

表9 腸炎ビブリオ O3:K6 検出のための直接塗沫と免疫磁気ビーズの比較

Samples	Plating after		immunomagnetic separation	
	Direct plating		TCBS	
	TCBS	CHROMagar	TCBS	CHROMagar
A	2/10* (20.0%)	2/12 (16.7%)	4/25 (16.0%)	10/24 (41.7%)
B	1/10 (10.0%)	3/12 (25.0%)	4/26 (15.4%)	14/24 (58.3%)
C	2/12 (16.7%)	6/12 (50.0%)	5/25 (20.0%)	8/22 (36.4)
D	3/9 (33.3%)	4/7 (57.1%)	7/18 (38.9%)	4/18 (22.2%)
Total	8/41 (19.5%)	16/45 (35.6%)	20/72 (27.8%)	36/88 (40.9%)

* O3 と K6 の凝集反応陽性コロニー数 / 全コロニー数

表10 腸炎ビブリオ分離における TCBS と CHROMagar 比較

		TCBS	CHROMagar
Oct week 2	A	0/56/64*	2/77/80
	B	4/11/17	31/48/62
	C	0/125/128	0/118/128
	D	4/55/64	7/72/80
Oct week 3	A	0/1/2	0/10/10
	B	0/52/55	1/63/63
	C	0/21/58	28/98/102
	D	0/33/36	0/50/64
Oct week 4	A	0/50/56	4/86/88
	B	0/64/68	0/87/92
	C	0/29/32	0/125/128
	D	0/25/40	0/88/88
Total	8/522/620 (1.5%, 84.2%) (1.3%)	73/922/985 (7.9%, 93.6%) (7.4%)	

*K6 凝集コロニー/腸炎ビブリオと同定されたコロニー/ 釣菌したコロニー

表 1 1 腸炎ビブリオ分離における TCBS と CHROMagar の比較 (採取海域ごとに集計)

	TCBS	CHROMagar
A	0/107/122 *	6/173/178
B	4/127/140	32/198/217
C	0/175/218	28/341/358
D	4/113/140	7/210/232
Total	8/522/620 (1.5%, 84.2%) (1.3%)	73/922/985 (7.9%, 93.6%) (7.4%)

*K6 凝集コロニー/腸炎ビブリオと同定されたコロニー / 鈎菌したコロニー

病原性 *Yersinia enterocolitica* の熱抵抗性に関する研究

東京農工大学農学部 林谷 秀樹

研究要旨

Yersinia enterocolitica において代表的な病原性血清型である O:3、O:5,27、O:8 および O:9 の熱抵抗性を培養温度ごとに比較検討すると同時に、培養温度が熱抵抗性に関与する理由の一つとして菌体外タンパク (*Yersinia outer membrane protein*, 以下 YOP) が関わっている可能性を考えて、YOP をコードするプラスミドを脱落させた上記菌株を作成し、同一条件での熱抵抗性を比較し、以下の結果を得た。

1) O:3、O:5,27 および O:8 ではいずれの菌株とも 7℃ ならびに 25℃ で培養した菌の 60℃ での D 値 (菌数が 1/10 に減少するのに要する時間) はほぼ近似していたが、37℃ で培養したものの D 値はいずれの菌株においても 7℃ ならびに 25℃ で培養した菌に比べその値は倍程度高かった。また、各血清型間ではいずれの培養温度における D 値もほぼ近似した値を示した。一方、O:9 の D 値は 7℃、25℃ ならびに 37℃ で培養した菌のいずれともほぼ近似した値を示し、また、37℃ 培養のもの D 値は他の血清型菌とほぼ近似した値を示したが、7℃ と 25℃ 培養菌では他の血清型菌よりも高い値を示した。これらのことから、*Y. enterocolitica* においては培養温度が高いと熱抵抗性が高まる傾向はみられたが、この現象は全ての菌株で発現するのではなく、血清型あるいは菌株により異なる可能性が示された。

2) O:3、O:5,27、O:8 および O:9 菌の全ての菌株においてプラスミド保有株と脱落株の D 値はいずれの培養温度でもほぼ近似した値を示し、差は認められなかった。これらのことから、YOP の存在の有無は *Y. enterocolitica* の熱抵抗性に影響を与えていないものと思われた。

A. 研究目的

Yersinia enterocolitica は食品や水を介して経口的に人に感染し、腸炎等を起こす代表的な食中毒原因菌の一つであり、4℃ 以下でも発育可能な低温菌としても知られている (16, 27, 30)。本菌の病原因子の一つとして、プラスミド上の遺伝子にコードされている菌体外タンパク (*Yersinia Outer membrane Protein*, 以下 YOP) がある。YOP には現在までに約 10 種類の存在が知られ、菌の腸管上皮細胞への付着やマクロファージの食

作用に対する阻害等に関与していることが明らかになっている(6, 14, 22)。YOPの産生は温度依存性で、培養温度が37℃の時に発現し、25℃では産生されない³⁾。

食品衛生上、加熱は食品の腐敗や人へ危害を与える可能性のある微生物を死滅させ、食品の安全性を守るための重要な殺菌処理法のひとつである。食品の加熱処理を行う場合、当然のことながら殺菌の対象となる細菌等の微生物の熱に対する抵抗力を把握する必要がある。その際、加熱処理による微生物の死滅に関与する種々の環境因子についても考慮しなければならない。細菌の熱抵抗性は培養温度、培養時間、pH等多くの要因の影響を受けることが知られている^{5, 8, 26)}。Y. *enterocolitica*の熱抵抗性についても様々な研究が行われており^{9, 11, 12, 20, 21, 28, 31)}、Paganら²⁵⁾はY. *enterocolitica*の熱抵抗性は菌の培養温度と関連があることを明らかにしている。しかし、この研究において供試された菌株は病原性や血清型の不明な1株だけであり、この現象が病原性Y. *enterocolitica*において普遍的に起こりうるものかどうかは明らかでなく、またこの現象が発現する機構についても不明なままである。

これらのことから、本研究ではY. *enterocolitica*の代表的な病原性血清型であるO:3、O:5, 27、O:8およびO:9の菌株を用いて、これらの菌株の熱抵抗性を発育温度ごとに比較検討すると同時に、発育温度が熱抵抗性に関与する理由のひとつとして、37℃培養で産生されるYOPが熱抵抗性と関わっている可能性を考え、YOPをコードするプラスミドを脱落させた上記菌株を作成し、同一条件で熱抵抗性を検討し、YOPと熱抵抗性との関係についても考察した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試菌株としてY. *enterocolitica*血清型O:3、O:5, 27、O:8¹³⁾、O:9(以下、それぞれO:3(+)、O:5, 27(+)、O:8(+)、O:9(+))とする)とこれらのプラスミド脱落株(以下、それぞれO:3(-)、O:5, 27(-)、O:8(-)、O:9(-))とする)の計8株を用いた。これらの菌株はstock culture agar

(Difco)の高層培地に穿刺し、25℃24時間培養後、使用するまで4℃で保存した。なお、プラスミド脱落株は以下のように作成した。プラスミドを保有する菌株をマグネシウムオキサレート培地(Blood Agar Base 40g/l、Glucose 1.8016g/l、20mM MgCl₂、20mM Na₂C₂O₄)に接種し、25℃と37℃で48時間培養した。そして、37℃で培養した培地上で発育して

きたコロニーから、25℃で培養した培地上のコロニーと同程度の大きさを示すコロニーを釣菌し、tripticase soy agar 平板培地 (BBL、以下 TSA) で 25℃ 48 時間培養した。純培養した菌はカルシウム依存性¹⁰⁾および自己凝集性¹⁹⁾の病原性状試験を調べて陰性であることを確認した後、Kado & Liu¹⁵⁾の方法によりプラスミドの分離を行い、最終的にプラスミドがないことを確認した菌株をプラスミド脱落株とした。

2. 熱抵抗性試験

1) 菌液の調整

定常期に達した菌は熱抵抗性の指標となる D 値 (decimal reduction time value) が安定していることから²⁵⁾、熱抵抗性試験で用いる菌は、菌の発育段階が対数増殖期から定常期に達した直後の菌液を用いることとした。定常期に達した直後の菌は、各供試菌株ごとに tripticase soy broth 液体培地 (BBL、以下 TSB) で培養後、一定時間ごとの菌量と菌液の吸光度との関係を探り、その成績から定常期に達した直後の菌液の吸光度値から推定して得ることとした。培養液中の菌量と吸光度との関係は以下のように調べた。供試菌株を TSA 平板培地で 25℃ 48 時間培養後、TSB 20 ml に 10^4 /ml となるように菌を接種し、7℃、25℃および 37℃の異なる 3 つの培養温度でそれぞれ培養した。そして一定時間ごとに菌液の吸光度を 600 nm の波長で吸光度計 (GeneQuant pro, pharmacia Biotech) を用いて測定した。また、同時にリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, pH 7.2, 以下 PBS) で適当な菌数になるように 10 倍階段希釈した菌液を TSA 平板培地に塗抹し、25℃で 48 時間培養後、発育してきたコロニー数をカウントして菌液中の菌数を測定した。そして、各菌株について各培養温度ごとに定常期に達した直後の菌液の吸光度ならびに定常期に達するまでの時間を調べ、これらの成績から熱抵抗性試験に供試する菌液の作成を行った。

2) 加熱処理

加熱処理の方法については図 1 に示す方法で行った。まず、定常期に達した直後の菌液を、滅菌したシリンジバイアル (15 mm × 40 mm、容量 3 ml、日電理化硝子) に 1 ml ずつ分注し、密封した。そして、菌液の入ったシリンジバイアルを 60℃に調整した恒温槽の温水中に入れ、菌液の温度が 60℃に達した時点、ならびにそれ以後 20 秒間隔ごとにバイアルを取り出し、直ちに氷水中で冷却した。菌液中の温度は温度測定用センサー (SE6951, 安立計器)

をつけた TSB 1ml が入ったシリンジバイアルを、菌液の入ったシリンジバイアルと同時に温水中に入れて測定し、データコレクタ (AM-7002K, 安立計器) を用いて管理した。熱抵抗性の試験は、いずれの菌株とも各培養温度につき 3 検体ずつ行った。

3) 菌数の測定

熱処理後、氷冷した菌液は、PBS で 10 倍階段希釈し、適当な菌数になるように希釈したものをそれぞれ 0.1ml ずつ TSA 平板培地に塗抹し、25℃ で 48 時間培養した。培養後、平板培地に発育してきたコロニーをカウントし、菌数を測定した。

4) D 値 (decimal reduction time value) の算出

D 値は、加熱試験により細菌の菌数が 1/10 に減少するのに要する時間である。D 値は生残菌数の対数と加熱時間とで描かれる生残菌数曲線の傾きから菌数が 1/10 に減少する時間 (分) を計算し、算出した¹⁾。

C. 研究結果

1. 各培養温度における菌数と吸光度

接種菌 ($10^4 / \text{ml}$) が、約 $10^9 / \text{ml}$ 前後の菌数まで増殖して定常期に達するまでの各培養温度における培養時間は、7℃ 培養の場合はいずれの菌株とも 92 時間、25℃ 培養菌の場合はいずれの菌株とも 14 時間、37℃ 培養の場合は O:3(+), O:5, 27(+), O:3(-), O:5, 27(-), O8(-) および O:9(-) 14 時間、O:8(+) は 16 時間、O:9(+) は 18 時間であった。また、菌数が定常期に達した時の吸光度はいずれの菌株とも概ね 0.4 前後であった。これらの結果に従って、菌は所定の時間培養後、吸光度が 0.4 に達していることを確認したものを加熱試験の供試菌液とした。なお、加熱試験に際し、予備実験の成績から菌液が 60℃ に達したときに菌数がおおよそ $10^6 / \text{ml}$ になるような濃度に滅菌生理食塩水で希釈したものを供試菌液として用いた。

2. 加熱処理後の菌数の消長

加熱処理による菌数の消長を図 2~5 に示した。

病原性 *Y. enterocolitica* 血清型 O:3, O:5, 27 および O:8 についてはプラスミド保有株、脱落株のいずれも加熱処理後、おおむね同じ減少傾向を示した。すなわち、7℃ と 25℃ 培養菌では 0 秒後の時点で $10^6 / \text{ml}$ 程度の菌数が時間の経過とともに急速に減少していき、40 秒から 60 秒経過後には $10^1 / \text{ml}$ 以下の菌

数になった。一方、37℃培養菌では7℃と25℃培養菌に比べ菌数の減少は緩やかで、100秒から120秒経過後に $10^1/\text{ml}$ 以下になった。

血清型 O:9 はプラスミド保有株、脱落株いずれとも、他の血清型菌とは異なる菌の減少傾向を示した。すなわち、この2菌株は培養温度の違いにより、菌の減少の姿に差は認められず、3つの培養温度いずれにおいても、 $10^6/\text{ml}$ 程度の菌数が、100秒経過後に $10^1/\text{ml}$ 以下の菌数に減少した。

3.60℃におけるD値

図6は各供試菌株の培養温度別にみたD値を示したものである。

培養温度別にみた生残菌数曲線の姿が同じ傾向を示した O:3(+), O:5,27(+), O:8(+), O:3(-), O:5,27(-) および O:8(-) の60℃におけるD値は、7℃培養菌ではそれぞれ0.18, 0.12, 0.19, 0.15, 0.17 および0.17, 25℃培養菌ではそれぞれ0.17, 0.12, 0.19, 0.14, 0.16 および0.17で、7℃および25℃培養菌のD値はいずれの菌株においてもよく近似していた。また、これらの37℃培養菌の60℃におけるD値は、それぞれ0.32, 0.31, 0.32, 0.25, 0.29 および0.29で、いずれの菌株とも7℃ならびに25℃培養菌のD値に比べて高い値を示した。一方、O:9(+)とO:9(-)の60℃におけるD値は、7℃培養菌では0.32と0.29、25℃培養菌では0.31と0.28、37℃培養菌では0.31と0.25で、両菌株ともいずれの培養温度においてもD値はよく近似していた。また、これらの菌株における37℃培養のものD値は他の血清型菌とほぼ近似した値を示したが、7℃と25℃培養菌では他の血清型菌よりも高かった。

D. 考察

今回、*Y. enterocolitica* 病原性血清型 O:3、O:5,27、O:8 および O:9 について、これらの菌株の熱抵抗性について調べた。その結果、O:3、O:5,27、O:8 ではいずれの菌株とも7℃ならびに25℃で培養した菌の60℃でのD値はほぼ近似した値を示し、また、各血清型間でもそれぞれの培養温度におけるD値はほぼ同じ値を示した。しかし、37℃培養したもののD値はいずれの菌株においても7℃ならびに25℃で培養した菌に比べその値は倍程度高かった。一方、O:9のD値は7℃、25℃ならびに37℃で培養した菌のいずれともほぼ近似した値を示し、また、37℃培養のものD値は他の血清型菌とほぼ近似した値を示したが、7℃と25℃培養菌では他の血清型菌よりも高い値を示した。これらのことから Pagen ら²⁵⁾ が報告した、*Y. enterocolitica* の

37℃培養菌は25℃以下で培養した菌に比べ、熱抵抗性が高いという成績は、O:3、O:5,27、O:8の3血清型菌では該当したが、O:9には当てはまらなかった。従って、今回の成績からみる限り、病原性 *Y. enterocolitica* においては培養温度が高いと熱抵抗性が高まる傾向はみられるものの、この現象は全ての菌株で発現するのではなく、血清型あるいは菌株により異なる可能性が示された。O:9だけが他の血清型菌に比べ発育温度による熱抵抗性が見られなかったことは興味深い現象であり、O:9は他の血清型菌とは異なる熱に対する抵抗機構を有する可能性が考えられるが、今回、血清型O:9で1株を供試したのみであり、この現象がこの血清型に普遍的にみられるかは現時点で明らかではなく、今後他の血清型菌も含め、さらに供試菌株を増やして詳細に検討していく必要があるものと思われる。

本研究において、O:9では観察されなかったものの、O:3、O:5,27およびO:8の3血清型菌では、37℃で培養した菌の熱抵抗性が25℃以下の低い温度で培養した菌の熱抵抗性よりも高かった。この理由として、*Y. enterocolitica* の病原性血清型菌において37℃で培養した場合に産生されるYOPが熱抵抗性と関わっている可能性が考えられたため、YOPの産生に関与する遺伝子がコードされている約42メガダルトンのプラスミドを脱落させ、YOPを産生しなくなった菌株を作成し、プラスミド保有菌株と脱落株との間で熱抵抗性の違いについて比較検討した。その結果、O:3、O:5,27、O:8およびO:9の全ての菌株においてプラスミド保有株とプラスミド脱落株のD値はいずれの培養温度でもほぼ近似した値を示し、両者間で差は認められなかった。これらのことから、YOPの存在の有無は、37℃で培養した *Y. enterocolitica* の熱抵抗性が高い原因にはなっていないものと思われた。

Aeromonas hydrophila や *Listeria monocytogenes* など、いくつかの細菌については、菌の熱抵抗性と培養温度との関係について検討がなされ、培養温度により菌の熱抵抗性が変化することが指摘されている^{4,8)}。菌の培養温度が高いと熱抵抗性が高まる理由の一つに、細菌が熱感作を受けると菌体外に産生するタンパク、すなわちヒートショックプロテイン (Heat shocked protein, HSP) の影響が考えられる。HSPの産生は、細菌が熱感作を受けたときに自己を守るための防御機構であるが、このタンパクは熱以外のストレスを受けたときにも産生され、熱以外の他の外界からのストレスに対する耐性を高めることも知られている^{23,24)}。細菌の産生するHSPは60~70キロダルトンのものが多く、*Y. enterocolitica* も60キロダ

ルトンの HSP を産生することが明らかになっている。Shenoy ら²⁹⁾ は *Y. enterocolitica* O:8 を 45℃ で 60 分間感作させてヒートショックを起こした菌株と熱感作させていない同一の菌株を用いて、55℃ ならびに 60℃ での熱抵抗性を比較し、熱感作した菌の方が高い熱抵抗性を示したことを報告し、このことから HSP が熱抵抗性に関与している可能性が高いことを指摘している。しかし、Pagan ら²⁵⁾ は、4℃ と 37℃ で培養後、54℃ と 57℃ で熱処理した *Y. enterocolitica* を TSAYE 培地と 2% NaCl を含む TSAYE 培地の両方で培養し、両方の培地に発育してきた菌数を比較することで熱感作により傷害された菌数の割合をみたところ、培養温度の違いにより障害を受けた菌の割合に差がみられなかったことから、HSP は培養温度による *Y. enterocolitica* の熱抵抗性の違いに関与していないものと推測している。また、37℃ の培養温度で *Y. enterocolitica* がヒートショックを起こし、HSP を産生するか否かも現時点では不明であり、今後、これらのことについても検討する必要がある。

熱抵抗性に関与する他の要因として、培養温度により細胞膜の変化や細胞膜の脂肪酸組成が変化することの影響が指摘されている^{2,7,17)}。Tsuchiya ら³²⁾ は 5℃、25℃ および 37℃ で培養した *Y. enterocolitica* の細胞膜における脂肪酸組成を調べ、培養温度が 5~25℃ までは不飽和脂肪酸の割合は高いが、37℃ の培養では急激に不飽和脂肪酸の割合が減少することを報告しており、このことが培養温度による熱抵抗性の違いに関与している可能性が考えられる。しかし、本研究では *Y. enterocolitica* の細胞膜組成については検討しておらず、今後の検討課題となった。

食品や水を汚染する病原体の殺菌法として、加熱処理は古くから最も有効確実な方法として利用されてきた。*Y. enterocolitica* は比較的熱に感受性の高い菌であるが、本研究により、血清型や菌株または培養温度により熱抵抗性が異なる可能性が示された。Kushal ら¹⁸⁾ は、62.8℃ で 30 分間低温殺菌を行い培養できない状態に不活化された *Y. enterocolitica* が、その後 10℃ で 8~10 日間培養すると培養可能な状態に回復することがあることを報告しており、不確実な加熱殺菌では、障害を受けた本菌が比較的速やかに回復する可能性のあることも考慮に入れて、今後食品等における *Y. enterocolitica* の加熱処理法を確立していく必要がある。

参考文献

- 1) 相磯和嘉, 1976. 食品微生物学, 医歯薬出版, 東京

- 2) Beuchat, L.R., 1978. Injury and repair of gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. *Adv. Appl. Microbiol.* 23:219-243.
- 3) Bolin, I., Portnoy, A., and Wolf-Watz, H., 1985. Expression of the temperature-inducible outer membrane protein of yersiniae. *Infect. Immun.* 48:234-240.
- 4) Condon, S., Garcia, M.L., Otero, A., and Sala, F.J., 1992. Effect of culture age, pre-incubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* 72:322-326.
- 5) Condon, S., Palop, A., Raso, J., and Sala, F.J., 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:149-152.
- 6) Cornelis, G., Biot, T., Lambert de Rouvroit, C., Michiels, T., Mulder, B., Sluiter, C., Sory, M.-P., Van Bouchaute, M., and Vanooteghem, J.-C., 1989. The *Yersinia* yop regulon. *Mol. Microbiol.* 3:1455-1459.
- 7) Earnshaw, R.G., 1995. Understanding physical inactivation process: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. J. Food. Microbiol.* 28:197-219.
- 8) Farber, J.M., Daley, E., Coates, F., Emmons, D.B., and Mckellar, R., 1992. Factors influencing survival of *Listeria monocytogenes* in milk in a high-temperature short-time pasteurizer. *J. Food Prot.* 55:946-951.
- 9) Francis, D.W., Spaulding, P.L., and Lobett, J., 1980. Enterotoxin production and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:174-176.
- 10) Gemski, P., Lazere, J.R., and Casey, T., 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 27:682-685.

- 11) Hanna, M.O., Stewart, J.C., Carpenter, Z. L., and Vanderzant, C., 1977. Effect of heating, freezing, and pH on *Yersinia enterocolitica*-like organisms from meat. J. Food Prot. 40:689-692.
- 12) Hanna, M.O., Stewart, J.C., Carpenter, Z.L., and Vanderzant, C., 1977. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* in skim milk. J. Food Sci., 42:1134.
- 13) Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Kaneko, K., Kosuge, J., Kato, M., Ogawa, M., and Kapperud, G., 1995. Potential source of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori prefecture, Japan. J. Clin. Microbiol. 33:1253-1257.
- 14) Heesemann, J., and Gaede, K., 1989. Mechanisms involved in the pathogenesis of *Yersinia* infections. Rheum. Int. 9: 213-217.
- 15) Kado, C.I., and Liu, S.T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145:1365-1373.
- 16) Kapperud, G., 1991. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. Int. J. Food Microbiol. 12:53-56.
- 17) Katsui, N., Tsuchido, T., Takano, M., and Shibasaki, I., 1981. Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid composition. J. Gen. Microbiol. 122:357-361.
- 18) Kushal, R., and Anand, S.K., 1999. Repair and recovery of thermally injured cells of *Yersinia enterocolitica* in milk. J. Food Prot. 62:1203-1205.
- 19) Laird, W., and Cavanaugh, D.A., 1980. Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. J. Clin. Microbiol. 11:430-432.
- 20) Lovett, J., Bradshaw, J.G., and Peeler, J.T., 1982. Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in milk. Appl. Environ. Microbiol. 44:517-519.
- 21) McMahan, C.M.M., Doherty, A.W., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A., and Hegarty, T., 1999. Synergistic effect of heat and sodium lactate on the thermal resistance of *Yersinia enterocolitica*

- and *Listeria monocytogenes* in minced beef. Lett. Appl. Microbiol. 28:340-344.
- 22) Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J., and Cornelis, G., 1990. Secretion of Yop proteins by yersiniae. Infect. Immun. 58:2840-2849.
- 23) Noll, A., and Autenrieth, I. B., 1996. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. Infect. Immun. 64:2955-2961.
- 24) Noll, A., Bucheler, N., Bohn, E., and Autenrieth, I. B., 1997. Microbial heat shock protein as vaccine. Behring Inst. Mitt 98:87-98.
- 25) Pagan, R., Manas, P., Raso, J., Javier, F., and Trepas, S., 1999. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures. Int. J. Food Microbiol. 47:59-66.
- 26) Palumbo, S. A., Williams, A. C., Buchanan, R. L., and Phillips, J. G., 1987. Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. J. Food Prot. 50:761-764.
- 27) Schiemann, D. A., 1989. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Doyle, M. P (ed.). In Foodborne bacterial pathogens, pp.601-672., Marcel Dekker, New York.
- 28) Shenoy, K., Murano, E. A., and Olson, D. G., 1998. Survival of heat-shocked *Yersinia enterocolitica* after irradiation in ground pork. Int. J. Food Microbiol. 39:133-137.
- 29) Shenoy, K., and Murano, E. A., 1996. Effect of heat shock on the thermotolerance and protein composition of *Yersinia enterocolitica* in brain heart infusion broth and ground pork. J. Food Prot. 59:360-364.
- 30) 塩沢寛治, 1991. *Yersinia enterocolitica*, 坂崎利一編, 食水系感染症と細菌性食中毒, pp.221-250, 中央法規出版, 東京.
- 31) Sorqvist, S., 1989. Heat resistance of *Campylobacter* and *Yersinia* strains by three methods. J. Appl. Bacteriol. 67:543-549.

32) Tsuchiya, H., Sato, M., Kanematsu, N., Kato, M., Hoshino, Y., Takagi, N., and Namikawa, I., 1987. Temperature-dependent changes in phospholipid and fatty acid composition and membrane lipid fluidity of *Yersinia enterocolitica*. Lett. Appl. Microbiol. 5:15-18.

E. 結論

Yersinia enterocolitica において代表的な病原性血清型である O:3、O:5, 27、O:8 および O:9 の熱抵抗性を発育温度ごとに比較検討すると同時に、発育温度が熱抵抗性に関与する理由の一つとして菌体外タンパク (*Yersinia* outer membrane protein、以下 YOP) が関わっている可能性を考えて、YOP をコードするプラスミドを脱落させた上記菌株を作成し、同一条件での熱抵抗性をを比較した結果、病原性 *Y. enterocolitica* においては培養温度が高いと熱抵抗性が高まる傾向はみられたが、この現象は全ての菌株で発現するのではなく、血清型あるいは菌株により異なる可能性が示された。また、YOP の存在の有無は *Y. enterocolitica* の熱抵抗性に影響を与えていないものと思われた。

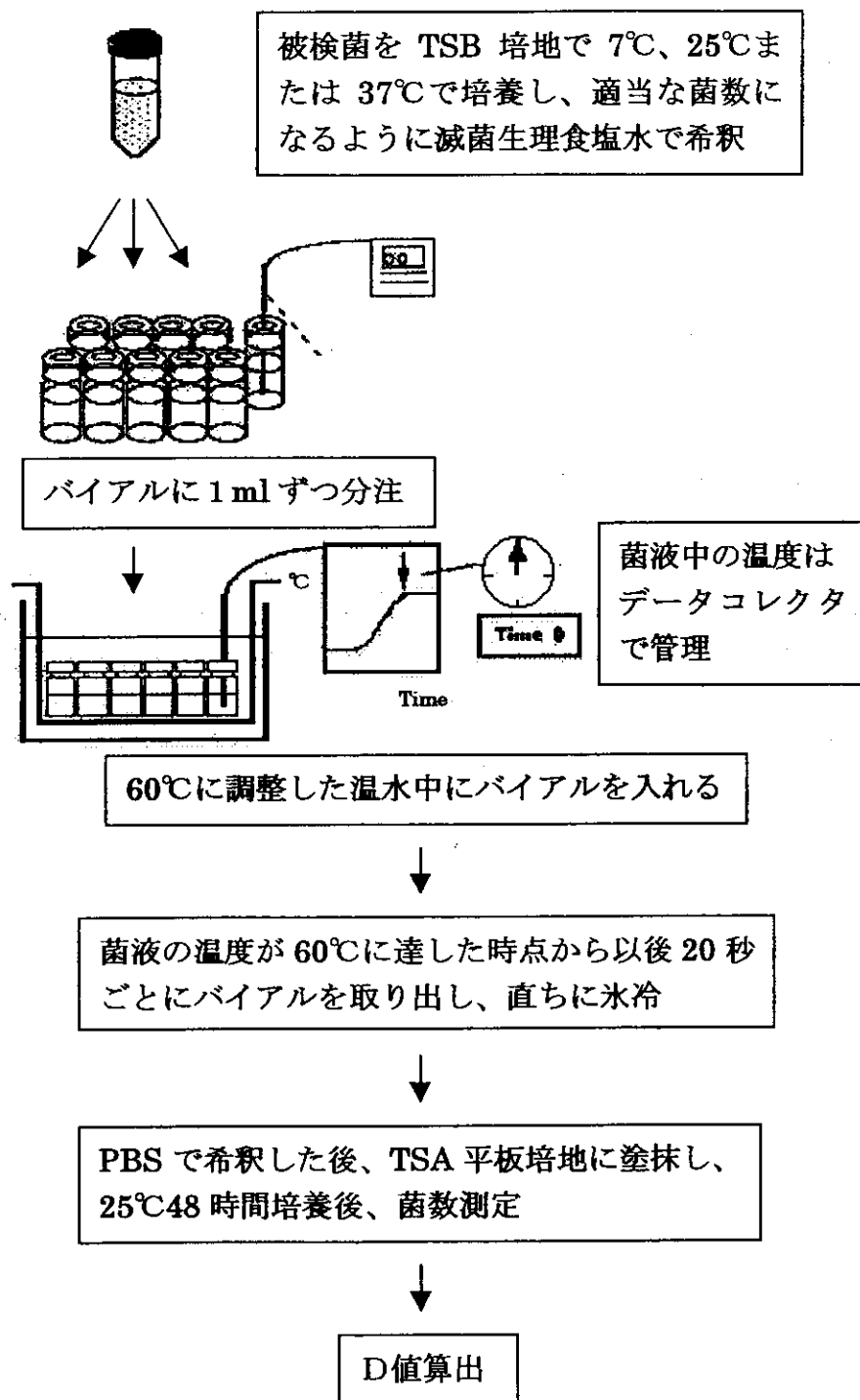


図 1. 熱抵抗性試験の手順

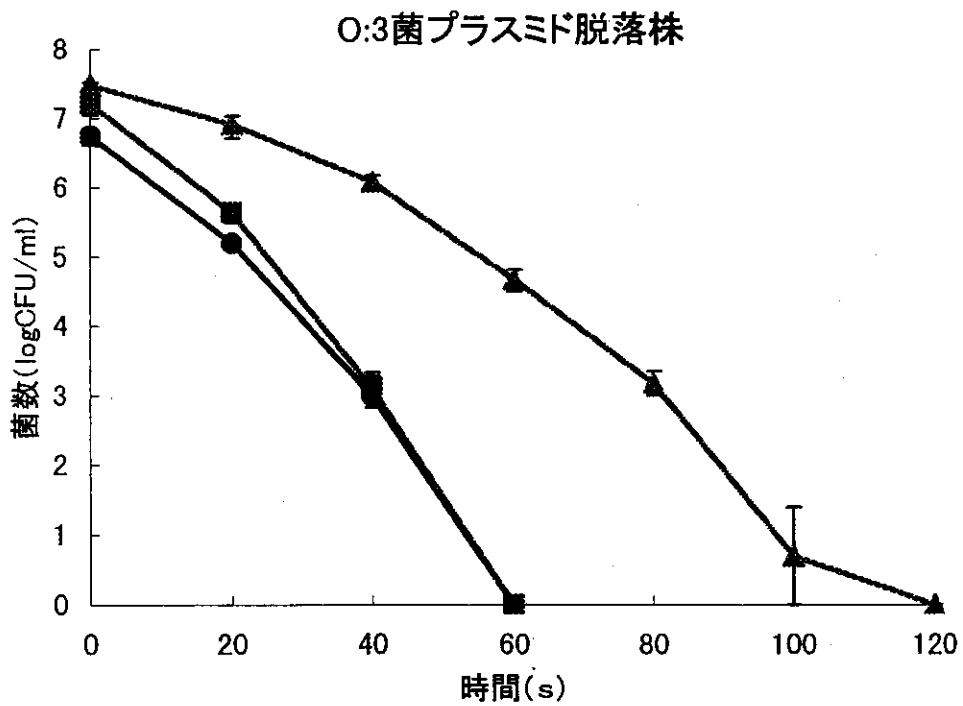
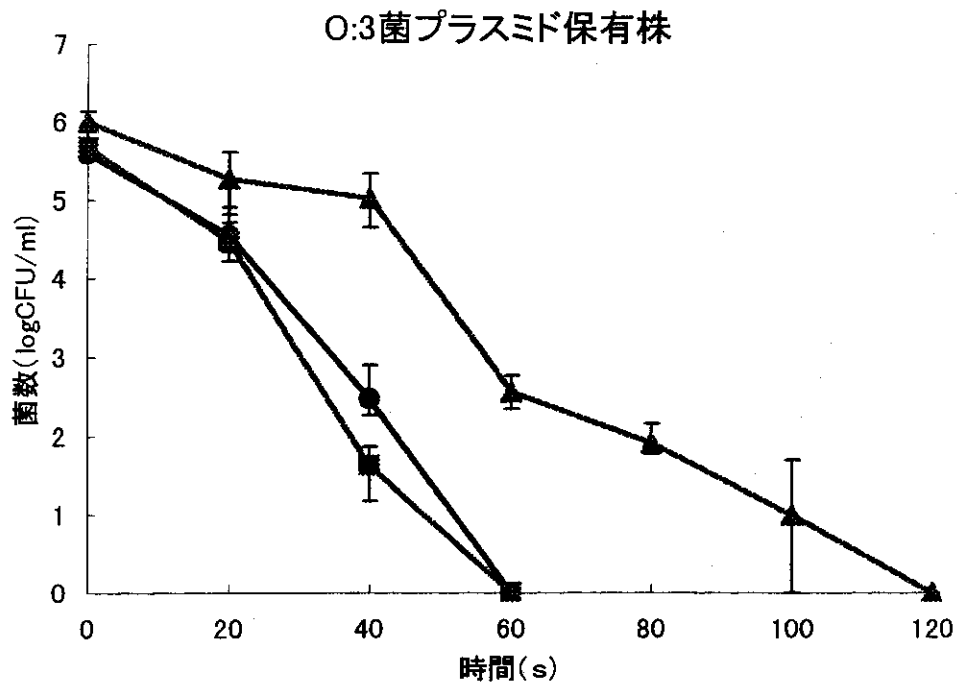


図2. 60°Cで加熱処理後の *Y. enterocolitica* O:3菌プラスミド保有株と脱落株の菌数の消長
 ●: 7°C培養菌 ■: 25°C培養菌 ▲: 37°C培養菌

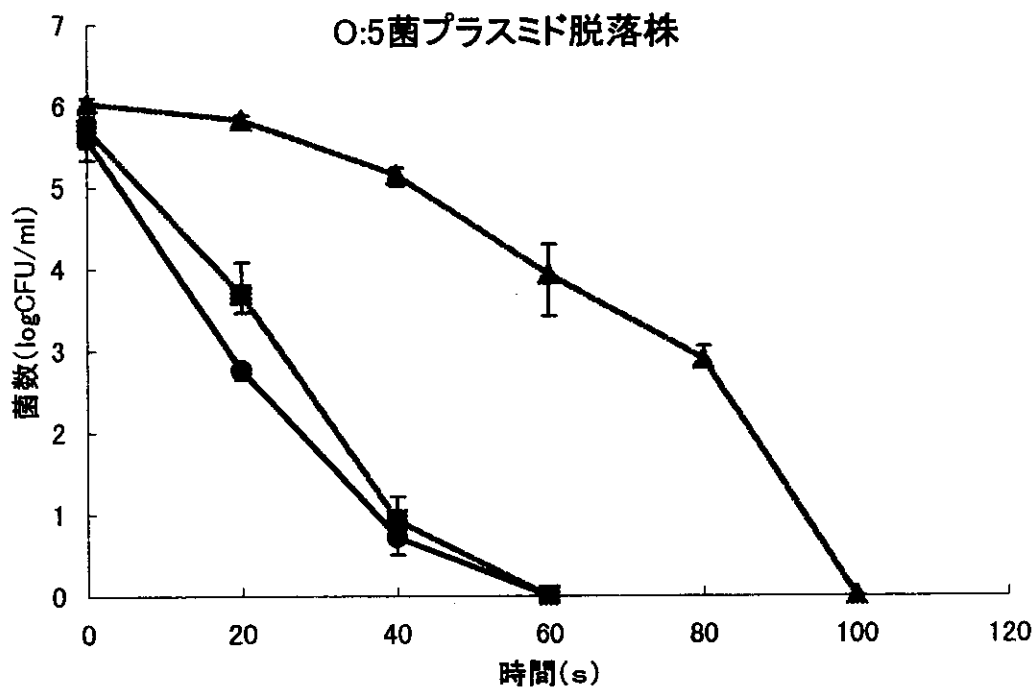
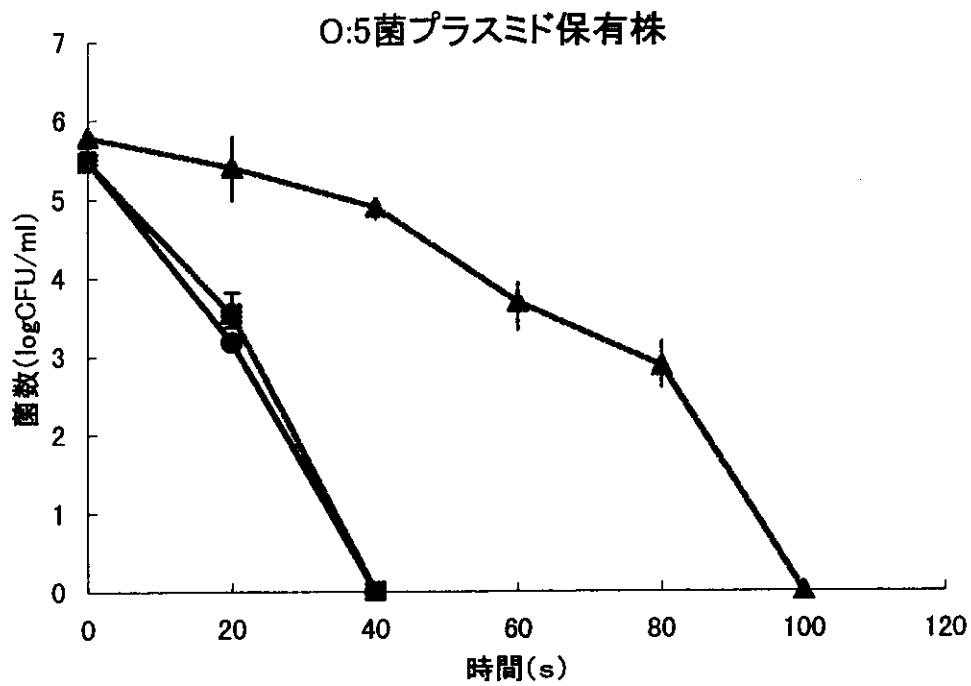


図3. 60°Cで加熱処理後の *Y. enterocolitica* O:5菌プラスミド保有株と脱落株の菌数の消長
 ●: 7°C培養菌 ■: 25°C培養菌 ▲: 37°C培養菌

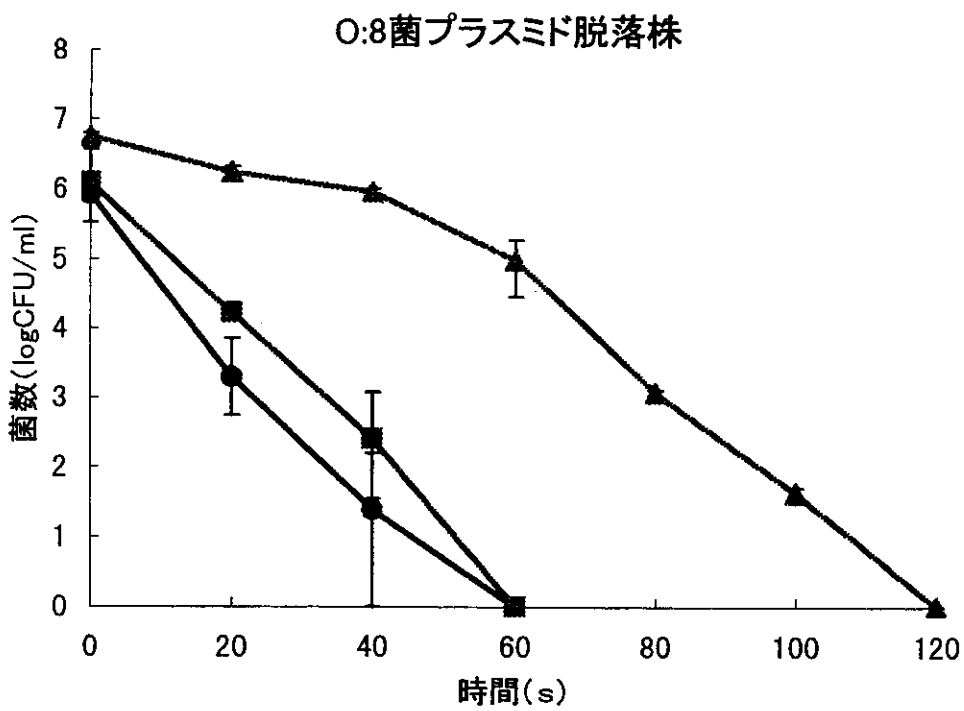
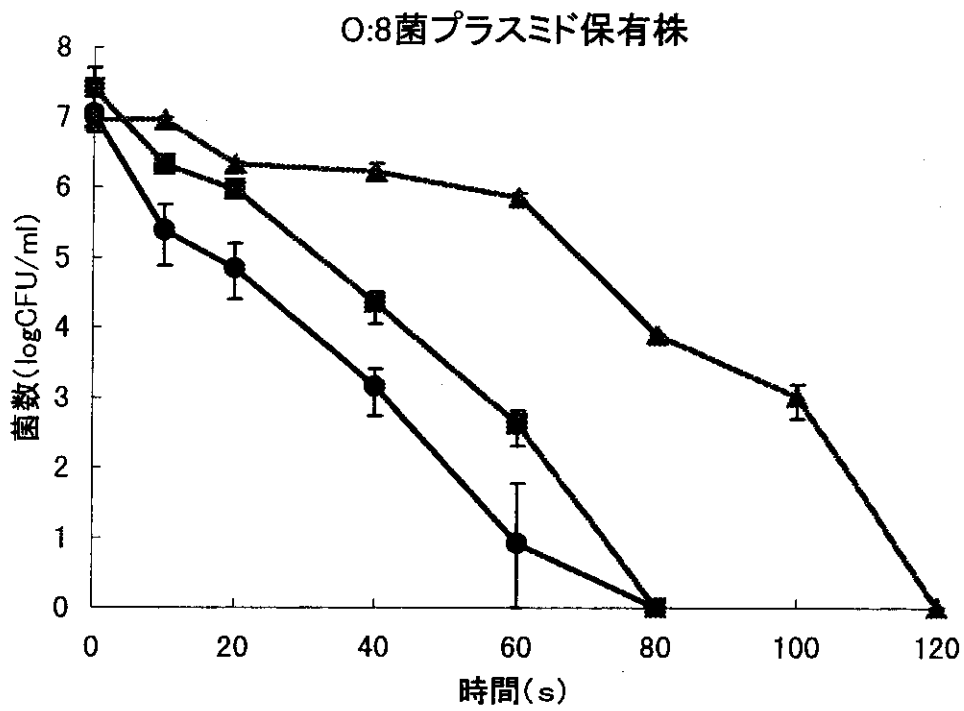


図4. 60°Cで加熱処理後の *Y. enterocolitica* O:8菌プラスミド保有株と脱落株の菌数の消長
 ●: 7°C培養菌 ■: 25°C培養菌 ▲: 37°C培養菌

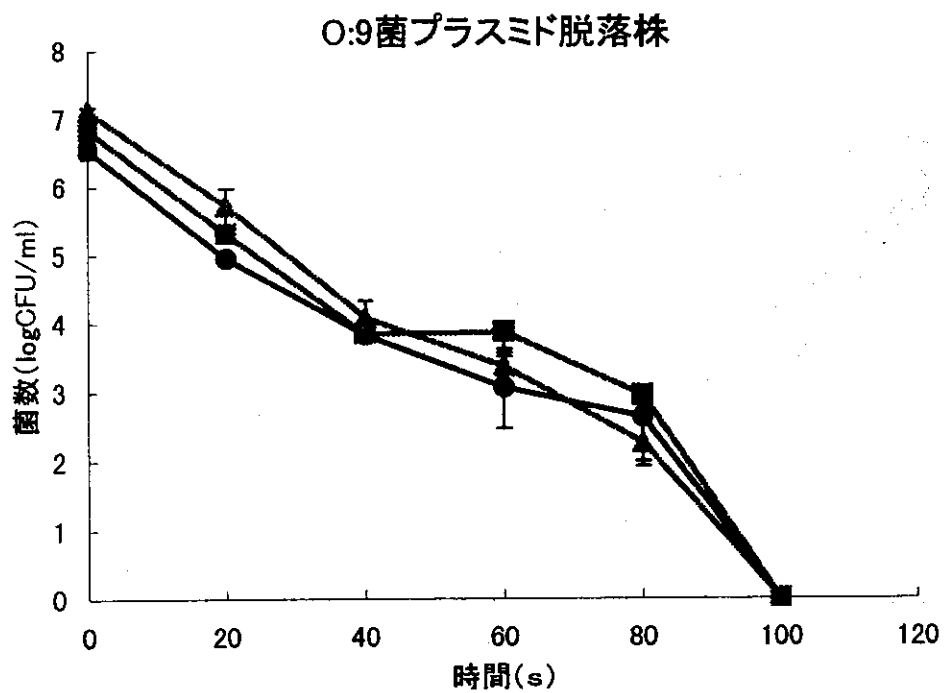
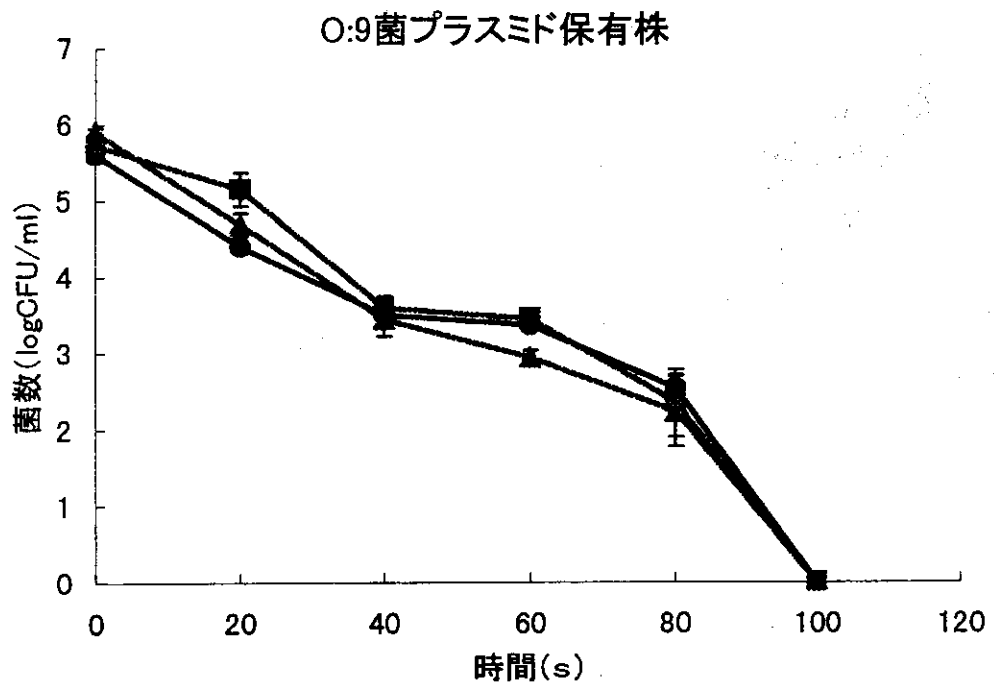


図5. 60°Cで加熱処理後の *Y. enterocolitica* O:9菌プラスミド保有株と脱落株の菌数の消長
 ●: 7°C培養菌 ■: 25°C培養菌 ▲: 37°C培養菌

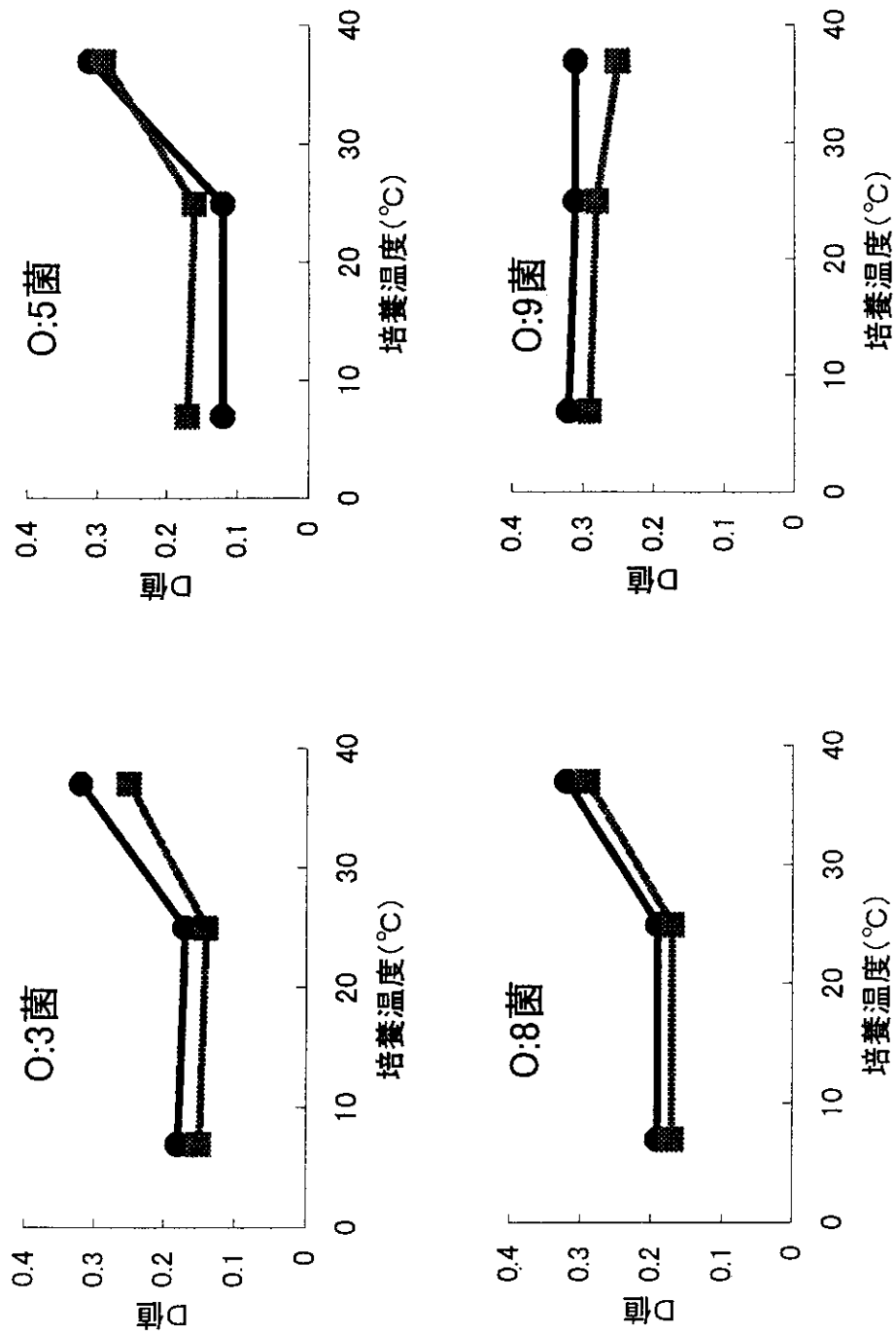


図6・*Y. enterocolitica* の60°CでのD値と培養温度の関係
 ●:プラスミド保有株 ■:プラスミド脱落株