

## 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、生きているが培養できない Variable but nonculturable (VBNC) 状態になることが知られる。これまでに、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。本年度は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した。さらに培養法と 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。

令和4年度は令和3年度から引き続き疫学調査を実施し、培養法と PMA-qPCR 法の間に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、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、生きているが培養できない 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

## (1) 疫学調査

6月に市販鶏肉の疫学調査、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 10g、市販鶏肉では 25g 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 10g 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 800 × g, 4°C で 10 分間遠心し、不純物を除去した。上清を 8,000 × g, 4°C で 10 分間遠心し、ペレットを PBS で懸濁し、160 μL としたものをサンプルとした。160μL のサン

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°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ため、8,000  $\times g$ 、4°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°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°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。

## (2) 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°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°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。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°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<sup>8</sup>CFU/mL の生菌サンプルとした。4°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<sup>5</sup>CFU/mL に調整し、疫学調査と同様に PMA-qPCR を実施した。

## (3) 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°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°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°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<sup>8</sup>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<sup>1</sup>~1 $\times$ 10<sup>3</sup>CFU/mLの菌液とし、鶏肉25gあたりに250  $\mu\text{L}$ 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

(1) 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) 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。5, 8月に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。

#### ii) 市販鶏肉

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。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。

## (2) 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。

## (3) 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

令和3年度の結果と合わせた検出率から考察する。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

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. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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) 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。
- 2) 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を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。
- 3) 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30日。東京都。

## H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okada, A., Tsuchida, M., Rahman, MM., Inoshima, Y.	Two-round treatment with propidium monoazide completely inhibits the detection of dead <i>Campylobacter</i> spp. cells by quantitative PCR.	Front. Microbiol.	13	801961	2022