

## 新規手法による食鳥肉におけるカンピロバクター汚染状況の調査に関する研究

研究代表者 岡田 彩加 岐阜大学応用生物科学部 助教

研究要旨：本研究では、カンピロバクター食中毒低減策の作製に寄与することを目的とし、食鳥肉のカンピロバクター汚染状況を正確に把握するための新規手法確立を目指した。現在、カンピロバクターによる食鳥肉の汚染状況は分離培養により調査されている。しかし、カンピロバクターは化学的、物理的ストレスにより、通常条件では培養できない損傷菌や、生物学的ストレスにより、生きては培養できない Variable but nonculturable(VBNC)状態になることが知られる。本研究では、VBNC 状態の菌を含めた生きたカンピロバクターを死菌と区別し検出する手法として、PMA-qPCR によるカンピロバクターDNA を検出する手法を確立した。また、確立した手法を用いて疫学調査を実施し、その有用性について検証するとともに、培養法と PMA-qPCR 法の感度について実験的に検証し、それぞれの利点を明らかとした。

疫学調査の結果、市販鶏肉には培養では検出できない生きたカンピロバクターが存在することが示され、VBNC 状態の菌の存在が示唆された。培養法と PMA-qPCR 法の間には検出率の有意差がないことがわかった。しかし、培養法と PMA-q PCR 法で陽性となる検体は一致しないことが多く、両方の検査を同時に実施することで、カンピロバクター陽性検体の見逃しを減らすことが可能になることがわかった。今後は定量的な検査により、より食中毒リスクの高い検体を検出するために有用な検査法について検証していく必要がある。

## 研究分担者

猪島 康雄 岐阜大学 教授  
松原 達也 岐阜大学 助教

## A. 研究目的

カンピロバクター属菌による食中毒は細菌による食中毒の原因として最も多くを占める。本研究では新規手法により、食鳥肉のカンピロバクター汚染状況を正確に把握することで、本食中毒低減策の作製に寄与することを目的とする。

これまでにも、カンピロバクターを分離培養することで食鳥肉の汚染状況は調査されている。しかし、カンピロバクターは化学的、物理的ストレスにより、通常条件では培養できない損傷菌や、生物学的ストレスにより、生きては培養できない Variable but nonculturable(VBNC)状態になることが知られる（本申請書内では便宜上損傷菌も VBNC に含める）。

VBNC 状態の菌は培養できないが生きており、マウスの腸管を通過することで培養可能となるため (Baffone et al., 2006)、人の体内で食中毒の原因となる可能性がある。さらに、カンピロバクター食中毒の発生とカンピロバクターの市販鶏肉からの検出の季節性にはミスマッチが存在し (Ishihara et al., 2011)、培養法による検出の不正確さが示唆される。VBNC は低温条件、空気にさらされる条件で誘導されやすく (Hazeleger et al., 1995, Oh et

al., 2015)、これまで検出率が低いと考えられていた冬季には VBNC による汚染が多い可能性がある。また、冷蔵での食品流通により VBNC が誘導されている可能性も高い。

以上より、カンピロバクター汚染状況を正確に把握するためには、VBNC を含めた正確なカンピロバクター検出が不可欠である。VBNC 状態の菌は培養不可のため、遺伝子検出が必要となるが、死菌まで検出される。本研究では、生菌のみを検出する新規方法として PMA-qPCR 法を基盤とした手法を確立し、確立した手法を用いて食鳥肉の正しいカンピロバクター汚染状況を把握することを目的とする。

## B. 研究方法

カンピロバクターはBSL2に該当するため、大学内で承認されたP2レベル実験室（応用生物科学部 B641、B642実験室）の安全キャビネット内で取り扱い、外部への拡散を防止した。実験終了後は実験室に設置済みのオートクレーブ高圧蒸気滅菌により不活化処理を行った。

## (1) PMA-qPCR法の確立

## (i) DNA抽出方法の検証

食品サンプルからの VBNC 状態の菌を含む生きたカンピロバクターの効率的なDNA抽出方法の検討を行った。食品などの夾雑物が多く含まれるサンプルでは、PCR 反応が阻害されるため、最もカ

ンピロバクターDNA 検出率の高くなる PCR 阻害物質の除去方法を検討した。実際に食鳥肉から検出を行うことを想定し、市販鶏肉 10 g を PBS10 mL と混合し、50%乳剤を作製し、作製した乳剤 200  $\mu$ L に *Campylobacter jejuni* JCM2013 を 10<sup>5</sup>CFU に調整した菌体ペレットを添加したサンプルを用いて検証を行った。

#### ①qPCR 試薬

PCR 阻害物質の影響は使用する qPCR 用試薬に大きく依存するため、以下の qPCR 用試薬について検討を行なった。

1) GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega), 2) TaqMan Fast Advanced master Mix (Applied Biosystems), 3) Probe qPCR Mix (Takara), 4) HotStartTTx(DNA)Kit (TOYOBO)

これらのキットを用いて qPCR を行った。DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。プライマー、プローブはカンピロバクター 16S リボソーム RNA を標的とした camp2F: 5'-CAC GTG CTA CAA TGG CAT AT-3', Camp2R: 5'-GGC TTC ATG CTC TCG AGT T-3', camp2probe: 5'-(FAM)-CAG AGA ACA ATC CGA ACT GGG ACA-(BHQ1)-3'を使用した。Mixture 組成およびプログラムはキットのマニュアルに従った。得られた Ct 値から PCR 増幅効率を算出した。

#### ②DNA 抽出、および PCR 阻害物質除去キット

PCR 阻害物質の含まれるサンプルからの DNA 抽出キットとして以下のキットについて検討を行った。

1) DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), 2) QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 3) NucleoSpin Tissue (マッハライ・ナーゲル), 4) NucleoSpin DNA Stool (マッハライ・ナーゲル), 5) PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)

さらに、PCR 阻害物質除去キットである OneStep PCR Inhibitor Removal Kits(ZYMO RESEARCH)による処理の影響を比較した。

DNA抽出およびOneStep PCR Inhibitor Removal Kits処理はそれぞれのキットのマニュアルに従って行った。qPCRは①のGoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega)を用いて行った。得られたCt値からPCR増幅効率を算出した。

#### (ii) PMA処理方法の検証

死菌の検出を確実に抑制する PMA-qPCR の条件および、食品サンプルから不純物 (PCR 阻害物質) を除去し、効率的にカンピロバクターDNA を抽出する手法を以下のように検討した。

#### ①使用菌株、培養条件

*Campylobacter jejuni* JCM2013 株を使用した。-80°C に保存したグリセロールストックより modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar (mCCDA)に塗布し、37°Cで 48 時間、微好気培養した。コロニーの一部をブルセラブロス 10mL に懸

濁し、37°Cで 36 $\pm$ 2 時間、微好気条件で浸透培養した。ブルセラブロスを用いて培養液の OD600 を 0.5 に調整し、1 $\times$ 10<sup>8</sup>CFU/mL の生菌サンプルとした。生菌サンプルを 95°Cで 5 分間加熱処理することで死菌サンプルを作製した。

#### ②PMA 処理および DNA 抽出

1 $\times$ 10<sup>8</sup>CFU/mL の菌液を希釈することで得た、様々な濃度の菌液 160 $\mu$ L に PMA Enhancer もしくはブルセラブロス を加えた。PMAxx を終濃度が 25, 50, 100  $\mu$ M となるように加え、37°Cで 10 分間インキュベートし、PMAxx 活性化のため LED Crosslinker 12 (Takara, Kusatsu, Japan) を用いて 15 分間照射を行った。PMA 処理を繰り返し実施する際には 8,000  $\times$  g, 4°Cで 10 分間遠心操作を行い、160  $\mu$ L の PBS で懸濁し、再度上記の操作を行った。DNA 抽出は 200  $\mu$ L の懸濁液から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて行い、100  $\mu$ L の蒸留水で溶出した。

#### ③qPCR 法

GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)、フォワードプライマー campF2 (5'-CAC GTG CTA CAA TGG CAT AT-3')、リバープライマーcampR2 (5'-GGC TTC ATG CTC TCG AGT T-3')、プローブ (5'-FAM-CAG AGAACAATC CGA ACT GGG ACA-BHQ1-3')を使用し、マニュアルに従い実施した。

#### ④鶏肉乳剤の調整

20 g の市販鶏肉 (カンピロバクター陰性を確認したもの) を 20 mL の PBS と混合し、1 分間ストマッカー処理を行った。ストマッカー袋のフィルターを通して回収した液を鶏肉乳剤として使用した。

#### ⑤密度勾配遠心法およびリンス法

密度勾配遠心法は以下のように実施した。Percoll (SigmaAldrich, St Louis, MO, USA)を用いて、1.130, 1.109, 1.066 g/mL の密度勾配溶液を作製し、密度の高いものから順に下層より重層した。市販鶏肉に 10<sup>5</sup>CFU の菌体を塗布し、冷蔵庫で一晩静置して汚染鶏肉を再現した。汚染鶏肉 20 g に PBS 80mL を加え、1 分間ストマッカー処理を行い、フィルターを通して懸濁液を回収し、20%乳剤とした。40 mL の乳剤を 800  $\times$  g, 4°Cで 10 分間遠心し、不純物を除去し、上清を 8,000  $\times$  g, 4°Cで 10 分間遠心した。ペレットを PBS 1mL で回収し、作製した密度勾配の上に重層した。超遠心機およびスイングローターを用いて、4,500  $\times$  g, 4°Cで 15 分間遠心した。1.109 g/mL と 1.066 g/mL の間に形成された層を *C.jejuni* の存在する層として回収した。

リンス法では上記と同様に作製した汚染鶏肉 20g をストマッカー袋に入れ、PBS10mL を添加し、手で揉み込むように表面をリンスした。フィルターを通して懸濁液を回収し、リンス液とした。リン

ス液を  $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心し、ペレットをサンプルとした。

## (2) 予備試験

予備試験として、食鳥処理場の中抜き後のと体を用いて、培養法および確立した PMA-qPCR 法によりカンピロバクター検出を実施した。

### ①PMA-qPCR 法

(1) で確立した、確実に死菌の検出を抑制する PMA 処理条件を用いて PMA-qPCR 法を実施した。

### ②培養法

NIHSJ-02法に準じて実施した。すなわち、検体に 5 倍量のプレストン培地を加え、1 分間ストマッカー処理を行い、 $42^{\circ}\text{C}$  で 24 時間、微好気条件で培養した。プレストン培地から 1 白金耳分の検体を mCCDA 培地およびスキロー培地に塗布し、 $42^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養した。得られたコロニーは C412F および C1228R プライマー (Linton et al., 1996) を用いたコロニー-PCR により同定を行った。

## (3) 疫学調査

2021 年 9, 12 月, 2022 年 3, 6 月に市販鶏肉の疫学調査、2021 年 11, 2022 年 2, 5, 8 月に食鳥処理場における中抜き後のと体およびチラー後のと体の疫学調査を実施した。食鳥と体では首皮 10 g、市販鶏肉では 25 g を使用した。

### ①PMA-qPCR 法

昨年度確立した、確実に死菌の検出を抑制する PMA 処理条件を用いて PMA-qPCR 法を実施した。

すなわち、市販鶏肉 25g または食鳥処理場で採取した首皮 10 g をストマッカー袋に入れ、PBS 10mL を添加し、手で揉み込むように表面をリンスした。フィルターを通して懸濁液を回収し、リンス液とした。リンス液を  $800 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心し、不純物を除去した。上清を  $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心し、ペレットを PBS で懸濁し、160  $\mu\text{L}$  としたものをサンプルとした。160  $\mu\text{L}$  のサンプルに PMA Enhancer を 40  $\mu\text{L}$ 、PMAxx を終濃度が 25  $\mu\text{M}$  となるように加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 10 分間インキュベートし、PMAxx 活性化のため LED Crosslinker 12 (Takara, Kusatsu, Japan) を用いて 15 分間光照射を行った。PMA 処理を繰り返し実施するため、 $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心操作を行い、160  $\mu\text{L}$  の PBS で懸濁し、再度上記の操作を行った。DNA 抽出は 200  $\mu\text{L}$  の懸濁液から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行い、100  $\mu\text{L}$  の蒸留水で溶出した。

qPCR 法は GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)、フォワードプライマー campF2 (5'-CAC GTG CTA CAA TGG CAT AT-3')、リバープライマー campR2 (5'-GGC TTC ATG CTC TCG AGT T-3')、プローブ (5'-FAM-CAG AGA ACA ATC CGA ACT GGG ACA -BHQ1-3') を使

用し、マニュアルに従い実施した。

### ②培養法

NIHSJ-02 法に準じて実施した。すなわち、検体 (市販鶏肉 25g または食鳥処理場で採取した首皮 10g) に 5 倍量のプレストン培地を加え、1 分間ストマッカー処理を行い、 $42^{\circ}\text{C}$  で 24 時間、微好気条件で培養した。プレストン培地から 1 白金耳分の検体を mCCDA 培地およびスキロー培地に塗布し、 $42^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養した。得られたコロニーは C412F および C1228R プライマー (Linton et al., 1996) を用いたコロニー-PCR により同定を行った。

(4) 実験的に誘導した VBNC 状態の菌の PMA-qPCR 法による検出

### ①VBNC 状態の菌の誘導

これまでに我々が確立した手法 (Yagi et al., *J. Microbiol. Methods* 195: 106456, 2022.) を用いて VBNC 状態のカンピロバクターを誘導した。

すなわち、*Campylobacter jejuni* NCTC11168 株を使用した。 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存したグリセロールストックより mCCDA 培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 48 時間、微好気培養した。コロニーの一部をブルセラブロス 10mL に懸濁し、 $37^{\circ}\text{C}$  で  $36 \pm 2$  時間、微好気条件で浸透培養した。新しくミューラーヒントンブロス 15 mL にブルセラブロスの培養液を 150  $\mu\text{L}$  を移植し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 24 時間、微好気条件で浸透培養した。培養液の OD600 を 1.0 に調整し、 $1 \times 10^8$  CFU/mL の生菌サンプルとした。 $4^{\circ}\text{C}$  で 42 日間、好気培養することで VBNC 状態を誘導した。生存率の確認は LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。培養可能菌数の確認は mCCDA 培地を用いて行った。

### ②PMA-qPCR 法による検証

①で VBNC 状態に誘導する前の培養可能状態の菌を新しく準備し、同様に検証した。

培養可能菌および VBNC 菌をそれぞれ  $1 \times 10^5$  CFU/mL に調整し、疫学調査と同様に PMA-qPCR を実施した。

## (5) カンピロバクター検出感度の検証実験

### ①擬似汚染鶏肉の作出

疫学調査で培養法、PMA-qPCR 法で共にカンピロバクター陰性であった鶏肉に実験的に増菌培養したカンピロバクターを塗布することで擬似汚染鶏肉を作出した。

すなわち、*C. jejuni* NCTC11168 株を  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存したグリセロールストックより mCCDA 培地に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 48 時間、微好気培養した。コロニーの一部をミューラーヒントン寒天培地に塗抹し、 $37^{\circ}\text{C}$  で  $18 \pm 2$  時間、微好気条件で培養した。寒天培地から滅菌綿棒で菌体を掻き取り、PBS に懸濁し、OD600

を1.0に調整し、 $1 \times 10^8$ CFU/mLの生菌サンプルとした。これらを階段希釈することで $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^3$ CFU/mLの菌液とし、鶏肉25 gあたりに250  $\mu$ Lずつそれぞれの菌液を塗布し(2.5~250 CFU/鶏肉25g)、4°Cで一晩保存することにより擬似汚染鶏肉とした。

## ②培養法およびPMA-qPCR法による検出

(3) 疫学調査と同様の方法で検出を行った。ただし、培養法では用いた寒天培地はmCCDAのみとした。

## C. 研究結果

### (1) PMA-qPCR法の確立

#### (i) DNA抽出方法の検証

#### ①qPCR試薬

qPCRを行なった結果、Ct値は次の通りであった。

1) GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega): 21, 2) TaqMan Fast Advanced master Mix (Applied Biosystems): 21, 3) Probe qPCR Mix (Takara): 21, 4) HotStartTTx(DNA)Kit (TOYOBO): 25。1) から3) のqPCR試薬ではPCR効率が同等であることが示された。本研究では以降、これまでに研究室で使用実績の多い1) GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega)を使用していくこととした。

#### ②DNA抽出、およびPCR阻害物質除去キット

qPCRを行なった結果、Ct値は次の通りであった。

1) DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN): 21, 2) QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN): 29, 3) NucleoSpin Tissue (マッハライ・ナーゲル): 21, 4) NucleoSpin DNA Stool (マッハライ・ナーゲル): 23, 5) PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen): 22。1) および3) の試薬で食品からのDNA抽出効率が高いことが示された。本研究では以降、これまでに研究室で使用実績の多い1) DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を使用していくこととした。

PCR阻害物質除去キットであるOneStep PCR Inhibitor Removal Kits(ZYMO RESEARCH)に関しては使用の有無により、Ct値に差は認められなかった。

#### (ii) PMA処理方法の検証

#### ①PMA Enhancerの必要性

PMA Enhancerはグラム陰性菌の生死判定の識別能を向上させる試薬である。本試薬の有無により、*C.jejuni*の死菌検出が抑制されるかを検証した。PMA Enhancerの添加は生菌の検出に影響を与えず、死菌の検出を大幅に抑制した( $\Delta Ct=7.9$ )。PMA Enhancerは死菌の誤判定低減に有効であることが示された。

#### ②最適なPMA濃度

菌種によって最適なPMA濃度が異なることが報告されているため、検証した。PMAxxの濃度を高くしても死菌の誤判定は低減できず、どの濃度においても生菌の検出が抑制されなかった。そのため、マニュアルで推奨される25  $\mu$ Mを使用していくこと

とした。

#### ③2連続のPMA処理

PMA Enhancerを使用し、様々な濃度のPMA処理を実施したが、死菌の検出を完全に抑制することができなかつたため、PMA処理を2回実施し、死菌抑制効果を検証した。PMA処理を2回繰り返すことで、 $10^5$ CFU/mLの*C.jejuni*の検出を完全に抑制することができた。また、鶏肉乳剤に*C.jejuni*を添加して同様の実験を行ったが、不純物存在下でも完全に死菌の検出を抑制できた。

#### ④密度勾配遠心法およびリンス法

1.109 g/mLと1.066 g/mLの間に形成された層を*C.jejuni*の存在する層として回収し、DNA抽出を行った。一方、不純物は1.066 g/mLとPBSの間の層に目視で確認された。密度勾配遠心法により精製を行うと添加した*C.jejuni*の1/40程度に減少しており、ロスが大きいことがわかった。

一方、リンス法では添加した*C.jejuni*の1/2程度回収できていたため、実際の疫学調査ではリンス液を使用することとした。

#### (2) 予備試験

予備試験は2021年9月に実施した。岐阜県内の食鳥処理場に協力を依頼し、中抜き後の食鳥と体から10 gずつ6検体の首皮を採取し、検体とした。PMA-qPCR法、培養法それぞれで5検体が陽性となったが、陰性となった1検体はそれぞれ異なる検体であった。PMA-qPCRでは培養では検出できない菌(VBNC菌など)を検出できることが示唆された。一方、培養では検出できたが、PMA-qPCRでは検出できない場合もあり、菌数が少ない場合は増菌培養を行うことで感度が高くなる可能性がある。

#### (3) 疫学調査

##### i) 食鳥処理場の食鳥と体

岐阜県内の食鳥処理場において、カンピロバクター陽性であることがわかっている鶏群の処理を実施している際にランダムに採材を行なった。中抜き後のと体およびチラー後のと体各10検体、合計20検体からPMA-qPCR法および培養法によりカンピロバクター属菌の検出を行なった。

5月の検体では、PMA-qPCR法では中抜き後の1検体陰性を除く全てで陽性となった。培養法ではチラー後の1検体陰性を除く全てで陽性となった。

8月の検体ではPMA-qPCR法では中抜き後の検体では9検体、チラー後の検体では4検体で陽性となった。培養法では全ての検体で陽性となった。

11月の検体では、PMA-qPCR法では20検体全てで陽性となった。一方、培養法ではチラー後の1検体のみで陽性となり、残りの19検体は陰性となった。

2月の検体ではPMA-qPCR法、培養法、ともに20検体全てで陽性となった。

##### ii) 市販鶏肉

9, 12, 3, 6月に小売店3店舗(A, B, C)それぞれにおいてモモ肉3検体、ムネ肉3検体、レバー3検体の合計9検体からPMA-qPCR法および培養法によりカンピロバクター属菌の検出を行なった。

小売店Cにおいてレバーが2検体しか購入できなかったため、合計8検体で実施した。

9月は小売店Cにおいてレバーが2検体しか購入できなかったため、合計8検体で実施した。モモ肉においてはPMA-qPCR法では9検体、培養法では8検体で陽性となった。ムネ肉においてはPMA-qPCR法では4検体、培養法では3検体で陽性となった。レバーにおいてはPMA-qPCR法では6検体、培養法では3検体で陽性となった。

12月はモモ肉においてはPMA-qPCR法では5検体、培養法では8検体で陽性となった。ムネ肉においてはPMA-qPCR法では3検体、培養法では5検体で陽性となった。レバーにおいてはPMA-qPCR法では3検体、培養法では2検体で陽性となった。

3月はモモ肉においてはPMA-qPCR法では2検体、培養法では1検体で陽性となった。ムネ肉においてはPMA-qPCR法では1検体、培養法では2検体で陽性となった。レバーにおいてはPMA-qPCR法では4検体、培養法では1検体で陽性となった。]

6月はモモ肉においてはPMA-qPCR法では3検体、培養法では5検体で陽性となった。ムネ肉においてはPMA-qPCR法では1検体、培養法では6検体で陽性となった。レバーにおいてはPMA-qPCR法では5検体、培養法では8検体で陽性となった。

#### (4) 実験的に誘導したVBNC状態の菌のPMA-qPCR法による検出

実験的に誘導したVBNC状態の菌は生存率が90%以上であり、mCCDA培地上で培養不能となっており、VBNC状態となっていることが確認された。

培養可能菌ではCt値が29であったのに対し、VBNC状態の菌ではCt値が33であった。

#### (5) カンピロバクター検出感度の検証実験

##### (i) モモ肉

培養法では $1 \times 10^1$ CFU/mL以上で検出可能であったが、PMA-qPCR法では $1 \times 10^2$ CFU/mL以上で検出可能であった。

##### (ii) ムネ肉

モモ肉と同様、培養法では $1 \times 10^1$ CFU/mL以上で検出可能であったが、PMA-qPCR法では $1 \times 10^2$ CFU/mL以上で検出可能であった。

##### (iii) レバー

培養法では $1 \times 10^3$ CFU/mL以上で検出可能であったが、PMA-qPCR法では $1 \times 10^2$ CFU/mL以上で検出可能であった。

#### D. 考察

DNA抽出方法の検証では、DNA抽出キットとqPCR試薬の検討を行なった。使用する試薬によりqPCR効率に差が認められ、より高率に食品中からカンピロバクターDNAを検出するためのキットとして、検討した試薬の中ではqPCR試薬では1) GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega), 2) TaqMan Fast Advanced master Mix (Applied Biosystems), 3) Probe qPCR Mix (Takara) が選定された。DNA抽出試薬では1) DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)および3) NucleoSpin Tissue (マッハライ・ナーゲル)が選定された。

また、PCR阻害物質除去キットであるOneStep PCR Inhibitor Removal Kits(ZYMO RESEARCH)に関しては、使用の必要性はないことが示された。

PMA処理条件については、PMA処理を2回繰り返すことで、死菌の検出を完全に抑制することに成功した。密度勾配遠心法ではカンピロバクターのロスが多かったが、これは既報(Fukushima et al., 2007)とも一致する。今回はリンス法を用いたが、今後サンプルの前処理方法について改良が望まれる。密度勾配法でロスが多かった要因について、カンピロバクターと鶏肉由来の物質の接着が関与している可能性がある。カンピロバクターは鶏肉の皮膚と接着し、その物質の1つは鳥血清アルブミンであることが報告されている

(Taniguchi et al., 2021)。鳥血清アルブミンは鶏の皮膚だけでなく、鶏肉にも含まれている可能性があることから、前処理の際に鶏肉由来不純物として除去している部分にカンピロバクターが含まれていた可能性がある。実際、実験的に鶏肉にカンピロバクターを添加した場合、低速(800×g)で遠心、除去した層にカンピロバクターが含まれていることを確認した(予備的試験のみのため、データ示さず)。リンス法では低速での遠心では不純物を全て除去することはできず、高速で遠心した際にも不純物が認められたため、カンピロバクターのロスが少なかったのかもしれない。今後、カンピロバクターと鶏肉との接着を阻害するが、PMAの効果を阻害しない方法を確立できれば、PMA-qPCR法によるカンピロバクターの検出率が大きく上昇する可能性がある。しかし、本仮説を検証するには時間がかかるため、1年間の調査を前提としている本研究課題では、今回確立した手法を用いて疫学調査を進めていくこととした。

市販鶏肉の調査ではモモ肉およびムネ肉におけるカンピロバクター検出率がそれぞれ培養法で61%、44%であったのに対し、PMA-qPCR法では53%、25%であり、培養法の検出率の方が若干高かったものの、同程度であった。一方、レバーにおいては培養法で42%であったのに対し、PMA-qPCR法では55%となり、PMA-qPCR法での検出率が上回ったが有意差は認められなかった。

市販鶏肉からの検出結果において、培養法とPMA-qPCR法の検出結果の陽性、陰性の対応を確認すると、共に陽性が33検体、共に陰性が40検体、培養法のみで陽性が19検体、PMA-qPCR法のみで陽性が13検体と、どちらか一方のみで陽性となる検体が多く存在した。PMA-qPCR法のみで陽性となる検体については、これまで検出できなかったVBNC菌を検出できた可能性がある。しかし、実験的にVBNC状態を誘導した菌を用いた検証では、VBNC状態の菌は培養可能状態の菌と比較し、同数の菌が含まれていてもCt値が低い結果となった。今回誘導したVBNC状態の菌は25日で誘導できるプロトコルを使用した、実際にDNA抽出に供したのはその15日後であったため、細胞膜の状態が通常よりも壊れやすくなっていった可能性がある。VBNC状態の菌の検出感度については今後の課題である。一方、培養法でのみ検出できた検体では、増菌培養を実施する培養法で検出感度が高い可能性が示唆されたため、実験的に検証を実施した。

モモ肉、ムネ肉では培養法で感度が高く、レバーではPMA-qPCR法で感度が高いことが示された。モモ肉、ムネ肉からの検出については感度の点では培養法が有用であると考えられるが、食中毒を引き起こすカンピロバクターの菌数が800個程度必要であることを考えると、その有用性は低い可能性がある。今後は定量的な検査法も取り入れて調査を実施する必要があるが、その場合はVBNC状態の菌の検出感度について詳細に検証する、またはデジタルPCRなどの絶対定量が可能な機器を取り入れるなどが必要となると考えられる。

季節性については今回の研究では培養法、PMA-qPCR法ともに有意差は認められなかった。しかしながら、3月に検出率が低い傾向が認められたため、今後検体数を増やし、詳細に検証する必要がある。

食鳥と体においては合計の検出率では中抜き後においては培養法、PMA-qPCR法でそれぞれ75%、95%であり、チラー後では培養法、PMA-qPCR法でそれぞれ75%、85%であった。大きな差は認められなかったが、11月の検体では培養ではほとんど検出できなかったにも関わらずPMA-qPCR法では全ての検体からカンピロバクターが検出されたため、季節ごとに異なる可能性があり、今後の検討課題である。

## E. 結論

PMA処理条件については、PMA処理を2回繰り返すことで、死菌の検出を完全に抑制することに成功した。本研究で確立した手法として国際誌に掲載された(印刷中)。密度勾配遠心法を用いた濃縮・精製ではロスが多いことがわかったため、密度勾配

遠心法は実施せず、不純物の混入を増やさないリンス法にてカンピロバクターの回収を行うこととした。確立した手法で疫学調査を実施し、VBNC状態の菌を検出できることが示唆されたが感度については今後の検証課題である。

疫学調査では培養法とPMA-qPCR法の検出率に有意差はなかったが、どちらか一方のみで陽性となる検体が多く存在した。両方の検査を同時に実施することで陽性検体の見逃しを減らすことが可能であると考えられる。

今回の調査では、食鳥処理場と市販鶏肉、ともに培養とPMA-qPCR法での検出率に差が認められなかったため、時間とともにVBNC状態の菌が増加するかについての結論を得ることはできなかった。今後は生菌選択的PCRにおいて定量的な調査を実施できるような検査法を確立し、疫学調査や実験的に鶏肉に塗布したカンピロバクター属菌がどのような挙動を示すかを検証していくことが必要であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yagi, S., Okada, A., Inoshima, Y. : Role of temperature, nutrition, oxygen, osmolality, and bacterial strain in inducing a viable but non-culturable state in *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Methods* 195: 106456, 2022.

2) Okada, A., Tsuchida, M., Rahman, MM., Inoshima, Y. : Two-round treatment with propidium monoazide completely inhibits the detection of dead *Campylobacter* spp. cells by quantitative PCR. *Front. Microbiol.* 13:801961, 2022.

### 2. 学会発表

1) 岡田彩加、猪島康雄. 培養できない菌も含めた行きた *Campylobacter* 属菌を死菌と区別し特異的に検出する方法の最適化. 第164回日本獣医学会学術集会. 令和3年9月. web開催.

2) 岡田彩加、猪島康雄. Propidium monoazide(PMA)を用いた Real-time PCR 法による鶏肉からの培養できない菌も含めた生きた *Campylobacter* 属菌検出法の検討. 令和3年度中部地区獣医師大会 獣医学術中部地区学会. 令和3年9月5日. web開催.

3) 土田瑞季、岡田彩加、猪島康雄. 市販鶏肉からのカンピロバクター属菌の検出における propidium monoazide (PMA)リアルタイムPCR法と培養法との比較. 令和4年度獣医学術中部地区学会. 令和4年8月28日. 岐阜県.

4) 岡田彩加、土田瑞季、猪島康雄. Propidium monoazide (PMA)を用いたリアルタイムPCR法による市販鶏肉からの培養できない菌も含めたカンピロバクター属菌の検出. 第165回日本獣医学会学術集会. 令和4年9月7日. web開催.

5) 岡田彩加, 土田瑞季, 猪島康雄. 生菌選択的リアルタイム PCR 法を用いた市販鶏肉のカンピロバクター属菌汚染状況の調査。第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 3 0 日. 東京都.

G. 知的所有権の取得状況  
該当なし