

添付資料 1. 細菌 DNA の抽出とホモロジー検索プロトコール

I-1 テンプレート DNA の調製

- 1) 細菌コロニーを滅菌爪楊枝で pick up し (菌は取り過ぎるないこと。僅かで良い。)、 $T_{10}N_{10}E_1$ (1000 U/ml のアクロモヘプチダセ^{注1}を含む) 50 μ l に懸濁する。
- 2) 55°C 10 分間インキュベーションする。
- 3) これに 100 μ l のインスタジーン (BioRad) ^{注2}を加え、56°C で 15 分間インキュベーションする。
- 4) 10 秒間ハイスピードでボルテックスをかける。
- 5) 100°C のヒートブロックまたは沸騰ウォーターバスに 8 分間つける。
- 6) 10 秒間ハイスピードでボルテックスをかける。
- 7) 10,000rpm で 3 分間遠心。
- 8) 50 μ l の PCR 反応あたりステップ 7) の上清を 10 μ l 使用する。^{注3}

I-2 テンプレート DNA の調製 (96 well-micro plate の場合)

- 1) PCR 用 96 well plate に $T_{10}N_{10}E_1$ (500 U/ml のアクロモヘプチダセ^{注1}を含む) を 50 μ l ずつ分注。
- 2) 細菌コロニーを滅菌爪楊枝で pick up し懸濁する。
- 3) PCR 機で 55°C で 10 分間インキュベーションする。
- 4) インスタジーン (BioRad) ^{注2}を 100 μ l 加える。
- 5) PCR 機で 56°C で 15 分間インキュベーションする。
- 6) Microtube mixer で 10 秒間ハイスピードでボルテックスをかける。
- 7) PCR 機で 100°C 8 分間インキュベーションする。
- 8) Microtube mixer で 10 秒間ハイスピードでボルテックスをかける。
- 9) 2,000rpm で 3 分間遠心。
- 10) 50 μ l の PCR 反応あたりステップ 7) の上清を 10 μ l 使用する。^{注3}

注 1 アクロモヘプチダセ (和光純薬) は 10 万ユニット/ml になるように 50mM Na-phosphate buffer (pH6.0)-50% glycerol に溶解し、-20°C で保存する。消費期限は 6 ヶ月。

注 2 インスタジーンマトリックスは使用する前にマグネチックスターラーで良く攪拌し、1,000 μ l のピペットマンを用いてピペティングしながら吸い取る。激しい攪拌や先の細いチップでのピペティングはマトリックスを壊すので注意すること。

注 3 残りは 4°C で保存する。長期保存する場合は、上清を新しいチューブに移し、-20°C で保存し、再使用時にはステップ 6, 7 を繰り返す。

I PCR による細菌 16S rRNA 遺伝子の増幅

- 1) あらかじめ以下の反応試薬を反応分 + 1 本分混合し、氷上に置いておく。

1 反応分当たり

滅菌水	24.75 μ l	
10×PCR バッファー	5.0 μ l	
dNTPs (各 2mM)	5.0 μ l	(最終濃度 0.2mM)
25mM MgCl ₂	5.0 μ l	(最終濃度 2.5mM)
20 μ M pA	1.0 μ l	(最終濃度 0.4 μ M) ^{注2}
20 μ M pD* or pJ*	1.0 μ l	(最終濃度 0.4 μ M) ^{注2}
Taq DNA ポリメラーゼ (5 ユニット/ μ l) ^{注1}	0.25 μ l	(1.25 ユニット)

- 2) 0.2ml のチューブに 1) で混合した反応液を 40 μ l ずつ分注する (氷中)。
- 3) インスタジーン上清 10 μ l を加える。反応液の容量は全体で 50 μ l になる。
- 4) 良く混合し、スピンドウンする。
- 5) GeneAmp PCR System 2400, 9700 (予め 93°C にしておく) にチューブをセットし、以下のサイクルをスタートさせる。

93°C	3分	} 36 cycles
93°C	30秒	
50°C	15秒	
72°C	30秒 ^{注3}	
72°C	7分	
4°C	ホールド	

7) PCR 反応物の 1 μ l を 2% アガロースゲルで解析する。

注1 Promega の Taq DNA Polymerase (Cat#M1861) を使用。10×Buffer と 25mM MgCl₂ 溶液が添付されている。

注2 プライマーの塩基配列と位置は別紙に記載する。

注3 pJ*を用いるときは 90 秒にする。

III-1 PCR 増幅産物の精製

(A) GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Pharmacia Biotech) の場合。

- 1) GFX カラムを Collection Tube の上に置く。
- 2) カラムに 500 μ l の Capture Buffer を加える。
- 3) DNA 溶液 (100 μ l まで) をカラムに移す。
- 4) ピペティング (4-6 回) により良く攪拌する。
- 5) 13,000rpm で 30 秒間遠心する。(半径 17cm のアングルローターを使用)
- 6) Collection Tube の溶出液を捨てる。カラムを元のチューブに戻す。
- 7) 500 μ l の Wash Buffer をカラムに加える。
- 8) 13,000rpm で 30 秒間遠心する。
- 9) Collection Tube の溶出液を捨て、カラムを新しい 1.5ml チューブに移す。
- 10) カラムに 10-50 μ l の滅菌蒸留水を加え、1 分間室温に放置する。
- 11) 13,000rpm で 1 分間遠心する。
- 12) 溶出液を 1-5 μ l 採って、アガロース・ゲル電気泳動を行ない、DNA を半定量する。^注

(B) Millipore MultiScreen FB filter plate の場合

- 1) MultiScreen FB plate の各ウェルに PCR サンプルと等量 (~100 μ l) の Binding Buffer を入れる。
- 2) PCR 反応液 (~100 μ l) を各ウェルに加え、ピペティングで充分攪拌する (5 回以上)。あるいは、予め PCR 反応液に等量の Binding Buffer を加えて良く攪拌後、MultiScreen FB plate に移しても良い。
- 3) 濾過液回収用 96 穴プレート (平底) に MultiScreen 用遠心リングをセットし、その上に MultiScreen FB plate をセットする。
- 4) 2,000rpm で 5 分間遠心する。
- 5) ろ液を捨て、MultiScreen FB plate の各ウェルに 200 μ l の 70% エタノールを加える。
- 6) 2,000rpm で 5 分間遠心する。
- 7) ステップ 5, 6 を繰り返す。
- 8) 5 分間バキュームし、エタノールを蒸発させる。
- 9) 新しい濾過液回収用 96 穴プレート (V 底) の上に MultiScreen FB plate を乗せ、T₁₀E_{0.1} 55 μ l を各ウェルに加える。
- 10) 2,000rpm で 5 分間遠心する。
- 11) 溶出液を 1-5 μ l 採って、アガロース・ゲル電気泳動を行ない、DNA を半定量する。^注

○ TE buffer: 10 mM Tris-HCl, pH8.0; 0.1mM Na₂EDTA

○ Binding buffer: 7M Guanidine-HCl; 200mM MES Buffer, pH5.6

33.44g Guanidine hydrochloride

22.5 ml of 400 mM MES (free acid)
 2.5 ml of 400 mM NaMES
 adjust pH to 5.6 with 1M NaOH and mess up to 50 ml.

注 100bp ladder marker (26ng/ μ l) の 10 μ l を一緒に泳動する。500bp のバンドの濃さが約 40ng に相当するので、それと比較して定量する。

IV PCR 増幅 DNA 断片のシーケンシング

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit の場合

1) 0.2ml チューブに以下の試薬を分注する。

滅菌水	x μ l
ABI PRISM の試薬混合液 (BigDye Terminator v1.1)	2.0 μ l
5 \times Sequence Buffer (PE Biosystems)	3.0 μ l
PCR 増幅 DNA 断片	y μ l (1~100ng) ^{注1}
3.2 μ M プライマー-D*	1 μ l (3.2 pmoles) ^{注2}
Total	20 μ l

2) 攪拌混合後、スピンドウンする。

3) GeneAmp PCR System 2400, 9700 (予め 96 $^{\circ}$ C にしておく) にチューブをセットし、以下のサイクルをスタートさせる。

96 $^{\circ}$ C	1 分	} 25 cycles
96 $^{\circ}$ C	10 秒	
50 $^{\circ}$ C	5 秒	
60 $^{\circ}$ C	4 分	
4 $^{\circ}$ C	ホールド	

○エタノール沈殿による精製

- 4) 1.5ml マイクロチューブに 2.0 μ l の 125 mM EDTA (pH8.0)、2.0 μ l の 3M 酢酸トリウム (pH5.2) 及び 50 μ l の 99%エタノールを分注する。
- 5) 20 μ l の反応液を (4) のチューブに移し、攪拌する。
- 6) 室温に 15 分放置
- 7) 室温で 15,000rpm、20 分間遠心する。
- 8) 上澄を捨て、250 μ l の 70%エタノールを加える。
- 9) 室温で 15,000rpm、5 分間遠心する。
- 10) 上澄を捨て、ドライアップする。
- 11) TRS25 μ l を加え、良くボルテックスしてサンプルを溶かす。専用チューブに移す。
- 12) 泳動直前に 96 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し、氷上で急冷する。

○Millipore MultiScreen HV plate による精製

- 1) カラムローダーを使って、96 穴 Millipore MultiScreen HV plate に Sephadex G-50 superfine の粉末を入れる。
- 2) 使用する分の穴だけに 300 μ l の滅菌蒸留水を加え、室温で 3 時間 (あるいは 4 $^{\circ}$ C で一夜) 放置する^{注3}。
- 3) 96well-microtiter plate に Centrifuge Alignment Flame を乗せ、さらにその上に Millipore MultiScreen HV plate を重ねる。
- 4) microtiter plate 用ローターで 2,000rpm で 5 分間遠心する。ろ液を捨てる。
- 5) MultiScreen HV plate のウェルの中心に反応液^{注4} (20 μ l) を添加する。
- 6) Centrifuge Alignment Flame を使って、96well-microtiter plate (V 底) の上に HV Plate

を重ねる。

- 7) 2,000rpm で 10 分間遠心する。
- 8) ろ液を 0.5ml チューブに移し、Hi-Di Formamide の 20 μ l を加えて混合する。
- 9) 泳動直前に 96°C で 2 分間加熱し、氷上で急冷する。

- 注1 DNA量はPCR産物のサイズによって変わる。ABI PRISM 310の取扱い説明書を参照。DNAの量が多すぎるとエロンゲーションが進まなくなることがある。
DNA溶液が T₁₀E₁ に溶けている場合で、これを 2 μ l 以上使用する時は 1mM MgCl₂ を同量添加すること。
- 注2 16S rRNA 遺伝子の全域の塩基配列を決定する場合は、pA と pJ* で増幅し精製した後、12種類のプライマーを使ってシーケンスする。
- 注3 一度膨潤させたゲルは、湿らせたタオルペーパーを入れたタッパウェアに密閉して保存すれば2週間は持つ。
- 注4 シーケンス反応液に 2 μ l の 2.2% SDS を加え、攪拌後スピンドウンする。これをサーマルサイクラーで 98°C 5 分間続いて 25°C 10 分加熱する。


プライマー配列

プライマー名	配列 (5' → 3')	方向性	塩基番号
A	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	+	7-27
C	CTACGGGAGGCAGCAGTGGG	+	341-361
C*	CCCACTGCTGCCTCCCGTAG	-	361-341
D	CAGCAGCCGCGGTAATAC	+	519-536
D*	GTATTACCGCGGCTGCTG	-	536-519
E	AAACTCAAAGGAATTGACGG	+	908-928
E*	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	-	928-908
I	GAAGGTGGGATGACGTC	+	1178-1195
I*	GACGTCATCCACCTTC	-	1195-1178
J*	GGTTACCTGTTACGACTT	-	1510-1492
K	TAGATACCCTGGTAGTCC	+	789-806
K*	GGACTACCAGGTATCTA	-	806-789

添付資料 2. ホモロジー検索結果

検体#35:

ACGTGTCTCAGTCCGGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTACCCACCAACTAGCTAAT
 CCGACTTAGGCTCATCCAATAGCGAGAGCGCAAGCGCCCCCTTTCCCGTAGGGTGTATGCGGTATTAATTCGAGTTCCCGGAGCTAT
 CCCCCTACTGGGCAGATTCTAAGTATTACTACCCGTCGCGCGCTCGTCAGCGAGAAGCAAGCTTCTCCTGTAACCGCTCGACTTGC
 ATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACCTCTATA

[gb|CP000713.1|](#)  Psychrobacter sp. PRwf-1, complete genome. Length=2978976

Score = 566 bits (306), Expect = 3e-158

Identities = 314/318 (98%), Gaps = 0/318 (0%)

Strand=Plus/Minus

Query 2	CGTGTCTCAGTCCGGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGTCGCCTTG	61
Sbjct 776959	CGTGTCTCAGTCCGGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGTCGCCTTG	776900
Query 62	GTAGGCCTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAGGCTCATCCAATAGCGAGAGCGC	121
Sbjct 776899	GTAGGCCTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAGGCTCATCCAATAGCGAGAGCGC	776840
Query 122	AAGCGCCCCCTTTCCCGTAGGGTGTATGCGGTATTAATTCGAGTTCCCGGAGCTATC	181
Sbjct 776839	AAGCGCCCCCTTTCCCGTAGGGTGTATGCGGTATTAATTCGAGTTCCCGGAGCTATC	776780
Query 182	CCCCCTACTGGGCAGATTCTAAGTATTACTACCCGTCGCGCGCTCGTCAGCGAGAAG	241
Sbjct 776779	CCCCCTACTGGGCAGATTCTAAGTATTACTACCCGTCGCGCGCTCGTCAGCAAGAAG	776720
Query 242	CAAGCTTCTCCTGTAACCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCT	301
Sbjct 776719	CAAGCTTCTCCTGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCT	776660
Query 302	GAGCCAGGATCAAACCTCT	319
Sbjct 776659	GAGCCATGATCAAACCTCT	776642

検体#36:

GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAACT
 GATAGGCCGCGAGCCATCCCCAACCGAAAAAAGTTCCACCCTCCAACATGCGTTAGAGAGTCATATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCC
 GGGCTTATCCCGAAGTCGGGGCAGGTTACTCAGTGTTACTCACCCGTTGCGCACTATCCACCATGTGCAAGCACACGGCTTCAGCGT
 TCGACTTGCATGTGTTAAGCACGAGCCAGCGTTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA

[dbj|AB177640.1|](#) Brevibacterium sp. H15 gene for 16S ribosomal RNA, isolate: H15. Length=1517

Score = 525 bits (284), Expect = 5e-146

Identities = 314/329 (95%), Gaps = 4/329 (1%)

Strand=Plus/Minus

Query 1	GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCT	60
Sbjct 327	GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCT	268
Query 61	CTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAACTGATAGGCCGCGAGCCATCCCCAACCGAAA	120
Sbjct 267	CTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAACTGATAGGCCGCGAGCCATCCCCAACCGAAA	208
Query 121	AAACTTTCCACCCTCCA-ACATGCGTTAGAGAGTCATATCCGGTATTAGACCCAGTTTCC	179

GCATGTGTTAGGCCTCCGCTACGTTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA

gb|DQ122247.1 Flavobacterium sp. iMT11121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Length=471

Score = 555 bits (300), Expect = 6e-155

Identities = 315/322 (97%), Gaps = 2/322 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query 1  GTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCACCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCATCGAC 60
          |||
Sbjct 321 GTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCACCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCATCGAC 262

Query 61  TTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTCTATCCACCGG 120
          |||
Sbjct 261  TTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTTTATCCACCTC 202

Query 121 AGTTTTCAATATGAAGTGATGCCACT-TAATATATTATGGGGTATTAATCTTCCTTTGGA 179
          |||
Sbjct 201  AGTTTTCAATATAAAGTGATGCCACTCT-ATATATTATGGGGTATTAATCTTCCTTTGGA 143

Query 180  AAGGCTATCCCCTGATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCTC 239
          |||
Sbjct 142  AAGGCTATCCCCTGATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACCCGTACGCCGCTCTC 83

Query 240  AAGCCTCCGAAGAGACTCTACCGCTCAGCTTGCATGTGTTAGGCCTCCCGCTAGCGTTCA 299
          |||
Sbjct 82  AAGTCTCCGAAGAGACTCTACCGCTCAGCTTGCATGTGTTAGGCCTCCCGCTAGCGTTCA 23

Query 300  TCCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 321
          |||
Sbjct 22  TCCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 1
```

検体#46:

CGATGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCTCCCTCTCAGGACCCCTAAAGATCATTGACTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTA
TCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTCTATCCACCGAGTTTCAATACTAAATGATGCCATCTAATATATTATGGAGTATTAATCTTCCTTT
CGAAAGGCTATCCCCTGATAAAGGTAGGTTGCACACGTGTTACGCACCCGTACGCCGCTCTCTAGTTCCGAAGAACTATACCGCTCG
GCTTGCATGTGTTAGGCCTCCCGCTAGCGTTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA

emb|AJ495802.1|CHR495802 Chryseobacterium sp. p20H 16S rRNA gene. Length=1450

Score = 536 bits (290), Expect = 2e-149

Identities = 312/322 (96%), Gaps = 5/322 (1%)

Strand=Plus/Minus

```
Query 5  GTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCTCCCTCTCAGGACCCCTAAAGATCATTGAC 64
          |||
Sbjct 320 GTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCTCCCTCTCAGGACCCCTAAAGATCATTGAC 261

Query 65  TTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTCTATCCACCGG 124
          |||
Sbjct 260  TTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTCTATCCACCGG 201

Query 125 AGTTTTCAATACTAAATGATGCCATCTAATATATTATGGAGTATTAATCTTCCTTTGAA 184
          |||
Sbjct 200  AGTTTTCAATATTAATGATGCCATCTAATATATTATGGAGTATTAATCTTCCTTTGAA 141

Query 185  AGGCTATCCCCTGATAAAGGTAGGTTGCACACGTGTTACGCACCCGTACGCCGCTCTCT 244
          |||
```



```

Query 61 CTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACAAGCTAATCTGATATCGGCCGCTCCAATAGTGAGA 120
          |||
Sbjct 259 CTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCTAATCTGATATCGGCCGCTCCAATAGTGAGA 200

Query 121 GGTCTTGCGATCCCCCCTTTCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCCACGCTTTCGCG 180
          |||
Sbjct 199 GGTCTTGCGATCCCCCCTTTCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCCACGCTTTCGCG 140

Query 181 TAGTTATCCCCGCTACTGGGCACGTTCCGATATATTACTCACCCGTTGCCACTCGCCG 240
          |||
Sbjct 139 TAGTTATCCCCGCTACTGGGCACGTTCCGATATATTACTCACCCGTTGCCACTCGCCG 80

Query 241 CCAAAGAAA-GCAAGCTTTCTTCGCGCTGCCGTTGCACTTGCATGTGTAAGCATCCCGC 299
          |||
Sbjct 79 CCAA-GAAAAGCAAGCTTCTTCGCGCTGCCGTTGCACTTGCATGTGTAAGCATCCCGC 21

Query 300 TAGCGTTCAATCTGAGCCAG 319
          |||
Sbjct 20 TAGCGTTCAATCTGAGCCAG 1

```

検体#49:

```

CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGACGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGAT
AGGCCGCGAGCCCATCCCCAACCGAAATTCCTTCCAGACGCAGACCATGCGGTACGTCACATATCCAGTATTAGACGCCGTTCCAGCG
CTTATCCCAGAGTCAGGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTGATCCCACAGAGCAAGCTCCGTGTTCCACCGTTCGAC
TTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA

```

emb|AM403722.1| Microbacterium sp. EP31 16S rRNA gene. Length=1486

Score = 599 bits (324), Expect = 3e-168

Identities = 324/324 (100%), Gaps = 0/324 (0%)

Strand=Plus/Minus

```

Query 1 CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGACGCCTT 60
          |||
Sbjct 324 CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGACGCCTT 265

Query 61 GGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCCAACCGAAATTC 120
          |||
Sbjct 264 GGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCCAACCGAAATTC 205

Query 121 TTTCCAGACGCAGACCATGCGGTACGTCACATATCCAGTATTAGACGCCGTTCCAGCG 180
          |||
Sbjct 204 TTTCCAGACGCAGACCATGCGGTACGTCACATATCCAGTATTAGACGCCGTTCCAGCG 145

Query 181 CTTATCCCAGAGTCAGGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTGATCCC 240
          |||
Sbjct 144 CTTATCCCAGAGTCAGGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTGATCCC 85

Query 241 ACAGAGCAAGCTCCGTGTTACCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTC 300
          |||
Sbjct 84 ACAGAGCAAGCTCCGTGTTACCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTC 25

Query 301 ATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA 324
          |||
Sbjct 24 ATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA 1

```

検体#50:

CCTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCTCTCAAACCAGCTACAGATCGCGGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACAAGCTAATC
TGATATCGGCCGCTCCAATAGTGAGAGGTCTTGCATCCCCCCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCCACGCTTTCGCGTAGT
TATCCCCGCTACTGGGCACGTTCCGATATATTACTACCCGTTCCGCACTCGCCGCAAGAAAGCAAGCTTTCTTCGCGCTGCCGTT
GACTTGCATGTGTAAGCATCCCGTAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA

gb|EF672088.1| *Pusillimonas* sp. DCY25T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Length=1479

Score = 556 bits (301), Expect = 2e-155
Identities = 310/314 (98%), Gaps = 2/314 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	3	TGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCTCTCAAACCAGCTACAGATCGCGGCCTTGGT	62
Sbjct	313	TGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCTCTCAAACCAGCTACAGATCGCGGCCTTGGT	254
Query	63	GAGCCTTTACCTCACCAACAAGCTAATCTGATATCGGCCGCTCCAATAGTGAGAGGTCTT	122
Sbjct	253	GAGCCTTTACCTCACCAACTAGCTAATCTGATATCGGCCGCTCCAATAGTGAGAGGTCTT	194
Query	123	GCGATCCCCCCTTTCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCCACGCTTTCGCGTAGTTA	182
Sbjct	193	GCGATCCCCCCTTTCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCCACGCTTTCGCGTAGTTA	134
Query	183	TCCCCGCTACTGGGCACGTTCCGATATATTACTACCCGTTCCGCACTCGCCGCAAG	242
Sbjct	133	TCCCCGCTACTGGGCACGTTCCGATATATTACTACCCGTTCCGCACTCGCCGCAA-G	75
Query	243	AAA-GCAAGCTTTCTTCGCGCTGCCGTTGACTTGCATGTGTAAGCATCCCGTAGCGT	301
Sbjct	74	AAAAGCAAGCTTTCTTCGCGCTGCCGTTGACTTGCATGTGTAAGCATCCCGTAGCGT	15
Query	302	TCAATCTGAGCCAG	315
Sbjct	14	TCAATCTGAGCCAG	1

検体#51:

TTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAG
CTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGCGATAAATCTTTCCCCGAAGGGCACATTTCGGCATTACCACCGTTTCAGGAGCTATTCCGA
ACCTAAAGGCACGTTCCACGTTACTACCCGTTCCGCACTAACCCTGAAGGGTCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAG
CGTTCGCTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA

gb|DQ533518.1| Uncultured *Brevundimonas* sp. clone 6-67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length=445

Score = 551 bits (298), Expect = 7e-154
Identities = 298/298 (100%), Gaps = 0/298 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	TTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTC	60
Sbjct	298	TTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTC	239
Query	61	GCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGCGA	120
Sbjct	238	GCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGCGA	179
Query	121	TAAATCTTTCCCGAAGGGCACATTTCGGCATTACCACCGTTTCAGGAGCTATTCCGA	180

```
|||||
Sbjct 178 TAAATCTTTCCCCGAAGGGCACATTCCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCCGA 119
Query 181 ACCTAAAGGCACGTTCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTAACCCCGAAGGGTCCGT 240
|||||
Sbjct 118 ACCTAAAGGCACGTTCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTAACCCCGAAGGGTCCGT 59
Query 241 TCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCGCTCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 298
|||||
Sbjct 58 TCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCGCTCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 1
```

平成 20 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）
（受託事業報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究
塩タラコ製造施設におけるバイオフィルムの一般生菌数とリステリアに関する検討

北海道立釧路水産試験場 利用部・加工部

担当者 北川 雅彦（利用部・主任研究員）
麻生 真悟（利用部・利用技術科長）
蛭谷 幸司（利用部・原料化学科長）
武田 浩郁（利用部・研究職員）
信太 茂春（加工部・保蔵流通科長）
飯田 訓之（利用部長）

研究要旨

バイオフィルム形成が見られるリステリアについて、非加熱製造・非加熱喫食食品の製造工程における衛生管理の最適なモニタリング手法を確立することを目的とする。

今年度は、塩タラコの製造施設において、製造環境からバイオフィルムを採集し、バイオフィルムの一般生菌数とリステリア菌の有無について調査を行った。その結果、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、天井雨漏り部の 10^1 cfu/mg biofilm を除き、 $10^3 \sim 10^6$ cfu/mg biofilm に分布していた。このうち、床タイル、フィレーマシンのキャストと魚体搬送部、フォークリフトのタイヤ側面とアクセルペダル、原魚処理用作業台、木製パレットから採集したバイオフィルムでは、クロモアガーリステリア寒天培地によりリステリア属菌陽性であるコロニーを検出した。そして、木製パレットでは *Listeria monocytogenes* と推定されるハローを有するコロニーを検出した。なお、細菌検査終了後の標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地については、菌叢の DNA 分析とリステリア属菌の同定を担当する帯広畜産大学畜産学部応用獣医学講座へ提供した。

A. 研究目的

バイオフィルム形成が見られるリステリアについて、非加熱製造・非加熱喫食食品の製造工程における衛生管理の最適なモニタリング手法を確立することを目的とする。

今年度は、塩タラコ製造施設における製造環境からバイオフィルムを採集し、バイオフィルムの一般生菌数とリステリアの有無について調査を行う。さらに、細菌検査を行った寒天培地については、バイオフィルムにおける微生物の菌叢把握とリステリア属菌の同定を分担する帯広畜産大学畜産学部応用獣医学講座へ提

供する。

B. 研究方法

1. 調査期間及び調査施設

本調査の実施期間は平成 20 年 7 月から平成 20 年 11 月とした。調査施設 A は北海道釧路管内にあり、塩タラコ製品をはじめスケトウダラフィレーなどの水産加工品を製造している。

2. 調査試料

(1) バイオフィルム

上述の調査施設 A では、原料は北海道東部沿岸で漁獲されたスケトウダラを用い、水揚げ当日に施設に搬入して裁割を行っている。当該施

設において、原魚裁割から魚卵の取り出しと原卵漬け込み処理、塩タラコ製品の箱詰めに至る工程で使用される器材、並びに作業環境よりバイオフィルムを採集した。バイオフィルムの採集は次のように行った。すなわち、滅菌済みのマイクロスポーテルあるいはスクレイパーを用いて、バイオフィルムを器材および作業環境より剥離し、滅菌済み蓋付き小型試験管(樹脂製)に採集した。各バイオフィルムの採集箇所および細菌検査に供した重量を表1に示した。

(2) 細菌検査

採集したバイオフィルムは、直ちに当該微生物実験室に搬入し、一般生菌数、リステリア(*Listeria monocytogenes*)について、次に示す方法により試験を行った。なお、本検査終了後の標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地については、菌叢のDNA分析とリステリア属菌の同定を担当する帯広畜産大学畜産学部応用獣医学講座へ提供した。

一般生菌数:表1に示したように、バイオフィルム数十から数百mgを滅菌チューブに滅菌的に精秤し、これに滅菌済みの0.1% Tween 80-生理的食塩水を10倍希釈となるよう適宜加えて激しく浸透し、10倍乳剤を調製した。この乳剤を適宜希釈し、標準寒天培地(日水製薬株)による混釈培養(35°C, 48時間)から一般生菌数を推定した。

リステリア:表1に示したように、バイオフィルム数十から数百mgを滅菌チューブに滅菌的に精秤し、これにハーフプレイザー培地(一次増菌培地(Oxoid社))10mLを加えて激しく浸透した後、30°Cで24時間培養した(一次増菌培養)。この培養液1.0mLをプレイザー培地(二次増菌培地(Oxoid社))10mLに接種し、37°Cにて24~48時間培養した(二次増菌培養)。一次増菌培養および二次増菌培養した試料は、クロモアガーリステリア寒天培地(CHROMagar社)を用いて、37°C24~48時間画線培養を行い、水色の定型的集落およびハローの有無によりリステリア属菌の検出と*Listeria monocytogenes*の推定を行った。

(倫理面への配慮)

当該施設名、従業員名、製品に関する情報を匿名とした。

C. 研究結果

(1) バイオフィルムにおける細菌検査結果

採集した各バイオフィルムのリステリア検査における一次増菌培地および二次増菌培地について、これら培地の黒色化の有無と、クロモアガーリステリア寒天培地(CHROMagar社)による水色の定型的集落およびハローの有無について確認した結果を表2に示した。その結果、二次増菌培養ではテーブル側面、ポリ容器底面、床タイル2、排水ピット・枠受け部、フィレーマシンのキャスターと魚体搬送部、スキナー・ローラー受け部横、フォークリフトのタイヤ側面とアクセルペダル、原魚処理用作業台1および2(いずれも木製)、貯水タンク、木製パレット1, 2, 3および4、プラスチック製まな板および原魚置き場壁の合計18カ所から得られたバイオフィルムの培地で、黒色化を観察した。このうち、床タイル2、フィレーマシンのキャスターと魚体搬送部、フォークリフトのタイヤ側面とアクセルペダル、原魚処理用作業台1および2(いずれも木製)、木製パレット1, 2および4の合計10カ所でリステリア属菌と推定される水色の定型的集落を確認した。そして、木製パレット1ではハローを有する水色の定型集落であることから、この器材に生成しているバイオフィルムは、*L. monocytogenes*を含むものであると推定した。

なお、すべての一次増菌培地について、培地の黒変化とクロモアガーリステリア寒天培地(CHROMagar社)による水色の定型的集落およびハローの有無について検討したところ、二次増菌培養の結果と同様であることを確認した。

図2に各バイオフィルムの一般生菌数を、クロモアガーリステリア寒天培地によるコロニー観察結果と合わせて示した。これによると、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、天井雨漏り部で 10^1 cfu/mg biofilmと低い値であったが、これを除く検体では 10^3 ~ 10^6 cfu/mg

biofilmの範囲に分布しており、このうち全体の約73%となる19カ所では 10^4 cfu/mg biofilm以上であった。なお、天井雨漏り部の一般生菌数が他と比べて顕著に低い値を示したが、これは採集した試料の大部分が鉄錆であり、バイオフィームがほとんど含まれていなかったことによるものと推測した。

クロモアガーリステリア寒天培地によりリステリア属菌と *L. monocytogenes* 陽性を推定したバイオフィームの一般生菌数は、 $10^3 \sim 10^6$ cfu/mg biofilmの範囲に分布し、フィレーマシンキャストで 1.2×10^6 cfu/mg biofilmと最も高い値を示し、次いで原魚処理作業台1および2が、いずれも 10^5 cfu/mg biofilm台を示した。また、床タイル2で 10^3 cfu/mg biofilm台を、フォークリフト・タイヤ側面およびアクセルペダルでは、それぞれ 10^4 cfu/mg biofilm台を示した。一方、*L. monocytogenes* 陽性を推定した木製パレット1の一般生菌数は 3.8×10^3 cfu/mg biofilmであり、この値はリステリア属菌陽性を推定した木製パレット2でもほぼ同様であった。また、木製パレット3および4では、いずれも 10^4 cfu/mg biofilm台を示し、後者でリステリア属菌陽性を推定した。

D. 考察

L. monocytogenes は比較的乾燥に強く、低温でも増殖することが知られている。近年、塩タラコ製造過程において、ローラーコンベヤ、パレットおよび魚卵漬け込み容器外壁より当該菌を含むバイオフィームが検出されており、非加熱で製造・喫食される水産加工品では、衛生管理の最適なモニタリング手法の確立が求められると同時に、その防除方法が大きな課題となっている。

今回の塩タラコ製造施設において、26箇所より採集したバイオフィームのうち、10箇所のバイオフィームからリステリア属菌を検出し、このうち1カ所(木製パレット)は *L. monocytogenes* であると推定した。原魚処理作業

台(木製)でリステリア属菌を検出していることから、原魚裁割工程における原卵への汚染や、*L. monocytogenes* の木製パレットから原卵への交叉汚染が容易に推測される。

当該施設で採集したバイオフィームの約38%がリステリア属菌および *L. monocytogenes* 陽性を示した理由の一つとして、当該施設が未舗装の道路に隣接しており、運搬作業や気象条件等により、土壌が施設内に持ち込まれやすい環境にあるためと考えられる。

本調査の結果から、バイオフィームが製造環境へ固着していることを確認した。今後は様々な非加熱水産加工食品製造環境からバイオフィームを採取し、その菌叢を把握すること、並びにバイオフィームがリステリア増殖に与える影響について、モデル試験により検討することが必要であると考えられた。

また、本調査で採集したバイオフィームは、リステリア属菌を含まないもの、リステリア属菌を含むもの、*L. monocytogenes* を含むものの3種類に分類できることから、これら3種類のバイオフィームの菌叢を把握することにより、当該菌の消長に関する情報を得られるのではないかと考える。

E. 結論

塩タラコの製造施設において、製造環境からバイオフィーム(採集箇所:26)を採集し、バイオフィームの一般生菌数とリステリアの有無について調査を行った。その結果、採集したバイオフィームの一般生菌数は、天井雨漏り部の 10^1 cfu/mg biofilmを除き、 $10^3 \sim 10^6$ cfu/mg biofilmに分布していた。このうち、原魚処理作業台など10カ所から採集したバイオフィームでは、クロモアガーリステリア寒天培地によりリステリア属陽性であることを確認した。そして、木製パレットでは *Listeria monocytogenes* を推定した。細菌検査終了後の標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地については、菌叢のDNA分析とリステリア属菌の同定を担当する帯広畜産大学畜産学部応用獣医学講座へ提供した。

今後、バイオフィルムについて化学的(薬剤)および物理的(スクレイピング等)処理を行い、処理前後のバイオフィルム菌叢の変化とリステリアの挙動を把握することが重要と考える。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

表1 各バイオフィルムの採集箇所と細菌検査に供した重量

No.	採集箇所	一般生菌数測定用 バイオフィルム重量 (g)	リステリア測定用 バイオフィルム重量 (g)
1	テーブル側面	0.1734	0.1651
2	サイドテーブル・キャスターハウジング	0.0657	0.0989
3	魚卵処理台(ステン)表面	0.0118	0.0279
4	床タイル	0.0034	0.0090
5	ポリ容器底面	0.0284	0.0410
6	計量器秤量台周囲	0.0012	0.0034
7	台車(緑)表面	0.0013	0.0040
8	床タイル	0.0090	0.0030
9	排水ピット・枠受け部	0.1052	0.0972
10	フィレーマシンキャスター	0.0602	0.0657
11	フィレーマシン魚体搬送部	0.1586	0.0210
12	スキナー・ローラー受け部横	0.0175	0.0354
13	フォークリフト・タイヤ側面	0.1446	0.1032
14	フォークリフト・アクセルペダル	0.0562	0.0472
15	天井雨漏り部	0.1094	0.1190
16	天井ドレイン	0.0298	0.0405
17	冷蔵庫床板	0.0164	0.0419
18	原魚処理用作業台1(木製)	0.0398	0.1307
19	原魚処理用作業台2(木製)	0.0451	0.1202
20	貯水タンク	0.0352	0.0495
21	木製パレット1	0.0085	0.0152
22	木製パレット2	0.0185	0.0387
23	木製パレット3	0.0256	0.0207
24	木製パレット4	0.0297	0.0837
25	プラスチック製まな板	0.0153	0.0132
26	原魚置き場壁	0.0176	0.0355

表2 各バイオフィルムにおけるリステリア属菌の検査結果

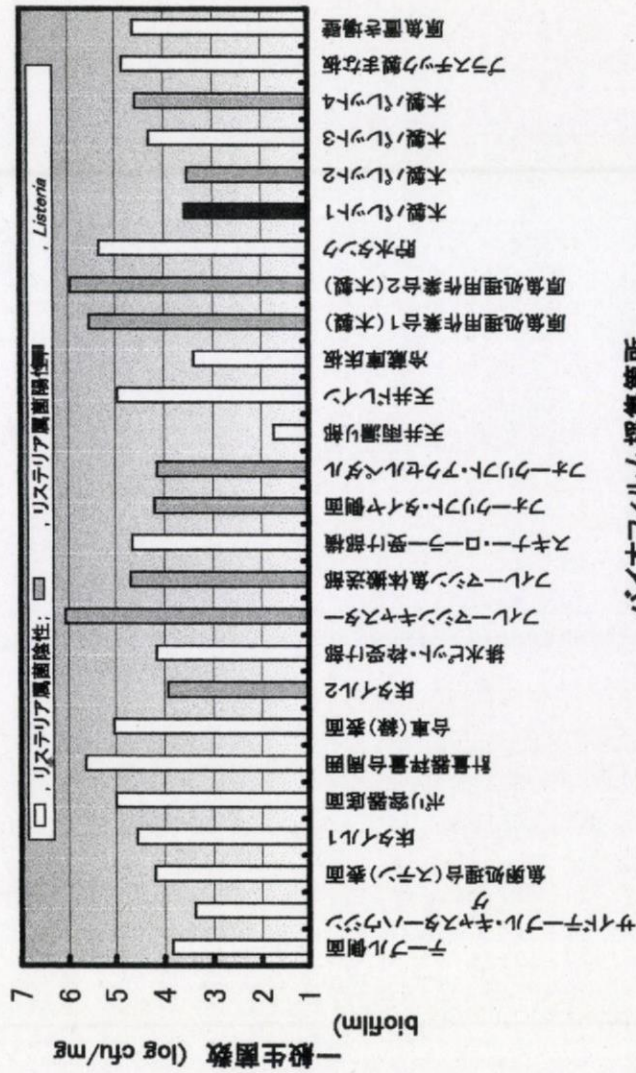
No.	採集箇所	リステリア一次増菌培養			リステリア二次増菌培養		
		一次増菌培地 変色	クロモアガーリステリア寒天培地		二次増菌培地 変色	クロモアガーリステリア寒天培地	
			水色発色	ハロー形成		水色発色	ハロー形成
1	テーブル側面	○	×	×	○	×	×
2	サイドテーブル・キャスターハウジング	×	—	—	×	—	—
3	魚卵処理台(ステン)表面	×	—	—	×	—	—
4	床タイル	×	—	—	×	—	—
5	ポリ容器底面	○	×	×	○	×	×
6	計量器秤量台周囲	×	—	—	×	—	—
7	台車(緑)表面	×	—	—	×	—	—
8	床タイル	○	○	×	○	○	×
9	排水ピット・粹受け部	○	×	×	○	×	×
10	フィレーマシンキャスター	○	○	×	○	○	×
11	フィレーマシン魚体搬送部	○	○	×	○	○	×
12	スキナー・ローラー受け部横	○	×	×	○	×	×
13	フォークリフト・タイヤ側面	○	○	×	○	○	×
14	フォークリフト・アクセルペダル	○	○	×	○	○	×
15	天井雨漏り部	×	—	—	×	—	—
16	天井ドレイン	×	—	—	×	—	—
17	冷蔵庫床板	×	—	—	×	—	—
18	原魚処理用作業台1(木製)	○	○	×	○	○	×
19	原魚処理用作業台2(木製)	○	○	×	○	○	×
20	貯水タンク	○	×	×	○	×	×
21	木製パレット1	○	○	○	○	○	○
22	木製パレット2	○	○	×	○	○	×
23	木製パレット3	○	×	×	○	×	×
24	木製パレット4	○	○	×	○	○	×
25	プラスチック製まな板	○	×	×	○	×	×
26	原魚置き場壁	○	×	×	○	×	×

注)○, 陽性; ×, 陰性; —, 未実施.

表3 各バイオフィルムにおける一般生菌数測定結果

No.	採集箇所	一般生菌数 (cfu/mg biofilm)
1	テーブル側面	6920
2	サイドテーブル・キヤスターハウジング	2435
3	魚卵処理台(ステン)表面	15264
4	床タイル1	35294
5	ポリ容器底面	88592
6	計量器秤量台周囲	425000
7	台車(緑)表面	107692
8	床タイル2	8333
9	排水ピット・枠受け部	14259
10	フイルーマシンキヤスター	1179402
11	フイルーマシン魚体搬送部	47289
12	スキナー・ローラー受け部横	43429
13	フォークリフト・タイヤ側面	15214
14	フォークリフト・アクセルペダル	13945
15	天井雨漏り部	54
16	天井ドレイン	87248
17	冷蔵庫床板	2439
18	原魚処理用作業台1(木製)	351759
19	原魚処理用作業台2(木製)	886918
20	貯水タンク	213068
21	木製パレット1	3765
22	木製パレット2	3243
23	木製パレット3	19141
24	木製パレット4	37037
25	プラスチック製まな板	67974
26	原魚置き場壁	40341

リステリア属菌が疑われる業者形成: 8, 11, 13, 14, 22, 24
 リステリア・モノサイトゲネス分離: 21



バイオフィルム採集箇所

図 水産加工施設で採集したバイオフィルムの一般生菌数とリステリア属菌

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究

カンピロバクター試験法に関する検討

分担研究者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒起因菌であるカンピロバクター・ジェジュニ／コリの試験では微好気培養を必要とし、食品等を検体とする試験においても、特殊な装置を用いた微好気培養を行わなければならない。このことが食品における本菌の試験を一般の試験室で行う場合の障害となっている。一方、通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いると、通常の好気培養用のインキュベーターで本菌の増菌培養が可能であることが昨年度の研究班の検討で示されている。そこで、地方衛生研究所 9 機関との共同研究を行い、実行性の高いと思われるこのような培養方法の妥当性を評価することにした。本年度は、開発した試験法の妥当性を評価するのに必要な標準試験法の検討を進めた。国際的な試験法である ISO 法に準じた標準となるカンピロバクター試験法案を作成し、研究室間共同試験により試験法案のバリデーションを試みた。鶏肉に人工的に菌株を接種した検体を共同研究者に送付し、各機関で試験を行いその結果を集計、評価した。増菌培地については、ISO 法で用いられているボルトン培地と、これまで国内で一般的に用いられてきたプレストン培地の性能比較を行った。選択寒天平板培地は、mCCDA 培地とバツラー培地について評価した。今回の研究室間共同試験により、プレストン培地での増菌の方がボルトン培地での増菌に比べ検出率が高いこと、ボルトン培地で増菌した場合は、選択平板培地は選択力の強いバツラー培地を用いないと分離率が低下することが明らかとなった。

研究協力者

影山亜紀子 国立医薬品食品衛生研究所
岡田由美子 同上
齊藤志保子 秋田県健康環境センター
藤田雅弘 群馬県衛生環境研究所
小野一晃 埼玉県衛生研究所
甲斐明美 東京都健康安全研究センター

横山敬子 同上
平松礼司 愛知県衛生研究所
田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所
石村勝之 広島市衛生研究所
富永潔 山口県環境保健センター
八尋俊輔 熊本県保健環境科学研究所
宮坂次郎 同上

吉田朋高 SUNATEC

松岡英明 東京農工大学

A. 研究目的

カンピロバクターは、微好気培養を必要とする細菌であり、食品の汚染実態調査を行う場合、特殊な培養装置を必要とすることから、このような装置が無い場合、食品における本菌の汚染を調べることは困難であった。さらにカンピロバクターは、酸素や乾燥ストレスに弱いため、試験法が異なると検出結果が大幅に異なってしまう。国内には公定法がないため、統一した試験法での汚染実態調査は行われていない。試験法を検討するためには、基準となる試験法の確立が必須である。前年度の検討から通気性の無い特殊フィルムを用いたストマッカー袋を用いることにより、好気培養下においても本菌の増菌培養が可能であることが示されている。この方法は広く汚染実態を調査する目的にはたいへん有用であると思われる。この方法が試験法としてどの程度の信頼性を持つかあるいは、国際的に認められる方法であるか判断するためには、基準となる試験法と科学的根拠のあるバリデーション(妥当性確認)を行わなくてはならない。基準となる試験法(ISO法など)をプロトコール化し、標準試験法を確定し、その上で今回開発した新しい試験方法の正当性を評価することが必要である。研究班ではISO法を基に検討を進め、標準試験法案を作成し、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”で作業部会案として認められたことから、菌株を人工的に接種した鶏肉について、9箇所の機関で研究室間共同試験を行った。その結果を解析し、カンピロバクター試験法に適用可能な妥当性

確認を行う方法論の確立を試みた。

B. 研究方法

あらかじめ25gずつ鶏挽肉をストマッカー袋に計量し、人工的に菌株を接種した検体を、共同研究者に送付し、カンピロバクター標準試験法作業部会案に従い、試験を実行した。試験は、国立医薬品食品衛生研究所がweb上で公開している“食品からのカンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の試験法案(ステージ2:作業部会案)NIHSJ-02-ST2”に従って実施した。

研究室間共同試験の規模は、9試験所で、陽性試料2濃度各3回反復、陰性試料3回反復で行った。陽性試料は高濃度接種群3、低濃度接種群3、非接種群3の合計9を、増菌培地2種類で行うこととし、計18試料を配布した。各機関の試験結果を収集し、定性試験法の評価法に従い評価し、2種類の増菌培地の比較と、選択寒天平板培地との組み合わせについて評価した。増菌培地はISO法で用いられているボルトン培地と、これまで国内で一般的に用いられてきたプレストン培地の性能比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は問題になる研究内容を含まない。

C. 研究結果

鶏挽肉に菌株をスパイクしたのち、4℃に保ち、菌数の変化を調べたところ、原因は不明であるが、接種24時間後は計測されるコロニー数が一時的に低くなり、48時間後に菌数が復活し、72時間後もその菌数が維持されることがわかった。繰り返し行った接種回収実験で再現性があったため、研究室間共同試験では、人工培養したカンピロバクターを接種した鶏挽