

研究ノート

MPN-RealTime PCRによる市販鶏肉中の *Campylobacter jejuni* の定量と分布

川崎 晋[§], 細谷 幸恵, 根井 大介, 稲津 康弘, 川本 伸一

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Quantitative analysis of *Campylobacter jejuni* by MPN-RealTime PCR in retail chicken meats

Susumu Kawasaki[§], Yukie Hosotani, Daisuke Nei,
Yasuhiro Inatsu and Shinichi Kawamoto

National Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

Quantitative analysis of *Campylobacter jejuni* by MPN-RealTime PCR was performed in retail chicken meats. At the same time, the important microbiological viable counts (such as, total viable cell, coliform, anaerobic cell counts, etc.) were estimated for searching surrogate indicators of *C. jejuni* counts. The quantitative range of MPN-RealTime PCR was estimated 0.04~31000 CFU/g, 32/52 of samples (62%) were positive for *C. jejuni* contamination. However, clear correlation was not observed between the level of contamination of *C. jejuni* and the viable counts of sanitation indicator bacteria tested by multiple regression analysis.

Key words: *Campylobacter jejuni*; MPN-RealTime PCR

緒言

近年、我が国では *Campylobacter jejuni/coli* を原因菌とした食中毒が急増しており、その発生件数は食中毒細菌による原因物質の1位となっている。*Campylobacter* による食中毒の主要原因食品としては鶏肉によるものが数多く報告されている。カンピロバ

クターは動物の腸管内に生息し、一般に家畜・家禽の保菌率が高いために、と畜場や食鳥処理場での生体解体工程や、食肉店舗での処理過程での交差汚染により、市販生肉が汚染を受けている可能性がある。特に鶏肉では *C. jejuni* が30~50%、*C. coli* が数%陽性という、極めて高い汚染率が報告されている¹⁾。

このような汚染実態からカンピロバクター食中毒は散発事例が数多く報告されている。しかし、本菌によ

[§] 連絡先 (corresponding author), skawasa@affrc.go.jp

る食中毒は潜伏期が比較的長く低菌数で感染が成立することから、疫学的調査が困難かつ不十分となっている現状がある。さらに、カンピロバクターの検査には微好気条件（酸素濃度5%）や血液培地など、特殊な培養環境条件の設定が必要²⁾なため、その調査をさらに困難にしている。本菌の培養法による検出は熟練の技術を要し、これに加えて、食品中における本菌の定量値を得るとなれば、その労力は膨大なものとなる。

しかし、近年のPCR法の発展により、特定微生物の検出の簡易高感度化が進んできた。一般にPCR法の感度は 10^3 CFU（CFU: Colony Forming Unit）の菌体が存在すれば核酸抽出過程を考慮しても検出可能であり³⁾、その高感度な手法から分布調査の効率化への活用が期待されてきた。また、蛍光プローブとPCR法を組み合わせたRealTime PCR法による解析法は、PCR反応過程を蛍光で直接モニタリング可能なことから、高感度迅速な菌の陽性/陰性判定に加えて定量も可能であると期待されている。

本研究では、RealTime PCR法による迅速な菌の陽性/陰性判定とMPN（最確数法：Most Probable Number）による定量計算法を組み合わせて、市販鶏肉中の*C. jejuni*の定量を試みた。MPN法は試料中の標的微生物数が微量でも、その単位体積当たりが存在する微生物数はポアソン分布に従うと推定して菌数を求める手法であり、確率分布的定量試験法として普及している。本法では希釈系列が多く必要なものの、最確数表により簡易に菌数を求めることができる。この手法とPCR法での迅速な判定を組み合わせれば、多数検体数の処理が可能であり、本菌の汚染状況把握に有効活用できる可能性がある。また、同時に一般生菌数や大腸菌群などの汚染指標、ならびに嫌気性菌数などの測定により、これらと*C. jejuni*汚染との関連性についても検討した。

実験材料および方法

1. 供試検体

検体は2011年から2012年の間で、茨城県つくば市内の市販鶏肉および直接食鳥処理場から入手した鶏肉、計52検体を用いた。

2. サンプル処理および汚染指標菌数の測定

供試検体は、図1に示したスキームにより処理した。供試検体25gを測りとり、これに抗生物質を除いた5%馬血液添加Bolton培地（OXOID）を225mL加え、

ストマッカー処理した。この乳剤2mLを滅菌カップに移し、菌数測定を行った。菌数測定はスパイラルプレート法で行い、菌液をTSA（Difco）平板〔一般生菌数〕1枚、Coliform寒天（Merck）平板〔大腸菌群数および大腸菌数〕1枚、TSC寒天基礎培地平板（自家調整：1Lあたりトリプトン15g、大豆ペプトン5g、ラブレムコ末5g、酵母エキス5g、メタ亜硫酸ナトリウム1g、クエン酸アンモニウム第二鉄1g、寒天14g）〔硫化水素産生嫌気性菌数〕1枚、BHI寒天（日水製薬）平板〔一般嫌気性菌数、一般微好気性菌数〕2枚、CCDA（OXOID）平板〔*Campylobacter*分離用選択培地に現れる菌数〕1枚にそれぞれ塗抹した。塗抹した平板はBHI寒天平板とCCDA平板それぞれ1枚は微好気条件で、残り1枚のBHI寒天平板とTSC寒天平板1枚は嫌気条件で培養した。培養気相条件は、アネロパック微好気ならびに嫌気培養用パック（三菱ガス化学）と専用の嫌気ジャー（三菱ガス化学）を用いて調整した。これらと残りの塗抹平板は35℃好気条件で培養し、その菌数を計測した。Coliform寒天平板では大腸菌群および大腸菌の典型集落数を数えた。

3. MPN-RealTime PCRによる*C. jejuni*の定量

2. で処理した乳剤250mLに所定の濃度となるよう抗生物質サプリメント（Bolton Broth Selective Supplement（OXOID））を加え、ストマッカー袋内で良く攪拌した。攪拌した後、乳剤1mLを抗生物質サプリメント含む5%馬血液添加Bolton培地9mLが分注された試験管1本に加えた。同時に乳剤350 μ L、35 μ Lを滅菌済みのマイクロタイタープレートに3ウェルずつ分注した。さらに乳剤1mLは9mLの滅菌希釈水で2段階希釈し、各35 μ Lを3ウェルずつ分注した。35 μ L分注したウェルにはさらに抗生物質含む5%馬血液添加Bolton培地315 μ Lを加え、合計の容量を350 μ Lとした。最終的に、ストマッカー袋、試験管、分注したマイクロタイタープレートを42℃48時間微好気培養した。

培養後、各350 μ Lの菌液を核酸抽出に供した。核酸抽出はDNA extraction kit [TA10]（プリマハム）を用いた。核酸抽出プロトコールは取扱説明書に準じた。抽出した核酸2 μ LをRealTime PCRによる検出に供した。RealTime PCR条件及びPCRプライマーと蛍光プローブはNogva et al.⁴⁾に従った。RealTime PCRにより所定の蛍光が観察された検体を陽性と判定し、その陽性数から*C. jejuni*の菌数をMPN法による計算で求めた。

4. 統計処理

得られた *C. jejuni* 菌数ならびに、2. での各平板で求めた菌数との関連性を求めるため重回帰分析を行い、重相関係数・決定係数・偏回帰係数を求めた⁵⁾。計算は Microsoft EXCEL 2007 を用いて行った。

結果および考察

PCR法を用いた *C. jejuni* 定量を行う前に、検出感度および検体からの核酸抽出の際の食品由来の阻害物質の影響を予備検討した。抗生物質を含む5%馬血液添加 Bolton 培地225 mLに鶏肉25 g 加えて乳剤とした検体にあらかじめ既知濃度の *C. jejuni* を加えたものから、核酸を抽出し本検出に供した結果、その検出感度は 1.2×10^3 細胞であった (Data not shown)。この値はPCRの検出感度として十分であり、鶏肉および培地混在系でも検出可能であることを示した。今回の核酸抽出には、以前著者らが食品において評価した核酸抽出法⁶⁾を用いたが、本抽出法は馬血液などを含む特殊な培地

については検討を行っていなかった。今回の実験系では5%馬血液含有培地を使用しても検出感度が劣らないことから、この抽出法は本実験系においても活用できることが明らかとなった。

今回のMPN法では図1に示したように3本法を変法して行った。本希釈系列でのMPN定量幅は確率論的ではあるが0.04~31000 CFU/gの範囲、すなわち食品衛生法で規定される25 g 当たり1細胞以上で定量値が得られるよう設定した。一般に *Campylobacter* の汚染はごく少量であり、低菌数 (Black *et al.*⁷⁾によれば100 CFU)でも感染が成立することから、より希釈系列を増やすことも検討したが、労力・操作性およびランニングコストの点から上記の希釈系で行うこととした。

MPN-RealTime PCRにて *C. jejuni* を検出したところ、52検体中32検体 (およそ62%) が陽性と得られた (図2-a)。この結果は、過去の文献値¹⁾とおおよそ一致した。得られた *C. jejuni* 菌数にはばらつきがあるものの、ほとんどが0.04~10 cells/gの範囲であった。10 cells/gを超えたのは5検体であり、15~660 cells/g

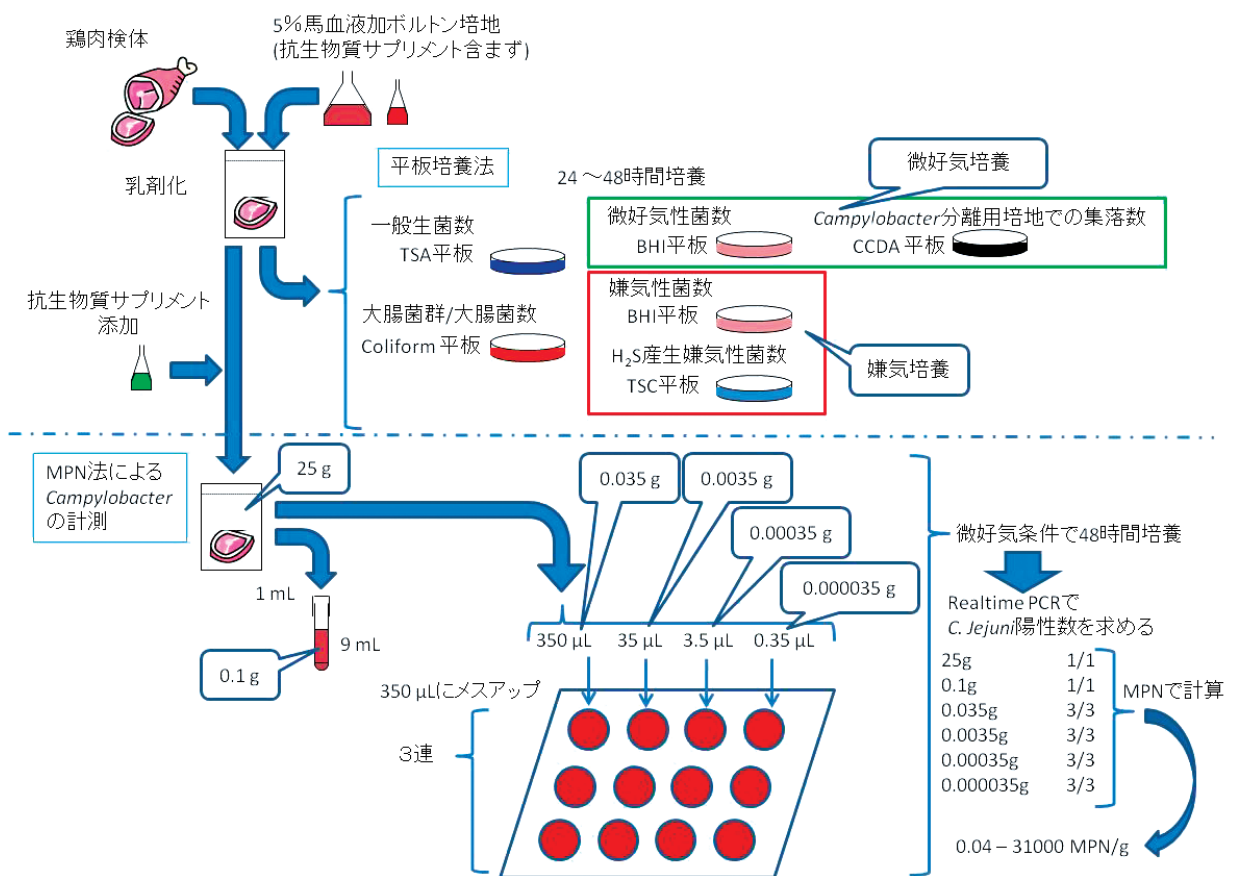


図1. 本実験のMPN-Realtime PCR法と菌数検査のスキーム

で推移した。これらの検体は全て鶏モモ肉であったが、特定の産地のみが汚染頻度が高いという結果は得られなかった。

その他、汚染指標菌数として考えられる一般生菌数 (TSA 平板による菌数)・大腸菌群数 (Coliform 寒天による菌数) および嫌気性菌数 (嫌気条件で培養した BHI 寒天による菌数) の分布を図 2-b, c, d に示した。一般生菌数と嫌気性菌数は、それぞれ 10^4 CFU/g と 10^3 CFU/g を中心に推移しているのに対し、大腸菌群数は 10^4 CFU/g 以下に収まるなかで、均等に分布していた。

重回帰分析により上記の汚染指標と *C. jejuni* 菌数との関連性を求めたが、いずれも明確な相関関係は認められず、大腸菌の有無と *C. jejuni* 菌数との関連性も認められなかった。古田ら⁸⁾は、糞便由来大腸菌 (*E. coli*) の汚染レベル (10 CFU/g 以上) と *Campylobacter* および *Salmonella* の汚染率との関連性を皮つき肉や砂肝などの内臓肉において認めているが、本結果では

糞便由来大腸菌に 10^2 CFU/g の頻度で汚染されていても *Campylobacter* が検出されない結果が得られており、明確な関連性までを認めることができなかった。

本研究では、一般に検討されている汚染指標菌だけでなく嫌気性菌数や微好機性菌数、硫化水素産生嫌気性菌数についても *C. jejuni* 菌数との関連性を検討したが、明確な関連性は得られなかった。*C. jejuni* の汚染は鶏肉の解体時における腸管内容物汚染が大きな原因と考えられているが、通常汚染指標とされる一般生菌数や大腸菌群などの相関は得られなかった。また多数培地を用いて嫌気性菌など様々な微生物群の菌数を求め、*C. jejuni* の汚染度を把握できる指標菌の探索を行ったが、難しいと考えられた。

しかしながら、本 MPN-RealTime PCR 法では *C. jejuni* の定量を従来法よりも労力を圧倒的に削減して実施できることから、本菌の鶏肉汚染状況の迅速な把握に活用できる可能性を示した。

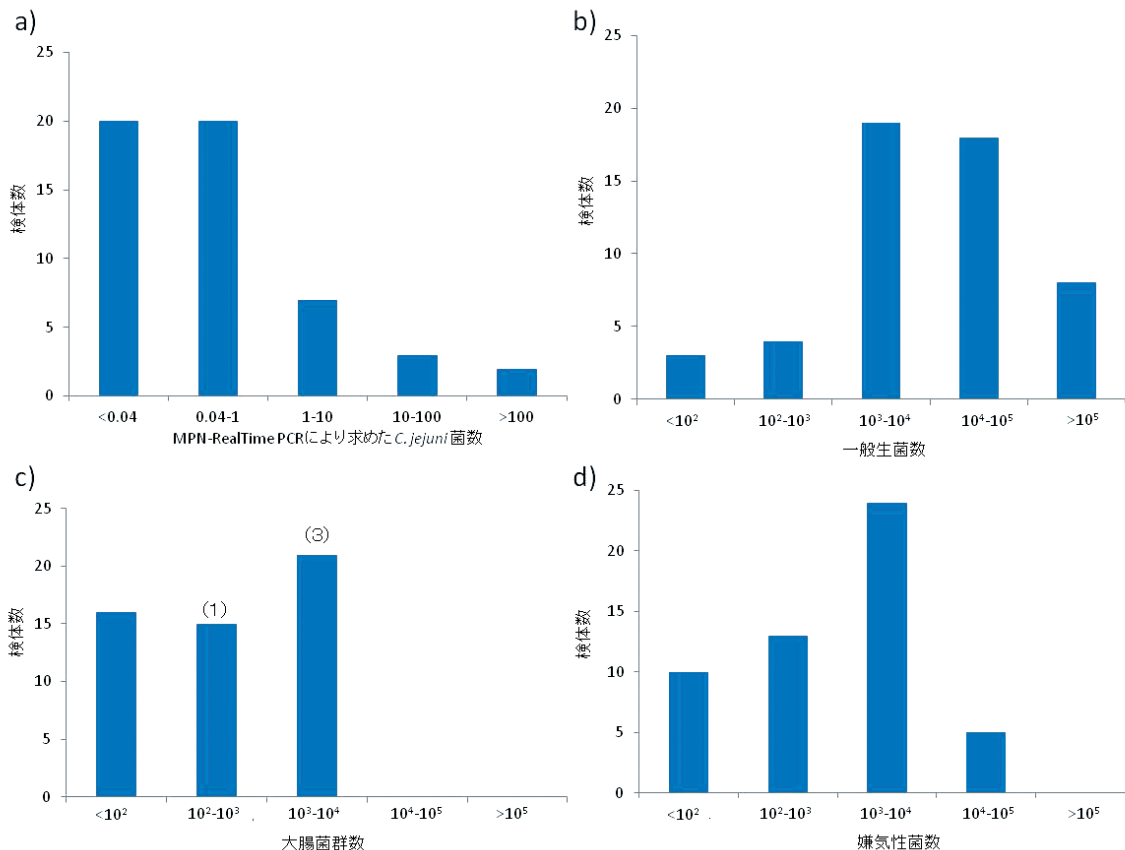


図 2. 市販鶏肉中における各生菌数の分布。大腸菌群の分布 (c) のグラフ内に示した括弧内の数字は大腸菌検出数を示す。

要 約

RealTime PCRとMPN法を組み合わせた方法により、市販鶏肉中の*Campylobacter jejuni*の定量を試みた。また同時に一般生菌数・大腸菌群数・嫌気性菌数などの汚染指標菌数も同時に測定し、これらの結果と*C. jejuni*の汚染度との関連性を求めた。*C. jejuni*の定量範囲は0.04~31000 CFU/gであり、52検体中32検体（およそ62%）が*C. jejuni*陽性と得られた。この定量結果と汚染指標菌数や様々な平板で出現した集落数などとの関連性の有無を重回帰分析により求めたが、関連性の認められる因子を見出すことはできなかった。

参考文献

- 1) 「食中毒予防必携」, 厚生省生活衛生局食品保健課乳肉衛生課食品化学課監修, ((社)日本食品衛生協会, 東京), (1998).
- 2) 「食品衛生検査指針-微生物編-」, 厚生労働省監修, ((社)日本食品衛生協会, 東京), (2004).
- 3) Kawasaki, S., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157: H7 in meat samples. *J. Food Prot.* **68**, 551-556 (2005).
- 4) Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., Rudi, K., Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*, *Appl Environ Microbiol.*, **66**, 4029-4036 (2000).
- 5) 高橋正弘, 吉田芳哉, 志賀康造, 横山公通, 鈴木和雄, 小林正稔, 金子精一, 加熱・非加熱食品の重要な微生物管理点の推定, *防菌防黴*, **27**, 153-158 (1999).
- 6) Kawasaki, S., Fratamico, P. M., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Evaluation of the Multiplex PCR System for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157: H7 in Various Food Samples, *Foodborne Pathogens and Disease*, **6**, 81-89 (2009).
- 7) Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., Blaser, M. J., Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans, *J. Infect. Dis.*, **157**, 472-479 (1988).
- 8) 古田宗宣, 小田隆弘, 樋脇弘, 財津修一, 村上光一, 馬場愛, 江渕寿美, 金子孝昌, 木原温子, 市販鶏肉類における*Campylobacter jejuni/coli*, *Salmonella*ならびに糞便系大腸菌群の汚染状況の関係, *日食微誌*, **27**, 200-205 (2010).