

# リアルタイム PCR 法及びイムノクロマト法による鶏糞を用いた *Campylobacter jejuni/coli* のスクリーニング法の検討

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

## Screening of *Campylobacter jejuni/coli* in fowl droppings by real-time PCR and immunochromatography

Naoto TAKAHASHI, Maika KOGA, Norihisa MATSUNAGA  
and Hiroyuki MARUYAMA

Health Science Section, Fukuoka City Institute for Health and the Environment

### 要約

食中毒に関連した養鶏場における *Campylobacter jejuni/coli* 汚染状況調査を想定し、リアルタイム PCR 法とイムノクロマト法について検討を行った。市販精製キットを用いて抽出液を精製した結果、やや DNA 収量の低下がみられたが精製度の向上がみられた。抽出液、精製液を 2 倍希釈した精製希釈液及び増菌培養した増菌液を抽出後リアルタイム PCR に供し、増菌培養法と比較したところ、抽出液は多くの検体でリアルタイム PCR 反応阻害が確認されたが、精製希釈液は培養法と近い結果となり、増菌培養液は培養法の結果と完全に一致した。さらに、*Campylobacter jejuni/coli* 陰性の鶏糞を用い、ブロッキング剤を使用せずにイムノクロマト法による測定を行うといずれも擬陽性となったが、ブロッキング剤を加える処理を行うと、いずれも陰性となった。*Campylobacter jejuni/coli* 陰性の鶏糞に *C. jejuni* を添加してイムノクロマト法による測定を行った結果、検出限界は  $10^8$ /cfu であった。以上のことから、鶏糞を用いたカンピロバクタースクリーニング検査法は、目的に合わせて直接検出法と増菌後検出法、又はその両方を行うことで、養鶏場のカンピロバクターの汚染状況を迅速に把握できると考えられた。

**Key Words** : カンピロバクター *Campylobacter* , 鶏糞 fowl droppings, リアルタイム PCR Real-Time PCR, イムノクロマト法 immunochromatography , 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であり、人が本菌に汚染された加熱不十分の鶏肉等を喫食することにより発症することが知られている。鶏肉が *C. jejuni/coli* に汚染される原因は様々なものが考えられるが、養鶏場に持ち込まれた *C. jejuni/coli* が鶏の消化管内に定着し、食鳥処理場で消化管内容物によって鶏肉や食鳥処理場を汚染することが原因の 1 つであるとされている<sup>1)</sup>。

カンピロバクター食中毒は福岡市内における細菌性食中毒の大半を占めており、食中毒発生源の特定や再発防止などの観点から、養鶏場における汚染状況調査が行われる可能性がある。保菌鶏の糞からは 1 g あたり  $10^5$  個以上の菌が検出されるため<sup>2)</sup>、保菌鶏か否かを判断するためには、糞の検査が有用である。鶏糞の DNA 抽出法はビーズを用いた抽出法が報告されているが<sup>3)</sup>、種々の抽出キットも市販されている。*C. jejuni/coli* の有無をリアルタイム PCR (以下 qPCR) を用いて迅速に検査することを目的として遺伝子抽出法などの検討を行った。

また、イムノクロマト法は遺伝子検査法に比べ特異性や検出限界が劣るものの、高価な機器を必要とせず養鶏場現場でも使用できる。*C. jejuni/coli* のイムノクロマト法による抗原検査キットとして、NH イムノクロマトカンピロバクター（日本ハム研究所）やシングルパス・カンピロバクター（メルク）が販売されている。鶏糞中のカンピロバクター抗原を直接検出するには鶏糞の前処理が必要であり、以前は糞便処理キット「ポタット」（日本ハム研究所）が販売されていたが、平成 29 年をもって販売中止となった。タンパク質の解析法であるウェスタンブロッティングでは、ブロッキング剤として BSA やスキムミルクでメンブレンを処理しており、イムノクロマト法でも非特異的反応の抑制として有効であることが報告されている<sup>4)</sup>。そこで、糞便処理キット「ポタット」に代わる前処理法として、tween20 及びスキムミルクによる前処理を検討し、qPCR 法との比較を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 qPCR 法を用いた鶏糞からの遺伝子検出法

#### 2.1.1 直接検出法（鶏糞からの直接検出）

試料は平成 29 年度に福岡市内の養鶏場 1 か所で採取した鶏糞 35 検体を用いた。FastDNA SPIN Kit for Soil (MP バイオ)（以下 SPIN Kit）を用いて、添付のプロトコルに従い DNA 抽出物（以下抽出液）を得た。抽出液を OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (ZymoResearch) を用いて、DNA 精製物（以下精製液）を得た。35 検体のうち 20 検体の抽出液及び精製液は NanoDrop1000(Thermo Fisher Scientific)を用いて 260/280 nm 吸光度比を測定し、DNA 濃度及び精製度を確認した。次に、抽出液及び精製液を 2 倍希釈したもの（以下精製希釈液）をテンプレートとし、表 1 のとおり PCR 反応液を調製した。使用したプライマープローブの配列は表 2 のとおり。QuantStudio 5 (Applied Biosystems) で表 3 のとおり qPCR 反応を行い、Ct 値が得られたものを陽性とした。

表 1 qPCR 反応液の組成

	液量(μL)
Premix Ex Taq(Perfect Real Time)	12.5
DW	3.2
25×Primer Mix(終濃度0.2μM)	1
<i>C. jejuni</i> 検出用MGB Probe	0.6
<i>C. coli</i> 検出用MGB Probe	0.6
IC検出用人工合成遺伝子	1
IC検出用Probe	0.6
ROX Reference Dye II	0.5
テンプレート	5
合計	25

表 2 使用したプライマープローブの配列

標的	名称	配列(5'-3')	文献
<i>C. jejuni</i>	hipO-F	AAAATAGGACTTCGTGCAGATATGG	当所で設計
	hipO-R	ACCGCAAGCATGCATTACATT	
	hipO-P	VIC-TTGCAAGAATGCACAAAT-MGB	
<i>C. coli</i>	glyA-F	TTTGCAGACATTGCACACATTG	当所で設計
	glyA-R	TGAGGAAATGGACTTGGATGCT	
	glyA-P	FAM-TGGACTTGTGTAGCAGGT-MGB	
Internal Control	JFP-F	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC	5)
	JFP-R	CCAACAGCTAGTTGACATCG	
	LAMFL	Cy5-GGTGCCGTTCACTTCCCGAATAAC-BHQ3	

表 3 qPCR 反応条件

ステップ	温度条件
初期変性	95°C 30 秒
PCR 反応 45 サイクル	95°C 5 秒
	60°C 20 秒

#### 2.1.2 増菌後検出法（鶏糞増菌液からの検出）

鶏糞 5 g にプットカンピロ/プレストン（日研生物医学研究所）（以下プレストン培地）25 g を加え混和したものを 10 mL 分取し、90 mL のプレストン培地で希釈後、アネロバック微好気（スギヤマゲン）を用いて 42 °C 24 時間微好気培養し、増菌培養した培養液（以下増菌液）を得た。増菌液 100 μL を分取し、腸管出血性大腸菌検査法<sup>6)</sup>のアルカリ熱抽出法に従い DNA 抽出後、qPCR で Ct 値が得られたものを陽性とした。

### 2.2 培養法

増菌液をバツラー培地及び mCCDA 培地に塗抹し、得られたコロニーを常法に従って同定した。

### 2.3 イムノクロマト法を用いた鶏糞からのカンピロバクター抗原検出

鶏糞 1 g に PBS 9 mL を加え、1 分間ボルテックスし 100°C 10 分加熱後、800×g で 1 分間遠心分離し、沈渣を吸い込まないように上清を回収した。上清にブロッキング剤として 10% Tween20 及び 10 %スキムミルクを、それぞれ最終濃度 1 %と 0.5 %になるよう加え、軽くボルテックスし 5 分間室温で静置した後、サンプル 100 μL を NH イムノクロマトカンピロバクターで測定した。テストラインとコントロールライン両方にバンドが生じたものを陽性とし、コントロールラインのみにバンドが生じたものを陰性とした。

## 3 結果

### 3.1 qPCR 法を用いた鶏糞からの遺伝子検出法及び培養法

抽出液と精製液の DNA 量及び 260/280 nm 吸光度比を表 4 に示す。DNA 濃度の平均は抽出液が 170 ng/mL, 精製液が 117 ng/mL であり, やや DNA 収量の低下がみられたが, 吸光度比は抽出液の平均値は 1.3, 精製液の平均値は 1.8 となり精製度の向上がみられた。

抽出液, 精製希釈液, 増菌液の qPCR 結果と培養法結果を表 5 に示す。精製前では, 多くの検体において qPCR 反応阻害が確認されたことに対し, 精製希釈液を用いた場合は培養法と近い結果となった。増菌後検出法の qPCR 結果は培養法の結果と完全に一致した。

表 4 抽出液と精製液の DNA 濃度及び 260/280nm 吸光度比

	抽出液		精製液	
	DNA濃度 (ng/mL)	260/280 吸光度比	DNA濃度 (ng/mL)	260/280 吸光度比
1	144	1.3	93.7	1.7
2	182	1.5	166	1.8
3	200	1.3	144	1.8
4	139	1.2	94.5	1.8
5	186	1.3	95.9	1.8
6	167	1.1	88.9	1.8
7	132	1.1	63.8	1.8
8	96.7	1	54.1	1.8
9	99.5	1.1	71.1	1.8
10	130	1	83.9	1.7
11	109	1	62.7	1.7
12	146	1.3	87.5	1.8
13	167	1.3	94.8	1.9
14	210	1.6	143	1.9
15	298	1.6	187	1.8
16	220	1.6	153	1.8
17	138	1.6	97.6	1.8
18	142	1.8	174	1.8
19	334	1.9	244	1.9
20	152	1.2	143	1.9
Av.	170	1.3	117	1.8
SD	60.8	0.3	49.8	0.1

表 5 DNA 抽出法別 qPCR 法と培養法との比較

陽性数/ 検体数	遺伝子検査法			培養法
	直接検出法		増菌後 検出法	
	抽出液	精製 希釈液	増菌液	
	4/34	22/34	24/34	24/34

### 3.2 イムノクロマト法を用いた鶏糞からのカンピロバクター抗原検出法

*C. jejuni/coli* 陰性の鶏糞を用い, 2 併行でブロッキング剤を使用せずに測定を行った結果, いずれも擬陽性とな

った。そこで, 同じ検体を用いブロッキング剤を加えた処理を行った結果, いずれも陰性となった (表 6)。

また, *C. jejuni/coli* 陰性の鶏糞に標準株 *C. jejuni* ATCC 294298 株を  $10^7$ /cfu 及び  $10^8$ /cfu となるように添加して 2 併行で測定を行った結果,  $10^7$ /cfu の試料はいずれも陰性となったが,  $10^8$ /cfu の試料はいずれも陽性となった (表 7)。

表 6 *C. jejuni* 陰性鶏糞を用いたイムノクロマトカンピロバクターでの測定結果

	ブロッキング剤なし	ブロッキング剤あり
陽性数/ 測定回数	2/2	0/2

表 7 *C. jejuni* 添加鶏糞を用いたイムノクロマトカンピロバクター検出限界の確認

鶏糞 1g あたりの 菌数 (cfu/g)	イムノクロマト カンピロバクター測定結果
$10^7$	—
$10^8$	+

## 4 考察

qPCR を用いたカンピロバクター遺伝子検出における鶏糞からの DNA 抽出法の検討を行った。直接検出法において, 食中毒発生時に使用している SPIN Kit の単体使用は阻害物質が残存することから鶏糞を用いたカンピロバクターの DNA 抽出法としては不十分であり, 追加で精製, 希釈が必要であった。精製希釈液をプレートとした場合, 培養法に近い結果が得られたことから, 迅速なスクリーニング法として有用であることが示された。増菌後検出法は 24 時間の増菌培養が必要となるものの, 培養法と検査結果が完全に一致したため, 直接検出法よりも正確なカンピロバクタースクリーニングが可能であった。

イムノクロマト法の前処理法として tween20 とスキムミルクをブロッキング剤として添加することで, 糞便成分による偽陽性を減らすことができた。本法の検出下限はキット取扱説明書と変わらず  $10^8$ /cfu となり, ブロッキング剤を加えたことによる感度の低下は確認されなかったが, 検出下限値が高くスクリーニング検査法として不十分であった。

以上のことから, 鶏糞を用いたカンピロバクタースクリーニング検査法は, 目的に合わせて直接検出法と増菌後検出法, 又はその両方を行うことで, 養鶏場のカンピロバクターの汚染状況を迅速に把握できると考えられた。

文献

- 1) 三澤尚明: 食鳥処理場におけるカンピロバクター制御法の現状と課題, 日本獣医師会雑誌, 65, 617-623, 2012
- 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) Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-Time PCR
- 4) 富永達矢, 常見崇史, 関根正裕: 安全・安心な食品製造工程の管理技術の確立, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 11, 2013
- 5) Nele Wellinghausen et al.: Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR, Applied and Environmental Microbiology, 67, 9, 3985-3993, 2001
- 6) 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