

猪肉製品における真菌酵母菌叢の探知に向けた研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 朝倉 宏

研究協力者 東京工業大学大学院 伊澤 和輝

麻布大学 小林 直樹

研究要旨

食肉を含む食品や食品加工・製造環境には真菌が多く存在し、異常増殖を呈した場合には、異味・異臭等を伴う腐敗を齎すことが知られる。特に熟成工程では真菌・酵母の増殖は不可避であり、そのリスク管理の在り方を検討する上では汚染実態の把握は欠かせない。利活用が推進されるジビエ食肉での真菌酵母汚染実態の多くは不明であることから、今後の効率的な真菌調査の実施に向けて、本年度は猪肉製品におけるハイスループットな真菌叢解析手法の確立に関する検討を行った。猪肉製品計25検体を対象として、従来手法である培養法、及び次世代シーケンス手法（NGS法）による真菌叢解析を実施し、両者の成績を比較した。その結果、従来の培養法に比べ、NGS法は簡便かつ難培養性の菌種であっても検出される効果的な手法であることが示されたほか、供試検体では酵母の占有率が極めて高く、*Malassezia*属菌等の医真菌学上必要な真菌種も高率に分布する特徴が明らかとなった。今後、本手法の活用により、真菌酵母汚染に関する実態把握をジビエ食肉の種別毎に把握することで、危害要因分析の充実に資するほか、リスク管理方法の妥当性評価、並びにジビエ食肉加工従事者の健康被害防止等に波及することが期待される。

A. 研究目的

食肉を含む食品や食品加工・製造環境には細菌のほか、真菌酵母も多く存在し、異常増殖を呈した場合には、異味・異臭等を伴う腐敗を齎すことが知られる。特に食肉については熟成が嗜好される現況にあるが、同工程における真菌酵母増殖は必然的に生じるものと考えられる。本分担研究では、昨年度迄に猪肉解体・加工施設における施設環境中での真菌酵母汚染実態を調査した上で、室内洗浄・湿度管理等による環境改善効果を評価し、特に高湿環境が招き得る真菌酵母の常在性が作業従事者に対する健康被害リスクとなりうる可能性を示した。

こうした背景を受けて、本年度は真菌酵母

による汚染が食品を介したヒトへの健康被害リスクとなりうる可能性を探索するための手法構築を主たる目的として、一般流通する猪肉製品を対象としたハイスループットな真菌叢解析手法に焦点を当てた検討を行い、培養法との比較を通じて考察を行った。

B. 研究方法

1. 猪肉製品検体及び前処理方法

国内で解体処理・加工され、一般流通する猪食肉製品計25製品を購入収集した。各製品から試験に供する検体として25gの肉片を採取し、PBS 20 mLと共にパルス式ホモジナイザー(Pulsifier、Microgen Bioproducts)

を用いて3分間ホモジナイズし、検体懸濁液を作製した。この懸濁液のうち500 µLを分取し、従来の培養法に供すると共に検体懸濁液残液全量を後述の次世代シーケンス法（以下、NGS法）による真菌叢解析のための核酸抽出に供した。

2. 培養法

上述の検体懸濁液500 µLをクロラムフェニコール0.01%加 potato dextrose agar（栄研化学）に塗抹し、25°Cで7日間好気培養を行った。培養後、形成された集落数を計測し、検体1gあたりの総真菌数を算出した。同時に、目視及び実体顕微鏡下での観察を通じ、集落外観性状を指標とした真菌・酵母類の分類を行い、分類群ごとの菌数を求めた。

2. NGS法による真菌酵母菌叢解析

上述の検体懸濁液残液全量を50 mL容遠沈管に加え、12,000 rpmで4°C・15分間遠心分離した。上清を除去後、NucleoSpin Soil（タカラバイオ）を用いて、付属のプロトコルに若干の変更を加えつつ、沈殿物よりDNA抽出を行った。溶解物全量に対して700 µLのSL1バッファー及び150 µLのSXバッファーを加え、転倒攪拌して懸濁させた。その後、同液をキット付属のカラムに移し、その後の操作は付属のプロトコルに従って行った。得られたDNAをテンプレートとして、rDNA-ITS1領域をターゲットとしたアンプリコンライブラリの作製を行った。PCRプライマーには、Forward (ITS1-KY01): 5'-CTHGGTCATTTAGAGGAASTAA-3' 及び Reverse (ITS2-KY02): 5'-TTYRCTRCGTTCTTCATC-3')¹⁾を用いた。PCR産物にインデックス配列およびアダプター配列を付加し、精製後に得られたアンプリコンライブラリをIllumina Hi-Seqに供し、シーケンス反応を行った。

得られたリードについては、prinseqソフトウェアを用いてアダプター配列を除去すると共に、QS>10を示す配列を抽出した。その後、両鎖のリードを連結し、配列情報を取得した。

得られたリード配列からQIIME2²⁾プラットフォーム上でDADA2³⁾を用い、代表配列を取得した。同代表配列をblast検索により、真菌ITS領域配列データベースである、UNITEデータベース⁴⁾に照合させることで真菌酵母菌叢としての分類(階層化)を行った。同結果から、元のリードの集計を行い、各検体における各真菌属の存在比率を算出した。

C. 研究結果

1. 培養法による真菌分布実態解析

猪肉製品供試検体について、まず培養法に基づく真菌酵母分布状況を表1に示した。全検体で酵母が総真菌数に対して、大きな比率を占め(73.6-100%)、総真菌数が多い検体ほどこの傾向は顕著であった。今回検討した検体では、産地や部位、形状による菌数分布傾向に差異は認められなかったものの、同一事業者由来の製品検体間では菌数分布は概ね一致を示した。

今回検討した検体では、真菌が非検出の検体または非常に少ない(<10 cfu/g)の検体は全体の44%を占めた。その要因としては今回試験に供した検体が予め冷凍状態であったため、付着真菌等が死滅し復元できなかったことが想定された。しかしながら、冷凍処理は真菌酵母の完全な死滅を招くことは想定し難く、高い菌数分布を示した検体については冷凍前段階で高い汚染菌数であった可能性が考えられた。

2. NGS法による真菌酵母菌叢解析結果

計25検体のDNA抽出物を鋳型として、ITS領域を増幅するためのPCR反応に供した結

果、7 検体 (R3-3、R3-8、R3-11、R3-34、R3-39、R3-40、R3-60) からのみ約 100-800 bp の増幅産物が得られた。NGS 法における PCR 増幅断片の有無と培養法による成績の関連性を図 1 に示した。PCR 増幅がみられなかった検体の多くは培養菌数も低い傾向にあることが確認され、PCR 増幅が認められなかった検体の多くは付着真菌酵母数が元来少なかったためと想定された。

次に NGS 法により得られた検体ごとの真菌酵母菌属の存在比率を図 2 に示した。これらのうち、検体 R3-3 については、繰り返し実験による再現性を確認するため、N=2 で検体を調整し (R3-3-1、R3-3-2)、NGS 法に供した。解析の結果、他の 6 検体に比べ、R3-3-1 及び R3-3-2 間で検出された真菌属及びそれらの各存在比率は高い類似性を示した。また、同一事業者で加工された 2 製品検体 (R3-39 及び R3-40) の結果も、他の 6 検体に比べて高い類似性を示し、加工施設環境或いは同環境での作業工程が真菌叢を決定づける一因である可能性が示唆された。

なお、全検体で酵母が占める割合は非常に高く、58.4-97.6%を占めた。この傾向は培養法の結果と概ね一致しており (表 1)、従来手法である培養法との間での相関性を裏付ける結果と捉えられた。

検出された真菌属のうち、酵母類としては、*Naganishia* 属菌、*Kurtzmonia* 属菌及び *Debaryomyces* 属菌等環境に広域に分布し、水、土壌、植物、魚肉、家畜肉等からの検出報告のある酵母菌属が高い占有率をもって検出された。また、*Malassezia* 属菌、*Candida* 属菌、*Cryptococcus* 属および *Trichosporon* 属菌といったアレルギーや感染症を引き起こす医真菌学上重要な酵母も 50-100%と高頻度に検出され、中でも *Malassezia* 属菌および *Candida* 属菌は占有率が高い傾向にあることが確認された (図 2)。

真菌については、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属といった通常環境に多く分布する真菌や、昨年度までの調査結果において猪肉解体加工施設環境から多く検出された *Cladosporium* 属菌は、37.5-62.5%の頻度で検出されたが、菌叢全体に占める占有率は低い状況にあった (図 2) ため、これらの真菌が猪肉表面において異常発育した可能性は低いと考えられた。

D. 考察

本分担研究では、猪肉製品における真菌酵母汚染実態を調査するための手法として、NGS 法を構築すると共に、同法の正確性を従来の培養法と照らし合わせることで検討した。

培養法に基づく成績として、同一事業者由来の製品検体間では菌数分布は概ね一致した。製品の表示ラベルには異なる加工日が付されていたことから、2 検体間での菌数に係る共通性の背景には施設環境或いは作業工程の同一性が要因となった可能性が推察された。

また、同一製品検体を 2 検体 (R3-3-1 及び R3-3-2) 平行比較した結果、非常に類似性の高い真菌叢成績として示されたことは、本解析手法が猪肉製品表面に付着する真菌酵母菌叢探知手法として安定性を示すものと考えられた。

一方、今回供試した猪肉製品における真菌叢全体の傾向として、*Cladosporium* 属菌や *Aspergillus* 属菌といった解体・加工環境の室内から高頻度に検出される真菌の占有率は総じて低く、汚染を受けて以降、猪肉表面で異常増殖した可能性は低いと考えられた。但し、今回の供試検体は何れも真菌酵母が生育し得ない冷凍状態で輸送保管されたものであり、今後はチルド状態、特に熟成工程を経て二次加工・出荷される猪肉加工製品を対

象とした検証を行うことで、こうした健康被害を招き得る真菌が異常増殖する可能性を明確に示すことが必要と思われる。

また、猪肉製品検体より検出された真菌の一部には、作業従事者の健康被害を招き得ると想定される菌属も含まれた。一例としては、医真菌に属する *Malassezia* 属菌が挙げられる。本菌は NGS 法により高い占有率で検出された一方、培養法で汎用される PDA 培地等では発育を認めず、培養には選択培地を要することから、培養法のみで本菌の汚染状況を総合的に把握することは困難と思われる。この他、*Trichosporon* 属をはじめとして、感染性やアレルギー性のある真菌属も今回の NGS 法により高頻度に検出される実態がはじめて確認された。

更に、酵母は培養法による簡易同定が概して困難であり、汚染分布に資する簡便な調査手法として本研究で構築した NGS 法を、ジビエ食肉及び同施設環境における真菌・酵母の汚染実態調査へと活用することは、危害要因分析の対象として検討を進め、更に加工従事者及び消費者の健康被害予防に向けて取るべきリスク管理策の構築へと波及すると期待される。

更に、本年度検討成績として得られた真菌叢の特徴が、原料となる動物種、加工・販売施設の衛生状態、販売店の衛生状態等、何に大きく影響されるものであるかを今後明らかにすることも必要と思われる。その解明は、効果的なジビエ食肉の安全性及び関連施設における衛生的環境の向上につながり、年間を通じた室内環境調査及び精肉の真菌分布について、継続した調査を進める必要があると考えられた。

参考文献：

- 1) Toju H, et al. 2012. PLoS One. 7: e40863.
- 2) Caporaso et al. 2010. Nat Methods. 7:335-6

3) Callahan et al. 2016. Nat Methods. 13:581-583

4) Kõljalg et al. 2013. Mol Ecol. 21: 5271-77

E. 結論

猪精肉の真菌叢の調査手法として、NGS 法を構築し、簡便かつ難培養性の菌種も確実に検出できる効果的な手法であることを示した。本分担研究で供試対象とした猪肉製品では全体に占める酵母の割合は総じて高く、また *Malassezia* 属菌等の医学上重要な真菌も高頻度に分布する実態をはじめて把握できた。今後は、NGS 法を用いたジビエ食肉における真菌叢の網羅的な把握に資する研究を通じ、衛生管理上、真菌・酵母に由来する健康リスクを把握し、その管理に努めることが必要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し（投稿準備中）

2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

表 1. 培養法による真菌数測定結果.

検体	事業者	猪肉の部位・形状	酵母数/g	真菌数/g	総真菌数/g
R3-3	A	モモ・スライス	1600 <	ND*	1600 <
R3-4	B	モモ・スライス	86.4	1.6	88.0
R3-5	B	モモ・スライス	6.4	3.2	9.6
R3-6	B	モモ・スライス	8.0	ND	8.0
R3-8	C	モモ・スライス	1600 <	ND	1600 <
R3-11	D	不明・不明	1600 <	ND	1600 <
R3-34	E	モモ・スライス	1600 <	32.0	1600 <
R3-36	F	ロース・スライス	3.2	ND	3.2
R3-39	G	モモ・スライス	192.0	68.8	260.8
R3-40	G	モモ・スライス	179.2	48.0	227.2
R3-41	H	モモ・スライス	48.0	3.2	51.2
R3-43	B	ロース・スライス	ND	17.6	17.6
R3-44	B	モモ・スライス	ND	ND	ND
R3-45	B	モモ・スライス	ND	ND	ND
R3-46	B	ロース・スライス	ND	ND	ND
R3-47	B	ロース・スライス	ND	ND	ND
R3-48	I	バラ・スライス	3.2	ND	3.2
R3-51	J	ロース・スライス	6.4	ND	6.4
R3-53	J	ロース・スライス	3.2	ND	3.2
R3-54	K	不明・スライス	1369.6	12.8	1382.4
R3-56	L	不明・スライス	1.6	1.6	3.2
R3-59	M	ロース・スライス	1600 <	25.6	1600 <
R3-60	N	ロース・スライス	550.4	86.4	636.8
R3-61	O	バラ・スライス	1600 <	ND	1600 <
R3-62	P	ミンチ	1600 <	1.6	1600 <

* ND, Not Detected.

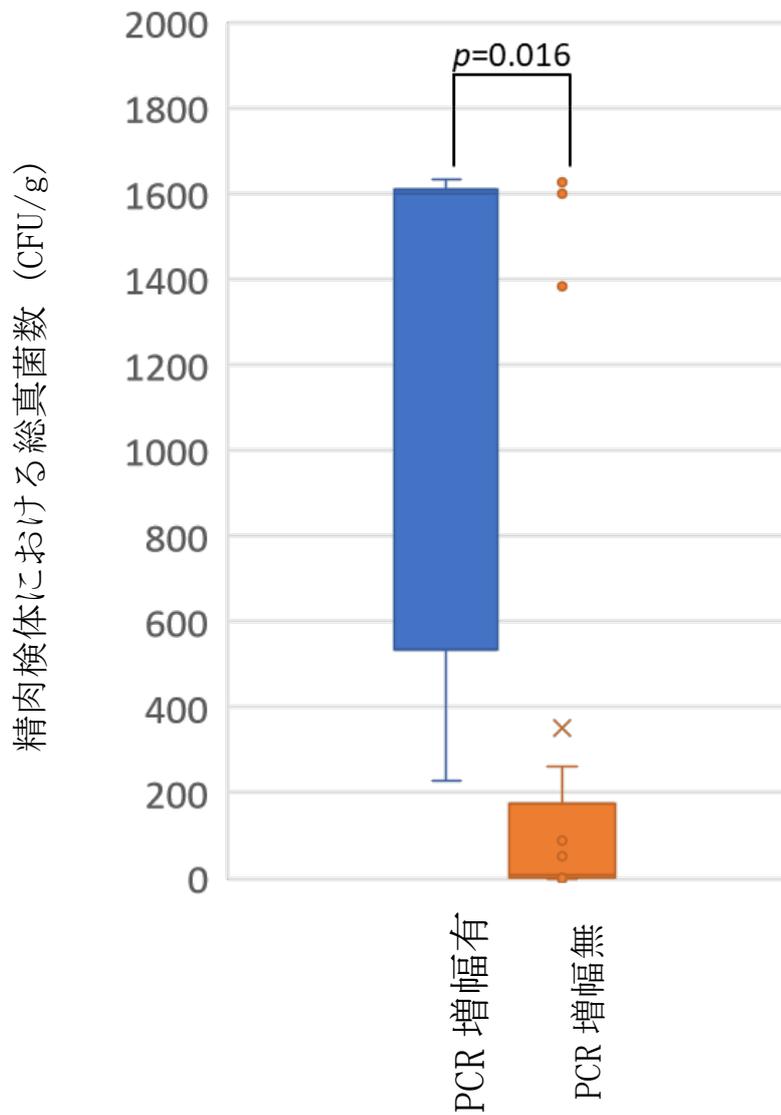


図 1. 猪肉製品検体における培養法による真菌数と NGS 法における PCR 増幅の有無との関連性.

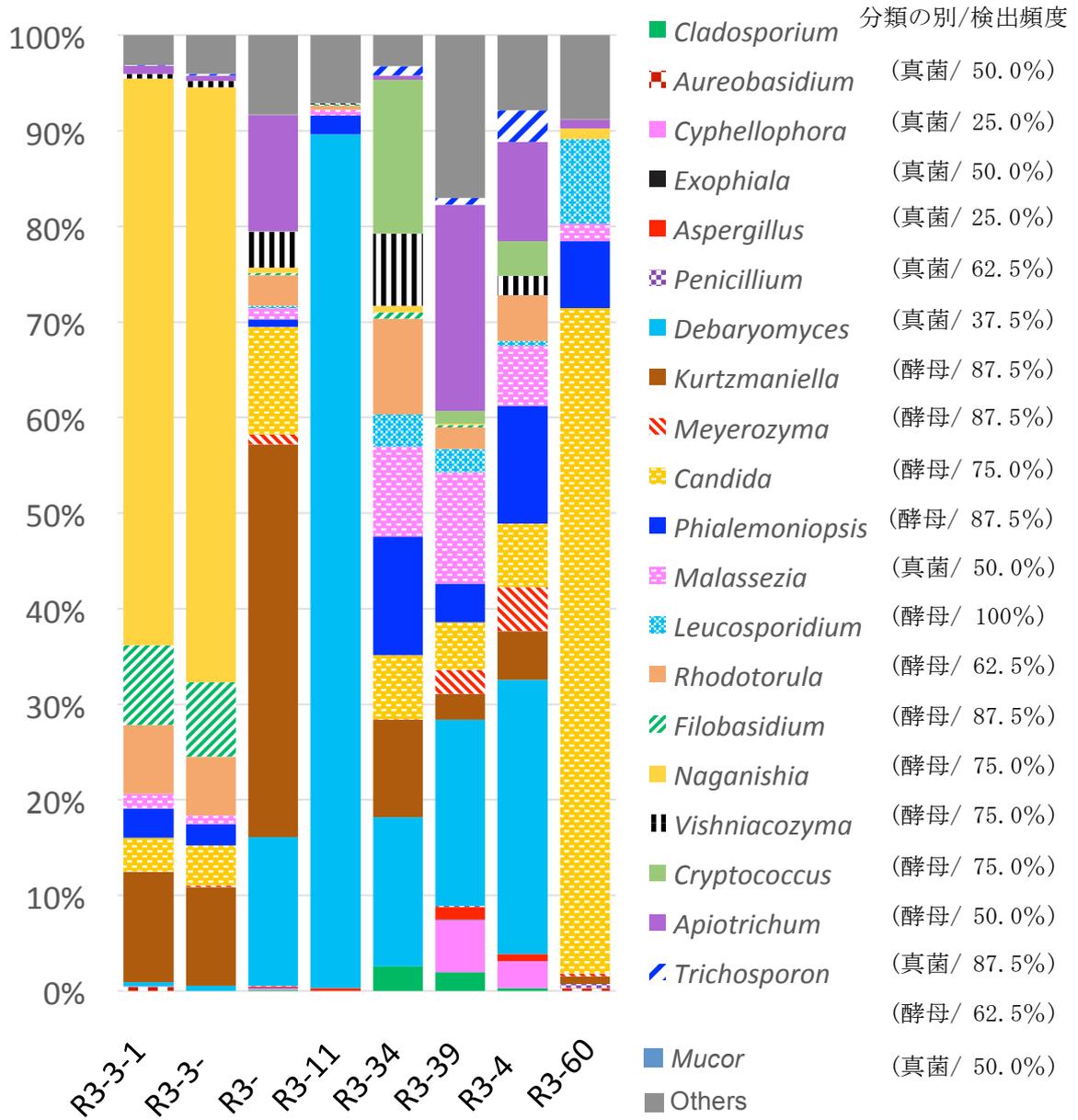


図 2. NGS 法による猪肉製品検体における真菌菌叢解析結果。
(バーチャート)