

表3. 毒素原性大腸菌O148による集団食中毒事例で  
原因菌が検出された食品

|    | 検出食品     | 提供日      |
|----|----------|----------|
| 1  | ネギ *     | 9月5日 洗浄前 |
| 2  | カットネギ    | 9月5日 検食  |
| 3  | カットキャベツ  | 9月5日 検食  |
| 4  | ネギ       | 9月3日 検食  |
| 5  | 鱈のから揚げ * | 9月5日 検食  |
| 6  | 長ネギ *    | 9月6日 原材料 |
| 7  | 長ネギ      | 9月7日 原材料 |
| 8  | 冷奴(ネギ)   | 9月6日 検食  |
| 9  | 冷奴(ネギ)   | 9月7日 検食  |
| 10 | ネギ       | 9月5日 原材料 |
| 11 | ネギ       | 9月6日 原材料 |
| 12 | カットネギ    | 9月5日 検食  |

\* 食品中のO148菌数: <0.3個/g

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

LAMP法による *trh* 検出法と魚介類由来主要病原因子の包括的  
検出法の開発

研究分担者      山崎 渉      宮崎大学 准教授

研究要旨：

腸炎ビブリオの主要な病原因子の一つである *trh* の LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)法による迅速検出法を開発した。垂型 (*trh1*・*trh2*)に関わらず包括的な検出が可能であった。さらに multiplex LAMP 法への応用を試みたところ、コレラ菌ならびに腸炎ビブリオの主要な病原遺伝子である *ctx*, *tdh* ならびに *trh* の 3 遺伝子の包括的な検出も可能であった。211 株のビブリオ属菌コロニーを使用して、従来法との定性試験における比較により LAMP 法の特異性を検討した結果、両者の結果は完全に一致した。LAMP 法は既存の PCR 法よりも迅速であり、DNA 抽出開始から 90 分以内に判定が可能であった。

A. 研究目的

腸炎ビブリオは、汽水域や沿海部に広く分布し、ヒトには多くの場合、魚介類を介して胃腸炎症状を引き起こす。TDH（耐熱性溶血毒）および TRH（TDH 類似溶血毒）を主要な病原因子とする病原菌である。環境中の腸炎ビブリオの多くは *tdh/trh* を保有しないのに対し、臨床患者由来腸炎ビブリオの多くは *tdh/trh* を保有する。*trh* は *tdh* と約 68%の相同性を有する一方で、*trh* の塩基配列はより多様であることが知られている。*trh* は *trh1* および *trh2* の 2 垂型に分類され、両者の相同性は約 84%である。

コレラ菌は最も重要な水系感染症のひとつであり、汚染された飲料水や魚介類を介してヒトに重篤な胃腸炎を引き起こす。CT（コレラ毒素）が主要な病原因子であり、環境中由来株の多くは *ctx* を保有しないのに対し、臨床患者由来株の多くは *ctx* を保有する。

それゆえ、*ctx*、*tdh* ならびに *trh* の 3 遺伝子は腸炎ビブリオならびにコレラ菌の主要な病原性マーカーとして広く認知されている。これらの病原体を食品や飲料水から迅速に検出し、被害拡大防止に貢献することは食品衛生ならびに公衆衛生上、極めて重要である。

さらに、魚介類における腸炎ビブリオの規格基準においては、各国・国際機関が腸炎ビブリオ菌数を基に独自の規制値を設けている。FAO/WHO CODEX 委員会は腸炎ビブリオの主要な病原因子である TDH および TRH を基にする新たな規制値の策定に取り組んでいる。既存の分離培養法や PCR 法、コロニーハイブリダイゼーション法等に基づき、特殊な機器や日数を要するため、迅速な行政意思決定を行う上で支障が多い。また、コレラの被害は経済的に貧しい開発途上国で大きいいため、大規模な設備を必要としない、安価な検査法が求められている。

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は簡易迅速な遺伝子検査法である。低コストであることに加え肉眼による結果判定が可能であり、高価な測定機器を必要としないため、特に開発途上国での使用に適している。筆者らはすでに *tdh*、*trh1* および *trh2* 検出用の LAMP 法 (Yamazaki W, et al. 2010; Appl. Environ. Microbiol., 76: 820-828) ならびにコレラ毒素遺伝子検出用の LAMP 法 (Yamazaki W, et al. 2008; BMC Microbiol 8:94) を開発している。

しかし、これらのプライマーセットに、さらにビブリオ・バルニフィカス検出用のプライマーセットを組み合わせて、魚介類由来の主要な病原因子の包括的なスクリーニングを試みたところ、検出感度が低下し、実用には適さなかった。各プライマーの競合が原因と推測されたので、負荷を軽減する必要がある。

それゆえ、昨年度より *trh1* および *trh2* を包括的に検出する単独のプライ

マーセットによる LAMP 法の開発を試みている。昨年度の段階では、自家製反応試薬の新規導入により、1 反応あたり約 100 円という低コストでの検査が可能となった。その上で *trh* 検出用の多数のプライマーセットを設計し、特異性を確認した。しかしながら、すべての供試株を確実に検出できるプライマーセットを設計することはできなかった。今年度は設計対象領域を見直した上で、さらにより多数の菌株を使用して、検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 菌株

本学において保管されている臨床患者・食品・環境由来のビブリオ属菌 211 株を使用した。病原遺伝子の保有状況 (既存の PCR 法もしくはコロニーハイブリダイゼーション法によって確認済) を含めた詳細な内訳は表 1 に示すとおりである。

### 2. *trh* プライマーの設計

GenBank データならびに保存株のシーケンスにより得た計 100 の *trh* 塩基配列を使用して、Primer Explorer V4 (富士通システムソリューションズ、東京) を用いて、*trh* 検出用の LAMP プライマーセットを設計した。計 103 プライマーセットを試験に供した。

### 3. 菌体からの DNA 抽出

クロモアガービブリオ寒天培地等に発育させた新鮮菌を 1.5-ml 容のマイクロチューブ内で 50  $\mu$ l の水酸化ナトリウム溶液 (25 mmol  $l^{-1}$ ) に浮遊させ、十分に混和したのちに 95  $^{\circ}C$  で 5

分間加熱した。4  $\mu$ l の Tris-塩酸溶液 (1 mol l<sup>-1</sup>、pH 7.5) で中和した後に 20,000  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した。上清 1  $\mu$ l をテンプレート DNA として使用した。

#### 4. LAMP 法

昨年度の本研究の成果により導入可能となった自家製の LAMP 反応液を使用した。反応液はリアルタイム濁度計 (Loopamp EXIA、Teramecs、京都) を用いて 63  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後に 80  $^{\circ}$ C 2 分間の条件で酵素反応を失活させた。60 分以内に濁度の微分値が 0.1 に達した検体を陽性と判定した。さらに今回新たに設計した *trh* プライマーと本研究者らがすでに開発済の *ctx* ならびに *tdh* プライマーとを混合し、multiplex LAMP 法の有用性を評価した。上記と同一反応条件下で試験を行った。

#### 5. PCR 法

PCR 法を実施し、供試菌株の病原性遺伝子保有状況を確認した。詳細は既報 (Tada J, et al. Mol Cell Probes 1992; 6:477-487 ならびに Hoshino K, et al. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 20:201-207) に従った。

#### 6. コロニーハイブリダイゼーション法

*Trh1* と *trh2* の型別のために一部の菌株について実施した。詳細は既報 (Kishishita M, et al. Appl. Environ. Microbiol 1992; 58:2449-2457) に従った。

### C. 研究結果

103 プライマーセットのうち、最も良好な増幅を示すセットを選択し、本試験に供した。その結果、表 1 ならびに表 2 に示すとおり、様々な組み合わせで *ctx*、*trh* ならびに *tdh* を保有する 211 株を試験した *trh* LAMP 法ならびに multiplex LAMP 法と既存法の結果は完全に一致した。1 反応あたりの費用は 100 円以下と低コストであった。DNA 抽出開始から判定まで、PCR 法では約 4 時間を必要としたのに対し、LAMP 法では 90 分以内で判定が可能であった。リアルタイム濁度計を使用した際に、増幅開始から判定に要した時間は *trh* LAMP 法で 19 分から 40 分、multiplex LAMP 法で 17 分から 43 分であった。さらに LAMP 法では反応チューブ内の白濁を確認することにより、肉眼でも容易に判定が可能であった。

### D. 考察

これまでの研究において本研究者らは LAMP 法による *ctx* ならびに *tdh* の迅速検出法を開発している。昨年度より、亜種を問わず検出できる *trh* の LAMP 法ならびにこれら 3 病原性遺伝子の包括的検出法の開発に取り組んでいる。

今年度の研究において、*trh*、*ctx* ならびに *tdh* を加えた 3 病原性遺伝子の LAMP 法による包括的検出法の開発に成功した。しかしながら、陽性に要した時間は 17 分から 43 分であり、ばらつきを示している。標的配列の遺伝的多様性のために、設計したプライマーとの間におそらくはミスマッチが

存在しており、それらがばらつきの原因と推測される。特に *trh* の塩基配列に関して、ヒト由来株と比較して環境由来株の配列が多様であることが知られており、由来による配列の違いは病原性の違いに関連している可能性も考えられる。

市販の LAMP キットのコストはプライマー込の反応試薬で1反応あたり約 1,200 円、プライマーを除く反応試薬のキットで1反応あたり約 400 円であるが、本研究で使用した自家製試薬はプライマーと反応試薬で1反応あたり約 100 円という低コストで反応が可能であった。LAMP 法は高価な測定機器を必要としないことから、自家製試薬を使用した場合、開発途上国における簡易迅速な低コスト検査法としての普及が期待できる。

いずれにしろ、公衆衛生上最も重要な 2 種の *Vibrio* 属菌における主要な病原性遺伝子の包括的検出法において、LAMP 法は既存の PCR 法やコロニーハイブリダイゼーション法よりも有用性が高いことは明白である。

来年度は *trh* の配列の多様性を考慮したプライマー配列の改善に重点をおいて研究を継続する予定である。

#### E. 結論

公衆衛生上最も重要な 2 種の *Vibrio* 属菌であるコレラ菌と腸炎ビブリオの主要な病原性遺伝子である *ctx*、*tdh* ならびに *trh* の 3 病原性遺伝子の LAMP 法による包括的検出法の開発に成功した。*trh* の配列の多様性を考慮して、さらにプライマー配列の改善を行う。

#### F. 健康危機情報 なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. Yamada, S., O. R. Escalante-Maldonado<sup>1</sup>, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi and W. Yamazaki. 2012. Development of a LAMP assay for detection of *trh* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and an attempt for comprehensive detection of seafood-borne entero-pathogens. 47th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Chiba, Japan. pp158-pp162.

2. Escalante-Maldonado<sup>1</sup>, O. R., A. Y. Kayali, W. Yamazaki, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2012. Dried form of a LAMP reagent is applicable to and highly reliable in detecting virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. 47th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Chiba, Japan (poster session).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録  
なし。

3. その他  
なし。

表 1. Trh-LAMP 法における結果

| <b>Species</b>             | <b>Genotype</b>  | <b>Trh-LAMP</b> |
|----------------------------|------------------|-----------------|
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh+ltrh-</i> | 0/6             |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh-ltrh+</i> | 85/85           |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh+ltrh+</i> | 31/31           |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh-ltrh-</i> | 0/65            |
| <i>V. cholerae</i>         | <i>ctx+</i>      | 0/1             |
| <i>V. mimicus</i>          | <i>tdh+</i>      | 0/2             |
| <i>G. hollisae</i>         | <i>tdh+</i>      | 0/1             |
| <i>Vibrio</i> spp.         | Negative         | 0/20            |

表 2. Multiplex LAMP 法における結果

| <b>Species</b>             | <b>Genotype</b>  | <b>Multiplex LAMP</b> |
|----------------------------|------------------|-----------------------|
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh+ltrh-</i> | 6/6                   |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh-ltrh+</i> | 85/85                 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh+ltrh+</i> | 31/31                 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>tdh-ltrh-</i> | 0/65                  |
| <i>V. cholerae</i>         | <i>ctx+</i>      | 1/1                   |
| <i>V. mimicus</i>          | <i>tdh+</i>      | 2/2                   |
| <i>G. hollisae</i>         | <i>tdh+</i>      | 1/1                   |
| <i>Vibrio</i> spp.         | Negative         | 0/20                  |

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）  
分担報告書

ヘリコバクター・ピロリと口腔内細菌との相互作用

|       |       |        |
|-------|-------|--------|
| 研究分担者 | 神谷 茂  | 杏林大学教授 |
| 研究協力者 | 大崎 敬子 | 杏林大学講師 |
| 研究協力者 | 米澤 英雄 | 杏林大学助教 |

研究要旨：

ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) は胃粘膜に定着・感染している。*H. pylori* と口腔内細菌の相互作用について検討を行うにあたり、スナネズミ胃内細菌叢構成細菌の解析を行った。*H. pylori* 感染および非感染スナネズミの胃内フローラに違いを認めたと、特に口腔内細菌に焦点を当てると、*Prevotella* 属菌が *H. pylori* 自然消失群スナネズミ胃内でのみ検出された。このことは *Prevotella* 属菌が本菌の定着に抑制的に働いていることを示唆している。

A. 研究目的

*H. pylori* は急性および慢性胃炎を惹起するとともに、胃十二指腸潰瘍の再発因子および胃 MALT リンパ腫や特発性血小板減少性紫斑病などの疾患への関与が指摘されている。さらに WHO により胃がんの確実性発がん因子グループ 1 として認定されており、除菌治療の重要性が認知されている。その一方で本国における感染状況は、中高齢者を中心に依然として高い感染率である（60%以上）。*H. pylori* は鞭毛、ウレアーゼ、熱ショックタンパク、空胞化毒素 (VacA)、CagA および *cag* pathogenicity island などさまざまな病原因子を有し、胃粘膜にバイオフィーム様構造体を形成して存在し

ている。

口腔内より *H. pylori* が、主として PCR 法などによる DNA レベルにおいて検出されることがこれまで多くの研究者により報告されている。また特に歯周病患者のデンタルプラーク中に本菌が高頻度で検出されることが報告され、口腔は *H. pylori* の感染、および除菌後の再感染におけるリザーバーとしての役割を担っていると考えられている。口腔内にはおおよそ 700 種類、数にして 10 億個以上、個人により 1 兆個を超える場合もある細菌が存在し縄張りを築いて存在している。これら口腔細菌は唾液とともに絶えず胃、そして消化管へと流入してい

る。

*H. pylori* は経口的にヒトに感染することは、ほとんどすべての研究者の一致した考えである。胃に棲息する細菌であること、そして胃を含む消化管の入り口である口腔と排出物である糞便において本菌が検出され、人体内ではこの経路以外で本菌は検出されないことがその理由である。

*H. pylori* のスナネズミ感染モデルは、ヒトの慢性持続性胃炎および胃がん発症モデルとして汎用されている。しかしスナネズミ胃内への本菌の持続感染は、1 回のみ *H. pylori* 投与では全検体への定着が成立しないこと、感染の長期化により時に *H. pylori* が自然消失することが知られている。この事例はこれまでヒトでは報告がなされていない。これらの事実はスナネズミの胃内細菌叢または口腔内細菌層が *H. pylori* 自然消失に関与している可能性を示唆している。しかしながらスナネズミ口腔内細菌叢に関する研究はこれまで何もしなされていない。そこで本研究では、口腔内細菌と *H. pylori* の細菌間相互作用を検討する上で、スナネズミ胃内の細菌叢の解析を行った。口腔内細菌は唾液とともに流入していることから、胃内細菌叢の解析から、*H. pylori* の感染に影響を与える口腔内細菌を見いだすことを最終目的とした。さらに *H. pylori* の持続感染に影響を与える胃内細菌叢を明らかとした。

## B 研究方法

1) 供試菌株：*H. pylori* は日本人胃炎患者由来の臨床分離株である TK1402 株を使用した。*H. pylori* 菌株はグリセロール含有 Brucella broth 中にて -70°C にて保存し、実験を行うたびにそこから発育させた。菌株は 7% fetal calf serum (FCS) 含有の Brucella 寒天培地にて 37°C 微好気条件下で発育させた。

2) スナネズミへの感染実験：TK1402 株を  $1 \times 10^7$  CFU に調整し、スナネズミ (MGS/sea、雌、5 週齢) へ 2 日間連続で経口投与した。感染から 1 年後、スナネズミ胃粘膜中の *H. pylori* 感染の有無について抗体検査および胃膜懸濁液からの DNA を使用して、*H. pylori* 選択的培地を用いた培養および *H. pylori* 特異的な 16SrRNA 遺伝子プライマーを用いた遺伝子定量的リアルタイム PCR にて測定した。

3) 胃粘膜検体からの総 DNA 回収：胃粘膜検体よりビーズ・フェノール法を使用して総 DNA を回収した。200  $\mu$  L のサンプルに対して 0.3g のガラスビーズ 300  $\mu$  L の溶解液 (200mM Tris-HCl、80mMEDTA)、50  $\mu$  L の 10% SDS 溶液およびフェノール 500  $\mu$  L を加え、浸透破砕機 (FastPrep FP120) を用いて 30 秒破砕し、フェノールクロロホルム処理後イソプロパノールで沈殿し 70% エタノールで洗浄し、総 DNA を抽出しこれを以降の実験に使用した。全ての動物実験は杏林大学大学院医学研究科共同研究施設部門



実験動物施設利用規定に基づいて、同施設内にて実施された。

4) スナネズミ胃内フローラ構成細菌の解析：*H. pylori* 感染および非感染スナネズミの胃切除材料を対象に、胃内細菌叢の解析を細菌群、菌属特異的な 16SrRNA 遺伝子プライマーを用いた遺伝子定量的リアルタイム PCR にて測定した。スナネズミの胃内細菌叢に関する情報は非常に少ないため、ヒト消化管細菌叢の構成細菌の情報を元に、*Bifidobacterium* 属菌, *Bacteroides fragilis* グループ菌, *Clostridium coccoides* グループ菌, *Clostridium leptum* サブグループ菌, *Atopobium* クラスター菌, *Prevotella* 属菌, *Fusobacterium* 属菌, *Veillonella* 属菌, *Staphylococcus* 属菌, *Streptococcus* 属菌, *Lactobacillus* 属菌, *Enterobacteriaceae* 科菌について検討を行った。(プライマー配列：表 1 参照)

表 1

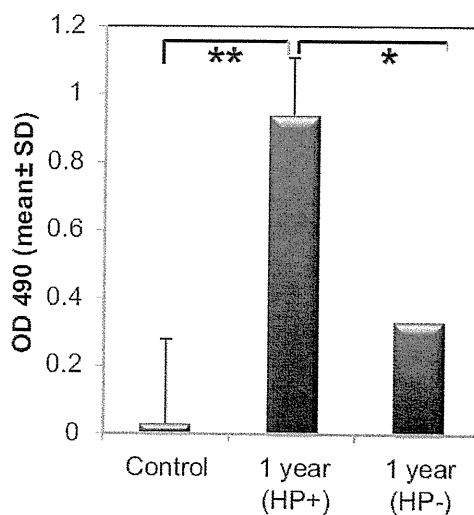
スナネズミ胃内フローラ構成細菌叢の解析に使用したプライマー

| Target bacterial group                   | Primer      | Sequence              |
|--|-------------|-----------------------|
| <i>Clostridium coccoides</i> group       | g-Ccoc-F    | AAATGACGGTACCTGACTAA  |
|  | g-Ccoc-R    | CTTGGATTTCATCTGCGCAA  |
| <i>Clostridium leptum</i> sub-group      | sg-Clept-F  | GGACAGCAGTGGAGT       |
|  | sg-Clept-R3 | CTTCTCTCTTTTGCAA      |
| <i>Bacteroides fragilis</i> group        | g-Bfra-F    | ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT |
|  | g-Bfra-R    | CCAGTATCAACTGCAATTTA  |
| <i>Bifidobacterium</i>                   | g-Bifid-F   | CTCCTGGAAACGGGATTC    |
|  | g-Bifid-R   | GGTGTCTTCCCGAATCTACA  |
| <i>Atopobium</i> cluster                 | o-Atopo-F   | GGGTTGAGAGACCGACC     |
|  | o-Atopo-R   | CGGAGCTTCTCTGACAG     |
| <i>Prevotella</i>                        | g-Preve-F   | CACGCTAAACGATGGAAGCC  |
|  | g-Preve-R   | GGTCCGGTTCGAGACC      |
| <i>Enterobacterium cybluloides</i> group | g-Ecylia-F  | GTGAYCGTAKTACCAGA     |
|  | g-Ecylia-R  | CTTGGTGCATATCC        |
| <i>Clostridium ramosum</i> sub-group     | sg-Cram-F   | GACACTGCATGGAGACC     |
|  | sg-Cram-R   | GGTTCATGGCTTACTG      |
| <i>Veillonella</i>                       | g-Veillo-F  | GRAGAGCGATGGAGCTT     |
|  | g-Veillo-R  | CGTGGCTTCTATFCC       |
| <i>Fusobacterium</i>                     | g-Fuso-F    | CWAAAGCGATAGTAAAC     |
|  | g-Fuso-R    | GCAGGCACTATCCGAT      |
| <i>Enterococcus</i>                      | g-Ent-F     | CCCTATATGTAAGTGGCAATF |
|  | g-Ent-R     | ACTCTGTACTTCCATFCT    |
| <i>Lactobacillus</i>                     | g-Lact-F    | AGCAGTAGGGAAATCTCCA   |
|  | g-Lact-R    | CACCGCTACAGATGGAG     |
| <i>Helicobacter pylori</i>               | 16S2-F      | CGCTAAGAGATGACCTATGTC |
|  | 16S2-R      | CCGTGCTCAGTTCAGTGTGT  |

## C 研究結果

1) *H. pylori* 感染の有無の解析：*H. pylori* 感染後 1 年経過したスナネズミより胃粘膜懸濁液を準備し、*H. pylori* 選択培地による培養、および抽出した DNA を鋳型としての定量的リアルタイム PCR にて、*H. pylori* 感染の有無について測定をした。11 匹の *H. pylori* を感染したスナネズミより 5 匹が *H. pylori* 陽性、6 匹が陰性と判定された。これらスナネズミより採血した血清を用いて、*H. pylori* 特異的な抗血清により ELISA 方にて抗体価の測定をしたところ、感染群のスナネズミ血清は有意に高い *H. pylori* 特異的抗体価を示した (図 1)。

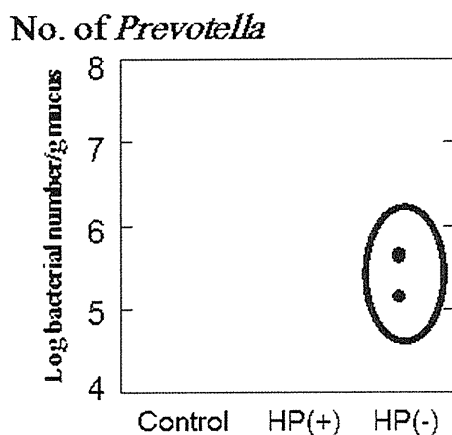
図 1



2) スナネズミ胃内細菌叢の解析：  
スナネズミの胃から *Atopobium* cluster, *Bifidobacterium* 属、*Clostridium coccoides*

group、*Clostridium leptum* subgroup、*Clostridium ramosum* subgroup、*Prevotella* 属、*E. cylindroides* group、*Lactobacillus* 属、*Enterococcus* 属の菌が検出された。一方、*Bacteroides fragilis* group、*Veillonella* 属、*Fusobacterium* 属の菌数は検出限界以下であった。スナネズミの胃で最優性の菌は *Lactobacillus* 属と *Enterococcus* 属の菌で胃粘膜 1 g あたりにそれぞれ、 $10^{6.4-7.2}$  個と  $10^{6.1-7.4}$  個の菌数で存在していた。各菌属の胃内生菌数と *H. pylori* の菌数についての相関を調べたところ、逆相関関係が認められたのは *Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属菌であった。また *Prevotella* 属菌は *H. pylori* 陰性群でのみ検出された (図 2)。

図 2



#### D 考察

*H. pylori* は世界人口の約半数に感染

しており、これら感染者は除菌をしない限りは一生本菌を胃内に持ち続ける。このような細菌がどのように胃粘膜への定着・感染するのか、どのような疾患を誘導するのかについての研究は、疫学・病態のみならず、診断・治療・予防などの観点から大変興味深い。

スナネズミは *H. pylori* 感染実験動物モデルとして汎用されている。本菌の感染を長期間持続でき、胃炎、胃潰瘍そして腸上皮化成が経時的に発生し、組織学的変化もヒトでの胃粘膜における変化と極めて類似していることが、スナネズミを用いる理由である。しかし、ヒトにおいては *H. pylori* は除菌をしない限りは一生保有し続けるのに対し、スナネズミではある一定の割合で自然消失が起こることが報告されている。これはスナネズミだけが保有する生体内細菌叢が関与していると考えられる。そこで今回、スナネズミ胃内フローラを解析することで、このような細菌の存在について検討を行った。また口腔は外界より食物・飲料といった外界物を摂取するための開口部であり、細菌学的にも消化管に匹敵するような多種類の常在細菌が棲息している。口腔に定着する細菌種やその菌数に関しては、新生児、乳歯の萌出後、永久歯列の完成後、口腔疾患の有無、無菌顎などの膨大な数の研究がなされてきている。しかし細菌の種類が 700 種以上にわたること、それらの細菌の生態が変化に富むことなどの理由から、必ずしも口腔内細菌

の全貌が明らかにされているわけではない。口腔内細菌の中にはいまだ培養不可能な細菌も存在している。口腔内細菌は唾液とともに絶えず胃へと流入していることから、胃内細菌叢を調べることで、口腔内細菌層の影響も調べることが出来ると考えた。

*H. pylori* の感染に対して抑制的に働く菌を検索するため、各菌属の胃内生菌数と *H. pylori* の菌数についての相関を調べたところ、有意な逆相関関係が認められたのは *Bifidobacterium* 属菌であった。この結果より、*Bifidobacterium* 属菌の菌数が増加する細菌構成が、*H. pylori* の菌数を減少させている可能性が示唆された。さらに *Prevotella* 属菌は *H. pylori* 陰性群でのみ検出された。*Prevotella* 属菌は口腔内でも多く存在している菌であり、主に歯周病の原因細菌とされている。*Prevotella* 属菌は短鎖脂肪酸である酪酸を産生することが明らかとなっている。われわれは酪酸は *H. pylori* に対して殺菌的な作用をもち、菌体表層構造を破壊することを昨年度の本報告書にて報告してきた。今回 *Prevotella* 属菌が *H. pylori* 陰性群でのみ検出されていることは、口腔内 *Prevotella* 属菌が胃内へと流入し、それが *H. pylori* 感染の持続に影響を与えていることを示唆している。その一方でスナネズミ口腔に本菌が存在しているのか、なぜヒト口腔の *Prevotella* 属菌ではこのような現象は起きえないのかについての詳細な検討が必要である。今後これらについて解明を行う予定である。

## E 結論

・スナネズミ *H. pylori* 長期感染後の胃内細菌叢は、感染群および非感染群で変化が起きていた。

・*Bifidobacterium* 属菌の菌数が増加するような細菌構成は、*H. pylori* の菌数を減少させた。

・*H. pylori* 長期感染後のスナネズミ胃内において *Prevotella* 属菌は *H. pylori* 陰性群でのみ検出された。

## F 健康危機管理

なし

## G 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kurai, D., K. Nakagaki, H. Wada, T. Saraya, S. Kamiya, Y. Fujioka, K. Nakata, H. Takizawa, H. GotoH. *Mycoplasma pneumoniae* Extract Induces an IL-17-Associated Inflammatory Reaction in Murine Lung: Implication for Mycoplasmal Pneumonia. Inflammation. In press.
2. Osaki, T., T. Matsuki, T. Asahara, C. Zaman, T. Hanawa, H. Yonezawa, S. Kurata, T. D. Woo, K. Nomoto, S. Kamiya. Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog.* 53:12-8. 2012.
3. Inoue, S., M. Niikura, S. Takeo, S. Mineo, Y. Kawakami, A. Uchida, S. Kamiya, F. Kobayashi. Enhancement

- of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing  $\gamma\delta$  T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. Proc Natl Acad Sci U S A. 24:12129-34, 2012.
4. Hojo, F., D. Sato, J. Matsuo, M. Miyake, S. Nakamura, M. Kunichika, Y. Hayashi, M. Yoshida, K. Takahashi, H. Takemura, S. Kamiya, H. Yamaguchi. Ciliates expel environmental *Legionella*-laden pellets to stockpile food. Appl Environ Microbiol. 78:5247-57, 2012.
  5. Oka, K., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, M. Okazaki, T. Manzoku, M. Takahashi, M. Tanaka, H. Taguchi, T. Watanabe, T. Inamatsu, S. Kamiya. Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. J Clin Microbiol. 50:915-21, 2012.
  6. Yonezawa, H., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, C. Zaman, T. D. Woo, M. Takahashi, S. Matsubara, H. Kawakami, K. Ochiai, S. Kamiya. Destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 61:582-9, 2012.
  7. Okuda, M., S. Kamiya, M. Booka, S. Kikuchi, T. Osaki, T. Hiwatani, K. Maekawa, Y. Fukuda. Diagnostic accuracy of urine-based kits for detection of *Helicobacter pylori* antibody in children. Pediatrics Internatl. 2013, in press
  8. Osaki, T., M. Okuda, J. Ueda, M. Konno, H. Yonezawa, F. Hojo, K. Yagyu, Y. Lin, Y. Fukuda, S. Kikuchi S. Kamiya. Multi locus sequence typing for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by using fecal specimens. J Med Microbiol. 2013, in press
2. 学会発表
1. Kikuchi S, Okuda M, Osaki T, Yagyu K, Lin Y, Kamiya S. Prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Japanese children. The 4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN 2012) November 14-18, 2012, Taipei.
  2. Okuda M, Kikuchi S, Ueda J, Osaki T, Yagyu K, Lin Y, Maekawa K, Yonezawa H, Kamiya S, Fukuda Y. Incidence of *Helicobacter pylori* infection in children during a one-year follow-up and the infection status in families in a rural area of Japan. European *Helicobacter* Study Group XXVth International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15, 2012, Slovenia..
  3. 北条史、大崎敬子、米澤英雄、花輪智子、蔵田 訓、山口博之、神

- 谷 茂. *Helicobacter pylori* の原生動物内における生存性の検討第 95 回日本細菌学会関東支部総会、平成 24 年 10 月 10-12 日、東京
4. 大崎敬子、奥田真珠美、上田純子、米澤英雄、北条史、柳生聖子、林櫻松、福田能啓、菊地正悟、神谷 茂. 糞便材料を用いた MLST 法による *Helicobacter pylori* 感染源の家族内検索、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日-30 日、岡山
  5. 北条史、大崎敬子、米澤英雄、花輪智子、山口博之、神谷 茂. *Helicobacter pylori* の原生動物内における生存性の検討、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日-30 日、岡山
  6. 奥田真珠美、菊地正悟、大崎敬子、上田純子、米澤英雄、林櫻松、柳生聖子、北条史、神谷 茂、福田能啓. 小児の *H. pylori* 感染状況と追跡調査-篠山スタディ第 2 報、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日-30 日、岡山
  7. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、Zaman Cynthia、神谷 茂. *Helicobacter pylori* のバイオフィルム形成とクラリスロマイシン抵抗性、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日-30 日、岡山
  8. 大崎敬子、奥田真珠美、蔵田 訓、神谷 茂. *Helicobacter pylori* 感染源の家族内検索のための MLST 法の応用 第 86 回日本感染症学会総会、平成 24 年 4 月 25-26 日、長崎
  9. 蔵田 訓、大崎敬子、田口晴彦、神谷 茂. *Mycoplasma pneumoniae* 菌体抗原を用いた Th17 免疫応答についての解析、第 86 回日本感染症学会総会、平成 24 年 4 月 25-26 日、長崎
  10. 杉崎健太郎、花輪智子、大崎敬子、蔵田 訓、神谷 茂. *Bordetella pertussis* の病原性発現における緊縮応答制御因子 ppGpp の役割、第 86 回日本感染症学会総会、平成 24 年 4 月 25-26 日、長崎
  11. 大崎敬子、米澤英雄、Zaman Cynthia、北条史、花輪智子、蔵田訓、神谷 茂. Interaction between *Helicobacter pylori* and Caco-2 cells in the co-culture system. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日.
  12. 北条史、大崎敬子、花輪智子、蔵田 訓、山口博之、神谷 茂. Analysis of symbiotic conditions between *Helicobacter pylori* and protozoa. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27 日-29 日.
  13. 蔵田訓、大崎敬子、花輪智子、米澤英雄、田口晴彦、神谷 茂. Induction of a Th17 response by *Mycoplasma pneumoniae* antigens. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日.
  14. 和田薫子、高橋志達、大崎敬子、花輪智子、蔵田訓、米澤英雄、岡健太郎、稲松考思、神谷 茂. 本邦に

おける NetB 毒素遺伝子産生性  
*Clostridium perfringens* の検討. 第85  
回日本細菌学会総会, 長崎, 平成  
24年3月27-29日.

15. 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子,  
蔵田訓, Zaman Cynthia, 神谷茂.  
*Helicobacter pylori* バイオフィルム  
形成が及ぼすクラリスロマイシン  
への抵抗性、および耐性菌出現へ  
の影響の解析. 第85回日本細菌学  
会総会, 長崎, 平成24年3月27-29  
日.

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

カンピロバクター・ジェジュニ・コリ以外の関連細菌の  
タイにおける分子疫学調査

分担研究者 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 Professor  
研究協力者 日根野谷淳 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 助教  
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

研究要旨：

タイの食肉から種々の培地を用いて *Campylobacter* 属菌とその関連細菌を分離して菌種を同定し薬剤感受性について調べた。鶏肉では *C. jejuni* の汚染率が 58%であったがその他の肉では分離されなかった。牛、豚、鳥の全ての食肉で *A. butzleri* の汚染率が 80%以上と極めて高かった。豚肉からは *C. hyointestinalis* も分離した。*C. jejuni* と *C. coli* ではキノロン系に対する耐性率が 60%から 100%、*A. butzleri* ではマクロライドとセフェム系に対する耐性率が 60%から 90%と高かった。*A. butzleri* について今後注意を払う必要がある。

A. 研究目的

*Campylobacter* 属菌による下痢症が我が国のみならず世界的に問題となっている。*Campylobacter* 属菌は現在少なくとも 25 菌種知られているが、世界的に問題となっているのは *C. jejuni* と *C. coli* である。しかしながら *Campylobacter* 属菌の分離には、抗菌薬を含む選択培地が用いられており *C. jejuni* と *C. coli* 以外の菌は見逃されている可能性がある。

南アフリカや欧州では、抗菌薬を含まないフィルター法で *C. jejuni* と *C.*

*coli* 以外の *Campylobacter* 属菌や *Arcobacter* 属菌も下痢症患者からかなりの頻度で分離されている。また、*Campylobacter* 属の多剤耐性菌が増加していることも問題となっている。

本研究では、タイにおける *C. jejuni* と *C. coli* 以外の関連細菌の分子疫学的解析を行うことを目的に、マーケットで売られている食肉から種々の培養法を組み合わせ、*C. jejuni* と *C. coli* を含め *Campylobacter* 属菌や *Arcobacter* 属菌の分離と分離菌の薬剤感受性について調べた。

## B. 研究方法

1) 検体：タイのタマサート大学、ランジットキャンパス近郊のマーケットで購入した豚肉 21 検体、牛肉 22 検体及び鶏肉 26 検体について調べた。

2) 培養：食肉検体 5 g を 5 mL の PBS でストマッカー処理して得られた揉み出し液から 100  $\mu$ L ずつ取り出し、Preston 培地、Bolton 培地あるいは Arcobacter 培地に添加し 37 $^{\circ}$  C で 24 から 48 時間微好気条件下 (85% N<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>) で培養した。それぞれの 24 時間あるいは 48 時間の増菌培養液の一部を Skirrow 培地、mCCDA 培地あるいはフィルター法にて 37 $^{\circ}$  C で 48 時間微好気条件下 (85% N<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>) での培養を行った。

3) 菌種の同定：培養法で得られた *Campylobacter* 属関連細菌と思われるコロニーは *cdt* 遺伝子を標的とした PCR 法あるいは 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析に基づき菌種を同定した。

4) 薬剤感受性試験：CLSI の方法に従いディスク拡散法で 10 種類の薬剤 (ナリジクス酸：NA、レボフロキサシン：LVFX、エリスロマイシン：EM、アジスロマイシン：AZM、クロラムフェニコール：CP、シプロフロキサシン：CPFX、アンピシリン：ABPC、クリンダマイシン：CLDM、フォスフォマイシン：FOM、セファロチン：CET) を用いて行った。

(論理面への配慮)

該当無し。

## C. 研究結果

1) 食肉からの *Campylobacter* 属及び関連細菌分離：Preston、Bolton あるいは Arcobacter 培地で増菌培養液を Skirrow 培地、mCCDA 培地、Filter 法で培養し *Campylobacter* 属及び関連細菌の分離を試みた。その結果、豚肉から *C. hyointestinalis* が分離されたがそれ以外の菌種は分離されなかった。一方、牛、鶏、豚肉から *Arcobacter* 属菌が多数分離された (表 1-3)。牛肉では 22 検体中 20 検体から *A. butzlei* が、鶏肉では 26 検体中 15 検体で *C. jejuni* が、23 検体から *A. butzlei* が、豚肉では 21 検体中、17 検体から *A. butzlei* が、1 検体から *C. hyointestinalis* が、別の 1 件検体から *A. cryaerophilus* が分離された。

2) 薬剤感受性：以前に分離していた菌も加え薬剤感受性について調べた結果、表 4 に示したように *C. jejuni* と *C. coli* は NA、LVFX や CPFX 等のキノロン系薬に対する耐性率が高く、*A. butzlei* は AZM や CLDM 等のマクロライド系薬及び ABPC や CET 等のセフェム系薬に対する耐性率が高かった。

## D. 考察

タイの食肉で *A. butzlei* の汚染率が高いことが明らかとなった。ドイツ連邦リスク評価研究所の意見書によれば「生肉中のアルコバクターは食中毒を引き起こす可能性がある」と発表している。しかしながら、今回最も高率に *A. butzlei* を分離できた方法は Bolton 増菌と Filter 法の組み合わせ



であり、この方法は現在ほとんど用いられていないため *A. butzlei* による下痢症が過小評価されている可能性がある。また、1 検体であったが *C. hyointestinalis* も分離された。我々は 6 菌種の *Campylobacter* 属菌を検出できる PCR 法や 4 菌種の *Arcobacter* 属菌を検出できる PCR 法を開発している。今後、これらの PCR 法を活用しながら *C. jejuni*、*C. coli* 以外の *Campylobacter* 属関連細菌の疫学について調べて行く必要がある。

#### E. 結論

*Arcobacter* 属菌がタイの市販肉に高度に汚染されていることが明らかとなった。薬剤耐性も *C. jejuni* や *C. coli* と異なっており、今後注視して行く必要がある。

#### F. 健康危機情報

*Arcobacter* 属菌による下痢症について今後注意を払う必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) S. Shiramaru, M. Asakura, H. Inoue, A. Nagita, A. Matsuhisa and **S. Yamasaki**. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. **J. Vet. Med. Sci.**, 74:857-862, 2012.

(2) 山崎伸二、朝倉昌博、四良丸 幸、井上春奈：カンピロバクターの簡便・迅速検査法、特集：食中毒の基礎と臨

床、日本臨床、70(8)：1305-1312、2012.

##### 2. 学会発表

(1) 山崎伸二、亀井数正、Srinuan Somroop、日根野谷淳、名木田 章、朝倉昌博、中川晋作：PCR-RFLP によるカンピロバクター属 6 菌種の検出、同定、第 9 回日本小児消化管感染症研究会 2013 年 2 月 9 日、大阪

(2) 朝倉昌博、山崎伸二：カンピロバクターの迅速検査法とその応用、シンポジウム、第 5 回日本カンピロバクター研究会 2012 年 11 月 30 日- 12 月 1 日、大阪

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当無し

##### 2. 実用新案登録

該当無し

##### 3. その他

該当無し

表 1. 牛肉からの *Campylobacter* 属菌及び *Arcobacter* 属菌の検出と分離

| 由来  | Preston |        |        | Bolton  |        |         | Arco    | 結果      |
|-----|---------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|
|     | Skirrow | mCCDA  | Filter | Skirrow | mCCDA  | Filter  | Filter  |         |
| 牛 1 | -/ND    | -/ND   | NG/ND  | -/ND    | -/ND   | Ab/ND   | ND      | Ab      |
| 2   | -/-     | NG/NG  | NG/NG  | -/Ab    | -/Ab   | NG/Ab   | ND      | Ab      |
| 3   | -/-     | -/-    | NG/NG  | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | ND      | Ab      |
| 4   | -/-     | -/-    | NG/NG  | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | ND      | Ab      |
| 5   | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/Ab   | -/Ab    | ND      | Ab      |
| 6   | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | ND      | Ab      |
| 7   | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/Ab   | Ab/Ab   | ND      | Ab      |
| 8   | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | Ab/Ab  | Ab/Ab   | ND      | Ab      |
| 9   | -/-     | Ab/Ab  | Ab/Ab  | -/-     | Ab/Ab  | Ab/Ab   | ND      | Ab      |
| 10  | -/-     | -/-    | Ab/-   | -/-     | Ab/-   | -Ab     | ND      | Ab      |
| 11  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | -/-     | Ab/Ab   | Ab      |
| 12  | -/-     | -/-    | -/Ab   | -/-     | -/Ab   | Ab/Ab   | Ab/Ab   | Ab      |
| 13  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/Ab   | Ab/Ab   | Ab/Ab   | Ab      |
| 14  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/Ab   | Ab/Ab   | Ab/Ab   | Ab      |
| 15  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | -/-     | Ab/Ab   | Ab      |
| 16  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | Ab/Ab   | Ab      |
| 17  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | -/-     | -/-     | -       |
| 18  | -/-     | -/-    | -/Ab   | -/-     | -/-    | -/-     | Ab/Ab   | Ab      |
| 19  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | -/-     | Ab/Ab   | Ab      |
| 20  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | -/-     | Ab/Ab   | Ab      |
| 21  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | -/-     | -/-     |         |
| 22  | -/-     | -/-    | -/-    | -/-     | -/-    | -/Ab    | Ab/Ab   | Ab      |
| 小計  | None    | Ab (1) | Ab (4) | Ab (1)  | Ab (9) | Ab (15) | Ab (10) | Ab (20) |

NG: no growth, ND: not done

Cj: *C. jejuni*, Cc: *C. coli*, Chyo: *C. hyointestinalis*, Ab: *A. butzleri*, Acry: *A. cryaerophilus*

( )内の数字は分離できた菌数を示す

表 2. 鶏肉からの *Campylobacter* 属菌及び *Arcobacter* 属菌の検出と分離

| 由来  | Preston       |                       |                       | Bolton  |                       |                       | Arco    | 結果                     |
|-----|---------------|-----------------------|-----------------------|---------|-----------------------|-----------------------|---------|------------------------|
|     | Skirrow       | mCCDA                 | Filter                | Skirrow | mCCDA                 | Filter                | Filter  |                        |
| 鶏 1 | -/ND          | Cj/ND                 | NG/ND                 | -/ND    | Cj/ND                 | NG/ND                 | ND      | Cj                     |
| 2   | -/ND          | Cj/ND                 | NG/ND                 | -/ND    | Cj/ND                 | NG/ND                 | ND      | Cj                     |
| 3   | -/ND          | NG/ND                 | NG/Cj                 | Cc/ND   | CjCc/ND               | Cj/CcAb               | ND      | CjCcAb                 |
| 4   | -/ND          | -/ND                  | NG/NG                 | -/ND    | Cj/ND                 | NG/Ab                 | ND      | CjAb                   |
| 5   | -/Cj          | -/Cj                  | NG/Cj                 | -/-     | -/-                   | NG/NG                 | ND      | Cj                     |
| 6   | -/-           | Cj/Ab                 | -/CcAb                | -/-     | Ab/Ab                 | Ab/CcAb               | ND      | CjCcAb                 |
| 7   | -/-           | CjAb/Cj               | -/Cj                  | -/-     | Ab/Ab                 | -/Ab                  | ND      | CjAb                   |
| 8   | -/-           | Cj/Cj                 | -/Cj                  | -/-     | -/Ab                  | Ab/Ab                 | ND      | CjAb                   |
| 9   | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | Ab/Ab                 | Ab/Ab                 | ND      | Ab                     |
| 10  | Cj/Cj         | Cj/Cj                 | -/Cj                  | -/-     | Ab/Ab                 | -/Ab                  | ND      | CjAb                   |
| 11  | Ab/-          | -/Ab                  | Cj/Ab                 | -/-     | Ab/Ab                 | Ab/CcAb               | ND      | CjCcAb                 |
| 12  | -/-           | Cj/Cj                 | Cj/Cj                 | -/-     | -/Ab                  | Ab/Ab                 | ND      | CjAb                   |
| 13  | -/-           | -/-                   | -/Cj                  | -/-     | Ab/-                  | Ab/Ab                 | ND      | CjAb                   |
| 14  | -/-           | Cj/-                  | Cj/-                  | -/-     | Ab/Ab                 | CjAb/Ab               | ND      | CjAb                   |
| 15  | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | Ab/Ab                 | -/Ab                  | Ab/Ab   | Ab                     |
| 16  | -/-           | Cj/-                  | -/Cj                  | -/-     | -/Ab                  | -/Ab                  | Ab/Ab   | CjAb                   |
| 17  | -/-           | -/-                   | -/Ab                  | -/-     | Ab/-                  | -/Ab                  | Ab/Ab   | Ab                     |
| 18  | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | -/-                   | -/Ab                  | Ab/Ab   | Ab                     |
| 19  | -/-           | Cc/-                  | -/-                   | -/-     | -/Ab                  | -/Ab                  | Ab/Ab   | CcAb                   |
| 20  | -/-           | Cj/-                  | -/-                   | -/-     | -/-                   | -/Ab                  | Ab/Ab   | CjAb                   |
| 21  | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | -/-                   | -/-                   | Ab/Ab   | Ab                     |
| 22  | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | -/Ab                  | -/Ab                  | Ab/Ab   | Ab                     |
| 23  | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | -/-                   | -/-                   | Ab/Ab   | Ab                     |
| 24  | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | Ab/Ab                 | -/Ab                  | Ab/Ab   | Ab                     |
| 25  | -/-           | -/Ab                  | -/Ab                  | -/-     | -/Ab                  | Ab/Ab                 | Ab/Ab   | Ab                     |
| 26  | -/-           | -/-                   | -/-                   | -/-     | -/Ab                  | Ab/Ab                 | Ab/Ab   | Ab                     |
| 小計  | Cj (2) Ab (1) | Cj (11) Cc (1) Ab (3) | Cj (10) Cc (1) Ab (4) | Cc (1)  | Cj (4) Cc (1) Ab (17) | Cj (2) Cc (3) Ab (21) | Ab (12) | Cj (15) Cc (4) Ab (23) |

表3. 豚肉からの *Campylobacter* 属菌及び *Arcobacter* 属菌の検出と分離

| 由来  | Preston |                        |                        | Bolton  |        |         | Arco   | 結果                               |
|-----|---------|------------------------|------------------------|---------|--------|---------|--------|----------------------------------|
|     | Skirrow | mCCDA                  | Filter                 | Skirrow | mCCDA  | Filter  | Filter |                                  |
| 豚 1 | -/-     | -/CcChyo               | -/Cc                   | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | ND     | CcChyoAb                         |
| 2   | -/-     | Cc/Ab                  | Cc/CcAb                | -/-     | Ab/Ab  | Ab/Ab   | ND     | CcAb                             |
| 3   | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | ND     | Ab                               |
| 4   | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/Ab    | Ab/Ab  | Ab/Ab   | ND     | Ab                               |
| 5   | -/-     | Cc/Ab                  | -/Ab                   | -/-     | -/Ab   | -/Ab    | ND     | CcAb                             |
| 6   | -/ND    | -/ND                   | NG/ND                  | -/ND    | -/ND   | Ab/ND   | ND     | Ab                               |
| 7   | -/-     | -/-                    | -/Acry                 | -/-     | -/-    | NG/Ab   | ND     | AbAcry                           |
| 8   | -/-     | -/Ab                   | -/Ab                   | -/-     | -/Ab   | -/Ab    | ND     | Ab                               |
| 9   | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | ND     | Ab                               |
| 10  | -/-     | -/-                    | -/Ab                   | -/-     | -/-    | Ab/Ab   | Ab/Ab  | Ab                               |
| 11  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/Ab   | -/Ab    | Ab/Ab  | Ab                               |
| 12  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/-     | -/-    | -                                |
| 13  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/Ab    | Ab/Ab  | Ab                               |
| 14  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/-     | -/-    | -                                |
| 15  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/-     | Ab/Ab  | Ab                               |
| 16  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/Ab    | Ab/Ab  | Ab                               |
| 17  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/-     | Ab/Ab  | Ab                               |
| 18  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/-     | -/-    | -                                |
| 19  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/Ab    | Ab/Ab  | Ab                               |
| 20  | -/-     | -/-                    | -/-                    | -/-     | -/-    | -/-     | -/-    | -                                |
| 21  | -/-     | -/-                    | -/Ab                   | -/-     | -/-    | Ab/-    | Ab/Ab  | Ab                               |
| 小計  | None    | Cc (3) Ab (1) Chyo (1) | Cc (2) Ab (5) Acry (1) | Ab (1)  | Ab (5) | Ab (15) | Ab (8) | Cc (3) Chyo (1) Ab (17) Acry (1) |

表4 タイの食肉から分離されたカンピロバクター関連細菌の薬剤耐性

| 菌種                      | NA   | LVFX | EM   | AZM | CP  | CPFY | ABPC | CLDM | FOM  | GET |
|-------------------------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|-----|
| <i>C. jejuni</i> (18)   | 61%  | 61%  | 0%   | 0%  | 0%  | 78%  | 22%  | 5.6% | 11%  | ND  |
| <i>C. coli</i> (6)      | 100% | 83%  | 33%  | 33% | 17% | 100% | 33%  | 33%  | 0%   | ND  |
| <i>A. butzleri</i> (27) | 19%  | 19%  | 3.7% | 56% | 22% | 15%  | 70%  | 59%  | 3.7% | 93% |