

検便輸送培地からのリアルタイム PCR 法による *Campylobacter jejuni/coli* 迅速検出法の検討

中野朝美・古賀舞香・田上紗弥加・光安志織・松永典久

福岡市保健環境研究所保健科学課

Investigation of the Rapid Detection Method of *Campylobacter jejuni/coli* from Transport Medium by Real-Time PCR

Asami NAKANO, Maika KOGA, Sayaka TANOUE, Shiori MITSUYASU
and Norihisa MATSUNAGA

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市保健環境研究所では、増菌培地からのリアルタイム PCR 法による迅速検査法を開発し、食中毒検査に要する日数を短縮してきた。本研究では、より速やかに結果を取得し、食中毒調査の方針決定に資する情報を得ることを目的として、ヒト糞便を浸出した検便輸送培地からのリアルタイム PCR 法による *Campylobacter jejuni/coli* 迅速検出法の検討を行った。ヒト糞便を浸出した検便輸送培地及びこの検便輸送培地をプレストン培地に接種し増菌培養した後の増菌培地から遺伝子抽出を行い、リアルタイム PCR 法で検査したところ、前者が陰性 (*C. jejuni/coli* の遺伝子不検出) の場合は後者も全て陰性となり、偽陰性はなかった。このことから、検便輸送培地からのリアルタイム PCR 法による *C. jejuni/coli* 迅速検出法によって、より速やかに食中毒調査の方針決定に資する情報を得ることが可能であると示された。

Key Words: カンピロバクター属 *Campylobacter*, 輸送培地 Transport medium, リアルタイム PCR Real-Time PCR

1 はじめに

福岡市では食中毒疑い事例が発生した場合、スワブを用いて調査対象者の直腸をぬぐい、便を採取する。そして、直腸をぬぐったスワブは、アミーズ液体培地（以下、「輸送培地」とする。）を含む輸送容器に保存後、速やかに福岡市保健環境研究所に搬入されることになっている。

食中毒疑い事例の発生時には、迅速かつ正確な検査が感染拡大の防止に大きく寄与するが、細菌検査は培養検査が主となるため、通常、細菌の分離・同定に 2～5 日を要している。そのため当所では、*C. jejuni/coli*, サルモネラ属菌及び腸管出血性大腸菌が原因として疑われる事例においては、直接培養及び増菌培養後に平板培地に塗抹培養する方法（以下、「培養法」とする。）と並行して、ヒト糞便を浸出した輸送培地を増菌培地

に接種して増菌培養後に遺伝子抽出を行い、リアルタイム PCR（以下、「qPCR」とする。）法を用いて目的遺伝子の検出を行う方法（以下、「増菌後検出法」とする。）により、速やかに原因菌を推定できるよう努めている。

しかし、増菌後検出法では、既報^{1, 2)} 及び通知³⁾ を参考に、各菌に対応する増菌培地を用いて 24 時間培養した後、アルカリ熱抽出法で遺伝子抽出を行い、その遺伝子を qPCR 法で検査して結果を得るため、結果判明までに検体搬入後 24 時間以上を要していた。

本研究では、増菌後検出法より速やかに *C. jejuni/coli* の遺伝子を検出し、食中毒調査の方針決定に資する情報を得ることを目的として、細菌性食中毒の中で最も発生件数が多い *C. jejuni/coli* を対象に、検便輸送培地からの qPCR 法による *C. jejuni/coli* 迅速検出法（以下、「輸送培地検出法」とする。）の検討を行った。

2 実験方法

試料には、平成31年度から令和3年度までに福岡市で発生した、カンピロバクター食中毒事例関連で採取された143検体を用いた。

増菌後検出法では、ヒト糞便を浸出した輸送培地をボルテックスミキサーで混和後、プレストン培地（ブチットーカンピロ（日研生物医学研究所））10 mLに接種し、42°Cで24時間微好気培養した増菌液100 µLを試料として、アルカリ熱抽出法（13,000×gで5分遠心し、上清除去後、沈渣に50 mM NaOH 85 µLを添加し、100°Cで10分加熱処理。その後、1 M Tris-HCl (pH7.0)（ニッポンジーン）15 µLを加えて中和し、さらに13,000×gで5分遠心。）で遺伝子抽出し、qPCRを行い、Ct値が得られたものを陽性とした。

輸送培地検出法では、ヒト糞便を浸出した輸送培地をボルテックスミキサーで混和後、500 µL分取し、分取した試料からアルカリ熱抽出法で遺伝子抽出し、qPCRを行い、Ct値が得られたものを陽性とした。

なお、増菌後検出法及び輸送培地検出法のqPCR法に用いた試薬には、Premix Ex Taq (Perfect Real Time)（タカラバイオ）を用い、終濃度0.2 µMプライマー、0.2 µMプローブとなるよう混合し、5 µLの鋳型遺伝子（テンプレート）を加えて計25 µLの反応系とした。qPCRに使用したプライマー及びプローブの配列、qPCR反応液の組成、qPCR反応条件は表1～3のとおりで、qPCR装置にはQuantStudio® 5 (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

表1 使用したプライマー及びプローブの配列

標的	名称	配列 (5'-3')	文献
<i>C. jejuni</i>	hipO-F	CTGCGGTCATGCTGGACATAC	4)
	hipO-R	AGCACCAACCAACCCTCTTCA	
	hipO-P	VIC-ATTGCTTGCTGCAAAAGT-MGB	
<i>C. coli</i>	glyA-F	AAACCAAAGCTTATCGTGTGC	4)
	glyA-R	AGTGACAGCAATGTGTGCAATG	
	glyA-P	FAM-CAACTTCATCCGCAAT-MGB	

表2 qPCR反応液の組成

	液量 (µL)
Premix Ex Taq (Perfect Real Time)	12.5
滅菌水	4.8
25×Primer mix	1
<i>C. jejuni</i> 検出用MGB Probe	0.6
<i>C. coli</i> 検出用MGB Probe	0.6
ROX Reference Dye II	0.5
テンプレート	5
合計	25

表3 qPCR反応条件

ステップ	温度条件
初期変性	95°C30秒
PCR反応 45サイクル	95°C5秒
	60°C20秒

3 実験結果

輸送培地検出法及び増菌後検出法の結果を表4に示す。輸送培地検出法で陰性となった55検体は、増菌後検出法でも全て陰性となった。輸送培地検出法で陽性となった69検体のうち、54検体は増菌後検出法でも陽性となったが、残り15検体は増菌後検出法では陰性となった。

なお、通常の食中毒検査と並行して実験を行ったため、増菌後検出法実施前に直接培養でコロニーが得られた場合には、増菌後検出法を行わなかった。

表4 輸送培地検出法と増菌後検出法の比較

	増菌後検出法 (検体数)	
	陽性	陰性
輸送培地 検出法 (検体数)	陽性 54 陰性 0	15 55

4 考察

本研究では、増菌後検出法より速やかに*C. jejuni/coli*の遺伝子を検出し、食中毒調査の方針決定に資する情報を得ることを目的として、輸送培地検出法の検討を行った。

ヒト糞便を対象として、輸送培地検出法と増菌後検出法の結果を比較したところ、輸送培地検出法で陰性の検体は、増菌後検出法でも全て陰性となったが、輸送培地検出法で陽性の検体には、増菌後検出法で陰性となるものも含まれており、これは主にVBNC (Viable But Non Culturable) 状態又は死菌のいずれかの理由によるものではないかと推察された。

食中毒発生時において、増菌後検出法では検体搬入翌日に*C. jejuni/coli*の遺伝子の有無を判定するが、輸送培地検出法では、輸送培地から直接遺伝子抽出を行い、検体搬入後約2時間で結果を得られるため、より

迅速に食中毒調査の方向性に関する情報を得ることが可能であることが示された。

また、輸送培地検出法で *C. jejuni/coli* 両方の遺伝子を検出し、増菌後検出法では *C. jejuni* の遺伝子のみを検出した検体が2検体あった。これは、*C. coli* がプレストン培地に含まれる抗生物質に対して感受性を有すると報告されている^{5, 6)}ことから、プレストン培地では増殖できなかった可能性があると考えられた。*C. jejuni/coli* の増菌培地としては、プレストン培地とボルトン培地が広く用いられるが、糞便等の夾雑菌が多い検体には、ボルトン培地より選択性が高いプレストン培地を用いることが多い。また、食中毒発生時に持ち込まれる検食等の検体は冷凍保存されていることが多く、菌の損傷が想定されるが、重度の損傷が想定される検体から *C. jejuni/coli* を検出するためには、損傷からの回復を考慮した培地の使用が必要といわれている⁷⁾。輸送培地検出法では、培地等の影響を受けず、採取した便中の *C. jejuni/coli* の菌種を正確に把握できるため、輸送培地検出法の結果に基づいた培地選択により、培養法による目的菌種の検出率向上が期待できると示唆された。

今後も検討を続け、より迅速かつ詳らかな検査法の確立を目指し、これまで以上に保健所を始めとする行政部署の食中毒疑い事例への迅速な対応の一端を担っていきたい。

文献

- 1) 高橋直人, 他: 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, 福岡市保健環境研究所報, 43, 43~51, 2018
- 2) 古賀舞香, 他: SYBR Green real-time PCR 法を用いた食品中のサルモネラ属菌スクリーニング法の検討, 福岡市保健環境研究所報, 42, 96~99, 2017
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 食安監発 1120 第 1 号: 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
- 4) Mily Leblanc-Maridor 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, 11, 113, 2011
- 5) 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, 4~7, 2009
- 6) 下島優香子, 他: 食肉中のカンピロバクター検出法の検討, 東京都健康安全研究センター研究年報, 61, 227~231, 2010
- 7) 岩田剛敏: 畜産物におけるカンピロバクター損傷菌の発生と対策, 日本食品科学工学会誌, 65 (5), 270~274, 2018