

称号及び氏名	博士（獣医学）	四良丸 幸
学位授与の日付	平成24年3月31日	
論文名	カンピロバクターの高感度、定量的、迅速検査法の開発と応用	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	小崎 俊司
	副査	三宅 眞実

## 論文要旨

### 緒言

*Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* による食中毒は近年我が国を含め諸外国においても発生頻度が高く、問題となっている。それゆえ、我が国ではこの 2 菌種が食中毒原因菌として指定されている。カンピロバクターはグラム陰性らせん状桿菌で、酸素濃度 5~10% の微好気条件下で発育する。カンピロバクターは家畜をはじめ動物の消化管に生息しており、感染動物はほとんど症状を示さない。ヒトはカンピロバクターに汚染された獣肉を喫食し本菌に感染する。*C. jejuni* は急性胃腸炎だけでなく、敗血症を引き起こし重篤化することがある。また、稀に *C. jejuni* による急性胃腸炎の治癒後に末梢神経障害であるギランバレー症候群を発症し、重症な場合死に至る。*Campylobacter fetus* は獣医学領域では反芻動物の生殖器疾患の原因菌として、ヒトの場合は敗血症や髄膜炎の原因菌として知られ、食中毒細菌には指定されていない。しかし *C. fetus* による食中毒事例や敗血症患者において下痢が先行症状として見られるという報告もある。そのため、*C. fetus* も下痢症起因菌として注意が必要であると考えられる。

カンピロバクター食中毒発生時、感染菌種により症状や予後が異なるため、迅速に原因菌を菌種レベルで同定することは、適切な治療や予後対策につながるだけでなく、感染ルートの特特定や感染拡大防止の上においても役立つ。また、食中毒を未然に防ぐため

には、事前に食品のカンピロバクター汚染を検査することも重要である。しかし、通常行われている、培養に基づくカンピロバクターの検査は、食品検体、臨床検体ともに約1週間前後かかる。また、微好気培養のための特殊な培養装置を要する。さらに菌種間で生化学的性状が類似し、同定が困難である。そのため、食品検査・臨床検査ともに迅速・簡便で精度の高いカンピロバクターの遺伝子検査法の開発が求められている。

そこで我々はカンピロバクターの病原因子の一つである細胞膨化致死毒素(*cdt*)遺伝子が *C. jejuni*, *C. coli* および *C. fetus* に菌種特異的かつ普遍的に保有されていることを見出し、*cdt* 遺伝子標的としたこれら3菌種を菌種特異的に検出・同定できる **Multiplex PCR** を開発した。臨床検体のカンピロバクターの検査において **Multiplex PCR** は単離菌あるいは単離を行う前の分離培養培地上のコロニーからこれら3菌種を検出・同定できた。本研究では **Multiplex PCR** が培養に頼らない迅速な臨床検査に適応可能かどうかを調べ、さらにより検出限界の低い **Nested-multiplex PCR** および **Duplex real-time PCR** を開発・評価し、これら **PCR** 法を臨床検体や食品検体を用いた検査に適用し、培養法によって得られた結果と比較・考察した。

## 第一章 高感度、定量的、迅速検査法の開発

**Multiplex PCR** が臨床検体から培養を行わずに直接カンピロバクターを検出できるかどうか調べた。下痢症患者由来の直腸スワブ **1007** 検体を滅菌生理食塩水に懸濁し、試験液を作製した。孔径 **0.45 μm** のセルロース混合エステル膜(以下フィルター)を、薬剤を含まない血液寒天培地上に載せ、その上に試験液 **100 μl** を滴下し **30** 分間静置後フィルターを取り去り培養する方法(以下、フィルター法)と、臨床検査で比較的良好に用いられている **Skirrow** 培地に試験液を塗抹し培養する方法でカンピロバクターの分離を行った。同時に試験液 **180 μl** へ **20 μl** の **10xTE** を加え **10** 分間ボイルし、遠心分離した上清を鋳型 **DNA**(以下ボイルテンプレート)として回収した。カンピロバクターが分離できた **55** 検体のボイルテンプレートから **Multiplex PCR** を用い直接検体よりカンピロバクターの検出を行ったところ **41** 検体から検出できた。一方、カンピロバクターが分離できなかった **80** 検体から **Multiplex PCR** でカンピロバクターの検出を試みたところ、**2** 検体から *C. jejuni* に相当する増幅バンドが確認され、増幅産物をシークエンスしたところ *C. jejuni* の *cdtB* 遺伝子に相当する特異的な増幅であることが確認できた。残り **78** 検体からは非特異的なバンドは得られなかった。以上より、*cdtB* を標的とした **Multiplex PCR** 法は臨床検体から直接カンピロバクターを検出でき、迅速性において優れていた。しかし感度の面で若干問題があることが分かり、より感度を上げることを目的に *C. jejuni* *C. coli* および *C. fetus* の *cdtB* 遺伝子を増幅できる共通プライマーで **PCR** を行い、その増幅産物をテンプレートとして種特異的プライマーを用いそれぞれの遺伝子を増やす **Nested-multiplex PCR** を開発した。**Nested-multiplex PCR** の検出限界は **PCR** チューブあたり **10<sup>0</sup> cfu** であり、**Multiplex PCR** の検出限界値 **PCR** チュー

ブあたり  $10^1$  cfu に比べ 10~100 倍向上していた。Nested-multiplex PCR の特異性と感度を調べたところ、それぞれ 100%、97%であった。

食品中にはカンピロバクターの汚染菌数が少なく、食品検査においては分離培養や遺伝子検査の前に増菌培養が不可欠である。検体中の少ないカンピロバクターを分離・検出するための最適な増菌培養の条件を評価するために増菌液中のカンピロバクターの動態を調べる必要がある。そこで食中毒細菌として指定されている *C. jejuni* と *C. coli* を食肉検体から迅速かつ定量的に検出できる、*cdtC* 遺伝子に基づく Duplex real-time PCR の開発を試みた。Duplex real-time PCR は PCR チューブあたり  $10^0$ ~ $10^3$  cfu の *C. jejuni* と *C. coli* をそれぞれ検出できた。Duplex real-time PCR の特異性と感度を調べたところ、それぞれ 100%、99%であった。

開発した Nested-multiplex PCR、Duplex real-time PCR とともに高感度にカンピロバクターを検出でき、臨床検体および食品検体中のカンピロバクターの迅速検査および培養条件の評価に有用であると考えられた。

## 第二章 開発した高感度、迅速検査法の臨床検査への応用

臨床検査における Nested-multiplex PCR の有用性について調べた。下痢症患者由来の直腸スワブ 1121 検体のうちカンピロバクターが分離できた 97 検体のボイルテンプレートから Nested-multiplex PCR と Multiplex PCR を用いカンピロバクターの検出を試みた。Multiplex PCR ではカンピロバクターの検出率は 80%であったが、Nested-multiplex PCR では 94%に向上し、Multiplex PCR では増幅バンドが薄かった検体も Nested-multiplex PCR では明瞭な増幅バンドが確認され、容易に結果を判定することができた。次に、培養法と Nested-multiplex PCR を用いた検査法を比較するために、下痢症患者由来直腸スワブ 1513 検体すべてから、各方法でカンピロバクターの検出・分離を行った。*C. jejuni* あるいは *C. coli* が分離または検出されたそれぞれ 150 検体、10 検体の培養法による分離率はそれぞれ 82.7%、90.0%であり、Nested-multiplex PCR による検出率はそれぞれ 98.7%、100%であった。Nested-multiplex PCR は直接検体からカンピロバクターを迅速に検出できるだけでなく、培養法で陰性となった検体からもカンピロバクターを検出することができた。また、本実験では培養法と Nested-multiplex PCR とともに *C. fetus* は分離・検出されなかった。さらにカンピロバクターが分離もしくは検出された検体の懸濁液中のカンピロバクターの菌数を Duplex real-time PCR より定量した。特に検体懸濁液中にカンピロバクターが  $10^5$  cfu/ml 以下であった場合は培養法では偽陰性となる確率が高かった。Nested-multiplex PCR では検体中の菌数の影響をほとんど受けることなくカンピロバクターを検出できた。しかし、検体中に多く菌が含まれていた場合でも培養法で陰性となった検体があり、検体中のカンピロバクターの抗菌剤に対する感受性や損傷、夾雑菌の増殖により培地上に発育できず分離できなかった可能性が考えられた。以上の結果より、開発した Nested-multiplex

PCR は培養法に比べ臨床検体から迅速かつ高感度にカンピロバクターを検出でき、臨床検査において有用であると考えられた。

### 第三章 開発した高感度、定量的、迅速検査法の食品検査への応用

Duplex real-time PCR の食品検体への応用を試み、食肉検体から Duplex real-time PCR を用いた方法と培養法でカンピロバクターを検出し、結果を比較した。培養法は標準法検討委員会で標準法案として検討が行われ、高頻度に用いられている方法である Bolton 培地または Preston 培地を用いた 24、48 時間増菌培養と mCCDA による 48 時間の分離培養を組み合わせた方法に準じた。食肉検体として *C. jejuni* および *C. coli* をそれぞれ添加した鶏肉を用いた場合、培養法では食肉 10 グラム当たり *C. jejuni* では  $2.7 \times 10^2$  cfu 以上、*C. coli* では  $1.6 \times 10^2$  cfu 以上の菌を添加した検体でそれぞれの菌種を分離することができた。Duplex real-time PCR を用いれば同様の結果を Bolton 培地では増菌 16 時間後に、Preston 培地では 24 時間後に得ることができ、培養法に比べ検査時間を大幅に短縮できた。定量結果から、*C. jejuni* では増菌 16 時間までは Bolton 培地の方が、24 時間以降は Preston 培地の方が増菌液中の菌数が多く、*C. coli* では増菌 48 時間まで Preston 培地に比べ Bolton 培地中の菌数が多かった。菌の分離を行う場合 Preston 培地中に *C. jejuni* が  $1.6 \times 10^4$  cfu 以上存在すれば *C. jejuni* が分離でき、*C. coli* の場合は Preston 培地中の菌数が Duplex real-time PCR の定量限界値以下の場合でも *C. coli* が分離できた。一方、Bolton 培地では *C. jejuni* および *C. coli* で菌数の増加が見られたものの、いずれの時間においてもカンピロバクターは分離できなかった。増菌培地によって菌の増殖が異なっており、増菌培地を評価する上で重要なデータとなると考えられた。今後さらに株数を増やし検討を行っていく必要がある。

次に食肉検体として市販食肉 21 検体を用い Duplex real-time PCR の評価を行った。培養法では Bolton 培地および Preston 培地で 24、48 時間増菌培養後、分離培地に mCCDA、Skirrow 培地およびフィルター法を用い 48 時間培養したところ、4 検体から *C. jejuni* が分離された。Duplex real-time PCR を用い検査を行った場合、*C. jejuni* が分離された 4 検体のうち増菌 16 時間後では 1 検体、増菌 24 時間後には 3 検体、増菌 48 時間後には 4 検体すべてから *C. jejuni* を検出することができた。また、カンピロバクターが分離できなかった 5 検体から Duplex real-time PCR を用いることでカンピロバクターが検出された。菌の薬剤感受性、損傷や夾雑菌の影響によりカンピロバクターが選択培地上に発育できなかったため分離できなかったと可能性が考えられた。通常 1 週間以上を要する食品からのカンピロバクターの検出・同定を Duplex real-time PCR では 3 日以内でき、本研究で開発した遺伝子検査法は食肉検体からのカンピロバクターの検査の時間を大幅に短縮できた。定量結果から、増菌培地中でのカンピロバクターの増殖が添加回収実験におけるカンピロバクターの増殖に比べ遅いことがわかった。食肉の加工・保管の間にカンピロバクターが損傷を受けた可能性が考えられた。今

後損傷を与えた菌を用い添加回収実験を行い、菌の動態を調べていく必要がある。

#### 総括

1. *cdtB* 遺伝子を標的とした **Multiplex PCR** は臨床検体から直接カンピロバクターを検出する上で感度の面で若干問題はあったが、迅速で有用な方法であることが分かった。
2. 開発した **Nested-multiplex PCR** と **Duplex real-time PCR** は感度・特異性が共に高く、検出限界も **PCR チューブあたり 10<sup>0</sup> cfu** と非常に低かった。
3. **Nested-multiplex PCR** は、培養法では **6 日間**を要する臨床検体からのカンピロバクターの検査を、培養を行うことなく約 **5.5 時間**でできた。
4. **Nested-multiplex PCR** は臨床検査において少ない菌数のカンピロバクターを検出でき、また夾雑菌の影響を受けず、培養法に比べ高い陽性率を示した。
5. **Duplex real-time PCR** は食品検体から **3 日以内**にカンピロバクターを検出でき、食品のカンピロバクター検査の大幅な時間短縮に貢献できた。
6. 食品検査において、増菌培地によってカンピロバクターの動態が異なっていた。**Duplex real-time PCR** を用いることで、増菌培地および培養条件の最適化が可能である。

#### 審査結果の要旨

カンピロバクター属細菌は、現在少なくとも **24 菌種**報告されている。中でも、*C. jejuni* と *C. coli* による食中毒が近年世界的に問題となっている。カンピロバクターは動物、特に鶏の消化管に生息しており、ヒトは主に加熱不十分な鶏肉の摂取により本菌に感染し下痢を発症する。*C. jejuni* は胃腸炎だけでなく稀に敗血症や末梢神経障害であるギランバレー症候群を発症させる。*C. fetus* は家畜の流産菌として知られるが、まれにヒトの敗血症や胃腸炎の原因となることもある。一方、*C. fetus* による集団食中毒も発生している。食中毒発生時、原因菌を菌種レベルで迅速に同定することは、感染源の特定や感染拡大防止のみならず適切な治療や予後対策においても有意義である。食中毒を未然に防ぐために、食品の微生物汚染を検査することも重要である。しかし、カンピロバクターは微好気性菌であるため、従来の培養検査では特殊な装置を必要とし、検査結果を得るまで約 **1 週間**を要する。さらに、菌種間の生化学的性状が酷似しており、誤同定もしばしば問題となる。そのため、簡便、迅速で精度の高い菌種レベルでのカンピロバクターの検査法の開発が重要である。我々の研究グループは、細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子を標的とし *C. jejuni*、*C. coli* 及び *C. fetus* を菌種特異的に検出できる **Multiplex PCR** 法を開発し、報告してきた。

本研究では、本 **Multiplex PCR** 法が糞便検体に直接適用できるか、さらにこれら **3** 菌種をより高感度に検出できる **Nested-multiplex PCR** 法と *C. jejuni* と *C. coli* を迅速かつ定量的に検出できる **Duplex real-time PCR** 法を開発し、臨床検体及び食品検体に適用できるかについて調べた。以下はそれらの結果の概要である。

第1章では、**Multiplex PCR** 法と、スキロー培地とフィルター法を用いた2種類の培養法で糞便 **711** 検体からカンピロバクターの検出又は分離を行った。いずれかの方法で陽性となったものは **58** 検体あり、**Multiplex PCR** 法の感度は **83%** でスキロー培地 (**74%**) やフィルター法 (**66%**) を用いた培養法よりも優れていた。より感度を上げることを目的に検出下限が **PCR** チューブあたり **1 cfu** となる *cdtB* 遺伝子を標的とした **Nested-multiplex PCR** 法を開発した。分離菌を用いて特異性と感度を調べたところ、それぞれ **100** と **97%** であった。さらに、電気泳動を必要としない *cdtC* 遺伝子を標的とした **Duplex real-time PCR** 法を開発した。**Duplex real-time PCR** 法は **PCR** チューブあたり **1~10<sup>3</sup> cfu** の *C. jejuni* と *C. coli* をそれぞれ検出でき、特異性と感度とも **100%** であった。これら新たに開発した **2** つの **PCR** 法は、簡便、迅速かつ高感度にカンピロバクターを検出できることを明らかにした。

第2章では、**Multiplex PCR** 法と **Nested-multiplex PCR** 法を用いて **1,121** の患者検体から培養を行うことなく直接カンピロバクターの検出を試みた。その結果、**Multiplex PCR** 法の検出率で **80%** であったが、**Nested-multiplex PCR** 法では **94%** とさらに向上した。次に、**Nested-multiplex PCR** 法と培養法を用いて **1,513** の患者検体からカンピロバクターの検出・分離を行った。**Nested-multiplex PCR** 法と培養法の感度はそれぞれ **99** と **85%** であった。さらに、カンピロバクターの陽性検体の懸濁液中の菌数を **Duplex real-time PCR** 法で定量したところ培養法で **10<sup>5</sup> cfu/ml** 以下の検体で菌が分離できない確率が高かったが、**Nested-multiplex PCR** 法では培養法では菌が分離できない場合でも検出できた。以上の結果より、**Nested-multiplex PCR** 法は迅速性と感度の点で優れた方法であり、臨床検査において有用であることを明らかにした。

第3章では、**Duplex real-time PCR** 法の有用性について食品検体を用いて評価した。鶏肉に *C. jejuni*、*C. coli* をスパイクし培養法にて菌分離を行った結果、鶏肉 **10** グラムに **10<sup>2</sup> cfu** 以上の菌を添加した場合、菌の分離、同定に約 **7** 日を要したが **Duplex real-time PCR** 法を用いると **24** 時間以内に同様の結果を得ることができた。市販食肉を用いて **Duplex real-time PCR** 法と培養法を比較した結果、約 **7** 日間を要する培養法と同等の結果を得るのに **Duplex real-time PCR** 法を用いた場合には、増菌培養を含め約 **3** 日間しか要さず、培養法で菌が分離できなかった検体からも検出が可能であった。

以上の結果は、**Nested-multiplex PCR** 法及び **Duplex real-time PCR** 法が患者検体や食品検体からカンピロバクター属菌を簡便、迅速かつ正確に検出できることを示し、培養法よりも遥かに優れていた。これらの研究成果は食品衛生学、応用獣医学分野のみならず医学領域においても多大な貢献をすると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士(獣医

学)の学位を授与することを適当と認める。