

JRA 畜産振興事業

平成 28 年度

新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業
報告書

東京大学大学院農学生命科学研究科
附属食の安全研究センター
2017 年 3 月

JRA 畜産振興事業

**新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業
報告書**

東京大学大学院農学生命科学研究科
附属食の安全研究センター
2017 年 3 月

はじめに

畜産物の食中毒菌等の病原体による汚染については、農場からと畜場、流通過程、小売店までのフードチェーンにおいて、それぞれモニタリングが実施されているが、完全に汚染を防止することは難しい。これは、各プロセスにおいて、食中毒病原体そのものや腸内細菌等の指標細菌を調べるなど、対象とする微生物が異なることや、食中毒病原体においては、低い出現頻度に対して100%摘発できる方法が欠如しているなどの問題に起因する。例えば、農場においては、腸管出血性大腸菌O157やカンピロバクターによる汚染調査が継続されているが、前者については保菌牛から必ずしも検出されず、後者についても、未だにその汚染源を特定するに至っていない。また、と畜場や食肉流通過程では、一般細菌、大腸菌群、大腸菌や腸球菌を指標細菌とするため、作業従事者の手や使用機材からの交差汚染を区別することは出来ない。さらに、腸管出血性大腸菌O157等の衛生管理基準設定では、滅多に検出されることのない病原体を対象とした情報不足から、根拠が不十分な管理基準を設定せねばならない懸念が指摘されている。そのため、農場における家畜の汚染と、と畜場・食肉流通ルートにおける共通した指標細菌の設定と、それによる汚染源及び汚染ルートの迅速な同定法が開発されれば、これらの問題の多くが解決できると期待される。

一方、国の食中毒統計を見ると、細菌性食中毒の発生件数と患者数は、漸減しているとは言え、相変わらずカンピロバクターとサルモネラ属菌などの畜産物由来食中毒の発生が上位を占めている。農林水産省においては、これら病原細菌による農場の汚染について地道にモニタリングを進めており、その成績は農家の意識向上や家畜保健衛生所による指導強化に大いに役立っている。しかし、そもそもの汚染源については不明のままであり、農場内での特定の細菌や細菌叢全体の動態を明らかにしなければ、汚染源特定は不可能と思われる。一方、厚生労働省の指導のもと、と畜場やその後の食肉加工工程における衛生管理は格段に向上した。しかし、僅かに紛れ込んだと思われる病原菌が、上記のような多くの食中毒を起こしていると考えれば、その汚染の場所、タイミング、様式についてなど、明らかにせねばならない問題は多く残っている。すなわち、これらの問題点を一括して解決できる農場から小売店に至るまでの共通した検査指標の設定と十分な特異性と感度を有する方法による汚染検出手法の開発は、今最も求められる喫緊の課題と言える。

本事業で主に取り扱った豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) は、豚に髄膜炎・敗血症、心内膜炎等を起こす病原細菌である。我が国では、年間30万頭の豚が感染し、その損害額は年間117億円と推計され、養豚業にとって恐れられている。一方、本菌は健康豚の扁桃や腸管内容物・糞便から検出されることから、豚に常在すると考えられている。さらに、我々のこれまでの農場での調査では、90%以上の健康豚の唾液からも検出され、汚染度はこれまでの推定をはるかに超えることが分かってきた。また、市販豚肉や豚内臓肉の汚染度の調査では、60%を超える内臓肉から本菌の遺伝子が検出され、数%のコマ肉・挽き肉からも同様に遺伝子が検出

された。これらの成績から、健康な豚の内臓には、元々高い確率で豚レンサ球菌が存在し、それが本来無菌であるはずの精肉を汚染してしまうと推察された。本菌は、豚に高い宿主特異性を有することから、牛や鶏、その他の動物からは通常検出されない。このようなこれまでの研究の背景から、本菌を新たな指標細菌として、農場からフードチェーンに至る各段階での汚染を調査すれば、動物の内臓や糞便等からの汚染を、人為的な汚染の介入に煩わされることなく検査することが可能になるのではないかと考え、本事業における研究開発を計画した。

本事業では、豚レンサ球菌の遺伝子をPCR等の遺伝子増幅法により検出する作業を一つのプロセスとし、もう一つのプロセスとして、存在する全ての細菌の遺伝子配列を決定して、そこから存在する菌種を推定するメタゲノム解析の手法を取り入れた。そして、これらを組み合わせて、農場からと畜場、食肉加工過程を経て、市販される肉までの試料を収集し、そこに存在する豚レンサ球菌とその他全ての細菌の動態を追跡し、最終的に食肉への汚染がどこで起こったのかを明らかにすることを目指した。すなわち、何らかの汚染源から食肉への汚染が起こった場合、特定の病原菌（ここでは豚レンサ球菌を想定）だけが単独で付着することではなく、汚染源に同時に存在していた他の細菌種も一緒に付着するはずであり、それらをまとめて明らかにすることができれば、汚染源や汚染場所の特定が可能であろうとの理論的解釈である。実際の計画では、既に我々が開発を終えている通常のPCRおよびLAMP法に加えて、定量的RT-PCRを新たに開発し、これらの方法で試料内に僅かに存在する豚レンサ球菌の遺伝子を検出した。さらに、同じサンプルから十分量のDNAが回収できたものについて、細菌分類学上菌種の決定に利用される16S rRNA遺伝子の一部配列をPCRで増幅し、その増幅産物全ての配列を高速シーケンサーで決定し、得られた配列情報をスーパーコンピュータで解析し、存在するほぼ全ての細菌種を推定するメタゲノム解析を実施した。メタゲノム解析では、これら菌種の推定だけでなく、試料中に存在する全てのDNA塩基配列を決定し、その情報解析も行った。これらの情報解析は、京都大学医学部へ委託し、技術的な指導と補佐も受ける体制とした。これらの作業の中で、豚レンサ球菌だけでなく、これに代わる指標細菌がないかについても検討した。農場から市販食肉に至るまでのフードチェーン全工程にわたり、新たな指標となる細菌の存在と、その他全ての細菌叢の動態を調査するような解析は、これまでにはない新しい取り組み方法であると思われ、新たな指標菌の候補の設定と、食肉への汚染源や汚染場所についての新規知見を得るべく、慎重に作業を進めたところである。本報告書には、それらの成績の詳細がまとめられている。本事業から得られた知見が、今後の食肉の衛生管理に役立っていくことを願っている。

2017年3月
東京大学大学院農学生命科学研究科
附属食の安全研究センター長
関崎 勉

目 次

第1章 農場およびフードチェーンの各工程における試料収集および菌検出・分離 新井沙倉、金炫呈、渡辺孝康、関崎 勉	page 6
第2章 16S rRNA 遺伝子配列を用いた網羅的な細菌叢解析 村瀬一典、丸山史人、渡辺孝康、関崎 勉	page 16
第3章 メタゲノム解析によるブタ唾液DNA試料内の細菌種および機能構成の解明 丸山史人、渡辺孝康、関崎 勉	page 28

第1章 農場およびフードチェーンの各工程における 試料収集および菌検出・分離

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター

新井沙倉、金炫呈、渡辺孝康、関崎 勉

1. はじめに

農場およびフードチェーンから試料を収集し、各試料に含まれる細菌を検出、定量、分離することで、豚および市販豚肉への*S.suis*汚染ルートを推定した成績について以下に述べる。本章で収集した試料は、第3、4章にも用いられた。

2. 事業実施方法

1) 試料の収集地および採取対象

まず、養豚場における試料収集を実施するため、豚を飼育している国内の4カ所の農場に協力を要請した(図1)。それぞれの農場で飼育している健康な哺乳子豚、離乳豚、育成豚、母豚、病豚から以下の生体試料及び環境試料を採取した。すなわち、生体試料として唾液、糞便及び腔の拭き取り試料を、環境試料として豚の餌箱の拭き取り及び水飲み場の拭き取り試料を採取した(図2)。

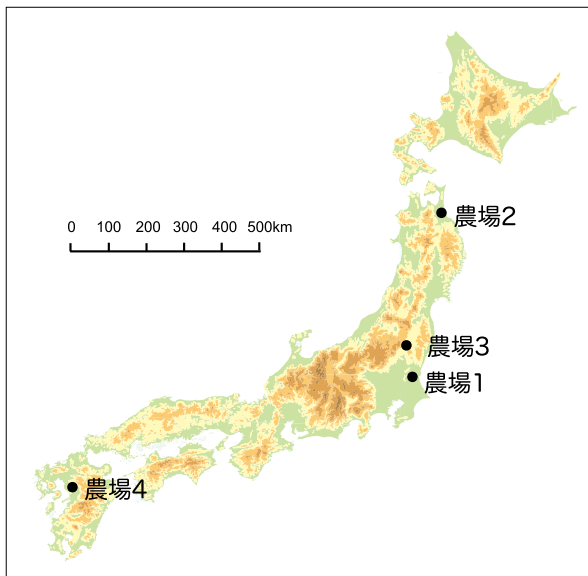


図1 試料を採取した農場の地理的位置。農場の位置を黒丸で示す。

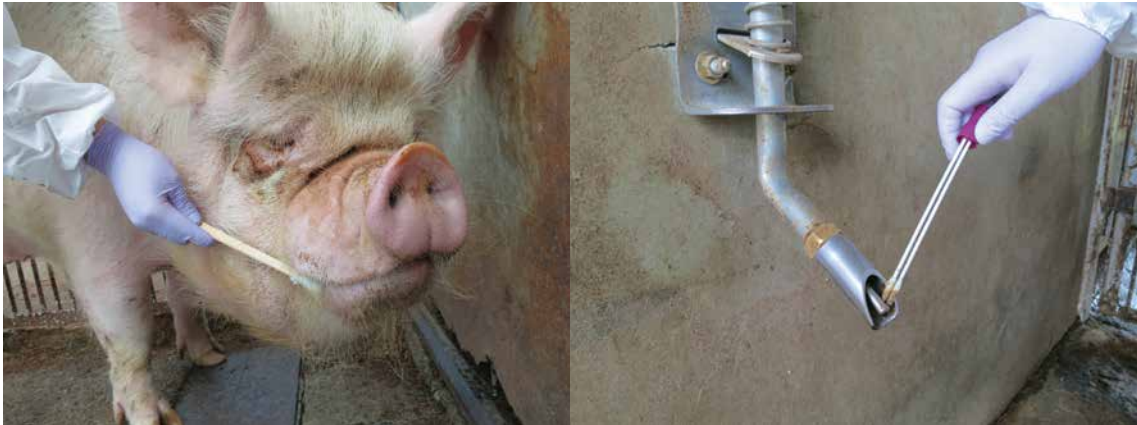


図2 唾液および水飲み場の拭き取り試料の採取風景。自家製の綿棒で口腔内を拭うことで唾液を採取し、市販の拭き取り棒を利用して水飲み場の拭き取り試料を採取した。

次に、と畜試料の収集のため食肉処理場に協力を要請し、内臓が取り除かれて豚肉だけになった状態の枝肉拭き取り試料と、内臓の一部である赤モノ（肝臓、心臓、肺、横隔膜、脾臓等）が入ったトレーの拭き取り試料を収集した（図3）。おおよそ1週間おきに合計4回に渡って枝肉の拭き取り試料と赤モノトレーの拭き取り試料を収集した。また、小売試料として、49の店舗から豚肉（カット肉、ひき肉）、豚内臓肉（タン、レバー、ハツ、モツ）及び鶏肉（ひき肉）を購入した。一部の店舗からは、時期を変えて繰り返し購入した。

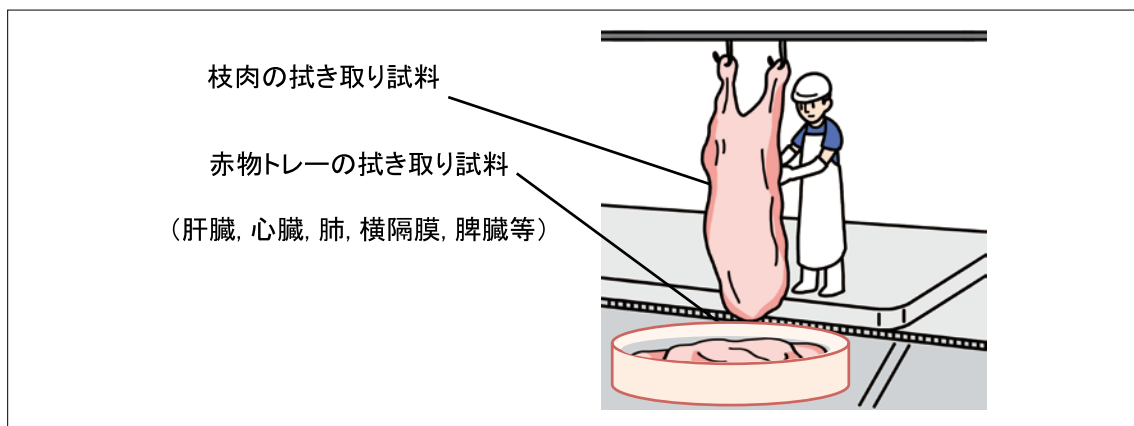


図3 と畜過程における試料採取部位。食肉処理場で解体された直後に採取した。

後述の細菌叢解析を行うにあたり、採取した時点の細菌叢を観察する必要があったため、細菌の増殖抑制作用とDNAの分解抑制作用のある溶液（RNAlater）が入ったチューブに農場試料及びと畜試料を回収した。また、小売試料は、購入後に保冷剤と一緒に実験室に持ち込み、その日のうちにDNAを抽出することで細菌の増殖を極力抑えた。

2) 試料からのDNA抽出

農場試料およびと畜試料については、RNAlater溶液中に入った状態のまま遠心分離に供し、形成された沈殿物を滅菌生理食塩水で洗浄した。この沈殿物から、市販のDNA抽出キット (PowerBiofilm[®] DNA Isolation Kit) を用いて、メーカーの作業手順に概ね従ってDNAを抽出した。ただし、細胞破碎に利用するビーズをより破碎力の強いジルコニアビーズに換え、通常の細胞破碎機よりも破碎力の強い機械 (Beads Crusher μ T-12) に換えた上で実施した。

購入した小売試料については、1試料を125gと規定した。滅菌ストマッカー袋に試料と滅菌生理食塩水を入れ、30秒間機械を用いて攪拌した。このとき滲出した肉汁の一部は -80°C に保存した。豚レンサ球菌 (*S.suis*) を培養するために残りの肉汁を液体培地 (Todd-Hewitt 培地) に接種し、5% CO_2 存在下で 37°C にて一晚培養した。アルカリ加熱法 [1] により培養後の液体培地からDNAを抽出した。また、*S.suis*が検出された一部の試料については、 -80°C に保存していた肉汁を溶解して、前述の農場・と畜試料と同じ方法でDNAを抽出した。

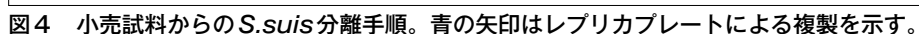
3) PCRによる細菌DNAの検出と定量

農場試料およびと畜試料については、まず試料の中に含まれる全ての細菌の数 (総菌数) を測定するために、総菌数測定に用いられる定量的リアルタイムPCR (qPCR_{TB}) [2] を行った。次に、*S.suis*の数を測定するために、*S.suis*に特異的な定量的リアルタイムPCR (qPCR_{SS}) [3] を行った。

小売試料については、試料の中に含まれる*S.suis*を検出するために、遺伝子検出法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) やPCRを利用した。アルカリ加熱法で抽出したDNAを、*S.suis*特異的なLAMP (LAMP_{SS}) またはPCR (*recN*PCR) [1, 4] に供試することで、各試料に*S.suis*が含まれているか否かを判定した。また、農場・と畜試料と同じ方法で抽出した一部の試料のDNAに対しては、前述のqPCR_{TB}とqPCR_{SS}を行い、試料に含まれる細菌数を定量できるか検討した。

4) *S.suis*陽性試料からの菌分離

*S.suis*特異的な検出法で陽性であった小売試料を菌分離に供試した。食肉中には*S.suis*以外の菌も多く存在することから、レプリカプレートを利用した分離法を行った (図4) [1, 5]。レプリカプレートとは、寒天培地上に生えた菌コロニーを他の培地上に写し取ることである。この方法では、*S.suis*の特徴である α 溶血を示すコロニーだけを選択して分離するため、レプリカプレートを利用しない方法よりも分離効率が良い。



1) 収集した試料

1) 収集した試料

農場からは、341 件の生体試料(唾液247 件、糞便71 件、膣の拭き取り23 件)と157 件の環境試料(餌箱の拭き取り72 件、水飲み場の拭き取り85 件)からなる、合計475 件の試料を収集した。それぞれの飼育時期ごとの内訳は表1に示した。

フードチェーンからは、39件のと畜試料(枝肉の拭き取り19件、赤モノトレーの拭き取り20件)と1,139件の小売試料(豚カット肉490件、豚ひき肉315件、豚レバー140件、豚タン106件、豚ハツ51件、豚モツ22件、鶏ひき肉15件)からなる、合計1,178件の試料を収集した(表2)。

JRA畜産振興事業
新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業報告書

表 1 農場から収集した試料の概要。

分類	試料	飼育時期	試料数	S. suis		
				陽性	陰性	検出率 (%)
生体	唾液	哺乳子豚	76	76	0	100.0
		離乳豚	55	55	0	100.0
		育成豚	50	50	0	100.0
		母豚	50	50	0	100.0
		病豚	16	16	0	100.0
		計	247	247	0	100.0
	糞便	哺乳子豚	7	3	4	42.9
		離乳豚	11	8	3	72.7
		育成豚	8	1	7	12.5
		母豚	41	14	27	34.1
		病豚	4	1	3	25.0
		計	71	27	44	38.0
	膣の拭き取り	母豚	23	20	3	87.0
計		341	294	47	86.2	
環境	餌箱の拭き取り	哺乳子豚	3	3	0	100.0
		離乳豚	14	12	2	85.7
		育成豚	11	9	2	81.8
		母豚	41	31	10	75.6
		病豚	3	2	1	66.7
		計	72	57	15	79.2
	水飲み場の拭き取り	哺乳子豚	16	6	9	40.0
		離乳豚	13	10	4	71.4
		育成豚	11	6	5	54.5
		母豚	41	12	29	29.3
		病豚	4	2	2	50.0
		計	85	36	49	42.4
	計		157	93	64	59.2
合計		475	387	111	81.5	

表 2 フードチェーンから収集した試料の概要。

分類	試料	試料数	<i>S. suis</i>		
			陽性	陰性	検出率 (%)
と畜	枝肉の拭き取り	19	0	19	0
	赤モノトレーの拭き取り	20	2	18	10.0
	計	39	2	37	5.1
小売	豚カット肉	490	46	444	9.4
	豚ひき肉	315	39	276	12.4
	豚レバー	140	90	50	64.3
	豚タン	106	65	41	61.3
	豚ハツ	51	30	21	58.8
	豚モツ	22	14	8	63.6
	鶏ひき肉	15	3	12	20.0
	計	1139	287	852	25.2
合計		1178	289	889	24.5

2) PCRによる細菌DNAの検出と定量

まず農場試料において、収集した試料の種類ごとに比較してみると、すべての試料でqPCR_{TB}は陽性となり、糞便試料は総菌数の平均値がやや高いが、膣の拭き取り試料は低く、その他の試料間ではおおよそ等しい値であることがわかった(図5)。一方、qPCR_{ss}は、全ての唾液試料で陽性だったが、糞便、膣の拭き取り、餌箱の拭き取り、水飲み場の拭き取り試料での*S.suis*検出率はそれぞれ38.0%、87.0%、79.2%、42.4%だった(表1)。また、*S.suis*が検出された試料で*S.suis*菌数の平均値を比較すると、唾液、糞便、膣の拭き取り、餌箱の拭き取り、水飲み場の拭き取り試料でそれぞれ 5.6×10^6 、 1.4×10^5 、 3.7×10^4 、 1.1×10^5 、 5.7×10^4 となり、*S.suis*の存在量は唾液で最多であった(図5)。次に、すべての豚で*S.suis*が検出された唾液試料における定量的リアルタイムPCRの成績を豚の飼育時期ごとに比較してみると、総菌数の平均値と*S.suis*菌数の平均値は哺乳子豚、離乳豚、育成豚、母豚、病豚でおおよそ等しい値だった(図6)。これによって、*S.suis*は総菌数に対して一定の割合(平均2%)で唾液中に存在していることがわかった。

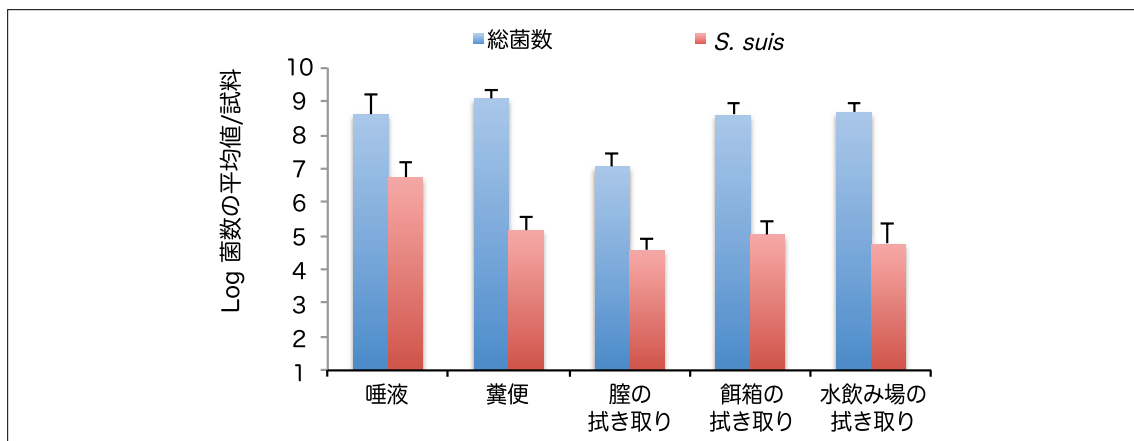


図5 農場から収集した生体および環境試料の細菌数。各試料の菌数の平均値および標準偏差を示す。

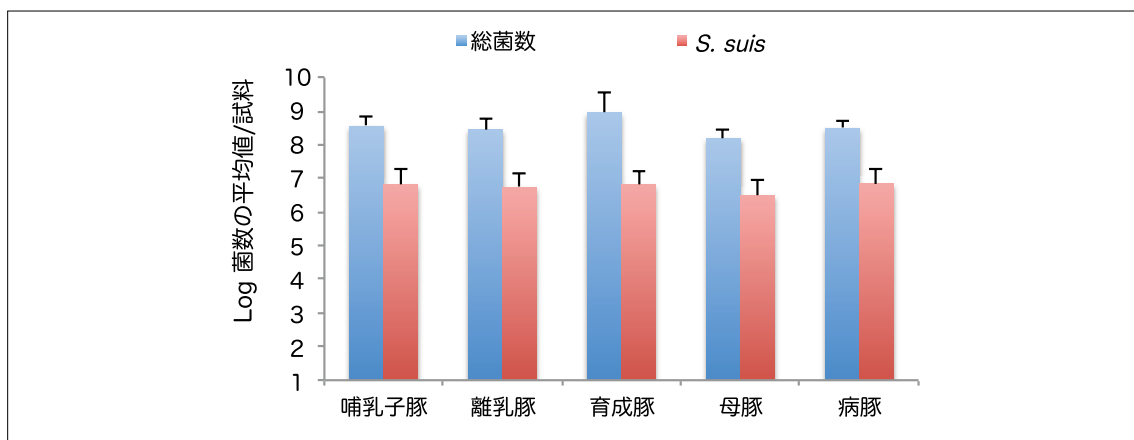


図6 唾液試料の飼育時期ごとの細菌数。各飼育時期における唾液の菌数の平均値および標準偏差を示す。

次に、と畜試料を調べると、枝肉の拭き取り試料は1件を除いた全ての試料でqPCR_{TB}が検出限界以下となり、*S. suis*は全てから検出されなかった。一方、赤モノトレーの拭き取り試料は、全てでqPCR_{TB}が陽性であり、その数は $4.6 \times 10^4 \sim 6.0 \times 10^6$ と幅があった。一方、その中で2件の試料からは*S. suis*が検出された(図7)。また、小売試料では、約10%の豚カット肉・ひき肉、50%以上の豚内臓肉、および20%の鶏ひき肉から*S. suis*が検出された(表2)。この*S. suis*が検出された試料の肉汁からDNAを直接抽出し、定量的リアルタイムPCRに供試したところ、豚内臓肉(豚タン、豚ハツ)は*S. suis*が定量できたものの、豚肉(豚カット肉、豚ひき肉)は全て検出限界以下だった(図8)。

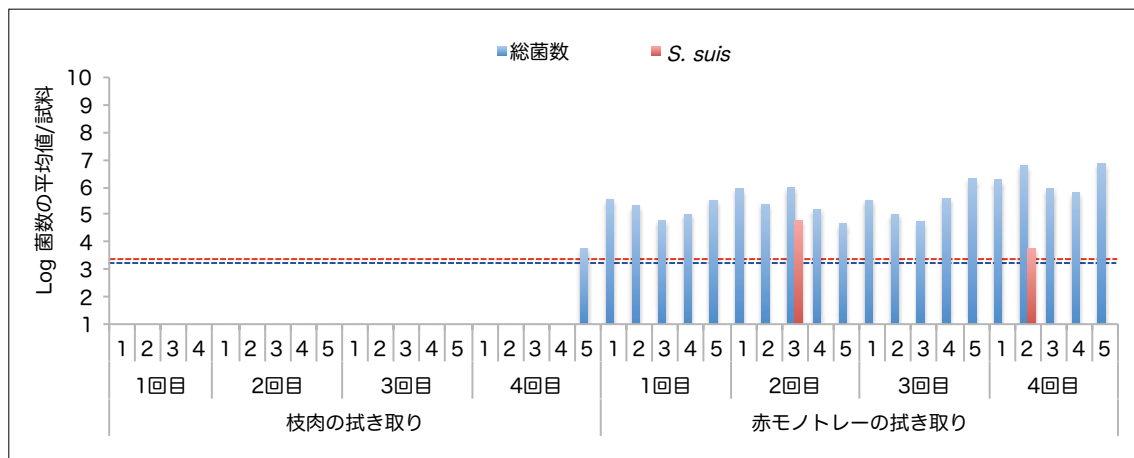


図7 と畜試料の細菌数。点線は検出限界値を示す。

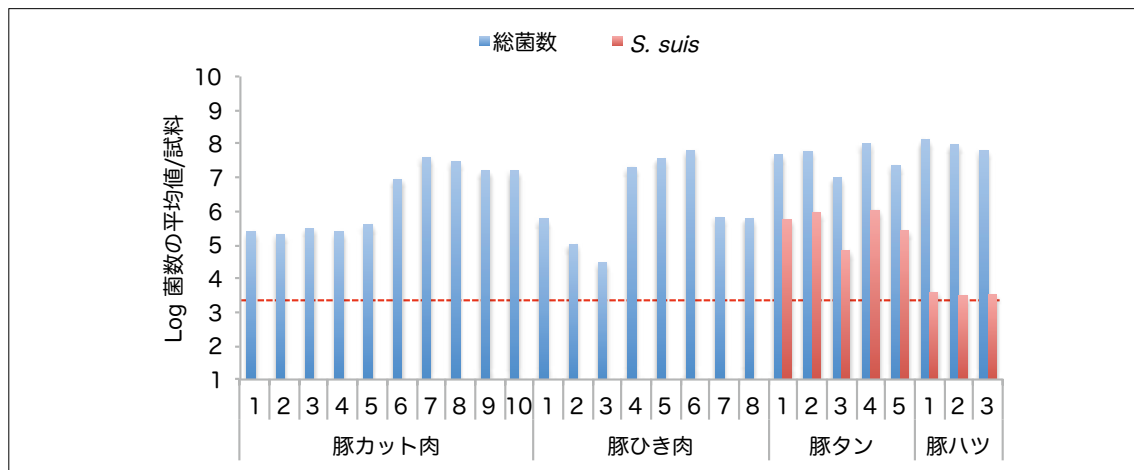


図8 小売試料の細菌数。点線は検出限界値を示す。

4) *S.suis* 陽性試料からの菌分離

合計19件の小売試料から136株の*S.suis*を分離した(表3)。豚ひき肉と豚レバーからは血清型が推定できない型別不能の株を分離した。一方、豚タンには様々な血清型が存在(血清型2、4、5、9、10、12、15、16、23、27、31、型別不能)し、複数の血清型の*S.suis*が一つの試料の中に混在する場合もあった。

表3 小売試料から分離した*S.suis*の血清型と株数。

試料	試料番号	血清型	菌株数
豚ひき肉	1	型別不能*	1
	2	型別不能	3
豚レバー	1	型別不能	8
	1	型別不能	1
	2	2	1
	3	2	1
	4	9	1
		型別不能	1
	5	31	1
		型別不能	1
	6	型別不能	3
	7	4	1
		15	1
		27	1
	8	9	1
		型別不能	3
	9	31	1
		型別不能	3
豚タン	10	9	1
		16	1
		型別不能	4
	11	23	4
		型別不能	2
	12	9	1
		16	2
		型別不能	5
	13	型別不能	9
	14	5	2
		10	1
		型別不能	15
	15	31	2
		型別不能	21
	16	10	2
		12	1
		31	1
		型別不能	29

5) 考察

農場試料の中で、*S.suis*が100%の試料から検出されたのは唾液試料だけであり、その他の試料は*S.suis*の検出率も、その菌数も唾液と比べて低かった。また、哺乳子豚を含むどの飼育時期の豚にも共通して 10^6 と多量の*S.suis*が唾液試料に存在していたため、新生豚が*S.suis*に感染するタイミングは生後直後であると考えられた。母豚の産道が子豚への*S.suis*の感染源になるという報告もあるが[6]、膣の拭き取り試料よりも唾液試料の方が*S.suis*菌数が多かったため、母豚の唾液も子豚への感染源になる可能性がある。

今回の調査では、*S.suis*の検出に遺伝子検出法を利用しているため、生きた菌と死んだ菌の両方を検出している。しかし、少なくとも一部の豚肉、豚内臓肉からは*S.suis*を分離できたことから、*S.suis*が生きた状態で市販豚肉、内臓肉中に存在する可能性があることがわかった。このため、少なくとも豚の口腔に関しては、唾液中に*S.suis*が大量に存在し、それが食肉加工段階を通過して店頭に並んだ時点でも生きた状態で保持されていることがわかった。

と畜試料では、すべての枝肉の拭き取り試料で*S.suis*が検出限界以下だったが、その後の処理工程を経た小売の試料では、枝肉を解体した後の豚カット肉と豚ひき肉から*S.suis*が検出された。同じ枝肉を追跡できたわけではないが、*S.suis*の混入は食肉処理場よりも後であることが示唆された。これは、鶏肉の成績からも支持される。つまり、鶏ひき肉の一部で*S.suis*が検出されたが、鶏肉は豚肉を処理する食肉処理場ではなく、鶏のみを扱う食鳥処理場で解体、出荷される。そのため、鶏は養鶏場から食鳥処理場で出荷されるまでの工程で豚もしくは豚肉と接する機会はなく、初めて出会う場所は食肉処理場及び食鳥処理場から出荷された食肉を扱う食品加工場や販売店である。ここで*S.suis*が豚肉や鶏肉に付着していると仮定すると、その混入源は高確率に*S.suis*が検出され、その菌数も多かった豚内臓肉であると考えられる。しかし、具体的にどの豚内臓肉が混入源なのか、どの処理工程の時に混入しているのかはここまでの成績では推察できない。食中毒細菌の汚染源として豚タンが疑われた場合には、上述の唾液と豚タンの*S.suis*検出率、*S.suis*菌数の成績より、*S.suis*を汚染の指標とするのが適していると思われる。しかし、*S.suis*以上に適している細菌種の存在の有無を確認するためには、細菌叢解析によってその他の細菌種の構成を観察する必要がある。

また、肉汁中の菌を培養した後にLAMPssまたは*recN*PCRによって*S.suis*が検出された試料を対象として、肉汁から直接DNAを抽出しqPCRssに供試したが、豚肉では全て検出限界以下だった。これは、豚肉中に含まれる*S.suis*の量がqPCRssで検出できる程には多くないことが理由である。そのため、今後小売試料から*S.suis*を検出する場合には、今回の調査の方法と同様に、培養の後にLAMPssによって判定するのが適していると考えられる。*recN* PCRでも検出できる場合もあるが、LAMPssの方が感度が高く(*recN*PCR：900 colony forming units (cfu)／反応、LAMPss：5.4 cfu／反応)、判定までの時間も短縮される利点がある(*recN* PCR：約110分、LAMPss：約60分) [1, 4]。

豚は個体識別をしていないため、どの枝肉が最終的にどの市販豚肉になるのか追跡できな

いが、それを可能とする家畜がいる。それが、生食等で腸管出血性大腸菌による食中毒が発生した牛(牛肉)である。牛は個体識別番号が1頭ずつ付与されているため、市販牛肉まで追跡できる。今回の成績で、*S.suis*が唾液を中心とした豚生体に数多く存在し、実際は存在し得ない豚肉にも混入していることがわかった。同様に牛生体に数多く存在する細菌が牛肉を汚染する事実があった場合には、枝肉から市販牛肉に至るまで同じ個体で追跡調査ができ、より詳細な汚染源の特定につながるだろう。

4. まとめ

母豚の唾液は、農場において子豚の*S.suis*感染源となる可能性がある。また、豚内臓肉はフードチェーンにおいて、豚肉及び鶏肉への*S.suis*の混入源となる可能性があることがわかった。今回の調査で収集した農場試料のように*S.suis*菌数が多い試料は、破碎法によるDNA抽出と定量的リアルタイムPCRによって量的な違いを観察することで、感染源の推定や、環境での生存性を観察することができる。一方、*S.suis*菌数が極めて少ないと考えられる小売試料に関しては、含有量の違いよりも混入の有無の判定が重要であるため、培養した後にLAMP法によって*S.suis*を検出するのが望ましい。

5. 引用文献

1. Arai S, Tohya M, Yamada R, Osawa R, Nomoto R, Kawamura Y, and Sekizaki T. Development of loop-mediated isothermal amplification to detect *Streptococcus suis* and its application to retail pork meat in Japan. *Int J Food Microbiol*, 2015. 208: 35-42.
2. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, and Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 2002. 148 (Pt 1) : 257-66.
3. Arai S, Kim H, Watanabe T, Tohya M, Suzuki E, Maruyama F, Murase K, Nakagawa I, and Sekizaki T. 投稿準備中.
4. Ishida S, Tien le HT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, and Sekizaki T. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*. *J Microbiol Methods*, 2014. 107: 66-70.
5. Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Hamada S, Rossignol C, Gottschalk M, and Takamatsu D. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 2014. 52 (5) : 1714-9.
6. Cloutier G, D'Allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, and Gottschalk M. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Vet Microbiol*, 2003. 97 (1-2) : 135-51.

第2章 16S rRNA 遺伝子配列を用いた網羅的な 細菌叢解析

¹ 京都大学大学院医学研究科

² 東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター

村瀬一典¹、丸山史人¹、渡辺孝康²、関崎 勉²

1. はじめに

本事業において、豚肉の病原細菌の汚染状況を明らかにするための新規バイオマーカー（指標細菌）を見出すため、次世代シーケンサーを用いた網羅的な細菌叢解析を実施し、養豚場から小売店までそれぞれの細菌叢を評価することで、豚肉の新たな汚染実態を明らかにするのである。

2. 事業実施方法

16S rRNA 遺伝子は全ての細菌が有する遺伝子であり、その配列上には細菌種ごとに多様性のある領域（可変領域）が存在することから、これまで細菌学における系統分類に広く利用されてきた。さらに、次世代シーケンサーを用いることで、一度に大量の配列を取得することができ、1つのサンプルから数百もの細菌の系統分類を有効的に行うことが可能となる。本解析では、試料中に混在する細菌種およびその構成（比率）を明らかにし、それらを総合的に評価・検証する必要がある。そのため、本解析では次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を用いた 16S rRNA による網羅的な細菌叢解析を実施した。

本解析に供試した試料数は、計 127 件であった。豚の唾液 (n=44) および糞便 (n=9) と、餌箱 (n=9) および水飲み場 (n=10) を養豚場からの試料とした。また、市販されている挽肉 (n=22)、コマ肉 (n=23)、タン (n=7)、ハツ (n=3) を肉加工品として解析に供した。

各試料から抽出・精製された DNA (新井の DNA 抽出項目) を用い、試料中に存在する細菌由来の 16S rRNA 遺伝子の可変領域 (V3-V4) に対して PCR 増幅を行った。調製された PCR 増幅産物は、次世代シーケンサー MiSeq に供され、各サンプルにつき約 500 塩基対からなる数万の配列リードを得た。得られた配列リードは、IM-TORNADO [1] とよばれる 16S メタゲノム解析専用のパイプライン上で処理され (図1)、各試料に存在する細菌叢の構成やその比率、また、試料間の関連性などを情報学的に精査した。

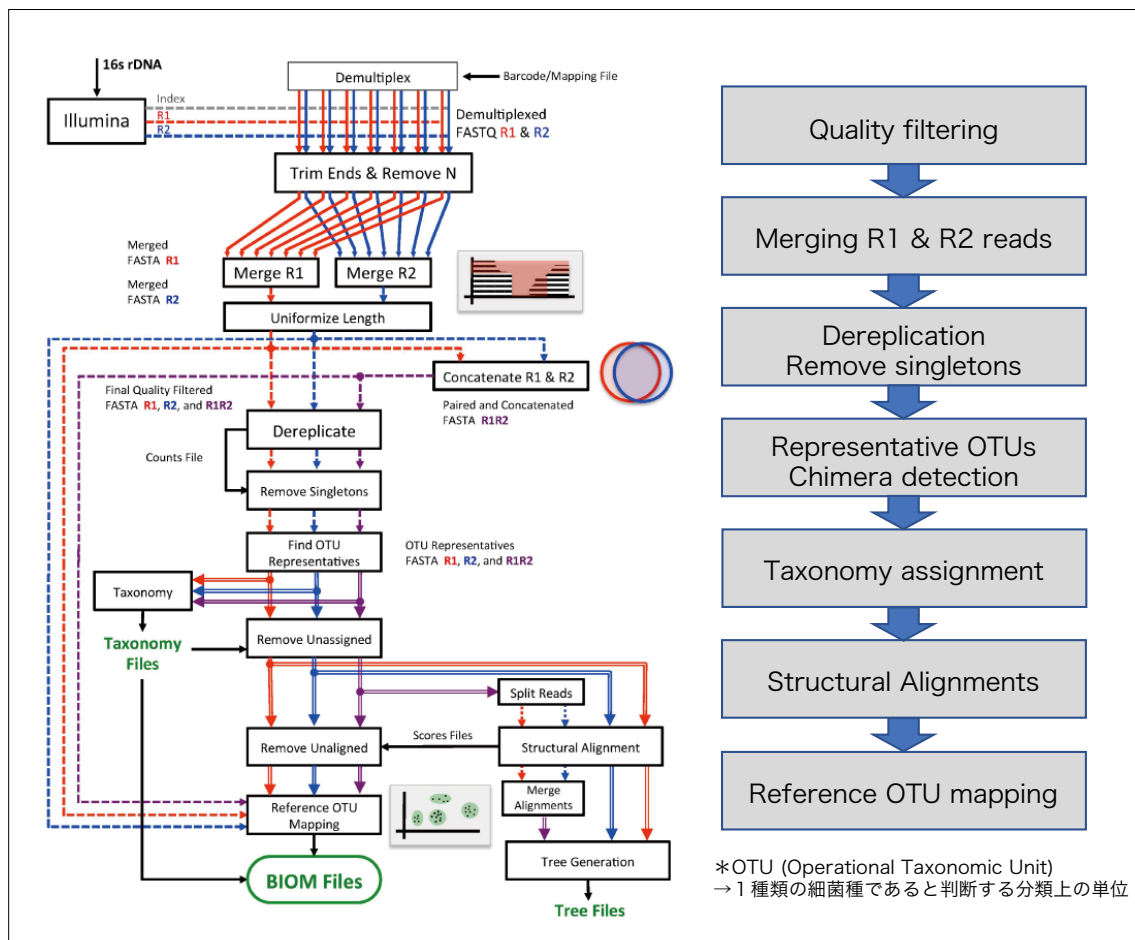


図1 16Sメタゲノム解析用のパイプライン(IM-TORNADO)を用いた細菌叢解析の流れ。

3. 事業実施成果

1) 各試料における細菌叢の全貌

各試料群におけるデータ解析の概要を表1に、細菌叢(属レベル)の構成およびその比率を図2および図3に示した。また、各試料群に存在する細菌属(全体平均が1%以上)の分布および比率を表2に示した。

各試料の解析に用いたリード数は約3-7万リードで、いずれの試料においてもGood's coverage値が0.99以上であることなどから、本解析に十分なデータ量であると考えられる。また、細菌種数について、生体および環境由来試料が平均450-540種である一方、肉加工品群は平均90-260種と大きな違いがみられた。さらに、種の多様性を示すSimpson指数からも生体および環境由来試料において種の多様性が高いことが示され、肉加工品では多様性が低い結果となった。

JRA畜産振興事業
新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業報告書

表 1 細菌叢解析に供した各試料群のデータ概要。

試料の種類	試料数	リード数	細菌種数	Good's coverage	Chao1指数	Simpson指数
唾液	44	62845±8081	471±133	≧ 0.99	596±168	0.935±0.028
糞便	9	62051±8234	543±42	≧ 0.99	645±49	0.952±0.022
餌箱	9	71435±11193	522±188	≧ 0.99	648±208	0.931±0.05
水飲み場	10	73334±12520	450±135	≧ 0.99	601±167	0.956±0.018
挽肉	22	73319±17066	189±46	≧ 0.99	255±194	0.775±0.13
コマ肉	23	69257±11273	108±33	≧ 0.99	158±55	0.694±0.158
タン	7	43859±16051	262±32	≧ 0.99	359±61	0.911±0.017

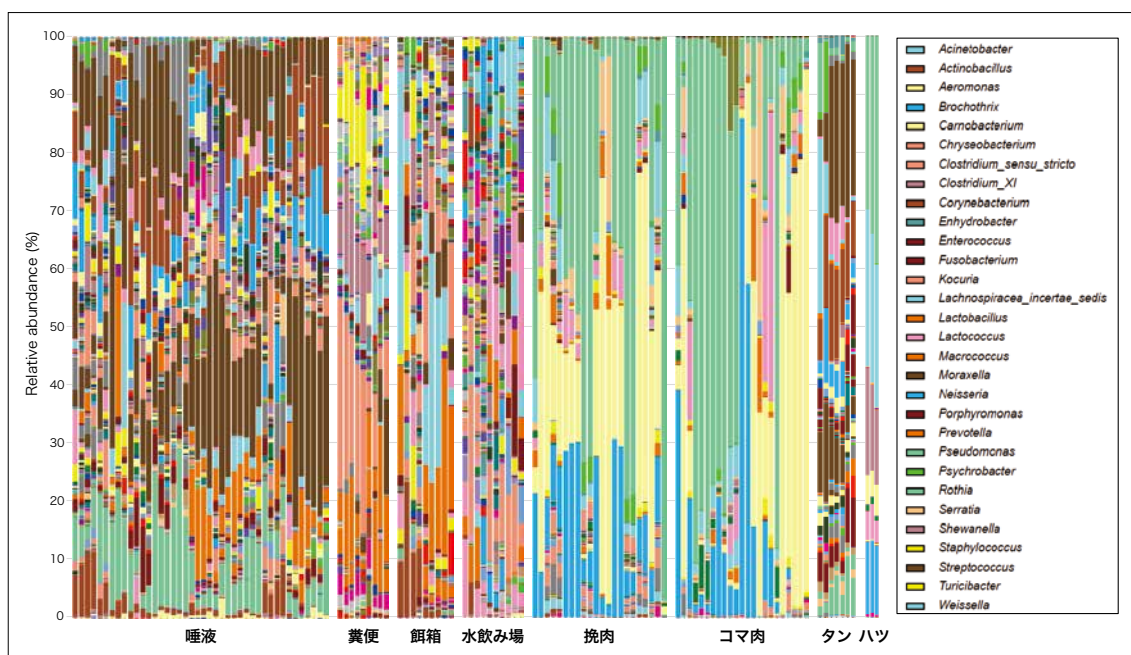


図 2 全試料における細菌叢構成。

JRA畜産振興事業
新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業報告書

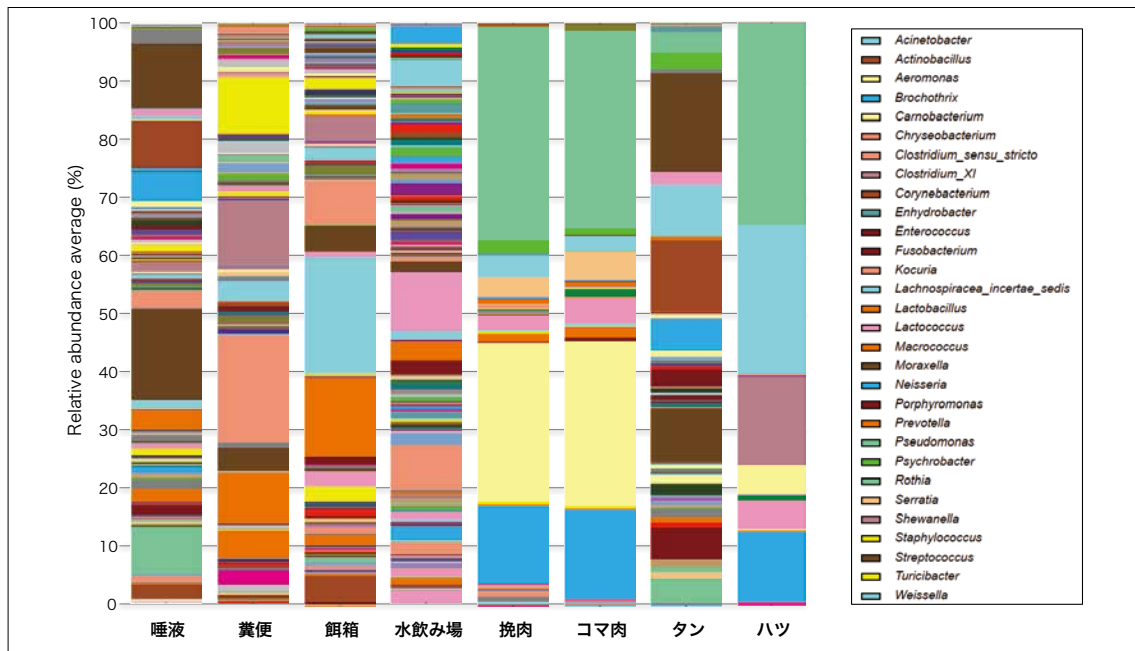


図 3 各試料群における細菌叢構成。

表 2 各試料群に存在する細菌属 (全体平均が 1% 以上) の分布と比率。

各試料群において、それぞれの細菌属の構成比率が全体平均以上の数値を示すものについて赤字で示した。

分類 (属)	生体試料		環境試料		肉加工品試料			
	唾液	糞便	餌箱	水飲み場	挽肉	コマ肉	タン	ハツ
<i>Pseudomonas</i>	0.0%	0.0%	0.1%	0.2%	36.8%	33.9%	3.5%	34.5%
<i>Carnobacterium</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	27.3%	28.3%	0.5%	0.3%
<i>Acinetobacter</i>	0.6%	0.0%	0.5%	4.6%	3.7%	2.6%	9.0%	25.7%
<i>Brochothrix</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	13.2%	15.3%	0.2%	12.2%
<i>Streptococcus</i>	15.8%	4.0%	4.4%	1.9%	0.1%	0.0%	9.3%	0.0%
<i>Lactobacillus</i>	3.4%	9.0%	13.6%	3.4%	1.3%	1.7%	0.1%	0.0%
<i>Clostridium_sensu_stricto</i>	3.1%	18.6%	7.4%	0.7%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%
<i>Moraxella</i>	11.2%	0.0%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	16.9%	0.0%
<i>Weissella</i>	1.5%	0.1%	20.1%	1.4%	0.2%	0.4%	0.0%	0.0%
<i>Lactococcus</i>	0.1%	0.0%	0.9%	10.1%	2.5%	4.3%	0.0%	4.8%
<i>Actinobacillus</i>	7.7%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	12.1%	0.0%
<i>Clostridium_XI</i>	1.6%	11.4%	4.3%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Shewanella</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.3%	15.3%
<i>Rothia</i>	8.3%	0.0%	0.9%	0.2%	0.0%	0.0%	4.2%	0.0%
<i>Turicibacter</i>	1.0%	9.8%	1.8%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Prevotella</i>	2.4%	4.9%	1.7%	0.4%	0.0%	0.0%	1.0%	0.0%
<i>Chryseobacterium</i>	0.6%	0.0%	1.0%	8.0%	0.5%	0.2%	0.3%	0.0%
<i>Neisseria</i>	5.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	5.3%	0.0%
<i>Corynebacterium</i>	2.5%	0.1%	4.7%	0.5%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
<i>Serratia</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.4%	4.8%	0.0%	0.1%
<i>Porphyromonas</i>	1.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	5.3%	0.0%
<i>Psychrobacter</i>	0.3%	0.0%	0.5%	0.1%	2.1%	1.3%	2.8%	0.1%

各試料群における細菌叢の特徴は以下の通りである。

- a) 唾液： *Streptococcus* 属、 *Moraxella* 属、 *Neisseria* 属など、主要な口腔内細菌属が優占する構成となっており、これまでに一部報告されている口腔内細菌叢 [2] と比較的同じような結果を示した。特に、 *Streptococcus* 属の構成比率は顕著に高く、後述する *Streptococcus* 属内の種レベル解析は本事業においても非常に重要であると考えられる。また、生育段階により各細菌属の構成比率に多少の違いが見られた。

- b) 糞便：唾液の細菌叢とは全く異なり、主に *Clostridium* 属、*Lactobacillus* 属等が優占して存在する細菌叢構成を示した。また、他の試料群とは異なり、糞便群内の試料間で非常に類似した細菌叢であった。
- c) 餌箱・水飲み場：唾液や糞便と同様、約400-500の細菌種から構成されているが、その組成および構成比率は生体試料（唾液・糞便）と異なる。また、*Lactobacillus* 属など、豚用飼料に含まれる細菌属も確認され、環境由来の細菌属種などを含む多様な細菌種によって構成されている。
- d) ひき肉・コマ肉・ハツ：他の試料群と比べ、構成する細菌種数（約90-200種）が少なく、また、一部の主要な優占属（*Pseudomonas* 属、*Turicibacter* 属、*Brochothrix* 属）によって構成された細菌叢を示した。本来、肉加工品は無菌であると考えられる。しかしながら、上記のような細菌属が確認されたことは、小売りまでの過程において、低温保存でも存在しうる細菌がコンタミネーションしたと推察される。
- e) タン： *Streptococcus* 属や *Moraxella* 属など、唾液と同様の優占属が存在し、また、非常に類似した細菌叢構成を示した。これは、口腔内の細菌種組成が食肉加工段階でもある程度維持されたためと考えられる。

各試料群の細菌叢は、それぞれを特徴付ける多様な細菌属によって構成されていることが明らかとなった。これまで、豚に関連する細菌叢解析については、学術的知見が乏しく、ほとんどなされていないのが現状であった。そのため、本解析で得られた結果は、豚のみならず、養豚場の環境、肉加工品まで含めた食肉加工過程における一連の細菌叢やその変化を評価するうえで、非常に重要な知見となり得る。

2) 各試料間の関連性の検証

上記の各試料群における細菌叢解析の結果に加え、本事業では、養豚場から肉加工品まで各段階の細菌叢を網羅的に評価し、新たな汚染実態を明らかにする必要がある。そのため、各試料群に類似性があるのか否かを検証するため、主成分分析および階層クラスター分析を行い、各試料間の関連性を検討した(図4)。

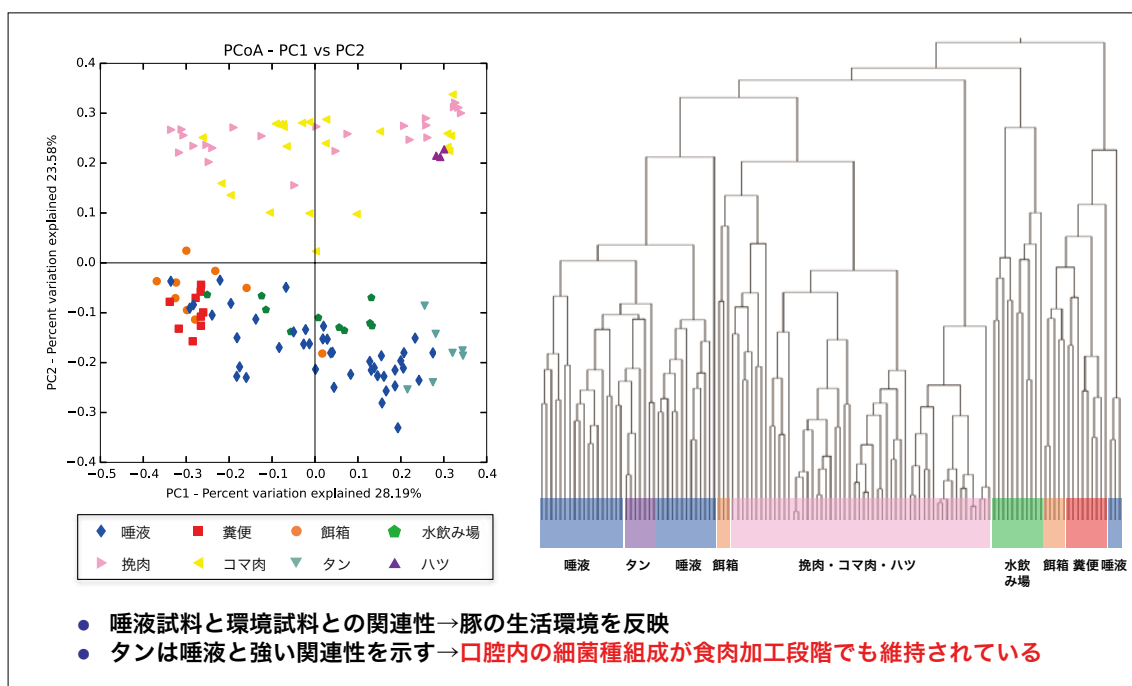


図4 全試料(群)における関連性の検証。

左図はweighted UniFrac解析で求めた距離行列に基づく主座標分析の結果、右図は階層クラスター分析の結果を示す。また、それぞれの試料群は、色分けされて図示している。

唾液試料は比較的ひとつのまとまり(クラスター)に集約されているが、試料によっては唾液や餌箱、水飲み場との関連性も確認された。これは、豚の唾液の一部が水飲み場・餌箱に付着したため、養豚場での生活環境を反映させた結果であると推察される。また、タンは唾液のクラスターの一部に集約されており、上記で言及した通り、両者の細菌叢構成は非常によく似ており、互いの関連性を示す結果となった。

タンを除く肉加工品(ひき肉・コマ肉・ハツ)は、生体・環境試料とは明らかに異なるクラスターを形成しているが、肉の種類による(クラスター内での)明確な違いは見られなかった。

3) 唾液細菌叢に存在する *Streptococcus* 属の種レベル解析

本事業では、豚肉の汚染状況を明らかにする新たな指標細菌の候補として *Streptococcus suis* (以降、*S.suis*) を掲げており、今回の調査においても小売り試料から *S.suis* の検出が確認された。本解析においても、唾液の細菌叢構成のうち、最も優占する細菌属が *Streptococcus*

属であったことから、本属内においてより詳細な種レベルでの解析を行う必要があると考えられる。しかしながら、従来の細菌叢解析では属レベルまでが限界であり、種レベルの解析は別途個別の解析を必要とする。そのため、まず、様々なデータベースから *Streptococcus* 属の 16S rRNA 配列を収集し、本解析に用いた可変領域 (V3-V4 領域) のみを抽出した。次に、抽出された計 5,227 の配列から重複配列を除き、計 909 の代表配列を得た。これら代表配列に記載されているアノテーション情報を基に代表配列をグルーピング化し、*Streptococcus* 属の種分類のためのデータベースとして構築した。

本解析において構築したデータベースを基に、唾液細菌叢に存在する *Streptococcus* 属を種分類した結果、計 23 種の分布が確認された (図 5)。生育段階により各種比率に違いはあるものの、*S.suis* および *S.porcorum* の 2 種の比率が他種と比べて高く、特に *S.suis* は母豚および哺乳子豚の優占種であった。また、離乳子豚および成豚についても *S.suis* は *S.porcorum* について高い比率を示し、豚の唾液細菌叢において、*S.suis* が主要な細菌種であること、さらに、本事業において汚染状況を明らかにするための指標菌として検討していく上で、非常に重要な細菌種であるといえる。

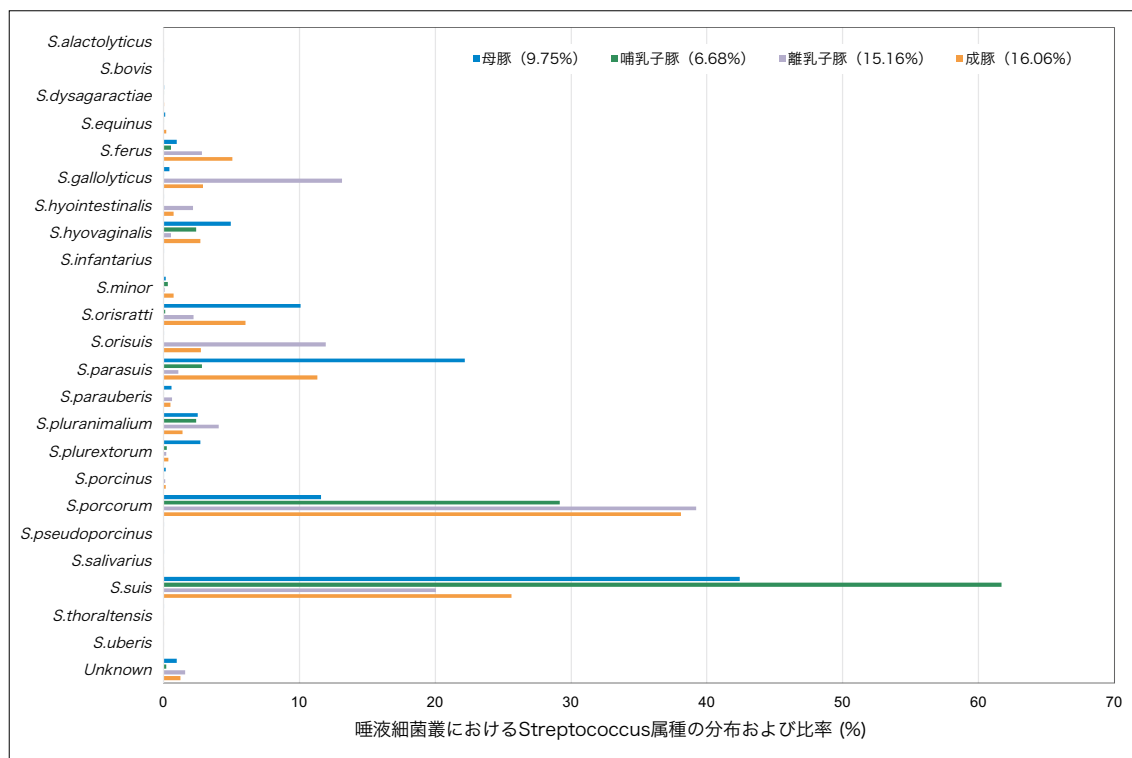


図 5 唾液細菌叢における *Streptococcus* 属内の種分布および存在比率。各生育段階 (母豚、哺乳子豚、離乳子豚、成豚) で色分けし、各種比率を算出した。ただし、データベースにおいて種分類できなかったものについては不明 (Unknown) とする。括弧内は唾液細菌叢における *Streptococcus* 属全体の構成比率を示す。

4) 肉加工品における関連性の検証

これまでの解析から、各試料群の細菌叢の全体像および関連性(図3, 図4)を示してきたが、本事業では、それらを総合的に評価し、豚肉の新たな汚染実態を明らかにすることを目的としている。そこで、肉加工品についてさらに詳細な知見を得るため、肉加工品内での各試料の関連性を再度検討した。

4種の肉加工品内のうち、タンおよびハツはそれぞれひとつの明確なクラスターを形成しており、特にタンにおいては、上記で言及した通り、唾液の細菌種組成の影響が強く、他の肉加工品とは明らかな違いを見せた(図6)。一方、挽肉とコマ肉については、明確なクラスターによる区別はなく、両者の細菌叢は比較的類似した関係性であると考えられる。また、興味深いことに、肉加工品の細菌叢は購入店舗および購入時期に強く関連していることが、本解析で初めて明らかとなった。

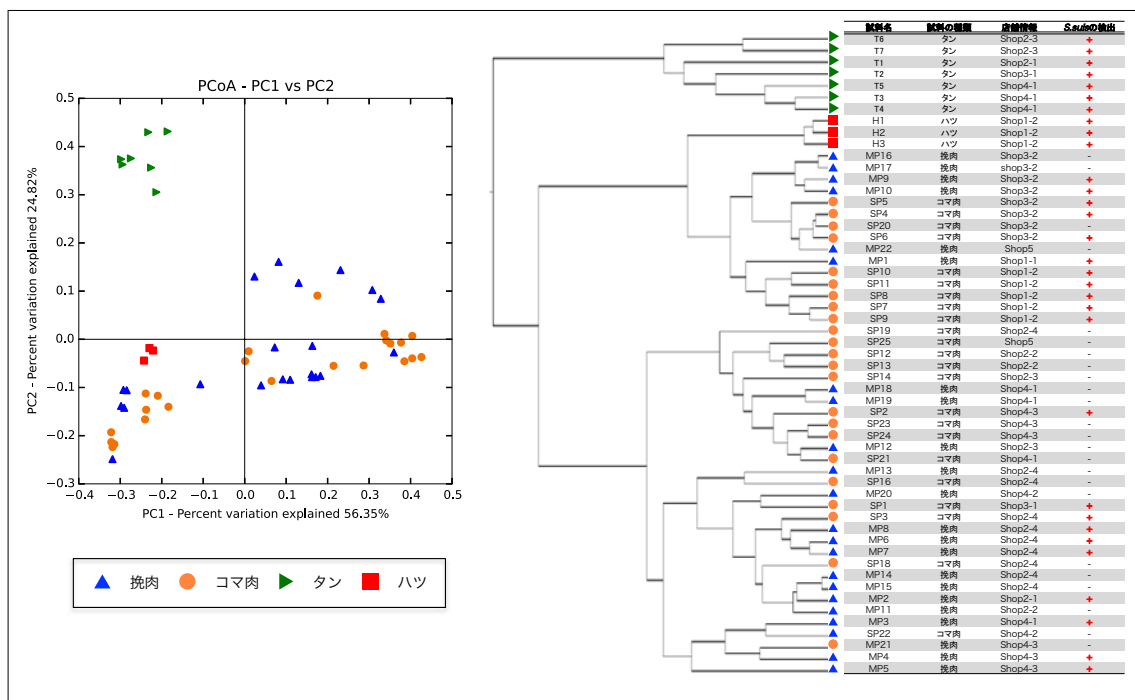


図6 肉加工品における関連性の検証。

左図はweighted UniFrac解析で求めた距離行列に基づく主座標分析の結果、右図は階層クラスター分析および対応する試料情報(試料名、肉加工品の種類、購入店舗情報、*S. suis*の検出結果)を示す。また、それぞれの試料群は、色分けして図示している。

5) 交差汚染の検証と *S.suis* の汚染指標菌としての可能性

本来、肉加工品（タンを除く）は無菌な状態であると考えられる。しかしながら、本解析の結果、ひき肉、コマ肉、ハツのいずれの肉加工品においても複数の細菌属によって構成される細菌叢が存在することが明らかとなった（図3）。さらに、本解析に用いた肉加工品のうち、約半数が *S.suis* 陽性の試料であった。前述の通り、*Streptococcus* 属は豚の唾液細菌叢において最も多い存在量を示す優占属（15.8%）であり、また、*S.suis* は本属における優占種である（図5）。これらのことから、まず *S.suis* 陽性・陰性の肉加工品群に分けてそれぞれの細菌叢を比較した。

S.suis 陽性・陰性の肉加工品群の比較について、両者の細菌叢構成に大きな違いは確認されず、いずれも *Pseudomonas* 属、*Carnobacterium* 属、*Bronchothrix* 属が優占属であった（図7）。ただし、*Pseudomonas* 属および *Carnobacterium* 属の存在比率には大きな差異があり、*S.suis* 陽性群では *Pseudomonas* 属が高く、*S.suis* 陰性群では *Carnobacterium* 属が高い結果となった。しかしながら、上記の両細菌属とも低温条件下での生存・増殖が可能であることが知られており [3]、食肉加工過程もしくは小売店のバックヤードにおいてコンタミネーションした結果であると推察され、*S.suis* の陽性・陰性に直接関連するとは考えにくい。

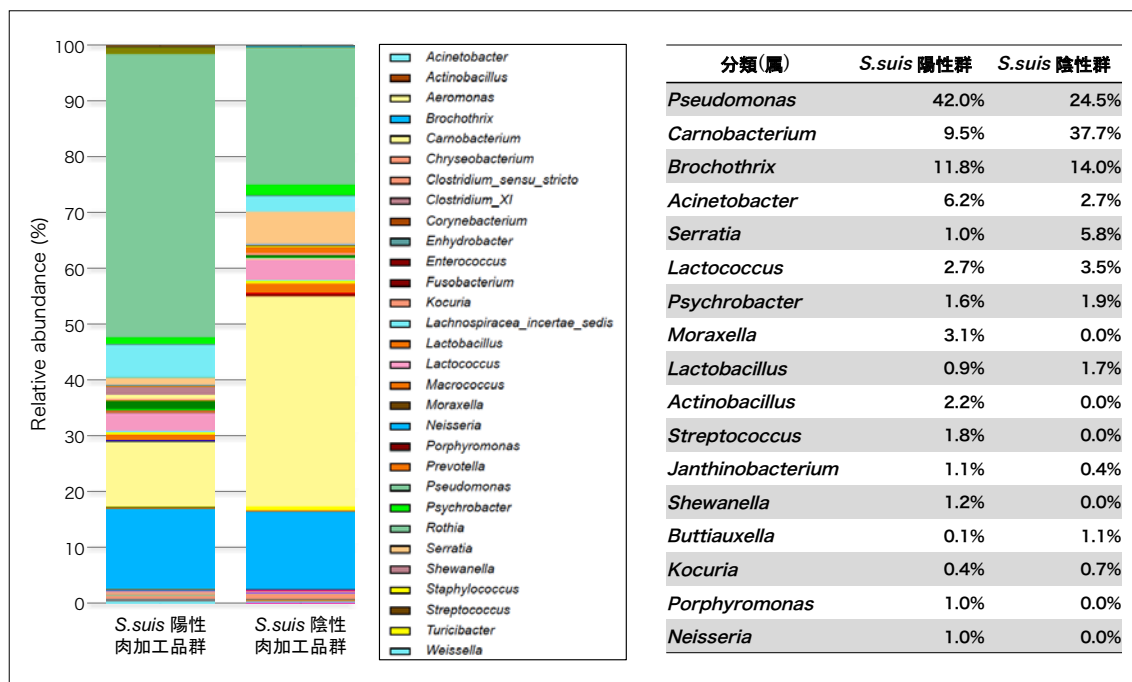


図7 *S.suis* 陽性・陰性の肉加工品別における細菌叢の構成と比率。

次に、*S.suis* 陽性・陰性群について、有意差検定を用いて両群に有意に異なる細菌種を同定し、それらが唾液もしくは糞便のどちらに起因する汚染であるのか否かを検証した。

表 3 *S.suis* 陽性群に有意に存在する細菌種

S.suis 陽性および陰性群について有意差検定 (t検定) を行い、有意水準は5% ($p<0.05$) とした。唾液もしくは糞便の細菌叢に共通して存在する場合は “+”、そうでない場合は “-” で示した。

属	種	唾液	糞便
<i>Acinetobacter</i>	<i>kyonggiensis</i>	+	-
	<i>lwoffii</i>	+	-
	<i>radioresistens</i>	+	+
<i>Aeromonas</i>	<i>caviae</i>	+	-
	<i>lacus</i>	-	-
	<i>salmonicida</i>	+	-
<i>Brochothrix</i>	<i>campestris</i>	-	-
<i>Flavobacterium</i>	<i>granuli</i>	+	-
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenza</i>	-	-
<i>Iodobacter</i>	<i>limmosediminis</i>	-	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>fragi</i>	-	-
<i>Shewanella</i>	<i>baltica</i>	-	-
	<i>putrefaciens</i>	+	-
	<i>xiamenensis</i>	-	-

検定の結果、*S.suis* 陽性群において有意に異なる細菌種は14菌種であった(表3)。さらに、これら14菌種が唾液もしくは糞便に共通して存在するか否かを精査した結果、半数の7菌種が唾液の細菌叢にも存在することが明らかとなった(うち1菌種は糞便にも共通して存在する)。これらの結果から、豚の唾液が肉加工品への交差汚染源となりうること、また、*S.suis* が肉加工品の汚染状況を明らかにするためのひとつの指標細菌になりうる可能性を示す結果となった。

4. 考察・まとめ

本解析では、豚肉の新たな汚染実態を明らかにするため、養豚場から小売りまでの各段階における試料について、次世代シーケンサーを用いた16S rRNA 遺伝子配列に基づく細菌叢解析を実施した。

養豚場に関連する試料の細菌叢は、それぞれを特徴付ける多様な細菌属によって構成されており、唾液の細菌叢においてはこれまでに一部報告されている口腔内細菌叢 [2] と同じような結果を示したが、生育段階により各細菌属の構成比率に多少の違いが見られた。特に、唾液細菌叢では *Streptococcus* 属の構成比率が顕著に高く、また、本属内の種レベルの解析では、分類できた計23種のうち *S.suis* が最も高い存在比率であったことから、唾液による交差汚染を検討していくうえで非常に重要な細菌種であると示唆された。糞便においては、唾液と全く異なる細菌叢構成を示し、さらに、他の試料群と比べ、糞便試料間で非常に強い関連性を示した。養豚場の環境として解析試料とした餌箱および水飲み場については、唾液や糞便などの生体由来の試料と異なる多様な細菌叢構成を示す一方、餌箱は *Lactobacillus* 属などが優占属として存在しており、これは豚用飼料に含まれる細菌に影響された結果であると考えられる。一部の試料では唾液と環境由来試料との関連性も確認され、養豚場での生活環境を反映させた結果であると推察される。近年、豚の口腔内(扁桃腺)や腸内の細菌叢に関する研究 [2, 4, 5] が活発に行われているが、学術的知見が少なく、また、それらは部分的な解析のみに留まっている。今回の解析は、豚の生体試料に加え、環境由来の試料も含む養豚場全体の細菌叢を評価・検証した解析結果であり、学術的意義のみならず、同様の調査を行う際のひとつの解析モデルとなると期待される。

一方、肉加工品群は養豚場からの試料とは全く異なる細菌叢を示し、*Pseudomonas* 属や *Carnobacterium* 属など一部の細菌属が大部分の構成を占める結果となった。これらの細菌属は低温条件下での生存・増殖が可能であることが知られている [3]。また、肉加工品の細菌叢は購入店舗および購入時期に強く関連していることから、小売店のバックヤードにおいてコンタミネーションし、それらが保持された結果であると推察される。ただし、タンについては、唾液と類似した細菌叢構成を示し、両者には関連性があるという結果も示された。これは、口腔内の細菌種組成が食肉加工段階においてもある程度維持されたためと考えられる。今後、食肉として流通するタンについても、食の安全性確保に向けた取り組みのなかで考慮される必要があると考えられる。

本来、無菌であると考えられる肉加工品において、複数の細菌属によって構成される細菌叢が存在することが明らかとなり、さらに、本解析に用いた肉加工品のうち、約半数が *S.suis* 陽性の試料であった。また、*Streptococcus* 属が豚の唾液細菌叢において最も多い存在量を示す優占属であり、*S.suis* は本属における優占種であったことから、肉加工品への唾液からの汚染が考えられた。そこで、*S.suis* 陽性・陰性群の肉加工品において有意に異なる細菌種を同定し、それらが唾液もしくは糞便のどちらに起因する汚染であるのか否かを検証した。その結果、

計14菌種が*S.suis*陽性群において有意に存在する細菌種であることが明らかとなり、さらに、その半数の7菌種が唾液の細菌叢にも存在することが明らかとなった。これらの結果から、豚の唾液が肉加工品への交差汚染源となりうることを示しており、また、*S.suis*が唾液による肉加工品への汚染実態を明らかにするためのひとつの指標細菌になりうる可能性を示唆するものであるといえる。これまでの食肉検査は、大腸菌をはじめ、主に糞便からの交差汚染を念頭に置いた実施体制であったが、さらなる食肉の安全性の確保に向けて、本解析の結果が示す唾液からの汚染も考慮し、今後、食肉製品に対する安全指針の見直し（フードチェーンにおける管理措置改善など）が望まれる。今回の解析では、養豚場および肉加工品の試料について、それらの細菌叢から汚染実態を明らかにしてきたが、今後、より段階的かつ詳細な知見を得るため、と畜過程および小売店のバックヤードにおける試料についても同様の解析を実施していく必要があると考えられる。

5. 引用文献

1. Jeraldo P, Kalari K, Chen X, Bhavsar J, Mangalam A, White B, Nelson H, Kocher JP, and Chia N. IM-TORNADO: a tool for comparison of 16S reads from paired-end libraries. PLoS One, 2014. 9 (12) : e114804.
2. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, and Mulks MH. Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. BMC Microbiol, 2012. 12: 20.
3. Liang R, Yu X, Wang R, Luo X, Mao Y, Zhu L, and Zhang Y. Bacterial diversity and spoilage-related microbiota associated with freshly prepared chicken products under aerobic conditions at 4 degrees C. J Food Prot, 2012. 75 (6) : 1057-62.
4. Xiao L, Estelle J, Kiilerich P, Ramayo-Caldas Y, Xia Z, Feng Q, Liang S, Pedersen AO, Kjeldsen NJ, Liu C, Maguin E, Dore J, Pons N, Le Chatelier E, Prifti E, Li J, Jia H, Liu X, Xu X, Ehrlich SD, *et al.* A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. Nat Microbiol, 2016: 16161.
5. Ramayo-Caldas Y, Mach N, Lepage P, Levenez F, Denis C, Lemonnier G, Leplat JJ, Billon Y, Berri M, Dore J, Rogel-Gaillard C, and Estelle J. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. Isme j, 2016. 10 (12) : 2973-2977.

第3章 メタゲノム解析によるブタ唾液DNA試料内の 細菌種および機能構成の解明

¹ 京都大学大学院医学研究科

² 東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター

丸山史人¹、渡辺孝康²、関崎 勉²

1. はじめに

本章では、メタゲノム解析によるブタ唾液DNA試料内(異なる4農場から1試料ずつDNA抽出、Illumina社Nextera XTキットにてライブラリ調製し、同社のMiSeqにてDNA断片の両側から301塩基ずつ配列を取得した)の細菌種および機能構成の解明にあたり、1)使用するメタゲノム解析ツールの選定、2)コントロールとしての16S rRNA遺伝子配列に基づく細菌種組成解析、3)メタゲノム解析に基づく種と機能組成、を以下に述べる。これらの4試料(jp1, jp2, jp3, jp4)のうちjp4については、ブタにストレプトマイシンおよびベンジルペニシリンが投与されている。

2. 事業実施方法とその成果・考察

1) 使用するメタゲノム解析ツールの選定

メタゲノム解析は1998年にその単語が使われて以降、いわゆる次世代DNAシーケンサー(新型DNAシーケンサー)の発展がその使用を推進してきた。そのために、多くのデータベース、解析ツールが報告されており、現在も数多くの新しいツールが報告されている。本事業で対象としている日本の養豚の唾液という試料は、これまでにメタゲノム解析された報告がないこと、将来的な事業で試料数が多くなることも予見されることから、出来る限り著名でゴールドスタンダードとして使用される可能性があるもの、種だけではなく機能組成も得られるもの、そしてサイズが大きく手続きが煩雑なデータ登録が容易、であるものを使用することが望ましい。また、本事業では微生物の病原性に着目していることから、病原因子と抗生物質耐性遺伝子についてもその情報を得ることが必要である。

そこで、2016年に主要なメタゲノム解析ツールを比較したLindgreenら[1]の論文を元に、知名度が高く、種と機能の両方が同時に得られ、塩基配列の登録情報が得られるEBI Metagenomics[2]とMG-RAST[3]を使用することとした。両者のパイプラインに含まれる解析は、互いに類似しているが、データベースやその類似性探索ツールは異なっている。特筆すべき事項として、MG-RASTにおいては、初期解析として本事業の中心である豚ゲノムが登録されており、多くの豚遺伝子情報が含まれていても解析に影響が少ないと考えられる。

病原因子と抗生物質耐性遺伝子データはその重要性から、多くのメタゲノム解析において実施されている。しかし、EBI Metagenomics [2] と MG-RAST [3] の両方にそのデータベースが含まれていないことから別途解析する必要がある。解析実施時点で、入手可能な病原因子、抗生物質耐性遺伝子データベースはともに複数存在していたため、このデータベースの選定を実施した。データベースに含まれる遺伝子数と含まれている遺伝子の選定方法、更新状況、引用数を鑑みた。その結果、病原因子の探索は、Virulence Factor Database (VFDB) [4] を、抗生物質耐性遺伝子は、Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [5] を、使用することとした。また、相同性を検索する方法として、もっとも一般的な Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ではなく、類似しているが速度が最大20,000倍と高速な DIAMOND [6] を用いることとした。

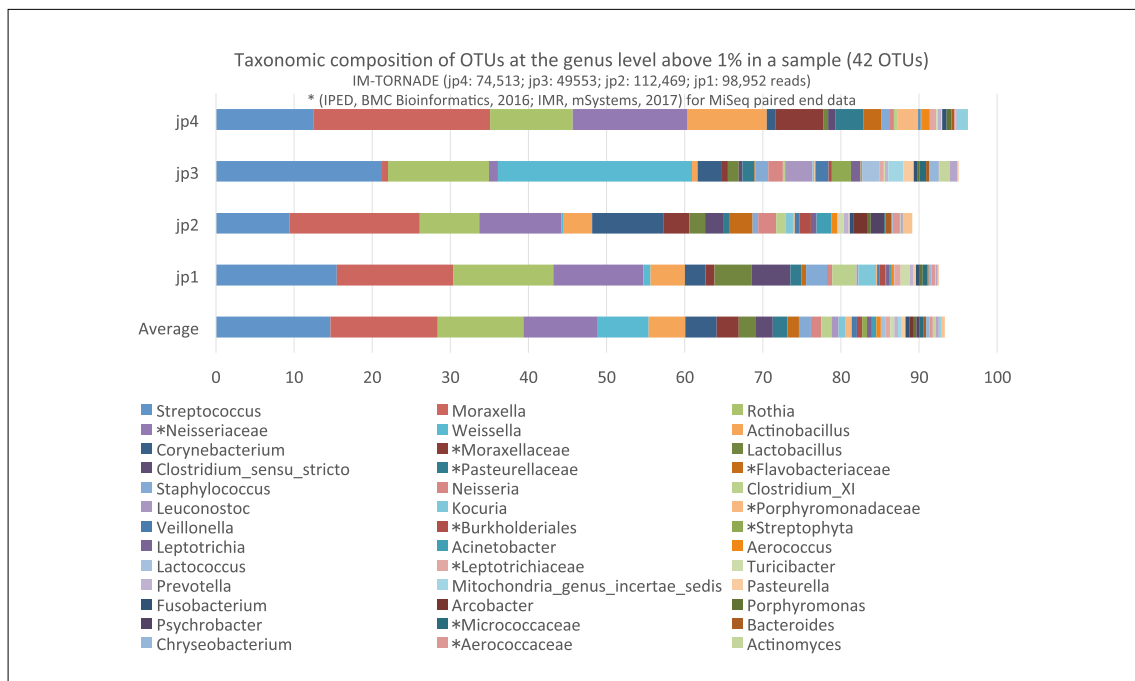


図1 16S rRNA配列に基づく細菌種組成(4試料のうち1試料でも1%以上の量存在していた42属を示している)。種組成の算出はイルミナ社のMiSeqにより得られた約500塩基のPCR産物の両端から301塩基の長さを取得した配列(重複領域あり)についてIM-TORNADEパイプライン[7]を利用した。このようなライブラリ両端の配列を利用して種組成を算出するパイプラインとしては、他にIPED[8]やIMR[9]がある。
*属のレベルで名称を決定できなかった場合には上位の名称を記した。

2) コントロールとしての16S rRNA遺伝子配列に基づく細菌種組成解析

詳細な方法論は、別の章の記載を参照されたい。メタゲノム解析と同じ試料のDNAについてIM-TORNADE[7]による16S rRNA遺伝子配列解析を実施した結果が、図1である。また、どれだけの種がどれだけ同定されたのかを表1にまとめた。解析には5-10万本の配列を用いた。

その結果、情報量が充実している16S rRNA遺伝子データベースを用いているにもかかわらず、数的に1%以上と優占していても属名が付かないOperational Taxonomic Unit (OTU) が

多数存在することがわかった。また、jp3という試料のみが他3試料と大きく異なることがわかった。抗生物質投与されているjp4の種組成はjp1、jp2と差は見られなかった。注意すべきは用いたPCRプライマー配列はdomain Bacteria用であるにも関わらず、得られたOTUの一部は、真核植物、古細菌由来であった。このことは、用いるPCRプライマーやPCR条件の検討の重要性を示している [10]。

表1 16S rRNA遺伝子配列に基づく細菌構成種のまとめ。同定された145属のうち、48属において属レベルでの名称が決定できていない(オレンジ色の四角内)。また、古細菌、葉緑体なども検出されている。各サンプルで1%以上存在したOTU (Operational Taxonomic Unit) を水色で示している。

Characteristics of OTUs.			Taxonomic composition over 1% in average of all the samples.					
Total OTUs	145	genus	Genus (or Family)	jp1	jp2	jp3	jp4	Average
No genus name	48	genus	Streptococcus	15.46	9.37	21.25	12.45	14.63
Remark	2	Chloroplast	Moraxella	14.87	16.70	0.77	22.64	13.75
Remark	2	Archaea	Rothia	12.81	7.62	12.89	10.56	10.97
Characteristics of OTUs over 1% in a sample.			Neisseriaceae	11.53	10.50	1.17	14.70	9.48
			Weissella	0.92	0.30	24.85	0.04	6.53
Total OTUs	42	genus	Actinobacillus	4.40	3.63	0.68	10.08	4.70
No genus name	10	genus	Corynebacterium	2.65	9.10	3.13	1.16	4.01
Remark	1	Chloroplast	Moraxellaceae	1.13	3.37	0.76	6.10	2.84
			Lactobacillus	4.80	2.01	1.37	0.58	2.19
			Clostridium_sensu_stricto	4.93	2.27	0.49	0.92	2.15
			Pasteurellaceae	1.44	0.76	1.52	3.62	1.84
			Flavobacteriaceae	0.58	3.05	0.12	2.30	1.51
			Staphylococcus	2.67	0.68	1.68	0.99	1.51
			Neisseria	0.67	2.31	1.87	0.61	1.37
			Clostridium_XI	3.11	1.24	0.25	0.48	1.27
			Other	18.01	27.09	27.21	12.76	21.27

3) メタゲノム解析に基づく種と機能組成

上述したように、メタゲノム解析においては、目的に応じて用いるツールとそれが使用するデータベース等に注意する必要がある。本事業においては、種と機能の取得のために、EBI-Metagenomics [2] とMG-RAST [3] を使用することとした。これらには機能分類に使用されるSubsystem [11]、IMG [12]、COG [13] や系統組成に使用されるGreengenes [14] など多くの異なるデータベースへ相同性検索した結果を一括で得ることが可能であり有用である。

表2に得られたメタゲノム配列データのまとめを示した。1試料につき、およそ500万本の配列、1G塩基をメタゲノム解析に使用した。これらの解析における相同性検索のしきい値は、e-value 5, identity 60%, amino acid length 15aaとした。

表2 4試料から得られたDNAのメタゲノム配列情報のまとめ。得られた総塩基数、配列本数、取得配列の重複部分を重ね合わせた場合の塩基数、配列数、データベース登録番号、そしてこの配列をRefSeqデータベース [15] に相同性が見られた配列数を示している。また、データベース相同性検索の探索条件も合わせて示した。

Summary of metagenomic reads (35-201 nt).

Sample	bp count (Gbp)	Sequence count (M)
jp1_f	1.03	4.67
jp1_r	1.07	4.67
jp2_f	1.22	5.52
jp2_r	1.28	5.52
jp3_f	1.26	5.68
jp3_r	1.34	5.68
jp4_f	1.02	5.20
jp4_r	1.09	5.20

Merged and filtered metagenomic reads.

Sampe	bp count (Gbp)	Sequence count (M)	Accession No#
jp1	1.63	6.63	ERR1697182
jp2	2.00	8.01	ERR1697183
jp3	2.12	8.47	ERR1697184
jp4	1.63	7.21	ERR1697185

Hits against RefSeq database

name	hits
1_S1_L001_R_join	2,340,844
2_S2_L001_R_join	4,970,706
3_S3_L001_R_join	3,310,437
4_S4_L001_R_join	1,624,961

e-value5

%-ident60

length15

min.abundance1

図2に、jp1のメタゲノム配列の品質チェック、病原因子、抗生物質耐性遺伝子など各種データベースへのヒット数の結果を示した。取得配列の最大半数程度がデータベースに割り当てられたが、データベースで大きく結果は異なることがわかった(表3)。このヒット数や特に含まれる真核生物情報(図3)の差異から機能組成はInterPro [16]、系統組成はTrEMBL [17]を用いることとした。

図3に示しているようにメタゲノム解析からは、主要な構成種に多くの真核生物が見られた。特にjp3で顕著であるが、これらの真核生物は植物、穀物であることから、これらの唾液メタゲノムデータにおいて餌の残存が大きく影響しているものと考えられた。すなわち、16S rRNA遺伝子による細菌叢がjp3のみ大きく異なる理由は餌の残存、餌を迅速に利用できる細菌属が増加しているという可能性も考慮する必要がある。

JRA畜産振興事業
新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業報告書

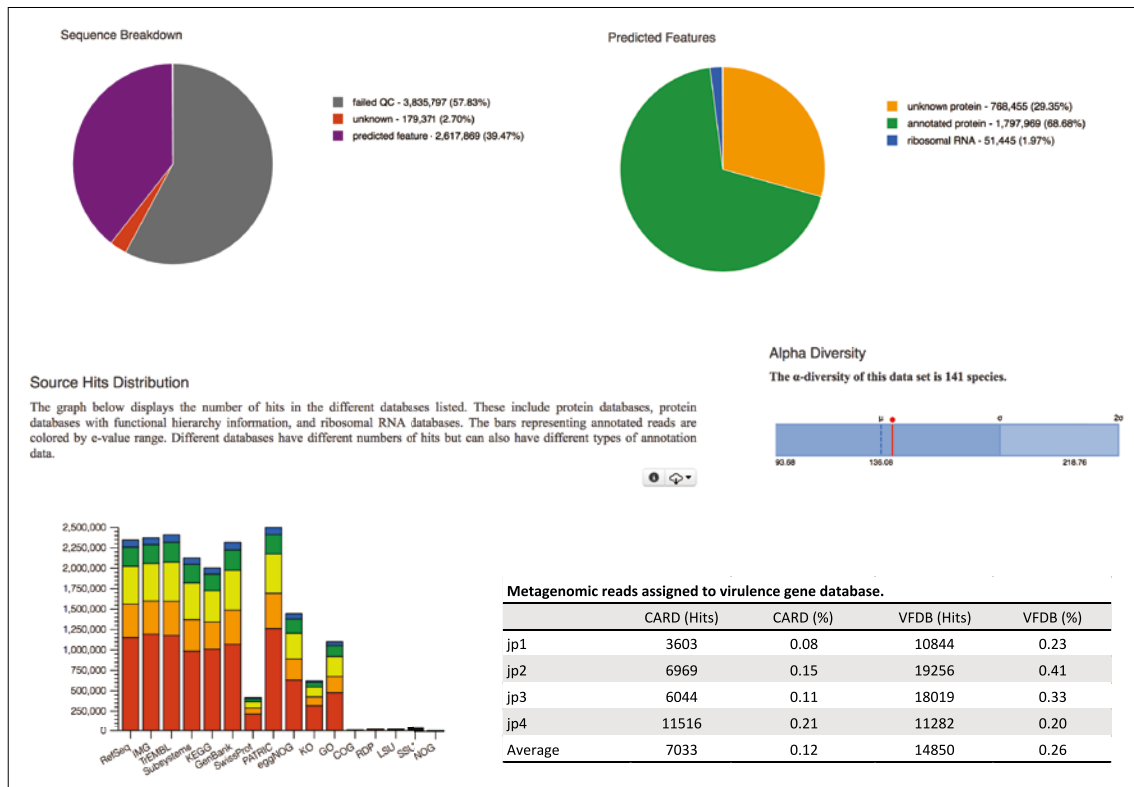


図2 メタゲノム配列のデータベース探索の結果。得られた配列の品質チェック、種々のデータベースに対して相同性を探索した結果を示している。

表3 メタゲノム配列の各種データベースに対する相同性検索結果。図2のヒット数の結果およびデータベースに含まれる真核生物種情報から水色でハイライトした結果を採用、以下の図表で議論している。

Assignments of metagenomic reads.							
Database	Assignment	All	Over 0.01%	Ratio (%)	Over 0.1%	Ratio (%)	Comment
EBI GO	function	2,719	921	34	157	6	Small number of reads was assigned
EBI GO slim	function	116	106	91	66	57	Small number of reads was assigned
EBI InterPro	function	14,319	3,383	24	269	2	Largest number of reads was assigned
EBI GreenGene phylum	taxon	25	21	84	8	32	Database includes only 16S
EBI GreenGene detail	taxon	669	402	60	97	14	Database includes only 16S
RAST_subsys_level1	function	28	28	100	27	96	RAST does not currently handle eukaryotes
RAST_subsys_level3	function	1,122	816	73	308	27	RAST does not currently handle eukaryotes
RAST_subsys_function	function	7,636	2,631	34	209	3	RAST does not currently handle eukaryotes
RAST_refseq_phylum	taxon	60	41	68	16	27	Compared to TrEMBLE, this includes less Eukaryota
RAST_refseq_genus	taxon	1,066	534	50	110	10	Compared to TrEMBLE, this includes less Eukaryota
RAST_refseq_species	taxon	2,518	1,080	43	184	7	Compared to TrEMBLE, this includes less Eukaryota
RAST_img_phylum	taxon	44	35	80	13	30	Compared to TrEMBLE, this includes much less Eukaryota
RAST_img_genus	taxon	738	477	65	100	14	Compared to TrEMBLE, this includes much less Eukaryota
RAST_img_species	taxon	1,932	969	50	175	9	Compared to TrEMBLE, this includes much less Eukaryota
RAST_cog	function	26	25	96	20	77	Small number of reads was assigned
RAST_tremble	taxon	1,808	507	28	101	6	Largest number of Eukaryota was included
VFDB	function	2,297	1,278	56	222	10	Virulence Factor Database
CARD	function	305	279	91	94	31	Comprehensive Antibiotic Resistance Database

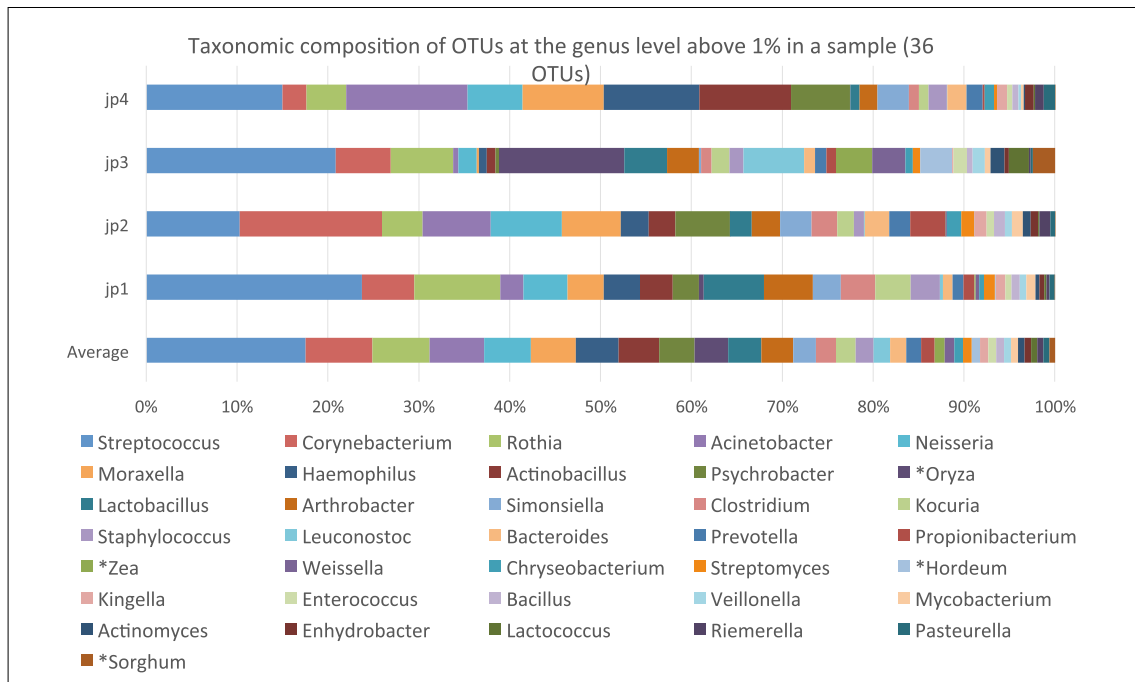


図3 メタゲノム配列のTrEMBLEデータベースによる種組成解析。4試料のうち1試料でも1%以上の量を示した36種を図示している。*真核生物。

図4では、16S rRNA 遺伝子による系統組成とメタゲノムによる系統組成を属レベルで比較している。その結果、一部において差異が見られるが、ほとんどのデータに差異は見られず、どちらを利用していても細菌種の解析において問題とならないことがわかった。

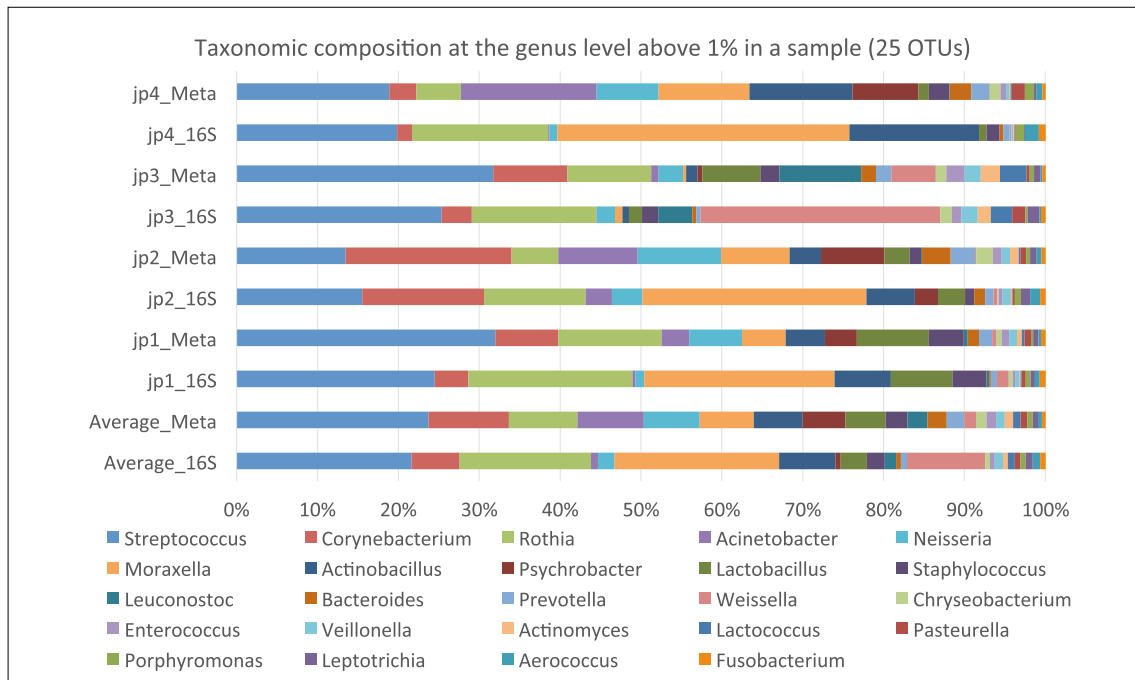


図4 16S rRNA 遺伝子増幅産物の結果とメタゲノム配列のTrEMBLEデータベースによる種組成解析。4試料のうち1試料でも1%以上の量を示した25種を図示している。細菌種のみかつ属レベルでの名が決定されているものだけを示している。

JRA 畜産振興事業
新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業報告書

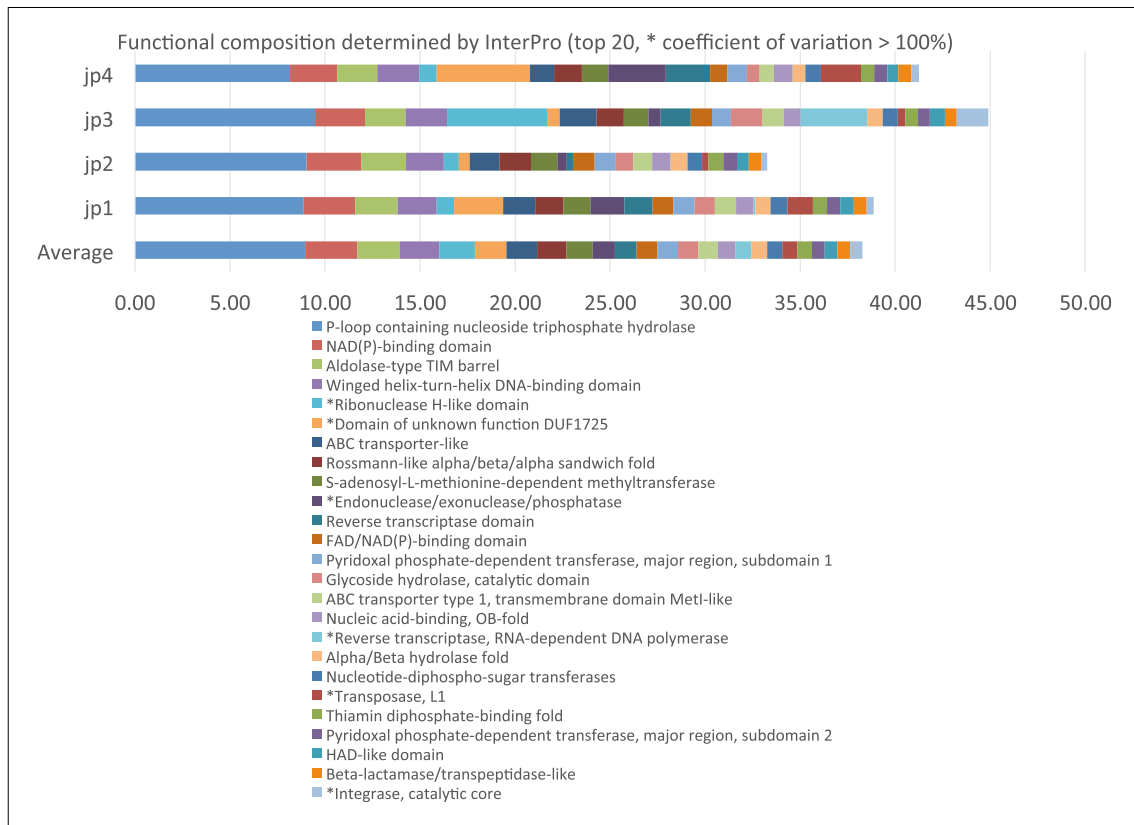


図5 メタゲノム配列の機能組成解析。InterProデータベース [16] により機能を決定した。4試料の平均が上位20位までのものの機能を示している。*変動係数が100%を超えている機能。

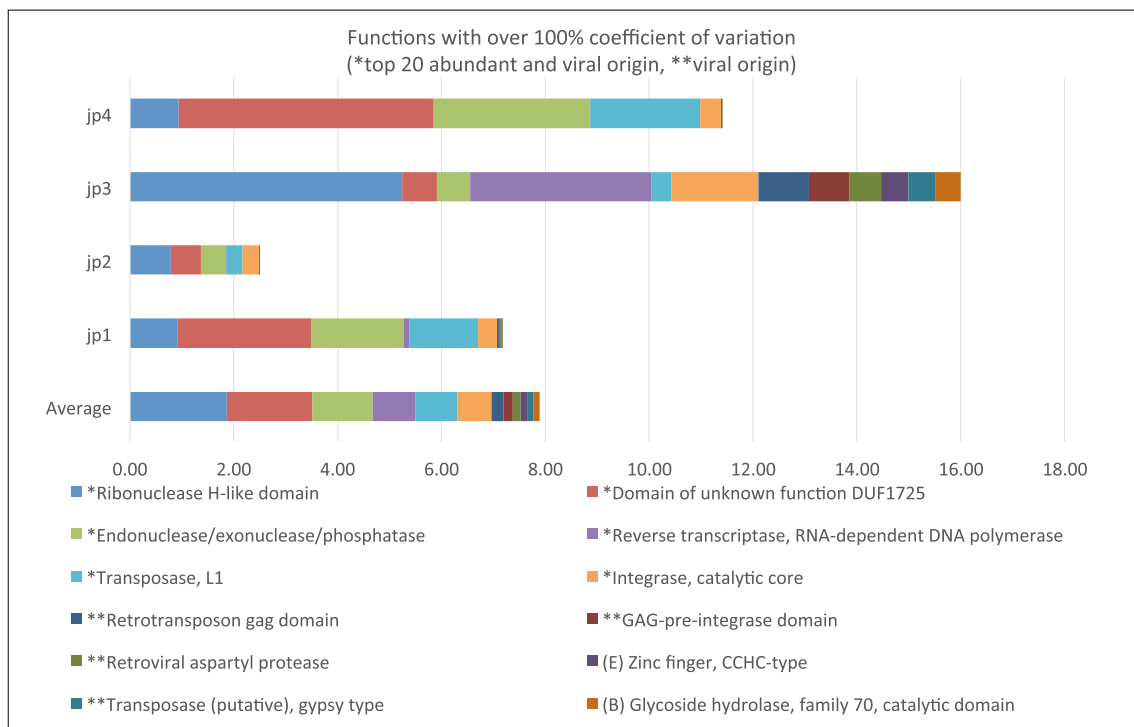


図6 変動係数が100%を超えたものの現存量。*図5に出現した量が多い機能かつウイルス由来であるもの。**ウイルス由来の機能。(E)：真核由来。(B)：細菌由来。

図5と図6においては、主要な機能組成と試料間で大きく現存量が異なる機能を調べた。図5の主要機能からは、必須遺伝子と思われる機能が数多くみられ、特筆すべき事項は認められなかった。しかし、図6にあるようにレトロウイルス(レトロエレメント)由来と考えられる機能において試料間の差異の多くを生じていた。これは、由来となる種の詳細解析が必要であるが、真核生物由来であると考えられることから餌の穀物ゲノムに含まれるレトロトランスポゾンの影響が最も強く考えられる。しかし、宿主の豚やバクテリオファージの可能性も考え、これらに割当てられた配列の詳細解析が今後必要となる。

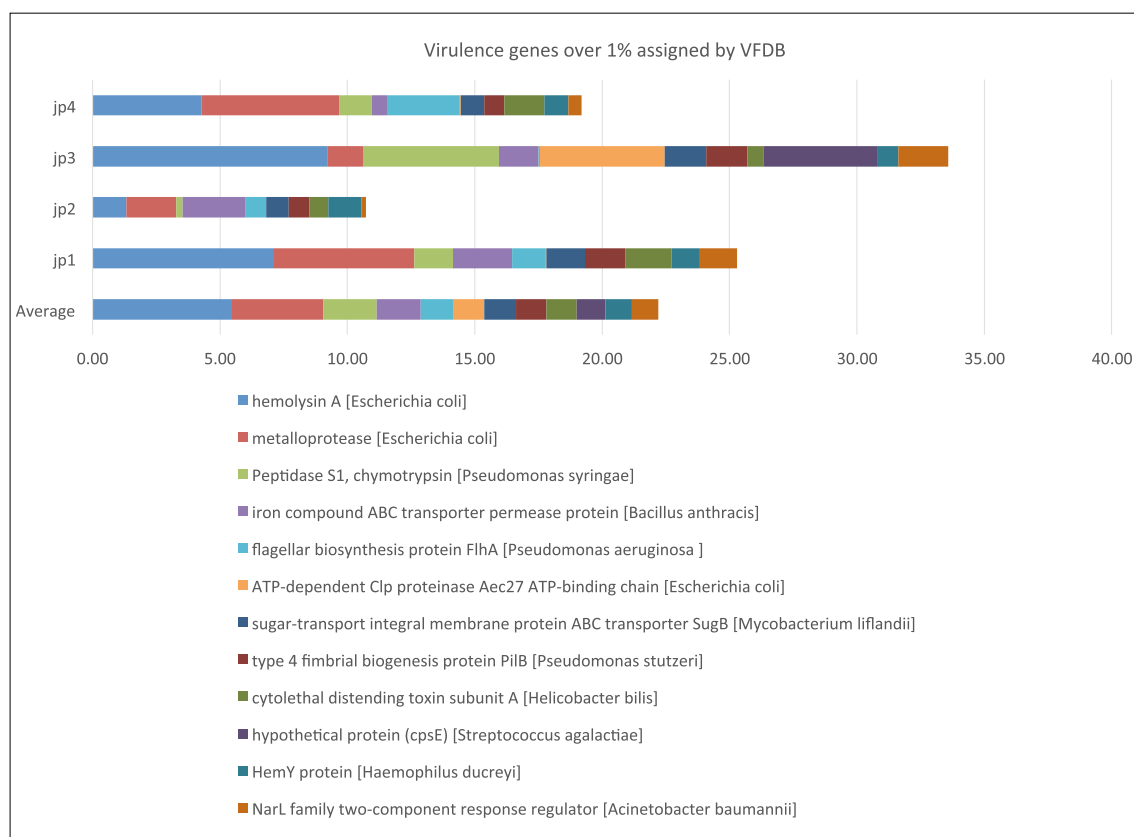


図7 メタゲノム配列に含まれる主要な病原因子組成。VFDBデータベース[4]により病原因子組成を決定した。

図7と図8では、病原因子データベースへの相同解析の結果を示している。主要な病原因子(図7)と変動係数が100%を超えた遺伝子(図8)をまとめている。jp3が主要な病原因子を多く保持しており、jp2では、構成はjp1、jp4と変わらないように見えるものの、割合は少ないことがわかった。図8から、変動係数にやはりjp3が大きく影響を与えていることがわかった。また、日本の豚の唾液における病原因子の網羅的な記述は本解析がはじめてであるが、病原因子組成はjp1、jp2、jp4においても割合はjp3よりはるかに少ないものの共通病原因子は少ないと考えられる。しかしながら、配列数が限定されていることから、試料数、配列数の両者を増やして本可能性については検証していくことが必要である。また、餌の残存の影響に注意した

試料の採取が重要であると考えられる。図8で特筆すべきは、莢膜 (capsule) と *Streptococcus* 属由来の病原因子が多く含まれていることである。*Streptococcus* は種構成において優占種であることから、試料に含まれる病原因子の増減が大きい遺伝子にこれらが同定されることは、*Streptococcus* 属の動態に注意することが重要である可能性を示している。

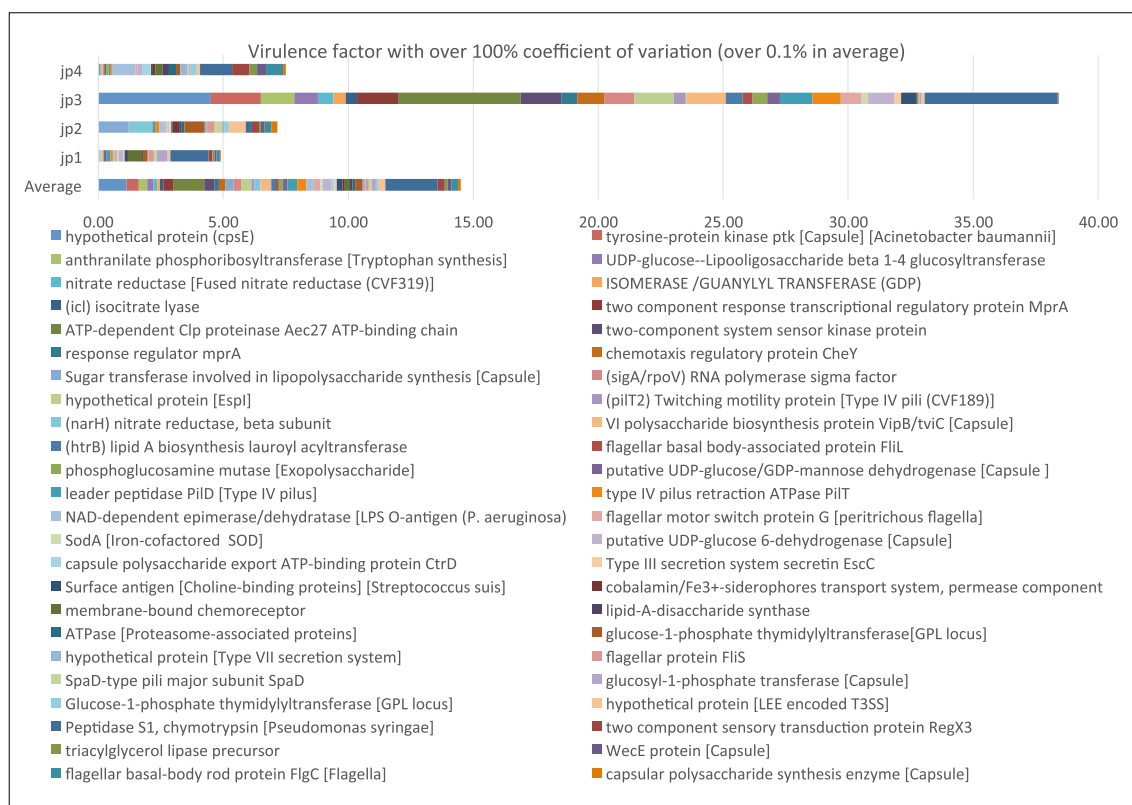


図8 メタゲノム配列に含まれる変動係数が大きな病原因子組成。VFDBデータベース [4] により病原因子組成を決定した。

JRA畜産振興事業
新たな指標細菌による畜産物汚染検出法開発事業報告書

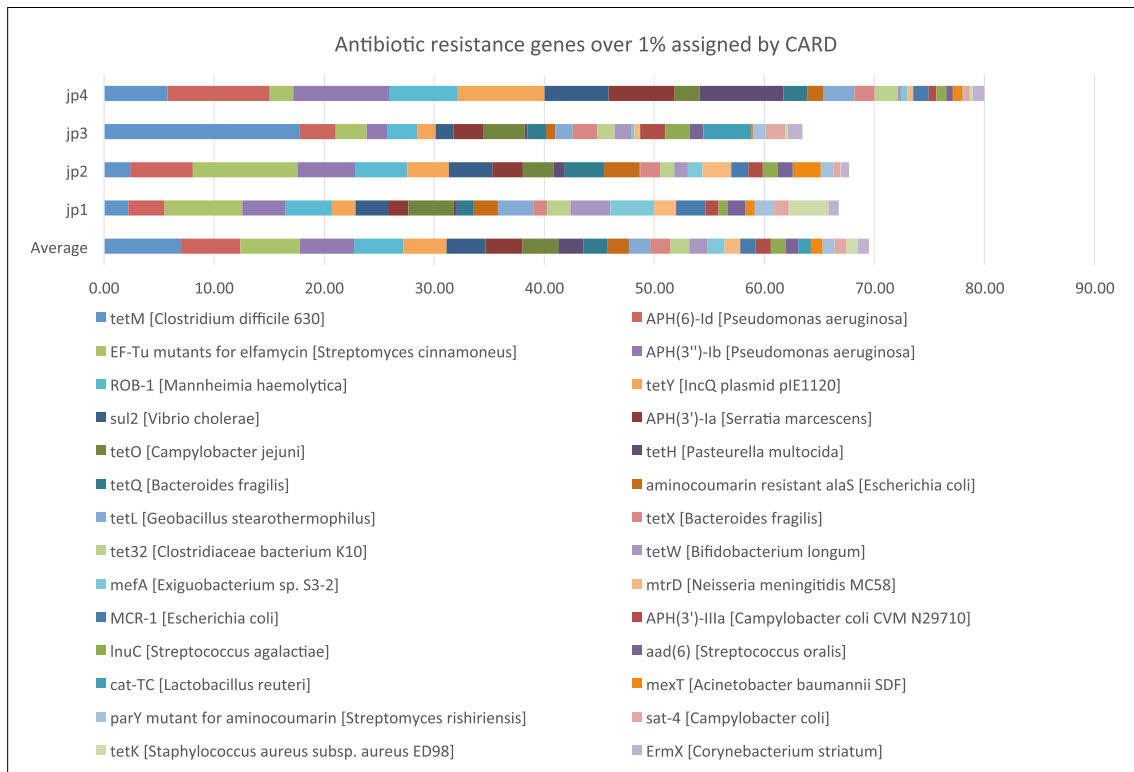


図9 メタゲノム配列に含まれる主要な抗生物質耐性遺伝子組成。CARDデータベース [5] により病原因子組成を決定した。

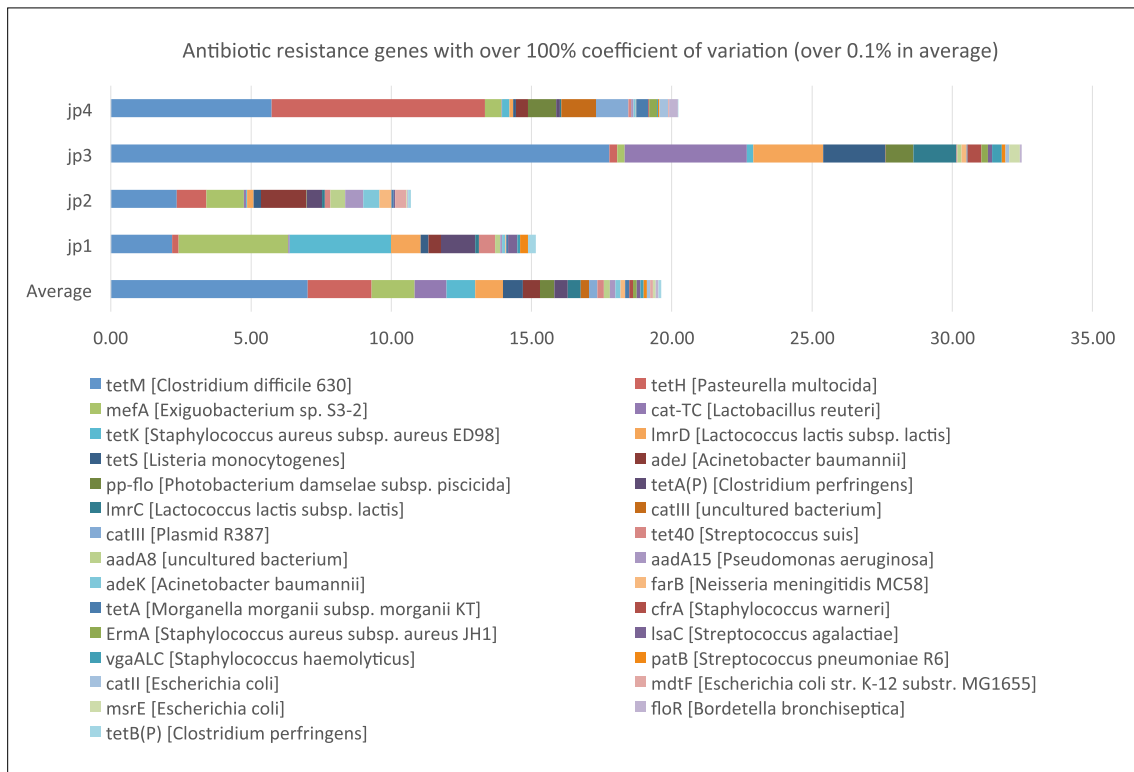


図10 メタゲノム配列に含まれる変動係数が大きな抗生物質耐性遺伝子組成。CARDデータベース [5] により病原因子組成を決定した。

図9と図10では、病原因子データベースへの相同解析の結果を示している。主要な抗生物質耐性遺伝子(図9)と変動係数が100%を超えた遺伝子(図10)をまとめている。jp4のみがstreptomycinとbenzylpenicillinを投与されていることが影響しているのか、主要な抗生物質耐性遺伝子の割合が最も多かった(表2)。

しかしながらこれらの抗生物質と関連が考えられる耐性遺伝子が見られないことから、この関連を精査する必要がある。変動係数が最も大きいものの多くにテトラサイクリン耐性遺伝子が多く含まれていた。抗生物質耐性遺伝子の種類も病原因子同様に変動が試料間で大きいことから、試料数、配列数の両者を増やして普遍性を検証していくことが必要である。また、変動係数の大きいものの由来細菌種に*Streptococcus*属が多いことは病原因子同様であるが、乳酸菌が多く含まれているのは興味深い。一部で乳酸菌が保有する抗生物質耐性遺伝子の問題が挙げられてきていることから、今後はこれらにも注意を払っていく必要がある。また、主要な病原因子は病原因子全体の20%程度しか占めないが、主要な抗生物質耐性遺伝子は70%となっていることから、病原因子はより多くのより少数の病原因子が多数存在し、試料間の差異が大きくなるものと考えられる。一方で抗生物質耐性遺伝子は変動するものの種類が限定されていることから、高精度なモニタリングには、定量的PCRの利用も検討すべきだと考えられる。

3. まとめ

メタゲノム解析においては、目的に応じて適切な解析方法の選定が必要である。本解析においては、これまで情報が全くない異なる日本の農場に由来する豚の唾液、合計4試料を対象とした。そのため、これらに含まれる包括的な種と機能の情報、そして、病原因子、抗生物質耐性遺伝子情報の取得が望まれた。そのため、まず使用するメタゲノム解析ツールを選定し、系統と機能予測が可能なEBI Metagenomics [2] とMG-RAST [3]、病原因子と抗生物質耐性についてはVFDB [4] そしてCARD [5] に対してDIAMOND [6] で相同性検索することとした。メタゲノム解析のコントロールとしての16S rRNA 遺伝子配列に基づく細菌種組成解析の結果から、豚の唾液の3割程度が属レベルで名称が決定できない、研究が進んでいない試料であることが判明した。また、jp3のみ他の試料と構成が異なっていたが、抗生物質投与されているjp4には、種の構成に大きな影響はみられなかった。メタゲノム解析に基づく種と機能組成の解明に取り組んだ結果、取得配列の最大半数程度がデータベースに割当られたが、データベースで大きく結果は異なることがわかった。また、唾液は真核生物由来のDNAが多く含まれることが予想されたことからメタゲノム解析において真核生物の情報も含まれるデータベースの選定が重要であると考えられた。その結果、機能組成予測はInterPro [16]、系統組成はTrEMBL [17] が適していた。メタゲノムを用いた系統組成には、餌の影響が大きいと予測されたが、これを排除して16S rRNA 遺伝子情報と比較したところ、メタゲノム種組成と類似しており、対象が細菌叢であるならば、16S rRNA 遺伝子のみの解析で問題ないことがわかった。メタゲノム機能遺伝子解析から、真核生物のレトロウイルス由来の機能が試料間の差異に大き

な影響を与えることがわかった。また病原因子と抗生物質耐性遺伝子の解析から、菌叢の構成が異なると病原因子の構成も大きく異なり、抗生物質耐性遺伝子プロファイルも菌叢により異なるが、テトラサイクリン耐性遺伝子が多いことが判明した。

これらの成果として、投与されている抗生物質は、種組成に影響があまりないと考えられるが、餌は種組成に大きく影響を与えると考えられる。また、種組成が異なると機能組成にも影響を与え、存在する主要病原因子の量を増加との関わりが考えられた。このことから、レトロウイルス(レトロエレメントのような可動性因子)の存在との関係の解明が今後の展開として重要だと考えられた。また抗生物質の投与は主要な抗生物質耐性遺伝子種を増加させる可能性がある。メタゲノム解析は、16S rRNA 遺伝子による種組成との整合性がありながら、データベースや解析の種類の選定に配慮が必要だが、16S rRNA 遺伝子のみからでは、見いだせない多くの知見が得られたことから、今後は十分な数の試料について同解析を進めることにより、統計検定して知見の正しさを検証していくことが重要だと考えられる。

4. 引用文献

1. Lindgreen S, Adair KL, and Gardner PP. An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Sci Rep*, 2016. 6: 19233.
2. Mitchell A, Bucchini F, Cochrane G, Denise H, ten Hoopen P, Fraser M, Pesseat S, Potter S, Scheremetjew M, Sterk P, and Finn RD. EBI metagenomics in 2016—an expanding and evolving resource for the analysis and archiving of metagenomic data. *Nucleic Acids Res*, 2016. 44 (D1): D595-603.
3. Keegan KP, Glass EM, and Meyer F. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. *Methods Mol Biol*, 2016. 1399: 207-33.
4. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, and Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res*, 2016. 44 (D1): D694-7.
5. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, *et al.* CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*, 2017. 45 (D1): D566-D573.
6. Buchfink B, Xie C, and Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods*, 2015. 12 (1): 59-60.
7. Jeraldo P, Kalari K, Chen X, Bhavsar J, Mangalam A, White B, Nelson H, Kocher J-P, and Chia N. IM-TORNADO: A Tool for Comparison of 16S Reads from Paired-End Libraries. *PLOS ONE*, 2014. 9 (12): e114804.
8. Mysara M, Leys N, Raes J, and Monsieus P. IPED: a highly efficient denoising tool

- for Illumina MiSeq Paired-end 16S rRNA gene amplicon sequencing data. BMC Bioinformatics, 2016. 17 (1) : 192.
9. Comeau AM, Douglas GM, and Langille MG. Microbiome Helper: a Custom and Streamlined Workflow for Microbiome Research. mSystems, 2017. 2 (1) .
 10. Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, and Kurokawa K. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. DNA Res, 2014. 21 (2) : 217-27.
 11. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, and Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res, 2014. 42 (Database issue) : D206-14.
 12. Chen IA, Markowitz VM, Chu K, Palaniappan K, Szeto E, Pillay M, Ratner A, Huang J, Andersen E, Huntemann M, Varghese N, Hadjithomas M, Tennessen K, Nielsen T, Ivanova NN, and Kyrpides NC. IMG/M: integrated genome and metagenome comparative data analysis system. Nucleic Acids Res, 2017. 45 (D1) : D507-D516.
 13. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, and Koonin EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. Nucleic Acids Res, 2015. 43 (Database issue) : D261-9.
 14. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, and Hugenholtz P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ISME J, 2012. 6 (3) : 610-8.
 15. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Res, 2016. 44 (D1) : D733-45.
 16. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang HY, Dosztanyi Z, El-Gebali S, Fraser M, Gough J, Haft D, Holliday GL, Huang H, Huang X, Letunic I, Lopez R, Lu S, Marchler-Bauer A, Mi H, *et al.* InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. Nucleic Acids Res, 2017. 45 (D1) : D190-D199.
 17. Schneider M, Lane L, Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Bougueleret L, and Bairoch A. The UniProtKB/Swiss-Prot knowledgebase and its Plant Proteome Annotation Program. J Proteomics, 2009. 72 (3) : 567-73.

あとがき

本報告書では、それぞれ既存の技術を組み合わせることで、これまでにない新しい解析フローの構築を目指した。その結果、農場での健康な豚の調査で、完全に100%の豚の唾液から豚レンサ球菌の遺伝子が検出されるというこれまでの常識を塗り替える成績を得た。また、メタゲノム解析の手法を利用した細菌叢解明では、と畜場での高い清潔度が明らかとなり、そこでの食肉への汚染は起こりにくいと推定されることが分かった。一方で、市販食肉については、腐敗菌に邪魔されて汚染した菌群の動態をそのままでは追跡できない状況であったが、汚染源を糞便だけにせず、豚レンサ球菌が常に検出されるだ液も疑うことにして、それぞれに存在する菌種の特徴を精査することにより、だ液あるいはそれに元々汚染されているタンが、豚肉の汚染源ではないかという新たな知見を得ることができた。さらに、だ液やその他の試料に存在する細菌叢解析から、レンサ球菌が最も多く存在することや、その中でも豚レンサ球菌が主要な菌種であることが分かり、本菌を豚肉汚染の指標として利用することの正当性が科学的にも証明されたのではないかと感じている。本事業で得られた成績は、食肉の衛生管理に関する一つの提言となると思われる。しかし、現時点では、まだ調査した試料の数も少なく、学会や関連業界の全ての関係者を十分説得できるほどの成績ではない。今後、農場、と畜場、市販豚肉を含めて、さらに広い地域からの試料を数多く収集し、それらについて同様な解析を行い、本事業で得られた成績が普遍的なものであることを示していかなければならない。そのためには、本事業の成果を参考にして、新たに事業を組み立て、信頼できる成績を積み上げる必要があると思われる。この事業成績を端緒として、フードチェーンにおける食肉汚染についての調査や試験成績が他の研究者・技術者により引き継がれ、一つの学説と発展することを望む。最後に、本事業は、食の安全研究センターに所属する特任教員、研究員、大学院生および京都大学医学部に所属する教員、特定教員による日夜を問わない献身的な作業があつてこそ達成できたものである。事業に関わったこれらのメンバーにここで改めて謝意を表したい。

2017年3月
東京大学大学院農学生命科学研究科
附属食の安全研究センター長
関崎 勉

謝 辞

本事業の実施にあたりご協力を賜りました青森県内、栃木県内、茨城県内および熊本県内の養豚場、ならびに山形県庄内食肉衛生検査所の関係者の皆様に感謝申し上げます。

