

# 鶏肉における生きているが培養できない カンピロバクターの検出方法の確立

岐阜大学応用生物科学部・助教 岡田 彩加

## ■ 目的

カンピロバクター属菌による食中毒は細菌による食中毒の原因として最も多くを占める。これまでも、カンピロバクターを分離培養することで鶏肉(食鳥処理場のと体、市販鶏肉)の汚染状況は調査されている。しかし、カンピロバクターは環境ストレスにより、生きているが培養できない Variable but nonculturable (VBNC) 状態になることが知られる。VBNC 状態の菌は食中毒の原因となることが示唆されているが、現在の培養法では検出できず存在が見逃されている。培養によらない生きて細菌の検出法として、Propidium monoazide (PMA) を用いた qPCR (PMA-qPCR) 法がある。しかし、鶏肉から DNA を抽出する場合、夾雑物が多く含まれるため、PMA 反応や PCR 反応が阻害される。また、増菌培養を実施する培養法と異なり感度が低いことが問題となる。これらを解決するため、これまでに密度勾配遠心法による精製を試みたが、ロスが大きかったため、別の精製法として、免疫磁気ビーズを用いた精製法を検証した。

## ■ 方法

カンピロバクターに汚染された鶏肉をカンピロバクター抗体および Dynabeads streptavidin Trial kit に含まれる C1、T1、M-270、M-280 を用いて、精製し、最も反応性の良いビーズを検証した。

次に実験室内で培養した *Campylobacter jejuni* NCTC11168 株(生菌または死菌)を用いて、免疫磁気ビーズ法による回収効率を検討した。免疫磁気ビーズを用いた精製法を実施後、qPCR 法によってカンピロバクター属菌を検出した。精製を行わず、遠心分離によって回収した場合と比較し、免疫磁気ビーズを用いた精製法の有用性を評価した。

次にカンピロバクターに汚染されていない鶏肉に、実験室内で培養した *Campylobacter jejuni* NCTC11168 株(生菌または死菌)を一定量塗布し、汚染鶏肉を再現した。免疫磁気ビーズを用いた精製法を実施後、PMA-qPCR 法によってカンピロバクター属菌を検出した。精製を行わず、遠心分離によって回収した場合と比較し、免疫磁気ビーズを用いた精製法の有用性を評価した。

## ■ 結果および考察

カンピロバクターに汚染された市販鶏肉を用いた検出実験では、Dynabeads streptavidin Trial kit に含まれる C1、T1、M-270、M-280 ビーズを用いた場合の Ct 値はそれぞれ 31、30、31、31 となった。ビーズの種類による差は認められなかったため、以降は最も古くに発売され、使用実績の多い M-280 を使用した。

実験室内で培養したカンピロバクターを用いた実験では、生菌-遠心、生菌-免疫磁気ビーズ、死菌-遠心、死菌-免疫磁気ビーズ、それぞれの Ct 値は 27、23、24、30 となり、免疫磁気ビーズによる生菌の回収効率は遠心分離よりも良いことがわかった。遠心分離よりも免疫磁気ビーズによる回収効率の方が高く、免疫磁気ビーズ法の有用性が示唆された。

実験的にカンピロバクターに汚染された鶏肉を用いた PMA-qPCR 法により実際の鶏肉における回収効率を検証した。遠心分離での回収率を 1 としたとき、免疫磁気ビーズでの回収率は 0.003 となり、回収効率が低かった。死菌ではどちらの回収方法でも回収効率が低かった。不純物が多い状態での免疫磁気ビーズを用いた精製法は難しいことが示唆された。

## ■ 結語

カンピロバクターは鶏の皮膚と特異的に結合する付着因子を持っていることが示唆されている。そのため、カンピロバクター抗体への結合よりも鶏の持つタンパク質との結合が強く、不純物を除去する過程でカンピロバクターをロスしてしまった可能性がある。今後は、精製をせず遠心分離のみでカンピロバクターを回収し、不純物存在下でも十分に PMA 反応が実施できるような PMA 処理条件を検証していく必要がある。