

- from cockles (*Anadara granosa*) at Tanjung Karang, Kuala Selangor. Int. Food Res. J. 18: in press.
- 15) S. M. Lutful Kabir, K. Kikuchi, M. Asakura, S. Shiramaru, N. Tsuruoka, A. Goto, A. Hinenoya, and S. Yamasaki. 2011. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 64:19-27,
 - 16) Pham van Hung, J. Zhang, M. Hayashi S.Yoshida, K. Ohkusu, and T. Ezaki. 2011. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on *dnaJ*, 16S rDNA and *rpoB* gene sequences. Jpn Soc. Cul. Coll.(submitted)
 - 17) Thanongsaksrikul J., Srimanote P., Maneewatch S., Choowongkamon K., Tapchaisri P., Makino S.-I., Kurazono H., and Chaicumpa W. 2010. A V_HH that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. J. Biol. Chem. 285: 9657-9666.
 - 18) Akada K.J., Aoki H, Torigoe Y, Kitagawa T, Kurazono H, Hoshida H, Nishikawa J, Terai S, Matsuzaki M, Hirayama T, Nakazawa T, Akada R, and Nakamura K. 2010. *Helicobacter pylori* CagA inhibits endocytosis of cytotoxin VacA in host cells. Disease Models & Mechanisms. 3(9-10): 601-617.
 - 19) Matsumoto A., Isomoto H., Nakayama M., Hisatsune J., Nishi Y., Nakashima Y., Matsushima K., Kurazono H., Nakao K., Hirayama T., and Kohno S. 2010. *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X_L, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. Digestive Diseases and Science, October 7.
 - 20) Toh, H., K. Oshima, A. Toyoda, Y. Ogura, T. Ooka, H. Sasamoto, SH. Park, S. Iyoda, K. Kurokawa, H. Morita, K. Itoh, TD. Taylor, T. Hayashi, and M. Hattori. 2010. Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. J. Bacteriol. 192(4):1165-6.
 - 21) Yano, T., K. K. Moe, K. Yamazaki, T. Ooka, T. Hayashi, and N. Misawa. 2010. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from

- quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet. Microbiol.* 134(2-4) :352-362.
- 22) Nakayama, K., Kurokawa, M., Fukuhara, H., Urakami, S., Yamamoto, K., Yamazaki, Y., Ogura, T., Ooka, and T. Hayashi. 2010. Genome comparison and phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains. *DNA Res.* 17:281-291.
- 23) Izumiya, H., Y. Pei, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Hayashi, S. Iyoda, and H. Watanabe. 2010. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.* 54:569-577.
- 24) Yen, H., T. Ooka, A. Iguchi, T. Hayashi, N. Sugimoto, and T. Tobe. 2010. NleC, a type III secretion protease, compromises NF- κ B activation by targeting p65/RelA. *PLoS Pathog.* 6 (12): e1001231.
- 25) Kusumoto, M., T. Ooka, Y. Nishiya, Y. Ogura, T. Saito, Y. Sekine, T. Iwata, M. Akiba, and T. Hayashi. 2011. IS-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nat. Commun.* 2:152, DOI:10.1038/ncomms1152.
- 26) Matsuura, G., N. Morinaga, K. Yahiro, R. Komine, J. Moss, H. Yoshida, and M. Noda. 2009. Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect. Immun.* 77:2919-2924.
- 27) Yahiro, K., N. Morinaga, J. Moss, and M. Noda. 2010. Subtilase cytotoxin induces apoptosis in HeLa cells by mitochondrial permeabilization via activation of Bax/Bak, independent of C/EBF-homologue protein (CHOP), Ire1alpha or JNK signaling. *Microb. Pathog.* 49:153-163.
- 28) Yahiro, K., M. Satoh, N. Morinaga, H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, F. Nomura, J. Moss, and M. Noda. 2010. Identification of Subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun.* In press.
- 29) Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kamiya S. 2010. Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (Suppl

- 1):S90-94.
- 30) Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. 2010. Analysis of the microflora in the stomach of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. J. Gastroenterol. Hepatol. 25 (Suppl 1):S11-14.
- 31) Bai CL, Osaki T, Yonezawa H, Hanawa T, Zaman C, Kurata S, Kamiya S, Tanaka H. 2010. In vitro and in vivo effects of the Mongolian drug Amu-ru 7 on *Helicobacter pylori* growth and viability. Microbiol. Immunol. 54(9):508-515.
- 32) Hanawa T, Osaki T, Manzoku M, Kawakami H, Tomoda A, Kamiya S. 2010. In vitro antibacterial activity of Phx-3 against *Helicobacter pylori*. Biol. Pharm. Bull 33(2):188-191.
- 33) Yabe S, Higuchi W, Takano T, Razvina O, Iwao Y, Isobe H, Yamamoto T. 2010. In vitro susceptibility to antimicrobial agents and ultrastructural characteristics related to swimming motility and drug action in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. J. Infect. Chemother. 16:174-85.
- 34) Yabe S, Higuchi W, Iwao Y, Takano T, Razvina O, Reva I, Nishiyama A, Yamamoto T. 2010. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from chickens and patients with gastritis or Guillain-Barré syndrome based on multilocus sequence types and pulsed-field gel electrophoresis patterns. Microbiol Immunol. 54:362-7.
- 35) Kodama, T., Gotoh, K., Hiyoshi, H., Morita, M., Izutsu, K., Akeda, Y., Park, K.-S., Cantarelli, V.V., Dryselius, R., Iida, T., and Honda, T. 2010. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region. PLoS One 5: e8678.
- 36) Hiyoshi, H., Kodama, T., Iida, T., and Honda, T. 2010. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity and mice lethality. Infect. Immun. 78: 1772-1780.
- 37) Kodama, T., Yamazaki, C., Park, K.-S., Akeda, Y., Iida, T., and Honda, T. 2010. Transcriptional regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes by ExsACDE regulatory cascade and H-NS. FEMS Microbiol. Lett. 311: 10-17.
- 38) Gotoh, K, Kodama, T., Hiyoshi, H., Izutsu, K., Park., K.-S., Dryselius,

- R., Akeda, Y., Honda, T. and Iida, T. 2010. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a therapeutic potential for bile acid-sequestering agents. PLoS One 5: e13365.
- 39) Okada, N., Matsuda, S., Matsuyama, J., Park, K.-S., de los Reyes, C., Kogure, K., Honda T. and Iida, T. 2010. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. BMC Microbiol. 10: 302.
- 40) Izutsu, K., and Iida, T. 2010. *Vibrio parahaemolyticus*. Genomes of Food- and Water-Borne Pathogens, ASM Press p. 77- 84.
- 41) Tokunaga, A., Yamaguchi, H., Morita, M., Arakawa, E., Izumiya, H., Watanabe, H., Osawa, R. 2010. Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139. Mol. Cell. Probes.
- 42) Hirai, K., Arimitsu, H., Umeda, K., Yokota, K., Shen, L., Ayada, K., Kodama, Y., Tsuji, T., Hirai, Y., and K. Oguma. 2010. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. Acta Med. Okayama. 64:163-170.
- 43) Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Kato, M., and T. Tsuji. 2009. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. DNA Res. 16:299-309.
- 44) Porter, S. R., Czaplicki, G., Mainil, J., Horii, Y., Misawa, N., and Saegerman, C. Q fever in Japan. An update review. Vet. Microbiol., (in press)
- 45) Yamazaki, W., Taguchi, M., Misawa, N. 2010. Development of loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Microbiol. Immunol., 54:398-404.
- 46) Moe, K. K., Yano, T., Misumi, K., Kubota, C., Nibe, K., Yamazaki, W., Muguruma, M., and Misawa, N. 2010. Detection of antibodies against *Fusobacterium necrophorum* and *Porphyromonas levii*-like species in dairy cattle with papillomatous digital dermatitis. Microbiol. Immunol., 54: 338-346.

- 47) Yano, T., Moe, K. K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., and Misawa, N. 2010. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet. Microbiol.*, 143: 352-362. な し
3.その他
な し
- 48) Moe, K. K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Masaaki Nakai, M., and Misawa, N. 2010. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J. Vet. Med. Sci.*, 72: 411-416.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

(研究分担者 西渕光昭)

「食品用殺菌剤」

国内特許査定 (特願 2010-544101)

国際特許出願 (国際出願番号
PTC/JP2010/060766)

(研究分担者 三澤尚明)

「真空および共振型超音波処理による食品材料における微生物の制御法及び制御装置」

特願 2010-065744

国際特許出願予定 (2011 年)

2.実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

アジアで重要な食中毒原因細菌の生態および疫学に関する研究

研究分担者	西渕光昭	京都大学教授
研究協力者	中口義次	京都大学助教
研究協力者	Abdul Aziz Djamal	(インドネシア) アンダラス大学助教授
研究協力者	Nguyen Binh Minh	ベトナム国立衛生疫学研究所微生物学 部門長
研究協力者	Varaporn Vuddhakul	(タイ) プリンス・オブ・ソクラ大学 助教授
研究協力者	Pharanai Sukhumungoon	(タイ) プリンス・オブ・ソクラ大学 大学院生
研究協力者	Son Radu	マレーシア・プトラ大学教授
研究協力者	Chai Fung Pui	マレーシア・プトラ大学大学院生
研究協力者	岩出義人	三重県保健環境研究所主幹研究員
研究協力者	勢戸和子	大阪府公衆衛生研究所主任研究員
研究協力者	山崎渉	宮崎大学准教授
研究協力者	瀬尾晃司	京都大学医学部学生
研究協力者	田中夏子	京都大学大学院医学研究科院生
研究協力者	杉山純一	デンカ生研株式会社研究顧問
研究協力者	権平文夫	デンカ生研株式会社生物ウイルス 試薬部部長

研究要旨：

アジアの多くの国々では、欧米の影響を受けつつ伝統的な食習慣が維持されているが、腸管感染症の発生状況や原因菌による食材の汚染情報が乏しい。研究分担者らは、日本や米国で最近特に重視された腸管感染症原因菌 4 種類（腸炎ビブリオ、サルモネラ菌、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌 0157）およびリステリア菌について、日本以外のアジア諸国についてタイ、インドネシア、ベトナム、マレーシアとの共同研究を実施した結果、これらの国々で、ひろく関連食品が汚染している可能性が示された。特に食品の生産現場や市場・露天などの衛生状態がこれらの病原菌の食品汚染に関係している。生で喫食する野菜やカット果物の交差汚染には注意が必要である。また輸出入食品（二枚貝や牛肉）の汚染も確認されたので、要注意である。腸炎ビブリオ感染症に関しては、食文化や宗教が感染症の発生率に影響していることが確認されたので、予防策の検討に役立つかも知れない。

A. 研究目的

アジアの多くの国々では、世界の他の発展途上国と同様に腸管感染症が非常に重要な疾病であるが、日本や米国のように国立研究機関を中心として、国内の腸管感染症の発生状況や感染の原因となる可能性のある食材を詳細にモニタリングする制度を確立している国はない。また、アジアの多くの国々では伝統的な食習慣が維持されながらも、生活様式や食習慣にグローバル化の影響が見られる。そこで、研究分担者らは、多発する腸管感染症の原因細菌として、日本や米国で過去10年間に特に重視された腸管感染症原因4種類（腸炎ビブリオ、サルモネラ菌、カンピロバクター [*Campylobacter jejuni/coli*]、腸管出血性大腸菌O157）(Scallan E, et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2011 Jan, DOI: 10.3201/eid1701.P11101]; IASR. 2008. 29: 213-215) に注目している。さらに患者数は少ないが致死率が高いので世界的に問題にされている食品由来感染症原因菌としてリステリア菌にも注意している。研究分担者らは、これらの菌種について日本以外のアジアの国々で現地の研究者と共同で、これらの病原菌の現地での重要性を明らかにする研究を展開している。本研究では、これらの国々において患者の発生状況や病原菌による食材の汚染を明らかにするフィールド調査の結果とラボでの分離菌の詳細な血清学的・遺伝学的解析の結果を統合して、感染症の発生および伝播と人々の

生活や衛生状態との相関関係を含めて感染症予防法を考察した。

B. 研究方法

1) 腸炎ビブリオの分離と検査：下痢患者から得た臨床サンプル（スワブまたは下痢便）を、インドネシアでは空輸または車で輸送のため一旦輸送培地（キャリブレア）で保存してから、ベトナムでは直接、CHROMagar Vibrio 寒天培地に接種し、腸炎ビブリオに特有な形状を示した集落について、生化学性状検査および遺伝学的検査（Kishishita et al. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2449-57）により、腸炎ビブリオであることを確認した。タイでは、選択分離培地として、CHROMagar Vibrio 寒天培地と TCBS 寒天培地を併用した。同定した菌株について、PCR 法によって、*tdh* 遺伝子の有無、*trh* 遺伝子の有無、パンデミック株か否か（GS-PCR）を検査した。O:K 血清型は特異抗血清を用いたスライド凝集試験によって決定した。二枚貝から腸炎ビブリオを分離する場合は、貝の身をアルカリペプトン水を用いた増菌培養に続いて、食塩ポリミキシンブイオンを用いた増菌培養を行った。その後特定の K 抗原型を標的とする免疫磁気ビーズ処理を施し、ビーズを CHROMagar Vibrio 寒天培地に接種した。改良法では、ビーズを寒天培地に接種せずに食塩ポリミキシンブイオン増菌培養に供し、必要に応じてこのステップを再度実施した後に CHROMagar Vibrio 寒天培地に接種し

た。腸炎ビブリオに特有な形状を示した集落について、特異的なK抗血清を用いたスライド凝集試験によってスクリーニングに供した。陽性と判定された集落について、上記のように同定とPCR法による遺伝子型検査を実施した。

2) 腸炎ビブリオのK抗原-O抗原関連遺伝子群の塩基配列の解析：パンデミック・クローンのK抗原変化に関係する可能性がある旨指摘されている領域 (Okura et al. 2008. *Microbiol Immunol.* 52:251-64.) およびその周辺領域 118 kb の塩基配列の決定のために、この領域の既報の塩基配列 (O3K6 型、RIMD2210633 株; O4:K68 型、AN5034 株) を鋳型として、60 組のプライマーを設計し、PCR walking 法を採用した。

3) サルモネラ属菌検査用 Multiplex PCR: 既報の *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium および *Salmonella* Typhi 検出用の標的遺伝子とPCRプライマーの塩基配列 (Soumet et al. 1998. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 113-117; Zhu et al. 1996. *J Appl Bacteriol.* 80: 244-251.) を参考にし、*Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium、および *Salmonella* Typhi を同時に検出できるプライマー3セットを決定し、プライマー濃度、マグネシウム濃度、および反応温度の組み合わせを調節して、multiplex PCR が実施可能な反応条件を検討・確立した。サンプル (カット果物) をペプトン水を用いた増菌

培養後に、ボイル法によってテンプレート DNA を調製し、上記の条件で multiplex PCR を実施した。標準的な MPN (most probable number [最確数]) 3 本法と multiplex PCR 法を組み合わせ、標的細菌 (群) の定量データを得た。

4) カンピロバクター菌の鶏肉 (ブロイラー) から調理を介した他の食材への交差汚染：鶏肉、調理器具、手などのカンピロバクター菌 (*Campylobacter* spp.) の菌量は、MPN-PCR 法によって推定した (Lindquist, J. 2001. http://www.jlindquist.net/general_micro/102dil3.html on 20/4/2007; Whyte et al. 2004. *Int. J. Food Microbiol.* 95: 111-118)。

5) タイ南部における市販牛肉からの大腸菌 O157:H7 の検出と解析：市販牛肉をノボビオシン添加 triptic soy broth を用いて増菌培養後、ウサギ抗 O157 抗体と抗ウサギ IgG 抗体-感作磁気ビーズを用いた 2 段階免疫磁気ビーズ法で、大腸菌 O157 をスクリーニングし、CHROMAgar O157 培地上に発育した特有の藤色コロニーを検査した。抗 O157 抗体と凝集を示し、PCR 法で病原遺伝子 (*stx*₁/*stx*₂, *eae*) が確認できた分離菌株の H 抗原型を過去に報告した方法 (Vuddhakul et al. 2000. *FEMS Microbiol. Lett.*, 18:343-347) により決定した。大腸菌 O157:H7 (*stx*₂⁺, *eae*⁺) に分類された分離株については、Stx2 産生能を TNP-PCR 法 (Koitabashi et al. 2006. *Microbiol.*

Immunol. 50(2): 135-148) で調べ、DNA フィンガープリントを IS-printing 法およびパルスフィールドゲル電気泳動法により決定・比較した。

6) 野菜からのリステリア菌の検出法：野菜サンプルを *Listeria* Enrichment Broth (BLEB [Buffered *Listeria* Enrichment Broth], Merck 社) と選択物質 (アクリフラビン、ナルジクス酸、シクロヘキサミド) を用いて 30°C で培養した。この培養法を MPN-PCR 法 (3 本法) と組み合わせて、菌量を推定した。各試験管の培養液を PALCAM 寒天培地に接種し、各プレートに発育してきた典型的なコロニー 5 個以上を PCR 法で検査した。分離菌の液体培養液からボイル法で DNA テンプレートを作製し、PCR 法で検査した。*Listeria* spp. および *L. monocytogenes* について、それぞれ 16S rRNA 遺伝子と *hly* 遺伝子を標的とするプライマーを使用した。

C. 研究結果

1) 腸炎ビブリオ：インドネシア、ベトナム、およびタイでの共同研究

分担研究者を中心とする東南アジアおよび東アジアでの共同研究グループネットワークのこれまでの研究成果から立てた仮説は、東南アジアで腸炎ビブリオ感染症が多発するのは、フィルターフィーダーである二枚貝に汽水環境中の菌が濃縮されることおよび、これらの二枚貝を十分加熱しないで喫食する食文化が広く東南アジアおよび東アジアに広がっていることが原因であるということである。

この仮説は、主としてタイでの長年の共同研究の結果とインドネシアで昨年度実施した予備調査の結果に基づく。本年度の研究では、この仮説を検証するために、インドネシアおよびベトナムで腸炎ビブリオ感染症の発生状況に関する共同研究を実施した。

インドネシアでは、国民の大部分をイスラム教徒が占め、宗教的な影響により魚介類を十分加熱して喫食するため、腸炎ビブリオ感染症の発生はほとんどないと予想された。そこで 2010 年 2 月から 9 月までの期間に、イスラム教徒が主流を占める西スマトラ州の州都であるパダンとシンガポールに近く中国系住民が混在する観光都市であるバタンで下痢患者の臨床サンプル (スワブまたは下痢便) から、腸炎ビブリオが分離されるか否かを検査した。その結果、パダンで検査した 244 検体からは全く腸炎ビブリオが分離されなかったが、バタンで検査した 291 検体のうち、1 検体から腸炎ビブリオ病原性株 (01:K36, *tdh*⁺, *trh*⁺, GS-PCR 陰性) が分離できた。追跡調査により、この菌が分離された患者は、中華系仏教徒で、病院を訪れた日の前日にレストランで Kerang と呼ばれる海洋性二枚貝を喫食していたことが判明した。

ベトナムは、ドイモイ以後急速な経済成長を続け、二枚貝を含む魚介類の生産 (主として養殖) および国内消費と輸出が増加し続けている。また社会主義国であるにもかかわらず、人々の生活は欧米化しており、健康食嗜好やオイスターバーで生ガキを食べる文化も吸収している。一方で、東南アジアおよび東アジアに共通する二枚貝を十分加熱しないで喫食する食習慣も広く根付いていることも現地のフ

ワールド調査で確認した。過去にベトナムにおける腸炎ビブリオ感染症の発生状況について、国際的に発信されたものは、中部海岸に位置する都市であるナチャンで研究分担者らの共同研究グループが報告した、1997年から1999年にかけて発生したパンデミック・クローンによる感染症の流行のみである (Chowdhury, et al. 2004. *Microbiol Immunol.* 48:319-27)。本研究では、首都であるハノイにおける状況を調査した。第1回(2009年6月)と第2回(2010年4月~6月)の調査において、それぞれ131検体と581検体の下痢患者のサンプルを検査した。その結果、第1回と第2回の調査でそれぞれ26%および9%の検体から腸炎ビブリオが分離された。合計85分離菌株のうち、1株が *trh*⁺ で、その他の株は *tdh*⁺ で、すべての菌株が病原遺伝子を保有していた。また85%の菌株がパンデミック・クローンに属し (GS-PCR陽性)、血清型が03:K6であった。

タイ南部ハジャイ市のプリンス・オブ・ソンクラ大学とは長年共同研究を継続している。この地域では、腸炎ビブリオ感染症が多発していることを確認し、腸炎ビブリオの臨床分離株および環境(二枚貝)分離株を継続的に分離・保存している。本年度はこれらの分離菌株のK抗原の解析を中心とする共同研究を実施した。11年間に分離した1895株の臨床分離株の0:K抗原型を比較すると、03:K6型パンデミック・クローンに属する菌株が毎年高頻度に分離されている以外は、各年の血清型分布がかなり頻繁に変化していることが明らかになった。例えば、パンデミック・クローンに属する (GS-PCR陽性) が、03:K6型以外の血

清型に属する菌株の中でも、01:K25型および04:K68型に属する菌株の分離頻度は比較的高く、いずれも毎年全分離株の5%を超えていたが、これら2型の経年分離頻度のピークがほぼ相互に変化する現象が観察された(図1)。これは臨床分離コレラ菌株の主たる0抗原型が01型と0139型との間で変化する消長現象と似ていた。このことは、これら2種のパンデミック・クローン血清型間で遺伝子レベルでの変化を伴う高頻度の血清型の相互変換が起こっている可能性を示唆している。この現象が起こるためには、それぞれの血清型を決定する重要な遺伝子群のカセットの入れ替えのようなメカニズムが必要であり、しかもこれはそれぞれの遺伝子群を持つ2菌株のどちらかに由来する遺伝子カセットの移動と組み換えが必要である。この現象が起こる可能性が最も高いのは、汽水環境中の菌が濃縮・蓄積される二枚貝の消化管中であると推測される。我々がかつて、この地域で二枚貝中の病原性株の分布頻度が高いと考え、菌体の最も外側の抗原であるK抗原に着目し、特にK6抗原型を有する菌株を標的とする免疫磁気ビーズ法を取り入れた分離法を用いて、二枚貝から03:K6型パンデミック・クローンに属する菌株を高頻度に分離した。本年度は、この免疫磁気ビーズ法を改良し、さらに特異性を向上させた新しい分離法を開発し(研究方法参照)、二枚貝から特定のK抗原型を有する菌株を効率よく分離することに成功した。パンデミック・クローンに属する菌株の抗原型(特にK抗原型)の変化に関与する可能性がある遺伝子群の存在する染色体上の領域が指摘されている (Okura et al. 2008. *Microbiol Immunol.*

52:251-64.)。この領域の上流および下流 (O 抗原の変化に影響する領域も含む可能性も考えられた) を含む 118 kb の領域について、パンデミック・クローンに属する臨床分離株 62 菌株および血清型がそれらと同一の環境分離株 (非パンデミック・クローン、上記の新しい分離法によって分離) 24 菌株を対象に塩基配列を比較解析した。臨床分離株と環境 (二枚貝) 分離株の一部がこの領域内の 4 カ所に相同領域 (9 kb ~ 35 kb) を共有していた。二枚貝分離株の中で相同領域を持つ菌株の割合は、例えば 04:K68 型では 6 株中 2 株、01:K76 型の場合、5 株中 2 株であった。さらに 04:K68 菌株の場合、解析した領域内にパンデミック・クローンでも非パンデミック・クローンでも血清型特有の塩基配列が検出された。この塩基配列は、118 kb の領域の移動を追跡する場合に有用なマーカーになると言える。同様なマーカー配列が 01:KUT 血清型の一部でも見つかった。即ち、我々はこれまで分離された KUT (K untypeable) 型に属するパンデミック・クローンのほとんどの菌株は我々が提唱した新たな 2 種の K 抗原型に属することを示したが、そのうちの 1 種の K 抗原を有する菌株がそのようなマーカー配列を有していた。これらの解析結果から、パンデミック・クローン菌株が相同領域での組み換えを介して遺伝子群のカセットの入れ替えのようなメカニズムで O:K 血清型を変化させる可能性が指摘できた (図 2)。

タイでの 11 年間の分離株を含めて、15 年間にアジア諸国で分離されたパンデミック・クローンに属する 2116 菌株 (共同研究を通して研究分担者のラボに蓄積したストック菌株) の K 抗

原型 (我々が提唱した新たな 2 種の K 抗原型も含む) を決定・再確認し、アジアの国別地図に分離年情報も含めてマッピングし、解析したところパンデミック・クローンの出現と O3:K6 型から他の血清型が派生しつつ国境を越えて伝播した様式に関する仮説が提唱できた (図 3)。この伝播の様子とハイガイ (アカガイに似る二枚貝で死ぬときに赤い血液状の液体を流出することから bloody clam と呼ばれる。Anadara granosa) の貿易ルートに共通点が見いだされた。かつてはタイから東南アジア諸国へ多く輸出されていたが、現在はベトナムも生産・輸出国として加わって競争が発生しており、聞き取り調査の結果、タイから中国まで空輸するルートもあるらしい。ハイガイをあまり加熱しないで喫食する食習慣は中華系住民を中心として広く東南アジアおよび東アジアに広がっている。この理由の 1 つは、そのようにしてこの貝を喫食することが強精剤的作用を持つと信じられているからであることも、各地での聞き取り調査の結果確認できた。

2) サルモネラ属細菌: マレーシアでの共同研究

サルモネラ属に属する細菌の中で、チフス菌 (*Salmonella* Typhi)、ネズミチフス菌 (*Salmonella* Typhimurium)、および食中毒の原因となるサルモネラ菌 (*Salmonella* spp.) の 3 グループの *Salmonella* 属細菌に汚染した食品による感染症は米国や日本でも重視されているが、東南アジアのような衛生状態が悪い地域では、より多発していると予想されるが、東南アジア諸国の中でも比較的経済力のあるマレーシアでも公式なデータはない。一方で経済力が豊かになるにつれて人々

は欧米化の影響を受け、食事の中にダイエットメニューを取り入れるようになってきた。そこで生で喫食する野菜や果物における食中毒菌の汚染に注意する必要性が指摘されている。研究分担者らは、最近 MPN-PCR 法を用いてマレーシアで市販されている野菜がカンピロバクター(発酵させてない鶏糞を肥料として使用するため)や腸炎ビブリオ(市場でのクロスコンタミネーションによる)に汚染している実態を報告した。本研究では、3 グループの *Salmonella* 属細菌を同時に検出できる multiplex PCR 法を開発し、それを MPN 法と組み合わせて使用し、市販されているカット果物における3グループの *Salmonella* 属細菌による汚染の状況を明らかにした。合計 210 検体の検査結果は、チフス菌、ネズミチフス菌、サルモネラ菌の汚染率がそれぞれ 7.6%、3.8%、23.3%で MPN 値は 0~19/g であった。露天商が販売している商品の汚染率が高く、スーパーマーケットの商品のほとんどは汚染していなかった。

3) カンピロバクター：マレーシアでの共同研究

研究分担者らは、かつてマレーシアで市販の野菜(ただし地面に近い部分が収穫される葉もの)が *Campylobacter jejuni* および *Campylobacter coli* によって汚染していることを報告し、さらにその原因は農場で肥料として使用している未発酵鶏糞であることを示した(Chai et al. 2009. J. Microbiol. Biotechnol. 19:1415-1420)。このことは、養殖している鶏が非常に高頻度にこれらの菌を保有し、現地で好んで食べられる鶏肉(ブロイラー)がこれらの菌によって高頻度に汚染していることを示

唆している。さらに現地の一般的調理習慣を考えると、鶏肉を調理したまな板を介して、生で喫食される他の食材の汚染が想定される。本研究では、現地の一般家庭での調理状況を想定し、実際に市販されている鶏肉(ブロイラー)をまな板と包丁を用いて調理し、その後に生のキュウリを調理するという設定で実験を行い、*C. jejuni* と *C. coli* を各ステップで MPN-PCR 法によって定量して、それらのデータにもとづいて菌の調理器具や手への付着性を計算し、シミュレーションによる、他の食材の交差汚染リスク評価を実施した。洗浄水中に検出した量から、調理器具(1.4-223.3 MPN/ml 洗浄水)のほうが手(0.7-43.4 MPN/ml 洗浄水)よりカンピロバクター菌の付着数が高いように見えたが Mann-Whitney U 試験では、有意な差が認められなかった。いずれを介しても最終調理品(生キュウリ)のカンピロバクター菌の高頻度の汚染が予想された(伝播率: 0~≥100%)。

4) 大腸菌 0157:H7：タイでの共同研究

研究分担者らは、かつてマレーシアや隣接するタイ南部において、市販牛肉から腸管出血性大腸菌の重要な病原遺伝子(*stx*₁/*stx*₂, *eae*)を保有し、大腸菌 0157:H7 に属する菌株をかなり分離した。特にマレーシアでは、インドからの輸入牛肉が高頻度に(約4割)汚染していたので、タイ南部において市販されている牛肉の汚染は、マレーシアからタイへの輸入牛肉の汚染が原因である可能性が考えられた。本研究では、マレーシア国境に近いタイ南部地域において、マレーシア産 31 検体およびタイ産(国産) 36 検体の市販牛肉を検査した。マレーシア産検体の 33.3%およびタイ産検体の 11.1%から

大腸菌 0157:H7 (stx_2^+ , eae^+) が検出された。両国からの分離菌は、近似する DNA フィンガープリントを示したので、マレーシアからタイへの輸入牛肉説が支持された。ただし、分離菌株のいずれも、研究分担者らが過去に報告した stx_2^+ 遺伝型を示すが、Stx2 (志賀毒素タイプ 2) の産生が認められないか、あるいはごく微量しか産生しないタイプの菌株 (Koitabashi et al. 2006. Microbiol. Immunol. 50(2): 135-148) であった。

5) リステリア菌：マレーシアでの共同研究

リステリア菌 (*Listeria* spp. および *Listeria monocytogenes*) を定量的に検出するために、MPN-PCR 法を確立し、マレーシアで市販の野菜のうち特に生に近い状態で消費される品種に属する (“ulam” と呼ばれるサラダ風のメニューに使用される) 306 検体を調べた。33.3% および 22.5% の検体が *Listeria* spp. および *L. monocytogenes* の検査で陽性であった。いずれの場合も、MPN/g は検出限界以下～1100 の範囲であった。

D. 考察

腸炎ビブリオ感染症に関しては、東南アジアの広域にわたる共同研究の結果、二枚貝を十分加熱してから喫食しない食習慣が感染症の多発原因として非常に重要であることを支持する証拠が十分えられた。さらにこの食習慣は宗教の違いや、性行動と関係する食の嗜好にも影響を受けており、それはさらに東南アジアや東アジアでのハイガイの貿易にも影響を及ぼしているという複雑な関係が浮かび上

がってきた。これらのアジア諸国の行政サイドが、このようなリスクについて国民を教育することによって感染症の発生予防に貢献することができると言える。

カット果物のサルモネラ属細菌汚染の調査結果は、露天商が販売している商品の衛生状態が菌の汚染率と深く関わっていることを明らかに示している。これはサルモネラ属細菌に限ったことでもなく、カット果物に限ったことでもない可能性が大きい。今後は、露天商が販売している商品の衛生状態の実態を、他の病原菌種や他の食品も対象にして、さらに詳しく調査する必要がある。

マレーシアでのカンピロバクターに関する研究結果から、鶏肉や葉ものの野菜を調理した場合、手洗いや調理器具の洗浄を入念に行う必要があることをマレーシア国民や同様の調理習慣を持つ近隣諸国の国民に知らせるべきであると提言したい。

タイでの大腸菌 0157:H7 に関する共同研究の結果から、マレーシアからタイへ大腸菌 0157:H7 によって汚染した牛肉が輸出されていることが明らかになったが、Stx2 非産生性 (あるいは低産生性) 菌株であつたので、これらの菌株による食肉の汚染は典型的な腸管出血性大腸菌によるものに比べてリスクは低いと言える。しかし、我々はかつてマレーシアで市販されている牛肉から分離された大腸菌 0157:H7 (stx_2^+ , eae^+) 菌株の三分の二は Stx2 を高レベルに産生すること

を報告した (Koitabashi et al. 2006. *Microbiol. Immunol.* 50: 135-148) ので、今後タイ南部において、マレーシアからタイへの輸入牛肉を監視する必要があると言える。また、これは東南アジアにおいて輸出入食品を介して腸管感染症原因菌が越境している一例であり、このような現象はハイガイの貿易を介した腸炎ビブリオのパンデミック・クローンの国境を越えた伝播を含めて、他の食品や他の病原菌種についても言えるであろう。このことは、これらの国々における国家権力・意志の弱さを示唆している。

マレーシアでのリステリア菌の研究結果から、*L. monocytogenes* を含むリステリア菌がおそらく市場での不衛生的な環境中で交差汚染によって市販の野菜を汚染した可能性を示唆している。そうであるならば、本菌による汚染は他の食材にも及んでいる可能性が考えられる。まだマレーシアではリステリア菌の感染例は報告されていないが、近隣のシンガポールでは報告されているので、今後注意を要する。

E. 結論

日本や米国で重視されている腸管感染症原因菌4種類と世界的に注目されているリステリア菌について、日本以外のアジア諸国について現地との共同研究を実施した結果、発展途上国のみならず、経済力のあるマレーシアにいたるまで、ひろく様々な食材が汚染している可能性が示唆された。特に食品の生産現場や市場などの衛生状態がこれらの病原菌の食材汚染に関係している。患者が多発している腸炎

ビブリオ感染症に関しては、食文化や宗教が感染症の発生率に影響していることが確認されたので、この点を熟慮しながら、予防策を検討すれば、発生率を低下させることが可能かも知れない。

F. 健康危機情報

日本以外のアジア諸国（発展途上国のみならず、マレーシアのような経済力のある国でも）について、重要な腸管感染症原因菌4種類（腸炎ビブリオ、サルモネラ属細菌、カンピロバクター、大腸菌 0157:H7）およびリステリア菌によって関連食材がかなり高い頻度で汚染している。特に生で食べる二枚貝、野菜、カット果物は感染のリスクが高く、露天で販売している商品はスーパーマーケットより汚染度が高い。これらの国々へ旅行する場合や、これらの国々から食材や食品を輸入する場合は、注意を必要とする。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishibuchi, M. 2010. Features of enteric infections in Asia. K. Tanaka, Y. Niki, Y. Akatsuki (ed.) *Current Topics of Infectious Diseases in Japan and Asia*. Springer, Tokyo, Japan. pp. 3 - 23.

Nishibuchi, M. 2010. Recent trend in infections by *Vibrio parahaemolyticus* and distribution of this bacterium in shellfish in Asia. *Proceedings of 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. P. Lassus (Ed.-in-chief). Ifremer. pp. 139-146.

Nishibuchi, M. 2010. Transborder Microorganisms: Molecular Epidemiological Analysis of Seafood-borne pathogens. In N. Ishikawa (ed.), Flows and Movements in Southeast Asia: New Approaches to Transnationalism. Kyoto University Press., in press.

西淵光昭. 2010. アジアの汽水環境の魚介類の病原細菌汚染の例. 化学療法の領域 26(10):2045-2052.

西淵光昭. 2010. 「食品の微生物汚染と安全性確保」: 国際的かつ多角的視点からの取り組みの重要性. 化学療法の領域 26(10):2036-2037.

Tang, J. Y. H, F. M. Ghazali, A. Z. Saleha, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, S. Radu. 2010. MPN-PCR enumeration of *Campylobacter* spp. in raw chicken meats and by-products. Front. Agric. China 4(4): 501-506.

Jeyaletchumi, P., R. Tunung, S. P. Margaret, R. Son, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, and P. K. Malakar. 2010. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables by MPN-PCR. Int. Food Res. J. 17: 281-286.

Tunung, R., F.M. Ghazali, M. A. Noranizan, K. K. Haresh, M. B. Lesley, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and R. Son. 2010. Rapid detection and enumeration of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw

vegetables from retail outlets. Int. Food Res. J. 17: 67-78.

Usha, M. R., R. Tunung, L. C. Chai, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, Y. K., Nishibuchi, M. and R. Son. 2010. A study on *Campylobacter jejuni* cross-contamination during chilled broiler preparation. Int. Food Res. J. 17: 107-115.

Pui, C. F., W. C. Wong, L. C. Chai, H. Y. Lee, A. Noorlis, T. C. T. John, Y. H. Tang, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and S. Radu. 2011. Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium. Trop. Med. Health., in press.

Pui, C. F., W. C. Wong, L. C. Chai, E. Nillian, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and Son Radu. 2010. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. Food Control doi:10.1016/j.foodcont.2010.05.021

Lee, H. Y., L. C. Chai, C. F. Pui, R. Tunung, W. Wong, M. Shuhaimi, Y. K. Cheah, M. G. Farinazleen, M. Nishibuchi, and R. Son. 2011. Using RAPD-PCR as molecular assessment on the performance of CHROMagar™ *Listeria* and PALCAM agar on isolation of *Listeria* spp. and

Listeria monocytogenes from foods. Int. Food Res. J. 18: 498-503.

Sukhumungoon, P., Y. Nakaguchi, N. Ingviya, J. Pradutkanchana, Y. Iwade, K. Seto, S. Radu, M. Nishibuchi, and V. Vuddhakul. 2011. Investigation of *stx*₂⁺ *ea*e⁺ *Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. Int. J. Food Res. J. 18:381-386.

Noorlis, A., F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, T. C. Tuan Zainazor, J. Ponniah, R. Tunung, J. Y. H. Tang, M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, Y. and R. Son. 2011. Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. Int. Food Res. J. 18: 673-679.

Lesley, M. B., L. Velnetti, Y. K. Cheah, R. Son, A. Kasing, L. Samuel, V. Micky, and M. Nishibuchi. 2011. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles (*Anadara granosa*) at Tanjung Karang, Kuala Selangor. Int. Food Res. J. 18: in press.

2. 学会発表

Koji Seo, Fumio Gondaira, Junichi Sugiyama, Pharanai Sukhumungoon, Varaporn Vuddhakul, Wataru Yamazaki, Kazuko Seto, Yoshito Iwade, Rika Shimizu, Natsuko Tanaka, Yoshitsugu Nakaguchi, Mitsuaki Nishibuchi: O:K serotype of *Vibrio*

parahaemolyticus: a very important epidemiological marker. US-Japan Cooperative Medical Science Program 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, December 6-8, 2010, Kyoto Univ., Kyoto.

Abdul Aziz Djamal, Harry Fajri Zisoni, Yoshitsugu Nakaguchi, Kazuko Seto and Mitsuaki Nishibuchi: The first reported *Vibrio parahaemolyticus* diarrheal case from Batam, Indonesia and some additional related epidemiological characteristics. US-Japan Cooperative Medical Science Program 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, December 6-8, 2010, Kyoto Univ., Kyoto.

Yoshitsugu Nakaguchi, Nguyen Binh Minh, Cuong Ngo Tuan, Tran Hoang Huy, Nguyen Hoai Thu, Le Thanh Huong, Kazuko Seto, Kazuhiro Okubo, Yoshito Iwade, Mitsuaki Nishibuchi: Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus* Infection in Hanoi, Vietnam. US-Japan Cooperative Medical Science Program 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, December 6-8, 2010, Kyoto Univ., Kyoto.

山下泰治、小谷博秀、川上大雄、西沢光昭: 焼成カルシウムをベースにした新しい食品用除菌剤の開発。日本防菌防黴学会第37回年次大会。東京都。平成22年9月22日。日防菌防黴学会第

37 回年次大会プログラム p. 23.

瀬尾晃司, 権平文夫, 勢戸和子, 山崎涉, 岩出義人, 杉山純一, 中口義次, 西瀨光昭: 腸炎ビブリオの K 抗原のバリエーションと特定の DNA 領域変化との相関関係の解析. 第 63 回日本細菌学会関西支部総会. 大阪府枚方市. 平成 22 年 11 月 20 日.

中口義次, Nguyen Binh Minh, Cuong Ngo Tuan, Tran Hoang Huy, Nguyen Hoai Thu, Le Thanh Huong, 勢戸和子, 大久保和洋, 岩出義人, 西瀨光昭: ベトナム北部ハノイ市における腸炎ビブリオ感染症調査. 第 44 回腸炎ビブリオシンポジウム. 秋田県秋田市. 平成 22 年 11 月 25-26 日.

瀬尾晃司, 権平文夫, 勢戸和子, 山崎涉, 岩出義人, 杉山純一, 中口義次, 西瀨光昭: 腸炎ビブリオの K 抗原をコードする DNA 領域の比較解析. 第 44 回腸炎ビブリオシンポジウム. 秋田県秋田市. 平成 22 年 11 月 25-26 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

「食品用殺菌剤」

国内特許査定 (特願 2010-544101)

国際特許出願 (国際出願番号
PTC/JP2010/060766)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

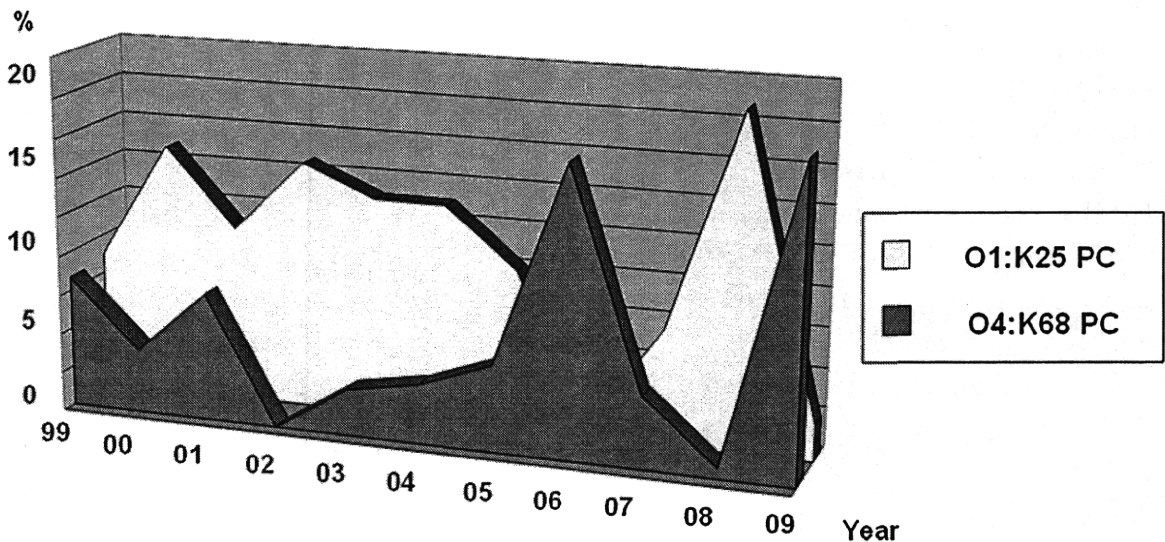


図1. タイ南部ハジャイ市で患者から分離された腸炎ビブリオの中で、パンデミック・クローンに属するO1:K25菌株およびO4:K68菌株の出現頻度の年次変化

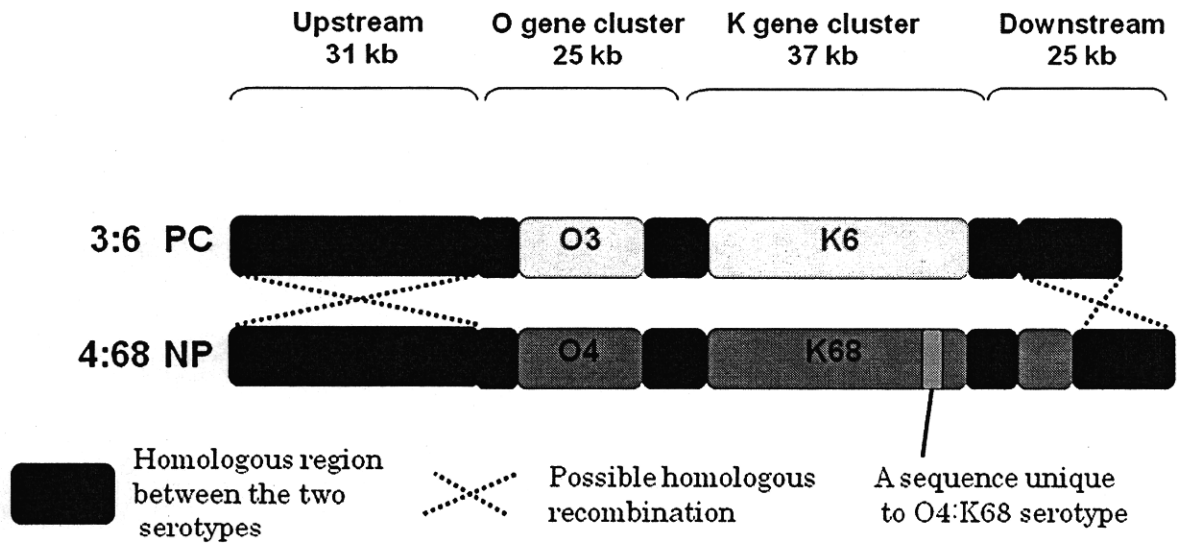


図2. パンデミック・クローンのO3:K6血清型とO4:K68血清型の変換に関与する遺伝子レベルでの変化についての仮説。3:6 PC: 患者から分離したO3:K6血清型パンデミック・クローン。4:68 NP: 二枚貝から分離したO4:K68血清型非パンデミック・クローン。

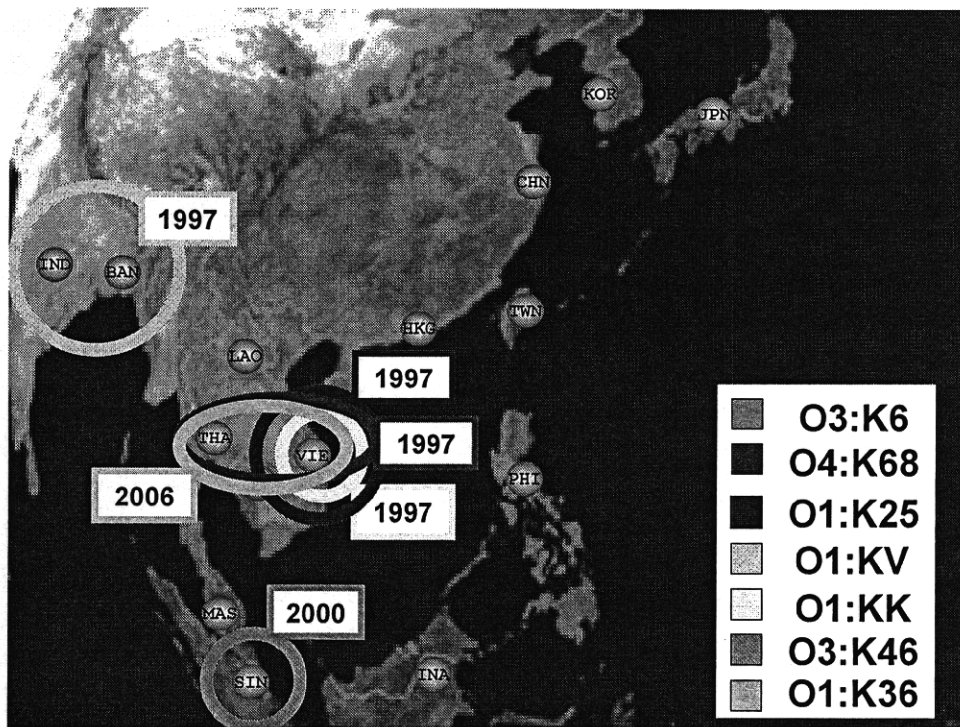


図3. アジア諸国で分離されたパンデミック・クローン菌株のO3:K6血清型およびそれから派生したと考えられる各種血清型の年代ごとのプロットングの一例。

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

日本とタイにおけるカンピロバクター関連細菌の疫学に関する研究
研究分担者 山崎伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授
研究協力者 Worada Faculty of Allied Health Sciences,
Samosornsuk Thammasat University, Assistant Prof.
研究協力者 朝倉昌博 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科客員研究員
研究協力者 四良丸 幸 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科院生（博士）

研究要旨：

カンピロバクターによる下痢症が我が国のみならずアジアの国々でも問題となっており、感染源である食肉の汚染状況を把握することは重要である。本研究では、我が国とタイの食肉からカンピロバクター関連細菌の分離・同定を行った。その結果、タイの家禽肉 24 検体中 15 検体で *C. jejuni*/*C. coli* が、豚肉 17 検体中 5 検体で *C. jejuni*/*C. coli*/*C. hyointestinalis* が陽性となったが、牛肉では全て陰性であった。一方、我が国の鶏肉 20 検体中 14 検体、豚肉 17 検体中 2 検体から *C. jejuni*/*C. coli* が、牛肉 34 検体中 5 検体で *C. coli*/*C. fetus* が陽性となった。両国の食肉はかなり汚染されていたが、菌種や陽性率は両国間で異なっていた。

A. 研究目的

カンピロバクター (*Campylobacter*) は我が国の細菌性食中毒の中で、発生件数、患者数において近年最も多く、問題となっている食中毒原因菌である。一方、我が国を含む欧米先進国を始めアジアの国々でもカンピロバクターによる下痢症が大きな問題となっている。特に、*C. jejuni* はギランバレー症候群の原因となることや小児の下痢症の場合重症化することが多く、*C. jejuni* の汚染実態を把握し、その感染を未然に防ぐ対策を講じることが重要である。

カンピロバクター属は現在 17 菌種が報告されているが、この中で下痢症患者から高頻度に分離されるのが *C. jejuni* と *C. coli* である。しかしながら、抗菌薬を含んだ選択培地を用いることからこれら 2 菌種以外の菌を培養し検出することは困難である。そこで本研究では、抗菌薬を含まないフィルター法も併用することにより、我が国及びタイの食肉からカンピロバクター属やアルコバクター属 (*Arcobacter*) 菌の分離・同定を試みた。

B. 研究方法

1) 食肉検体：

タイではスーパーマーケットとオープンマーケットで、我が国ではスーパーマーケットで食肉を購入し直ちに検査に供した。タイでは、鶏肉 22 検体、家鴨 2 検体、豚肉 17 検体、牛肉 34 検体、我が国では、鶏肉 20 検体、牛肉 34 検体、豚肉 17 検体を用いた。

2) カンピロバクター属菌の培養：

食肉検体を 25 g (一部 10 g) を滅菌したナイフで切り取り、等量の滅菌生理食塩水でストマッカー処理を行った。得られた揉み出し液 1 mL 又は 10 mL を 1.25 倍濃度のボルトン又はプレストン培地 4 mL 又は 40 mL に加え、日本の検体は 16-48 時間、タイの検体は 24-48 時間 37°C 微好気条件下 (N₂ 80%、CO₂ 7.5%、H₂ 7.5%、O₂ 5%) で培養した。培養後、それぞれの増菌培養液一白金耳をスキロー寒天培地又は mCCDA 培地に塗り広げ 48 時間以上、37°C 微好気条件下で培養した。さらに、増菌培養液 100 µL を血液寒天培地上に載せた孔径 0.45 µm のセルロースアセテート膜上に添加し、30 分間放置後、セルロースアセテート膜を取り除き上記と同様の条件で培養した。以下のこの方法をフィルター法と略す。

3) カンピロバクターの検出、単離、同定：

ボルトン又はプレストン培地で増菌培養後、100 µL を 900 µL の TE buffer に加え、100°C、10 分間煮沸した。遠心分離により得られた上清を

PCR テンプレートとし、Nested-Multiplex PCR 法で *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の *cdt* 遺伝子の検出を試みた。

一方、mCCDA、スキロー培地及びフィルター法でカンピロバクター様と判定されたコロニーを、抗菌薬を含まない血液寒天培地で純培養後、生化学的性状試験、*cdt* 遺伝子を標的とし *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* を鑑別できる multiplex PCR、馬尿酸水解酵素 (*hipO*) 遺伝子の検出及び 16S rRNA 遺伝子の解析により菌種を同定した。

C. 研究結果

1) タイの食肉：鶏肉 22 検体と鴨 2 検体の計 24 検体のうち、15 検体から *C. jejuni* が、4 検体から *C. coli* が、13 検体から *A. butzleri* が分離された。一方、豚肉 17 検体のうち、1 検体から Nested-Multiplex PCR で *C. jejuni* が検出されたが、分離されなかった。4 検体から *C. coli* が、1 検体から *C. hyointestinalis* が、1 検体から *A. cryaerophilus* が、9 検体から *A. butzleri* が分離された。牛肉 34 検体からは、*Campylobacter* 属菌は全く検出も分離もされなかったが、10 検体から *A. butzleri* が分離された。

C. jejuni の分離は、増菌培地としてプレストン培地 (14 検体) を用いた方がボルトン培地 (5 検体) を用いたより良かった (結果は示さず)。特に、プレストンと mCCDA 培地の組み合わせが最もよく、11 検体から *C. jejuni* が分離された。*C. coli* については、ボルトンとフィルター法の組み合わせ