

Erysipelothrix 属菌の D 値に関する研究

Study of the D-values of Erysipelothrix spp

アレシャンドレ トモミツ オカタニ¹, 森田英利¹, 加藤行男¹, 林谷秀樹²

麻布大学獣医学部

Alexandre T. Okatani¹, Hidetoshi Morita¹, Yukio Kato¹, Hideki Hayashidani²

¹ School of Veterinary Medicine, Azabu University, ² Tokyo University of Agriculture and Technology

Abstract. Abstract. We studied the thermo-resistance of *E. rhusiopathiae* serovar 2 (strain A), *E. tonsillarum* serovar 7 (strain B), *Erysipelothrix* spp. serovar 13 (strain C), and serovar 18 (strain D), *E. rhusiopathiae* serovar N (strain E), and strains which the serovars could not be determined by the usual method but could be determined as *E. rhusiopathiae* (strains F and G), and determined as *Erysipelothrix* spp. serovar 13 (strains H and I) by PCR, and, determined the D-values according to the grown temperature. Strains D, and F to I, which lack the heat stable antigen or which the serovar could not be determined, showed higher D-values when grown at 37 °C than when the same strains grown at 25 °C, while the strains having the heat stable antigen (A to C) did not show any significant differences. Strains of *Erysipelothrix* spp serovar 13 (C, H and I) showed D-values from 2.3 to 9.6 min, which was higher than those of strains A, B, D, E, F, and G which showed D-values from 0.6 to 1.7 min. Thus, the thermo-resistance of *Erysipelothrix* spp. might depend on the serovar, and also, it might be considered that heat stable antigens might be involved in the heat resistance of strains of this genus.

1. 目的

Erysipelothrix 属菌は、人では類丹毒を、豚では豚丹毒を引き起こす代表的な人獣共通感染症の原因菌として知られている。本菌は豚においては、急性型の敗血症、亜急性型の蕁麻疹、慢性型の心内膜炎や関節炎を引き起こし、家畜の届出伝染病に指定されている。本菌による人の感染は、獣医師、と畜場従業員、食肉取り扱い者や漁師など、動物や動物由来食品を取り扱う業種に多く、職病的要素を持つ (1)。しかし、近年、市販豚肉、市販鶏肉、市販魚介類および市販狩猟動物肉が本菌によって高率に汚染されていることが報告され、これら食品を介して一般消費者への感染が危惧されている (1, 2, 3)。

食品の安全性を守るための食品の殺菌処理法の一

つとして、加熱処理は広く用いられる方法である。しかし、その効力は殺菌の対象となる細菌の熱抵抗力に左右される。また、細菌の熱抵抗性は培養温度、培養時間、pHなど多くの要因の影響を受けることが知られている。

以上のことから、本研究では、*Erysipelothrix* 属菌の D 値を算出し、菌種による熱抵抗性の違いおよび培養温度が各菌株の熱抵抗性に与える影響を検討した。

2. 材料と方法

供試菌株として *E. rhusiopathiae* ATCC19414 (血清型 2 型, 以下菌株 A), *E. tonsillarum* ATCC43339 (血清型 7 型, 以下菌株 B), *Erysipelothrix* spp. Pécs56 (血清型 13 型, 以下菌株 C), *Erysipelothrix* spp. 715

Table 1. *Erysipelothrix* spp. strains used for determining the D-values

Strain	Serovar	Species
A	2	<i>E. rhusiopathiae</i>
B	7	<i>E. tonsillarum</i>
C	13	<i>Erysipelothrix</i> spp.
D	18	<i>Erysipelothrix</i> spp.
E	N ^a	<i>E. rhusiopathiae</i>
F	UT ^b	<i>E. rhusiopathiae</i>
G	UT ^b	<i>E. rhusiopathiae</i>
H	13 ^c	<i>Erysipelothrix</i> spp.
I	13 ^c	<i>Erysipelothrix</i> spp.

^a: Strain lacking the heat-stable antigen

^b: Strains untypable by the gel double-diffusion test, but identified as *E. rhusiopathiae* by the primers developed by Takeshi et al. (J. Clin. Microbiol. 37:4093-4098, 1999)

^c: Strains untypable by the gel double-diffusion test, but identified as *Erysipelothrix* spp. serovar 13 by the primers developed by Takeshi et al. (J. Clin. Microbiol. 37: 4093-4098, 1999)

(血清型 18 型, 以下菌株 D), 耐熱性抗原を持たない *E. rhusiopathiae* MEW-22 (血清型 N 型, 以下菌株 E), 鶏肉 (皮膚) や鶏の羽から分離され, 寒天ゲル内沈降反応による抗原抗体反応が得られなかったが, PCR 法 (4) では *E. rhusiopathiae* と同定された菌株 F および G, および *Erysipelothrix* spp. 血清型 13 型と同定された菌株 H および I の計 9 菌株を用いた (表 1)。

熱抵抗性試験は, 各菌株を tryptose phosphate broth (以下 TPB) に接種し, 25 °C および 37 °C の異なる 2 つの培養温度でそれぞれ定常期に達するまで培養した菌を用いた。定常期に達した直後の菌液 1 ml を密封容器に無菌的に分注し, 52 °C に調整した恒温槽の温水中に入れ, 菌液の温度が 52 °C に達した時点, ならびにそれ以後一定時間毎に容器を取り出し, 直ちに氷水中で冷却した。

菌数の測定は, 加熱処理後に氷冷した菌液を PBS

で 10 倍段階希釈し, 各段階の希釈液 0.1 ml を Tween80 0.1 % および寒天 1.5 % 加 tryptose phosphate broth 寒天平板培地 (以下 TBP 寒天培地) に塗抹し, 37 °C で 48 時間培養し, 測定した。

D 値の算出は, 生存菌数の対数と加熱時間とで描かれる生存菌数曲線の傾きから菌数が 1/10 に減少する時間 (分) を計算し, 算出した。

3. 結果と考察

供試した *Erysipelothrix* 属菌株の 52 °C における D 値を表 2 に記した。供試した菌株を 25 °C で培養した場合, A 株, B 株, C 株ならびに D 株の D 値はそれぞれ 1.1, 1.4, 2.6 および 1.1 であった。同じ菌株を 37 °C で培養した場合, D 値はそれぞれ 1.3, 1.3, 2.3 および 1.3 で, いずれの菌株においても培養温度による D 値の変動に有意差は認められなかった。しかし, 耐熱性高原を欠く E 株, および血清型別不能菌株の F 株, G 株, H 株および I 株を 25 °C で培養した場合の D 値は, それぞれ 0.9, 0.6, 0.7, 3.5 および 4.0 であったのに対し, 37 °C で培養した場合の D 値は, それぞれ 1.7, 1.2, 1.6, 8.0 および 9.6 で, いずれの菌株においても 25 °C で培養した時の D 値に比べて有意に高かった (P < 0.05)。

培養温度別に見ると, 25 °C で培養した場合には, PCR 法で *E. rhusiopathiae* に同定された血清型別不能菌株 F 株および G 株の D 値は E 株以外のすべての菌株よりも低く, 37 °C では F 株がその他の菌株の D 値よりも低かったが, いずれの温度においても C 株, H 株および I 株以外とは大きな差は認められなかった。逆に, 血清型 13 型の C 株および PCR で血清型 13 型と同定された H 株および I 株の D 値は 25 °C および 37 °C のいずれの培養温度においても, その他の菌

Table 2. D-values of the *Erysipelothrix* strains at 52 °C

Grown temperature, °C	Strain ^a									
	A (2)	B (7)	C (13)	D (18)	E (N ^b)	F (UT ^c)	G (UT ^c)	H (13 ^d)	I (13 ^d)	
25	1.1	1.4	2.6	1.1	0.9	0.6	0.7	3.5	4.0	
37	1.3	1.3	2.3	1.3	1.7	1.2	1.6	8.0	9.6	

^a: The number in the parentheses are the serovars of each strain

^b: Strain lacking the heat-stable antigen

^c: Strains untypable by the gel double-diffusion test, but identified as *E. rhusiopathiae* by the primers developed by Takeshi et al. (J. Clin. Microbiol. 37: 4093-4098, 1999)

^d: Strains untypable by the gel double-diffusion test, but identified as *Erysipelothrix* spp. serovar 13 by the primers developed by Takeshi et al. (J. Clin. Microbiol. 37: 4093-4098, 1999)

株のD値に比べ、有意に高かった ($P < 0.05$)。

培養温度の違いによる熱抵抗性の変動は他の細菌でも観察され、その理由としては、培養温度が高いと細胞膜の脂肪酸組織が変化し、長鎖脂肪酸、直鎖脂肪酸および飽和脂肪酸の割合が増加し、熱抵抗性が高くなる。逆に、培養温度が低く、短鎖脂肪酸、分枝鎖脂肪酸および不飽和脂肪酸の割合が増加すると熱抵抗性が低くなることが報告されている (5,6)。本研究では、*Erysipelothrix* 属菌の培養温度と菌株の脂肪酸組織の関係については検討しておらず、また、その関係を検討した報告が過去に見られないことから、本菌属の熱抵抗性と菌体脂肪酸との関係については現時点では明らかではない。しかし、本研究により、*Erysipelothrix* spp.血清型13型が他の菌種よりも熱抵抗背が高く、血清型別不能菌株の熱抵抗性が培養温度の上昇に伴って高くなることが明らかになり、*Erysipelothrix* 属菌の熱抵抗性は菌種ならびに血清型を決定する熱抵抗性抗原の有無によって異なる可能性が示唆された。

4. 要 約

E. rhusiopathiae 血清型2型 (A株)、*E. tonsillarum* 血清型7型 (B株)、*Erysipelothrix* spp.血清型13型 (C株) および血清型18型 (D株)、*E. rhusiopathiae* 血清型N型 (E株) ならびにPCRで*E. rhusiopathiae* に同定された血清型別不能菌株F株およびG株、および*Erysipelothrix* spp.血清型13型に同定された血清型別不能菌株H株およびI株のD値を算出し、熱抵抗性を菌種ならびに培養温度により比較検討し、以下の結果を得た。1) 耐熱性抗原を欠く菌株および血清型別不能菌株 (E~I株) では37℃で培養した場合のD値が25℃で培養した場合よりも有意に高かったが、血清型別ができた菌株 (A~D株) では両者

間に差は認められなかった。2) *Erysipelothrix* spp 血清型13に同定されたC株、H株およびI株のD値は2.3から9.6分で、A株、B株、D株、E株、F株およびG株の0.6から1.7分に比べ有意に高かった。これらのことから、*Erysipelothrix* 属菌の熱抵抗性は菌種ならびに血清型を決定する熱抵抗性抗原の有無によって異なる可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Brooke, C. J. and Riley, T. V., *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational disease. *J. Med. Microbiol.*, 48: 789-799, 1999.
- 2) Nakazawa, H., Hayashidani, H., Higashi, J., Kaneko, K. and Ogawa, M., Occurrence of *Erysipelothrix* spp. in broiler chickens at an abattoir. *J. Food Prot.* 61: 907-909, 1998.
- 3) Nakazawa, H., Hayashidani, H., Higashi, J., Kaneko, K. and Ogawa, M., Occurrence of *Erysipelothrix* spp. in chicken meat parts from a processing plant. *J. Food Prot.* 61: 1207-1209, 1998
- 4) Takeshi, K., Makino, S., Ikeda, T., Takada, N., Nakashiro, A., Nakanishi, K., Oguma, K., Katoh, Y., Suganuma, H., and Ohyama, T., Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4093-4098, 1999.
- 5) Bechat, L. R., and Worthington, R. E., Relationships between heat resistance and phospholipids fatty acid composition of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. and Environm. Microbiol.* 31: 389-394, 1976.
- 6) Jujena, V. K., Foglia, T. A., and Marmer, B. S., Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: effects of pH, acidulant and growth temperature. *J. Food Prot.* 61: 683-687, 1998.