

市販肉から分離される新規汚染指標細菌・豚レンサ球菌の 比較ゲノム解析

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日本学術振興会・特別研究員 RPD 黒木 香澄

■ 目 的

本邦で畜産物の汚染監視に使われている指標細菌は人や不特定多数の動物、環境中にも存在しているため、汚染源や汚染経路を特定することは難しい。我々は新たな汚染指標細菌として、豚から高頻度に検出されるが、元々肉には存在せず、鶏からも検出されない豚レンサ球菌が有用と考え、研究を進展させてきた。本研究では、豚の内臓肉を介して精肉が本菌に汚染されることを実証するため、当初は市販の精肉と内臓肉から本菌を分離し比較ゲノム解析を実施する計画だったが、より確実に内臓肉を介した精肉の汚染実態を捉えるため、内臓肉と精肉の細菌叢解析を実施した。

■ 方 法

関東の複数の店舗から市販の豚精肉および豚内臓肉を購入した。滅菌ストマッカー袋に市販肉と滅菌生理食塩水を入れ、30 秒間手で揉んだ後、液体だけを遠心し、得られた沈殿物を試料とした。試料を洗浄後 DNeasy PowerBiofilm Kit(Qiagen)を用いて DNA を抽出した。ただし、菌体破碎はキット付属のビーズではなく、より破碎力の強い直径 0.5mm と 5mm のジルコニアビーズを用いた。抽出した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域に対して PCR を行い、調製された増幅産物は、MiSeq(Illumina)にて配列決定した。取得した配列は Illinois Mayo Taxon Organization from RNA Dataset Operations ver. 2.0.3.2 を用いて処理し、精度の低い配列やキメラ配列を削除後、operational taxonomic unit(OTU)を作成した。各 OTU は Ribosomal Database Project データベース ver. 11 を用いて相同性検索を行い、細菌分類群を属レベルで推定した。それ以降の解析は MacQIIME ver. 1.9.1 を用い、多様性指数の算出や主座標分析を行った。

■ 結果および考察

多様性指数は精肉よりも内臓肉の方が高く、内臓肉は細菌による汚染度が高かったことが示唆された。また、豚レンサ球菌陽性のカット肉は陰性のカット肉に比べて多様性指数が高く、内臓肉など汚染度が高いものを介して、豚レンサ球菌の汚染が起きたと考えられた。

各試料の構成細菌を比較すると、全ての試料に腐敗菌が存在しており、小売店で販売されるまでの期間に腐敗菌が付着し増殖したと考えられた。また、内臓肉は精肉と主要な構成細菌が異なっていたことから、精肉とは異なる細菌汚染があったか、元々細菌が存在していたと示唆された。

全ての試料について主座標分析を行った結果、本菌陽性の肉試料は、内臓肉試料の多くがプロットされた箇所にクラスターを形成する傾向が認められた。さらに、Linear discriminant analysis effect size 解析で本菌陽性のカット肉には 26 種類の細菌属が有意に多く存在することがわかった。このうち 7 菌属は豚タン、6 菌属は豚だ液、3 菌属は豚内臓肉に平均 2% 以上存在する優占属だったことから、豚だ液の細菌叢を反映すると考えられる豚タンが、豚内臓肉の中で最も疑わしい豚レンサ球菌の汚染源であると示唆された。また、豚糞便で平均 2% 以上存在する細菌属の中で、本菌陽性の豚カット肉に有意に多く存在する細菌属は 2 菌属しかなかった。以上の成績から、豚レンサ球菌の精肉への汚染は豚の糞便よりも、内臓肉、特にタンを介して起こる可能性が明らかとなった。

■ 結 語

16S rRNA 遺伝子の増幅産物を用いたメタゲノム解析の結果、豚レンサ球菌は豚内臓肉、特にタンを介して精肉を汚染する可能性が示された。