

## 市販豚肉・内臓肉に存在する致死性病原体の正確な定量法の開発

東京大学大学院農学生命科学研究科付属食の安全研究センター・教授、センター長 関崎 勉

### ■ 目 的

豚体内にはヒトに対して致死性となる病原体が潜んでいる。中でも豚レンサ球菌は、健康な豚からも検出されることがあり、香港で市販豚肉からの検出報告がある。そこで、H25年度旗影会研究助成で豚レンサ球菌 DNA を高感度に検出する LAMP 法を、H26 年度同研究助成で定量的 PCR 法を開発し、我が国の市販豚肉・内臓肉での高い汚染を示し、陽性材料からの菌分離もできた。また、菌分離の成否は、凍結融解や分離方法によるよりも汚染総菌数と豚レンサ球菌の比の影響が大きいことを示した。しかし、試料調整過程のサンプルロスの影響が無視できないと考え、本研究では、内部対照遺伝子を含む菌を作製し、市販豚肉・内臓肉中の豚レンサ球菌の高精度な検出・定量法を完成させることを目的とした。

### ■ 方 法

近年の分類再評価によって豚レンサ球菌と異なる *S.orisratti* となった血清型 32 型と 34 型のゲノムデータから、内部対照遺伝子の組み込みに適当な *purH-purD* 領域の構造が保存された株を選別した。内部対照遺伝子としてプラスミド pHY300-Spc-recAp-EGFP 上の緑色蛍光タンパク質遺伝子 *gfp* を用いた。これと *purH* と *purD* の遺伝子領域配列を連結させた断片を作製し、温度感受性ベクターを利用して *S.orisratti* の当該ゲノム領域との遺伝子置換を行うため、この断片の TA cloning を行った。これと平行して、菌株による試料からの回収率を比較するために、豚レンサ球菌の有莢膜株 SUT-1683 と無莢膜株 SUT-1680 の一定量を豚コマ肉に接種し、一定時間静置した後菌を回収した。

### ■ 結果および考察

ゲノム配列検索の結果、血清型 34 型参考株が使用に適していた。pHY300PLK から *gfp* 遺伝子領域と *purH* 遺伝子領域をそれぞれ増幅させ、両者の増幅断片を混合して、cross-over PCR により連結した (*purH-gfp*)。次いで、*gfp* 遺伝子領域と *purD* 遺伝子領域の増幅断片を混合して、同様に連結した (*gfp-purD*)。最後に、*purH-gfp* 断片と *gfp-purD* 断片を混合して同様に連結し、3つの遺伝子領域が連結した *purH-gfp-purD* 断片を作製した。両端に dA を付加して TA-cloning ベクターにクローニングを試みたが、得られた断片は、予想される制限酵素切断部位を示さず、クローニングは失敗に終わった。

並行して進めた有莢膜株と無莢膜株を豚肉に接種した回収実験では、有莢膜株の回収率が平均して 88.3%であったのに対して、無莢膜株では 79.5%と低かったが、統計的には有意差は無かった。

### ■ 結 語

本研究の目的は、定量法での試料調整作業におけるサンプルロスを補正できるような内部対照の開発であった。しかし、候補として利用した *gfp* 遺伝子を、豚レンサ球菌の定量的 real-time PCR 法では陽性とならない類似の他菌種に組み込む作業は困難であった。一方、類似菌ではなく同種の豚レンサ球菌で莢膜の有無の違いを呈する菌を用いた回収実験では、豚コマ肉への吸着性に統計的に有意な差は無かった。しかしながら、実験的に行った回収率は、約 80-90%程度の範囲であり、この程度を目安として、定量的 real-time PCR 法で算出された菌数を補正すれば、実用上は問題無い程度の菌数を求めることができると推定された。従って、昨年までに算出した汚染菌数を用いて、実際の菌数推定は可能であろう。