

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659307

研究課題名(和文)カンピロバクター食中毒の低減に用いるファージの分離とスクリーニング

研究課題名(英文) Isolation of Campylobacter phage from poultry and reduction of food-borne outbreak by Campylobacter jejuni/coli

研究代表者

石井 營次 (ISHII, Eiji)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：80158740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円、(間接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：量販店6店舗で購入した調理用の鶏肝223検体から、Campylobacter jejuni/coli が100検体から分離された。これらの菌株を宿主に、その分離源である鶏肝の増菌培養液及び肝懸濁液をphage分離用の原液として、phageの分離および単離を試みた。その結果、溶菌活性の強いphageが3検体から分離され、7種の単離phageが10億～>100億pfu/mlの濃度で得られた。これらのphageは分離株の30%に感受性を示し、4、-20、-80で15ヶ月後も活性が認められた。しかし、phageの検出率が低いことと宿主の溶菌スペクトルの範囲が狭いことが課題であった。

研究成果の概要(英文)：A total of 100 Campylobacter jejuni/coli strains was isolated from 223 specimens of poultry liver purchased at 6 retail stores. Three crude phages were detected from the Preston enrichment culture of livers and divided into seven pure phages, which made the plaque against 30 C.jejuni/coli isolates. The phage suspension was obtained at more than one billion pfu/ml, and the plaque forming activity of these phages in the SM buffer solution was retained for more than 15 months after preservation at 4C, -20C, and -80C.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：社会医学、衛生学

キーワード：カンピロバクター 食中毒 鶏肉 ファージ分離法 生物製剤

1. 研究開始当初の背景

(1)カンピロバクター食中毒の発生件数は毎年1,2位を占めており、特に、小児を中心に散发性食中毒としても多く発生している。この食中毒の原因食材として鶏肉が多いことが知られている。

(2)人に対するカンピロバクターの発症菌量は100のオーダーであるため、鶏肉の生食や調理済み食品への汚染で食中毒に至るため、鶏肉のカンピロバクター対策は重要な課題となっている。

(3)カンピロバクターは鶏の糞便や血液中に分布しているが、鶏にとって有害な細菌ではない。しかし、血液を通じて肝などの臓器を汚染するほか、糞便から解体時に肉への汚染が起こり、鶏肉の6割以上が汚染されているといわれる。そのためにも鶏のカンピロバクター保菌率を下げるのがカンピロバクター食中毒対策になると考えられる。

2. 研究の目的

(1)カンピロバクターは約30年以上前に一般に知られるようになった主要な食中毒菌で、その当時から小児の散发性食中毒の原因菌として知られていた。このカンピロバクターによる食中毒は現在ノロウイルス食中毒とともに事件数で上位にある。

(2)また、カンピロバクターは動物類に広範な保菌が知られており、特に、鶏での保菌率が高いため、食材としての鶏肉がその食中毒の原因になりやすい。ヒトは極めて少量の摂取で発症するため、食中毒患者の多発にも結びついている。

(3)さらに、カンピロバクターを保菌した鶏からは鶏肉に解体されるときに汚染が避けられないことと、血液を介して食用に供される肝などの内部にも分布していることが知られている。そのため、このカンピロバクター食中毒を低減するにはこの鶏でのカンピロバクター保菌率を低くすることが大きな効果を発揮するものとみられる。

(4)これまで、鶏のカンピロバクターなどの細菌の保菌の根絶や低下のために抗生物質などが飼育段階で投与されてきているが、これは鶏肉への残留抗生物質の問題や耐性菌の出現の問題があり、食品の安全性確保のため、できるだけ避ける必要がある。そこで、生物学的に安全性のあるファージの利用が考えられる。このファージを微生物製剤とした利用の可能性をみるため、本研究では宿主としてのカンピロバクターとそれに対するファージを分離し、製剤化の可能なファージの検出を試みた。

3. 研究の方法

(1)鶏肉材料からのカンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) の分離

2012年10月から2013年12月に、6量販店から購入した鶏肝、70パッケージ223検体をカンピロバクターの分離材料とした。鶏肝を細切し、切開面をスキロー寒天培地またはバツラー寒天培地に直接塗抹し、42で10%CO₂ 孵卵器で2日間培養した。また、細切した鶏肝約10gをプレストン増菌培地で、42の湯浴中で2日間培養し、スキロー寒天培地およびバツラー寒天培地に塗抹し、以下前述と同様に培養した。カンピロバクターを疑う集落を血液寒天培地に再塗抹し、培養後常法に従い同定を行った。

(2)カンピロバクターファージ分離材料の調整

カンピロバクターファージ分離用の材料として、上記のプレストン増菌培養後の培養液と鶏肝2-5gのSM buffer 4mlによる懸濁液を用いた。各々を遠心分離処理後、0.2μmのフィルターで濾過した溶液をファージ分離用原液とした。

(3)カンピロバクターファージの増殖方法

カンピロバクターが分離された同一材料のファージ分離用原液の組み合わせで、培養を行った。BSA寒天培地で継代培養2回以上繰り返した宿主をBrucella brothに一白金耳接種し、42、10%CO₂ 孵卵器で2-3時間培養した宿主液2-3mlにファージ分離用原液200μl添加し、1-2日間培養後、遠心処理し、0.2μmのフィルターで濾過した溶液をファージ検出・分離用液とした。

(4)カンピロバクターファージの検出・分離および単離方法

2012年10月から12月に購入した鶏肝を材料として分離を試みた。カンピロバクターファージの検出はスポット法または重層法で行った。両方法ともBolton寒天またはBrucella寒天を下層培地として、上層にSoft寒天(Brucella broth+0.6% Agar)を重層した。スポット法は2-3時間培養した宿主液200μlを固化前のSoft寒天4mlと混ぜて重層し、固化後寒天上にファージ検出・分離用液2-2.5μlを接種した。重層法はスポット法での固化前のSoft寒天に宿主液100-200ulとファージ検出・分離用液50-200ulを混ぜ合わせ重層し固化させた。培養はいずれも10%CO₂ 孵卵器で1日行い、透明の溶菌斑またはブラークの形成の有無により、ファージを判定した。

ファージの分離は、重層法やスポット法で検出されたファージの透明の溶菌斑を少量のSM bufferに回収し、よく懸濁し、遠心処理後の上清を再び重層法で培養し、Soft寒天部分を再度SM bufferに回収し、分離したファージ(複数のファージを含んでいる可能性がある)を粗ファージ(crude phage)とした。

またファージの単離は粗ファージを重層法やスポット法で単独のプラークを形成させ、単一プラークを一粗ファージ当たり 3-5 個のプラークについて、同様に SM buffer で回収し、さらに重層法で培養し、Soft 寒天部分から回収し、単離ファージとした。なお、SM buffer にファージを回収する場合、最終的にすべて 0.2 μm のフィルターで濾過処理を行った。

(5) カンピロバクターファージのスクリーニング方法

上記(2)(3)で述べた、カンピロバクターが分離された同一材料のファージ分離用原液との組み合わせで増殖させたファージ検出・分離用液を用いて、スポット法のみで行った。

(6) カンピロバクターファージの増殖及び保存方法の検討

ファージの増殖は重層法で培養し、SM buffer に回収した。保存は粗ファージ及び単離ファージについて、4、-20、または-80 で行い、ファージ活性はプラーク形成の有無を中心に調べた。また、得られたファージ液のファージ濃度 pfu (plaque forming unit)/ml をプラーク法で求め、保存条件をファージの消長から調べた。

(7) カンピロバクターファージの溶菌スペクトルの測定方法

得られた単離ファージを用いてカンピロバクター各分離株に対して、ファージ活性をスポット法で調べ、各単離ファージの溶菌スペクトルの範囲を調べた。

4. 研究成果

(1) カンピロバクター分離結果

2012年10月から2013年12月に6量販店で購入した鶏肝、70パッケージ、223検体からカンピロバクターが100検体(陽性率45%)から分離された。包装(ロット)単位での陽性率は47/70(68%)で、一般的な鶏肉のカンピロバクターの陽性率と同等か、高い陽性率とみられる。鶏肝からの本菌の陽性率は鶏肉の一般的な汚染率、あるいは鶏の保菌率とみられる。菌種の内訳は *C. jejuni* 92株、*C. coli* 8株であった。また、培養方法別にみた検体数に対する陽性率は直接培養法 82/223、増菌培養法 50/223 であった。カンピロバクターは血液中にも分布していることから、以後のファージの分離材料としても有用とみられた。

(2) カンピロバクターファージの分離および単離

まず、確実にファージの分離と単離を行うため、2012年10月から12月に用いた鶏肝からの材料について試み、分離条件の確立を目指した。過去に行った前実験でもファージか

どうか確認できなかったが、Preston 増菌培養液をファージ液とした場合の重層法で、寒天培地上の変化が確認できたことから、主として、Preston 増菌培地の培養液からのファージの検出・分離を試みた。

上記期間に購入した鶏肝の Preston 増菌培養で得られた 26 株の *C. jejuni* を宿主とし、その増菌培養液をファージ検出・分離溶液としてファージ増殖培養を行い、重層法でファージ検出を試みた。明瞭なプラークがみられなかったが、表面を光にかざすことにより、小さな斑点がみられる寒天培地が3試料あった。それらの重層した Soft 寒天部分を SM buffer に回収して、回収液と宿主培養液を重層する操作を繰り返すことにより、明瞭なプラークが得られた(写真1)。

検出されたプラークは寒天培地上で大きさの異なるものもみられることから、複数の phage であることを視野に単離を試みた。

まず、各試料から得られたファージと分離源が同じ宿主を用いて、Brucella broth によりファージの増殖培養を1日と2日行い各ファージの増殖液6種を得た。これらの増殖ファージを各3種の宿主に対してスポット法により溶菌斑を作成させた。結果は表1に示すとおり、同一試料内の宿主とファージにより



写真1

溶菌斑が確認されたが、それ以外に宿主とファージが異種間の試料、すなわち他の試料の宿主に対しても溶菌斑がみられるものがあった。試料のファージでは試料の宿主に対し2日間の増殖培養液からのファージで観察され、試料のファージは試料の宿主に溶菌斑が確認された。

これらのスポット法による溶菌斑の検出結果を表1のA~Iとして示した。これらの溶菌斑を SM buffer に回収し、得られたファージ液を検出されたときの宿主に対して重層法でプラークの検出を試みた。さらにその重層部分からファージを回収し、再び重層を繰り返して、ファージの安定性をみたところ、安定したファージはA,B,D,E,F,H,Iの各粗ファージ7種類あったが、不明瞭な溶菌斑が観察されたCとGでは検出されなくなった。つぎに回収された粗ファージは複数のファージを含んでいることが考えられることから、単離を試みた。

表1. ファージが検出された分離源宿主と増殖培養後の粗ファージによる溶菌活性*

ファージ分離 源試料**	ファージ分離源宿主試料***		
	1	2	3
a	+ A	-	-
b	+ B	-	-
a	-	+ E	-
b	+w C	+ F	- w G
a	+ D	-	+ H
b	+ D	-	+ I

*: +は溶菌あり、+w は不明瞭な溶菌が認められる、- は溶菌なし、各 A~I は各粗ファージとして回収

** : 増殖培養が a は 1 日、b は 2 日で得られたファージ

*** : 1 と 、 2 と 、 3 と は同じ試料から得られたもの

単離法は重層法で得られた単一のプラークからの回収を試みたが、重層法で回収しにくい場合、宿主培養液のみを soft 寒天培地で重層した後、固化後各ファージ液を適宜 SM buffer で希釈した液 0.1ml を表面に塗抹し、1 日培養後生成した単一プラークを回収し、増殖培養した。さらに重層法で培養増殖させたファージを回収し、単離ファージとした。この場合、ファージ D は当初検出されたときの試料を宿主として用い、各粗ファージから 3~5 個のプラークを回収した。写真 2 は単離ファージの回収に用いた寒天培地状のプラークを示している。各単離ファージを溶菌スペクトル試験及び保存条件の検討に用いた。

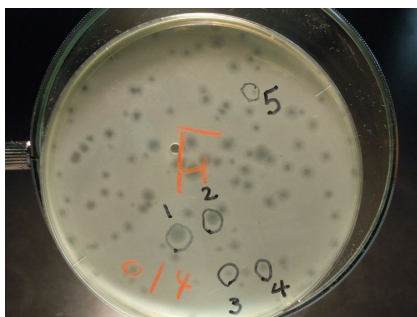


写真 2 . 粗ファージを重層培養し得られたプラーク

7 種の粗ファージ A,B,D,E,F,H,I の各々 3 ~ 5 個のプラークについて、表 1 の宿主 1 , 2 , 3 に対する溶菌活性を調べた。各粗ファージの複数の単離ファージの溶菌活性パターンはすべて同一パターンを示した。それらの結果を表 2 に示す。単離ファージを A,B,D,E,F,H,I で示しているが、各ファージが分離された宿主カンピロバクターは、A,B は宿主 1 , E,F は宿主 2 , D,H,I は宿主 3 で、各々の分離源の試料は表 1 のとおりである。

各単離ファージと宿主の関係は、例えば A,B と宿主 1 は同一試料 から分離されており、プラークを形成する可能性の高い関係にある。同様の関係が E,F と宿主 2 に観察される。D,H,I は本来の同一分離源からの宿主 3 を溶菌しているが、さらに宿主 1 に対しても

溶菌活性を示し、表 1 の粗ファージの溶菌活性パターンと同様である。このスペクトル表からは 3 種類のファージに分類された。しかし、同一分離試料からの単離ファージはすべて同じ溶菌スペクトルであったが、同じものかどうか、さらに多くの宿主に対する結果を見る必要があると考えられる。

表 2 . 各単離ファージのその分離源宿主に対する溶菌スペクトル

単離ファージ	スポット法		
	1	2	3
A	+	-	-
B	+	-	-
D	+	-	+
E	-	+	-
F	-	+	-
H	+	-	+
I	+	-	+

(3) 鶏肝からのカンピロバクターファージのスクリーニング結果

上記で得られた単離ファージを用いて、スポット法と重層法で検出感度を比較した場合、重層法よりスポット法の方が検出感度は高く、重層法ではプラークや溶菌斑が観察されない場合があるのに対し、スポット法では明瞭に観察された。これはカンピロバクターが好気性菌ということから重層した寒天内と寒天表面では酸素分圧が異なることによる生育条件の差に関係することも考えられ、そのプラークの形成条件の詳細な検討が必要とみられる。

ファージが検出された試料からの分離株以外のカンピロバクター分離株 (直接培養の分離株を含む) 97 株について分離株を宿主として各々の Preston 増菌培養液および肝懸濁液の各ファージ分離・検出溶液との増殖培養を行い、スポット法でファージの検出を試みた。その結果、いずれの試料からもファージは検出されなかった。この過程では溶菌斑が観察されることもあったが、その溶菌斑の回収液をさらに重層法で培養を繰り返した場合、プラークは検出されなかった。本実験ではこの検出法の確立が課題として残っている。肝でなく、鶏の糞便などを用いて検出を試みた文献などでは検出率の高い報告もあるが、ファージの分離材料により、その検出率が異なることも考えられる。また、単離や保存条件などについての詳細な報告は少なく、これらの点がファージの製剤としての応用実験の少ないこととの関係が推察される。

(4) 鶏肝から分離したカンピロバクターに対する単離ファージの溶菌スペクトル結果

上記(3) に示した 7 種の各単離ファージを用いて、カンピロバクター分離株に対する溶菌パターンを調べた。この 7 種のファージ

に感受性を示したのは 100 株中 30 株で、その型は 4 種に分かれ(表 3)、1 型、2 型、3 型、4 型とすると各々5、16、3、6 株であった。

表 3 . 単離ファージに感受性のカンピロバクター分離株、30 株のファージ型

単離ファージ	スポット法 + : 溶菌 - : 溶菌なし			
	ファージ型			
	1 型	2 型	3 型	4 型
A	+	-	-	+
B	+	-	-	+
D	+	+	-	-
E	-	-	+	-
F	-	-	+	-
H	+	+	-	-
I	+	+	-	-

この単離ファージによる分離株のファージ型と表 2 の溶菌スペクトルを見ると、単離ファージ A・B、D・H・I、E・F は各々同一試料から分離されており、かつ同じ宿主に同様な溶菌性を示すことから、同じファージである可能性が高いが、前述したようにさらに多くの感受性株について調べることにより明らかになるものと思われる。これらの鶏肝から得られたファージの感受性株の割合は実用面からみると低いと考えられるが、ここでのファージは肝から分離していることから血液中にも分布しているファージが得られたこととなり、鶏の腸管以外の体内での作用の可能性など、応用の可能性もある。

(5) カンピロバクターファージの保存法の検討

単離ファージはその利用性を考えた場合、安定性があることが望ましい。しかし、まず、確実な保存方法を得ることが重要である。カンピロバクターの場合は-80 での保存が必要であるが、ファージの場合もその温度で保存した増菌培養液からも検出されることを確認した。そのため、室温や冷蔵温度での生存が可能かどうか、など基礎的な保存条件を調べる必要がある。研究期間の範囲内でスポット法での検出、ファージ数の変化、さらに増殖による感度を高くした方法を用いて調べた。

実験当初に分離された 3 種類の粗ファージを冷蔵温度(4) および-20 と-80 の各冷凍庫内で保存し、定期的にスポット法によるブランク形成でファージ活性を調べた結果、3 種類のファージはともに 1 年 3 ヶ月以上の活性維持が確認された。このファージの保存液は SM buffer およびそれに 10%DMSO を添加したもので行ったが、いずれも同様の結果であった。また、参考にファージが検出された宿主とファージの増殖培養液を室温(20-25) で一晩放置した場合、ファージは検出されなかった。

また、単離ファージ 7 種類について冷蔵温度(4) と-80 の冷凍庫内で保存し、ファ

ージ濃度(pfu/ml)の変化を調べた。SM buffer に回収した当初のファージ数は $10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml 以上であったが、2 ヶ月保存後では 4 で $10^4 \sim 10^7$ pfu/ml、-80 では $10^4 \sim 10^{10}$ pfu/ml の各ファージ濃度となり、オーダーが低下するものが多かった。単離ファージの種類によっても異なることも考えられるが、適したファージ濃度があることも考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

石井 營次、鶏肝の *Campylobacter jejuni/coli* の分布と鶏の保菌率、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、2013 年 9 月 10 日~11 日、千里ライフサイエンスセンター(豊中市)

石井 營次、*Campylobacter jejuni/coli* Phage の分離方法の検討と特定宿主に対する phage 検出状況、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、2013 年 9 月 10 日~11 日、千里ライフサイエンスセンター(豊中市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石井 營次 (ISHII, Eiji)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：80158740

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし