



Development of a Method for Detecting *Coxiella burnetii*  
in Cheese Samples

Akihiko Hirai

Division of Food Microbiology

Department of Microbiology

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

チーズからの *Coxiella burnetii* 検出法の開発に関する研究

東京都健康安全研究センター  
微生物部 食品微生物研究科  
平井 昭彦

## 目 次

英文要旨	1
要旨	6
I Development of a Method for Detecting <i>Coxiella burnetii</i> in Cheese Samples	11
1. Introduction	11
2. Materials and Methods	11
3. Results	13
4. Discussion	14
5. References	15
II 市販牛乳の <i>Coxiella burnetii</i> 汚染状況および鶏卵中の <i>C. burnetii</i> 検査法の検討	17
1. 緒言	17
2. 実験方法	18
1. 試料	18
2. 牛乳からの DNA 抽出	18
3. 鶏卵からの DNA 抽出法の検討	18
4. プライマーおよび PCR 条件	19
5. 検出感度の検討	19
6. マウスによる <i>C. burnetii</i> の分離試験	19
3. 結 果	19
1. 市販牛乳の <i>C. burnetii</i> 汚染状況調査	19
2. 鶏卵からの PCR 法による <i>C. burnetii</i> 検出法の検討	20
3. PCR 法による卵黄からの <i>C. burnetii</i> 検出感度	20
4. PCR 法を用いた鶏卵中の <i>C. burnetii</i> 検査結果	21
4. 考察	21
5. 文献	22
謝辞	24

## Development of a Method for Detecting *Coxiella burnetii* in Cheese Samples

*Coxiella burnetii* is an obligate intracellular bacterium and the causative agent of Q fever. It affects a variety of arthropods, birds and mammals and is found worldwide, except in New Zealand. Q fever manifests as either acute or chronic illness in humans. The acute disease is usually a flu-like, self-limiting illness that is accompanied by fever, headache and myalgia. Chronic disease occurs in approximately 1%–3% of patients ; endocarditis and hepatitis are the most frequently seen manifestations.

The most common source of infection in humans is the inhalation of aerosols contaminated with *C. burnetii*. Infected animals such as goats, sheep, cattle, dogs and cats excrete high concentrations of *C. burnetii* in their urine, feces, milk and birth products. The sources of Q fever outbreaks recently occurred in the Netherlands are thought to be dairy goats and sheep farms.

The consumption of contaminated raw milk and other dairy products has also been proposed as a route of human infection. Several epidemiological studies suggest that the consumption of dairy products was a potential source of Q fever outbreaks in France, Newfoundland and Greece. *C. burnetii* is very stable in the environment; hence, dairy products made from unpasteurized milk are a potential source of human infection. However, few studies have investigated the presence of *C. burnetii* in cheese. Therefore, this study aimed to develop a method for detecting *C. burnetii* in cheese samples and determine the presence of *C. burnetii* in cheeses that are available in commercial markets. The method and results are

summarized below:

- 1) As *C. burnetii* cannot be cultured artificially, nested PCR was used as a screening method for detecting the organisms. A novel method of extracting *C. burnetii* DNA from cheese, which could be used in nested PCR, was developed. Three types of cheese (i.e., soft, semihard and hard) were used to optimize the screening conditions. To determine the optimal melting temperature, cheeses were incubated with PBS at 45°C, 50°C and 56°C and then homogenized by a stomacher. Small amounts of solid substance remained in hard cheeses at 45°C and 50°C ; hence, 56°C was selected as the melting temperature.
- 2) The effective separation of fat and protein from the homogenate was examined by centrifugation at  $900 \times g$  and  $400 \times g$  at 4°C. The fat had solidified due to the low temperature (4°C) during centrifugation; hence, the fat was easy to separate. The average volumes of the aqueous layers were 14.8 ml and 14.5 ml at  $900 \times g$  and  $400 \times g$ , respectively. The aqueous layer at  $900 \times g$  was greater than that at  $400 \times g$ . The aqueous layers was then transferred to new tubes and centrifuged at  $22,000 \times g$ . The average pellet weight (0.53 g) at  $900 \times g$  was lower than that (0.68 g) at  $400 \times g$ . Therefore, a centrifugal force of  $900 \times g$  was adopted.
- 3) To optimize the re-extraction step, residual fat and protein were examined as described above. The melting conditions were identical for all 3 types of cheese. The average volumes of the aqueous layers recovered at  $900 \times g$  did not differ from that recovered at  $400 \times g$  after centrifuging for re-extraction. However, the pellet weights were too small to measure.

- 4) DNA was extracted as described previously with some modifications to enable efficient extraction from cheese pellets. Each pellet was resuspended in PBS, and SDS, proteinase K and glycogen were subsequently added. The mixture was incubated at 56°C for 1 h. Sodium iodide solution and isopropanol were added to the mixture to pellet the DNA. The DNA pellet was then washed twice with 70% ethanol and dried. The dried pellet was dissolved in 50 µl distilled water, and the DNA was used as a template. A new DNA extraction method from cheese was developed on the basis of these results. *C. burnetii* DNA was detected by nested PCR targeting the *com1*, *htp-B* and *icd* genes. The result was considered positive if all 3 target genes were successfully amplified.
- 5) *C. burnetii* Nine Mile phase II was inoculated in a Buffalo green monkey (BGM) cell culture and incubated in a CO<sub>2</sub> incubator for 7–10 days. After the medium was collected, *C. burnetii* particles were removed from the BGM cells by low-gravity centrifugation and washed twice with PBS. After the final centrifugation, pelleted *C. burnetii* was resuspended in a formalin–saline solution for disinfection. Thereafter, the disinfected *C. burnetii* was washed with and resuspended in PBS. *C. burnetii* was quantified as particles/ml. The samples were then frozen at -80°C until use.
- 6) A 10-fold dilution series of *C. burnetii* particles were spiked into semihard-type cheese. The DNA was extracted as described above to determine the detection limit. The samples spiked with  $6.0 \times 10^2$  particles/g were found to be positive for all 3 target genes; therefore, this was determined to be the detection limit of the method.
- 7) A total of 147 cheese samples were collected from commercial

markets in the Tokyo Metropolitan area from June 2005 to December 2008. The samples included 96 natural cheeses made from pasteurized milk, 41 natural cheeses made from unpasteurized raw milk, and 10 processed cheeses. One hundred seventeen samples were imported products, chiefly from France, Italy and Switzerland; whereas, 30 were domestic products. Of the 147 examined cheese samples, 28 (19.0%) were positive for *C. burnetii* DNA. Positive samples included 20 (20.8%), 7 (17.1%) and 1 (10.0%) of the 96 natural, 41 raw milk and 10 processed cheese, respectively.

- 8) The amplified PCR products were purified and sequenced. The sequence data were aligned using ClustalW. Differences in the gene sequences were not found in the successfully sequenced samples. The only exception was at position 745 of the *icd* gene, where guanine in the Nine Mile strain was substituted with adenine in all of the sequenced samples.
- 9) The viability of *C. burnetii* in the 28 PCR-positive samples was assessed by inoculation into immunosuppressed mice. Three weeks after inoculation, DNA from the mouse spleen was extracted and the spleen stamp was examined. All samples tested by PCR and microscopic examination were found to be negative.

In conclusion, we developed a PCR-based method for effectively separating the protein and fat in cheese by optimizing the conditions of each step. PCR-based methods have already been developed for detecting *C. burnetii* DNA in milk, eggs and mayonnaise. The detection limit reported herein ( $6.0 \times 10^2$  particles/g) is similar to that reported in milk, eggs and mayonnaise. Among the examined

commercial cheese samples, 19% were positive for *C. burnetii* DNA. Furthermore, 20% of the domestic cheese samples and 7 raw milk cheeses from France and Italy were positive in the PCR test. *C. burnetii* viability was examined in PCR-positive samples; however, all samples were negative. Although *C. burnetii* appears to have lost its viability in these cheeses, our study is limited by its small sample size. Therefore, the significance of the oral route of infection remains controversial. Further studies are required to determine the risk of *C. burnetii* infection via the oral route. The method presented herein is a useful tool for determining the presence of *C. burnetii* DNA in cheese samples for the purpose of food hygiene.

## チーズからの *Coxiella burnetii* 検出法の開発に関する研究

*Coxiella burnetii* は偏性細胞内寄生性細菌であり、ヒトに熱性疾患である Q 熱を引き起こす。本菌はニュージーランドを除くほぼ世界中に分布しており、家畜、野生動物、野鳥、マダニが保菌している。Q 熱の病態には発熱、筋肉痛等のインフルエンザ様症状を呈する急性 Q 熱と、このうち 1~3% の患者が発症する慢性 Q 熱があり、慢性 Q 熱を発症すると心内膜炎や肝炎を呈して予後不良である。

本症のヒトへの感染経路は主に経気道感染である。本菌に感染したヤギ、ヒツジ、ウシなどの家畜、イヌやネコなどのコンパニオンアニマルは、尿、糞便、乳や出産時の胎盤・羊水等の中に大量の本菌を排菌して環境を汚染する。本菌は環境中で長期間生存できることから、塵芥と共に風に巻き上げられた本菌が呼吸器を介してヒトに感染する。近年オランダで発生した Q 熱アウトブレイクは、酪農用ヤギと羊農場が原因と推定されている。

一方、生乳や乳製品による経口感染も示唆されており、フランス、カナダおよびギリシャで発生した Q 熱アウトブレイクでは、それぞれ未殺菌乳や乳製品、ヤギ乳チーズあるいは田園地帯で作成されたチーズの摂取などが感染経路と推定されている。しかしながら、本菌の経口感染に関しては未だ不明な点も多く、また乳製品の本菌汚染についても調査報告はほとんど無く実態は不明である。そこで、本菌による乳製品の汚染状況に関する基礎的研究として、多量のタンパク質と脂肪を含み検査が困難であるチーズからの本菌検出方法を開発した。また、開発した方法を用いて市販チーズの汚染実態を調べ、以下の結果を得た。

- 1) *C. burnetii* は培地で培養できないため、チーズから直接 DNA を抽出し本菌に特異的な遺伝子を PCR 法で検出する遺伝子検

査を、スクリーニング検出法として用いることとした。最初にタンパク質と脂肪を除去し菌体を分離する方法を検討した。ソフト、セミハードおよびハードの3タイプのチーズを使用し、各チーズ10gにPBS20mlを加え、45℃、50℃および56℃で加熱後ストマッキングし、チーズの溶解性を検討した。その結果、ハードタイプチーズは、45℃あるいは50℃加熱では一部固形物が残るが、56℃加熱では完全に溶解することが判明し、加熱温度には56℃を採用することとした。

2) 次に、タンパク質を含む固形分と脂肪を除去する方法について、低温・低速遠心法を検討した。乳剤を900×gあるいは400×gで20分間4℃にて遠心し、水層（中間層）を分取して容量を計測し、分離状況を調べた。遠心後、チーズの脂肪は4℃の低温で上層に固化し、容易に水層との分別が可能であった。また、分取した水層の容量は900×gで14.8 ml(回収率74.2%)、400×gで14.5 ml(回収率72.6%)であり、900×gの回収率がやや高い成績であった。さらに、それぞれの水層を22,000×gで20分間4℃で遠心し、沈渣の重量を比較した。900×gから分取した水層からの沈渣は0.53 gであり、400×gの水層からの沈渣は0.68 gであった。以上の検討から、900×gの遠心の方が水層の回収率が高く、また残渣重量が少ないことが明らかとなり、低速遠心には4℃、900×gを採用することとした。

3) 固化した脂肪と固形分からの菌の再抽出について、上記と同様の検討を行った。脂肪と固形分にPBSを再度加え加熱後ストマッキングした結果、3タイプ全てのチーズが全ての温度で溶解し、差異は認められなかった。また、乳剤から再抽出時にPBSを分離する遠心力も、900×gあるいは400×gの水層で差異は認められず、また沈渣重量にも差異は認められなかった。以上の検討結果を基に、チーズから沈渣として菌体を得る方法を確立した。

- 4) 沈渣からの DNA 抽出は、既報の検査法を基にして、チーズの遠心沈渣から効果的に抽出できるよう修正した。沈渣を PBS に再浮遊し、SDS, proteinase K および glycogen を加えて 56°C 1 時間消化した。消化後、沃化ナトリウムとイソプロピルアルコールを加えて DNA を抽出し、70% エチルアルコールで洗浄、乾燥した後 50 $\mu$ l の蒸留水に溶解して DNA テンプレートとした。PCR 法による *C. burnetii* の遺伝子検出には、*com1* (増幅産物 438bp), *htp-B* (増幅産物 325bp) および *icd* (増幅産物 370bp) とそれぞれ異なる部位の遺伝子をターゲットとした nested PCR 法を用い、3 遺伝子全ての増幅が確認された場合を陽性と判定することとした。
- 5) 標準菌株として、*C. burnetii* Nine Mile 株を用いた。本菌を BGM (Buffalo green monkey) 細胞を用いて、7~10 日間 CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養後、培養液を分取し、低速遠心で細胞成分を除いた後、上清を高速遠心して菌体を沈渣として回収し、ホルマリン加生理食塩水に再浮遊させて不活化した。PBS で洗った後 PBS に再浮遊し、菌数を計測した後使用時まで -80°C で保存した。この試験は、バイオセーフティレベル (BSL) 3 実験室内で実施した。
- 6) 開発した検査法の検出感度を検討した。あらかじめ *C. burnetii* が陰性であることを確認したセミハードタイプチーズに、標準菌株を 1g 当たり 6.0  $\times$  10<sup>3</sup>, 6.0  $\times$  10<sup>2</sup>, 6.0  $\times$  10<sup>1</sup> および 6.0  $\times$  10<sup>0</sup> 添加して抽出操作を行い、PCR 法により検出を行った。各濃度 5 検体について検討した結果、3 遺伝子全てが増幅され陽性と判定したものは、チーズ 1g 当たり 6.0  $\times$  10<sup>2</sup> 以上添加した試料であり、6.0  $\times$  10<sup>1</sup> 添加した試料では *com1* 遺伝子で 100%, *htp-B* 遺伝子で 60% および *icd* 遺伝子で 80% 陽性と結果が安定しなかった。このことから本検査法の検出感度は 6.0  $\times$  10<sup>2</sup>/g とした。
- 7) 本検査法を用いて、東京都内で市販されていた市販チーズ

147 検体について *C. burnetii* の汚染実態を調査した。調査期間は 2005 年 6 月から 2008 年 12 月まで、検体は殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ 96 検体、未殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ 41 検体およびプロセスチーズ 10 検体である。また、117 検体は輸入品、30 検体は国産品である。実態調査の結果、28 検体 (19.0%) が陽性となった。陽性数は、殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ 96 検体中 20 検体 (20.8%)、未殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ 41 検体中 7 検体 (17.1%) およびプロセスチーズ 10 検体中 1 検体 (10.0%) であった。原産国別では、フランス 76 検体中 15 検体 (19.7%)、日本 30 検体中 6 検体 (20.0%) およびイタリア 14 検体中 7 検体 (50.0%) であり、これらの検体には *C. burnetii* 遺伝子の存在することが明らかとなった。

8) PCR で増幅された生成産物は精製後にシーケンス解析を行なった。その結果、3 遺伝子全てにおいて検体間での差異は認められなかった。次に、添加試験に使用した Nine Mile 株と比較した結果、*icd* 遺伝子の 745 位が Nine Mile 株ではグアニンであるのに対し、検体では全てアデニンであり、点変異が認められた。*icd* 遺伝子配列を比較した報告によれば、745 および 1089 位における点変異が Nine Mile 株と Priscilla 株を型別可能としており、今回の検体は Priscilla 株のグループに属することが明らかとなった。また、これらの結果から、今回のスクリーニング結果が、添加試験に使用した Nine Mile 株の汚染による誤陽性ではないことも確認された。

9) スクリーニング検査法で陽性となった 28 検体について、冷凍保存した検体から菌を抽出し *C. burnetii* の生存性を検討した。このとき、最初の抽出のための加熱温度を 50°C とし、本菌の不活化を極力防ぐこととした。遠心沈渣は sucrose phosphate glutamate に再浮遊し、サイクロフォスファミドにより免疫抑制処理をしたマウスの腹腔内に接種し、3 週間後に

マウス体内で増殖したか否を検討した。その結果、全ての検体がマウス脾臓消化物の PCR 検査で陰性、脾臓スタンプ標本をギムザ染色・鏡検して菌体を認めなかったことから、*C. burnetii* はマウス体内で増殖していないと考えられ、スクリーニング陽性検体中には死菌または遺伝子のみが存在していたものと考えられた。この生存性確認試験は、当センターの動物実験許可を得て BSL3 実験室内で実施した。

以上の結果から、加熱溶解温度、低温・低速での遠心、再抽出法等を最適化することにより、タンパク質と脂肪に富むチーズから効果的に DNA を抽出することが可能となった。本法による *C. burnetii* 遺伝子の検出感度は  $6.0 \times 10^2/\text{g}$  であり、既報の牛乳、鶏卵あるいはマヨネーズからの *C. burnetii* 遺伝子検出感度と同等、あるいはより高感度であった。

また、本法を用いた汚染実態調査により、市販チーズの 19% に *C. burnetii* 遺伝子が存在することが確認された。また、輸入チーズのみならず、国産チーズの 20% にも *C. burnetii* 遺伝子が存在することが明らかとなった。フランスおよびイタリア産の陽性検体には、未殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ 7 検体も含まれていた。遺伝子検査で陽性であった検体について生存性試験を行なった結果、本菌が生存しているものは認められなかった。これらの結果は、本菌に感染した家畜が乳中に本菌を排菌し、チーズの原料乳を汚染していることを示唆するものであり、チーズ製造方法によっては人への感染源となる可能性も否定できないことが明らかとなった。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、御懇篤な御指導、御高配を賜りました麻布大学大学院環境保健学研究科 松田基夫教授に深甚なる謝意を表します。また、御懇切な御高閲を賜りました山本静雄教授並びに古畑勝則教授に深謝致します。

また、本研究に貴重な御指導と御助言を賜りました東京都健康安全研究センター微生物部 甲斐明美博士、仲真晶子博士ならびに関係各位に深甚なる謝意を表します。