

令和元年度 【 学園研究費助成金< B > 】研究成果報告書

学部名 生活科学部

フリガナ カドヤ リョウスケ
氏名 門屋 亨介

研究期間 令和元年度

研究課題名 食肉フードチェーンにおける食中毒細菌汚染状況の提示

研究組織

	氏名	学部	職位
研究代表者	門屋 亨介	生活科学部	准教授
研究分担者			
研究分担者			

1. 本研究開始の背景や目的等 (200字～300字程度で記述)

カンピロバクター、サルモネラ、病原性大腸菌は食中毒の主要な原因菌であり、下痢や嘔吐などを引き起こし、食卓の安全を確保するうえでこれら細菌の汚染防止は緊急の課題である。現状では、小売店で販売されていた食肉の多くが食中毒細菌に汚染されており、細菌の汚染が小売店内で起きる可能性が指摘されている。小売店での食肉加工などの作業中の汚染を防除できれば、より安全な食肉を消費者に提供することができ、商品価値を高めることにも繋がる。しかし、調査は対象店舗数や検体数が十分とは言えず、小売店内での汚染の実態を詳細に把握することまではできない。そこで本研究では店舗数と検体数、検体の種類を増やし、小売店内での食中毒細菌汚染の実態とその経路を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の推進方策 (300字程度で記述)

名古屋市内の小売店から購入した豚精肉・内臓肉、鳥精肉・内臓肉サンプルにおける *Campylobacter*、*Salmonella*、病原性大腸菌の検出と次世代シーケンサー (NGS) を用いた食肉細菌叢の解析を行う。

各肉サンプル試料の食中毒細菌汚染を確認するため、増菌培養と nested PCR 法を組み合わせた方法で食中毒細菌を検出する。さらに食肉サンプルから抽出した細菌 DNA16S rRNA の V3-V4 領域を PCR で増幅し、NGS と Qiime を用いた細菌叢解析を行った。これまで *Campylobacter* 検出にのみ用いられてきた nested PCR を他の菌でも展開することによるより精度の高い汚染検出と細菌叢解析による各店舗間、店舗内での豚肉と鶏肉の交差汚染を含めた各食中毒細菌の汚染経路の特定を行う。

3. 研究成果の概要 (600字～800字程度で記述)

名古屋市内食肉小売店 10 店舗から豚精肉 15 サンプル、豚内蔵肉 7 サンプル、豚ひき肉 8 サンプル、鳥精肉 15 サンプル、鳥内蔵肉 13 サンプル、鳥ひき肉 2 サンプルを購入した。ストマック袋に検体 100g を入れ、生理食塩水 100ml 加え、各サンプル内の微生物を抽出した。抽出液を各食中毒細菌選択培地 (*Campylobacter*: ボルトン選択培地、*Salmonella*: ランバクイックサルモネラ選択培地、病原性大腸菌: BGLB 選択培地) で 48 時間培養し、ゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR 法で各食中毒細菌の汚染度を決定した。このとき、従来の検出法と比較し感度の高い Nested-PCR 法を用いた。それに加え、各肉サンプルの 16S rRNA 遺伝子内 v3-v4 領域の配列を次世代シーケンサーで読み取り、細菌叢を決定した。

豚精肉の食中毒細菌汚染度は *Salmonella*:40%、*Campylobacter*:70%、病原性大腸菌:15%、豚内蔵肉は *Salmonella*:33%、*Campylobacter*:83%、病原性大腸菌:27%、豚ひき肉は *Salmonella*:60%、*Campylobacter*:100%、病原性大腸菌:50%となった。また、鳥精肉の食中毒細菌汚染度は *Salmonella*:60%、*Campylobacter*:80%、病原性大腸菌:20%、鳥内蔵肉は *Salmonella*:65%、*Campylobacter*:85%、病原性大腸菌:75%、鳥ひき肉は *Salmonella*:65%、*Campylobacter*:100%、病原性大腸菌:0%となった。全国平均と比較し汚染度が 10～20%高い結果となったが、検出感度の高い Nested-PCR 法を用いているためだと思われる。今後は PCR 法の検定だけではなく、実際に食肉中から食中毒菌を単離し、菌株同定を試み、真の汚染度を検討する。

細菌叢解析を用いた店舗間比較では、豚精肉の *Campylobacter* 及び *Salmonella* 汚染、鳥精肉の *Campylobacter* 汚染は店舗内での汚染肉からの交差汚染である可能性が示唆された。

4. キーワード (本研究のキーワードを 1 項目以上 8 項目以内で記載)

① <i>Campylobacter</i>	② <i>Salmonella</i>	③ 病原性大腸菌	④ nested PCR
⑤ 次世代シーケンサー	⑥ 細菌叢解析	⑦	⑧

5. 研究成果及び今後の展望 (公開した研究成果、今後の研究成果公開予定・方法等について記載すること。既に公開したものについては次の通り記載すること。著書は、著者名、書名、頁数、発行年月日、出版社名を記載。論文は、著書名、題名、掲載誌名、発行年、巻・号・頁を記載。学会発表は発表者名、発表標題、学会名、発表年月日を記載。著者名、発表者名が多い場合には主な者を記載し、他〇名等で省略可。発表数が多い場合には代表的なもののみ数件を記載。)

今回の研究では、食肉の細菌性食中毒汚染は、店舗内における汚染肉からの交差汚染である可能性が示唆された。今後はさらに調査する検体数を増加し、汚染の状況を詳細に検討する必要がある。それに加え、同一店舗内での鶏肉と豚肉の交差汚染の可能性を検討する必要がある。次年度の調査では同一店舗で豚肉と鶏肉を購入し検討する必要がある。

本研究成果は 2020 年度農芸化学学会で発表を行うことを計画し、準備を行っている。

また、本研究は継続的な研究を行うことで食中毒汚染の全容が明らかになることが予想されるため、さらなる調査を行う予定である。そのため、「伊藤記念財団」等の民間研究助成に応募し研究の継続を図る。

2～3 年間の研究結果を基に国際学会誌への原著論文投稿を計画している。