

で本生物が発見されれば、世界に先駆けて原因毒の構造決定に成功する確率は高い。また、本生物は形態変化が大きく、顕微鏡観察による同定が困難なことから、免疫抗体による測定キットあるいはバイオセンサーの開発が望まれている。この方面でも日本の研究者は世界の最先端にあり、UNESCO、WHO等の国際機関による講習会に招かれている。国内での生物の発見が困難であったり、長期間を要する場合、米国に本生物に対する共同研究を提案し、生物の供与を受けることができれば、研究を発展させ、国際的な貢献を行うことが可能である。

## ニ) 有毒プランクトンに関する総合的な調査

前述のように有毒プランクトンの発生は世界的に増加の傾向にある。その対応については複数の所轄官庁が当たっているため、全体像を示す資料は整備されていない。環境・健康に悪影響を及ぼす種類について、総合的な資料を整備し、実体を把握することは、今後の対応にとって好ましい。

## E. 研究協力者等

本研究は以下の研究協力者をえて実施した。また、分担の範囲は以下に示す通りである。

野口玉雄：長崎大学水産学部 教授  
多部田修：長崎大学水産学部 教授  
安元 健：日本食品分析センター学術顧問

「下痢性貝毒の新しい分類のための検査方法の確立」(大島)

「中国産養殖フグの魚種鑑定に係る調査研究」(野口、多部田)

「パリトキシンの汚染実態調査」(野口)

「フィステリア等新しい魚介毒に関する文献調査及び精度管理に関する調査」(安元)

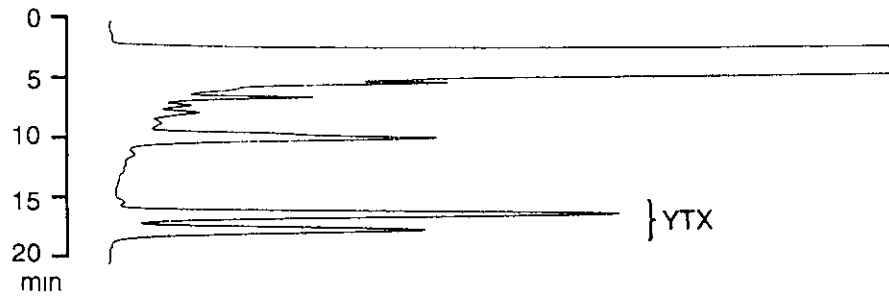


図1 *Protoceratium reticulatum* 山田湾株のDMEQ-TAD蛍光分析

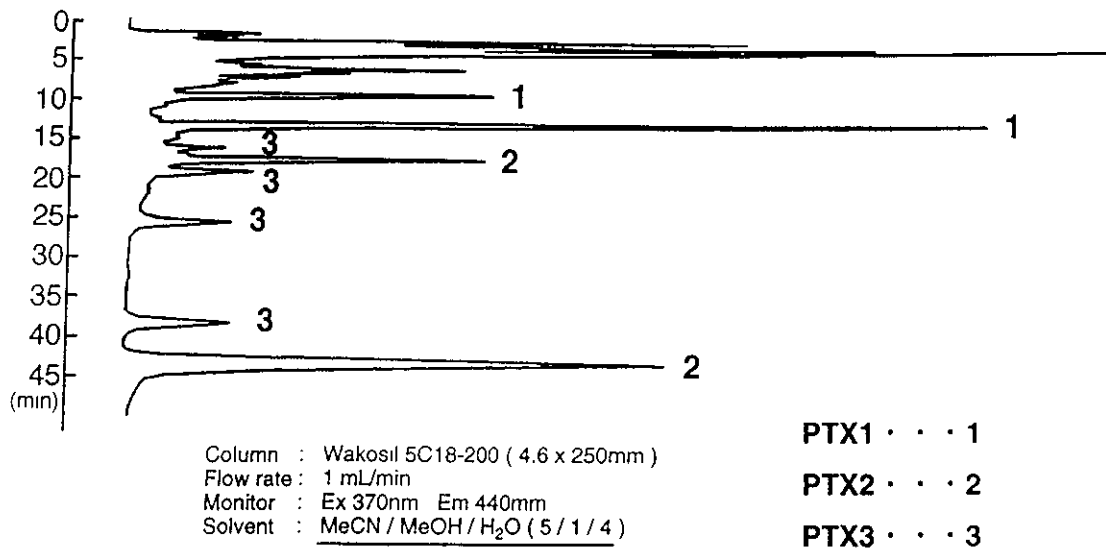


図2 PTX1、PTX2、PTX3の一斉分析クロマトグラムと分析条件

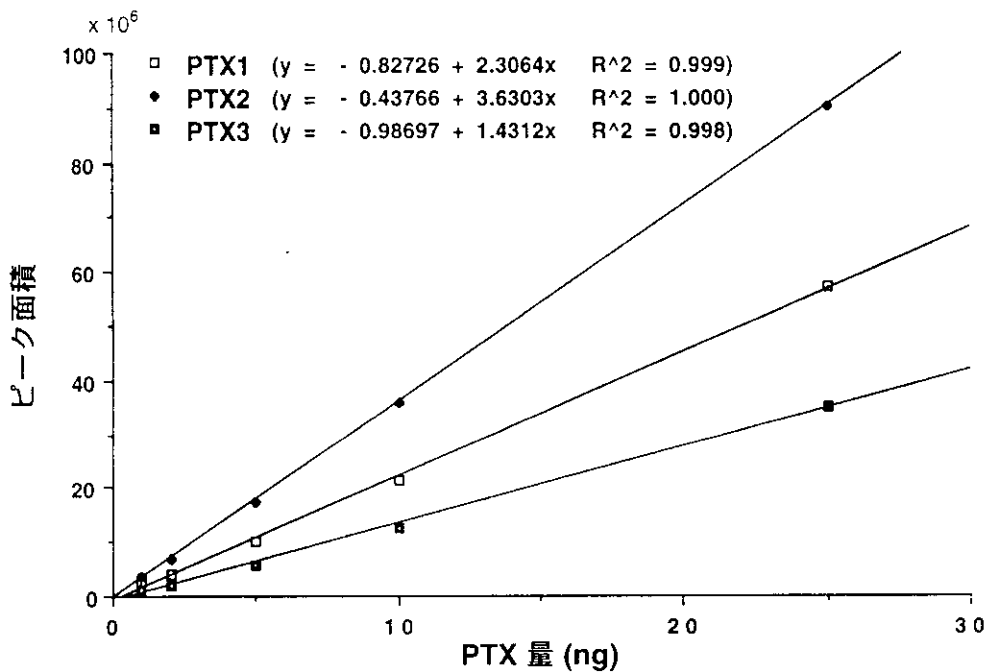


図3 PTX1、PTX2、PTX3の検量線

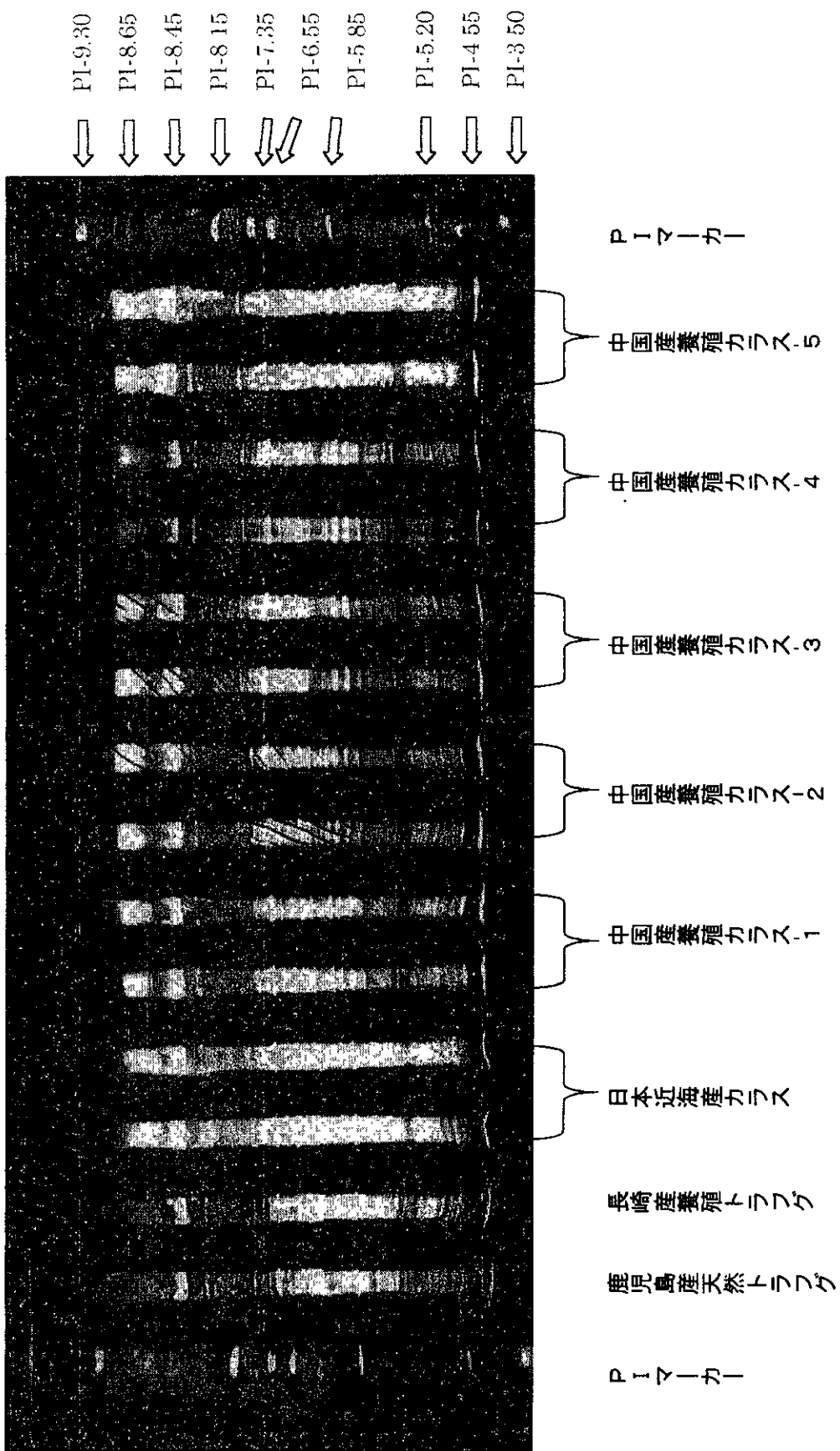


図4. トラフグ、カラス、中国産養殖カラスの泳動パターン

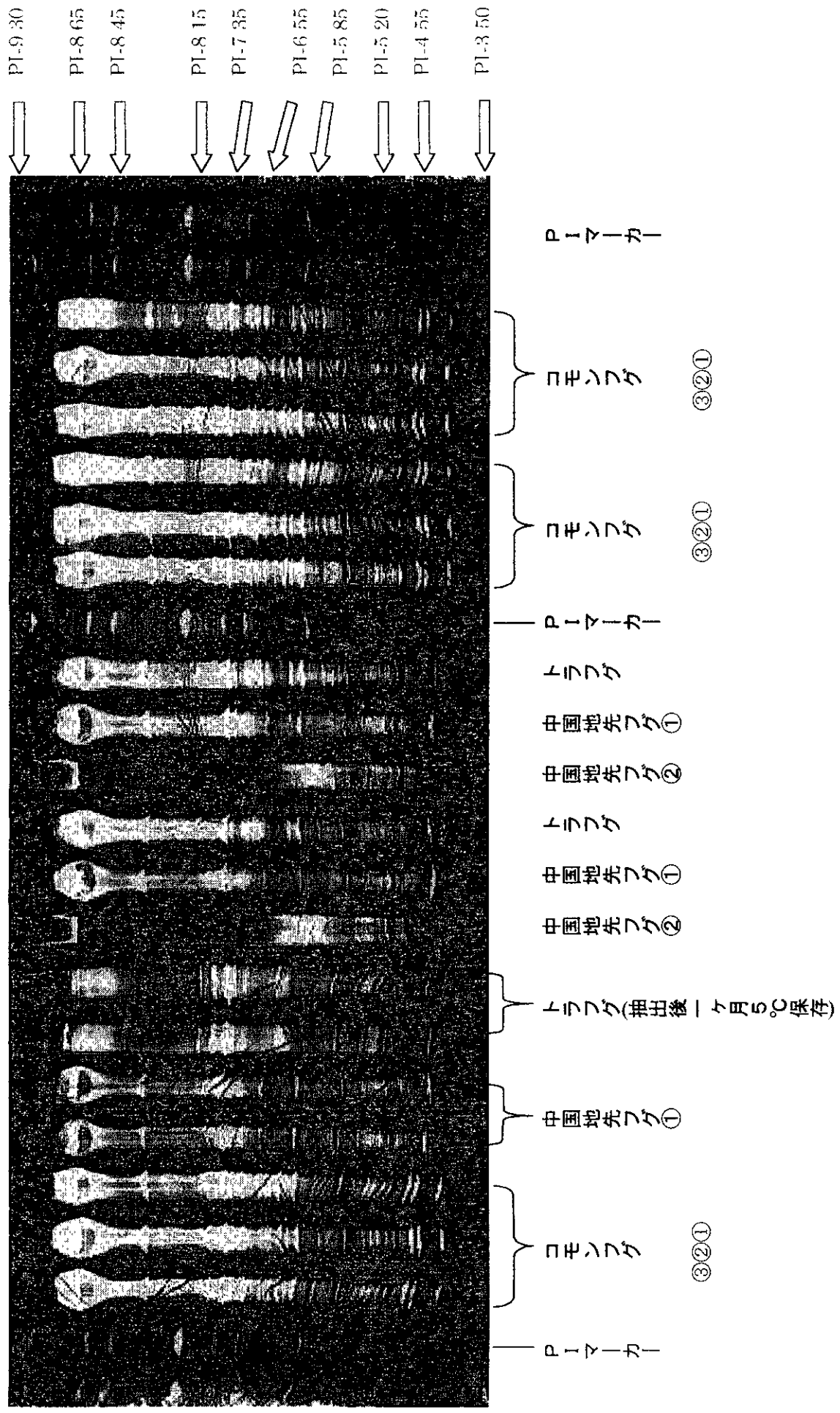


図5. 中国産地先フグとトラフの泳動パターン

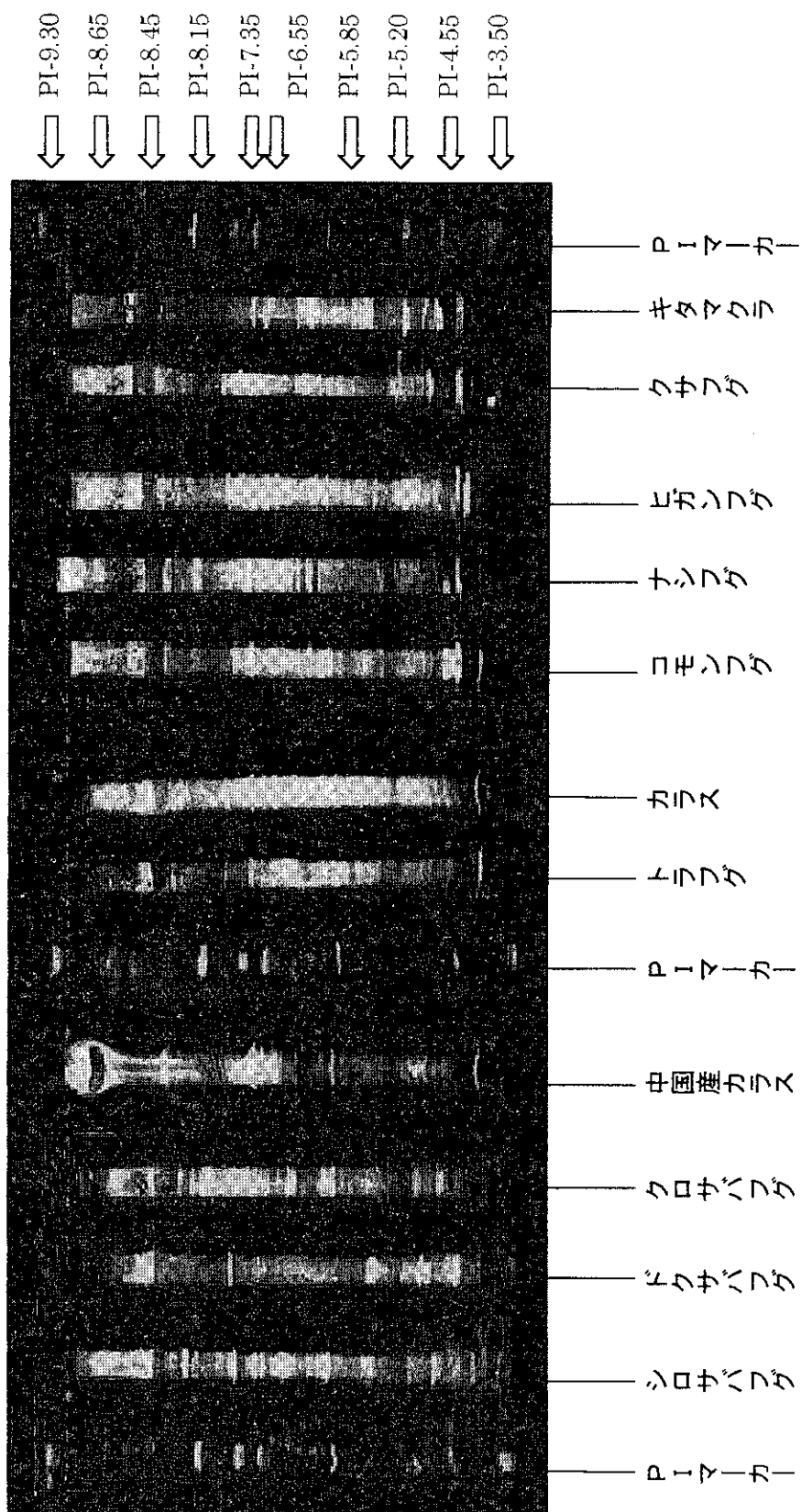


図6. フグ10魚種の泳動パターン

表 1. 徳島県牟岐地先で採集されたアオブダイの毒性

Spring '98				Autumn '98			
No.	Toxicity(MU/g)			No.	Toxicity(MU/g)		
	Muscle	Liver	Viscera		Muscle	Liver	Viscera
1	<0.5	<0.5	<0.5	1	<0.5	<0.5	<0.5
2	<0.5	<0.5	0.5	2	<0.5	<0.5	<0.5
3	0.5	—	<0.5*	3	0.5	<0.5	0.5
4	<0.5	<0.5	0.5	4	<0.5	<0.5	<0.5
5	0.5	<0.5	0.5	5	<0.5	<0.5	0.5
6	0.5	0.5	0.5	6	<0.5	<0.5	0.5
7	0.5	<0.5	0.5	7	<0.5	<0.5	0.5
8	<0.5	<0.5	<0.5	8	<0.5	<0.5	0.5
9	<0.5	<0.5	<0.5	9	<0.5	<0.5	0.5
10	<0.5	<0.5	0.5	10	<0.5	<0.5	0.5
11	<0.5	<0.5	0.5	11	0.5	<0.5	<0.5
12	<0.5	<0.5	0.5				
13	0.5	<0.5	0.5				
14	0.5	<0.5	0.5				
15	<0.5	<0.5	<0.5				
16	<0.5	<0.5	0.5				
17	<0.5	—	2.0*				
18	<0.5	<0.5	<0.5				
19	0.5	<0.5	1.0				
20	2	<0.2	<0.5				

—:Not tested

\* :Included liver

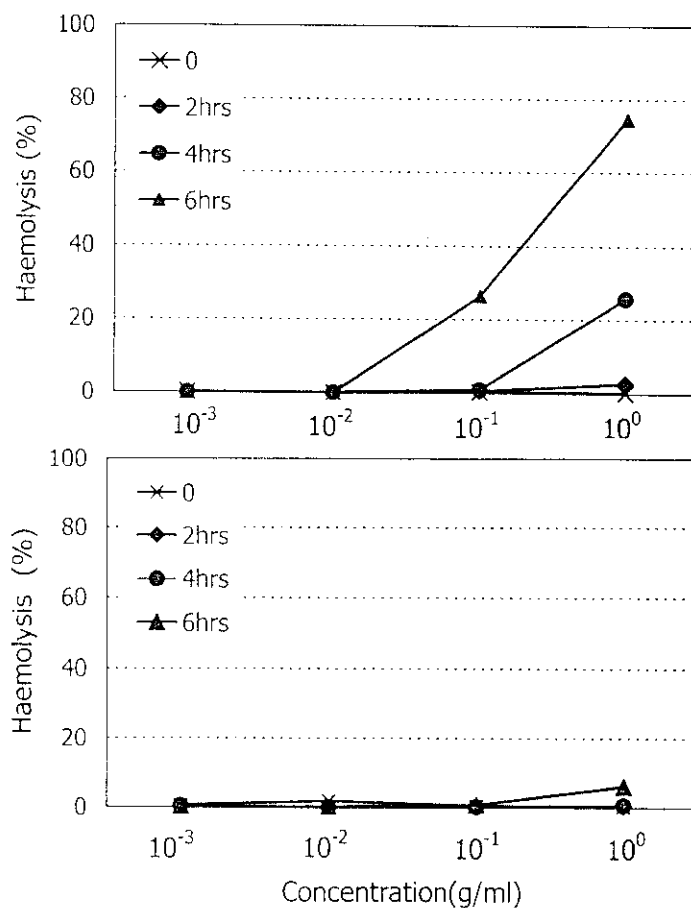


図 7. 徳島産アオブダイ抽出液の溶血試験  
上段：マウス毒性試験有毒試料，下段：無毒試料

## 生乳及び市販乳中の Q 熱病原体 (*Coxiella burnetii*) に関する調査研究

研究協力者 山本茂貴（国立公衆衛生院）

研究協力者 長岡宏美（静岡県環境衛生科学研究所）

### 研究要旨

*C. burnetii* による生乳の汚染状況および種々の殺菌温度の市販乳における *C. burnetii* の生残状況について調査研究を行った。生乳は乳房内残乳、農家飼育牛由来および乳業会社原料乳 151 検体を用いた。そのうち、直接 PCR で 104 検体中 46 検体（44.2%）で遺伝子が検出され、151 検体中 56 検体（37.1%）でマウスでの分離が陽性となった。さらに、特別牛乳（未殺菌乳）は 1 ロットを調べたところ、5 検体中 3 検体（60.0%）で直接 PCR 陽性となり、4 検体（80.0%）でマウスでの分離陽性となった。62°C 30 分殺菌乳は、43 検体中 38 検体（88.4%）で直接 PCR 陽性、43 検体中 15 検体（34.9%）でマウスでの分離陽性となった。63°C 30 分殺菌乳は 35 検体中 16 検体（45.7%）で直接 PCR 陽性、35 検体中 7 検体（20.0%）でマウスでの分離が陽性となった。一方、85°C 15 秒および 120°C 2 秒殺菌乳は、9 検体中 6 検体（66.7%）、10 検体中 8 検体（80.0%）と直接 PCR でそれぞれ陽性となったが、マウスでの分離はどちらも陰性であった。

### 研究目的

前年度は、食品中の *C. burnetii* の汚染状況を検討する目的で、市販チーズおよび低温殺菌牛乳から外膜蛋白をコードする *com1* 遺伝子から作製したプライマー OMP3,4,5 および 6 を用いて nested PCR 法による遺伝子検出、およびマウスを用いた *C. burnetii* の分離を試みた。その結果、一部の市販チーズ及び低温殺菌乳から *C. burnetii* が分離された。そこで、今年度は、*C. burnetii* による生乳の汚染状況および種々の殺菌温度の市販乳における *C. burnetii* の生残状況について調査研究を行った。

### 材料と方法

検査材料：生乳は静岡県西部と畜場でと殺解体された乳牛の乳房内残乳 71 検体、農家飼育牛由来 20 検体および乳業会社の原料乳 61 検体を用いた。市販牛乳は、特別牛乳 5 検体、62°C 30 分 43 検体（同一製造者）、63°C 30 分 37 検体（A 社 35 検体、B 及び C 社 1 検体ずつ）、75°C 15 分 4 検体、80°C 15 分 1 検体、85°C 15 分 1 検体、85°C 15 秒 12 検体、120°C 2 秒 10 検体及び 130°C 2 秒から、それぞれ 0.5ml ずつ 5 検体を PCR 法の材料とし、また、それぞれの検体 1 ml ずつをマウス 3 匹にそれぞれ接種した。

マウス接種実験：4 週齢の A/J マウスにサイクロオキサリド 4 mg/マウスを皮下注射し、検体 1 ml を腹腔内に接種した。3 週後にマウスを殺し脾臓の IF 抗原検出および PCR の材料とした。実験期間中 5 日おきに初回と同量のサイクロオキサリドを皮下注射した。ギムザ染色、IF 抗原

およびマウス脾臓の PCR が陽性となった場合にマウスから分離陽性とした。

PCR の方法：牛乳 0.5 ml を lysing solution 0.5 ml で処理後、NaI を加えた isopropanol で洗浄し、得られた DNA を鋳型に、外膜蛋白の com1 遺伝子から設計されたプライマー（Zhang ら、J. Clin. Microbiol. 1998, vol36, p77-80）を用いて nested PCR を行った。脾臓の PCR は Stein, A. and Raoult, D. (J. Clin. Microbiol. 1992, 30 2462-2466) の方法で準備した DNA を鋳型に同様のプライマーを用いて nested PCR を行った。

I F 抗原：マウス脾臓のスタンプ標本を間接蛍光抗体法で染色し、顕微鏡下（400x）で観察し、3 視野中に 10 個以上観察された場合に＋、5-9 個は±、5 個未満は－とした。同時に作成したスタンプ標本を用いて Giemsa 染色を行い顕微鏡下で *C. burnetii* の存在を確認した。

マウス血清抗体価：検体接種後 3 週でマウスを殺し、血清を採取した。それを PBS(-) で 2 倍階段希釈し、培養細胞で増殖した *C. burnetii* nine mile 株をスライドガラスに塗抹した抗原プレートを用いて間接蛍光抗体法により抗体価を測定した。

## 結 果

乳業会社の原乳 61 検体を nested PCR で調べたところ 36 検体（59.0%）で *C. burnetii* 遺伝子が検出され、38 検体（62.3%）でマウスでの分離が陽性となった。マウスでの分離陽性となった場合の血清抗体価は 32 倍～256 倍であった。生乳の直接 PCR で陽性となったもののうち 1 検体がマウスでの分離陰性であった。一方、生乳の直接 PCR で陰性となったもののうち 3 検体でマウスでの分離が陽性となった。農家飼育牛から採取した生乳は直接 PCR を実施しなかったが、20 検体中 7 検体（14.0%）でマウスでの分離が陽性となった。マウス血清抗体価は 32 倍～512 倍であった。と畜場で採取した乳房内残乳 71 検体中 44 検体で直接 PCR をおこなったところ、10 検体（22.7%）で陽性となり、マウスでの分離は 71 検体中 11 検体（15.5%）で陽性となった。マウスでの分離が陽性となったマウスの血清抗体価は 32 倍～128 倍であった。生乳の結果をすべてまとめると直接 PCR で 104 検体中 46 検体（44.2%）で遺伝子が検出され、151 検体中 56 検体（37.1%）でマウスでの分離が陽性となった。マウスでの血清抗体価は 32 倍～512 倍であった。生乳から高率に分離されたことから、次に、市販乳における *C. burnetii* の汚染状況を調査した。

特別牛乳（未殺菌乳）は 1 ロットを調べたところ、5 検体中 3 検体（60.0%）で直接 PCR 陽性となり、3 検体（60.0%）でマウスでの分離陽性となった。陽性マウスの血清抗体価は 32 倍～128 倍であった。62℃30 分殺菌乳は、43 検体中 38 検体（88.4%）で直接 PCR 陽性、43 検体中 15 検体（34.9%）でマウスでの分離陽性となった。63℃30 分殺菌乳は 35 検体中 16 検体（45.7%）で直接 PCR 陽性、35 検体中 7 検体（20.0%）でマウスでの分離が陽性となった。マウスの血清抗体価は 32 倍～256 倍であった。一方、85℃15 秒および 120℃2 秒殺菌乳は、9 検体中 6 検体（66.7%）、10 検体中 8 検体（80.0%）と直接 PCR でそれぞれ陽性となったが、マウスでの分離はどちらも陰性であった。

## 考 察

生乳の直接 PCR による遺伝子検出で 44.2%、マウスでの分離で 37.1% と高率



に検出されたことから、*C. burnetii* が乳牛に広く浸淫していることが明らかとなった。直接 PCR で検出されなかった 3 検体がマウスでの分離で陽性となったことから、これらの乳牛での乳中への排出菌数は低いと考えられた。しかしながら、マウスでの分離で陽性となったものの中には、血清抗体価が 5 1 2 倍になるものがあり、乳中の菌数が高いものも存在する可能性が示唆された。市販乳調査では、6 2 °C 3 0 分および 6 3 °C 3 0 分殺菌乳で直接 PCR により 8 8 . 4 % または 3 4 . 9 % でそれぞれ遺伝子が検出され、3 4 . 9 または 2 0 . 0 % でそれぞれマウスからの分離は陽性であった。マウスでの分離が陽性であった牛乳の製造会社の温度記録によると 6 3 . 0 °C 以上の温度で 3 0 分処理されており、温度の上昇および下降は 1 - 2 分以内におこなわれていた。アメリカでの *C. burnetii* の熱抵抗性に関する研究で、*C. burnetii* は華氏 1 4 3 ° F 3 0 分の加熱では生残するが、華氏 1 4 5 ° F ( 6 2 . 8 °C ) 3 0 分の加熱では死滅するとされている (1)。今回の研究では、6 3 °C 3 0 分加熱の市販乳から *C. burnetii* が分離されたことから、日本に浸淫している *C. burnetii* 株は熱抵抗性が高い可能性が考えられた。しかし、牛乳由来の Q 熱患者はこれまで明らかとなっておらず、これまでの Q 熱患者は牛乳以外の感染源から感染した可能性が高いと考えられた。

これらの結果から、日本の *C. burnetii* 株は熱抵抗性は高いが、病原性は低い可能性も考えられた。しかしながら、牛乳からの *C. burnetii* 感染の可能性はないとはいえないことから、牛乳の適切な殺菌温度については検討する必要があると考えられた。

#### 参考文献

- 1 . Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance, 1995 revision, FDA

表 1

	検体数	直接PCR 陽性数/検体数 (%)	マウスでの分離 陽性数/検体数 (%)
<b>生 乳</b>			
乳業会社原乳	61	36/61 (59.0)	38/61 (62.3)
農家飼育牛生乳	20	NT	7/20 (14.0)
乳房内残乳	71	10/44 (22.7)	11/71 (15.5)
生乳合計	152	46/105 (43.8)	56/152 (36.8)
<b>市 販 乳</b>			
特別牛乳 (未殺菌)	5	3/5 (60.0)	3/5 (60.0)
62°C30分殺菌	43	38/43 (88.4)	15/43 (34.9)
63°C30分殺菌	37	18/35 (51.4)	9/35 (25.7)
65°C30分殺菌	2	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)
75°C15分殺菌	4	2/4 (50.0)	0/4 (0.0)
80°C15分殺菌	1	1/1 (100.0)	0/1 (0.0)
85°C15分殺菌	1	1/1 (100.0)	0/1 (0.0)
85°C15秒殺菌	12	7/12 (58.3)	0/12 (0.0)
120°C2秒殺菌	10	8/10 (80.0)	0/10 (0.0)
130°C2秒殺菌	7	5/7 (71.4)	0/7 (0.0)
市販乳合計	122	84/122 (68.9)	27/122 (22.1)

NT. not tested