

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K02249

研究課題名（和文）ファージを用いたカンピロバクター ジェジュニ/コリの制御法に関する研究

研究課題名（英文）Study on the control of *Campylobacter jejuni/coli* using phages

研究代表者

古田 宗宜 (Furuta, Munenori)

中村学園大学・栄養科学部・准教授

研究者番号：00343731

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、カンピロバクター溶菌ファージを利用して、鶏肉の*C. jejuni*と*C. coli*を制御する方法について検討した。鶏肝および豚肉から*C. coli*に対する溶菌スペクトルが広い*C. coli*溶菌ファージが複数株分離された。そのうち、ファージPHCcc33-3とファージPHCcc142-6は、4℃で真空パック保存中の鶏皮の*C. coli*数を1～2桁減少させた。これらファージと*C. jejuni*溶菌ファージPHC 10をミックスした溶液は、4℃で真空パック保存中の鶏皮の*C. jejuni*および*C. coli*数を1桁減少させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義や社会的意義は、ファージを利用する実用的なカンピロバクター非加熱制御法の構築につながることである。制御材として利用するファージは、国内に汚染している*C. jejuni*および*C. coli*に対して有効なファージでなければならぬため、国内の食品などからファージを分離して使用する必要がある。国産鶏肉の*C. jejuni*および*C. coli*の汚染率を下げることであれば、わが国のカンピロバクター食中毒のリスクの低減に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the use of *Campylobacter* lytic phages to control *C. jejuni* and *C. coli* in chicken meat. Several phages with a broad lytic spectrum against *C. coli* were isolated from chicken liver and pork. Of these, phages PHCcc33-3 and PHCcc142-6 reduced *C. coli* counts on chicken skin by 1～2 orders of magnitude during vacuum-packed storage at 4°C. A mixed solution of phage PHCcc33-3, phage PHCcc142-6, and *C. jejuni* lytic phage PHC 10 was able to reduce by one orders of magnitude the numbers of *C. jejuni* and *C. coli* on chicken skin during vacuum-packed storage at 4°C.

研究分野：食品衛生学、食品微生物学

キーワード：バクテリオファージ カンピロバクター制御 カンピロバクター コリ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カンピロバクターは、先進国または開発途上国に関わらず世界各国で主要な食中毒の原因菌として重要視されている。カンピロバクター食中毒の主な原因菌種は、カンピロバクター ジェジュニ（以下、*C. jejuni*と略す）およびカンピロバクター コリ（*C. coli*と略す）であり、家畜、家禽、伴侶動物および野生動物などの腸管内に広く存在している。我が国でもカンピロバクター食中毒は、細菌性食中毒の中で最も多く発生しており、なかなか減少しない状況が続いている。カンピロバクター食中毒の主な原因食品は、加熱または加熱不十分の鶏肉とその内臓であり、市販鶏肉はカンピロバクターに高率に汚染されている。これは、食鳥処理場での脱羽および内臓除去の工程などで腸内容物が漏出し、と体や鶏肉製品に汚染が広がるためであると考えられている。カンピロバクター食中毒を減少させるためには、市販鶏肉のカンピロバクター汚染率を低減させることが重要であり、非加熱で実用的なカンピロバクター制御法の開発が早急な課題となっている。

### 2. 研究の目的

研究の目的は、カンピロバクター食中毒低減のため、主な原因食品である鶏肉中の *C. jejuni* および *C. coli* の制御法を構築することである。諸外国では、食品微生物制御におけるバクテリオファージ（ファージ）の利用が広まりつつあり、食品中のリステリア菌、サルモネラ属菌および大腸菌 O157 の制御剤として、ファージ製剤の利用が認められている国がある。本研究では、カンピロバクター食中毒リスクの低減のため、カンピロバクターに対して感染し溶菌するファージを利用した制御法を構築することを目指す。わが国と海外では、分離される *C. jejuni* 株および *C. coli* 株の遺伝学的な性質やファージに対する感受性は異なることが予想される。そのため、国産の食品や環境から分離されたカンピロバクター株に対して有効なファージを制御剤として利用することが必要である。そこで、まず、鶏肉などから *C. coli* を溶菌するファージを分離し、性状解析を行い、国内で分離された *C. coli* 株に対して広い溶菌スペクトルを持つなどの *C. coli* 制御剤として有効なファージを選択する。選択したファージとこれまでに研究室で分離・保存している *C. jejuni* 制御に有効なファージを組み合わせ、鶏肉類の *C. jejuni* および *C. coli* の両菌種をターゲットとした制御法の構築を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 市販鶏肉および豚肉類からの *C. coli* の検出

市販鶏肉類 164 検体（肝 73 検体、皮 13 検体、肉 78 検体）からの *C. coli* の分離は、直接分離法、プレストンまたはプレストン ISO 処方培地による増菌培養法および直接分離法と増菌培養法を併用した併用法のいずれかで行った。直接分離法は、検体に滅菌生理食塩水を加えストマッカー処理後、0.1mL をバツラー平板上に塗抹し 42 で 48 時間微好気培養後、生じたカンピロバクター様コロニーについて、常法によって *C. coli* を同定した。増菌培養法は検体にプレストンまたはプレストン ISO 処方培地を加えストマッカー処理し 42 で 48 時間微好気培養後、バツラー平板培地に塗抹して直接法と同様に *C. coli* を同定した。併用法は直接分離法と増菌培養法の両方を併用して行った。市販豚肉類 53 検体（ホルモン 6 検体、肝 3 検体、肉 34 検体）からの *C. coli* の検出は、プレストン ISO 処方培地を用いた増菌培養法によって行った。

#### (2) 市販鶏肝および豚ホルモンからの *C. coli* 溶菌ファージの検出

検体に 1mM CaCl<sub>2</sub>、10mM MgSO<sub>4</sub> 添加プレストン ISO 処方培地を加えストマッカー処理後、ホスト菌として *C. coli* 10 株を接種し袋上部を密栓して 42 で 24 時間培養後、培養液の遠心分離上清（12000g、4、5 分）をフィルターろ過して得たる液をファージ試験液としてファージの検出を行った。ファージ試験液からのファージの検出は、各ホスト菌を重層した NZCYM 培地上にファージ試験液 10μL を滴下して 42 で 24 時間微好気培養後、透明帯の有無によって溶菌ファージの存在を判定した。透明帯部分を SM バッファーに回収しファージ懸濁液とし、段階希釈液とホスト菌液を NZCYM 培地に重層（重層法）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。これを 3 回繰り返してファージを純化し、ファージ液として 4 で保存した。また、ファージの力価を高めるため、重層法で微好気培養後に表面全体が溶菌した重層培地上に SM バッファーを添加し、4 で保存した後、SM バッファーを回収しフィルターろ過することによって、ファージの力価を高めた。ファージ数の測定は、ファージ液を SM バッファーで段階希釈した後、各段階希釈液 100μL にホスト菌液 200μL を加えて、重層法を行い 42 で 24 時間微好気培養後、培地上に生じたプラーク数から算出した。

#### (3) ファージの性質解析 溶菌スペクトル

溶菌スペクトルの検査には、鶏由来の *C. coli* 22 株および *C. jejuni* 1 株の合計 23 株、または *C. coli* 23 株（鶏由来 16 株、豚由来 7 株）および *C. jejuni* 5 株（鶏由来）の合計 28 株を用い

た。溶菌スペクトルの検査方法は、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 10 $\mu$ L をスポットし、**42** で **24** 時間好気培養後、溶菌反応の有無によって調べた。

#### (4) ファージの性質解析 培養液中におけるファージのカンピロバクター制御効果

カンピロバクター菌液を接種後、ファージ液を添加した後、**42** で好気培養して経時的に生菌数を測定した。菌数測定は、培養液の段階希釈液 **0.1mL** を血液寒天培地に塗抹し、**42** で **48** 時間好気培養後、生じたコロニー数を計測した。

#### (5) ファージを用いた市販鶏皮におけるカンピロバクター制御効果

鶏皮は、3 cm $\times$ 3 cm (**9 cm<sup>2</sup>**) にカットして用いた。カットした鶏皮にカンピロバクター菌液 (*C. coli* **142** のみ、または *C. coli* **142** と *C. jejuni* **L26**) を接種後、室温で静置した後、ファージ液を添加してさらに室温で静置した。その後、真空パック器を使用して個別に真空包装した後、**4** で **48** 時間保存し経時的にカンピロバクター生菌数を測定した。カンピロバクターの生菌数は、バツラー平板寒天培地を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 市販鶏肉類からの *C. coli* および *C. coli* 溶菌ファージの検出

*C. coli* 溶菌ファージの分離や溶菌スペクトルの検査に使用するため、市販鶏肉類 **164** 検体から *C. coli* の検出を行った。その結果、直接法で行った **63** 検体からは **1** 検体、増菌法で行った **59** 検体からは **6** 検体、併用法で行った **42** 検体からは **7** 検体の合計 **14** 検体 (**8.7%**) から *C. coli* が検出された。各検体から分離された *C. coli* **14** 株は、ファージの検出や溶菌スペクトル検査へ利用するまで、**-80** で保存した。次に市販鶏肝から *C. coli* 溶菌ファージの分離を行った。*C. coli* 溶菌ファージの分離は、これまでの研究で *C. jejuni* 溶菌ファージの分離に効果的であった増菌法を基に行った。ホスト菌として、市販鶏肉類から分離された *C. coli* **14** 株のうち **8** 株と研究室保存の鶏由来 *C. coli* **2** 株の合計 **10** 株を使用し、市販鶏肝 **19** 検体からファージの検出を行った。その結果、**19** 検体中 **3** 検体から **4** 株の *C. coli* 溶菌ファージが分離された。分離されたファージ **4** 株のうち **2** 株は *C. coli* **P76** をホスト菌として分離され、残り **2** 株は *C. coli* **142** をホスト菌として分離された。これらのファージは、**SM** バッファー中で冷蔵保存した。いずれのファージ溶液も力価は **10<sup>7</sup>** 台 **PFU/mL** であった。

#### (2) *C. coli* 溶菌ファージ分離株 **4** 株の性状解析

はじめに溶菌スペクトル検査を行った。その結果、いずれのファージも溶菌反応を示したのは、各ファージが検出されたそれぞれのホスト菌 **1** 株のみであった。また、ファージ **1** 株は冷蔵保存中に検出されなくなり、以降の検査はできなくなった。次に培養液中におけるファージの *C. coli* の制御効果について調べた。その結果、最も溶菌効果が高かったファージでも、ファージ未接種と比較して、**10** 時間後に **1** 桁程度菌数が低い程度であり、**24** 時間後には、ファージ未接種と同程度まで菌数が増加し、十分な制御効果は認められなかった。これらの結果から、いずれのファージも溶菌スペクトルが狭く、溶菌力も弱いうえに冷蔵保存中にファージ液の力価が低下しやすいことなどもあり、*C. coli* 制御材として適していないと判断した。そこで新たに *C. coli* 溶菌ファージの検出を行った。

#### (3) 市販豚肉類からの *C. coli* の検出

*C. coli* 溶菌ファージの分離に新たにホスト菌として使用する、または、溶菌スペクトル検査に使用する *C. coli* 株を得るため、市販豚肉類 **53** 検体について *C. coli* の検出を行った。その結果、**53** 検体中 **7** 検体 (**20.6%**) から *C. coli* が検出された。特にホルモンは、検査した **6** 検体中すべての検体から *C. coli* が検出された。各検体から分離された *C. coli* **7** 株は、その後の検査に使用するまで **-80** で保存した。

#### (4) 市販鶏肝および豚ホルモンからの *C. coli* 溶菌ファージの検出

市販豚肉類から分離された *C. coli* **7** 株のうち **4** 株と鶏由来株 **6** 株を合わせた **10** 株をホスト菌として使用し、市販鶏肝および豚ホルモンから *C. coli* 溶菌ファージの検出を行った結果を表 **1** に示す。市販鶏肝および豚ホルモン **10** 検体中全ての検体から *C. coli* 溶菌ファージが検出され合計 **35** 株の *C. coli* 溶菌ファージが分離された。このうち、**14** 株を選択して **SM** バッファー中で冷蔵保存した。また、ファージ液の力価を高めるためにファージの増幅を行った結果、**10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>** 台 **PFU/mL** と高い力価のファージ液が得られた。次にこれらのファージについて性状解析を行った。

表1. 市販鶏肝および豚ホルモンから *C. coli* 溶菌ファージの検出

検体 番号	検体	ホスト菌株									
		P76	142	33	56	74	149	CB2	CB20	CB24	CB29
1	豚ホルモン	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2	鶏肝	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	豚ホルモン	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
4	鶏肝	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
5	鶏肝	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
6	豚ホルモン	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
7	鶏肝	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
8	鶏肝	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
9	鶏肝	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
10	鶏肝	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

#### (5) 分離された *C. coli* 溶菌ファージ 14 株の性状解析

新たに分離されたファージについて、その性状解析のため、溶菌スペクトル検査を行った。はじめに *C. coli* 23 株（鶏由来 16 株、豚由来 7 株）に対して実施し、その結果によってさらに *C. jejuni* 5 株（鶏由来）に対しても追加実験を行った。表 2 に *C. coli* 23 株に対する溶菌スペクトルの結果を示す。ファージによって溶菌スペクトルに差が見られ、ファージ 14 株のうち、3 株（PHCcc142-6、PHCcc33-3 および PHCcc33-6）は、検査に使用した *C. coli* 23 株すべてに対して溶菌反応を示した。これら 3 株に 50% 以上の溶菌スペクトルを示した 3 株を加えた計 6 株については、*C. jejuni* 5 株に対する溶菌スペクトル検査を追加で実施した。その結果、ファージ PHCcc33-3 は、*C. jejuni* 5 株のうち 4 株に対しても溶菌反応を示した。その他のファージは、*C. jejuni* 5 株のうち 1~2 株に対して溶菌反応を示した。次に、広い溶菌スペクトルを示したファージ 5 株について、培養液中での *C. coli* 142 に対するファージの制御効果について調べた。その結果、単独でも複数のファージを組み合わせても 8 時間後にファージ未接種と比較して、1 桁程度菌数が低い程度であり、24 時間後には、ファージ未接種と同程度まで菌数が増加し、培養液中では十分な制御効果は認められなかった。

表2. *C. coli* 23株に対する溶菌スペクトル

保存ファージ株	溶菌株数	溶菌率 (%)
PHCcc142-1	1	4.3
PHCcc142-2	1	4.3
PHCcc142-3	19	82.6
PHCcc142-4	1	4.3
PHCcc142-5	1	4.3
PHCcc142-6	23	100
PHCcc142-7	4	17.4
PHCcc142-8	13	56.5
PHCcc142-9	20	87.0
PHCcc 33-3	23	100
PHCcc 33-6	23	100
PHCccP76-5	1	4.3
PHCccP76-6	2	8.7
PHCccP76-7	2	8.7

#### (6) ファージを用いた市販鶏皮におけるカンピロバクター制御効果

はじめに鶏肉中の *C. coli* に対するファージの制御効果を明らかにするため、広い溶菌スペクトルを示したファージ PHCcc142-6 およびファージ PHCcc33-3 を使用して、*C. coli* 制御効果を調べた。図 1 に鶏皮に *C. coli* 142 を接種後、ファージ PHCcc142-6 またはファージ PHCcc33-3 を接種し、4 で真空パック条件で保存した *C. coli* の菌数変化を示す。ファージ PHCcc33-3 を接種後、1 時間後には *C. coli* 菌数が 2 桁程度減少し、48 時間後まで同等の制御効果であった。ファージ PHCcc142-6 を接種した場合でも 1 時間後には、*C. coli* 菌数が 1 桁程度減少し、48 時間後まで同等の制御効果が継続した。次に鶏肉中の *C. jejuni* および *C. coli* の両菌種をターゲットとしたファージの制御効果を明らかにするため、ファージ PHCcc142-6 およびファージ PHCcc33-3 と研究室保存株の *C. jejuni* に対して広い溶菌スペクトルを持つ *C. jejuni* 溶菌ファージ PHC10 の 3 株を混合したファージ混合液を使用して、*C. jejuni* および *C. coli* を接種した鶏皮中のカンピロバクター制御効果を調べた。図 2 に鶏皮に *C. jejuni* L26 および *C. coli* 142 を接種後、ファージ混合液を接種し、4 で真空パック条件で保存したカンピロバクターの菌数変化を示す。ファージ混合液を接種した場合、1 時間後には、カンピロバクター菌数は 1 桁程度減少した。その後 48 時間後までファージ未接種の真空パック保存のものよりも 1 桁程度菌数は低い結果であった。

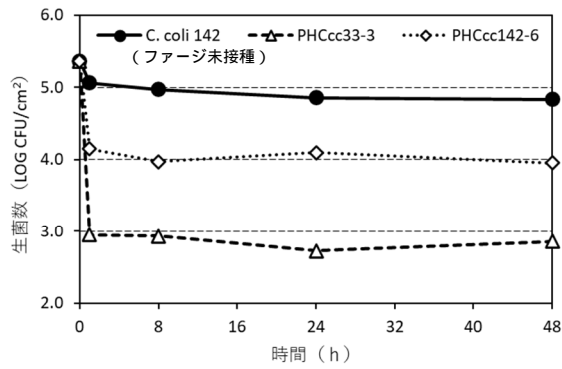


図1. ファージを接種した鶏皮における4°C真空パック保存中の*C. coli*の菌数変化

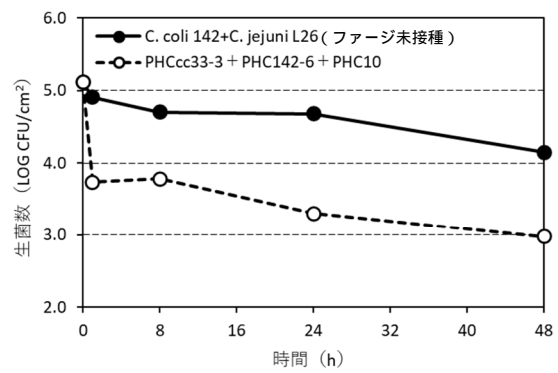


図2. 3種類のファージを接種した鶏皮における4°C真空パック保存中の*C. jejuni* および*C. coli*の菌数変化

以上の結果から、*C. jejuni* 溶菌ファージと *C. coli* 溶菌ファージを混ぜたファージ混合液を接種し真空パックで冷蔵保存する方法は、*C. jejuni* または *C. coli* のどちらかに汚染されている場合や両方に汚染されている食肉に対しても有効な制御法となりうることがわかった。今後、*C. jejuni* 溶菌ファージと *C. coli* 溶菌ファージの使用条件を詳細に検討し、*C. jejuni* および *C. coli* に対する制御効果を向上させることができれば、将来的に *C. jejuni* および *C. coli* の両菌の汚染を減らすことが可能となり、カンピロバクター食中毒の低減につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古田 宗宜、本城 賢一、宮本 敬久
2. 発表標題 市販鶏肉類からのCampylobacter coli特異的溶菌ファージの分離
3. 学会等名 第40回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------