

第3世代 PCR(ddPCR)を用いた *Campylobacter* 属菌の菌数定量

畑中 律敏、S.P. Awasthi、日根野谷 淳、山崎 伸二
大阪公立大学大学院 獣医学専攻、大阪国際感染症研究センター

【背景】

Campylobacter jejuni や *C. coli* は、我が国のみならず世界中で食中毒を引きおこし問題となっている。本菌による食中毒を制御していくためには、食品中や食環境の本菌による汚染を検出するだけでなく菌数を定量し、汚染経路を把握していくことが重要である。菌数の定量には平板塗抹法や混釈培養法等の生菌数を計測する方法が汎用されている。しかしながら本菌種の生菌数の定量には、選択性の高い分離培地を用い、微好気条件下で48時間の培養が必要である。さらに本菌種は遊走性が高いため、しばしばコロニー数のカウントを困難とする。また、real-time PCRを用いた菌数の定量も行われているが、検量線を作成する際にCFUを基にしており、結果が培養法および実施者によって異なることが示唆される。そこでこれらの問題を解決するために本研究では第3世代 PCR droplet digital PCR (ddPCR)を用いた菌数の絶対定量を試みた。

【方法】

C. jejuni 81-176株および *C. coli* ATCC33559株を血液寒天培地に画線塗抹し37°C嫌気条件下(10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂)で48時間培養後、発育したコロニーをPBSに懸濁した。菌液をOD₆₀₀=1.0に調整後血液寒天培地を用い菌数測定を行うとともに、アルカリ熱抽出法で鋳型DNAを調整した。菌数測定の結果より各種菌濃度の鋳型DNAを調整し、構築した *C. jejuni*, *C. coli* 特異的 ddPCRにてターゲット遺伝子 (*cdt* 遺伝子: 1菌体当たり1コピー)のコピー数を定量した。

【結果・考察】

C. jejuni および *C. coli* が100 CFU/μL相当になるよう調整した鋳型DNAを用いてddPCRを行った結果、鋳型DNA内の *cdt* 遺伝子のコピー数は *C. jejuni* で1400 ± 59 copies/μL、*C. coli* で2100 ± 61 copies/μLであった。以上のことより、鋳型DNA内にはCFUによる菌数よりも10倍以上多い菌体のDNAが含まれていることが明らかとなった。これらの鋳型DNAには培地上に発育できる菌体、VBNC(生きてはいるが発育できない)状態の菌体等の生菌と培養過程において死菌となった菌体のDNAも含まれていると考えられ、今後死菌のDNAを分解するPMA処理を組み合わせた生菌のDNAのみを検出定量できる系の構築・検証を行うことが必要であると考えられた。