

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：47118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350114

研究課題名(和文) 鶏肉におけるカンピロバクター特異的ファージを用いた制御法に関する研究

研究課題名(英文) Study on control method using Campylobacter specific bacteriophages in chicken meat

研究代表者

古田 宗宜 (FURUTA, Munenori)

中村学園大学短期大学部・食物栄養学科・講師

研究者番号：00343731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、市販鶏肉からカンピロバクター特異的ファージを分離し、これらを鶏肉に使用してカンピロバクターを制御する方法について検討した。市販鶏肉15検体中13検体から増菌法によって26株のファージが分離された。これらのうちファージPHC10はC. jejuni 46株中31株に対して溶菌反応を示した。in vitroにおけるC. jejuniの制御効果を調べた結果、42℃で6～12時間後にC. jejuni菌数は初発菌数よりも1～3桁減少した。鶏皮にファージPHC22を接種後、4℃で真空パック保存では1時間後に2桁程度C. jejuni菌数を減少させることができた。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to isolate Campylobacter specific lytic phages from retail chicken meats and to clarify method for controlling Campylobacter in chicken meats by using these isolates. A total of 26 phages were effectively isolated from 13 of 15 retail chicken meats by the enrichment method. Of these, phage PHC10 showed active against 31 of the 46 C. jejuni isolates tested. In vitro effects of phage isolates on viability of C. jejuni were investigated. The result showed that these phages reduced viable counts of C. jejuni by 1～3 log after 6～12 h of incubation at 42 °C as compared to the initial counts. Chicken skin inoculated with phage PHC22 was able to reduce viable counts of C. jejuni by 2 log after 1 h of incubation at 4 °C by using vacuum packaging as compared to the control.

研究分野：食品衛生学，食品微生物学

キーワード：カンピロバクター 食中毒菌制御 バクテリオファージ

## 1. 研究開始当初の背景

カンピロバクターは先進国における主要な食中毒原因菌であり、我が国でも食中毒発生件数および患者数は非常に多く、減少傾向が見られない。主な原因食品は鶏肉であり、市販鶏肉における本菌の汚染率は非常に高く、鶏の解体過程に交差汚染によって汚染が広がることが知られている。さらに近年、カンピロバクターのフルオロキノロン系薬剤に対する耐性菌の増加が世界的な問題となっており、抗生物質に依存しないカンピロバクター制御法の開発は感染症対策としても重要である。

これまでカンピロバクター制御法としては、過酢酸やオゾンなどを利用した化学的制御法やマイクロバブルや超音波処理などの物理的手法を組み合わせた方法について研究が行われてきたが、殺菌剤の安全性や高価な機材が必要であるなどの点で問題を残しており、現在まで加熱以外に有効な制御法は無い。このような背景から、鶏肉取扱い現場でも実施可能な安全性が高く安価な新規カンピロバクター制御法の開発が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

諸外国では、食肉加工品に対するリステリア菌制御法としてリステリア菌に特異的に感染し溶菌するバクテリオファージ(以下、ファージ)を利用した制御法が認可されている。ファージは細菌にのみ感染して溶菌するウイルスであり、環境中や人の腸管内にも多数存在していて、動物や植物に対して無害な地球上で最も多い生命体である。これまでも食中毒細菌に特異的なファージが単離され、同種の食中毒細菌株の型別に利用されてきたが、カンピロバクターを特異的に溶菌するファージについては、海外では鶏肉や環境中から分離された報告があるが、我が国での分離報告はほとんど無い。

本研究では、ファージを用いた制御法の安全性と特異性に着目し、カンピロバクターを特異的に溶菌するファージを単離し、これを用いて鶏肉を中心に食品のカンピロバクター制御法を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 市販鶏肉類からのファージの分離

検体は、市販鶏肉 15 検体(鶏肝 13 検体および鶏皮 2 検体)を用いた。検体にプレストン培地を加えた後、ストマッカー処理した懸濁液に宿主菌株として 9 菌株のカンピロバクター ジェジュニ(以下、*C. jejuni*)および 1 菌株のカンピロバクター コリ(以下、*C. coli*)の菌液を添加した後、42 で 24 時間培養した培養液を遠心分離後、上清をフィルターを通して得たる液をファージ検出液とした(増菌法)。

ファージ検出液からのファージの分離は、宿主菌の菌液を上層培地に接種した後、重

層した NZCYM 培地上にファージ検出液をスポット接種して培養後(スポット培養)、透明帯が確認された場合、透明帯部分を SM バッファーに回収した。回収した溶液は、宿主菌とともに上層培地に接種して NZCYM 寒天培地に重層し、42 で 24 時間微好気培養後、生じたクリアな単一プラークを SM バッファーに回収した。

この操作を 3 回繰り返してファージの純化を行った。

### (2) *C. jejuni* および *C. coli* の遺伝子型別

鶏および牛から分離された *C. jejuni* 46 株(鶏肝由来 21 株、鶏肉由来 15 株、鶏腸由来 9 株および鶏皮由来 1 株)および *C. coli* 7 株(鶏肝由来 5 株、鶏肉由来 1 株および牛肝由来 1 株)について、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法によって RAPD 型別および自動化リボタイピング(AR)法によってリボグループにそれぞれ型別した。

RAPD 法は、プライマーとして OPA-11 を使用して PCR を行った後、PCR 産物の電気泳動パターンの違いによって分類した。AR 法は、制限酵素として *Pst* I を使用してリボプリンター™ システムを用いて取扱説明書に準じて行った。リボプリンター™ 内で自動的に行われたリボタイピングでは、供試菌株とデータベース内の菌株間のリボパターンが比較され、類似度が 0.93 以上であれば同一のリボグループとして分類される。

### (3) 溶菌スペクトル

溶菌スペクトル検査には、RAPD 法および AR 法によって型別された *C. jejuni* 46 株および *C. coli* 7 株を用いた。溶菌スペクトルは、各菌株の菌液を上層培地に接種した後、重層した NZCYM 培地にファージ液をスポット培養後、溶菌反応の有無によって調べた。

### (4) ファージの形態観察

分離されたファージ 5 株について、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて形態観察を行った。

### (5) *in vitro* におけるファージの *C. jejuni* 制御

*C. jejuni* L26 とファージを BHI 培地に接種後、42 で微好気培養して経時的に生残菌数を測定した。菌数は、血液寒天培地を用いて、菌接種後 0、2、4、6、8、10 および 12 時間後に測定した。ファージ PHC 10 については、さらに 24 時間後の菌数も測定した。

### (6) 鶏肉におけるファージの *C. jejuni* 制御

鶏肉におけるファージの *C. jejuni* の制御効果を調べるため、*C. jejuni* L26 を接種した市販鶏皮にファージを接種(MOI10<sup>2</sup>または 10<sup>3</sup>)後、保存温度(4 または 20 )保存形態(好気または真空パック)を変えて保存し、経時的に *C. jejuni* 生残菌数を測定した。*C. jejuni* の生菌数は、バツラー平板培地を使用して測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 市販鶏肉からのファージの分離

市販鶏肉類からのファージの分離結果について表1に示す。

市販鶏肉類 15 検体中 13 検体から合計 26 株のファージが増菌法によって分離された。これらのうち、14 株は *C. jejuni* L26 を宿主菌として分離され、残りの 12 株は *C. jejuni* 49、799、または 803 を宿主菌として分離された。このことからファージの分離法として増菌法は効果的であり、宿主菌株として *C. jejuni* L26 のようなファージに対する感受性の高い菌株を用いることや複数の菌株を宿主菌として使用することによって分離率が向上することが示唆された。また、我が国と海外では鶏や環境中に存在するカンピロバクターの遺伝学的な性質やファージ感受性は異なることが予想されるため、国産の鶏肉からファージを分離するためには国内で分離された菌株を宿主菌として使用すべきであると考えられる。

表1. 鶏肉から分離されたファージ

検体 番号	鶏肉 部位	宿主菌株										
		<i>C. jejuni</i>										<i>C. coli</i> 728
		L26	23	30	34	49	799	800	802	803		
1	肝	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
2	肝	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
3	肝	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
4	肝	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
5	肝	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-
6	肝	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	肝	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	肝	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	肝	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	肝	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	肝	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-
12	肝	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	肝	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
14	皮	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
15	皮	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
合計		14	0	0	0	7	3	0	0	2	0	0

##### (2) *C. jejuni* および *C. coli* の遺伝子型別

鶏肉および鶏内蔵から分離された *C. jejuni* 46 株について、RAPD 法および AR 法により型別した。その結果、*C. jejuni* 46 株は 24 種類の RAPD 型および 25 種類のリボグループに分類された。これらのうち 6 種類の RAPD 型では 1 つの RAPD 型内に複数のリボグループが含まれ、また、6 種類のリボグループでは、1 つのリボグループ内に複数の RAPD 型が含まれた。RAPD 型およびリボグループを組み合わせることによって *C. jejuni* 46 株は、32 種類に詳細に分類することができた。*C. coli* 7 株はそれぞれ 3 種類の RAPD 型およびリボグループに分類された。これらは、同じ RAPD 型のもは同じリボグループに分類された。

*C. jejuni* および *C. coli* の遺伝子型別法として、RAPD 法と AR 法を組み合わせた分類法は、迅速で簡便であると同時に菌株識別能力の高い菌株分類法として疫学調査などに有効であることが示唆された。

##### (3) 溶菌スペクトル

分離されたファージの *C. jejuni* 46 株に対する溶菌スペクトルは、ファージによって異なった。一方、*C. coli* 7 株対してはいずれのファージも溶菌反応を示さなかった。

表2に分離されたファージ 26 株についての *C. jejuni* 46 株に対する溶菌スペクトルの結果を示す。最も広い溶菌スペクトルを示したのは、ファージ PHC10 であり *C. jejuni* 46 株中 31 株 (67.4%) で溶菌反応が認められた。*C. jejuni* 799 を宿主菌株として分離された 3 株 (ファージ PHC17、18 および 19) は、いずれも広い溶菌スペクトル (56.5%) を示した。

表2. *C. jejuni* に対するファージの溶菌スペクトル

ファージ	溶菌 株数	溶菌率 (%)	ファージ	溶菌 株数	溶菌率 (%)
PHC1	2	4.3	PHC14	28	60.9
PHC2	2	4.3	PHC15	5	10.9
PHC3	3	6.5	PHC16	6	13.0
PHC4	2	4.3	PHC17	26	56.5
PHC5	6	13.0	PHC18	26	56.5
PHC6	2	4.3	PHC19	26	56.5
PHC7	11	23.9	PHC20	10	21.7
PHC8	9	19.6	PHC21	2	4.3
PHC9	5	10.9	PHC22	13	28.3
PHC10	31	67.4	PHC23	3	6.5
PHC11	3	6.5	PHC24	11	23.9
PHC12	7	15.2	PHC25	24	52.2
PHC13	19	41.3	PHC26	16	34.8

PHC 1 ~ PHC14: 宿主菌 *C. jejuni* L26

PHC15 ~ PHC16: 宿主菌 *C. jejuni* 803

PHC17 ~ PHC19: 宿主菌 *C. jejuni* 799

PHC20 ~ PHC26: 宿主菌 *C. jejuni* 49

##### (4) ファージの形態観察

ファージ 5 株 (ファージ PHC5、10、19、22、および 25) について TEM による形態観察を行った。その結果、いずれのファージも 20 面体構造の頭部と伸縮性の尾部を有するミオウイルス科に属するファージであることが確認された。これら 5 株のファージのうち 3 株 (ファージ PHC10、19 および 25) は頭部の直径が 94 ~ 99 nm であり、これまでに分離報告のあるものと同等の大きさであった。残りの 2 株 (ファージ PHC5 および 22) は頭部の直径が 57 nm 程度であり、これまでに報告されたものと比較すると若干小さいファージであった。

図2にファージ PHC19 およびファージ PHC5 の電子顕微鏡像を示す。

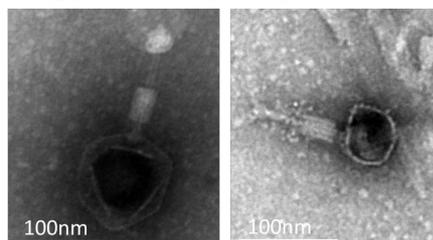


図1. ファージの透過型電子顕微鏡像

左図: PHC19, 右図: PHC5

(5) *in vitro* におけるファージの *C. jejuni* 制御  
ファージ PHC10

図2に *in vitro* におけるファージ PHC10 接種後 24 時間後までの *C. jejuni* の菌数変化を示す。*C. jejuni* はファージ接種後、8~12 時間後までは初発菌数よりも 1 桁程度低かった。その後、菌数は増加したが 24 時間後までコントロールと比較して菌数は有意に低かった。12 時間以降に菌数が増加した理由としては、ファージ PHC10 に対する耐性菌が存在する可能性が考えられる。

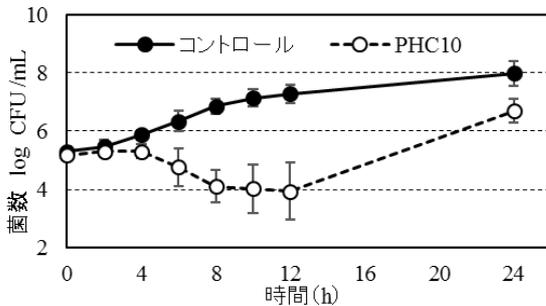


図2. *in vitro* におけるファージ PHC10 接種後の *C. jejuni* L26 の菌数変化

その他のファージ

図3、4に *in vitro* におけるファージ 18 株をそれぞれ接種後の 12 時間後までの *C. jejuni* の菌数変化を示す。すべてのファージで *C. jejuni* の菌数は減少したが、ファージによって殺菌効果に差が見られた。18 株のファージのうち 12 株 (ファージ PHC 3、5、6、8、9、11、12、20、21、22、23 および 24) は、初発菌数と比較して 6~10 時間後までに 3 桁程度減少し、3 株 (ファージ PHC 1、2 および 7) は 6~10 時間後までに 2 桁程度減少し、残り 3 株 (ファージ PHC 14、19 および 25) は 8~12 時間後までに 1 桁程度減少した。この結果からファージによって溶菌力に差があることがわかった。

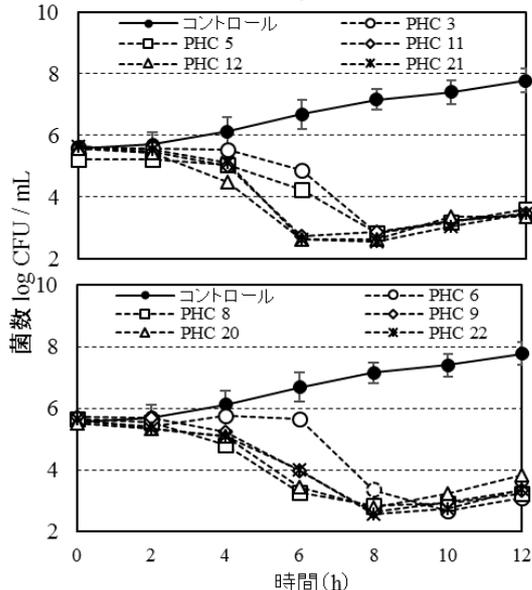


図3. *in vitro* におけるファージ接種後の *C. jejuni* L26 の菌数変化

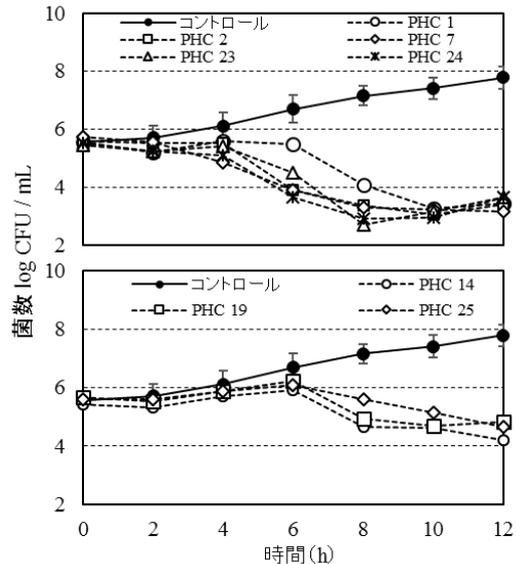


図4. *in vitro* におけるファージ接種後の *C. jejuni* L26 の菌数変化

(6) 鶏肉におけるファージの *C. jejuni* 制御  
保存温度

ファージ接種後の鶏肉の保存温度とカンピロバクター制御効果について調べるため、保存温度を変えて生残菌数を比較した。

図4にファージ PHC10 またはファージ PHC22 を接種 (MOI10<sup>2</sup>) した鶏皮における 20 または 4 保存中の *C. jejuni* の菌数変化を示す。ファージ PHC10 を接種後、20 で保存した場合は 48 時間後にはコントロールと比較して 1 桁程度菌数が減少したが、4 で保存した場合は菌数に差は見られなかった。一方、ファージ PHC22 を接種した場合は 4 および 20 保存の両方で 24 時間後にはコントロールと比較して 1 桁程度菌数が減少した。このことから、ファージ PHC22 のような溶菌力の強いファージを用いると鶏皮を 4 の低温で保存してもカンピロバクターを殺菌することが可能であることがわかった。この結果は鶏皮上のファージによるカンピロバクターの溶菌がファージの増殖によるものではなく、外因性溶菌 ; LO (Lysis from without) によるものであることを示唆しており、カンピロバクター制御効果を向上させるためには高濃度のファージを接種する必要性があることが考えられた

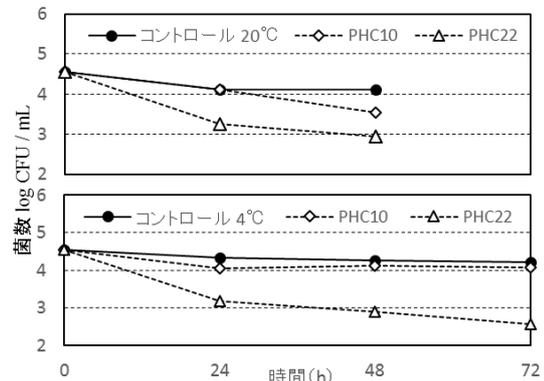


図5. ファージを接種した鶏皮における 20°C または 4°C 保存中の *C. jejuni* L26 の菌数変化

## 保存形態

ファージ接種後の効果的な鶏肉の保存形態を明らかにするため、ファージ接種後の保存形態を変えて生残菌数を比較した。ファージは制御効果を向上させるため MOI<sup>10</sup> となるように接種して保存温度は 4℃ に設定した。

図 6 にファージ PHC22 を接種後、4℃ で好気条件または真空パック条件で保存中の *C. jejuni* の菌数変化を示す。コントロールでは好気条件と真空パック条件では、ほとんど菌数に差が見られなかった。ファージを接種した検体では、1 時間後にはコントロールと比較して好気条件で 1 桁程度、真空パック条件で 2 桁程度菌数が減少した。

以上の結果からファージを使用した鶏肉のカンピロバクター制御法として、高濃度のファージを接種後、真空パックで 4℃ (冷蔵) 保存する方法がカンピロバクターの制御と鶏肉の品質保持の両面から有効な方法であることが考えられた。

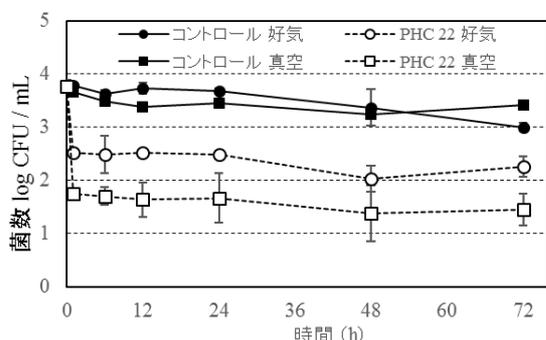


図6. ファージを接種した鶏皮における4℃保存中の *C. jejuni* L26 の菌数変化

また、ファージ PHC10 についても MOI が 10<sup>3</sup> になるように接種後、4℃ の好気条件で保存した場合、ファージ PHC22 と比較すると若干殺菌効果は低かったが 1 時間後にはコントロールよりも菌数が減少することが確認された。したがって、溶菌スペクトルの広いファージ PHC10 および溶菌力の強いファージ PHC22 は、カンピロバクター制御材として有効なファージであることがわかった。

本研究によって、増菌法による効率的なファージ分離法やファージを用いたカンピロバクター制御法の有効性を見出すことができた。今後はさらに制御効果を向上させる条件を検討していく。また、ファージは鶏肉などの食品だけでなく、鶏に直接投与してカンピロバクター感染を低減する抗菌性生物剤としての応用や特異性を利用した食品からのカンピロバクター検出法・同定法開発への展開も期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

古田 宗宜、奈須 敬之、Hoang Minh Duc、梅木 晃一、本城 賢一、宮本 敬久、鶏肉および鶏内蔵から分離された *Campylobacter jejuni* における Random

Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法および自動化リボタイピング法による遺伝子型別、日本防菌防黴学会誌、査読有、44 巻、2016、515-519

〔学会発表〕(計 4 件)

奈須 敬之、古田 宗宜、Hoang Minh Duc、本城 賢一、宮本 敬久、カンピロバクター特異的バクテリオファージの分離と利用に関する研究、日本防菌防黴学会 第 43 回年次大会、2016 年 9 月 27 日、きゅりあん (東京)

奈須 敬之、古田 宗宜、Hoang Minh Duc、本城 賢一、宮本 敬久、カンピロバクター特異的バクテリオファージの分離と利用に関する研究、平成 27 年度 (公社) 日本栄養・食料学会九州・沖縄支部および (公社) 日本食品科学工学会西日本支部合同大会、2015 年 10 月 31 日、沖縄市町村自治会館 (沖縄)

Munenori Furuta, Takayuki Nasu, Hoang Minh Duc, Kenichi Honjoh, Takahisa Miyamoto, Characterization of *Campylobacter* Bacteriophages Isolated from Chicken Samples, International Association for Food Protection: 2015. 7. 28、Oregon Convention Center (Oregon)

古田 宗宜、梅木 晃一、Hoang Minh Duc、小田 隆弘、本城 賢一、宮本 敬久、カンピロバクター特異的ファージの分離とその性質、日本防菌防黴学会 第 41 回年次大会、2014 年 9 月 25 日、きゅりあん (東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (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

古田 宗宜 (FURUTA MUNENORI)  
中村学園大学短期大学部・食物栄養学科・講師  
研究者番号: 00343731

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

宮本 敬久 (MIYAMOTO TAKAHISA)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 70198160

(4) 研究協力者 なし