

Study on the isolation and characterization of *Clostridium perfringens* and its biocontrol by phages

ノア, モハマディ, タヒル

<https://hdl.handle.net/2324/5068275>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏名	ノア モハマディ タヒル (Noor Mohammadi Tahir)			
論文名	Study on the isolation and characterization of <i>Clostridium perfringens</i> and its biocontrol by phages (ウエルシュ菌の分離、同定とファージによるバイオコントロールに関する研究)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	宮本敬久
	副査	九州大学	教授	土居克実
	副査	九州大学	准教授	本城賢一

論文審査の結果の要旨

Clostridium perfringens (ウエルシュ菌) は、グラム陽性の芽胞形成細菌で、動物の大腸内や自然界に広く分布する食中毒細菌である。本研究では、鶏肉における本菌汚染状況を調べるとともに鶏肉から単離したウエルシュ菌特異的なファージの特性を詳細に評価し、その利用について検討したものである。

まず、福岡市内の小売店から購入した 53 検体の鶏肉のうち 19 検体 (36%) から従来法によりウエルシュ菌を検出し、19 株を分離している。これらの菌株はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法により、すべて異なるウエルシュ菌株であることを明らかにしている。毒素遺伝子の PCR 検査の結果、分離された 19 株は、すべてエンテロトキシン遺伝子陰性、アルファ毒素遺伝子陽性であり、A 型菌であることを確認している。

次に、福岡市内の小売店から購入した 73 検体の鶏肉を試料とし、ウエルシュ菌標準株および分離したウエルシュ菌株の混合菌液を宿主菌液として用いて 6 株のウエルシュ菌特異的ファージの単離に成功している。異なるウエルシュ菌 25 株に対する溶菌活性を調べた結果、ファージ CPQ1 は最も広い宿主域を示し、耐熱性も高いことを明らかにしている。さらに形態学的、生化学的および遺伝学的解析の結果、CPQ1 はポドウイルス科のポドウイルス亜科に属し、ゲノムは 18,535 bp の直鎖状二本鎖 DNA で抗生物質耐性、毒素および病原性遺伝子を含まないこと、平均潜伏期間は 50 分、平均バーストサイズは 6,500 plaque-forming unit であることを明らかにしている。ウエルシュ菌で人為的に汚染させた低温殺菌牛乳と鶏肉において、24°Cでのファージ CPQ1 の添加によりウエルシュ菌生菌数がそれぞれ 2 log および 1.2 log と有意に減少することを明らかにしており、これは食品のウエルシュ菌制御におけるファージの有効性を初めて示したものである。

さらにファージによるウエルシュ菌制御の実用化を目指し、鶏肉 32 検体から新たに 4 株のウエルシュ菌溶菌ファージを単離している。単離したファージ合計 10 株の宿主域を比較し、異なる宿主域を有するファージ CPQ3、4、7、8、9 および 10 について様々な組み合わせでファージカクテルを調製してウエルシュ菌制御について検討している。その結果、CPQ3、7、8 および 10 の 4 株のファージの組み合わせが最も強い溶菌活性を示し、8 および 37°Cにおいて培地中でウエルシュ菌の生菌数を 4 時間後には 4 log 以上減少させ、48 時間後でも耐性菌の再増殖を完全に抑制することを明らかにしている。これら 4 株のファージは、すべてポドウイルス科のポドウイルス亜科に属し、約 18 kbp の直鎖状二本鎖 DNA ゲノムを有するファージで、抗生物質耐性、毒素および病原性遺伝子を含まないことを明らかにしている。最後に、ウエルシュ菌で人為的に汚染させた市販レトルトカレーを用いて調べた結果、本ファージカクテルの添加は 24°Cにおいて生菌数

を 4 log 以上減少させ、この後 48 時間完全にウエルシュ菌の増殖を抑制したことから、本ファージカクテルは高い実用性を有することを明らかにしている。

以上要するに、本研究は、鶏肉におけるウエルシュ菌汚染状況を調べるとともに本菌特異的なファージを単離して特性を解明し、食品中でのウエルシュ菌制御におけるファージ単独およびファージカクテルの有効性を明らかにしたもので、食品衛生化学および食品微生物学の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。