

# リアルタイム PCR 法を用いたヒト糞便及び鶏肉からの *Campylobacter jejuni/coli* 検出法の検討

高橋直人・古賀舞香・松永典久・丸山浩幸

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Detection and Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Human Feces and Chicken Meat by Real-Time PCR

Naoto TAKAHASHI, Maika KOGA, Norihisa MATSUNAGA  
and Hiroyuki MARUYAMA

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

### Summary

Duplex real-time PCR assays for directly detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human fecal samples and enriched Preston broth containing human feces and chicken have been developed. DNA in the human fecal and broth samples were isolated by Hot-Alkaline DNA Extraction and DNA extraction kit, respectively. Primers and probes were designed for species-specific detection of *Campylobacter* by use of DNA sequences of *C. jejuni* *hipO* gene and *C. coli* *glyA* gene.

Additionally, a primer set and a probe added to real-time PCR master mix to confirm PCR inhibitors in samples. The real-time PCR assays for human feces and enriched-Preston broth were performed on 11 and 112 samples, respectively, and compared to culture methods. Although a small number of PCR-positive-samples were not isolated *Campylobacter* by a culture method, the result of culture method were in good agreement with that of real-time PCR, and hence these assays should be useful for screening test of *Campylobacter* in human feces and chicken meat.

**Key Words** : カンピロバクター *Campylobacter*, リアルタイム PCR Real-Time PCR, アルカリ熱抽出法 Hot-Alkaline DNA Extraction, 糞便検体 Fecal samples, 鶏肉 Chicken Meat, スクリーニング検査 Screening test

### 1 はじめに

*Campylobacter jejuni/coli* (以下 *C. jejuni/coli*) は人の下痢症の原因菌とされ、細菌性食中毒の中で最も発生件数が多い ([http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html))。また微好気性の細菌であり、鶏の腸管で増菌するため、鶏糞から高濃度に検出される<sup>1) 2)</sup>。一方、食肉中では増菌しないため、検査においては、培養法による増菌が必要である<sup>3)</sup>。培養法を用いた *C. jejuni/coli* の検査は、結果判定までに4~5日を要しており、食中毒予防、拡大防止のために迅速な検査が求められている。

*C. jejuni/coli* の迅速検査法として、抗原抗体反応を利用したイムノクロマト法<sup>4)</sup>や特異的遺伝子領域を増幅させ

て検査するコンベンショナル PCR 法, LAMP 法<sup>5) ~7)</sup>, リアルタイム PCR (以下 qPCR) 法などが報告されている<sup>8) ~12)</sup>。遺伝子検査の中でも qPCR 法は食中毒細菌の検査法として、腸管出血性大腸菌検査法において、平成 26 年 10 月, qPCR 法を用いた食品増菌液からの遺伝子検出によるスクリーニング検査が通知され<sup>13)</sup>, 煩雑な検査の簡略化に利用されている。そこで, *Campylobacter* 食中毒発生時の迅速な検査法の確立とスクリーニング検査の導入を目的として, 遺伝子検査法の中でも, 迅速かつ特異性の高い qPCR 法を用いたヒト糞便及び鶏肉からの *C. jejuni/coli* 遺伝子の検出法を検討したので報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 qPCR 法の特異性と定量性の確認

#### 2.1.1 qPCR 試薬及び測定条件

*C. jejuni* の *hipO* 遺伝子及び *C. coli* の *glyA* 遺伝子を標的に、プライマー設計ソフトである Primer Express を用いてプライマープローブを設計した。また、当所で既にレジオネラ属菌検査で使用しているインターナルコントロール検出用プライマープローブを組み合わせた (Table 1)。マスターミックスには、Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を使用し、インターナルコントロールとして  $\lambda$  フェージ DNA の遺伝領域<sup>1,4)</sup> を用いた。PCR 反応液は、最終濃度が 0.2  $\mu$ M プライマー、0.2  $\mu$ M プローブ、5  $\times$  Premix Ex Taq, 9  $\times$  インターナルコントロールとなるよう混合し、鋳型 DNA 5  $\mu$ L と水を加え、全量を 25  $\mu$ L に調整した。qPCR 装置には、QuantStudio<sup>®</sup> 5 (Applied Biosystems) を用い 95 $^{\circ}$ C 30 秒 1 サイクル  $\rightarrow$  95 $^{\circ}$ C 5 秒, 60 $^{\circ}$ C 20 秒 45 サイクルの反応を行った後、実験データを解析し、Ct 値が得られたものを陽性とした。

Table 1 Primers and probes used in real-time PCR assay for *C. jejuni* and *C. coli*

Assey	Name	Sequences(5'-3')	Origin
<i>C.jejuni</i>	hipO-F	5'-AAAATAGGACTTCGTGCAGATATGG-3'	This study
	hipO-R	5'-ACCGCAAGCATGCATTACATT-3'	
	hipO-P	5'-VIC-TTGCAAGAATGCACAAT-MGB-3'	
<i>C.coli</i>	glyA-F	5'-TTTGCGAGACATTGCACACATTG-3'	This study
	glyA-R	5'-TGAGGAAATGGACTTGGATGCT-3'	
	glyA-P	5'-FAM-TGGACTTGTGTAGCAGGT-MGB-3'	
Internal Control	JFP-F	5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3'	14)
	JFP-R	5'-CCAACAGCTAGTTGACATCG-3'	
	LAMFL	Cy5-GGTGCCGTTCACTTCCCGAATAAC-BHQ3	

#### 2.1.2 特異性の確認

標準菌株として、*C. jejuni* ATCC294298 株及び *C. coli* ATCC43478 株を使用した。さらに当所の保存菌株である *C. jejuni* 30 株、*C. coli* 30 株、宮崎大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学講座から分与された *C. lari*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, (以下 *C. spp.*) 及び他の食中毒菌として *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Shwarzengrund*, *Vibrio fluvialis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* を使用し特異性の確認を行った。

#### 2.1.3 定量性の確認

標準菌株懸濁液の DNA 抽出液を TE バッファー (pH 8.0) (ニッポンジーン) (以下 TE) で段階希釈したも

のを、qPCR 結果より決定係数 (以下  $R^2$  値), PCR 増幅効率及び検出下限値を確認した。

### 2.2 ヒト糞便及び鶏肉からの DNA 抽出法の検討

#### 2.2.1 ヒト糞便からの直接検出法

食中毒事例関連ヒト糞便 1 検体を用い、市販キットとして FastDNA SPIN Kit for Soil (MP バイオ) (以下 SPIN Kit), QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), MonoFas DNA 精製キット (GL サイエンス), ZR Fecal DNA Prep Kit (Zymo Research) を用いて DNA 抽出を 10 回繰り返す。次に、ヒト糞便 11 検体を用いて SPIN Kit で DNA を抽出し、糞便中の阻害物質除去を目的として、抽出液を OneStep<sup>™</sup> PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research) (以下精製キット) により精製し、精製前と精製後の抽出液を用いて NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific) により 260/280 吸光度比を測定後、qPCR の Ct 値を測定した。また、mCCDA 培地及びバツラー培地に塗抹後 42 $^{\circ}$ C で 48 時間培養し、得られた定型コロニーを同定した。

#### 2.2.2 増菌後検出法

##### 1) 標準菌株増菌液及び鶏肉増菌液の調製

プレストン培地 (プチットーカンピロ (日研生物医学研究所)) 10mL に標準菌として *C. jejuni* ATCC294298 株を接種し、42 $^{\circ}$ C 24 時間培養した増菌液 100  $\mu$ L を試料とした。また、あらかじめ *Campylobacter* 陰性であることを確認した鶏肉 11 検体を、鶏肉 25g に対し 100mL のプレストン培地を加え 42 $^{\circ}$ C 24 時間培養し、これに 10<sup>4</sup> cfu/mL になるよう標準菌として *C. jejuni* ATCC294298 株及び *C. coli* ATCC43478 株を接種し (以下標準菌添加鶏肉増菌液)、この 100  $\mu$ L を試料とした。

##### 2) 熱抽出法

増菌液 100  $\mu$ L を 10,000  $\times$  g, 10 分遠心後上清を除去し、TE を 100  $\mu$ L 加え 100 $^{\circ}$ C 10 分加熱後、10,000  $\times$  g, 10 分遠心し上清を鋳型 DNA とした。

##### 3) アルカリ熱抽出法

腸管出血性大腸菌の通知法に従い抽出を行った<sup>1,3)</sup>。増菌液 100  $\mu$ L を 10,000  $\times$  g, 10 分遠心後上清を除去し、50mM NaOH 85  $\mu$ L 加え 100 $^{\circ}$ C 10 分加熱後、1M Tris-HCl 15  $\mu$ L で中和し、10,000  $\times$  g, 10 分遠心し上清を鋳型 DNA とした (Fig. 1)。

またアルカリ熱抽出法では、DNA 抽出液に色素成分が残り、やや褐色となるため、色素成分が qPCR の Ct 値の大きさに影響を及ぼすかどうかを確認した。方法として最初の 10,000  $\times$  g, 10 分遠心後上清除去の後に、滅菌水 100  $\mu$ L を加え、30 秒ボルテックス後 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 rpm 各 1 分遠心後上清を除去する行程を追加して Ct 値を比較した。

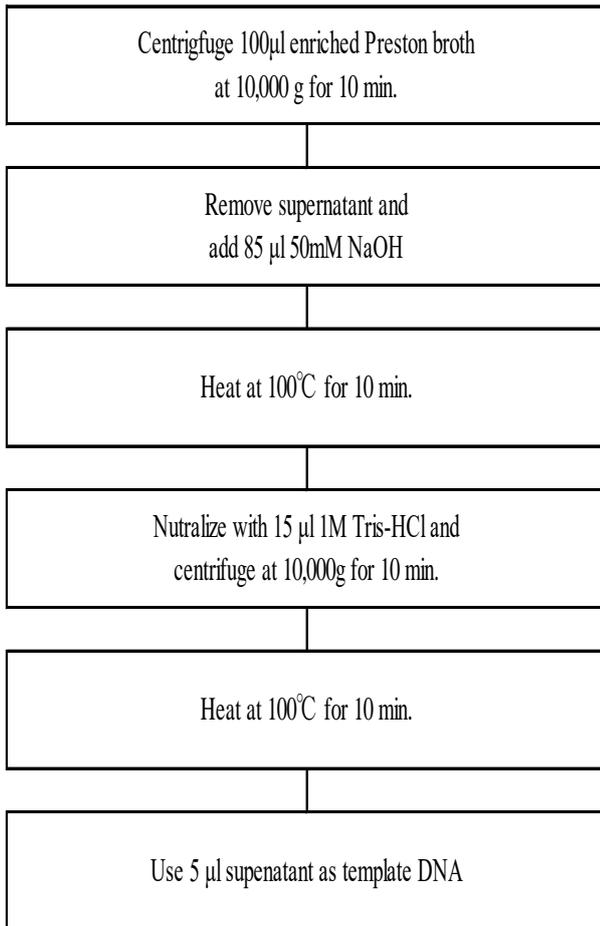


Fig. 1 Hot-Alkaline DNA Extraction from enriched Preston broth

4) 市販抽出キットを用いた方法

増菌液 100µL を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、キット添付のプロトコルに従って抽出した。

2.3 食中毒事例関連のヒト糞便及び市販鶏肉を用いた培養法と増菌後検出法の比較

試料は、平成 28 年 4 月～平成 29 年 12 月に福岡市で発生した *Campylobacter* 食中毒事例関連ヒト糞便 53 検体、食中毒事例関連の鶏肉 33 検体及び市内流通の未加熱の鶏肉 26 検体を用いた。カンピロバクター標準試験法 ([http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-02\\_S T4\\_rev01.pdf](http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-02_S T4_rev01.pdf)) に従って検査を行った。ヒト糞便約 100mg に対し 10mL、鶏肉 25g に対し 100mL のプレストン培地を加え、30 秒間ストマッカー処理し、42°C で 24 時間培養後、増菌液 10µL を mCCDA 培地及びバツラー培地に塗抹後 42°C で 48 時間培養し、得られた定型コロニーを同定した。また、増菌液 100µL よりアルカリ熱抽出法で DNA を抽出後、qPCR で測定し Ct 値が得られたものを陽性とした (Fig. 2)。

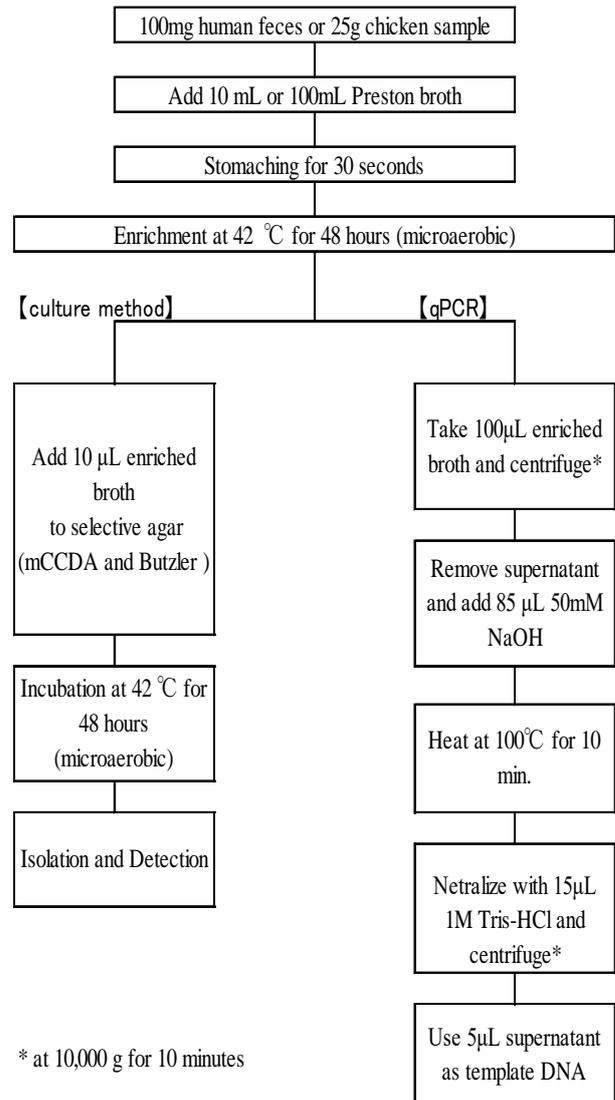


Fig. 2 Culture and Real-Time PCR flowchart of detection of *Campylobacter* from human feces and chicken samples

3 実験結果

3.1 qPCR 法の特異性と定量性の確認

設計したプライマー及びプローブを用いて qPCR を行った結果、*C. jejuni/coli* のみ陽性となり、*C. spp.*及びその他の食中毒菌は陰性となった (Table 2)。次に、標準試料として、標準菌株を用いて定量性の確認を行った結果、R<sup>2</sup>値は *C. jejuni/coli* どちらも 0.99 以上となり、DNA 量と Ct 値は高い相関を示した。PCR 増幅効率率はそれぞれ 90.2%、95.3%であった。検量線は *C. jejuni*、*C. coli* ともに 1cfu/ウェル～10<sup>4</sup> cfu/ウェルの範囲で直線性が得られた (Fig. 3)。直線性が得られた段階希釈液のうち最も小さい値を検出下限値とした。

Table 2 A List of strains used for the validation of specificity of real-time PCR assay for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

Bacterial species	No. of strains	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		Real-Time PCR	Real-Time PCR	Real-Time PCR	Real-Time PCR
<i>C. jejuni</i> ATCC294298	1	Positive	Negative		
<i>C. jejuni</i> isolated from poultry	20	Positive	Negative		
<i>C. jejuni</i> isolated from human feces	10	Positive	Negative		
<i>C. coli</i> ATCC 43478	1	Negative	Positive		
<i>C. coli</i> isolated from poultry	21	Negative	Positive		
<i>C. coli</i> isolated from human feces	9	Negative	Positive		
<i>C. lari</i>	1	Negative	Negative		
<i>C. hyointestinalis</i>	1	Negative	Negative		
<i>C. fetus</i>	1	Negative	Negative		
<i>C. upsaliensis</i>	1	Negative	Negative		
<i>Bacillus cereus</i>	1	Negative	Negative		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	Negative	Negative		
<i>Salmonella</i> Shwarzengrund	1	Negative	Negative		
<i>Vibrio fluvialis</i>	1	Negative	Negative		
<i>Escherichia coli</i>	2	Negative	Negative		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	Negative	Negative		
<i>Clostridium perfringens</i>	1	Negative	Negative		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	Negative	Negative		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Negative	Negative		

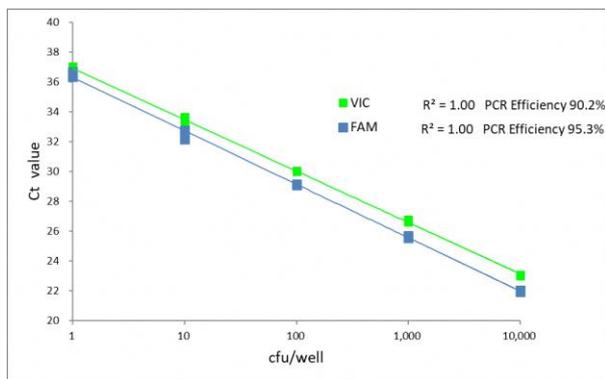


Fig. 3 Dynamic range and sensitivity of real-time PCR assay for *C. jejuni* and *C. coli*. Standard curves of 10-fold dilution of DNA extracted from *C. jejuni* ATCC294298 and *C. coli* ATCC43478. (from  $1.0 \times 10^0$  to  $1.0 \times 10^4$  cfu/well)

### 3.2 ヒト糞便及び鶏肉からの DNA 抽出法の検討

#### 3.2.1 直接抽出法

ヒト糞便 1 検体を用いて市販の DNA 抽出キット 4 種により Ct 値を比較した結果, 10 回の平均値は 34.0~36.5 であった (Fig. 4) . 当所の食中毒検査で使用している SPIN Kit が Ct 値 34.0 と最も小さい値を示したため, SPIN Kit により抽出することとした.

*C. jejuni* 食中毒事例の糞便 11 検体を SPIN Kit を用いて抽出し抽出液の吸光度を測定後, 一部を精製キットで精製しそれぞれ qPCR で測定した. 精製前と精製後の Ct 値はそれぞれ 19.0~29.5, 18.9~30.0 (Table 3) 吸光度比はそれぞれ 1.7~2.0, 1.7~1.9 (Table 4) となった. また, 精製操作により Ct 値, 吸光度比に差は見られなかったこ

とから, 精製キットは使わず SPIN Kit の単体使用を採用した. 直接培養法と比較したところ, qPCR と培養法の結果は一致した (Table 3) .

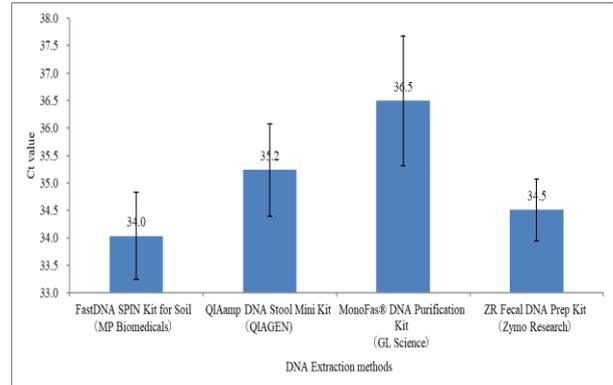


Fig. 4 Comparison of 5 DNA direct extraction kits from human feces

Table 3 Comparison of Ct value of DNA directly extracted from human fecal samples and their purified samples

Sample Name	Ct value of DNA extracted by SPIN Kit	Ct value of purified samples	Result of culture method
Ji2	19.0	19.1	+
Ji6	19.2	18.9	+
Ji7	29.5	30.0	+
Ji10	20.3	22.0	+
Ji13	24.8	24.4	+
2069	No Ct	No Ct	-
2070	No Ct	No Ct	-
2071	22.2	22.0	+
2195	25.5	25.3	+
2196	27.5	27.4	+
2197	28.3	27.1	+

Table 4 260/280 absorbance ratios of template DNA directly extracted from human fecal samples and their purified samples

Sample Name	260/280 absorbance of DNA extracted by SPIN Kit	260/280 absorbance of purified samples
Ji2	1.8	1.8
Ji6	1.8	1.8
Ji7	1.8	1.7
Ji10	1.8	1.8
Ji13	1.9	1.8
2069	1.9	1.9
2070	1.7	1.8
2071	1.8	1.8
2195	1.9	1.9
2196	2.0	1.8
2197	1.9	1.9

### 3.2.2 増菌後検出法

標準菌を増菌したプレストン培地の qPCR により得られた Ct 値の平均は、熱抽出法で 34.1 となりアルカリ熱抽出法の 27.8, 抽出キットの 28.0 に比べ高い値を示した (Table 5) . 標準菌添加鶏肉増菌液を用いた qPCR の結果は、標準菌を増菌したプレストン培地と同様に熱抽出で他二法に比べ高い値を示したが、検体によっては Ct 値が得られないものがあつた (Table 6) (Table 7) . 一方、アルカリ熱抽出法は抽出キットと同程度の Ct 値が得られ、抽出キットより安価で簡便であることからアルカリ熱抽出法を採用することとした (Table 5) (Table 6) (Table 7) .

色素成分が qPCR の Ct 値の大きさに影響を及ぼすかの検討の結果は、3,000 rpm, 6,000 rpm, 1 分の遠心洗浄を行った場合、洗浄ステップを加えない場合に比べ Ct 値が大きくなり、9,000rpm, 12,000rpm, 1 分の遠心洗浄した場合には同程度の Ct 値を示した. 洗浄ステップを加えることで Ct 値が小さくなることはなく (Fig. 5) , 色素成分を除くための洗浄ステップは不要と判断した.

Table 5 A list of Ct value of 3 different types of DNA Extraction methods from *C.jejuni*-positive Preston broth

Sample No.	Hot DNA Extraction	Hot-Alkaline DNA Extraction	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
1	33.6	27.8	27.6
2	33.6	27.6	28.1
3	34.1	27.7	27.9
4	34.8	27.9	27.9
5	33.7	27.8	27.9
6	34.1	27.8	28.4
7	33.9	27.8	28.2
8	34.3	27.9	27.9
9	34.3	27.8	27.9
10	34.6	27.7	28.2
Average	34.1	27.8	28.0
SD	0.4	0.1	0.2

Table 6 A list of Ct value of 3 different types of DNA Extraction methods from *C.jejuni*-positive Preston broth with chicken samples

Sample No.	Types of samples	Hot DNA Extraction	Hot-Alkaline DNA Extraction	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
A	Liver	39.0	33.1	34.8
B	Thigh	37.9	33.2	34.7
C	Thigh	39.7	33.7	35.0
D	Breast	39.9	35.0	34.5
E	Minced chicken	39.5	34.4	34.9
F	Minced chicken	40.7	34.4	34.6
G	Thigh	38.6	33.7	34.5
H	Thigh	37.4	34.6	35.1
I	Breast	No Ct	37.0	34.3
J	Liver	39.1	38.1	36.6
K	Gizzard	39.0	33.4	34.9
Average		35.6	31.8	32.0
SD		1.0	1.6	0.7

Table 7 A list of Ct value of 3 different types of DNA Extraction methods from *C.coli*-positive Preston broth with chicken samples

Sample No.	Types of samples	Hot DNA Extraction	Hot-Alkaline DNA Extraction	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
A	Liver	38.5	31.1	32.6
B	Thigh	36.6	31.2	32.3
C	Thigh	37.9	31.2	31.8
D	Breast	38.9	31.8	32.5
E	Minced chicken	No Ct	31.5	32.1
F	Minced chicken	No Ct	31.4	32.5
G	Thigh	37.3	31.2	32.3
H	Thigh	36.5	31.8	32.5
I	Breast	38.7	32.3	32.9
J	Liver	39.6	35.0	33.1
K	Gizzard	37.0	31.0	32.4
Average		34.1	29.2	29.8
SD		1.2	1.2	0.4

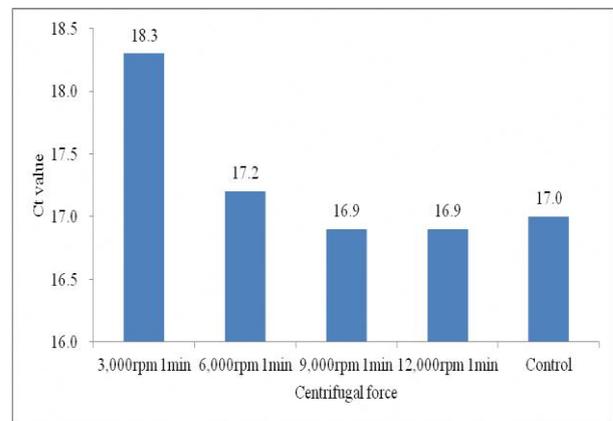


Fig. 5 The Effectiveness of washing steps at 3,000 rpm to 12,000 rpm

### 3.3 食中毒事例関連のヒト糞便及び市販鶏肉を用いた培養法と増菌後検出法の比較

#### 3.3.1 ヒト糞便

増菌後検出法で *C. jejuni* 陽性の 23 検体のうち、20 検体は培養法陽性となり、3 検体は陰性となった. *C. coli* の陽性の 7 検体全て培養法と一致した (Table 8) .

Table 8 Comparison of *Campylobacter* detection number of human feces by Real-Time PCR assay and Culture method

	<i>C. jejuni</i>	Real-Time PCR	
		Positive	Negative
Culture method	Positive	20	0
	Negative	3	30
	<i>C. coli</i>	Real-Time PCR	
		Positive	Negative
Culture method	Positive	7	0
	Negative	0	46

陽性検体の Ct 値は, *C. jejuni* で 19.9~43.5, *C. coli* で 16.7~24.8 となった (Table 9) . このうち *C. jejuni/coli* の遺伝子が両方検出されたものの Ct 値 (平均値) は, それぞれ 33.6, 19.5 であり, どちらか一方のみを検出したものの Ct 値 (平均値) 25.8, 18. に比べ高かった (Fig. 6) .

Table 9 A list of Ct value of Real-Time PCR assay for enriched Preston broth for human feces

Sample Name	Types of samples	qPCR		Culture method	
		<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>
CAMB2016-9	Human feces	30.3	No Ct	+	-
CAMB2016-12	Human feces	23.6	No Ct	+	-
CAMB2016-15	Human feces	31.2	No Ct	+	-
CAMB2016-16	Human feces	24.6	No Ct	+	-
CAMB2016-21	Human feces	26.7	No Ct	+	-
CAMB2016-39	Human feces	27.6	No Ct	+	-
CAMB2016-50	Human feces	No Ct	16.7	-	+
CAMB2016-104	Human feces	29.3	16.8	-	+
CAMB2016-106	Human feces	24.9	24.8	+	+
CAMB2016-107	Human feces	30.7	17.2	-	+
CAMB2016-110	Human feces	25.1	No Ct	+	-
CAMB2017-6	Human feces	23.4	No Ct	+	-
CAMB2017-45	Human feces	23.0	No Ct	+	-
CAMB2017-51	Human feces	19.9	No Ct	+	-
CAMB2017-52	Human feces	22.8	No Ct	+	-
CAMB2017-102	Human feces	21.7	No Ct	+	-
CAMB2017-103	Human feces	No Ct	19.7	-	+
CAMB2017-108	Human feces	43.5	18.8	-	+
CAMB2017-111	Human feces	40.0	20.0	+	+
CAMB2017-112	Human feces	31.1	No Ct	+	-
CAMB2017-115	Human feces	25.3	No Ct	+	-
CAMB2017-149	Human feces	30.4	No Ct	+	-
CAMB2017-150	Human feces	30.9	No Ct	+	-
CAMB2017-152	Human feces	20.8	No Ct	+	-
CAMB2017-161	Human feces	26.9	No Ct	+	-

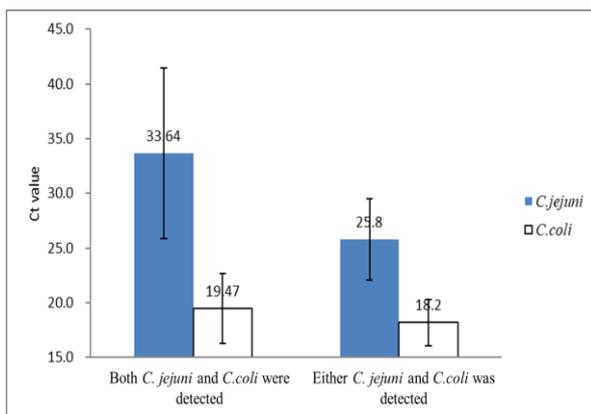


Fig. 6 Average of Ct value of both *C.jejuni* and *C.coli* positive fecal samples and either *C.jejuni* or *C.coli* positive ones

### 3.3.2 鶏肉

増菌後検出法で *C. jejuni* 陽性の 30 検体のうち, 26 検体は培養法陽性となった. *C. coli* の陽性の 9 検体のうち, 8 検体は培養法陽性となった (Table10) . 陽性検体の

Ct 値は, *C. jejuni* で 22.9~44.6, *C. coli* で 28.4~38.1 となった (Table 11) . このうち *C. jejuni/coli* の遺伝子が両方検出されたものの Ct 値 (平均値) は, 38.3, 33.9 であり, どちらか一方のみを検出したものの Ct 値 (平均値) は, 32.5, 34.9 であった. *C. jejuni* は, ヒト糞便と同様に両方検出されたものの Ct 値が, 高い傾向が見られた. しかし *C. coli* については, 明確な傾向はみられなかった (Fig. 7) .

Table 10 Comparison of *Campylobacter* detection number of chicken samples by Real-Time PCR assay and Culture method

Culture method	<i>C. jejuni</i>	Real-Time PCR	
		Positive	Negative
Positive		26	0
Negative		4	29

Culture method	<i>C. coli</i>	Real-Time PCR	
		Positive	Negative
Positive		8	0
Negative		1	50

Table 11 A list of Ct value of Real-Time PCR assay for chicken samples

Sample Name	Types of samples	qPCR		Culture method	
		<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>
CAMB2016-1	Liver	41.4	No Ct	+	-
CAMB2016-2	Gizzard	26.2	No Ct	+	-
CAMB2016-18	Liver	35.5	28.4	+	+
CAMB2016-19	Breast	37.2	No Ct	+	-
CAMB2016-22	Unknown(Chicken)	40.5	No Ct	+	-
CAMB2016-23	Unknown(Chicken)	24.0	No Ct	+	-
CAMB2016-24	Unknown(Chicken)	27.2	No Ct	+	-
CAMB2016-37	Liver	32.6	No Ct	+	-
CAMB2017-101	Breast	29.9	No Ct	+	-
CAMB2017-113	Liver	32.5	33.0	+	+
CAMB2017-114	Gizzard	28.0	No Ct	+	-
CAMB2017-116	Gizzard	24.0	No Ct	+	-
CAMB2017-117	Breast	33.1	No Ct	+	-
CAMB2017-120	Thigh	39.0	No Ct	+	-
CAMB2017-121	Breast	33.5	38.1	-	+
CAMB2017-123	Thigh	34.0	No Ct	+	-
CAMB2017-124	Breast	34.1	No Ct	+	-
CAMB2017-126	Breast	39.7	No Ct	-	-
CAMB2017-127	Breast	35.6	No Ct	+	-
CAMB2017-129	Breast	23.4	No Ct	+	-
CAMB2017-131	Minced chicken	33.6	33.9	+	+
CAMB2017-133	Liver	44.3	37.4	+	-
CAMB2017-134	Minced chicken	40.0	31.0	+	+
CAMB2017-135	Breast	42.8	33.5	-	+
CAMB2017-136	Thigh	44.6	36.0	+	+
CAMB2017-137	Thigh	33.9	No Ct	+	-
CAMB2017-138	Gizzard	No Ct	34.9	-	+
CAMB2017-139	Liver	29.1	No Ct	+	-
CAMB2017-142	Minced chicken	38.4	No Ct	+	-
CAMB2017-151	Liver	22.9	No Ct	+	-
CAMB2017-160	Liver	42.0	No Ct	+	-

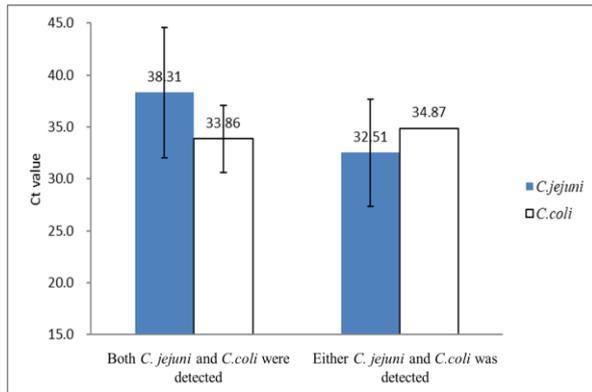


Fig. 7 Average of Ct values of both *C.jejuni* and *C.coli* positive chicken samples and either *C.jejuni* or *C.coli* positive ones

#### 4 考察

qPCR を用いた *Campylobacter* の検査法の検討は報告されており<sup>8)~12)</sup>, 各メーカーより販売されている qPCR 用プレミックス試薬が用いられている。しかし, 本法で用いたプレミックス試薬は, 従来 10 分必要であった初期変性や, 増幅サイクルの変性, アニーリングステップが短縮されており, 従来の qPCR 法よりも迅速な検出が可能であった。また, インターナルコントロール検出用のプライマー及びプローブを加えることで, 反応阻害の確認やテンプレート DNA の入れ忘れ等を防止でき, より信頼性の高い検査が可能であると考えられた。

qPCR 法の特異性について確認を行ったところ, 当所で検査を行っている主要な食中毒菌に反応せず, *C. jejuni/coli* を特異的に検出できることが確認され (Table 2), 培養法で分離した菌の同定が可能となった。一般的に *Campylobacter* の同定はグラム染色, カタラーゼ試験, オキシダーゼ試験に加え酢酸インドキシル加水分解試験や馬尿酸塩加水分解試験が用いられるが, 馬尿酸塩加水分解試験において, 馬尿酸塩を分解しない *C. jejuni* が報告されているほか, 検査手技によっては偽陽性となることが知られている<sup>15) 16)</sup>。本法では *C. jejuni* の検出を目的として, 馬尿酸塩加水分解酵素をコードする遺伝子である *hipO* をターゲットとしており, 上記のような菌株の誤同定を防ぐことが可能であると考えられた。

また, qPCR 法の定量下限値について確認を行ったところ, 1 ウェルあたり 10 コピー又は 1cfu となり, これは増菌後検出法における増菌液 1mL あたり  $10^3$  コピー又は  $10^2$  cfu となった。増菌培養液から培養法により *C. jejuni/coli* を検出するためには, 増菌液中に  $10^2$  cfu/mL 以上の菌が必要であるため, 検出感度は培養法と同等又はそれ以上であると考えられた。

ヒト糞便から直接 *Campylobacter* の検出を行うために,

効率的に遺伝子を抽出する方法を, 4 種類の市販抽出キットで比較検討した。ヒト糞便は, 遺伝子検査を行う上で夾雑物が多く, また遺伝子増幅阻害物質の含有を考慮する必要がある。その中で SPIN Kit が最も Ct 値が低く, 精製キットの有無にかかわらず高い精製が得られることが判明し, 培養法とも一致したことから食中毒の患者便からの検出も可能であることが示唆された。

次にヒト糞便, 鶏肉の増菌後検出法と培養法の比較を行ったところ, 培養法で *Campylobacter* 陽性となった検体は, ヒト糞便及び鶏肉増菌液を試料とした qPCR 法においてすべて陽性となった。一方, ヒト糞便では 25 検体中 3 検体 (12.0%), 鶏肉 31 検体 5 検体 (16.1%) は培養法陰性, qPCR 法陽性となり培養法と qPCR 法の結果が一致しなかった。このうち *C. jejuni/coli* 両方の遺伝子を検出してもどちらか一方しか分離されない検体が鶏肉, 糞便それぞれ 3 検体あった。このような培養検査との不一致がおこる原因の 1 つに, 培地の選択性等による *Campylobacter* の発育阻害により, *C. jejuni/coli* の一方又は両方がプレストン培地で発育しても, 他方又は両方が分離培地である mCCDA 培地やバツラー培地に発育できなかったことが考えられ, 同様の事例が他の自治体で報告されている<sup>17)~19)</sup>。標準試験法で用いられているプレストン培地に含まれる選択剤は, *C. coli* の発育を阻害することが報告されており<sup>20)</sup>, mCCDA 培地では *P. aeruginosa* 等の培地表面を遊走する菌や<sup>21)</sup>, 基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の発育による *Campylobacter* 検出率の低下が問題となっている<sup>22)~25)</sup>。他にも冷凍検体の検査では, プレストン培地よりもボルトン培地の検出率が高くなることが報告されている<sup>20)</sup>。このように, 標準試験法の第一選択培地だけでなく, 検体によって適した増菌培地及び選択培地を使用する必要があり, 今回検討した方法によりスクリーニングを行い, 培養法の結果と比較し必要に応じて使用する培地を追加することで, 培養法の検出率向上に寄与すると考えられる。

また, qPCR 法で得られたヒト糞便及び鶏肉を合わせた Ct 値の平均は, *C. jejuni* 又は *C. coli* の遺伝子が検出された検体において *C. jejuni* は 31.3, *C. coli* は 27.5 であった。しかし, *C. jejuni/coli* 両方の遺伝子が検出された場合は, *C. jejuni* で 36.6, *C. coli* で 28.4 と高くなり, Ct 値が 40 を超えるものも散見された。これは反応試薬中に両方の遺伝子が存在することで, 一方の鋳型 DNA が優先的に反応し, dNTP 等の試薬を消費することで Ct 値が大きくなると考えられた。一般的に Ct 値が 40 を超えるものは偽陽性の可能性があると考えられるが, 本法においては Ct 値が 41~44 の検体で培養法陽性となったため, 45 サイクルまでに Ct 値が得られたものを陽性と判断する必要があることが示された。また, 実際の食中毒検査に

において *C. jejuni/coli* の両方に感染していると疑われる場合は, *C. jejuni/coli* の単味プライマー及びプローブを使用しシングルプレックスで実施することでより正確に *Campylobacter* 遺伝子を検出できると考えられた。

一般的に, 細菌性食中毒発生時の行政処分は, 培養法による原因菌の分離が必要である。今回検討した両法は共に培養法に代わる検査法であることが示唆された。しかし, 抗生剤の投与や採取後のヒト糞便の保存状態によっては, 遺伝子が検出されても培養法陰性となる可能性があり, 遺伝子検査結果のみを持って行政処分を行うことは難しいと考える。ただし増菌後検出法で陰性の検体は, 培養法による確認検査の必要性は低く, 培養を行う前のスクリーニングを目的とした検査として有用であることが示された。

## 謝辞

本研究を行うにあたり, 菌株を分与していただきました宮崎大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学講座に御礼申し上げます。

## 文献

- 1) 三澤尚明:カンピロバクター感染症, モダンメディア, 51, 3, 2005
- 2) Stern N J and M C Robach: Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses, J. Food Prot. 66: 1557-1563, 2003.
- 3) 小野一晃:カンピロバクター, モダンメディア, 54, 5, 2008
- 4) 小田隆弘, 他:二段階増菌法とイムノクロマト法キット“シカイムノテストカンピロバクターII”を併用した鶏肉類からの *Campylobacter jejuni/coli* の簡易迅速検出法の有効性の検討, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 2, 124-132, 2012
- 5) 四良丸幸, 他: *Campylobacter* (cdt gene) PCR Detection and Typing Kit による市販鶏肉からのカンピロバクター属菌の検出, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 4, 197-207, 2012
- 6) KlenaJD, : Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the Lipid A Gene lpxA, Journal of Clinical Microbiology, 42,12,5549-57,2004
- 7) 古畑勝則, 他: LAMP 法及び培養法による市販鶏肉からのカンピロバクター検出法, 日本食品微生物学会雑誌, 23, 4, 237-241, 2006
- 8) 小野一晃:異なる3種類の遺伝子検査法を用いた食中毒患者便からのカンピロバクター迅速検査法の検討, 日本獣医師会雑誌, 66, 483~487, 2013
- 9) 久保垂希子, 他:カンピロバクター属菌種判定を目的とした multiplex real-time PCR 法の検討, 北海道立衛生研究所報, 62, 77-79, 2012
- 10) 伊達佳美, 他:リアルタイム PCR 法を用いた *Campylobacter jejuni* と *C. coli* 検出のための選択増菌培地の評価, 日本食品微生物学会雑誌, 28, 3, 186-192, 2011
- 11) 樋脇弘, 他:Light Upon eXtension Fluorogenic Primer を使ったリアルタイム PCR 法による食品増菌液からの *Campylobacter jejuni/coli* の検出, 日本食品微生物学会雑誌, 26, 2, 120-126, 2009
- 12) Leblanc-Maridor M et al. : Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples, BMC Microbiology,22,11,113,2011
- 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長:腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について, 平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 1 号, 2010
- 14) Nele Wellingshausen et al. : Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR, Applied and Environmental Microbiology,67,9,3985-3993,2001
- 15) 伊藤武:カンピロバクターの検査法について, 環境衛生と微生物検査の葉「es」, 47, 2009
- 16) 藤岡美幸, 他: *Campylobacter jejuni* と *C. coli* を同定する馬尿酸塩加水分解試験に用いる至適菌濃度, 医学検査, 63, 2, 2014
- 17) 小野一晃, 他:カンピロバクター食中毒における患者便及び食品からの分離菌株の型別, 日本食品微生物学会雑誌, 21, 2, 151-155, 2004
- 18) 川瀬遵, 他:リアルタイム PCR 法を利用した *C. jejuni* と *C. coli* の混合感染事例の検討, 島根保環研所報, 52, 2010
- 19) 高橋恵美, 他:食中毒検査から分離されたカンピロバクター菌株の解析結果, 宮城県保健環境センター年報, 27, 2009
- 20) 伊達佳美, 他:凍結鶏肉からのカンピロバクター検出のための選択培地に関する検討, 神奈川県衛生研究所研究報告, 39, 2009
- 21) 渋谷亮:カンピロバクターの検査—mCCDA 培地について—環境衛生と微生物検査の葉「es」, 49, 2010
- 22) 百瀬愛佳:食品のカンピロバクター標準試験法, 日本食品微生物学会雑誌, 30, 2,, 93-97, 2013

- 23) Egea P et al. : Increased raw poultry colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain, *Int. J. Food Microbiol.*, 159, 69–73, 2012
- 24) Nadine Geser et al. : Occurrence and characteristics of extended-spectrum-lactamase (ESBL) producing enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk, *BMC Vet. Res.*,8,21–29,2012
- 25) Hiroi M et al. : revalence of extended-spectrum-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals, *J. Vet. Med. Sci.*, 74, 189–195, 2012

#### 要約

ヒト糞便から *C. jejuni* 及び *C. coli* 遺伝子の直接検出と、ヒト糞便と鶏肉を増菌培地で培養した菌液からの検出を目的として、マルチプレックスリアルタイム PCR 法を開発した。ヒト糞便中及び増菌液の DNA をそれぞれ市販抽出キット及びアルカリ熱抽出法を用いて抽出した。qPCR のプライマー及びプローブは、*C. jejuni* の *hipO* 遺伝子と *C. coli* の *glyA* 遺伝子をターゲットに、それぞれ特異的に検出できるように設計を行った。さらに、PCR 阻害確認を目的として 1 対のプライマー及びプローブを用いた。ヒト糞便 11 検体及び増菌培地 112 検体を用いて、qPCR 法と培養法の比較を行った結果、qPCR 法陽性、培養法陰性となった検体がいくつか確認されたものの、培養法陽性となった検体はすべて qPCR 法陽性となったことから、本法はヒト糞便及び鶏肉の *C. jejuni/coli* スクリーニング検査法として有用であることが示された。