

難である。このことから、培養困難なカンピロバクター、なかでもコッコイド化した菌体の関与が示唆されており、本菌の水平伝播、感染経路や制御方法を考える上で重要な問題となっている。しかしながら、現状ではコッコイド化したカンピロバクターの特性に関する科学的な知見は極めて少なく、この問題の解決には到底至っていない。前年度の研究から、コッコイド化した菌では、好気ストレスによる菌体構成成分の障害・変性は最小限に抑えられていることが示唆された。そこで、本年度は、この状態の菌が活着しているか否か、mRNAの発現を解析することで検討した。その結果、コッコイド化した菌を90%の含む培養液中の菌体からmRNAの発現が確認された。この結果は、コッコイド化した菌の中にはまだ活着している菌体が存在することを示唆する。このようなコッコイド化した菌体は条件が整うことで、再びらせん状に戻り増殖能を回復する高い可能性を持つと考えられる。従って、遺伝子の発現を確認したことによって明らかとなったまだ活着しているコッコイド化したカンピロバクターについて、実際の環境中において、これが汚染拡大につながる水平伝播や感染に関与しているか否か、明らかにする必要性が強く指摘される。

本年度の研究によって、カンピロバクター食中毒の制御において、コッコイド化した菌の重要な位置づけがますます高まった。今後、この問題を明らかにする必要がある。これによって、コッコイド化した本菌の重要性が科学的に判断されるとともに、増殖能の回復を試みるための最適条件の設定に必要な情報が得られ、本食中毒の

制御・予防対策への応用が可能になることが期待される。

### 3. ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

本調査では個々の農場の衛生管理状態に関する情報まで把握できておらず、菌分離頻度の減少傾向に関わる特定の要因は明確ではない。しかしながら、カンピロバクター陽性鶏群の減少は、ブロイラー飼育農家に対する衛生指導の効果を表しているのかもしれない。一方、1990年代から増加してきたキノロン系抗菌剤耐性菌は2004年までは減少しておらず、2005年度のみ低い値を示した。無薬飼育の普及等による衛生管理意識の増大によるものかもしれないが今後の耐性率の変動を続けてモニターし解析していく必要がある。

### E. 結論

1. 気密性袋を用いた×5希釈試料による大量培養法は、カンピロバクター定性検査に使用可能と考えられた。

2. 気密性袋を用いた×5希釈試料によるMPN定量法は、大量培養法と比較して同等あるいはそれ以上の検出感度を示し、定性検査としても有用と考えられた。

3. 気密性袋を用いた×5希釈によるMPN定量法では、微好気培養法に比較して、陽性率および定量値が低くなる傾向がみられたことから、さらに検討が必要と考えられた。

4. コッコイド化した菌体の中には、mRNAを発現し、まだ活着している菌が存在していることが示された。このことはこの形態の菌体が再び増殖能を回復する可能性を持つことが示唆された。

5. 農場（鶏群）およびブロイラー（個体）における菌汚染実態を調査した結果。カンピロバクター陽性鶏群、個体ともに減少傾向が認められた。分離された菌のナリジクス酸耐性は2005年度に減少傾向を示した。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. 2004. Identification and Characterization of an Oxidative Stress-Responsive Protein from *Campylobacter jejuni*, Homologous to Rubredoxin Oxidoreductase/Rubrerhythrin. FEMS Microbial. Letters. 235(1):57-63.
2. Yamasaki, M., Igimi, S., Katayama, Y., Yamamoto, S., and Amano, F. Effects of anaerobic preculture on aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Bioscience Microflora* 2003. 22, 21-25.
3. 国井悦子他：鶏肉のカンピロバクター培養検査法の検討・鶏肉の検査方法別検出感度および検出率の比較，広島市衛生研究所年報，24,49 -54 (2005)

##### 2. 学会発表

1. 山崎学、山本茂貴、五十君静信。カンピロバクターの酸素ストレスに対する応答性。第26回日本食品微生物学会学術総会，2005年11月10-11

日。金沢。

2. Yamasaki, M., Amano, F., Kim, T. W., Yamamoto, S., and Igimi, S. Aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni* precultured under anaerobic condition. The 13<sup>th</sup> International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (CHRO 2005). Gold Coast, Australia. September 2005.
3. 山崎学，天野富美夫，山本茂貴，五十君静信。 *Campylobacter jejuni* のcoccoid化における酸素の影響。第78回日本細菌学会総会，2005年4月4-6日。東京。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

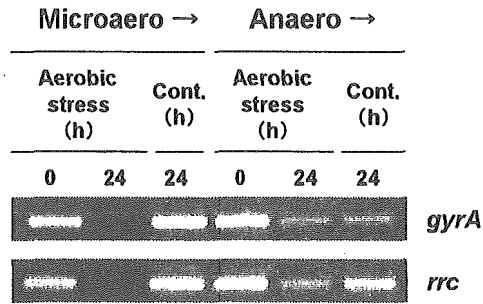


图 1. RT-PCR analysis of mRNA expression in *C. jejuni* after aerobic stress for 24 h. *gyrA* encodes DNA gyrase A subunit. Rrc is a possible oxidative stress-protective protein in *C. jejuni*.

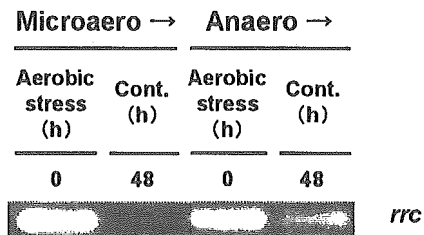


图 2. RT-PCR analysis of mRNA expression in *C. jejuni* after aerobic stress for 48 h. *gyrA* encodes DNA gyrase A subunit. Rrc is a possible oxidative stress-protective protein in *C. jejuni*.

細菌性食中毒の予防に関する研究

鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

分担研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部長

研究要旨

鶏肉からのカンピロバクターの分離は、その検査法により検出率が異なり、鶏肉におけるカンピロバクターの汚染実態を調べるには、その検査法の標準化が必須である。そこで、研究班として検査法の統一を試み、統一したプロトコールの確認と、微好気培養法の妥当性を確認することを目的とし、市販鶏肉からのカンピロバクター検出を試みると共に、定量的な汚染状況を検討した。

協力研究者

齊藤志保子

秋田県衛生科学研究所 主任研究員

料を4袋作成し、2袋は直ちに実験1に供した。

残りの2袋は-20℃に保存し、実験1で分離陽性であった検体について実験2を実施した。

検査方法：

A. 研究目的

次の4項目について評価することを目的とした。

1. 5倍乳剤と、10倍乳剤の分離を定量的に比較し、増菌培地の量を評価する。
2. 気密袋を微好気培養方法の代用として採用可能かを評価する。
3. Bolton 使用時の温度シフトの必要性を評価する。
4. Bolton の選択力の弱さを、分離培地の選択で補うことが可能かどうかを評価する。

実験1 検査試料の一方に100ml(5倍乳剤)のPreston増菌培地、他方に225ml(10倍乳剤)のPreston増菌培地を加え、30秒間ストマッキングした。それぞれの気密袋から、MPN3本法(10ml、1ml、0.1ml)を2組作り、1組は従来の微好気培養法で、残りの1組は気密袋に、シーラーで密封した後、好気培養した。

気密袋に残った乳剤は、シーラーで密封、好気培養し、定性試験とした。

それぞれの培地は、42℃、24時間培養後、mCCDAに接種し、42℃で微好気培養後、カンピロバクターの分離を試みた。

B. 研究方法

材料：市販鶏皮つきもも肉13検体を購入し、皮の部分約8g、肉約17g、計25gを気密袋にはかりとり検査試料とした。1検体から検査試

験2 -20℃に1週間保存してあった検査試料のうち、実験1で陽性であった検体につい

て、Bolton 培地 100ml 1 加えて 5 倍乳剤を作製し、1 方は、37℃、4 時間培養後、42℃に温度シフトアップし、20～44 時間微好気培養した。他方ははじめから 42℃で 24～48 時間微好気培養した。それぞれ 24 時間後と 48 時間後 mCCDA、Skirrow、Preston 培地に接種し微好気培養した。

### C. 結果

#### 1. 5 倍乳剤と 10 倍乳剤との比較

検討結果は表 2 のとおりである。好気培養における 5 倍乳剤と 10 倍乳剤の MPN 値で 5 倍乳剤の方高かった検体は 4 検体、10 倍乳剤の方が高かった検体は 3 検体であり、どちらかに多い傾向は認められなかった。微好気培養における 5 倍乳剤と 10 倍乳剤の MPN 値は好気培養に比べて値の差が小さい傾向がみられたが、5 倍乳剤の方が高かった検体は 6 検体、10 倍乳剤の方が高かった検体は 1 検体と、5 倍乳剤の分離成績の方がやや良好であった。

鶏肉 25g に対する増菌培地は 100ml (5 倍乳剤) で良いと考えられた。

#### 2. 好気培養と微好気培養の比較

5 倍乳剤における MPN 値が好気培養で高かった検体は 1 検体、微好気培養で高かった検体は 4 検体であったが、MPN 値の差は 10 倍乳剤に比べて小さかった。10 倍乳剤における MPN 値が好気培養で高かった検体は 4 検体、微好気培養で高かった検体は 4 検体と同数であった。汚染菌数が少なかった検体 No. 4 は好気培養陽性、微好気培養陰性であった。逆に No. 11 は好気培養陰性、微好気培養陽性であった。

好気培養による分離成績は微好気培養と同等に近く、気密袋を微好気培養方法の代用として採用可能と考えられた。

#### 3. Bolton 使用時の温度シフトの必要性

検討結果は表 3 のとおりである。温度シフトの有

効性は認められず、Bolton 使用時の温度シフトの必要性はないと考えられた。

#### 4. Bolton と分離培地の組み合わせ

検体 No. 4 については mCCDA では雑菌の繁殖により 24 時間及び 48 時間培養でカンピロバクターが分離できなかった。Skirrow、Preston 平板培養でも 48 時間培養では雑菌のため分離不可であったが、24 時間培養では分離可能であった。No. 3 は 48 時間培養で mCCDA が Skirrow や Preston 培地より雑菌の繁殖が多かった。これ以外の検体では mCCDA、Skirrow、Preston いずれの培地でも雑菌に妨害されることなくカンピロバクターが分離可能であった。

雑菌が多い検体でも、Skirrow、Preston 培地との組み合わせで Bolton の選択力の弱さを補うことが可能と考えられた。

表 1 検体一覧とカンピロバクター検出結果

No	検体名	産地	C.jejuni	C.coli	血清群(株数)
1	鶏もも肉	岩手県	—	—	
2	鶏もも肉	国産	—	—	
3	鶏もも肉	国産	+	—	B(2)、C(1)
4	鶏もも肉	岩手県	+	—	D(3)
5	鶏もも肉	岩手県	—	—	
6	鶏もも肉	青森県	+	+	A(2)、L(1)
7	鶏もも肉	岩手県	+	—	UT(3)
8	鶏もも肉	岩手県	+	—	UT(3)
9	鶏もも肉	国産	+	—	J(1)、UT(2)
10	鶏もも肉	国産	—	—	
11	鶏もも肉	岩手県	+	—	UT(3)
12	鶏もも肉	岩手県	+	—	B(2)、C(1)
13	鶏もも肉	国産	+	—	J(2)、Y(1)

表 2 Preston 培地を用いた MPN 法による鶏肉からのカンピロバクター検査結果

2-1 微好気培養

検体 No	分離 菌種	5 倍乳剤			10 倍乳剤		
		MPN 陽性 管数	MPN 値 (/100g)	定性	MPN 陽 性管数	MPN 値 (/100g)	定性
1		0,0,0	< 15		0,0,0	< 30	
2		0,0,0	< 15		0,0,0	< 30	
3	C.jejuni	3,1,0	215		2,0,0	92	
4		0,0,0	< 15		0,0,0	< 30	
5		0,0,0	< 15		0,0,0	< 30	
6	C.jejuni	3,1,0	215		2,0,0	92	
7	C.jejuni	3,0,0	115		3,1,0	430	
8	C.jejuni	3,3,3	> 5500		3,3,3	> 11000	
9	C.jejuni	1,0,0	18		0,0,0	< 30	
10		0,0,0	< 15		0,0,0	< 30	
11	C.jejuni	1,1,0	37		1,0,0	36	
12	C.jejuni	3,0,0	115		2,0,0	92	
13	C.jejuni	3,3,1	2300		3,2,0	930	

2-2 好気培養(気密性ストッカー袋)

検体 No	分離 菌種	5 倍乳剤			10 倍乳剤		
		MPN 陽性 管数	MPN 値 (/100g)	定性	MPN 陽 性管数	MPN 値 (/100g)	定性
1		0,0	< 15	—	0,0	< 30	—
2		0,0	< 15	—	0,0	< 30	—
3	C.jejuni	3,1,0	215	+	0,0,0	< 30	+
4	C.jejuni	0,0,0	< 15	—	1,0,0	36	+
5		0,0,0	< 15	—	0,0,0	< 30	—
6	C.jejuni	3,1,0	215	+	0,0,0	< 30	+
	C.coli	2,0,0	46	+	3,0,0	230	+
7	C.jejuni	3,0,0	115	+	2,0,0	92	—
8	C.jejuni	3,3,2	5500	+	3,3,0	2400	+
9	C.jejuni	0,1,0	15	+	2,0,0	92	—
10		0,0,0	< 15	—	0,0,0	< 30	—
11		0,0,0	< 15	—	0,0,0	< 30	—
12	C.jejuni	3,1,0	215	+	1,0,0	36	+
13	C.jejuni	3,3,0	1200	+	3,3,0	2400	+

注) 網掛け: 同一検体における MPN の最高値

表3 Bolton 培地を用いた凍結保存鶏肉からのカンピロバクター検査結果

検体 No	分離 陽性 菌種	Bolton						Boltonシフトアップ					
		CCDA		skirrow		preston		CCDA		skirrow		preston	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1													
2													
3	C.jejuni	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
4	C.jejuni	- <sup>+++</sup>	- <sup>+++</sup>	++	- <sup>+++</sup>	+	- <sup>+++</sup>	- <sup>+++</sup>	- <sup>+++</sup>	++	- <sup>+++</sup>	++	- <sup>+++</sup>
5													
6	C.jejuni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C.coli	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	C.jejuni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	C.jejuni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10													
11		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	C.jejuni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	C.jejuni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+<sup>+</sup>: 平板中の雑菌少数

+<sup>+</sup>: 平板中の雑菌中等度

-<sup>+++</sup>: 平板中の雑菌多数のため分離陰性



細菌性食中毒の予防に関する研究

鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

分担研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部長

研究要旨

鶏肉からのカンピロバクターの分離は、その検査法により検出率が異なり、鶏肉におけるカンピロバクターの汚染実態を調べるには、その検査法の標準化が必須である。そこで、研究班として検査法の統一を試み、統一したプロトコールの確認と、微好気培養法の妥当性を確認することを目的とし、市販鶏肉からのカンピロバクター検出を試みると共に、定量的な汚染状況を検討した。

協力研究者

藤田雅弘 群馬県衛生環境研究所

独立研究員

A. 研究目的

カンピロバクター食中毒は、食品衛生上重要であるが、予防対策のリスクアセスメントをするうえで、統一された検査方法でデータを比較解析する必要がある。このため、カンピロバクター食中毒の原因食品として、しばしば問題となる鶏肉を用いて、カンピロバクター検査法の検討をおこなった。1つには、増菌培養方法を検討するため、サンプル調整時の増菌培地使用量を、他方として増菌培養条件である。微好気条件と大量のサンプル処理時に使用する気密袋を用いて好気条件下で培養する2つの条件を検討した。

B. 研究方法

（実験1） 好气的条件下で培養する場合の気密袋

を用いる方法と微好気条件下で培養する微好気ジャーを用いる方法を検討した。鶏肉25gをはかりとり、1つを通常のスロマックバッグにいれ、10倍量のPBSでスロマッキングし、作成した乳剤を1mlづつ、ボルトン培地（37℃4時間後42℃24時間）及び、プレストン培地（42℃24時間）で微好気培養後に、mCCDA及びkarmaliで分離培養をおこなった。一方で、鶏肉を気密バックにいれ、10倍量のボルトン培地及びプレストン培地を加え、スロマッキングし好気培養を実施した。それぞれ1エーゼをmCCDA及びKarmali培地に塗抹し分離培養を行い、30サンプルを用いて検出率を比較した（図1）。

（実験2） 皮付き鶏もも肉を12検体購入し、25gを気密袋にはかりとり実験にもちいた。残りの鶏肉の25gを計量し-20℃に保存し、以下の実

験3に使用した。1つに100ml、もう一つに25mlのプレストン増菌培地を加え30秒間ストマッキングした。それぞれの気密袋からMPN3本法を2組つくり、1組を従来の微好気培養法、もう1組を気密袋にいれシール密封した後、好気培養を実施した(42℃24時間)。気密袋に残った乳剤は、大量培養と考え、シーラーで密封し好气的条件下で培養することとした(42℃24時間)。それぞれの組を増菌培養後、mCCDAに接種し、42℃24～48時間、微好気培養後にカンピロバクターの分離状況を調べた(図2)。

(実験3) -20℃で2週間保存した検体に、ボルトン培地を100ml加えストマッキングした。それぞれの気密袋からMPN3本法を2組つくり、1つを従来の微好気培養法、1つを気密袋にいれシール密封し好気培養した。気密袋に残った乳剤は、大量培養と考え、シーラーで密封し好气的条件下で培養した。培養温度の「シフトあり」は37℃4時間培養後に、42℃24時間及び44時間培養した。「シフトなし」は42℃24時間及び48時間培養した。それぞれの組を増菌培養後、mCCDA及びKarmaliに接種し、42℃24～48時間、微好気培養後にカンピロバクターの分離を試みた。

### C. 研究結果及び考察

実験1から、微好気培養法と気密袋では、検体処理工程における初期の接種菌数の違いから、気密袋を用いる大量培養のほうが、カンピロバクターの検出率が高かった。またいずれの方法においても、ボルトン増菌培地よりもプレストン増菌培地の検出率は高かった。しかしながら、分離培地であるmCCDAとKarmali培地の分離率の差はみられなかった(表1)。

このことから、気密袋を用いてプレストン培地で増菌する場合、従来おこなっていた検体処理をおこ

ない、微好気条件下で増菌培養を行う方法と気密袋による大量培養は同等にカンピロバクターを検出できることが示唆された。

実験2において、プレストン培地を用いて増菌培養する場合の希釈倍率による検出数を比べたところ、5倍希釈と10倍希釈では違いが見られなかった。MPN法では、微好気条件下でおこなう方法が、気密袋を用いた場合より検出サンプル数が増えるが、陽性検体のMPN値を比べたところ違いは見られなかった。実験3でカンピロバクター陽性となった鶏肉6検体を-20℃凍結後、ボルトン培地で検出したところ、24時間増菌培養よりも44時間以上増菌培養する方がカンピロバクターが検出されるサンプル数が増えた。しかしながら、6検体すべてから、冷凍による損傷菌を検出できなかった。また、温度シフトをすることにより検出される検体が増加することはなく、温度シフトの効果はあまり期待できないことがわかった。ボルトン培地で増菌した場合、mCCDAおよびKarmali培地上にカンピロバクター以外の雑菌が6検体のうち2検体にみられ、分離培養に支障をきたすことが考えられた。

### E. 結論

以上のことから、鶏肉からカンピロバクターを検出する場合、サンプルは25gをはかりとり、5倍乳剤を使用することが最適であると考えられた。また、気密袋を使用し、増菌培地にプレストン培地を用いた大量培養法であれば、従来の微好気培養と同等の結果が得られることがわかった。冷凍サンプルから検出をする場合、冷凍による損傷菌に考慮し、ボルトン培地を使用する場合、温度シフトの効果は期待できないので、この手間を省略してよいと思われるが、培養時間は44時間以上とする必要があると考えられた。また、ボルトン培地の選択性を考えた場合、雑菌の分離培地上の生育を考慮し、分離培

地の選択及び培地への摂取量を検討する必要があると考えられた。

G. 研究発表

F. 健康危険情報

特になし

図表

図1 実験1の手順

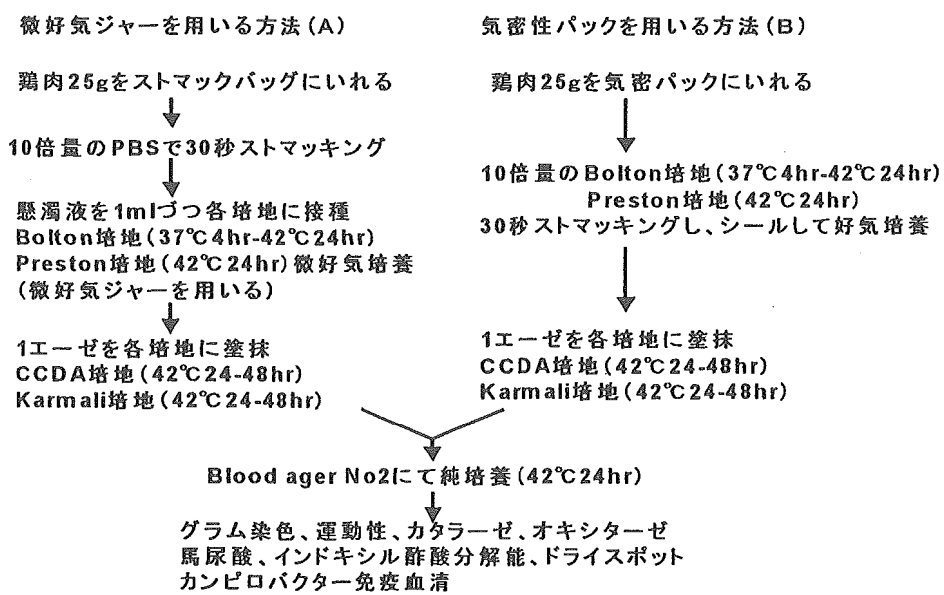


図2 実験2の手順

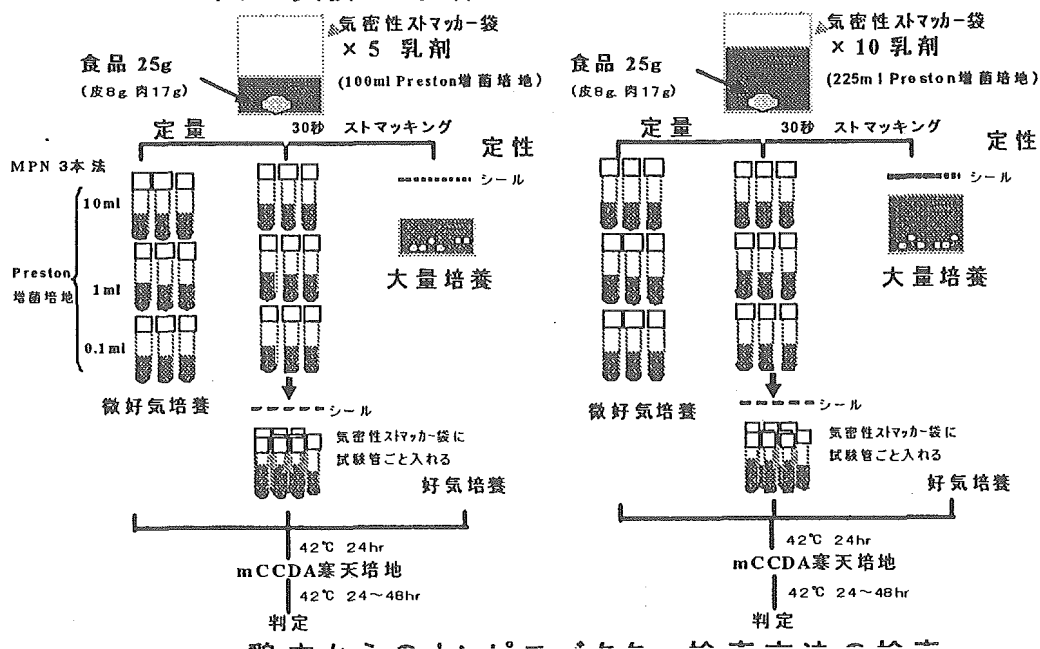


表1

実験1 *Campylobacter*の検出率(陽性率/検体数)

培養方法		Preston増菌培地		Bolton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

表2

## 実験2の検査成績

方法及び 希釈倍率	気密袋好気培養		微好気培養		気密袋大量好気培養	
	×5	×10	×5	×10	×5	×10
検査数	12	12	12	12	12	12
陽性数	4(1)	3	6(1)	5	3(1)	3(1)
平均菌数 (CFU/100g)	$3.1 \times 10^2$	$2.2 \times 10^2$	$3.3 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	-	-
検出限界以下	8	9	6	7	9	9

( )は*C.coli*を検出した例数

低温流通鶏肉なので増菌培地としてプレストン培地のみ使用

表 3

## 実験3の検査成績

培養条件 方法 分離培地	気密袋好気培養				微好気培養				気密袋大量好気培養				
	シフト有		シフト無		シフト有		シフト無		シフト有		シフト無		
	K.	C.	K.	C.	K.	C.	K.	C.	K.	C.	K.	C.	
検査数	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
増菌24hr後	陽性数	2	2	1	1	2	2	3	3	2	2	2	2
	平均菌数 (CFU/100g)	$6.1 \times 10^2$	$6.1 \times 10^2$	$2.3 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$1.3 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$	$7.8 \times 10^2$	$7.8 \times 10^2$	—	—	—	—
増菌44hr後	陽性数	3	3	3	3	4	2	5	5	2	2	2	2
	平均菌数 (CFU/100g)	$4.1 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2$	$2.8 \times 10^3$	$2.8 \times 10^3$	$1.7 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$	$7.4 \times 10$	$7.4 \times 10$	—	—	—	—

K: Karmali培地、 C: mCCDA培地

細菌性食中毒の予防に関する研究

鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

分担研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部長

研究要旨

鶏肉からのカンピロバクターの分離は、その検査法により検出率が異なり、鶏肉におけるカンピロバクターの汚染実態を調べるには、その検査法の標準化が必須である。そこで、研究班として検査法の統一を試み、統一したプロトコールの確認と、微好気培養法の妥当性を確認することを目的とし、市販鶏肉からのカンピロバクター検出を試みると共に、定量的な汚染状況を検討した。

協力研究者

田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所主任研究員

久米田裕子 大阪府立公衆衛生研究所主任研究員

山崎 渉 大阪府立公衆衛生研究所研究員

勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所主任研究員

塚本定三 大阪府立公衆衛生研究所細菌課長

A. 研究目的

昨年度の研究結果から検討すべきと考えられた以下の事項について、分担研究者から示された統一検査方法（実験 1 と 2）に従って検討した。

- (1) 増菌培養時の希釈率の違いを定量的に比較する。
- (2) 気密袋を微好気培養の方法として採用可能かを評価する。
- (3) Bolton 増菌培地使用時の温度シフトの必要性を評価する。
- (4) Bolton 増菌培地の選択力の弱さを、分離培地の選択で補うことが可能かどうかを評価する。

B. 研究方法

実験 1. (増菌培養時の希釈率の違いを定量的に比較し、気密袋を微好気培養の方法として採用可能かを評価した。) 鶏皮付きもも肉を平成 16 年 10 月 10 日に全て事なる店から 1 検体あたり 150g 以上購入し、10 月 11 日に実験を開始した。

1. 皮の部分が約 1/3 (約 8g 程度)、肉 2/3 となるように 25g を気密袋にはかりとり (同じ物を 2 つ作る)、残った鶏皮付きもも肉は、同様に 25g ずつ計量し、実験 2 用に -20℃に保存した。
2. 一方に 100ml の Preston 増菌培地 (5 倍乳剤)、他方に 225ml の Preston 増菌培地 (10 倍乳剤) を加え、30 秒間ストマッキングした。
3. それぞれの気密袋から、MPN3 本法 (10ml、1ml、0.1ml) を 2 組作り、1 組は従来の微好気培養法で、残りの 1 組は気密袋に試験管ごと入れ、シーラーで密封した後、好気

培養した (42°C、24h)。

4. 気密袋に残された乳剤は、大量培養と考え、シーラーで培養液の上部 2cm 付近をシールし、好気条件下で培養を行った (42°C、24h)。(定性試験)
5. それぞれの培地は、42°C、24h 培養後、mCCDA に約 40 $\mu$ l (ディスポスポイドで 1 滴) 塗抹し、42°C で微好気培養してカンピロバクターの分離を試みた。発育菌種の同定は、大量培養で発育した 3 コロニーを釣菌して同定した。

実験 2. (実験 1 の試料の残り (鶏皮付きもも肉) を -20°C に 1 週間保存した検体を用い、Bolton の温度シフトの有効性を評価するとともに、分離培地 mCCDA とそれ以外の分離培地との分離効率を検討した。)

1. -20°C 保存検体に 100ml の Bolton 増菌培地を加えて 5 倍乳剤を作製し、30 秒間ストマッキングし、シーラーで培養液の上部 2cm 付近をシールした後、好気条件下で培養を行った。
2. 培養温度の「シフト有り」は、37°C、4h → 42°C、24~44h 増菌培養し、1 日目(24h)に分離培地に分離後、更に培養し 2 日目(44h)の分離を行った。「シフト無し」は、42°C、24~44h (上記同様、1 日目と 2 日目の 2 回) 分離培養した。
3. 分離培地には、mCCDA、Modified Butzler 培地を用い、それぞれの培地に約 40 $\mu$ l (ディスポスポイドで 1 滴) 塗抹し、42°C で微好気培養してカンピロバクターの分離を試みた。発育菌種の同定は、24 時間増菌培養で発育した 3 コロニーを釣菌して同定した。

## C. 研究結果及び考察

### 実験 1. (表 1)

(1) 増菌培養時の希釈率の違いの定量的比較 : MPN3 本法での菌数比較の結果、微好気培養では、5 倍乳剤の方が 10 倍乳剤より菌数が多かった検体が 3 検体、10 倍のほうが多かった検体が 4 検体、同じであった検体が 3 検体であった。好気培養では 5 倍の方が多かった検体が 4 検体、10 倍のほうが多かった検体が 3 検体、同じであった検体が 3 検体であり、5 倍と 10 倍ではほぼ同等の結果が得られた。

(2) 気密袋を微好気培養の方法として採用可能かの評価 : 5 倍乳剤の MPN 値では微好気培養の方が気密袋使用より菌数が多かった検体が 7 検体、気密袋使用の方が多かった検体が 2 検体、同じであった検体が 1 検体であった。10 倍乳剤では微好気培養の方が気密袋使用より菌数が多かった検体が 6 検体、気密袋使用の方が多かった検体が 1 検体、同じであった検体が 3 検体であり、微好気培養の方が菌数が多くなる傾向があった。また、気密袋を使用した大量培養法で定性試験を行った結果では、雑菌が多く発育する傾向が認められた。

### 実験 2. (表 2)

(3) Bolton 増菌培地使用時の温度シフトの必要性の評価 : 温度「シフト有り」で陽性は 3 検体、「シフト無し」で陽性は 4 検体であり、温度シフトを行わないほうが、成績が良かった。

(4) Bolton 増菌培地の選択力の弱さを、分離培地の選択で補うことが可能かどうかの評価 : mCCDA 分離培地と比べて Butzler 分離培地の方が雑菌が少なく検出率が高かった。また、使用する平板によって分離される菌種が異なることがあった。

#### D. 結論

増菌培養の希釈は5倍と10倍ではほぼ同等の結果が得られたことから、培地量の少ない5倍乳剤が有用であると考えられた。

気密袋を用いた MNP 定量法は微好気培養より菌数が少なくなる傾向が認められたが、大量培養に比べて雑菌の影響を受けにくいことが判明した。

Bolton 増菌培地使用時の温度シフトの必要性は認められなかった。また Bolton 増菌培地からのカンピロバクター分離には、選択性の高い Butzler 培地の方が検出率が高かった。しかし *C.coli* が mCCDA 培地でのみ検出されたことから、発育菌種を問題とする検査においては、選択性の弱い mCCDA 培地と選択性の高い Butzler 培地の併用が必要であると考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし



表1 実験1

検体 No.	×5乳剤 (鶏肉25g、100mL Preston増菌培地)						×10乳剤 (鶏肉25g、225mL Preston増菌培地)						
	微好気培養			好気培養			微好気培養			好気培養			
	定量		MPN (cfu/100g)	定量		Campylobacterの発育状況 colony数 (雑菌発育状況)	定量		MPN (cfu/100g)	定量		Campylobacterの発育状況 colony数 (雑菌発育状況)	
MPN 3本法	10 1 0.1	MPN 3本法	10 1 0.1	MPN 3本法	10 1 0.1	MPN 3本法	10 1 0.1	MPN 3本法	10 1 0.1	MPN 3本法	10 1 0.1	MPN (cfu/100g)	定性: 大量培養
1	3 3 3	>5500	3 3 3	>5500	+++	Cjejuni	3 3 0	2400	3 2 3	2900	++	Cjejuni	
2	2 2 0	105	1 0 0	18	+	Cjejuni (雑菌多数)	2 0 1	140	0 0 0	<30	+	Cjejuni (雑菌多数)	
3	1 1 0	37	1 0 0	18	+++	Cjejuni	2 1 0	150	1 0 0	36	++	Cjejuni	
4	3 3 0	1200	3 2 0	465	+++	C.coli	3 1 0	430	1 0 0	36	+++	C.coli: 2* Cjejuni: 1*	
5	2 1 0	75	1 1 0	37	++	Cjejuni	1 1 0	74	1 0 0	36	++	Cjejuni	
6	3 3 1	2300	3 2 2	1050	+++	Cjejuni	3 3 1	4600	3 3 1	4600	+++	Cjejuni	
7	0 0 0	<15	1 0 0	18	+	Cjejuni (雑菌多数)	0 0 0	<30	0 0 0	<30	+	Cjejuni	
8	0 0 0	<15	0 0 0	<15	+少数	Cjejuni	0 0 0	<30	0 0 0	<30	-		
9	1 1 0	37	2 1 1	100	-	Cjejuni (雑菌多数)	3 0 0	230	1 0 0	36	-	Cjejuni (雑菌多数)	
10	3 3 1	2300	2 2 1	140	-	Cjejuni (雑菌多数)	3 2 1	1500	3 1 0	430	+++	Cjejuni	

\*数字はコロニー数

表 2 実験 2

-20°C 7日間保存鶏肉 25g Bolton x 5 乳剤												
検体 No.	培養温度「シフト有り」						培養温度「シフト無し」					
	24h 培養		48h 培養		24h 培養		48h 培養		24h 培養		48h 培養	
	CCDA Campylo- bacter 発育	Butzler Campylo- bacter 発育	CCDA Campylo- bacter 発育	Butzler Campylo- bacter 発育	CCDA Campylo- bacter 発育	Butzler Campylo- bacter 発育	CCDA Campylo- bacter 発育	Butzler Campylo- bacter 発育	CCDA Campylo- bacter 発育	Butzler Campylo- bacter 発育	CCDA Campylo- bacter 発育	Butzler Campylo- bacter 発育
1	-	有 + <i>C.jejuni</i>	-	+++	+	-	+++	無 <i>C.jejuni</i>	+++	無 <i>C.jejuni</i>	+++	-
2	-	有	-	+++	-	+	+++	有	-	有	-	+
3	-	有	-	+++	-	+++	+++	無	-	無	-	-
4	++ <i>C.coli</i>	-	+++	-	+++	-	+++	有 <i>C.jejuni</i>	+++	無 <i>C.jejuni</i>	++	+
5	-	有	-	+++	-	+	+++	有	-	有	-	+
6	-	有 + <i>C.jejuni</i>	-	+++	+	+	+++	無 <i>C.jejuni</i>	+++	無 <i>C.jejuni</i>	+++	-
7	-	有	-	+++	-	+	+++	有	-	有	-	+
8	-	無	-	-	-	-	-	無	-	無	-	-
9	-	有	-	+++	-	++	+++	有	-	有	-	++
10	-	有	-	+++	-	-	+++	有	-	有	-	+

細菌性食中毒の予防に関する研究  
鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究  
-気密性袋を用いた好気培養法による定量・定性検査法の有効性評価-

協力研究者 石村勝之 吉野谷 進 下村 佳 古田喜美 国井悦子  
谷口正昭 萱島隆之 笠間良雄 松本 勝 荻野武雄  
（広島市衛生研究所 生物科学部）

## 研究要旨

鶏肉からのカンピロバクター検出においては、検査方法の違いにより検出率が大きく異なることが指摘されている。従って、本邦の鶏肉におけるカンピロバクターのリスクアセスメントを行うためには、標準化された信頼性の高い定量あるいは定性検査法の設定が必要である。今回、標準化に向けての協力研究として、気密性袋を使用した好気培養法の有効性について、増菌培地希釈倍率の影響および微好気培養法との比較検討を行った。

気密性袋を用いた好気培養法において、大量培養法は×5希釈で80%（8/10）、×10希釈で60%（6/10）の陽性率を、MPN法は×5希釈で90%（9/10）、×10希釈で100%（10/10）と高率に本菌を検出できた。微好気培養と好気培養のMPN定量性の比較では、×5希釈では、微好気培養の方が高MPN値を示す割合が高かった。一方、×10希釈では、好気培養の方が高MPN値を示す割合が高かった。

以上の結果、気密性袋を使用した好気培養法は、定性的には大量培養およびMPN法とも微好気培養法と同等の検出率がみられることから、本菌の培養検出に使用できると考えられた。一方、MPN法による定量性についても有効性が示唆されたが、希釈倍率および好気・微好気の培養条件による差異については、さらに検討が必要と考えられた。

## A. 研究目的

鶏肉からのカンピロバクター分離においては、検査方法の違いにより検出率が大きく異なることが指摘されている。わが国では、現在必ずしも統一的に普及した標準的検査法が確立していないことから、本菌のリスクアセスメントに必要な、生産から摂取段階において信頼性の高い定量および定性データの生成が行え、今後広く普及・使用される標準的検査法の検討が必要である。

今回、標準化に向けての検討課題への研究協力として、気密性袋を使用した好気培養法について微好気培養法と比較し、その有効性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試料

平成17年7月～12月に採取した下記試料計26検体を供試した。

（1）実験1：スーパー等で店頭購入したパック詰鶏

皮付モモ肉10検体

（2）調査：収去鶏皮付モモ肉16検体（食肉処理業および食肉販売業で合成樹脂製袋詰原料（未開封品）から無菌的に採取したもの）

## 2. 方法

### （1）実験1

研究班統一の方法により行った。鶏皮付モモ肉試料を気密性袋2袋に各々25gずつ採取し、Preston培地（Oxoid）100mlおよび225mlを加えて30秒間ストマッキングし、均一化した。（×5希釈液および×10希釈液の作製）。各希釈液について、10mlを6本の空試験管、1ml、0.1mlを各6本のPreston培地10ml加試験管に接種し、各系列3本計9本を42℃、24時間、ガスパック培養（微好気培養法）と気密性袋密封培養（好気培養法）により増菌培養した。その一金耳（10μL）をmCCDA培地（Oxoid）に塗布し、42℃、48時間微好気培養し、陽性本数からMPN値を求めた。試験管に分注した残液袋を出来る限り空気を除き、シーラー

で密封後、同様に好気培養し、大量培養とした。

## (2) 調査

収去鶏皮付モモ肉試料 25g を気密性袋に採取し、Preston 培地 100ml にて5倍希釈し、実験1と同様に分注した試験管各9本を微好気および好気培養するとともに、シールした残液袋を好気大量培養後、分離培地としてmCCDAおよびButzler培地を用いてMPN定量値と定性結果を比較した。

## C. 研究結果および考察

### 1. 実験1

#### (1) 大量培養法

気密性袋を用いた好気培養法による大量培養では、×5希釈試料で80% (8/10)、×10希釈試料で60% (6/10)の陽性率であった。

#### (2) MPN 定量法

×5希釈試料の微好気培養によるMPN値は<15~>5500 MPN/100g (9/10)、好気培養では<15~2300 MPN/100g (9/10)であった。微好気培養および好気培養の比較では、微好気培養の方が、高MPN値を示す割合が高かった (8/10)。

×10希釈試料の微好気培養法によるMPN値は<30~4600 MPN/100g (9/10)、好気培養法では36~11000 MPN/100g (10/10)であった。微好気培養および好気培養の比較では、好気培養が、高MPN値を示す割合が高かった (7/10)。

### 2. 調査

#### (1) 大量培養法

×5希釈試料による大量培養(好気培養法)では、mCCDA培地で陽性率50% (8/16)、Butzler培地で44% (7/16)を示した。

#### (2) MPN 定量法

×5希釈試料によるMPN法(微好気培養法)では、mCCDA培地、Butzler培地とも陽性率81% (13/16)を示し、MPN値は<15~>5500 MPN/100gであった。

×5希釈試料によるMPN法(好気培養法)では、mCCDA培地で陽性率69% (11/16)、Butzler培地で65% (10/16)を示し、MPN値は<15~>5500 MPN/100gであった。

微好気および好気培養法のMPN定量値の比較では、微好気培養法が高値あるいは同値を示すものが81% (13/16)であった。一方、好気培養法は50% (8/16)で

あり、微好気培養法の方が高値あるいは同値を示す場合が多かった。

以上の結果から、気密性袋を用いた好気培養による大量培養法およびMPN法でも、高率にカンピロバクターが検出されたことから、本袋を使用すれば、必ずしも微好気培養を行わなくともPreston培地中でのカンピロバクターの増殖が可能なが認められた。

培地希釈率に関しては、×5希釈を用いた気密性袋による大量培養法は×10希釈と同等以上の陽性率を示し、×5希釈を用いたMPN法は、微好気および好気培養とも×10希釈と同等の陽性率およびMPN値を示した。この結果から、×5希釈による大量培養法は、×10希釈を用いた基本的な培養方法と同様にカンピロバクター定性検査に使用可能と考えられた。一方、気密性袋を用いた×5希釈によるMPN定量法は、大量培養法と比較して同等以上の検出率を示したことから、操作量は増えるものの、定量値が得られるとともに、必要培地量が大幅に削減できるメリットもあることから、定性法としても有用性が示された。

MPN法による定量値の比較では、×5希釈での微好気培養によるMPN法は、好気培養法によるMPN法より高MPN値を示す割合が高く、×10希釈のMPN法では逆の傾向がみられたことから、希釈倍率と微好気および好気培養間でのMPN値に関する差異傾向についてはさらに検討が必要と考えられるが、そのMPN値は95%信頼限界の下限および上限域に互いにオーバーラップするものも多かったことから、気密性袋を用いたMPN定量検査法の有用性が示唆された。

## D. 結論

1. 気密性袋を用いた×5希釈試料による大量培養法は、カンピロバクター定性検査に使用可能と考えられた。
2. 気密性袋を用いた×5希釈試料によるMPN定量法は、大量培養法と比較して同等あるいはそれ以上の検出感度を示し、定性検査としても有用と考えられた。
3. 気密性袋を用いた×5希釈によるMPN定量法では、微好気培養法に比較して、陽性率および定量値が低くなる傾向がみられたことから、さらに検討が必要と考えられた。

## E. 研究発表