

表3 採取時期別・種類別・培養法・培地別検出比較

採取時期	種類	培養法・増菌培地	mCCDA	Butzler	
7～8月	国産・チルド	直接法	12.5%	40.0%	
		試験管法・×2CEM	84.6%	64.7%	
		大量培養法・プレストン	94.1%	64.7%	
		大量培養法・ホルトン	58.8%	76.5%	
	輸入・冷凍	直接法	20.0%	0%	
		試験管法・×2CEM	0%	20%	
		試験管法・×2プレストン	0%	0%	
		試験管法・×2ホルトン	0%	0%	
		大量培養法・プレストン	20%	20%	
		大量培養法・ホルトン	20%	0%	
	10～11月	国産・チルド	直接法	16.7%	10.5%
			試験管法・×2CEM	22.2%	22.2%
試験管法・×2プレストン			31.6%	31.6%	
試験管法・×2ホルトン			33.3%	26.3%	
大量培養法・プレストン			57.9%	36.8%	
大量培養法・ホルトン			57.9%	52.6%	
輸入・冷凍		直接法	7.7%	0%	
		試験管法・×2CEM	7.1%	7.1%	
		試験管法・×2プレストン	0%	0%	
		試験管法・×2ホルトン	0%	0%	
		大量培養法・プレストン	28.6%	21.4%	
		大量培養法・ホルトン	28.6%	21.4%	

- ・ 7～8月は、国産・チルドは試験管法で65%～84%、大量培養法は59%～94%、
- ・ 輸入・冷凍は、試験管法0～20%、大量培養法は0%～20%。
- ・ 10～11月、国産・チルドは試験管法で22%～33%、大量培養法は36%～58%、
- ・ 輸入・冷凍は、試験管法0～7%、大量培養法は21%～29%。
- ・ 以上から、今回の検討においては、国産・チルドは、秋季は夏季に比べ全般的に分離率が低い結果であり、試験管法は、大量培養法の分離率の約2分の1程度であった。一方、輸入・冷凍の分離率は、両法とも国産・チルドより低く、特に試験管法は、分離できない検体が多く認められた。

(2) カンピロバクター接種系における各検査法の分離能の比較
各検査方法における分離結果を表4・表5に示した。

(1) 試験管法 (ストマッキング)

- ① 1.2 cfu/g 接種では, 分離不安定。
- ② 5.0 cfu/g 接種では, 分離比較的安定。
- ③ 5.0 cfu/g 接種では, 2日増菌では分離は1日で可能。
- ④ 1日増菌の場合, 分離2日培養が適当。

(2) 試験管法 (てもみ)

- ① 1.2 cfu/g 接種では, 分離不安定。
- ② 5.0 cfu/g 接種では, 分離比較的安定。
- ③ 1日増菌の場合, 分離2日培養が適当。
- ④ 1.2 cfu/g 接種では, 手もみ処理はストマック処理に比較して分離能がよい可能性を示唆。

表4 試験管法の比較試験結果

方法	接種菌数	検体No.	1日増菌				2日増菌			
			プレストン		ボルトン		プレストン		ボルトン	
			CCDA	バター	CCDA	バター	CCDA	バター	CCDA	バター
試験管法(ストマッカー)	1. 2cfu/g	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	②+	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-	③+	-
		c	-	-	-	-	-	-	-	-
	分離培養	1日目	0	0	0	0	0	0	0	0
		2日目	0	1	0	0	0	0	0	0
		3日目	0	0	0	0	0	0	1	0
試験管法(ストマッカー)	5. 0cfu/g	1	②+	②+	①+	-	-	①+	①+	①+
		2	②+	②+	②+	①+	①+	①+	①+	①+
		3	①+	①+	②+	②+	-	-	①+	①+
		c	-	-	-	-	-	-	-	-
	分離培養	1日目	1	1	1	1	1	2	2	2
		2日目	2	2	2	1	0	-	-	-
		3日目	-	-	-	0	0	-	-	-
試験管法(てもみ)	1. 2cfu/g	1	-	-	②+	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	②+	②+
		3	②+	-	-	②+	①+	①+	②+	②+
		c	-	-	-	-	-	-	-	-
	分離培養	1日目	0	0	0	0	1	1	0	0
		2日目	1	0	1	1	0	0	2	2
		3日目	0	0	0	0	0	0	0	0
試験管法(てもみ)	5. 0cfu/g	1	-	-	②+	③+	-	①+	①+	①+
		2	①+	②+	①+	①+	-	①+	-	-
		3	②+	①+	②+	②+	①+	-	①+	①+
		c	-	-	-	-	-	-	-	-
	分離培養	1日目	1	1	1	1	1	2	2	2
		2日目	1	1	2	1	0	-	-	-
		3日目	0	0	-	1	0	-	-	-

C : 対照 ; O+ : コロニー形成, O内の数字は形成した日数

(3) 大量培養法

- ① 1.2 cfu/g 接種以上の系で分離安定。
- ② 接種試験系すべて分離培養1日目でコロニー形成。

表5 大量培養法の比較試験結果

方法	接種菌数	検体No.	1日増菌			
			プレストン		ポルトン	
			CCDA	バツラー	CCDA	バツラー
大量培養法	1. 2cfu/g	1	①+	①+	①+	①+
		2	①+	①+	①+	①+
		3	①+	①+	①+	①+
		c	—	—	—	—
		検出数	3	3	3	3
大量培養法	5. 0cfu/g	1	①+	①+	①+	①+
		2	①+	①+	①+	①+
		3	①+	①+	①+	①+
		c	—	—	—	—
		検出数	3	3	3	3
大量培養法	16. 8cfu/g	1	①+	①+	①+	①+
		c	—	—	—	—
		検出数	1	1	1	1
大量培養法	84. 0cfu/g	1	①+	①+	①+	①+
		c	—	—	—	—
		検出数	1	1	1	1

C: 対照 ; O+: コロニー形成, O内の数字は形成した日数

5. まとめ

- (1) 試験管法は, 夏季では国産チルド鶏肉において大量培養法と同等の分離率(約85%)を示した。
- (2) 試験管法は, 秋季では国産チルド鶏肉において大量培養法の約2分の1の分離率(約30%)であった。
- (3) 輸入・冷凍鶏肉では, 大量培養法, 試験管法とも分離能が低かったが, 特に試験管法は低い結果であった。
- (4) 試験管法の検出感度は, 新鮮菌において5cfu/g付近であった。一方, 大量培養法は, 1.2cfu/g以下に検出限界があると考えられた。
- (5) 試験管法に大量培養法と同等の感度を求める場合, 試料量の増加や培養系に接種できる菌数が増加できる操作(遠心分離など, *参考参照)の追加が必要と考えられた。
- (6) 輸入冷凍鶏肉からのカンピロバクター分離は, 汚染が国産チルドと同等と仮定した場合, 何らかの損傷回復操作が必要と考えられた。

*参考 遠心分離法(試行中)

- ② 0.2 cfu/g 接種では, 分離不安定。
- ③ 1.0 cfu/g 接種以上で分離可能。

④ 16.8 cfu/g 以上では、分離培養 1 日目からコロニー形成。

別紙 1

- ① 接種鶏肉は、チルド流通の国内産モモ肉とし、25g に細切したブロックを試料とする。
- ② 接種菌数は、約 10cfu/g および 1cfu/g の 2 条件。
- ③ 培養は 10ml 倍濃度培地の試験管法および 225ml 等濃度培地使用の大量培養法の 2 系統とする。
- ④ 増菌培地は、CEM、プレストン培地およびボルトン培地の 3 種類。
- ④ 培養条件は、プレストン培地は 42℃, 24hr および 48hr ガスパックによる好気培養、ボルトン培地は 35℃, 4hr、42℃, 20hr から 48hrs 培養とする。
- ⑤ 分離培地は、mCCDA 培地およびバツラー寒天培地の 2 種類とする。培養条件は、両培地とも 42℃, 24hrs から 72hrs までとする。
- ⑥ 1 実験系で菌接種試料 3 検体、無接種試料 1 検体計 4 検体とする。

(鶏肉ブロックの調製)

- ① 市販のチルド流通国内産モモ肉を 3kg 購入し、25g のブロックを 80+3 個調製する。
- ② ブロック肉を良く混合して 20 個ずつ分包し、試験開始まで 40℃ 冷凍庫に保管する。
- ③ ブロック肉 3 個の生菌数をプレストン培地で測定し、最確数 100/100g 以上カンピロバクター汚染している鶏肉は使用しない。

(鶏肉ブロックへ菌接種)

- ① 保存菌をブルセラ培地 5ml に菌を接種し、42℃, 24 時間で 2 回培養する。
- ② 90ml 生食入り滅菌ポリ缶で 10(2)/ml または 10(1)/ml の菌液を調製する。
- ③ 鶏肉ブロック 40 個を 1 個ずつストマッカー袋に入れる。
- ④ 鶏肉入ストマッカー 30 袋に所定濃度の菌液を検体量の 1/10 量加えて穏やかに混合後、1 時間程度冷蔵保管する。
- ⑤ 表 2 に従い、生食または培地を加え、ストマッキングまたは手もみ(搾り出し)をする。
- ⑥ 生食処理した検体は、浸出液 10ml を倍濃度のプレストン培地またはボルトン培地に接種する。

表 2 鶏肉接種試験(1 試験系：菌無添加 1 検体, 菌添加 3 検体計 4 検体)

培養法	乳剤処理の溶媒	処理方法	培地量	増菌培地	
				プレストン培地	ボルトン培地
試験管法	等量生食	ストマッキング 1min	2 倍濃度 10ml	4	4
〃	〃	手もみ 1min	〃	4	4
計				8	8
大量培養法	9 倍量培地	ストマッキング 1min	等濃度 225ml	4	4
計				12	12

(培養・分離・確認)

- ① プレストン培地は 42℃, 24 時間および 48 時間まで、ボルトン培地は 37℃, 4 時間および 42℃, 20 時間から 48 時間まで好気培養する。
- ② 培養 24 時間後および 48 時間後に 1 白金時の増菌培地を、mCCDA およびバツラー寒天

培地に接種し、42℃、24時間～72時間まで培養する。

③分離培地を24時間、48時間、72時間ごとにコロニーを確認し、培養の継続は、コロニーを確認できない場合とする。

④疑わしいコロニー3個を釣菌し、顕微鏡検査で特徴的コロニーを認めた場合陽性とする。

平成16年度厚生労働科学研究費補助金
食品中からのカンピロバクター培養法に関する検討
協力研究者 平松 礼司 愛知県衛生研究所

実験1. 鶏肉からの検出

1. 検体 1 もも肉、2 むね肉、3 ささみ、4 鶏かわ、5 手羽先の計5検体

2. 検査法

検体 10g
↓
プレストン 90ml
↓
42℃、24h 培養
↓
培養液 1 エーゼ及び 100µl
をスキロー及び CCDA 培地に塗抹
↓
42℃、48h 培養

3. 結果

スキロー培地 5検体すべて1 エーゼ及び 100µl 塗抹とも発育するが、すべて遊走状態で発育し、再分離してもなおカンピロバクター分離不可のため検出されず。

CCDA 培地 No2 検体を除くすべての検体で菌発育、100µl 塗抹ではスキロー培地のような遊走状態の発育も認められたが1 エーゼ塗抹ではコロニーはきれいに分離。No3 のささみ検体より Lior の血清型 TCK13 の *Campylobacter jejuni* を検出。

4. 考察

鶏肉からのカンピロバクター検出のための分離培地には緑膿菌のような妨害菌が発育しない CCDA 培地の方がスキロー培地より良好であり、1 エーゼ塗抹の方が 100µl 塗抹よりコロニーの分離が良好であった。

実験2. カンピロバクターが検出されたささみ検体の冷蔵保存1週間後の検出

1. 検体 1週間冷蔵保存された No3 ささみ検体

2. 検査法

検体 10g
↓
プレストン 90ml
ボルトン 90ml
↓
42℃、24h 培養
↓
培養液1 エーゼをスキロー
及び CCDA 培地に塗抹
↓
42℃、48h 培養

3. 結果

スキロー培地 プレストン増菌培養液からは発育は認められたもののカンピロバクターは検出されず、ボルトン増菌培養液からはわずか1コロニーの発育が認められ Lior の血清型 TCK13 の *Campylobacter jejuni* を検出。

CCDA 培地 プレストン及びボルトン増菌培養液とも発育は認められず。

4. 考察

冷蔵状態で菌数が減少しストレス状態にあるカンピロバクター検出には、増菌培養にはプレストンよりもボルトン培地が、分離培養には CCDA よりもスキロー培地が有効ではないかと推察された。

なお、冷蔵保存後のささみ中のカンピロバクター生菌数測定を食品衛生検査指針微生物編(2004)に従って、寒天直接塗抹法およびMPN法で実施したが、どちらも検出限界以下であった。

実験3. カンピロバクター菌液凍結後の検出

1. 使用菌株 ささみ分離株(TCK13)

2. 検査法

菌株をスキロー培地に発育させた
新鮮菌を生理食塩水に懸濁し、約
McFarland1 に調製し、試験液とする。

↓

さらに生理食塩水で、10倍段階希釈

↓

希釈液を-20℃で凍結

↓

凍結保存3日後に融解した希釈液1mlをポルトン培地100ml
およびプレストン培地100mlに添加

↓

42℃または35℃で24h培養

↓

培養液1エーゼを

CCDA培地に塗抹

↓

42℃、48h培養

3. 検査結果

増菌培地	培養温度	希釈液		
		10 ¹	10 ²	10 ³
プレストン	42℃	発育	—	—
	35℃	—	—	—
ポルトン	42℃	—	—	—
	35℃	—	—	—

4. 考察

菌液凍結後の検出は10倍希釈液がプレストン培地、42℃培養のみでの検出となったが、再実験、再検討を要すものと考えられる。

実験4. 滅菌ストマッカー袋による non-headspace 培養と通常のカスパック培養との 検出感度の比較

1. 使用菌株 散発患者分離株(Lior4)

2. 検査法

菌株をスキロー培地に発育させた
新鮮菌を生理食塩水に懸濁し、約
McFarland1 に調製し、試験液とする。

↓

さらに生理食塩水で、10 倍段階希釈

↓

試験液および希釈液 1ml をボルトン培地 100ml
またはプレストン培地 100ml に添加

↓

42℃、24h 培養 (non-headspace 培養およびカスパック培養)

↓

培養液 1 エーゼを
CCDA 培地に塗抹

↓

42℃、48h 培養

3. 検査結果

	最小発育添加菌量	
	ボルトン培地	プレストン培地
non-headspace 培養	33cfu/ml	10cfu/ml
カスパック培養	3.3cfu/ml	1.0cfu/ml

4. 考察

non-headspace 培養はカスパック培養と比較し、検出感度が増菌培地の種類を問わず約
1 オーダー低下することが判明した。

平成16年度厚生労働科学研究費補助金
食品からのカンピロバクター検出法の検討

協力研究者 八尋俊輔, 宮坂次郎, 荒平雄二

熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部

目的

食品からのカンピロバクターの検出法は統一されていないため、検出法によって検出率が変動するので、検出方法を統一する必要がある。最適な検出法を選択するため以下の検討を行った。

研究材料と方法

市販の鶏肉（モモ肉，胸肉）を試料として用いて、検討を行った（表1）。

表1 検査に用いた試料

No.	種類	産地
1	鶏もも肉	国産
2	鶏むね肉	国産
3	鶏もも肉	国産
4	鶏もも肉	国産
5	鶏むね肉	国産
6	鶏もも肉	国産
7	鶏むね肉	国産
8	鶏むね肉	国産
9	鶏もも肉	アメリカ産
10	鶏もも肉	国産
11	鶏むね肉	国産
12	鶏むね肉	国産
13	鶏むね肉	国産
14	鶏むね肉	国産

鶏肉の表面に近い部分約 200g を採取し、12000rpm, 2 分間ホモジナイズして均一化を図り、これを検体とした。

カンピロバクター増菌法として以下の 8

系列を検討した。

①検体 25g にプレストン培地（馬溶血液 5%含有）225ml を加え、ストマッカーにて 1 分間処理後、微好気で 42℃, 48 時間培養した。

②検体 25g にボルトン培地（馬溶血液 5%含有）225ml を加え、ストマッカーにて 1 分間処理後、微好気で 42℃, 48 時間培養した。

③検体 25g にボルトン培地（馬溶血液 5%含有）225ml を加え、ストマッカーにて 1 分間処理後、微好気で 37℃, 4 時間培養後、42℃, 44 時間培養した。

④検体 25g にプレストン培地（馬溶血液 5%含有）225ml を加え、ストマッカーにて 1 分間処理後、その液を 10ml 試験管に分取し、微好気で 42℃, 48 時間培養した。

⑤検体 25g にボルトン培地（馬溶血液 5%含有）225ml を加え、ストマッカーにて 1 分間処理後、その液を 10ml 試験管に分取し、微好気で 42℃, 48 時間培養した。

⑥検体 25g にボルトン培地（馬溶血液 5%含有）225ml を加え、ストマッカーにて 1 分間処理後、その液を 10ml 試験管に分取し、微好気で 37℃, 4 時間培養後、42℃44 時間培養した。

なお、①～⑥の微好気培養は CampyPak Plus (BBL) を使用し、嫌気ジャー内で行った。

⑦検体 25g にプレストン培地（馬溶血液 5%含有）225m を加え、ストマッカーにて

1 分間処理後、ストマッカー袋から空気をできるだけ追い出し、シーラーにて密閉した後、42℃、48 時間培養した。

⑧検体 25 g にボルトン培地（馬溶血液 5% 含有）225ml を加え、ストマッカーにて 1 分間処理後、ストマッカー袋から空気をできるだけ追い出し、シーラーにて密閉した後、42℃、48 時間培養した。

増菌培養後、分離選択培地として mCCDA を用い 42℃、48 時間培養後、カンピロバクターが疑われるコロニーを分離した。分離したコロニーは以下の 1~6 によって同定した。

1. 直接検鏡で形態、運動性の確認
2. グラム染色でグラム陰性のらせん型の桿菌を確認
3. オキシダーゼ陽性
4. カタラーゼ陽性
5. 簡易同定キットで凝集確認
6. *jejuni* と *coli* の種の確定のため、PCR による遺伝子検査

なお、検査はすべて定性試験とした。

研究結果と考察

結果を表 2 に示す。最も陽性率が高かったのは系列 3 で 72.7%であった。

増菌培地の性能比較では、プレストン培地を用いた系列 1 が 64.3%，ボルトン培地を用いた系列 2 が 57.1%，ボルトン培地を用い温度をシフトアップした系列 3 が 72.7%であった。しかし、プレストン培地で検出されないがボルトン培地で検出される、またはその逆の場合もあり、単純に両培地の性能比較は難しいと思われた。

試料番号 12~14 の系列 2 では全く検出できなかった。この 3 検体は同じ嫌気ジャ

ーで培養しており、増菌培地の検鏡によりまったく菌が認められなかった。使用した微好気パックが十分働かず、微好気状態になっていなかったことが推測された。試料番号 12~14 をのぞいた系列 2 の陽性率は 73%であり、温度のシフトアップを行った系列 3 と差はない。これらのことから、温度のシフトアップにおける影響はないと考えられる。

10ml の培養系（4~6）は陽性率が低く、培養量が多い方がよいことがわかった。また、嫌気ジャーを用いた微好気培養と袋をシールした 7, 8 を比較すると微好気培養がよい成績を示した。

検出された菌は、ほとんどが *C.jejuni* であったが *C.coli* も検出された。検体番号 10, 11 からは *jejuni* も *coli* も検出された。

今回検討した鶏肉 14 試料のうち 11 試料からカンピロバクターが分離された（85.7%）。不検出であったアメリカ産を除くと 92.3%と高い分離率を示した。増菌培地 10ml を分取して培養を行う従来の方法では、ほとんど検出ができず、培養液全量を微好気培養すると高い陽性率を示した。しかし、培養液全量をそのまま培養する方法は（ストマッカー用袋の口を密閉する方法をふくめて）、後処理が非常に煩雑である上に、多量の菌が増殖しているので危険を伴う検査であると感じた。また、ストマッカー用袋を密閉する方法は、密閉手技で差が出る可能性があると思われた。

増菌培地全量をそのまま培養する方法は、検出率が高いが、コストや安全性の面で今後課題があると感じた。試験管で培養できる方法の検討が今後必要であると思われる。

1 No.\系列	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	—	※	—	—	—	—	—
2	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	※	—	—	—	—	—
3	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	※	—	—	—	—	<i>jejuni</i>
4	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	—	—	—	<i>jejuni</i>	—	—
5	<i>jejuni</i>	—	—	—	—	—	—	—
6	—	<i>coli</i>	<i>coli</i>	—	<i>coli</i>	—	—	—
7	—	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	—	—	—	—	—
8	—	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—
10	<i>jejuni</i>	<i>jejuni, coli</i>	<i>jejuni</i>	—	—	—	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>
11	<i>coli</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	—	—	—	—	—
12	<i>jejuni</i>	—	<i>jejuni</i>	—	—	—	—	—
13	<i>jejuni</i>	—	<i>jejuni</i>	—	—	—	—	—
14	<i>jejuni</i>	—	<i>jejuni</i>	—	—	—	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>
陽性率 (%)	64.3	57.1	72.7	0	7.1	7.1	14.3	21.4

表 2. 各系列における陽性率と分離された菌種

※検査は未実施

Campylobacter の検出率 (陽性数/検体数)

培養方法	プレストン増菌培地		ボルトン増菌培地		
	CCDA	Karmali	CCDA	Karmali	
A	<i>C.jejuni</i>	8/30 (26.7)	8/30 (26.7)	6/30 (26.7)	6/30 (26.7)
	<i>C.coli</i>	1/30 (3.3)	1/30 (3.3)	1/30 (3.3)	1/30 (3.3)
B	<i>C.jejuni</i>	12/30 (40.0)	13/30 (43.3)	12/30 (40.0)	10/30 (33.3)
	<i>C.coli</i>	1/30 (3.3)	1/30 (3.3)	1/30 (3.3)	1/30 (3.3)

() : %

培養法 A : 微好気増菌培養 (ガス発生キット使用)

培養法 B : 気密性パックによる増菌培養

分離された *C.jejuni* の血清群 (Penner)

培養方法	プレストン増菌培地		ボルトン増菌培地	
	CCDA	Karmali	CCDA	Karmali
A	B群 (1)	B群 (1)	B群 (1)	B群 (1)
	C群 (1)	C群 (1)	-	-
	D群 (1)	D群 (1)	D群 (1)	D群 (1)
	J群 (1)	J群 (1)	J群 (1)	J群 (1)
	K群 (1)	K群 (1)	K群 (1)	K群 (1)
	-	-	L群 (1)	L群 (1)
	Y群 (1)	Y群 (1)	-	-
	UT (2)	UT (2)	UT (1)	UT (1)
	B	B群 (1)	B群 (1)	B群 (1)
C群 (2)		C群 (1)	-	-
D群 (3)		D群 (3)	D群 (5)	D群 (1)
J群 (1)		J群 (1)	J群 (1)	J群 (1)
K群 (1)		K群 (1)	K群 (1)	K群 (1)
L群 (1)		-	L群 (1)	-
-		N群 (1)	-	-
-		Y群 (1)	-	-
UT (3)		UT (4)	UT (3)	UT (5)

() : 株数

表1. 培養条件の違いによるカンピロバクターの分離状況 (埼玉 小野一晃)

No.	培 養 条 件		
	微 好 気	好 気	好 気
	MPN* ¹ (cfu/100g)	定性* ²	袋* ³
1	<15	-	-
2	<15	-	-
3	5500	+	+
4	>5500	+	+
5	>5500	+	+
6	465	+	+
7	75	+	+
8	215	+	+
9	>5500	+	+
10	45	+	+
11	1200	+	+
12	2300	+	+
13	1200	+	+
14	215	+	+
15	2300	+	+
16	>5500	+	+
17	5500	+	+
18	2300	+	+
19	<15	-	-
20	<15	-	-
21	<15	+	-
22	<15	-	-

*¹鶏肉25g + Preston増菌培地100ml (5倍乳剤) を微好気培養

*²MPN法で使用した残りの乳剤を微好気培養

*³鶏肉25g + Preston増菌培地100ml (5倍乳剤)
をできるだけ袋内の空気を除いた状態でシール後

コメント

今回使用した袋により、特に微好気状態で培養しなくても良いことが示唆:

表2. 検体量の違いによるカンピロバクターの分離状況 (埼玉 小野一晃)

No.	検体量25g ^{*1}			検体量50g ^{*3}		
	陽性管数	MPN値 (cfu/100g) ^{*2}	定性	陽性管数	MPN値 (cfu/100g) ^{*4}	定性
1	/3, 0/3, 0/	<15	-	0/3, 0/3, 0/	<9	-
2	/3, 0/3, 0/	<15	-	0/3, 0/3, 0/	<9	-
3	/3, 0/3, 0/	20	-	0/3, 0/3, 0/	<9	+
4	/3, 0/3, 0/	<15	-	0/3, 0/3, 0/	<9	-
5	/3, 3/3, 0/	1200	+	3/3, 3/3, 1/	1380	+
6	/3, 3/3, 3/	>5500	+	3/3, 3/3, 3/	>3300	+
7	/3, 3/3, 2/	5500	+	3/3, 3/3, 3/	>3300	+
8	/3, 1/3, 0/	215	+	3/3, 3/3, 1/	1380	+
9	/3, 3/3, 0/	1200	+	3/3, 3/3, 1/	1380	+
10	/3, 2/3, 0/	465	+	3/3, 3/3, 1/	1380	+
11	/3, 3/3, 1/	2300	+	3/3, 3/3, 1/	1380	+
12	/3, 3/3, 1/	2300	+	3/3, 3/3, 1/	1380	-
13	/3, 3/3, 0/	1200	+	3/3, 3/3, 3/	>3300	+
14	/3, 3/3, 1/	2300	+	3/3, 3/3, 2/	3300	+
15	/3, 3/3, 3/	>5500	+	3/3, 3/3, 3/	>3300	+
16	/3, 3/3, 3/	>5500	+	3/3, 2/3, 3/	870	+
17	/3, 3/3, 0/	45	-	0/3, 3/3, 0/	27	-
18	/3, 2/3, 0/	30	-	1/3, 1/3, 0/	21	-
19	/3, 3/3, 3/	>5500	+	3/3, 3/3, 3/	>3300	+
20	/3, 3/3, 3/	>5500	+	3/3, 3/3, 3/	>3300	+
21	/3, 1/3, 0/	35	-	0/3, 0/3, 0/	<9	+
22	/3, 3/3, 3/	>5500	+	3/3, 3/3, 3/	>3300	+
23	/3, 0/3, 0/	45	-	2/3, 0/3, 0/	27	-
24	/3, 1/3, 0/	75	-	3/3, 2/3, 0/	279	+

*1 鶏肉25g + Preston増菌培地100ml (5倍乳剤) で実施

*2 MPN換算表の値を5倍して100g当たりの菌数を求めた

*3 鶏肉50g + Preston増菌培地100ml (3倍乳剤) で実施

*4 MPN換算表の値を3倍して100g当たりの菌数を求めた

コメント

検体採取量50gの方が25gのものに比べ菌の検出感度が高いことが示唆さ
 汚染菌数の低い冷凍品や輸入鶏肉の検査においては、検体採取量50gの方が良い

市販鶏肉のカンピロバクター汚染実態調査 (埼玉 小野一晃)

No.	検体量25g		検体量50g	
	MPN* (cfu/100g)	定性	MPN** (cfu/100g)	定性
1	0,0,0	-	0,0,0	-
2	0,0,0	-	0,0,0	-
3	1,0,0	-	0,0,0	+
4	0,0,0	-	0,0,0	-
5	3,3,0	+	3,3,1	+
6	3,3,3	+	3,3,3	+
7	3,3,2	+	3,3,3	+
8	3,1,0	+	3,3,1	+
9	3,3,0	+	3,3,1	+
10	3,2,0	+	3,3,1	+
11	3,3,1	+	3,3,1	+
12	3,3,1	+	3,3,1	-
13	3,3,0	+	3,3,3	+
14	3,3,1	+	3,3,2	+
15	3,3,3	+	3,3,3	+
16	3,3,3	+	3,2,3	+
17	0,3,0	-	0,3,0	-
18	0,2,0	-	1,1,0	-
19	3,3,3	+	3,3,3	+
20	3,3,3	+	3,3,3	+
21	1,1,0	-	0,0,0	+
22	3,3,3	+	3,3,3	+
23	2,0,0	-	2,0,0	-
24	2,1,0	-	3,2,0	+

*鶏肉25g + Preston増菌培地100ml (5倍乳剤) で実施

**鶏肉50g + Preston増菌培地100ml (3倍乳剤) で実施

分 担 研 究 報 告 書

無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

五十君 静信

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
（分担研究報告書）

無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所・室長
研究協力者 牧野 壮一 帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター長
武士 甲一 帯広畜産大学・教授
北川 雅彦 北海道立釧路水産試験所・主任研究員
松原 伸二 (株)キュー&シー・課長
植田 富貴子 日本獣医畜産大学・助教授
落合 由嗣 日本獣医畜産大学・助手
本藤 良 日本獣医畜産大学・教授
庄司 紘史 久留米大学・教授
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター
岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官
大塚佳代子 埼玉県衛生研究所・主任研究官

研究要旨

無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究は、以下の4点を中心に研究を行った

1. 食品を介したヒトのリステリア症の把握
2. 臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析
3. リステリアの疫学マーカーの検索とその標準化
4. 非加熱喫食食品中のリステリアのリスクアセスメント

これらを通じて、我国における食品を介したリステリア症を検証する。すなわち、我国における食品媒介感染症としてのリステリア症の発生状況を把握し、そのヒトへの危害について分析を試みた。

A. 研究目的

我国における食品媒介感染症としてのリステリア症の発生状況を把握し、そのヒトへの危害について科学的に分析を行い、リスクマネジメントに必要な科学的根拠を提供する。危害の想定される特定の非加熱喫食食品については、リスクアセスメントを行い、具体的なリス

クマネジメントの方法に関する情報を提供する。これにより、リステリアによるリスクが明かとなり、食品を介したヒトのリステリア症の発生を未然に防止できることが期待される。

B. 研究方法

1. 食品を介したヒトのリステリア症の掌握

下痢症患者の原因菌分離時に、リステリア分離培地 PALCAM 寒天培地を加え、直接塗末により菌の分離を試み、リステリアが下痢症の原因となっているかを調べた。植田らは、ヒト・リステリア症（髄膜炎患者）および食肉汚染分離株のゲノム構造の特性による分子疫学的解析から、地域常在汚染、複合汚染およびヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与を検討した。

2. 臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析

菌株の収集は、臨床分離株、環境分離株、食品分離株とも機会がある毎に分与を受け、保存を行った。岡田らは、これらの株を用いて、強毒株の指標となりうるマーカーの検索を PCR 法及び Southern Dot Hybridization 法により行ったうえ、そのカテゴリー分けを行った。これらの株の病原性について培養細胞を用いた感染実験を行うことで評価し、実際に低病原性群が存在しているかどうかを検証した。

3. リステリアの疫学マーカーの検索とその標準化

疫学マーカーの検索については、植田らおよび岡田らの実験の中で行った。

4. 非加熱喫食食品中のリステリアのリスクアセスメント

本年度は、スモークサーモンと辛子明太子およびたらこについて検討した。武士らは、北海道内の2箇所のスモークサーモン製造施設を調査施設とし、原材料であるサケ、製造工程や製造環境におけるリステリアに対する危害分析を行った。仲真らは、博多の研究者と協力し、辛子明太子およびたらこのリステリアの増殖について検討した。製品にリステリア菌株を接

種し室温保存（25℃）および冷蔵保存（4℃、10℃）での挙動を検討した。それぞれの研究方法については、各協力研究報告書を参照にしていたきたい。

（倫理面への配慮）

当研究においては、疫学情報を取り扱う可能性があるが、この場合は、“疫学研究に関する倫理指針”に従い実験内容や方法などについて国立医薬品食品衛生研究所の倫理審査委員会の審査を受け、個人情報保護について最大限の倫理的な配慮を行い研究する。リステリア研究の患者情報の取り扱いに関しては、国立医薬品食品衛生研究所の医学研究倫理委員会の審査を既に受けており、医学研究倫理規定に基づき管理を行った。

C. 研究結果

1. 食品を介したヒトのリステリア症の掌握

下痢症患者のリステリア分離培地 PALCAM 寒天培地での直接塗末法による分離の試みは、既に680検体を越えているが、まだ、菌の分離は出来ていない。ヒト・リステリア症（髄膜炎患者）および食肉汚染分離株のゲノム構造の特性による分子疫学的解析から、地域常在汚染、複合汚染およびヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与を検討し、疫学マーカーの同一性から、地域常在汚染、複合汚染およびヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与を明らかにした。

2. 臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析

菌株の収集は、臨床分離株、環境分離株、食品分離株とも順調に進んでいる。これらの株を用いて、強毒株の指標となりうるマーカーの検

索をPCR法及びSouthern Dot Hybridization法により行ったうえ、そのカテゴリー分けを行った。これらの株の病原性について培養細胞を用いた感染実験を行うことで評価し、ウシ由来株で57%（危険率5%）、豚由来株で33%（危険率5%）に実際に低病原性群が存在していることを示した。

3. リステリアの疫学マーカーの検索とその標準化

疫学マーカーの検索については、*iap* 遺伝子の変異により疫学マーカーとして用いる方法について、検討しており、この遺伝子の配列の差は、株の同一性を調べるのに有効であることが示された。*plcA* 遺伝子と *hly* 遺伝子においては、その保有状況が病巣由来株とそれ以外の株間ではっきりとした有意差が示された。

4. 非加熱喫食食品中のリステリアのリスクアセスメント

北海道内の2箇所のスモークサーモン製造施設を調査施設とし、原材料であるサケ、製造工程や製造環境におけるリステリアに対する危害分析を行った。施設Aでは、作業開始前の内臓輸送用ベルトからリステリアが検出された。施設Bでは、魚体処理室引き戸の車輪から検出された。両施設とも、原材料、中間製品、最終製品、その他の製造環境からは、リステリアは検出されなかった。

辛子明太子およびたらこのリステリアの増殖について検討した。製品の25℃保存では1日目に菌数がやや減少したがその後増加し3日目には当初より2~4オーダー増加した。4℃保存では菌数は徐々に減少したが3週間後には2週間目より増加したのもあった。10℃保存でも徐々に減少したが減少の程度は4℃

より少なく、3日目には2週間目より菌数の増加したのもあった。

それぞれの研究結果については、各協力研究報告書を参照にしていきたい

D. 考察

1. 食品を介したヒトのリステリア症の掌握

下痢症患者からのリステリア分離の試みは、既に680検体を越えているが、まだ、菌の分離は出来ていない。健康成人の糞便からの分離率は、1.3~1.5%であるが、下利便からの分離はこの頻度よりはるかに低い。これは、ダイレクト法による分離であるため、低い菌数は検出されないためである。臨床的にかかわっている場合は高い菌数であることが予想されるため、リステリアによる下痢症患者は極端に少ないものと思われる。

ヒトのリステリア症（髄膜炎患者）および食肉汚染分離株のゲノム構造の特性による分子疫学的解析から、*iap* 遺伝子の遺伝子配列を疫学マーカーとして用いると株の同一性が言える。特定の地域における長期に渡る常在汚染と汚染食肉の関与を検討し、疫学マーカーの同一性から、その地域のリステリア症患者との関与が強く示唆された。

2. 臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析

収集された臨床分離株、環境分離株、食品分離株を用いて、強毒株の指標となりうるマーカーの検索をPCR法及びSouthern Dot Hybridization法により行ったうえ、そのカテゴリー分けを行った。この時点で、臨床分離株とその他の分離株には、特定の病原因子遺伝子の保有状態で明らかな有意さを認めた。これは