



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect <i>Campylobacter</i> in twenty-five grams of chicken meat( 内容と審査の要旨(Summary) )
Author(s)	林, 将大
Report No.(Doctoral Degree)	博士(再生医科学) 乙第1471号
Issue Date	2013-09-11
Type	博士論文
Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/47819">http://hdl.handle.net/20.500.12099/47819</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	林 将 大（岐阜県）
学位の種類	博 士（再生医科学）
学位授与番号	乙第 1471 号
学位授与日付	平成 25 年 9 月 11 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect <i>Campylobacter</i> in twenty-five grams of chicken meat
審査委員	（主査）清 島 満 教授 （副査）前 川 洋 一 教授 （副査）出 口 隆 教授

### 論文内容の要旨

*Campylobacter* による食中毒は全体の 3 割を占める重要な疾病であるが、わが国では公定法が示されていない。*Campylobacter* 属菌は、家畜、家禽、伴侶動物および野生動物の腸管内に広く分布し、本菌に汚染された食肉、特に食鳥肉の生食、加熱不足での喫食あるいは二次汚染等が食中毒の発生源要因となっている。2013 年現在、25 菌種登録されている *Campylobacter* 属菌のうち、*C. jejuni* および *C. coli* がヒトの主要な食中毒原因菌を占めている。

*Campylobacter* は、他の食中毒原因菌と比較して人工培地上での発育が遅く、増菌培養には血液が添加された培地を必要とし、検出・同定までに約一週間を必要とする。また、*Campylobacter* の培養には炭酸ガスを加えた微好気の特異的な環境を必要とすることも検査の障害となっている。鶏は *Campylobacter* に高度に汚染されており、食中毒予防のためには、食肉処理場において陽性検体を特定し、食肉として流通する前に生産現場の段階で排除することが極めて重要である。そのため、迅速・簡便かつ精度の高い *Campylobacter* の検査法の開発が急務であった。

そこで本研究では、*Campylobacter* の増菌培養を溶血液無添加かつ好気培養が可能な培地をデザインし Food Pathogen Enrichment 培地（以下 FPE 培地）と命名した。本培地と迅速な検査が可能な遺伝子検査法を組み合わせ、新たな検査プロトコルを構築した。このプロトコルを用いて、従来法では一週間かかる検査工程を検査開始から翌日で終了する新たな検査法を提案した。新検査法と従来法を市場の鶏肉で検証した結果、新検査法では市場の新鮮鶏肉の *Campylobacter* の汚染が 80 % であったのに対し、国際的に使用されている従来法では 18 % と新しい検査法の有用性を実証することができた。

#### 【対象と方法】

##### 新規培地と既存培地の比較

FPE 培地および従来法で頻用される 2 種類の既存増菌培地を用いて *Campylobacter* の発育速度を比較した。FPE 培地による増菌培養法は FPE ブイヨン 225ml を 500ml 容積のポリプロピレンボトルに入れ、そこに 25g の鶏肉をいれて、密栓し、24 時間の振とう培養を行って従来法と比較した。

##### 新規検査プロトコルと従来法の比較

FPE 培地による増菌法および Real-time PCR 法を組み合わせた新しい検査プロトコルを検証した。

本法の検出限界を測定するため、倍数希釈した希釈菌液を鶏肉に添加し、新規検査プロトコールと国際的な標準プロトコールの検出限界を比較した。また、*Campylobacter* は凍結ストレスに弱いため、凍結した鶏肉から *Campylobacter* を検出する方法についても両手法で比較した。

市販鶏肉の汚染調査および従来法との比較

市販鶏肉を用いて新規検査プロトコールと従来法の比較を実施し、開発した増菌培地と遺伝子検査の有効性を検証した。

#### 【結果および考察】

FPE 培地は、既存増菌培地である Bolton 培地や Preston 培地と同等の発育支持性能を示した。本研究において構築した新規検査プロトコールは、雑菌除菌処理した鶏肉を使った場合、*C. jejuni* および *C. coli* とともに 25 g あたり  $5.8 \sim 1.1 \times 10^1$  CFU の検出感度があった。これは同時に実施した Bolton 培地を用いた従来法と同等の感度があった。凍結ストレスを与えた群でも、25 g あたり  $9.9 \times 10^1 \sim 2.0 \times 10^2$  CFU と検出感度に低下が認められるものの、これも従来法と同等の結果を示した。

一方、市販食肉材料から *Campylobacter* の検出を比較した。従来法の 9 件 (18 %) と明らかに違いがあった。FPE 培地によって *Campylobacter* 陽性と判定された 40 件の内、39 件からは分離培養でも *Campylobacter* を検出することができた。

Bolton 培地では、多剤耐性の ESBL 産生 *Escherichia coli* が多く検出されたのに対し、FPE 培地は polymyxin B および rifampicin が添加されており、これら 2 剤の添加により ESBL 産生 *E. coli* の発育が阻害されたことが分かった。

#### 【結論】

炭酸ガスと血液が不要な新規 FPE 培地を使って増菌し、Real-time PCR 法を組み合わせた *Campylobacter* の新規検査プロトコールは、従来法に比べて短時間かつ高感度に *Campylobacter* を検出した。この新規プロトコールは、食材から *Campylobacter* を検出する手法として従来法に代わる有効な手段であることを実証した。

### 論文審査の結果の要旨

申請者林将大は *Campylobacter* の汚染検査のために新規培地と遺伝子検査を組み合わせた新しいプロトコールを作成し、従来法に比べて短時間かつ高感度に *Campylobacter* を検出することを示し、その有用性を実証した。本研究成果は細菌学に重要な貢献をしたものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Masahiro Hayashi, Sayoko Kubota-Hayashi, Tatsuya Natori, Takuya Mizuno, Machiko Miyata, Shigeru Yoshida, Jiwei Zhang, Keiko Kawamoto, Kiyofumi Ohkusu, Souichi Makino, Takayuki Ezaki: Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat  
International Journal of Food Microbiology 163, 41-46 (2013)