

令和 5 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

食肉中のカンピロバクターの殺菌法と生菌数の新規定量法の構築

研究代表者 畑中 律敏 大阪公立大学大学院 獣医学研究科 准教授

研究要旨

本年度（令和 5 年度）の目標として *Campylobacter jejuni*, *C. coli* を特異的に検出・定量するための ddPCR 系の構築を試みた。ddPCR 構築にあたって、*C. jejuni*, *C. coli* に普遍的に存在し、かつ 1 菌体当たり 1 コピーしか存在しない細胞膨化致死毒素(*cdt*)遺伝子をターゲットに Primer/Probe を設計した。構築した ddPCR については、*C. jejuni*, *C. coli* 各 20 菌株ずつ（臨床分離株、ニワトリ、ウシ由来株）他の *Campylobacter* 属菌 5 菌種、および近縁種 3 菌種計 20 菌株、および他の腸内細菌科菌群 12 菌種 40 菌株を用い感度・特異度を検証した。構築した ddPCR の感度・特異度は共に 100%であった。さらに、同一のテンプレートを用いリアルタイム PCR と ddPCR で結果を比較すると、ddPCR の方がより感度よく多量の *Campylobacter* を検出できることが分かった。さらに、PMA を用い生菌のみを感度よく検出・定量できる ddPCR（PMA-ddPCR）の条件を見出しており、次年度に向けて様々な由来の菌株を用い評価を行っている。

A. 研究目的

我が国の細菌性食中毒の中でカンピロバクター食中毒は、事件数・患者数とも常に上位に位置し問題となっている。カンピロバクター食中毒の多くは、本菌で汚染された食肉を加熱不十分な状態で喫食することが原因と考えられている。また、我が国には「鳥刺し」や「たたき」といった半生の状態で喫食する食文化もあり、食中毒の発生リスクが高まる。そのため、カンピロバクター食中毒を減らすためには食肉の汚染をいかに減らすかが重要であり、そのためには迅速に生菌を検出・定量し消毒薬等で殺菌および

評価する方法を確立することが重要である。

しかしながら、消毒薬の評価は多くの場合、試験管内で対象菌と薬剤を混和した後に生菌数を計測することで行われ、食品中や食肉処理現場での評価は十分とはいえない。その背景には生菌と死菌を区別するためには培養法に依存せざるを得なく、迅速性や感度の問題もある。そこで本研究では、鶏肉のカンピロバクター汚染に焦点をあて、食鳥処理場や調理現場にも応用できる方法を提案するための基盤データの収集を目的に、培養法では定量できない微量の生菌のみを迅速に定量する Droplet Digital PCR (ddPCR)

法の構築を行うとともにカンピロバクターを汚染させた鶏肉を塩素系消毒薬で処理し、殺菌効果の検討を行う。

B. 研究方法

1) ddPCR の構築

C. jejuni, *C. coli* に普遍的に存在し、かつ 1 菌体当たり 1 コピーしか存在しない細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子をターゲットに Primer/Probe を設計した。まず、設計した Primer/Probe の感度を確認するために、*C. jejuni*, *C. coli* 各 20 菌株ずつ (臨床分離株、ニワトリ、ウシ由来株) を用いリアルタイム PCR にて反応性を確認した。また、特異度を確認するために、他の *Campylobacter* 属菌 5 菌種 (*C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*)、および近縁種 3 菌種 (*Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii*, *Helicobacter pylori*) 計 20 菌株、および他の腸内細菌科菌群 12 菌種 40 菌株を用い感度・特異度を検証した。

2) ddPCR および平板塗抹法による菌数定量の差

C. jejuni 81-176 株 および *C. coli* ATCC33559 株をそれぞれ Bolton 培地で 24 時間、80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ 条件下で培養後、20,000 xg で遠心後上清を捨て、PBS で菌体を懸濁し OD₆₀₀=1.0 に調整した後、PBS にて 10 倍段階希釈を行い、平板塗抹法で血液寒天培地を用いて菌数カウントを行った。

調整した菌液より、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出し鋳型を作製した。菌数カウントの結果より 1,000 CFU/μL となるように鋳型を希釈し、ddPCR で鋳型中の DNA のコピー数を定量し比較した。

3) 鶏盲腸便中の *C. jejuni*, *C. coli* の菌数定量

C. jejuni, *C. coli* が陽性である鶏盲腸便 3 検体 (Sample1, 2, 3) を PBS で 10 倍希釈し、アルカリ熱抽出法で鋳型を作製し、リアルタイム PCR および ddPCR で菌数の定量を行い比較した。

4) PMA 処理の予備検討

C. jejuni 81-176, JCM2013 株をそれぞれ 48 h 血液寒天培地で培養後 BPW で菌体を懸濁した。10,000 xg で遠心後上清を捨て、100 μM の PMA 溶液を加え 10 分間室温で静置後 15 分間 LED クロスリンカーで光照射を行った。再度同条件で遠心後上清を捨て、上記と同様の条件で PMA 溶液を加え、光照射を行った。再度同条件で遠心後上清を捨て、アルカリ熱抽出法で鋳型を調整し、ddPCR を行った。

C. 研究結果

1) 構築した ddPCR の感度・特異度

設計した Primer/Probe を用い、リアルタイム PCR で、PCR の感度および特異度の評価を行った。用いた *C. jejuni* および *C. coli* はそれぞれ全て、*C. jejuni* および *C. coli* と同定することができ、本 Primer/Probe の感度は 100% であった。また、他の *Campylobacter* 属菌 5 菌種 (*C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*)、および近縁種 3 菌種 (*Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii*, *Helicobacter pylori*) 計 20 菌株、および他の腸内細菌科菌群 12 菌種 40 菌株に対し PCR を行った結果全て陰性となったことより、本 Primer/Probe の特異度は 100% であった。

2) CFU と遺伝子の copy 数の違い

C. jejuni 81-176 株 および *C. coli* ATCC33559

の鋳型を 1,000 CFU/μL に調整し、ddPCR で遺伝子のコピー数を定量すると、それぞれ 1,423±375 および 3,497±498 copies/μL であった。以上のことより、CFU と DNA の copy 数には差異が生じることが明らかとなった。

3) 鶏盲腸便中からの菌数定量

鶏盲腸便 (Sample1, 2, 3) より作製した鋳型を用い、リアルタイム PCR を用いて菌数定量を行った結果、Sample1 (*C. jejuni*; 478.6 CFU/μL, *C. coli*; 316.2 CFU/μL)、Sample2 (*C. jejuni*; 14.5 CFU/μL, *C. coli*; 39.8 CFU/μL)、Sample3 (*C. jejuni*; 20.0 CFU/μL, *C. coli*; 89.1 CFU/μL)であった。一方、ddPCR を用いて菌数定量を行った結果、Sample1 (*C. jejuni*; 6, 892 CFU/μL, *C. coli*; 357.7CFU/μL)、Sample2 (*C. jejuni*; 130.4 CFU/μL, *C. coli*; 27.2 CFU/μL)、Sample3 (*C. jejuni*; 214.2 CFU/μL, *C. coli*; 184.1 CFU/μL)であった。

4) PMA 処理による生菌のみの検出

C. jejuni 81-176 株においては OD₆₀₀=1.0 に調整した場合、熱処理した死菌においては PMA 非処理群で 10.3±0.5 log copies/μL、PMA 処理群で 9.5±0.4 log copies/μL となり、PMA 処理を行っても、死菌は検出された。一方 OD₆₀₀=0.1 に調整した場合、PMA 非処理群で 9.2±0.2 log copies/μL、PMA 処理群で検出限界未満 (≦3.0 log copies/μL) となり、PMA 処理により死菌は検出されなくなった。一方、*C. jejuni* JCM2013 株においては OD₆₀₀=1.0 に調整した場合においても、熱処理した死菌においては PMA 非処理群で 10.1±0.4 log copies/μL、PMA 処理群で検出限界未満 (≦3.0 log copies/μL) となり、PMA 処理により死菌は検出されなくなった。

D. 考察

本研究では、*C. jejuni* および *C. coli* においてゲノム上に 1 コピーしかないと解っている *cdt* 遺伝子をターゲットに Primer/Probe を設計し、検出される遺伝子のコピー数が菌数となる定量可能な ddPCR を構築した。

血液寒天培地を用いて平板塗抹法で求めた菌数を元に、1,000 CFU/μL となるように鋳型を調整し ddPCR で DNA のコピー数を定量した結果、CFU よりも多量の DNA コピー数が鋳型に存在していることが明らかとなった。平板塗抹法では、寒天培地上に発育できる菌数を計測しており、ddPCR では生菌・死菌どちらの DNA をも計測しているため、このような差が見られたと考えられた。

次に鶏盲腸便を用いてリアルタイム PCR と ddPCR で *Campylobacter* の定量を行った結果、リアルタイム PCR で定量した結果と比較し ddPCR で定量した結果が高い菌数を示す場合が多かった。通常リアルタイム PCR を用いて菌数定量を行う場合、検量線を CFU ベースで作成するため、常に本来の菌数とは異なる数値を定量結果としてしまっていることが示唆される。また、リアルタイム PCR においては、PCR 反応阻害物質による影響も受けていることが示唆された。

構築した PMA 処理法では、菌株によって PMA の感受性が異なることが明らかとなったが、OD₆₀₀=0.1 に調整した場合 PMA 処理によって死菌は ddPCR によって検出されなくなった。OD₆₀₀=0.1 に菌液を調整した場合菌液中の菌数は約 10⁷~10⁸ CFU/mL であり、食肉中の汚染菌数は約 10⁶ CFU/g 程度であるため、本プロトコルを食肉の汚染実態調査に用いることができると考えられた。

E. 結論

C. jejuni, *C. coli* の菌数を絶対定量することができる ddPCR を構築した。生菌の DNA のみを検出する PMA-ddPCR を構築した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし