

別添 3

## 令和 6 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 6 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) 構築した ddPCR の検出限界

*C. jejuni* 81-176 株を血液寒天培地を用い 48 時間 37°C で培養した後、菌数を調整し 10 g の鶏肉に  $1.0 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , copies/g となるように植菌した。植菌後、鶏肉と 90 mL の Buffered Pepton Water でストマッキングを行い揉みだし液を作製した。この揉みだし液を 20,000 g で 10 分間遠心後上清を捨て、100 倍濃縮し、DNA を抽出し ddPCR で検出を試みた。

### 2) 消毒薬で処理した菌体に対する PMA 処理

*C. jejuni* 81-176, JCM2013 株を血液寒天培地を用い 48 時間 37°C で培養した後、菌体を PBS に懸濁後 OD<sub>600</sub>=0.1 に調整した。調整した菌液に対し、100 ppm の次亜塩素酸 Na または 25 ppm の亜塩素酸水を用いて 5 分間殺菌処理を行い、チオ硫酸 Na を用いて消毒薬の殺菌活性を中和した。処理した菌体に対して PMA 処理を行い ddPCR にて DNA が検出されるか確認した。また、消毒薬にて処理後の菌体については血液寒天培地を用いて菌が生残していないことを確認した。

### 3) 鶏肉揉みだし液中における PMA 処理の効果

*C. jejuni* 81-176 株を 2) のように培養後、亜塩素酸水を用いて殺菌を行い、死菌を作製した。作製した死菌を、1) で作製した鶏肉揉みだし液に植菌し、PMA 処理を行い ddPCR にて DNA が検出されるか検証した。

### 4) 鶏肉へ植菌する菌体の培養方法の検討

*C. jejuni* 81-176, JCM2013 株を血液寒天培地で 48 時間または Bolton 培地で 24 または 48 時間培養後の菌体を回収し、それぞれ PMA 処理群と非処理群をリアルタイム PCR につけて Ct 値を比較した。

## C. 研究結果

### 1) 構築した ddPCR の検出限界

*C. jejuni* を定量スパイクした鶏肉揉みだし液を 100 倍濃縮し、ddPCR にて *C. jejuni* の検出を試みた。約  $1.0 \times 10^3$  copies/g となるように植菌した場合まで検出できた。しかしながら、ddPCR での定量結果は  $(1.84 \pm 0.46) \times 10^3$  copies/g となり、構築した ddPCR でスパイクした *C. jejuni* を定量できた。

### 2) 消毒薬で殺菌した死菌に対する PMA 処理の効果

昨年度の研究において熱処理し、殺菌した菌体に対しては PMA 処理により死菌が検出されなくなることは確認されていた。塩素系薬剤の殺菌メカニズムはタンパク質の変性によるものであるため、塩素系薬剤で処理された死菌の細胞膜・細胞壁を透過し DNA に作用できるかを確認した。

100 ppm の次亜塩素酸 Na または 25 ppm の亜塩素酸水にて処理した菌体はどちらも PMA 処理を行うと約  $10^8$  copies/mL の菌体が ddPCR で検出されなくなり、検出限界以下 ( $10^3$  copies/mL 未満) となった。また、血液寒天培地上に発育せず、殺菌されていると考えられ、塩素系消毒薬で殺菌した場合にも構築した PMA-ddPCR は有用であった。

### 3) 鶏肉揉みだし液中の死菌に対する PMA 処理の効果

本研究の最終目的である、食鳥処理工程における塩素系消毒薬の *Campylobacter* の殺菌効果の評価に構築した PMA-ddPCR を用いるために、実際の鶏肉揉みだし液中においても塩素系薬剤で殺菌した死菌に対して PMA 処理が有効であるか評価を行った。

評価を行った結果、約  $10^8$  copies/g となるように植菌し、100 倍濃縮した鶏肉揉みだし液においても PMA 処理により菌体はほぼ検出されなくなり、ほぼ検出限界 ( $10^2$  copies/g) となり、構築したプロトコールによって塩素系消毒薬による殺菌効果は検証できると考えられた。

#### 4) CFU と DNA コピー数の違い

昨年度の研究において、血液寒天培地で 48 時間培養した際の菌体において CFU と DNA のコピー数に約 100 倍の差があり、死菌が多いことが明らかとなっていた。今後鶏肉に生菌を植菌し、消毒薬の殺菌効果を PMA-ddPCR で評価するにあたって生菌が多い状態の菌を植菌する必要がある。そこで、様々な培養条件後の菌体を PMA-リアルタイム PCR を用いて Ct 値を比較し、死菌の割合が少ない培養条件を検討した。

各培養条件で培養した菌体を PMA 処理有・無で Ct 値を比較すると、48 時間血液寒天培地で培養した場合  $24.1 \pm 0.8$  および  $20.6 \pm 0.6$ 、24 時間 Bolton 培地で培養した場合  $21.6 \pm 0.1$  および  $20.7 \pm 0.2$ 、48 時間 Bolton 培地で培養した場合  $22.6 \pm 0.6$  および  $21.5 \pm 0.3$  であり、24 時間 Bolton 培地で培養した場合 Ct 値は安定し、かつ PMA 処理の有無で Ct 値に大きな差は見られなかった。

#### D. 考察

本研究では、生菌のみを検出し絶対定量

ができる PMA-ddPCR を構築し、*Campylobacter* に対して塩素系消毒薬で処理した際に迅速にその殺菌効果を検証できる方法を構築しようとした。これまでの研究において生菌のみを検出・定量できる PMA-ddPCR を構築した。今年度はさらに、塩素系消毒薬にて殺菌した菌体に対して PMA 処理は有効なのか、実際に鶏肉に対して塩素系消毒薬を使用した際の殺菌効果の評価に用いることができるのかを検証した。

PMA は、生菌の細胞膜は透過しないが、死菌では細胞膜にできた隙間を透過し、DNA に結合する。一方、塩素系消毒薬は菌体を殺菌する際に蛋白質を変性させ、凝集させることがこれまでの研究で見られていた。そのため、塩素系消毒薬で処理した菌体に対し、PMA 処理が有用であるかは不明であったが、本研究においては期待通り死菌に対し PMA 処理は有用であり、死菌の DNA は ddPCR で検出されなかった。

さらに、PMA によって PCR を阻害するには光照射による PMA と DNA の強固な結合が必要となる、しかしながら鶏肉揉みだし液のように実際のサンプルは混濁していることが多く、従来の光照射によってサンプル中の死菌の DNA に PMA が強固に結合できるかは不明であったが、本研究では 100 倍濃縮し、濁度が高くなった鶏肉揉みだし液においても従来のプロトコール通りの光照射で死菌が ddPCR で検出されなくことを確認できた。

来年度 (令和 7 年度) は実際に、鶏肉に対し *Campylobacter* をスパイクし、塩素系消毒薬の殺菌効果について PMA-ddPCR で定量できるか検証を行う予定であるが、PMA-ddPCR を構築する際に、48 時間血液寒天培

地で培養した菌体では CFU と DNA のコピー数に約 100 倍の差があり、これが死菌によるものであることが示唆された。そこで、より死菌が少ない菌体を準備するため様々な培養条件の菌体に対し PMA 処理を行い安定して死菌が少ない培養条件を検討した。24 時間 Bolton 培地で培養すると、48 時間血液寒天培地で培養した際のように PMA 処理の有無でリアルタイム PCR 時の Ct 値に大きな差は確認されず、死菌の割合が少なくなり、スパイクした際に塩素系消毒薬による殺菌効果を検証するために使用する予定である。

#### E. 結論

構築した PMA-ddPCR プロトコールは 100 倍濃縮した鶏肉揉みだし液中においても塩素系消毒薬で処理した菌体は検出されず、鶏肉を用いた塩素系消毒薬の殺菌評価に使用できると考えられる。

#### 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