

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658230

研究課題名(和文) 病原因子遺伝子情報を用いたジビエの食中毒危害微生物の解析と検査法

研究課題名(英文) Study on the rapid genetical methods for detection of pathogenicities in game meats

研究代表者

小西 良子 (KONISHI, YOSHIKO)

麻布大学・その他部局等・教授

研究者番号：10195761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：野生動物の増加に伴って野生動物の肉をジビエとして食用有効活用する動きが盛んに行われている。野生動物の肉等とは畜場法の対象外であることから、その衛生管理はほとんど行われていない。本研究では、シカ肉を対象として実態調査の結果から食品衛生上の危害物質を決定し、病原因子遺伝子に焦点を当て、その検査法を確立した。これらの成果をガイドラインとして作成し、安全なジビエの供給に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Increase of wild deer population is a big problem for Japanese farm industry because of their huge consumption of farm products results in economically severe damage. In Japan, guideline for game meat hygiene is still not formulated, distribution of venison to market is very difficult. In this study we found that the important hazards are Salmonella, Listeria, Escherichia coli O-157 and Sarcocystis from venison. To develop the genetic method to detect major food-borne pathogens, we examined the detection efficiency in venison by two kinds of genetic method, real-time PCR, LAMP and nucleotid chromatography, NASBA. The results show that Lamp method is more sensitive than real-time PCR for EHEC and Salmonella and L. monocytogenes in venison and Sarcocystis in venison could be detected by NASBA method. These information would be foundation to establish guidelines for game meat those were hunted for protect farm industry.

研究分野：食品衛生

キーワード：ジビエ 食品衛生 シカ肉 衛生管理

1. 研究開始当初の背景

近年野生動物における農作物や林業への被害は甚大なものになっていることから、多くの地域で狩猟および狩猟以外で捕獲した個体数調整のために捕獲したシカやイノシシの肉を、資源として見直しジビエとして食用に有効活用する地域振興事業が行われている。

これらの食肉はと畜場法の対象外であることから、牛、豚、鳥等で行われている食肉検査は行われていない。しかしながら野生動物であるため、多くの危害微生物、危害物質が肉に含まれている可能性は非常に高い。すでに、いくつかの地域ではE型肝炎ウイルスによる食中毒や、結核菌の検出などの事例が報告されている。また、近年死亡事例が報告された腸管出血性大腸菌や、一過性食中毒を引き起こす住肉胞子虫の存在も疑われている。

このような現状では、食中毒対策はほとんどとられておらず、安全なジビエの供給は担保されてないため、早急な効率的な衛生管理の提言が望まれている。

食肉処理場等で現在行われている衛生管理を目的とした食中毒微生物検査は、日数と費用がかかるため、実用的な方法とはいえない。また、検査対象となる微生物の選択も難しい問題である。そのため野生動物の実情に合った衛生管理の構築をする必要がある。

2. 研究の目的

野生動物の増加に伴って害畜駆除目的の狩猟がおこなわれているが、最近これら狩猟で得られた野生動物の肉をジビエとして食用有効活用する動きが盛んに行われてい

る。しかし、野生動物の肉等とはと畜場法の対象外であることから、その衛生管理はほとんど行われていないのが現状である。野生動物の肉等には、牛、豚、鳥肉に汚染する食中毒菌以外にも食中毒の危害物質となる有害細菌や、ウイルス、寄生虫など多くの有害微生物が含まれている可能性が高い。本研究では、食中毒菌の保有する病原因子遺伝子に焦点を当て、野生動物の肉および糞中の食中毒の危害微生物由来病原因子を検討し、その検査法を確立する。これらの成果をガイドラインとして作成し実行することにより、安全なジビエの供給に貢献するものである。

3. 研究の方法

本研究は以下の3つの項目を行った。

1) 食中毒細菌中の病原性因子遺伝子の検出法の検討

(1) 野生ニホンジカ試料採取

静岡県富士宮市富士山麓地域において2012年10月16、17日、また、同県伊豆市天城地域において、2012年12月4日と2013年5月28日の二度にわたり、野生ニホンジカの試料採取を行った。試料は大腿部筋肉を採取した。生ハムはスーパーマーケットで購入した。

リアルタイムPCRはサルモネラ属菌の検出にはCycleave®PCR Salmonella Detection Kit Ver.2.0(Takara Clontech)、腸管大腸菌の検出にはCycleave®PCR EHEC (O 抗原型) Typing Kit(Takara Clontech)、リステリアの検出にはCycleave®PCR *Listeria monocytogenes* (inlA gene) Detection Kit(Takara Clontech)を用いた。

Lamp法は、それぞれの菌種特異的な栄研化学(株)のキットを用いた。

(3) 培養および検出

検出法としては2方法を検討した。一つ目は、シカ肉を用いて、ストマックしたものに直接 10^1 - 10^8 cfu/g の *Salmonella infantis* または *Salmonella Enteritidis*, EHEC O157 および *Listeria monocytogenes* を接種し、リアルタイムPCR および Lamp 法で検出し検出感度を検討した。もう一つは 10^2 cfu/g の *Salmonella infantis* または *Salmonella Enteritidis*, EHEC O157 および *Listeria monocytogenes* それぞれを一晩前培養したあと、希釈しリアルタイムPCR および Lamp 法で検出し検出感度を検討した。

(4) 生ハムとシカ肉での検出感度の比較

(3)の結果前培養したほうが感度がよかったので、汎用性がある生ハムとシカ肉での感度の違いを検討した。方法はスキーム1の前培養に準じた。

2) 食中毒起因細菌の病原性因子遺伝子の実態調査

(1) 野生ニホンジカ試料採取

1)-(1)と同じ試料を用いた。試料は大腿部筋肉と糞便を採取した。2013年5月28日のシカ由来試料は10頭分、2012年12月4日は9頭分、2011年10月は20頭分、計39頭だった。そのうち、オス24頭、メス15頭であった。

(2) ニホンジカ試料からの *Salmonella* 属菌、*Listeria* 属菌、*Escherichia coli* の分離培養と分離株の保存

採取したニホンジカ筋肉を水で洗い蒸留水で流し70%エタノールを吹きかけてから包丁で肉のまわりをトリミングしたのち、中心部分5g細断したものを各種菌分離培養に用いた。Tryptic Soy Broth(TSB)を用いて37、24時間培養した。また、糞検体は15mlチューブにTSB10ml、糞を1g入れ37、24時間培養した。さらに培養液をMLCB寒天培地²、Chromagar

Listeria 培地、セフェキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルビトール・マッコンキー培地(CT-SMAC培地)に塗布した後、37で18時間培養を行い、培地上のコロニーを釣菌し各選択培地にさらに分離し37 24時間培養を行った。保存は、カジトン培地で行った。

(3) PCR法による *Salmonella* 属菌、*Listeria* 属菌、*Escherichia coli* の同定

(3)-1. *Salmonella* 属菌の同定

Salmonella 属菌の同定は、*Salmonella* 属菌の16SrDNAに特異的なプライマーを用いた polymerase chain reaction(PCR) kit (Takara)を用いた。

(3)-2. *Listeria* 属菌の同定

Listeria 属菌の同定は、*Listeria* 属菌の16SrDNA、*plcA* に特異的なプライマーを用いた PCR kit(Takara)で行った。

(3)-3. *Escherichia coli* の同定

Escherichia coli の同定は、*Escherichia coli* の中でも病原性を持つ大腸菌である腸管出血性大腸菌(EHEC)、毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管凝集性大腸菌(EAggEC)のそれぞれが特徴的に保持する遺伝子である、VT1、VT2、*elt*、*invE*、*eae*、*aggR* 遺伝子領域に特異的なプライマーを用いた。

反応後は電気泳動後、マーカーを指標に同定を行った。

(4) シークエンス法によるDNA塩基配列の決定

(4)-1. DNAの精製

PCR産物10 μ lに対し、ExoSAP-IT(Affymetrix社)を用い37.0 15分、80.0 15分の条件で精製を行った。

(4)-2. DNA塩基配列の決定

BigDye Terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems社)を用いて反応を行った。DNA配列はApplide

Biosystems 3730 XL genetic analyzer(Applide Biosystem 社)を用いて決定した。

(5) 遺伝子解析

得られたシーケンスデータは、ATGC(ゼネティックス社)を用いて、マルチプルアライメントを行い、rDNA の部分塩基配列を得た。得られた塩基配列は、National Center for Biotechnology Information(NCBI)で提供している Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)を用い、GenBank 登録配列との相同性検索を行った。この検索結果を参照し、各菌種の同定を行った。

3) 食中毒起因寄生虫の遺伝子検査の開発と確立

シカでの食中毒事例のある寄生虫であるサルコシステイス属に着目し、その検査法を核酸クロマト法(NASBA法)により検討した。シカ肉では検査法の検討のためのサルコシステイス属寄生虫の陰性検体が入手出来なかったことから、肉質が類似している馬肉を検体として用いる事とした。馬肉として、熊本県産馬肉 90 検体分を使用した。内訳は、カナダ産：72 検体および国産：18 検体であった。

馬肉中のサルコシステイス属の寄生数は厚生労働省が定めた公定法であるリアルタイム PCR 法で測定した。NASBA 法は、馬肉(1-3g)をメスで細かく切り刻み、混ぜ合わせ、その中から 0.1g をストマフィルターにいれ 1 分間攪拌する。次に遠心し、沈殿に核酸抽出試液(300 μ L)を加え、室温で 20 秒間 Vortex し、沈殿の懸濁液を調製した後、1.5mL チューブに移す。10 秒間スピンダウンし、上清を核酸溶液とする。NASBA 試薬にサルコシステイス用プライマー溶液を加え、NASBA 反応溶液を調製する。さらに NASBA 酵素試薬溶解液を調整し、

NASBA 反応溶液を反应用チューブ

に分注し、核酸溶液を加える。41 1 分間保温し、増幅反応終了後のチューブに展開液(3 滴)を滴下し、核酸クロマトストリップを挿す。検出ラインを目視で確認する。

4. 研究成果

1) 食中毒起因細菌の病原性因子遺伝子の検出法

シカ肉中の腸管出血性大腸菌、サルモネラおよびリステリアを遺伝子で測定するために、シカ肉にそれぞれの菌を添加し、最適な条件を検討した。

その結果直接法では EHEC O157, *L.monocytogenes*, *S.enteritidis* の検出感度では LAMP 法において 10³ cfu/g, リアルタイム PCR では 10⁷ cfu/g であった。

培養法(enrichment culture method)では Lamp 法では EHEC O157 は 10² fu/g, *L.monocytogenes*, では 10³u/g, *S.enteritidis* では 10⁶/g であった。リアルタイム PCR では 10² cfu/g, *L.monocytogenes*, では 10⁴ cfu/g, *S.enteritidis* では 10⁴ cfu/g の感度であった。

次に汎用性が実証されている生ハムと感度を比較してみると、LAMP 法では EHEC O157 は同等であり、*L.monocytogenes* ではシカ肉の方が感度がよく、サルモネラ属は生ハムの方が感度が良かった。リアルタイム PCR 法では生ハムは EHEC O157 の感度が非常に高かったが、*L.monocytogenes* は全く検出不能であった。しかしシカ肉では *L.monocytogenes* およびサルモネラ属を 10⁴ cfu/g の感度で検出できた。

2) 食中毒起因細菌の病原性因子遺伝子の実態調査

ニホンジカ試料 39 頭から、セフェキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルビトール・マッコンキー寒天培地(CT-SMAC 培地)

には赤色、無色のコロニーが認められた。Chromagar Listeria 培地からは白色辺縁明瞭なコロニーと、白色辺縁不明瞭でハコ形成を伴うコロニーが認められ、MLCB 培地からは黒色または濃青色の辺縁明瞭なコロニーが認められた。各培地から分離された菌株数は、CT-SMAC 培地から 54 株、Chromagar Listeria 培地から 59 株、MLCB 培地からは 65 株が分離された。

まず、CT-SMAC 培地由来の分離菌株の病原性大腸菌由来の病原因子遺伝子 6 種類について、PCR を行った。その結果、各遺伝子の保有について、VT1、0 株(0.00%)、VT2、0 株(0.00%)、*elt*、1 株(1.85%)、*iae*、0 株(0.00%)、*invE*、0 株(0.00%)、*aggR*、0 株(0.00%)が認められた。この結果はシカ 39 頭中 1 頭に相当し、陽性率は 2.56%であった。

Chromagar Listeria 培地由来の分離菌株の遺伝子保有状況について調べた結果、*Listeria monocytogenes* に特異的に保有される病原遺伝子である *plcA* と *Listeria* 属 16SrRNA に焦点をあて PCR を行った結果、各遺伝子の保有状況は *plcA*、0 株(0.00%)、*Listeria* 属 16SrRNA は 8 株(13.6%)であった。MLCB 培地由来の分離菌株の遺伝子保有状況については、*Salmonella* 属 16SrDNA は、65 株(100%)であった。

遺伝子シーケンス法による Chromagar Listeria 培地由来の分離菌株の菌種同定により、*Listeria innocua*、2 株(25.0%)、*Enterococcus mundtii*、3 株(37.5%)、*Carnobacterium divergens*、1 株(12.5%)で、残り 2 分離株については菌種同定することができなかった。各菌株の由来は、*Listeria innocua* についてはすべて肉由来である一方、*Enterococcus mundtii*、*Camobacterium divergens* についてはすべて糞便由来であった。

遺伝子シーケンス法による MLCB 培地由来の分離菌株の菌種同定により、*Raoultella ornithinolytica*、8 株(12.3%)、*Citrobacter* 属は 8 株(12.3%)で、種は *freundii*、3 株(4.62%)、*braakii*、5 株(7.69%)、*Salmonella* 属は 7 株(10.8%)で、種は *typhi*、1 株(1.54%)、*enterica*、1 株(1.54%)、*houten*、1 株(1.54%)、*bongori*、4 株(6.15%)、*Escherichia fergusonii*、5 株(7.69%)、*Enterobacter* 属は 5 株(7.69%)で、種は *ludwigii*、3 株(4.62%)、*canceroqenus*、1 株(1.54%)、*cloacae*、1 株(1.54%)、*Klebsiella oxytoca*、3 株(4.62%)、*Pseudomonas aeruginosa*、3 株(4.62%)、*Shigella flexneri*、1 株(1.54%)、*Acinetobacter radioresistens*、1 株(1.54%)、*Leclercia adecarboxylata*、1 株(1.54%)、*Pantoea aqglomerans*、1 株(1.54%)、*Morganella morganii*、1 株(1.54%)、*Yersinia enterocolitica*、1 株(1.54%)が認められた。残り 21 株については、菌種同定することはできなかった。各菌株の由来は、*Raoultella ornithinolytica*、糞便由来 4 株、肉由来 4 株、*Citrobacter* 属は *freundii*、3 株すべて肉由来、*braakii*、5 株すべて糞便由来、*Salmonella* 属では *Typhi*、肉由来 1 株、*enterica*、肉由来 1 株、*Houten*、糞由来 1 株、*bongori*、肉由来 3 株、肉由来 1 株、*Escherichia fergusonii*、5 株すべてが糞便由来、*Enterobacter* 属は、*ludwigii*、糞便由来 2 株、肉由来 1 菌株、*canceroqenus*、糞便由来 1 株、*cloacae*、糞便由来 1 株、*Klebsiella oxytoca*、肉由来 3 株、*Pseudomonas aeruginosa* 肉由来 2 株、*Shigella flxneri*、糞便由来 1 株、*Acinetobacter radioresistens*、糞便由来 1 株、*Leclercia adecarboxylatah*、糞便由来 1 株、*Pantoea aqglomerans*、糞便由来 1 株、*Morganella morganii*、糞便由来 1 株、*Yersinia enterocolitica*、糞便由来 1 株で

あった。

3) 食中毒起因寄生虫の遺伝子検査の開発と確立

馬肉中に汚染するサルコシスティス属を検出する NASBA 法が、シカ肉に汚染するサルコシスティス属を検出出来るかを確認した。シカ肉においてもバンドが検出されたことから、馬肉と同様サルコシスティス属の検出に NASBA 法は有効であることが分かった。本来ならばシカ肉の陽性検体と陰性検体を用いて NASBA 法の性能を評価すべきであるが、入手したシカ肉すべてでサルコシスティス属の寄生があったことから、本実験には適さないと判断された。そこで、陰性検体が入手出来、シカ肉と同様、鉄分、タンパク質が多い馬肉を代替品として、NASBA 法の評価を行った。

その結果 リアルタイム PCR 法で得られた結果と NASBA 法での結果の陽性一致率は、80%であった。偽陽性は 17%であった。検出限界は 104cfu/g と推測された。

しかし、バンドが読みにくかったり、肉に含まれる鉄分の影響で増殖阻害が起こる頻度が部位によっては高かった。これらの結果から、LAMP 法のほうがやや検出率が高かったが、今後の一斉試験法には LAMP 法および NASBA-核酸法の両方を用い、細菌と寄生虫を同時に検出する系の確率は可能であることが示された。

以上のことから、ジビエのモデルとしてシカ肉を用いた本研究結果から、食品衛生上の危害物質として、EHEC, サルモネラ属菌、リステリア菌および寄生虫が挙げられることが分かった。さらにその診断法として、現場での対応が可能な核酸クロマト法 (NASBA 法) や、迅速に判定ができる LAMP 法が有効であることが示唆された。

今後はさらにこれらの危害物質を対象に簡便法を開発する必要があると思われた。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

小西良子、奥田 惇、石崎直人、山崎朗子：
野生動物における食中毒危害微生物病原因子の探索、日本防菌防黴学会第41回年次大会 2014年9月 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小西 良子 (Yoshiko KONISHI)

麻布大学 生命・環境科学部・教授

研究者番号：10495761