

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350179

研究課題名(和文) 養鶏現場で簡便かつ迅速に実施できるカンピロバクター保菌鶏の超高感度検出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a rapid, simple and ultrasensitive method for detecting chicken infected campylobacter in the field.

研究代表者

川津 健太郎 (Kawatsu, Kentaro)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・課長

研究者番号：20260367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：カンピロバクター保菌鶏を検出するために、迅速、簡便、超高感度な蛍光イムノクロマト法の確立を試みた。確立した蛍光イムノクロマト法の試作キット(蛍光 IC Campy)の検出感度は、 $1.1 \times 1000 \sim 1.7 \times 10000$ CFU/ml (C. jejuni) 及び $1.4 \times 1000 \sim 1.8 \times 10000$ CFU/ml (C. coli)であった。蛍光 IC Campyは、従来の金コロイドイムノクロマト法より高感度であり、カンピロバクター保菌鶏の現場即応型検査法として有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish a rapid, simple and ultrasensitive fluorescence immunochromatographic assay for detecting chicken infected campylobacter in the field. The sensitivities of the experimental fluorescence immunochromatographic kit established in the present study were found to range from 1.1×1000 to 1.7×10000 CFU/ml for C. jejuni and from 1.4×1000 to 1.8×10000 CFU/ml for C. coli, respectively. This kit was more sensitive than a conventional colloidal gold immunochromatographic assay and appeared to be useful for detecting chicken infected campylobacter in the field.

研究分野：食品細菌学

キーワード：カンピロバクター 蛍光イムノクロマト法 高感度検出 鶏糞便

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni* 又は *Campylobacter coli*) による食中毒は国内で発生件数が最も多い細菌性食中毒である。本食中毒は、他の多くの細菌性食中毒が減少傾向にあるにもかかわらず未だに制御されていない。本食中毒の主な感染源は、食鳥処理場における処理過程において、カンピロバクター保菌鶏の腸内容物に汚染された鶏肉である。

従って、本食中毒の発生を抑える根本的な対策は、養鶏場における鶏のカンピロバクター汚染の清浄化に取り組むことである。

その際、各養鶏現場にて鶏の保菌実態を詳細に把握し、それを踏まえて清浄化対策を講ずることが効果的である。しかし、現状では、養鶏現場での鶏の保菌調査は、過去に研究レベルで散発的に実施された場合を除いて、一般的には実施されていない。

その結果、養鶏場におけるカンピロバクター汚染の清浄化対策は不十分なものとなっており、このことが本食中毒の発生を低減できない要因の一つである。

養鶏現場で鶏の保菌調査が実施されない理由は、現場で簡便、迅速に実施できる高感度検査法がないためであり、その開発が求められていた。

本研究代表者は、これまでにカンピロバクターに対するモノクローナル抗体 4B4 (以下、4B4 抗体) を作出し、これを用いて、食中毒患者の糞便懸濁液や食品の増菌培養液からカンピロバクターを 15 分で簡便に直接検出できるイムノクロマト法を開発していた。本法の迅速性と簡便性は、養鶏場の現場で実施可能な現場即応型検査法として有望であると考えられた。

一方、本法は、被検液 1 ml 中に 10^5 個程度のカンピロバクターが存在すれば、それを検出可能であったことから、その検出感度は急性期患者の糞便懸濁液や食品の増菌培養液からカンピロバクターを検出するには十分であるが、カンピロバクター保菌鶏の検出に使用するためには、高感度化 (10~100 倍程度) が必要と考えられた。

最近、金コロイド粒子の代わりに蛍光物質を内包したシリカ粒子で標識した抗体を使用することにより、イムノクロマト法を高感度化 (10~100 倍程度) する手法が報告された。この技術を本研究代表者が開発したカンピロバクター検出用イムノクロマト法に導入し、その高感度化が達成できれば、養鶏現場においてカンピロバクター保菌鶏を検出するのに有用な検査法になると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、超高感度な蛍光イムノクロマト法によるカンピロバクター保菌鶏の現場即応型検出法を新たに開発し、それを用いて養鶏場における鶏の保菌実態を把

握することである。

3. 研究の方法

(1) 既に作出している 4B4 抗体は、抗カンピロバクター抗体として優れた親和性を持つことが実証されているので、これを蛍光シリカナノ粒子 (Quartz Dot[®]、古河 AE 株式会社) で標識して、蛍光イムノクロマト法によるカンピロバクター検出系を構築した。

次いで、構築した蛍光イムノクロマト法の検出感度を、*C. jejuni* 5 株、*C. coli* 5 株を用いて、評価した。

さらに、鶏糞便を検査対象として本蛍光イムノクロマト法のカンピロバクター保菌鶏の検査法としての有用性を評価する前に、実検体として市販鶏肉 171 検体を用いて本蛍光イムノクロマト法の食品のカンピロバクター検査法としての有用性を評価した。市販鶏肉は、そのプレストン培地での 24 時間増菌培養液を蛍光イムノクロマト法で検査し、その結果を従来法 (金コロイドイムノクロマト法および細菌培養法) による検査結果と比較した。

(2) 鶏糞便試料で蛍光イムノクロマト法を正確に実施するために、鶏糞便前処理法を検討した。

具体的には、様々な濃度のカンピロバクター菌液を人工的に添加した鶏糞便を用いて、最適の前処理手順、糞便懸濁液に添加する最適の界面活性剤の種類及び濃度等、を検討した。

(3) 食鳥処理場で採取した鶏盲腸便 56 検体について、開発した鶏糞便前処理法と蛍光イムノクロマト法の組合せを用いてカンピロバクター検査を実施し、その検査結果を従来法 (金コロイドイムノクロマト法および細菌培養法) のそれと比較することにより、本法の保菌鶏検出法としての有用性を評価した。

(4) 蛍光イムノクロマト法を用いた養鶏現場における鶏の保菌調査を以下の方法で実施した。

複数の養鶏場にて、開発した鶏糞便前処理法と蛍光イムノクロマト法の組合せを用いて、鶏のカンピロバクター保菌検査を実施し、その検査結果をもとに、各養鶏場における鶏の保菌実態を検討した。

また、蛍光イムノクロマト法を用いて、市販生鶏肉類におけるカンピロバクターの汚染実態調査も実施した。

4. 研究成果

(1) 4B4 抗体を使って蛍光イムノクロマト法の試作キットを作成し、それを用いて様々な濃度に調整したカンピロバクター加熱死菌を測定し、最適の検体量、反応時間

について検討した。その結果、最適検体量は、70~85 μ lで、最適の反応時間は20~30分であった。さらに、測定に際して、検体に0.1%の濃度で界面活性剤(TritonX-100)を加えることにより、フロースピードが最適化されて非特異的反応の発生を抑制することができ、蛍光イムノクロマト法の試作キット(蛍光 IC Campy)の構築に成功した(図1)。



図1. 蛍光イムノクロマト法の概要

この蛍光 IC Campy で *C. jejuni* 5 株、*C. coli* 5 株の希釈菌液を測定した結果、その検出感度は、 $1.1 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^4$ CFU/ml (*C. jejuni*) 及び $1.4 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^4$ CFU/ml (*C. coli*) であった(表1)。従来法である金コロイド IC の検出感度は、 10^5 CFU/ml 程度であったので、蛍光 IC Campy の検出感度は、その10~100倍優れていた。

表1. 蛍光イムノクロマト法の検出感度の評価

<i>C. jejuni</i> (5株)				<i>C. coli</i> (5株)			
Penner/MLST	菌数 (CFU/ml)	直接塗抹培養	蛍光 IC Campy	MLST	菌数 (CFU/ml)	直接塗抹培養	蛍光 IC Campy
B/4526	1.1×10^8	+	+(5027)	1593	1.3×10^4	+	+(2442)
	1.1×10^2	-	-(780)		1.3×10^8	+	-(680)
O/22	1.6×10^4	+	+(5908)	1181	1.8×10^4	+	+(4315)
	1.6×10^8	+	-(892)		1.8×10^8	+	-(772)
L/2535	1.7×10^4	+	+(8555)	NT	1.8×10^4	+	+(2250)
	1.7×10^8	+	-(973)		1.8×10^8	+	-(573)
R/NT	1.2×10^4	+	+(4328)	NT	3.7×10^8	+	+(3479)
	1.2×10^8	+	-(891)		3.7×10^8	-	-(491)
G/NT	3.7×10^8	+	+(4648)	1628	1.4×10^8	+	+(2640)
	3.7×10^2	-	-(855)		1.4×10^2	-	-(855)

検出感度: $1.1 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$ CFU/ml 検出感度: $1.4 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^4$ CFU/ml

表2. 市販鶏肉類からのカンピロバクター検出

24時間増菌培養			金コロイド IC		蛍光 IC Campy	
直接塗抹培養	陽性	54	陽性	陰性	陽性	陰性
直接塗抹培養	陰性	117	0	117	0	117

次いで、蛍光 IC Campy の検出感度が優れていることを更に検証するために、市販鶏肉

(未加熱) 171 検体の24時間増菌培養液を用いて、細菌培養法、金コロイドイムノクロマト法(金コロイド IC) 及び蛍光 IC Campy によるカンピロバクター検査を実施し、その結果を比較した(表2)。

細菌培養法では、54 検体からカンピロバクターが検出された。そのうち、金コロイド IC では、24 検体(44.4%) がカンピロバクター陽性となったのに対して、蛍光 IC Campy では、44 検体(81.5%) がカンピロバクター陽性となった。一方、細菌培養法でカンピロバクター陰性となった117 検体については、両方法ともにカンピロバクター陰性であった。従って、食品の増菌培養液を用いたカンピロバクター検査においても、従来法である金コロイド IC より蛍光 IC Campy が優れていることが実証された。

(2) 食品のカンピロバクター検査において優れた検出感度が実証された蛍光 IC Campy をカンピロバクター保菌鶏の検査に利用するために糞便前処理法について検討した。

その結果、市販キット(糞便前処理キットポタット、日本ハム中央研究所)を用いて調整した鶏糞懸濁液を低速遠心(800 \times g、1分)後、その上清に10% TritonX-100を1/10量添加する方法が最適の前処理法であった。

(3) 本糞便前処理法を用いて、カンピロバクター保菌鶏の現場即応型検出法としての蛍光 IC Campy の性能を評価した。評価には、食鳥処理場において採取した鶏盲腸便56 検体を用いた。

その結果、従来法である金コロイド IC では陰性となった検体についても、蛍光 IC Campy では陽性となり、蛍光 IC Campy では、糞便1gあたり 10^5 CFU以上のカンピロバクターが存在すれば、100%で陽性となることが明らかとなった(表3)。

表3. 鶏盲腸便からのカンピロバクター検出

カンピロバクター菌数 (CFU/便1g)	検体数	金コロイド IC 陽性	蛍光 IC Campy 陽性
10^6	3	1	3
10^5	5	0	5
10^4	19	0	9
10^3	9	0	0
< 10^3 *	20	0	0

*カンピロバクター培養陰性

さらに、蛍光 IC Campy では、糞便1gあたり 10^4 CFUのカンピロバクターが存在する場合でも、そのほぼ半分(47.4%)は検出可能であることも明らかとなった(表3)。

また、細菌培養法でカンピロバクター陰性

であった盲腸便については、蛍光 IC Campy でも全て陰性となった。

以上の結果から、蛍光 IC Campy は、従来の金コロイド IC より高感度であり、カンピロバクター保菌鶏の現場即応型検出法として有望であることが示唆された。

(4) 確立した鶏糞便前処理法と蛍光 IC Campy の組み合わせを用いて、5 箇所の養鶏場において、カンピロバクター保菌鶏のモニタリング調査を実施した。調査したサンプル数は、計 69 検体で鶏の日齢は、27～48 日齢であった。蛍光 IC Campy で調査した結果、カンピロバクター保菌鶏の割合は、約 10%であった。また、これらのカンピロバクター陽性となった鶏におけるカンピロバクターの保菌数は、糞便 1g あたり最高で 10^7 CFU であった。今回の調査においては、カンピロバクター保菌鶏の検出は、農場により偏りがあり、全く保菌鶏が検出されなかった農場も存在した。

また、蛍光 IC Campy を用いて、鶏肉類におけるカンピロバクターの汚染実態調査も継続して実施した。282 検体の市販生鶏肉類を調査した結果、カンピロバクターの汚染率は、約 26%であった。この結果は、同時に実施した細菌培養法とほぼ同程度であった。

以上のように本研究において構築された蛍光 IC Campy は、養鶏場におけるカンピロバクター保菌鶏の現場即応型検出法として有用であり、その迅速性と高い検出感度は、食品におけるカンピロバクター検査においても、威力を発揮すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. 川津健太郎、蛍光イムノクロマト法によるカンピロバクター新検査キットの評価、第 8 回カンピロバクター研究会、2015 年 12 月 4 日、京都大学桂キャンパス (京都府・京都市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川津 健太郎 (Kawatsu, Kentaro)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部
・課長

研究者番号：20260367

(2) 研究分担者

坂田 淳子 (Sakata, Junko)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部
・主任研究員

研究者番号：30455547