

令和 4 年 4 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05535

研究課題名(和文)カンピロバクターの環境動態解明とシームレスな食中毒制御スキームの開発

研究課題名(英文)Elucidation of environmental dynamics of Campylobacter and development of a seamless foodborne disease control scheme

研究代表者

山崎 渉 (Yamazaki, Wataru)

京都大学・東南アジア地域研究研究所・教授

研究者番号：70393262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：養鶏場や食鳥処理場の現場で実施できる高感度なカンピロバクターの迅速検査の実現には、簡易なDNA抽出法の開発と蛍光LAMP法の使用が有用であることを明らかにした。環境中の微量なカンピロバクターを高感度に検出できる技術の開発には至らなかったが、適切な抗体の選別、酵素処理などによる阻害物質の除去、マイルドかつ短時間のサンプル前処理などが技術確立に重要であることがわかった。開発の過程で比較対象として行った実験結果から、ヒト・動物感染症の両方の診断能力を向上させ得る重要な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養鶏場や食鳥処理場の現場で実施できる高感度迅速なカンピロバクターのPOCT(Point-of-care testing、その場検査法)の実現には、簡易なDNA抽出法開発の開発と蛍光LAMP法の使用が有用であることを明らかにした。環境サンプルからカンピロバクター等の微量な病原体を培養法に依存することなく高感度に検出する技術確立には、適切な抗体の選別、酵素処理等による阻害物質の除去、マイルドかつ短時間のサンプル前処理等が重要であることがわかった。開発過程における比較対象実験から、微量なインフルエンザウイルスの高感度な検出技術開発や牛伝染性リンパ腫診断のPOCT開発の成功という研究成果が派生した。

研究成果の概要(英文)：The development of a simple DNA extraction method and the use of a fluorescent LAMP method were found to be useful in realizing a highly sensitive rapid test for Campylobacter that can be performed at poultry farms and poultry slaughterhouses. Although we were unable to develop a technique that can detect micro-amount of Campylobacter in the environment with high sensitivity, we found that selection of appropriate antibodies, removal of inhibitory materials by enzyme treatment or other means, and mild and short sample pretreatment were important for establishing the technique. The results of experiments conducted as a comparison during the development process provided important insights that could improve diagnostic capabilities for both human and animal infectious diseases.

研究分野：獣医感染症学

キーワード：カンピロバクター 養鶏場 食鳥処理場 野鳥 環境水 微量ウイルス濃縮 牛伝染性リンパ腫 インフルエンザウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター・ジェジュニおよびカンピロバクター・コリ(以下、「カンピロバクター」という)は国内における細菌性食中毒の原因の第一位である。食鳥処理場での加工時における鶏腸内容物からの汚染を受ける鶏肉が主要な原因食品である。同菌は養鶏場内にひとたび侵入すると、初発感染ブロイラーの腸内で増殖したのちに、食糞行動や密閉鶏舎内での多頭飼育、暑熱対策のための強制換気による病原体の鶏舎内循環等の要因を背景に、数日以内に同一鶏舎のブロイラー群内に急速に広がる。ひとたび侵入を許すと、食鳥処理場への出荷前までに同一鶏舎内の全ブロイラー個体を汚染する(Yamazaki et. al., 2016, J. Appl. Microbiol., doi: 10.1111/jam.13141)。食鳥処理時における、と体盲腸の損傷ならびに総排泄腔(クロアカ)からの内容物の漏出・拡散は、カンピロバクター陽性と体から陰性と体へ原材料汚染を広げるリスクファクターである。それゆえ、現場(養鶏場や食鳥処理場)でのカンピロバクター陽性・陰性鶏群の正確かつ即時の鑑別が原材料汚染防止のために必須である。

カンピロバクターは環境中や冷凍状態において、容易に培養能を失う。また、微好気性菌である同菌による食中毒は、一般的な通性嫌気性菌による食中毒とは異なり、外気温ではなく養鶏場での保菌率に高度に相関することから、食中毒低減のためには流通段階の温度管理よりも原材料(鶏肉)汚染防止が重要である(Yamazaki et. al., 2017, doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.132)。それゆえ、1) 欧州連合においても提唱されている養鶏場・食鳥処理場レベルでの陽性・陰性鶏群の区分出荷処理による市販鶏肉の原材料汚染低減策の確立が課題となっている。現場で実施できる現行のカンピロバクターのスクリーニング法には免疫クロマト法がある。しかし、検出感度が低く、陽性判定には腸内容物 1 グラムあたり 100 万個以上のカンピロバクターが必要であり、微量保菌検体に対しては、偽陰性判定をされてしまうことが明らかにされている (Sabike, Yamazaki et. al., 2016, Front. Microbiol., doi.org/10.3389/fmicb.2016.01582; Food Control, 2017, 10.1016/j.foodcont.2016.11.037)。クロアカ内容物 1 グラムあたりの菌数は 1 千~1 億と個体やサンプル採取時期によって多様であり、1 グラムあたり 1 千~10 万個程度の低~中菌数を有するサンプルからの検出が特に問題である。すなわち、実効性のある区分出荷処理のために現場でできる高感度迅速なカンピロバクター検出法の不存在が原材料汚染低減策確立のボトルネックである。

研究代表者はすでに養鶏場の鶏舎環境内では、サルモネラに比してカンピロバクターは速やかに培養能を失うことを明らかにしている(Yamazaki et. al., 2016)。感染後に動物の体内で増幅した多量のカンピロバクターを含有する新鮮便検体とは異なり、環境サンプル中の菌量は極めて少ない上に、培養能を喪失していることが多い。それゆえ、環境サンプルの細菌検査では多くの場合、偽陰性(本来細菌が存在しているが、正確に検出できない状態)を示してしまうことが知られている。

2. 研究の目的

養鶏場や食鳥処理場で実施できるカンピロバクターの高感度な迅速検出法を開発することで効果的な原材料汚染防止対策を確立する。さらに、培養法に依存しない高感度なカンピロバクター検出法を開発し、不明な点が多い同菌の環境動態の解明を促進する。

3. 研究の方法

(1) 養鶏場や食鳥処理場で実施できるカンピロバクター陽性・陰性鶏群の鑑別システム開発

研究代表者は先行研究において、濁度測定を基盤とした LAMP(濁度 LAMP)法により、クロアカ(養鶏場における出荷時の区分処理を想定)と盲腸(食鳥処理場での即時鑑別を想定)内容物からのカンピロバクターのスクリーニングシステムの開発に成功している (Sabike, Yamazaki et. al., 2016, 2017)。開発済の方法をさらに改良し、内蔵バッテリーを備えたポータブル機器や軽量なヒートブロックによる測定の導入、比色・蛍光色素使用による迅速化・視認性の改善などによる低コスト化や簡易迅速な POCT(Point-of-care testing, その場検査)化を図る。さらに、新開発する免疫磁気ビーズ法による菌濃縮と SDBS (ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム)による新しい簡易核酸抽出法を同菌に初めて応用する。これらを統合し、養鶏場や食鳥処理場で実施できるカンピロバクターの POCT を開発する。

(2) 野鳥などの環境サンプルに対するカンピロバクター調査と高感度検査法の開発

カンピロバクター特異的な市販ポリクローナル抗体や自家製モノクローナル抗体(免疫クロマトキットとして市販キット化済、Kawatsu, et. al., 2008, J. Clin. Microbiol., doi: 10.1128/JCM.02170-07)を使用して免疫磁気ビーズ法を開発し、環境サンプルからのカンピロバクターの効率的な濃縮分離を実現する。開発する方法によって培養に依存することなく、同菌の

高感度な検出を実現する。

4. 研究成果

(1) 養鶏場や食鳥処理場で実施できるカンピロバクター陽性・陰性鶏群の鑑別システム開発

出荷時および食鳥処理時にカンピロバクター陽性・陰性の肉養鶏(ブロイラー)群を簡易・迅速かつ正確に鑑別できるシステム開発のために、研究代表者らが開発済の鶏盲腸便(食鳥処理場での即時鑑別を想定)と鶏クロアカ(養鶏場における出荷時の区分処理を想定)からのカンピロバクター直接検出法(濁度 LAMP 法を基盤)を新たに蛍光 LAMP 法に応用した。

培養法との比較の結果、鶏盲腸便 131 サンプルに対して、本法の結果は完全に一致し、診断的特異度・診断的感度はともに 100%を示した。鶏クロアカ 161 サンプルに対しては、診断的特異度は 100%を示す一方で、診断的感度は 93%を示した。濁度 LAMP 法との比較では、鶏クロアカに対する診断的感度が 10%改善されるとともに、他の値はいずれも同じく 100%を示した。さらに両サンプル種いずれにおいても、検出所要時間は濁度 LAMP 法と比較して有意に短縮されたことから、今回開発した蛍光 LAMP 法がより高い性能を示すことが明らかになった。

しかしながら、開発法では核酸抽出キットは不要だが、高速遠心機を使用する必要があるため、現場での実施、POCT 化には障壁がある。現場での実施を実現するために、高速遠心機に代えて乾電池稼働型の卓上遠心機の使用によって、より簡易にサンプルから DNA を抽出する改良が必要である。そのために、SDBS を用いた簡易核酸抽出法を新しく開発し、鶏クロアカ(カンピロバクター・ジェジュニを人為的に添加)に対して実施し、性能評価を試みた。しかし、蛍光 LAMP 法とリアルタイム PCR 法による遺伝子増幅は確認できなかった。SDBS では、鶏クロアカ内に存在すると示唆される遺伝子増幅阻害物質(未同定だが鳥類のクロアカに多量に含有する尿酸を推測)は不活化できない可能性が示唆された。

この問題を解決する工程で、糞便・クロアカよりも阻害物質が少ないと推測されるサンプル(牛血液とヒト唾液)を対象として、開発法を再検討した。その結果、牛血液から牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)のプロウイルス DNA を簡易抽出(高速遠心機は不要)し、蛍光 LAMP 法およびリアルタイム PCR 法で検出できる POCT の開発に成功した。ヒト唾液に対しては阻害物質の不活化が不十分だったためか、十分な検出感度が得られなかった。しかし、SDBS に代えて喀痰除去剤である SAP(セミアルカリプロテナーゼ)を使用することで、唾液からの POCT 検出も可能になった。クロアカ内カンピロバクターに対する POCT 実現のためには、サンプル中に存在する遺伝子増幅阻害物質の影響を緩和するためのさらなる改良が必要であることが分かった。

(2) 野鳥におけるカンピロバクター調査と高感度検査法の開発

カンピロバクターの自然環境における生態・動態を把握するために、2018 年から 2020 年にかけて茨城県(霞ヶ浦沿岸)・宮崎市(大淀川沿岸)・京都市(鴨川沿岸および中洲)において、野鳥(主にカモ)の新鮮な自然排泄糞便 144 サンプルを収集した。リン酸緩衝食塩水により 10%に調整した糞便液の遠心上清から、自動核酸抽出機(MagLEAD 6gC, PSS 社製)とカートリッジカラム(magDEA Dx SV, PSS 社製)を用いて、DNA を抽出した。抽出 DNA に対して、遺伝子検出法(蛍光 LAMP 法とリアルタイム PCR 法)によって、カンピロバクターの保菌率を調査した。予想に反して、すべてのサンプルが陰性を示した。

上述の(1)で示した先行開発においては、鶏クロアカを対象とした蛍光 LAMP 法によるカンピロバクターの陽性率は 33%だった。それゆえ、鶏と比較して、野鳥(主にカモ)におけるカンピロバクターの保菌率は極めて低いか、仮に保菌しているとしても、その保菌量は遺伝子検出法の検出感度を下回る少量である可能性が示唆された。そこで、野鳥の糞便および環境水中に微量に存在するカンピロバクターを培養能喪失株も含めて高感度に濃縮検出するための技術開発を新しく行った。

濃縮検出のために、2 種類の抗原検出 ELISA 用ポリクローナル抗体(Bio-Rad 社製、Invitrogen 社製)と 2 種類のモノクローナル抗体 [大阪健康安全基盤研究所より分与された市販イミュノクロマトキットに使用されている自家製抗体(Kawatsu, et. al., 2008, J. Clin. Microbiol.)] をそれぞれ、市販のプロテイン G コート磁気ビーズ(MBL 社製)に感作させ、免疫磁気ビーズを作製した。PBS(環境水を想定)、カモ糞便(カンピロバクター陰性を確認済)1%乳剤の 2 種類のサンプルにカンピロバクター・ジェジュニ(一夜微好気培養の新鮮菌 ATCC 292111 を使用)を添加したうえで、濃縮処理前後のサンプルをそれぞれリアルタイム PCR 検出により比較した。濃縮前のサンプルについては、PBS は遠心無、カモ糞便 1%乳剤は遠心無および 900xg・2 分間遠心後上清の両方

を上述の自動核酸抽出にて 200ul を 50ul に溶出した(4 倍濃縮)。同時に各々のサンプル 10ml を免疫磁気ビーズ処理後に SDBS 加熱(100 °C・10 分)抽出によって、10ul に濃縮検出した(1000 倍濃縮)。

その結果、いずれの抗体を用いても、濃縮処理後に Ct 値の減少は確認されず、濃縮効果は得られなかった。市販ポリクローナル抗体においては、Bio-Rad 社製では 10 以上、Invitrogen 社製では 6 以上、Ct 値の増加が確認された。2 種類の自家製モノクローナル抗体においては、いずれも検出限界を下回り Ct 値は測定されなかった。培養法に依存することなく、サンプル中の微量なカンピロバクター・ジェジュニを高感度に検出するためには検出系のさらなる改善が必要であることが分かった。

同菌よりも核酸抽出がより簡易に可能なインフルエンザウイルスを対象として、上述の免疫磁気ビーズ法と SDBS 抽出(ウイルスに対しては加熱処理不要であることを確認済)を組み合わせた微量ウイルス濃縮技術(Micro-amount of Virion Enrichment Technique, MiVET)の開発と改良を試行した。PBS と市販鶏肉 10%乳剤(サンプル量をいずれも 50ml に増量)およびカモ糞便に同ウイルスを添加したうえで同法を実施し、上述の自動核酸抽出法と比較した結果、PBS と市販鶏肉では 100 倍から 1000 倍、カモ糞便では 10 倍以上の濃縮効果が確認された。それゆえ、カンピロバクター・ジェジュニを対象とした濃縮検出が失敗した理由はカモ糞便に由来する反応阻害物質ではなく、使用した抗体の菌体捕捉力が極めて弱いことが原因と推測した。

鶏肉からの微量ウイルス濃縮に際しては、前処理工程を 2 点改良し、比較検討した。(1)免疫磁気ビーズとサンプルの感作時間を 15 分から 30 分に延長した上で、 α -アミラーゼなどの消化酵素を添加した。(2)さらに、10%鶏肉乳剤を作製する際に、ストマッカーを使用しない手揉みによる穏やかな混和、ストマッカーによる混和(短時間)、ストマッカーによる混和(長時間)の 3 種を比較検討した。その結果、(1)に加えて、(2)の手揉み法あるいはストマッカーによる混和(短時間)の条件下であれば、従来の核酸抽出法と比較して 100-1000 倍の濃縮性能を確認することができた。ストマッカーによる混和(長時間)では、濃縮性能は 10-100 倍に低下した。

鶏肉のカンピロバクター汚染は腸内細菌に由来するため肉の表面に局限している。それゆえ、鶏肉表面に付着している菌体を手揉み法あるいは短時間のストマッカー処理によって、PBS 中へ充分に遊離させることができる。長時間のストマッカー処理はかえって、鶏肉に由来する抗体捕捉・遺伝子増幅を阻害する物質の PBS 中への遊離を増加させている可能性が示唆された。それゆえ、マイルドかつ短時間のサンプル前処理が本技術の確立に重要であることがわかった。

養鶏場や食鳥処理場で実施できる高感度な POCT の実現については、簡易な DNA 抽出法の実現が必要であることと蛍光 LAMP 法の使用が有用であることを明らかにすることができた。環境サンプルからカンピロバクターなどの微量な病原体を培養法に依存することなく高感度に検出する技術確立には、適切な抗体の選別、酵素処理などによる阻害物質の除去、マイルドかつ短時間のサンプル前処理が重要であることがわかった。開発の過程で比較対象として行った実験結果から、環境中の微量なインフルエンザウイルスの高感度な検出技術開発や牛伝染性リンパ腫診断の POCT 化が実現するという研究成果が派生した。ヒト・動物感染症の両方の診断能力を向上させ得る重要な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamazaki W., Matsumura Y., Thongchankaew-Seo Uraiwan., Yamazaki Y., Nagao M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Development of a point-of-care test to detect SARS-CoV-2 from saliva which combines a simple RNA extraction method with colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Virology	6. 最初と最後の頁 104760 ~ 104760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcv.2021.104760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Y., Thongchankaew Seo U., Nagao K., Mekata H., Yamazaki W.	4. 巻 71
2. 論文標題 Development and evaluation of a point of care test with a combination of EZ Fast DNA extraction and real time PCR and LAMP detection: evaluation using blood samples containing the bovine leukaemia DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 560 ~ 566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.13376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Makino R., Yamazaki Y., Nagao K., Apego F. V., Mekata H., Yamazaki W.	4. 巻 12
2. 論文標題 Application of an Improved Micro-amount of Virion Enrichment Technique (MiVET) for the Detection of Avian Influenza A Virus in Spiked Chicken Meat Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food and Environmental Virology	6. 最初と最後の頁 167 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12560-020-09425-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Liu, Y. H., Yamazaki, W., Huang, Y. T., Liao, C. H., Sheng, W. H., Hsueh, P. R.	4. 巻 52
2. 論文標題 Clinical and microbiological characteristics of patients with bacteremia caused by Campylobacter species with an emphasis on the subspecies of C. fetus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Microbiology, Immunology and Infection	6. 最初と最後の頁 122-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmii.2017.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki, W., Makino, R., Nagao, K., Mekata, H., Tsukamoto, K.	4. 巻 66
2. 論文標題 New micro-amount of virion enrichment technique (MIVET) to detect influenza A virus in the duck feces	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transboundary Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 341-348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.13027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sabike, I. I., Yamazaki, W.	4. 巻 82
2. 論文標題 Improving detection accuracy and time for Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in naturally infected live and slaughtered chicken broilers using real-time fluorescent LAMP approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Food Protection	6. 最初と最後の頁 189-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4315/0362-028X.JFP-18-179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 山崎 渉	4. 巻 22
2. 論文標題 食肉衛生検査における病原体摘発の重要性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 獣医疫学雑誌	6. 最初と最後の頁 83-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2743/jve.22.83	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yamazaki W.
2. 発表標題 A point-of-care test to detect SARS-CoV-2 from saliva
3. 学会等名 1st knowledge sharing activity: PSU-Harvard-Kyoto Collaborative Linkages for Microbial Genome Resources (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamazaki, W.
2. 発表標題 Development of micro-amount of virion enrichment technique (MiVET) and application to highly sensitive detection of avian influenza virus from PBS and chicken meat samples
3. 学会等名 United States-Japan cooperative medical science program 54th annual joint panel meeting on cholera and other bacterial enteric infections (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki, W.
2. 発表標題 Development of micro-amount of virion enrichment technique (MiVET) and application to transboundary animal diseases countermeasures
3. 学会等名 ESVV-EPIZONE 2018, 11th International congress for veterinary virology-ESVV 2018, 12th Annual meeting of EPIZONE (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamazaki, W.
2. 発表標題 Development of micro-amount of virion enrichment technique (MiVET) and application to transboundary animal diseases countermeasures
3. 学会等名 4th Annual GARA (Global African swine fever research alliance) scientific workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 渉
2. 発表標題 食肉衛生検査における病原体摘発の重要性
3. 学会等名 第53回獣医疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 京都大学 大学院医学研究科 社会健康医学系専攻	4. 発行年 2021年
2. 出版社 インターメディカ	5. 総ページ数 228
3. 書名 パブリックヘルスの今日・明日	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 東南アジア地域研究研究所 https://kyoto.cseas.kyoto-u.ac.jp/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------