

図2 沿岸4地点の海水中の *V. vulnificus* のMPN値と海水温の推移

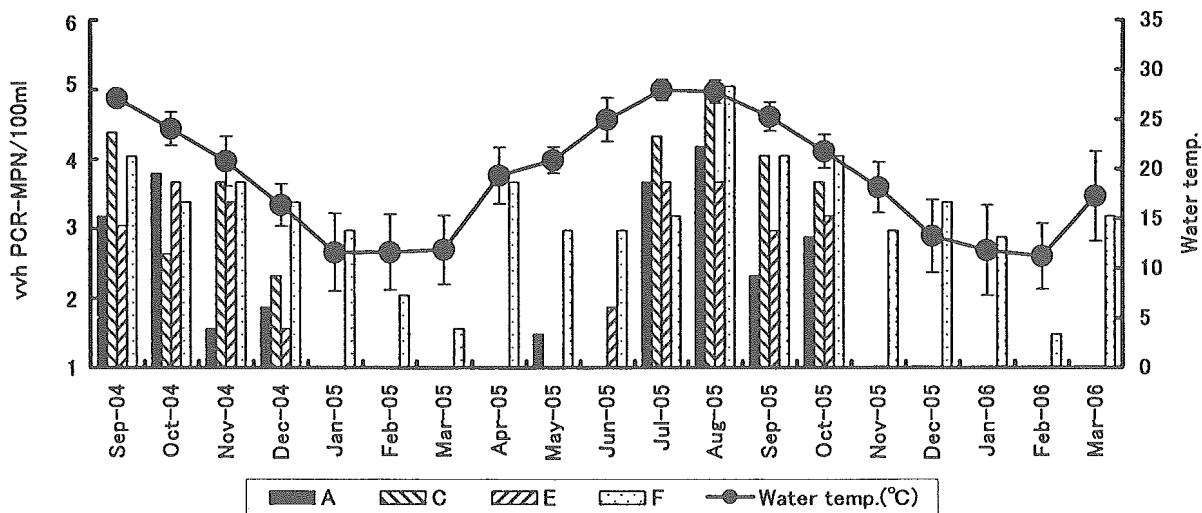


図3 沿岸4地点の海水中のPCR(vvh)-MPN値と海水温の推移

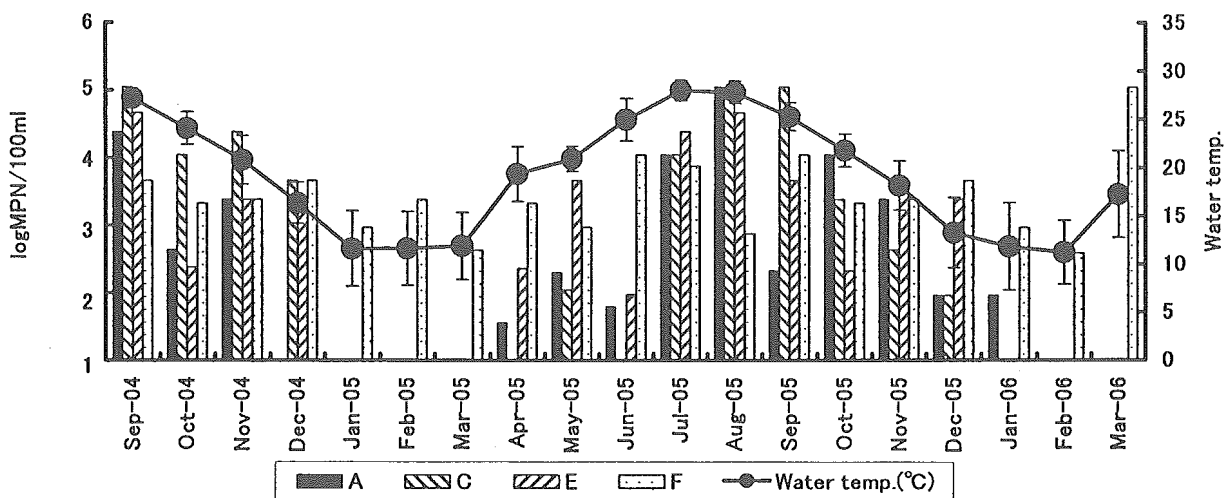


図4 沿岸4地点の海水中の *V. parahaemolyticus* のMPN値と海水温の推移

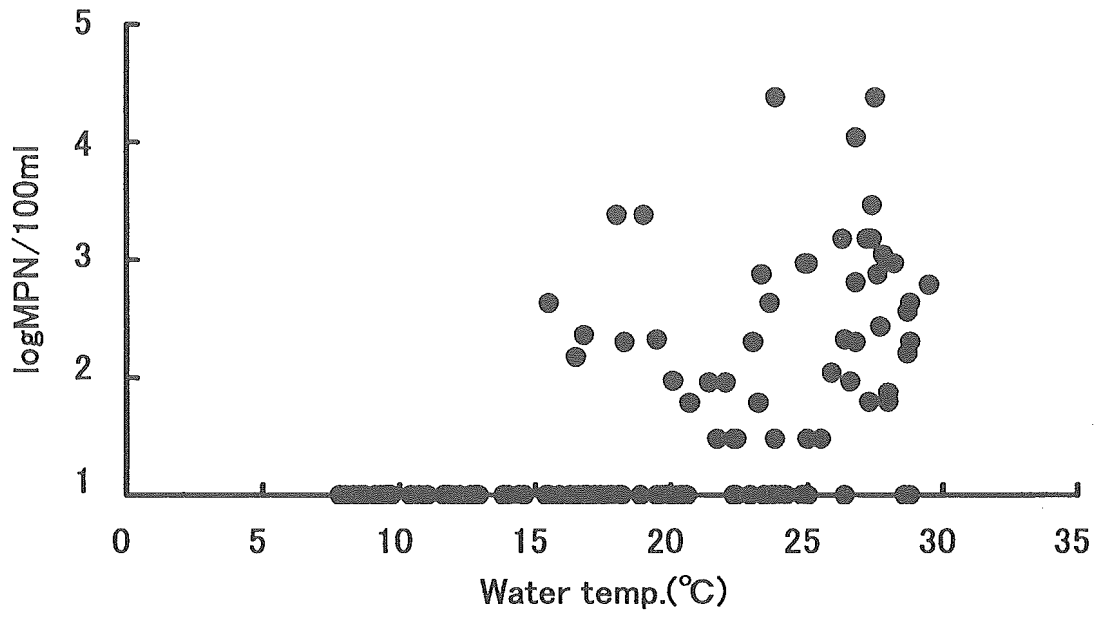


図5 沿岸7地点の海水温と*V. vulnificus*のMPN値

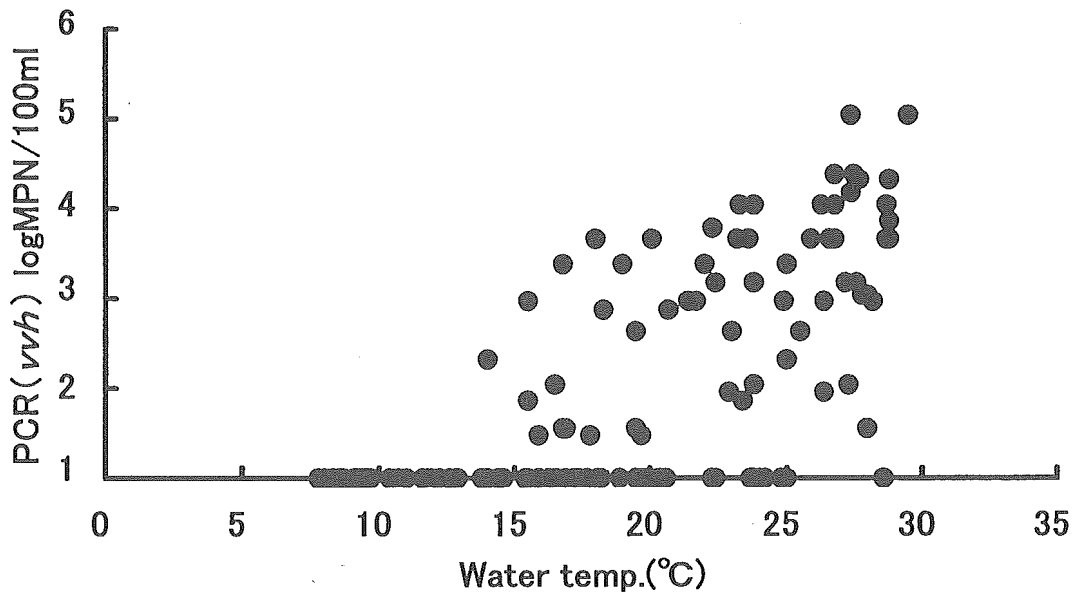


図6 沿岸7地点の海水温とPCR(vvh)-MPN値

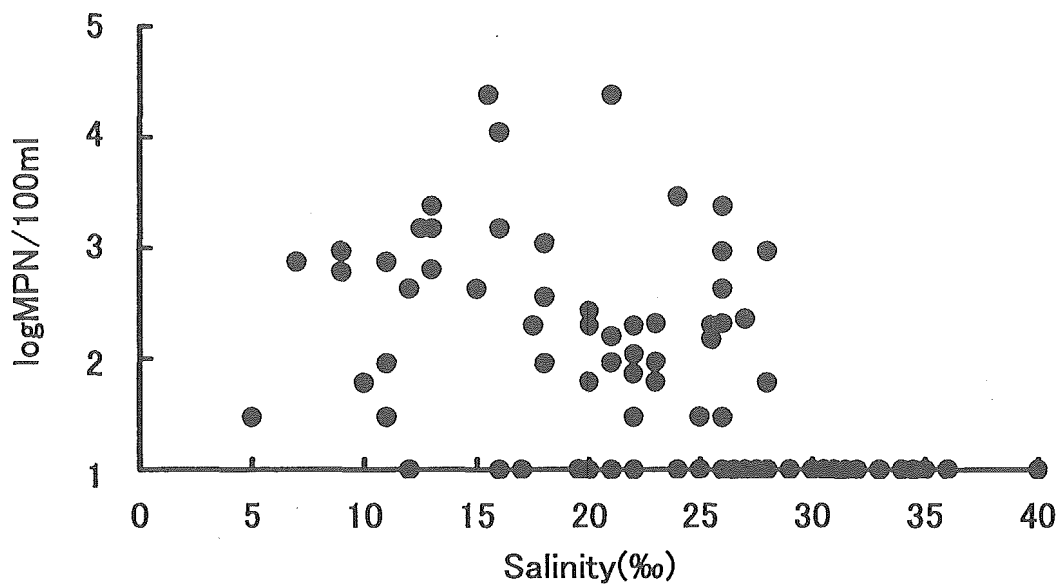


図7 沿岸7地点の塩分と*V. vulnificus*のMPN値

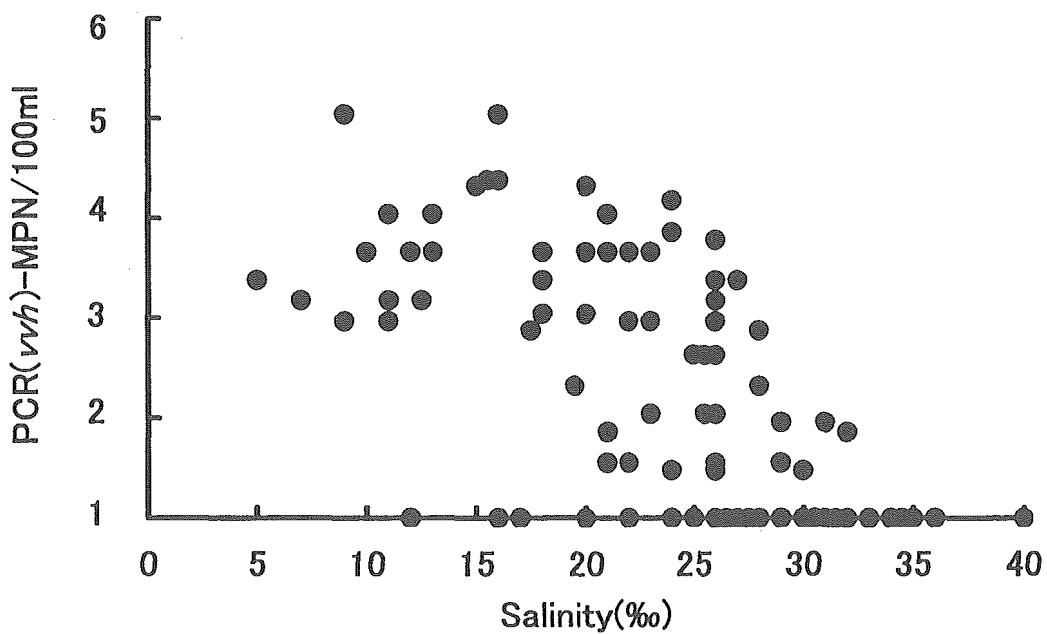


図8 沿岸7地点の塩分とPCR(vvh)-MPN値

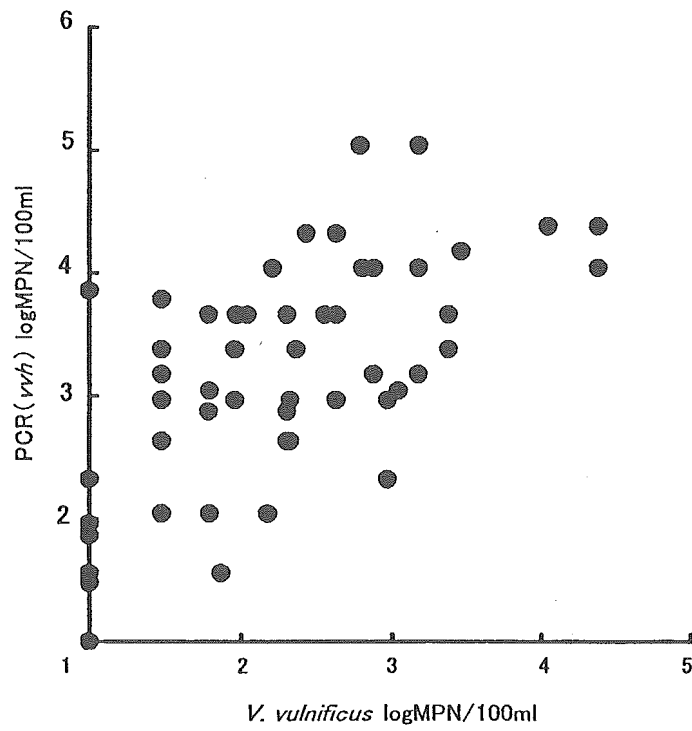


図9 沿岸海水における *V. vulnificus* の菌分離とPCR(vvh)のMPN値の比較

表1 沿岸7地点の海水からの検出状況

	検体数	<i>V. vulnificus</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>
		菌分離	PCR(v v h)	
2004年9月	7	7	7	7
2004年10月	7	5	5	7
2004年11月	7	3	4	6
2004年12月	7	1	4	4
2005年1月	7	1	1	1
2005年2月	7	1	1	1
2005年3月	7	0	1	2
2005年4月	7	1	1	4
2005年5月	7	1	1	7
2005年6月	7	1	2	7
2005年7月	7	6	6	7
2005年8月	7	6	7	7
2005年9月	7	6	7	7
2005年10月	7	5	6	7
2005年11月	7	1	2	6
2005年12月	7	1	1	7
2006年1月	7	1	1	3
2006年2月	7	0	1	1
2006年3月	7	1	1	1
	133	48	59	92

表2 沿岸海水における*V. vulnificus* の菌分離とPCRによるMPN値の比較

	菌分離	PCR
検出された検体数	48	59
MPN値が高かった検体数 菌分離>PCR	4	
MPN値が高かった検体数 PCR>菌分離		50
MPN値が同等であった 検体数	5	5
検出されなかった検体数	85	74
検体数	133	133

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

研究要旨

腸炎ビブリオ食中毒は、本菌汚染魚介類の摂食によって発生する。このため、本研究では魚介類の調理・加工時の衛生的取扱いにおける重要点を見い出すために魚介類の部位別による腸炎ビブリオの分布及び汚染菌数を明らかにした。2005 年の 6 月から 11 月に、東京湾で採取した魚類 30 検体を体表、鰓及び消化管に部位別し、各部位における腸炎ビブリオの保菌状況を培養法を用いて測定した結果、全検体の体表において腸炎ビブリオは検出されなかった。鰓及び消化管では、腸炎ビブリオが検出されたが、その頻度は鰓に比べ消化管の方が約 2 倍高かった。鰓における汚染菌数は、培養法では 2.8-5.7 log cfu/尾であり、一方、消化管における汚染菌数は、培養法では 1.7-4.7log cfu/尾であった。また、腸炎ビブリオは、6 月から 8 月は検出されたが、9 月以降は検出されなかった。培養法は検体中の競合する他細菌によって正確な腸炎ビブリオ菌数測定がされていない事が考えられた。また、腸炎ビブリオは体表には分布せず鰓及び消化管に高菌数で分布していることから、魚介類の取扱い時には鰓及び消化管の除去やこれらからの二次汚染防止が重要であると考えられる。

研究協力者

小沼 博隆 東海大学海洋学部

田久保好慶 東海大学海洋学部

瀬川 優子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

腸炎ビブリオ食中毒は、本菌汚染魚介類の摂食によって発生する。このため、本研究では魚介類の調理・加工時の衛生的取扱いにおける重要点を見い出すため

に魚介類の部位別による腸炎ビブリオの分布及び汚染菌数について検討した。本菌の検出時期は概ね 5～10 月で、夏期の検出率は 100%に近いが、冬期の検出率は稀である。このため、主に夏期に検体

を採取し流通を経由しない状態で検討を行うことにした。

B. 研究方法

1. 供試検体

東京湾において魚類を採取し供試した。入手した個体を研究所に持ち帰る際に、個体ごとに滅菌ビニール袋に隔離して運ぶことで、極力二次汚染が生じないようにした。また、輸送の際はクーラーボックスに検体を入れて、低温での輸送を行った。検体は、サッパ 16 検体、キビナゴ 6 検体、カタクチイワシ 6 検体、サバ 1 検体、ウグイ 1 検体の計 30 検体であった (表 1)。

2. 検体からの各部位の採取

持ち帰った検体は、滅菌済みの解剖用具を使い解剖した後、部位ごとにわけ、それぞれを PBS (ダルベッコ (-) PBS 粉末: 日水) の入ったチューブに投入し攪拌した。解剖部位は、鰓、消化管 (胃～肛門) の 2 ケ所を選択した。PBS の分量は 10 ml とした。

3. 生菌数測定

検体の部位別での生菌数を測定した。測定するにあたって適当な菌数にするために、ホモジネートを 2% NaCl 添加 PBS 4.5 ml で 10^{-3} まで 10 倍階段希釈を行った。その後、希釈液より消化管と鰓に関しては 0 ～ -3 階段希釈液から、それぞれ 0.1 ml を 2% NaCl 添加 TSA に塗抹し、35°C にて一晚培養後、その菌数を測定した。

4. 腸炎ビブリオ数の定量

鰓と消化管は 10^{-3} まで 10 倍階段希釈し、それぞれ 0.1 ml をクロモアガービブリオ培地 (CHROM agar 社) に塗抹し、35°C で一晚培養した。培地上の腸炎ビブリオである可能性があると思われる藤色のコロニーを白金線で釣菌し、クロモアガービブリオ培地に画線し、その後 35°C で一晚培養した。

画線分離したコロニーを、糖分解性、硫化水素生産性試験と、塩濃度耐性試験を行った。試験には、TSI (Triple Sugar Iron Agar : OXOID) 半斜面培地、NaCl 添加 NB (Nutrient Broth : DIFCO) 培地を使用した。クロモアガービブリオ培地に画線分離された単一コロニーを一白金線釣菌し、NB 培地に浸した後、TSI 培地に画線及び突刺し、それぞれを 35°C で一晚培養した。腸炎ビブリオの典型的な性状は NB 培地において、NaCl 添加 0% に陰性、3% に陽性、8% に陽性を示し、TSI 培地において、斜面部が赤く、高層部が黄色を示す。本実験において、TSI 培地において典型的性状を示したコロニーのうち、NB 培地において NaCl 添加が 3% と 8% で陽性を示したものを ToxR 遺伝子を標的に PCR に供試し確認した。

PCR に供試する菌の DNA の抽出をボイル法で行った。画線分離を行ったクロモアガービブリオ培地のコロニーを、0.1 ml の 1×TE (TRIS EDTA Buffer : SIGMA) を予め入れたチューブに洗い混み、95°C で 5 分間ボイルした。その後、10,000×G

で10分間遠心した後、上清をTemplate DNAとした。下記のマスターミックス45 μl にTemplate DNAを5 μl を加え、計50 μl とし、サーマルサイクラー (PTC-200 Peltier Thermal cycler: MJ RESEARCH)を用いて、94°C 1分及び63°C 1.5分の行程を20サイクル設定し、PCRを行った。(PCRマスターミックス組成: 10 \times buffer 5 μl , dNTP mixture 4 μl , forward primer (toxrl) 2 μl , reverse primer (toxr2) 2 μl , Ex Taq 0.25 μl , D.W. 31.75 μl)

3%アガロース (NuSieve 3:1 agarose: Cambrex Bio Science Rockland)にて電気泳動し産物の確認を行った。DNAの泳動バンドを検出するために、ゲルをエチジウムブロマイドにて染色を行った。

C. 結果

1. 生菌数測定

生菌数のそれぞれの部位の検出率は鰓が29/30 (97%)、及び消化管が30/30 (100%)であった。また、定量値は鰓が2.4~6.3 log cfu/g (2.8~5.3 log cfu/尾)であった。検出された検体の内、最大の値を示した検体は検体番号2番のキビナゴであり、最小の値を示した検体は検体番号27番のサバであった。消化管は3.4~6.5 log cfu/g (2.8~7.1 log cfu/尾)であった、最大の値を示した検体が検体番号21番のサッパであり、最小の値を示した検体は検体番号7番のサッパであった。(表2)

2. 腸炎ビブリオの定量

クロモアガービブリオ培地上で腸炎ビブリオの典型コロニーである藤色のコロニーをTSI培地及びNaCl添加NB培地で性状試験を行った。その結果、検体のそれぞれの部位の腸炎ビブリオ検出率は鰓では6/30 (25%)、消化管では14/30 (47%)であった。定量ができた検体の腸炎ビブリオ定量値は、鰓では2.5~4.1 log cfu/g (2.8~5.7 log cfu/尾)であった。最大の値を示した検体は検体番号5番のキビナゴであり、最小の値を示した検体は検体番号17番のサッパであった。消化管では1.4~4.1 log cfu/g (1.7~4.7 log cfu/尾)であった。最大の値を示した検体は検体番号13番のカタクチイワシであり、最小の値を示した検体は検体番号8番のサッパであった(図1および2)。

D. 考察

魚類における部位別の腸炎ビブリオの定量実験を行った。また、同時に部位別の生菌数も測定した。その結果、腸炎ビブリオの検出率においては、鰓よりも消化管が高い検出率を示した。腸炎ビブリオ数に関しては、消化管において多く定量でき、消化管よりは少ないが鰓からも定量された。生菌の検出率においても、鰓よりも消化管の検出率が高かった。生菌数に関しては、消化管において多く定量でき、消化管よりは少ないが、鰓からも定量された。この要因の一つとして、供試した魚の食性が原因だと考えられる。本実験で供試した魚の食性は主にプラン

クトン食性である。腸炎ビブリオをはじめ海洋細菌は、プランクトンの殻に含まれる物質であるキチンに吸着しやすい性質を有する。このことから考えると、腸炎ビブリオが付着したプランクトンを食することによって菌が内臓に多く含まれていると考えた。また、鰓に関しては、海中のプランクトンが鰓に蓄積したために、腸炎ビブリオが多く検出されたのではないかと考えられた。本章の実験結果から、消化管および鰓に腸炎ビブリオが多く保有されていることが認められた。このことから魚類を調理する際には、消化管を含む内臓と鰓を完全に取り除くこと、また調理後の器具等を放置しないこと等で本菌の増殖を抑制することができると思われる。

E. 結論

腸炎ビブリオ食中毒は、本菌汚染魚介類の摂食によって発生する。このため、本研究では魚介類の調理・加工時の衛生的取扱いにおける重要点を見出すために魚介類の部位別による腸炎ビブリオの分布及び汚染菌数を明らかにした。全検体の体表において腸炎ビブリオは検出されなかったが、鰓及び消化管では、腸炎ビブリオが検出されたが、その頻度は鰓に比べ消化管の方が約 2 倍高かった。鰓における汚染菌数は、培養法では 2.8-5.7 log cfu/尾であり、一方、消化管における汚染菌数は、培養法では 1.7-4.7 log cfu/尾であった。また、腸炎ビブリオは、

6 月から 8 月は検出されたが、9 月以降は検出されなかった。培養法は検体中の競合する他細菌によって正確な腸炎ビブリオ菌数測定がされていない事が考えられた。また、腸炎ビブリオは体表には分布せず鰓及び消化管に高菌数で分布していることから、魚介類の取扱い時には鰓及び消化管の除去やこれらからの二次汚染防止が重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photocatalytic TiO₂ oxidation. *Chemosphere*. 62: 149-154, 2006.

Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K., and Hara-Kudo, Y. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic bird in Japan. *Epidemiology and Infection*. In press.

2. 学会発表

瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫. 三次元微細セル構造磁器質光触媒フィルターによるノリ加工廃水の浄化. 日本防菌防黴学会. 平成 17 年 5 月. 大阪.
田久保好慶、後藤元樹、工藤由起子、小沼博隆. リアルタイム PCR 法を用いた魚介類における腸炎ビブリオの部位別分布とその定量. 第 141 回日本獣医学会学術集会、平成 18 年 3 月、

つくば。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし。

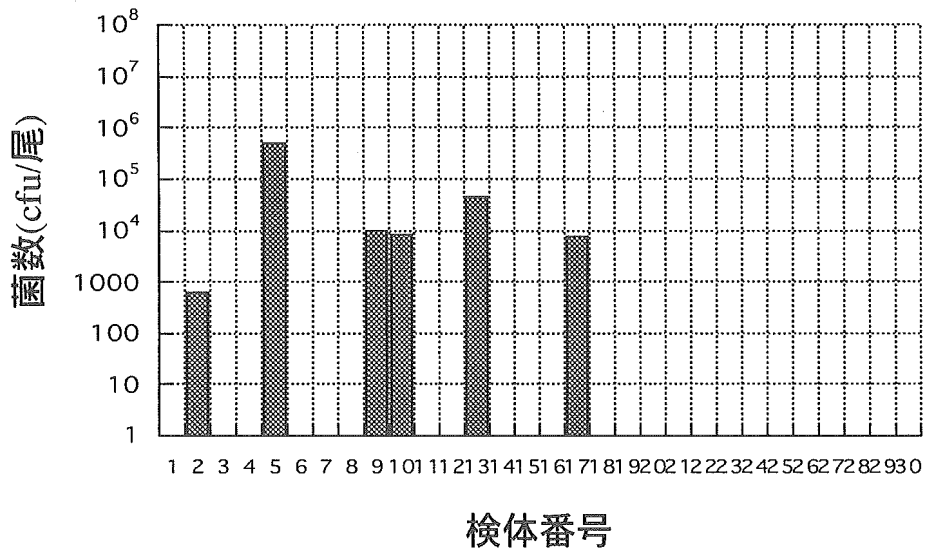


図1. 鰓における腸炎ビブリオ数

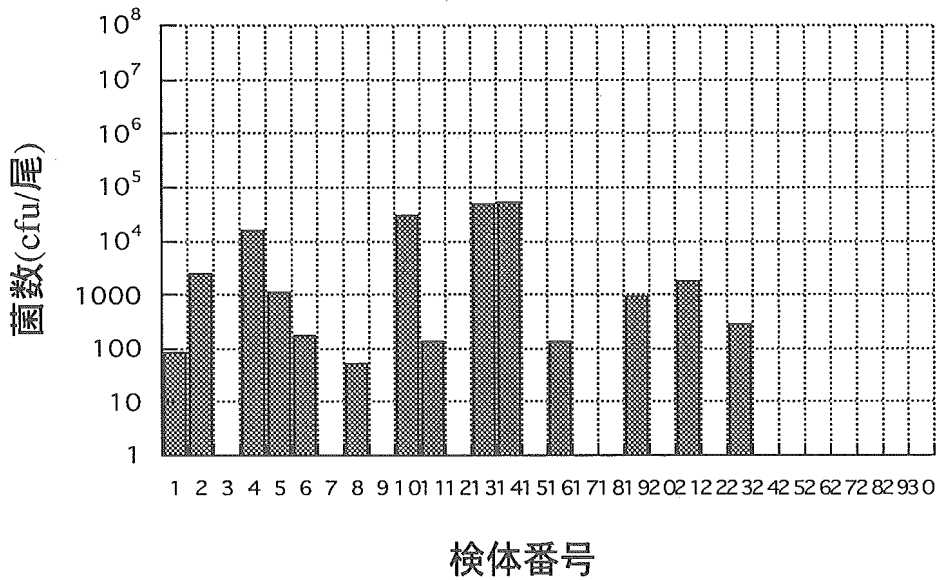


図2. 消化管における腸炎ビブリオ数

表1 供試検体

検体番号	検体名	採取日時	採取場所
1	キビナゴ	2005. 6. 13	東京都江東区東京港
2	キビナゴ	2005. 6. 13	東京都江東区東京港
3	キビナゴ	2005. 6. 13	東京都江東区東京港
4	キビナゴ	2005. 6. 13	東京都江東区東京港
5	キビナゴ	2005. 6. 13	東京都江東区東京港
6	サッパ	2005. 6. 28	東京都江東区東京港
7	サッパ	2005. 6. 28	東京都江東区東京港
8	サッパ	2005. 6. 28	東京都江東区東京港
9	サッパ	2005. 7. 12	東京都江東区東京港
10	サッパ	2005. 7. 12	東京都江東区東京港
11	サッパ	2005. 7. 12	東京都江東区東京港
12	サッパ	2005. 7. 12	東京都江東区東京港
13	カタクチイワシ	2005. 7. 12	東京都江東区東京港
14	カタクチイワシ	2005. 7. 12	東京都江東区東京港
15	サッパ	2005. 8. 9	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
16	サッパ	2005. 8. 9	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
17	サッパ	2005. 8. 9	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
18	サッパ	2005. 8. 23	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
19	サッパ	2005. 8. 23	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
20	サッパ	2005. 8. 23	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
21	サッパ	2005. 8. 23	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
22	サッパ	2005. 8. 23	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
23	サッパ	2005. 9. 16	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
24	ウグイ	2005. 10. 26	神奈川県川崎市川崎区多摩川河口
25	キビナゴ	2005. 10. 29	神奈川県横浜市中区本牧埠頭
26	カタクチイワシ	2005. 10. 29	神奈川県横浜市中区本牧埠頭
27	サバ	2005. 11. 20	神奈川県横浜市中区本牧埠頭
28	カタクチイワシ	2005. 11. 20	神奈川県横浜市中区本牧埠頭
29	カタクチイワシ	2005. 11. 20	神奈川県横浜市中区本牧埠頭
30	カタクチイワシ	2005. 11. 20	神奈川県横浜市中区本牧埠頭

表2 検体の生菌数

検体 NO.	魚種名	生菌数(log cfu/g)		生菌数(log cfu/検体)	
		鰓	消化管	鰓	消化管
1	キビナゴ	4.93	4.35	2.77	2.76
2	キビナゴ	6.26	4.86	5.31	4.34
3	キビナゴ	2.92	4.95	3	4.1
4	キビナゴ	ND	3.29	ND	2.78
5	キビナゴ	3.08	5.08	2.77	4.39
6	サッパ	4.94	4.8	4.53	5.25
7	サッパ	4.01	3.4	3.6	3.9
8	サッパ	4.29	4.49	4.23	5.42
9	サッパ	4.41	6.5	4.11	7.14
10	サッパ	3.55	4.67	3.08	5.36
11	サッパ	3.87	3.69	3.51	4.19
12	サッパ	3.73	3.79	3.46	4.2
13	カタクチイワシ	5.31	5.7	5.31	5.2
14	カタクチイワシ	4.62	5.72	4.67	6.23
15	サッパ	3.67	4.93	3.49	5.35
16	サッパ	4.1	4.62	3.88	5.09
17	サッパ	3.65	5.76	3.21	6.08
18	サッパ	4.91	5.36	4.85	5.88
19	サッパ	5.02	5.6	4.89	6.42
20	サッパ	4.5	5.02	4.09	5.58
21	サッパ	4.98	6.52	4.56	7.08
22	サッパ	4.3	6.21	4.23	6.21
23	サッパ	2.98	5.06	2.85	5.56
24	ウグイ	4.09	3.24	5.01	4.61
25	キビナゴ	3.82	5.19	2.78	4.63
26	カタクチイワシ	3.39	4.73	3.46	4.71
27	サバ	2.41	4.58	3.57	5.75
28	カタクチイワシ	4.16	4.15	4.45	4.29
29	カタクチイワシ	3.65	5.73	3.38	5.97
30	カタクチイワシ	4.13	4.33	3.81	4.47

ND=不検出

分 担 研 究 報 告 書

鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

山本茂貴

平成17年度厚生労働科学研究食品安全確保研究事業

分担研究報告書

細菌性食中毒の予防に関する研究

分担研究課題：鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

分担研究者	山本 茂貴	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	山崎 学	国立医薬品食品衛生研究所
	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所
	山崎 渉	大阪府立公衆衛生研究所
	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	塚本 定三	大阪府立公衆衛生研究所
	齋藤志保子	秋田県衛生科学研究所
	藤田 雅弘	群馬県衛生環境研究所
	平松 礼司	愛知県衛生研究所
	石村 勝之	広島市衛生研究所
	吉野谷 進	広島市衛生研究所
	下村 佳	広島市衛生研究所
	古田 喜美	広島市衛生研究所
	国井 悦子	広島市衛生研究所
	谷口 正昭	広島市衛生研究所
	萱島 隆之	広島市衛生研究所
	笠間 良雄	広島市衛生研究所
	松本 勝	広島市衛生研究所
	荻野 武雄	広島市衛生研究所
	富田 正章	山口県環境保健研究センター
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	中馬 猛久	鹿児島大学

研究要旨

昨年度の研究で、鶏肉からのカンピロバクター分離法の標準化を検討し、増菌培地として Preston 培地と Bolton 培地は同等の効力を持つこと、分離培地は CCDA 培地より Butzler 培地が検出率が良かったことが明かとなった。それを用いて、微好気環境の簡易法としての気密袋について検討した。気密性袋を用いた好気培養法において、大量培養法は×5 希釈で 80% (8/10) , ×10 希釈で

60% (6/10)の陽性率を、MPN 法は×5 希釈で 90% (9/10) , ×10 希釈で 100% (10/10)と高率に本菌を検出できた。微好気培養と好気培養の MPN 定量性の比較では、×5 希釈では、微好気培養の方が高 MPN 値を示す割合が高かった。一方、×10 希釈では、好気培養の方が高 MPN 値を示す割合が高かった。以上の結果、気密性袋を使用した好気培養法は、定性的には大量培養および MPN 法とも微好気培養法と同等の検出率がみられることから、本菌の培養検出に使用できると考えられた。一方、MPN 法による定量性についても有効性が示唆されたが、希釈倍率および好気・微好気の培養条件による差異については、さらに検討が必要と考えられた。

本食中毒の予防・制御を考える上で重要な好気ストレスによってコッコイド化した本菌について、mRNA の発現を解析した結果、その発現が確認され、培養液中にまだ生きている菌体が存在していることが示された。この結果は、コッコイド化した菌の中にはまだ生きている菌体が存在することを示唆し、このことは、この形態の菌体が再び増殖能を回復することを強く示唆する結果であった。

カンピロバクターは鶏が主な保菌動物であり、農場段階での調査により高率に保菌していることが明かとなった。

A. 研究目的

近年、細菌性食中毒の予防対策にはリスクアセスメントの手法を用いた科学的な知見が世界的に求められている。そこで、我が国においても、主要な細菌性食中毒の原因菌および食品を対象に、その汚染頻度や高汚染食品を把握するとともに食中毒の発生菌量を調べ、これらの結果をもとに我が国独自の微生物学的リスクアセスメントを試みる必要がある。

本研究では、世界的にも、また我が国においても発生件数が増加したカンピロバクター食中毒について、そのリスクプロファイルを行うとともに、汚染実態調査によりデータ収集し、定量的リスク評価を行うことを目的とする。また、本菌の食品や環境中での挙動について調べる。とくに、本菌の形態がらせん状から球状に変化（コッコ

イド化）した菌に着目する。この形態の菌体は人工培地での増殖能を欠いているが、再び元のらせん状桿菌に戻り増殖能を回復する可能性をもつことから、本菌の感染経路を考える上で重要な問題となっている。

このことから、コッコイド化した菌について詳細に解析し、食中毒につながる汚染拡大や菌の伝播との関連性について知見を得ることを目的とする。本研究によって、カンピロバクター食中毒に関わる食品のリスクを明らかにし、その制御方法に関する科学的根拠を提供することが期待される。

17年度の研究においては、分離培養法を確立し、市販鶏肉の汚染率及び菌数調査を行った。また、ブロイラー飼育農家での汚染率を調査した。コッコイド化した本菌の mRNA の発現について、本食中毒の主な原因菌種であるカンピロバクター・ジェジュ

ニを用いて PCR 法で解析・検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 培養方法の検討

1) 大量培養法

試料を気密性袋 2 袋に各々 25g ずつ採取し、Preston 培地 (Oxoid) 100 ml および 225ml を加えて 30 秒間ストマッキングし、均一化した。(×5 希釈液および×10 希釈液の作製)。

2) MPN 定量法

各希釈液について、10ml を 6 本の空試験管、1ml, 0.1 ml を各 6 本の Preston 培地 10ml 加試験管に接種し、各系列 3 本計 9 本を 42°C, 24 時間、ガスパック培養(微好気培養法)と気密性袋密封培養(好気培養法)により増菌培養した。その一白金耳 (10 μL) を mCCDA 培地 (Oxoid) に塗布し、42°C, 48 時間微好気培養し、陽性本数から MPN 値を求めた。試験管に分注した残液袋を出来る限り空気を除き、シーラーで密封後、同様に好気培養し、大量培養とした。

(2) 調査

鶏皮付モモ肉試料 25g を気密性袋に採取し、Preston 培地 100ml にて 5 倍希釈し、1) と同様に分注した試験管各 9 本を微好気および好気培養するとともに、シールした残液袋を好気大量培養後、分離培地として mCCDA および Butzler 培地を用いて MPN 定量値と定性結果を比較した。

2. コッコイド化した菌の mRNA の発現

コッコイド化した菌の解析には、供試菌株としてカンピロバクター・ジェジュニの患者由来株を用いた。コッコイド化した菌の調製は、これまでの我々の研究によって

設定した培養法によって行った。すなわち、微好気条件下にて前培養した菌液を新鮮な培地に接種し、嫌気条件下にて 1 日処理した後、菌液を大気条件下に移し激しく振とう培養することで、菌に酸素によるストレス(好気ストレス)を与えた。好気ストレス後、菌体を回収し全 RNA を抽出した。抽出した RNA から cDNA を調製し、これを鋳型として、DNA ジャイレース遺伝子 (*gyrA*)、および酸化ストレス応答タンパク質 Rrc 遺伝子 (*rrc*) に対するプライマーを用いて RT-PCR を行い、mRNA の発現を解析した。一方、微好気培養した後に好気ストレスを与えた菌(ストレスによるコッコイド化は起こらない)についても、同様に解析した。

3. プロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

鹿児島県下のプロイラー飼育農場から食鳥処理場に搬入されたプロイラーの盲腸内容物をプレストンブロス、バツラー寒天培地でそれぞれ 42°C 48 時間増菌選択培養し、常法に従い同定を行い、菌株を収集した。2 週ごとに 2 農場 2 鶏群ずつ (1995 年度: 1 鶏群 5 羽、2003 年度から 2005 年度: 1 鶏群 16 羽) 調査した。ナリジクス酸感受性はディスク法 (30 μg) で調べた。

C. 研究結果

1. 培養法の検討

1) 大量培養法

気密性袋を用いた好気培養法による大量培養では、×5 希釈試料で 80% (8/10), ×10 希釈試料で 60% (6/10) の陽性率であった。

2) MPN 定量法

×5 希釈試料の微好気培養による MPN 値は<15~>5500 MPN/100g(9/10), 好気培養では<15~>2300 MPN/100g(9/10)であった。微好気培養および好気培養の比較では, 微好気培養の方が, 高 MPN 値を示す割合が高かった (8/10)。

×10 希釈試料の微好気培養法による MPN 値は<30~>4600 MPN/100g(9/10), 好気培養法では 36~11000 MPN/100g(10/10)であった。微好気培養および好気培養の比較では, 好気培養が, 高 MPN 値を示す割合が高かった (7/10)。

(2) 調査

1) 大量培養法

×5 希釈試料による大量培養(好気培養法)では, mCCDA 培地で陽性率 50% (8/16), Butzler 培地で 44% (7/16)を示した。

2) MPN 定量法

×5 希釈試料による MPN 法(微好気培養法)では, mCCDA 培地, Butzler 培地とも陽性率 81% (13/16)を示し, MPN 値は<15~>5500 MPN/100g であった。

×5 希釈試料による MPN 法(好気培養法)では, mCCDA 培地で陽性率 69% (11/16), Butzler 培地で 65% (10/16)を示し, MPN 値は<15~>5500 MPN/100g であった。

微好気および好気培養法の MPN 定量値の比較では, 微好気培養法が高値あるいは同値を示すものが 81% (13/16)であった。一方, 好気培養法は 50% (8/16)であり, 微好気培養法の方が高値あるいは同値を示す場合が多かった。

以上の結果から, 気密性袋を用いた好気培養による大量培養法および MPN 法でも, 高率にカンピロバクターが検出されたことから, 本袋を使用すれば, 必ずしも微好気

培養を行わなくとも Preston 培地中でのカンピロバクターの増殖が可能なが認められた。

培地希釈率に関しては, ×5 希釈を用いた気密性袋による大量培養法は×10 希釈と同等以上の陽性率を示し, ×5 希釈を用いた MPN 法は, 微好気および好気培養とも×10 希釈と同等の陽性率および MPN 値を示した。この結果から, ×5 希釈による大量培養法は, ×10 希釈を用いた基本的な培養方法と同様にカンピロバクター定性検査に使用可能と考えられた。一方, 気密性袋を用いた×5 希釈による MPN 定量法は, 大量培養法と比較して同等以上の検出率を示したことから, 操作量は増えるものの, 定量値が得られるとともに, 必要培地量が大幅に削減できるメリットもあることから, 定性法としても有用性が示された。

2. コッコイド化した菌の mRNA の発現

前年度までの研究結果同様、嫌気処理後にストレスを与えた菌では、ストレス 24 時間後では、培養液中の菌の約 40%の菌体が、ストレス 48 時間後では、約 90%の菌体がコッコイド化し、菌体構成成分の障害・変性が最小限に抑えられていることを確認した。一方、微好気処理した後にストレスを与えた菌では、コッコイド化した菌体の増加は認められなかった。また、両者の寒天培地上でコロニー形成能は検出限界以下であり、増殖能は認められなかった。それぞれの培養液から菌体を回収し、以降の解析に用いた。

まずストレス 24 時間後の菌体の mRNA について解析した結果、微好気培養後にストレスを与えた場合、標的とした遺伝子 *gyrA* および *rrc* の mRNA の発現は検出限界以下で

あり、認められなかった(図1)。一方、嫌気処理後にストレスを与えた場合では、発現量の減少は認められたものの、これらの mRNA が検出され、菌体内で両遺伝子の発現がまだ行われていることが確認された。さらに、ストレス 48 時間後の菌体の mRNA についても解析した結果、嫌気処理した後にストレスを与えた菌体では *rrc* の mRNA の発現が認められた(図2)。以上の結果から、嫌気条件下にて生存した後に好気ストレスを受けた菌の中にはまだ遺伝子の発現を行っている菌が存在していること示す。

3. ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

農場における汚染実態、ブロイラー個体における菌汚染実態を表1に示した。2003年度では45鶏群中26鶏群(57.8%)がカンピロバクター陽性を示したが2005年度では44鶏群中9鶏群(20.5%)と減少傾向が認められた。分離された菌株のナリジクス酸耐性状況を表2に示した。2003年度は81株中33株(41.0%)が耐性を示し、2004年度もほぼ同様な値を示したが、2005年度は36株中耐性が6株(16.7%)と減少を示した。2005年度では耐性株はすべてカンピロバクター・ジェジュニでありカンピロバクター・コリはすべて感受性であった。

D. 考察

1. 培養方法の検討

1) 大量培養法

培地希釈率に関しては、×5希釈を用いた気密性袋による大量培養法は×10希釈と同等以上の陽性率を示し、×5希釈を用い

た MPN 法は、微好気および好気培養とも×10希釈と同等の陽性率および MPN 値を示した。この結果から、×5希釈による大量培養法は、×10希釈を用いた基本的な培養方法と同様にカンピロバクター定性検査に使用可能と考えられた。一方、気密性袋を用いた×5希釈による MPN 定量法は、大量培養法と比較して同等以上の検出率を示したことから、操作量は増えるものの、定量値が得られるとともに、必要培地量が大幅に削減できるメリットもあることから、定性法としても有用性が示された。

2) MPN 定量法

MPN 法による定量値の比較では、×5希釈での微好気培養による MPN 法は、好気培養法による MPN 法より高 MPN 値を示す割合が高く、×10希釈の MPN 法では逆の傾向がみられたことから、希釈倍率と微好気および好気培養間での MPN 値に関する差異傾向についてはさらに検討が必要と考えられるが、その MPN 値は95%信頼限界の下限および上限域に互いにオーバーラップするものも多かったことから、気密性袋を用いた MPN 定量検査法の有用性が示唆された。

2. コッコイド化した菌の mRNA の発現

微好気条件下にて増殖するカンピロバクターはらせん状桿菌であるが、生育に不利な環境になることでコッコイド化した菌体が現れる。この形態の菌体は人工培地での増殖能を欠いているが、再びらせん状に戻り増殖能を回復する可能性をもつことが指摘されている。本菌は家禽や家畜などから高率に分離されており、この汚染の拡大には環境中に排泄された菌の水平伝播が原因であることが疑われている。それにもかかわらず、それらの飼育環境からの分離は困