

## 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。VBNC 状態の菌を含めた生きたカンピロバクターを検出する手法として食鳥肉から PMA-qPCR によるカンピロバクターDNA の検出法を確立することを最終目標とし、本年度は PCR 阻害物質が多く含まれる食品サンプルから効率的に DNA を検出するための手法の検討を実施した。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として、使用する qPCR 試薬、DNA 抽出キット、PCR 阻害物質除去キットについて検討を行い、最適な試薬を選定した。また PCR 阻害物質除去キットについては使用の有無により PCR 効率に差が認められなかったため、使用の必要はないことが示された。今後、密度勾配遠心法の検討、PMA-qPCR 法の確立を行い、実際の汚染状況の調査を行なっていくことで、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を目指す。

## 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

令和 2 年度は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 抽出方法の検討を中心に行った。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 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。

## C. 研究結果

### 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。

## D. 考察

令和 2 年度は生きたカンピロバクターを検出する新規手法において使用する 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。

## E. 結論

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 qPCR のための DNA 抽出試薬および qPCR 試薬の検討を行い、いくつかの試薬を選定することができた。今後は、カンピロバクターの濃縮および阻害物質の除去を目的とした密度勾配遠心法などと組み合わせることで、より効率的にカンピロバクター DNA を検出する方法を検討するとともに、生菌のみを検出する PMA-qPCR 法の条件検討を行うことで、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す。確立された手法を用いて、食鳥肉のカンピロバクター汚染状況を調査することが可能となる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) 八木彩予、岡田彩加、猪島康雄.

Campylobacter jejuni の VBNC (viable but non-culturable) 状態への移行に最適な再現条件の検討。第 163 回日本獣医学会学術集会。令和 2 年 9 月 14 日。山口県 (web 開催)。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

