

カンピロバクターのリアルタイム PCR による菌数定量の問題

富田 茉佑¹、畑中律敏^{2,3}、Sharda Prasad Awasthi^{2,3}、日根野谷 淳^{2,3}、山崎 伸二^{2,3}

¹大阪府立大学 生命環境科学域 獣医学類、²大阪公立大学大学院 獣医学研究科、

³大阪国際感染症研究センター

背景・目的：*Campylobacter jejuni* は食中毒細菌であり、我が国においても毎年多くの患者が発生している。主に加熱不十分な鶏肉の喫食により感染し、腹痛や下痢を引き起こす。本菌による食品汚染の定量には、寒天培地を用いた菌数カウント（CFU）やリアルタイム PCR が広く使用されている。平板塗抹法は安価かつ簡便である一方で、培養に 2 日必要である。一方で、リアルタイム PCR は、標的遺伝子の DNA 量を検出・定量する方法で、感度が高く早期に結果を出せる。しかしながら、DNA 量から正確かつ信頼性のある菌数を定量するには、適切な検量線を作成する必要がある。本研究では、リアルタイム PCR での菌数定量において、より正確に CFU の値と同等の値を求めるための検量線の作成方法について検討した。

材料・方法：*C. jejuni* JCM2013 株および 81-176 株を、(I)5 %馬血液寒天培地で 48 時間静置培養、5 mL ボルトン液体培地で(II)24 時間または(III)48 時間振とう培養した。培養後の菌体をそれぞれ、PBS (pH 7.4) に懸濁、OD₆₀₀ =1 に調整し、5 %馬血液寒天培地に平板塗抹して CFU を算出するとともに、アルカリ熱抽出により DNA テンプレートを作製した。

- ①CFU を基に、テンプレートを調整して PCR を行い、検量線を作成・比較した。
- ②各テンプレート中における DNA のコピー数を droplet digital PCR(ddPCR)により定量した。
- ③各培養後の菌体の生死状態を確認するために、DAPI/PI 染色を実施した。

結果・考察：各培養後の OD₆₀₀ =1 における平板塗抹法の結果は JCM2013 株で(I)9.0±0.3, (II)9.4±0.2, (III)7.6±0.7、81-176 株で(I)8.4±1.4, (II)9.6±0.5, (III)8.6±0.0 log CFU/mL となり同一菌濃度における菌数カウントの値は異なっていた。次に CFU を基に各 DNA テンプレートを同一 CFU となるよう調整し、リアルタイム PCR を行った結果、各テンプレートで Ct 値は異なっており、いずれの菌株においても Ct 値は培養条件(III)<(I)<(II)の順に大きくなった。一方で各培養後の OD₆₀₀ =1 にて作製したテンプレートの Ct 値は JCM2013 株で 20、81-176 株では 19 とほぼ同等であり、培養条件の違いにおける DNA 量に差はないと考えられた。そこで DNA コピー数を定量するために ddPCR にて定量した結果、JCM2013 株、81-176 株でそれぞれ約 10, 11 log copies/mL でありいずれも CFU 値と DNA コピー数に差があった。各培養後の菌体を DAPI/PI 染色を行った結果、CFU 値と DNA コピー数に差が大きいものほど、死菌の割合が高い傾向が見られた。これらの結果から、培養条件によって死菌の割合が異なるためリアルタイム PCR で検量線を作成する際には、死菌の DNA を排除する方法の構築が今後必要であると考えられる。