

学 位 論 文 題 名

Nested Polymerase Chain Reaction によるエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の
検出法の開発と家畜腸内容物および食肉における分布状況に関する研究

学位論文内容の要旨

ウェルシュ菌による食中毒の原因は本菌が産生するエンテロトキシンであるが、食品および環境中に存在するウェルシュ菌のうち、エンテロトキシンを産生する菌はその一部であると考えられている。ウェルシュ菌による食中毒の主要原因食品である食肉における本菌の汚染状況、および食肉の汚染源として重要視されている家畜腸内容物における本菌の分布状況に関する報告は多いが、その多くはエンテロトキシン非産生菌を含めたウェルシュ菌についての調査成績であり、エンテロトキシン産生ウェルシュ菌を対象とした調査成績は少ない。また、家畜腸内容物および食肉中のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を定量的に調査した報告はみあたらない。本研究では、nested polymerase chain reaction(nested PCR)法と最確数(most probable number;MPN)法を組合せることにより、家畜腸内容物および食肉中のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を定量的に調査する方法を考案し、本方法を用いて家畜の保菌状況および食肉の汚染状況を調査した。

第1章では、プライマーペアの作成およびPCRの反応条件の検討を行い、nested PCR法を確立した。本nested PCR法によ

り、試験に用いたすべてのエンテロトキシン産生ウェルシュ菌から特異的にDNAが増幅され、さらに増幅DNAはその制限酵素切断パターンからエンテロトキシン産生遺伝子の一部であることが確認された。エンテロトキシン非産生ウェルシュ菌およびウェルシュ菌以外の菌種からは増幅産物は検出されなかった。次に、検出感度を検討するためにエンテロトキシン産生菌を10倍段階希釈し、それぞれの希釈液を用いてnested PCR法を行い通常のsingle PCR法の結果と比較した。nested PCR法では1~10 colony forming unit(CFU)の菌数から陽性反応を得ることが可能であり、single PCR法と比較して約1,000倍高感度であった。以上の結果から、nested PCR法は少数のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の検出に有効と考えられる。

第2章では、実験的に家畜腸内容物および食肉にエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を添加し、これらの検体から菌を分離することなく直接nested PCR法によりエンテロトキシン産生遺伝子を検出する方法について検討した。まず、検体の乳剤からエンテロトキシン産生遺伝子の検出を試みたところ検出感度が低く、家畜の保菌調査および食肉の汚染調査に用いるには、さらに感度の高い方法が必要と考えられた。次に、検出感度を上げるためにnested PCR反応前に増菌培養を行い、培養液からエンテロトキシン産生遺伝子の検出を試みたところ十分な検出感度を得られ、また同一検体中に共存するエンテロトキシン非産生ウェルシュ菌の影響がみられなかったことから、増菌培養後のnested PCR反応はエンテロトキシン産生菌と非産生菌が共存する家畜腸内容物および食肉からのエンテロトキシン産生ウェ

ルシュ菌の検出に有効と考えられる。

第3章では、第2章で示した増菌培養とnested PCR法を組合せたエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の検出方法にMPN法を組合せて、家畜腸内容物および食肉中のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の菌数を測定する方法を考案し、その有効性について検討した。実験的に腸内容物および食肉にエンテロトキシン産生ウェルシュ菌のみを添加した場合、本方法により測定した当該菌の菌数は寒天平板培養法により測定した菌数(CFU)と高い相関が認められた。また、腸内容物および食肉にエンテロトキシン産生菌と非産生菌の両者を添加した場合も同様に、本方法により測定したエンテロトキシン産生菌の菌数とCFUは高い相関が認められた。これらのことから、nested PCRとMPN法を組合せた方法は家畜の腸内容物および食肉におけるエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の菌数測定に有効と考えられる。一方、比較のために通常のMPN法によりエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の定量を行ったところ、腸内容物および食肉にエンテロトキシン産生ウェルシュ菌のみを添加した場合はCFUと高い相関がみられたが、エンテロトキシン産生菌と共にエンテロトキシン非産生菌を同一検体に添加した場合は、エンテロトキシン産生菌を検出する確率が低くなり、少数のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の添加ではCFUとの間に相関はみられなかった。したがって、通常のMPN法はウェルシュ菌総菌数の測定には有効であるが、エンテロトキシン非産生ウェルシュ菌と同一検体中に存在する少数のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の菌数測定には不適當であると考えられる。

第4章では、第3章で示したnested PCRとMPN法を組合せた方法により家畜腸内容物、および食肉中のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の菌数を測定した。また、併せて通常のMPN法によりウェルシュ菌の総菌数を測定し、エンテロトキシン産生菌と非産生菌の比率を明らかにした。家畜腸内容物におけるエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の分布状況調査では、牛および豚と比較して鶏の保菌率および保菌数が最も高かった。一方、食肉の汚染状況調査では、牛肉および鶏肉はエンテロトキシン産生ウェルシュ菌陽性で、豚肉はすべて陰性であった。また、鶏肉の汚染率および菌数が牛肉より高かった。さらに、家畜腸内容物および食肉中には少数のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌と多数のエンテロトキシン非産生ウェルシュ菌が共存していることが明らかとなった。本章の結果から、ウェルシュ菌食中毒の原因として鶏肉を重要視しなければならないことが示唆された。著者の知る限りでは、本研究は家畜および家禽の腸内容物ならびに食肉におけるエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の分布状況を定量的に調査した初めての報告と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 小 沼 操

副 査 教 授 高 島 郁 夫

副 査 教 授 首 藤 文 栄 (岩手大学農学部)

学 位 論 文 題 名

Nested Polymerase Chain Reaction によるエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の 検出法の開発と家畜腸内容物および食肉における分布状況に関する研究

ウェルシュ菌による食中毒の原因は本菌が産生するエンテロトキシンであるが、その産生菌は食品や環境中に存在するウェルシュ菌の一部である。しかし、食肉等の本菌の汚染状況に関する従来の報告は非産生菌も含めており、産生菌のみを対象とした成績は少ない。本論文では、nested polymerase chain reaction (PCR)法と最確(most probable number,MPN)法を組み合わせることにより、エンテロトキシン産生ウェルシュ菌を定量的に検出する方法を考案し、家畜の保菌状況と食肉の汚染状況を調査した。

第1章では、nested PCR法について、既報のエンテロトキシン遺伝子の構造を参考にしてプライマーを作成し、増幅反応の条件を検討した。これにより、従来のsingle PCR法より約1,000倍高感度でエンテロトキシン産生ウェルシュ菌のみを検出する方法を確立した。第2章では、家畜腸内容物や食肉に実験的にエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を添加し、増菌培養した後、これらの検体から菌を分離することなく直接nested PCR法を行ったところ、多数の非産生菌が共存していても特異的に産生菌を検出できることを確認した。第3章では、増菌培養とnested PCR法を併用した上記の検出方法にMPN法を組合わせて、検体中のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の菌数を測定する方法を考案し、寒天平板培養法と対応させてその有効性を検討した。その結果、通常のMPN法に較べてはるかに少ない菌数でも測定できることが明らかになった。第4章では、この新しい方法を用いて、各種の食肉や家畜腸内容物など実際の検体について分析した。家畜腸内容物では、牛や豚と比較して鶏の保菌率・保菌数が高かった。一方、食肉では、豚肉は全て陰性であったが牛肉や鶏肉は陽性で、特に鶏肉の汚染率・菌数が高かった。また、全ての検体中に多数のエンテロトキシン非産生ウェルシュ菌が共存していることも明らかとなった。これらの結果より、ウェルシュ菌食中毒の原因として鶏肉を重視する必要性が示唆された。

以上のように、本論文は、家畜と家禽の腸内容物並びに食肉におけるエンテロトキシ

ン産生ウェルシュ菌の分布状況を定量的に調査した初めての報告であり、食品衛生学や獣医学への貢献が大きい。よって審査員一同は、申請者三輪憲永氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分にあると認めた。