

冷蔵流通される牛肉で膨張腐敗を引き起こす低温性クロストリジウム属菌の検査法の開発

東京海洋大学食品生産科学部門・助教 中村 綾花

■ 目的

牛部分肉は、真空包装され冷蔵条件で流通されているが、温度不備のない状況であっても、真空包装内にガスが発生する膨張腐敗が起こることがある。この現象は Blown Pack Spoilage(BPS)と呼ばれ、異臭、ネト、変色などの腐敗現象も起こることから、大量の廃棄につながり、食肉業界に甚大な損害をもたらしている。BPS の原因菌として、低温性クロストリジウム属菌が知られているが、偏性嫌気性で胞子形成菌であることから、培養法による検出が難しく、BPS が起きた場合、現場ではその原因究明に至っていないのが現状である。本研究では、BPS の原因菌である低温性クロストリジウム属菌を検出および定量することのできる遺伝子検査法を確立することを目的とした。

■ 方法

はじめに、過去に本研究室で分離した、BPS 由来 6 株、生体由来 2 株の低温性 *Clostridium* 属菌について、全ゲノム解析を行った。得られたドラフトゲノムに対し、DFAST(National Institute of Genetics Japan)にてアノテーションを行い、ハウスキーピング遺伝子の一つである *rplp* 遺伝子の配列を得た。次に、GenBank に登録されている低温性クロストリジウム属菌および研究室保有株の *rplp* 遺伝子を元に系統樹を作成し、BPS の主要原因菌である *Clostridium estertheticum* に近いグループの菌群(*Cl. estertheticum* グループ)を qPCR 系の検査対象とした。*rplp* 遺伝子内に *Cl. estertheticum* グループを検出するためのプライマーおよびプローブを設計し、qPCR 解析を行った。最後に、*Clostridium* 属菌の培養液を段階希釈し、DNA 抽出を行った後、qPCR 系に供し、検量線の作成を行った。

■ 結果および考察

全ゲノム解析で得られた本研究室所有の低温性クロストリジウムのドラフトゲノムを GenBank に登録されてある低温性クロストリジウムの配列と ANI 解析したところ、生体由来 1 株は *Cl. estertheticum* と相同性が近く、96% であった。一方で、BPS 由来 6 株は、*Cl. estertheticum* と相同性が低く、82% 程度であった。BPS 由来 6 株は、これまでに報告されている他の低温性クロストリジウム属菌との相同性が乏しく、ANI 解析の結果、70–84% 程度であった。このことより、本研究室所有の BPS 由来 6 株は、新種の低温性クロストリジウム属菌である可能性が考えられた。低温性クロストリジウム属菌の *rplp* 遺伝子を元に系統樹を作成したところ、BPS 由来 6 株は、BPS 主要な原因として知られている *Cl. estertheticum* と同一のノードを共有しており、実際に BPS を起きた菌株であることから、これらをハイリスクグループと認識し、*Cl. estertheticum* グループとした。*Cl. estertheticum* グループを検出するためのプライマー、プローブを設計し、qPCR 検出系を評価したところ、*Cl. estertheticum* グループの菌群は本検査系で検出することができた。更に、*Cl. sporogenes* および *Cl. perfringens* などのアウトグループは検出されず、排他性が確認された。検量線を作成し、本検査系の定量性を確認したところ、 10^4 CFU/ml 程度までは定量することができたものの、定量 PCR としては感度が低いことから、更なる改善が必要だと考えられた。

■ 結語

本研究では、低温性クロストリジウム属菌のうち、特に BPS を起こすリスクが高い菌群の qPCR 系を開発した。今後、さらに定量性を改善し、デジタル PCR などと組み合わせることで培養を介さず定量することのできる検査系の開発が求められる。本検査系を現場に取り入れることで、BPS が起きた際の迅速な原因究明や汚染源の追跡、食肉製造現場におけるモニタリング調査などに活用することが期待される。