

異なる3種類の遺伝子検査法を用いた食中毒患者便からの カンピロバクター迅速検査法の検討

小 野 一 晃[†]

埼玉県衛生研究所 (〒338-0824 さいたま市桜区上大久保639-1)

(2013年1月28日受付・2013年4月23日受理)

要 約

糞便からのカンピロバクター検査において、従来の培養法とPCR法、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法、リアルタイムPCR法による遺伝子検査法の結果を比較した。培養法では42/55検体 (76.4%) からカンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) が検出されたが、PCR法で42/55検体 (76.4%)、LAMP法で49/55検体 (89.1%)、リアルタイムPCR法で50/55検体 (90.9%) がそれぞれカンピロバクター陽性と判定された。遺伝子検査法は培養法よりも検出感度が高く、培養法で菌が検出されなかった場合でも、PCR法で3/13検体 (23.1%)、LAMP法で7/13検体 (53.8%)、リアルタイムPCR法で8/13検体 (61.5%) がカンピロバクター陽性と判定された。遺伝子検査法では、いくつかの検体でDNA抽出試料中の反応阻害物質により偽陰性と判定されたが、検体を滅菌蒸留水で5~10倍希釈することで改善がみられた。遺伝子検査法は糞便からのカンピロバクターの迅速検査法として有効であることが示唆された。——キーワード：カンピロバクター、LAMP法、患者便、PCR法、リアルタイムPCR法。

----- 日獣会誌 66, 483~487 (2013)

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) は人の下痢症の起原因菌とされ、近年、わが国でも欧米諸国と同様に、本菌による食中毒事例が増加する傾向にある [1]。カンピロバクター食中毒は、喫食してから発症するまでの潜伏期間が一般に2~5日と他の食中毒細菌に比べて長く [2]、また、培養法による糞便検査では、結果判定までに2日以上を要する。食中毒事件発生時の行政対応の遅れは、場合によっては健康被害の拡大につながる懸念されることから、迅速な検査法の開発が強く求められている。

現在、さまざまな分子生物学的手法が微生物の迅速検査に利用されているが [3-6]、国内におけるカンピロバクター食中毒発生時に、複数の遺伝子検査法と培養法の結果を比較した例はみられない。今回、患者便のカンピロバクター検査において、PCR法、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法及びリアルタイムPCR法の3種類を用いた遺伝子検査法と従来の培養法を比較し、迅速な結果判定が期待される遺伝子検査法の有効性について検討した。

材料及び方法

供試材料：2007年6月~2012年7月にかけて、当所に搬入された下痢症患者の糞便を対象に検査を行った。患者の喫食状況や症状、潜伏時間など疫学調査の結果から、カンピロバクター食中毒 (腸炎) が疑われたもの55検体 (集団発生12事例)、それ以外のもの100検体、計155検体を供試した。

培養法：カンピロバクターの定量検査法は、糞便1gを9mlの滅菌生理食塩水に入れ、段階希釈後各0.2mlをカンピロバクター血液無添加選択培地 (関東化学株, 東京) に選択サプリメント (関東化学株, 東京) を添加したmCCDA培地 [7] に塗抹し、微好気状態 (O₂ : 5%, CO₂ : 10%, N₂ : 85%) で42℃, 48時間培養後、発育したカンピロバクター菌数を測定し、常法に基づき [8] 菌種の同定を行った。

なお、上述の試験に並行して、ニュートリエントブイヨンNo. 2 (関東化学株, 東京) にプレストンカンピロバクター選択サプリメント (関東化学株, 東京) とカン

[†] 連絡責任者：小野一晃 (埼玉県衛生研究所)

〒338-0824 さいたま市桜区上大久保639-1

☎048-853-7196 FAX 048-853-5164

E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

表1 検査開始日の違いによる糞便中のカンピロバクター菌数の比較

検査開始日	糞便中のカンピロバクター菌数(cfu/g)							
	50未満		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
	陰性 ^{a)}	陽性 ^{a)}						
喫食後10日以内 (n=35)	3	5	2	2	10	3	5	5
喫食後13日以降 (n=20)	10	8	2	0	0	0	0	0

a) 増菌培養後の結果

ピロバクター発育サプリメント (関東化学株, 東京) を添加し, 5%量の馬脱繊維血液 (株日本バイオテスト研究所, 東京) を加えた9mlのプレストン培地 [9] に糞便1gを入れ, 増菌培養後mCCDA培地に塗抹し, 同様に定性試験を行った。

加えて赤痢菌, サルモネラ属菌, 腸炎ビブリオ, 黄色ブドウ球菌, 病原大腸菌, ウエルシュ菌及びセレウス菌を対象として, 常法に基づき [10], 糞便中の食中毒細菌検査を行った。

遺伝子検査法: 1検体当たり180~220mgの糞便から, 市販のQIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) を用い, キット添付のプロトコルに従ってDNAを抽出し, PCR法, リアルタイムPCR法, LAMP法の検査を行った。

PCR法: Lintonら [11] の報告に準じて, *Campylobacter jejuni/coli*, *C. jejuni* 及び *C. coli* 同定用, 計3種類のプライマーを用いて, 遺伝子増幅装置 (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, U.S.A.) により行った。なお, 0.1%牛血清アルブミンを (タカラバイオ株, 東京) を反応液に1/10量添加した。

LAMP法: 市販のキット (Loopamp *Campylobacter* Detection kit, 株栄研化学, 東京) を用い, 操作はキット添付のプロトコルに従った。遺伝子増幅装置 (Real-time Turbidimeter LA-320C, 株栄研化学, 東京) により反応後, 判定した。

リアルタイムPCR法: 市販のキット (TaqMan *Campylobacter jejuni* Detection kit, Applied Biosystems, U.S.A.) を用い, 操作はキット添付のプロトコルに従った。遺伝子増幅装置 (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, U.S.A.) により, プロトコルの判定基準に基づき, Ct値 (検出閾値サイクル数) が45未満の試料を陽性と判定した。

成 績

カンピロバクター食中毒が疑われた患者便 (12事例; n=55) の検査結果: 培養法については, 供試した42/55検体 (76.4%) でカンピロバクターが検出された。表1に検査開始日の違いによる糞便中のカンピロバ

表2 検査開始日の違いによる培養法と遺伝子検査法の比較

検査開始日	培養法の結果	遺伝子検査法による陽性率 (%)		
		PCR法	LAMP法	リアルタイムPCR法
喫食後10日以内 (n=35)	陽性 (n=32)	31/32 (96.9%)	32/32 ^{a)} (100.0%)	32/32 ^{b)} (100.0%)
	陰性 (n=3)	1/3 (33.3%)	2/3 (66.7%)	3/3 (100.0%)
喫食後13日以降 (n=20)	陽性 (n=10)	8/10 (80.0%)	10/10 (100.0%)	10/10 (100.0%)
	陰性 (n=10)	2/10 (20.0%)	5/10 (50.0%)	5/10 (50.0%)

a) 滅菌蒸留水で10倍希釈した試料を用いた再試験で陽性となった3検体を含む

b) 滅菌蒸留水で5倍希釈した試料を用いた再試験で陽性となった1検体を含む

クター菌数を比較した結果を示す。疫学調査において, 原因と推定された食品を喫食してから10日以内に検査した患者便 (事例1~7) については, 32/35検体 (91.4%) から菌が検出され, 糞便中の菌数は, 23/35検体 (65.7%) が10⁵cfu/g以上であったのに対し, 喫食後13日以降に検査した患者便 (事例8~12) については, 10/20検体 (50.0%) から菌が検出され, 糞便中の菌数は, 18/20検体 (90.0%) が50cfu/g未満であった。

次に, 検査開始日の違いによる培養法と遺伝子検査法を比較した結果を表2に示す。

PCR法については, 供試した42/55検体 (76.4%) でカンピロバクター陽性と判定された。糞便中の菌数が10³cfu/g以上の29検体については, PCR法によりカンピロバクター陽性と判定されたが, 50cfu/g未満の3/26検体 (11.5%) については, 培養法で菌が検出されてもPCR法では陰性であった。一方, 培養法で菌が検出されなくてもPCR法で陽性と判定されたものが3/13検体 (23.1%) あった。

LAMP法については, 供試した46/55検体 (83.6%) でカンピロバクター陽性と判定された。リアルタイムPCR法で陽性でLAMP法で陰性と判定された4検体のうち3検体については, 抽出試料に市販のLAMP法キット付属の陽性コントロール (1μl) を加えた場合にも陰性であった。これら3検体について, 滅菌蒸留水で10倍希釈した試料を用いて再試験を行ったところ, 陽性と判定された。なお, 培養法で陰性であった7/13検体 (53.8%) についても, LAMP法で陽性であった。

リアルタイムPCR法については, 供試した49/55検体 (89.1%) でカンピロバクター陽性と判定された。なお, 培養法で菌が検出された1検体についてはIPC (internal positive control) の増幅が起らず偽陰性が

表3 喫食後13日以降に検査した5事例の患者便20検体の検査結果

事例 No.	検査開始日	培養法		遺伝子検査法		
		菌数 (cfu/g)	菌の種類	PCR法	LAMP法	リアルタイムPCR法
8	21日	<50	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
		5.0×10^3	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
		<50	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
9	13日	<50	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
		<50	ND ^{b)}	-	+ ^{c)}	+
		<50	ND	+	+	+
		<50	<i>C. jejuni</i>	-	+	+
10	13日	<50	ND	+	+ ^{c)}	+
		<50	<i>C. coli</i>	+	+	+
		<50	ND	-	-	-
11	13日	<50	ND	-	-	-
		<50	<i>C. coli</i>	-	+	+
		<50	ND	-	+	+
		5.0×10^3	<i>C. coli</i>	+	+	+
		<50	ND	-	+	+
12	13日	<50	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
		<50	ND	-	-	-
		<50	ND	-	-	-
		<50	ND	-	-	-
		<50	<i>C. jejuni</i>	+	+	+

a) 共通食を喫食後検査を開始するまでに要した日数

b) 増菌培養後も菌検出されず

c) 滅菌蒸留水で10倍希釈した試料を用いた再試験で陽性

疑われたため、滅菌蒸留水で5倍希釈した試料を用いて再試験を行ったところカンピロバクター陽性と判定された。また、培養法で陰性であった8/13検体(61.5%)についてもリアルタイムPCR法で陽性であった。

次に、喫食後13日以降に検査した5事例(事例No. 8~12)の患者便20検体の培養法及び遺伝子検査法による結果を表3に示す。事例8と事例12では培養法と遺伝子検査法の結果に差はみられなかったが、培養法で菌が検出されず、遺伝子検査法でのみカンピロバクター陽性と判定されたものが、事例9で2検体、事例10で1検体、事例11で2検体みられた。なお、いずれの事例においても、各グループ内で複数の患者が複数の遺伝子検査法でカンピロバクター陽性と判定された。

カンピロバクター食中毒が疑われなかった患者便(n=100)の検査結果: 患者の喫食状況や症状、潜伏時間など疫学調査の結果から、カンピロバクター食中毒(腸炎)が疑われなかった100検体の糞便については、ウエルシュ菌が検出されたものが17検体(17.0%)、黄色ブドウ球菌が検出されたものが2検体(2.0%)あったが、カンピロバクターを含めその他の細菌はすべて陰性であった。

一方、遺伝子検査法では、1検体(1.0%)がLAMP

法とリアルタイムPCR法でいずれも陽性であった。なお、リアルタイムPCR法では、3検体でIPCの増幅が起こらず偽陰性が疑われたが、滅菌蒸留水で5倍希釈した試料を用いたことで改善された。

考 察

カンピロバクター食中毒が疑われた12事例について患者便中の菌数を測定したところ、検査開始日により結果が大きく異なることが明らかとなった。喫食してから発症までの潜伏期間は、各人の喫食量やホスト側の要因などにより左右されることが推測されたことから、同一グループ内において、共通食を喫食してから実際に糞便を検査するまでに要した日数を基に調査を行った。その結果、喫食後13日以降に検査した場合には、90.0%(18/20)の糞便中のカンピロバクター菌数が50cfu/g未満であり、10日以内に検査を開始した場合に比べ大きく減少していた。本菌による食中毒の潜伏期間は2~5日と他の細菌性食中毒に比べて長いこと、保健所等への通報の遅れなどにより初動調査が遅れた場合には、従来の培養法による検査では原因菌を明らかにすることが難しくなる可能性が示唆された。

一方、患者便から直接DNAを抽出して遺伝子検査を試みたところ良好な結果を得た。培養法で菌が検出されなかった場合でも、遺伝子検査法の場合にはPCR法で3/13検体(23.1%)、LAMP法で7/13検体(53.8%)、リアルタイムPCR法で8/13検体(61.5%)がカンピロバクター陽性と判定された。このように、遺伝子検査法では従来の培養法で菌が検出されなかった場合でも、糞便中のカンピロバクターの有無を判定することが可能であった。

本試験に用いたDNA精製キットは糞便からのDNA抽出法としてその使用が推奨されている[5, 12]。しかし、食中毒患者便から直接DNAを抽出し、遺伝子検査法を試みたところ、いくつかの検体で偽陰性の結果が得られたことから、抽出試料中の反応阻害物質を完全には除去できないことが示唆された。

糞便中に含まれる反応阻害物質としては、多糖類、胆汁酸、ビリルビン、ヘモグロビンなどがあげられるが[13, 14]、PCR法の場合には、反応液中に牛血清アルブミン(BSA)を加えることで[6]、LAMP法やリアルタイムPCR法の場合には、抽出試料(原液)の5~10倍希釈液を用いることで良好な結果が得られた[15]。

今回、3種類の遺伝子検査法を比較したところ、PCR法は、培養法で菌分離された42検体中3検体(7.1%)が陰性と判定された。これらの検体については、他の2法ではいずれも陽性と判定されたことから、検出感度が劣ることが示唆された。

LAMP法は、リアルタイムPCR法で陽性であった50

検体中1検体(2.0%)が陰性と判定された。この検体については、リアルタイムPCR法でIPCの反応阻害がみられず、また、糞便中の菌数が50cfu未満/gと低かったことから、両者の検出感度の違いによるものと考えられた。キット添付のプロトコルによるそれぞれの検出感度は、リアルタイムPCR法で1~5cfu/tube, LAMP法で60cfu/tubeと記載されている。また、今回用いたLAMP法の試薬では、4種類の異なるプライマーによる反応が同時に進行しないと、いわゆるループを形成せずに継続した反応が起こらないことから、使用したリアルタイムPCR法の試薬に比べ、反応阻害物質の影響をより受けやすいことが示唆された。

リアルタイムPCR法は、今回用いた遺伝子検査法の中で良好な成績を示したことから、カンピロバクター食中毒が疑われた患者便について追加試験を行った。その結果、供試した15検体中1検体については、増菌培養法で菌が検出されたにも関わらず(糞便中の菌数は50cfu/g未満)IPCの増幅が起こらず、試料を滅菌蒸留水で5倍希釈後、さらにBSAを1μl/tube加えることで陽性と判定された。

本菌による食中毒かどうかを判断するためには、細菌検査の結果の他に、①鶏肉や鶏(牛)レバーなどの食品を生または半生状態で喫食していないか、②喫食してから発症するまでの潜伏期間や症状はどうか、③当該施設以外で共通の食事はないかなどの喫食状況調査の結果を十分に考慮する必要がある。今回、患者の喫食情報などの疫学調査の結果から、カンピロバクター食中毒が疑われた場合と、カンピロバクター食中毒が疑われなかった場合とに分けて検査を行った。このうち、疫学調査によりカンピロバクター食中毒が疑われなかった場合には、遺伝子検査法で陽性と判定された検体は、わずか1/100検体(1.0%)に過ぎず、既報の健康保菌者の割合[2]と同等の値であることがわかった。遺伝子検査法では、生菌だけではなく死菌も同様に検出してしまう可能性があるが、健康な人の糞便について、遺伝子検査を行ってもカンピロバクター陽性と判定される可能性は低いことが推察された。このことから、同一の食品を喫食したグループ内で、複数の患者が遺伝子検査により陽性と判定された場合には、仮に培養法で菌が検出されない場合でもカンピロバクター食中毒である可能性が高いことが示唆された。

このように、疫学調査の結果と複数(2種以上)の遺伝子検査法の結果を総合的に判断することにより、従来の培養法では患者便から菌が検出されない場合においても、カンピロバクターが食中毒の原因菌であるかどうかの推定が可能であることが示唆された。特に検査の開始が遅れ、培養法では菌の検出が難しい場合に活用できることが期待された。加えて、遺伝子検査法では、検査開

始後3~4時間で結果が得られたことから、カンピロバクター食中毒発生時の迅速検査法として有効であることが示唆された。

引用文献

- [1] Olson CK, Ethelberg S, Wilfrid van Pelt, Tauxe RV : Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. *Campylobacter*, Nachamkin I, et al eds, 3rd ed, 163-189, ASM press, Washington DC (2008)
- [2] Blaser MJ, Engberg J : Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Campylobacter*, Nachamkin I, et al eds, 3rd ed, 99-121, ASM press, Washington DC (2008)
- [3] Amri AA, Senoh AC, Ismaeel AY, Al-mahmeed AE, Botta GA : Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J Medical Microbiol*, 56, 1350-1355 (2007)
- [4] Keramas G, Bang DD, Lund M, Madsen M, Bunkenborg H, Telleman P, Christensen CBV : Use of culture, PCR analysis, and DNA microarrays for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from chicken feces, *J Clin Microbiol*, 42, 3985-3991 (2004)
- [5] Inglis GD, Kalischuk LD : Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces, *Appl Environ Microbiol*, 69, 3435-3447 (2003)
- [6] Rudi K, Høidal HK, Katla T, Johansen BK, Nordal J, Jakobsen KS : Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification, *Appl Environ Microbiol*, 70, 790-797 (2004)
- [7] Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D : Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces, *J Clin Microbiol*, 19, 169-171 (1984)
- [8] On SL : Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms, *J Clin Microbiol Rev*, 9, 405-422 (1996)
- [9] Bolton FJ, Robertson L : A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol*, 35, 462-467 (1982)
- [10] Bernard KA, Dumler JS, Petti CA, Richter SS, Vandamme PAR : Bacteriology. Manual of Clinical Microbiology, Versalovic J, et al eds, 10th ed, 308-899, ASA press, Washington DC (2011)
- [11] Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J : PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, *J Clin Microbiol*, 35, 2568-2572 (1997)
- [12] McOrist AL, Jackson M, Bir AR : A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples, *J Microbiol Methods*, 50, 131-139 (2002)
- [13] Cone R, Hobson A, Huang M : Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions, *J Clin Microbiol*, 30, 3185-3189 (1992)
- [14] Wilson CJ : Inhibition and facilitation of nucleic acid

amplification, J Appl Microbiol, 26, 9-11 (1997)
[15] Chaban B, Ngeleka M, Hill JE : Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs

reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals, BMC Microbiol, 10, 73-79 (2010)

Investigation of Rapid Detection Method for *Campylobacter jejuni/coli* in Human Diarrheal Feces Using Three Different DNA-Based Methods

Kazuaki ONO[†]

* *Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, 338-0824, Japan*

SUMMARY

The results of *Campylobacter jejuni/coli* detection obtained using the three DNA-based methods PCR, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR were compared to those obtained by conventional culture. By culturing, *C. jejuni/coli* was detected in 42/55 (76.4%) samples, whereas 42/55 (76.4%) were found to be positive using PCR, 49/55 (89.1%) were found to be positive using LAMP, and 50/55 (90.9%), were found to be positive using real-time PCR. The DNA-based methods were more sensitive than culturing, with three (23.1%), seven (53.8%) and eight (61.5%) of 13 culture-negative samples found to be *C. jejuni/coli* positive using the PCR, LAMP and real-time PCR methods, respectively. Although there were several false negative cases observed, the 5-10-fold dilution of the samples with distilled water facilitated the positive reaction. The DNA-based methods were rapid and thought to be substantially more effective in detecting *C. jejuni/coli* in diarrheal feces than conventional culturing.

—Key words : *Campylobacter jejuni/coli*, LAMP, patient feces, PCR, real-time PCR.

[†] Correspondence to : Kazuaki ONO (*Saitama Institute of Public Health*)

639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, 338-0824, Japan

TEL 048-853-7196 FAX 048-853-5164 E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

—*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 66, 483 ~ 487 (2013)