性が考えられる。*S. suis*が原因の豚の心内膜炎は、主にと畜場で摘発される(Lakkitjaroen *et al.*, 2011)。本研究に供試したハツは、試験の前に表面を観察し、病変がないことを確認したが、まだ肉眼では摘発できない初期の心内膜炎があった可能性は捨てきれない。そこで、初期の心内膜炎の可能性を除くと、と畜場を出た後の加工場や各店舗の裏側で行われるカット、選別、混和、パック詰め等の処理時に*S. suis*を元々含んでいる内臓肉から豚肉やハツへ交差汚染が起きているのではないかと仮説を立てた。しかし、本研究では限られた検体数しか調べていないことから、この仮説を立証するためには、より多くの検体を収集し、内臓肉と一緒に販売している店舗とそうでない店舗とを比較する必要がある。また、市販豚内臓肉と同時に販売されている鶏肉や牛肉等から*S. suis*が検出されることがあれば、本仮説を支持するものとなる。

全種類の市販豚肉・内臓肉の総生菌数を比較したが、LAMP<sub>SS</sub>の成績との関連は見られなかった。しかし、香港の市販豚肉の*S. suis*汚染を報告したCheung *et al.* (2008)によると、総生菌数と*S. suis*汚染の間には相関関係があった。本研究と香港の成績の違いは、両国の食品衛生管理体制の違いによるところが大きいのではと推測

した。本研究で得られた成績では、内臓肉から豚肉への*S. suis*汚染は、汚染された市販豚肉中の*S. suis*を含む総生菌数の多さには依存せず、一緒に扱われる豚内臓肉に*S. suis*が存在するか否か、適切に扱われているかが重要な鍵になると考えられた。

ST1 complexに属する*S. suis*は、他のcomplexに属する株よりもヒトに対する病原性が高く、公衆衛生上の問題になることから注目されてきた(King *et al.*, 2002)。しかし、その他のヒト臨床分離株は、ST28 complex (旧ST27 complex) に属するST25、ST28、ST101、ST102、ST103およびST104に分類されることが多いため(Chang *et al.*, 2006; Takamatsu *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 2012)、ST28 complexもヒトの*S. suis*感染を考える上では重要なグループと考えられている。一方、近年食品を介したヒトの*S. suis*感染症が注目され、新しい食品媒介病原体と考えられている(Nghia *et al.*, 2011; Pachirat *et al.*, 2012)。しかし、これまで、市販豚肉・内臓肉への*S. suis*汚染は報告されたが(Cheung *et al.*, 2008; Ip *et al.*, 2007)、検出された*S. suis*のヒトへの病原性については言及されていなかった。本研究では、市販豚内臓肉から*S. suis*のDNAのみならず、ヒトへ病原性のあるST28を分離したことから、日本の市販豚肉・内臓肉における*S. suis*汚染の実態を初めて明らかにし、職業として生の豚肉・内臓肉を扱う機会が多い人を中心に、これらの取り扱いには慎重を期す必要があることを示した。

本研究では、*S. suis*血清型2型以外にも様々な血清型を分離したため、市販豚肉・内臓肉の同一パック中に数種類の*S. suis*が混在していることを示した。また、ここでは、*S. suis*にのみ着目したが、市販豚内臓肉に付着している他の食品媒介病原体も、本菌と同じ経路で食肉を汚染する可能性が示唆された。*S. suis*は豚の常在細菌の一つであり、市販豚内臓肉中に高頻度に存在するため、市販豚肉に混入した際には、感度の高いLAMP<sub>SS</sub>で容易に検出できたと考えられる。しかし、その他の食品媒介



病原体は、それぞれ個々の検出方法は開発されているが、食肉を汚染することは稀であり、そのため、消費者に渡る前に検出、摘発することは困難を極めている。従って、交差汚染により食肉に付着するその他の食品媒介病原体を検出する指標として、*S. suis* が有効である可能性が示唆された。本研究で提案された仮説を検証し、交差汚染の起こるタイミングの特定と交差汚染防止の重要管理点を設定するためにも、市販食肉を用いたさらなる研究を進める必要がある。

ところで、本研究で供試した LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体からは、必ずしも生きた菌の分離に成功しなかった。そのため、菌が流通の過程で凍結融解等により死滅したのか、または方法の不備によって分離出来なかったのかは不明である。従って、食品媒介病原菌を考える上で重要な生菌の検出と、その含有量に関する検討については課題が残された。

## 5. 要約

分類再評価後の真の *S. suis* に特異的な新規の LAMP<sub>SS</sub> を開発した。真の *S. suis* である、血清型参考株、野外株および代表株にのみ特異的であり、感度は 5.4 cfu/反応だった。様々な種類の市販豚肉・内臓肉を LAMP<sub>SS</sub> に供試したところ、LAMP<sub>SS</sub> の成績では、レバー (70.3%)、モツ (63.6%)、タン (59.4%)、外国産豚ひき肉 (57.9%) およびハツ (56.3%) で高い陽性率を示した。また、国産豚カット肉 (6.9%)、国産豚ひき肉 (7.4%) および外国産豚カット肉 (12.6%) では低い陽性率だった。次いで、陽性検体を LAMP<sub>2J</sub> に供したところ、外国産豚ひき肉 (54.5%)、タン (28.3%)、外国産豚カット肉 (18.8%)、国産豚カット肉 (15.8%)、レバー (14.4%)、ハツ (11.1%)、モツ (7.1%) および国産豚ひき肉 (5.6%) の順で高い陽性率を示した。それぞれの市販豚肉・内臓肉の総生菌数を LAMP<sub>SS</sub> 陽性グ

ループと陰性グループで比較したが、有意差はなかった。菌分離では、肉汁に*S. suis*以外の菌が多く含まれるため、レプリカプレート法を利用した独自な方法を開発した。すなわち、選択培地上に形成したコロニーに対して、レプリカプレートを作製後、マスタープレート上のコロニーを全て回収してDNAを抽出した。これに対してLAMP<sub>SS</sub>陽性の場合のみ、レプリカプレートから菌分離を行った。その結果、血清型1型1株、血清型2型2株を含む総計149株の*S. suis*を分離した。血清型2型の2株は、それぞれ異なるタンから分離されており、遺伝子型別の結果、ヒトへの感染も報告されているST28だった。また、LAMP<sub>SS</sub>の成績と販売形態を比較したところ、豚肉と内臓肉の両者を販売する小売店の方が、内臓肉を販売しない小売店よりもLAMP<sub>SS</sub>陽性国産豚肉検体数が多かった。また、LAMP<sub>SS</sub>陽性豚肉が多い小売店から時期を変えて複数回購入すると、繰り返しLAMP<sub>SS</sub>陽性検体が見られる場合があった。上述の小売店による成績の差に加え、市販豚肉中やその表面には、元々*S. suis*は存在しないはずであることから、市販豚肉への*S. suis*汚染は、と畜場を出た後の食肉加工中に起きたと推定された。

### 第3章 食肉中の *S. suis* 検出・定量を目的とした新規 real-time PCR の開発

#### 1. はじめに

ユッケ食中毒の発生から牛肉等の生食規制が強まり、2012年7月からは生食用牛レバー販売禁止基準が施行された。その反動として、豚肉や豚レバーの生食を提供する飲食店や通信販売が登場するなど、豚肉等の生食について消費者の混乱や知識の欠如が露呈された。一方、豚にはヒトに対して致死的となる病原体が存在するが、その実態は不明な点が多い。特に、*S. suis* の場合、ヒトが感染すると髄膜炎や劇症型感染症等致死的な経過をとる場合もあり、2005年中国で215名の患者（うち39名が死亡）を出した事件以来注目されている(Yu *et al.*, 2006)。オランダ政府衛生局は、今後早急に対策をとるべき人獣共通感染症の第9位に本病を挙げている(Havelaar *et al.*, 2010)。これらのヒト症例の多くは豚肉または豚内臓肉を原因としているため、第2章で述べた通り日本の市販豚肉・内臓肉に潜在する *S. suis* について、著者らが開発した LAMP 法とその陽性検体からの菌分離を実施したところ、半数以上の豚内臓肉と一部の豚肉から *S. suis* の遺伝子が検出された。しかし、陽性検体からは必ずしも生きた菌の分離に成功せず、そこに存在する *S. suis* が、店頭に並ぶまでの凍結融解等により死滅し、危険性を無視できるほどに減少したのか、方法の不備によって分離出来なかったのかは不明のままであった。そこで、本研究では、真の *S. suis* に特異的な定量的 real-time PCR (qPCR<sub>SS</sub>) を、第1章に記載した通り、*Streptococcus* 属菌の分類に適している *recN* 遺伝子を標的として開発した。

また、食品媒介病原体を検出する際に留意すべき重要な点は、DNA だけでなく、生菌を検出することであり、そのために様々な方法が開発されてきた。その代表的な手法として、ethidium bromide monoazide (EMA) や propidium monoazide (PMA)

を利用した方法がある (Josefsen *et al.*, 2010; Minami *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011)。これら 2 つの試薬の原理は共通しており、菌体を含む試料へこれらの試薬を添加し、可視光に暴露することで細胞膜の構造が脆くなっている死菌の細胞質に試薬が入り込み、DNA を修飾する。EMA または PMA と反応させた試料から DNA を抽出し、遺伝子増幅反応に供試した場合、既に修飾されている死菌の DNA は遺伝子増幅反応が進まず、結果として生菌のみの DNA を増幅できる。そこで本研究では、市販豚肉・内臓肉に対して EMA 反応を行った後に DNA を抽出し、新たに開発した qPCR<sub>SS</sub> に供試することで市販豚肉・内臓肉中で生存している *S. suis* のみを検出する一連の方法を開発した。さらに、凍結融解による菌の生死への影響を調べ、日本の市販豚肉・内臓肉における実用上の危険性を科学的に検証した。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌株および培養条件

供試した菌株は、表 4 に示した。また、第 1 章に記載した方法で培養した。

### 2) 市販豚肉・内臓肉

第 2 章に記載した市販豚肉・内臓肉のうち、-80°C に保存している肉汁が十分量残っているものを供試した (表 8)。各検体を、第 2 章で *S. suis* 分離時に使用したマスタープレート上のコロニーの LAMP<sub>SS</sub> の成績と菌分離成績に分け、比較した。第 2 章と同じ方法で SSS を添加した TH 寒天培地を用意し、そこへ 10 倍階段希釈した肉汁を接種し、生えてきたコロニー数を計測し、この値 (cfu/ml 肉汁) を m-cfu とした。

### 3) 凍結融解

市販豚肉・内臓肉は既に様々な細菌に汚染されている可能性があるため、薬剤耐性マーカーを付与した *S. suis* を選択し、これを市販豚肉に接種することで、凍結融解を繰り返すことによる生菌数の減衰について測定した。まず *S. suis* 代表株の中でテトラサイクリン (TC) 耐性の *S. suis* 89-1591 を TH 寒天培地に培養、掻き取り、500 $\mu$ l の滅菌生理食塩水に懸濁し、ストレプトマイシン (SM) 400 $\mu$ g 添加 TH 寒天培地に接種した。この選択培地上に出現したコロニーを純培養し、SKR-1 とした。

SKR-1 を TH ブロース 3ml に接種し、5% CO<sub>2</sub> 下で 37 °C、16 時間培養した。その培養液を、10 倍階段希釈し、それぞれの希釈段階の一部を TH 寒天培地上に接種した。次に、ストマッカー袋に入った市販国産豚肉 25g を 6 セット用意し、そのうち 5 セットには SKR-1 培養液を 200 $\mu$ l 接種し、残りの 1 セットには滅菌生理食塩水を 200 $\mu$ l 接種した。SKR-1 および生理食塩水接種豚肉をそれぞれ 1 セット残してその他の合計 4 セットは -20°C に冷凍した。冷凍しなかった SKR-1 および生理食塩水接種豚肉それぞれ 1 セットに 225ml の滅菌生理食塩水を加え、手でしっかり混合した。そのうち 1ml を無菌的に回収し、15,000rpm、10 分間の遠心分離を行い、上清を捨てた。沈渣へ滅菌生理食塩水 100 $\mu$ l を添加し、懸濁した。その懸濁液を 10 倍階段希釈し、それぞれの希釈段階の一部を TC 10 $\mu$ g および SM 400 $\mu$ g 添加 TH 寒天培地上に接種した。翌日、冷凍庫に入れた合計 4 セットを全て取り出し、20°C に設定したウォーターバスへ 1 時間入れた。1 セットを残し、その他の合計 3 セットは再度 -20°C に冷凍した。冷凍しなかった SKR-1 接種豚肉は、前日と同様に処理した。また、初めて冷凍した日から数えて 5 日後、6 日後、7 日後にも同様の凍結融解試験を行った。cfu は、TC および SM 添加 TH 寒天培地に接種した翌日、培地上に生えた SKR-1 コロニー数を計測することで求めた。

#### 4) qPCR<sub>SS</sub> に供試する Primer の開発

第1、2章と同様に、Tien *et al.* (2013) および Glazunova *et al.* (2010) から、*S. suis* 基準株、血清型参考株および *recM* 近縁種の *recM* 遺伝子の塩基配列を得た。また、第1章で決定した32および34型の *recM* 遺伝子の塩基配列も加え、Sequencher software と GENETYX software および MEGA 5 を用いてアセンブルし、真の *S. suis* とその他の株の *recM* 遺伝子の塩基配列を目視で判別した。真の *S. suis* には共通しており、その他の株では異なる塩基配列が多い箇所を選定し、その領域に Primer を複数セット設計した。本試験では、real-time PCR の中でも、特異性に優れている Probe 法を採用した。設計したそれぞれの Primer 間領域を選択し、Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) に配列情報と設計 Primer を入力することで、それぞれに適している Probe を設計した。Probe を上述の *recM* 遺伝子配列情報に照らし合わせ、真の *S. suis* には共通しており、その他の株では異なる塩基配列が多い箇所に設計されているものを選択した。Primer3 で設計できなかった場合には、目視で 17-25bp、GC% が 40-60%、T<sub>m</sub> 値 60-65°C になるように Probe を設計した。Probe は、よりシグナルを増幅させ、かつバックグラウンドを軽減させるダブルクエンチャーシステムを採用した。

また、ゲノムサイズが既知の *S. suis* P1/7 をスタンダード DNA として供試し、10 倍階段希釈したスタンダード DNA の値から標準曲線を描いた。本試験では、P1/7 のゲノム DNA は、第1章に記載した Mogollon *et al.* (1990) の報告によって抽出し、抽出 DNA 溶液中の 2 本鎖 DNA の濃度を、Quantifluor<sup>®</sup> dsDNA System (Promega, WI, US) を用いて Quantus<sup>™</sup> Fluorometer (Promega) で測定した。その DNA 濃度と、*S. suis* P1/7 のゲノムサイズが 2,007,491bp である (Accession

番号：AM946016) ことから、スタンダード DNA 中の *S. suis* 菌数を計算した。設計した Primer と Probe は、その後、このスタンダード DNA のみを供試することで、10 倍階段希釈を再現できているか（非特異的反応がないか）確認し、その後感度を求めた。

さらに、*S. suis* 血清型 2 型の基準株、血清型参考株 (*S. suis* からは除外されるべき血清型も含む) および *recN* 近縁種を供試することで、その特異性を評価した。全ての反応には GeneAce Probe qPCR Mix  $\alpha$  (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を供試し、Primer は、最終濃度 0.5  $\mu$ M、Probe は最終濃度 0.2  $\mu$ M になるように加えた。StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (ThermoFisher SCIENTIFIC, Massachusetts, US) を使用し、50 °C 2 分間、95 °C 10 分間の後、95 °C 30 秒、60 °C 60 秒を 45 サイクル繰り返した。

特異性の評価で真の *S. suis* 特異的だった Primer セットを qPCR<sub>SS</sub> の Primer とした。さらに、表 4 に示した *S. suis* 代表株および複数の細菌種を供試して、qPCR<sub>SS</sub> の特異性を確認した。

## 5) EMA

EMA による死菌 DNA 増幅阻害は、その濃度と反応時間を適切な条件に設定しないと、生菌の DNA との結合、あるいは不完全な死菌 DNA との結合を生じるため、反応条件の検討が必要である。EMA 反応は、市販の Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (TaKaRa, Shiga, Japan) を利用し本菌に適した反応条件を検討した。すなわち、*S. suis* P1/7 を TH ブロースに接種し、5% CO<sub>2</sub> 下で 37 °C 培養することで、Optical density 600nm (OD<sub>600</sub>) の値が 0.3 になる対数増殖期まで培養した。この培養液を 10 倍希釈した菌液を 2 本に分け、片方は 95 °C で 5 分間加熱す

ることで殺菌した。生菌、死菌それぞれ20 $\mu$ lを2本ずつ1.5mlチューブに入れ、そこへ第2章で記載した方法で調整した国産豚ひき肉の肉汁を、200 $\mu$ l ずつ加えた。これら合計4本をAからDとした（A：生菌/EMA処理無し、B：死菌/EMA処理無し、C：生菌/EMA処理有り、D：死菌/EMA処理有り）。これらを1,000rpm 1分間の遠心によって大きな沈渣を沈殿させ、上清を新しい2mlチューブ(Quiagen, Hilden, Germany)へ回収した。15,000rpm 3分間遠心し、上清を捨て、沈渣をAとBの2本は55 $\mu$ l、CとDの2本は40 $\mu$ lの滅菌生理食塩水に懸濁した。CとDにはキットに含まれるSolutionA（核酸修飾反応の促進試薬）を10  $\mu$ l加え、よく懸濁した後、SolutionBを原液のまま5 $\mu$ l添加した。ボルテックスした後、遮光し、氷上で5分間反応させた。次に、氷上に置いたまま、100V 500Wのハロゲンランプ(Iwasaki Electric Co. Ltd, Tokyo, Japan) を使用し、光源から20cm離れた状態で、15分間光を照射した。最後に、AからDの4セットを、DNA抽出効率の高い細胞破砕機を利用するPowerbiofilmキット(MoBio, Carlsbad, CA, USA)を用いてDNAを抽出した。検体中の細胞を破砕する工程では、Retsch MM300 (Retsch, Haan, Germany)を使用した。

次に、上述のAからDの試料から抽出したDNAを、開発したqPCR<sub>SS</sub>に供試し、Ct値（PCR増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数）を求めた。Ct値は、1つ増幅すごとに1/2倍の標的DNA含量を示すことから、AとCを比較した時には差が少なく（生菌への影響が少なく）、BとDを比較した時にDのCt値が著しく上がる（死菌のDNA増幅が抑制されている）ことが求められるため、AからDまでのCt値を比較して正しいEMA処理方法かどうかを検討した。その後の市販豚肉・内臓肉からのDNA抽出は、-80°Cに保存していた肉汁のうち100 $\mu$ lを、上述のEMA処理およびPowerbiofilmを用いてDNA抽出することで得た。



### 3. 成績

#### 1) qPCR<sub>SS</sub> の確立

真の *S. suis* に特異的な real-time PCR のために、*recN* 遺伝子配列上の 157bp を標的にした Forward Primer (qPCR<sub>SS</sub>-preF) : 5'- AGACTACAAACAGCTC TCTTCT -3'、Reverse Primer (qPCR<sub>SS</sub>-preR) : 5'- CTTCGTAATGGTATTGA GCA -3'、Probe (qPCR<sub>SS</sub>-preP) : 5'- (FAM)CAATCGTCT(ZEN)CATGCAA TTGG(IBFQ) -3 を設計した。スタンダード DNA のみを供試したところ、増幅曲線が 115% と高く、感度も 278.3 菌数/反応と低かったため、次に、*recN* 遺伝子配列上の 248bp を標的にした Forward Primer (qPCR<sub>SS</sub>-F) : 5'-AGCGTCTCAGC GATGTGG-3'、Reverse Primer (qPCR<sub>SS</sub>-R) 5'-GAGCTGACCTGCTCGTTC AAC-3'、Probe (qPCR<sub>SS</sub>-P) 5'-(FAM)CAATCGTCT(ZEN)CATGCAATTGG (IBFQ)-3' を設計した。増幅曲線は 91% で、感度は 9.9 *S. suis* 菌数/反応と高かったことから、こちらを qPCR<sub>SS</sub> の Primer、Probe セットとした。

#### 2) qPCR<sub>SS</sub> の特異性

表4に記載している血清型2型の *S. suis* 代表株、および *recN* 近縁種以外の全ての細菌種を供試して qPCR<sub>SS</sub> の特異性を判定した。真の *S. suis* に含まれる血清型の *S. suis* 菌株 (2株の代表株) は、qPCR<sub>SS</sub> 陽性だった。また、その他の細菌種では全て陰性だった (表4)。

#### 3) 凍結融解

*S. suis* SKR-1 を市販豚肉に接種した場合における凍結融解の成績は、図6に示

した。2回の凍結融解では、*S. suis* SKR-1の生菌数はほとんど変化が無く、4回繰り返しても凍結融解前の約1/4までの減少にとどまった。また、生理食塩水接種豚肉は、コロニーを形成しないことを確認した。

#### 4) EMA 反応と鋳型 DNA の抽出

Ct 値はそれぞれ A : 25.7、B : 30.5、C : 27.6、D : 検出限界以下となった。すなわち、生菌の EMA 処理の有無 (A と C) で比較すると、1.9 の差があり、これはキットが推奨する 2~4 以下の範囲に収まっているため、生菌にとっては適切な反応条件と考えられる。一方、死菌の EMA 処理の有無 (B と D) で比較すると、D が検出限界 (およそ 34) 以下であったことから、死菌の DNA の増幅が十分抑制されていることがわかった。そのため、本試験で検討した条件は、至適条件内に当てはまると考え、その後の豚肉・内臓肉検体にもこの条件で EMA 処理を行った。しかし、レバーから調整した肉汁は光を通さないため、EMA の使用には適さなかった。

#### 5) 市販豚肉・内臓肉を供試した qPCR<sub>SS</sub> と m-cfu

市販豚肉・内臓肉を供試した qPCR<sub>SS</sub> と m-cfu の成績を表 8 に示した。多くの検体では、qPCR<sub>SS</sub> の定量限界以下の菌数しか検出されなかった。定量可能な検体の中には、肉汁 1ml あたり 10,000 を超える *S. suis* 菌数を示す検体もあったが、全てタンなどの内臓肉だった。菌分離できなかった検体のうち、マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP<sub>SS</sub> 陰性検体は、*S. suis* に対する m-cfu の相対量が大きく、かつ *S. suis* の絶対数も少なかった。マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA が LAMP<sub>SS</sub> 陽性の検体で、菌分離陽性検体と陰性検体との *S. suis* に対する m-cfu の相対量に大差はなかった。また、図 7 に市販豚肉・内臓肉を

供試した m-cfu/*S. suis* 菌数と *S. suis* 分離成績を示した。m-cfu/*S. suis* 菌数を一定の値で区切り、その前後でそれぞれ *S. suis* が分離できた検体数と分離できなかった検体数を比較した。m-cfu/*S. suis* 菌数の値を 300 で区別すると、*S. suis* が分離できなかったグループの 300 以上は 6 検体 (60%)、300 以下は 4 検体 (40%) だった。一方、*S. suis* が分離できたグループの 300 以上は 4 検体 (29%)、300 以下は 10 検体 (71%) だった。次に、m-cfu/*S. suis* 菌数の値を 400 で区別すると、*S. suis* が分離できなかったグループの 400 以上は 6 検体 (60%)、400 以下は 4 検体 (40%) だった。一方、*S. suis* が分離できたグループの 400 以上は 3 検体 (21%)、400 以下は 11 検体 (79%) だった。さらに、m-cfu/*S. suis* 菌数の値を 500 で区別すると、*S. suis* が分離できなかったグループの 500 以上は 4 検体 (40%)、500 以下は 6 検体 (60%) だった。一方、*S. suis* が分離できたグループの 500 以上は 3 検体 (21%)、500 以下は 11 検体 (79%) だった。

#### 4. 考察

本研究で、*S. suis* 血清型 20、22、26、32、33 および 34 型を除くすべての真の *S. suis* を検出する新規の qPCR を開発した。既存の *S. suis* 特異的 qPCR には、Yang *et al.* (2010) の開発した *gdh* 遺伝子を標的にしたものや、Su *et al.* (2008) および Bonifait *et al.* (2014) の開発した 16S rRNA 遺伝子を標的にしたものがある。しかし、これらは全て血清型再評価前の *S. suis* を標的としているため、最新の分類に基づいた疫学研究を行う場合には、本 qPCR<sub>SS</sub> が適している。

第 2 章で、日本で市販される豚肉・豚内臓肉における *S. suis* 汚染の実態が明らかになったが、LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体でも必ずしも菌分離が陽性とならず、どの程度の菌数が豚肉等を汚染しているのか、菌分離に成功しない理由は菌数の少なさに起因する

のか、分離方法の不備に起因するのかは不明であった。市販豚肉に付着した *S. suis* に対する凍結融解の影響を調べた成績では、2 回程度の処理はほとんど *S. suis* の生菌数に影響を与えないことが分かった。同じ条件下で、カンピロバクターは 4 回で 1/100、サルモネラは 1/2 にまで減少することが報告されている(品川ら、2004)。*S. suis* は、サルモネラと同程度と考えられ、通常の凍結融解ならば、その影響は無視してよいと思われる。

次に、*S. suis* の生菌のみが陽性となる検出方法を構築した。第 2 章で供試した検体を利用して、*S. suis* の生菌数を推定し、かつ各検体の m-cfu と *S. suis* の菌分離成績と比較した。*S. suis* の菌分離には、数 100 個の独立したコロニーが発育したマスタープレートを供試したため、m-cfu が数 100 個程度に対して 1 個以上の *S. suis* を含む肉汁でないと、マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP<sub>SS</sub> が陽性とならず、菌分離は容易でない。表 8 に示した成績は、ばらつきがあり、サンプル数も少ないことから、統計的に有意差を示すことはできないが、マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP<sub>SS</sub> が陰性となった検体では、概して推定 *S. suis* 菌数が qPCR<sub>SS</sub> の定量可能限界以下であること、さらに、*S. suis* に比べ m-cfu の数が多いことが分かる。一方、マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP 法が陽性となった検体のうちで、菌分離に成功した検体と菌分離できなかった検体との間では、*S. suis* の菌数に比べた m-cfu には大きな違いはなかった。これは、分離の成否が m-cfu との比ではなく、別な要因によることを示唆する。恐らく、他の菌のコロニーが *S. suis* のコロニーに覆い被さってしまい単離できなかったものと推測される。すなわち、第 2 章で考案したレプリカプレート法を用いた *S. suis* の菌分離法は、図 7 の成績を見比べた成績からも m-cfu との比が 400

以下であれば、ほぼ分離可能であるが、m-cfu の比が 400 以上の場合には、分離が難しいことを示唆している。

一方、肉汁中に含まれる *S. suis* の菌数全体を見ると、多くが qPCR<sub>SS</sub> による定量限界以下を示した。しかし、定量可能な検体の中には肉汁 1ml 当たりで 10,000 (肉 1g 当たりに換算すると 1,000) を超えるものも見られたが、それら推定菌数の多い検体は全てタンだった。このように、日本における市販豚肉・内臓肉の *S. suis* 汚染が明らかとなったが、国産のカット肉やひき肉での汚染は概して少なく、反面、タンなど内臓肉においては高度に汚染されているものも存在することが明らかとなった。上記の成績および第 2 章の成績と合わせると、内臓肉は元々汚染されており、カット肉やひき肉など筋肉への汚染は、内臓肉に起因すると考えられる。これらの成績は、内臓肉の処理・加工工程では、内臓から筋肉への交差汚染に注意する必要があるとともに、ヒトに有害な *S. suis* による作業員への感染についても警鐘を鳴らす必要があると考えられた。

以上の成績より、豚肉における *S. suis* 汚染は、豚内臓肉からの交差汚染の可能性が高いことや、レプリカ法と LAMP 法を組み合わせた菌分離法は、m-cfu に対して一定の比率以上に *S. suis* が存在していれば、ほぼ分離可能であることが示された。しかし、市販豚肉・内臓肉から肉汁を調整する過程で、汚染している菌のうちどの程度が肉汁中に回収されているのか、また、肉汁から DNA を調整する際に、DNA がどの程度の効率で回収できるのかについては正確に定量できなかった。この課題は、食肉および細菌には存在しない遺伝子配列を、人工的にゲノム配列に組み込んだ *S. suis* を作製することで解決する可能性がある。食肉にこの菌を人工的に添加し、DNA 抽出までの一連の作業を行い、組み込んだ遺伝子配列を標的とした real-time PCR

を応用することで、食肉に添加した量と採取的に DNA として回収された量比を観察することができる。

また、カット肉やひき肉の *S. suis* 汚染源が内臓肉とする仮説を立証するためには、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析が有効と考える。もしこの仮説が正しければ、内臓肉に存在する *S. suis* 以外の他の細菌種も一緒にカット肉やひき肉に付着しているはずである。*S. suis* 汚染が認められた市販豚肉、認められなかった市販豚肉および同時に販売されていた内臓肉とで構成細菌種を網羅的に調べるメタ 16S rRNA 遺伝子解析 (Pace, 1997) を行い、*S. suis* 汚染が認められた市販豚肉と同時に販売されていた内臓肉には共通して存在し、*S. suis* 汚染が認められなかった市販豚肉には存在しない細菌種がみつければ、この仮説をより強固なものとすることができるだろう。

## 5. 要約

第2章の研究成績から、日本の市販豚肉・内臓肉における *S. suis* 汚染の実態を初めて明らかにし、多くの検体から *S. suis* 遺伝子が検出され、さらに一部からはヒトの感染例が多い血清型 2 型の遺伝子も検出されたが、遺伝子陽性検体から必ずしも生きた菌の分離に成功しなかったため、菌が流通の過程で凍結融解等により死滅したのか、または方法の不備によって分離出来なかったのかは不明だった。そこで、正確な *S. suis* 菌数測定ができる qPCR<sub>SS</sub> の開発とそれを用いた菌数測定、凍結融解による *S. suis* への影響を評価した。Taqman プローブを用いた qPCR<sub>SS</sub> は、いずれも真の *S. suis* である、29 の血清型参考株および代表株にのみ特異的であり、感度は 9.9 *S. suis* 菌数/反応だった。食肉からの感染を起こす生菌のみを検出するため、死菌の DNA に結合し、遺伝子増幅反応を阻害する ethidium monoazide (EMA) 処理を行った後、DNA を抽出した。これを用いて、市販豚肉・内臓肉から調整した

肉汁中の *S. suis* 菌数を qPCR<sub>SS</sub> によって推定した。得られた成績と、菌分離時に用いた選択培地上に発育した総コロニー数を m-cfu として測定し、菌分離成績と比較した。その結果、多くの検体では、qPCR<sub>SS</sub> の定量限界以下の菌数しか検出されなかった。定量可能な検体の中には、肉汁 1ml あたり 10,000 を超える *S. suis* 菌数を示す検体もあったが、全てタンなどの内臓肉だった。菌分離できなかった検体のうち、マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP<sub>SS</sub> 陰性検体は、*S. suis* に対する m-cfu の相対量が大きく、かつ *S. suis* の絶対数も少なかった。マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体で、菌分離陽性検体と陰性検体との *S. suis* に対する m-cfu の相対量に大差はなかった。凍結融解による影響では、ストレプトマイシンおよびテトラサイクリン耐性の *S. suis* 変異株を選択して使用し、既に検体中に存在するかもしれない *S. suis* の影響を排除した。この変異株を市販の豚カット肉に接種して凍結融解を繰り返すことで、菌数の減衰を測定した。2 回の凍結融解では、*S. suis* 変異株の生菌数はほとんど変化が無く、4 回繰り返しても凍結融解前の 1/4 までの減少にとどまった。以上の成績より、市販豚肉・内臓肉における菌数を推定した結果、豚肉では *S. suis* の汚染菌数は少ないが、内臓肉では多く、食肉加工中の内臓肉の処理工程で豚肉への汚染が起こる可能性がより一層強く示唆された。

## 総括

*Streptococcus suis* は、グラム陽性球菌であり、豚に髄膜炎、敗血症等を引き起こし、世界中の養豚業界で経済的負担になっている病原体である (Staats *et al.*, 1997; Fittipaldi *et al.*, 2012)。*S. suis* は、莢膜の抗原性から 35 の血清型 (1-34、1/2 型) に型別されていたが、近年、血清型 32 型と 34 型の参考株は *Streptococcus orisratti* であると報告された (Hill *et al.*, 2005)。また、血清型 20、22 および 26 型は *Streptococcus parasuis* という新しい細菌種に分類され (Nomoto *et al.*, 2015)、さらに血清型 33 型も *S. suis* とは別種にすべきと報告された (Tien *et al.*, 2013)。従って、現在では 29 の血清型が真の *S. suis* と考えられるが、その特異的な簡易同定法は確立していない。一方、*S. suis* は人獣共通感染症の病原体であり、日本を含め、養豚が盛んな世界各国でヒトの髄膜炎や敗血症および劇症型感染症の発生が報告されている (Ye *et al.*, 2006; Mai *et al.*, 2008; Takamatsu *et al.*, 2008)。日本では、豚、または豚肉を扱う人を中心として *S. suis* に感染した事例もあり、食の安全を考える上でも重要な病原体だが、日本の食肉を対象とした調査は行われていなかった。そこで著者は、分類再評価後の真の *S. suis* に特異的な遺伝子増幅法を開発し、正しい疫学調査に有用な方法を確立すると共に、*S. suis* による食肉汚染の実態を探るため、開発した方法の一部を日本の市販豚肉・内臓肉に応用した。

まず、第 1 章では、*recN* 遺伝子を標的にした、真の *S. suis* に特異的な *recN* PCR を開発し、その特異性と感度を分類再評価前の 35 血清型全ての *S. suis* に特異的な *gdh* PCR および 16S PCR と比較した。その結果、*recN* PCR は、真の *S. suis* にのみ特異的だが、*gdh* PCR は一部の *recN* 近縁種でも増幅した。また、*recN* PCR は異なる血清型参考株でも、およそ一定した感度を示したが、16S PCR では血清型



による感度の違いが顕著だったため、本研究で開発した *recN* PCR は、優れた特異性と安定した感度を示し、今後の疫学調査等の有用な手法となることが示された。

次に、第2章では、PCR よりもさらに感度に優れ、遺伝子増幅を阻害する物質の影響が少ない LAMP 法に着目し、真の *S. suis* に特異的な LAMP<sub>SS</sub> を開発、その特異性と感度を検証したところ、真の *S. suis* にのみ特異的であり、感度は 5.4 cfu/反応だった。また、合計 996 検体の市販豚肉・内臓肉を LAMP<sub>SS</sub> に供試したところ、市販豚内臓肉は全ての種類の検体で 50%以上が陽性であり、豚肉でも 7~58% の陽性率を示した。さらに、LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体を、ヒトに高い病原性を示す血清型 2 型特異的な LAMP<sub>2J</sub> に供試したところ、全ての種類の市販豚肉・内臓肉で陽性の検体があった。さらに、LAMP<sub>2J</sub> 陽性検体から、レプリカプレートを利用して菌分離を試みたところ、血清型 1 型 1 株、血清型 2 型 2 株を含む総計 149 株の *S. suis* を分離した。それぞれの市販豚肉・内臓肉の総生菌数を LAMP<sub>SS</sub> 陽性グループと陰性グループで比較したが、有意差はなかった。血清型 2 型の 2 株は、それぞれ異なるタンから分離されており、遺伝子型別の結果、ヒトへの感染も報告されている ST 28 だった。また、LAMP<sub>SS</sub> の成績と販売形態を比較したところ、豚肉と内臓肉の両者を販売する店舗の方が、内臓肉を販売しない店舗よりも LAMP<sub>SS</sub> 陽性国産豚肉検体数が多く、かつ LAMP<sub>SS</sub> 陽性豚肉が多い小売店から時期を変えて複数回購入すると、繰り返し LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体が得られる場合があり、豚肉への *S. suis* 汚染は、と畜場を出た後の食肉加工中に起きたと推定された。しかし、遺伝子陽性検体から必ずしも生きて菌の分離に成功しなかったため、菌が流通の過程で凍結融解等により死滅したのか、または方法の不備によって分離出来なかったのかは不明だった。

最後に、第3章では、正確な *S. suis* 菌数測定ができる qPCR<sub>SS</sub> の開発とそれを用いた菌数測定、凍結融解による *S. suis* への影響を評価した。Taqman プローブを

用いた qPCR<sub>SS</sub> は、真の *S. suis* にのみ特異的であり、感度は 9.9 *S. suis* 菌数/反応だった。食肉からヒトが感染する生菌のみを検出するため、死菌の DNA に結合し、遺伝子増幅反応を阻害する EMA 処理を行った後、DNA を抽出し、市販豚肉・内臓肉から調整した肉汁中の *S. suis* 数を qPCR<sub>SS</sub> によって推定した。得られた成績と、菌分離時に用いた選択培地上に発育した総コロニー数を m-cfu として測定し、菌分離成績と比較したところ、多くの検体では、qPCR<sub>SS</sub> の定量限界以下の菌数しか検出されなかった。定量可能な検体の中には、肉汁 1ml あたり 10,000 を超える *S. suis* 菌数を示す検体もあったが、全てタンなどの内臓肉だった。菌分離できなかった検体のうち、マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP<sub>SS</sub> 陰性検体は、*S. suis* に対する m-cfu の相対量が大きく、かつ *S. suis* の絶対数も少なかった。マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP<sub>SS</sub> 陽性の検体で、菌分離陽性検体と陰性検体との *S. suis* に対する m-cfu の相対量に大差はなかった。凍結融解試験では、2 回の凍結融解では、*S. suis* 変異株の生菌数はほとんど変化が無く、4 回繰り返しても凍結融解前の 1/4 までの減少にとどまった。以上の成績より、市販豚肉・内臓肉における菌数を推定した結果、豚肉では *S. suis* の汚染菌数は少ないが、内臓肉では多く、食肉加工中の内臓肉の処理工程で豚肉への汚染が起こる可能性がより一層強く示唆された。内臓肉では高度に汚染された検体もあり、加工処理に対する注意だけでなく、作業員への感染に対する注意も必要である。

以上より、本研究において開発した真の *S. suis* 検出法は、食肉の汚染経路解明だけでなく他の対象にも応用でき、今後広く利用されることが期待される。さらにこれらの知見から、その他の食中毒細菌の汚染でも *S. suis* と同じ経路をたどる可能性が示唆され、本研究成果は今後、フードチェーン全体の衛生管理を考える上で重要な鍵になるとと思われる。

## 謝辞

本論文を終わるにあたり、御校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 山田章雄教授、平山和宏准教授、神戸大学大学院農学研究科 大澤朗教授、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 山崎伸二教授に深甚の謝意を表します。

本研究の実施にあたって、ご指導、ご協力をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科 関崎勉教授、渡辺孝康特任助教、神戸大学自然科学系先端融合研究環野本竜平特命助教（現：神戸市環境保健研究所）、愛知学院大学薬学部医療薬学科 河村好章教授、酪農学園大学獣医学群 菊池直哉教授、高橋樹史准教授、東京女子医科大学医学部医学科 菊池賢教授、Nong Lam 大学 Le Hong Thuy Tien 氏には心より感謝いたします。

また、本研究の遂行を通じて様々な点でご協力いただきました、東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター食品病原微生物学研究室の皆様には感謝いたします。

## 文献

- Arends, J. P., Zanen, H. C. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev. Infect. Dis. 10, 131–137
- Bonifait, L., Veillette, M., Letourneau, V., Grenier, D., Duchaine, C. 2014. Detection of *Streptococcus suis* in bioaerosols of swine confinement buildings. Appl. Environ. Microbiol. 80:3296–3304
- Callejo, R., Prieto, M., Salamone, F., Auger, J. P., Goyette-Desjardins, G., Gottschalk, M. 2014. Atypical *Streptococcus suis* in man, Argentina, 2013. Emerg. Infect. Dis. 20, 500-502
- Chang, B., Wada, A., Ikebe, T., Ohnishi, M., Mita, K., Endo, M., Matsuo, H., Asatuma, Y., Kuramoto, S., Sekiguchi, H., Yamazaki, M., Yoshikawa, H., Watabe, N., Yamada, H., Kurita, S., Imai, Y., Watanabe, H. 2006. Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 59, 397-399
- Chatellier, S., Harel, J., Zhang, Y., Gottschalk, M., Higgins, R., Devriese, L. A., Brousseau, R. 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16s rRNA gene sequence comparison. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 581-589
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J., Stein, R., Ge, B. 2011. Rapid detection of viable *Salmonellae* in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. Appl. Environ. Microbiol. 77 (12): 4008–4016
- Cheung, P. Y., Lo, K. L., Cheung, T. T., Yeung, W. H., Leung, P. H., Kam, K. M. 2008. *Streptococcus suis* in retail markets: How prevalent is it in raw pork. Int. J. Food Microbiol. 127, 316–320

- Collins, M. D., Hutson, R. A., Hoyles, L., Falsen, E., Nikolaitchouk, N., Foster, G. 2001. *Streptococcus ovis* sp. nov., isolated from sheep. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1147–1150
- Collins, M. D., Hutson, R. A., Falsen, E., Inghanas, E., Bisgaard, M. 2002. *Streptococcus gallinaceus* sp. nov., from chickens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1161–1164.
- Donsakul, K., Dejthevaporn, C., Witoonpanich, R. 2003. *Streptococcus suis* infection: clinical features and diagnostic pitfalls. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 34 (Pt. 1), 154-158
- Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D., Gottschalk, M. 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future. Microbiol.* 7, 259-279
- Glazunova, O. O., Raoult, D., Roux, V. 2010. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2140–2148
- Goyette-Desjardins, G., Auger, J. P., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M. 2014. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg. Microb. Infect.* 3.
- Havelaar, A. H., van Rosse, F., Bucura, C., Toetenel, M. A., Haagsma, J. A., Kurowicka, D., Heesterbeek, J. H., Speybroeck, N., Langelaar, M. F., van der Giessen, J. W., Cooke, R. M., Braks, M. A. 2010. Prioritizing emerging zoonoses in the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 5:e13965.

- Hayashi, N., Arai, R., Tada, S., Taguchi, H., Ogawa, Y. 2007. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. *Food Microbiol.* 24, 778–785
- Higgins, R., Gottschalk, M. 1990. An update on *Streptococcus suis* identification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 249–252
- Higgins, R., Gottschalk, M. 2005. Streptococcal diseases, p 769–783. In Straw BE, D’Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (ed), *Diseases of swine*, 9th ed. University of Iowa Press, Iowa City, IA.
- Hill, J. E., Gottschalk, M., Brousseau, R., Harel, J., Hemmingsen, S. M., Goh, S. H. 2005. Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet. Microbiol.* 107, 63-69
- Huy, N. T., Hang, le. T. T., Boamah, D., Lan, N. T., Van, Thanh. P., Watanabe, K., Huong, V. T., Kikuchi, M., Ariyoshi, K., Morita, K., Hirayama, K. 2012. Development of a single-tube loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four pathogens of bacterial meningitis. *FEMS Microbiol. Lett.* 337, 25–30
- Ip, M., Fung, K. S. C., Chi, F., Cheuk, E. S. C., Chau, S. S. L., Wong, B. W. H., Lui, S. L., Hui, M., Lai, R. W. M., Chan, P. K. S. 2007. *Streptococcus suis* in Hong Kong. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57 (1), 15–20
- Itano, T., Kawakami, H., Kono, T., Sakai, M. 2006. Detection of fish nocardiosis by loop-mediated isothermal amplification. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1381–1387
- Josefsen, M. H., Lofstrom, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E., Hoorfar, J. 2010. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using

- real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5097–5104
- Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., Suzutani, T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 70, 499–501
- Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Sawanpanyalert, P., Boonnark, A., Noithachang, W., Sriyakum, D., Simkum, S., Chokngam, S., Gottschalk, M., Akeda, Y., Oishi, K. 2011. Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand. *Lancet.* 378, 960.
- King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., Whatmore, A. M. 2002. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3671–3680
- Kobayashi, H., Morozumi, T., Miyamoto, C., Shimizu, M., Yamada, S., Ohashi, S., Kubo, M., Kimura, K., Mitani, K., Ito, N., Yamamoto, K. 1996. *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *J. Vet. Med. Sci.* 58, 109-113
- Kurosaki, Y., Sakuma, T., Fukuma, A., Fujinami, Y., Kawamoto, K., Kamo, N., Makino, S. -I., Yasuda, J. 2009. A simple and sensitive method for detection of *Bacillus anthracis* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1947–1956
- Lakkitjaroen, N., Takamatsu, D., Okura, M., Sato, M., Osaki, M., Sekizaki, T. 2011. Loss of capsule among *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its biological significance. *J. Med. Microbiol.* 60, 1669–1676

- Lederberg, J., Lederberg, E.M. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63, 399–406
- Mai, N. T., Hoa, N. T., Nga, T. V., Linh, L. D., Chau, T. T., Sinh, D. X., Phu, N. H., Chuong, L. V., Diep, T. S., Campbell, J., Nghia, H. D., Minh, T. N., Chau, N. V., de Jong, M. D., Chinh, N. T., Hien, T. T., Farrar, J., Schultsz, C. 2008. *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clin. Infect. Dis.* 46, 659–667
- Marois, C., Bougeard, S., Gottschalk, M., Kobisch, M. 2004. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. *J. Clin. Microbiol.* 42 (Pt. 7), 3169–3175
- Minami, J., Yoshida, K., Soejima, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. 2010. New approach to use ethidium bromide monoazide as an analytical tool. *J. Appl. Microbiol.* 109: 900–909
- Mogollon, J. D., Pijoan, C., Murtaugh, M. P., Kaplan, E. L., Collins, J. E., Cleary, P. P. 1990. Characterization of prototype and clinically defined strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 28 (Pt.11), 2462–2466
- Mori, Y., Notomi, T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 15, 62–69
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 289, 150–154
- Nghia, H. D. T., Hoa, N. T., Linh, L. D., Campbell, J., Diep, T. S., Chau, N. V. V., Mai, T. T. H., Hien, T. T., Spratt, B., Farrar, J., Schultsz, C. 2008. Human case of *Streptococcus suis* serotype 16 infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 155–157



- Nghia, H. D., Tu, le T. P., Wolbers, M., Thai, C. Q., Hoang, N. V., Nga, T. V., Thao, le T. P., Phu, N. H., Chau, T. T., Sinh, D. X., Diep, T. S., Hang, H. T., Truong, H., Campbell, J., Chau, N. V., Chinh, N. T., Dung, N. V., Hoa, N. T., Spratt, B. G., Hien, T. T., Farrar, J., Schultsz, C. 2011. Risk factors of *Streptococcus suis* infection in Vietnam. A Case-Control Study. PLOS ONE 3: e17604.
- Nomoto, R., Maruyama, F., Ishida, S., Tohya, M., Sekizaki, T., and Osawa R. 2015. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:438-443
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic. Acids. Res. 28:E63.
- Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C., Gottschalk, M., Takamatsu, D. 2014. Development of a two-step multiplex PCR assays for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. 52, 1714–1719
- Okwumabua, O., O'Connor, M., Shull, E. 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. FEMS. Microbiol. Lett. 218, 79-84
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science. 2; 276 (5313): 734-40.
- Pachirat, O., Taksinachanekit, S., Mootsikapun, P., Kerdsin, A. 2012. Human *Streptococcus suis* Endocarditis: Echocardiographic Features and Clinical Outcome. Clin. Med. Insights Cardiol. 6, 119-123
- Sekizaki, T. 2012. *Streptococcus suis*: An emerging biothreat. J. Disaster. Res. 7:303-312

- 品川邦汎,重茂克彦,齊藤志保子 2004. 凍結・解凍回数及び保存温度による食肉中のカンピロバクターとサルモネラの菌数の変動 平成 15 年度農林水産省食品製造工程 管 理 情 報 高 度 化 促 進 事 業  
(<https://www.shokusan.or.jp/haccp/news/pdf/newreport01.pdf>)
- Staats, J. J., Feder, I., Okwumabua, O., Chengappa, M. M. 1997. *Streptococcus suis*: past and present. Vet. Res. Commun. 21, 381-407
- Su, Y., Yao, W., Perez-Gutierrez, O. N., Smidt, H., Zhu, W. Y. 2008. Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. FEMS. Microbiol. Ecol. 66:546–555
- Suankratay, C., Intalaporn, P., Nunthapisud, P., Arunyingmongkol, K., Wilde, H. 2004. *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health 35(4), 868–876
- Takamatsu, D., Wongsawan, K., Osaki, M., Nishino, H., Ishiji, T., Tharavichitkul, P., Khantawa, B., Fongcom, A., Takai, S., Sekizaki, T. 2008. *Streptococcus suis* in humans, Thailand. Emerg. Infect. Dis. 14 (Pt. 1), 181-183
- Takeuchi, D., Kerdsin, A., Pienpringam, A., Loetthong, P., Samerchea, S., Luangsuk, P., Khamisara, K., Wongwan, N., Areeratana, P., Chiranairadul, P., Lertchayanti, S., Petcharat, S., Yowang, A., Chaiwongsaen, P., Nakayama, T., Akeda, Y., Hamada, S., Sawanpanyalert, P., Dejsirilert, S., Oishi, K. 2012. Population-based study of *Streptococcus suis* infection in humans in Phayao province in northern Thailand. PLOS ONE 7: e31265.

- Tien, Ie. T. T., Nishibori, T., Nishitani, Y., Nomoto, R., Osawa, R. 2013. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and *sodA* and *recN* phylogenies. *Vet. Microbiol.* 162, 842–849.
- Tsai, H. Y., Liao, C. H., Liu, C. Y., Huang, Y. T., Teng, L. J., Hsueh, P. R. 2012. *Streptococcus suis* infection in Taiwan, 2000–2011. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 75-77
- Wang, F., Jiang, L., Ge, B. 2012. Loop-mediated isothermal amplification assays for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and human stools. *J. Clin. Microbiol.* 50, 91–97
- Yamazaki, W., Ishibashi, M., Kawahara, R., Inoue, K. 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol.* 8, 163.
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K., Misawa, N. 2009. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1597-1603
- Yang, W., Cai, X., Hao, Y., Liu, Y., Wang, S., Xing, R., Gu, J., Li, C., Yue, X., Yuan, C., Zhang, M., Cui, L., Hua, X., Yang, Z. 2010. Characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 blood infections using RT-qPCR to quantify glutamate dehydrogenase copy numbers. *J. Microbiol. Methods* 83, 326-329
- Ye, C., Zhu, X., Jing, H., Du, H., Segura, M., Zheng, H., Kan, B., Wang, L., Bai, X., Zhou, Y., Cui, Z., Zhang, S., Jin, D., Sun, N., Luo, X., Zhang, J., Gong, Z., Wang, X., Wang, L., Sun, H., Li, Z., Sun, Q., Liu, H., Dong, B., Ke, C., Yuan, H., Wang, H., Tian, K., Wang,

- Y., Gottschalk, M., Xu, J. 2006. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 12 (Pt. 8), 1203-1208
- Yu, H., Jing, H., Chen, Z., Zheng, H., Zhu, X., Wang, H., Wang, S., Liu, L., Zu, R., Luo, L., Xiang, N., Liu, H., Liu, X., Shu, Y., Lee, S. S., Chuang, S. K., Wang, Y., Xu, J., Yang, W., and the *Streptococcus suis* study groups. 2006. Human *Streptococcus suis* Outbreak, Sichuan, China *Emerg. Infect. Dis.* 12, 914-920
- Zhang, J., Zhu, J., Ren, H., Zhu, S., Zhao, P., Zhang, F., Lv, H., Hu, D., Hao, L., Geng, M., Gong, X., Pan, X., Wang, C., Qi, Z. 2013. Rapid visual detection of highly pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2 using loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3250-3256

表 1 本論文第 1 章で供試した *S. suis* 菌株と *recN* PCR の成績

株名	血清型	由来	<i>recN</i> PCR
基準株と血清型参考株 (真の <i>S. suis</i> )			
NCTC 10237 (=5428)	1	病豚	+
NCTC 10234 <sup>T</sup> (=S735)	2	病豚	+
4961	3	病豚	+
6407	4	病豚	+
11538	5	病豚	+
2524	6	病豚	+
8074	7	病豚	+
14636	8	病豚	+
22083	9	病豚	+
4417	10	病豚	+
12814	11	病豚	+
8830	12	病豚	+
10581	13	病豚	+
13730	14	病人	+
NCTC 10446	15	病豚	+
2726	16	病豚	+
93A	17	健康豚	+
NT77	18	健康豚	+
42A	19	健康豚	+
14A	21	健康豚	+
89-2479	23	病豚	+
88-5299A	24	病豚	+
89-3576-3	25	病豚	+
89-5259	27	病豚	+
89-590	28	病豚	+

92-1191	29	病豚	+
92-1400	30	病豚	+
92-4172	31	病牛	+
2651	1/2	病豚	+

基準株と血清型参考株 (真の *S. suis* から除外されるべき血清型)

86-5192	20	病牛	-
88-1861	22	病豚	-
89-4109-1	26	病豚	-
EA1172.91	32	病豚	-
EA1832.92	33	病羊	-
92-2742	34	病豚	-

代表株、豚およびヒト由来野外株 (真の *S. suis*)

P1/7	2	病豚	+
89-1591	2	病豚	+
HUT-1	2	病人	+
GUT-49, 57	1	病豚	+
GUT-6, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 51, 59, 60, 61, 62, 66, 69, 70, 72, 85, 92, 95, 102, 111, 116, 120, 123, 127, 131, 132, 136, 138, 143, 150, 151	2	病豚	+
GUT-14, 22, 23, 24, 31, 44, 55, 74, 84, 88, 89, 91, 96, 105, 106, 107, 114, 119, 124, 129, 130, 141, 144, 145, 148, 155, 162	3	病豚	+
GUT-1, 2, 3, 4, 16, 30, 34, 37, 50, 73,	4	病豚	+

86, 87, 90, 118, 134, 137, 146, 158			
GUT-58	5	病豚	+
GUT-8, 9, 10, 15, 28, 29, 52, 53, 78, 98, 115, 157	7	病豚	+
GUT-27, 99, 104	8	病豚	+
GUT-7, 63, 77, 128, SUT-3, 354, 376, 403, 405	9	病豚と健康豚	+
GUT-156, SUT-288	11	病豚と健康豚	+
SUT-38	12	健康豚	+
GUT-32, SUT-290, 298, 300, 314, 333	15	病豚と健康豚	+
SUT-246, 268, 269	16	健康豚	+
GUT-33, SUT-436	25	病豚と健康豚	+
GUT-35, SUT-10	31	病豚と健康豚	-

代表株、豚および牛由来野外株（真の *S. suis* から除外されるべき血清型）

SUT-283, 286, FUT-29	20	健康豚と豚肉	-
GUT182, SUT-380	22	病豚と健康豚	-
GUT-183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193	33	病牛	+

---

表 2 本論文第 1 章で陰性対照として供試したその他の細菌種

細菌種	株名	由来
<i>recN</i> 近縁種		
<i>Streptococcus acidominimus</i>	ATCC 51725 <sup>T</sup>	a
<i>Streptococcus gallinaceus</i>	CCUG 42692 <sup>T</sup>	a
<i>Streptococcus minor</i>	CCUG 47487 <sup>T</sup>	a
<i>Streptococcus ovis</i>	CCUG 39485 <sup>T</sup>	a
その他の <i>Streptococcus</i> 属		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	ATCC 35666	a
<i>Streptococcus entericus</i>	JCM 12180 <sup>T</sup>	b
<i>Streptococcus oralis</i>	JCM 12997 <sup>T</sup>	b
<i>Streptococcus orisratti</i>	ATCC 700640 <sup>T</sup>	a
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	FKI2012	c
<i>Streptococcus plurextorum</i>	CECT 7308 <sup>T</sup>	d
<i>Streptococcus porci</i>	CECT 7374 <sup>T</sup>	d
<i>Streptococcus porcinus</i>	ATCC 43138 <sup>T</sup>	a
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344 <sup>T</sup>	a
その他の細菌属		
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	FBPM-460	e
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	FBPM-462	f
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	ATCC 27164 <sup>T</sup>	g
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Fujisawa	h
<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	ATCC 43339 <sup>T</sup>	h
<i>Escherichia coli</i>	MC-1	a, i
<i>Haemophilus parasuis</i>	FBPM-463	f
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	J <sup>T</sup>	j
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	BTS-7 <sup>T</sup>	j



<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	S16 <sup>T</sup>	j
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	FBPM-465	a
<i>Staphylococcus hyicus</i>	FBPM-464	f

---

a： 所属研究室保管株

b： ナショナルバイオリソースプロジェクトを介した理化学研究所 RBC から購入した株

c： 福井県家畜保健衛生所（葛城肅仁氏）から分与された株

d： J. F. Fernández-Garayzábal, Sanidad Animal Facultad de Veterinaria Universidad Complutense, Spainから分与された株

e： 東京大学獣医微生物学研究室の堀本泰介教授から分与された株

f： 茨城県県北家畜保健衛生所の大谷芳子氏から分与された株

g： 茨城大学の足立吉数教授からゲノム DNA を分与された

h： 動物衛生研究所の下地善弘氏からゲノム DNA を分与された

i： Shiga toxin 2e (Stx2e) 産生 *E. coli*

j： 動物衛生研究所の小林秀樹氏から分与された株

表 3 本論文第 1 章で供試した Primer

遺伝子	Primer	塩基配列 (5' -3')	産物長 (bp)	由来
<i>recN</i>	SSrecN-F	CTACAAACAGCTCTCTTCT	336	本研究
	SSrecN-R	ACAACAGCCAATTCATGGCGTGATT		
16S rRNA gene	16S-195 (s)	CAGTATTTACCGCATGGTAGATAT	319	Marois <i>et al.</i> (2004)
	16S-489 (as2)	GTAAGATACCGTCAAGTGAGAA		
<i>gdh</i>	JP4	GCAGCGTATTCTGTCAAACG	688	Okwumabua <i>et al.</i> (2003)
	JP5	CCATGGACAGATAAAGATGG		

表 4 本論文第 2 章および第 3 章で供試した細菌種と LAMP<sub>SS</sub> および qPCR<sub>SS</sub> の成績

細菌種	株名	血清型	由来	LAMP <sub>SS</sub>	qPCR <sub>SS</sub>
真の <i>S. suis</i>	基準株と血清型参考株				
	NCTC 10237 (=5428)	1	病豚	+	+
	NCTC 10234 <sup>T</sup> (=S735)	2	病豚	+	+
	4961	3	病豚	+	+
	6407	4	病豚	+	+
	11538	5	病豚	+	+
	2524	6	病豚	+	+
	8074	7	病豚	+	+
	14636	8	病豚	+	+
	22083	9	病豚	+	+
	4417	10	病豚	+	+
	12814	11	病豚	+	+
	8830	12	病豚	+	+
	10581	13	病豚	+	+
	13730	14	病人	+	+
	NCTC 10446	15	病豚	+	+
	2726	16	病豚	+	+
	93A	17	健康豚	+	+
	NT77	18	健康豚	+	+
	42A	19	健康豚	+	+
	14A	21	健康豚	+	+
	89-2479	23	病豚	+	+

88-5299A	24	病豚	+	+
89-3576-3	25	病豚	+	+
89-5259	27	病豚	+	+
89-590	28	病豚	+	+
92-1191	29	病豚	+	+
92-1400	30	病豚	+	+
92-4172	31	病牛	+	+
2651	1/2	病豚	+	+

真の *S. suis* から除外されるべき血清型

血清型参考株

86-5192	20	病牛	-	-
88-1861	22	病豚	-	-
89-4109-1	26	病豚	-	-
EA1172. 91	32	病豚	-	-
EA1832. 92	33	病羊	-	-
92-2742	34	病豚	-	-

真の *S. suis*

代表株、豚由来野外株

P1/7	2	病豚	+	+
89-1591	2	病豚	+	+
GUT-49	1	病豚	+	ND <sup>m</sup>
GUT-6	2	病豚	+	ND
GUT-14	3	病豚	+	ND
GUT-1	4	病豚	+	ND
GUT-58	5	病豚	+	ND
GUT-8	7	病豚	+	ND

	GUT-27	8	病豚	+	ND
	GUT-7	9	病豚	+	ND
	GUT-156	11	病豚	+	ND
	SUT-38	12	健康豚	+	ND
	GUT-32	15	病豚	+	ND
	SUT-246	16	健康豚	+	ND
	GUT-33	25	病豚	+	ND
	GUT-35	31	病豚	+	ND
真の <i>S. suis</i> から除外されるべき血清型	豚および牛由来野外株				
	SUT-283	20	健康豚	-	ND
	SUT-380	22	健康豚	-	ND
	GUT-183	33	病牛	-	ND
<i>recN</i> 近縁種					
<i>Streptococcus acidominimus</i>	ATCC 51725 <sup>T</sup>		a	-	-
<i>Streptococcus gallinaceus</i>	CCUG 42692 <sup>T</sup>		a	-	-
<i>Streptococcus minor</i>	CCUG 47487 <sup>T</sup>		a	-	-
<i>Streptococcus ovis</i>	CCUG 39485 <sup>T</sup>		a	-	-
その他の <i>Streptococcus</i> 属					
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	ATCC 35666		b	-	-
<i>Streptococcus entericus</i>	JCM 12180 <sup>T</sup>		c	-	-
<i>Streptococcus</i>	JCM 12997 <sup>T</sup>		c	-	-

*oralis*

<i>Streptococcus orisratti</i>	ATCC 700640 <sup>T</sup>	a	-	-
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	FKI2012	d	-	-
<i>Streptococcus plurextorum</i>	CECT 7308 <sup>T</sup>	e	-	-
<i>Streptococcus porci</i>	CECT 7374 <sup>T</sup>	e	-	-
<i>Streptococcus porcinus</i>	ATCC 43138 <sup>T</sup>	b	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344 <sup>T</sup>	f	-	-

その他の細菌属

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	FBPM-460	g	-	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	FBPM-462	h	-	-
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	ATCC 27164 <sup>T</sup>	i	-	-
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Fujisawa	j	-	-
<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	ATCC 43339 <sup>T</sup>	j	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MC-1	a, k	-	-
<i>Haemophilus parasuis</i>	FBPM-463	h	-	-
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	J <sup>T</sup>	l	-	-
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	BTS-7 <sup>T</sup>	l	-	-
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	S16 <sup>T</sup>	l	-	-

<i>Salmonella enterica</i>				
subsp. <i>enterica</i>	FBPM-465	a	-	-
serovar				
Choleraesuis				
<i>Staphylococcus</i>	FBPM-464	h	-	-
<i>hyicus</i>				

---

a : 所属研究室保管株

b : 酪農学園大学獣医細菌学ユニットの菊池直哉教授から分与された株

c : ナショナルバイオリソースプロジェクトを介した理化学研究所 RBC から購入した株

d : 福井県家畜保健衛生所（葛城肅仁氏）から分与された株

e : J. F. Fernández-Garayzábal, Sanidad Animal Facultad de Veterinaria Universidad Complutense, Spainから分与された株

f : 順天堂大学（現東京女子医科大学）の菊池賢准教授（現教授）から分与された株

g : 東京大学獣医微生物学研究室の堀本泰介教授から分与された株

h : 茨城県県北家畜保健衛生所の大谷芳子氏から分与された株

i : 茨城大学の足立吉数教授からゲノム DNA を分与された

j : 動物衛生研究所の下地善弘氏からゲノム DNA を分与された

k : Shiga toxin 2e (Stx2e) 産生 *E. coli*

l : 動物衛生研究所の小林秀樹氏から分与された株

m : 試験していない

表 5 本論文第 2 章で供試した Primer

方法と Primer	塩基配列 (5' -3')	産物長 (bp)	由来
<i>recN</i> PCR			本研究 (第 1 章)
SS <i>recN</i> -F	CTACAAACAGCTCTCTTCT	336	
SS <i>recN</i> -R	ACAACAGCCAATTCATGGCGTGATT		
LAMP <sub>SS</sub>			本研究
F3	TGTCGATGATGTTTTGGACTA		
B3	GCTTTCTCCATATACAAGTCTTG		
FIP	AAGCTGAACTTCCAAATCATCTCC CAGCGAAGAATACAATCTATTGAC		
BIP	TAGAGAAAGAATTGGTTGAACGAGC GCGGATAATATCTTCTAAAACAAC		
LB	GGTCAGCTCAGCCAATCACGC		
LAMP <sub>2J</sub>			Zhang <i>et al.</i> (2013)
F3	GTGTTTCAAACGAAGGAAT		
B3	GCACCTCTTTTATCTCTTCCAA		
FIP	GTTGCCGTCAACAATATCATCAGAA CGGTATCAAAAATAGCACAGC AGAGAATGATAGTGATTTGTCGGG		
BIP	TTTGCAGCTCAGATTCTTG		
LB	AGGGTTACTTGCTACTTTTGATGG		



表 6 本論文第 2 章で供試した食肉と LAMP の成績

市販豚肉・内臓肉	供試検体数	LAMP <sub>SS</sub>		LAMP <sub>2J</sub>	
		陽性	(%)	陽性	(%) <sup>a</sup>
国産カット肉	277	19	(6.9)	3	(15.8)
外国産カット肉	127	16	(12.6)	3	(18.8)
アメリカ	74	10	(13.5)	2	(20)
イタリア	5	1	(20)	0	(0)
カナダ	20	0	(0)	ND <sup>b</sup>	ND
スペイン	5	0	(0)	ND	ND
デンマーク	5	1	(20)	0	(0)
ポーランド	5	0	(0)	ND	(0)
メキシコ	13	4	(30.8)	1	(25)
国産ひき肉	244	18	(7.4)	1	(5.6)
外国産ひき肉	19	11	(57.9)	6	(54.5)
イタリア	14	11	(78.6)	6	(54.5)
メキシコ	5	0	(0)	ND	ND
レバー	128	90	(70.3)	13	(14.4)
タン	101	60	(59.4)	17	(28.3)
ハツ	48	27	(56.3)	3	(11.1)
モツ	22	14	(63.6)	1	(7.1)
合計	966	255	(26.4)	47	(18.4)

<sup>a</sup> : LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体のみ、LAMP<sub>2J</sub> に供試した。LAMP<sub>2J</sub> 陽性検体率は、(LAMP<sub>2J</sub> 陽性検体数) / (LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体数) × 100 によって求めた。

<sup>b</sup> : 試験していない

表7 マスタープレート上のコロニーから抽出したDNAのLAMP法成績と分離した*S. suis*野外株数とその血清型

サンプル	供試検体数	LAMP <sub>SS</sub>	LAMP <sub>2J</sub>	血清型	<i>S. suis</i> 分離 菌株数
SP-J1 <sup>a</sup>	1	-	ND <sup>i</sup>	ND	0
SP-J2	2	-	ND	ND	0
SP-F1 <sup>b</sup>	1	-	ND	ND	0
SP-F2	1	-	ND	ND	0
SP-F3	1	-	ND	ND	0
MP-J1 <sup>c</sup>	1	-	ND	ND	0
MP-F1 <sup>d</sup>	1	+	+	nontypeable	1
	1	+	+	nontypeable	3
MP-F2	3	+	-	ND	0
	1	-	ND	ND	0
L1 <sup>e</sup>	1	+	-	nontypeable	8
L2	1	+	-	ND	0
L3	1	+	-	ND	0
L4	1	+	-	ND	0
L5	1	+	-	ND	0
	1	-	ND	ND	0
L6	2	-	ND	ND	0
L7	2	-	ND	ND	0
L8	1	-	ND	ND	0
L9	1	-	ND	ND	0
L10	1	-	ND	ND	0
T1 <sup>f</sup>	3	+	-	2	1
				31	1
				nontypeable	3
				5	2
				10	3
12	1				
31	3				
nontypeable	65				

				2	1
T2	2	+	+	9	2
				31	3
				nontypeable	6
T3	2	+	-	9	2
				16	3
				nontypeable	9
T4	2	+	-	23	1
				31	1
				nontypeable	8
	1	+	-	ND	0
T5	1	+	-	nontypeable	9
T6	2	+	-	4	1
				15	1
				27	1
				31	1
				nontypeable	1
T7	1	+	-	9	1
				nontypeable	3
T8	1	+	-	nontypeable	3
T9	1	-	ND	ND	0
H1g	1	+	-	nontypeable	1
H2	1	+	-	ND	0
	1	-	ND	ND	0
I1h	1	+	-	ND	0

a: 国産カット肉

b: 外国産カット肉

c: 国産ひき肉

d: 外国産ひき肉

e : レバー

f : タン

g : ハツ

h : モツ

i : 試験していない

表 8 本論文第 3 章で供試した食肉と qPCR<sub>SS</sub> および m-cfu の成績

<i>S. suis</i> 分離成績	マスタープレート上のコロニーから抽出した DNA の LAMP		検体	qPCR <sub>SS</sub>	m-cfu/ <i>S. suis</i> 菌数
	LAMP <sub>SS</sub>	LAMP <sub>2J</sub>		<i>S. suis</i> 菌数 / 1 ml 肉汁	
ND <sup>a</sup>	-	ND	SP-J1 <sup>b</sup>	*477	65
	-	ND	SP-J2-1	-	NC <sup>g</sup>
	-	ND	SP-J2-2	*214	262
	-	ND	SP-F1 <sup>c</sup>	-	NC
	-	ND	SP-F3	-	NC
	-	ND	MP-F2-4 <sup>d</sup>	*342	2632
	-	ND	T9 <sup>e</sup>	6, 107	460
			平均±SD	1, 106±2, 208	122, 003±303, 671
陰性	+	-	MP-F2-3	*834	53
	+	-	T4-3	98, 045	62
	+	-	H2-2 <sup>f</sup>	*2212	431
			平均±SD	33, 817±5, 5939	182±216
陽性	+	+	MP-F1-1	*808	59

+	+	MP-F1-2	*1092	36
+	+	T1-1	14,032	165
+	+	T2-1	13,226	135
+	-	T1-2	4,664	872
+	-	T1-3	5,611	642
+	-	T1-4	4,317	287
+	-	T3-1	-	NC
+	-	T3-2	*2869	24
+	-	T4-1	18,846	200
+	-	T6-1	*1852	202
+	-	T6-2	*1583	261
+	-	T7	4,644	332
+	-	T8	4,402	101
平均±SD			5,577±5,686	279±253

a : 試験していない

b : 国産カット肉

c : 外国産カット肉

d : 外国産ひき肉

e : タン

f : ハツ

g : 計算できない

\* : qPCR<sub>SS</sub> での定量限界以下、検出限界以上

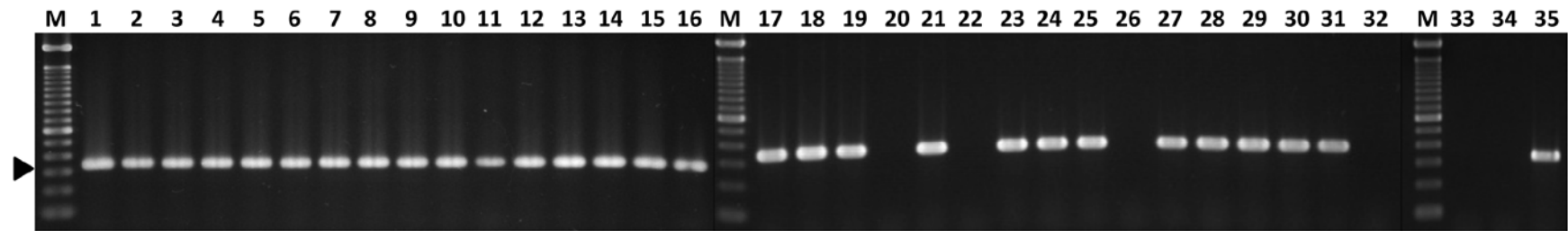


図1 *S. suis* 基準株と血清型参考株を供試した *recN* PCR の成績

1-34 は分類再評価前のものも含む *S. suis* 基準株（血清型 2 型）およびその他の血清型参考株を示し、35 は *S. suis* 血清型 1/2 型の参考株を示す。M は DNA サイズラダー（100 bp DNA Ladder, Life Technologies）であり、矢頭は 336 bp の位置を示す。



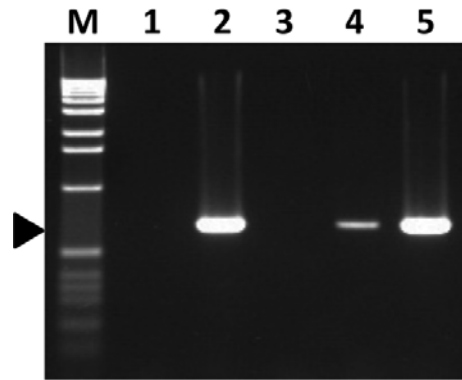


図2 *recN*近縁種を供試した *gdh* PCR の成績

1は *S. acidominimus*、2は *S. gallinaceus*、3は *S. minor*、4は *S. ovis*、5は *S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup> (血清型 2 型) を示す。M は DNA サイズラダー (1 Kb DNA Ladder, Life Technologies) であり、矢頭は 688 bp の位置を示す。

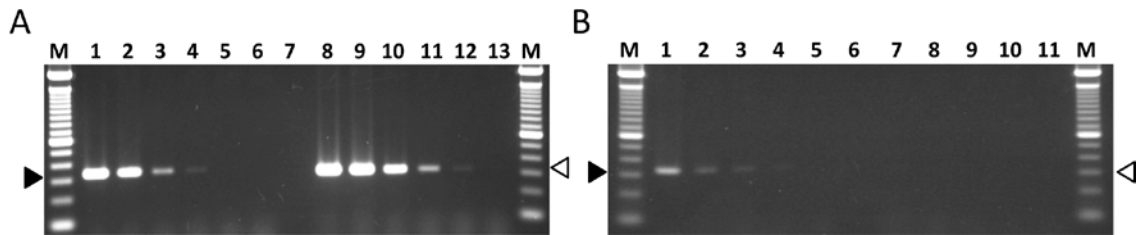


図3 *S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup> (A) と *S. suis* 4961 (B) の  
 階段希釈 DNA を供試した *recN* PCR と 16S PCR の成績

M は DNA サイズラダー (100 bp DNA Ladder, Life Technologies) である。矢頭は 336 bp の位置を示し、白抜き矢頭は 319 bp の位置を示す。

A) 1 と 8 は  $9.0 \times 10^5$  cfu/反応、2 と 9 は  $9.0 \times 10^4$  cfu/反応、3 と 10 は  $9.0 \times 10^3$  cfu/反応、4 と 11 は  $9.0 \times 10^2$  cfu/反応、5 と 12 は  $9.0 \times 10$  cfu/反応、6 と 13 は 9.0 cfu/反応を示し、7 はブランクである。

B) 1 と 7 は  $1.0 \times 10^6$  cfu/反応、2 と 8 は  $1.0 \times 10^5$  cfu/反応、3 と 9 は  $1.0 \times 10^4$  cfu/反応、4 と 10 は  $1.0 \times 10^3$  cfu/反応、5 と 11 は  $1.0 \times 10^2$  cfu/反応を示し、6 はブランクである。

16S-195 (s) (5'-3')	C	A	G	T	A	T	T	T	A	C	C	G	C	A	T	G	G	T	A	G	A	T	A	T
<i>S. suis</i> NCTC 10234 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. suis</i> 4961	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C

16S-489 (as2) (5'-3')	G	T	A	A	G	A	T	A	C	C	G	T	C	A	A	G	T	G	A	G	A	A	
<i>S. suis</i> NCTC 10234 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. suis</i> 4961	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図4 16S-195 (s) と 16S- 489 (as2) の Primer 領域における  
*S. suis* NCTC 10234<sup>T</sup> と *S. suis* 4961 の配列

枠の中にアルファベットが書かれていないものは、それぞれの Primer 配列と同じ配列であることを示す。

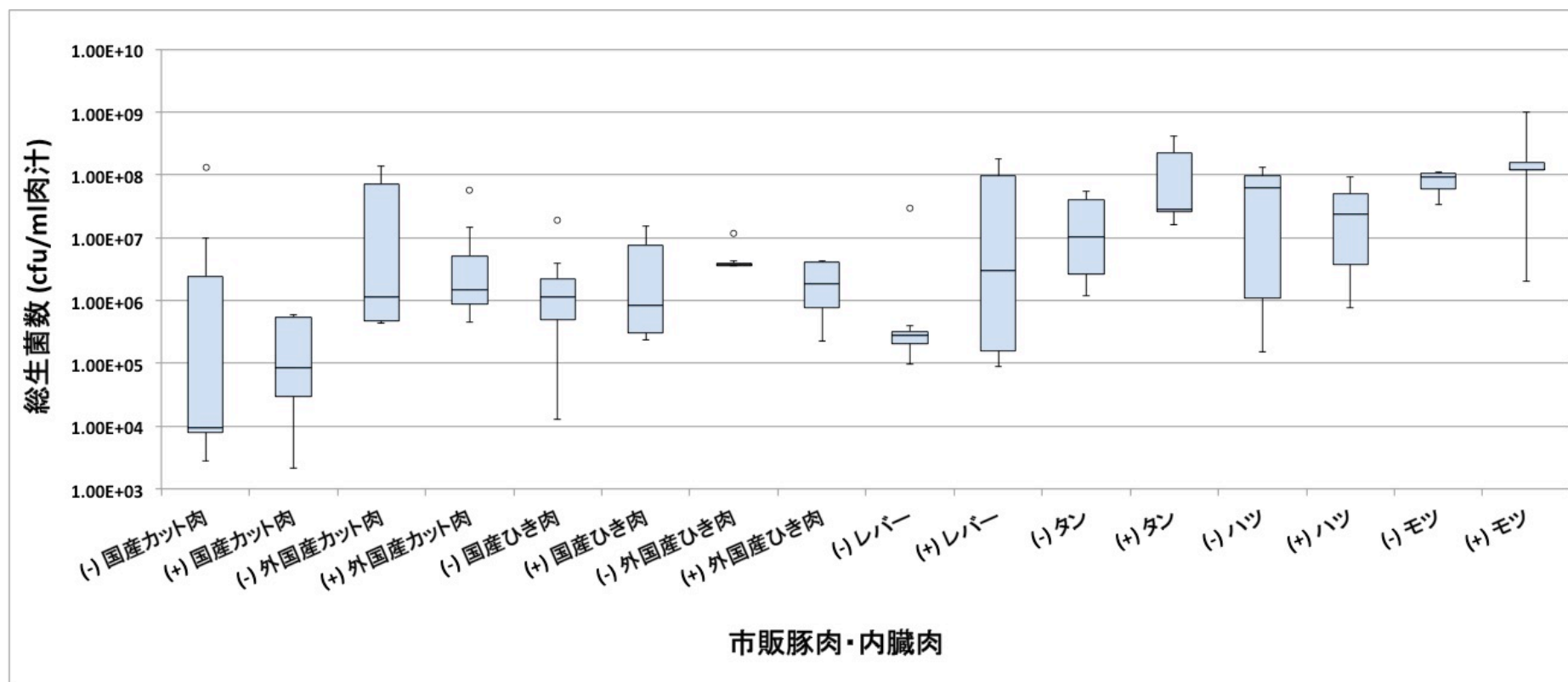


図5 LAMP<sub>SS</sub> 陰性サンプル (-) と、LAMP<sub>SS</sub> 陽性サンプル (+) の総生菌数

箱の中央にある水平線は、中央値を示す。箱の下端と上端は、それぞれ 25%値と 75%値を示す。箱の上下の線は、外れ値を除いた最大値と最小値を示す。○は 25%値と 75%値からそれぞれ 1.5 倍以上離れた外れ値を示す。

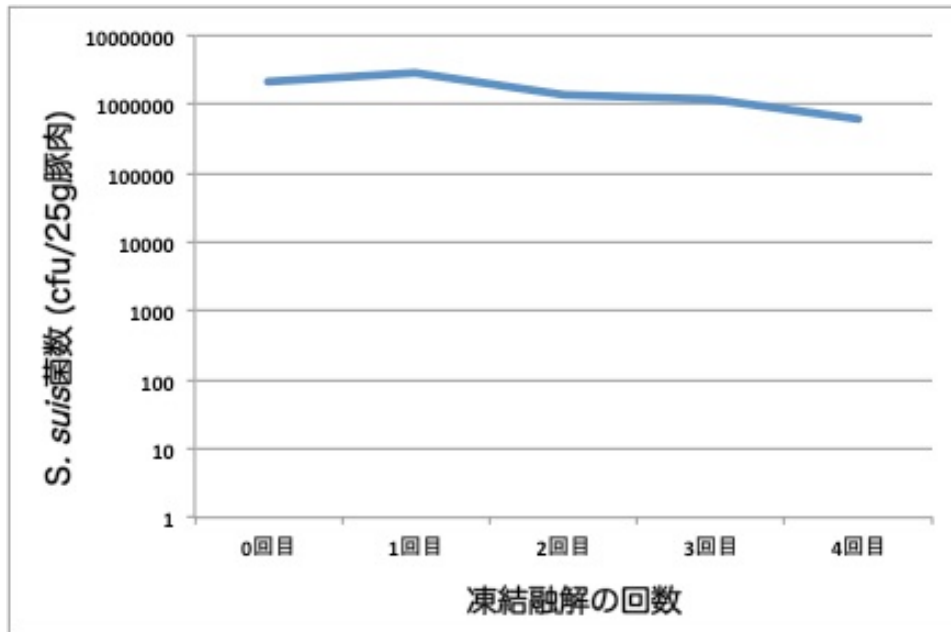


図6 豚肉へ *S. suis* SKR-1 を接種し、凍結融解を繰り返した場合の生菌数

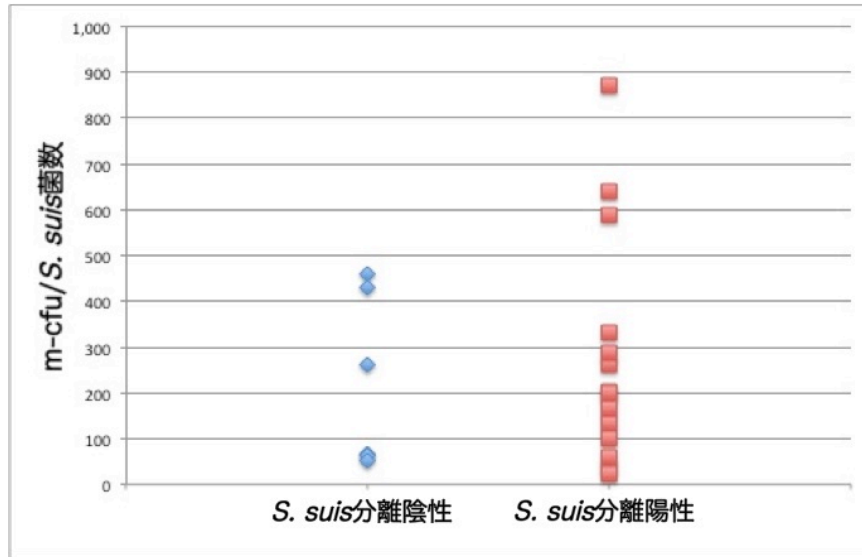


図7 市販豚肉・内臓肉を供試した m-cfu/*S. suis* 菌数と  
*S. suis* 分離成績

m-cfu/*S. suis* 菌数が 1000 以上の検体 (*S. suis* 分離陰性のグループに含まれる 4 検体) は、表示していない。