

令和元年度・衛生研究所研究費事業報告

Campylobacter 属菌の検査法の検討

(計画年度：令和元年度)

研究代表者

食品微生物担当

瀬川由加里*1

共同研究者

食品微生物担当

榊田希 中川佳子*2 佐藤実佳 土井りえ 島田慎一

副所長兼食品微生物検査室長

石井里枝

はじめに

カンピロバクター属菌の中で、*Campylobacter jejuni/coli* (以下、*jejuni/coli*) は食中毒の原因菌に指定されており、近年は細菌性食中毒の中で最も発生数が多い。そのため、食中毒発生時には *jejuni/coli* の検出を目的とした検査を実施することが多く、当所でもこの2菌種の検出を目的とした検査を実施している。しかし、この2菌種以外のカンピロバクター属菌にも、人に対する病原性を持ち、家畜、家きん及び野生鳥獣が保有する菌種がある。また、カンピロバクター属菌に類似するアルコバクター属菌は好気性のらせん状桿菌で、その中でも *Arcobacter butzleri* は人の下痢症に関連し、食肉からの検出報告があることから食中毒の原因菌となる可能性がある。

当所で現在実施しているリアルタイム PCR (以下、rPCR) を用いた遺伝子一斉スクリーニング検査や分離培養法ではこれらの菌を検出できないため、食中毒発生時の検査に応用する目的で、カンピロバクター属菌及び *Arcobacter butzleri* の rPCR を用いたスクリーニング法と分離培養法の実用的検討を行ったので報告する。

材料及び方法

1 rPCR によるカンピロバクター属菌及び *Arcobacter butzleri* の検出

rPCR は Lund, McGoldrick, Boer らの既報告のプライマーを用い、*Campylobacter fetus* (以下、Cf) 以外のカンピロバクター属菌、Cf 及び *Arcobacter butzleri* の3系統をインターカレーター法で実施した。検出感度試験はカンピロバクター属菌5菌種 (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, Cf) 及び *Arcobacter butzleri* を、特異性

試験は前述の6菌種及び腸内細菌を中心とした10菌種を用いて実施した。

2 便への菌添加試験

(1) 菌添加便の DNA 抽出物における rPCR の検出感度試験
便 (食中毒細菌陰性を確認済) 2検体に各濃度の菌液 (表1) を添加し、QIAamp FAST DNA stool mini kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。rPCR は1の方法で実施した。

(2) 培養法の検出感度試験

便は5%馬脱繊維血加プレストン培地 (選択剤無添加) を用いて10%乳剤とし、これに各濃度の菌液 (表1) を添加した。各添加菌濃度あたり3枚のコロンビア血液寒天培地上に、アイソポアメンブレンフィルター0.6 μm (メルク) を静置し、菌添加乳剤200 μL を滴下した。室温で30分放置後にフィルターを除き、カンピロバクター属菌は37°Cで微好気培養、*Arcobacter butzleri* は30°Cで好気培養した。

3 食中毒事例への適用

当所に搬入された食中毒疑い11事例の便34検体について、3系統の rPCR を1の方法で実施した。11事例中5事例は培養検査で *Campylobacter jejuni* が陽性、1事例は *Campylobacter coli* が陽性、5事例は食中毒細菌陰性であった。

表1 便添加菌量

菌種	rPCR (CFU/g)	培養法 (CFU/g)
<i>Campylobacter jejuni</i>	$5.6 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^7$	$5.6 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^6$
<i>Campylobacter coli</i>	$6.2 \times 10^2 \sim 6.2 \times 10^5$	$6.1 \times 10^3 \sim 6.1 \times 10^5$
<i>Campylobacter lari</i>	$2.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^6$	$8.8 \times 10^2 \sim 8.8 \times 10^4$
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	$1.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^6$	$1.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$
<i>Campylobacter fetus</i>	$1.7 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^7$
<i>Arcobacter butzleri</i>	$2.8 \times 10^4 \sim 2.8 \times 10^7$	$2.8 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^5$

*1 現 川口市保健所

*2 現 熊谷保健所

結果

1 rPCR によるカンピロバクター属菌及び *Arcobacter butzleri* の検出

Cp 値35未満を陽性と判定した。検出感度試験で陽性となった最少菌量は、Cf 以外のカンピロバクター属菌の検出系では菌種により異なり $2.5 \times 10^1 \sim 5.6 \times 10^3$ CFU/mL, Cf の検出系では 1.7×10^2 CFU/mL, *Arcobacter butzleri* の検出系では 2.8×10^4 CFU/mL であった。また、特異性試験では目的とした菌のみが陽性となった。

2 便への菌添加試験

(1) 菌添加便抽出物における rPCR の検出感度

Cp 値35未満を陽性と判定した。陽性となった最少菌量は、Cf 以外のカンピロバクター属菌の検出系では $2.5 \times 10^3 \sim 5.6 \times 10^5$ CFU/g, Cf の検出系では 1.7×10^4 CFU/g, *Arcobacter butzleri* の検出系では 2.8×10^5 CFU/g であった。

(2) 培養法の検出感度

コロニーの同定は、顕微鏡検査でらせん状桿菌を確認した場合を陽性と判定した。陽性となった最少菌量は、*Campylobacter jejuni* では 5.6×10^4 CFU/g, *Campylobacter coli* では 6.1×10^5 CFU/g, *C. lari* では 8.8×10^4 CFU/g, *C. upsaliensis* では 1.5×10^4 CFU/g, Cf では 1.7×10^7 CFU/g, *Arcobacter butzleri* では 2.8×10^5 CFU/g であった。

3 食中毒事例への適用

今回検討したカンピロバクター属菌の検出系では、培養検査で *Campylobacter jejuni* 陽性5事例の15検体中13検体及び *Campylobacter coli* 陽性1事例の3検体中3検体が rPCR 陽性となった。通常実施している「遺伝子一斉スクリーニング検査」による *jejuni/coli* の rPCR 結果ともほぼ一致した。Cf 及び *Arcobacter butzleri* の検出系では、食中毒事例11事例に由来する34検体すべてが陰性であった。

考察

今回検討を行った3系統の rPCR の中で、カンピロバクター属菌と Cf の検出系は特異性と検出感度に優れていて、有用であると考えられた。一方、*Arcobacter butzleri* の検出系は特異性の点では優れていたが、「Cp 値35未満を陽性にする」という判定方法では検出感度が 2.8×10^4 CFU/mL となってしまった。*Arcobacter butzleri* の検出系では、 2.8×10^3 CFU/mL のとき Cp 値が35以上ではあったが検出はされたので、Cp 値の判定基準を再考したいと考えている。

便への菌添加試験では rPCR は培養法と比較して、同等もしくは10倍から1000倍検出感度が高かった。また、菌液の検出感度試験と比較して、便からの DNA 抽出工程による感度の低下は10倍未満であった。このことから、今回用いた便の抽出法と rPCR の検出系は有用であると考えられた。

一般にフィルター法による培養は検出感度が低いと言われているが、Cf 以外は便1 g あたり 10^3 個から 10^5 個の菌を検出することができ、良い状態の検体であれば十分菌が検出できると考えられた。Cf は供試した他の菌と比較して菌体が大きく、フィルターの穴を通過しづらかった可能性が考えられた。

展望

カンピロバクター属菌及び類縁菌である *Arcobacter butzleri* の rPCR の有効性を確認し、食中毒スクリーニング検査に導入でき実用的であることが示された。また、フィルター法による培養は、Cf を除き有効な手法であることが確認できた。今後は、食品への応用が期待されるが、カンピロバクター属菌は増殖が遅く、抗生物質に感受性の菌種をもターゲットとするため、増菌培地の工夫が必要であり、今回の便の成果を踏まえて更なる検討を進めて行く予定である。

公表

第32回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会：埼玉（2020）