

## 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。本年度は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することを目標とした。PMA 処理条件については、PMA 処理を2回繰り返すことで、死菌の検出を完全に抑制することに成功した。密度勾配遠心法を用いた濃縮・精製ではロスが多いことがわかったため、密度勾配遠心法は実施せず、不純物の混入を増やさないリンス法にてカンピロバクターの回収を行うこととした。予備試験として、食鳥処理場の中抜き後のと体で培養法と確立した PMA-qPCR 法によりカンピロバクターの検出を実施し培養法と同程度の検出率でカンピロバクターを検出できた。9 月以降、培養法と PMA-qPCR 法による食鳥肉におけるカンピロバクター存在状況を調査している。令和4 年度も引き続き調査を実施し、季節性の変化を明らかにする。

## 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

## (1) PMA-qPCR 法の確立

令和3 年度は死菌の検出を確実に抑制する PMA-qPCR の条件および、食品サンプルから不純物(PCR 阻害物質)を除去し、効率的にカンピロバクター DNA を抽出する手法を以下のように検討した。

## ①使用菌株、培養条件

*Campylobacter jejuni* JCM2013 株を使用した。-80℃ に保存したグリセロールストックより modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar (mCCDA)に塗布し、37℃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℃で 36±2 時間、微好気条件で浸透培養した。ブルセラブロスを用いて培養液の OD600 を 0.5 に調整し、1×10<sup>8</sup>CFU/mL の生菌サンプルとした。

生菌サンプルを 95°C で 5 分間加熱処理することで死菌サンプルを作製した。

#### ②PMA 処理および DNA 抽出

1×10<sup>8</sup>CFU/mL の菌液を希釈することで得た、様々な濃度の菌液 160μL に PMA Enhancer もしくはブルセラブロス を加えた。PMA<sub>xx</sub> を終濃度が 25, 50, 100 μM となるように加え、37°C で 10 分間インキュベートし、PMA<sub>xx</sub> 活性化のため LED Crosslinker 12 (Takara, Kusatsu, Japan) を用いて 15 分間光照射を行った。PMA 処理を繰り返し実施する際には 8,000 × g, 4°C で 10 分間遠心操作を行い、160 μL の PBS で懸濁し、再度上記の操作を行った。DNA 抽出は 200 μL の懸濁液から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行い、100 μL の蒸留水で溶出した。

#### ③qPCR 法

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。

#### ④鶏肉乳剤の調整

20 g の市販鶏肉 (カンピロバクター陰性を確認したもの) を 20 mL の PBS と混合し、1 分間ストマッカー処理を行った。ストマッカー袋のフィルターを通して回収した液を鶏肉乳剤として使用した。

#### ⑤密度勾配遠心法およびリンス法

密度勾配遠心法は以下のように実施した。Percoll (SigmaAldrich, St Louis, MO, USA) を用いて、1.130, 1.109, 1.066 g/mL の密度勾配溶液を作製し、密度の高いものから順に下層より重層した。市販鶏肉に 10<sup>5</sup>CFU の菌体を塗布し、冷蔵庫で一晩静置して汚染鶏肉を再現した。汚染鶏肉 20 g に PBS 80mL を加え、1 分間ストマッカー処理を行い、フィルターを通して懸濁液を回収し、20%乳剤とした。40 mL の乳剤を 800 × g, 4°C で 10 分間遠心し、不純物を除去し、上清を 8,000 × g, 4°C で 10 分間遠心した。ペレットを PBS 1mL で回収し、作製した密度勾配の上に重層した。超遠心機およびスイングローターを用いて、4,500 × g, 4°C で 15 分間遠心した。1.109 g/mL と 1.066 g/mL の間に形成された層を *C.jejuni* の存在する層として回収した。

リンス法では上記と同様に作製した汚染鶏肉 20g をストマッカー袋に入れ、PBS 10mL 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 8,000 × g, 4°C で 10 分間遠心し、ペレットをサンプルとした。

#### (2) 予備試験および疫学調査

予備試験として、食鳥処理場の中抜き後のと体を用いて、培養法および確立した PMA-qPCR 法によりカンピロバクター検出を実施した。また、9, 12, 3 月に市販鶏肉の疫学調査、11, 2 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 10 g、市販鶏肉では 25 g を使用した。

#### ①PMA-qPCR 法

(1) で確立した、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。

#### ②培養法

NIHSJ-02法に準じて実施した。すなわち、検体に 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 mCCD A 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。

### C. 研究結果

#### (1) PMA-qPCR 法の確立

##### ①PMA Enhancer の必要性

PMA Enhancer はグラム陰性菌の生死判定の識別能を向上させる試薬である。本試薬の有無により、*C.jejuni* の死菌検出が抑制されるかを検証した。PMA Enhancer の添加は生菌の検出に影響を与えず、死菌の検出を大幅に抑制した ( $\Delta Ct = 7.9$ )。PMA Enhancer は死菌の誤判定低減に有効であることが示された。

##### ②最適な PMA 濃度

菌種によって最適な PMA 濃度が異なることが報告されているため、検証した。PMA<sub>xx</sub> の濃度を高くしても死菌の誤判定は低減できず、どの濃度においても生菌の検出が抑制されなかった。そのため、マニュアルで推奨される 25 μM を使用していくこととした。

##### ③2 連続の PMA 処理

PMA Enhancer を使用し、様々な濃度の PMA 処理を実施したが、死菌の検出を完全に抑制することができなかったため、PMA 処理を 2 回実施し、死菌抑制効果を検証した。PMA 処理を 2 回繰り返すことで、10<sup>5</sup>CFU/mL の *C.jejuni* の検出を完全に抑制することができた。また、鶏肉乳剤に *C.jejuni* を添加して同様の実験を行ったが、不純物存在下でも完全に死菌の検出を抑制できた。

##### ④密度勾配遠心法およびリンス法

1.109 g/mL と 1.066 g/mL の間に形成された層を *C.jejuni* の存在する層として回収し、DNA 抽出を行った。一方、不純物は 1.066 g/mL と PBS の間の層に目視で確認された。密度勾配遠心法により精製を行うと添加した *C.jejuni* の 1/40 程度に減少しており、ロス

が大きいことがわかった。

一方、リンス法では添加した*C.jejuni*の1/2程度回収できていたため、実際の疫学調査ではリンス液を使用することとした。

## (2) 予備試験および疫学調査

### ①予備試験の結果

予備試験は2021年9月に実施した。岐阜県内の食鳥処理場に協力を依頼し、中抜き後の食鳥と体から10 gずつ6検体の首皮を採取し、検体とした。PMA-qPCR法、培養法それぞれで5検体が陽性となったが、陰性となった1検体はそれぞれ異なる検体であった。PMA-qPCRでは培養では検出できない菌（VBNC菌など）を検出できることが示唆された。一方、培養では検出できたが、PMA-qPCRでは検出できない場合もあり、菌数が少ない場合は増菌培養を行うことで感度が高くなる可能性がある。

### ②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。11、2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。

11月の検体では、PMA-qPCR法では20検体全てで陽性となった。一方、培養法ではチラー後の1検体のみで陽性となり、残りの19検体は陰性となった。

2月の検体ではPMA-qPCR法、培養法、ともに20検体全てで陽性となった。

#### ii) 市販鶏肉

9、12、3月において、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。

9月は小売店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9検体、培養法では8検体で陽性となった。ムネ肉においてはPMA-qPCR法では4検体、培養法では3検体で陽性となった。レバーにおいてはPMA-qPCR法では6検体、培養法では3検体で陽性となった。

12月はモモ肉においてはPMA-qPCR法では5検体、培養法では8検体で陽性となった。ムネ肉においてはPMA-qPCR法では3検体、培養法では5検体で陽性となった。レバーにおいてはPMA-qPCR法では3検体、培養法では2検体で陽性となった。

3月はモモ肉においてはPMA-qPCR法では2検体、培養法では1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2検体で陽性となった。レバーにおいてはPMA-qPCR法では4検体、培養法では1検体で陽性となった。

## D. 考察

密度勾配遠心法ではカンピロバクターのロスが多かったが、これは既報（Fukushima et al., 2007）とも一致する。今回はリンス法を用いたが、今後サンプルの前処理方法について改良が望まれる。密度勾配法でロスが多かった要因について、カンピロバクターと鶏肉由来の物質の接着が関与している可能性がある。カンピロバクターは鶏肉の皮膚と接着し、その物質の1つは鳥血清アルブミンであることが報告されている（Taniguchi et al., 2021）。鳥血清アルブミンは鶏の皮膚だけでなく、鶏肉にも含まれている可能性があることから、前処理の際に鶏肉由来不純物として除去している部分にカンピロバクターが含まれていた可能性がある。実際、実験的に鶏肉にカンピロバクターを添加した場合、低速（800 × g）で遠心、除去した層にカンピロバクターが含まれていることを確認した（予備的試験のみのため、データ示さず）。リンス法では低速での遠心では不純物を全て除去することはできず、高速で遠心した際にも不純物が認められたため、カンピロバクターのロスが少なかったのかもしれない。今後、カンピロバクターと鶏肉との接着を阻害するが、PMAの効果阻害しない方法を確立できれば、PMA-qPCR法によるカンピロバクターの検出率が大きく上昇する可能性がある。しかし、本仮説を検証するには時間がかかるため、1年間の調査を前提としている本研究課題では、今回確立した手法を用いて疫学調査を進めていくこととした。

疫学調査において、食鳥処理場の食鳥と体では、カンピロバクター汚染鶏群を対象としたため、高い汚染率であり、特に2月の調査ではPMA-qPCR法と培養法との差が認められにくかった。しかし、11月の調査ではPMA-qPCR法と培養法での差が顕著に認められた。培養法ではほとんどの検体で陰性であったのに対し、PMA-qPCR法では全ての検体で陽性となった。PMA-qPCR法でVBNC状態のカンピロバクターを検出できた可能性がある。

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63%、37%であったのに対し、PMA-qPCR法では59%、30%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24%であったのに対し、PMA-qPCR法では52%となり、PMA-qPCR法での検出率が大きく上回ったが有意差は認められなかった。レバーにおいては培養法での検出よりもPMA-qPCR法での検出が推奨されることが示唆されたが、今後検体数を増やして検証していく必要がある。また、モモ肉やムネ肉においても培養法では検出できなかった検体においてPMA-qPCR法では検出できた検体も存在した。本手法により、

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。一方、培養法でのみ検出できた検体もあった。これは上述のようにカンピロバクターと鶏肉との接着が要因となっている可能性がある。

今後、食鳥と体、市販鶏肉の両方において調査を引き続き実施し、PMA-qPCR 法の有用性を検証していく予定である。

#### E. 結論

PMA処理条件については、PMA処理を2回繰り返すことで、死菌の検出を完全に抑制することに成功した。本研究で確立した手法として国際誌に掲載された（印刷中）。密度勾配遠心法を用いた濃縮・精製ではロスが多いことがわかったため、密度勾配遠心法は実施せず、不純物の混入を増やさないリンス法にてカンピロバクターの回収を行うこととした。確立した手法で疫学調査を実施し、VBNC状態の菌を検出できることが示唆された。今後、令和4年度も引き続き調査を実施し、季節性の変化を明らかにする予定である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yagi, S., Okada, A., Inoshima, Y. : Role of temperature, nutrition, oxygen, osmolality, and bacterial strain in inducing a viable but non-culturable state in *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Methods* 195: 106456, 2022.

##### 2. 学会発表

1) 岡田彩加、猪島康雄. 培養できない菌も含めた行きた *Campylobacter* 属菌を死菌と区別し特異的に検出する方法の最適化. 第164回日本獣医学会学術集会. 令和3年9月日. web開催.

2) 岡田彩加、猪島康雄. Propidium monoazide(PMA)を用いた Real-time PCR 法による鶏肉からの培養できない菌も含めた生きた *Campylobacter* 属菌検出法の検討. 令和3年度中部地区獣医師大会 獣医学術中部地区学会. 令和3年9月5日. web開催.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし