別紙３

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究研究事業）
総括研究報告書

デジタルPCRによるカンピロバクター生菌の定量的調査および迅速カンピロバクター検査法の確立

研究代表者　岡田　彩加　岐阜大学応用生物科学部　准教授

研究要旨：カンピロバクターは細菌性食中毒の主要原因菌であり、食鳥処理場における汚染低減対策が求められている。海外では処理場における検出基準値が設定されているが、培養法は検査に時間を要することから、迅速かつ簡便な定量法の確立が必要である。本研究では、デジタル PCR（dPCR）および PMA-dPCR を用いたカンピロバクター検出法の評価を行った。市販鶏肉 120 検体を対象に、直接分離培養、増菌培養、PMA 処理なし dPCR、PMA-dPCR、PMA Enhancer 併用 PMA-dPCR を比較した。その結果、PMA 処理なし dPCR では 87/120 検体、PMA-dPCR では 66/120 検体、PMA Enhancer 併用条件では 40/120 検体が陽性となり、PMA 処理により死菌由来 DNA シグナルが除去されること、さらに Enhancer 併用により膜損傷菌や VBNC 状態菌由来シグナルも低減される可能性が示唆された。また、食鳥処理場チラー後検体では、PMA 処理なしおよび PMA-dPCR で全検体が陽性であった一方、Enhancer 併用条件では 1/4 検体のみ陽性であった。これらの結果から、PMA-dPCR は食鳥処理場における迅速検査法として有用である可能性が示された。次年度は、PMA 処理を実施した核酸検出法を基盤としたオンサイト検出法の構築を進める予定である。

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。カンピロバクター食中毒制御のために、食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染低減が求められる。諸外国の一部では既に食鳥処理場におけるカンピロバクターの検出基準値が定められているが、培養法によるものである。しかし、カンピロバクターは環境ストレスにより、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。VBNC 状態の菌が多く存在する場合、培養法では正しい評価ができない可能性がある。そのため、VBNC 状態の菌が実際に鶏肉の流通過程に存在するのかを明らかにした上で、適した迅速・簡便なカンピロバクター定量法を確立する必要がある。

申請者はこれまでに培養によらない生きたカンピロバクターの検出法（PMA-qPCR）を確立し（Okada et al., 2022）、培養法と PMA-qPCR による市販鶏肉からのカンピロバクター検出率は同等であることを示したが、本手法では VBNC 状態の菌は検出できないこともわかった（Okada et al., 2023）。また、PMA-qPCR 法での定量値は培養法よりも低くなるという報告があり（Josefsen et al., 2010）、qPCR での定量が難しいことがわかる。

本研究では食鳥処理場で簡便、迅速なオンサイトの検査を実施するための手法を確立することを目的とし、今年度は昨年度確立した PMA-dPCR 法を用いて、市販鶏肉における調査を実施することを達成課題とした。

B．研究方法

令和7年度は既に確立済みの PMA-dPCR 法を用いて市販鶏肉の疫学調査を実施した。

①使用した検体

市販鶏肉として、令和7年2月から令和8年1月まで毎月10検体の市販鶏肉（もも肉）を小売店3店舗（A, B, C）から購入した。

食鳥処理場の検体として、令和7年12月にチラー後の首皮を採取した。複数の首皮を一つの袋にまとめて約100gを１サンプルとし、合計4サンプルを用いた。

これらのサンプルについて以下の通り培養法および核酸検出法によりカンピロバクター属菌の検出を行なった。

②検体の処理方法

市販鶏肉125gまたは食鳥処理場で採取した首皮100gをストマッカー袋に入れ、PBS 40mL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 8000 × g、10 分間、4℃で遠心し、ペレットをPBSで懸濁し、1 mLとした。それを用いて、増菌培養、直接分離培養、PMA EnhancerなしのPMA-dPCR、PMA EnhancerありのPMA-dPCR、PMA処理なしのdPCR、5つの検証方法を実施した。すなわち、1つの検証方法ごとに25 gの鶏肉を用いていることとな

る。増菌培養では200 μLをプレストン培地10 mLに加え、42℃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培地に塗布し、42℃で48時間微好気条件で培養した。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。直接分離培養では、2枚のmCCDAにそれぞれ100 μLのサンプルを塗沫し、42℃で48時間微好気条件で培養した。PMA Enhancerあり、なしのPMA-dPCRでは200μLのサンプルに40 μLのPMA EnhancerもしくはPBSを加え、PMAxxを終濃度50 μMとなるように添加し、その後DNA抽出を実施した。PMA処理なしのdPCRでは200 μLをPMA処理せずにそのままDNA抽出に供した。その後③と同様にPMA―dPCR、PMA EnhancerありのPMA―dPCR、PMA処理なしのdPCRを実施した。

③DNA抽出およびdPCR

DNA は、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用して抽出した。抽出した DNAを使用し、QIAcuity One、2plex（QIAGEN）によるdPCRを実施した。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′, もしくは、camp2F-595: 5′- ACT CAA CTG ACG CTA AGG CG - 3′, Camp2R: 5′-GGC TTC ATG CTC TCG AGT T- 3′、camp2 probe: 5′-(FAM) –CAG AGA ACA ATC CGA ACT GGG ACA-(BHQ1)-3′を使用した。dPCR混合物は、4 xプローブPCRマスターミックス（QIAcuityプローブPCRキット、QIAGEN）を使用し、DNA 4μLを含む最終容量40μLに調製した。QIAcuity Nanoplate 26k 24ウェル（QIAGEN）を使用して、dPCR反応を95°Cで2分、続いて95°Cで15秒、60°Cで1分の50サイクルで実施した。

C．研究結果

①市販鶏肉からのカンピロバクター検出結果

令和7年2月から令和8年1月までの計120検体の市販鶏肉について、直接分離培養、増菌培養、PMA処理なしのdPCR、PMA EnhancerなしのPMA-dPCR、PMA EnhancerありのPMA-dPCRを実施した。その結果、直接分離培養では52/120検体（43.3%）、増菌培養では56/120検体（46.7%）が陽性であった。一方、分子生物学的検査では、PMA処理なしのdPCRで87/120検体（72.5%）、PMA EnhancerなしのPMA-dPCRで66/120検体（55.0%）、PMA EnhancerありのPMA-dPCRで40/120検体（33.3%）が陽性であった。PMA処理を行わないdPCRは最も高い陽性率を示し、PMA処理を行うことで陽性率は低下した。特にPMA Enhancerを併用した条件では、より低い陽性率を示した。

②食鳥処理場検体におけるカンピロバクター検出結果

チラー後のサンプルでは3検体で直接分離培養陽性、4検体全てにおいて増菌培養陽性であった。細菌数は直接分離培養で陽性であった検体全てで2CFU/20gであった。遺伝子検出法についてはPMA処理なし条件およびEnhancerなしPMA処理条件では全4検体が陽性であった。一方、EnhancerありPMA処理条件では1/4検体のみが陽性であり、多くのシグナルは膜損傷菌あるいはVBNC状態菌由来である可能性が示唆された。

D．考察

PMA 処理なしの dPCR は最も高い陽性率を示した一方、PMA 処理を行った PMA-dPCR では陽性率が低下した。PMA は膜損傷細胞や死菌由来 DNA への結合により PCR 増幅を阻害するため、PMA-dPCR では主として膜構造を保持した菌由来シグナルが検出されたと考えられる。さらに、PMA Enhancer を併用した条件では陽性率がさらに低下した。PMA Enhancer は外膜透過性を高めることで、損傷菌や VBNC 状態細胞にも PMA を作用させることが可能であることから、Enhancer 併用条件ではより健常な細胞由来シグナルのみが検出された可能性が示唆された。これらの結果から、市販鶏肉中には死菌由来 DNA だけでなく、膜損傷菌あるいは VBNC 状態菌も一定数含まれている可能性が考えられた。

そのため、次年度のオンサイト検出法確立では PMA 処理を行なった上での遺伝子検出法を基盤としていく。

E．結論

本年度は実際に市販鶏肉と食鳥処理場サンプルから培養法と遺伝子検出法による検出を試み、VBNC状態のカンピロバクターの存在の有無について検証した。食鳥処理場サンプルについては引き続きの検証が必要であるが、市販鶏肉にはVBNC状態のカンピロバクターが存在することが示唆された。

次年度はPMA−dPCRをベースとしたオンサイト検出法の確立を目指す。

F．健康危険情報

該当なし

G．研究発表

1. 論文発表

1）Md. Jannat Hossain, Okada, A., Inoshima, Y. : Digital polymerase chain reaction combined with propidium monoazide (PMA) without PMA enhancer detects viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells. Microb. Pathog. 208: 108020, 2025.

2. 学会発表

1）Md. Jannat Hossain、岡田彩加、猪島康雄. Absolute quantification of viable Campylobacter jejuni using digital PCR with propidium monoazide. 第 98 回

日本細菌学会総会．令和 7 年 5 月 30 日． 金沢開催.

２）Md. Jannat Hossain、岡田彩加、猪島康雄. Propidium monoazide(PMA)を用いたデジタル PCR 法による鶏肉からの生きた *Campylobacter* 属菌定量法の検討. 令和 7 年度獣医学術中部地区学会．令和 7 年 8 月 31 日． 名古屋開催.

H．知的財産権の出願・登録状況

該当なし