

水耕栽培環境における大腸菌と
原生動物の相互作用に関する研究

Studies on the interaction between bacteria and protozoa
in the hydroponic environments

佐藤 聖

2019

目 次

和文要旨

Summary

第 1 章 研究の背景と目的	1
1-1 水耕栽培作物の衛生管理をめぐって	
1-2 原生動物と細菌の相互作用	
1-3 本研究の目的	
第 2 章 各種葉菜類栽培中の水耕液に接種した大腸菌の植物体内部への侵入 とそれに影響を及ぼす諸因子の検討	11
2-1 緒言	
2-2 材料および方法	
2-2-1 植物の水耕栽培	
2-2-2 大腸菌株	
2-2-3 大腸菌侵入試験	
2-2-4 表面殺菌法	
2-2-5 細菌および原生動物の定量法	
2-2-6 希釈平板法および $\mu\text{C-FISH}$ 法による大腸菌の測定	
2-2-7 原生動物の観察・撮影法	
2-2-8 統計解析	
2-3 結果および考察	

2-3-1 レタス栽培水耕液中の大腸菌および原生動物の動態

2-3-2 各種水耕栽培葉菜類への大腸菌侵入

第 3 章 原生動物による大腸菌の捕食・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

3-1 緒言

3-2 材料および方法

3-2-1 植物の栽培条件

3-2-2 水耕栽培作物への大腸菌曝露

3-2-3 未除菌およびフィルター除菌した水耕液中での大腸菌生残試験

3-2-4 レタス栽培中の水耕液中での大腸菌および原生動物の動態

3-2-5 蛍光標識細菌の原生動物による捕食の観察

3-2-6 原生動物の形態学的同定

3-2-7 統計解析

3-3 結果および考察

3-3-1 水耕液のフィルター除菌による大腸菌への影響

3-3-2 蛍光標識菌体の原生動物による捕食

3-3-3 大腸菌および原生動物のバイオボリューム

第 4 章 水耕液中の原生動物を抑制する薬剤の検討・・・・・・・・・・・・ 41

4-1 緒言

4-2 材料および方法

4-2-1 供試薬剤

4-2-2 供試原生動物

4-2-3 原生動物のメトロニダゾールに対する感受性試験

4-2-4 原生動物のピランテルパモ酸塩に対する感受性試験

4-2-4-1 DMSO が大腸菌の生存に及ぼす影響試験

- 4-2-4-2 DMSO が大腸菌の増殖に及ぼす影響試験
- 4-2-4-3 DMSO がレタスの生育に及ぼす影響試験
- 4-2-4-4 原生動物のピランテルパモ酸塩に対する感受性試験
- 4-2-5 植物の栽培およびメトロニダゾール存在下での大腸菌暴露試験
- 4-2-6 水耕液中の微生物の経時的変化の測定
 - 4-2-6-1 大腸菌定量法
 - 4-2-6-2 原生動物定量法
- 4-2-7 葉面殺菌および洗浄
- 4-2-8 植物内の大腸菌検出
- 4-2-9 原生動物の混合薬剤に対する感受性試験
 - 4-2-9-1 混合薬剤がレタスの生育に及ぼす影響試験
 - 4-2-9-2 混合薬剤が大腸菌の生存に及ぼす影響試験
 - 4-2-9-3 原生動物の混合薬剤に対する感受性試験
- 4-2-10 統計解析
- 4-3 結果および考察
 - 4-3-1 原生動物のメトロニダゾールに対する感受性
 - 4-3-2 DMSO が大腸菌の生存および増殖に及ぼす影響
 - 4-3-3 DMSO がレタスの生育に及ぼす影響
 - 4-3-4 原生動物のピランテルパモ酸塩に対する感受性
 - 4-3-5 植物の重量
 - 4-3-5-1 メトロニダゾール無添加の場合の植物の重量
 - 4-3-5-2 メトロニダゾールを添加した場合の植物の重量
 - 4-3-6 水耕液中の微生物の経時的変化
 - 4-3-6-1 メトロニダゾール無添加の場合の微生物の経時的変化
 - 4-3-6-2 メトロニダゾールを添加した場合の微生物の経時的変化

- 4-3-7 植物体内への大腸菌侵入の有無
 - 4-3-7-1 メトロニダゾール無添加の場合
 - 4-3-7-2 メトロニダゾールを添加した場合
- 4-3-8 混合薬剤がレタスの生育に及ぼす影響
- 4-3-9 混合薬剤が大腸菌の生存に及ぼす影響
- 4-3-10 混合薬剤が原生動物の生存に及ぼす影響

第5章 大腸菌の反復接種による植物体内部への侵入閾値の解明・・・91

- 5-1 緒言
- 5-2 材料および方法
 - 5-2-1 供試作物
 - 5-2-3 植物の栽培および大腸菌暴露試験
 - 5-2-4 水耕液中の微生物の経時的変化の測定
 - 5-2-4-1 大腸菌の定量
 - 5-2-4-2 原生動物の定量
 - 5-2-5 葉面殺菌および洗浄
 - 5-2-6 植物体内の大腸菌検出方法
 - 5-2-7 API20E による簡易同定
- 5-3 結果および考察
 - 5-3-1 水耕液中の微生物の経時的変化
 - 5-3-1-1 初発菌密度 10^6 CFU/mL の場合の水耕液中の微生物の経時的変化
 - 5-3-1-2 初発菌密度 10^4 CFU/mL の場合の水耕液中の微生物の経時的変化
 - 5-3-2 植物体内への大腸菌侵入の有無
 - 5-3-2-1 初発菌密度 10^6 CFU/mL の場合の植物体内への大腸菌侵入の有無

5-3-2-2 初発菌密度 10^4 CFU/mL の場合の植物体内への大腸菌
侵入の有無

5-3-3 大腸菌陽性株の API20E による簡易同定結果

第 6 章 総合考察 109

謝辞 116

引用文献 117

和 文 要 旨

本研究では、水耕栽培作物体内部への大腸菌の侵入条件、特に侵入に必要な最低菌密度（閾値）に及ぼす原生動物や常在細菌の菌密度や作物種について検討し、最終的には閾値を解明するために様々な実験を行った。

1. 各種葉菜類を栽培中の水耕液に堆肥由来の非病原性大腸菌を接種し、植物体内部へと大腸菌が侵入するかどうか試験した。レタス、ホウレンソウ、およびコマツナでは大腸菌が植物体内部へと侵入したのに対し、コネギでは侵入しなかった。その際の大腸菌密度は、試験期間後に大幅に減少しており、大腸菌の侵入が観察されなかったコネギにおいても同様であった。このため、侵入の閾値を正確に求めることはできなかった。

水耕液に接種した大腸菌が急激に減少する原因を解明するため、希釈平板法および $\mu\text{C-FISH}$ 法を用いて大腸菌密度を測定した。接種直後の大腸菌密度は、 $3.3 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$ であったが、7日後には大幅に（4~7桁）減少し、希釈平板法と $\mu\text{C-FISH}$ 法での菌密度にほとんど差はなかった。このことから、水耕液に接種した大腸菌が急激に減少する原因は **viable but non-culturable (VNC)** 化したためではないことが判明した。同時に、栽培後の水耕液を顕微鏡観察したところ原生動物が多数確認された。レタスへの大腸菌侵入試験では、大腸菌接種 5~7 日後に原生動物数が増加していた。

2. 水耕液に接種した大腸菌の減少の原因を解明するために、 $0.2 \mu\text{m}$ または $1.0 \mu\text{m}$ のフィルターを用いて水耕液をろ過し、そのろ液に大腸菌を接種した。その結果、未ろ過の水耕液では大腸菌が大幅に減少したのに対し、ろ過した水耕液では大腸菌が全く減少しなかった。さらに、蛍光標識した大腸菌菌体（**FLB**）を水耕液に添加し 30 分間インキュベートしたところ、原生動物体内に **FLB** が多数取り込まれていることを確認した。以上のことから、水耕液に接種された大腸菌を原生動物が捕食していることが示唆された。さらに、細菌と原生動物のバイオボリュームを測定し、原生動物のバイオ

ボリュームの増加量と大腸菌のバイオボリュームの減少量に矛盾がないことを確かめた。

3. 原生動物が、水耕液に接種した大腸菌減少の主要因であることを解明したことから、水耕栽培作物への大腸菌侵入閾値の正確な解明のためには、原生動物の捕食作用を抑制する必要があることが明らかとなった。そこで、抗原生動物薬（メトロニダゾールおよびピランテルパモ酸塩）を用いて、原生動物を抑制することを試みた。高濃度のメトロニダゾール（500～1,000 mg/L）により原生動物の運動性が抑えられたが、水耕液に同濃度を添加したところ原生動物の捕食を抑制することには至らなかった。一方、ピランテルパモ酸塩は DMSO に溶解させる必要があるため、原生動物に有効な濃度を水耕液に添加すると、DMSO の影響からレタスに生育障害が出ることを判明した。そこで両薬剤の混合使用により原生動物を抑制することを試みたが、抑制できなかった。これらのことから、抗原生動物薬による水耕液中の原生動物を抑制することは適切でないことが判明した。
4. 水耕液中の大腸菌密度を維持するために、定期的到大腸菌を水耕液に接種することを試みた。その結果、水耕液中の大腸菌密度を 5 日間ほぼ維持することに成功し、原生動物存在下におけるレタスへの侵入閾値を解明することができた。すなわち、大腸菌密度が 2×10^4 CFU/mL から 1×10^5 CFU/mL の範囲で 5 日間維持されることである。

以上のように、水耕液の衛生管理において、原生動物と細菌の相互作用は非常に重要なものであることを明らかにした。しかし今日まで、水耕液中の原生動物に着目した研究はなく、本研究の成果は、今後の水耕栽培作物の衛生管理の進展に大きく寄与できると期待される。

Summary

To clarify the threshold cell density for the internalization of *Escherichia coli* into hydroponic vegetables, *E. coli* isolated from cow dung was inoculated into hydroponic medium and determined the dynamics of *E. coli* and protozoa were investigated.

1. To investigate the internalization of *E. coli* into hydroponic leafy vegetables, *E. coli* was inoculated into hydroponic medium during cultivation. *E. coli* was revealed to internalize into lettuce, spinach, and Komatsuna plants, while not into small green onion plant. The cell density of *E. coli* was decreased markedly during cultivation in all plants. To clarify the cause of a quick decrease in the *E. coli* population, the cell density of *E. coli* was determined by using plate counting with coliform agar (CA) and the μ C-FISH method. The cell density of *E. coli* decreased markedly by as much as 4 to 8 orders of magnitude during 7-day cultivation. Notably, very little difference was observed between counts by the plate method vs. the μ C-FISH method. These results suggest that the decrease in the *E. coli* population was not due to a physiological change into the viable but non-culturable (VNC) state but true death. Many protozoa were observed under a light microscope in hydroponic medium during plant cultivation.
2. To clarify the cause of the decrease in the *E. coli* population inoculated into hydroponic medium, *E. coli* was inoculated into intact, 0.2 μ m-filtrated or 1.0 μ m-filtrated hydroponic medium after plant cultivation. As a result, *E. coli* decreased markedly in the intact hydroponic medium, but totally not in the filtrated hydroponic medium. Furthermore, fluorescently labeled bacteria (FLB) were prepared from *E. coli* culture and added into hydroponic medium. FLB was observed to be ingested quickly by protozoa (mostly ciliates and flagellates). These findings suggest that protozoa feed on *E. coli* inoculated in hydroponic medium. In addition, analysis of the bio-volumes of bacteria

and protozoa observed to be showed that the increment of protozoan bio-volume and the decrement of *E. coli* bio-volume were in accordance with a prey-predator relationship.

3. To elucidate the threshold cell density of *E. coli* for the internalization into hydroponic vegetables, antiprotozoal agents were investigated to inhibit protozoan predation. Metronidazole and pyrantel pamoate were selected and used. Protozoan motility was suppressed markedly at 500 to 1,000 mg/L of metronidazole, but no suppression of protozoan predation was observed in the hydroponic medium. Pyrantel pamoate was relatively water-insoluble and thus dissolved in DMSO, which was added into hydroponic medium at an effective concentration for protozoa. However, it was found that lettuce plants died due to the toxicity of DMSO. Therefore, attempts were made to inhibit protozoan predation by using a mixture of the two kinds of drugs, however, the mixture was not effective to inhibit protozoan activity.
4. To compensate the the loss of cell density caused by predation by protozoa so as to maintain cell density of *E. coli* in hydroponic medium, *E. coli* suspension was added periodically into hydroponic medium. As a result, cell density of *E. coli* almost unchanged during 5-day incubation in hydroponic medium, resulting in elucidation of the threshold cell density for internalization into lettuce plant with the presence of protozoa, that is, *E. coli* population at a range of 2×10^4 CFU/mL to 1×10^5 CFU/mL maintained for 5 days.

These results suggest the importance in the interaction between bacteria and protozoa in hydroponic medium. To date, however, there has been no research focusing on protozoan behavior in the hydroponic environments except this study. The results of this study are considered to contribute greatly to progress in the hygiene management of hydroponic vegetable production in the near future.

第 1 章 研究の背景と目的

1 水耕栽培作物の衛生管理をめぐって

近年、水耕栽培は農薬を使わない生鮮野菜の栽培法として安心・安全なイメージを持ち、消費者から歓迎されている。加えて、年間を通して安定的な生産が可能であることから、我が国の水耕栽培施設数は年々増加している。すなわち、商業的な水耕栽培施設は 2011 年（平成 23 年）には全国で 93 か所であったが、7 年後の 2018 年（平成 30 年）には 373 か所となり、4 倍以上に著しく増加している（表 1-1）。

しかし、多くの施設では培養液を循環させて使用するため、ひとたび水耕栽培施設内に食中毒菌が侵入すると装置内で増殖して野菜の汚染が拡大する恐れがある（農林水産省農林水産技術会議，2005）。レタス（Doyle and Erickson, 2008 ; Taylor ら，2013）、ハウレンソウ（Doyle および Erickson, 2008）、トマト（CDC, 2007 ; Doyle および Erickson, 2008）、メロン（Munnoch ら，2009 ; McCollum ら，2013）、およびスプラウト（CDC 2009 ; Bayer ら，2014 ; Uphoff ら，2014）を含む様々な生鮮野菜や果物が病原菌のベクターとして報告されており、水耕栽培作物による大規模な食中毒が欧米では毎年のように発生している。表 1-2 は生鮮野菜とその最小加工品を原因食品とする国内外の食中毒事例を示したものである。大腸菌および *Salmonella* による食中毒が多いが、多くの種類の植物種、細菌種の組み合わせによって食中毒が発生している。さらに 2011 年には、水耕栽培されたフェヌグリークスプラウトが原因と目される大規模な食中毒がヨーロッパで発生し、4,300 人近くの感染者および 53 人の死者が出ている（European Food Safety Authority, 2011 ; Frank ら，2011）。一方、我が国では病原性大腸菌 O157:H7 による国内最大級の食中毒が 1996 年に発生し、感染者 9,451 人、死者数 12 人を出した（Michino ら，1999）。この原因食品として厚生省は、1996 年 8 月 7 日に“貝割れ大根については、原因食材とは断定できないが、その可能性も否定できない。”との中間報告を発表し、それに

より生産業界は大きな風評被害を受けた（厚生労働省，2004）。さらに，9月26日には“堺市学童集団下痢症の原因食材としては，特定の生産施設から7月7日，8日，及び9日に出荷された貝割れ大根が最も可能性が高いと考えられる。”との最終報告を出した（厚生労働省，2004）。しかし，その後の立ち入り検査においては，施設，従業員および周辺環境からは大腸菌 O157 が培養検査で検出されず，業界が国に対して提起した民事訴訟ではカイワレ大根が原因食材ではないと結論された（厚生労働省，2004）。このような経緯から，業界では水耕栽培衛生管理マニュアルを策定し（日本施設園芸協会，1999），自主的な衛生管理マニュアルの整備が進んだ（日本施設園芸協会，2003）。さらに，それらの普及実践の徹底に伴い，これ以降はカイワレ大根のような芽もの野菜（スプラウト）や水耕栽培作物による食中毒の報告はほとんどない。

これら生鮮野菜を介した食中毒の原因菌のほとんどは，大腸菌 O157:H7 とサルモネラである。特に，短期間の水耕栽培作物であるスプラウトを介した食中毒は，欧米ではこれらの原因菌により年複数回発生しており（表 1-3），米国疾病予防センターや欧州疾病予防センターはスプラウトの生食を避けるよう警告している（ECDE ; CDC, 2018）。

一方，厚生労働省（2018）による平成 29 年度の食中毒菌汚染実態調査によると，水耕栽培が主であるアルファルファ，カイワレ，みつば，もやし，およびレタスから高頻度で大腸菌が検出されている（表 1-4）。衛生指標における大腸菌は，“大腸菌群の中でインドール産生能，メチルレッド反応，VP 反応，およびシモンズのクエン酸塩利用能の 4 つの性状試験（IMVIC 試験）の結果が「+++」または「-+++」のもので 44.5°C で増殖できるもの”と定義されている（Ike, 2011）。したがって，衛生指標として検出される大腸菌の多くは必ずしも病原性を有さないが，潜在的な汚染の可能性を示していると理解すべきであろう。水耕栽培施設の衛生管理では，施設内に病原菌を持ち込まないことが最も重要であり，ひとたび水耕栽培装置に病原菌が侵入すると装置全体に拡散し，汚染が広がる恐れが指摘されている（農林水産省農林水産技術会議，2005）。これ

らのことから、衛生管理をより一層強化することが望まれる。

多くの研究で、ヒト病原菌が植物表面を汚染するばかりではなく、植物体内部にまで侵入することが実験的に証明されている (Franz ら, 2007 ; Itoh ら, 1998 ; Sharma ら, 2009)。表 1-5 は、種々のヒト病原菌を様々な条件で各種作物に曝露した際の植物体内部への侵入の可否についてまとめたものである。この表のように、水耕栽培作物の根部に各種のヒト病原菌を曝露した際に、植物体内部へと病原菌が侵入することが報告されている。

前述した 1996 年の堺などで発生した大規模食中毒では、感染者からの大腸菌 O157:H7 分離株の一つは、種子からカイワレ大根の可食部に侵入することが実験的に証明されている (Itoh ら, 1998)。そのため、病原菌の侵入を左右する条件を詳細に解明することは水耕栽培の衛生管理にとって重要である。特に植物体内部に侵入するために必要な病原菌の菌密度 (閾値) の解明は衛生管理上もっとも重要である。この点に関して、水耕液を寒天で固化した培地でレタスを栽培した際、大腸菌 O157:H7 が 10^2 CFU/mL のごく低い菌密度で根部に接種されると植物体内部へと侵入することが報告されている (表 1-5, Jablasone ら, 2005)。その一方で、水耕液で栽培しているレタスに大腸菌 O157:H7 を 10^7 CFU/mL の菌密度で曝露しても植物体内部に侵入しなかったという報告もある (表 1-5, Franz ら, 2007)。このように、同一植物種・同一菌株であっても植物体内部への病原菌侵入に必要な菌密度に大きな違いがあり、それを左右する所為因子を解明することは喫緊の課題である。

2 原生動物と細菌の相互作用

原生動物とは、単細胞真核生物のうち生態が動物的なものである。その生態は多種多様にわたり、その分類は遺伝子解析の発展に伴い改定が繰り返されている (Adl ら, 2012)。多くの原生動物が自然環境中において重要な細菌捕食者であることが知られており、淡水 (Berninger ら, 1991 ; Hahn および Höfle, 2001 ; Pernthaler, 2005 ; Kanavillil および Kurissery, 2013)、海水 (Fenchel,

1982; Hahn および Höfle, 2001; Sherr および Sherr, 2002; Pernthaler, 2005), 土壌 (Clarholm, 1981; Vargas および Hattori, 1986; Rønn ら, 2002), およびバイオフィーム (Dopheide ら, 2011; Knavillil および Kurissery, 2013; Inaba ら, 2018) などの自然環境における原生動物の役割に関して多くの報告がある。それらに加え、浄化槽などの人工的な環境においても細菌捕食者として働いていることが報告されている (Chabaud ら, 2006; Sibille ら, 1998)。

一方で、捕食した細菌が必ずしも原生動物によって殺菌・消化されないという以下のような報告もある。大腸菌 O157:H7 (Barker ら, 1999; Gourabathini ら, 2008), *Salmonella* (Barker および Brown, 1994; Brandl ら, 2005; Gourabathini ら, 2008), および *Listeria monocytogenes* (Ly および Müller, 1990; Barker および Brown, 1994) のような一部の細菌種の中には、捕食後に消化されずに原生動物細胞中で長期間生存し、その後、生きたまま原生動物細胞外へと放出されるものもある。植物体表面でこのようなヒト病原菌が放出された場合、これが原因で食中毒を引き起こす可能性があり、食品安全性および公衆衛生にとって重要であると指摘されている (Gourabathini ら, 2008)。

既述のように、原生動物は細菌捕食者であるが、その捕食効率は餌細菌の菌密度に依存している。Mallory ら (1983) は、*Salmonella typhimurium* 単体または *S. typhimurium* および *Enterobacter agglomerans* の混合溶液に繊毛虫 *Tetrahymena thermophilus* を接種した。すると、*S. typhimurium* のみの場合、*S. typhimurium* 菌数は 10^4 cells/mL より減少することはなかったが、*E. agglomerans* との混合溶液では 10^1 cells/mL にまで減少した。これは、細菌の菌密度が低下すると原生動物による捕食効率が低下し、一定の菌密度以下になるとほとんど捕食できないが他の細菌種が共存すると、それを捕食することにより、より低い菌密度まで捕食が可能になると説明されている。すなわち、原生動物と細菌の相互作用において、標的細菌と原生動物のみを観察するだけでは不十分で、標的細菌以外の細菌の動態も同時に観察することが必要であることを示している。

3 本研究の目的

以上のように、欧米では水耕栽培作物による食中毒が頻発しており、水耕栽培作物の衛生管理の重要性が指摘されてきた。日本では、施設園芸協会による自主的な衛生管理マニュアルの整備もあり水耕栽培作物による食中毒はほとんど発生していないが、欧米で多発する状況は日本でもいずれ起きることと考えるべきであろう。

このような背景から水耕栽培作物体内部へとヒト病原菌が侵入するための条件、特に閾値を解明することが必要であり、多くの研究者が検討してきた（表1-5）。しかし、ヒト病原菌が作物体内部へ侵入する閾値が報告によって異なり、閾値に関する合意された見解はない。その要因として、様々な原因が考えられるが、筆者は水耕液中に原生動物が存在することを見出し、それらが大きく影響していると考えた。水耕栽培作物体内部へのヒト病原菌侵入に、原生動物が影響を及ぼすことを報告した研究は従来なく、本研究が初めての報告となる。

そこで本研究では、大腸菌が水耕栽培作物体内部へと侵入するための閾値を解明することを目的とした。まず、水耕液に接種した大腸菌が急激に減少し、大腸菌密度が一定に保たれなかったため閾値を正確に決定できなかった。その原因が原生動物による大腸菌の捕食にあることを突き止め、その影響を排除するために抗原生動物薬の使用を種々検討した。しかし、水耕栽培植物に悪影響を与えずに原生動物に効果がある抗原生動物薬は見いだせなかった。そこで、捕食圧下でも大腸菌密度を維持するために、大腸菌を反復接種することで菌密度を一定に保つようにした。その結果、原生動物の存在下での大腸菌の植物体内部への侵入閾値を決定することに成功した。

表 1-1 水耕栽培施設数の変遷

調査年		人口光 利用型	太陽光人口光 併用型	太陽光のみ 利用型	計
2011年	平成 23年	64	16	13*	93
2012年	24年	106	21	83*	210
2013年	25年	125	28	151*	304
2014年	26年	165	33	185*	383
2015年	27年	185	33	195*	413
2016年	28年	191	36	79*	306
2017年	29年	197	31	126*	354
2018年	30年	183	32	158*	373

* 施設面積 1ha 以上の施設

日本施設園芸協会（2018）の表を一部改編

表 1-2 生鮮野菜とその最少加工品を原因食品とする国内外の食中毒事例

発生前	発生国	汚染源	原因菌	発症者数	死者数
1996年	日本	原因不明（カイワレ大根？）	<i>E. coli</i> O157:H7	9,451	12
1997年	米国	アルファルファ	<i>E. coli</i> O157:H7	108	0
2000年	日本	カブの浅漬け	<i>E. coli</i> O157:H7	8	3
2002年	日本	キュウリの浅漬け	<i>E. coli</i> O157:H7	112	0
2004年	米国	トマト	<i>Salmonella</i> Braenderup	110	0
2005年	カナダ	緑豆スプラウト	<i>Salmonella</i> Enteritidis	648	0
2005年	オーストラリア	アルファルファ	<i>Salmonella</i> sp.	125	0
2006年	米国	ハウレンソウ	<i>E. coli</i> O157:H7	205	3
2006年	米国	トマト	<i>Salmonella</i> Typhimurium	183	0
2006年	米国	レタス	<i>E. coli</i> O157:H7	81	0
2007年	オーストラリア, 欧州	ベビーキャロット	<i>Sigella sonnei</i>	230	0
2007年	ノルウェー, フィンランド, デンマーク	アルファルファ	<i>Salmonella</i> Weltevreden	45	0
2008年	米国	ペッパー（ハラペーニョ, セラーノ）	<i>Salmonella</i> Saintpaul	1,442	2
2009年	米国	アルファルファ	<i>Salmonella</i> Saintpaul	235	0
2010年	英国	豆モヤシ	<i>Salmonella</i> Bareilly	218	0
2011年	欧州（ドイツで発生拡大）	スプラウト	<i>E. coli</i> O104:H4	4,321	50
2011年	米国	メロン	<i>Listeria monocytogenes</i>	146	30
2012年	日本	ハクサイの浅漬け	<i>E. coli</i> O157	169	8
2015年	米国	キュウリ（メキシコから輸入）	<i>Salmonella</i> Poona	767	4
2017年	カナダ	ロメインレタス?	<i>E. coli</i> O157:H7	30	1
2018年	オーストラリア	ロックメロン	<i>Listeria monocytogenes</i>	20	7
2018年	米国	ロメインレタス	<i>E. coli</i> O157:H7	43	0

川本伸一（2013）一部改編

表 1-3 欧米諸国におけるスプラウトによる食中毒事例（一部）

発生年	発生国	汚染作物	原因菌	発症者
2011 年	欧州, カナダおよび米国	スプラウト	<i>E. coli</i> O104:H4	4,321
	米国	アルファルファ	<i>Salmonella</i> Enteritidis	27
	米国	クローバースプラウト	<i>E. coli</i> O26	29
2016 年	米国	アルファルファ	<i>E. coli</i> O157	7
	オーストラリア	緑豆スプラウト	<i>Salmonella</i> Saintpaul	233
	米国	アルファルファ	<i>Salmonella</i>	30

米国疾病予防管理センターおよび国立医薬品食品衛生研究所ホームページから作成

表 1-4 平成 29 年度の食中毒菌汚染実態調査

調査結果の推移(平成27～29年度)

検体名	総検体数			検査の結果、陽性となった検体数 (注)()内の数字は供試検体数												
				E.coli			サルモネラ属菌			腸管出血性大腸菌			カンピロバクター			
	H27	H28	H29	H27	H28	H29	H27	H28	H29	H27	H28	H29	H27	H28	H29	
野菜	アルファルファ	23	10	6	1(23)	3(9)	1(4)	0(10)	-	-	0(13)	0(1)	0(2)	-	-	-
	カイワレ	78	45	60	11(78)	3(22)	3(36)	0(41)	-	-	0(53)	0(23)	0(23)	-	-	-
	カット野菜	341	153	194	10(341)	8(76)	5(111)	0(187)	-	-	0(208)	0(77)	0(91)	-	-	-
	キュウリ	106	69	88	8(106)	3(23)	3(53)	0(42)	-	-	0(67)	0(46)	0(37)	-	-	-
	みつば	38	20	38	12(38)	2(8)	8(23)	0(16)	-	-	0(19)	0(12)	0(15)	-	-	-
	もやし	94	41	59	47(94)	8(21)	15(39)	0(48)	-	-	0(52)	0(20)	0(20)	-	-	-
	レタス	93	38	71	7(93)	3(23)	4(44)	0(47)	-	-	0(49)	0(15)	0(27)	-	-	-
	漬物野菜	257	6	16	21(257)	0(4)	0(5)	0(101)	-	-	0(139)	0(2)	0(11)	-	-	-
食肉	ミンチ肉(牛)	32	74	52	0(2)	-	-	0(32)	0(11)	1(10)	0(32)	0(62)	0(42)	0(5)	0(1)	-
	ミンチ肉(豚)	94	7	61	5(7)	-	-	4(94)	0(1)	3(54)	1(94)	0(6)	0(11)	0(3)	-	-
	ミンチ肉(牛を含むもの)	78	7	33	3(5)	-	-	0(78)	1(1)	1(18)	1(78)	0(5)	0(14)	0(5)	0(2)	0(2)
	ミンチ肉(鶏)	35	-	34	-	-	-	22(35)	-	14(28)	0(34)	-	0(8)	1(5)	-	0(1)
	カツステーキ肉	67	46	50	3(3)	-	-	4(67)	0(20)	2(29)	0(67)	0(25)	0(25)	-	0(1)	-
	牛結着肉	29	90	59	6(7)	-	-	8(29)	1(47)	4(27)	0(29)	0(43)	0(34)	0(7)	-	-
	生食用の食肉(牛)	1	-	4	0(1)	-	-	0(1)	-	0(1)	0(1)	-	0(2)	0(1)	-	0(1)
	鶏たたき	32	69	25	15(24)	-	-	1(32)	5(23)	0(11)	0(23)	0(20)	0(2)	5(32)	3(26)	0(13)
	馬刺	98	135	46	10(58)	-	-	0(97)	0(46)	0(22)	0(61)	0(46)	0(14)	0(97)	0(43)	0(17)
	ローストビーフ	7	5	3	0(4)	-	-	0(7)	0(2)	0(1)	0(4)	0(3)	0(1)	0(7)	-	0(1)
加工品	漬物	364	173	204	32(364)	11(101)	12(112)	0(193)	-	-	0(267)	0(72)	0(97)	-	-	-
小計		1,867	988	1,103	191(1505)	41(287)	51(427)	39(1157)	7(151)	25(201)	2(1290)	0(478)	0(476)	6(162)	3(73)	0(35)

(注)()内の数字は供試検体数

検体名	総検体数			検査結果(陽性率(%))												
				E.coli			サルモネラ属菌			腸管出血性大腸菌			カンピロバクター			
	H27	H28	H29	H27	H28	H29	H27	H28	H29	H27	H28	H29	H27	H28	H29	
野菜	アルファルファ	23	10	6	4.3%	33.3%	25.0%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
	カイワレ	78	45	60	14.1%	13.6%	8.3%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
	カット野菜	341	153	194	2.9%	10.5%	4.5%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
	キュウリ	106	69	88	7.5%	13.0%	5.7%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
	みつば	38	20	38	31.6%	25.0%	34.8%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
	もやし	94	41	59	50.0%	38.1%	38.5%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
	レタス	93	38	71	7.5%	13.0%	9.1%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
	漬物野菜	257	6	16	8.2%	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-
食肉	ミンチ肉(牛)	32	74	52	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	10.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
	ミンチ肉(豚)	94	7	61	71.4%	-	-	4.3%	0.0%	5.6%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
	ミンチ肉(牛豚混合)	78	7	33	60.0%	-	-	0.0%	100.0%	5.6%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	ミンチ肉(鶏)	35	-	34	-	-	-	62.9%	-	50.0%	0.0%	-	0.0%	20.0%	-	0.0%
	カツステーキ肉	67	46	50	100.0%	-	-	6.0%	0.0%	6.9%	0.0%	0.0%	0.0%	-	0.0%	-
	牛結着肉	29	90	59	85.7%	-	-	27.6%	2.1%	14.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-	-
	生食用の食肉(牛)	1	-	4	0.0%	-	-	0.0%	-	0.0%	0.0%	-	0.0%	0.0%	-	0.0%
	鶏たたき	32	69	25	62.5%	-	-	3.1%	21.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	15.6%	11.5%	0.0%
	馬刺	98	135	46	17.2%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	ローストビーフ	7	5	3	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-	0.0%
加工品	漬物	364	173	204	8.8%	10.9%	10.7%	0.0%	-	-	0.0%	0.0%	0.0%	-	-	-

(注)腸管出血性大腸菌については、O26、O103、O111、O121、O145及びO157について検査を実施。

出典：厚生労働省 HP

表1-5 食中毒菌の植物体内への侵入の可否に関する文献一覧

出展	菌種	作物	栽培基質	滅菌or非滅菌	接種菌濃度 (Log CFU/ mL or g dry soil)	侵入の可否
Warriner <i>et al.</i> , 2003	<i>Escherichia coli</i> P36	ハウレンソウ	寒天	滅菌	7	根にのみ+
		ハウレンソウ	寒天	滅菌	2	根にのみ+
		ハウレンソウ	寒天	滅菌	3	根にのみ+
Jablasone <i>et al.</i> , 2005	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	クレス	水耕液(寒天)	滅菌	2	+
		レタス	水耕液(寒天)	滅菌	2	+
		ラディッシュ	水耕液(寒天)	滅菌	2	+
		ハウレンソウ	水耕液(寒天)	滅菌	2	+
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	クレス	水耕液(寒天)	滅菌	2	-
		レタス	水耕液(寒天)	滅菌	2	+
		ラディッシュ	水耕液(寒天)	滅菌	2	+
		ハウレンソウ	水耕液(寒天)	滅菌	2	-
	<i>Listeria monocytogenes</i>	クレス	水耕液(寒天)	滅菌	2	-
		レタス	水耕液(寒天)	滅菌	2	-
ラディッシュ		水耕液(寒天)	滅菌	2	-	
ハウレンソウ		水耕液(寒天)	滅菌	2	-	
Franz <i>et al.</i> , 2007	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	レタス	水耕液	非滅菌	7	+
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	レタス	水耕液	非滅菌	7	-
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	レタス	土耕	非滅菌	9	+
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	レタス	土耕	非滅菌	9	+
Kroupitski <i>et al.</i> , 2009	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	レタス	—	—	8(葉に接種)	+
Itoh <i>et al.</i> , 1998	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	カイワレ	滅菌水	滅菌	3	+
Solomon <i>et al.</i> , 2002	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	レタス	土耕	非滅菌	4~8	+
Sharma <i>et al.</i> , 2009	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ハウレンソウ	水耕液(寒天)	滅菌	4~7	+
			土耕	低温殺菌	4~8	-
Miles <i>et al.</i> , 2009	<i>Salmonella enterica</i> serovar Montevideo	トマト	灌漑水		7	(2週ごとの菌液接種を 42日以上続けた場合)
Kutter <i>et al.</i> , 2006	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2	オオムギ	珪砂		8	+
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium DT104h	オオムギ	珪砂		8	+
	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	オオムギ	珪砂		8	+
	<i>Listeria ivanovii</i>	オオムギ	珪砂		8	+
	<i>Listeria innocua</i>	オオムギ	珪砂		8	+
Deering <i>et al.</i> , 2012	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ラッカセイ	0.8% 軟寒天	滅菌	7(種子を浸した)	+
Bernstein <i>et al.</i> , 2007	<i>Escherichia coli</i> strain TG1	トウモロコシ	水耕		7	+
Guo <i>et al.</i> , 2002	<i>Salmonella enterica</i> Montevideo	トマト	水耕		4.55	+
		Michigan	水耕		4.55	+
		Poona	水耕		4.55	+
		Hartford	水耕		4.55	+
		Enteritidis	水耕		4.55	+
		トマト	水耕		4.55	+
Koseki <i>et al.</i> , 2011	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ハウレンソウ	水耕		3	根:+, 葉:-
			水耕		6	+
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis or Typhimurium	ハウレンソウ	水耕		3	+
			水耕		6	+
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ハウレンソウ	水耕		3	根:+, 葉:-
			水耕		6	+
Macarasin <i>et al.</i> , 2014	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ハウレンソウ	水耕		5 or 7	7でより多く+
			土耕		5 or 7	5で+
Nthenge <i>et al.</i> , 2007	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	レタス	水耕		5	+(成長するほどに侵入 率が悪い)
		レタス	水耕		7	+(成長するほどに侵入 率が悪い)
Dong <i>et al.</i> , 2003	<i>Salmonella enterica</i> Cubana	アルファルファ	培地	滅菌	0~7	+
	<i>Salmonella enterica</i> Infantis	アルファルファ	培地	滅菌	0~7	+
	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	アルファルファ	培地	滅菌	0~7	1以降で+
	<i>Salmonella enterica</i> 8137	アルファルファ	培地	滅菌	0~7	2以降で+
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	アルファルファ	培地	滅菌	0~7	+
Cooley <i>et al.</i> , 2003	<i>Salmonella enterica</i> Newport	シロイヌナズナ	培地	滅菌	4 or 6	+
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	シロイヌナズナ	培地	滅菌	4 or 6	+

+: 侵入, -: 侵入せず

第2章 各種葉菜類栽培中の水耕液に接種した大腸菌の植物体内部への侵入とそれに影響を及ぼす諸因子の検討

2-1 諸言

多くの研究で、水耕栽培作物の根部に各種のヒト病原菌を曝露した際に、植物体内部へと病原菌が侵入することが報告されている（表 1-5, Cooley ら, 2003; Dong ら, 2003; Guo ら, 2002; Jablasone ら, 2005; Kutter ら, 2006; Sharma ら, 2009). しかし, 実験的に大腸菌を水耕液等に接種した場合, 同じ菌濃度であっても植物体内部への侵入の有無が異なる（染谷, 2012). その際に病原菌の侵入を左右する条件を解明することが重要である. 特に植物体内部に侵入するために必要な病原菌の菌密度（閾値）の解明は衛生管理上もっとも重要である. この点に関して, 水耕液を寒天で固化した培地でレタスを栽培した際, 大腸菌 O157:H7 が 10^2 CFU/mL のごく低い菌密度で根部に曝露されると植物体内部へと侵入することが報告されている（Jablasone ら, 2005). 一方で, 水耕液で栽培しているレタスに大腸菌 O157:H7 を 10^7 CFU/mL 接種しても植物体内部に侵入しなかったという報告もある（Franz ら, 2007). このように, 同じ植物種と微生物種の組み合わせであっても植物体内部への病原菌侵入に必要な菌密度に著しい違いがある.

そこで本章では, 水耕栽培における植物体内部への大腸菌の侵入に必要な菌密度（閾値）を左右する諸因子を検討する目的で, 各種の水耕栽培葉菜類の根部に大腸菌を種々の菌密度で曝露し, 植物体内部への侵入の有無を精査した.

2-2 方法および材料

2-2-1 植物の水耕栽培

コマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis* “楽天”, タキイ種苗), リーフレタス (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*, 株式会社トーホク), ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* “おてもやん”, 株式会社トーホク), コネギ (*Allium fistulosum* L. “ス

トレート”，八江農芸)，およびチンゲンサイ (*B. rapa subsp. chinensis* “緑陽”，株式会社トーホク) を，水耕栽培実験に用いた．10 個のポリウレタン製プラグ (2.5 × 2.5 × 2.5 cm ; 株式会社共和) の切れ込みに，各品種の種子を 3 粒ずつ播種した．ステンレスバットにプラグを移し，脱イオン水で満たしてグローブチェンバー (CFH-305, トミー精工) 内に静置し，約 10 日間育苗した (明期 23°C, PPFD 300 μmol/m²/s, 暗期 20°C, 湿度 70%, 日長 16 時間)．発育の良い苗のうち生育段階の揃った苗を 6 株選び，発泡スチロール製の水耕栽培装置 (30 × 21 × 13.5 cm) に移植し，1/2 園試処方の水耕液 (表 2-1) を満たし，約 30 日間栽培した (明期 : 16 h, 23°C, PPFD 300 μmol/m²/s ; 暗期 : 8 h, 20°C, PPFD 0 μmol/m²/s)．

2-2-2 大腸菌株

牛ふん由来非病原性 *Escherichia coli* KM1 (Wu ら, 2009) を，水耕液への菌曝露に用いた．小型 L 字培養管 (55 mm × 80 mm × 直径 17 mm) に NB 培地 (表 2-2) 6 mL を入れ，これに NB 培地による大腸菌 KM1 株の新鮮培養液を 60 μL 接種し，バイオフィトレコーダー (ADVANTEC, TVS062CA) を用いて 36°C, 45 strokes/min にて約 6 時間振とう培養し，対数増殖後期の菌液を得た．この培養液を 0.1 M 生理食塩リン酸緩衝液 (PBS ; 13 mM NaCl, 30 mM Na₂HPO₄ 無水和物) を用いて 3 回遠心洗浄 (15,000 rpm, 15 分間) し，そのペレットを 100 mL の 0.1 M PBS に再懸濁し 10⁹ CFU/mL の菌液を得た．30 日栽培後の各植物の水耕液に，10⁷ CFU/mL から 10⁸ CFU/mL となるように遠心洗浄 *E. coli* KM1 菌体懸濁液を添加した．*E. coli* KM1 接種直後および 7 日後に水耕液試料を約 1.5 mL 採取し，微生物学的試験に供した．

2-2-3 大腸菌侵入試験

レタス，コマツナ，コネギおよびハウレンソウを約 30 日栽培後，各水耕液に大腸菌 KM1 の洗浄菌体を 10⁵~10⁹ CFU/mL となるように接種し，明期 16 h，

23°C ; 暗期 8 h, 20°C で 4~7 日間曝露した. 各 6 株のうち大きい苗と小さい苗を除いた 3 株を選び, 滅菌したハサミでウレタン製プラグの直上部をカットし, 地上部を得た. 同時に水耕液 1 mL を採取し, 植物体と共に微生物分析に供した.

2-2-4 表面殺菌法

得られた植物体地上部 (1 株当たり, レタスでは 30~60 g, ホウレンソウでは 4.5~7.6 g, コマツナでは 5.5~8.3 g, コネギでは 0.8~1.1 g) を 1L の 80% エタノールに 5 秒間浸漬した後, 水道水で洗浄した. これを, 葉面殺菌液(表 2-3) (Dong ら, 2003) に水没させ 2 分間浸し, その後, 滅菌水約 1 L で葉面殺菌液を約 20 秒間洗い流した. これを滅菌水 1 L に 1 分間浸し洗浄し, さらに新たな滅菌水 1 L で同様に洗浄した. 表面殺菌の成否の判定のために, 2 回目の洗浄に用いた滅菌水を 0.2 μm の滅菌メンブランフィルターでろ過し, このフィルターを乳糖ブイヨン (Lactose Broth, LB, 表 2-4) 培地 5 mL に浸漬し, 36°C で 24 時間増菌培養した. その培養液 100 μL をコリフォームアガー培地 (Coliform Agar, CA, 表 2-5, Merck Millipore) に塗抹接種し, 36°C で 18 時間培養後, 青紫色の増殖で示される大腸菌の有無により表面殺菌の成否を判定した.

2-2-5 細菌および原生動物の定量法

大腸菌 KM1 を接種して 1 時間後 (0 日後) および 4~7 日間経過後の水耕液を約 1 mL 採取し, 滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し, これを繰り返して $10^4\sim 10^6$ 希釈液を得た. これらを下記手順に従い, 希釈平板法による大腸菌の定量, および MPN 法 (早津, 2016) または検鏡法による原生動物の定量に供した.

大腸菌の定量には, 適切と思われる希釈段階 (3 段階) の水耕液希釈液各 100 μL を 3 枚の CA 培地に塗抹接種し, 36°C で 18 時間培養した. 植物体内部へと侵入した大腸菌の検出には, 葉の摩砕液を用いた希釈平板法および増菌培養

法，ならびに切片培養法を用いた．滅菌した乳棒および乳鉢で葉を磨碎し，これを滅菌メスシリンダーに入れ，滅菌生理食塩水を加え全量を 100 mL としたものを葉の摩碎液とした．この一部を希釈平板法に用い，残り（約 99 mL）を LB 培地 90 mL に入れ，36°C で 24 時間増菌培養した．その培養液 100 μ L を CA 培地に塗抹接種し，36°C で 18 時間培養後，青紫色の発色で示される大腸菌の増殖の有無により植物体内への侵入の有無を判定した．植物体の切片の作成には，滅菌したカッターの刃（OLFA）を用いて植物体の茎の部分を薄く切り，15～30 枚の切片を得た．これらを CA 培地上に載せて滅菌ピンセットの先端で圧着し，36°C で 18 時間培養して，青紫色のコロニーが切片内部に検出されたものを大腸菌侵入陽性と判定した．

水耕液中の原生動物の定量には，*Enterobacter cloacae* を餌細菌とした 8 連 \times 6 段階希釈の MPN 法または血球計算盤（A106；Thoma）を用いた検鏡法により測定した．MPN 法では，レタス浸出液を滅菌 96 穴マイクロプレート（イワキ）に 180 μ L ずつ分注し，これに，NB 培地で 36°C，6 時間培養した *E. cloacae* の遠心洗浄菌体懸濁液を 2 μ L 加え， 10^6 CFU/mL とした．ここに水耕液試料希釈液を 20 μ L 加え，20°C で 4 日間暗所にて培養した．各ウェルを位相差倒立顕微鏡（対物 20 倍：Axiovert 135；Zeiss）で観察し，鞭毛虫，繊毛虫，およびアメーバの有無を確認し MPN 法により細胞数を求めた．この検鏡による判別が難しい場合は，そのウェルの培養液 10 μ L をスライドガラス上に滴下し，カバーガラスで封入後，微分干渉顕微鏡（OPTIPHOT-2；Nikon）にて高倍率（対物 40 倍）で検鏡し，判定した．血球計算盤による検鏡法では，試料 20 μ L を血球計算盤に滴下し，カバーガラスで封入後，微分干渉顕微鏡にて高倍率（対物 40 倍）で検鏡し，鞭毛虫，繊毛虫，およびアメーバの細胞数を計数した．

2-2-6 希釈平板法および μ C-FISH 法による大腸菌の測定

ステンレスブレード付のホモジナイザー（AM—II 型日本精機）に水耕液試料（10 mL）および滅菌生理食塩水（0.85% NaCl）95 mL を入れ，15,000 rpm で

15 分間分散処理した．分散した試料を 10 倍段階希釈で 10^{-6} まで希釈した．*E. coli* 数を CA 培地で測定した．それぞれの希釈段階で 3 連で行い， 36°C で 18 h 培養した．青紫色のコロニーを，*E. coli* として計数した．

本研究では，*E. coli* の特異的検出のために，蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法と組み合わせた活性細菌を検出する技術，すなわちマイクロコロニー FISH (μC -FISH) 法を用いた (Wu ら，2009)．各水耕液試料を，白色ポリカーボネートフィルター (孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ ，直径 $25\ \text{mm}$ ，ADVANTEC) でろ過捕集し，1/100 Luria-Bertani 培地 (表 2-6) または普通寒天培地 (Nutrient Agar, NA, 表 2-7, 栄研) 上に置き， 30°C で 16 h 培養した．培養後のフィルターを 4% パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; $130\ \text{mM}$ 生理食塩水， $10\ \text{mM}$ リン酸バッファー [pH 7.4]) を含ませた濾紙上にて 4°C で一晩固定した．固定後，50，80，100% の各濃度のエタノールを含ませた濾紙上に、フィルターを濃度の低い方から順にそれぞれ 5 分間，3 分間，3 分間載せることで脱水処理をした．ES445 プローブ (5'-CTT TAC TCC CTT CCT CCC-3' ; 5' 末端 Cy3 標識，HPLC 精製) (Kenzaka ら，2001) を用いて，*E. coli* のマイクロコロニーを他の常在菌コロニーと区別した．フィルターをスライドグラス上に置き，あらかじめ 48°C に温めておいたハイブリダイゼーションバッファー (HB ; $0.9\ \text{M NaCl}$ ， $20\ \text{mM Tris-HCl}$ [pH7.4]，0.01% SDS，35% ホルムアミド， $1\ \text{ng}/\mu\text{L}$ ES445 プローブ) $100\ \mu\text{L}$ をフィルター上に添加した．乾燥を防ぐために $2\ \text{mL}$ の HB で湿らせたキムワイプを入れた角型シャーレにスライドグラスを置き， 46°C で 15 分間ハイブリダイゼーションした．その後，フィルターを $10\ \text{mL}$ の洗浄液 (WS ; $80\ \text{mM NaCl}$ ， $20\ \text{mM Tris-HCl}$ ， $5\ \text{mM ethylenediaminetetraacetic acid}$ [EDTA] および 0.01% SDS) が入ったプラスチック容器に移し， 48°C で 20 分間洗浄した．このフィルターを濾紙上で乾燥させ，4'-diamino-2-phenylindole (DAPI， $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) $5\ \mu\text{L}$ で 5 分間対比染色した．フィルターを濾紙上で再度乾燥させ，イメージジョンオイルをのせたスライドグラスに載せ，蛍光顕微鏡下で大腸菌のマイクロコロニーを計数 (G 励

起, 510 nm~560 nm, 10 倍対物レンズ), またはマイクロコロニー自動計数システム (MACS, 中央電機計器製作所) を使用して測定した.

2-2-7 原生動物の観察・撮影法

水耕液中の原生動物の観察には, 微分干渉顕微鏡を用いた. 水耕液試料 10 μ L をスライドガラス上に滴下し, カバーガラスで封入後検鏡し, 微分干渉像を高感度デジタルカメラ (Axiocam HRc ; Zeiss) にて撮影した. 鞭毛虫の観察には対物 40 倍, 繊毛虫およびアメーバの観察には対物 20 倍のレンズを用いた.

2-2-8 統計解析

統計ソフト JMP (SAS Institute Inc.) にて, 危険率 5% ($P < 0.05$) で有意差検定した.

2-3 結果および考察

2-3-1 レタス栽培水耕液中の大腸菌および原生動物の動態

大腸菌の植物体内部への侵入を証明するには, 葉の表面に付着している可能性がある大腸菌を殺菌する必要がある. そこでまず, 表面殺菌が完全かレタスを対象に検討した. すなわち, 約 4 週齢のレタス地上部を葉面殺菌後, 3 回目の洗浄液を全て増菌培養に供試して大腸菌の残存の有無を検査した. その結果を, 大腸菌の初発菌密度のレベルごとに取りまとめた (表 2-8). 初発菌密度が 10^9 CFU/mL と高い場合, 表面殺菌の成功率は 2/3 株 (66.7%) と低かったが, 植物体数が少ないため, 他の処理区との有意差は認められなかった. また, 10^8 CFU/mL の場合も 15/28 株 (53.6%) と低く, これは, 10^7 CFU/mL の場合や (9/9 株, 100%), 10^6 CFU/mL の場合 (14/15 株, 93.3%) と比べて有意に低かった ($P < 0.05$). 10^5 CFU/mL では 3/3 株すべて (100%) が表面殺菌に成功したが, 植物体数が少ないため 10^8 CFU/mL 処理区との有意差は認められなかった. このように, 初発菌密度が高い場合には表面殺菌が成功しにくい傾向のあ

ることが判明した。この理由として、大腸菌の暴露中に水耕液からエアロゾルが発生し、初発菌密度が高いほど高濃度に葉面が大腸菌によって汚染される可能性が考えられる。そこで、グロースチェンバー内の落下菌（NA培地、15分間開放）を測定したが、大腸菌は全く検出されなかった。他の要因としては、植物体を保持しているウレタン製プラグが水耕液で常時濡れているため、水耕液中の大腸菌がプラグを介して葉の表面に移動した可能性や、根から内部に侵入した大腸菌が、根をカットした際に切り口から出てきて植物体表面を汚染した可能性が考えられる。いずれの場合でも接種菌密度が高いほど植物体表面の汚染の確率は高くなると想定される。しかし現時点において、表面殺菌が失敗する原因は不明である。そこで、以降では、表面殺菌が成功した場合のみのデータを示す。

大腸菌を希釈平板法および $\mu\text{C-FISH}$ 法により測定したところ、4種類の作物全てにおいて7日間で著しい菌数の減少が観察された（図 2-1）。この時、希釈平板法と $\mu\text{C-FISH}$ 法で得られた菌数の差はほとんどなく、大腸菌密度の急激な減少は、**viable but non-culturable (VNC)** 状態への生理学的変化によって引き起こされたのではないと推測された。 $\mu\text{C-FISH}$ 法の基本となるマイクロコロニー法では VNC 状態にある細菌も検出できる（Binnerup ら、1993）。つまり、VNC 細胞を検出することができる技術である $\mu\text{C-FISH}$ 法によって大腸菌密度の急激な減少が希釈平板法による菌数と変わらないことが判明したため、観察された菌密度の減少は実際の細菌死によるものであると示唆された。

レタス内部へ大腸菌が侵入する閾値を解明するために、約 30 日齢のレタスの水耕液に大腸菌 KM1 を $10^5 \sim 10^9$ CFU/mL となるように接種し、4~7 日間曝露した。レタス内部への大腸菌侵入の判定には、葉面殺菌後の葉を切片培養法に供試し、かつ葉の摩砕物を希釈平板法と増菌培養法に供試した。切片培養法（図 2-2）では、大腸菌コロニーは主に維管束上に観察された。すなわち、葉の基部（図 2-2C）および中位部（図 2-2D）のいずれからでも大腸菌コロニーが維管束上に認められた。このことから、根から侵入した大腸菌は維管束を通り、

地上部まで移行してきたことが明らかであった。維管束が主要な移動経路の一つであることは、*Salmonella enterica* によるピーナツ植物体への侵入で明らかにされている (Deering ら, 2012)。

レタスへの大腸菌侵入試験の結果を表 2-9 に示す。大腸菌の初発菌密度 ($10^5 \sim 10^9$ CFU/mL) に対して、いずれの場合も曝露 4~7 日後の終末大腸菌密度は 3~6 桁も著しく減少した。すなわち、曝露期間を通して大腸菌密度が一定ではなかったことが明らかであった。レタス植物体内部への大腸菌の侵入率は、大腸菌の初発菌密度が低くなるに従って減少する傾向が認められた。すなわち、 10^9 CFU/mL と高い場合には 2/2 株 (100%)、 10^8 CFU/mL では 6/16 株 (37.5%)、 10^7 CFU/mL では 2/9 株 (22.2%)、 10^6 CFU/mL では 2/14 株 (14.3%)、そして 10^5 CFU/mL では 0/3 株 (0%) であった。大腸菌の初発菌密度が高いほど植物体内部への侵入率が高くなる傾向が明らかであり、初発菌密度 10^5 CFU/mL と 10^6 CFU/mL の間に菌侵入の閾値が存在する可能性がある。

レタス栽培中の水耕液中には、アメーバ (図 2-3A)、繊毛虫 (図 2-3B)、および鞭毛虫 (図 2-3C) が観察され、これらを MPN 法または血球計算盤法にて定量した。大腸菌接種前の水耕液中の原生動物の細胞密度は、試験ごとに多少変動したが、表 2-9 に示すようにほぼ $10^3 \sim 10^4$ cells/mL のレベルにあった。淡水 (Hahn および Höfle, 2001 ; Pernthaler, 2005 ; Kanavillil および Kurissery, 2013) および海水 (Hahn および Höfle, 2001 ; Pernthaler, 2005 ; Fenchel, 1982 ; Sherr および Sherr, 2002) のような水環境において原生動物が細菌の捕食者であることはよく知られており、それらの水環境と同様に水耕液中でも原生動物が細菌捕食者として働いていると推察される。

大腸菌曝露期間中に原生動物の密度は、測定した限りではほぼすべて増加した (表 2-9)。初発大腸菌密度 10^8 CFU/mL の際、大腸菌密度は 2~3 日後に 1×10^5 CFU/mL に減少した (図 2-4)。鞭毛虫および繊毛虫密度は、大腸菌接種後 1 日で上昇した。しかし、初発大腸菌密度が低い場合 (10^6 CFU/mL)、大腸菌密度は急激に減少し、5 日後には $2 \sim 4 \times 10^3$ CFU/mL にまで減少した。原生動物は

4~5 日後に出現した (図 2-4).

2-3-2 各種水耕栽培葉菜類への大腸菌侵入

大腸菌がハウレンソウ, コマツナ, およびコネギに侵入する際の閾値を解明するために, 約 30 日齢の上記植物の水耕液に大腸菌 KM1 を $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL の初発菌密度となるように接種し 7 日間曝露した.

ハウレンソウでは (表 2-10), 初発菌密度に関わらず高頻度で大腸菌が内部に侵入した. すなわち, 初発菌密度 10^8 CFU/mL では 9/12 株 (75%), 10^7 CFU/mL では 8/10 株 (80%) で大腸菌の侵入が切片培養や増菌培養で確認された. 終末大腸菌密度は, 初発菌密度 10^8 CFU/mL では $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL, 10^7 CFU/mL では $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL に減少した.

コマツナでは (表 2-11), 初発菌密度 10^8 CFU/mL 大腸菌が 5/7 株 (71.4%) で植物体内部に侵入し, 10^7 CFU/mL では侵入が全く認められず (0/9 株), この差は有意であった ($P < 0.05$). すなわち, コマツナでは 10^7 CFU/mL および 10^8 CFU/mL の間に菌侵入の閾値があることが示唆された. 終末大腸菌密度は, 両区共に大きく減少しており, 特に 10^7 CFU/mL では 10^1 CFU/mL にまで低下していた.

一方コネギでは (表 2-12), 10^8 と 10^7 CFU/mL の初発菌密度で試験したが, いずれの場合でも大腸菌の侵入は確認できなかった (0/18 株). このとき大腸菌密度は初発 10^8 CFU/mL では 10^3 CFU/mL まで減少した.

大腸菌侵入試験の結果を植物種ごとにまとめた (表 2-13). レタスとコマツナでは, 大腸菌の初発菌密度が高いほど植物体内部への侵入率が高くなる傾向が明らかであった. レタスでは, 初発菌密度 10^5 CFU/mL と 10^6 CFU/mL の間に菌侵入の閾値が存在する可能性がある. コマツナでは, 閾値が 10^8 と 10^7 CFU/mL の間に存在する可能性が高い. ハウレンソウでは菌密度 (10^8 と 10^7 CFU/mL) に関わらず植物体内部へと大腸菌が 75~80% の高い頻度で侵入した. したがって, 菌侵入の閾値は 10^7 CFU/mL よりも低いと考えられる. 一方コネ

ギでは、高い初発菌密度 (10^8 と 10^7 CFU/mL) に関わらず大腸菌が植物体内部へ侵入しなかった。これらの結果から、大腸菌の植物体内部への侵入の閾値は、植物種によって大きく異なることが示された。大腸菌が侵入したレタス、ハウレンソウ、およびコマツナは双子葉植物であり、侵入しなかったコネギは単子葉植物という違いがある。両者には維管束の配置や太さ、根の構造等に大きな違いがあり、これらが大腸菌の侵入に影響を及ぼしている可能性も考えられる。しかし、単子葉植物での大腸菌等の侵入に関する報告は本研究を除いてはほとんど見当たらず、知見が極めて少ない。

表 2-1 水耕液の試薬濃度と原液使用量

原液番号	試薬名	原液濃度 (g/L)	調合量 (mL/3 L)
1	NH ₄ H ₂ PO ₄	22.73	10
	NH ₄ Cl	5.53	
2	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	85	16.67
3	KCl	22.48	10
4	KNO ₃	54.56	16.67
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.83	10
微量元素	H ₃ BO ₃	2.96	3
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.8	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.092	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	
	EDTA-Fe		0.04 g/L

表 2-2 普通ブイヨン(NB)培地*の組成

成分	g/L
肉エキス	5
ペプトン	10
塩化ナトリウム	5
pH	7

*栄研

表 2-3 葉面殺菌液の組成

組成	最終濃度
NaClO	0.1 %
PBS	0.2 M
SDS	0.1 %
Tween20	0.1 %
	2 L

表 2-4 乳糖ブイヨン(LB)培地*の組成

成分	g/L
肉エキス	3
ペプトン	10
乳糖	5
ブロムチモールブルー	0.024
	pH 7.2

*栄研

表 2-5 クロモカルトコリフォームアガー(CA)培地*の組成

成分	g/L
ペプトン	3.0
塩化ナトリウム	5.0
リン酸二水素ナトリウム	2.2
リン酸一水素ナトリウム	2.7
ピルビン酸ナトリウム	1.0
トリプトファン	1.0
ソルビトール	1.0
タージトール 7	0.2
発色基質	0.4
寒天	10.0
	pH 6.8

*Merck

表 2-6 1/100 Luria-Bertani 培地の組成*

成分	g/L
トリプトン	0.10
酵母エキス	0.05
塩化ナトリウム	0.10
寒天	15.00
pH	7.20

表 2-7 普通寒天(NA)培地*の組成

成分	g/L
肉エキス	5
ペプトン	10
塩化ナトリウム	5
寒天	15
pH	7

*栄研

表 2-8 異なる初発大腸菌密度でのレタスの表面殺菌の可否

初発大腸菌密度 (CFU/mL)	Run 数	植物株数	表面殺菌成功株数	成功率 (%)	
10 ⁹	1	3	2	66.7	ab
10 ⁸	10	28	15	53.6	b
10 ⁷	3	9	9	100.0	a
10 ⁶	5	15	14	93.3	a
10 ⁵	1	3	3	100.0	ab

異なるアルファベットは有意差を示す ($P < 0.05$, Tukey's HSD test).

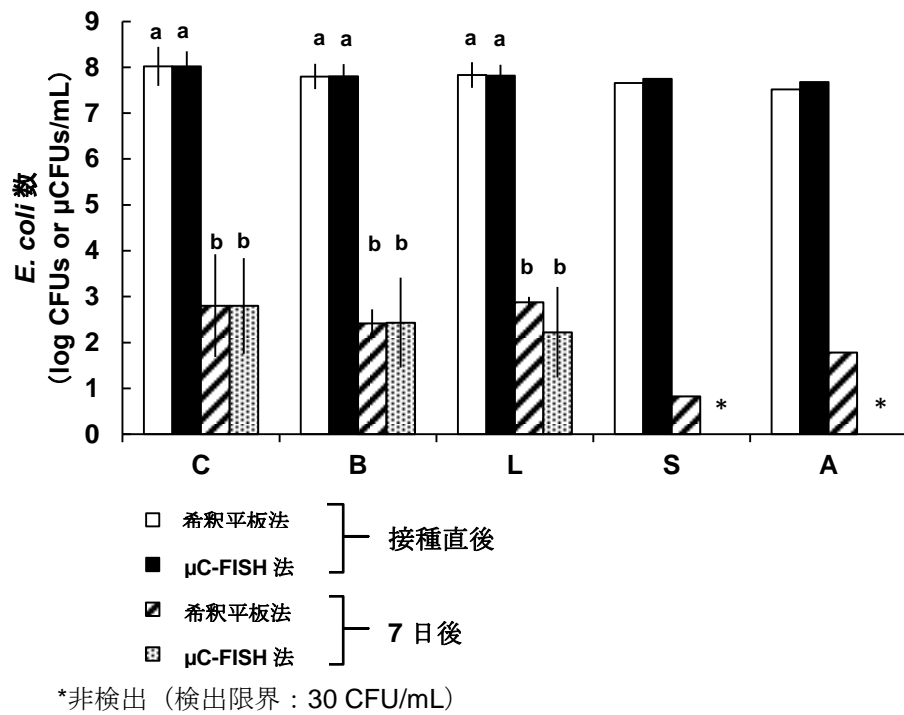


図 2-1 水耕液中の *E. coli* の生残性

C : 対照区 (植物非栽培) , B : *Brassica rapa* var. *perviridis*, L : *Lactuca sativa*, S : *Spinacia oleracea*, A : *Allium fistulosum*. 反復回数 : C, 3 反復 ; B および L, 2 反復 ; S および A, 反復なし.

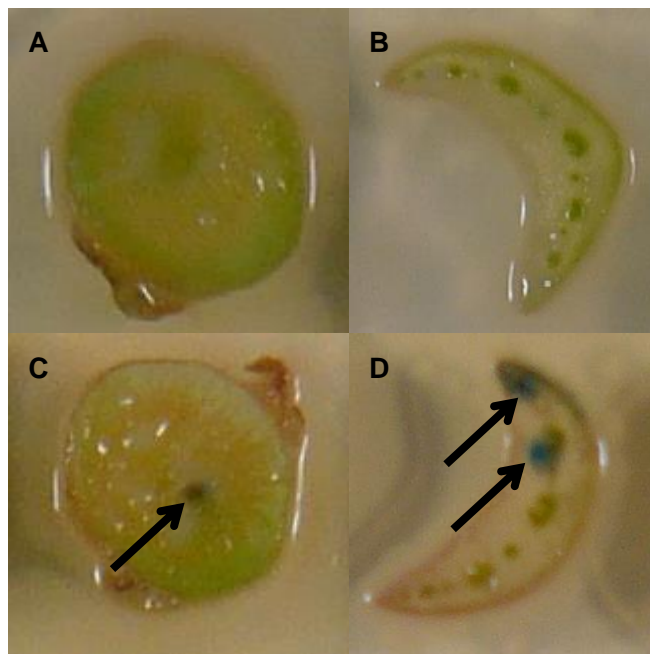


図 2-2 コマツナの切片培養

A および B : *E. coli* を接種していない対照区, C および D : *E. coli* が侵入した切片.

A および C : 茎の下部, B および D : 茎の上部.

矢印は維管束に侵入した *E. coli* のコロニーを示す.

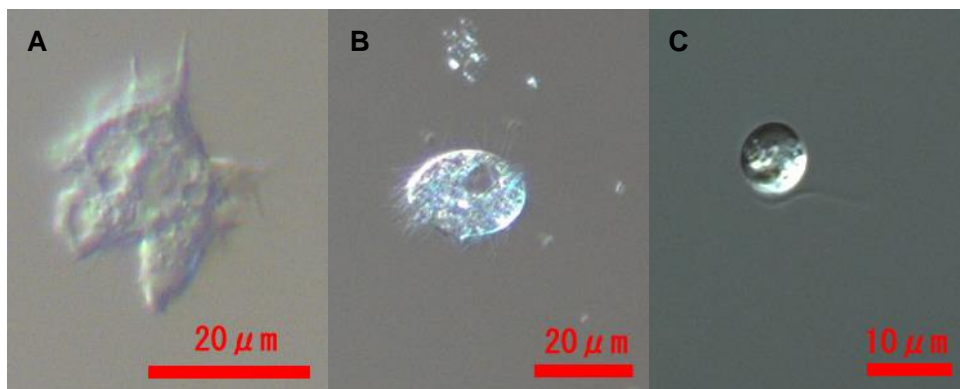


図 2-3 レタス栽培中の水耕液で観察された原生動物.

A : アメーバ, B : 繊毛虫, C : 鞭毛虫

表2-9 異なる菌密度でのレタスへの*E. coli* 侵入

試験No.	暴露日数 (Days)	大腸菌密度(CFU/mL)		原生動物密度		株No.	内部侵入大腸菌の検出			侵入	侵入率(%)
		初発	終末	初発	終末		希釈平板法	増菌培養法 ¹⁾	切片培養法 ²⁾		
1	4	(2.7±0.2)×10 ⁹	(5.3±4.0)×10 ³	N.T. ³⁾	N.T.	1	- ⁴⁾	+	2/18	+	100 a
						2	-	+	2/18	+	
2	5	(2.6±0.3)×10 ⁸	(4.8±0.4)×10 ⁴	<1.0×10 ⁴	9.0×10 ⁴	4	-	+	0/15	+	37.5 ab
						5	-	-	0/15	-	
						6	-	-	0/15	-	
3	5	(2.3±0.4)×10 ⁸	(2.5±0.1)×10 ⁴	<1.0×10 ⁴	<1.0×10 ⁴	7	-	-	0/15	-	22.2 ab
						8	-	-	0/15	-	
						9	-	-	0/15	-	
4	5	(2.0±0.2)×10 ⁸	(2.6±0.7)×10 ²	<1.0×10 ⁴	<1.0×10 ⁴	10	-	+	0/15	+	14.3 b
						12	-	+	0/15	+	
5	7	(6.6±0.0)×10 ⁸	(1.0±0.3)×10 ³	N.T.	N.T.	13	-	-	0/20	-	0 b
						15	-	-	0/20	-	
6	7	(8.1±1.3)×10 ⁸	(2.3±0.0)×10 ²	N.T.	N.T.	16	-	-	0/20	-	0 b
						17	-	-	0/20	-	
						18	-	-	0/20	-	
7	7	(7.2±0.6)×10 ⁸	(2.4±0.5)×10 ³	N.T.	N.T.	19	-	+	2/20	+	0 b
						20	-	+	4/20	+	
						21	-	-	3/20	+	
8	7	(5.9±0.3)×10 ⁷	(1.1±0.4)×10 ²	N.T.	N.T.	22	-	-	3/20	+	0 b
						23	-	-	0/20	-	
						24	-	-	0/20	-	
9	7	(4.5±1.1)×10 ⁷	(1.5±0.6)×10 ²	N.T.	N.T.	25	-	-	0/20	-	0 b
						26	-	-	0/20	-	
						27	-	-	0/20	-	
10	7	(5.1±0.4)×10 ⁷	(2.3±1.5)×10 ¹	N.T.	N.T.	28	-	-	0/20	-	0 b
						29	-	-	0/20	-	
						30	-	-	1/20	+	
11	5	(2.1±0.1)×10 ⁶	(1.8±0.2)×10 ³	<1.0×10 ⁴	1.0×10 ⁴	32	-	+	0/15	+	0 b
						33	-	-	0/15	-	
12	5	(4.7±0.6)×10 ⁶	(3.8±0.4)×10 ³	<1.0×10 ⁴	1.0×10 ⁴	34	-	-	0/15	-	0 b
						35	-	+	0/15	+	
						36	-	-	0/15	-	
13	5	(3.4±0.4)×10 ⁶	(7.4±1.5)×10 ²	4.9×10 ³	1.4×10 ⁴	37	-	-	0/30	-	14.3 b
						38	-	-	0/30	-	
						39	-	-	0/30	-	
14	5	(9.2±1.7)×10 ⁶	(2.3±0.7)×10 ²	2.3×10 ³	7.5×10 ⁵	40	-	-	0/25	-	0 b
						41	-	-	0/25	-	
						42	-	-	0/25	-	
15	5	(2.1±0.2)×10 ⁶	(3.3±5.8)×10 ⁰	1.1×10 ⁴	7.5×10 ³	43	-	-	0/30	-	0 b
						44	-	-	0/30	-	
						45	-	-	0/30	-	
16	4	(1.6±0.2)×10 ⁵	(1.7±1.2)×10 ²	N.T.	N.T.	46	-	-	0/18	-	0 b
						47	-	-	0/18	-	
						48	-	-	0/18	-	

¹⁾ 植物全体の*E. coli*陽性(+)または陰性(-)

²⁾ 陽性切片/全切片

³⁾ 未試験

⁴⁾ 植物全体の0.3%中で*E. coli*陰性

侵入率での異なるアルファベットは有意差があることを示す($P < 0.10$, Tukey's HSD test).

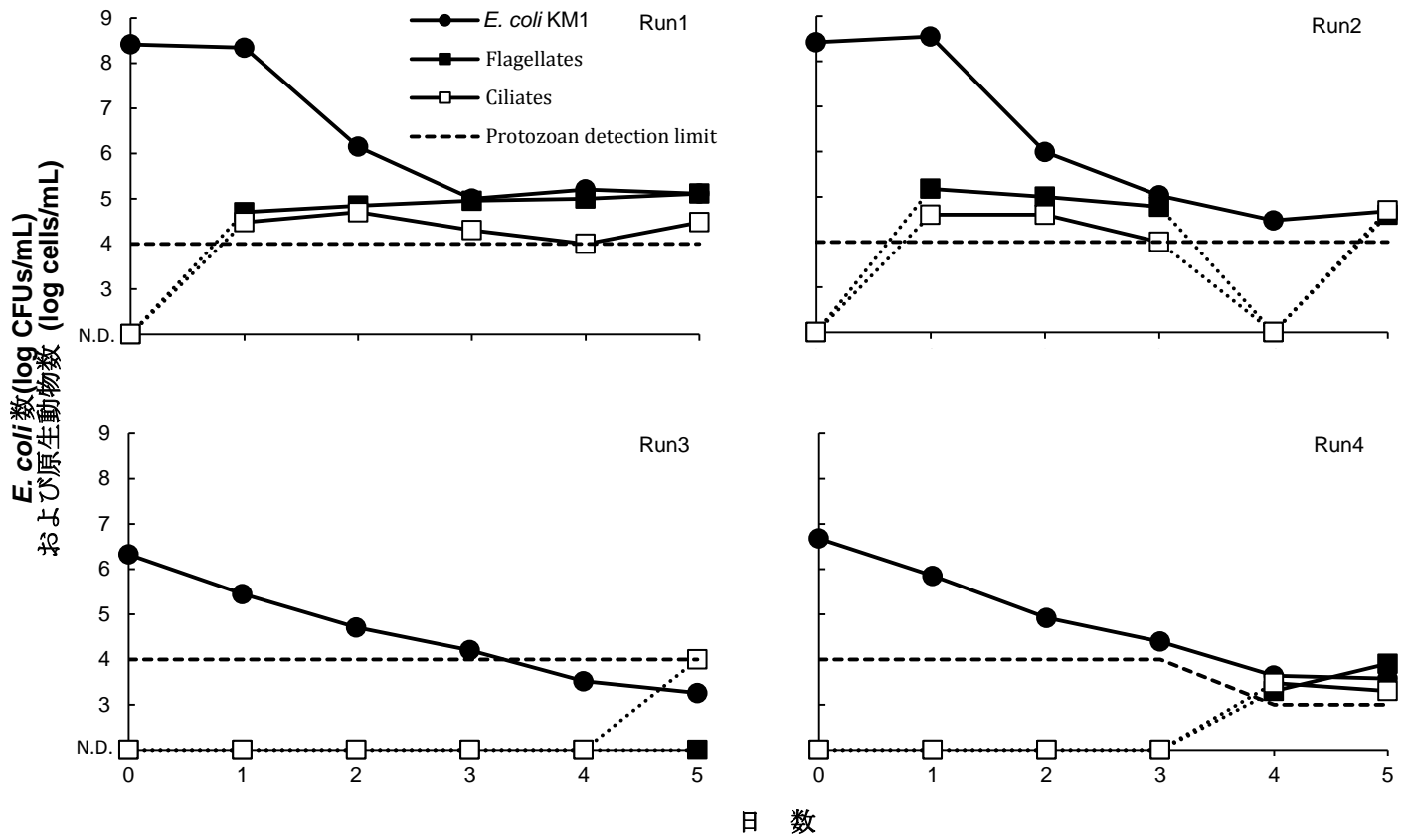


図 2-4 レタス栽培中の水耕液における *E. coli* KM1 および原生動物の動態

表2-10 ホウレンソウへの*E. coli* の侵入

Run	大腸菌密度 (CFU/mL)		株No.	大腸菌の検出			表面殺菌の可否	侵入の可否
	初発	終末		希釈平板法	増菌培養法	切片培養法*		
1	(3.1±0.4)×10 ⁸	(1.3±0.1)×10 ²	1	-	-	1/20	+	+
			2	-	+	5/20	+	+
2	(3.6±0.3)×10 ⁸	(2.4±0.6)×10 ²	5	-	-	5/20	+	+
3	(3.3±0.3)×10 ⁸	(3.2±0.3)×10 ²	7	-	+	3/20	+	+
4	(6.7±0.2)×10 ⁸	(1.5±0.0)×10 ³	10	-	-	4/20	+	+
			12	-	-	0/20	+	-
5	(7.0±0.6)×10 ⁸	(2.5±0.3)×10 ⁴	13	-	+	0/20	+	+
			14	-	-	0/20	+	-
			15	-	-	3/20	+	+
6	(6.8±0.3)×10 ⁸	(1.4±0.2)×10 ⁴	16	-	-	5/20	+	+
			17	-	-	4/20	+	+
			18	-	-	0/20	+	-
7	(3.5±0.4)×10 ⁷	(5.7±3.1)×10 ¹	19	-	+	2/20	+	+
8	(4.0±0.4)×10 ⁷	(4.3±2.1)×10 ¹	24	-	+	0/20	+	+
			25	-	+	0/20	+	+
			26	-	+	3/20	+	+
9	(7.3±1.0)×10 ⁷	(1.2±0.2)×10 ³	27	-	-	3/20	+	+
			28	-	-	0/20	+	-
10	(6.7±0.2)×10 ⁷	(4.1±0.2)×10 ³	29	-	+	3/20	+	+
			31	-	-	1/20	+	+
11	(5.2±0.3)×10 ⁷	(6.0±0.8)×10 ³	32	-	-	2/20	+	+
			33	-	-	0/20	+	-

*陽性切片/全切片

表2-11 コマツナへの*E. coli*の侵入

Run	大腸菌密度 (CFU/mL)		株No.	大腸菌の検出			表面殺菌の可否	侵入の可否
	初発	終末		希釈平板法	増菌培養法	切片培養法*		
1	$(5.4 \pm 1.1) \times 10^8$	$(2.3 \pm 1.1) \times 10^2$	1	-	-	1/20	+	+
			2	-	-	5/20	+	+
2	$(6.2 \pm 0.5) \times 10^8$	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^2$	4	-	-	1/20	+	+
			6	-	-	0/20	+	-
3	$(5.4 \pm 0.2) \times 10^8$	$(4.1 \pm 0.3) \times 10^3$	7	-	-	3/20	+	+
			8	-	-	2/20	+	+
			9	-	-	0/20	+	-
4	$(4.8 \pm 0.3) \times 10^7$	$(4.3 \pm 0.6) \times 10^1$	10	-	-	0/20	+	-
			11	-	-	0/20	+	-
			12	-	-	0/20	+	-
5	$(4.7 \pm 0.4) \times 10^7$	$(2.7 \pm 3.1) \times 10^1$	13	-	-	0/20	+	-
			14	-	-	0/20	+	-
			15	-	-	0/20	+	-
6	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^7$	$(1.0 \pm 1.0) \times 10^1$	16	-	-	0/20	+	-
			17	-	-	0/20	+	-
			18	-	-	0/20	+	-

*陽性切片/全切片

表2-12 コネギへの*E. coli*の侵入

Run	大腸菌密度 (CFU/mL)		株No.	大腸菌の検出			表面殺菌の可否	侵入の可否
	初発	終末		希釈平板法	増菌培養法	切片培養法*		
1	$(4.6 \pm 1.0) \times 10^8$	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^3$	1	-	-	0/20	+	-
			2	-	-	0/20	+	-
			3	-	-	0/20	+	-
2	$(5.2 \pm 0.3) \times 10^8$	$(3.9 \pm 0.6) \times 10^3$	4	-	-	0/20	+	-
			5	-	-	0/20	+	-
			6	-	-	0/20	+	-
3	$(4.9 \pm 0.6) \times 10^8$	$(3.9 \pm 0.2) \times 10^3$	7	-	-	0/20	+	-
			8	-	-	0/20	+	-
			9	-	-	0/20	+	-
4	$(6.2 \pm 0.6) \times 10^7$	$(8.0 \pm 3.6) \times 10^1$	10	-	-	0/20	+	-
			11	-	-	0/20	+	-
			12	-	-	0/20	+	-
5	$(5.8 \pm 0.9) \times 10^7$	$(2.7 \pm 2.1) \times 10^1$	13	-	-	0/20	+	-
			14	-	-	0/20	+	-
			15	-	-	0/20	+	-
6	$(5.3 \pm 0.6) \times 10^7$	$(9.0 \pm 2.6) \times 10^1$	16	-	-	0/20	+	-
			17	-	-	0/20	+	-
			18	-	-	0/20	+	-

*陽性切片/全切片

表2-13 侵入試験のまとめ

植物種	菌密度		植物株数	侵入率 (%)
	初発	終末		
レタス	10 ⁹	10 ³	2	100 a x
	10 ⁸	10 ² -10 ⁴	16	38 a xy
	10 ⁷	10 ¹ -10 ²	9	22 a xy
	10 ⁶	10 ⁰ -10 ³	15	14 a y
	10 ⁵	10 ²	3	0 a y
ハウレンソウ	10 ⁸	10 ² -10 ⁴	12	75 a x
	10 ⁷	10 ¹ -10 ³	10	80 a x
コマツナ	10 ⁸	10 ² -10 ³	7	71 a x
	10 ⁷	10 ¹	9	0 b y
コネギ	10 ⁸	10 ³	9	0 a x
	10 ⁷	10 ¹	9	0 a x

異なるアルファベットは植物間の有意差を示す(aおよびb: $P < 0.05$, xおよびy: $P < 0.10$. Tukey's HSD test).

第3章 原生動物による大腸菌の捕食

3-1 諸言

前章で、様々な葉菜類を栽培中の水耕液に大腸菌を接種すると、数日間で急激に減少するという現象に直面した。これでは、植物体内部への侵入の閾値（菌密度）を正しく求めることができない。そこで、この現象の原因を調べたところ、原生動物が水耕栽培システムにおいて細菌捕食者として存在することを見出した。自然環境中で原生動物が細菌捕食者として働くことはよく知られている。また、自然環境中のみならず浄化槽などの人工環境中においても細菌捕食者として働いていることが報告されている（Chabaud ら, 2006 ; Sibille ら, 1998）。そこで本章では、水耕液に侵入した外来菌を捕食する原生動物の役割を明らかにするため、水耕野菜栽培中の水耕液に接種された大腸菌および常在原生動物集団の動態について、詳細な検討を行った。

3-2 材料および方法

3-2-1 植物の栽培条件

レタス (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) (ちりめんちしゃ, 株式会社トーホク), チンゲンサイ (*B. rapa* subsp. *chinensis* “緑陽”, 株式会社トーホク), およびコマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis* ‘Rakuten’) (楽天, タキイ種苗) を水耕栽培に用いた。ポリウレタン製のプラグ (2.5 × 2.5 × 2.5 cm) 6 個に各植物の種子を 3 個ずつ播種し、2-2-1 と同条件で栽培した。

3-2-2 水耕栽培作物への大腸菌暴露

非病原性 *E. coli* KM1 株を用いた。培養条件は 2-2-2 と同様である。

3-2-3 未除菌およびフィルター除菌した水耕液での大腸菌生残試験

植物栽培後の水耕液を、メンブランフィルターユニット(ポリカーボネート,

ADVANTEC)で濾過し、フィルター除菌水耕液とした。小型 L 字管 (容量 6 mL) に未除菌の水耕液またはフィルター除菌 (孔径 0.2 μm または 1.0 μm) した水耕液を 5.4 mL 入れ、そこに 10^9 CFU/mL の *E. coli* 遠心洗浄菌液 (2-2-2 参照) を 0.6 mL 添加し、30°C で 7 日間インキュベートした。大腸菌接種直後および 7 日後に *E. coli* 数を CA 培地 (表 2-5) にて計測した。

3-2-4 レタス栽培中の水耕液中での大腸菌および原生動物の動態

新鮮 *E. coli* 菌液を、 10^6 または 10^8 CFU/mL となるように 4~5 週齢のレタス栽培中の水耕液に接種し、5 日間経時的に水耕液を採取した。*E. coli* の計数には CA 培地を用い、原生動物の計数には血球計算盤を用い微分干渉顕微鏡で観察した。

3-2-5 蛍光標識細菌の原生動物による捕食の観察

Sherr ら (1987) の方法に従い、*E. coli* の蛍光標識菌体 (Fluorescently labeled bacteria, FLB) を作製した。すなわち、*E. coli* KM1 の新鮮培養菌体を PBS で 3 回遠心洗浄 (15,000 rpm) し、最後に PBS に再懸濁した。再懸濁液 0.9 mL に 5-(4, 6-dichlorotriazin-2-yl) aminofluorescein (DTAF ; 2 mg/mL, SIGMA) を 0.1 mL 加え、この溶液を 60°C で 2 時間インキュベートした。得られた DTAF 染色細胞を PBS で遠心洗浄し、PBS に再懸濁した。

原生動物を増殖させるために、*E. coli* KM1 をレタス栽培直後の水耕液に接種し、30°C で 24 時間インキュベートした。得られた原生動物の培養物 0.5 mL に FLB 懸濁液を 0.5 mL 加え、30 分間インキュベートした。微分干渉顕微鏡にて原生動物の観察をし、蛍光顕微鏡の B 励起 (450~495 nm) で FLB を観察した。

3-2-6 原生動物の形態学的同定

水耕液中で増殖した原生動物を吸引器でフィルター上に捕集し、凍結乾燥お

よびイオンスパッタリングを施した後、従来法に従って走査型電子顕微鏡（SEM, S-3400N, 日立）で観察し、形態学的に同定した。

3-2-7 統計解析

統計ソフト JMP（SAS Institute Inc.）にて、危険率 5%（ $P < 0.05$ ）で有意差検定した。

3-3 結果

3-3-1 水耕液のフィルター除菌による大腸菌への影響

未除菌およびフィルター除菌した各種葉菜類栽培後の水耕液に接種した大腸菌密度を、接種直後および 5 日後に測定した（図 3-1）。未除菌区の大腸菌密度は 5 日間で 10^8 CFU/mL から 2~4 桁減少したが、0.2 μm フィルター除菌区では全く変化しなかった。インキュベーション 5 日後の未除菌水耕液では原生動物が多数観察された（データ示さず）。

未除菌区における急激な大腸菌密度の低下の原因を解明するために、1.0 μm 除菌区も追加し常在菌および原生動物も同時に測定した（図 3-2）。大腸菌接種前の常在菌密度は 1.2×10^7 CFU/mL であり、接種後の大腸菌密度は 3.9×10^7 CFU/mL であった。未除菌区の SA による常在菌および大腸菌の菌密度は 5 日間で 2 桁減少したが、0.2 μm および 1.0 μm 除菌区では全く変化しなかった。大腸菌密度は未除菌区で 3 桁以上低下し、その減少の程度は SA 菌数の場合よりも大きかった。0.2 μm および 1.0 μm 除菌区における大腸菌密度はインキュベーション前後で変化しなかった。原生動物に関しては、未除菌区において鞭毛虫数およびアメーバ数はほとんど変化しなかったが、繊毛虫数が大幅に増加した。原生動物は 0.2 μm において検出されず、1.0 μm 除菌区ではほとんど検出されなかった。

これらの結果から、水耕液中の大腸菌密度減少が、孔径 0.2 μm および孔径 1.0 μm のフィルターで除去できる生物学的因子、すなわち 1.0 μm 以上の微生物

物である原生動物との相互作用によるものであることが示唆された。これはまた、1.0 μm フィルター処理された水耕液中に原生動物がほとんど観察されず、加えて糸状菌や酵母も観察されなかったという結果によっても支持される。

3-3-2 蛍光標識菌体の原生動物による捕食

原生動物が、大腸菌を捕食していることを検証するために、蛍光染色菌体 (FLB) の取り込み試験を行った。原生動物培養物に FLB 懸濁液を接種し、30°C で 30 分間培養した。ほぼすべての繊毛虫および鞭毛虫が、自らの体内いっばいに FLB を取り込んでいることを観察した (図 3-3)。

これらの結果は、水耕液中にて原生動物が短時間で、旺盛に FLB を摂取したことを示している。白川および我孫子 (2001) は、*Cryptotaenia canadensis* subsp. *japonica* (ミツバ)、リーフレタス、およびバターヘッドレタス栽培中の水耕液に接種した大腸菌が本研究と同様に減少することを報告しているが、大腸菌減少の原因について言及していない。水耕液中に原生動物が存在していることに注目した報告は筆者の知る限り存在しない。本研究は、水耕液中の外来菌の動態に対して原生動物が重要な役割を担うことを報告した初めてのものである。

3-3-3 大腸菌および原生動物のバイオボリューム

原生動物による大腸菌捕食量の収支を明らかにするため、未除菌水耕液中の大腸菌および原生動物のバイオボリュームを画像解析にて測定した (表 3-1)。大腸菌の単細胞のバイオボリュームは $0.39 \mu\text{m}^3$ で、鞭毛虫、アメーバ、および繊毛虫のバイオボリュームはそれぞれ大腸菌の 100 倍、3,300 倍、および 5,600 倍であった。各個体群集のバイオボリュームは、それぞれの単細胞バイオボリュームにそれぞれの細胞密度を掛けて推定した。大腸菌バイオボリュームは 5 日間のインキュベーション中に $1.5 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ 減少したが、全原生動物バイオボリュームは $1.3 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 増加した。全原生動物バイオボリュームの増加は、

大腸菌のバイオボリュームの減少の約 8.7%に相当した。鞭毛虫のバイオボリュームはマイナスで、アメーバはややプラスであった。繊毛虫バイオボリュームの増加 ($1.2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) が原生動物の全バイオボリュームの増加に最も寄与したことは注目に値する。これらの結果から、大腸菌は、鞭毛虫、アメーバ、繊毛虫の三者に捕食されたが、繊毛虫により鞭毛虫の捕食も生じ、最終的に繊毛虫のバイオボリュームが原生動物全体の大部分を占めるに至ったものと考えられる。

本研究で得られた大腸菌および各原生動物の単細胞バイオボリュームは、以前の研究ですでに得られている値 (Rogerson ら, 1994 ; Tiffany ら, 2007) とほぼ一致している。本研究では、全原生動物バイオボリュームの増加量は、大腸菌バイオボリュームの減少量の約 9%に相当した。Scott (1985) によると、被捕食者-捕食者の関係における繊毛虫の増殖/捕食効率は 4.9~11%であり、本研究で得られた値は、これとほぼ一致する。したがって、水耕液に接種した大腸菌減少の原因が原生動物の捕食によるものであることを強く支持する。

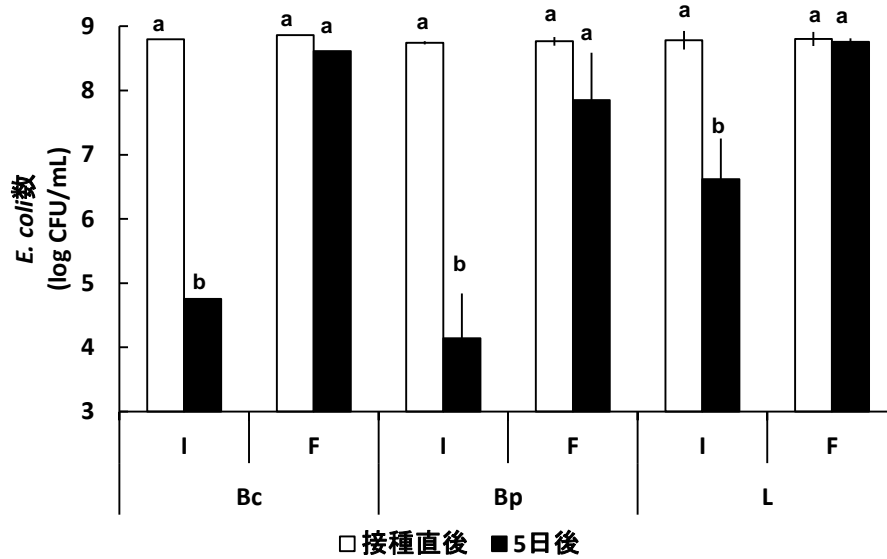


図 3-1 植物栽培後の未除菌 (I) および 0.2 μm 除菌 (F) した水耕液中での *E. coli* の生残性 Bc: *Brassica rapa* subsp. *chinensis*, Bp: *B. rapa* var. *perviridis*, L: *Lactuca sativa*
 反復回数: Bc, 反復なし; Bp, 2 反復; L, 3 反復.

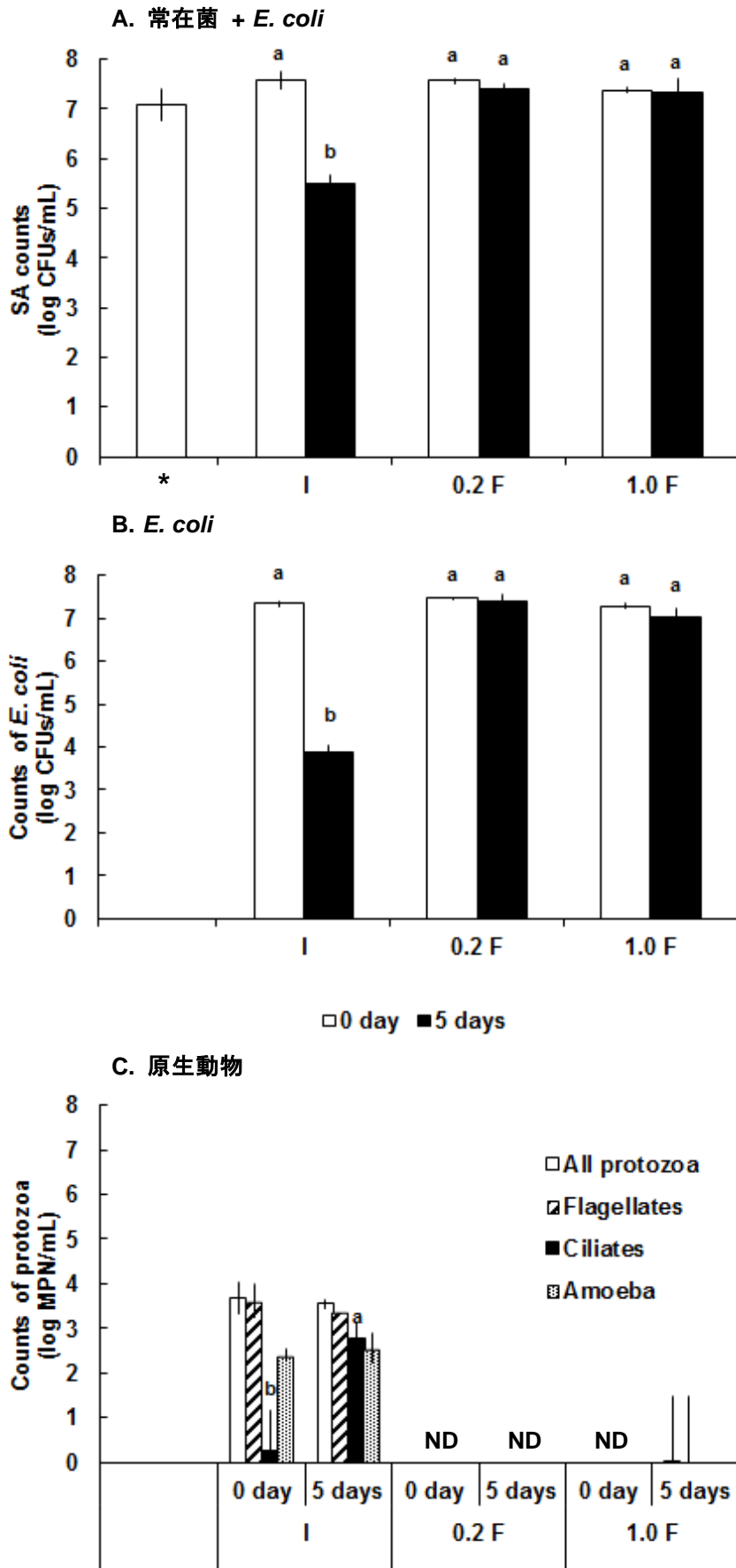


図 3-2 レタス栽培後の未除菌 (I), 0.2 μm 除菌 (0.2F), および 1.0 μm 除菌 (1.0F) した水耕液に接種した *E. coli* の生残性

* *E. coli* 接種前の常在菌数. ND : 非検出 (< 5 MPN/mL). 全ての実験は 3 反復した.

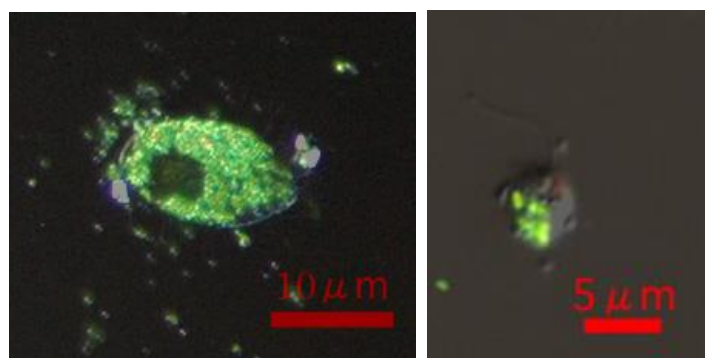


図 3-3 蛍光染色菌体を取り込んだ原生動物細胞
左：繊毛虫；右：鞭毛虫

表 3-1 未除菌水耕液中の *E. coli* および原生動物のバイオボリューム (μm^3)

	単一細胞		個体群		5 日間での 差異
	バイオボリューム*	比率	0 day	5 days	
<i>E. coli</i>	0.39±0.14	1	1.5×10^7	3.0×10^3	-1.5×10^7
全原生動物			5.1×10^5	1.8×10^6	1.3×10^6
鞭毛虫	$(3.9 \pm 1.4) \times 10^1$	100	1.6×10^5	9.1×10^4	-7.1×10^4
アメーバ	$(1.3 \pm 0.38) \times 10^3$	3,300	3.5×10^5	4.8×10^5	1.3×10^5
繊毛虫	$(2.2 \pm 1.2) \times 10^3$	5,600	3.9×10^3	1.2×10^6	1.2×10^6

*それぞれの生物で 30 細胞を画像解析に用いた.

第4章 水耕液中の原生動物を抑制する薬剤の検討

4-1 諸言

前章までに水耕液に実験的に大腸菌を接種すると、水耕液中の大腸菌密度が数日間で著しく減少すること、および水耕液中に接種した大腸菌が水耕液に存在する原生動物によって捕食されることを見出した。さらに、原生動物の捕食により大腸菌密度が減少するため、植物内部への大腸菌侵入の可否に影響を与え、侵入の閾値（菌密度）の測定が正確にできないことが判明した。したがって、閾値の解明には原生動物の捕食作用を抑制して実験する必要がある。しかし、現在のところ、その有効な方法は見出されていない。そこで本章では、文献調査に基づき抗原生動物薬（表 4-1）の中からメトロニダゾールおよびピランテルパモ酸塩を選択し、原生動物への増殖抑制の効果を検討した。

メトロニダゾールは、トリコモナス膣炎や細菌性膣症に対して効果がある薬剤である（富士製薬工業株式会社，2015）。その作用機序は次の通りである。1）酸化還元系によって還元を受け、ニトロソ化合物（R-NO）へと変化し、このR-NOにより抗原虫作用および抗菌作用を示す。2）反応の途中で生成したヒドロキシラジカルがDNAを切断し、DNAらせん構造の不安定化を招く（富士製薬工業株式会社，2015）。我々がメトロニダゾールを選択した理由は、作用機序が明らかになっていることに加え植物体への影響が少ないと期待されたためである。

一方、ピランテルパモ酸塩は、回虫、鉤虫、蟯虫、および東洋毛様線虫に効果があり、水耕液中の原生動物にも効果が期待できること、また、マウスへの経口投与での急性毒性が $> 24,000 \text{ mg/kg}$ と非常に低いため（佐藤製薬株式会社，2014）、植物に対する安全性にも問題ないと考えられたためである。さらに、メトロニダゾールとピランテルパモ酸塩を組み合わせた場合、ランブル鞭毛虫に対する効果が向上したという報告がある（Hausenら，2010）。しかし、ピランテルパモ酸塩は水への溶解度が極めて低いため、ジメチルスルホキシド

(Dimethyl sulfoxide, DMSO) に一旦溶解させる必要がある。そのため、水耕液に使用する場合に、DMSO が大腸菌およびレタスに悪影響を及ぼすかどうかについても検討した。

4-2 材料および方法

4-2-1 供試薬剤

抗原生動物薬であるメトロニダゾール (図 4-1, Sigma-Aldrich) およびピラントールパモ酸塩 (図 4-2, 和光) を供試した。

4-2-2 供試原生動物

供試原生動物として、水耕液から分離・純化した繊毛虫 *Colpoda* sp. および鞭毛虫 *Stramenopiles* を用いた。*Colpoda* sp. と *Stramenopiles* の形態をそれぞれ図 2-3B, 図 2-3C に示す。

4-2-3 原生動物のメトロニダゾールに対する感受性試験

メトロニダゾール水溶液の調製方法を図 4-3 に示す。滅菌した脱イオン水 100 mL に対してメトロニダゾール 0.5 g を無菌的に添加，混合溶解した。それをメンブランフィルター（孔径 0.2 μm ）で濾過除菌後，供試した。原生動物のメトロニダゾールに対する感受性試験法を図 4-4 に示す。各原生動物をレタス浸出液 1.8 mL に接種し，20°C で 5 日間前培養した。前培養液（最終原生動物密度 10^4 cells/mL）および大腸菌（最終菌密度 10^6 CFU/mL）をメトロニダゾール溶液（最終濃度 0, 100, 250, 500, 1,000 mg/L）が入った小試験管に全量 2 mL となるように接種し（表 4-2），レタスの栽培環境と同一にするため，グロースチェンバー内で（明期 23°C, PPFD 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 暗期 20°C, 湿度 70%, 日長 16 時間）にて 48 時間インキュベーションした。インキュベーション後の各試料 10 μL をスライドグラスにとり，カバーグラスで封入後，微分干渉顕微鏡の対物 10 倍もしくは 20 倍で鞭毛虫および繊毛中の運動性の有無を観察した。

スライドグラス 1 枚中の全ての原生動物（約 30 個体以上）の運動性がなかった場合には，効果ありと判定した。

4-2-4 原生動物のピランテルパモ酸塩に対する感受性試験

4-2-4-1 DMSO が大腸菌の生存に及ぼす影響試験

大腸菌 KM1 遠心洗浄菌体を 10 倍希釈し，L 字管に水耕液，DMSO を種々の量添加し，そこへ大腸菌液を 60 μ L 添加した（表 4-3）。バイオフィトレコーダーを用いて 36°C, 45 rpm, 5 日間振とう培養した。経時的にこの溶液を採取し，CA 培地による希釈平板法（36°C, 18 時間）に供試し，大腸菌数を計測した。

4-2-4-2 DMSO が大腸菌の増殖に及ぼす影響試験法

大腸菌 KM1 遠心洗浄菌体を 10 倍希釈し，L 字管に NB 培地，DMSO を種々の量添加し，そこへ大腸菌液 60 μ L 添加した（表 4-4）。バイオフィトレコーダーを用いて 36°C, 45 rpm, 6 時間振とう培養した。培養後の溶液を，バイオフィトレコーダーのそれぞれの増殖曲線および，培養液の状態を目視で判定した。

4-2-4-3 DMSO がレタスの生育に及ぼす影響試験

播種から 22 日後，実生 3 株を実容積 500 mL の水耕装置に移植し，DMSO を最終濃度が 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5%となるように水耕液に添加した。その後レタスを 8 日間栽培し，DMSO がレタスの生育に影響を及ぼすか，その濃度および日数を検討した。

4-2-4-4 原生動物のピランテルパモ酸塩に対する感受性試験

ピランテルパモ酸塩 DMSO 溶液の調製手順を図 4-5 に示す。5 mL の DMSO に対してピランテルパモ酸塩を 250 mg 添加，混合し，供試した。原生動物のピランテルパモ酸塩感受性試験の手順については以下のとおりである（図 4-6）。各原生動物を上記（4-2-3）の条件で前培養，培養液 200 μ L をレタス浸出液 1.8

mL に接種し、20°C で 5 日間前培養した。前培養液を血球計算盤に 100 μ L 滴下し、カバーガラスで圧着後、微分干渉顕微鏡の対物 10 倍で検鏡し、原生動物数を計測した。レタス浸出液を用いて培養液を 10 倍および 100 倍希釈し、小試験管に水耕液、ピランテルパモ酸塩液 (0, 10, 25, 50, 100 mg/L) を添加し、そこへ各原生動物液または希釈液を添加した (表 4-5)。このとき、薬剤の溶解性の制約から、濃度上限は 100 mg/L に設定した。これを 20°C, 4 日間インキュベーションした。原生動物の接種 0, 1, 2, 3, 4, 日の培養液を採取し、MPN 法で原生動物を計測した。培養液 20 μ L を、マイクロチューブ (1.5 mL 容, アズワン) に入ったレタス浸出液 180 μ L を用いて適宜希釈した。96 穴ウェルプレートにレタス浸出液 160 μ L と大腸菌 KM1 液 (最終濃度 10^6 CFU/mL) 20 μ L を接種し、そこに培養液原液または希釈液を 8 連ずつ接種した。このプレートを 20°C, 4 日間インキュベーション後、倒立顕微鏡の対物 10 倍でウェルプレートを検鏡した。ウェル内に原生動物が存在していれば陽性とし、そのウェル数から MPN 表を用いて原生動物を定量した。

4-2-5 植物の栽培およびメトロニダゾール存在下での大腸菌曝露試験

レタスの栽培をグロースチェンバー内で行なった。ウレタンマット (2.5 \times 2.5 \times 2.5 cm) に供試作物を播種し、グロースチェンバー内 (明期 23°C, PPFD 300 μ mol/m²/s, 暗期 20°C, 湿度 70%, 日長 16 時間) で約 10 日間育苗した。

播種から 13 日後に水耕液 6 L 入りの水耕装置に実生 6 株を移植、栽培した。播種から 22 日後に水耕液 1 L 入りの水耕装置に移植し、水耕液にメトロニダゾールを無添加、最終濃度 500 mg/L または 1,000 mg/L となるように添加した。栽培期間中は水耕液を 1 週間毎に交換した。播種から 25 日後に初発菌数が 10^6 CFU/mL となるように大腸菌液を水耕液に接種し、5 日間曝露した。小型の水耕栽培装置 (水耕液 1 L 入り) でのレタス栽培の様子の一例を図 4-7 に示す。

4-2-6 水耕液中の微生物の経時的変化の測定

4-2-6-1 大腸菌定量法

水耕液を 1 mL ずつ経時的に採取し，滅菌生理食塩水 1.8 mL に加えて適宜希釈した．その後，CA 培地（表 2-5）3 連に 100 μ L ずつ塗末接種し，36°C で 18 時間培養した後，大腸菌密度を求めた．

4-2-6-2 原生動物定量法

2-2-5 と同様の手順で行った．

4-2-7 葉面殺菌および洗浄

植物収穫後，2-2-4 と同様の手順で行った．

4-2-8 植物内の大腸菌検出

2-2-5 と同様の手順で行った．

4-2-9 原生動物の混合薬剤に対する感受性試験

4-2-9-1 混合薬剤がレタスの生育に及ぼす影響試験

供試作物の栽培は 4-2-4 と同様の手順で行った．播種から 25 日後，新たな水耕液に換え，そこに DMSO，メトロニダゾールおよびピランテルパモ酸塩を最終濃度が，それぞれ，0.05%，500 mg/L，25 mg/L となるように水耕液に添加した（表 4-6）．その後レタスを 5 日間栽培し，混合薬剤がレタスの生育に影響を及ぼすか，その濃度を検討した．

4-2-9-2 混合薬剤が大腸菌の生存に及ぼす影響試験

大腸菌 KM1 遠心洗浄菌体を 10 倍希釈し，滅菌した中試験管に水耕液，ピランテルパモ酸塩およびメトロニダゾールを種々の量添加し，そこへ大腸菌液を 600 μ L または 800 μ L 添加した（表 4-7）．20°C，5 日間インキュベーションし

た。経時的にこの溶液を採取し、CA 培地による希釈平板法（36°C，18 時間）に供試し、大腸菌数を計測した。

4-2-9-3 原生動物の混合薬剤に対する感受性試験

各原生動物をレタス浸出液で 20°C，2 日間前培養し、培養液を 100 倍希釈した。滅菌した中試験管に水耕液，DMSO，メトロニダゾールおよびピランテルパモ酸塩を添加し，そこへ各原生動物希釈液（最終原生動物密度が 5.5×10^1 MPN/mL 以下となる）を接種した（表 4-8 および表 4-9）。これを 20°C，5 日間インキュベーションした。経時的にこの溶液を採取し，原生動物数を MPN 法で定量した。

4-2-10 統計解析

統計ソフト JMP（SAS Institute Inc.）にて，危険率 5%（ $P < 0.05$ ）で有意差検定した。

4-3 結果

4-3-1 原生動物のメトロニダゾールに対する感受性

メトロニダゾールは最終濃度 500 および 1,000 mg/L の添加により繊毛虫および鞭毛虫の運動を抑制した（表 4-10）。この結果，原生動物の捕食作用を抑制できると期待できたため，大腸菌曝露試験に用いた。

4-3-2 DMSO が大腸菌の生存および増殖に及ぼす影響

DMSO を 0～10%の濃度で水耕液に添加し，大腸菌 KM1 を接種して 5 日間インキュベートした。その結果，曝露期間中の大腸菌数にほとんど変化は見られなかった（表 4-11 および図 4-8）。10%DMSO でも影響を受けずに生存した。

しかし，NB 培地に DMSO を 5%および 10%添加した場合，増殖曲線が他の濃度の時と比較して遅延し（図 4-9），目視で確認しても培養液の濁度が薄かつ

た（図 4-10）. このことから、DMSO を培地に 5%以上添加すると大腸菌の増殖に影響を及ぼすことが判明した.

以上の結果から、DMSO 5%以上の濃度の場合には大腸菌の増殖に影響があることが明らかとなった. DMSO は細胞機能を阻害することが指摘されていることから（内田ら, 2011）, 供試条件下では、DMSO の最終濃度が 5%以上の場合、大腸菌の増殖機能に対して阻害をもたらすと考えられる.

4-3-3 DMSO がレタスの生育に及ぼす影響

すべての試験区の生育状況を写真に示す（図 4-11～4-16）. DMSO 添加区において、DMSO 添加 3～5 日後にレタスの葉の周辺部が枯れるか、もしくはレタス自体が枯死した（図 4-12～4-16）. その程度は DMSO 濃度に依存しており、1～5%ではレタスが枯死し、0.5%以下では葉の周辺部のみが枯れた.

以上のことから、DMSO を水耕液に 0.1%以上添加するとレタスに多少とも影響を及ぼすことが判明した.

4-3-4 原生動物のピランテルパモ酸塩に対する感受性

繊毛虫の初発濃度が 10^2 MPN/mL の場合でのみ、ピランテルパモ酸塩が 100 mg/L で薬剤添加 1 時間後に検出限界値 (5.5×10^1 MPN/mL) 以下となり、増殖抑制効果がみられた（表 4-12 および図 4-17）. しかし、初発濃度 10^3 MPN/mL 以上の場合は、ピランテルパモ酸塩が 100 mg/L でも増殖抑制効果はなかった.

鞭毛虫の初発濃度が 10^3 MPN/mL および 10^4 MPN/mL の場合において、ピランテルパモ酸塩が 100 mg/L で薬剤添加 1 時間後に検出限界値 (5.5×10^1 MPN/mL) 以下となり、増殖抑制効果がみられた（表 4-13 および図 4-18）. 初発濃度 10^5 MPN/mL 以上の場合は、ピランテルパモ酸塩が 100 mg/L でも増殖抑制効果はなかった.

以上の結果から、原生動物密度がある程度低くないとピランテルパモ酸塩の

効果が出ないことが判明した。このため、大腸菌曝露試験には実用性がないことが判明したため、大腸菌曝露試験には用いないこととした。

4-3-5 植物の重量

4-3-5-1 メトロニダゾール無添加の場合の植物の重量

30日間の栽培でレタスの重量は15～26 gであった（表 4-14）。このことから、実容積 1 L の水耕装置でもレタスが十分に生育することが判明した。

4-3-5-2 メトロニダゾールを添加した場合の植物の重量

2回の試験において、レタスの重量は9～23 gと、かなりばらつきがあったが（表 4-15）、レタスの外観についても変化がなかったことから、試験を行う上では支障はなかった。

メトロニダゾール 1,000 mg/L 添加した場合、2回の試験においてレタスの葉の周辺部が枯れ、レタスの秤量および大腸菌侵入の分析ができなかった（データ示さず）。このため、メトロニダゾールを供試する場合は最終濃度 500 mg/L が限界だと考えられる。

4-3-6 水耕液中の微生物の経時的変化

4-3-6-1 メトロニダゾール無添加の場合の微生物の経時的変化

2回の試験において大腸菌が5日間で 10^6 CFU/mL から $10^0 \sim 10^2$ CFU/mL へ4～6桁減少した（表 4-16 および図 4-19）。第1回試験では原生動物数は5日間で $10^2 \sim 10^3$ MPN/mL から $10^4 \sim 10^5$ MPN/mL へ1～3桁増加しており、第2回試験では鞭毛虫数のみ一時、 10^3 MPN/mL から 10^4 MPN/mL へ1桁増加した。これらのことから、大腸菌が原生動物によって捕食されたと考えられる。

4-3-6-2 メトロニダゾールを添加した場合の微生物の経時的変化

メトロニダゾールを 500 mg/L となるように水耕液に添加した場合、2回の試

験において、どちらも大腸菌数は 10^6 CFU/mL から $10^1 \sim 10^2$ CFU/mL へ 4~5 桁減少した (表 4-17 および図 4-20)。また、原生動物の増殖はほぼ認められなかったが減少はしなかった。しかし、大腸菌が減少したことから、メトロニダゾール 500 mg/L では原生動物の捕食作用を抑えられないことが判明した。

メトロニダゾールを 1,000 mg/L となるように水耕液に添加した場合、2 回の試験において大腸菌数は 10^6 CFU/mL から $10^1 \sim 10^2$ CFU/mL へ 4~5 桁減少した (表 4-17 および図 4-21)。どちらの試験においても鞭毛虫数は $10^2 \sim 10^3$ MPN/mL を維持しほぼ一定で、5 日後に 1~2 桁増加した。繊毛虫数は 10^2 MPN/mL から 10^4 MPN/mL へ 2 桁増加した。よって、原生動物によって大腸菌が捕食されたと考えられる。以上のことから、メトロニダゾール最終濃度 1,000 mg/L でも、原生動物による大腸菌捕食作用を抑制できないことが判明した。

メトロニダゾール最終濃度 500 mg/L 以上で原生動物の運動性を抑制した (表 4-10)。しかし、大腸菌曝露試験においては、原生動物による捕食作用を抑制できなかった。メトロニダゾールはトリコモナス症に有効な薬剤であり、66 株の *Trichomonas vaginalis* に対する試験では $0.0625 \mu\text{g/mL} \sim 1 \mu\text{g/mL}$ で殺菌的に作用したという報告がある (Jennison ら, 1961)。メトロニダゾールは嫌気的環境の方が細胞に取り込まれやすいという報告があり (Müller および Lindmark, 1976)、上述の *T. vaginalis* も嫌気性原生動物である。そのため、好気的な環境である水耕栽培液中では、細胞への浸透性が低下し、薬効が弱まったと考えられる。

4-3-7 植物体内への大腸菌侵入の有無

4-3-7-1 メトロニダゾール無添加の効果

2 回の試験において大腸菌の侵入は認められなかった (表 4-18)。これは、原生動物の捕食により終末大腸菌密度が $10^0 \sim 10^2$ CFU/mL までに減少する条件下では侵入できないためだと考えられる。

4-3-7-2 メトロニダゾール添加の効果

メトロニダゾール 500 mg/L の場合では、2 回の曝露試験の全ての植物株において、大腸菌の侵入は認められなかった（表 4-19）。これは、原生動物の捕食により、大腸菌が著しく減少したことが原因だと考えられた。一方、メトロニダゾール 1,000 mg/L の場合では、2 回の曝露試験においてレタスの葉の周辺部が枯死したため大腸菌侵入の分析ができなかった。1,000 mg/L のメトロニダゾールでも原生動物の捕食作用を抑制できなかったことから、メトロニダゾールの最終濃度をこれ以上上げることは困難であり、供試の条件ではメトロニダゾールが有効ではないと判断した。

4-3-8 混合薬剤がレタスの生育に及ぼす影響

混合薬剤および DMSO 無添加の場合のレタスの様子を図 4-22、DMSO を 0.05% 添加した場合のレタスの様子を図 4-23、混合薬剤を添加した場合のレタスの様子を図 4-24 に示す。前述のように DMSO を水耕液に 0.1% 以上添加するとレタスに多少とも影響を及ぼすことが判明した（図 4-12）が、DMSO を最終濃度が 0.05% を添加した場合および混合薬剤を添加した場合において、対照区と変わらず正常に生育した（図 4-23）。同様の DMSO 濃度となる混合薬剤を添加した場合においても、対照区と変わらず正常に生育した（図 4-24）。これにより、メトロニダゾール最終濃度 500 mg/L およびピランテルパモ酸塩最終濃度 25 mg/L を添加した水耕液中ではレタスが十分に生育することが判明した。

4-3-9 混合薬剤が大腸菌の生存に及ぼす影響

in vitro における混合薬剤を添加した水耕液中の大腸菌数の経時的变化を表 4-20 および図 4-25 に示す。第 1 回試験では、全ての区において 5 日間で 10^7 CFU/mL をほぼ維持しており、全ての試験区において有意差は見られなかった。第 2 回試験では対照区と混合薬剤 1/4 濃度区では有意差がなかったが、対照区と混合薬剤 1/4 濃度区の両区と混合薬剤 1/1 濃度区では有意差があった。しか

し、全ての区において、大腸菌数が 5 日間で 10^7 CFU/mL を維持したことから、供試する上では影響がないと判定した。

以上のことから、メトロニダゾール（最終濃度 500 mg/L）とピランテルパモ酸塩（最終濃度 25 mg/L）の混合薬剤は大腸菌の生存に影響がないことが判明した。

4-3-10 混合薬剤が原生動物の生存に及ぼす影響

繊毛虫については、2 回の試験の全ての区において、検出限界 (5.5×10^1 MPN/mL) 以下から 10^3 MPN/mL へと 2 ケタ増加した(表 4-21 および図 4-26)。鞭毛虫も同様に、2 回の試験の全ての区において、検出限界 (5.5×10^1 MPN/mL) 以下から 10^5 MPN/mL へと 4 ケタ増加した(表 4-21 および図 4-27)。最終濃度 500 mg/L のメトロニダゾールを添加した生理食塩水中で 48 時後に原生動物の運動性が抑制された。一方混合薬剤では、特に鞭毛虫において、混合薬剤を水耕液に添加して 24 時間後(1 日後)までは菌数が検出限界 (5.5×10^1 MPN/mL) 以下を維持しており、増殖を抑制できていた。この差は、標的細菌である大腸菌の菌密度の違いであると考えられる。本実験の最終大腸菌密度は、第 3 章の試験よりも 3 桁多い 10^7 CFU/mL だった。よって、メトロニダゾールに耐性を持つ原生動物がより速やかに増殖したと考えられる。

混合薬剤が効かなかった理由としては、混合薬剤の有効性を報告した先行研究では (Hausen ら, 2010)、メトロニダゾールよりもピランテルパモ酸塩の方が多量に使用されていた。本研究では DMSO の植物体に対する悪影響を考慮してピランテルパモ酸塩よりもメトロニダゾールの方が多量であり、混合する際の各薬剤の濃度の差異が関係している可能性も考えられる。

以上のように、種々の検討結果から、メトロニダゾール(最終濃度 500 mg/L) とピランテルパモ酸塩 (最終濃度 25 mg/L) を単独使用しても混合薬剤として使用しても、使用可能な濃度範囲では繊毛虫および鞭毛虫の増殖を抑制できないことが判明した。

表4-1 検討した薬剤

化合物名	対象
ピランテルパモ酸塩	回虫・鉤虫・蟯虫
メベンダゾール	鞭虫症
ジエチルカルバマジンクエン酸塩	フィラリア
サントニン	回虫
イベルメクチン	腸管糞線虫症, 疥癬
プラジカンテル	肝吸虫症・肺吸虫症, 横川吸虫症
アルベンダゾール	包虫症
メトリホネート	住血吸虫症
オキサムニキン	抗住血吸虫薬
ニコロサミド	条虫(特にサナダムシ)
クロロキン	抗マラリア薬, 抗アメーバ薬
スルファドキシシン・ピリメタミン	抗マラリア薬
キニーネ塩酸塩水和物(塩酸キニーネ)	マラリア
メフロキン塩酸塩	マラリア
アトバコン・プログアニル塩酸塩	マラリア
アルテミシニン	抗マラリア薬
プリマキン	抗マラリア薬
メトロニダゾール	抗菌薬, 抗原虫薬, DNA合成阻害薬, トリコモナス症, 細菌性膣症, <i>Helicobacter pylori</i> 感染症, アメーバ赤痢, ランブル鞭毛虫感染症, <i>Clostridium difficile</i> による感染性腸炎, 偽膜性大腸炎など
チニダゾール	抗原虫薬, トリコモナス症
スピラマイシン酢酸エステル	抗生物質, 梅毒, 猩紅熱
スルファメトキサゾール・トリメトプリム	抗菌薬, 腸チフス, パラチフス, ニューモシスチス肺炎, カリニ肺炎
ペンタミジンイセチオン酸塩	抗真菌薬, 抗原虫薬, カリニ肺炎
ニタゾキサニド	抗原虫薬, クリプトスポリジウム症

KEGG DRUGより作表

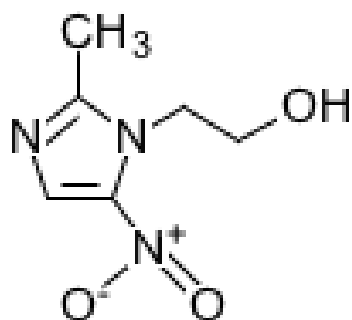


図 4-1 メトロニダゾールの構造式

KEGG DRUG ホームページ

(https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?D00409+-ja) より

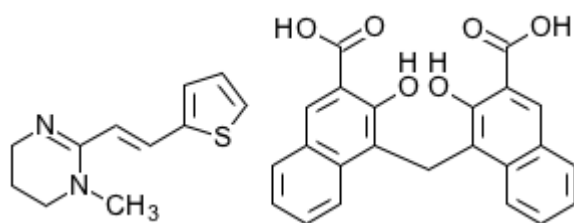


図 4-2 ピランテルパモ酸塩の構造式

KEGG DRUG ホームページ

(https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?D00486+-ja) より

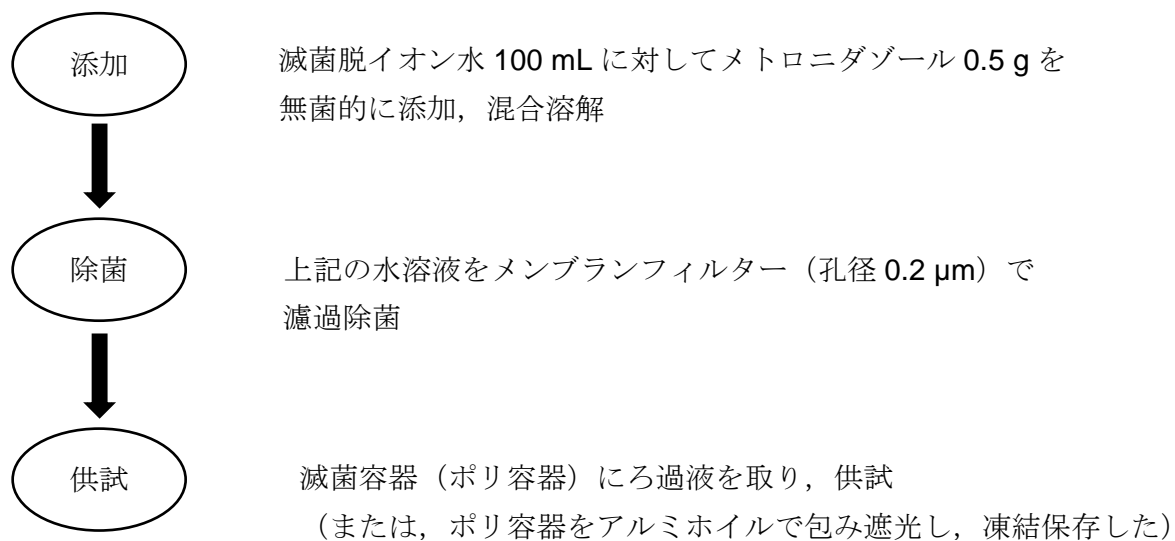


図 4-3 メトロニダゾール水溶液（5,000 mg/L）の調製

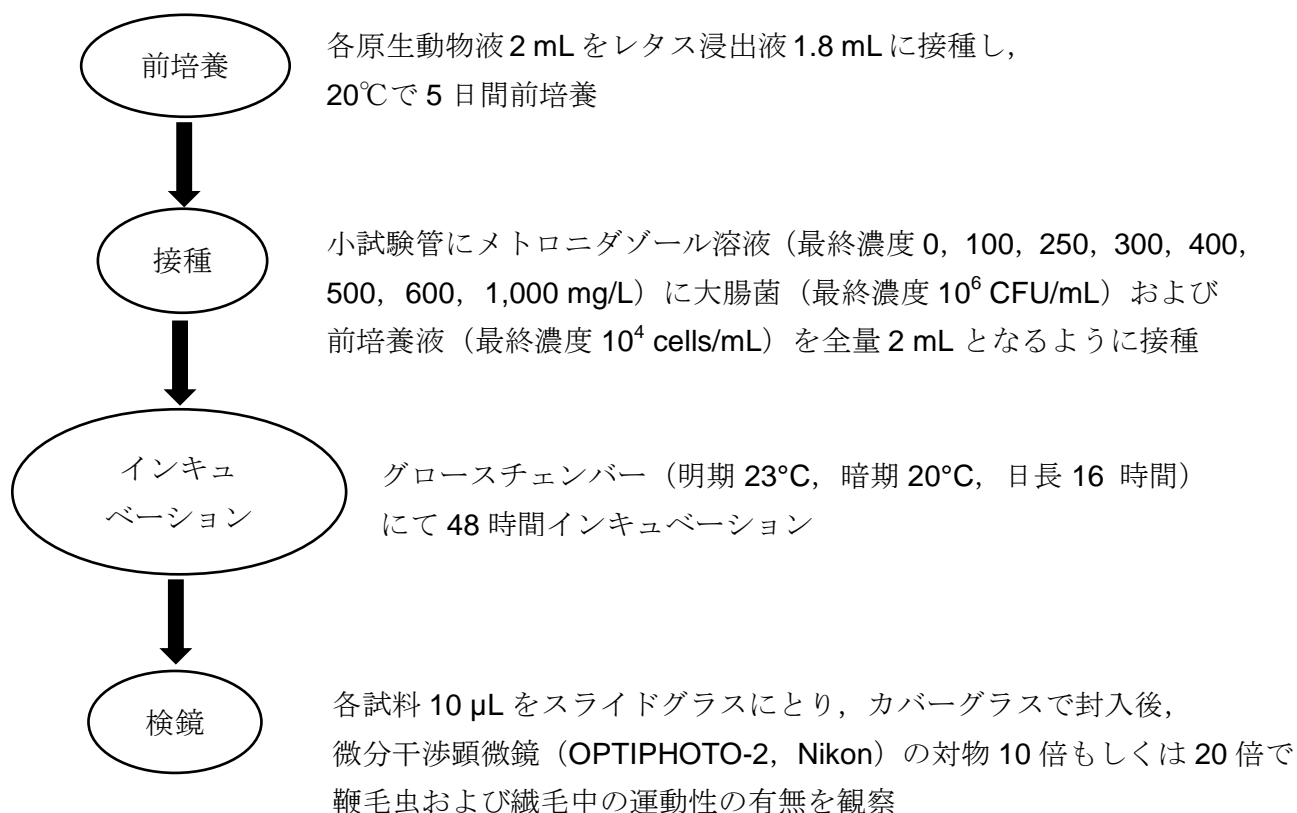


図 4-4 原生動物のメトロニダゾールに対する感受性試験の手順

表 4-2 原生動物のメトロニダゾール感受性試験における試験液の処方

(μL)	メトロニダゾール濃度 (mg/L)				
	0	100	250	500	1,000
生理食塩水	1,600	1,560	1,500	1,400	1,200
メトロニダゾール水溶液*	0	40	100	200	400
大腸菌*	200	200	200	200	200
原生動物液*	200	200	200	200	200
全量	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000

* メトロニダゾール 5,000 mg/L

** 最終濃度 10^6 CFU/mL

*** 最終濃度 10^4 cells/mL

表 4-3 DMSO が大腸菌の生存へ及ぼす影響評価における調液処方

DMSO 最終濃度 (%)	0	1	2	5	10
	添加量 (mL)				
水耕液	6.00	5.94	5.88	5.70	5.40
DMSO	0.00	0.06	0.12	0.30	0.60
大腸菌 KM1 液*	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
全量	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00

* 最終濃度 10^6 CFU/mL

表 4-4 DMSO が大腸菌の増殖に及ぼす影響評価における調液処方

DMSO 最終濃度 (%)	0	1	2	5	10
	添加量 (mL)				
NB 培地	6.00	5.94	5.88	5.70	5.40
DMSO	0.00	0.06	0.12	0.30	0.60
大腸菌 KM1 液*	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
全量	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00

* 最終濃度 10^6 CFU/mL

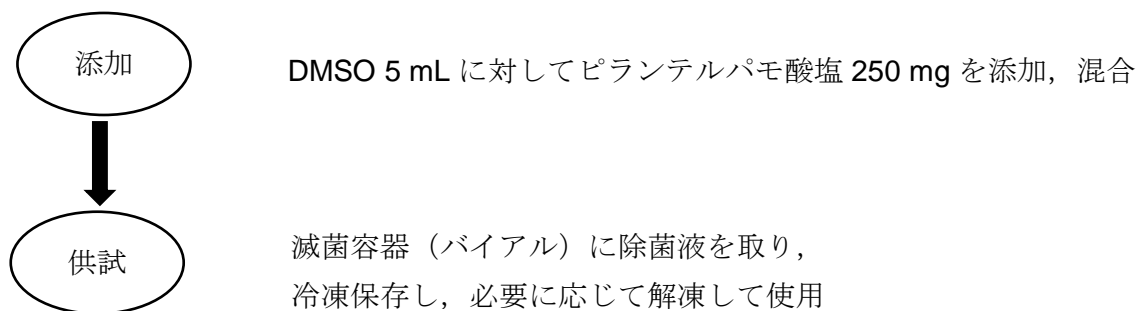


図 4-5 ピランテルパモ酸塩 DMSO 溶液（50,000 mg/L）調製

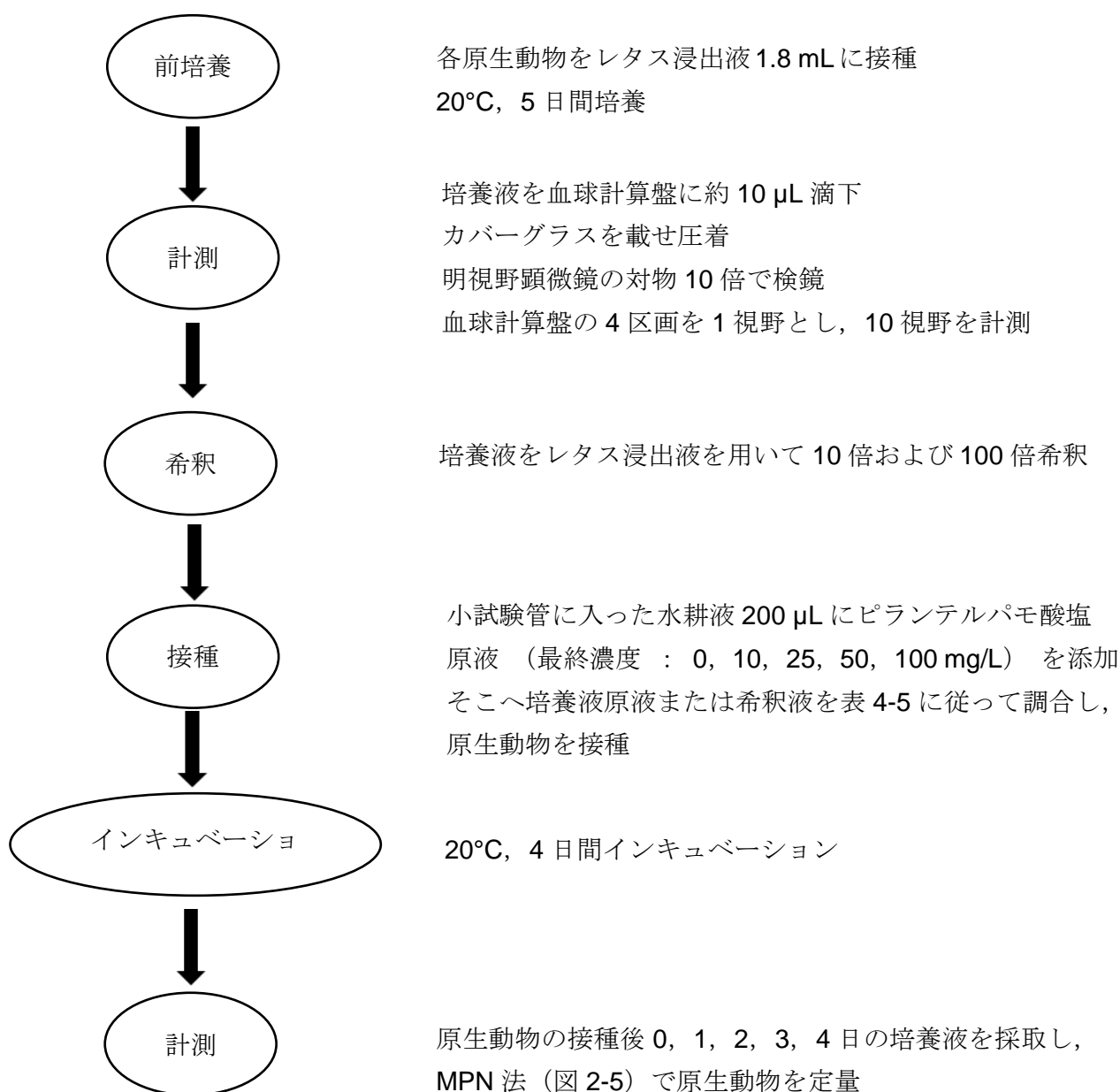


図 4-6 ピランテルパモ酸塩が原生動物の生存に及ぼす影響の評価

表 4-5 原生動物のピランテルパモ酸塩感受性試験における成分調製法

	DMSO 無添加	PP*最終濃度 (mg/L)				
		0	10	25	50	100
		添加量 (μL)				
水耕液	200	150	196	199	198	196
PP 原液	0	0	4**	1	2	4
各原生動物液	1,800	1,800	1,800	1,800	1,800	1,800
DMSO	0	50	0	0	0	0
全量	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000

* Pyrantel Pamoate (ピランテルパモ酸塩)

** 10 mg/L 試験区には 10 倍希釈 PP 液を添加



図 4-7 水耕装置 (水耕液 1 L 入り) での栽培の外観

表 4-6 レタスの種々の試薬に対する感受性の検討試験

	対照区	DMSO 添加区	混合薬剤添加区*
	(mL)		
水耕液	899.5	899.5	899.5
滅菌水	100.5	100.0	0.0
DMSO	0.0	0.5	0.0
ピランテルパモ酸塩 DMSO 溶液**	0.0	0	0.5
メトロニダゾール水溶液***	0.0	0	100.0
全量	1000.0	1000.0	1000.0

* 最終濃度:ピランテルパモ酸塩 25 mg/L, メトロニダゾール 500 mg/L

** ピランテルパモ酸塩 50,000 mg/L

*** メトロニダゾール 5,000 mg/L

表 4-7 大腸菌 KM1 の混合薬剤に対する感受性試験

(μL)	対照区	混合薬剤添加区	
		1/4 濃度区	1/1 濃度区*
滅菌水耕液	5,400	7,000	4,800
ピランテルパモ酸塩 DMSO 溶液**	0	1	3
メトロニダゾール水溶液***	0	200	600
<i>E. coli</i> KM1 液****	600	800	600
全量	6,000	8,000	6,000

* 最終濃度:ピランテルパモ酸塩 25 mg/L, メトロニダゾール 500 mg/L

** ピランテルパモ酸塩 50,000 mg/L

*** メトロニダゾール 5,000 mg/L

**** 10^8 CFU/mL (最終濃度 10^7 CFU/mL)

表 4-8 繊毛虫の混合薬剤に対する感受性試験

(μL)	対照区	混合薬剤添加区	
		1/4 濃度区	1/1 濃度区*
滅菌水耕液	5,340	6,920	4,740
大腸菌 KM1 液**	600	800	600
ピランテルパモ酸塩 DMSO 溶液***	0	1	3
メトロニダゾール水溶液****	0	200	600
繊毛虫液*****	60	80	60
全量	6,000	8,000	6,000

* 最終濃度:ピランテルパモ酸塩 25 mg/L, メトロニダゾール 500 mg/L

** 10^8 CFU/mL

*** ピランテルパモ酸塩 50,000 mg/L

**** メトロニダゾール 5,000 mg/L

***** 初発濃度 $< 5.5 \times 10^1$ MPN/mL (培養 2 日後の培養液を 100 倍希釈)

表 4-9 鞭毛虫の混合薬剤に対する感受性試験

	対照区	混合薬剤添加区	
		1/4 濃度区	1/1 濃度区*
	(μ L)		
滅菌水耕液	5,400	7,000	4,800
大腸菌 KM1 液**	600	800	600
ピランテルパモ酸塩 DMSO 溶液***	0	1	3
メトロニダゾール水溶液****	0	200	600
鞭毛虫液*****	6	8	6
全量	6,000	8,000	6,000

* 最終濃度:コンバントリン 25 mg/L, メトロニダゾール 500 mg/L

** 10^8 CFU/mL

*** コンバントリン 50,000 mg/L

**** メトロニダゾール 5,000 mg/L

***** 初発濃度 $< 5.5 \times 10^1$ MPN/mL(培養 2 日後の培養液を 100 倍希釈)

表 4-10 運動性による原生動物のメトロニダゾール感受性の評価*

	メトロニダゾール最終濃度 (mg/L)				
	0	100	250	500	1,000
繊毛虫 <i>Colpoda</i> sp.	+	+	+	-	-
鞭毛虫 <i>Stramenopiles</i>	+	+	+	-	-

* + : 運動性あり, - : 運動性なし

表 4-11 DMSO を種々の濃度で添加した水耕液中の大腸菌数の経時的変化

DMSO 最終濃度 (%)	大腸菌数 (CFU/mL) *					
	培養日数 (日)					
	0	1	2	3	4	5
0	$(4.40 \pm 1.30) \times 10^6$	$(3.37 \pm 0.74) \times 10^6$	$(4.37 \pm 0.64) \times 10^6$	$(3.40 \pm 1.10) \times 10^6$	$(2.37 \pm 0.36) \times 10^6$	$(1.42 \pm 0.09) \times 10^6$
1	$(4.87 \pm 0.91) \times 10^6$	$(5.53 \pm 0.21) \times 10^6$	$(5.00 \pm 0.99) \times 10^6$	$(5.47 \pm 1.71) \times 10^6$	$(7.37 \pm 0.46) \times 10^6$	$(4.00 \pm 0.50) \times 10^6$
2	$(4.63 \pm 1.72) \times 10^6$	$(5.17 \pm 0.57) \times 10^6$	$(5.10 \pm 1.00) \times 10^6$	$(4.93 \pm 0.38) \times 10^6$	$(5.70 \pm 0.27) \times 10^6$	$(3.80 \pm 0.56) \times 10^6$
5	$(3.43 \pm 0.64) \times 10^6$	$(5.13 \pm 0.67) \times 10^6$	$(4.73 \pm 0.29) \times 10^6$	$(4.80 \pm 0.30) \times 10^6$	$(3.10 \pm 1.15) \times 10^6$	$(2.80 \pm 0.29) \times 10^6$
10	$(4.23 \pm 0.14) \times 10^6$	$(3.90 \pm 0.66) \times 10^6$	$(4.03 \pm 0.64) \times 10^6$	$(2.95 \pm 0.17) \times 10^6$	$(2.09 \pm 0.28) \times 10^6$	$(1.75 \pm 0.08) \times 10^6$

* 検出限界 : 0.3 CFU/mL

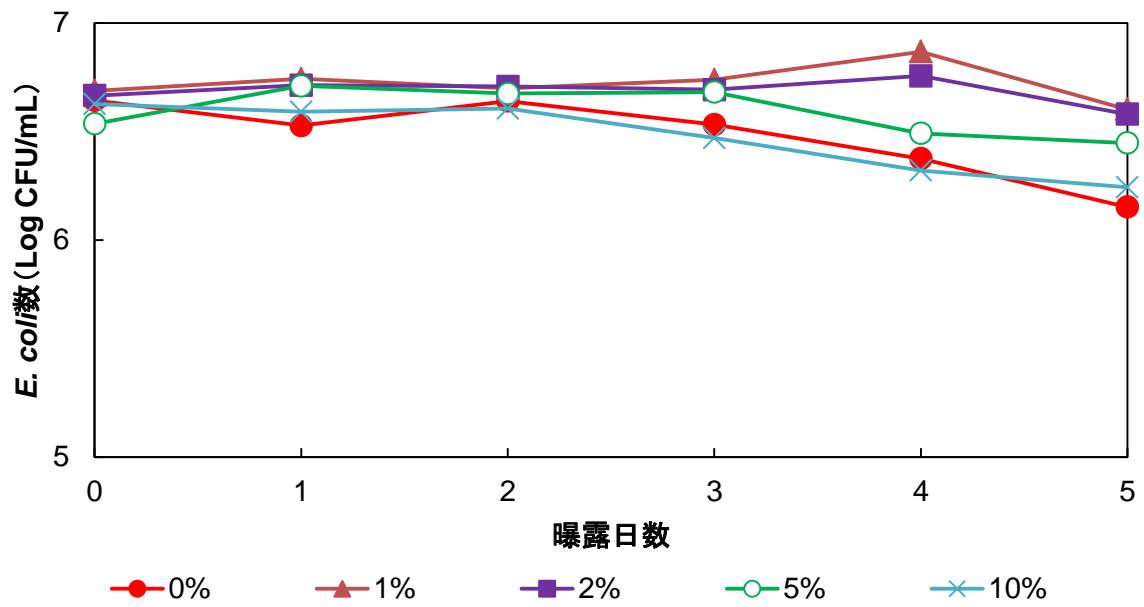


図 4-8 DMSO の添加が水耕液中の大腸菌数に及ぼす影響

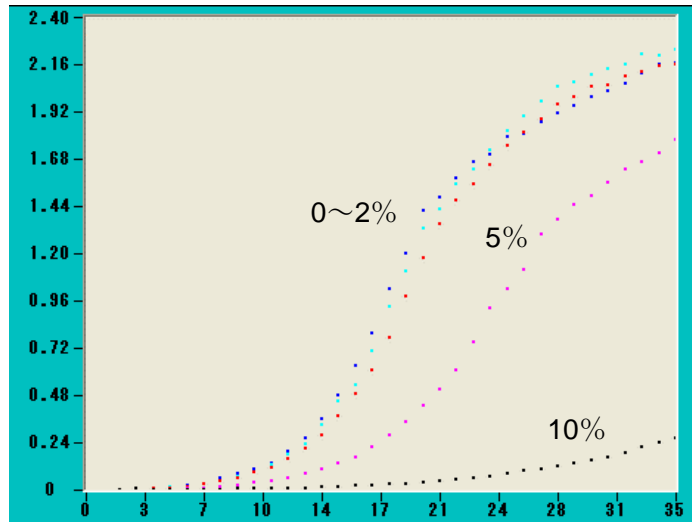


図 4-9 種々の濃度の DMSO を NB 培地に添加した際の大腸菌の増殖曲線

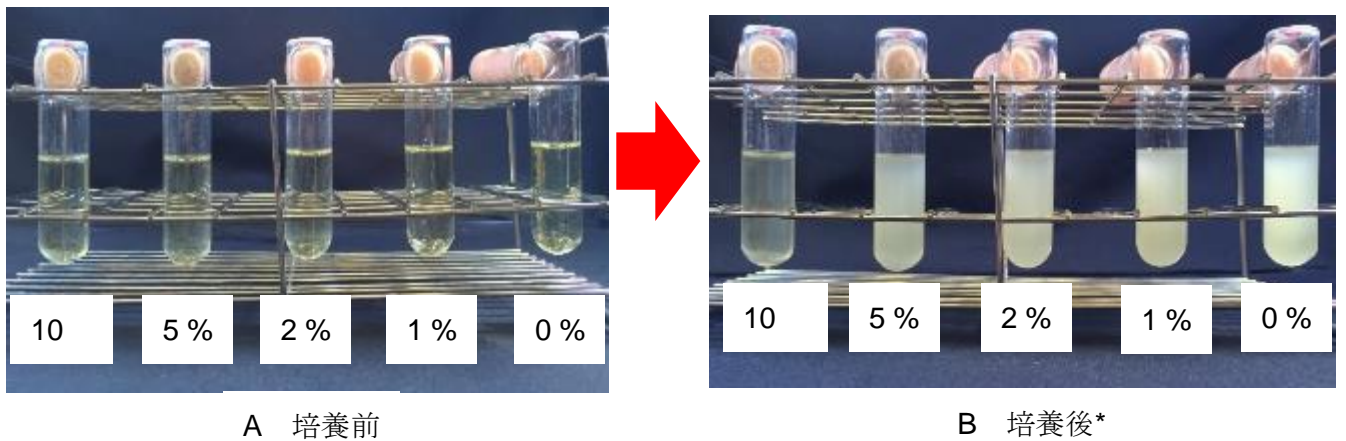


図 4-10 種々の濃度の DMSO を NB 培地に添加した際の大腸菌培養前後の培養液外観の変化

* 6 時間後



0日後



1日後



2日後



3日後



4日後



5日後



6日後



7日後



8日後

図 4-11 DMSO 無添加のレタスの外観



0日後



1日後



2日後



3日後



4日後



5日後



6日後



7日後



8日後

図 4-12 最終濃度 0.1%となるように DMSO を水耕液に添加した際のレタスの外観



0日後



1日後



2日後



3日後



4日後



5日後



6日後



7日後



8日後

図 4-13 最終濃度 0.2%となるように DMSO を水耕液に添加した際のレタスの外観



0日後



1日後



2日後



3日後



4日後



5日後



6日後

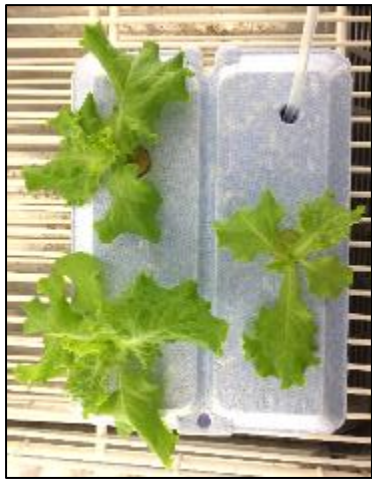


7日後



8日後

図 4-14 最終濃度 0.5%となるように DMSO を水耕液に添加した際のレタスの外観



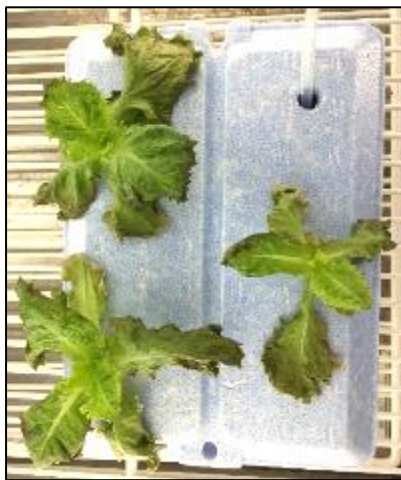
0日後



1日後



2日後



3日後



4日後



5日後



6日後



7日後



8日後

図 4-15 最終濃度 1%となるように DMSO を水耕液に添加した際のレタスの外観



0日後



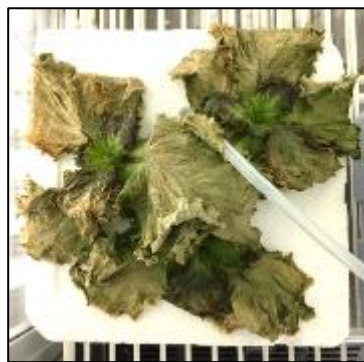
1日後



2日後



3日後



4日後



5日後



6日後



7日後

図 4-16 最終濃度 5% となるように DMSO を水耕液に添加した際のレタスの外観

表 4-12 ピランテルパモ酸塩を投与した *In vitro* 試験における繊毛虫 (*Colpoda* sp.) 数の経時的変化

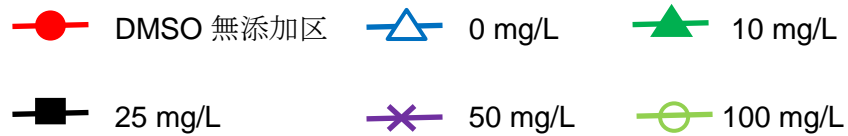
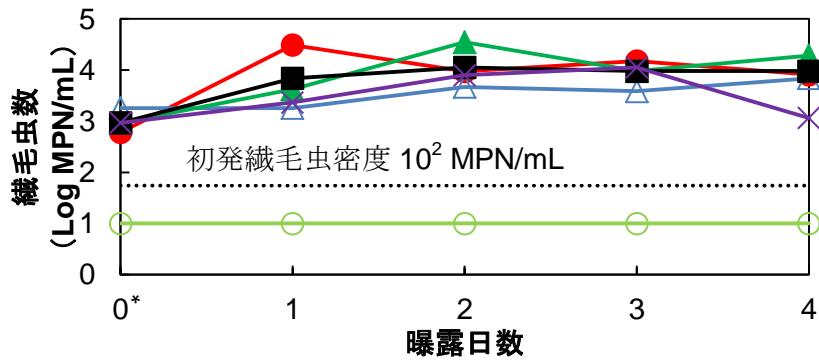
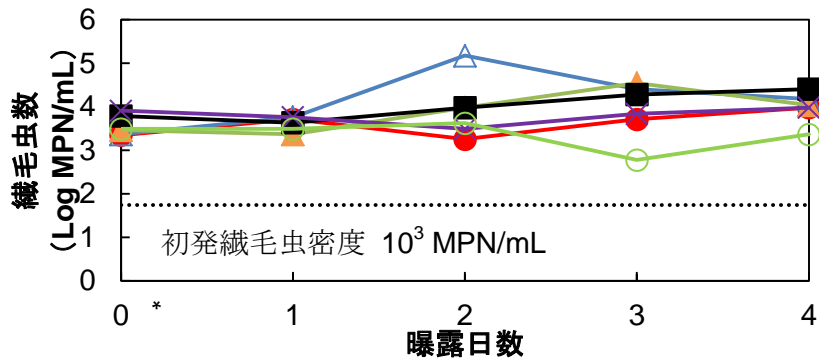
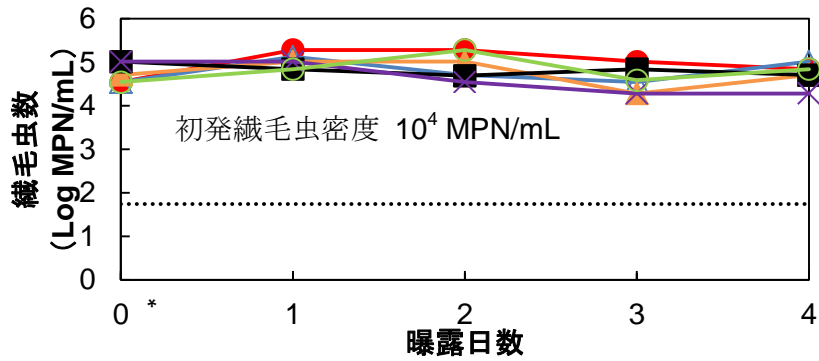
初発 原生動物 密度* (cells/mL)	初発 原生動物 密度** (MPN/mL)	Pylantel pamoate 最終 濃度 (mg/L)	DMSO (μ L)	原生動物密度*** (MPN/mL)				
				培養期間 (日)				
				0****	1	2	3	4
4×10^5	10^4	0	0	3.51×10^4	1.34×10^5	5.15×10^4	3.51×10^4	1.04×10^5
		0	50	3.51×10^4	1.93×10^5	1.93×10^5	1.04×10^5	6.95×10^4
		10	0	5.15×10^4	1.04×10^5	1.04×10^5	1.93×10^4	5.15×10^4
		25	0	1.04×10^5	6.95×10^4	4.90×10^4	6.95×10^4	5.10×10^4
		50	0	1.04×10^5	1.04×10^5	3.51×10^4	1.93×10^4	1.93×10^4
		100	0	3.51×10^4	6.95×10^4	1.93×10^5	3.87×10^4	6.95×10^4
4×10^4	10^3	0	0	2.23×10^3	5.15×10^3	1.81×10^3	5.15×10^3	9.55×10^3
		0	50	2.34×10^3	5.75×10^3	1.51×10^5	2.55×10^4	1.51×10^4
		10	0	2.91×10^3	2.34×10^3	9.55×10^3	3.51×10^4	1.09×10^4
		25	0	6.15×10^3	4.34×10^3	9.55×10^3	1.93×10^4	2.55×10^4
		50	0	8.15×10^3	5.75×10^3	3.11×10^3	6.90×10^3	9.55×10^3
		100	0	3.11×10^3	3.11×10^3	4.21×10^3	6.00×10^2	2.34×10^3
4×10^3	10^2	0	0	1.81×10^3	1.81×10^3	4.07×10^3	3.87×10^3	6.90×10^3
		0	50	6.05×10^2	3.11×10^4	9.45×10^3	1.51×10^4	8.15×10^3
		10	0	9.30×10^2	4.21×10^3	3.51×10^4	9.55×10^3	1.93×10^4
		25	0	9.30×10^2	6.90×10^3	1.13×10^4	9.55×10^3	9.55×10^3
		50	0	9.30×10^2	2.34×10^3	7.95×10^3	1.13×10^4	1.56×10^3
		100	0	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$

* 血球計算盤計測法

** MPN 法

*** 検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

**** 薬剤添加から 1 時間後



* 薬剤曝露 1 時間後

** 破線は検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

図 4-17 種々の濃度のピランテルパモ酸塩が繊毛虫の生存に及ぼす影響

表 4-13 ピランテルパモ酸塩を投与した In vitro 試験における鞭毛虫 (*Stramenopiles*) 数の経時的変化

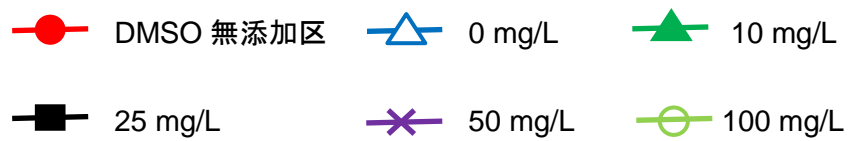
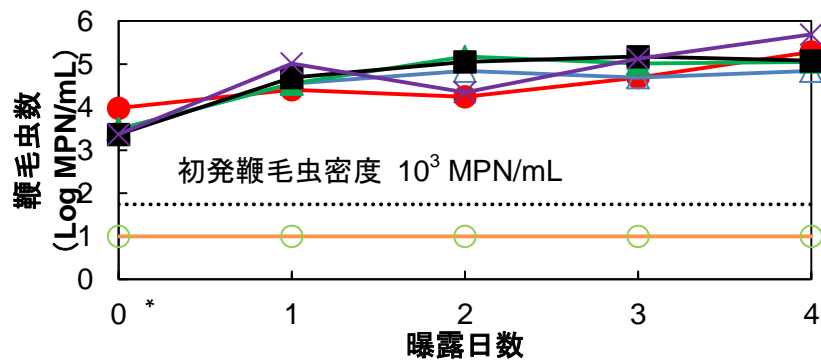
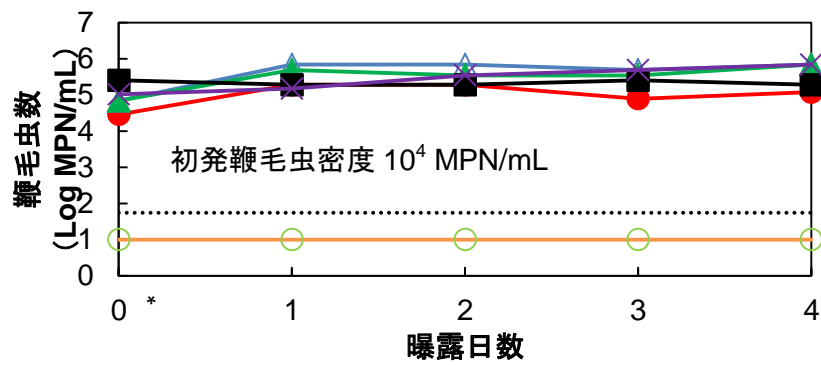
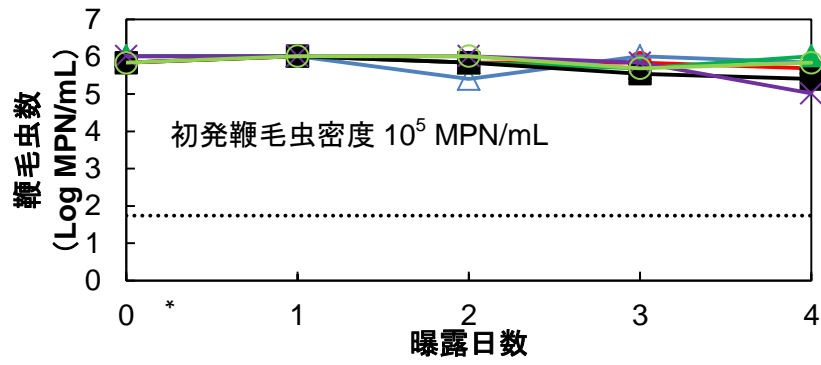
初発 原生動物 密度* (cells/mL)	初発 原生動物 密度** (MPN/mL)	Pylantel		原生動物密度*** (MPN/mL)				
		pamoate 最終 濃度 (mg/L)	DMSO (μ L)	培養期間 (日)				
				0****	1	2	3	4
7×10^5	10^5	0	0	6.95×10^5	1.04×10^6	6.95×10^5	6.95×10^5	4.91×10^5
		0	50	1.04×10^6	1.04×10^6	2.54×10^5	1.04×10^6	6.95×10^5
		10	0	1.04×10^6	1.04×10^6	6.95×10^5	4.91×10^5	1.04×10^6
		25	0	6.95×10^5	1.04×10^6	6.95×10^5	3.51×10^5	2.54×10^5
		50	0	1.04×10^6	1.04×10^6	1.04×10^6	6.95×10^5	1.04×10^5
		100	0	6.95×10^5	1.04×10^6	1.04×10^6	4.91×10^5	6.95×10^5
7×10^4	10^4	0	0	2.91×10^4	1.93×10^5	1.93×10^5	7.95×10^4	1.20×10^5
		0	50	6.95×10^4	6.95×10^5	6.95×10^5	4.91×10^5	6.95×10^5
		10	0	6.95×10^4	4.91×10^5	3.51×10^5	3.51×10^5	6.95×10^5
		25	0	2.55×10^5	1.93×10^5	1.93×10^5	2.55×10^5	1.93×10^5
		50	0	1.04×10^5	1.51×10^5	3.51×10^5	4.91×10^5	6.95×10^5
		100	0	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$
7×10^3	10^3	0	0	9.55×10^3	2.55×10^4	1.75×10^4	4.91×10^4	1.93×10^5
		0	50	3.11×10^3	3.51×10^4	6.95×10^4	4.91×10^4	6.95×10^4
		10	0	3.11×10^3	3.51×10^4	1.51×10^5	1.04×10^5	1.13×10^5
		25	0	2.34×10^3	4.91×10^4	1.33×10^5	1.51×10^5	1.20×10^5
		50	0	2.34×10^3	1.04×10^5	2.23×10^4	1.34×10^5	4.91×10^5
		100	0	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$

* 血球計算盤計測法

** MPN 法

*** 検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

**** 薬剤添加から 1 時間後



* 薬剤曝露1時間後

** 破線は検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

図4-18 種々の濃度のピランテルパモ酸塩が鞭毛虫の生存に及ぼす影響

表 4-14 メトロニダゾール無添加時のレタスの栽培日程*

試験 No.	株 No.	播種	容器移植**	菌液接種	収穫	栽培期間 (日)	収穫時のレタス地上部生重 (g/wet)	収穫後の葉数 (枚)
	1						20.19	12
1	2	4月11日	5月6日	5月6日	5月11日	30	16.50	9
	3						15.46	11
	1						26.97	12
2	2	5月19日	6月11日	6月13日	6月18日	30	26.94	13
	3						24.46	10

* 2016年実施

** 播種から23日後に別の水耕装置 (21×30×4 cm, 水耕液 1 L 入り) に移植

表 4-15 メトロニダゾールを添加した場合のレタスの栽培日程*

試験 No.	株 No.	播種	メトロニダゾール			菌液接種	収穫日	栽培期間 (日)	収穫後の レタス地上部生重 (g/wet)	収穫後の 葉数 (枚)
			濃度 (mg/L)	添加日	添加期間 (日)					
1	1							10.18	12	
	2	6月23日	500	7月15日	8	7月16日	7月23日	30	11.44	11
	3							9.47	11	
2	1							22.37	13	
	2	7月7日	500	7月29日	8	8月1日	8月6日	30	18.62	10
	3							23.22	12	
1	1							NT**	NT	
	2	7月21日	1,000	8月12日	8	8月12日	8月20日	30	NT	NT
	3							NT	NT	
2	1							NT	NT	
	2	8月17日	1,000	9月8日	8	9月11日	9月16日	30	NT	NT
	3							NT	NT	

* 2016年実施

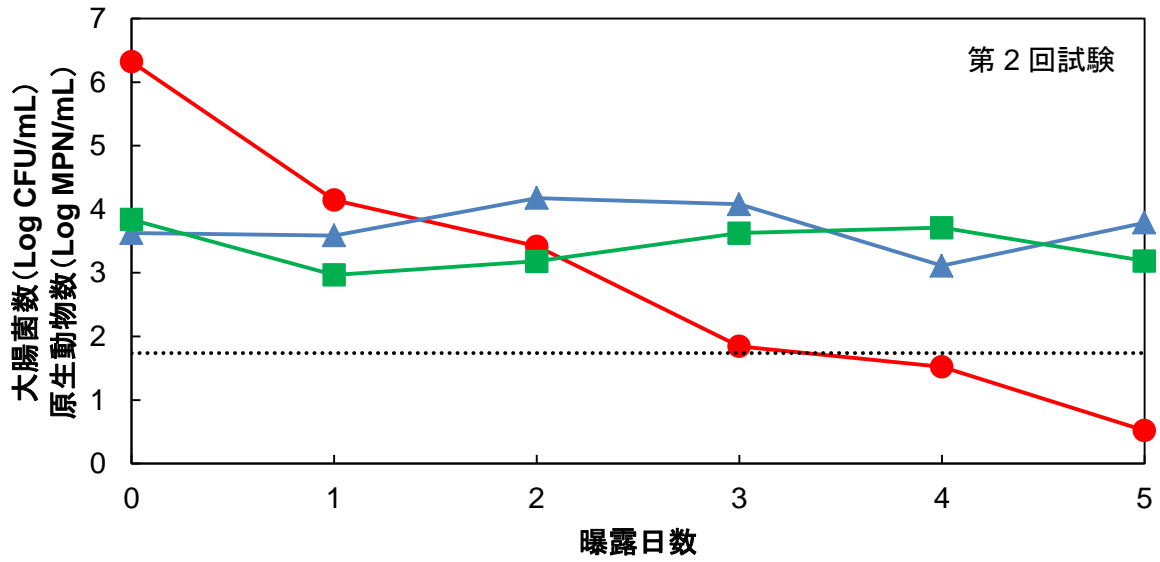
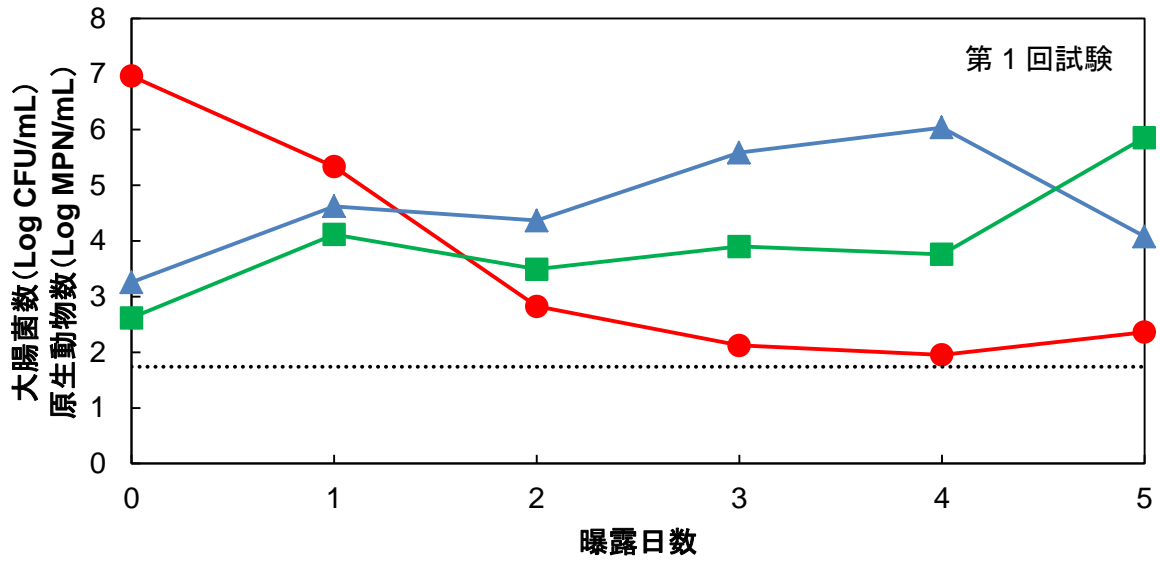
** NT : Not Tested

表 4-16 メトロニダゾール無添加時の水耕液中の大腸菌と原生動物の経時的変化

	試験 No.	曝露日数 (日)						
		0	1	2	3	4	5	
大腸菌*	1	$(9.20 \pm 1.74) \times 10^6$	$(2.17 \pm 0.09) \times 10^5$	$(6.67 \pm 1.53) \times 10^2$	$(1.33 \pm 0.23) \times 10^2$	$(9.00 \pm 2.65) \times 10^1$	$(2.30 \pm 0.66) \times 10^2$	
	2	$(2.09 \pm 0.19) \times 10^6$	$(1.40 \pm 0.20) \times 10^6$	$(2.63 \pm 0.26) \times 10^3$	$(7.00 \pm 1.00) \times 10^1$	$(3.33 \pm 0.58) \times 10^1$	$(3.33 \pm 5.78) \times 10^0$	
原生動物**	1	鞭毛虫	1.81×10^3	4.21×10^4	2.34×10^4	3.87×10^5	1.09×10^6	1.20×10^4
		繊毛虫	4.15×10^2	1.31×10^4	3.11×10^3	7.95×10^3	5.75×10^3	7.20×10^5
	2	鞭毛虫	4.21×10^3	3.87×10^3	1.51×10^4	1.20×10^4	1.30×10^3	6.15×10^3
		繊毛虫	6.90×10^3	9.30×10^2	1.52×10^3	4.21×10^3	5.15×10^3	1.54×10^3

* 単位 : CFU/mL (検出限界 : 0.3 CFU/mL)

** 単位 : MPN/mL (検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL)



● 大腸菌 ■ 繊毛虫 ▲ 鞭毛虫

*破線は原生動物の検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

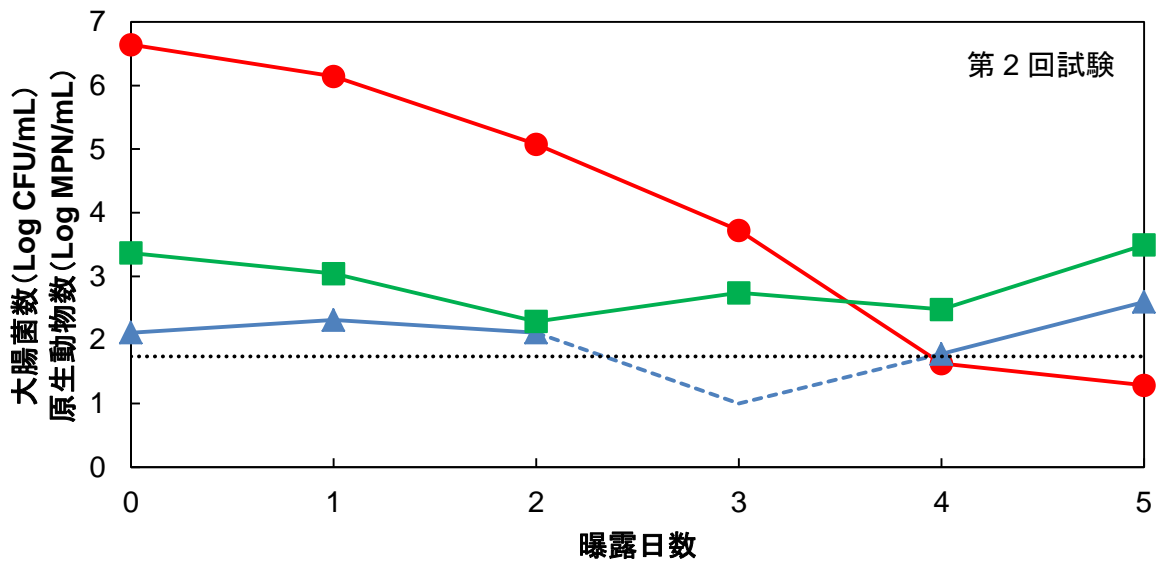
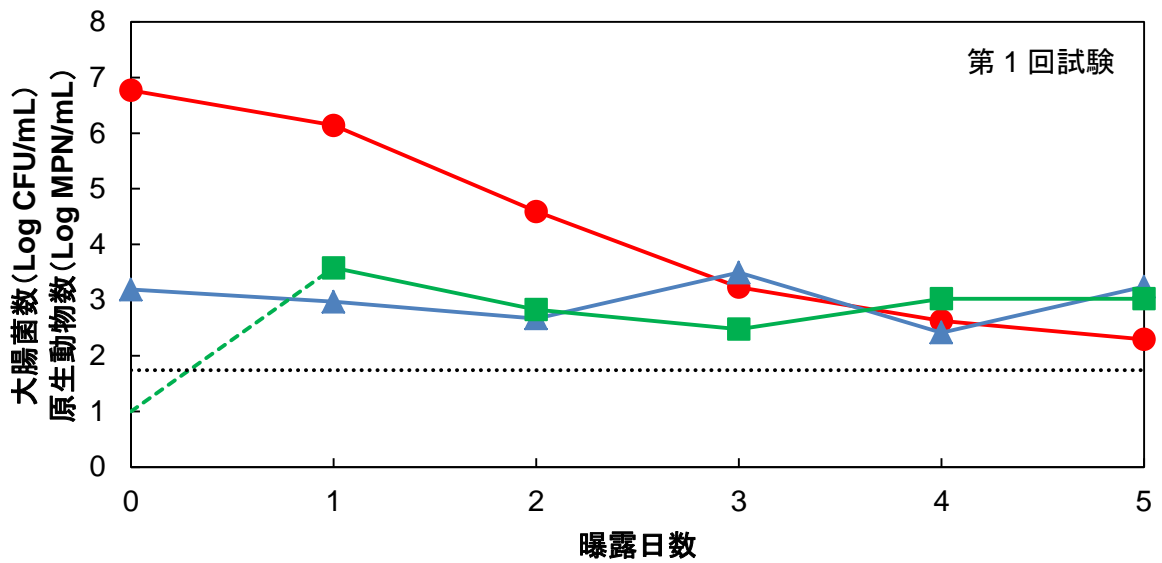
図 4-19 メロニダゾール無添加時の大腸菌数および原生動物数の経時的変化

表 4-17 メトロニダゾールを水耕液に添加した場合の水耕液中の大腸菌と原生動物の経時的変化

試験 No.	メトロニダゾール		曝露日数 (日)							
	最終 濃度 (mg/L)	添加期 間 (日)	0	1	2	3	4	5		
大腸菌*	1		$(5.87 \pm 0.59) \times 10^6$	$(1.38 \pm 0.08) \times 10^6$	$(3.90 \pm 0.56) \times 10^4$	$(1.70 \pm 0.72) \times 10^3$	$(4.23 \pm 0.84) \times 10^2$	$(1.97 \pm 0.51) \times 10^2$		
	2		$(4.37 \pm 1.29) \times 10^6$	$(1.39 \pm 0.16) \times 10^6$	$(1.19 \pm 0.10) \times 10^5$	$(5.27 \pm 1.68) \times 10^3$	$(4.23 \pm 7.7) \times 10^1$	$(1.93 \pm 0.40) \times 10^1$		
原生動物**	1	500	8	鞭毛虫	1.54×10^3	9.30×10^2	4.65×10^2	3.11×10^3	2.60×10^2	1.74×10^3
				繊毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	3.80×10^3	6.75×10^2	3.00×10^2	1.06×10^3	1.06×10^3
	2			鞭毛虫	1.30×10^2	2.05×10^2	1.30×10^2	$< 5.5 \times 10^1$	6.0×10^1	3.95×10^2
				繊毛虫	2.32×10^3	1.10×10^3	1.95×10^2	5.50×10^2	3.00×10^2	3.11×10^3
大腸菌	1			$(4.23 \pm 0.84) \times 10^6$	$(1.17 \pm 0.19) \times 10^5$	$(1.14 \pm 0.39) \times 10^3$	$(6.67 \pm 1.53) \times 10^1$	$(2.30 \pm 1.35) \times 10^2$	$(9.03 \pm 1.82) \times 10^2$	
	2			$(1.68 \pm 0.06) \times 10^6$	$(9.37 \pm 0.81) \times 10^4$	$(2.28 \pm 0.17) \times 10^3$	$(2.23 \pm 0.15) \times 10^2$	$(1.33 \pm 0.58) \times 10^1$	$(7.33 \pm 4.51) \times 10^1$	
原生動物	1	1,000	8	鞭毛虫	9.25×10^2	5.05×10^2	8.00×10^2	1.07×10^3	2.65×10^3	7.20×10^3
				繊毛虫	7.90×10^2	1.34×10^4	1.07×10^4	1.22×10^3	1.57×10^4	1.04×10^4
	2			鞭毛虫	2.23×10^3	3.30×10^3	8.15×10^2	8.05×10^2	9.20×10^2	5.45×10^3
				繊毛虫	9.15×10^2	1.54×10^3	4.65×10^2	9.20×10^2	5.50×10^2	1.51×10^4

* 単位 : CFU/mL (検出限界 : 0.3 CFU/mL)

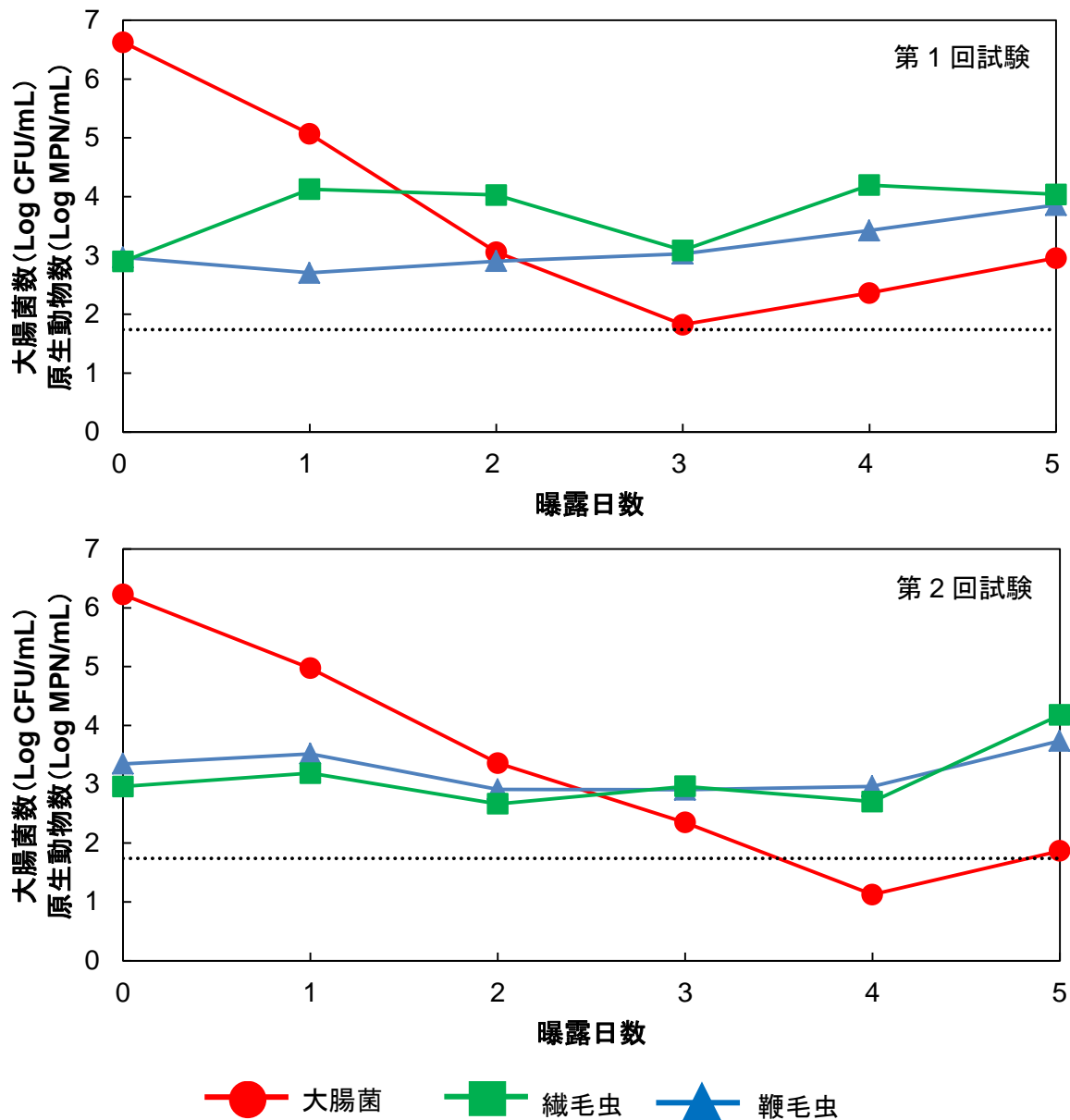
** 単位 : MPN/mL (検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL)



● 大腸菌 ■ 絨毛虫 ▲ 鞭毛虫

*破線は原生動物の検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

図 4-20 最終濃度 500 mg/L となるようにメトロニダゾールを水耕液に添加した際の
大腸菌数および原生動物数の経時的変化



* 破線は原生動物の検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

図 4-21 最終濃度 1,000 mg/L となるようにメロニダゾールを水耕液に添加した際の
大腸菌数および原生動物数の経時的変化

表 4-18 メトロニダゾール無添加時のレタス内部への大腸菌侵入の有無*

試験 No.	大腸菌密度 (CFU/mL) **		植物株 No.	葉内の大腸菌の有無			洗浄水の 汚染の有無	侵入の判定
	初発大腸菌密度 (CFU/mL)	終末大腸菌密度 (CFU/mL)		希釈平板	増菌培養	切片培養***		
1	$(9.20 \pm 1.74) \times 10^6$	$(2.30 \pm 0.66) \times 10^2$	1	—	—	0/25	—	—
			2	—	—	0/25	—	—
			3	—	—	0/25	—	—
2	$(2.09 \pm 0.19) \times 10^6$	$(3.33 \pm 5.78) \times 10^0$	1	—	—	0/30	—	—
			2	—	—	0/30	—	—
			3	—	—	0/30	—	—

* + : 陽性, - : 陰性

** 検出限界 : 0.3 CFU/mL

*** 陽性の切片/培養した切片数

表 4-19 メトロニダゾールを添加した場合のレタス内部への大腸菌侵入の有無*

試験 No.	メトロニダゾール濃度 (mg/L)	大腸菌密度 (CFU/mL)**		植物株 No.	葉内の大腸菌の有無			洗浄水の 汚染の 有無	侵入の 判定
		初発大腸菌密度	5日後の大腸菌密度		希釈 平板	増菌 培養	切片 培養***		
1	500	$(5.87 \pm 0.9) \times 10^6$	$(1.97 \pm 0.51) \times 10^2$	1	—	—	0/30	—	—
				2	—	—	0/30	—	—
				3	—	—	0/30	—	—
2	500	$(4.37 \pm 1.29) \times 10^6$	$(1.93 \pm 0.40) \times 10^1$	1	—	—	0/30	—	—
				2	—	—	0/30	—	—
				3	—	—	0/30	—	—
1	1,000	$(4.23 \pm 0.84) \times 10^6$	$(9.03 \pm 1.82) \times 10^2$	1	NT****	NT	NT	NT	NT
				2	NT	NT	NT	NT	NT
				3	NT	NT	NT	NT	NT
2	1,000	$(1.68 \pm 0.06) \times 10^6$	$(7.33 \pm 4.51) \times 10^1$	1	NT	NT	NT	NT	NT
				2	NT	NT	NT	NT	NT
				3	NT	NT	NT	NT	NT

* + : 陽性, — : 陰性

** 検出限界 : 0.3 CFU/mL

*** 陽性の切片/培養した切片数

**** NT : Not Tested (レタスが枯れたため)



0 日後



1 日後



2 日後



3 日後



4 日後



5 日後

図 4-22 混合薬剤および DMSO 無添加のレタスの外観



0 日後



1 日後



2 日後



3 日後



4 日後



5 日後

図 4-23 最終濃度が 0.05% となるように DMSO を水耕液に添加したレタスの外観



0 日後



1 日後



2 日後



3 日後



4 日後



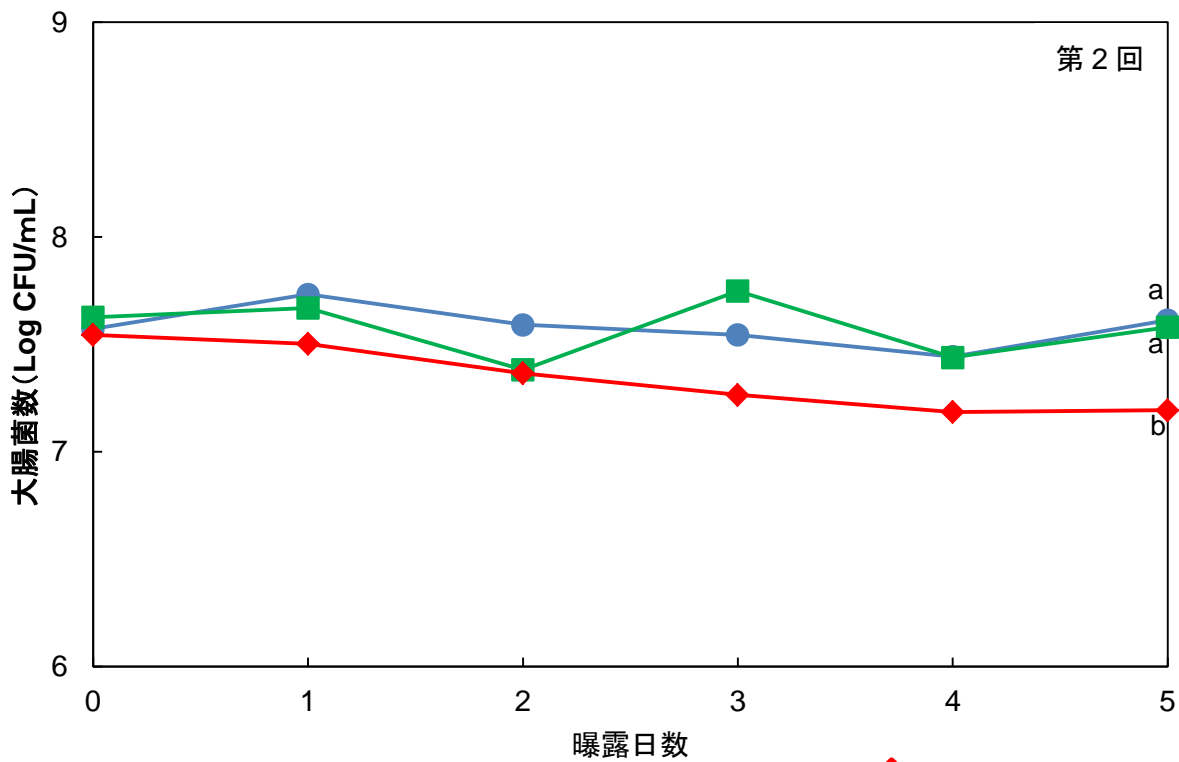
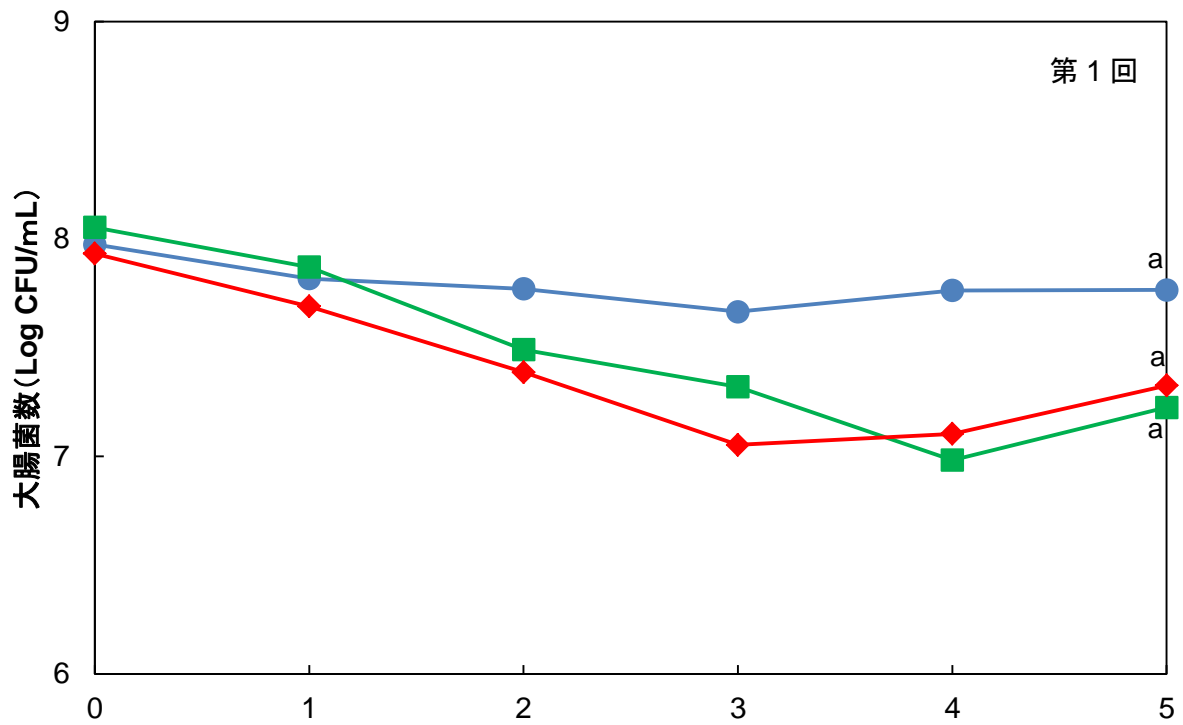
5 日後

図 4-24 混合薬剤を水耕液に添加し 0～5 日間曝露したレタスの外観

表 4-20 混合薬剤を曝露した際の大腸菌数の経時的変化*

試験 No.	試験区	曝露日数					
		0	1	2	3	4	5
1	薬剤無添加区	$(9.43 \pm 2.19) \times 10^7$	$(6.57 \pm 0.47) \times 10^7$	$(5.90 \pm 1.70) \times 10^7$	$(4.63 \pm 1.20) \times 10^7$	$(5.80 \pm 0.10) \times 10^7$	$(5.83 \pm 2.11) \times 10^7$
	1/4 濃度区	$(1.13 \pm 0.06) \times 10^8$	$(7.43 \pm 1.19) \times 10^7$	$(3.10 \pm 0.44) \times 10^7$	$(2.09 \pm 0.36) \times 10^7$	$(9.63 \pm 3.22) \times 10^6$	$(1.68 \pm 0.73) \times 10^7$
	1/1 濃度区	$(8.57 \pm 0.77) \times 10^7$	$(4.90 \pm 0.82) \times 10^7$	$(2.44 \pm 0.15) \times 10^7$	$(1.13 \pm 0.10) \times 10^7$	$(1.27 \pm 0.18) \times 10^7$	$(2.12 \pm 0.05) \times 10^7$
2	薬剤無添加区	$(3.73 \pm 0.47) \times 10^7$	$(5.40 \pm 0.78) \times 10^7$	$(3.90 \pm 0.60) \times 10^7$	$(3.50 \pm 0.69) \times 10^7$	$(2.77 \pm 0.64) \times 10^7$	$(4.10 \pm 0.30) \times 10^7$
	1/4 濃度区	$(4.23 \pm 0.12) \times 10^7$	$(4.67 \pm 1.10) \times 10^7$	$(2.41 \pm 0.11) \times 10^7$	$(5.60 \pm 1.28) \times 10^7$	$(2.75 \pm 0.40) \times 10^7$	$(3.80 \pm 0.35) \times 10^7$
	1/1 濃度区	$(3.50 \pm 0.35) \times 10^7$	$(3.18 \pm 0.32) \times 10^7$	$(2.32 \pm 0.28) \times 10^7$	$(1.84 \pm 0.16) \times 10^7$	$(1.53 \pm 0.21) \times 10^7$	$(1.56 \pm 0.27) \times 10^7$

*単位 : CFU/mL (検出限界 : 0.3 CFU/mL)



● 薬剤無添加区
 ■ 薬剤 1/4 濃度添加区
 ◆ 薬剤 1/1 濃度添加区

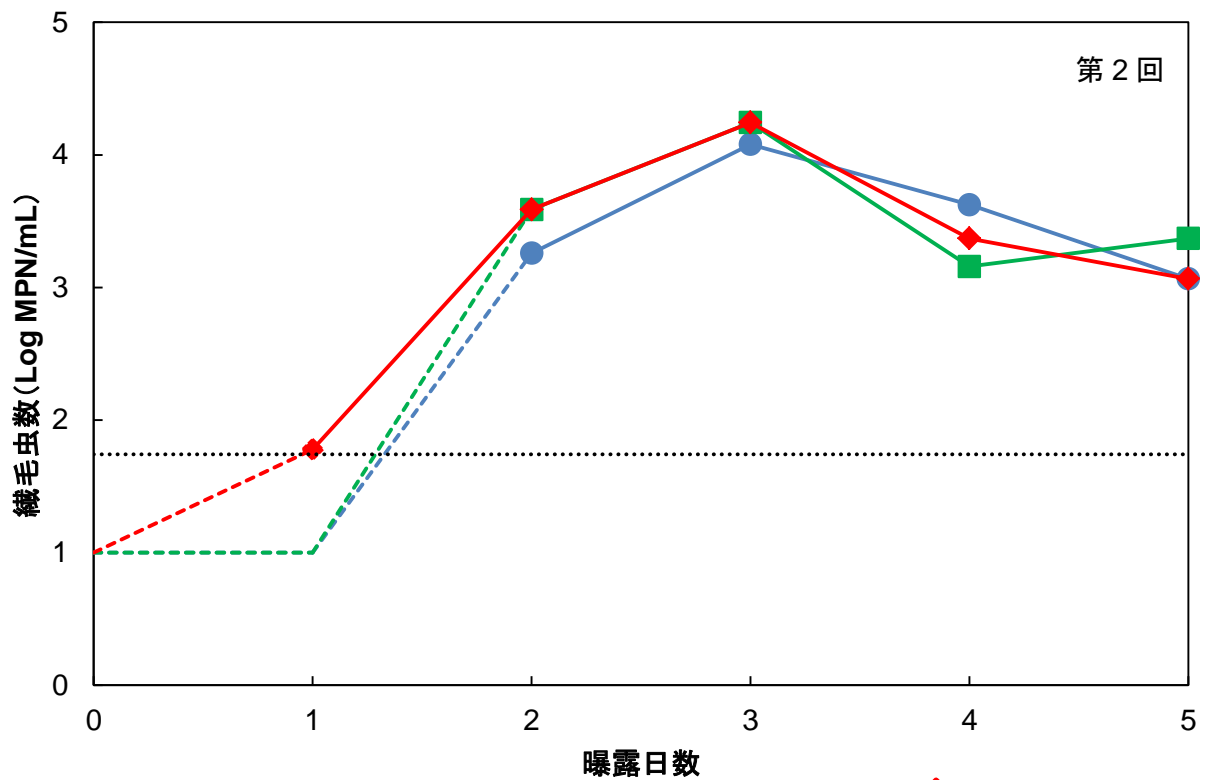
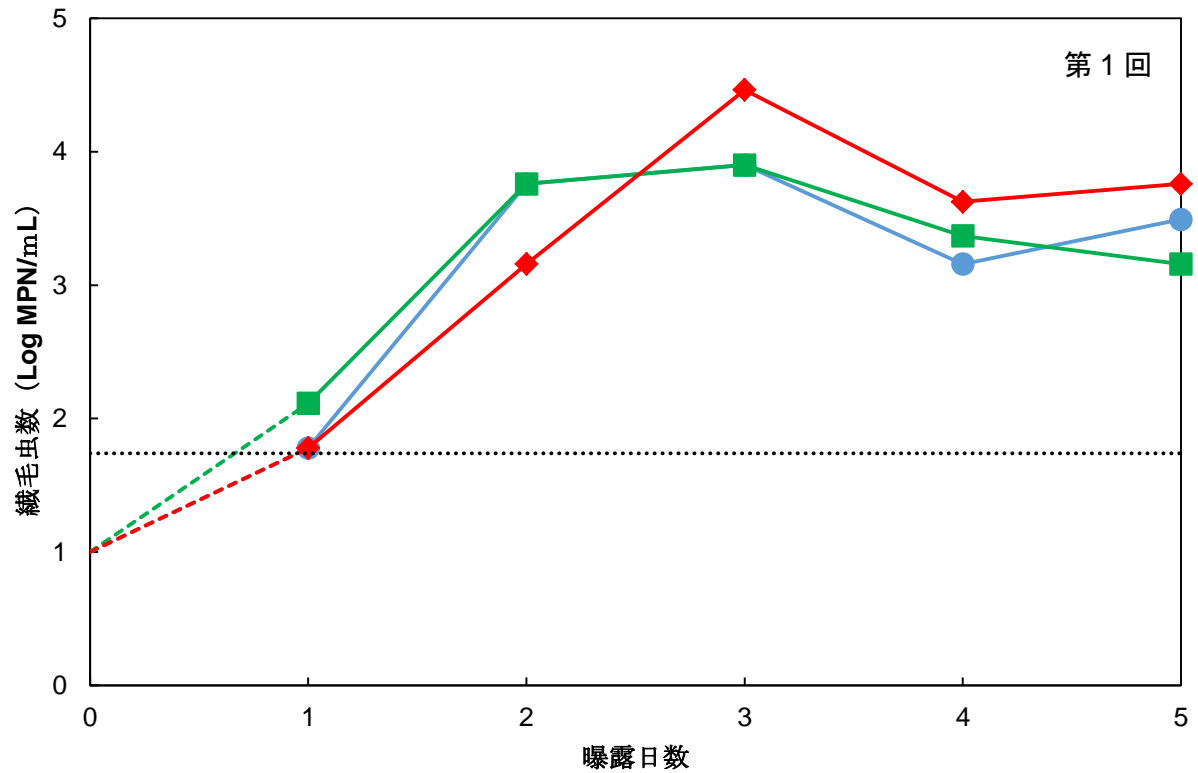
図中の異なるアルファベット(小文字)は Tukey-Kramer の HSD 検定により, $P < 0.05$ で有意差があることを示す

図 4-25 *In vitro* 試験における混合薬剤の添加が大腸菌の生存に及ぼす影響

表 4-21 混合薬剤に対する原生動物の感受性

試験 No.	試験区	原生動物数 (MPN/mL)*							
		曝露日数							
		0	1	2	3	4	5		
1	対照区	繊毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	5.75×10^3	7.95×10^3	1.44×10^3	3.11×10^3	
		鞭毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	1.81×10^4	2.34×10^5	8.15×10^5	1.13×10^6	
	1/4 濃度区	繊毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	1.30×10^2	5.75×10^3	7.95×10^3	2.34×10^3	1.44×10^3	
		鞭毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	6.90×10^3	2.34×10^5	9.55×10^5	7.95×10^5	
	1/1 濃度区	繊毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	1.44×10^3	2.91×10^4	4.21×10^3	5.75×10^3	
		鞭毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	5.75×10^3	1.44×10^5	7.95×10^5	9.55×10^5	
	2	対照区	繊毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	1.81×10^3	1.20×10^4	4.21×10^3	1.16×10^3
			鞭毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	5.75×10^3	9.55×10^4	8.51×10^5	6.15×10^5
1/4 濃度区		繊毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	3.87×10^3	1.75×10^4	1.44×10^3	2.34×10^3	
		鞭毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	2.91×10^3	3.59×10^4	2.91×10^5	4.91×10^5	
1/1 濃度区		繊毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	3.87×10^3	1.75×10^4	2.34×10^3	1.16×10^3	
		鞭毛虫	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	3.00×10^2	2.23×10^3	6.95×10^4	3.51×10^5	

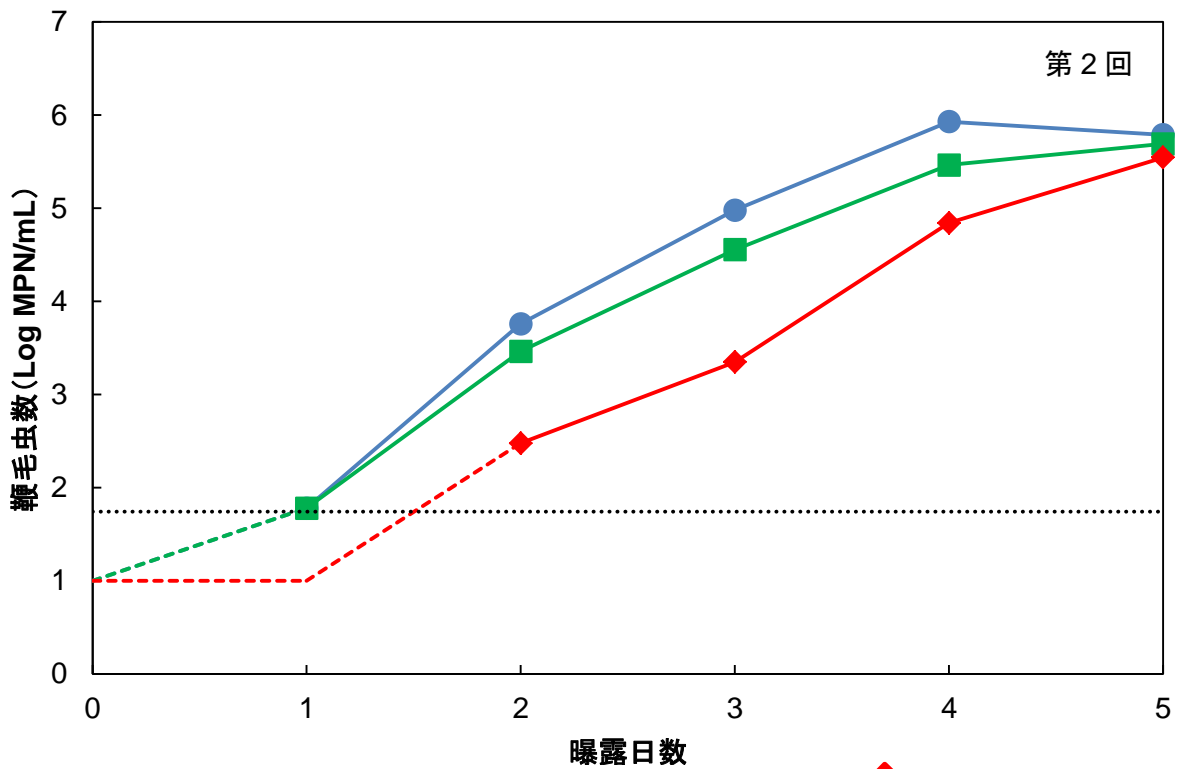
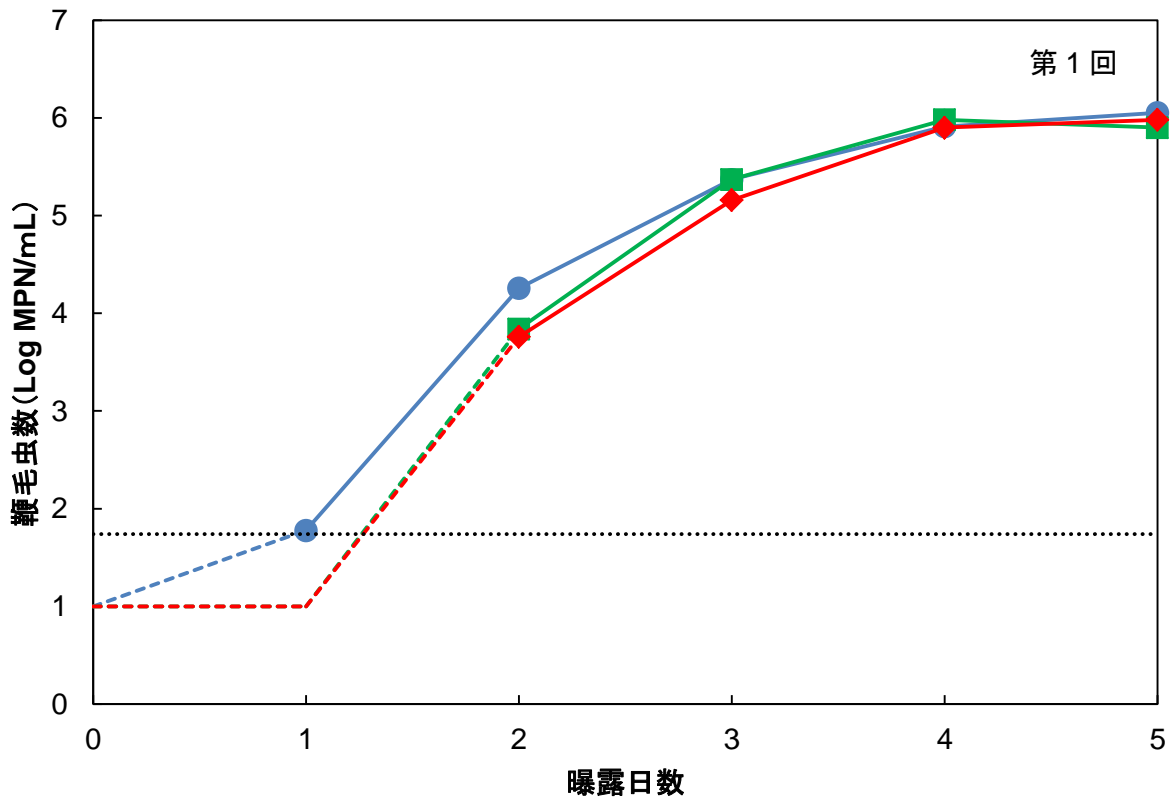
*検出限界 : 5.5×10^1



● 薬剤無添加区
 ■ 薬剤 1/4 濃度添加区
 ◆ 薬剤 1/1 濃度添加区

図 4-26 混合薬剤に対する繊毛虫の感受性

*破線は原生動物の検出限界 (5.5×10^1 MPN/mL)



● 薬剤無添加区
 ■ 薬剤 1/4 濃度添加区
 ◆ 薬剤 1/1 濃度添加区

図 4-27 鞭毛虫の混合薬剤に対する感受性

*破線は原生動物の検出限界 (5.5×10^1 MPN/mL)

第 5 章 大腸菌の反復接種による植物体内部への侵入閾値の解明

5-1 諸言

前章において種々の検討を重ねたが、水耕液中の原生動物を抑制する有効な薬剤を見出すことができなかった。

そこで本章では、大腸菌を水耕液に 1 日 2 回反復接種することによって原生動物の捕食圧を打消し、水耕液中の大腸菌菌密度を維持させた上で、レタス内部への侵入の可否と閾値を決定した。

5-2 試料と方法

5-2-1 供試作物

2-2-1 と同様のものを供試した。

5-2-3 植物の栽培および大腸菌曝露試験

供試作物の栽培をグロースチェンバー内で行なった。ウレタンマット ($2.5 \times 2.5 \times 2.5$ cm) に供試作物を播種し、グロースチェンバー内 (明期 23°C , PPFD $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 暗期 20°C , 湿度 70%, 日長 16 時間) で約 10 日間育苗した。播種から 10 日後に水耕液 1 L 入りの水耕装置に移植した。栽培期間中は水耕液を 1 週間毎に交換した。播種から 25 日後に大腸菌を最終濃度が 10^6 CFU/mL (図 5-1) または、 10^4 CFU/mL となるよう水耕液に接種した (図 5-2)。

大腸菌を 1 日 2 回反復接種し (大腸菌初発菌密度 10^6 CFU/mL の場合は 0 日後, 午後~1 日後, 午後は反復接種せず), 5 日間行った。

5-2-4 水耕液中の微生物の経時的変化の測定

5-2-4-1 大腸菌の定量

4-2-6-1 と同様の手順でおこなった。

5-2-4-2 原生動物の定量

2-2-5 と同様の手順で行った。

5-2-5 葉面殺菌および洗浄

植物収穫後，2-2-4 と同様の手順で行った。

5-2-6 植物体内の大腸菌検出方法

2-2-5 と同様の手順で行った。

5-2-7 API20E による簡易同定

レタス内部に侵入した大腸菌が，接種した大腸菌と同一であるか確認するため，生化学試験および API 20E による簡易同定を行った。その手順を図 5-3 に示す。増菌培養および切片培養に出現したコロニーの中から青紫色のコロニーを白金線で取り CA 培地に塗末接種し，36°C で 18 時間培養した。分離できていないコロニーは再度上記の操作を繰り返し，純化ができたコロニーは NA 培地に再度塗末接種し，36°C で 18 時間培養した。これらの純化した細菌を生化学試験に供し，その後，腸内細菌用簡易同定キット API20E（日本ビオメリュー）に接種し，36°C で 18 時間培養した。培養ウェル中の自発的な反応および試薬添加による呈色反応を記録し，その結果を 7 桁の API プロファイルコードに変換し，これを apiweb™ に入力して検索または，API20E プロファイルインデックスと照らし合わせて同定した。

5-3 結果

5-3-1 水耕液中の微生物の経時的変化

5-3-1-1 初発菌密度 10⁶ CFU/mL の場合の水耕液中の微生物の経時的変化

大腸菌初発菌密度 10⁶ CFU/mL の場合の水耕液中の大腸菌および原生動物を定量した（表 5-1.および図 5-4）。2 反復の試験において大腸菌が 5 日間ではぼ

10^6 CFU/mL を維持していた。繊毛虫数については、Run1 では 5 日間で 10^2 MPN/mL から 10^4 MPN/mL へ 2 ケタ増加しており、Run2 では 10^3 MPN/mL を維持していた。鞭毛虫については、5 日間を通して検出限界値 (5.5×10^1 MPN/mL) 以下～ 10^2 MPN/mL を推移しており、これまでの試験と比べると、低かった。

接種した大腸菌数は、本来であれば、 10^7 CFU/mL まで達するが、両 Run における終末大腸菌密度が 10^6 CFU/mL だったことから、大腸菌が原生動物によって 1 桁分捕食されたと考えられる。

5-3-1-2 初発菌密度 10^4 CFU/mL の場合の水耕液中の微生物の経時的変化

大腸菌初発菌密度 10^4 CFU/mL の場合の水耕液中の大腸菌および原生動物を定量した (表 5-2 および図 5-5)。2 反復の試験において大腸菌が 5 日間で、 $9 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL を推移していた。一方、2 反復の試験において、繊毛虫は 5 日間で 10^2 MPN/mL から 10^3 MPN/mL へ 1 桁増加していた。一方で、鞭毛虫は、5 日間を通して検出限界 (5.5×10^1 MPN/mL) 以下～ 10^1 MPN/mL を推移していた。

5 日間の原生動物数は、接種した大腸菌数が 10^6 CFU/mL の場合と比べると、全体的に約 1 桁低かった。捕食すべき大腸菌の菌密度が低かったため、原生動物の増殖が低調となったと考えられる。このため、原生動物による大腸菌の捕食圧が弱まったと考えられる。

5-3-2 植物体内への大腸菌侵入の有無

5-3-2-1 初発菌密度 10^6 CFU/mL の場合の植物体内への大腸菌侵入の有無

2 反復の試験において、洗浄水の汚染 (青紫色コロニーの出現) は確認されなかった (図 5-6)。よって、葉面を十分に殺菌できていたと言える。切片培養の結果については、Run1 の植物体の切片からは大腸菌が検出されなかった (図 5-7)。しかし、Run2 の株 No. 1 の切片培養試験においては、30 切片中 20 切片が大腸菌陽性を示し、植物体内部に大腸菌が侵入したことが目視によって確認

できた (図 5-8).

レタス磨碎物の 10 倍希釈液を接種した全ての CA 培地から大腸菌は検出されなかった (図 5-9). 培養後のレタス磨碎物を接種した CA 培地については, Run1 の植物体からは大腸菌が検出されなかった (図 5-10). 一方, Run2 の全ての植物体において, 増菌培養法で大腸菌陽性だった.

洗浄水が大腸菌に汚染されていなかったことから, 大腸菌が植物体内部へ侵入したと判定された (表 5-3). 大腸菌が侵入しなかった Run1 のレタスの重量は 20 g 前後だったが, 侵入した Run2 のレタスの重量は 12 g 程度だったことから, 植物体内部への大腸菌侵入には, 植物体の大きさも関与している可能性がある.

5-3-2-2 初発菌密度 10^4 CFU/mL の場合の植物体内への大腸菌侵入の有無

2 反復の試験において, Run2 の株 No. 3 の洗浄水が大腸菌に汚染されていたため, 内部侵入の判定ができなかった (図 5-6). 切片培養においては, 全株から大腸菌は検出されなかった (図 5-7). 判定不可である Run1 の株 No. 3 を除くと, レタス磨碎物の 10 倍希釈液を接種した全ての CA 培地から大腸菌は検出されなかった (図 5-9). 培養後のレタス磨碎物を接種した CA 培地については, Run1 の株 No. 2 から大腸菌が検出された (図 5-10). 一方で Run2 の植物体からは大腸菌は検出されなかった. よって, 洗浄水の汚染により内部侵入が判定できなかったものを除くと, Run1 の株 No. 2 の増菌培養法からのみ大腸菌の内部侵入が確認された (表 5-3). また, 今回の試験においても, 大腸菌が侵入した Run1 のレタス (株 No. 2) の重量は 13 g 程度であり, 侵入しなかった Run2 のレタスの重量は 22 g 程度だったことから, 大腸菌のレタス内部への侵入には, レタスの重量との関係性があると考えられる.

5-3-3 大腸菌陽性株の API20E による簡易同定結果

レタス内部に侵入した大腸菌が接種した大腸菌と同一であることを確認するた

め、侵入したと判定されたコロニーを分離・純化し、生化学試験および API20E による簡易同定を行った。コロニーは追加曝露試験で大腸菌陽性と判定した増菌培養および切片培養の培地から分離し、全部で 5 株となった。生化学試験の結果、レタス内部から分離した全ての菌株が大腸菌 KM1 株と同じ生化学的性質を示した（表 5-4）。そこで、API20E による簡易同定に供した。その一例を図 5-11 に示す。大腸菌陽性株の簡易同定結果を表 5-4 に示す。分離した 5 株すべてが大腸菌 KM1 と同一の API コード（5104572）を持つ大腸菌であると判定された。これらの結果から、水耕液に接種した大腸菌が根を介して植物体地上部へと移行したことが確認された。その際の植物体内部への大腸菌侵入の閾値は、大腸菌密度が 2×10^4 CFU/mL ~ 1×10^5 CFU/mL の範囲で 5 日間維持された場合であると示された。

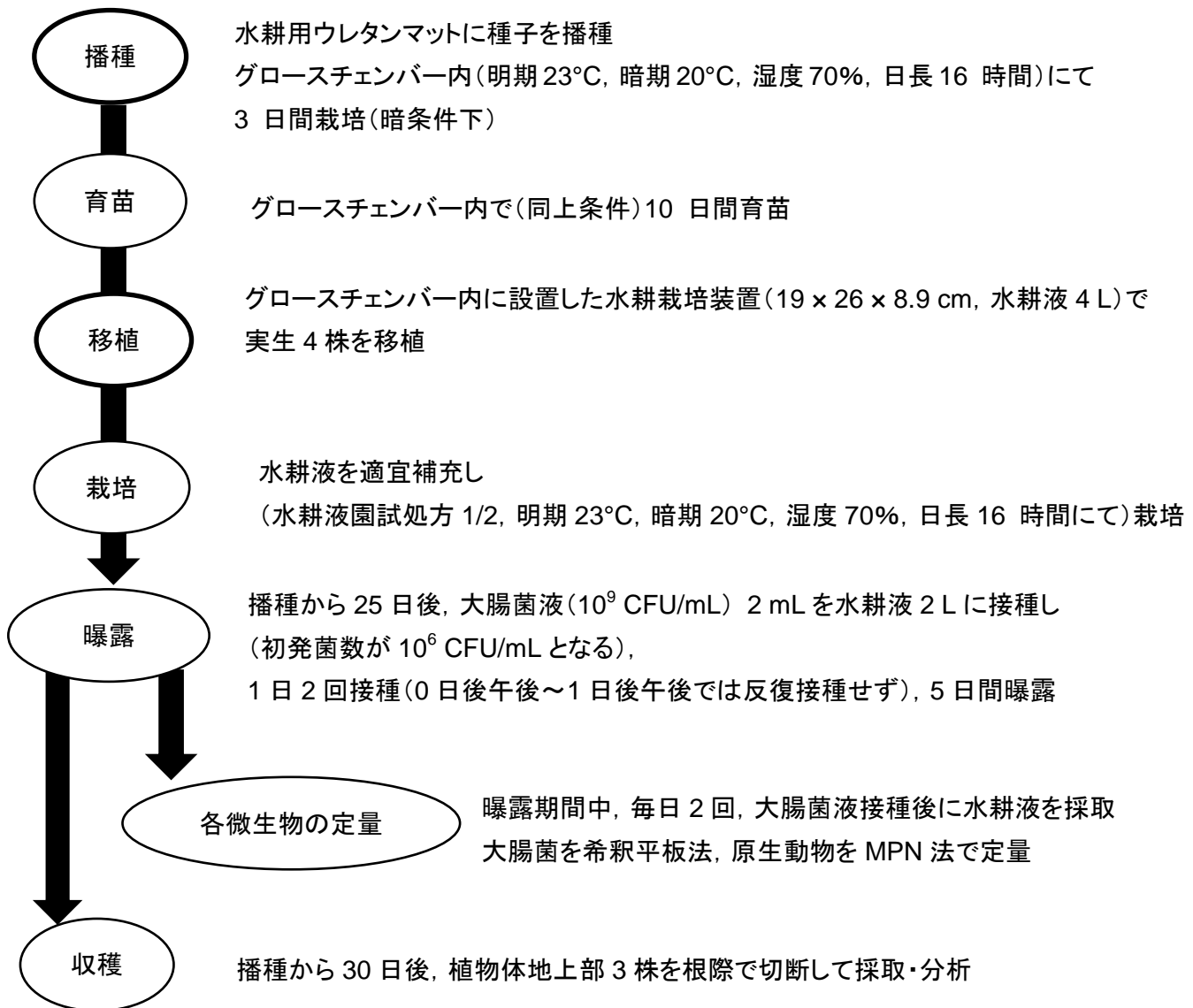


図 5-1 供試植物の水耕栽培および大腸菌反復接種による曝露試験の手順
(大腸菌初発菌密度 10^6 CFU/mL)

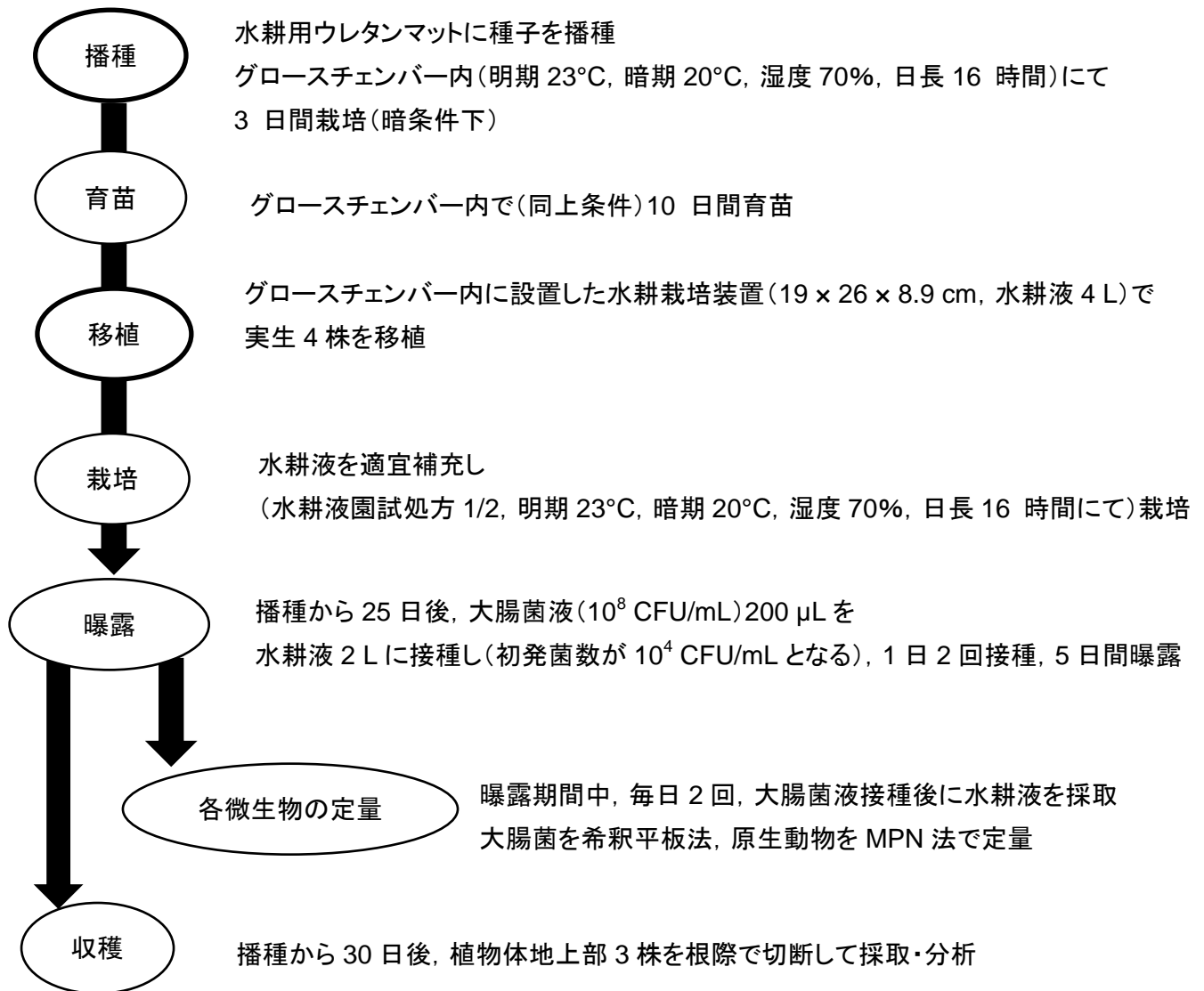


図 5-2 供試植物の水耕栽培および大腸菌反復接種による曝露試験の手順
(大腸菌初菌密度 10⁴ CFU/mL)

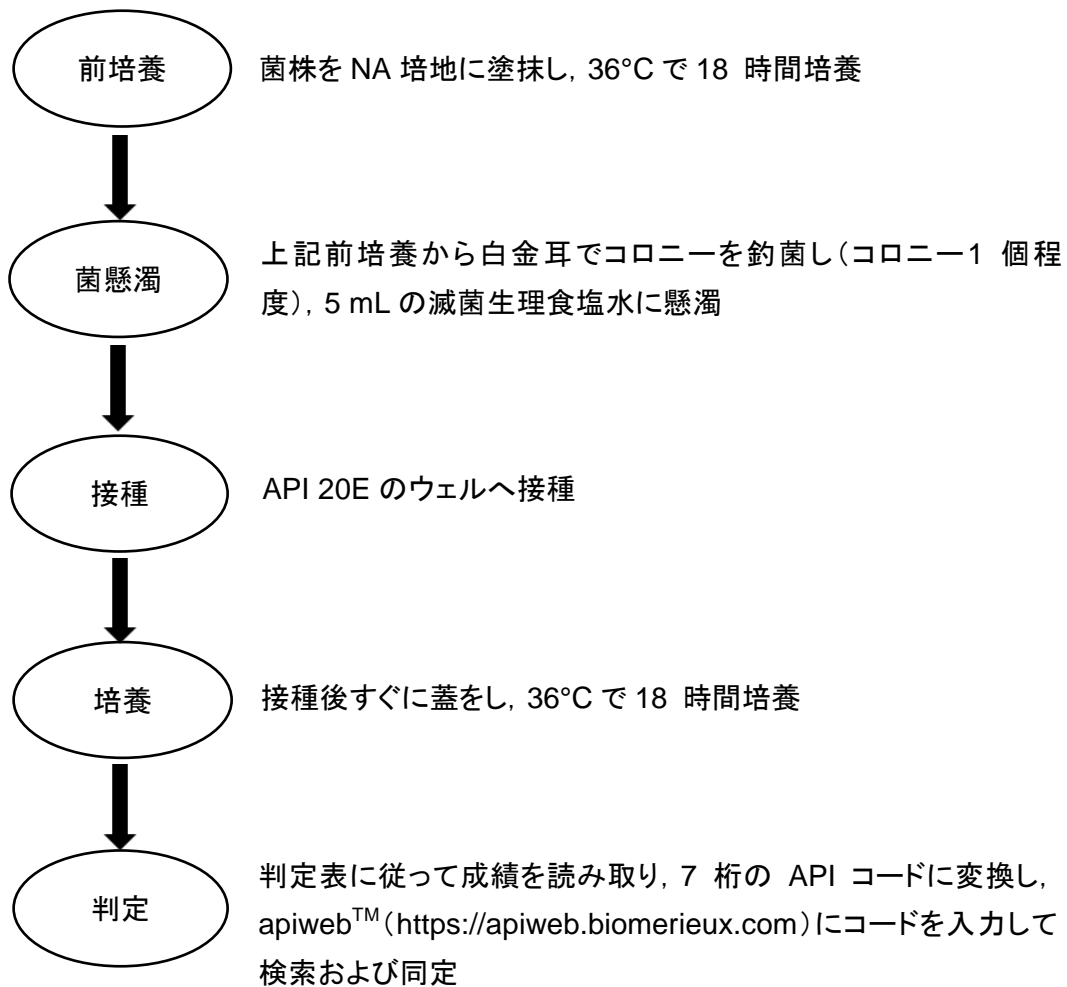


図 5-3 API 20E の手順

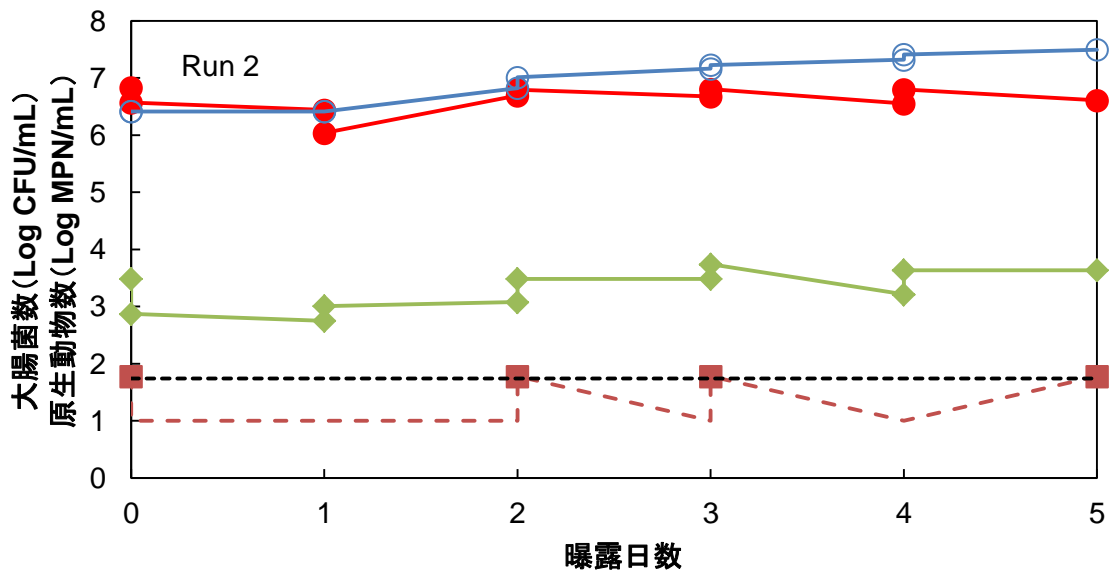
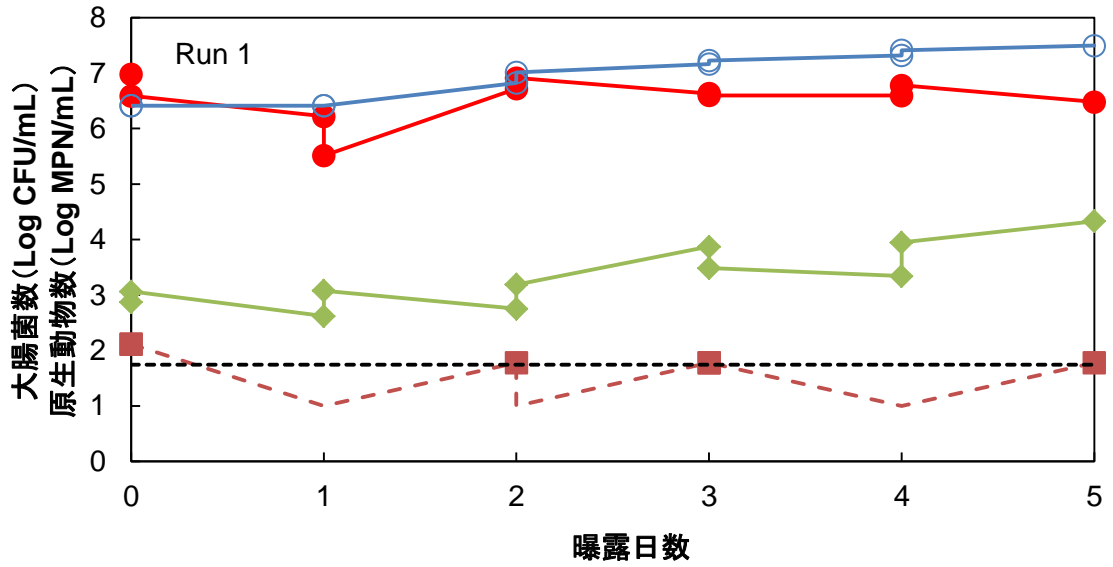
表 5-1 大腸菌を反復接種した際の水耕液中の大腸菌と原生動物の経時的変化(大腸菌初発菌密度 10^6 CFU/mL)

Run		曝露日数										
		0		1		2		3		4		5
		AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM
大腸菌*	接種源	(2.60 ± 0.10) $\times 10^9$	NT**	NT	NT	(4.07 ± 0.78) $\times 10^9$	(3.63 ± 0.45) $\times 10^9$	(4.30 ± 0.70) $\times 10^9$	(2.35 ± 0.39) $\times 10^9$	(4.00 ± 0.44) $\times 10^9$	(4.97 ± 1.19) $\times 10^9$	(5.43 ± 0.90) $\times 10^9$
	1	(9.63 ± 0.21) $\times 10^6$	(3.90 ± 0.78) $\times 10^6$	(1.66 ± 0.16) $\times 10^6$	(3.27 ± 0.47) $\times 10^5$	(5.23 ± 0.21) $\times 10^6$	(8.20 ± 2.07) $\times 10^6$	(4.30 ± 1.15) $\times 10^6$	(3.97 ± 0.76) $\times 10^6$	(3.93 ± 0.32) $\times 10^6$	(6.03 ± 0.38) $\times 10^6$	(3.03 ± 0.31) $\times 10^6$
	2	(6.77 ± 0.96) $\times 10^6$	(3.70 ± 0.46) $\times 10^6$	(2.75 ± 0.38) $\times 10^6$	(1.09 ± 0.25) $\times 10^6$	(4.93 ± 1.79) $\times 10^6$	(6.27 ± 0.70) $\times 10^6$	(4.73 ± 1.17) $\times 10^6$	(6.40 ± 0.70) $\times 10^6$	(3.57 ± 0.42) $\times 10^6$	(6.30 ± 0.46) $\times 10^6$	(4.07 ± 0.12) $\times 10^6$
	原生動物***	鞭毛虫	1.30×10^2	1.30×10^2	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	6.0×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	6.0×10^1	6.0×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$
	繊毛虫	7.45×10^2	1.16×10^3	4.15×10^2	1.20×10^3	5.65×10^2	1.54×10^3	7.45×10^3	3.06×10^3	2.19×10^3	8.85×10^3	2.14×10^4
	鞭毛虫	6.0×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	6.0×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	6.0×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	6.0×10^1
	繊毛虫	3.06×10^3	7.45×10^2	5.65×10^2	1.02×10^3	1.20×10^3	3.06×10^3	3.06×10^3	5.50×10^3	1.63×10^3	4.32×10^3	4.32×10^3

* 単位 : CFU/mL (検出限界 : 0.3 CFU/mL)

** NT: Not Tested (0 日後 PM~1 日後 PM では追加接種せず)

*** 単位 : MPN/mL (検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL)



- 大腸菌
- 大腸菌 (捕食圧がない場合の計算値)
- ◆ 繊毛虫
- 鞭毛虫

図 5-4 大腸菌を反復接種した水耕液中の大腸菌と原生動物の経時的変化
(大腸菌初発菌密度 10^6 CFU/mL)

* 破線は原生動物の検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL

表 5-2 大腸菌を反復接種した際の水耕液中の大腸菌と原生動物の経時的变化(大腸菌初発菌密度 10^4 CFU/mL)

Run	曝露日数												
	0		1		2		3		4		5		
	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM		
大腸菌*	接種源	(9.57 ± 0.21)	(9.00 ± 1.70)	(9.63 ± 0.31)	(8.77 ± 0.87)	(4.13 ± 0.65)	(2.16 ± 0.17)	(3.67 ± 0.12)	(4.47 ± 2.11)	(6.30 ± 0.36)	(6.40 ± 0.44)	(5.90 ± 0.10)	
		$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^8$
	1	(7.40 ± 0.78)	(9.93 ± 1.21)	(1.07 ± 0.38)	(1.72 ± 0.08)	(1.12 ± 0.18)	(9.97 ± 0.76)	(9.80 ± 0.50)	(9.10 ± 1.20)	(5.07 ± 0.25)	(4.97 ± 0.32)	(1.47 ± 0.49)	
		$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^5$	$\times 10^5$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^4$
	2	(5.27 ± 0.67)	(7.33 ± 4.33)	(1.11 ± 0.14)	(1.18 ± 0.10)	(8.27 ± 0.97)	(5.80 ± 0.89)	(7.10 ± 0.27)	(1.41 ± 0.19)	(1.01 ± 0.09)	(9.83 ± 0.40)	(2.13 ± 0.20)	
		$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^5$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^5$	$\times 10^4$	$\times 10^4$	
原生動物**	鞭毛虫	1	6.00×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	
		2	1.20×10^2	2.05×10^2	6.00×10^1	6.00×10^1	6.00×10^1	1.30×10^2	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	1.30×10^2	1.95×10^2	2.34×10^3
	鞭毛虫	1	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	$< 5.5 \times 10^1$	6.00×10^1	6.00×10^1	$< 5.5 \times 10^1$	2.80×10^2
		2	5.65×10^2	1.20×10^2	5.65×10^2	3.00×10^2	3.00×10^2	3.80×10^2	6.00×10^1	3.00×10^2	3.00×10^2	3.00×10^2	4.21×10^3

* 単位 : CFU/mL (検出限界 : 0.3 CFU/mL)

** 単位 : MPN/mL (検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL)

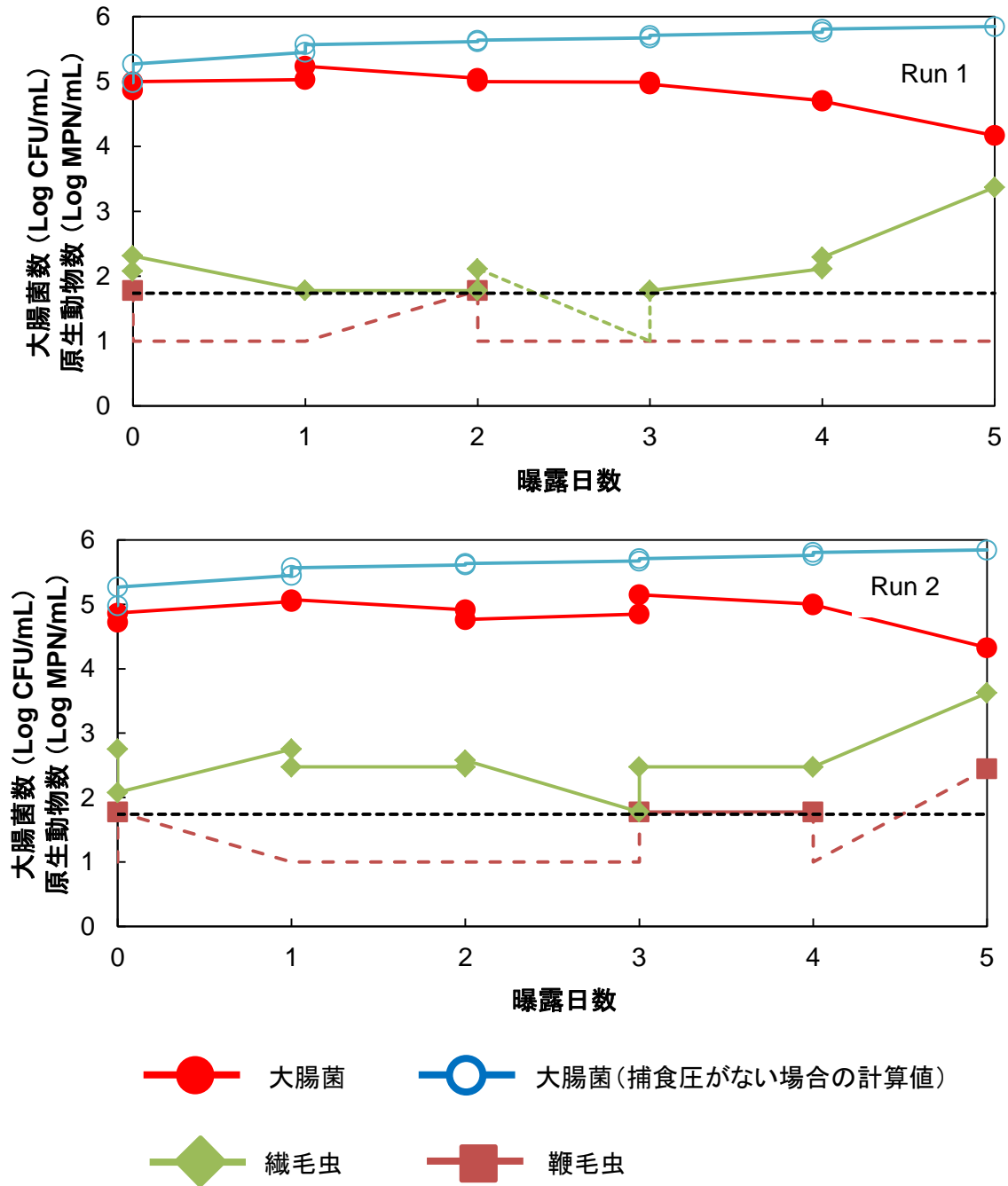


図 5-5 大腸菌を反復接種した水耕液中の大腸菌と原生動物の経時的変化
(大腸菌初発菌密度 10^4 CFU/mL)

*破線は原生動物の検出限界 : 5.5×10^1 MPN/mL



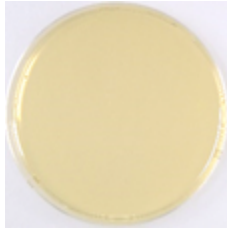
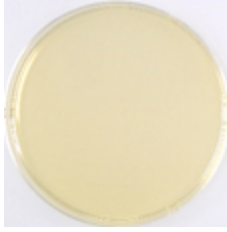



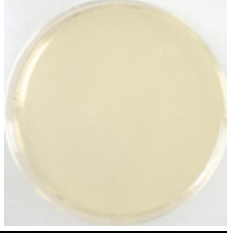
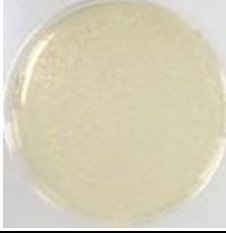
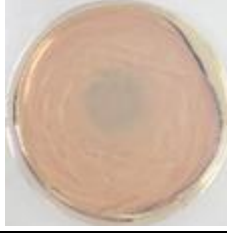

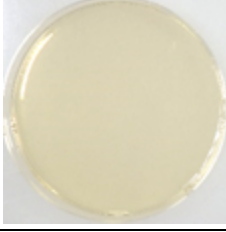
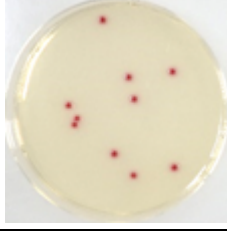
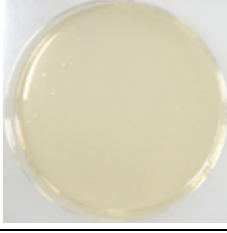
大腸菌初発菌密度 (CFU/mL)	植物株 No.			
	1	2	3	
10^6	Run 1			
	Run 2			
	対照区			
10^4	Run 1			
	Run 2			
	対照区			

図 5-6 洗浄水をろ過したメンブランフィルターの増菌培養液を接種した CA 培地の培養性状













大腸菌初発菌密度 (CFU/mL)	植物株 No.			
	1	2	3	
10^6	Run 1			
	Run 2			
10^4	Run 1			
	Run 2			

図 5-7 大腸菌曝露 5 日後のレタス切片の CA 培地上の性状

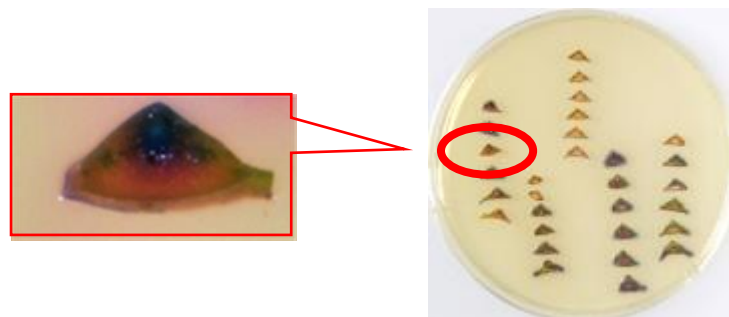


図 5-8 大腸菌陽性切片の拡大図
(大腸菌初発菌密度 10^6 CFU/mL, Run 2-1)






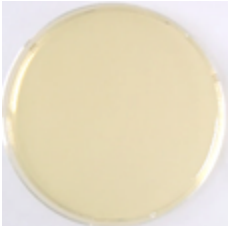





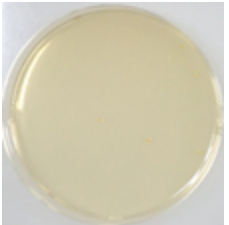
大腸菌初発菌密度 (CFU/mL)	植物株 No.			
	1	2	3	
10^6	Run 1			
	Run 2			
	Run 1			
	Run 2			

図 5-9 レタス磨碎物の 10 倍希釈液を接種した CA 培地の性状





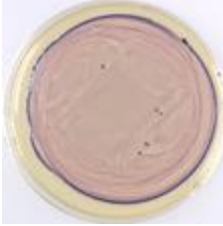
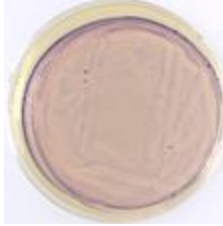
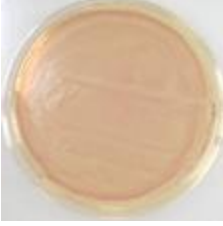
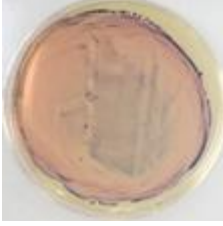
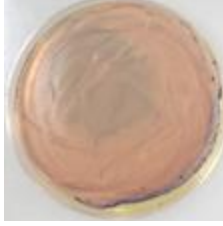


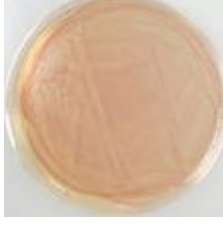
大腸菌初発菌密度 (CFU/mL)	植物株 No.			
	1	2	3	
10^6	Run 1			
	Run 2			
10^4	Run 1			
	Run 2			

図 5-10 増菌培養後のレタス磨碎物液を接種した CA 培地の性状

表 5-3 大腸菌を反復接種した場合のレタス内部への大腸菌侵入の有無

曝露大腸菌密度 (CFU/mL)	Run	大腸菌密度(CFU/mL)*			株 No.	葉内の大腸菌の有無**			洗浄水の 汚染の 有無	侵入の 判定
		最小	最大	平均		希釈平板	増菌培養	切片培養***		
10 ^{6****}	1	$(3.27 \pm 0.47) \times 10^5$	$(9.63 \pm 0.21) \times 10^6$	$(4.56 \pm 2.55) \times 10^6$	1	-	-	0/30	-	-
					2	-	-	0/30	-	-
					3	-	-	0/30	-	-
	2	$(1.09 \pm 0.25) \times 10^6$	$(6.77 \pm 0.96) \times 10^6$	$(4.60 \pm 1.70) \times 10^6$	1	-	+	20/30	-	+
					2	-	+	0/30	-	+
					3	-	+	0/30	-	+
10 ^{4*****}	1	$(1.47 \pm 0.49) \times 10^4$	$(1.72 \pm 0.08) \times 10^5$	$(8.81 \pm 3.91) \times 10^4$	1	-	-	0/30	-	-
					2	-	+	0/30	-	+
					3	+*****	+	0/30	+	判定不可
	2	$(2.13 \pm 0.20) \times 10^4$	$(1.41 \pm 0.19) \times 10^5$	$(8.44 \pm 3.23) \times 10^4$	1	-	-	0/30	-	-
					2	-	-	0/30	-	-
					3	-	-	0/30	-	-

* 検出限界 : 0.3 CFU/mL

** + : 陽性, - : 陰性

*** 陽性の切片/培養した切片数

**** 実施日:2018年11月5日~12日

***** 実施日:2018年12月3日~10日

***** 2.3 CFU/g 生重

表 5-4 大腸菌を反復接種した水耕液のレタス内部から検出された大腸菌陽性菌株の生化性状*

曝露大腸菌濃度 (CFU/mL)	分離源			細胞形状	カタラーゼ	オキシダーゼ	グラム染色	芽胞
	試験 Run	植物株 No.	試験					
10 ⁶	2	1	切片培養	短桿菌	+	-	-	-
		1	磨砕物増菌培養	短桿菌	+	-	-	-
		2	磨砕物増菌培養	短桿菌	+	-	-	-
		3	磨砕物増菌培養	短桿菌	+	-	-	-
10 ⁴	1	2	磨砕物増菌培養	短桿菌	+	-	-	-
大腸菌 KM1 株				短桿菌	+	-	-	-

* + : 陽性, - : 陰性



図 5-11 API20E による簡易同定結果の一例
(大腸菌初発菌密度 10⁶ CFU/mL, Run 2-1, 切片培養 API CODE = 5104572)

6章 総合考察

本研究では、水耕液中での大腸菌および原生動物の動態を解明し、原生動物による大腸菌の捕食作用の抑制方法を検討し、水耕栽培作物内部への大腸菌侵入の閾値を解明した。

本研究ではまず、水耕液に接種した大腸菌が数日間で大幅に減少すること、この原因が原生動物の捕食によるものであり、大腸菌は菌密度を一定に維持できないことを示した。水耕液に接種した大腸菌菌密度の急激な低下は、 $\mu\text{C-FISH}$ 法と希釈平板法による菌数がほぼ一致したことから、VNC状態への生理学的変化によるものではなく、大腸菌の死滅によることを示した。フィルター処理実験により、水耕液中の大腸菌の減少は、孔径 $1.0\ \mu\text{m}$ および $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターで除去できる生物学的因子、すなわち原生動物によるものであることが示唆された。加えて、 $1.0\ \mu\text{m}$ 処理区で原生動物がほとんど観察されず、糸状菌および酵母も観察されなかったという結果によっても支持されている。水耕液中の鞭毛虫および繊毛虫による FLB 捕食試験により、原生動物が水耕液中で活発に細菌を捕食していることを実証した。それに加え、大腸菌および原生動物（鞭毛虫、アメーバ、および繊毛虫）のバイオボリュームを測定し、その増減を比較した結果、全原生動物バイオボリュームの増加量は大腸菌バイオボリュームの減少量の約 9%に相当し、これは Scott (1985) により報告された捕食原生動物と非捕食細菌の存在比の値とほぼ一致する。白川および我孫子 (2001) は、*Cryptotaenia canadensis* subsp. *japonica* (ミツバ)、リーフレタス、およびバターヘッドレタス栽培中の水耕液に接種した大腸菌が本研究と同様に減少することを報告しているが、大腸菌減少の原因については言及していない。本研究は、水耕液中の外来菌の生存性に原生動物が重要な役割を担うことを報告した初めてのものである。

水耕液の常在菌と大腸菌では、大腸菌の方が原生動物に捕食されやすいことが判明した。これは、原生動物の細菌捕食には嗜好性がある (Dopheide ら、

2011) 可能性, また本研究では接種した大腸菌密度が常在菌密度よりも著しく高かったために, 常在菌よりも原生動物に捕食されやすくなったためと考えられる.

Mallory ら (1983) により, 標的細菌 (本研究での大腸菌に相当) の他に原生動物の餌となる細菌が存在すると, 他の細菌が存在しないときよりも標的細菌の菌密度が減少することが報告されている. 本研究において, 常在菌がほとんど減少せず, 大腸菌が大幅に減少する理由は, 原生動物が大腸菌に対する嗜好性を有していること, ならびに常在菌が多く存在したため, 大腸菌菌密度が低くなってからも, 菌密度の高い常在菌が捕食される際に, 常在菌と共に大腸菌が捕食されたためと考えられる.

多くの研究者が, 淡水 (Berninger ら, 1991 ; Hahn および Höfle, 2001 ; Pernthaler, 2005 ; Kanavillil および Kurissery, 2013), 海水 (Fenchel, 1982 ; Hahn および Höfle, 2001 ; Sherr および Sherr, 2002 ; Pernthaler, 2005), 土壌 (Clarholm, 1981 ; Vargas および Hattori, 1986 ; Rønn ら, 2002), およびバイオフィーム (Dopheide ら, 2011 ; Knavillil および Kurissery 2013 ; Inaba ら, 2018) などの自然環境において原生動物が細菌捕食者として重要な役割を果たしていることが報告されている. このような役割が水耕液中でも果たされていることを本研究で明らかにした.

このような現象は, 生鮮野菜へのヒト病原菌侵入に大きな影響を与える可能性がある. 多くの研究で, 植物体内部への腸内細菌の侵入に焦点があてられてきたが, 細菌の侵入に要する菌密度 (閾値) に関しては, 統一した見解がない. 生鮮野菜へのヒト病原菌の実験的な侵入は Itoh ら (1998) によって初めて報告された. 彼らは, 滅菌水中のハツカダイコンに大腸菌 O157:H7 を 10^3 CFU/mL で接種した際に, 植物体内部へと侵入すると報告した. 無菌条件下では, ヒト病原菌の植物体内部への侵入閾値は非滅菌条件下よりも低くなるようであり, 大腸菌 O157:H7 が約 10^2 CFU/mL の濃度でレタス, クレス, ハツカダイコン, およびハウレンソウを含む様々な生鮮野菜に侵入すると報告されている

(Jablasone ら, 2005). 同様に、*Salmonella enterica* は、レタスおよびハツカダイコンの植物に滅菌系では同じ濃度で侵入することが報告されている (Jablasone ら, 2005). さらに、大腸菌 O157:H7 と *S. enterica* は、接種菌密度 10^0 CFU/mL において滅菌寒天で成長したアルファアルファに侵入したと報告されている (Dong ら, 2003). しかしこれらとは対照的に、大腸菌 O157:H7 は、非滅菌の水耕栽培で生育したレタス内部に、 3×10^7 CFU/mL の濃度でさえも侵入できなかった (Franz ら, 2007). これらの報告で観察された滅菌状態と非滅菌状態での閾値の矛盾は、非滅菌条件下 (水耕栽培) での原生動物の存在および滅菌条件でのそれらの不在によって説明することができる.

本研究では、大腸菌の植物体内部への侵入の閾値が、植物種によって大きく異なることを明らかにした. 大腸菌が侵入したレタス、ハウレンソウ、およびコマツナは双子葉植物であり、侵入しなかったコネギは単子葉植物という違いがある. 両者には維管束の配置や太さ、根の構造等に大きな違いがあり、これらが大腸菌の侵入に影響を及ぼしている可能性も考えられる. しかし、単子葉植物での大腸菌等の侵入に関する報告は本研究を除いてはほとんど見当たらず、知見が極めて少ない. 双子葉類の 3 種でも侵入の閾値が異なっており、レタスでは 10^5 CFU/mL と 10^6 CFU/mL の間、ハウレンソウでは 10^7 CFU/mL よりも低密度、そしてコマツナでは 10^7 CFU/mL と 10^8 CFU/mL の間に閾値があることが示唆された. これは、大腸菌の接種が 1 回のみの場合であり、レタスにおいて大腸菌を反復接種した際には 10^4 CFU/mL でも大腸菌が植物体内部へと侵入した. このことから、大腸菌密度が維持された場合には低菌密度であっても植物体内部に侵入する可能性が高いことが判明した. 切片培養法により大腸菌コロニーが主に維管束上に観察されたことから、根から侵入した大腸菌は維管束を通り、地上部まで移行してきたことが明らかであった. 維管束が主要な移動経路の一つであることは、*S. enterica* によるピーナツ植物体への侵入でも明らかにされている (Deering ら, 2012).

大腸菌の内部侵入における閾値を左右する因子には、初発菌密度、曝露期間、

植物種、および原生動物の存在があることが明らかであった。特に、初発大腸菌密度と侵入率に高い関連性があることが示唆された。水耕栽培ホウレンソウに大腸菌 O157:H7 を曝露した際に、初発菌密度が 10^5 CFU/mL の場合よりも 10^7 CFU/mL の場合により高い頻度で内部に侵入したという報告がある (Macarisin ら, 2014)。同様に、アルファルファに *S. enterica* を $10^0 \sim 10^7$ CFU/mL の初発菌密度で曝露した際に、初発菌密度が高いほど、内部に侵入した *S. enterica* の菌密度が上昇した (Dong ら, 2003)。本研究でも 10^5 CFU/mL の低菌密度ではレタス植物体内部への菌侵入は生じなかったが、大腸菌密度が高くなっていくにつれて侵入率が上昇する傾向が認められた。したがって、本研究の諸結果は、これらの報告を支持する。

本研究は非滅菌条件であり、そのため原生動物の影響を受け、大腸菌の植物体内部への侵入の閾値を決定することが難しかった。すなわち、大腸菌の植物体内部への侵入の閾値を解明するためには、初発菌密度を維持することが不可欠であるが、原生動物が存在するために困難である。そこで、原生動物による捕食作用を抑制する抗原生動物薬を種々検討した。まずメトロニダゾールについては、大腸菌曝露試験において、濃度 500~1,000 mg/L の範囲で原生動物の増殖をある程度抑えられた。しかし、大腸菌密度が著しく減少したことから、捕食作用は抑えられなかったと示唆される。次いでピランテルパモ酸塩については、*in vitro* 試験において原生動物密度がある程度低くないと効果がないことが判明した。

抗原生動物薬は嫌氣的な人体腸管内で効果を発揮するものであり、メトロニダゾールは嫌氣的環境の方が細胞に取り込まれやすいとの報告がある (Müller および Lindmark, 1976)。このことから、好氣的な水耕栽培液の中では、細胞への浸透性が低下して薬効が弱まったと考えられる。

したがって、両薬剤とも単独では十分な効果がないことが判明した。メトロニダゾールとピランテルパモ酸塩を組み合わせた場合、ランブル鞭毛虫に対する効果が向上したという報告があり (Hausen ら, 2010)、両薬剤をレタスお

よび大腸菌への影響がない濃度で混合し、原生動物への効果を判定した。しかし、供試の条件では、原生動物の増殖を抑制できなかったため、両薬剤を混合使用しても大腸菌の捕食作用を抑制できないと考えられる。以上のことから、薬剤による原生動物の大腸菌捕食作用の抑制は困難であると判明した。

そこで、大腸菌を反復接種することによって原生動物の捕食圧を相殺し、水耕液中の菌密度を一定に維持した上で植物体内部への侵入の有無を検討した。大腸菌初発菌密度 10^6 CFU/mL または 10^4 CFU/mL の大腸菌を水耕液に追加接種した場合、接種した大腸菌密度の総和に比して終末菌密度は約 10%に相当した。これは、原生動物によって約 90%の菌体が捕食されたためだと考えられる。また、原生動物の中でも、鞭毛虫は比較的少数しか検出されなかったのに対して、繊毛虫は 1 桁増加していたことから、大腸菌捕食には繊毛虫が大きく寄与していると考えられる。

初発菌密度 10^6 CFU/mL の試験では、レタス全 6 株のうち 3 株の内部に大腸菌が侵入した。また、植物体 Run2-1 の 30 切片のうち、20 切片から大腸菌が検出されたことから、根から侵入した大腸菌が維管束を介して植物体内部を広域的に移動することが証明された。一方、初発菌密度 10^4 CFU/mL の試験では、レタス全 5 株のうち、洗浄水が汚染されていた 1 株を除き、1 株の内部に大腸菌が侵入していた。これらの結果から、大腸菌が 1.5×10^4 CFU/mL ~ 1.7×10^5 CFU/mL の菌密度で 5 日間維持された場合に、レタス内部に侵入することが判明した。このように、原生動物の捕食圧下においても、大腸菌の侵入閾値を正確に測定できたのは、本研究が初めてである。

先行研究において水耕液や灌漑水中の大腸菌の生存性が悪いことが示されており (Lopez-Galvez ら, 2016 ; Bernstein ら, 2006), 本研究においても水耕液に接種した大腸菌が原生動物による捕食作用によって著しく減少した。これらのことを踏まえると、本研究における反復接種のように菌密度が維持される状況は現実の水耕栽培施設では稀であり、今回判明した閾値は生産現場では極めて起こりにくいと言える。また、自然状態では原生動物による捕食作用がある

ため、生産現場では、今回判明した閾値よりも高い初発菌密度でないと植物体内部への侵入は起こりにくいとも考えられる。

本研究の実験結果から、大腸菌は、レタスが吸水する際に根から内部へ侵入した可能性が高いと考えられる。Wachtelら（2001）の試験では、ポット土壤に大腸菌 O157:H7 を接種し、レタスの幼苗に曝露したところ、根に単体または小さな凝集体で存在しており、接種した大腸菌 O157:H7 の大部分が維管束内部（Wachtel らは導管ではないかと推察）に存在していたと述べており、本研究の見解と一致する。一方、Wrightら（2012）は、作物の液体培地に大腸菌を接種した場合、根の表面組織のアポプラスト（細胞壁と細胞膜の間）に大腸菌の集団が存在しており、植物共生細菌と類似したメカニズムで細胞内部に侵入する可能性があることを報告している。このことは、維管束系だけでなく、根の表面の細胞からでも植物体内部に侵入できることを示しているが、シンプラストにまで侵入するかどうかの知見はない。加えて、植物側がヒト病原菌を植物共生菌だと誤認して結果的に誘引してしまう、あるいは、防御機能が応答せず、ヒト病原菌が排除されない可能性も考えられる。

水耕栽培施設、特に養液循環型の施設にヒト病原菌が侵入した場合、水耕栽培装置全体に汚染が広がり、作物を汚染するリスクが高いことが指摘されている（農林水産省農林水産技術会議、2005）。一方本研究により、水耕液に接種した大腸菌は原生動物に急激に捕食され、菌密度が短時日に著しく減少すること、また原生動物共存下で大腸菌の接種が一回だけの場合には、作物体への侵入は 10^6 CFU/mL 以上の高い菌密度で初めて生ずることを明らかにした。大腸菌反復接種試験では 10^4 CFU/mL でも大腸菌のレタス内部への侵入が観察された。しかし、水耕栽培施設が一挙に 10^6 CFU/mL もの高い菌密度で食中毒菌によって汚染される可能性、および水耕液に混入した大腸菌が 10^4 CFU/mL で長期間維持される可能性は考えにくい。これらのことから、水耕液に常在する原生動物の捕食作用は、水耕栽培施設における食中毒菌汚染の脅威を低減する自然の仕組みであると言える。

我が国の水耕栽培施設の衛生管理にあたっては、日本施設園芸協会による水耕栽培の衛生管理ガイド（日本施設園芸協会，1999）などの周知により，その水準は国際的にも高い．この点，毎年のように水耕栽培野菜やスプラウトなどによる大規模な食中毒が多発している欧米（EFSA，2011；Frankら，2011）とは一線を画している．本研究で明らかにした水耕液中での原生動物と大腸菌の相互作用ならびに大腸菌の植物体内部への侵入閾値に関する知見は，水耕栽培作物の衛生管理に大きく貢献すると期待される．今後一層の安全安心な水耕栽培野菜の生産のための衛生管理には、ヒト病原菌と原生動物との相互作用などに関するさらなる知見の集積が望まれる．

謝 辞

博士論文を執筆するに当たり、多くの方々からご指導ご鞭撻を賜りました。

まず、佐賀大学農学部 of 染谷孝名誉教授に厚く御礼申し上げます。研究生のころより、約 8 年間にわたり、染谷先生の研究室に在籍させていただき、研究のみならず、様々なことを学ばせていただきました。微生物学に関する基礎から応用に至る多くの知識、実験のご指導、研究に取り組む姿勢などを丁寧にご指導くださり、研究者としてあるべき姿をご教授いただきました。一生の宝として、今後の研究活動に活かしてまいります。

佐賀大学農学部上野大介准教授には、いつも貴重なアドバイスをいただきました。また、染谷教授の退官後に主指導教員を引き受けていただいたこと、深く感謝いたします。

本研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたり、熱心なご指導ご鞭撻を賜り、公私にわたりお気遣いいただきました、佐賀大学農学部の龍田典子技術補佐員に心から厚く御礼申し上げます。

また、染谷研究室の卒業生の諸先輩方および同期・後輩の皆様にも深く感謝いたします。研究生時代から博士課程に至るまで、様々な場面で研究室の皆様を支えられ、叱咤激励を受けながら、今日まで過ごしてまいりました。

連合農学研究科の諸先生、職員の方をはじめ、これまで、私を支えてくださったすべての皆様に深い感謝の意を表します。

最後に、惜しめない援助と激励、そして支えとなってくれた家族に心から感謝いたします。

引用文献

1. Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., leGall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C., Smirnov, A., and Spiegel, F. W. 2012: The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59**, 429–493.
2. Barker, J. and Brown, M. R. W. 1994: Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, **140 (Pt 6)**, 1253–1259.
3. Barker, J., Humphrey, T. J., and Brown, M. R. W. 1999: Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol. Lett.*, **173**, 291–295.
4. Bayer, C., Bernard, H., Prager, R., Rabsch, W., Hiller, P., Malorny, B., Pfefferkorn, B., Frank, C., De Jong, A., Frlesema, I., Stark, K., and Rosner, B. M. 2014: An outbreak of *Salmonella* Newport associated with mung bean sprouts in Germany and the Netherlands, October to November 2011. *Eurosurveillance*, **19**.
5. Berninger, U. G., Finlay, B. J., and Kuuppo-Leinikki, P. 1991: Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnol. Oceanogr.*, **36**, 139–147.
6. Bernstein, N., Sela, S., Pinto, R., and Ioffe, M. 2007: Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of Maize via the root system. *J. Food Prot.*, **70 (2)**, 471-475.
7. Binnerup, S. J., Jensen, D. F., Thordal-Christensen, H., and Sørensen, J. 1993: Detection of viable, but non-culturable *Pseudomonas fluorescens*

- DF57 in soil using a microcolony epifluorescence technique. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **12**, 97-105.
8. Brandl, M. T., Rosenthal, B. M., Haxo, A. F., and Berk, S. G. 2005: Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1562–1569.
 9. CDC (Centers for Disease Control) 2007: Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants—United States, 2005–2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **56**, 909–911.
 10. CDC (Centers for Disease Control) 2009: Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with eating alfalfa sprouts—United States, 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **58**, 500–503.
 11. CDC (Centers for Disease Control) 2018: Foods Linked to Food Poisoning. <https://www.cdc.gov/foodsafety/foods-linked-illness.html> (2019年5月閱覽)
 12. Chabaud, S., Andres, Y., Lakel, A., and Le Cloirec, P. 2006: Bacterial removal in septic effluent: influence of biofilm and protozoa. *Water Research*, **40**, 3109-3114.
 13. Clarholm, M. 1981: Protozoan grazing of bacteria in soil—impact and importance. *Microb. Ecol.*, **7**, 343–350.
 14. Cooley, M. B., Miller, W. G., and Mandrell, R. E. 2003: Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4915-4926.
 15. Deering, A. J., Pruitt, R. E., Mauer, L. J., and Reuhs, B. L. 2012: Examination of internalization of *Salmonella* serovar Typhimurium in peanut, *Arachis hypogaea*, using immunocytochemical techniques. *Food Res. Int.*, **45**, 1037-1043.

16. Dong, Y., Iniguez, A. L., Ahmer, B. M. M., and Triplett, E. W. 2003: Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1783–1790.
17. Dopheide, A., Lear, G., Stott, R., and Lewis, G. 2011: Preferential feeding by the ciliates *Chilodonella* and *Tetrahymena* spp. and effects of these protozoa on bacterial biofilm structure and composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 4564–4572.
18. Doyle, M. P. and Erickson, M. C. 2008: Summer meeting 2007—the problems with fresh produce: an overview. *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 317–330.
19. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control): Prevention and control measures for *Escherichia coli*.
<https://ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/prevention-and-control>
(2019年5月閱覽)
20. EFSA (European Food Safety Authority) 2011: Shiga toxin–producing *E. coli* (STEC) O104: H4 2011 outbreaks in Europe: taking stock. *EFSA Journal*, **9**, 2390.
21. Fenchel, T. 1982: Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **9**, 35–42.
22. Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., An der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M. J., Follin, P., Müller, L., King, L. A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., and Krause, G. 2011: Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.*, **365**, 1771–1780.

23. Franz, E., Visser, A. A., Van Diepeningen, A. D., Klerks, M. M., Termorshuizen, A. J., and Van Bruggen, A. H. C. 2007: Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiol.*, **24**, 106–112.
24. 富士製薬工業株式会社 2015 : フラジール®錠 250 mg, <https://database.japic.or.jp/pdf/newPINS/00054870.pdf> (2019年5月閲覧)
25. Gourabathini, P., Brandl, M. T., Redding, K. S., Gunderson, J. H., and Berk, S. G. 2008: Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2518–2525.
26. Guo, X., Van Iersel, M. W., Chen, J., Brackett, R. E., and Beuchat, L. R. 2002: Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3639–3643.
27. Hahn, M. W., Höfle, M. G. 2001: Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 113–121.
28. Hausen, M. A., Menna-Barreto, R. F. S., Lira, D. C., De Carvalho, L., and Barbosa, H. S. 2011: Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. *Parasitol. Int.*, **60**, 54-55.
29. 早津雅仁 2016 : 土壤微生物実験法第3版, 第9章 MPN法, pp. 73-77, 養賢堂, 東京.
30. 池晶子 2011 : 微生物から知る食の安全. 生物工程基礎講座ーバイオよもやま話ー, **89** 巻, **5** 号, 257-260.
31. Inaba, T., Hori, T., Sato, Y., Aoyagi, T., Hanajima, D., Ogata, A., and Habe, H. 2018: Eukaryotic microbiomes of membrane-attached biofilms in membrane bioreactors analyzed by high-throughput sequencing and microscopic observations. *Microbes Environ.*, **33**, 98–101.

32. Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H., and Kumagai, S. 1998: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1532–1535.
33. Jablasone, J., Warriner, K., and Griffiths, M. 2005: Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *Int. J. Food Microbiol.*, **99**, 7–18.
34. Jennison, R. F., Stenton, P., and Watt, L. 1961: Laboratory studies with the systemic trichomonade, metronidazole. *J. Clin. Path.*, **14**, 431-435.
35. Kanavillil, N. and Kurissery, S. 2013: Dynamics of grazing protozoa follow that of microalgae in natural biofilm communities. *Hydrobiologia*, **718**, 93–107.
36. Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagdee, B., Mikami, E., and Nasu, M. 2001: Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *J. Health Sci.*, **47**, 353–361.
37. 厚生労働省 2018 : 平成 29 年度食品の食中毒汚染実態調査の結果について, 薬生食監発 0329 第 4 号.
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinzenbu/0000200764.pdf> (2018 年 12 月閲覧)
38. 厚生労働省 2004 : 病原性大腸菌 O157 集団食中毒事件について
<https://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/01/dl/s0113-5e.pdf> (2019 年 5 月閲覧可能)
39. Kutter, S., Hartmann, A. and Schmid, M. 2006: Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **56**, 262-271.
40. Lopez-Galvez, F., Gil, M. I., Pedrero-Salcedo, F., Alarcón, J. J., and

- Allende, A. 2016: Monitoring generic *Escherichia coli* in reclaimed and surface water used in hydroponically cultivated greenhouse peppers and the influence of fertilizer solutions. *Food Control*, **67**, 90-95.
41. Ly, T. M. C. and Müller, H. E. 1990: Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J. Med. Microbiol.*, **33**, 51–54.
42. Mallory, L. M., Yuk, C. S., Liang, L. N., and Alexander, M. 1983: Alternative prey: A mechanism for elimination of bacteria species by protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1073–1079.
43. McCollum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O'Connor, K. A., Cosgrove, S., Gossack, J. P., Parachini, S. S., Jain, N. S., Ettestad, P., Ibraheem, M., Cantu, V., Joshi, M., DuVernoy, T., Fogg Jr., N. W., Gorny, J. R., Mogen, K. M., Spires, C., Teitell, P., Joseph, L. A., Tarr, C. L., Imanishi, M., Neil, K. P., Tauxe, R. V., and Mahon, B. E. 2013: Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *N. Engl. J. Med.*, **369**, 944–953.
44. Michino, H., Arak, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., and Yanagawa, H. 1999: Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.*, **150**, 787–796.
45. Müller, M., and Lindmark, D. G. 1976: Uptake of Metronidazole and Its Effect on Viability in Trichomonads and *Entamoeba invadens* Under Anaerobic and Aerobic Conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9 (4)**, 696-700.
46. Munnoch, S. A., Ward, K., Sheridan, S., Fitzsimmons, G. J., Shadbolt, C. T., Piispanen, J. P., Wang, Q., Ward, T. J., Worgan, T. L. M., Oxenford, C., Musto, J. A., McAnulty, J., and Durrheim, D. N. 2009: A multi-state outbreak of *Salmonella* Saintpaul in Australia associated with cantaloupe consumption. *Epidemiol. Infect.*, **137**, 367–374.

47. 日本施設園芸協会 1999：水耕栽培の衛生管理ガイド。日本施設園芸協会，東京。
48. 日本施設園芸協会 2003：生鮮野菜衛生管理ガイド—生産から消費まで—。日本施設園芸協会，東京。
49. 農林水産省：園芸用施設の設置等の状況（H28）。養液栽培施設の方式別設置実面積の推移。
http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/engei/sisetsu/haipura/setti_28.html
（2018年12月閲覧）
50. 農林水産省農林水産技術会議（2005）進化する施設栽培 大規模施設から植物工場まで，農林水産研究開発レポート No. 14。
<http://www.affrc.maff.go.jp/docs/report/pdf/no14.pdf>（2018年12月閲覧）
51. Pernthaler, J. 2005: Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Rev. Microbiol.*, **3**, 537–546.
52. Rogerson, A., Butler, H. G., and Thomason, J. C. 1994: Estimation of amoeba cell volume from nuclear diameter and its application to studies in protozoan ecology. *Hydrobiologia*, **284**, 229–234.
53. Rønn, R., Gavito, M., Larsen, J., Jakobsen, I., Frederiksen, H., and Christensen, S. 2002: Response of free-living protozoa and microorganisms to elevated atmospheric CO₂ and presence of mycorrhiza. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**, 923–932.
54. 佐藤製薬株式会社 2014：医薬品インタビューフォーム，コンバントリン®錠 100 mg・コンバントリン ドライシロップ。
55. Scott, J. M. 1985: The feeding rates and efficiencies of a marine ciliate, *Strombidium* sp., grown under chemostat steady-state conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **90**, 81–95.
56. Sharma, M., Ingram, D. T., Patel, J. R., Millner, P. D., Wang, X., Hull, A. E.,

- Donnenberg, M. S. 2009: A novel approach to investigate the uptake and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. *J. Food Prot.*, **72**, 1513–1520.
57. Sherr, B. F., Sherr, E. B., and Fallon, R. D. 1987: Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 958–965.
58. Sherr, E. B. and Sherr, B. F. 2002: Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**, 293–308.
59. 白川隆および我孫子和雄 2011: 水耕栽培における大腸菌の消長と制御技術の開発. 野菜・茶業試験場研究報告, **16**, 135-146.
60. Sibille, I., Sime-ngando, T., Mathieu, L., and Block, J. C. 1998: Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 197–202.
61. 染谷 孝 (2012) : 生鮮野菜による食中毒を防ぐ. 食品と容器, **50 (6)** : 385-391.
62. Taylor, E. V., Nguyen, T. A., Machesky, K. D., Koch, E., Sotir, M. J., Bohm, S. R., Folster, J. P., Bokanyi, R., Kupper, A., Bidol, S. A., Emanuel, A., Arends, K. D., Johnson, S. A., Dunn, J., Stroika, S., Patel, M. K., and Williams, I. 2013: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010. *J. Food Prot.*, **76**, 939–944.
63. Tiffany, M. A., Swan, B. K., Gebler, G. F., Cole, J. C., González, M. R., Reifel, K. M., Watts, J. M., Small, E. B., and Hurlbert, S. H. 2007: Ciliate plankton dynamics and survey of ciliate diversity in the Salton Sea, California, 1997-1999. *Lake Reserv. Manage.*, **23**, 606–619.
64. 内田努, 宮村謙一郎, 永山昌史, および郷原一寿 2011 : Dimethyl sulfoxide による分散ラット心筋細胞の凍結保護機構の実験的検討. 低温生物工学会

- 誌, **58 (1)**, 59-63.
65. Uphoff, H., Hedrich, B., Strotmann, I., Arvand, M., Bettge-Weller, G., and Hauri, A. M. 2014: A prolonged investigation of an STEC-O104 cluster in Hesse, Germany, 2011 and implications for outbreak management. *J. Public Health*, **22**, 41–48.
66. Vargas, R. and Hattori, T. 1986: Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **38**, 233–242.
67. Wachtel, M. R., Whitehand L. C., and Mandrell, R. E. 2002: Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J. Food Prot.*, **65 (1)**, 18-25.
68. Wright, K. M., Chapman, S., McGeachy, K., Humphris, S., Campbell, E., Toth, I. K., and Holden, N. J. 2012: The Endophytic Lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification and Internal Localization in Roots. *Phytopathology*, **103 (4)**, 333-340.
69. Wu, S., Ueno, D., Inoue, K., and Someya, T. 2009: Direct viable count combined with fluorescence in situ hybridization (DVC-FISH) for specific enumeration of viable *Escherichia coli* in cow manure. *Microbes Environ.*, **24**, 33–38.