

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 24 年度博士課程入学

氏名 新井沙倉

指導教員名 関崎勉

論文題目 豚レンサ球菌の食肉汚染に関する研究

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す。*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。また、血清型 20、22、および 26 型は *Streptococcus parasuis* という新しい菌種に分類され、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。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* は人獣共通病原体であり、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。日本では、豚や豚肉と関与しているヒトの感染例があり、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、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・内臓肉に応用して以下の成績を得た。

まず、recombination/repair protein (*recN*) 遺伝子を標的にした、真の *S. suis* に特異的な PCR (*recN* PCR) を開発し、その特異性と感度を検証した。さらに、その成績を分類再評価前の 35 血清型全ての *S. suis* に特異的な glutamate dehydrogenase (*gdh*) を標的にした PCR (*gdh* PCR) および 16S rRNA 遺伝子を標的にした PCR (16S PCR) と比較した。全ての血清型参考株 (35 株)、様々な血清型の *S. suis* 野外株および代表株 (151 株)、*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) (4 株)、その他の *Streptococcus* 属菌 (9 株) およびその他菌属の豚の病原細菌 (12 株) を供試した結果、*recN* PCR は、いずれも真の *S. suis* で

ある、29の血清型参考株、野外株および代表株にのみ特異的に336bpの増幅産物を形成した。一方、*gdh* PCRは、*recN*近縁種の一部 (*Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus ovis*) で陽性となり、特異性に問題があった。さらに、16S PCRと*recN* PCRの感度は、血清型2型の参考株を供試した*recN* PCRでは、900 colony forming unit (cfu) /反応であったのに対し、16S PCRでは90 cfu/反応であった。しかし、血清型3型参考株の場合、*recN* PCRでは1,048 cfu/反応だったのに対し、16S PCRでは1,048,000 cfu/反応以上だった。このように、*recN* PCRはいずれの血清型参考株でも、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。さらに、血清型3型参考株の遺伝子配列中の16S PCRのPrimerに相当する領域に血清型2型には認められない変異があることがわかった。以上の成績より、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道具となることが示された。

次に、PCR よりもさらに感度に優れ、遺伝子増幅阻害物質の影響が少ない loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法に着目し、真の *S. suis* に特異的な LAMP 法 (LAMP_{SS}) を開発、その特異性と感度を検証した。*recN* PCR と同様に、いずれも真の *S. suis* に属する血清型の株にのみ特異的であり、感度は 5.4 cfu/反応であった。また、合計 996 検体の市販豚肉 (カット肉 404 (国産 277、外国産 127)、ひき肉 263 (国産 244、外国産 19))・内臓肉 299 (レバー 128、タン 101、ハツ 48、モツ 22) を収集し、それらから調整した肉汁を LAMP_{SS} に供試し、LAMP_{SS} 陽性の場合には、ヒトの *S. suis* 感染例の約 90%を占める血清型 2 型特異的な既報の LAMP 法 (LAMP_{2J}) も実施した。LAMP_{2J} 陽性の場合には、菌分離、血清型別、遺伝子型別 (multi locus sequence typing: MLST) を行った。LAMP_{SS} 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_{2J} 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。それぞれの豚肉・内臓肉の総生菌数を LAMP_{SS} 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の方法を開発した。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

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_{SS} 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 sequence type 28 であった。また、LAMP_{SS} 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_{SS} 陽性検体数が多かった。また、LAMP_{SS} 陽性豚肉が多い店舗から時期を変えて複数回購入すると、繰り返し LAMP_{SS} 陽性検体が得られる場合があった。上述の店舗による成績の差に加え、豚肉中やその表面には、元々 *S. suis* は存在しないはずであり、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。

以上より、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た。その結果、多くの検体から *S. suis* の遺伝子が検出され、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ため、生の豚肉等の取り扱いには慎重を期す必要があると思われた。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。そこで、正確な *S. suis* 菌数測定ができる定量的 real-time PCR (qPCR_{SS}) 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_{SS} は、いずれも真の *S. suis* に属する血清型の株に特異的であり、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* 数を qPCR_{SS} 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_{SS} 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、マスタープレートでの LAMP_{SS} 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。マスタープレートでの LAMP_{SS} 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。凍結融解による影響を評価する際には、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。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思われる。