

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）

総合研究報告書

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

食中毒のリスクとなる生菌のカンピロバクターによる食肉汚染を迅速かつ絶対定量できる PMA-ddPCR の構築を試みた。構築した PMA-ddPCR の感度・特異度は共に 100%であり、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検出できた。また、菌体を PMA 処理することで死菌を検出せずに生菌のみを検出し、塩素系処理消毒薬にて処理した際にも PMA 処理によって死菌は PCR で検出されなくなった。さらに、鶏肉中の生菌および鶏肉を塩素系消毒薬にて処理した場合の生菌についても培養法と同等の定量値を示すことができた。以上のことより、食鳥処理場等の CCP において汚染を迅速にモニタリングできると、食中毒のリスクの低減に貢献できると考えられた。

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、そのためには食鳥処理場等の CCP において迅速に生菌を検出・定量し汚染を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、カンピロバクターの生菌数を定量する方法は一般的に培

養法が用いられており、結果を得るまでに 2 日間かかってしまう。また、近年普及してきたリアルタイム PCR を用いる方法では、生菌と死菌を区別することができず、さらに検量線が作成者によって異なってしまう、実施者によって定量値が変わってしまう問題もある。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、培養法と同等の生菌の定量値を迅速に定量する PMA-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。また、塩素系消毒薬で処理した鶏肉についても構築した PMA-ddPCR

で生菌の定量を試みた。

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。

5) 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 x 10⁴, 10³, 10², 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。

6) 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 OD₆₀₀=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 400 ppm 亜塩素酸水 (遊離塩素濃度 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。

7) 鶏肉揉みだし液中における PMA 処理の効果

C. jejuni 81-176 株を培養後、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、5)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。

8) 培養法および PMA-ddPCR による鶏肉中の生菌数の定量

C. jejuni 81-176 株を血液寒天培地を用い 24 時間 37℃で培養した後、菌数を調整し 10 g の鶏肉に 1.0×10^8 CFU/g となるように植菌した。植菌後、鶏肉を室温で 30 分間静置した後に、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 1 mL 取り出し 13,000 g で遠心後上清を捨て 100 μ L の PBS で懸濁後 PMA 処理を行い、アルカリ熱抽出法で DNA テンプレートを作製した。作製したテンプレートは構築した PMA-ddPCR にて定量を行った。

また培養法で生菌数を定量するために、揉みだし液を 1 mL 取り出し PBS で 10 倍段階希釈を行い、各希釈段階を mCCDA 培地 3 枚に 100 μ L ずつ塗抹し、37℃嫌気条件 (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) 下で 48 時間培養し、発育したコロニー数を計測し生菌数を定量した。実験は 3 回行った。

9) *Campylobacter* で汚染した鶏肉に対する塩素系消毒薬による殺菌効果および生菌数の定量

C. jejuni 81-176, Chi2 (鶏肉由来), 8214 (ウ

シ由来)、*C. coli* CBF48-1 (鶏肉由来), Pf31 (豚肉由来) 株の計 5 株を用いた。各菌株を血液寒天培地を用い 24 時間 37℃で培養した後、1)同様に 10 g の鶏肉に植菌した。植菌後室温で 30 分間静置後、4℃の 500 mL の蒸留水 (DW)、100 ppm の次亜塩素酸 Na または 400 ppm の亜塩素酸水に 30 分間浸漬した。その後鶏肉を取り出し 90 mL の PBS とストマッキングを行い揉みだし液を作製した。揉みだし液より 8)同様に DNA テンプレートを作製し、PMA-ddPCR を行うとともに、mCCDA を用いて培養法による生菌数の定量を行った。実験は全て 3 回行った。

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/ μ L に調整し、ddPCR で遺伝子のコピー数を定量すると、それぞれ $1,423 \pm 375$ および $3,497 \pm 498$ copies/ μ L 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。

5) 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 x 10³ 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 ± 0.46) x 10³ 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。

6) 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 400 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 10⁸ copies/mL の菌体が ddPCR で検出されなくなり、検出限界以下 (10³ 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。

7) 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 10⁸ 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 (10² 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。

8) 培養法および PMA-ddPCR による鶏肉中の生菌数の定量

鶏肉揉みだし液中の生菌数を構築した PMA-ddPCR で定量した結果、 7.10 ± 0.12 log copies/g であった。次に mCCDA を用いて生菌数を定量した結果は 7.18 ± 0.23 log CFU/g であった。これら 2 つの方法で定量した生菌数の値について t 検定を行った結果 p 値は 0.79 であり、両者に有意な差は確認されなかった。

9) 塩素系消毒薬で処理した鶏肉における生菌数の定量

C. jejuni 81-176 株を植菌し DW、100 ppm の次亜塩素酸 Na、400 ppm の亜塩素酸水に浸漬した場合の生菌数はそれぞれ、培養法で 6.32 ± 0.15 、 6.17 ± 0.11 、 3.83 ± 0.05 log CFU/g、PMA-ddPCR でそれぞれ 6.45 ± 0.19 、 6.00 ± 0.06 、 3.70 ± 0.04 log copies/g であった。培養法および PMA-ddPCR での定量値に対して t 検定を行ったが、どの条件下においても有意差は確認されなかった。また、DW 処理群と 100 ppm の次亜塩素酸 Na 浸漬群の生菌数には有意差はなかったが、DW 処理群または 100 ppm 次亜塩素酸 Na 処理群と 400 ppm 亜塩素酸水処理群では 400 ppm 亜塩素酸水処理群において有意に生菌数の減少が確認された。他の 4 菌株においても同様の結果が得られた。

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/ μ L 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、 $OD_{600}=0.1$ 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。 $OD_{600}=0.1$ に菌液を調整した場合菌液中の菌数は約 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL であり、食肉中の汚染菌数は約 10^6 CFU/g 程度であるため、本プロトコー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。

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。

生菌のみを迅速に絶対定量する PMA-ddPCR を用いて、実際の鶏肉検体における生菌数を従来の培養法と同等に定量できるか評価を行った。培養法で得られた生菌数と PMA-ddPCR で得られた生菌数には有意差はなかった。本来培養法では生菌数を得るまでに 2 日間を要していたところを、構築した PMA-ddPCR を用いることで、約 3～4 時間程度で生菌数を得ることができるようになると考えられた。

さらにより多くの菌株を用いて検証を行うとともに、塩素系消毒薬にて鶏肉を処理した際の生菌数についても培養法と同等の定量値を示すことができるのか検証を行った。その結果、塩素系消毒薬で処理した鶏肉においても、培養法と同等の定量値を示すことができた。さらに、食鳥処理場で使用されている 100 ppm の次亜塩素酸 Na で処理するより 400 ppm の亜塩素酸水で処理した際の方が有意に生菌数を落とすことができ、

約 2 log CFU 落とすことができていた。本結果より、食鳥処理場における体の冷却工程（チラープール）等において、次亜塩素酸 Na を使用する代わりに亜塩素酸水を使用することで、より食中毒のリスクを下げることができるかもしれない。

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。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。構築した PMA-ddPCR を使用することで、迅速に培養法と同等の生菌数を定量できた。さらに塩素系消毒薬にて処理した際にも定量できるため、今後食鳥処理場等の CCP のモニタリングに応用していくことで、食中毒のリスクの低減に寄与できると考えられた。

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

第 18 回 日本カンピロバクター研究会総会、
2025 年 12 月 19 日～20 日、北海道帯広、
概要

「塩素系消毒薬による殺菌効果の PMA-ddPCR による評価法の構築」優秀発表賞

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし